

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等政策研究事業
 難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
 分担研究報告書（平成 28 年度）

NUDT15 遺伝子多型を用いたチオプリン誘発白血球減少の予測

研究分担者 安藤 朗 滋賀医科大学 消化器内科 教授

研究要旨：チオプリン製剤は、炎症性腸疾患の寛解維持に重要な薬剤であるが、その投与中に、白血球減少、肝障害、嘔気などの副作用が生じ、使用継続が困難となる例が約 20%存在する。今回、NUDT15 の遺伝子多型を用いたチオプリン導入における副作用予測の可能性を検討した。

A. 研究目的

チオプリン製剤は、炎症性腸疾患の寛解維持に重要な薬剤であるが、その投与中に、白血球減少、肝障害、嘔気などの副作用が生じ、使用継続が困難となる例が約 20%存在する。今回、NUDT15 の遺伝子多型を用いたチオプリン導入における副作用予測の可能性を検討した。

B. 研究方法

当科通院中で、チオプリン製剤による治療を受けている炎症性腸疾患患者 161 例（潰瘍性大腸炎（UC）89 例、クローン病（CD）72 例）および健常者 103 例を対象とした。末梢血より DNA を採取し、TaqMan PCR 法を用いて NUDT15(rs116855232)、TPMT(rs1142345)、MRP4(rs3765534)、ITPA(rs1127354)の遺伝子多型を解析した。白血球減少の評価は NCI-CTCAE に準拠し、Grade2 (WBC<3000/mm³)を白血球減少と定義した。白血球減少および 6-TGN 濃度と各遺伝子多型について多変量解析を行った。6-TGN 濃度は HPLC 法で測定した。チオプリン投与後 8 週間以内の白血球減少を早期、チオプリン投与後 8 週以降の白血球減少を遅発性とし、NUDT15 遺伝子多型との関連を検討した。

（倫理面への配慮）

研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険

性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）を十分に行い、倫理面に問題がないと判断した場合には、その旨を記入するとともに必ず理由を明記することとした。

C. 研究結果

マイナーアレルの頻度は、NUDT15 が 10%、TPMT が 1.3%、MRP4 が 14%、ITPA が 13%であった（図 1）。白血球減少と各遺伝子多型との関連を、多変量解析で検討したところ、NUDT15 variant のみが有意な相関を認めた（OR:5.86、95%IC:2.50-13.60、P =3.91x10⁻⁵）（図 2）。また、NUDT15 variant は早期（P=2.0x10⁻¹²）および遅発性の白血球減少（P=1.9x10⁻⁴）と有意な相関が認められた（図 3）。NUDT15 homovariant の 2 例は重篤な白血球減少と重篤な脱毛をきたした（図 3）。しかし、NUDT15 variant と 6-TGN 濃度との有意な相関は認められなかった（P=0.36）（図 4）

（図 1）Genotype および Allele 頻度

Genotype allele	Total (n=264)	UC (n=89)	CD (n=72)	Healthy (n=79)
NUDT15 R139C				
C/C (wild type)	213 (80.7%)	69	58	86
C/T	48 (18.2%)	18	14	16
T/T	3 (1.1%)	2	0	1
Allele frequency	10.2%			
TPMT A719G				
A/A (wild type)	257 (97.3%)	86	70	101
A/G	7 (2.7%)	3	2	2
G/G	0	0	0	0
Allele frequency	1.30%			
MRP4 G2269A				
G/G (wild type)	196 (74.2%)	67	55	74
G/A	63 (23.9%)	20	16	27
A/A	5 (1.9%)	2	1	2
Allele frequency	13.80%			
ITPA C94A				
C/C (wild type)	203 (76.9%)	72	56	75
C/A	55 (20.8%)	16	16	23
A/A	6 (2.3%)	1	0	5
Allele frequency	12.7%			

（図 2）チオプリン関連白血球減少症に関する多変量解析

Variables	Odds ratio	95% CI	P value
NUDT15 variant	5.38	1.91-15.2	0.001
TPMT variant	1.31	0.17-9.97	0.79
MRP4 variant	1.71	0.62-4.74	0.3
ITPA variant	0.77	0.24-2.45	0.66
6-TGNs	1	1.0-1.00	0.37

(図3) IBD患者(n=161)のNUDT15遺伝子多型と白血球減少

NUDT15 genotype	WT (C/C) n=127	Hetero (C/T) n=32	Homo (T/T) n=2	P value
Leukopenia (WBC<3,000), n (%)	25 (19.6%)	18 (56%)	2 (100%)	1.7 x 10⁻⁵
Early leukocytopenia (within 8 week), n (%)	2 (1.6%)	2 (6.3%)	2 (100%)	1.03 x 10 ⁻⁴
Grade4 (WBC<1,000)	0	0	2	6.8 x 10 ⁻⁶
Grade3 (WBC<2,000)	1	1	0	
Grade2 (WBC<3,000)	1	1	0	
no leukopenia	125	30	0	
Late leukocytopenia (after 8 week), n (%)	23 (18.4%)	16 (53.3%)	-	4.3 x 10 ⁻⁴
Grade4 (WBC<1,000)	0	0	-	
Grade3 (WBC<2,000)	3	1	-	
Grade2 (WBC<3,000)	20	15	-	
no leukopenia	102	14	-	
Early severe hair loss, n(%)	0	0	2 (100%)	-

(図4) 白血球減少を来した患者(n=45)のチオプリン投与量と6-TGN濃度

NUDT15 genotype	WT (C/C)	Hetero (C/T)	Homo (T/T)	P value
Initial dose of AZA (mg/kg/day)	0.72 ± 0.05 (n=25)	0.73 ± 0.08 (n=18)	0.75 (n=2)	0.37
AZA dose at WBC nadir (mg/kg/day)				
Patients with leukocytopenia	0.96 ± 0.07 (n=25)	0.88 ± 0.09 (n=18)	0.75 (n=2)	0.26
6TGN levels at WBC nadir (pmol/8 × 10⁸ RBCs)				
Patients with leukocytopenia	370.6 ± 34.4 (n=25)	367.8 ± 55.9 (n=18)	341 (n=2)	0.4
with early leukocytopenia	364.0 (n=2)	292.0 (n=2)	341 (n=2)	-
with late leukocytopenia	371.3 ± 37.5 (n=23)	382.9 ± 64.5 (n=16)	-	0.43
Prednisolone dose at WBC nadir (mg/day)	9.2 ± 1.0 (n=3)	8.3 ± 1.5 (n=10)	12.5 ± 7.5 (n=2)	0.31

D. 考察

NUDT15 リスクホモは約1%の頻度であり、全症例で重篤な白血球減少および脱毛が認められ、チオプリン関連白血球減少症の予測因子として日本人においてもNUDT15の遺伝子多型解析が有用であると考えられた。さらに、6-TGNs濃度との相関は認められず、NUDT15の遺伝子多型に関連した白血球減少には6-TGNsの測定は有用ではないことが考えられた。このため、NUDT15の遺伝子多型を薬剤投与前に

測定し、リスクホモには投与禁忌、ヘテロタイプには慎重投与を行うことが臨床的には重要となると考えられる。

E. 結論

NUDT15 homovariant に対しては、チオプリン投与は、基本的に禁忌。NUDT15 heterovariant は慎重投与すべきと考えられた。チオプリン誘発性白血球減少の予測因子として、NUDT15の遺伝子多型解析は有用であると考えられ、個別化治療のツールとしての可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Yoshino T, Nakase H, Takagi T, Bamba S, Okuyama Y, Kawamura T, Oki T, Obata H, Kawanami C, Katsushima S, Kusaka T, Tsujikawa T, Naito Y, Andoh A, Kogawa T. Risk factors for developing colorectal cancer in Japanese patients with ulcerative colitis: a retrospective observational study-CAPITAL (Cohort and Practice for IBD total management in Kyoto-Shiga Links) study I. *BMJ Open Gastroenterol.* 2016 Nov 24;3(1):e000122. PubMed PMID: 27933204.

2: Nishida A, Imaeda H, Ohno M, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Andoh A. Efficacy and safety of single fecal microbiota transplantation for Japanese patients with mild to moderately active ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 2016 Oct 11. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27730312.

3: Asada A, Bamba S, Morita Y, Takahashi K, Imaeda H, Nishida A, Inatomi O, Sugimoto M, Sasaki M, Andoh A. The effect of CYP3A5

genetic polymorphisms on adverse events in patients with ulcerative colitis treated with tacrolimus. *Dig*

Liver Dis. 2016 Sep 21. pii: S1590-8658(16)30738-1.

doi:10.1016/j.dld.2016.09.008. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27717793.

4: Andoh A, Nishida A, Takahashi K, Inatomi O, Imaeda H, Bamba S, Kito K, Sugimoto M, Kobayashi T. Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *J Clin Biochem Nutr.* 2016 Jul;59(1):65-70. doi: 10.3164/jcbn.15-152. PubMed PMID: 27499582; PubMed Central PMCID: PMC4933688.

5: Ban H, Bamba S, Nishida A, Inatomi O, Shioya M, Takahashi KI, Imaeda H, Murata M, Sasaki M, Tsujikawa T, Andoh A. Prognostic factors affecting early colectomy in patients with moderate to severe ulcerative colitis treated with calcineurin inhibitors. *Exp Ther Med.* 2016 Aug;12(2):829-834. PubMed PMID: 27446283; PubMed Central PMCID: PMC4950154.

6: Kanda T, Nishida A, Ohno M, Imaeda H, Shimada T, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Andoh A. *Enterococcus durans* TN-3 Induces Regulatory T Cells and Suppresses the Development of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Experimental Colitis. *PLoS One.* 2016 Jul 20;11(7):e0159705. doi: 10.1371/journal.pone.0159705. PubMed PMID: 27438072; PubMed Central PMCID: PMC4954729.

7: Morita Y, Imaeda H, Nishida A, Inatomi O, Bamba S, Sasaki M, Tsujikawa T, Sugimoto M, Andoh A. Association between serum adalimumab concentrations and endoscopic disease activity in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016 Nov;31(11):1831-1836. doi: 10.1111/jgh.13400. PubMed PMID: 27043158.

8: Morita Y, Bamba S, Takahashi K, Imaeda H, Nishida A, Inatomi O, Sasaki M, Tsujikawa T, Sugimoto M, Andoh A. Prediction of clinical and endoscopic responses to anti-tumor necrosis factor-antibodies in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2016 Aug;51(8):934-41. doi: 10.3109/00365521.2016.1144781. PubMed PMID: 26888161.

9: Andoh A. Physiological Role of Gut Microbiota for Maintaining Human Health. *Digestion.* 2016;93(3):176-81. doi: 10.1159/000444066. PubMed PMID: 26859303.

10: Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T, Fujii M, Shioya M, Imaeda H, Inatomi O, Bamba S, Sugimoto M, Andoh A. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion.* 2016;93(1):59-65. doi: 10.1159/000441768. Erratum in: *Digestion.* 2016;93(2):174. PubMed PMID: 26789999.

11: Nishida A, Hidaka K, Kanda T, Imaeda H, Shioya M, Inatomi O, Bamba S, Kito K, Sugimoto M, Andoh A. Increased Expression of Interleukin-36, a Member of the Interleukin-1 Cytokine Family, in

Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2016 Feb;22(2):303-14. doi: 10.1097/MIB.0000000000000654. PubMed PMID: 26752465.

12: Ohno M, Koyama S, Ohara M, Shimamoto K, Kobayashi Y, Nakamura F, Mitsuru K, Andoh A. Pyoderma Gangrenosum with Ulcerative Colitis Successfully Treated by the Combination of Granulocyte and Monocyte Adsorption Apheresis and Corticosteroids. *Intern Med.* 2016;55(1):25-30. doi: 10.2169/internalmedicine.55.5422. PubMed PMID: 26726081.

13: Asada A, Nishida A, Shioya M, Imaeda H, Inatomi O, Bamba S, Kito K, Sugimoto M, Andoh A. NUDT15 R139C-related thiopurine leukocytopenia is mediated by 6-thioguanine nucleotide-independent mechanism in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2016 Jan;51(1):22-9. doi: 10.1007/s00535-015-1142-4. PubMed PMID: 26590936.

2. 学会発表

1. 森田幸弘、馬場重樹、安藤 朗 パネルディスカッション3「IBD モニタリングツールをいかに使いこなすか？」 潰瘍性大腸炎におけるUCEISを用いた内視鏡的活動度評価と抗TNF- α トラフ濃度との関連 第102回 日本消化器病学会総会(東京)、平成28年4月23日
2. 浅田歩美潰瘍性大腸炎患者におけるCYP3A5 遺伝子多型がタクロリムス投与例の経過に与える影響について第102回 日本消化器病学会総会(東京)、平成28年4月22日

3. Takahashi K., H.Imaeda, A.Andoh High butyrate-producing bacteria species are reduced in the fecal microbial community in Crohn's diseaseThe 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (Kyoto), July 9, 2016
4. Imaeda H., Y.Morita, T.Fujimoto, K.Takahashi, A.Nishida, O.Inatomi, S.Bamba, M.Sasaki, T.Tsujikawa, M.Sugimoto, A.Andoh Serum adalimumab trough levels required for mucosal healing during maintenance therapy of Crohn's diseaseThe 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (Kyoto), July 9, 2016
5. Morita Y., S.Bamba, K.Takahashi, H.Imaeda, A.Nishida, O.Inatomi, M.Sasaki, T.Tsujikawa, M.Sugimoto, A.AndohPrediction of clinical and endoscopic responses to anti-tumor necrosis factor- α antibodies in ulcerative colitisThe 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (Kyoto), July 8-9, 2016
6. Ohno M., A.Nishida, S.Sakai, K.Nishino, M.Fujii, Y.Morita, H.Imaeda, A.Andoh Highly bioavailable curcumin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (Kyoto), July 8-9, 2016
7. Kanda T., A.Nishida, K.Takahashi, K.Hidaka, H.Imaeda, O.Inatomi, S.Bamba, M.Sugimoto, A.Andoh Interleukin(IL)-36 and IL-36 induce proinflammatory mediators from human

- colonic subepithelial myofibroblasts.
The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (Kyoto), July 8-9, 2016
8. Fujii M., A.Nishida, K.Takahashi, S.Bamba, A.Andoh The role of Interleukin-26 in Inflammatory Bowel Disease The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (Kyoto), July 8-9, 2016
 9. Nishida A., M.Shioya, H.Imaeda, O.Inatomi, S.Bamba, M.Sugimoto, A.Andoh NUDT15 R139C-related thiopurine leukocytopenia is mediated by 6-thioguanine nucleotide-independent mechanism in Japanese patients with inflammatory bowel disease The 4th Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's & Colitis (Kyoto), July 8-9, 2016
 10. 森田幸弘、馬場重樹、大野将司、藤井誠、高橋憲一郎、今枝広丞、西田淳史、稲富理；來住優輝（彦根市立病院）；駒井康伸（長浜赤十字病院）；杉本光繁（滋医大・光診）；辻川知之（同・総内／東近江総合医療セ）；佐々木雅也（滋医大・栄）；安藤朗 Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity(UCEIS)を用いた抗 TNF- 抗体製剤の有効性予測と粘膜治癒と血清トラフ濃度との関連性について 第7回 日本炎症性腸疾患学会学術集会（京都）平成28年7月10日
 11. 馬場重樹、高橋憲一郎、森田幸弘、今枝広丞、西田淳史、稲富理；佐々木雅也（滋医大・栄）；杉本光繁（同・光診）；安藤朗 チオプリン製剤の代謝産物である 6-methylmercaptapurine/6-thioguanine nucleotide 比に影響を与える因子について 第7回 日本炎症性腸疾患学会学術集会（京都）平成28年7月10日
 12. 西田淳史、浅田歩美、高橋憲一郎、今枝広丞、馬場重樹；杉本光繁（滋医大・光診）；安藤朗 チオプリン誘発性白血球減少と NUDT15 遺伝子多型との関連についての検討 第7回 日本炎症性腸疾患学会学術集会（京都）平成28年7月10日
 13. 西田淳史、浅田歩美、安藤朗 ワークショップ1「炎症性腸疾患の診断と治療の最前線」 チオプリン誘発性白血球減少の予測因子としての NUDT15 遺伝子多型の有用性 第105回 日本消化器病学会近畿支部例会（大阪）、平成28年9月17日
 14. 今枝広丞、森田幸弘、安藤朗 パネルディスカッション2「粘膜治癒を目指した IBD の治療戦略」 クロウン病内視鏡的粘膜治癒に必要なアダリムマブ血清トラフ値に関する検討 第92回 日本消化器内視鏡学会総会、第58回 日本消化器病学会大会、第14回 日本消化器外科学会大会 合同（神戸）平成28年11月3日
 15. Imaeda H. Comparison of the Gut Microbial Community Between Obese and Lean Peoples Using 16S Gene Sequencing in Japanese Population Asian Pacific Digestive Week 2016 (Kobe), Nov 3, 2016
 16. 森田幸弘、馬場重樹、西田淳史 パネルディスカッション8「生物製剤抵抗性炎症性腸疾患の治療方針をめぐって」 クロウン病における抗 TNF 抗体製剤の治療戦略について～累積投与継続率を向上させるには～ 第58回 日本消化器病学会大会、第92回 日本消化器内視鏡学会総会、第14回 日本消化器外科学会大会 合同（神戸）平成28年11月4日
 17. 西田淳史、馬場重樹、今枝広丞；杉本光繁（滋医大・光診）；安藤朗 当科における潰瘍性大腸炎に対する糞便移植法の効果の

検討 第 58 回 日本消化器病学会大会（神戸）平成 28 年 11 月 5 日

18. 西田淳史、浅田歩美、安藤 朗 NUDT15 遺伝子多型とチオプリン関連早期，晚期白血球減少との関連 第 58 回 日本消化器病学会大会（神戸）平成 28 年 11 月 5 日
19. Imaeda H. Serum Adalimumab trough Levels Required for Mucosal Healing During Crohn ' s Disease Maintenance Therapy Asian Pacific Digestive Week 2016 (Kobe) , Nov 5 , 2016
20. 西田淳史、今枝広丞、馬場重樹、安藤 朗 ワークショップ 2 「大腸疾患とプロバイオティクス，便移植」 当科での潰瘍性大腸炎に対する糞便微生物移植法の検討 第 71 回 日本大腸肛門病学会学術集会（三重）、平成 28 年 11 月 18 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

- 1 . 特許取得
なし
- 2 . 実用新案登録
なし
- 3 . その他
なし