

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17443

研究課題名(和文) NUDT15遺伝子に着目したチオプリン製剤の薬物動態の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Thiopurine metabolism associated with NUDT15 gene and clinical application.

研究代表者

清原 裕貴 (Hiroki, Kiyohara)

北里大学・北里研究所病院・医師

研究者番号：20626379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：NUDT15遺伝子変異を有する炎症性腸疾患患者において免疫調節薬(IM)による重篤な白血球減少が起こる機序解明を目的とした。IM使用患者のリンパ球DNAにはIMの代謝産物である deoxy-thioguanosine (dTG)が取り込まれるが、NUDT15 R139C変異により末梢血単核球DNAへdTGの取り込みが促進していた。また単核球DNA中のdTG濃度と末梢血リンパ球数の間に負の相関があり、IM未使用患者由来の末梢血CD4+T細胞と、IMの誘導体である6-thioguanineの共培養により、NUDT15遺伝子変異を有する患者でリンパ球のアポトーシスが促進されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりNUDT15遺伝子変異(R139C)の存在によって、白血球減少が相対的に低用量の免疫調節薬の使用でも起こりやすい機序の一つが明らかとなった。将来的に、リンパ球DNA中のdTG濃度が、個体差の大きいIMの至適投与量の評価として有用である可能性が示されたことに加え、NUDT15遺伝子多型(R139C)を有する患者においては、特にこのdTGのリンパ球DNAへの取り込みを介したアポトーシスが促進されており、IMの薬理学的な作用とアポトーシスとの間に関連がある可能性が示され、これまで十分に明らかとなっていなかったIMの作用機序解明の一助となりうる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to investigate why severe leukocytopenia is induced by thiopurine particularly in patients with NUDT15 genetic variant (R139C).

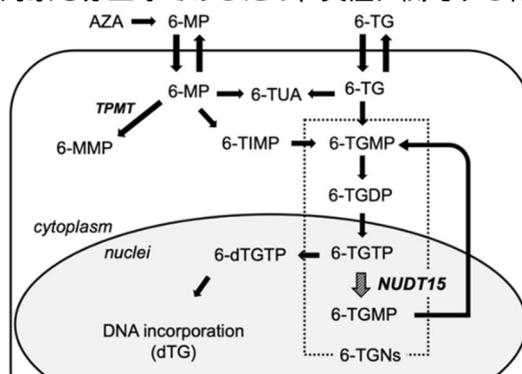
Deoxy-thioguanosine (dTG) is a metabolite of thiopurine, and the incorporation of dTG into lymphocytes was accelerated in patients with NUDT15 genetic variant (R139C). Furthermore, dTG concentration in the DNA of peripheral mononuclear cells was inversely correlated with leukocyte count in peripheral blood. Finally, a thiopurine derivative, 6-thioguanine, was co-cultured with CD4+ lymphocytes derived from patients without thiopurine treatment, and the apoptosis of the lymphocytes was accelerated in NUDT15 (R139C) variant.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 チオプリン NUDT15

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患患者の治療において、IM であるチオプリン製剤(アザチオプリンおよび 6-メルカプトプリン)は、5-アミノサリチル酸製剤のみで寛解状態を維持することが困難な症例における寛解維持療法や、生物学的製剤の投与を必要とする難治例における併用療法など、主要な薬剤として位置づけられる。このチオプリン製剤は必要な投与量や副作用の発現において、個体差が大きいという特徴がある。その理由には、薬物の代謝産物が薬効のほかに副作用の発現にも関与しており、さらに薬物代謝酵素の活性に個体差が大きいことが挙げられる。チオプリン製剤の体内の代謝は(図 1)のように複雑な経路から成り立つ。アザチオプリンや 6-メルカプトプリンは体内で 6-thioguanin nucleotides (6-TGN)と総称される物質へ代謝される。この中で 6-thioguanosine triphosphate (6-TGTP)は 6-deoxy-thioguanosine triphosphate (6-dTGTP)に代謝され白血球中の DNA に組み込まれて、白血球のアポトーシスを誘導することが *in vitro* で報告されている<sup>(1)</sup>。チオプリン製剤の作用が過剰となることにより、白血球減少症という副作用が問題となる。チオプリン製剤の投与により、重篤な脱毛や白血球減少症を来す症例が存在し、こうした症例では投与量の減量や時に投与中止が必要となる。これまでに、チオプリン-S メチルトランスフェラーゼ(TPMT)やイノシントリフォスファターゼ(ITPase)の酵素活性の違いが、チオプリン製剤の副作用リスクと関連していることが知られているが、日本を含むアジア人においては欧米人に比べて TPMT 変異の頻度が低いにも関わらず、相対的に低用量で白血球減少を含めた用量依存性の副作用が出現しやすい。これは TPMT や ITPase の酵素活性の差以外にも規定因子があることが示唆する事実である。近年 *Nudix Hydrolase 15 (NUDT15)* 遺伝子のコドン 139 における遺伝子多型 (R139C)が、アジア人のチオプリン製剤投与後の白血球減少発現と非常に強い相関があることが明らかとなっており<sup>(2)</sup>、本邦においても同様のことが報告された<sup>(3)</sup>。実際に、*NUDT15* は本邦の炎症性腸疾患患者の約 20%で変異型を有する<sup>(4)</sup>。変異型の患者の多くはヘテロ(C/T)変異を有し、野生型の患者(C/C)に比べ少量の投与で治療効果の発現や、用量依存的な副作用である白血球減少を呈するが、ホモ変異(T/T)を有する患者においてはごく少量のチオプリン製剤の投与でも重篤な白血球減少や脱毛を起こすため、一般にチオプリン製剤の投与は困難である。*NUDT15* は、6-TGTP を 6-チオグアノシン 1 リン酸(6-TGMP)へ変換する役割を有する酵素である(図 1)。NUDT15 に遺伝子多型があることにより、6-TGTP および 6-dTGTP が増加し、白血球 DNA 中に取り込まれる 6-dTGTP が増加すると考えられている。白血球減少の起こるメカニズムの一つとして、この DNA への取り込みによりアポトーシスが誘導される可能性があるが、実際の炎症性腸疾患患者においてこうした 6-TGTP の関与する機序に関してはこれまでに明らかとなっていない。さらに、チオプリン製剤の投与量の指標として、欧米においては赤血球中の 6-TGN 濃度測定が普及しているが、本邦ではほとんどの施設において測定することができないという現状がある。またこの測定系は、6-TGTP や 6-TGMP などを含む総 6-TGN としての濃度測定系であり、測定対象も赤血球であるため、炎症に關与する白血球に 6-dTGTP が取り込まれる程度を反映していないという問題点があること、さらに本邦においては *NUDT15* 遺伝子多型により総 6-TGN 濃度に比して 6-TGTP 濃度が相対的に高い症例が少なからず存在すると考えられ、赤血球中の総 6-TGN 濃度は本邦においては必ずしもチオプリン製剤の白血球への影響を正確に反映していない可能性がある。そこで、チオプリン製剤の投与量の妥当性を判断するための赤血球中総 6-TGN 濃度に代わる新たな指標の模索が必要である。加えて、*NUDT15* の遺伝子多型がいかんして白血球減少の副作用に関与し、またチオプリン製剤投与中の白血球減少は寛解維持療法のアウトカムにおいてどのような影響を与えるのかについては今後明らかにする必要がある。



(図 1) チオプリン代謝経路

(文献(5)より一部改変して引用)

### 2. 研究の目的

本研究では、*NUDT15* 遺伝子多型を有することで、チオプリン製剤が白血球にどのような影響を与えるのか、特に白血球(末梢血単核球)中の DNA への取り込みとリンパ球のアポトーシスとの関連という点において明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象患者

チオプリン製剤投与患者における検討を行うため、2016年4月から2017年11月の間に北里大

学北里研究所病院に通院した炎症性腸疾患患者で、チオプリン製剤が投与され、研究協力の同意が得られた患者より末梢血を採取した。また、チオプリン誘導体によるリンパ球への影響を検証することを目的とした *ex vivo assay* のため、チオプリン製剤による治療を受けていない患者からも同様に末梢血を採取した。

## (2) *NUDT15* 遺伝子多型の同定

患者の末梢血に対して、TaqMan® single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping assay (Thermo Fisher Scientific) を用いて、*NUDT15* R139C SNP の同定を行った。この遺伝子型は野生型(CC)とヘテロ変異(CT)、ホモ変異(TT)に分類した。

## (3) 赤血球中 6-TGN 濃度と末梢血単核球 DNA 中 dTG 濃度の測定

チオプリン製剤投与患者から得られた末梢血球をもちいて、赤血球中 6-TGN 濃度(6TGN<sup>RBC</sup>, pmol/8x10<sup>6</sup> RBC)と、末梢血単核球 DNA にとりこまれた dTG 濃度(dTG<sup>PBMC</sup>, mol/10<sup>6</sup> moles dA)の検討を行った。6TGN<sup>RBC</sup> は、liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 法により測定した。dTG<sup>PBMC</sup> については、Vacutainer CPT Mononuclear Cell Preparation Tubes (BD Biosciences)を用いて末梢血単核球(PBMC)を単離し、LC-MS/MS 法を用いて測定した。測定された dTG 濃度は deoxyadenosine 濃度によって標準化して評価した。

## (4) 臨床データの収集

北里大学北里研究所病院において診療録より後方視的に患者情報の収集を行った。本研究においては、患者背景として年齢、性別、体重、罹病期間、チオプリン製剤の投与量と投与期間、併用された治療薬、また血液検査結果より検体採取時点における白血球数とリンパ球数を収集し、チオプリン製剤の投与量やリンパ球数に対する 6TGN<sup>RBC</sup>, dTG<sup>PBMC</sup> との比較検討を *NUDT15* 遺伝子変異有無別に実施した。なお、チオプリン製剤には 6-メルカプトプリン(6-MP)とそのプロドラッグであるアザチオプリン(AZA)の 2 種類があり、本研究では AZA の投与量を 2.08 で除すことで当力価の 6-MP の投与量に換算して評価した<sup>(6)</sup>。

## (5) チオプリン誘導体と CD4<sup>+</sup>T 細胞による *ex vivo assay*

チオプリン製剤への曝露によりリンパ球のアポトーシスが誘導されることがこれまでの報告から明らかとなっているが、*NUDT15* 遺伝子多型の違いがこの過程に及ぼす影響を検証するために、チオプリン製剤を使用していない患者由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞を MACS magnetic beads (Miltenyi Biotec)を用いて単離し、チオプリン誘導体である 6-thioguanine (6-TG)との共培養を *ex vivo* で実施した。共培養後のリンパ球のアポトーシスの頻度を、Annexin V の標識によるフローサイトメトリーで評価し、また CFSE Cell Division Tracker Kit (BioLegend)を用いて細胞増殖の評価を行った。細胞増殖の評価は 6-TG 添加群と非添加群の細胞増殖の比率の差をもって比較検討を行った。

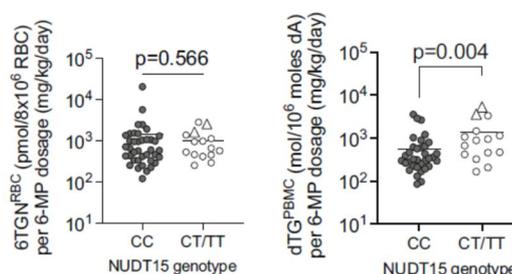
## 4. 研究成果

### (1) 患者背景

チオプリン製剤による治療を受けている 54 名の患者において *NUDT15* 遺伝子多型の同定ならびに 6TGN<sup>RBC</sup>, dTG<sup>PBMC</sup>, チオプリン製剤の投与量、末梢血リンパ球数の検討を行った。*NUDT15* 遺伝子多型の内訳は CC(野生型), 39 名; CT(ヘテロ変異型), 13 名; TT(ホモ変異型) 2 名であった。チオプリン製剤の投与量(中央値)は 6-MP として 0.33 mg/kg/day であり、多型別では CC 0.36 mg/kg/day; CT 0.27 mg/kg/day; TT 0.01 mg/kg/day であった(P=0.03, Kruskal-Wallis test)。

### (2) *NUDT15* 遺伝子多型別の薬物代謝産物濃度の比較

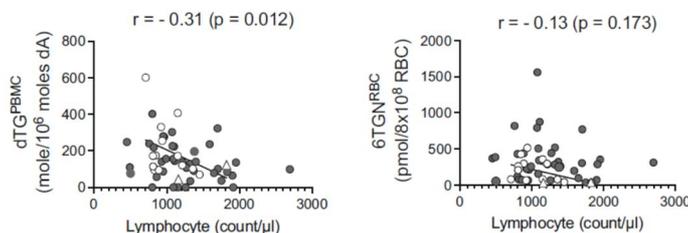
単位 6-MP 投与量 (mg/kg/day) あたりの 6TGN<sup>RBC</sup>, dTG<sup>PBMC</sup> を *NUDT15* 遺伝子変異の有無で比較検討を行った。6TGN<sup>RBC</sup> については *NUDT15* 遺伝子変異の有無によって差はみられなかったが、dTG<sup>PBMC</sup> (mean)は non-variants vs. heterozygous variants vs. homozygous variants, 295.3 vs. 663.0 vs. 4418.0 mol dA per mg/kg/day of 6-MP であり野生型に比べて変異型 (CT および TT) では同一の 6-MP 投与量に対して dTG<sup>PBMC</sup> が野生型患者に比べて高値になることが明らかとなった(図 2)。



(図 2) *NUDT15* 遺伝子変異とチオプリン代謝産物濃度

### (3) チオプリン代謝産物濃度と末梢血リンパ球数の相関

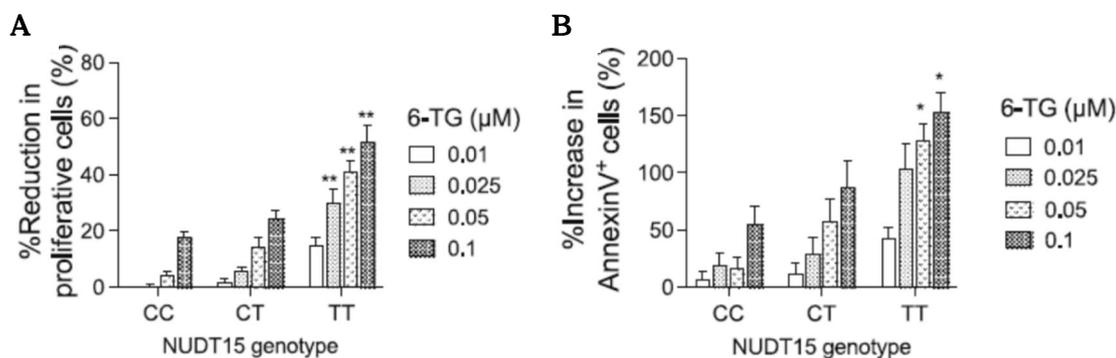
Spearman の順位相関係数に基づく全患者集団における相関の検討では、dTG<sup>PBMC</sup> と末梢血リンパ球数との間には負の相関がみられた( $r=-0.31$ ,  $P=0.012$ )一方で、6TGN<sup>RBC</sup> と末梢血リンパ球数の間に相関はみられなかった( $r=-0.13$ ,  $P=0.173$ ) (図 3)。これらの結果から、NUDT15 遺伝子変異の存在を考慮すると、末梢血単核球 DNA 中の dTG 濃度は赤血球中 6-TGN 濃度よりもチオプリン製剤投与量やリンパ球減少と強く相関することが示唆された。



(図 3) チオプリン代謝産物濃度と末梢血リンパ球数

#### (4) リンパ球のアポトーシス誘導における NUDT15 遺伝子変異のもつ影響

チオプリン製剤を使用していない患者由来の末梢血単核球から CD4<sup>+</sup>T 細胞を単離し、チオプリン誘導体である 6-TG と共培養すると経時的にリンパ球 DNA 中の dTG 濃度が上昇し、共培養開始から 72 時間後には CC, 311.0; CT, 554.7; TT, 1070.0 fmol/μg DNA と NUDT15 遺伝子変異によって有意な取り込みの亢進がみられた。CD4<sup>+</sup>T 細胞の細胞増殖は共培養中の 6-TG 濃度の増加にともない減少しており、またホモ変異においてその傾向は明らかであった(図 4A)。また Annexin V の蛍光標識を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシスの検討においても、6-TG 濃度の上昇にともなうアポトーシス細胞の増加とともに、細胞増殖と同様ホモ変異においてアポトーシスが顕著に増加することが示された(図 4B)



(図 4) 6-TG による CD4<sup>+</sup>T 細胞の細胞増殖とアポトーシスへの影響

#### (5) まとめ

今回の研究成果から、NUDT15 遺伝子多型を有する炎症性腸疾患患者においては、末梢血単核球 DNA 中の dTG 濃度が野生型の患者に比べて上昇しやすいことが明らかとなった。さらに *ex vivo* assay において同遺伝子変異を有する患者由来の CD4<sup>+</sup>T 細胞では dTG の DNA への取り込みを介したアポトーシスが促進されていた。これらの結果より、NUDT15 遺伝子変異を有する炎症性腸疾患患者において、チオプリン製剤によって白血球減少が起こるメカニズムとして、リンパ球中の DNA への dTG の取り込み亢進によるアポトーシスの促進が起こっている可能性が示唆された。

#### <引用文献>

- (1) Moriyama T, et al. Nat Genet 2016; 48:367-73.
- (2) Yang SK, et al. Nat Genetics 2014; 46:1017-20.
- (3) Kakuta Y, et al. Pharmacogenomics J. 2016; 16:280-5.
- (4) Kakuta Y, et al. J Gastroenterol. 2018; 53:1065-1078.
- (5) Toyonaga T, et al. J Gastroenterol. 2021; 56:999-1007
- (6) Derijks LJ, et al. Aliment Pharmacol Ther. 2006; 24:715-29.

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toyonaga Takahiko, Kobayashi Taku, Kuronuma Satoshi, Ueno Aito, Kiyohara Hiroki, Okabayashi Shinji, Takeuchi Osamu, Redfern Christopher P. F., Terai Hideki, Ozaki Ryo, Sagami Shintaro, Nakano Masaru, Coulthard Sally A., Tanaka Yoichi, Hibi Toshifumi	4. 巻 56
2. 論文標題 Increased DNA-incorporated thiopurine metabolite as a possible mechanism for leukocytopenia through cell apoptosis in inflammatory bowel disease patients with NUDT15 mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 999 ~ 1007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01820-0	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroki Kiyohara, Taku Kobayashi, Takahiko Toyonaga, Satoshi Kuronuma, Aito Ueno, Shinji Okabayashi, Osamu Takeuchi, Sally A. Coulthard, Christopher P. F. Redfern, Hideki Terai, Yoichi Tanaka, Ryo Ozaki, Masaru Nakano, Toshifumi Hibi
2. 発表標題 NUDT15 variance increases DNA-incorporated thiopurine metabolites and lymphocyte apoptosis in patients with inflammatory bowel disease.
3. 学会等名 15th Congress of ECCO (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究協力者	小林 拓 (Kobayashi Taku)  (10424144)	北里大学北里研究所病院・炎症性腸疾患先進治療センター・センター長  (32607)	
研究協力者	竹内 修 (Takeuchi Osamu)  (00249997)	北里大学北里研究所病院・研究部・部長補佐  (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	豊永 貴彦 (Toyonaga Takahiko)  (30773634)	東京慈恵会医科大学・消化器・肝臓内科・助教  (32651)	
研究協力者	黒沼 智 (Kuronuma Satoshi)  (90748055)	北里大学北里研究所病院・研究部・上級研究員  (32607)	
研究協力者	佐上 晋太郎 (Sagami Shintaro)  (10837371)	北里大学北里研究所病院・消化器内科・医員  (32607)	
研究協力者	田中 庸一 (Tanaka Yoichi)  (40525341)	国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・主任研究官  (82601)	
研究協力者	中野 雅 (Nakano Masaru)  (50265807)	北里大学北里研究所病院・消化器内科・副院長・消化器内科部長  (32607)	
研究協力者	日比 紀文 (Hibi Toshifumi)  (50129623)	北里大学北里研究所病院・炎症性腸疾患先進治療センター・特任教授  (32607)	

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