

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07808

研究課題名（和文）小児ワルファリン至適投与量予測モデルの作成：検証的な多施設共同前方視的観察研究

研究課題名（英文）PHARMACOGENOMIC STUDY TO PREDICT WARFARIN STABLE DOSE IN JAPANESE CHILDREN

研究代表者

小林 徹（Kobayashi, Tohru）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臨床研究センター・部門長

研究者番号：50431713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：日本人小児におけるワルファリン視的投与量予測モデルを開発するため、多施設共同前方視的コホート研究を実施した。123名が本研究の解析対象として収集された。ワルファリン至適投与量に関連していた遺伝子多型はVKORC1のみであった。ルート変換したワルファリン至適投与量（mg/day）を結果変数とし、VKORC1遺伝子多型の有無、身長、目標PT-INRの3種類を説明変数としたモデルが最良の予測性能を示していた（自由度調整済みR二乗 0.728）。記法モデルと比較した結果、L1 errorおよびL2 errorは最も小さく今回作成したモデルが最良の予測性能を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血栓予防に用いられる古典的な薬剤であるワルファリンは適切な投与量設定が困難であることが知られていません。今回、日本人小児における新たなワルファリン至適投与量予測モデルを作成しました。モデルにはVKORC1の遺伝子多型、身長、目標PT-INRが選ばれ、今まで報告された予測モデルと比較してもより正確な値が得られることが本研究により明らかとなりました。今後、より適切なワルファリンの使用が進むことが期待されます。

研究成果の概要（英文）：A multicenter prospective cohort study was conducted to develop a model for predicting the warfarin stable dose in Japanese children. A total of 123 patients were enrolled in the study. VKORC1 is the only SNPs associated with warfarin stable dose. To predict square root-transformed warfarin stable dose (mg/day) as the outcome variable, the presence of VKORC1 polymorphism, height, and target PT-INR were the independent variables which showed the best predictive performance (degree of freedom-adjusted R-squared 0.728). In comparison with previously reported models, the present model showed the best predictive performance with the smallest L1 error and L2 error.

研究分野：小児科

キーワード：ワルファリン VKORC1 至適投与量 身長 目標PT-INR 予測モデル

## 1. 研究開始当初の背景

ミレニアムプロジェクト以降、個人の遺伝情報に基づいた個別化医療が推進されてきた。北米では Clinical Pharmacogenetic Implementation Consortium (CPIC) が US Food and Drug Administration (FDA) と共同で薬理遺伝学の臨床応用を推進しており、一部は既に臨床応用されているが、日本はいまだ発展途上である。

ワルファリンは血栓塞栓症の治療や予防に使用される抗凝固薬であり、2011年2月に公知申請によって本邦でも小児の用法・用量が追加承認された。ワルファリンは小児循環器疾患患者、主に Fontan 手術後や人工弁置換後の患者で幅広い年齢層に使用されている。添付文書には小児のワルファリン維持投与量として、12ヶ月未満 0.16 mg/kg/日、1歳以上15歳未満 0.04~0.10 mg/kg/日の目安が示されている。従来からワルファリンの至適投与量には大きな個人差があるため、初期投与量の推測が困難な薬物の一つとされている。不安定なコントロールによって生じる重篤な出血や血栓の形成は患者の生命予後や QOL の悪化に直結するため、臨床医には慎重な投与量の調整を行っている。

ワルファリンの標的分子はビタミン K 依存性凝固因子の生成に関与するビタミン K エポキシド還元酵素 (VKORC1) であり、生体内で薬理作用を示す S 体ワルファリンの主な代謝酵素はチトクローム P450 2C9 (CYP2C9) である。成人領域では 2000 年前後から VKORC1 と CYP2C9 の遺伝子多型がワルファリン至適投与量や重篤な出血イベントの発生に寄与することが相次いで報告されるようになった。2007年に米国 FDA はワルファリン添付文書にワルファリン投与量に影響する因子として CYP2C9 と VKORC1 の遺伝子多型に関する情報を追加し、同時に両遺伝子検査キットを承認した。成人ではワルファリン至適投与量を予測するための基準は複数開発されている。一方で小児における薬理遺伝学情報に基づくワルファリンの至適投与量決定に関し、定まった見解は存在しない。Nowak-Gottl らは初の小児患者のみのデータを 2011年に報告し、遺伝子多型ではなく年齢が最もワルファリン投与量に関連する因子であることを示した (Blood 2011)。一方 Moreau らは身長と VKORC1 の遺伝子多型が、Biss らは身長と CYP2C9・VKORC1 の遺伝子多型がワルファリン投与量に関連する因子であることを報告した (ともに Blood 2012)。その後も小規模研究が複数公表されているものの、現時点では小児領域において遺伝子多型とワルファリン至適投与量の関連に一定の見解は存在しない。

我々は小児のワルファリン投与量と遺伝子多型の関連を検証する目的で系統的レビューメタ解析を実施した。その結果、小児においても CYP2C9、VKORC1 の遺伝子多型はワルファリン至適投与量と関連することが示された。しかしこれらの研究はすべて観察型研究であり、患者背景 (人種、年齢、目標 PTINR、基礎疾患、併用薬) が理論的に均質でないことから結果の解釈には注意が必要である。報告の大部分は白人のサンプル集団であり、他人種において結果の再現性が得られるかは不明である。アジア人を主とする研究は日本から発表された 2 編のみである。しかしともに症例数が 40 例程度と少数例の検討であり、日本人のアレル頻度 (Wild vs Variant CYP2C9\*2 100:0, CYP2C9\*3 19:1, VKORC1 1:9) から考えると十分な統計学的検出力を有していない。

## 2. 研究の目的

日本人小児におけるワルファリン感受性関連遺伝子とワルファリン至適投与量の関連を明らかにし、日本人小児のワルファリン至適投与量設定基準を開発すること。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象患者および除外基準

以下の基準を全て満たす患者を対象とする。

- ・ 血栓塞栓症の予防もしくは治療としてワルファリンが使用されている、研究参加時年齢が 0 歳以上 18 歳以下の小児
- ・ ワルファリン至適投与量に既に到達し、DNA 検体採取前 28 日以内にワルファリン投与量が変更されていない患者
- ・ 研究への参加に当たり十分な説明を受けた後、患者本人もしくは代諾者の自由意思による文書での同意が得られた患者

以下の基準に該当する患者は本研究から除外する。

- ・ DNA 検体採取日より起算し、28 日以内にワルファリン投与量が変更された患者
- ・ 妊婦および授乳婦
- ・ 文書での同意を得られなかった患者
- ・ 納豆、クロレラ、青汁、セントジョーンズワート (西洋オトギリソウ) 等ビタミン K が豊富に含まれる食材やサプリメントを定期的 (1 回/週以上) に摂取している患者
- ・ 主治医が本研究の対象者として不適当と判断した患者

### (2) 臨床情報

下記臨床情報について収集した。

患者背景：性別、生年月、採血日時、採血時身長、採血時体重、人種、特殊な食事の有無、重篤な出血性基礎疾患の有無、基礎疾患

ワルファリン関連情報：ワルファリン投与開始年月日、目標 PTINR 値、PTINR 許容範囲、検体採取時 PTINR、ワルファリン服用理由、ワルファリン一日投与量、ワルファリン最終内服日時、

ワルファリン剤型（先発・ジェネリック）最終内服日時、服用コンプライアンス状況  
 DNA 検体採取 28 日以内の併用薬投与の有無：アミオダロン、ボセンタン、ビタミン K 製剤、  
 抗菌薬、抗てんかん薬  
 有害事象情報：ワルファリン投与中の重篤な出血症・血栓症の発生回数、ワルファリン投与中  
 に PTINR4.0 以上となった回数

(3) 遺伝子多型解析方法

研究参加者より採取した全血は DNA 抽出後、-80℃ の冷凍庫で保存した。遺伝子多型はサンガー  
 シークエンス法により VKORC1 は 1639G>A、CYP2C9 は\*1/\*2/\*3、CYP4F2 は\*1/\*3 はタイピングし  
 た。

(4) 統計解析方法

連続変数は平均値 ± SD または中央値（最小値-最大値） 離散変数は実数（割合）で示した。  
 各遺伝子多型（Wild type, Heterozygus, Homozygus）におけるワルファリン至適投与量分布の  
 相違は Yonckheere-Terpstra test を用い検定した。P 値は両側検定にて 0.05 未満を統計学的  
 有意差ありとした。

予測する結果変数はワルファリン至適投与量とし、単位は mg/kg/day と mg/day の 2 種類を用  
 いた。また、ワルファリン至適投与量は実数およびルート変換した値を用いたため、計 4 種  
 類の結果変数について検討した。説明変数は遺伝子多型の有無（VKORC1、CYP2C9、CYP4F2）、年  
 齢、性別、身長、体重、基礎疾患、目標 PT-INR とした。予測モデルの構築は重回帰分析を用い、  
 総当たり法にて各結果変数に対する最適モデルをベイズ情報統計量（BIC）により決定した。作  
 成されたモデル間の性能評価は自由度調整 R 二乗を用いた。

既報モデルとの推定精度比較は L1 error および L2 error を用いた。Optimistic bias を考  
 慮して、本研究で得られたモデルはランダムクロスバリデーション（学習：評価 = 1 : 1、2  
 00 回繰り返し）を行って各指標を算出した。

(5) 倫理的事項

本研究計画はヘルシンキ宣言およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則り作  
 成された。また、本研究の実施に当たっては国立研究開発法人国立成育医療研究センター倫理  
 審査委員会の実施許可を得ており、すべての研究参加者または代諾者による研究参加に関する  
 文書同意を取得している。

4. 研究成果

研究期間内に 123 名が登録された。男女比は 1.5 と男児が多く、年齢の中央値は 7 歳であ  
 った。目標 PT-INR は 2 未満が約半数であり、ワルファリンの適応はフォンタン手術後が  
 約 6 割と最多であった。出血合併症を 13 例（10.6%）、血栓合併症を 3 例（2.4%）に認め  
 た。VKORC1 では wild、heterozygus、homozygus の順にワルファリン至適投与量が少  
 なかったが（ $P < 0.001$ ）、CYP2C9 および CYP4F2 の遺伝子多型ではワルファリン至適投  
 与量に統計学的有意差を認めなかった（それぞれ  $P = 0.191$ ,  $P = 0.776$ ）。

結果変数を mg/kg/day としたワルファリン至適投与量の上位 3 予測モデルを下図に示す。  
 ワルファリン至適投与量が実数の場合、性別、体重、VKORC1 遺伝子多型の 3 説明変数  
 で作成した予測モデルの性能が最良であった。一方で、ルート変換後の場合は性別、体重、  
 目標 PTINR、VKORC1 遺伝子多型の 4 説明変数にて最適モデルが作成された。

	variable		co-efficient	SE	p-value	BIC
mg/kg/day						
Model 1	Gender	Male	reference			-447.705
		female	-0.016	0.0067	0.018	
	Body weight		-0.001	0.0002	<0.001	
	VKORC1	wild or heterozygus	reference			
		homozygus	-0.071	0.0079	<0.001	
Model 2	Gender	Male	reference			-447.241
		female	-0.015	0.0066	0.026	
	Age category	1 year-old or less	reference			
		2 to 9 years-old	-0.027	0.013	0.036	
		10 years or older	-0.052	0.013	<0.001	
VKORC1	wild or heterozygus	reference				
	homozygus	-0.069	0.008	<0.001		
Model 3	Age category	1 year-old or less	reference			-447.218
		2 to 9 years-old	-0.027	0.013	0.031	
		10 years or older	-0.052	0.013	<0.001	
	Target PT-INR range	less than 2,5	reference			
		2.5 or more	0.026	0.012	0.027	
	VKORC1	wild or heterozygus	reference			
homozygus		-0.069	0.0078	<0.001		

Square root of mg/kg/day						
Model 1	Gender	Male	reference			-356.55
		female	-0.022	0.0096	0.020	
	Body weight		-0.001	0.0003	<0.001	
	Target PT-INR range	less than 2,5	reference			
		2.5 or more	0.042	0.017	0.015	
Model 2	VKORC1	wild or heterozygus	reference			-356.039
		homozygus	-0.106	0.011	<0.001	
	Gender	Male	reference			
		female	-0.021	0.0096	0.028	
	Body weight		-0.002	0.0004	<0.001	
Model 3	After mechanical valve replacement	Yes	reference			-355.779
		No	0.029	0.012	0.02	
	VKORC1	wild or heterozygus	reference			
		homozygus	-0.106	0.011	<0.001	
	Body weight		-0.002	0.0004	<0.001	
Model 3	After mechanical valve replacement	Yes	reference			-355.779
		No	0.033	0.013	0.011	
	VKORC1	wild + heterozygus	reference			
		homozygus	-0.105	0.012	<0.001	

結果変数を mg/day とした場合のワルファリン至適投与量予測モデルのうち、上位 3 モデルを下表に示す。実数、ルート変換ともに身長、目標 PTINR、VKORC1 遺伝子多型が最も予測性能に優れたモデルとして選択された。

	variable		co-efficient	SE	p value	BIC
mg/day						
Model 1	Height		0.027	0.002	<0.001	254.837
	Target INR range	less than 2.0	reference			
		2.0 to less than 2.5	0.260	0.117	0.028	
		2.5 or more	0.836	0.212	<0.001	
	VKORC1	wild or heterozygus	reference			
Model 2		homozygus	-1.438	0.135	<0.001	255.09
	Height		0.027	0.002	<0.001	
	Target INR range	less than 2.5	reference			
		2.5 or more	0.712	0.208	<0.001	
	VKORC1	wild or heterozygus	reference			
Model 3		homozygus	-1.438	0.137	<0.001	256.793
	Age(year)	1 year-old or less	reference			
		2 to 9 years-old	-0.532	0.254	0.038	
		10 years or older	-1.017	0.377	0.008	
	Height		0.035	0.004	<0.001	
	Target INR range	less than 2,0	reference			
		2,0 to less than 2.5	0.299	0.115	0.011	
		2.5 or more	0.853	0.207	<0.001	
	VKORC1	wild + heterozygus	reference			
	homozygus	-1.402	0.133	<0.001		
Square root of mg/day						
Model 1	Height		0.010	0.0007	<0.001	-11.682
	Target INR range	less than 2,0	reference			
		2.0 to less than 2.5	0.101	0.040	0.012	
		2.5 or more	0.269	0.072	<0.001	
	VKORC1	wild or heterozygus	reference			
Model 2		homozygus	-0.478	0.046	<0.001	-9.914
	Height		0.010	0.0007	<0.001	
	Target INR range	less than 2,5	reference			
		2.5 or more	0.221	0.071	0.002	
	VKORC1	wild or heterozygus	reference			
Model 3		homozygus	-1.437	0.047	<0.001	-9.592
	Gender	Male	reference			
		female	-0.063	0.039	0.108	
	Height		0.010	0.001	<0.001	
	Target INR range	less than 2,0	reference			
		2.0 to less than 2.5	0.090	0.040	0.025	
		2.5 or more	0.257	0.072	<0.001	
VKORC1	wild or heterozygus	reference				
	homozygus	-0.481	0.045	<0.001		

作成した各モデルにおける自由度調整 R 二乗を下表に示す。今回作成した 4 種類のモデルにおいて、説明変数を体重で標準化せずに mg/day を用いる、また実数ではなくルート変換する事によって予測性能が向上する事がわかる。以上から、本研究における最適モデ

ルは説明変数を身長、目標 INR、VKORC1 遺伝子多型の 3 変数、結果変数をルート変換した一日あたりのワルファリン至適投与量とした。

	variable	R square
Model (mg/kg/day)	gender, body weight, VKORC1	0.447
Model (square root of mg/kg/day)	body weight , target INR range, VKORC1	0.488
Model (mg/day)	height , target INR range, VKORC1	0.709
Model (square root of mg/day )	height , target INR range, VKORC1	0.728

既報 6 モデルとの予測性能誤差の比較を下表に示す。L1 error、L2 error とともに今回作成したモデルが最も小さく最適予測モデルと判断された。

Predictive model	L1 error	L2 error
Nowak-Gott, et al.	0.764	0.794
Moreau, et al.	0.615	0.609
Biss, et al.	0.530	0.445
Nguyen, et al.	0.715	1.073
Shaw, et al.	0.665	0.614
Wakamiya, et al.	0.493	0.512
Present model	0.472	0.398

本研究により、以下の事が明らかとなった。

日本人小児において VKORC1 遺伝子多型がワルファリン至適投与量を決定する遺伝子多型として最も重要な遺伝子多型であった。

身長、目標 INR、VKORC1 遺伝子多型を説明変数とし、ルート変換した一日あたりワルファリン至適投与量を結果変数とする予測モデルが最良の予測性能を示した。

今回作成したモデルは既報モデルと比較しても測定誤差が最も少なかった。

以上より、日本人を含むアジア系人種におけるの小児ワルファリン至適投与量予測モデルとして最大規模である本研究によって、日本人小児におけるワルファリン至適投与量予測モデルを開発することができた。

本研究において、日本人賞においては 3 遺伝子多型のうち VKORC1 が小児のワルファリン至適投与量に関連することが示された。VKORC1 の効果量は過去報告された日本人小児や成人における検討結果と同様であり、今回の検討によってその関連性に関するエビデンスがより強固になったと考えることが妥当であろう。また、CYP2C9 は日本人における遺伝子多型割合が低く、本研究においても 1 名のみであった。検出力不足により予測モデル内に含まれなかった可能性も想定されるため、結果の解釈には注意が必要である。一方で CYP4F2 とワルファリン至適投与量の関連は平井らとの先行研究とは異なる結果が得られた。平井らの研究は患者数が我々の検討と比べて 1/3 程度である。そのため、より偏った結果が得られた可能性が想定される。実際に他人種を含めた系統的レビュー・メタ解析では CYP4F2 とワルファリン至適投与量との関連は否定的であった。今後、アジア系に特化したさらなる症例蓄積と解析結果の統合が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 akeuchi M, Kobayashi T, Biss T, Kamali F, Vear SI, Ho RH, Bajolle F, Lorient MA, Shaw K, Carleton BC, Hamberg AK, Wadelius M, Hirono K, Taguchi M, Wakamiya T, Yanagimachi M, Hirai K, Itoh K, Brando LR, Ito S.	4. 巻 20
2. 論文標題 CYP2C9, VKORC1, and CYP4F2 polymorphisms and pediatric warfarin maintenance dose: a systematic review and meta-analysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacogenomics J.	6. 最初と最後の頁 306-319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41397-019-0117-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林徹
2. 発表標題 日本人小児における薬理遺伝的情報に基づくワルファリン至適投与量予測モデルの開発
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------