

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24406010

研究課題名(和文) アジア系集団における結核治療薬による副作用と治療効果に関連する遺伝子の探索

研究課題名(英文) Pharmacogenomics study of anti-tuberculosis drugs in the Asian population

研究代表者

徳永 勝士 (Tokunaga, Katsushi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40163977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：アジア系集団における結核遺伝疫学研究ネットワークを活用し、抗結核薬による肝障害の関連遺伝子研究を行った。タイと日本でそれぞれ肝障害発症群53名、73名を含む結核患者138名、366名において、N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2) 変異型遺伝子をホモで持つslow acetylatorと肝障害との関連解析オッズ比はタイで8.80、日本で4.32であり統計学的に有意に高かった。また、NAT2遺伝子以外の未知の関連遺伝子を探索する為の第一段階のゲノムワイド関連解析が終了した。本研究結果から国際メタ解析と対費用効果検討を進め、NAT2遺伝子多型を含む遺伝子スクリーニング・プログラムを立案する。

研究成果の概要(英文)：We have been conducting International Collaborative TB Research in Asia. Anti-TB drug-induced liver injury (AT-DILI) is a main reason of treatment failure. A total of 138 Thai TB patients including 53 AT-DILI cases and 366 Japanese TB patients including 73 AT-DILI cases were enrolled. The odds ratios of N-acetyltransferase 2 (NAT2) slow acetylator (SA) status with AT-DILI were 8.80 (95% confidence interval (CI) 4.01-19.31, P-value = 1.53×10^{-8}) in Thais and 4.32 (95%CI 1.93-9.66, $p=5.56 \times 10^{-5}$) in Japanese. Our results demonstrated that the acetylator status of NAT2 is an important determinant for AT-DILI in Asia. We performed first-phase genome-wide association study to search for the additional genetic factors. International meta-analysis and cost-effectiveness analysis may provide data to support the individualization of anti-TB treatment in Asian TB patients based on genotyping of the NAT2 and additional genes.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：薬理遺伝学 ゲノム医科学 結核 副作用 関連遺伝子 国際共同研究 タイ インドネシア

1. 研究開始当初の背景

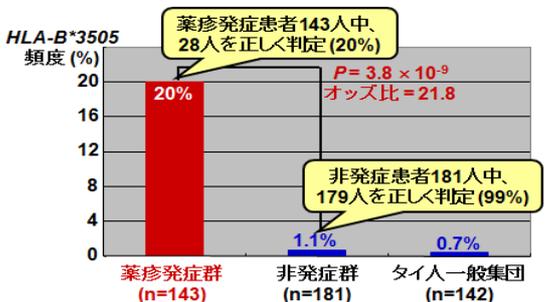
結核は、世界3大感染症として、人類に多大な健康被害を与えている。我々は結核症の感受性遺伝子の同定の為、ゲノムワイド連鎖解析[Genes Immun 2009; 10(1):77-83]、同定された領域の Fine Mapping[Genes Immun 2010; 11(5):416-22]、候補遺伝子研究[Hum Immunol 2011;72(9):741-5, Hum Immunol. 2010; 71(7):697-701, Tuberculosis (Edinb). 2009;89(1):71-6]、ゲノムワイド関連解析 (GWAS: Genome-wide association study) についても、タイ人患者検体と共に複十字病院が参加するオーダーメイド医療の実現化プログラムによるバイオバンク・ジャパンの検体を使い、メタ解析を実施した。

抗結核薬の副作用としては、肝機能異常、アレルギー反応、胃腸障害などが挙げられる。特に、肝障害は重大な副作用であり、しばしば抗結核薬による治療の中止の原因となり、治癒の遅延につながる。抗結核薬の肝障害に関連する因子を同定できれば、結核治療を開始する際に、非常に有用な情報となり、日本やタイのみならず世界の公衆衛生上の課題である結核症のより安全で優れた治療法の確立に貢献が出来る。既存の関連遺伝子では、臨床でバイオマーカーとして使用できる感度と特異度を持たない。結核の疾患感受性遺伝子は、我々のチームを含めて、GWASを中心とした網羅的な遺伝子検索が進められているが、アジア系集団における薬剤応答性については日本以外に報告がない。

2. 研究の目的

薬の作用と遺伝子多型などの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剤応答性を予測する為の研究分野であるファーマコゲノミクスが進展し、個々の患者に合った薬を適切に使い分けことが可能になりつつある。理化学研究所はタイ研究機関との共同研究により、抗 HIV 薬の副作用に関連する遺伝子[Pharmacogenet Genomics. 19(2):139-46, 2009, Clin Infect Dis. 50(4):597-604, 2010] の、また、東大人類遺伝学教室は日本人における C 型肝炎の治療効果に関連する遺伝子同定 [Nat. Genet. 41: 1105-1109, 2009]. の実績を持つ。

HLA-B*3505はネビラピンによる薬疹と関連する (タイ国マヒドン大学との共同研究)



Chantarangsu, Mushihiro et al. Pharmacogenet Genomics 19:139-46 (2009)

世界三大感染症の一つであり、日本国内においても未だ大きな公衆衛生上の課題である結核症に対し、理研と東大はタイ保健省医科学局と研究チームを組み、ゲノムワイドな手法による結核症感受性遺伝子探索を進めている。その研究基盤を活用し、結核治療薬による副作用と治療効果に関連する遺伝子の探索をアジア系集団において進める。

3. 研究の方法

タイにおいては、我々のチームが参画してきたタイ国のチェンライ県病院と胸部疾患研究所病院より結核患者症例を 109 例収集した。その中の 38 例に対しては、詳細に薬剤血中濃度を測定している。薬剤性肝障害 (DILI: Drug-induced liver injury) の症例はこの 2 病院からの 44 例の他にタイ保健省が運営する副作用サーベイランス・システムに参加している 10 病院の倫理委員会の承認が得られ検体収集が進行している。タイ保健省が運営する副作用サーベイランス・システムでは、DILI に報告されている症例の中で、イソニアジド (INH: isoniazid)、リファンピシン (RFP: rifampicin)、ピラジナミド (PZA: pyrazinamide) の抗結核薬主要 3 剤が上位を占め、エタンブトール (EB: ethambutol) やこの 4 剤の合剤を含めると 2001 年 1 月 1 日より 10 年間で報告されている 3,937 例の薬剤関連肝障害のうち、2,822 例 (71.7%) を占めている。この中からも症例を抽出する。この 2 つの補完的方法に検体を収集した。最初の研究では、タイにおいて、INH を含む抗結核薬治療をした結核患者 138 名 (肝障害の発症群 53 名との非発症群 85 名) の遺伝子解析を実施した。

日本においてはオーダーメイド医療の実現化プログラムによるバイオバンク・ジャパンに参加して症例を提供しており、結核患者の臨床データベースが確立されて過去の抗結核薬による肝障害の同定可能な複十字病院にて、重複しない症例を収集する。複十字病院の結核患者 366 名 (肝障害の発症群 73 名と非発症群 293 名) で NAT2 多型を比較した。

ゲノム薬理学の既知の知識に基づく候補遺伝子アプローチにより、各薬剤の薬物動態関連遺伝子について関連解析を実施する。

最初の候補遺伝子として N-アセチルトランスフェラーゼ 2 (NAT2) 多型を検討した。C282T (rs1041983), C481T (rs1799929), G590T (rs1799930) と G857A (rs1799931) の一塩基多型 4 箇所に基づいて NAT2 多型を検討し、NAT2*6A 等の変異型アリルをホモで持つ slow acetylator (SA)、ヘテロで持つ intermediate acetylator (IA)、持たない rapid acetylator (RA) の頻度を求めた。

尚、これらの検体収集は既に倫理委員会の承認 (日本では、(公財)結核予防会複十字病院倫理委員会 2010 年 10 月 18 日承認、(独)理化学研究所横浜研究所研究倫理委員会 2011 年 2 月 15 日承認、東京大学ヒトゲノム・

遺伝子解析研究倫理審査委員会も 2011 年 3 月 10 日承認済みで、タイでは従来の研究計画の延長承認)を得て進められている。

4. 研究成果

タイ人結核患者において、*NAT2**6A 等の変異型遺伝子をホモで持つ slow acetylator (SA)、ヘテロで持つ intermediate acetylator (IA)、持たない rapid acetylator (RA)の頻度が肝障害発症群でそれぞれ 71.7%、22.6%、5.7%であった。非発症群では 22.4%、62.4%、15.3%で、SA と肝障害との関連解析でオッズ比が 8.80(95% 信頼区間 4.01-19.31, $p=1.53 \times 10^{-8}$)であった。(次頁、(1)と(2))

日本では、SA の頻度が肝障害発症群で 17.8%(13/73)、非発症群で 4.8%(14/293)で、関連解析のオッズ比は 4.32(95%信頼区間 1.93-9.66, $p=5.56 \times 10^{-5}$)であった。(次頁、(3)と(4))

タイの結果を日本人類遺伝学会第 59 回総会で、日本の結果を日本結核病学会で報告し、その内容を論文投稿した。

結果(1) Haplotype and diplotype configurations at *NAT2* in Thai TB patients

Haplotype	Diplotype configurations, N (%)						No. of subjects, N (%)
	*4	*13	*5B	*5E	*6A	*7B	
*4	14 (10.1)	1 (0.7)	4 (2.9)	0	31 (22.5)	27 (19.6)	81 (58.7)
*13	-	1 (0.7)	0	0	2 (1.5)	1 (0.7)	Rapid / intermediate acetylators
*5B	-	-	2 (1.5)	0	6 (4.3)	7 (5.1)	57 (41.3)
*5E	-	-	-	0	0	0	Slow acetylators
*6A	-	-	-	-	20 (14.5)	17 (12.3)	
*7B	-	-	-	-	-	5 (3.6)	
No. of haplotypes, N (%)	91 (33.0)	6 (2.2)	21 (7.6)	0	96 (34.8)	62 (22.5)	

結果(2)タイ人結核症患者における抗結核薬による副作用(肝障害)発症と*NAT2*遺伝子多型との関連解析

	Slow acetylators (SA)	Intermediate acetylators (IA)	Rapid acetylators (RA)
DILI (n=53)	38 (71.7%)	12 (22.6%)	3 (5.7%)
Tolerant control (n=85)	19 (22.4%)	53 (62.4%)	13 (15.3%)

SA vs IA + RA: $P = 1.53 \times 10^{-8}$, OR = 8.80 (95%CI = 4.01-19.31) *NAT2*遺伝子のリスクアレルをホモに持つ患者(SA)は肝障害の発症頻度が上昇する

結果(3)Haplotype and diplotype configurations at *NAT2* in 366 Japanese TB patients

Haplotype	Diplotype configurations, N (%)						No. of subjects, N (%)
	*4	*13	*5B	*5E	*6A	*7B	
*4	178 (48.6)	0	9 (2.5)	0	104 (28.4)	48 (13.1)	339 (92.6)
*13	-	0	0	0	0	0	Rapid / intermediate acetylators
*5B	-	-	2 (0.5)	0	2 (0.5)	1 (0.2)	27 (7.4)
*5E	-	-	-	0	0	0	Slow acetylators
*6A	-	-	-	-	10 (2.7)	9 (2.5)	
*7B	-	-	-	-	-	3 (0.8)	
No. of haplotypes, N (%)	517 (70.6)	0	16 (2.2)	0	135 (18.4)	64 (8.7)	

結果(4):日本人結核症患者における抗結核薬による副作用(肝障害)発症と*NAT2*遺伝子多型との関連解析

	Slow acetylators (SA)	Intermediate acetylators (IA)	Rapid acetylators (RA)
TB-DILI (n=73)	13 (17.8%)	29 (39.7%)	31 (42.5%)
Tolerant control (n=293)	14 (4.8%)	132 (45.1%)	147 (50.2%)

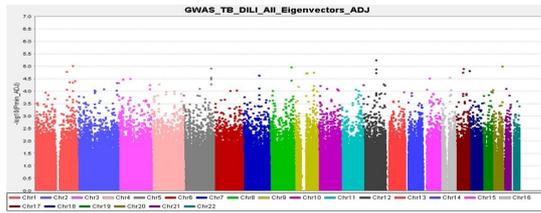
SA vs IA + RA: $P = 5.56 \times 10^{-5}$, OR = 4.32 (95%CI = 1.93-9.66) 日本人でも*NAT2*遺伝子のリスクアレルをホモに持つ患者(SA)は肝障害の発症頻度が上昇する。

タイ人で初めて *NAT2* 遺伝子多型と抗結核薬治療による肝障害との関連を示した。日本人一般集団での SA の頻度は 11%の報告があり、サンプル数を増やし SA 頻度を確認する必要があるが、タイでは SA の頻度がより高く、インドネシアでは、更に高い 35.6%(76/212)の報告がある。

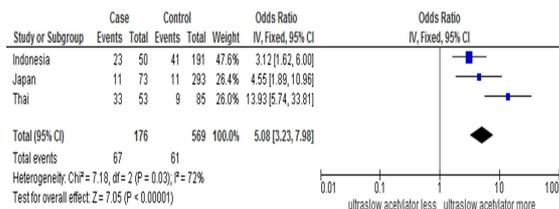
異なる SA の頻度とオッズ比等の関連性のデータを基に政策的に遺伝子スクリーニングの対費用効果をアジアで比較検討する前向き研究が望まれる。ゲノムワイド関連解析も活用し *NAT2* 以外の遺伝要因の探索、血中濃度測定を並行実施して RA の治療効果に与える影響も含めての詳細な検討が必要である。

*NAT2*遺伝子との関連は確立しており、タイと日本のサンプルで確認できた様に陽性コントロールとして活用できる。現在、*NAT2*以外の関連遺伝子同定の為、ゲノム薬理学の既知の知識に基づく候補遺伝子アプローチによって、*NAT2*以外のイソニアジド、ピラジナミドおよびリファンピシンの薬物動態関連遺伝子について関連解析を実施している。また、HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPB1, HLA-DQB1 と HLA-DRB1 等の HLA 遺伝子の関連解析、未知の遺伝子を探索する為、GWAS を実施した。以下に現在試行した結果の図を示すが、日本のサンプル数のみではゲノムワイドに有意な SNP は同定できなかったため、タイとインドネ

シアでも実施し、国際メタ解析により同定力を高める。



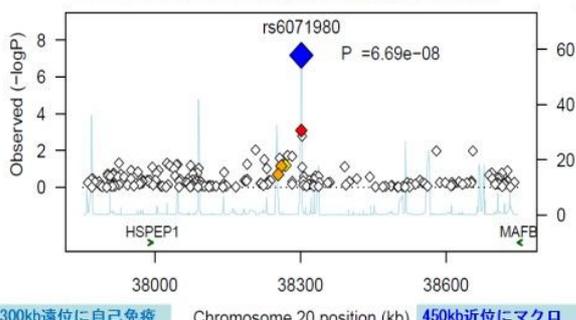
同定された関連遺伝子の再現性の確認の為にReplicationサンプルの収集を継続する。再現性の検討には、日本のサンプルのみならず、インドネシアのサンプルも活用できる様にSEAPharm(Southeast Asian Pharmacogenomics)のネットワークを活用し、国際メタ解析をする。以下に現在試行している図を示すが、国際メタ解析が同定力の向上に貢献している。



薬剤応答性関連遺伝子は、理想的には長期コホート研究が必要なので実施される事は極めて少ない。タイ国チェンライ県では、1987年から電子化された結核サーベイランス・システムを維持しており、1996年からは菌体、2002年からは血液検体の保存を実施している。菌体側の解析で、タイに多いEAI株が日本に多い北京株や他の菌株群に比較して結核発症後の1年生存率を下げる危険因子であると同定されているので、それとの相互作用も含めて解析を検討する。

本研究の基盤となる結核症感受性遺伝子探索でゲノムワイド関連解析は年齢に層別化した分析結果で有意な結果が得られていたが、研究開始年に論文が受諾された[J Hum Genet 2012;57(6):363-367]。

45歳未満の日本人とタイ人のゲノムワイド関連メタ解析結果



300kb遠位に自己免疫肝炎と1型糖尿病に関連するHSPEP1遺伝子

450kb近位にマクロファージの分化に関与するMAFB遺伝子

これらの遺伝子を活用した結核診断の研究結果も受諾された[Genes Immun. 2015 Mar 12. Epub ahead of print]. タイ人におけるヒト白血球抗原(HLA)遺伝子解析を進め、HLA遺伝子型と結核症との関連が結核菌体型毎に異なる事を米国人類遺伝学会で、タイ人におけるHLA遺伝子とハンセン氏病の関連を2013年国際ヒトゲノム会議で報告した。

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7件)

Satproedprai N, Wichukchinda N, Suphankong S, Inunchot W, Kuntima T, Kumpeerasart S, Wattanapokayakit S, Nedsuwan S, Yanai H, Higuchi K, Harada N, Mahasirimongkol S. Diagnostic value of blood gene expression signatures in active tuberculosis in Thais: a pilot study. Genes Immun. 2015 Mar 12. doi:10.1038/gene.2015.4. [Epub ahead of print]

Shotelersuk V, Limwongse C, Mahasirimongkol S. Genetics and genomics in Thailand: challenges and opportunities. Mol Genet Genomic Med. 2014 May; 2(3):210-6. doi: 10.1002/mgg3.83.

Tokunaga K. Lessons from Genome-Wide Search for Disease-Related Genes with Special Reference to HLA-Disease Associations. Genes (Basel). 2014 Feb 26; 5(1):84-96. doi: 10.3390/genes5010084.

蓮田泰誠. PGxの今後: GWASによる薬剤応答性関連遺伝子の同定. 臨床病理 62, 83-8 (2014).

Mushiroda T, Giacomini KM, Kubo M. Special Section on Pharmacogenomics: recent advances and future directions. J Hum Genet. 2013 Jun; 58(6):305.

Dinu I, Mahasirimongkol S, Liu Q, Yanai H, Sharaf Eldin N, Kreiter E, Wu X, Jabbari S, Tokunaga K, Yasui Y. SNP-SNP Interactions Discovered by Logic Regression Explain Crohn's Disease Genetics. PLoS One. 2012; 7(10):e43035. doi: 10.1371/journal.pone.0043035.

Mahasirimongkol S, Yanai H, Mushiroda T, Promphittayarat W, Wattanapokayakit S, Promjai J, Yuliwulandari R, Wichukchinda N, Yowang A, Yamada N, Kantipong P, Takahashi A, Kubo M, Sawanpanyalert P, Kamatani N, Nakamura Y, Tokunaga K. Genome-wide association studies of tuberculosis in Asians identify distinct at-risk locus for young tuberculosis J Hum Genet

〔学会発表〕(計 18 件)

野内英樹、吉山崇、山田紀男、奥村昌夫、佐々木結花、尾形英雄 アジアにおける抗結核薬治療による肝障害の遺伝要因探索：N-acetyltransferase 2 (NAT2) 遺伝子型との関連解析初期結果 第90回日本結核病学会総会(一般口頭演題 演題番号O-143)、2015年3月27日、長崎ブリックホール
Wattanapokayakit S, Mushiroda T, Yanai H, Wichukchinda N, Inunchot W, Chuchottawon C, Nedsuwan S, Denjanta S, Kantima T, Mahasirimongkol S, Tokunaga K Association of NAT2 polymorphisms with anti-tuberculosis drug-induced liver injury in Thai patients 日本人類遺伝学会第59回大会(演題番号2P005)、2014年11月21日、タワーホール船堀
中内彩香、Mahasirimongkol S, Wattanapokayakit S, 野内英樹, Wong JH, 蒔田泰誠, 徳永勝士 次世代シーケンシングを用いた20番染色体上候補領域における結核の新規感受性遺伝子の探索、日本人類遺伝学会第59回大会(演題番号1P062)、2014年11月20日、タワーホール船堀
野内英樹、吉山崇、樋口一恵、奥村昌夫、佐藤厚子、森本耕三、佐々木結花、工藤翔二、原田登之、尾形英雄 結核菌特異的インターフェロン 産生能検査(IGRA)のクオンティフェロンTB検査(QFT)精度管理マニュアル作成とT-スポットTB検査(T-spot TB)の初期経験 第89回日本結核病学会総会(ワークショップ：要望演題、演題番号WS1-1)、2014年5月9日、岐阜県長良川国際会議場
Tokunaga K. Searching for drug response genes: towards clinical application. International Seminar and Workshop on Molecular Medicine Oral Presentation, Yarsi University, April 15, 2014.
Mushiroda T. Individualization of anticancer therapy based on pharmacogenomics. International Seminar and Workshop on Molecular Medicine Oral Presentation, Yarsi University, April 15, 2014
Mahasirimongkol S. Pharmacogenomics of SJS/TENS in Thailand. International Seminar and Workshop on Molecular Medicine Oral Presentation, Yarsi University, April 15, 2014.
Yuliwulandari R. Functional polymorphisms in the promoter & coding region of NAT2 Gene.

International Seminar and Workshop on Molecular Medicine Oral Presentation, Yarsi University, April 15, 2014
野内英樹, Mahasirimongkol S, 岩淵英子、吉森浩三、吉山崇、Nedsuwan S, Chaiyasirinrije B, 奥村昌夫、尾形英雄、山田紀男、Sawanpanyalert P, 蒔田泰誠, 徳永勝士、工藤翔二 宿主と菌のゲノム情報の統合的活用による結核研究を基礎医学研究者と進めるためのコホート基盤形成 第24回日本疫学会学術総会(演題番号P2-061)、2014年1月25日、仙台市青年文化センター
野内英樹、出井禎 結核菌特異的インターフェロン 産生能をみるクオンティフェロンTB検査精度管理の為の研究とマニュアル作成 第60回日本臨床検査医学会学術集会(一般口頭演題、感染症、演題番号O-131)、2013年11月1日、神戸国際会議場
中内彩香、Mahasirimongkol S, Wattanapokayakit S, 野内英樹、蒔田泰誠, Sawanpanyalert P, 徳永勝士 20番染色体上候補領域における結核の感受性遺伝子の探索 第58回日本人類遺伝学会(一般演題P101)、2013年11月22日、江陽グランドホテル、仙台
Mahasirimongkol S, Smittipat N, Juthayothin T, Mushiroda T, Pokayawattanakit S, Wichukchinda N, Nedsuwan S, Dokladda K, Rukseree K, Billamas P, Palittapongarnpim P, Chaiyasirinroje B, Chaiprasert A, Yanai H, Tokunaga K. Lineages-based Association Analysis in tuberculosis (Abstract No.864W). the 63rd Annual Meeting of The American Society of Human Genetics(ASHG), October 23, 2013, Boston Convention Center, Boston, MA, USA
徳永勝士 ゲノム・遺伝子解析研究がもたらす革新 第62回日本医学検査学会 2013年5月18日 JRホテルクレメント(香川県)
Wattanapokayakit S, Mahotarn K, Phatsadon S, Wichukchinda N, Mushiroda T, Mahasirimongkol S, Tokunaga K Association analysis of HLA class II and leprosy in Thai population (Abstract No. HGM2013-ICG-1209) Joint Conference of Human Genome Meeting HGM) 2013 and 21st International Congress of Genetics April 14-16, 2013. The Sands Expo and Convention Center, Singapore
野内英樹、岩淵英子、吉森浩三、吉山崇、奥村昌夫、佐々木結花、倉島篤行、尾形英雄、山田紀男、工藤翔二 日本人とタイ人における結核感受性遺伝子座の同定

第88回日本結核病学会総会（一般口頭演題、細菌学（結核菌・抗酸菌・真菌等）2、演題番号165）、2013年3月29日、千葉県幕張メッセ

野内英樹、出井禎 菌と人のコホート検体バンクによる結核の発症と難治化に関する要因研究（第3報） 第59回日本臨床検査医学会学術集会（一般口頭演題、遺伝子、感染症 演題番号0-112）、2012年11月30日、国立京都国際会館

野内英樹、吉山崇、倉島篤行、出井禎、水野和重、石井加津恵、青野昭男、奥村昌夫、佐々木結花、尾形英雄、蒔田泰成、徳永勝士、工藤翔二 薬理遺伝学を含む難治性要因研究の基盤作成を目指した結核患者コホート研究 第57回日本人類遺伝学会（一般演題 薬理遺伝学 P-18）、2012年10月25日、京王プラザホテル、東京

野内英樹、水野和重、青野昭男、吉山崇、倉島篤行、奥村昌夫、森本耕三、窪田素子、青木美砂子、上山雅子、早乙女幹朗、尾形英雄、工藤翔二 臨床検査残余検体を活用した菌と人の検体バンクによる難治性結核の研究 第87回日本結核病学会総会（一般口頭演題、診断（細菌学的診断、鑑別診断）2、演題番号127）、2012年5月11日、広島県広島市広島国際会議場

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学教室ホームページ

<http://www.humgenet.m.u-tokyo.ac.jp/>

の中で、結核研究の紹介

<http://www.humgenet.m.u-tokyo.ac.jp/research/1-5.html> をしている。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永勝士 (TOKUNAGA, Katsushi)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40163977

(2) 研究分担者

蒔田泰誠 (MUSHIRODA, Taisei)
統合生命医科学研究センター・ファーマコゲノミクス研究グループ・グループディレクター
研究者番号：40392146

野内英樹 (YANAI, Hideki)
東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員（公益財団法人結核予防会・複十字病院・医員）
研究者番号：60437845

(4) 研究協力者

大前陽輔 (OMAE, Yousuke)
中内彩香 (NAKAUCHI, Ayaka)
MAHASIRIMONGKOL, Surakameth

WATTANAPOKAYAKIT, Sukanya
他タイ保健省関係者
YULIWULANDARI, Rika
他インドネシア関係者