

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590652

研究課題名(和文) アジア人、白人、黒人患者のための遺伝子情報に基づく抗凝固薬導入アルゴリズムの作成

研究課題名(英文) Establishment of pharmacogenetic-based dosing algorithm of warfarin for Asian, Caucasian and African American patients

研究代表者

高橋 晴美 (TAKAHASHI, Harumi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20211344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：異なる人種においても適応可能なワルファリン(WF)導入治療アルゴリズムを作成する目的で、体内動態(PK)と薬物応答性(PD)に関する遺伝子情報を基にアジア人(台湾系中国人)、黒人と白人患者を対象として、WFの応答性に関与する変動要因について検討した。その結果、WFのPKの変動因子として、CYP2C9*8、CYP2C9*3、CYP2C9*2、性別(女性)、年齢、PDの変動因子としてVKORC1*2、CYP4F2*3、投与前の凝固活性が抗凝固効果の個体差に寄与していた。アジア人におけるover-anticoagulationにはPK因子(クリアランス)が寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To establish the initiating dosing algorithm of warfarin in 3 different populations (Asian, African American and Caucasians), pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) factors associated with inter-individual variability in anti-coagulation responses were investigated by performing the retrospective and prospective clinical studies. Multivariate analyses showed that mutations of CYP2C9*8, CYP2C9*3, CYP2C9*2, sex and age were predictors of PK (clearance) and that mutations of VKORC1*2 & CYP4F2*3 and the baseline coagulation activity were predictors of PD (IC50 & the non-linear index). Furthermore, all results indicate that factors associated with the reduced metabolic activity of warfarin might be critical determinants of the over-anticoagulation response during initiation therapy in Asian patients.

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：ワルファリン 個体差 応答性 CYP2C9 VKORC1 遺伝子多型 INR

1. 研究開始当初の背景

抗凝固薬ワルファリン (WF) は血栓塞栓症の予防・治療薬として世界的に第一選択薬であるが、WF による治療は、常に出血性合併症という重大な臨床的リスクを伴う。更に、WF により安定した抗凝固効果を維持するための投与量には大きな個人差が存在するため、特に導入期の出血合併症の予防という観点から各症例毎に抗凝固効果 (International Normalized Ratio, INR) を綿密にモニターし、投与量の調節が行われている。それでも尚、しばしば投与中に、治療域を逸脱してしまう症例をたびたび経験する。

最近、WF 維持量の個人差には体内動態 (PK: 投与量 - 血中濃度) と感受性 (PD: 血中濃度 - 抗凝固効果) に関与する遺伝子変異 (*CYP2C9**2/*3 と *VKORC1**2 変異) が人種によらず大きく影響していることが、多くの臨床研究で明らかにされてきた。

2. 研究の目的

アジア人の WF 維持量は欧米白人や黒人患者に比較して有意に少なく、体重で補正しても維持量には人種差が認められる。そこでアジア人のみならず白人、黒人患者にも応用可能な有効で安全な WF 導入アルゴリズム (変動要因に応じた WF 導入量と導入後の投与量の調整方法) を構築するために、その基礎情報となる以下の3点について検討することを目的とした。

- (1) アジア人患者を対象とし、WF 導入後3か月間に得られた血液サンプルを用いて WF 投与開始後血中 S-WF 濃度 (Cp) が上昇する過程、Cp の上昇により凝固活性 (NPT; 血漿中 Normal prothrombin 濃度) が低下する過程、NPT の低下により、抗凝固効果 (INR) が上昇する過程、それぞれの時間推移と各過程の変動要因を定量的に表現できるモデルを母集団解析法により構築する。
- (2) アジア人患者を対象に WF 導入期から維持量設定までの期間 (抗凝固効果が安定維持期に入るまでの期間) において over-anticoagulation (INR>4) イベントに及ぼす両遺伝子型 (*CYP2C9* と *VKORC1* 遺伝子) や患者背景因子 (年齢、体表面積など) などの PK と PD に関する影響因子の寄与を比較・検討する。
- (3) アジア人、黒人、白人患者を対象に、体内動態 (PK; S-WF のクリアランス、CL) の変動要因を明確にし、CL の人種間比較を行う。次いで、人種差の影響因子について検討する。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者と患者情報の収集: 血栓塞栓症予防のため WF 導入が予定された年齢 20 才以上の台湾系中国人患者 (196 名)、白人患者 (122 名) と黒人患者 (60 名) とした。本研究は臨床試験に参加した施設、台湾 Academia Sinica、イリノイ大学と明治薬科大学の施設内倫理委員会の承認後に実施した。

入院・外来患者: 心房細動などのため WF 投与が必要な患者

* 除外基準: 文書による同意が得られない患者、及び担当医師が不適切と判断した患者

(2) 試験期間・測定法・解析法

試験エントリー・採血・遺伝子検査・フォローアップ期間: 9 月 (2009) ~ 12 月 (2013)
採血・INR・出血事象を WF 導入後定期的に 3 か月間観察する。

患者情報の収集項目: 年齢、性別、身長、体重、腎機能、肝機能、食生活、飲酒・喫煙習慣、WF 応答性に影響する併用薬
測定項目

* S-WF の血漿中濃度: HPLC-UV 法で測定した。

* *CYP2C9* 遺伝子変異 (*CYP2C9**3) と *VKORC1* と *CYP4F2* 遺伝子変異 (*VKORC1**2 と *CYP4F2**3): SMAP 法とダイレクトシーケンシング法により検査した。

* 凝固活性: カルボキシル化トロンビン活性 (NPT): Carin activase-1 法により測定した。

* 抗凝固効果: INR を指標とした。

解析方法

前述の 2. 目的の項の (1) に記載した母集団解析法 ~ は以下のモデル式を用いた。

* WF 投与後の Cp 上昇の時間推移: 一次吸収過程のある 1 - compartment model を用いて CL の母集団平均値と各患者の CL を推定した。誤差モデルとしては CL の個体間変動は対数誤差モデル、Cp の個体内変動は絶対誤差モデルを選択した。

* Cp 上昇による NPT (凝固活性低下) の時間推移: WF による NPT 濃度低下に存在する時間的遅れを表現するために、NPT 生成阻害型の間接反応モデルを用いて、IC50 と Kout を推定した。誤差モデルとしては IC50 と Kout の個体間変動は対数誤差モデル、NPT の個体内変動は絶対誤差モデルを選択した。

* NPT (凝固活性) 低下による抗凝固効果 (INR) の上昇: Cp の上昇による投与前 NPT0 の阻害に伴い INR が非線形的に上昇するモデルを用いて、非線形性を表現する指数パラメータである α を推定した。誤差モデルとしては α の個体間変動は対数誤差モデル、INR の個体内変動は相対誤差モデルを選択した。

統計解析法

* CL、IC50 と α と連続変数 (年齢や体重など) の相関性は Pearson 法を用いた。

* CL、IC50 と α と離散変数 (遺伝子変異の有無など) の中央値の比較は Mann-Whitney U test を用いた。

* 比率の検定はカイ自乗検定、あるいは Fisher's exact test を用いた。

* 両側検定を行い、有意水準は全てにおいて $P < 0.05$ とした。

* データは平均値 \pm SD、あるいは中央値 (25% - 75%) で表現した。

4. 研究成果

(1) WF 投与量-血中濃度-NPT 濃度-INR の関係を表現するモデルの検討

今回構築したモデルを図 1 に示した。Cp の時間推移を表現する PK (Eq.1) Cp 上昇に伴い NPT が低下する過程に時間的遅れを表現した PD-1 (Eq.2) と NPT0 の阻害に伴い INR が非線形的に上昇する PD-2 (Eq.3) という 3 つのステップを仮定した。

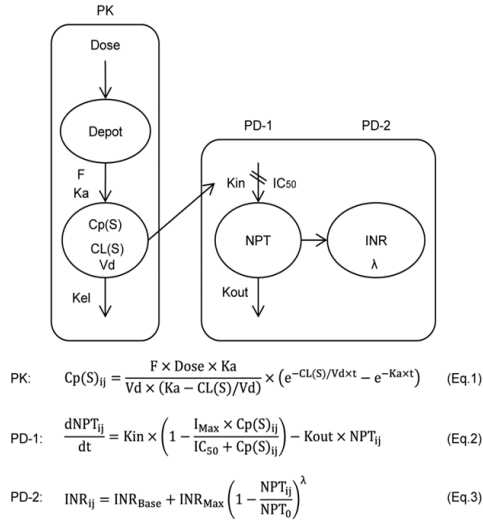


図 1 WF の Cp-NPT-INR 関係を表現したモデル
本モデルの予測精度は図 2 で示した Visual Predictive Check、頑健性は Bootstrap 法により確認した。これら 3 つのモデルにより各患者の Cp、NPT と INR の予測値は実測値を良好に反映していた。

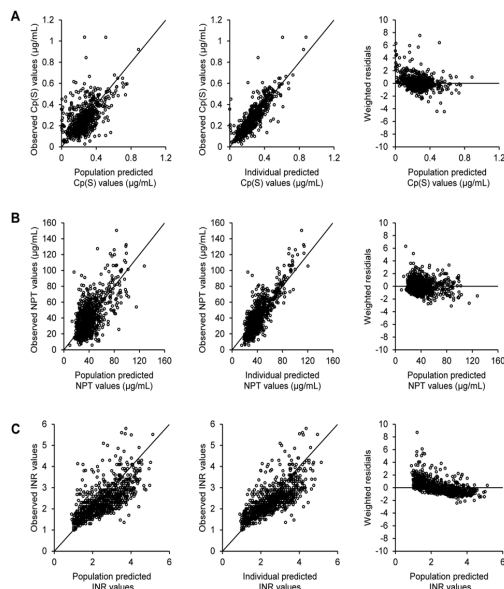


図 2 Cp,NPT,INR の Visual Predictive Check

(2) アジア人における INR>4 に寄与する因子
アジア人において CL の有意な影響因子は CYP2C9*3 変異と患者の体表面積 (BSA) であった。尚、アジア人では加齢に伴い BSA が有意に低下するという内部相関性が認められたため、年齢は変動因子から除外した。

IC50 の変動要因としては VKORC1*2 変異と CYP4F2*3 変異が、 の変動要因には投与前の凝固活性である NPT0 が抽出された。各変動要因のインパクトを図 3 に示した。CL に対しては CYP2C9*3 変異、IC50 に対しては VKORC1*2 変異が大きな影響因子であることが明らかとなった。

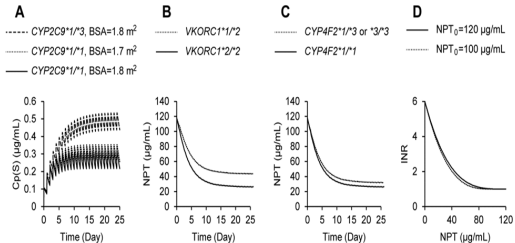


図 3 CL,IC50, に及ぼす各影響因子のインパクト

次いで、アジア人患者を INR \geq 4 を示した群と INR<4 の二群に分けて CL、IC50、 を比較した結果を図 4 に示した。INR \geq 4 を示した患者では CL と が有意に小さかったが、IC50 はほぼ等しい値であった。特に CL は平均約 30%程度小さい低かったことから、CYP2C9 活性が低下している臨床状況下 (CYP2C9*3 変異型患者、BSA が小さい患者、高齢者、肝疾患患者、薬物相互作用等) においては、WF 導入時において綿密な INR のモニターが必要と考えられた。

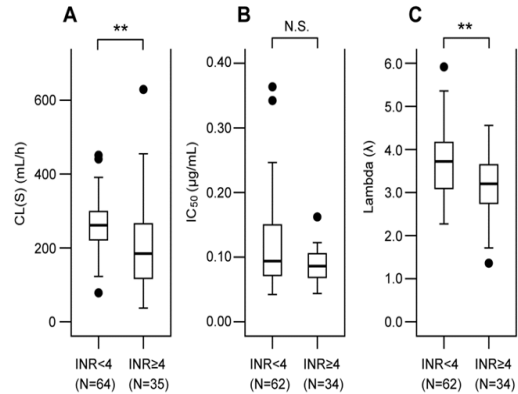


図 4 INR \geq 4 と <4 の患者群における CL,IC50, の比較

(3) CL の人種間比較

次に黒人、白人、アジア人を対象に Cp の母集団解析を行い、CL の変動要因探索と人種間比較を行った。内部相関の検討により、対象集団は加齢に伴い体重が減少し、体重は黒人、白人、アジア人の順に軽いという特徴を有していた。

前述と同様にモデルの精度、再現性、安定性は Visual Predictive Check と Bootstrap 法により確認した。Cp の予測値は実測値と概ね一致していた。

多変量解析により CL の有意な変動要因を検討した結果、CYP2C9*8、CYP2C9*3、CYP2C9*2、Sex (女性)、年齢の順に CL が低い結果を示した。

次に各患者の CL 推定値を人種ごとに比較した結果、アジア人、白人、黒人の順で CL が小さく、アジア人・白人に比較して黒人では CL が約 30% 有意に小さいことが明らかとなった。この原因として黒人患者のみに認められる *CYP2C9**8 変異の影響が大きいと考えた。

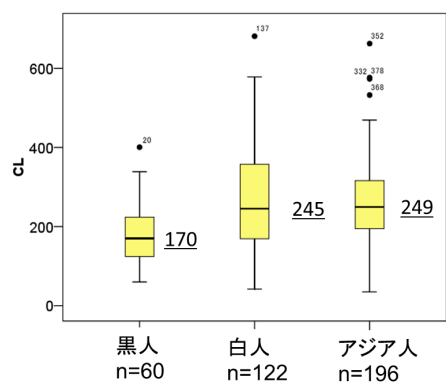


図 5 CL の 3 人種間比較

以上の検討により、黒人患者において WF の維持量が多い原因は PK の人種差に起因するものではなく、PD (感受性が低い) における人種差の存在が示唆された。

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 8 件)

Perera MA, Cavallari LH, Limdi NA, Gamazon ER, Konkashbaev A, Daneshjou R, Pluzhnikov A, Crawford DC, Wang J,⁶ Liu N, Tatonetti N, Bourgeois S, Takahashi H, Bradford Y, Burkley BM, Desnick RJ, Halperin JL, Khalifa SI, Langae TY, Lubitz SA, Nutescu EA, Oetjens M, Shahin MH, Patel SR, Sagreya H, Tector M, Weck KE, Rieder MJ, Scott SA, Wu AHB, Burmester JK, Wadelius M, Deloukas P, Wagner MJ, Mushiroda T, Kubo M, Roden DM, Cox NJ, Altman RB, Klein TE, Nakamura Y, Johnson JA. Genetic variants associated with warfarin dose in African-American individuals: a genome-wide association study. *Lancet*, **382**, 790-796, 2013. 査読有

DOI:10.1016/S0140-6736(13)60681-9

Larisa H. Cavallari, David Vaynshteyn, Kimberly M. Freeman, Danxin Wang, Minoli A. Perera, Harumi Takahashi, Katarzyna Drozda, Shitalben R. Patel, Hyun-Young Jeong. *CYP2C9* promoter region SNPs linked to the R150H polymorphism are functional suggesting their role in *CYP2C9**8-mediated effects. *Pharmacogenet. Genomics*, **23**(4), 228-231, 2013. 査読有

DOI:10.1097/FPC.0b013e32835e95c7

Yosuke Ichimura, Harumi Takahashi, Michael TM Lee, Mari Shiomi, Kiyoshi Mihara, Takashi

Morita, Chen, Hirotochi Echizen. Inter-individual differences in baseline coagulation activities and their implications for INR control during warfarin initiation therapy, *Clin. Pharmacokinet.*, **51**(12), 799-808 (2012). 査読有

DOI:10.1038/clpt.2011.269

Yong Liu, Hyun-Young Jeong, Harumi Takahashi, Katarzyna Drozda, Shitalben R. Patel, Nancy L. Shapiro, Edith A. Nutescu, Larisa H. Cavallari. Decreased warfarin clearance associated with the *CYP2C9* R150H(*8) polymorphism. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **91**, 660-665 (2012). 査読有

DOI:10.1007/s40262-012-0009-6

〔学会発表〕(計 20 件)

抗凝固薬ワルファリンの母集団薬物動態/薬力学モデル解析、大原みなみ、MTM Lee、長井 壘、小野塚秋子、有馬亜希、YT Chen、高橋晴美、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 (横浜)

Warfarin と抗癌薬の相互作用に関する *in vitro* から *in vivo* への予測、岡澤 司、大原みなみ、平出 誠、魚住真哉、上村有美、中山 卓、高橋晴美、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 (横浜)

Association between the *CYP2C9**8 variant and warfarin clearance in African Americans, Katarzyna Drozda, Harumi Takahashi, Shitalben R. Patel, Nancy L. Shapiro, Edith A. Nutescu, Larisa H. Cavallari, 2011 Annual Meeting of American College of Clinical Pharmacy, 2011, October 16-19 (IL, USA)

Inter-individual differences in baseline coagulation activities and their clinical implications for warfarin therapy. Harumi Takahashi, Yosuke Ichimura, M.T. Michael Lee, Mari Shiomi, Kiyoshi Mihara, Takashi Morita, Yuan-Tsong Chen, Hirotochi Echizen. The 23rd Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2011, July 23-29 (Kyoto)

Prediction of warfarin exposure and INR response in children. A-K Hamberg, M Wadelius, H Takahashi, L Friberg, EN Jonsson. The PAGE (the Population Approach Group in Europe) meeting, 2011, June 7-10 (Athens, Greece)

高橋晴美：第 32 回日本臨床薬理学会年会 シンポジウム「抗凝固薬の個別化治療：ゲノム情報の臨床的意義」2011 年 12 月 (浜松)

〔図書〕(計 3 件)

高橋晴美、本態性高血圧症、慢性心不全、冠攣縮性狭心症、消化性潰瘍、脂質異常症、再生不良性貧血、*In 2 ページで理解する標準薬物治療ファイル* pp.2-3、pp.4-5、pp.12-13、pp.28-29、pp.44-45、pp.52-53、日本アプライド・セラピューテ

イクス学会編、南山堂、2013
川名純一、小海春恵、高橋晴美、III. 心臓・血管系疾患/腎疾患/泌尿・生殖器疾患
虚血性心疾患、In 薬物治療スキルアップシリーズ 医療薬学テキスト
pp.48-63、北田光一編集総括、南江堂、2011

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.my-pharm.ac.jp/~yakuzai>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 晴美 (TAKAHASHI, Harumi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20211344

(2)研究分担者

塩見 真理 (SHIOMI, Mari)

明治薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：30300768

(H23 と H24)

(3)連携研究者

南條 修二 (NANJHO, Shuji)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：70328615

(H23)

佐々木 康綱 (SASAKI, Yasutuna)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：20235279

(H23)

藤田 健一 (FUJITA, Kenichi)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：60281820

(H23)

(4)研究協力者

Michael T.M. Lee

Institute of Biomedical Sciences, Academia
Sinica, Taipei, Taiwan

Larisa H Cavallari

イリノイ大学シカゴ校・薬学部・准教授