

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390168

研究課題名（和文） 抗結核剤の副作用発現を予測できる遺伝子診断システムの確立

研究課題名（英文） Establishment of DNA-based diagnosis for detecting tuberculosis patients with anti-tuberculosis drug-induced side effects

研究代表者

塚元 和弘 (TSUKAMOTO KAZUHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30253305

研究成果の概要：抗結核剤を服用した肺結核患者 100 例を、副作用（肝障害、皮疹、薬剤熱、好酸球増多症）の有無で副作用発現群と非発現群に分け、両群間で候補遺伝子多型の出現頻度を有意差検定する「相関解析研究」を行った。抗結核剤の薬剤性肝障害感受性遺伝子として *NAT2*, *CYP1A1*, *iNOS*, *Bach1* および *Crml* を同定した。同様に、薬剤性肝障害抵抗性遺伝子として *GSTP1* を、薬剤性皮疹感受性遺伝子として *CYP1A2*, *iNOS* および *Bach1* を、薬剤熱感受性遺伝子として *iNOS* と *Nrf2* を、薬剤熱抵抗性遺伝子として *GSTP1* と *SOD1* を、薬剤性好酸球増多症感受性遺伝子として *CYP1A2* を、そして薬剤性好酸球増多症抵抗性遺伝子として *iNOS*, *TXNIP* および *IL-1β* を同定した。

次に、相関を認めた遺伝子多型をバイオマーカーとして用い、副作用を予測できる遺伝子診断法を検索した。検査法として感度・特異度・オッズ比および *P* 値のバランスが最も良かったバイオマーカーの組み合わせは、薬剤性肝障害の予測には「*iNOS* + *Crml*」が、薬剤性皮疹の予測には「*iNOS* + *Bach1*」が、薬剤熱の予測には「*iNOS* + *Nrf2*」が有用であった。今後もバイオマーカーの解析を継続し、感度と特異度が共に 100% に近く、オッズ比が 20 以上で、かつ *P* 値が 0.001 以下のバイオマーカーを用いた遺伝子診断法を確立して臨床応用する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ファーマコゲノミクス

1. 研究開始当初の背景

結核は現在世界的に注目されている再興感染症の一つである。我が国では、生活水準

の向上や有効な抗結核薬の開発により罹患率も死亡率も順調に低下した。しかし、平均寿命の延長に伴う高齢者結核の再燃・再発、

エイズの流行による結核患者の増加、および多剤耐性結核菌の出現や抗結核薬による副作用の発現などによる治療抵抗性あるいは難治性の患者が増加してきた。また若年発症の粟粒結核患者も増えていることから、1999年7月に「結核緊急事態宣言」が発表された。

結核は感染後の発病やその後の進展のみならず、抗結核剤の治療効果や副作用（肝障害、皮疹、薬剤熱、末梢神経炎、好酸球増多症、高尿酸血症など）の発現にも個人差を認める。発病・進展および治療効果には結核菌の要因と宿主側の要因の両者が寄与しているが、副作用の発現には抗結核剤に対する宿主側の要因が主に起因している。

抗結核剤の種類は極めて少なく、治療上その他の治療薬を選択する余地がない。つまり、必ずイソニアジドとリファンピシンを含む3剤（もう一剤はエタンブトールかストレプトマイシン）、あるいは4剤（さらに追加する一剤はピラジナミド）で6ヶ月～9ヶ月間治療が行われる。しかし、治療中に副作用が発現すると抗結核剤の中断や中止を余儀なくされる。ある期間休薬後に減感作療法として少量より同じ抗結核剤を再投与する。そして副作用の再発がないことを確認しながら増量する。もし、また副作用が発現すると減量せざるを得ない。このように投与と中止を繰り返すために治癒の遷延を招き、時に耐性結核菌が出現して難治性になり、不幸な転帰となる。これらを回避するためにも、副作用にかかわる宿主側の要因を明らかにすることで、抗結核剤の種類とその使用量を適切に選択でき、途中で中断することのない安全で長期治療が可能となる。最終的には治療効果と患者のQOLの向上に貢献できると思われる。

抗結核剤の副作用を起しやすき要因を解明する臨床研究が多くなされており、既に判明している危険因子（環境因子）として、高齢者、女性、やせ、HBs抗原陽性、抗HCV抗体陽性、HIV陽性、肝疾患の既往、飲酒、低アルブミン血症が報告されている。一方、遺伝因子としては、*N*-acetyltransferase 2 (*NAT2*)、Cytochrome P450 2E1 (*CYP2E1*)、Glutathione *S*-transferase M1 (*GSTM1*)、HLA-DQA1、HLA-DQB1などの遺伝子多型と副作用との相関が報告されている。しかし、欧米人と日本人間でも、あるいは他のアジア諸国の人と日本人間でも、必ずしも遺伝子多型と副作用発現との相関解析の結果が一致するとは限らない。また、一塩基多型 single nucleotide polymorphisms (SNPs)やSNPsの組み合わせであるハプロタイプの多型との相関解析の報告も少ないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、抗結核薬で治療した肺結核患

者を、治療中に副作用が発現した群と非発現群に分ける。そして、両群間で候補遺伝子多型の出現頻度を比較する相関解析の手法を用いて、副作用感受性遺伝子あるいは抵抗性遺伝子を複数同定した。

次に、同定した感受性遺伝子多型が副作用の発現を予測できるバイオマーカーとなり得るかを検証した。最終的には、このバイオマーカーを組み合わせて、高感度でかつ高特異度に副作用の発現を予測できる遺伝子診断システムを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 長崎大学附属病院呼吸器内科およびその関連病院で、抗結核剤（イソニアジドとリファンピシンを含む）で治療した肺結核患者を対象とした。文書によるインフォームド・コンセントを行い、同意の得られた患者100名を本研究に登録し、試料（血液）を提供して頂いた。倫理委員会の承認を得ている。

(2) 同意の得られた患者の診療記録より、臨床症状、合併症の有無、肝炎ウイルス感染の有無、治療前と治療中の検査データ、治療薬、治療歴および副作用（肝障害・皮疹・薬剤熱・好酸球増多症）などの臨床情報を収集した。

(3) 情報管理者により匿名化された血液からDNAを抽出した。

(4) JSNPおよびInternational HapMapのデータベースから36個の候補遺伝子のSNPsの多型情報を入手した。候補遺伝子として、①抗結核剤の代謝や解毒に関与する遺伝子群 (*NAT2*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2E1*, *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *NQO1*)、②代謝の過程で肝細胞内で発生する過酸化酸素に対する抗酸化酵素とその発現に関与する遺伝子群 (*HMOX1*, *iNOS*, *Nrf2*, *Keap1*, *Bach1*, *Crml*, *TBP2*, *MafF*, *MafG*, *MafK*)、③炎症性サイトカインに関与する遺伝子群 (*IL-1 β* , *IL-4*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-13*, *TNF- α*)、④その他の遺伝子群 (*NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *RelA*, *RelB*, *cRel*, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*)に着目した。

(5) 候補遺伝子内に存在するすべてのSNPsから、HaploviewあるいはiHapソフトウェアを用いて多型解析を行うtag SNPsを選出した。次に、各tag SNPの多型情報を用いて、それぞれの多型領域を挟むようにPCR用のprimer pairsを作製した。

(6) PCR産物を制限酵素で切断し、切断の有無で多型の有無を判断するPCR-制限酵素断片長多型(RFLP)法か、PCR産物の塩基配列を

を直接決定する PCR-DNA シークエンス法で tag SNPs の多型を決定した。

(7) 患者の臨床情報と SNP 多型間で相関解析を行った。各候補遺伝子ごとに、副作用（肝障害・皮疹・薬剤熱・好酸球増多症）発現群と非発現群間で SNPs 多型の出現頻度を有意差検定（ χ^2 乗検定法とロジスティック回帰分析）することで、抗結核剤による副作用感受性遺伝子を同定した。

(8) 同定した候補遺伝子多型を複数組み合わせさせたもの（多変量解析を行い、組み合わせさせた各多型がお互いに独立していることを検証した後に）をバイオマーカーとして用いて、抗結核剤の副作用の発現を予測できる遺伝子診断法であるかを検証した。高感度で、高特異度、かつ高オッズ比（相対的危険を意味する）のバイオマーカーの組み合わせを検索し、同時に P 値が 0.01 以下で強い相関を示す検査法として有用であるかを評価した。

4. 研究成果

(1) 患者の臨床情報の解析

100 名の結核患者が本研究に登録された。平均年齢は 64.0 ± 17.4 歳で、男性 56 名、女性 44 名であった。病側は両側肺野が 52 例、片側肺野が 42 例、肺野外が 6 例であった。病型分類では I 型が 4 例、II 型が 26 例、III 型が 61 例、IV 型が 1 例、不明が 8 例であった。合併症を持っている患者は 67 名で、その内訳のべ数は、糖尿病 23 例、高血圧 13 例、アルコール性肝障害 7 例、気管支喘息 6 例、C 型慢性肝炎 5 例、塵肺 4 例、慢性関節リウマチ 3 例、肺気腫 3 例、慢性腎不全 2 例、陳旧性心筋梗塞 2 例、痛風 2 例、脳梗塞後遺症 2 例、肺癌 2 例、胃潰瘍 2 例であった。その他の合併症として、B 型慢性肝炎、間質性肺炎、クローン病、十二指腸潰瘍、ネフローゼ症候群、慢性腎炎、鉄欠乏性貧血、パーキンソン病、甲状腺機能低下症であった。

抗結核剤は、イソアジド (INH)、リファンピシン (RFP)、エタンブトール (EB)、ピラジナミド (PZA)、ストレプトマイシン (SM) およびレボフロキサシンであった。その使用頻度は、INH と RFP は全例で使用されており、その他では EB 69 例、PZA 64 例、SM 28 例、レボフロキサシン 1 例であった。INH、RFP に EB あるいは SM を加えた 3 剤併用療法は 33 例 (EB29 例、SM4 例) で、同 3 剤併用療法に治療開始 2 ヶ月間のみ PZA を併用する 4 剤併用療法は 63 例 (EB39 例、SM24 例) であった。INH と RFP の 2 剤併用のみが 3 例、4 剤併用療法にレボフロキサシンを加えた 5 剤併用が 1 例であった。

(2) 抗結核剤の副作用情報の解析

100 例のうち 82 例に副作用を認めた。その内訳のべ数は、好酸球増多症 34 例、皮疹 25 例、肝障害 18 例、薬剤熱 15 例、その他の副作用が 14 例であった。その他とは、めまい・ふらつきなどの平衡障害、末梢神経炎、視神経障害、高尿酸血症、難聴、白血球減少症、薬剤性肺炎、血小板減少症、嘔気・嘔吐であった。

副作用を認めた 82 例中 41 例 (50%) で副作用のため抗結核薬の投与が中止されていた。肝障害は全例で中止となり、皮疹では 25 例中 13 例 (52%)、薬剤熱では 15 例中 3 例 (20%) で中止となった。その他では、平衡障害や嘔気・嘔吐、血小板減少症などで投与中止となった。好酸球増多症のみを理由として中止した例はなかった。

複数の副作用を認めた症例の特徴は、

- ① 肝障害を発現した結核患者は、発現しなかった患者と比べて、皮疹 ($P = 0.003$) や薬剤熱 ($P = 0.027$) を伴いやすかった。
- ② 皮疹の出た結核患者は、好酸球増多症 ($P = 0.003$) や薬剤熱 ($P = 0.010$) を併発しやすかった。
- ③ 薬剤熱の出た結核患者は、皮疹や肝障害を併発しやすかった。
- ④ 病側や病型分類で、また合併症の有無で副作用の発現率に有意差はなかった。であったことから、副作用の発現には抗結核剤の肝細胞内蓄積だけでなく、一部アレルギーが関与していることが推察された。

(3) 抗結核剤の薬剤性肝障害感受性遺伝子

- ① *NAT2* の slow acetylator の患者は約 9.8 倍肝障害を起こしやすかった。 ($P = 0.002$, オッズ比 (OR) = 9.75)
- ② *NAT2* の *NAT2*6A/*7B* をもつ患者は、もたない患者と比べて、8 倍肝障害を起こしやすかった。 ($P = 0.029$, OR = 8.00)
- ③ *CYP1A1* の rs4646421 SNP で C/C genotype をもつ患者は約 3 倍肝障害を起こしやすかった。 ($P = 0.033$, OR = 3.02)
- ④ *iNOS* の rs11080344 SNP で C/C genotype をもつ患者は約 2.9 倍肝障害を起こしやすかった。 ($P = 0.044$, OR = 2.87)
- ⑤ *Bach1* の rs2070401 SNP で C/C genotype をもつ患者は約 16 倍肝障害を起こしやすかった。 ($P = 0.018$, OR = 16.2)
- ⑥ *Crm1* の rs11125883 SNP で A/A genotype をもつ患者は 3.2 倍肝障害を起こしやすかった。 ($P = 0.026$, OR = 3.20)

以上から、抗結核剤の薬剤性肝障害感受性遺伝子は *NAT2*, *CYP1A1*, *iNOS*, *Bach1* および *Crm1* であった。

(4) 抗結核剤の薬剤性肝障害抵抗性遺伝子

- ① *GSTP1* の rs6591256 SNP で A/A genotype

をもつ患者は約 2.8 倍肝障害を起こしにくかった。(P = 0.049, OR = 0.35)
以上から、抗結核剤の薬剤性肝障害抵抗性遺伝子は *GSTP1* であった。

(5) 抗結核剤の薬剤性皮疹感受性遺伝子

- ① *CYP1A2* の rs762552 SNP で C/C genotype をもつ患者は皮疹を起こしやすかった。(P = 0.019)
- ② *iNOS* の rs12944039 SNP で A/A genotype をもつ患者は約 10 倍皮疹を起こしやすかった。(P = 0.047, OR = 10.1)
- ③ *Bach1* の rs2070401 SNP で C/C genotype をもつ患者は約 10 倍皮疹を起こしやすかった。(P = 0.047, OR = 10.1)

以上から、抗結核剤の薬剤性皮疹感受性遺伝子は *CYP1A2*, *iNOS* および *Bach1* であった。

(6) 抗結核剤の薬剤熱感受性遺伝子

- ① *iNOS* の rs944722 SNP で T/T genotype をもつ患者は約 4.3 倍薬剤熱を起こしやすかった。(P = 0.027, OR = 4.29)
- ② *iNOS* の rs2314810 で G/G genotype をもつ患者は約 5.8 倍薬剤熱を起こしやすかった。(P = 0.021, OR = 5.78)
- ③ *iNOS* の rs11080344 SNP で C/C genotype をもつ患者は約 3.7 倍薬剤熱を起こしやすかった。(P = 0.042, OR = 3.67)
- ④ *iNOS* の rs12944039 SNP で A/A genotype をもつ患者は 21 倍薬剤熱を起こしやすかった。(P = 0.010, OR = 21.0)
- ⑤ *Nrf2* の rs6726395 SNP で A/A genotype をもつ患者は約 4.8 倍薬剤熱を起こしやすかった。(P = 0.014, OR = 4.81)

以上から、抗結核剤の薬剤熱感受性遺伝子は *iNOS* と *Nrf2* であった。

(7) 抗結核剤の薬剤熱抵抗性遺伝子

- ① *GSTP1* の rs6591256 SNP で A/A genotype をもつ患者は約 3 倍薬剤熱を起こしにくかった。(P = 0.048, OR = 0.33)
- ⑥ *SOD1* の rs1041740 SNP で C/C genotype をもつ患者は約 4.1 倍薬剤熱を起こしにくかった。(P = 0.030, OR = 0.24)

以上から、抗結核剤の薬剤熱抵抗性遺伝子は *GSTP1* と *SOD1* であった。

(8) 抗結核剤の薬剤性好酸球増多症感受性遺伝子

- ① *CYP1A2* の rs762552 SNP で A/A genotype を持つ患者は約 3 倍好酸球増多症を起こしやすかった。(P = 0.011, OR = 3.01)
- 以上から、抗結核剤の薬剤性好酸球増多症感受性遺伝子は *CYP1A2* であった。

(9) 抗結核剤の薬剤性好酸球増多症抵抗性遺伝子

- ① *iNOS* の rs12944039 SNP で G/G genotype をもつ患者は約 2.3 倍好酸球増多症になりにくかった。(P = 0.048, OR = 0.43)
 - ② *TXNIP* の rs7211 SNP で T/T genotype をもつ患者は好酸球増多症を起こしにくかった。(P = 0.048)
 - ③ *IL-1β* の rs1143643 SNP で A/A genotype をもつ患者は約 6.7 倍好酸球増多症を起こしにくかった。(P = 0.001, OR = 0.15)
- 以上から、抗結核剤の薬剤性好酸球増多症抵抗性遺伝子は *iNOS*, *TXNIP* および *IL-1β* であった。

(10) 抗結核剤の副作用の発現を予測できる遺伝子診断法の有用性の評価

〈薬剤性肝障害の予測〉

- ① 検査法として感度・特異度・オッズ比 (相対的危険度) および P 値のバランスが最も有用であった遺伝子多型の組み合わせ (バイオマーカー) は「*iNOS* + *Crml1*」であり、感度=44.4%とやや低かったが、特異度=91.5%で、オッズ比=8.57 (つまり、8.57 倍なりやすいことを意味する) と共に高く、そして P 値=0.000112 と強い相関を認めた。
- ② 次に有用であった組み合わせは「*CYP1A1* + *Crml1*」で、感度・特異度・オッズ比および P 値は、それぞれで 33.3%, 91.5%, 5.36, および 0.0046 であった。
- ③ 最もオッズ比が高かった組み合わせは「*iNOS* + *Crml1* + *MafK*」で (オッズ比=16.2), また特異度=98.8%と共に高かったが、感度=16.7%と低く、P 値=0.0178 と相関も弱かったのが難点であった。

〈薬剤性皮疹の予測〉

薬剤性皮疹の発現を予測できるバイオマーカーの組み合わせは「*iNOS* + *Bach1*」が最も有用であった。感度・特異度・オッズ比および P 値は、それぞれで 24.0%, 97.3%, 11.53, および 0.00028 であった。

〈薬剤熱の予測〉

薬剤熱の発現を予測できるバイオマーカーの組み合わせは「*iNOS* + *Nrf2*」が最も有用であった。感度・特異度・オッズ比および P 値は、それぞれで 33.3%, 94.1%, 8.00, および 0.0063 であった。

今後もバイオマーカーの解析を継続し、感度と特異度が共に 100%に近く、オッズ比が 20 以上で、かつ P 値が 0.001 以下のバイオマーカーを用いた遺伝子診断法を確立して臨床応用する。そして、結果のすべてを英語論文にまとめて、英語雑誌や当研究室のホームページで公表する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Higuchi N, Tahara N, Yanagihara K, Fukushima K, Suyama N, Inoue Y, Miyazaki Y, Kobayashi T, Yoshiura K, Niikawa N, Wen C-Y, Isomoto H, Shikuwa S, Mizuta Y, Kohno S, Tsukamoto K. A haplotype, NAT2*6A, of the N-acetyltransferase 2 gene is an important biomarker for a risk of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Japanese patients with tuberculosis. *World J Gastroenterol* 13(45):6003-6008, 2007.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 田原尚子, 小島三枝, 樋口則英, 小林 奨, 塚元和弘. 抗結核薬の副作用感受性遺伝子の同定. 第 52 回日本薬学会九州支部総会 2006, 12/9-10 (熊本)
- ② 稲嶺達夫, 飯尾直美, 田原尚子, 樋口則英, 小林 奨, 塚元和弘. 抗結核薬の副作用と小 Maf 群遺伝子多型との相関解析. 日本薬学会第 127 年会 2007, 3/28-30 (富山)
- ③ 柳原克紀, 田原尚子, 稲嶺達夫, 樋口則英, 小林 奨, 関 雅文, 泉川公一, 大野秀明, 宮崎義継, 平潟洋一, 塚元和弘, 河野 茂. 結核患者における肝障害発現と ROS 関連遺伝子多型との相関解析. 第 47 回日本呼吸器病学会 2007, 5/10-12 (東京)
- ④ 馬渡 力, 吉田真里子, 樋口則英, 塚元和弘. *iNOS* 遺伝子は抗結核剤による肝障害感受性遺伝子である. 日本薬学会第 128 年会 2008, 3/26-28 (横浜)
- ⑤ 馬渡 力, 藤江祥子, 吉田真里子, 樋口則英, 塚元和弘. 抗結核薬による好酸球増多症感受性遺伝子の同定. 第 16 回医療薬学フォーラム 2008, 7/12-13 (東京)
- ⑥ Mawatari T, Fujie S, Yoshida M, Higuchi N, Kondo S, Tsukamoto K. Polymorphisms of *iNOS* are associated with anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity in Japanese patients with tuberculosis. 58th American Society of Human Genetics Annual Meeting 2008, 11/11-15 (in Philadelphia, USA).
- ⑦ 馬渡 力, 藤江祥子, 吉田真里子, 樋口則英, 近藤新二, 塚元和弘. *GSTP1* 遺伝子は抗結核剤による肝障害感受性遺伝子である. 第 29 回日本臨床薬理学会年会 2008, 12/4-6 (東京)
- ⑧ 馬渡 力, 藤江祥子, 吉田真里子, 樋口則英, 近藤新二, 塚元和弘. *Xpo1* 遺伝子は抗結核剤による肝障害感受性遺伝子であ

る. 日本薬学会第 129 年会 2009, 3/26-28 (京都)

- ⑨ 吉田真里子, 藤江祥子, 馬渡 力, 樋口則英, 近藤新二, 塚元和弘. *SOD1* 遺伝子は抗結核薬の副作用感受性遺伝子である. 日本薬学会第 129 年会 2009, 3/26-28 (京都)
- ⑩ Tsukamoto K. DNA-based diagnosis for personalized medicine. 2nd Asian Symposium on Pharmaceutical Sciences in Nagasaki 2009, 3/16-18 (in Nagasaki, Japan).

[その他] (計 2 件)

- ① 学会発表の番号 8 の「馬渡 力, 藤江祥子, 吉田真里子, 樋口則英, 近藤新二, 塚元和弘. *Xpo1* 遺伝子は抗結核剤による肝障害感受性遺伝子である. 日本薬学会第 129 年会 2009, 3/26-28 (京都)」は, 日本薬学会が厳選して一般市民用に公開している「ハイライトポスター賞」に選ばれ, 一般市民向けに研究成果を公表した。
- ② 研究成果を当研究室のホームページに公開している。
http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/research/rsh_mt.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚元 和弘 (TSUKAMOTO KAZUHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 30253305

(2) 研究分担者

早田 宏 (SODA HIROSHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員
研究員
研究者番号: 60244042

(3) 研究協力者

柳原 克紀 (YANAGIHARA KATSUNORI)
長崎大学・長崎大学附属病院・講師
研究者番号: 40315239
稲嶺 達夫 (INAMINE TATSUO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 00549628
樋口 英則 (HIGUCHI HIDENORI)
田原 尚子 (TAHARA NAOKO)
馬渡 力 (MAWATARI TSUTOMU)
吉田 真里子 (YOSHIDA MARIKO)
藤江 祥子 (FUJIE SYOKO)
中浦 彩乃 (NAKAURA AYANO)