

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590671

研究課題名(和文)炎症性腸疾患薬のファーマコゲノミック・バイオマーカーの機能的探索及び活用法の提案

研究課題名(英文)A functional search for pharmacogenomic biomarker of the drugs on inflammatory bowel disease, and suggestion of its utilization

研究代表者

大野 雅子(OHNO, Masako)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：50467528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アザチオプリン(AZA)は中等度以上の炎症性腸疾患に用いられる重要な免疫調節薬であるが、臨床上、薬物応答性の個人差が大きい。この問題の要因を探るべく、本研究ではそのファーマコゲノミック・バイオマーカーの機能的探索を行い、AZAの効果あるいは副作用発現の個人差との関連性を示す遺伝子多型を見出した。これら因子を活用したAZAの個別化適正投与方法が示唆された。実践的臨床研究を通して薬学生の臨床研究マインドを育成できた。

研究成果の概要(英文)：Azathioprine (AZA) is an important immunomodulator used for inflammatory bowel disease. Its use is unfortunately limited due to marked inter-individual differences in responses to the drug. In this study, we found the pharmacogenomic factors that may be involved in safety or efficacy during AZA therapy. The findings suggest that the SNPs contribute to the optimization of low-dose AZA treatment. Educational program was also designed through the study to nurture the clinical research mind of the pharmacy student.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：ファーマコゲノミクス アザチオプリン 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は、腸管粘膜の非特異的な炎症で、びらんや潰瘍を形成する。10~20 歳代に好発し、下痢、粘血便、腹痛などの症状を示し、緩解と再燃を繰り返す慢性疾患である。アザチオプリン (AZA) は、ステロイド依存性のクローン病 (CD) の緩解導入及び緩解維持並びにステロイド依存性の潰瘍性大腸炎 (UC) の緩解維持に対して適応を有する唯一の免疫調節薬であり、治療上重要な位置を占めている。AZA 療法の問題点として、骨髄抑制などの重篤な副作用がみられること、副作用・有効性発現に個人差があること、小児での安全性が十分には確立されていないことが挙げられる。一方、AZA によるステロイド減量効果が期待されることから、とくに小児ではステロイドによる成長障害や緑内障の発現を避ける目的でも免疫調節療法のニーズが高まっている。しかし、わが国の小児に対して、この貴重な医薬品を有効かつ安全に使用するための科学的根拠は乏しい。

プリン系代謝拮抗薬である AZA / 6-メルカプトプリン (AZA/6-MP) は、効果や副作用発現の個体差が大きい。これら薬物の代謝酵素チオプリン S-メチルトランスフェラーゼ (TPMT) の遺伝子多型は AZA/6-MP による重篤な骨髄抑制と相関することから、米国食品医薬品局は患者の TPMT 遺伝子多型 (または活性) 検査を推奨している。しかし、最も重要とされる *TPMT*3* だけでは骨髄抑制など副作用を十分に説明できない。日本人の場合、AZA/6-MP 治療により 1 割以上が骨髄抑制の副作用を発症するにもかかわらず、*TPMT*3/*3* 保持者は 0.06% にすぎないことから、*TPMT*3* 以外の影響因子があると考えられる。AZA が生体内で代謝を受け、免疫抑制作用を発揮する活性体へと転換される過程には、複数の酵素やトランスポーターが関与する。これら薬物動態関連分子の活性の個体差が AZA/6-MP の薬効の個体差に関わる可能性が非常に高い。

一方、薬学部が 6 年制となり、チーム医療の中で、臨床研究マインドを持って、科学的根拠に基づく薬物治療を推進できる薬剤師の育成が重要課題となっている。しかし、薬学部において臨床薬理学的視点で臨床研究の実践教育ができる大学は極めて少ない。

これらの背景から、本研究では、AZA による免疫抑制療法を受ける炎症性腸疾患患者を対象として、TPMT 活性および 6-TGN 濃度を調査すると共に、それらの個体差および骨髄抑制など直接的な表現型に影響を及ぼす薬物動態関連分子の遺伝子型を包括的に解析し、機能的解析に基づき AZA の反応性に関わるファーマコゲノミック (PG) な因子を明らかにして、その活用法を提案すること、これら臨床研究の実践を通して、薬学生の臨床研究マインド育成のためのプログラムを創出することを計画した。

2. 研究の目的

(1) 治療上 AZA を導入する CD および UC 患者を対象に、薬物動態関連分子の機能的解析により、AZA の反応性に関わるファーマコジェネティック・バイオマーカー (PG バイオマーカー) を探索し、さらにその活用法を提案すること、(2) 臨床研究マインドをもつ薬剤師の育成に向けた教育プログラムを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 炎症性腸疾患薬 AZA をモデルとした前向き PG 研究

国内多施設による AZA の前向き観察研究

CD または UC と診断され AZA を導入する患者 (小児、成人) を対象とし、遺伝子解析用の採血を行い、実臨床における AZA 治療開始前および開始後 18 ヶ月間の臨床経過を観察した。また、定常状態において血中濃度測定用の採血を行った。治療効果は、CD 群と UC 群に分けて、主に AZA 投与前後の国際的活動度指標の変化を評価した。国際的活動度指標には IOIBD スコア (CD)、Lichtiger Index (UC) を用いた。安全性は副作用で評価し、因果関係については症例報告書に記載された臨床検査値および医師の判断などに従って分類した。

AZA の反応性に関わる PG バイオマーカーの探索および統合的アルゴリズムの構築

AZA の薬効に影響する因子の探索にあたり、薬物の体内動態に関わる因子 (チオプリン S-メチル転移酵素 (TPMT) などの薬物代謝酵素、薬物輸送タンパク (Mrp4 など) や薬物の作用に関わる因子 (IMPDH など) の遺伝子多型などを解析対象として抽出した。薬物濃度用の採血ができた者については、赤血球中 6-TGN 濃度を測定した。遺伝子解析はダイレクトシーケンス法、TaqMan プローブ法、PCR-RFLP 法などで行った。症例報告書に基づき、併用薬などの環境因子も勘案して臨床情報を精査した。抽出した遺伝子多型情報と薬物血中濃度、薬効および副作用との相関解析を行い、AZA 治療の有効性・安全性の個人差に影響を及ぼす因子を探索した。さらに、個別化適正投与のための統合的アルゴリズムの構築およびその活用法の提案を試みた。

倫理的配慮

兵庫医療大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査専門委員会および各研究実施施設 IRB 等の承認を得た後に実施した。小児本人にも理解力に応じた説明を行い研究への賛意を得るように努めた。*TPMT*3/*3* が重篤な骨髄抑制と関連するとされているため、被験者登録時に行った TPMT 遺伝子多型判定の結果は直ちに担当医師に返却した。

(2) 臨床研究マインドをもつ薬剤師育成プログラムの創出

薬学生自身が実践を通して、臨床研究および臨床薬理学的解析・評価を行うための素養

を身につけることができるように、本 PG 研究のみならず、複数の実践的な臨床研究 (NCT00298870 等) を用いて、新たな研究計画の立案および調査、解析に挑ませた。これらの研究に携わった薬学部 5、6 年次生の理解・習熟度評価に基づき、臨床研究および薬効評価に関する基礎的な教育プログラムの立案を試みた。

4. 研究成果

(1) AZA による副作用および遺伝子多型頻度

副作用の評価基準は、観察期間中に発現した有害事象のうち、併用薬等を考慮して AZA との因果関係がありうるものと定義した。副作用は骨髄抑制による血液障害、肝障害、脱毛、消化器症状、倦怠感、関節痛、発熱、筋肉痛などであった。本検討では、小児 IBD 患者における副作用発現頻度が成人に比して高かった。AZA 初期投与量は副作用発現の有無に影響していなかった。

解析した各種遺伝子多型のアレル頻度は、既報に基づく日本人あるいは東洋人のアレル頻度とほぼ一致していた。

(2) 赤血球中 6-TGN 濃度、*TPMT* 遺伝子多型、*ABCC4* 遺伝子多型および副作用の関連性

対象者の中に *TPMT**3/*3 は存在せず、*TPMT**1/*3 の副作用発現への影響はなかった。*TPMT* 活性の指標とされる血中 6-TGN 濃度に関しては、6-TGN 濃度が低値でも重篤な骨髄抑制が出現すること、*TPMT**3 非保有者群においても血中 6-TGN 値にかなりばらつきがあることがわかった。このばらつきは *TPMT* 活性だけでは明らかに説明できなかった。これらの因子と副作用の間にも関連性を認めなかった。一方、排泄型トランスポーターである *ABCC4* の遺伝子多型は、6-TGN 濃度や副作用との関連性が示唆されているが、本検討ではこれらの間に何の相関性も認めなかった。

(3) *ITPA* 遺伝子多型の AZA 療法に及ぼす影響 イノシン 3 リン酸ピロホスファターゼ

(*ITPA*) は AZA の中間代謝物を分解する酵素であり、欠損すると AZA の細胞毒性が増大するとされている。本検討の対象者では、*ITPA* 遺伝子多型と副作用との関連性はみられなかった。両者の関係については多くの報告があり、いまだその関連性の有無は明瞭でない。しかし、本検討の結果は日本人 IBD 患者を対象にした既報と一致していた。

一方、AZA の有効性との関連性について検討したところ、CD 患児に対する AZA 療法開始後 6 ヶ月間の IOIBD スコアの変化は、*ITPA* *c*94 *C>A* (rs 1127354) の遺伝子型間で明らかに異なり ($p < 0.05$)、*CA* 群の方が *CC* 群より緩解導入維持効果が高いことが判明した。また、UC 患児に対する緩解維持効果でも同様の傾向が見られた。低用量 AZA 療法の場合、酵素活性の高い野生型遺伝子を有する患者では十分な治療効果が得られていない可能性

がある。

(4) その他の薬物動態関連分子の遺伝子多型が AZA 療法に及ぼす影響

まず、データベースや先行研究を調査して、AZA の薬物動態に関連するその他の代謝酵素やトランスポーターなどのうち、薬物応答性に影響すると予想されるものを抽出し、それらの遺伝子解析法を確立した。

AZA の代謝過程に関わるある種の遺伝子について、その遺伝子多型と副作用との間の関連性が示唆された。そこで、さらに詳細な検討を加えてハプロタイプ解析を行った結果、あるハプロタイプの保有数に応じて副作用の発現頻度が減少することがわかった。

また、別の遺伝子多型でも副作用発現との関連性を示唆する知見を得た。

(5) 個別化投与法のプロトタイプ創出

本検討により、AZA の有効性あるいは安全性の個人差の要因となりうる PG マーカーが抽出された。プロトタイプではあるが、統計学的解析を加えて、新たに見出した PG マーカーを組み入れた統合的アルゴリズムを創出し、その活用法の提案を試みた。今後さらなる臨床研究を通して、これらを検証していくことにより、AZA の個別化適正投与に繋がることが期待される。

(6) 薬学生の臨床研究マインド育成に適した臨床薬理教育プログラムの立案

臨床研究教育については、実践的な複数の臨床研究を活用して学生の臨床研究マインドの育成を試みるとともに、Web 公開講座を活用した逆転授業的セミナーやボトムアップミーティングを導入して一定の成果を得た。学生自身の視点で見出したりサーチクエスションから新たな研究計画を立案し、調査・解析するなど、学生の臨床研究意識を啓発できた。一連の臨床研究プロセス学修に向けた基盤教育プログラムのプロトタイプを創出できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Matsumoto T, Ohno M, Azuma J. Future of Pharmacogenetics-based therapy for tuberculosis. *Pharmacogenomics*, 2014;15(5):601-607. 査読有. doi: 10.2217/pgs.14.38.

〔学会発表〕(計 5 件)

大野雅子, 奥村早喜, 上野山博子, 桂木聡子, 橋本佳奈, 村上雅裕, 天野学, 森山雅弘, 南畝晋平, 田尻仁. 小児炎症性腸疾患のアザチオプリン療法に及ぼす *ITPA* 遺伝子多型の影響. 第 36 回日本臨床薬理学会学術総会. 2015 年 12 月 9-11 日. 京王プラザホテル (東京都新宿区).

Ohno M, Tajiri H. Possible

contribution of inosine triphosphate pyrophosphatase gene polymorphisms to azathioprine therapy in children with Crohn's Disease. The 14th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. 2015 年 10 月 11-15 日 (Rotterdam, The Netherlands).

大野雅子, 横田総一郎, 東純一, PGx 結核治療法の臨床試験グループ. 排菌陽性結核症に対する PGx 結核療法の臨床効果. 第 34 回日本臨床薬理学会学術総会. 2013 年 12 月 4-6 日. 東京国際フォーラム (東京都千代田区).

Ohno M, Yokota S, Azuma J. Therapeutic potential of the NAT2 genotype-guided dosing stratification of isoniazid in chemotherapy for tuberculosis. The 13th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology. 2013 年 09 月 22-26 日 (Salt Lake City, USA).

大野雅子, 東純一, PGx 結核治療法の臨床試験グループ. 排菌陽性患者における NAT2 多型を活用した個別化結核治療の効果. 医療薬学フォーラム 2013/第 21 回クリニカルファーマシーシンポジウム. 2013 年 7 月 20-21 日. 石川県立音楽堂・ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県金沢市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 雅子 (OHNO, Masako)
兵庫医療大学・薬学部・講師
研究者番号: 50467528

(2) 連携研究者

東 純一 (AZUMA, Junichi)
兵庫医療大学・薬学部・教授
研究者番号: 30144463
(平成 26 年 9 月まで連携研究者)