

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15497

研究課題名(和文)クロザピン誘発性無顆粒球症の発症機序解明と発症予測バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenic mechanisms of clozapine-induced agranulocytosis

研究代表者

齋藤 竹生 (Takeo, Saito)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：30767611

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)：クロザピンは無顆粒球・顆粒球減少症を引き起こす。本研究の目的は、未だ解明されていないこの副作用の発症機序の解明である。この副作用に免疫学的機序が関与することを検証するため、クロザピン誘発性無顆粒球症(CIA)群の末梢血単核細胞を用いた、クロザピンによるリンパ球刺激試験を行なった。対照群として、クロザピンを服用しても顆粒球の減少をきたさなかった投与コントロール群を用いて、CIA群とのリンパ球増殖の差を確かめた。増殖活性を比較したところ、CIA群がトレラントコントロール群よりも増殖活性が強い傾向を認めた。この傾向をより確かなものにするため、今後さらにサンプル数を拡大した検討を行う必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA-B\*59:01がクロザピン誘発性無顆粒球症において、大きな効果量を持つ確実なリスクであることが再確認されたこと、クロザピン誘発性無顆粒球症の発症において、免疫学的な発症機序の関与が示唆されたことは、クロザピン誘発性無顆粒球症の発症を防ぐ方法を確立するための足がかりになると考えられる。発症の予防手段が確立されれば、クロザピン治療の安全性が増すことにより、医師と患者がクロザピン導入を積極的に受け入れるようになり、患者の早期回復、社会復帰につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Clozapine-induced agranulocytosis (CIA)/clozapine-induced granulocytopenia (CIG) (CIAG) is a life-threatening event for schizophrenic subjects treated with clozapine. To date, the pathogenic mechanisms of CIAG remain largely unknown. Recent studies suggested immune-mediated mechanisms were involved in CIAG. Therefore, we evaluated the clozapine-induced lymphocyte proliferation using peripheral blood mononuclear cells of CIA patients to determine whether T-cell-mediated allergic reactions were involved in the pathogenesis of CIA. We compared the lymphocyte proliferation between CIA and tolerant control patients. The lymphocyte proliferation of CIA patients was increased compared with that of tolerant control patients. Although our results suggested immune-mediated mechanisms were involved in CIA, further investigations using more cases are warranted to ascertain this trend in clozapine-induced lymphocyte proliferation in CIA.

研究分野：精神科遺伝学

キーワード：薬理ゲノム学 クロザピン 無顆粒球症 顆粒球減少症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症患者は本邦で70-80万人いると推定され、その1/3が通常の抗精神病薬では十分な効果が得られない治療抵抗性統合失調症であるとされる。クロザピンは治療抵抗性統合失調症に適応のある唯一の薬剤であるが、本邦では十分には普及していない。その理由は、クロザピンが誘発する重篤な副作用である無顆粒球症にあると考えられる。無顆粒球症の発症には免疫学的機序による要因と、薬剤の直接的な毒性による要因という2つの要因が推測されているが、未だに発症機序は解明されておらず、事前に発症を予測する手段もない。そのため発症機序解明と予測因子の同定が切望されている。申請者らは、薬理ゲノム学的解析においてクロザピン誘発性無顆粒球・顆粒球減少症 (Clozapine-induced agranulocytosis/ granulocytopenia : 以下、CIAG) の有意な遺伝的リスクとして、HLA遺伝子であるHLA-B\*59:01を同定した (Saito et al. Biol Psychiatry 2016)。このリスクの効果量はオッズ比が約10と非常に大きい。しかし、日本人集団においてHLA-B\*59:01のアレル頻度が約2%と低いことから、発症予測のバイオマーカーとして用いた場合には陽性適中率が低く、直ちに実臨床へ応用することは困難である。そのため、さらなる新規のバイオマーカーを同定し、HLA-B\*59:01を含めた複数のバイオマーカーを組み合わせて、発症予測精度を上げる必要がある。一方で見出されたリスク遺伝子が、抗原提示に関わるMHCクラス IIに属するHLA-B遺伝子であることから、免疫学的機序が関与する蓋然性高いと考えられる。このため、発症機序の解明には免疫系に焦点を当てた検討が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、CIAGの発症機序解明と発症予測バイオマーカーの同定を目的とする。治療抵抗性統合失調症の治療において、未だにクロザピンに代わる有用な薬剤は無いため、この薬剤を安全に使用できるようにすることは、精神科医療において重要な課題である。本研究を通じて発症機序が明らかになれば、無顆粒球症を誘発しないクロザピンの開発や、無顆粒球症の発症を抑止する治療法の開発に繋がる可能性がある。また無顆粒球症に関するバイオマーカーを同定し、発症予測をすることが可能となれば、患者のQOLを維持するだけでなく、無顆粒球症治療に費やされる医療費が削減されるといった現実的な利益をもたらす。またクロザピン治療の安全性が増すことにより、医師と患者がクロザピン導入を積極的に受け入れるようになり、患者の早期回復、社会復帰につながる。このことはひいては、精神科病床の長期入院患者の減少や、無用な薬剤の減薬による医療費削減に繋がると考える。

## 3. 研究の方法

### 1) 免疫学的機序の解明: リンパ球刺激試験を用いた免疫学的機序の関与の検証

クロザピンで誘発される免疫応答をin vitroでのリンパ球増殖で検出する。クロザピン誘発性無顆粒球症(CIA)群とクロザピンを服用しても顆粒球の減少をきたさなかった投与コントロール群の間に、クロザピンの刺激によるリンパ球増殖に差を認めれば、CIA発症に免疫学的機序、特に遅発性のアレルギー反応が関与することを示すことになる。

対象: ケース群としてCIA4症例、投与コントロール4症例を用いた。

方法: CIA群と投与コントロール群より末梢血単核細胞(PBMC)を抽出し用いた。PBMCにクロザピンを添加し、さらに3H-thymidineを加え培養した上でその取り込みを測定した。

### 2) Next Generation Sequencing(NGS)を用いた詳細な遺伝子型の検討

CIAGの遺伝的リスクであるHLA-B\*59:01はHLA-B\*59:01:01:01とHLA-B\*59:01:01:02の2つの遺伝子多型があることが知られている。HLA-B\*59:01を保有していたとしても、CIAGを発症しない症例もあることから、この多型の違いが発症に寄与している可能性がある。

対象：ケース群としてHLA-B\*59:01を保有するCIAG14症例、コントロールとしてHLA-B\*59:01を保有する投与コントロール24症例を用いた。

方法：NGSを用いてHLA-B\*59:01について8桁レベルのタイピングを実施した。関連解析を Fisher's exact testを用いて行なった。

### 3) HLA関連解析によるHLA-B\*59:01とCIAGの関連の追試

対象：ケース群としてCIA9症例、コントロール群として投与コントロール121症例を用いた。

方法：Luminex法でHLA-B遺伝子多型のジェノタイピングを実施した。関連解析を Fisher's exact testを用いて行なった。

## 4. 研究成果

### 1) 免疫学的機序の解明：リンパ球刺激試験を用いた免疫学的機序の関与の検証

増殖活性を比較したところ、増殖活性は平均で、CIA群が投与コントロール群に比べ約2倍であった。CIA群が投与コントロール群よりもリンパ球増殖反応が強い傾向を認めた。この傾向をより確かなものにするため、今後さらにサンプル数を増やした検討を行っていく必要がある。

### 2) Next Generation Sequencing(NGS)を用いた詳細な遺伝子型の検討

CIAG群ではHLA-B\*59:01:01:01が10例、HLA-B\*59:01:01:02が4例、投与コントロール群ではHLA-B\*59:01:01:01が18例、HLA-B\*59:01:01:02が6例であった。HLA-B\*59:01:01:01をCIAGのリスクとして仮定した場合、関連解析の結果はOR = 0.8, P = 1であり、統計学的に有意な頻度の差は認めなかった。よって、この2つの多型の違いがCIAGの発症に寄与している可能性は低いと考えられた。

### 3) HLA関連解析によるHLA-B\*59:01とCIAGの関連の追試

HLA-B\*59:01の保有率はCIA群で55.6%(5/9)、投与コントロール群で8.3%(10/121)であった。関連解析の結果OR = 13.3, P = 0.001と統計学的有意差を認め追試に成功した。HLA-B\*59:01はCIAにおいて、大きな効果量を持つ確実なリスクであることが確かめられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito Takeo, Ikeda Masashi, Mushiroda Taisei, Iwata Nakao, Clozapine Pharmacogenomics Consortium of Japan (CPC-J)	4. 巻 54
2. 論文標題 Human leukocyte antigen DRB1*04:05 and clozapine-induced agranulocytosis/granulocytopenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Australian & New Zealand Journal of Psychiatry	6. 最初と最後の頁 545 ~ 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0004867419900296	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 -
1. 著者名 Murata Yui, Ikegame Tempei, Koike Shinsuke, Saito Takeo, Ikeda Masashi, Sasaki Tsukasa, Iwata Nakao, Kasai Kiyoto, Bundo Miki, Iwamoto Kazuya	4. 巻 99
2. 論文標題 Global DNA hypomethylation and its correlation to the betaine level in peripheral blood of patients with schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry	6. 最初と最後の頁 109855 ~ 109855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pnpbp.2019.109855	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 -
1. 著者名 Taniguchi Satoru, Ninomiya Kohei, Kushima Itaru, Saito Takeo, Shimasaki Ayu, Sakusabe Takaya, Momozawa Yukihide, Kubo Michiaki, Kamatani Yoichiro, Ozaki Norio, Ikeda Masashi, Iwata Nakao	4. 巻 74
2. 論文標題 Polygenic risk scores in schizophrenia with clinically significant copy number variants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 35 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12926	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 -
1. 著者名 Saito Takeo, Ikeda Masashi, Mushiroda Taisei, Iwata Nakao, Clozapine Pharmacogenomics Consortium of Japan (CPC-J)	4. 巻 54
2. 論文標題 Human leukocyte antigen DRB1*04:05 and clozapine-induced agranulocytosis/granulocytopenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Australian & New Zealand Journal of Psychiatry	6. 最初と最後の頁 545 ~ 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0004867419900296	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Murata Yui, Ikegame Tempei, Koike Shinsuke, Saito Takeo, Ikeda Masashi, Sasaki Tsukasa, Iwata Nakao, Kasai Kiyoto, Bundo Miki, Iwamoto Kazuya	4. 巻 99
2. 論文標題 Global DNA hypomethylation and its correlation to the betaine level in peripheral blood of patients with schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry	6. 最初と最後の頁 109855 ~ 109855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pnpbp.2019.109855	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Taniguchi Satoru, Ninomiya Kohei, Kushima Itaru, Saito Takeo, Shimasaki Ayu, Sakusabe Takaya, Momozawa Yukihide, Kubo Michiaki, Kamatani Yoichiro, Ozaki Norio, Ikeda Masashi, Iwata Nakao	4. 巻 74
2. 論文標題 Polygenic risk scores in schizophrenia with clinically significant copy number variants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 35 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12926	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Ikeda M, Takahashi A, Kamatani Y, Momozawa Y, Saito T, Kondo K, Shimasaki A, Kawase K, Sakusabe T, Iwayama Y, Toyota T, Wakuda T, Kikuchi M, Kanahara N, Yamamori H, Yasuda Y, Watanabe Y, Hoya S, Aleksic B, Kushima I, Arai H, Takaki M, Hattori K, Kunugi K, Okahisa Y, Ohnuma T, Ozaki N, Someya T, Hashimoto R, Yoshikawa T, Kubo M, Iwata N	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Genome-Wide Association Study Detected Novel Susceptibility Genes for Schizophrenia and Shared Trans-Populations/Diseases Genetic Effect	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Schizophrenia Bulletin	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/schbul/sby140	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齋藤竹生
2. 発表標題 薬理遺伝学による臨床現場への応用を見据えて (シンポジウム7 精神科遺伝学がもたらした地平)
3. 学会等名 第41回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤竹生
2. 発表標題 精神疾患の薬理ゲノム学 (シンポジウム48 生物学的精神医学のフロンティア)
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤竹生
2. 発表標題 向精神薬の薬理ゲノム学研究 (第7回若手研究者育成プログラム)
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----