

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860539

研究課題名(和文)炎症性腸疾患治療薬の薬理遺伝学研究-オーダーメイド医療にむけて-

研究課題名(英文)Pharmacogenetics for IBD drug

研究代表者

卜部 祐司(Urabe, Yuji)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：10648033

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)：近年、炎症性腸疾患に対して様々な薬剤が開発され、長期間の寛解維持が可能となってきました。一方で治療が多様化したため、寛解導入や維持療法への方法が複雑化しています。これらの治療法の効果に関与する素因はまだまだ不明であるため、治療効果や副作用の発症をあきらかにするため研究をおこないました。約例の炎症性疾患患者の血液からDNAを抽出し、薬効に関連する遺伝子上にあるSNPをインベーター法にてタイピングを行い、治療効果や副作用に関連する感受性遺伝子を探索した。しかしながら炎症性腸疾患治療薬の薬効や副作用に有為に関連するSNPは発見できなかった。

研究成果の概要(英文)：Recently, the development of various new drugs for inflammatory bowel disease (IBD) has improved the rate of remission maintenance. Nevertheless, the methods for remission maintenance and/or permanent treatment for IBD are complicated according to the various types of IBD treatments available. The aim of this study was to clarify the genetic factors contributing to the treatment effect for IBD. Genomic DNA was extracted from approximately 600 IBD patients, and the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of genes associated with the treatment effect of IBD drugs were determined using a multiplex polymerase chain reaction-based invader assay. We explored susceptibility genes for the effects of IBD drugs; however, did not discover any significant association of the SNPs tested with the effect of IBD drugs.

研究分野：Genetics Gastroenterology

キーワード：SNP IBD Pharmacogenetics drug

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトゲノムの多様性が、さまざまな疾患の発症や、薬効、薬剤副作用に関する個人差に関わっているという考えが広まりつつある。生活習慣病や悪性腫瘍などに代表される多因子疾患については common disease-common variant 仮説に基づいた関連解析 (genome-wide association study:GWAS)により、疾患感受性遺伝子の同定をめざした研究が盛んに行われており、一定の成果が現れている。一方、疾患感受性ではなく薬の作用とゲノム情報を結びつけることにより、特定の患者における薬理応答性に関連する要因を見出そうという研究分野が薬理遺伝学である。これは個々の患者の薬による副作用のリスクや効果を投与開始前に予測することができれば、より安全で適切な薬物療法の提供、すなわち、オーダーメイド投薬が可能となる。この際に使うゲノムバイオマーカーとして SNP (single nucleotide polymorphism)を臨床応用しようとする試みが世界的な趨勢になってきている。申請者は以前より消化管領域のバイオマーカーの探索をおこなっており、臨床的なバイオマーカーとして食道の背景粘膜所見が食道の重複癌の発症に関連することや遺伝的なバイオマーカーとして十二指腸潰瘍の発症に PSCA 遺伝子上の多型が関連することについて報告してきた。

消化管領域の疾患のなかで、炎症性腸疾患は、原因不明な炎症が腸管に繰り返しおこす難治性疾患である。大部分の患者が生涯にわたって寛解と再燃を繰り返す疾患であり、20歳代から40歳代を中心に国内だけで10万人以上が罹患している。近年、炎症性腸疾患の治療薬はメサラジンやインフリキシマブ、アダリムマブなどの新規治療薬が開発されてきており、これまでに寛解導入や寛解維持が困難であった患者に対しても病勢のコントロールが可能になりつつある。しかしながら新規治療薬のインフリキシマブやアダリムマブなどの抗 TNF 治療薬についてはアナフィラキシー反応やインフリキシマブ/アダリムマブ抗体の産生、免疫抑制などの重篤な副作用が認められ、さらに現時点では投与終了時期のコンセンサスが得られていないため、寛解導入後も寛解維持のため1回の投与あたり約30万円という高額な薬剤を投与し続けなければならないといった医療経済的な負担も指摘されている。このため薬剤応答に対するバイオマーカーの同定が試みられているが、現時点では見つかっていない。しかしながら抗 TNF 治療薬は関節リウマチの治療薬としても用いられており、この領域では薬剤応答に関連するゲノムバイオマ

ーカーがいくつか報告されていることから、炎症性腸疾患においても同様にゲノムバイオマーカーが存在すると考えられる。また、既存の炎症性腸疾患治療薬においてもメソトレキセートやアザチオプリンで慢性関節リウマチの効果に関するゲノムバイオマーカーが報告されており、アザチオプリンに関しては TPMT 遺伝子の多型が副作用発症のバイオマーカーになることが FDA に承認されていることなどから、炎症性腸疾患の治療効果に関わるゲノムバイオマーカーも存在すると考えられる。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患の再燃・寛解を繰り返す難治例には遺伝的な素因が関わっている可能性が高いが、これについても未解明である。本研究では主に炎症性腸疾患の治療効果の遺伝性要素を検出し、治療法選択のバイオマーカーの検索と共に、治療感受性に即した治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 炎症性腸疾患患者のヒト由来試料および臨床情報の収集

広島大学および関連施設にて書面による同意を得た上で提供されるヒト由来試料(血液)及び診療情報を用いる。試料および診療情報を連結可能匿名化してデータベース化する。

ヒト血液由来試料からゲノム DNA を抽出する。また診療情報から患者背景(喫煙歴、飲酒歴、BMI など)、炎症性腸疾患の病勢の推移と治療薬の投与履歴から治療薬の効果判定を行う。さらに定期的におこなっている大腸内視鏡検査の際に組織を生検にて採取する。症例数として1000人(広島大学病院600例、関連病院400例)の試料および資料について収集する。

(2) 炎症性腸疾患治療薬の薬剤応答に関連のある SNP の同定。

インフリキシマブやアダリムマブ、タクロリムスといった寛解導入や寛解維持につかわれる薬剤を中心に血中濃度や治療効果といった薬剤応答と関連のある SNP について探索する。探索をおこなう SNP は HAPMAP JPT に含まれる SNP のなかで、薬剤の代謝に関わる遺伝子付近および遺伝子上にある SNP について探索を行う。薬剤応答と有意に関連する SNP を発見した後は、独立した別サンプルにて追試を行い、再現性を確認する。

再現性が確認された後に発見された SNP がアミノ酸置換を伴う、スプライシングバリエーションを変化させるといった機能的な SNP でないかについて検討する。機能的な SNP でなかった場合、direct sequence をもちいてリシーケンシングを行い、mutation やレアな variant の検索を行う。また imputation や fine mapping を行い、機能的な SNP が発見された SNP と強い連鎖不平衡な状態かについて検討を行う。薬剤応答に環境要因が関連ある場合には logistic 解析を行い、環境要因からも独立したリスク要因であることを確認する。複数の関連がある SNP が見つかった場合は weighted genetic risk score を用いた calculative な risk score を算出する。

4. 研究成果

(1) 試料の収集

我々は広島大学および関連施設にて書面による同意と得た上で提供されるヒト由来試料（血液）と診療情報を解析に用いた。診療情報を連結可能匿名化おこなったのち、患者背景（生活歴や身長・体重など）、炎症性腸疾患の病勢の推移と治療薬の投与履歴や治療法の効果について抽出した。血液からは gDNA の抽出をおこなった。試料の提供は 1000 例を予定としていたが、最終的に 545 例にとどまった。この理由とし当施設への 1 回のみ受診が一定数存在したことや、関連病院での試料の提供数が当初の予定よりすくなくあったことがあげられる。平成 25 年度を目処としていたが、平成 26 年度の収集を継続していた。

(2) 解析

まずは収集したサンプルの診療情報を解析し、TNF 製剤の使用者を抽出し、抽出したサンプルについて TNF 代謝経路の遺伝子上のアミノ酸置換に関連する SNP のタイピングを

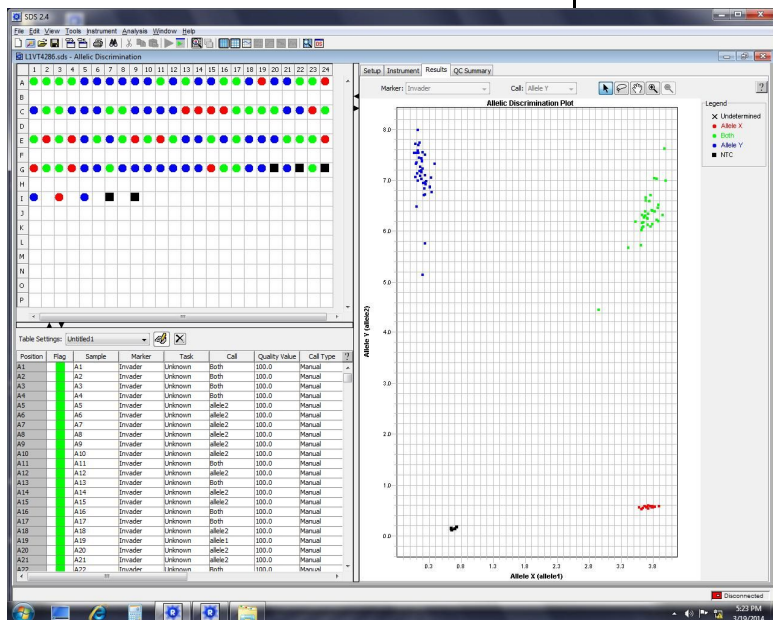
インベーター法にて行った。TNF 製剤の responder 例と nonresponder にわけて解析を行った結果、多重検定で補正した後も有為な関連のある SNP は発見できなかった。さらにタクロリムス使用者や G-CAP、L-CAP 使用者についても解析をおこなったが有為に関連を得ることはできなかった。さらに解析の範囲を HAPMAP に含まれていない SNP やスプライスサイト上の SNP、炎症性腸疾患の発症に関連のある SNP などに広げて解析をおこなってみたが、いずれも有為な関連を得ることができなかった。

(3) 考察

有為な結果を得ることができなかった原因として、治療が治験などと比較し条件設定を細かくすることができず、多種の薬剤が同時に投与させているため、どの薬剤の効果があつたのかははっきりとしないことや多剤による相互作用の影響を受けて一つの薬剤の治療効果を判断することが困難であった点があげられる。またサンプルの治療効果治療効果を判定後に治療が聞いてきた例や再燃後時の治療薬が効果不十分で追加で別の治療薬を行ったため、治療効果をリアルタイムで反映出来ず、responder か nonresponder のどちらの群にのり入れるべきか判定困難な例が多数認められた。特に他施設のサンプルではタイムラグがあり、進行する治療効果を逐一手に入れることができなかった点があげられる。また網羅的な解析ではなかったため、実験をおこなったあとに再度治療薬の変更などがあり、タイピングのサンプル集団を再考しなおす必要も多々認められ、タイピングを施行し直す必要もあつた。また全体のサンプルサイズは十分であっても薬剤毎では十数例にとどまる治療法が多く、検出力をみることができなかった点も要因であると考えられる。

(4) Future Plan

ターゲットを絞り込んだ解析では非常に困難であり、まずは次世代シーケンサーや BeadChip などによる網羅的なタイピングやシーケンスを用い、その後に臨床情報などを加味しながらサンプルの選択や responder と nonresponder の選定を行っていく方が効率よく解析ができると考えられる。またサンプルサイズを増加させるため、他施設との共同研究も視野に入れていく。また薬効では多剤使用による相互作用などから解析が非常に困難であったが、副作用では比較的どのような薬剤かの特定が用意であるため、副作用



の発症に關与するゲノムマーカーの探索を検討していく。また同一家系内で薬効や副作用の発症に差があるサンプルが複数存在しており、このようなサンプルを用いた Trio 解析をおこなえば、サンプル数が少なくとも解析も用意であることから、家系サンプルの検索も今後おこなっていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/gitract/>

6．研究組織

(1)研究代表者

卜部 祐司 (Yuji Urabe)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医

科学研究センター・客員研究員

研究者番号：10648033