

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08459

研究課題名（和文）新たに同定されたチオプリン代謝酵素NUDT15のヒト血球内活性測定法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for measuring the activity of the newly identified thiopurine metabolizing enzyme NUDT15

研究代表者

志賀 永嗣 (Shiga, Hisashi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20583355

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：チオプリン代謝酵素であるNUDT15の活性を直接測る方法を開発するため本研究が行われた。NUDT15が代謝するのは6TGTPであり、代謝産物は6TGMPであることから、まずはこれらを測定する方法を開発した。その後、各遺伝子型の被検者から赤血球を採取し、6TGTPを付加したうえで一定時間後に代謝産物である6TGMPを測定したところ、遺伝子型による違いが検出できた。これによって酵素活性を比較することは可能であることが示されたが、検体を保存する時間、保存方法で測定結果が大きく変動し、遺伝子型による違い以上の変化が出るため、実際の臨床で使用するにはさらなる安定化の方法が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古くから存在する免疫抑制剤であるチオプリン製剤は、炎症性腸疾患などの様々な疾患で現在も活用されている。日本人ではチオプリンを代謝する酵素であるNUDT15の遺伝子に複数のパターン（遺伝子型）が存在し、個人によって酵素の活性が大きく異なる。特に酵素の活性が極めて低いタイプ（日本人の1%）では白血球減少などの高度の副作用が発生する。現在NUDT15の遺伝子型検査が可能だが、特定の遺伝子多型しか検出できず未知の変異があった場合は検出されない。また、未知の変異が仮にあった場合、酵素活性がどう変わるかは不明であることから、直接酵素活性を測定可能であれば非常に有用である。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to develop a method to directly measure the activity of NUDT15, a thiopurine metabolizing enzyme. 6TGTP is metabolized by NUDT15, and the metabolite is 6TGMP, so a method to measure these was first developed. Then, erythrocytes were collected from subjects of each genotype, 6TGTP was added, and the metabolite 6TGMP was measured after a certain time, and differences by genotype could be detected. Although this showed that it was possible to compare the enzyme activities, the results varied greatly depending on the time and method of storage of the specimens, and the results varied more than the genotype differences.

研究分野：消化器内科学

キーワード：チオプリン製剤 薬理ゲノム NUDT15

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患(IBD)は原因不明の慢性腸炎で、日本でもその発症が急増している難治性疾患である。IBDは特に若年者での発症が多く、長期間QOL害する疾患である。治療には複数あるが、免疫調節薬であるチオプリン製剤(アザチオプリンと6-メルカトルプリン)はステロイド依存例や術後寛解維持のために古くから多くの有効性に関するエビデンスがある。しかし、日本人をはじめとしたアジア人では、チオプリン製剤で重篤な副作用が欧米と比較すると高頻度で経験される。チオプリンの副作用は、投与前にはわからないため、副作用の可能性だけで服用を回避されることが多いため、チオプリンがあまり活用されず、高額な抗体製剤に依存する症例が多いとされる。

臨床上特に問題となる副作用として、骨髄抑制や脱毛が薬剤中止のリスク因子となっている。副作用の有無は、薬物代謝酵素の遺伝的な活性の違いが関係していることが知られており、欧米人ではTPMT遺伝子が、日本人ではNUDT15遺伝子が関係している。特に、日本人で問題となるNUDT15遺伝子はExon3に存在するp.Arg139Cys(R139C)多型のうち、Cys/CysはNUDT15の活性をほぼ消失させる多型で、チオプリンをごく少量でも服用を継続すると、高度の骨髄抑制と全脱毛がほぼ必発である。日本人には、このR139C多型がアリル頻度10%程度でリスクホモ症例が約1%いるため、ここを見ることで重篤な副作用に限定すれば大部分が回避できることがわかっている。

チオプリン投与前の遺伝子検査としてR139Cの検出のみで重篤な副作用のリスク回避は十分と考えられ臨床応用が進んだ。しかし、R139C以外のExon1の多型も*in vitro*での機能解析の結果、NUDT15の活性を低下させることが報告され、R139Cの検出のみではリスク回避が困難な症例が存在する。さらに上記以外にも複数のアミノ酸置換をきたす多型が最近報告され、その多くは非常にまれな変異で、それらの個人ごとのディプロタイプを臨床検査としてすべて調べることは頻度やコストを考えると効率も悪く困難である。人種的な遺伝的背景の違いによって調べる遺伝子変異も異なり、かといって必ずしも稀な変異が無いともいえず、仮に見つけられたとしてそれが副作用のリスクとなる酵素活性にかかわる多型かは不明である。

2. 研究の目的

新たに同定されたチオプリン代謝酵素であるNUDT15の活性を、チオプリン製剤をまだ服用していないヒトが事前に体外で測定することで、適切な投与量や副作用の回避をするロジックの確立を目指す。

3. 研究の方法

NUDT15遺伝子は、チオプリン代謝産物で薬効を示す最終産物である6-TGTPを6-TGMPに加水分解する。6-TGTPは生体内には存在しない物質であることから、被検者の血球を分離し、外部から6TGTPを付加、その後の6-TGMP・TGTPの量を測定することで、NUDT15の活性が予測できると考えた。そのため本研究では6TGTP、6TGMP分析法確立および赤血球を使った代謝評価法の確立を行う。

具体的には、まず、測定方法として標準検体を用いて液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)による6TGTPおよび6TGMP分析法を確立する。その後、赤血球検体を用いNUDT15の基質となる6TGTPを付加したうえで、時間ごとの6TGTP/6TGMPを測定する。これらが遺伝子型によって違うかどうか、さらに臨床応用を考えた場合に測定までの時間や保存方法などによる違いがあるかを検討する。

4. 研究成果

被験者赤血球を使った6TGTP/6TGMP比算出によるNUDT15酵素活性評価の実現可能性評価を行った。まず、6TGTP/TGMPの測定系を確立するため、標準物質を用いてLC/MSによる測定系の検討を開始した。分析カラム・移動相などの設定条件を複数設定しクロマトグラムの結果から、適切な条件を確定できた。

NUDT15コドン139の遺伝子型(Arg/Arg, Arg/Cys, Cys/Cys)の各1名ずつの被験者から採血を行い、赤血球成分を分離氷冷し、6TGTPを添加、37℃で15-120分での各種タイムポイントを設定しインキュベーションを行い、検体を氷冷。徐タンパク、攪拌・遠心・上清分取後後室素乾固後、水200µLに再溶解しLC/MSによる測定を行った。その結果、6TGMPの生成量は、インキュベート15分後から、遺伝子型別に有意差をみとめ、特に、リスクホモ群(Cys/Cys)群では、ワイルドタイプ(Arg/Arg)に比較し、有意に6TGMP生成量が減少していた(試行回数3回、 $p < 0.01$)。また、同様の有意差が、30分、60分、120分でも確認された。一方で、TGTPの減少量は予想に反して3群で有意差を確認できなかった。以上から、NUDT15活性の測定としてヒトからの採血検体で、コドン139による活性の違いは検出できる可能性が示唆された。

次に、前述の酵素活性測定系での測定値について、日内再現性及び日間再現性の確認を行った。

3 被験者それぞれにおいて、3日間、1日あたり5回測定し、それぞれの再現性を比較した。コドン 139 多型が Arg/Arg, Arg/Cys, Cys/Cys である健常人から採取した赤血球検体について、日内安定性及び日間安定性を比較するために同一検体を1日あたり5回、3日間、60分間インキュベートを行いLC/MSにて6-TGMP及び6-TGTPを測定したところ、3日間全てCys/Cys-Arg/Cys間、Cys/Cys-Arg/Arg間における6-TGMP/6-TGTP比で有意な差が認められた($p < 0.01$)。6-TGMP/6-TGTP比それぞれの最小-最大値は、1日目においてArg/Argは0.155-0.303、Arg/Cysは0.460-0.735、Cys/Cysは0.517-0.915、2日目においてArg/Argは0.289-0.560、Arg/Cysは0.873-1.17、Cys/Cysは0.920-1.46、3日目においてArg/Argは0.203-0.426、Arg/Cysは0.636-1.06、Cys/Cysは0.758-1.35であった。以上のように、同一検体を用いて1日あたり5回、3日間測定したところ、6-TGMP、6-TGTPのそれぞれの量にばらつきを認めたものの、6-TGMP/6-TGTP比を用いた場合にはほぼ同等の遺伝子型による測定値の違いが確認できた。

最終年度には検体の保存時間による変動を検討した。コドン 139 多型が Arg/Arg である赤血球検体を用い、検体採取から凍結までの保存時間による測定値の安定性を検討したところ、室温保存では9時間及び24時間放置の検体で6-TGMP/6-TGTP比が80%を下回る結果となり、測定値は不安定となった。Codon139多型が Arg/Arg である凍結保存後赤血球検体を、インキュベート前に室温及び冷蔵で保存し、測定値の安定性を検討したところ、室温保存では4時間保存の場合に6-TGMP/6-TGTP比が60.3%、60.9%、24時間保存の場合に17.7%、15.8%と測定結果が不安定となった。冷蔵保存した検体は24時間保存で80%を下回り測定結果が不安定となった。

このように本手法では、遺伝子型別での酵素活性の違いを比較で検出することは可能であったが、絶対値としての安定性がなく、検体の採取から測定までの管理で容易に結果が変動することが明らかとなった。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kakuta Yoichi, Izumiyama Yasuhiro, Okamoto Daisuke, Nakano Takeru, Ichikawa Ryo, Naito Takeo, Moroi Rintaro, Kuroha Masatake, Kanazawa Yoshitake, Kimura Tomoya, Shiga Hisashi, Kudo Hisaaki, Minegishi Naoko, Kawai Yosuke, Tokunaga Katsushi, Nagasaki Masao, Kinouchi Yoshitaka, Suzuki Yasuo, Masasmune Atsushi	4. 巻 55
2. 論文標題 High-resolution melt analysis enables simple genotyping of complicated polymorphisms of codon 18 rendering the NUDT15 diplotype	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 67 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01638-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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	角田 洋一 (Kakuta Yoichi) (50509205)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

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