

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08976

研究課題名(和文) NUDT15遺伝子多型を用いた炎症性腸疾患の個別化医療へ向けたエビデンスの確立

研究課題名(英文) Precision medicine using NUDT15 variant for thiopurine therapy in inflammatory bowel diseases

研究代表者

中村 志郎 (Nakamura, Shiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：50271185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：チオプリン製剤は炎症性腸疾患の治療で用いられ、副作用として全脱毛や白血球減少症がある。この原因は不明であったが、2014年にNUDT15遺伝子の変異が副作用と強く相関すると韓国から報告された。よって我々は、この結果が日本人で再現できるか、またどのような分子機構が関連するか検討した。本研究で、我々は日本人でもNUDT15遺伝子の変異により副作用が生じることが説明でき、またこの変異の保有者は、通常型の人に比べより少量でかつ治療効果も高いことを見つけた。またこの変異により遺伝子機能の喪失が起こり副作用が生じる可能性を示唆した。NUDT15はチオプリン誘発性の副作用を予測できる遺伝子マーカーである。

研究成果の概要(英文)：Thiopurines are generally used for the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD), but induce adverse events (AEs) including severe hair loss and early leukopenia. The causes of those AEs in Japanese IBD patients remain unknown. In 2014, it was reported that NUDT15 genetic variant was strongly associated with those AEs in Korean IBD patients. Therefore, we investigated whether this association could be replicated in Japanese and how this gene was involved in thiopurine-induced cell death. In this study, we could replicate the strong associations, and found that the carriers of risk allele in NUDT15 gene could be followed up with lower dose of thiopurine and better clinical efficacy than those of non-risk allele. We generated NUDT15 deficient cells to investigate the molecular mechanisms of thiopurine-induced cell death, and found that this genetic variant might induce loss of function of NUDT15. NUDT15 is a promising genetic marker for the prediction of thiopurine-induced AEs.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：NUDT15 炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 クロウン病 チオプリン 個別化医療 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Diseases, 以降 IBD) 等の治療薬として用いられるチオプリン製剤(アザチオプリン、メルカプトプリン)では、全脱毛や早期白血球減少症などの副作用がこれまで問題であった。

欧米では TPMT 遺伝子多型がチオプリン誘発性の白血球減少症に強く関連することから、内服開始前に TPMT testing が臨床応用され、一般的に利用できる状態になっているが、日本人では多型頻度が低く、臨床応用する意義は低いとされてきた。またアジア人では TPMT 遺伝子多型が通常型でも欧米人よりむしろ高い頻度で上記の副作用が生じることから、アジア人では TPMT 以外の原因となる遺伝子の存在が想定されていた。

2014年のYang SKらの報告により、NUDT15 R139C多型が韓国人ではTPMTより上記の副作用と非常に強く関連することが報告された。これにより日本人でこれまでTPMT遺伝子では説明のつかなかった副作用がNUDT15遺伝子多型で説明できる可能性が示唆された。

しかしながら本研究の申請時点で、日本人におけるデータがなく韓国人と同様な結果が replicate されるか不明で、また副作用に至る分子メカニズムもNUDT15遺伝子の機能も未知のままであった。

もし日本人においてもYang SKらの結果が再現されれば、感度、特異度とも非常に高いことから日本人におけるチオプリン誘発性副作用の予測の強力な genetic marker となることが考えられ、臨床応用に向けて本研究内容は是非検討すべき課題であった。

2. 研究の目的

(1)本研究では、日本人IBD患者においてもYang SKらの結果が再現されるかどうかを第一の目的とした。

(2)また再現できればYang SKらの報告では韓国人IBD患者において感度、特異度とも非常に高いことから日本人におけるチオプリン誘発性副作用の予測の強力な genetic marker となることが考えられ、臨床に利用できるエビデンスの確立を目的とした。

(3)副作用予防に利用できる可能性があるため、NUDT15遺伝子の機能やチオプリン投与後の細胞死のメカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)日本人IBD患者におけるNUDT15遺伝子多型と白血球減少症や全脱毛などの副作用

の相関を調べるため、本研究に同意が得られた患者の末梢血より genomic DNA を抽出する。その後 Taqman SNP Genotyping Assays または Sanger 法にて遺伝子多型を解析する。

(2)その遺伝子多型の頻度と、白血球減少症、全脱毛、膵炎等のチオプリン誘発性の副作用と相関性があるか検討する。またその副作用を生じるまでの期間や副作用時のチオプリン服用量と R139C genotype の相関性も検討する。

(3)NUDT15 R139C多型におけるC/CおよびC/T genotypeにおいて、目標とするチオプリン投与量やチオプリンの活性代謝産物6-TGN値に差異があるか調べるためチオプリン量や6-TGN値を測定し、genotypeとの関係性を検討する。

(4)NUDT15 R139C多型におけるC/CおよびC/T genotypeにおいて、チオプリンの治療効果に差異があるか、また治療効果予測のマーカーとなりうるかの検討を患者カルテより後ろ向きに検討を行う。

(5)CRISPR/Cas9 system を用いて細胞株に対しNUDT15遺伝子の欠損株と変異株(p.Arg139Cys)を作製する。

(6)上記(4)で作製した細胞を用い、6-MP添加後の細胞増殖能や細胞死を評価し、NUDT15の遺伝子機能や細胞死の分子メカニズムを検討する。

4. 研究成果

(1)日本人IBD患者におけるNUDT15遺伝子多型と白血球減少症や全脱毛などの副作用の相関

2014年にYang SKらは、NUDT15遺伝子のexon3のp.Arg139Cysとの強い相関を報告したが、本研究開始後、2016年にMoriyama Tらにより、NUDT15遺伝子の詳細な解析が報告され、それらも含めて解析を行った。チオプリン製剤治療歴のある160名のIBD患者のDNAを用いて遺伝子多型の解析を行った。NUDT15遺伝子のexon1に存在するp.Val18_Val19insGlyVal (SNP ID: rs554405994)とp.Val18Ile (rs186364861)、またexon3に存在するp.Arg139Cys (rs116855232)とp.Arg139His (rs147390019)の合計4つの遺伝子多型をTaqman法或いはSanger法で解析した。p.Arg139Hisにおいては変異のあるサンプルを認めなかった。嘔気などの消化器症状で内服中止となった11名を除く149名において内服開始後の白血球減少症と全脱毛と上記遺伝子多型との解析では、p.Arg139Cysは強い相関性を認めた(P<0.0001)。p.Val18_Val19insGlyValと

p.Val181Ile に関しては有意差を認めなかった。よって p.Arg139Cys がチオプリン製剤の副作用予測の強いマーカーとなることが確認された。また R139C T/T genotype の症例は全例副作用により早期にチオプリン中止となっていたが、内服継続できた C/C と C/T genotype の症例において、白血球減少症に至るまでの期間を検討すると、C/T では有意に早期に白血球減少症をきたしていた ($P < 0.0009$)。これらの結果は 2017 年に Intestinal research 誌に publish された。我々の研究結果だけでなく、日本の他施設からの報告でも同様の結果で、韓国人で報告された強い相関性は日本人でも再現された。

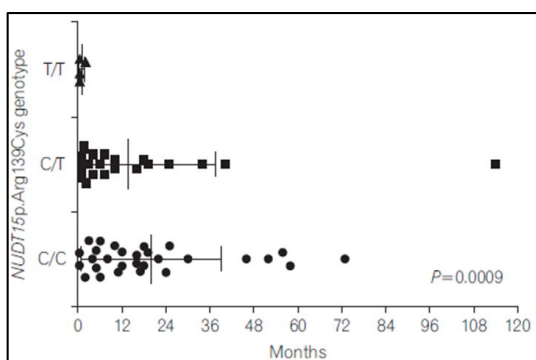


Figure. チオプリン開始から白血球減少症をきたすまでの期間の比較 (Sato T, Takagawa T et al. Intest Res. 2017 Jul;15(3):328-337 より引用)

(2)臨床に応用できるエビデンスの確立を目的とし、NUDT15 R139C 多型の C/C と C/T genotype におけるチオプリン開始後の臨床経過を検討した。

C/C189 例、C/T60 例を対象に 2 群で後ろ向きに検討を行った。チオプリン内服開始 1 年後の内服量 (6-MP は azathioprine [AZA] に換算) は、C/C 群 (AZA129 例、6-MP29 例) 57.4 ± 22.6 mg/日に対し、C/T 群 (AZA31 例、6MP11 例) 44.6 ± 23.0 と有意に低かった ($p < 0.01$)。また 1 年後 MCV は C/T 群 6.8 ± 6.2 fl で、C/C 群 4.3 ± 6.9 に比べ有意に上昇していた ($p < 0.01$)。チオプリン内服開始後、1 年以内に白血球 $4000/\mu\text{l}$ 未満になる割合は C/T 群 71% で C/C 群 42% に比べ有意に高く ($p < 0.001$)。チオプリン製剤以外の他剤累積治療追加率は 1 年後で C/T 群 19% (8/42) と C/C 群 46% (73/158) に比べ有意に低値だった ($p = 0.02$)。特に抗 TNF 抗体未投与チオプリン単独治療例では、累積治療追加率が C/T 群で C/C 群に比し有意に低率だった ($p < 0.001$)。また寛解維持期 6-TGN 値は C/T 群で 179.6 ± 97.3 pmol/8 x 10^8 RBC で、C/C 群 322.4 ± 152.5 に比べ有意に低値だった ($p < 0.001$)。よって C/T 症例は C/C 症例より少量のチオプリン投与でよく反応し、他剤治療追加が少なく治療経過が良好であった。チオプリン開始前の NUDT15

genotyping は T/T 症例の副作用回避のみならず C/T 症例の治療最適化にも有用であると考えられる。これらの検討は現在投稿準備中である。これまで日本でのチオプリン療法は、6-TGN 値 235-450 pmol/8 x 10^8 RBC の範囲にあれば治療効果域とみなされてきたが、本研究により C/T 症例はそれよりも低く 100-250 pmol/8 x 10^8 RBC の範囲でも寛解維持ができる可能性が示唆され、C/T 症例の治療効果域の設定には今後症例を増やしエビデンスを強くしていく必要がある。

(3) CRISPR/Cas9 system を用いた細胞株に対する NUDT15 遺伝子の欠損株と変異株 (p.Arg139Cys) の作製と、細胞増殖能や細胞死の評価

Jurkat cells, HEK293T cells において、CRISPR/Cas9 system を用い NUDT15 欠損細胞を作製した。その後 western blot, FACS 等で細胞死を、また WST-8 assay にて細胞増殖の評価を行った。細胞にチオプリン製剤を投与し western blotting で評価を行った。6-MP 添加後、NUDT15 欠損細胞では control 細胞と比較し apoptosis のマーカーである cleaved Caspase3 をより強く認め、Autophagy 誘導の代表的なマーカーである LC3-II の強い発現を認めた。また MAP kinase 関連分子のリン酸化が NUDT15 欠損細胞で強く誘導されていた。FACS においても同様の傾向で NUDT15 欠損細胞において多くの Annexin V+, propidium iodide+細胞が認められた。WST-8 による細胞増殖の評価においては、6-MP 添加後、NUDT15 欠損細胞において細胞増殖能が低下していた。これらの結果より R139C 多型は loss of function 型の変異であると考えられる。また NUDT15 欠損細胞に NUDT15 wild type あるいは NUDT15 mutant (p.Arg139Cys) の発現ベクターを transfection し、stable cell line を作製した。現在これらの細胞を用い実験継続中で、autophagy や apoptosis に関連する分子メカニズムを検討している。

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 1 件)

1. NUDT15, FT0, and RUNX1 genetic variants and thiopurine intolerance among Japanese patients with inflammatory bowel diseases. Toshiyuki Sato, Tetsuya Takagawa, Yoichi Kakuta, Akihiro Nishio, Mikio Kawai, Koji Kamikozuru, Yoko Yokoyama, Yuko Kita, Takako Miyazaki, Masaki Iimuro, Nobuyuki Hida, Kazutoshi Hori, Hiroki Ikeuchi, Shiro Nakamura Intest Res. 2017 Jul;15(3):328-337. doi: 10.5217/ir.2017.15.3.328. Epub 2017 Jun

12.

〔学会発表〕(計 7件)

(1) 高川哲也, 佐藤寿行, 角田洋一, 西尾昭宏, 河合幹夫, 上小鶴孝二, 横山陽子, 木田裕子, 宮寄孝子, 飯室正樹, 樋田信幸, 堀和敏, 池内浩基, 中村志郎 Diplotype 分類に基づいた NUDT15 活性レベルと炎症性腸疾患患者のチオプリン誘発性白血球減少症及び全脱毛の相関. 第 25 回日本消化器関連学会週間 2107.10.13 福岡

(2) 高川哲也, 佐藤寿行, 角田洋一, 藤森絢子, 小柴良司, 藤本晃士, 河合幹夫, 上小鶴孝二, 横山陽子, 木田裕子, 宮寄孝子, 樋田信幸, 渡辺憲治, 堀和敏, 池内浩基, 中村志郎. NUDT15 genotype に応じたチオプリン製剤を用いた IBD の治療戦略. 厚生労働科学研究 難治性疾患等政策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成 29 年度第 1 回総会 2017.7.19 東京

(3) 角田洋一, 木内喜孝, 中村志郎, 高川哲也, 花井洋行, 池谷賢太郎, 櫻庭裕丈, 西田淳史, 佐々木誠人, 岡庭紀子, 久松理一, 小林拓, 小野寺馨, 石黒陽, 篠崎大, 長沼誠, 平岡佐規子, 荒木寛司, 佐々木悠, 志賀永嗣, 本谷聡, 小野寺基之, 松岡克善, 藤谷幹浩, 佐藤雄一郎, 桂田武彦, 梁井俊一, 穂苅量太, 石原俊治, 新井勝大, 野口光徳, 中川倫夫, 加藤順, 杉田昭, 松浦稔, 遠藤克哉, 内藤健夫, 諸井林太郎, 黒羽正剛, 木村智哉, 金澤義丈, 安藤朗, 鈴木康夫, 下瀬川徹. チオプリン不耐症を判別する NUDT15 遺伝子検査の開発を軸とした炎症性腸疾患治療薬に関係する遺伝子マーカーの探索と臨床応用研究(MENDEL Study). 厚生労働科学研究 難治性疾患等政策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成 29 年度第 1 回総会 2017.7.19 東京

(4) Sato Toshiyuki, Takagawa Tetsuya, Kakuta Yoichi, Fujimori Ayako, Koshihara Ryoji, Fujimoto Koji, Kaw ai Mikio, Kamikozuru Koji, Yokoyama Yoko, Kita Yuko, Miyazaki Takako, Imuro Masaki, Watanabe Kenji, Hida Nobuyuki, Hori Kazutoshi, Ikeuchi Hiroki, Nakamura Shiro. Thiopurine-induced Leukopenia Is Associated with a Variant in NUDT15, but Not FTO and RUNX1 in Japanese Patients with Inflammatory Bowel Diseases. The 5rd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis (AOCC) Poster Oral 2017.6.17 Seoul

(5) 高川哲也, 佐藤寿行, 角田洋一, 西尾昭宏, 河合幹夫, 上小鶴孝二, 横山陽子, 木田裕子, 宮寄孝子, 樋田信幸, 堀和敏,

中村志郎. 日本人 IBD 患者のチオプリン関連副作用予測における NUDT15 遺伝子多型の優位性(FTO 及び RUNX1 遺伝子との比較). 厚生労働科学研究 難治性疾患等政策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成 28 年度第 2 回総会 2017.1.20 東京

(6) 角田洋一, 木内喜孝, 内藤健夫, 花井洋行, 飯田貴之, 佐々木誠人, 岡庭紀子, 中村志郎, 高川哲也, 西田淳史, 久松理一, 小林拓, 篠崎大, 小野寺馨, 石黒陽, 志賀永嗣, 櫻庭裕丈, 平岡佐規子, 長沼誠, 穂苅量太, 桂田武彦, 梁井俊一, 本谷聡, 石原俊治, 藤谷幹浩, 新井勝大, 中川倫夫, 加藤順, 野口光徳, 遠藤克哉, 安藤朗, 鈴木康夫, 下瀬川徹. 「炎症性腸疾患患者におけるチオプリン関連副作用と NUDT15 遺伝子多型との相関性に関する多施設共同研究(MENDEL Study)」. 厚生労働科学研究 難治性疾患等政策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成 28 年度第 2 回総会 2017.1.20 東京

(7) 高川哲也, 佐藤寿行, 河合幹夫, 上小鶴孝二, 横山陽子, 木田裕子, 宮寄孝子, 飯室正樹, 樋田信幸, 堀和敏, 中村志郎. NUDT15 Knockout cells を用いた NUDT15 遺伝子変異からチオプリン誘発性白血球減少症に至る分子メカニズムの解明. 厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成 27 年度第 2 回総会 2016.1.22 東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 志郎 (Shiro, Nakamura)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：50271185

(2) 研究分担者

高川 哲也 (Tetsuya, Takagawa)

兵庫医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：20444614

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()