

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390045

研究課題名（和文）重篤かつ予測困難な抗血小板薬誘発肝障害を事前回避するシステムの基盤構築と運用

研究課題名（英文）Development of a system, which can pre-avoid anti-platelet agents-induced severe hepatic dysfunction that is difficult to predict

研究代表者

有吉 範高（ARIYOSHI NORITAKA）

千葉大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00243957

研究成果の概要（和文）：チエノピリジン系抗血小板薬のうち、チクロピジン塩酸塩による重篤かつ予測困難な肝障害と関係すると考えられる *HLA-A*3303* の簡易診断法を開発した。また、*HLA-A*3303* とは異なる肝障害関連候補遺伝子多型を確認した。クロピドグレル硫酸塩では、肝障害の発現そのものが少ないが、予備的研究で、*HLA-A*0206* あるいは *HLA-B*3901* の関与が疑われたため、これらに対する簡易遺伝子診断法を開発し、second population で検証した。しかし肝障害発現例が極めて少なく、これら *HLA* 型がクロピドグレル誘発肝障害に関与しているとの確証を得ることはできなかったが、これら両チエノピリジン系抗血小板薬誘発性の肝障害に関わる遺伝的因子は異なることが示唆され、一方の薬物で肝機能障害が発現した場合は、他方に安全な切り替えが可能であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We have developed a simple genotyping method to detect *HLA-A*3303*, which appeared to be responsible for severe hepatic dysfunction induced by ticlopidine. In this study, we have confirmed that another candidate gene polymorphism, which may be involved in ticlopidine-induced hepatotoxicity. We found that either or both *HLA-A*0206* and *HLA-B*3901* may be responsible for clopidogrel-induced hepatic dysfunction in our preliminary studies. Thus, simple genotyping methods to detect these specific *HLA* alleles were developed. Then, we applied these genotyping methods to confirm whether either or both *HLA* alleles were truly related to the clopidogrel-induced hepatic dysfunction in the second population. However, reproducible results were not obtained, possibly due to a small number of patients with clopidogrel-induced hepatic dysfunction. It was suggested that different genetic factors may be involved in hepatic dysfunction induced by ticlopidine and clopidogrel, although we have not identify the causal *HLA* allele responsible for clopidogrel-induced hepatic dysfunction. These results indicate that ticlopidine and clopidogrel could be used safely as alternative drug each other.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 6,300,000 | 1,890,000 | 8,190,000 |
| 2009年度 | 5,700,000 | 1,710,000 | 7,410,000 |
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,900,000 | 4,470,000 | 19,370,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療

1. 研究開始当初の背景

我が国は高齢化が進み、虚血性心疾患で、経皮的冠動脈インターベンション(PCI)を受ける患者数は増え続けており、それに伴って抗血小板薬の使用は増えている。チエノピリジン系抗血小板薬は、PCIでステントを留置された患者に使用されるが、以前繁用されていたベアメタルステント(BMS)の場合は、少なくとも3カ月、その後主流となった薬剤溶出ステント(DES)では、長期にわたって投与することが必要である。

本研究の開始当初、対象疾患に対して我が国で使用されているチエノピリジン系抗血小板薬の多くは、チクロピジン塩酸塩(以下、チクロピジン)であった。チクロピジンは、副作用が多いことが知られており、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、顆粒球減少(無顆粒球症含む)、および重篤な肝障害が三大副作用として知られている。中でも肝障害は、実験動物では再現できず、薬剤の投与量に非依存性であり、活性代謝物の生成と免疫応答反応の関与が疑われ、予測困難な特異体質性(idiosyncratic)の有害事象と捉えられていた。また、欧米人では極めてまれであるのに対し、日本人において副作用頻度が高いこと、チクロピジンを投与した全ての患者に起こるわけではなく、一部の患者に起こること、などから遺伝的因子の存在が疑われていた。この問題に対し、Hirataらによって、日本人におけるチクロピジン誘発肝障害の原因遺伝子として *HLA-A*3303* が報告された。さらに Ariyoshi(本研究代表者)らは、*HLA-A*3303*の他に、チクロピジンの代謝的活性化に関わる *CYP2B6* の遺伝子多型も関連する可能性を見出しつつあるところであった。

一方、チクロピジンの後継医薬品として、副作用の頻度がかなり低いクロピドグレル硫酸塩(以下、クロピドグレル)が承認されたものの、本研究の開始当初は、その適応がまだPCI施行、あるいは予定患者には拡大されていなかったため、急性冠症候群患者に対する使用には制限があった。

2. 研究の目的

上記背景の下、本研究では、開始当初の目的として、第一に、千葉大学医学部附属病院(以下当院)において塩酸チクロピジンを処方された症例で、*HLA-A*3303*と*CYP2B6*

遺伝子多型が、チクロピジン誘発肝障害と、真に関連しているかに関して、検証的研究を行うこと。第二に、結果が検証された際には、前向き研究を行って、遺伝子診断の有用性を明らかにすること。第三に有用性が確認された場合には、実地臨床において、ルーチンで遺伝子診断を行う体制を整備し、チクロピジン誘発肝障害を発症するリスクが高い患者を予測し、肝障害の発症を事前に回避するためのシステム稼働することを目的とした。

しかしながら、PCI患者へのクロピドグレルの適応拡大後、チクロピジンは副作用の多さから殆ど使用されなくなり、検証的研究に必要な症例数を集められなくなったため、同じチエノピリジン系の抗血小板薬であるということから、主たる対象薬物をクロピドグレルに替えて検討を続けることとなった。

3. 研究の方法

- (1) 詳細な患者情報が得られる当院のチクロピジン投与患者において *HLA-A*3303* と研究代表者らが、他の population で見出しつつあった *CYP2B6* 遺伝子多型が、真にチクロピジン誘発肝障害と関連性があるかについて、検証的症例-対照研究を実施した。研究に先立ち、*HLA-A*3303*の簡易遺伝子診断法の開発を行った。症例-対照研究については、目標症例数を日本人における *HLA-A*3303*の頻度と、オッズ比から約1,000例とし、医学研究院の生命倫理委員会の承認を得て実施したが、クロピドグレルの適応拡大以降、新規にチクロピジンの投与を開始する患者が殆どいなくなった。
- (2) チクロピジン誘発肝障害と関連する可能性のある新たな遺伝子多型候補として、理化学研究所がゲノムワイド関連解析(GWAS)から、rs17708401を見出した。チクロピジン誘発肝障害の症例に関して、遺伝子解析研究のための検体を保管している医療機関は、全国的にも殆どないため、理化学研究所から、研究代表者あて共同研究の申し入れがあり、当院で収集したチクロピジン誘発肝障害例、非肝障害例の解析を行った。この症例-対照研究に先立ち、rs17708401の簡易遺伝子多型診断法を開発した。
- (3) クロピドグレルを新規に投与開始する患者は、副作用が少ないため、投与開始後、入院による観察期間が短く、退院後、外病院にて、経過観察が行われるようになったため、肝機能障害例を見逃さない

ために、Faxによる連絡網を構築した。なお、PCI後、約6か月を経過した時点で、再度、当院に来院してもらった際に、抗血小板薬がクロピドグレルから他のものに替えられていないか（替えられていた場合は、その理由）、服用状況に変化はないか、等を病棟担当薬剤師が調査した。最初の集団では131例の新規クロピドグレル投与患者のうち、2例の肝障害患者が認められた。

- (4) クロピドグレル新規投与患者の最初の集団における肝障害患者2名で、共通に認められたHLA型が、*HLA-A*0206*と*HLA-B*3901*であったことから、これらが、クロピドグレル誘発肝障害と関連する可能性を第二集団で検証することを目的として、*HLA-A*0206*と*HLA-B*3901*を検出できる簡易遺伝子診断法を開発した。
- (5) クロピドグレル新規投与患者の第2集団として、145例から遺伝子解析研究に対する同意を取得し、*HLA-A*0206*と*HLA-B*3901*の診断を実施した。

4. 研究成果

- (1) 医療現場において、*HLA-A*3303*を施設内診断することを視野に入れ、本土日本人の大部分（99.5%）を説明しうる*HLA-A*対立遺伝子12種類（*HLA-A*0101*, **0201*, **0206*, **0207*, **0210*, **1101*, **2402*, **2601*, **2602*, **2603*, **3101*, **3303*）の組み合わせからなる遺伝子型の中から、*HLA-A*3303*を有する個体を正確かつ診断する方法を構築することとした。操作が簡便で高額な装置を使うことなく低コストで行える方法として、最初にPCR-SSCP法を検討した。本診断法では、*HLA-A*3303*を診断できるものの、PCR後、非変性ポリアクリルアミドゲルで、2時間ほどの低温電気泳動を行い、その後、銀染色が必要であること、さらに電気泳動は、48サンプル用のプレキャストゲルを使用するため、数検体の分析には適しておらずコストがかかった。



検体2 検体3 検体4 検体5 検体6 検体7

図1 SSCP分析による*HLA-A*3303*診断

実臨床では、1検体、あるいは多くても数検体の診断が必要であることが殆どであること。プレキャストゲルの銀染色は、時間とコストがかかるだけでなく、重金属廃液が出るため、好ましくない

考えられたため、改良を行うこととした。そこでRFLP分析を検討したところ、図2のように、図1のSSCP分析と同じ分析パターンが得られることが明らかとなった。これにより、コストと時間の大幅削減が可能となった。



図2 RFLP分析による*HLA-A*3303*診断

本診断法を用いて、新規にチクロピジン投与した患者39例（肝障害例6例、非肝障害例33例）の*HLA-A*3303*診断を行った。

表1 *HLA-A*3303*とチクロピジン誘発肝障害との関連性

| | 肝障害有 | 肝障害無 | 計 | P |
|-----------------|------|------|----|--------|
| <i>A*3303</i> 有 | 2 | 3 | 5 | 0.1614 |
| <i>A*3303</i> 無 | 4 | 30 | 34 | |
| 計 | 6 | 33 | 39 | |

*HLA-A*3303*のオッズ比は、5と大きかったものの、95%信頼区間は、0.63-39.7であり、*HLA-A*3303*の頻度分布には、肝障害群と非肝障害群との間で、統計学的に有意な差は認められなかった。データは示さないが、*CYP2B6*多型についても両群に統計学的な差は認められなかった。本研究では、症例収集過程において、主たる薬物がチクロピジンからクロピドグレルに替わったため、症例数が僅か39例と少なかつたため、統計学的な検出力が足りなかつた可能性がある。

- (2) チクロピジン誘発肝障害と関連する可能性のあるrs17708401の診断法についても、図3に示すように、PCR-RFLP法で開発することが可能であった。

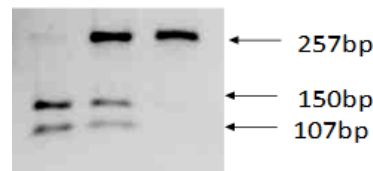


図3 RFLP分析によるrs17708401分析

本診断法を用いて、その時点までに収集されたチクロピジン投与患者48例（肝障害例8例、非肝障害例40例）のrs17708401診断を行った。表2にその解析結果を示す。

表 2 rs17708401 とチクロピジン誘発肝障害との関連性

| | 肝障害有 | 肝障害無 | 計 | P |
|------|------|------|----|--------|
| SNP有 | 5 | 7 | 12 | 0.0166 |
| SNP無 | 3 | 33 | 36 | |
| 計 | 8 | 40 | 48 | |

興味深いことに、本多型を有する患者は、肝障害患者に多く、統計学的にも有意であった。ただし、検討できた症例数は多くはなく、また、本多型を有していても肝障害が起きない患者も存在することから、肝障害予測の確実性は、本多型を有する患者でチクロピジンを避けるほど十分とは言えなかった。しかしながら、本多型診断で肝障害リスクを予め予測し、投与後、肝酵素値が挙げる傾向を認められた場合には直ちに投与を中止する等の措置を取ることによって、重篤な肝障害を回避することには利用可能と考えられた。

- (3) クロピドグレルは、2007年にPCIが適用される急性冠症候群（不安定狭心症、非ST上昇心筋梗塞）に対して適応が追加されると、研究代表者の当初予想をはるかに上回るスピードで、チクロピジンに置き換わっていった。重篤な肝障害は報告されているものの、その頻度は、チクロピジンと同じチエノピリジン骨格を有しているながら、活性化に関与する主たる酵素も異なっていることから、研究代表者は、活性中間体が結合する蛋白質も異なる結果、それを認識して抗原提示を行うHLAも異なるとの仮説を立てていた。第1集団131例のうち、主治医判定で肝障害と判定された患者は、僅か2例であった。
- (4) クロピドグレルで肝障害を呈した *HLA-A*3303* の判定を行ったところ、両検体とも有していなかったため、検査機関に *HLA-A* および *HLA-B* の遺伝子型判定を依頼したところ、両症例ともに *HLA-A*0206* および *HLA-B*3901* を有していた。クロピドグレルの代謝的活性化に最も寄与する *CYP2C19* の表現型は、両症例とも EM であった。そこで、研究代表者は、クロピドグレルは、*CYP2C19* で代謝された際に生成する不安定な代謝中間体が、*CYP2C19* そのものか、他の蛋白質に特異的に結合し、これが *HLA-A*0206*、あるいは *HLA-B*3901* を介して抗原提示されることで、肝障害

を引き起こすとの作業仮説を立てた。これを裏付けるため、第2集団で検証するのに先立ち、*HLA-A*0206* および *HLA-B*3901* に対する簡易診断法を開発した。いずれの診断法も、*HLA-A*3303* の診断法と同様、Nested allele-specific PCR と、RFLP 分析を組み合わせた方法であり、低コストで1日以内の診断が可能であった。

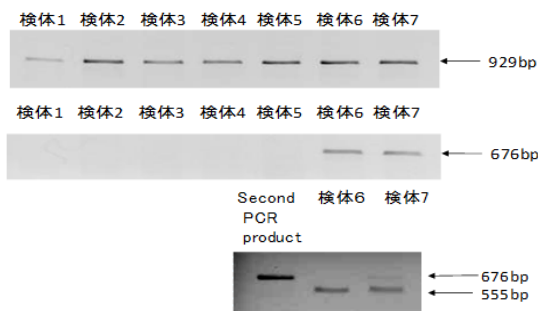


図 4 *HLA-A*0206* 診断法の開発

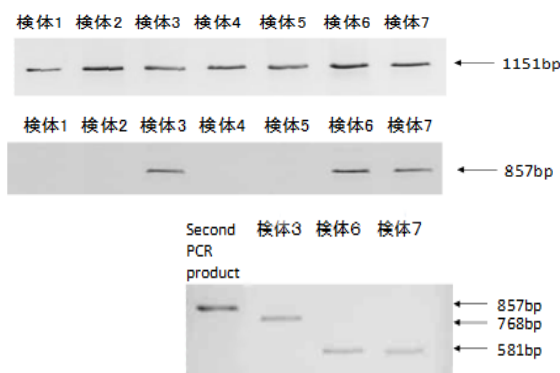


図 5 *HLA-B*3901* 診断法の開発

なお、これら診断結果の妥当性は、PCR産物のシーケンス解析を行うことと、HLA型既知、および未知検体のHLA型を開発した診断法で判定した結果と、検査会社に外注して得た結果を突き合わせることで確認した。

- (5) クロピドグレル投与患者の第2集団145名の中には、肝障害と判定され、他薬に変更された症例2名、肝酵素値が一過性に上昇したものの、クロピドグレルを中止することなく、無処置で回復した症例2名も加えて、4例を肝障害患者とした上で、開発した診断法を全症例に適用し、*HLA-A*0206* および *HLA-B*3901* の有無を確認した。

表 3 *HLA-A*0206* とクロピドグレル誘発肝障害との関連性

| | 肝障害有 | 肝障害無 | 計 | <i>P</i> |
|-----------------|------|------|-----|----------|
| <i>A*0206</i> 有 | 0 | 24 | 24 | 1 |
| <i>A*0206</i> 無 | 4 | 117 | 121 | |
| 計 | 4 | 141 | 145 | |

表 4 *HLA-B*3901* とクロピドグレル誘発肝障害との関連性

| | 肝障害有 | 肝障害無 | 計 | <i>P</i> |
|-----------------|------|------|-----|----------|
| <i>B*3901</i> 有 | 0 | 11 | 11 | 1 |
| <i>B*3901</i> 無 | 4 | 130 | 134 | |
| 計 | 4 | 141 | 145 | |

第2集団(145名)の遺伝子診断を行ったところ、第1集団(131名)の結果と異なり、クロピドグレル誘発肝障害患者において、*HLA-A*0206* および *HLA-B*3901* は検出できなかった。症例数が少ないため、結論を出すには難しいが、この第2集団において、再現性が認められないことから、少なくとも本研究では、クロピドグレル誘発肝障害と *HLA-A*0206* あるいは *HLA-B*3901* の関連性は検証することができなかった。

本研究では、開始当初、チクロピジンによる肝障害を予測するために、*HLA-A*3303* の診断が有用か否かを検証し、有用性が示された場合は、診療科ならびに検査部と共同で、チクロピジン投与予定の患者の遺伝子を投与前に検査し、その診断結果を基に投与の可否を決定する体制を整備する予定であった。しかし、クロピドグレルの適応拡大により、チクロピジンの使用が急速に縮小し、検証的研究のための症例集積ができなくなった。結果として、*HLA-A*3303* が、チクロピジン誘発肝障害と密接に関連しているか否かについて、十分に確認することができなかった。

そこで、対象薬物を、症例数の集積が見込めるクロピドグレルに変更し、第1集団において、クロピドグレル誘発肝障害との関連性が予想される *HLA* を見出したものの、ほぼ同じ数の第2集団では検証することができなかった。結果として、現時点において、クロピドグレル誘発肝障害と関連性がある *HLA* を特定できたとはいえない。

しかしながら、本研究を実施することによって、以下の点を明らかにすることができた。第一に、チクロピジン誘発肝障害の原因遺伝子多型の有力な候補である rs17708401 に関する遺伝子診断法を開発し、この多型が、当院における小集団でも、統計学的に有意にチクロピジン誘発肝障害と関連することを示

した。少なくとも本研究では、*HLA-A*3303* よりも、チクロピジン誘発肝障害との関連性が深い可能性が示されており、この結果は、理化学研究所が、別のより多い集団で検討した時の結果と一致している。興味深いことに、この多型は、蛋白質をコードしている領域にはないため、なぜチクロピジン誘発肝障害と関連性を示すのか、現時点では全く不明であり、今後の解明が待たれるところである。

第二に、本研究を通じて、チクロピジンで肝障害を起こした患者に対し、クロピドグレルに変更した患者、および逆にクロピドグレルで肝障害を呈した患者に対して、チクロピジンに変更した患者が10名以上確認されている。このことは、チクロピジン誘発肝障害をもたらす遺伝的な因子と、クロピドグレル誘発肝障害をもたらす遺伝的な因子が異なる可能性を示唆しているものである。したがって、両者は同じチエノピリジン系の抗血小板薬でありながら、重篤な肝障害という有害作用の機序は、同一でない可能性が高い。このことは、クロピドグレルでは肝障害を起こすため、不耐容の患者ばかりでなく、クロピドグレルでは有効性が低い、いわゆるクロピドグレルレジスタンスの患者には、チクロピジンを処方することで、より有効な治療が行える可能性をも示唆している。ただし、その際は、チクロピジン誘発肝障害のリスクを調べた上で、そのリスクの低い患者に処方することが望ましいため、本研究で開発した *HLA-A*3303*、および rs17708401 の診断法が活用できる可能性がある。

第三に、本研究では、*HLA-A*3303*、*HLA-A*0206* および *HLA-B*3901* をそれぞれ特異的に診断する方法を開発することができた。このことは、特定の *HLA* 型を医療機関で、迅速かつ低コストで診断する方法を開発することが可能であることを意味している。この研究の成果は、現在、研究代表者が所属する研究室で、カルバマゼピン誘発重篤皮膚障害と関連性が高いと報告され、添付文書にも記載されている *HLA-A*3101* の診断法開発に応用されている。また、がんペプチドワクチンの投与適合者を判別する *HLA-A*2402* および、*HLA-A*0201* の診断法開発にも応用されつつある。

以上、本研究では、新薬の承認と適応拡大により、当初の研究目的を変更せざるを得ず、予想した症例数も十分確保できなかったため、当初目的を達成することはできなかった。しかしながら、研究の過程において、臨床的に有用な知見、ならびに次の開発研究に繋がるコンセプトならびに、具体的な開発のプロセスを確立することができたことの意義は、大変大きいと考えられる。

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 Ariyoshi N, Iga Y, Hirata K, Sato Y, Miura G, Ishii I, Nagamori S, Kitada M. *Drug Metab Pharmacokinet*. 査読有 2010, 25(3): 298-306. Enhanced susceptibility of HLA-mediated ticlopidine-induced idiosyncratic hepatotoxicity by *CYP2B6* polymorphism in Japanese.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 有吉 範高、内山 数貴ら、フェリリン誘発肝障害の感受性に関わる遺伝的素因の検討、第 21 回日本医療薬学会年会、2011.10.1 神戸
- ② 内山 数貴、有吉 範高ら、抗血小板薬誘発肝障害との関連性が疑われる HLA 型遺伝子診断法の開発、第 131 回日本薬学会年会、2011.3.30 静岡
- ③ 有吉 範高、久保田史佳ら、医療機関向けに開発した *HLA-A*3303* 簡便・迅速遺伝子診断法の改良、第 19 回日本医療薬学会年会、2009.10.25 長崎
- ④ 久保田史佳、有吉 範高ら、特定 HLA-A ハプロタイプピングの簡易診断法の開発と評価、第 129 回日本薬学会年会、2009.3.26 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有吉 範高 (ARIYOSHI NORITAKA)
千葉大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：00243957

(2) 研究分担者

北田 光一 (KITADA MITSUKAZU)
千葉大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：90110345

(3) 連携研究者

石井 伊都子 (ISHII ITSUKO)
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：00202929