

研究計画書（第1版）

炎症性腸疾患における Pharmacogenomics 研究およびその遺伝子変異の検討

研究責任者（研究代表者）

地方独立行政法人山梨県立病院機構・山梨県立中央病院
消化器内科 小嶋裕一郎

研究分担者

消化器内科 小俣政男、望月 仁、鈴木洋司、細田健司、
高岡慎弥、吉村 大、中込圭子、芦沢 浩、
ゲノム解析センター 弘津陽介
中央検査部 雨宮健司

個人情報管理者

矢崎麻紀子

個人情報分担管理者

内田 拓郎

連絡先

山梨県立病院機構・山梨県立中央病院
〒400-8506 山梨県甲府市富士見 1-1-1
電話： 055-253-7111
FAX： 055-253-8011

2016 年 7 月 15 日 第1版

1. 目的

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎(以下 UC)およびクローン病(以下 CD)における治療反応性、副作用出現に関するゲノム異常を明らかにし、治療を行う際の治療予測、副作用発現に関わる遺伝子異常の同定を行う。また UC、CD における変異を明らかにする。

2. 背景

炎症性腸疾患患者は増加の一途を辿り、厚生労働省の 2014 年度の特定疾患患者登録数は UC181,560 人、CD42,397 名となっている。また、若年発症の患者が多く今後消化器疾患の中で重要性がさらに増してくることが明らかである。また治療選択肢も多くなり、当初から治療に用いられている 5ASA 製剤に加えて、チオプリン製剤(アザチオプリン、6メルカプトプリン)、タクロリムス、抗 TNF- α 抗体(インフリキシマブ、アダリムマブ)が使用可能となった。これらの薬剤は患者毎に有効性および副作用発現頻度が異なり、これまでにいくつかの遺伝子変異が、薬剤の有効性および副作用に関連することが、明らかにされている。たとえば *NUDT15* のミスセンス変異により、チオプリン製剤による白血球減少がこうりつに起こること、*HLA-DQA1-HLA-DRB1* variant がチオプリン製剤による膵炎の可能性を高めること、*Cyp3A* polymorphism、*ACBC1* polymorphism が、タクロリムスの血中濃度を下げることなどが、報告されている。

3. 対象

山梨県立中央病院を受診、通院中の患者。

UC あるいは CD の診断が臨床的に確定している患者。

本研究に関して、患者本人あるいは代諾者から文書で同意を得ている患者。

4. 目標症例数

上記の適格基準を満たす UC, CD 患者 200 名

を当面の目標とする

5. プロトコール

5-1

患者由来組織の遺伝子を絞り込んだ遺伝子パネルを用いたターゲットシーケンス、全遺伝子を対象とするエクソーム解析、RNA シーケンス解析を実施する。また、既知の SNP がある場合はそれに関して、検討する。

5-2

ターゲットシーケンス、エクソーム解析で同定した変異を起こした遺伝子機能から、細胞内で異常になるシグナル経路を調べる。また、RNA シーケンス解析から融合遺伝子の

同定をする。

6. 方法

末梢血検体からの DNA 抽出は、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen 社)を使用する。血液を遠心分離して上清をチューブに回収し、さらに 20000g,10 分間遠心後の血漿を -80℃で凍結保存する。血液を遠心分離した中間層を白血球サンプルとする。血漿からの DNA 抽出は、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (キアゲン社)、白血球からの DNA 抽出は、QIAamp DNA Blood Mini Kit(キアゲン社)を使用する。ターゲットシーケンス、エクソーム解析にはマルチプレックス PCR 法により目的の遺伝子領域を増幅し、ライフテクノロジー社の次世代シーケンサー IonPGM または IonProton を用いてシーケンス解析を行う。RNA の抽出にはキアゲンのキットを使用し、バイオアナライザ 2100 (アジレント社)で RNA 分解度を調べて品質確認をする。RNA を cDNA に逆転写後、酵素法により断片化した cDNA ライブラリを作成し、次世代シーケンサーで解析を行う。SNP に関しては Sanger Sequencing 法を用いて行う。

7. 個人情報の管理

個人情報の管理は全て国の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（文部科学省・厚生労働省・経済産業省：平成 25 年 2 月 8 日全部改正版）」に基づき実施する。個人情報管理者、個人情報分担管理者を置き連結可能匿名化を行った上でデータ解析を行う。

8. 説明と同意

別紙の患者説明書（解析計画書の開示）及び山梨県立中央病院遺伝子検査説明書・同意書第 2 版（2013 年 9 月 1 日改訂）を用いて担当医より十分に説明し、同意を書面で取得する。試料については 本研究実施後、他の遺伝子探索に将来利用する場合を想定し保存する。（山梨県立中央病院遺伝子検査説明書・同意書第 2 版の記載に準じる）。本研究内容については、当院で院内掲示を行うことで患者への書面による新たな同意は省略する。

9. 当院で本研究を行う意義

次世代シーケンサー技術の発展により、個別化医療が可能となる時代が到来する。これにより副作用のリスクが少ない、個々にあった薬剤の選択が可能となり、テーラーメイド診療が可能となることが期待される。当院では次世代シーケンサーをいち早く導入し、遺伝情報を治療に応用するために、ゲノム解析センターで臨床的シーケンスの体制を整えてきた。これを有効に活用し、炎症性腸疾患診療の発展に寄与できる。

10. 経費

遺伝子検索の本人負担は無しとする

11. 参考文献

1. **Amin J**, Huang B, Yoon J, Shih DQ. Update 2014: advances to optimize 6-mercaptopurine and azathioprine to reduce toxicity and improve efficacy in the management of IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2015; **21**(2): 445-452 [PMID: 25248004 DOI: 10.1097/mib.0000000000000197]
2. **Colombel JF**, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, Lichtiger S, D'Haens G, Diamond RH, Broussard DL, Tang KL, van der Woude CJ, Rutgeerts P. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *The New England journal of medicine* 2010; **362**(15): 1383-1395 [PMID: 20393175 DOI: 10.1056/NEJMoa0904492]
3. **Present DH**, Meltzer SJ, Krumholz MP, Wolke A, Korelitz BI. 6-Mercaptopurine in the management of inflammatory bowel disease: short- and long-term toxicity. *Annals of internal medicine* 1989; **111**(8): 641-649 [PMID: 2802419]
4. **Meijer B**, Mulder CJ, Peters GJ, van Bodegraven AA, de Boer NK. Efficacy of thioguanine treatment in inflammatory bowel disease: A systematic review. *World J Gastroenterol* 2016; **22**(40): 9012-9021 [PMID: 27833392 PMCID: PMC5083806 DOI: 10.3748/wjg.v22.i40.9012]
5. **Sandborn WJ**. Pharmacogenomics and IBD: TPMT and thiopurines. *Inflammatory bowel diseases* 2004; **10**: S35-S37
6. **Yang SK**, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, Haritunians T, Ye BD, Kim KJ, Park SH, Park SK, Yang DH, Dubinsky M, Lee I, McGovern DP, Liu J, Song K. A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to

thiopurine-induced leukopenia. *Nature genetics* 2014; **46**(9): 1017-1020 [PMID: 25108385 PMCID: PMC4999337 DOI: 10.1038/ng.3060]

7. **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. *Journal of gastroenterology* 2016; **51**(1): 22-29 [PMID: 26590936 DOI: 10.1007/s00535-015-1142-4]

8. **Chiangthong K**, Ittiwut C, Muensri S, Sophonphan J, Sosothikul D, Seksan P, Suppipat K, Suphapeetiporn K, Shotelersuk V. NUDT15 c.415C>T increases risk of 6-mercaptopurine induced myelosuppression during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2016; **101**(1): e24-26 [PMID: 26405151 PMCID: PMC4697903 DOI: 10.3324/haematol.2015.134775]

9. **Yang JJ**, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, Pei D, Chen Y, Crews KR, Kornegay N, Wong FL, Evans WE, Pui CH, Bhatia S, Relling MV. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015; **33**(11): 1235-1242 [PMID: 25624441 PMCID: PMC4375304 DOI: 10.1200/jco.2014.59.4671]

10. **Shah SA**, Paradkar M, Desai D, Ashavaid TF. Nucleoside diphosphate-linked moiety X-type motif 15 C415T variant as a predictor for thiopurine-induced toxicity in Indian patients. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2017; **32**(3): 620-624 [PMID: 27416873 DOI: 10.1111/jgh.13494]

11. **Ailing Z**, Jing Y, Jingli L, Yun X, Xiaojian Z. Further evidence that a variant of the gene NUDT15 may be an important predictor of azathioprine-induced toxicity in Chinese subjects: a case report. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 2016; **41**(5): 572-574 [PMID: 27381176 DOI: 10.1111/jcpt.12420]
12. **Moriyama T**, Nishii R, Perez-Andreu V, Yang W, Klussmann FA, Zhao X, Lin TN, Hoshitsuki K, Nersting J, Kihira K, Hofmann U, Komada Y, Kato M, McCorkle R, Li L, Koh K, Najera CR, Kham SK, Isobe T, Chen Z, Chiew EK, Bhojwani D, Jeffries C, Lu Y, Schwab M, Inaba H, Pui CH, Relling MV, Manabe A, Hori H, Schmiegelow K, Yeoh AE, Evans WE, Yang JJ. NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nature genetics* 2016; **48**(4): 367-373 [PMID: 26878724 PMCID: PMC5029084 DOI: 10.1038/ng.3508]
13. **Hirotsu Y**, Nakagomi H, Sakamoto I, Amemiya K, Mochizuki H, Omata M. Detection of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Japanese population using next-generation sequencing. *Mol Genet Genomic Med* 2015; **3**(2): 121-129 [PMID: 25802882 PMCID: PMC4367084 DOI: 10.1002/mgg3.120]
14. **Sakamoto I**, Hirotsu Y, Nakagomi H, Ouchi H, Ikegami A, Teramoto K, Amemiya K, Mochizuki H, Omata M. BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients with ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Cancer* 2016; **122**(1): 84-90 [PMID: 26439132 DOI: 10.1002/cncr.29707]
15. **Hirotsu Y**, Nakagomi H, Amemiya K, Oyama T, Inoue M, Mochizuki H, Omata M, Hirotsu Y, Nakagomi H, Sakamoto I, Amemiya K, Oyama T, Mochizuki H, Omata M. Intrinsic HER2 V777L mutation mediates resistance to trastuzumab in a breast cancer patient. Multigene panel analysis identified germline mutations

of DNA repair genes in breast and ovarian cancer. *Med Oncol* 2017; **34**(1): 3 [PMID: 27900589]

16. **Hirotsu Y**, Nakagomi H, Sakamoto I, Amemiya K, Oyama T, Mochizuki H, Omata M. Multigene panel analysis identified germline mutations of DNA repair genes in breast and ovarian cancer. *Mol Genet Genomic Med* 2015; **3**(5): 459-466 [PMID: 26436112]

17. **Kopylov U**, Battat R, Benmassaoud A, Paradis-Surprenant L, Seidman EG. Hematologic indices as surrogate markers for monitoring thiopurine therapy in IBD. *Dig Dis Sci* 2015; **60**(2): 478-484 [PMID: 25236422 DOI: 10.1007/s10620-014-3362-5]

18. **Kakuta Y**, Naito T, Onodera M, Kuroha M, Kimura T, Shiga H, Endo K, Negoro K, Kinouchi Y, Shimosegawa T. NUDT15 R139C causes thiopurine-induced early severe hair loss and leukopenia in Japanese patients with IBD. *The pharmacogenomics journal* 2016; **16**(3): 280-285 [PMID: 26076924 DOI: 10.1038/tpj.2015.43]

19. **Meijer B**, Wilhelm AJ, Mulder CJJ, Bouma G, van Bodegraven AA, de Boer NKH. Pharmacology of Thiopurine Therapy in Inflammatory Bowel Disease and Complete Blood Cell Count Outcomes: A 5-Year Database Study. *Therapeutic drug monitoring* 2017; **39**(4): 399-405 [PMID: 28489727 PMCID: PMC5538301 DOI: 10.1097/ftd.0000000000000414]

20. **Moriyama T**, Yang YL, Nishii R, Ariffin H, Liu C, Lin TN, Yang W, Lin DT, Yu CH, Kham S, Pui CH, Evans WE, Jeha S, Relling MV, Yeoh AE, Yang JJ. Novel variants in NUDT15 and thiopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia from diverse ancestry. *Blood* 2017 [PMID: 28659275]

DOI: 10.1182/blood-2017-05-782383]