

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590936

研究課題名（和文）MRP4 遺伝子多型解析による炎症性腸疾患に対するテラーメイド免疫療法の構築

研究課題名（英文）Ready to go for treatment of Inflammatory bowel disease by using analyzing MRP4 SNPs

研究代表者

伴 宏充（Ban, Hiromitsu）

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：30598363

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000 円、（間接経費） 1,170,000 円

研究成果の概要（和文）：潰瘍性大腸炎・クローン病患者および健常者のサンプルDNAは合計279人となり、3遺伝子のSNPをTaqMan probe法と従来のDirect sequence法の双方で検討を行った。MRP4 G2269A SNPはG/Aが68名、A/Aが7名でアリル頻度は14.7%であった。TPMT A719G SNPはA/Gが5名、G/Gが0名でアリル頻度は0.9%であった。ITPA C94A SNPはC/Aが61名、A/Aが6名でアリル頻度は13.1%であった。このことよりTaqMan SNP Genotyping Assaysを使用したTaqMan probe法は迅速なSNP解析に有用である。

研究成果の概要（英文）：Sample DNA of ulcerative colitis, the Crohn disease patient who collected it by 2014 and the physically unimpaired person volunteer examined 279 personality in total, SNP of 3 genes in the both sides of the TaqMan probe method and the conventional Direct sequence method. As for the MRP4 G2269A SNP, 68 people, A/A were seven people G/A, and the alllyl frequency was 14.7%. As for the TPMT A719G SNP, five people, G/G were 0 people A/G, and the alllyl frequency was 0.9%. As for the ITPA C94A SNP, 61 people, A/A were six people C/A, and the alllyl frequency was 13.1%. There was no great difference and a result of HapMap, and there was a difference by the TaqMan probe method and the Direct sequence method neither. It was revealed that the TaqMan probe method using TaqMan SNP Genotyping Assays was more useful for quick SNP analysis than the above-mentioned result.

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 薬剤感受性遺伝子 遺伝子一塩基多型

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) に代表される炎症性腸疾患 (IBD) の患者数が爆発的に増加している。IBD 診療において、ステロイドの減量とともに症状の悪化をきたすステロイド依存型 UC や CD の寛解維持のために、2006 年に免疫調節剤 (アザチオプリン (AZA)/6-メルカプトプリン (6-MP) などのチオプリン製剤) の保険適応が認められ、その投与機会が増えている。一方、白血球減少や肝機能障害などの副作用が 15-30% の患者に起こると報告され (Gisbert JP. et al. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1783-1800)、また、日本人はこの薬剤に対する感受性が高く欧米人に比べて少量の投与が推奨されている (日本人 0.6-1.2mg/kg/日, 欧米人 2-3mg/kg/日) (Hibi T et al. *J Gastroenterol.* 2003;38:740-6)。我々は、投与量の指標として AZA/6-MP の最終代謝産物の 6-thioguanine nucleotide (6-TGN) 血中濃度 (基準値 250-450 pmol/8 × 10<sup>8</sup>RBC) の測定が投与量の調節に有用であることや、6-TGN 濃度と白血球数が逆相関することを報告してきた (Andoh A et al. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:1373-7)。

白血球減少や日本人特有のチオプリン高感受性について、AZA/6-MP の代謝酵素である thiopurine s-methyltransferase (TPMT) や inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase) の遺伝子多型との関連が示唆されてきた。これらの酵素遺伝子の一塩基多型 (SNP) が酵素活性の低下をまねき副作用やこれらの薬剤に対する高感受性を惹起するとされている (図 1)。しかし、日本人では、TPMT 遺伝子多型 (A719G ; rs1142345) の頻度は数パーセントにとどまり (Takatsu N et al. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:1258-64)、また、ITPase 遺伝子多型との関連は、メタアナリシスの解析では否定されている (Van Dieren JM et al. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26:643-52)。

すなわち、日本人におけるチオプリン高感受性や白血球減少と関連した遺伝的背景因子は未だ特定されていない。

一方、細胞膜に存在する薬物トランスポーター multidrug resistance protein 4 (MRP4) は、6-MP や 6-TGN の細胞内から細胞外への能動輸送に係わり、その活性低下は、6-TGN の細胞内への蓄積を招き白血球減少や骨髄抑制などに至るとされる (図 1)。2008 年には MRP4 遺伝子 SNP (G2269A ; rs3765534) が、MRP4 蛋白の細胞膜発現低下を来たし 6-TGN の細胞外への排出異常から細胞内 6-TGN 濃度が上昇し骨髄抑制をきたすことが報告された (Krishnamurthy P et al. *Cancer Res.* 2008;68:4983-9)。

さらに、HapMap などの SNP に関するデータベースでは、MRP4 遺伝子 SNP は日本人の約 20% 前後に認められるが白人や黒人にはほとんど認められない、日本人に特有の

SNP とされている。すなわち、この MRP4 遺伝子の多型が、日本人特有のチオプリン高感受性や白血球低下の副作用と密接に関連している可能性が示唆される。しかし、これまで MRP4 遺伝子多型を臨床症例において検討した報告は日本人、欧米人を含めてなされていない。我々は、この MRP4 遺伝子多型に注目し、2010 年に世界で初めて日本人 IBD 患者におけるチオプリン高感受性と MRP4 遺伝子多型の関連について明らかにした (Ban H et al. *J Gastroenterol.*)。未だ、他疾患での検討も報告されていない。すなわち、MRP4 遺伝子 SNP をもつ患者では、6-TGN の上昇と白血球の有意な低下を認めた。さらに、MRP4 遺伝子 SNP と ITPase 遺伝子 SNP の相互作用についても明らかにした。ただ、現在、この遺伝子多型の解析はダイレクトシーケンシング法を用いており、臨床の場における迅速な対応が困難な状況にある。本研究では、この MRP4 遺伝子多型とチオプリン高感受性との関連について、TPMT 遺伝子多型 (A719G ; rs1142345) と ITPase 遺伝子多型 (C94A ; rs1127354) との関連を含め追求すると同時に、これら遺伝子多型の簡便な同時解析法を確立し、炎症性腸疾患患者の免疫調節剤投与に際して、迅速な至適投与量の決定と副作用の予測につながるテーラーメイド治療法の構築を目的とする。

## 2. 研究の目的

2-1. MRP4 遺伝子、TPMT 遺伝子、ITPase 遺伝子 SNP のリアルタイム PCR 法を用いた同時解析法の確立

現在は、MRP4 遺伝子 SNP はダイレクトシーケンシング法、TPMT 遺伝子 SNP と ITPase 遺伝子 SNP は restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法を用いて解析している。これらの方法では迅速に多検体を解析できないため、蛍光標識した detection プローブとリアルタイム PCR を組み合わせた PCR ベースの解析法の確立を目指す。また、多検体からの迅速な DNA 抽出法の有用性についても検討する。

2-2. チオプリン製剤投与のテーラーメイド化の臨床検討 チオプリン製剤投与に当たり、MRP4 遺伝子 SNP を含めた解析を行い、免疫調節剤の初期投与量の割り付けを行い、治療効果、副作用、6-TGN 濃度を検討し遺伝子多型別の投与量の有用性を前向きに検討する。

## 3. 研究の方法

平成 23 年度は、主に (1) の SNPs 同時解析法の開発にあたる。短時間に多数の臨床検体 (EDTA 採血した末梢血) からサンプル DNA を迅速に抽出する必要があるため、市販されている数種類の DNA 抽出キットの有用性について基礎検討を加える。DNA 抽出法が確定した段階で、既報のリアルタイム PCR を応用した SNP 解析法を、MRP4、TPMT、ITPase の 3 遺伝

子それぞれについて検討する。すなわち、蛍光標識した SNP に相補的な detection プローブ（残る断端には蛍光のクエンチャーが結合）と SNP を挟む一組の PCR プローブを用意する。理論は、蛍光標識した detection プローブをサンプル DNA とハイブリダイゼーションし、その後、そこを挟むプローブで PCR をすることによりハイブリしていたプローブが分解され（クエンチャーが外れて）蛍光を発する（以下の図）。一方、相補的でない蛍光プローブはフリーのまま残るためクエンチャーの影響により蛍光がでない。これらを各 SNP に異なる蛍光色素を用いることにより、最終的に 3SNPs の同時解析を試みる。この新しい解析法の結果については従来からのダイレクトシーケンシング法と PCR ベースの RFLP 法にて確認する。

平成 24 年度以降は、23 年度に確立したリアルタイム PCR 法を応用した SNPs 解析法の精度の検証を進めると同時に、炎症性腸疾患患者において SNPs 解析に基づいたチオプリン製剤投与のテーラーメイド化の臨床的基礎検討をすすめる。第一は、チオプリン製剤ナীব症例を対象として、MRP4 遺伝子 SNP を中心とした遺伝背景とチオプリン投与量、治療効果、白血球数の推移、副作用出現率、血中 6-TGNs 濃度を前向きに調査し、関連を明らかにする。投与前に開発した方法を用いて SNPs 検索を行うと同時に、厚労省の難治性炎症性腸管障害調査研究班が示している炎症性腸疾患患者に対する

チオプリン製剤の投与量に準じてチオプリン製剤の投与を開始する（イムラン 50mg/日、もしくはロイケリン 30mg/日）。TPMT 遺伝子 SNP 症例は、数パーセントの確率で存在するが、副作用が必発するので投与しない。潰瘍性大腸炎については、投与前と投与 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月後の臨床症状について以下に示す Seo's index を用いて評価する（表 1）。内視鏡的な治療効果の判定は、投与前と 2 ヶ月後の下部内視鏡検査による所見につき判定は、厚労省研究班の重症度分類に従っておこなう。白血球数、6-TGNs 濃度を含めた臨床検査値は、投与前、投与 2 週、4 週、6 週、8 週目に行う。クローン病については、Crohn's disease activity index (CDAI) による臨床活動度による評価を用いる。これらについて、SNPs の結果との統計学的解析を加え、至適投与量、副作用発現予測の基礎データを得る。さらに、SNPs の重複と臨床効果、副作用発現、臨床データとの関連を数値化し、日本人に特有のチオプリン高感受性の背景を明らかにする。MRP4 を含めたチオプリン代謝酵素遺伝子 SNPs に基づいたチオプリン投与量設定を、臨床活動度、内視鏡重症度、投与前白血球数などの数値を用いたデータマイニングにより数式化し、テーラーメイド治療の基礎検討を行う。エンドポイントは 6 カ月後の有害事象発生率を Cox の比例ハザードモデルで算出する。（TPMT SNP(-) +

MRP4 SNP(-) 群を基準とした相対および絶対リスクの低下を評価する）

#### 4. 研究成果

MRP4、TPMT、ITPase の 3 遺伝子における SNPs の同時解析法の開発について検討した結果、短時間に多数の臨床検体からサンプル DNA を抽出するために、最も安定して採取が可能であった QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, 51106) を DNA 抽出キットとして、また、SNP 解析法は Light Cycler 480 (Roche) を使用した Applied Biosystems 社の TaqMan probe 法 (TaqMan SNP Genotyping Assays) を用いることとした。

2014 年度までに収集した潰瘍性大腸炎・クローン病患者および健康者ボランティアのサンプル DNA は合計 279 人となり、3 遺伝子の SNP を TaqMan probe 法と従来の Direct sequence 法の双方で検討を行った。TaqMan SNP Genotyping Assays の probe は TPMT A719G (rs1142345) は Assay ID: C\_19567\_20 を、MRP4 G2269A (rs3765534) は Assay ID: C\_27478235\_20 を、ITPase C94A (rs1127354) は Assay ID: C\_27465000\_10 の probe を使用した。

MRP4 G2269A SNP は G/A が 68 名、A/A が 7 名でアリル頻度は 14.7%であった。TPMT A719G SNP は A/G が 5 名、G/G が 0 名でアリル頻度は 0.9%であった。ITPase C94A SNP は C/A が 61 名、A/A が 6 名でアリル頻度は 13.1%であった。いずれも HapMap の結果と大差なく、TaqMan probe 法と Direct sequence 法では相違がなかった。以上の結果より、TaqMan SNP Genotyping Assays を使用した TaqMan probe 法は迅速な SNP 解析に有用であることが明らかとなった。

本検討により確立した TaqMan probe 法を用いて、炎症性腸疾患患者における SNPs 解析に基づいたチオプリン製剤投与のテーラーメイド化の臨床的基礎検討をすすめた。第一は、チオプリン製剤ナীব症例を対象として、MRP4 遺伝子 SNP を中心とした遺伝背景とチオプリン投与量、治療効果、白血球数の推移、副作用出現率、血中 6-TGNs 濃度を前向きに調査し、関連を明らかにする。投与前に開発した方法を用いて SNPs 検索を行うと同時に、厚労省の難治性炎症性腸管障害調査研究班が示している炎症性腸疾患患者に対するチオプリン製剤の投与量に準じてチオプリン製剤の投与を開始する（イムラン 50mg/日、もしくはロイケリン 30mg/日）。TPMT 遺伝子 SNP 症例は、数パーセントの確率で存在するが、副作用が必発するので投与しない。潰瘍性大腸炎については、投与前と投与 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月後の臨床症状について以下に示す Seo's index を用いて評価する。内視鏡的な治療効果の判定は、投与前と 2 ヶ月後の下部内視鏡検査により厚労省研究班の重症度分類に従って行う。白血球数、6-TGN 濃度を含めた臨床検査値は、投与

前、投与 2 週、4 週、6 週、8 週目に行う。  
クローン病については、Crohn's disease activity index(CDAI) による臨床活動度による評価を用いる。これらについて、SNPs の結果との統計学的解析を加え、至適投与量、副作用発現予測の基礎データを得た。

#### 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 3 件)

1)安藤 朗, 今枝広丞, 大崎理恵, 伴 宏充 炎症性腸疾患-病因解明と診断・治療の最新知見- 特論 チオプリン代謝関連酵素の遺伝子多型と日本人における特徴 日本臨床 70(1):639-645, 2012、査読有

2)Osaki R, Imaeda H, Ban H, Aomatsu T, Bamba S, Tsujikawa T, Sasaki M, Fujiyama Y, Andoh A. Accuracy of genotyping using the TaqMan PCR assay for single nucleotide polymorphisms responsible for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Exp Ther Med*. 2(5):783-786, 2011、査読有

3)安藤 朗, 伴 宏充, 大崎理恵, 今枝広丞 潰瘍性大腸炎の Therapeutic Strategy Standard な治療法から最新情報まで - 病態解析に基づく実現性の高い治療戦略 - 日本人特有のチオプリン高感受性遺伝子の同定とテーラーメイド医療の展開 *Intestine* 15(3):267-272, 2011 査読無

〔学会発表〕(計 3 件)

1)伴 宏充, 安藤 朗, 藤山 佳秀 遺伝子多型解析と消化器疾患 炎症性腸疾患患者におけるチオプリン高感受性遺伝子の検討 第 99 回日本消化器病学会総会、2013

2)安藤 朗, 今枝広丞, 伴 宏充 MRP4/ABCC4 遺伝子多型と炎症性腸疾患 日本人特有のチオプリン高感受性との関連 第 84 回日本生化学会大会、2011

3)大崎理英, 安藤 朗, 伴 宏充, 今枝広丞, 馬場重樹, 塩谷 淳, 青松友槻, 稲富 理, 佐々木雅也, 辻川知之, 斎藤康晴, 藤山佳秀 アザチオプリン/6-メルカプトプリン投与時における TaqMan probe を用いたチオプリン体代謝酵素一塩基多型の迅速診断法 第 53 回日本消化器病学会大会、2011

〔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

伴 宏充 (BAN, Hiromitsu)  
滋賀医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号: 30598363

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: