

日本人炎症性腸疾患患者におけるメサラジン製剤不耐症状に対する診断法と
遺伝的背景に関する検討

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

内科病態学講座消化器病態学分野

鈴木郁

1. 要約

1) 背景と目的

メサラジン製剤は炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) の治療に用いられ、特に潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC) においては寛解導入から維持まで用いられる非常に重要な治療薬である。他方、メサラジン製剤では一部の患者に起こる発熱や下痢の増悪といった不耐症状が問題となる。しかしこれらは IBD そのものの悪化と類似した症状を呈するため、メサラジン不耐症状の迅速かつ正確な診断方法の確立や不耐症例を事前に判別する予測法の確立が望まれる。

2) 方法

検討 1 としてメサラジン服用後に不耐様症状を呈した場合にそれがメサラジンの不耐症状かどうかを診断する方法としての薬剤誘発性リンパ球刺激試験 (drug-induced lymphocyte stimulation test; DLST) の有用性を検討するため、メサラジン製剤内服中または内服歴のある IBD 患者に対して DLST を行い、不耐群と非不耐群との間で陽性率等の結果の差異を比較する。また、検討 2 としてメサラジン不耐例の一部が遺伝的に規定されている可能性を考え、メサラジンを服用する前に事前に予測可能かを検討するため、ゲノムワイド相関解析 (genome-wide association study; GWAS) とそれによる遺伝率の推定、多遺伝子予測モデル (polygenic risk score; PRS) の構築を行う。

3) 結果

検討 1 にてメサラジン原末群での DLST は不耐群、非不耐群ともに擬陽性を含む陽性率は 0%であり、製剤間比較群では不耐群で 33.3%、非不耐群で 14.3%であった。また、検討 2 にて GWAS ではメサラジン不耐症状の発現に 6 番染色体の rs144384547 が有意な相関を示した。副作用のうち最も典型的な副作用である発熱かつ下痢増悪についてその遺伝率は 24.2%と推定された。この副作用を推定する PRS モデルでは $P \leq 3e-4$ 以下の 610 SNP で構築されたものが最も強く有意な相関を示した ($pR^2=0.036$, $P=2.5e-02$)。

4) 結論

検討 1 にて、メサラジン原末では全例 DLST が陰性であることや実際の製剤での陽性率も高くないことから、メサラジン不耐はメサラジンそのものに対する反応ではない可能性があり、DLST はメサラジン不耐の診断法としての有用性は限定的であると考えられた。検討 2 にて、メサラジン不耐症状の発現に関与している可能性のある一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) が抽出され、メサラジンによる副作用のうち発熱かつ下痢増悪については遺伝的背景の関与が強く示唆された。しかし、遺伝率は限定的であることから、遺伝的背景以外にも複数の要素がメサラジン不耐症状の発現には関与していると考えられた。

2. 研究背景

炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease;IBD)とは、慢性あるいは寛解・再燃性の腸管の炎症性疾患を総称し、その多くを占めるのは潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis;UC)とクローン病(Crohn disease;CD)である。本邦における患者数は、前者では16万人以上、後者では4万人以上とされており、年々増加傾向である¹⁾。

本邦におけるIBD治療薬には様々なものがあるが、そのうち第一選択薬として代表的に使用されるのがメサラジン製剤である。メサラジン製剤には主に経口剤と坐剤がある。メサラジン製剤の化学構造式は構造式: $C_7H_7NO_3$ であり、原末のまま内服した場合、そのほとんどが小腸で吸収されるが、時間依存性徐放性製剤やpH依存性製剤などによるドラッグデリバリーシステム(drug delivery system;DDS)の工夫を施すことで各所腸管粘膜に局所的に作用して炎症の改善に寄与する。

本邦では一般名がメサラジンである製剤として、そのDDSの違いからペンタサ錠®(メサラジン錠)、ペンタサ顆粒®、アサコール錠®、リアルダ錠®などがある。また、サラゾスルファピリジン(サラゾピリン錠®)は腸内細菌叢の働きで腸管内でスルファピリジンとメサラジンに分解吸収される。メサラジンは全身に分布するN-アセチルトランスフェラーゼ(N-acetyltransferases;*NAT*)によって、生体内で安定なアセチル体(N-アセチルメサラジン)となり、腎臓で代謝され尿中に排泄される。特にUCにおいては、これらのメサラジン製剤のみで臨床的寛解を保てる症例も非常に多いことから、その役割は非常に重要である²⁾³⁾。

しかし、本邦においてはメサラジン製剤使用症例における数%で副作用に類似した不耐症状が出現する⁴⁾⁵⁾ことが広く知られている。メサラジン製剤に対する不耐症状が出現した場合には、メサラジン製剤の使用中止や減感作療法⁵⁾⁶⁾といった治療法を選択せざるを得なくなり、寛解導入及び維持に制限を生じてしまうため、予後が不良となる。

メサラジン不耐には明確な定義が存在しない。一般的には不耐症状として様々なものが報告されているが、中でも頻度の高い典型的なものに発熱や下痢増悪などが挙げられる。このような症例はしばしば「メサラジンアレルギー」と表現されるが、下痢が持続する場合や被疑薬中止による改善が明確でない場合、原疾患の増悪の可能性などもあり実際に不耐であったか判断に苦慮する。

これまでメサラジン不耐症例に対し、代表的なアレルギー検査の一つである薬剤誘発性リンパ球刺激試験(drug-induced lymphocyte stimulation test;DLST)の感度は24.0%、特異度は80.5%であるとした報告⁷⁾があるが、感度及び特異度に言及した報告はその1例のみであり、メサラジン不耐の診断法としてはまだ十分に評価されていない。また、通常DLSTは薬剤の1回使用量に対して行われる検査であるが、メサラジン製剤は製剤によって剤形や1回量が大きく異なるため、検査方法が一定しない。

これまでメサラジン不耐例及び非不耐例の双方において、統一したメサラジン製剤種及び製剤量に対してDLSTを施行し比較した報告は未だない。そのため、本研究においては不耐例及び非不耐例の双方に対し、統一したメサラジン製剤種及び製剤量に

対する DLST を施行し、メサラジン不耐の診断における DLST の有用性の検討を行うこととした。

また、前述の既報⁷⁾において DLST の感度が低い原因として、メサラジン不耐の発現にはアレルギー以外の他に複数の機序が関与している可能性がある。また、DLST は基本的に薬剤暴露後に行われる検査であり、服用前に不耐症例を判定することは困難である。そのため、事前に不耐症例を予測する方法は臨床的なニーズが高く、開発が期待される。

そのように事前に不耐症状のような副作用様症状を予測するために有用な方法として、遺伝的背景の検討が挙げられる。他薬剤においては副作用症状の発現に遺伝的背景が関与しているものも多く、例として前述したメサラジン製剤の一種であるサラゾスルファピリジンでは薬剤代謝酵素の N-アセチルトランスフェラーゼ 2 (N-acetyltransferases 2; *NAT2*) の遺伝子多型が薬剤血中濃度に影響を及ぼし、副作用症状の発現にも関与する。但し、サラゾスルファピリジンは腸内細菌叢によってスルファピリジンとメサラジンに分離されるが、*NAT2* が関与するのはスルファピリジンの代謝であり、メサラジンに対する反応との関連性は認められてはいない。

メサラジン不耐に遺伝的背景が関与しているかについてはこれまで検討がほとんどないため、詳細はわかっていない。従来は薬物の代謝経路にある酵素の遺伝子多型と副作用の関連を調べる候補遺伝子解析が行われていたが、近年のゲノム解析技術の向上によって、仮説なく網羅的に全ゲノム上の遺伝子多型の相関解析を行うゲノムワ

イド相関解析(genome-wide association study;GWAS)が行われるようになった。これにより、例えばアジア人におけるチオプリン製剤の副作用と Nudix ヒドロラーゼ 15(Nudix hydrolase 15;*NUDT15*) 遺伝子多型との関連が近年発見されたが⁸⁾、それまでは *NUDT15* の機能は不明であり、チオプリン製剤の代謝に *NUDT15* が関与しているとは考えられていなかった。このことから、既知の遺伝子だけでのアプローチでは不耐を規定する遺伝的背景を同定することには限界があり、GWAS によるアプローチは非常に有用であると考えられる。メサラジン不耐症状の発現についても前述の通り、その遺伝的背景の関与については全くの不明であることから、GWAS による遺伝的背景の網羅的な解析を行うこととした。

3. 研究目的

IBD の長期治療戦略において問題となるメサラジン製剤への不耐症例の診断に関する問題点の解決のため、メサラジン服用後に不耐様症状を呈した症例がメサラジンによる症状かどうかを診断する既存の方法の有用性や問題点を明らかにし、またメサラジンを服用する前に不耐例を「事前に予測」できるかどうかを遺伝学的解析から明らかにする。本研究目的の達成のため、以下の2つの検討を行う。

検討 1. 不耐症状発現例での不耐診断のための DLST の手法及び有用性の検討

検討 2. 不耐症例の遺伝的背景の検討及び不耐症例事前診断モデルの構築

4. 方法

1) 対象

検討1では、2018年3月から2020年3月の期間に東北大学病院消化器内科通院中のメサラジン製剤内服中または内服歴のあるIBD患者のうち、メサラジン原末群として不耐例10例、非不耐例49例、メサラジン製剤間比較群として不耐例6例、非不耐例7例の計72例を対象にメサラジン製剤に対するDLSTを施行した。

検討2では、東北大学病院消化器内科が2016年から2018年までに行った先行研究「炎症性腸疾患患者におけるチオプリン関連副作用と *NUDT15* 遺伝子多型との相関性に関する多施設共同研究(MENDEL Study)」に参加した全国の炎症性腸疾患専門施設通院中であったIBD患者1523例(メサラジンによる発熱や下痢の増悪の副作用を認めた127例、それ以外の1396例)と、東北大学病院通院中IBD患者788例(メサラジンによる発熱や下痢増悪などの症状を認めた31例、それ以外の757例)を対象にGWASを行った。

これらの研究は、厚生労働省「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて施行され、東北大学医学部倫理委員会の承認の元、IBD患者に文書を用いて説明し、同意を得たうえで行った。

それぞれの倫理承認番号は「5-ASA製剤使用中の炎症性腸疾患患者における薬剤誘発性リンパ球刺激試験の有用性の検討」が2018-1-951、「炎症性腸疾患患者におけるチ

オプリン関連副作用と *NUDT15* 遺伝子多型との相関性に関する多施設共同研究 (MENDEL study)」が 2020-1-480、481 である。

2) メサラジン製剤の投与と不耐の判定

サラゾスルファピリジンを除くメサラジン製剤 (メサラジン錠®、ペンタサ錠®、ペンタサ顆粒®、アサコール錠®、リアルダ錠®) を使用した症例のうち、メサラジン製剤内服開始後 1 週間から 1 か月以内に発熱、下痢増悪、肺炎、膵炎、皮疹、間質性腎炎などの腎機能障害、肝機能障害、心膜炎といった何らかの有害事象を認め、かつ被疑薬となったメサラジン製剤を中止後数日から 1 週間以内にそれらの症状が消失または軽快した症例を本研究における不耐症例と定義した。

3) DLST

文書にて同意を得られた患者から採血を施行した後、株式会社 LSI メディエンスに委託して解析した。採取した血液とリン酸バッファーを混合したものをさらに分離液と混合し、遠心してリンパ球層と赤血球層に分離し、リンパ球層を遠心して上清を破棄し、さらに遠心した後にヘパリン加全血を使用し、 1×10^6 個/ml となるように細胞数を調整して 10% 患者血漿加培養液に浮遊させてリンパ球浮遊液を作成した。メサラジン製剤は 1 回内服量を粉碎して培養液に追加し、超音波をかけて遠心し、上清を連続倍数希釈して 9 濃度作成した。各濃度の薬剤 $20 \mu\text{l}$ とリンパ球浮遊液 $200 \mu\text{l}$ とを

混合し、37°C0.5%CO₂で65.5時間培養し、³H-チミジン[®]を20μl追加して37°C0.5%CO₂で6.5時間培養した後、セルハーベストを行って液体シンチレーションカウンターで取り込まれた³H-チミジン[®]を測定した。

本邦で使用可能な経口メサラジン製剤のうち、サラゾスルファピリジン[®]以外はすべて薬効成分はメサラジン[®]であり、またサラゾスルファピリジン[®]はスルファピリジン[®]とメサラジン[®]のアゾ結合が腸内細菌叢の働きによって分離されメサラジン[®]が薬効を示す。各メサラジン製剤はそれぞれによって1回内服量が最小で500mgから最大で4800mgと大きく異なるため、DLSTの方法を統一するために本研究ではメサラジン[®]原末を選択し、0.5g、1g、2g、5gの各用量でDLSTを施行した(メサラジン[®]原末群)。また、メサラジン[®]製剤別の添加物の差異も不耐症状の発現に関与している可能性があることから、製剤間での比較を行うためにメサラジン[®]原末[®]の他、ペンタサ錠[®]、ペンタサ顆粒[®]、サラゾピリン錠[®]、アサコール錠[®]、リアルダ錠[®]の各製剤によるDLSTも施行した(製剤間比較群)。各製剤量は一般的な1回内服量とし、ペンタサ錠[®]500mg2錠、ペンタサ顆粒[®]94%2000mg1包、サラゾピリン錠[®]500mg2錠、アサコール錠[®]400mg3錠、リアルダ錠[®]1200mg4錠とした。メサラジン[®]原末は2gとした。

結果については、stimulation index(SI)値が200%以上を陽性、180%以上200%未満を擬陽性、180%未満を陰性と定義した。

4) GWAS

メサラジン不耐症状に関与する候補遺伝子多型を探索する Discovery GWAS として、メサラジン製剤の服用歴のある MENDEL study 参加 IBD 患者について解析を行った。先行研究において日本人に最適化されたカスタムジェノタイピングアレイ⁹⁾である「ジャポニカアレイ v1」においてジェノタイピングした 643,411 の多型データを使用した¹⁰⁾。サンプルの精度管理として、個人毎の Genotyping Rate が 97%以下のものを除外し、さらに遺伝学的な近親者の除外のため Identity by descent を PLINK software の PI_HAT 値で評価し、PI_HAT 0.15 以上の症例を除外し、残りの 1523 例についてその後の解析を行った。また本研究では新たに東京大学が保有する日本人ゲノムリファレンスデータを用いてリファレンス上にある遺伝子多型について各検体での遺伝子型の推定 (imputation) を行い、ハーディー・ワインベルグ平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium;HWE) 値 $>1e-5$ 、マイナーアレル頻度 (Minor Allele Frequencies;MAF) >0.01 、imputation の INFO スコア >0.5 、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism;SNP) の Genotyping Rate $>97\%$ を満たした計 7,215,027SNPs を解析対象とし、性別、上位 4 つの主成分 (PC1、PC2、PC3、PC4)、疾患名を共変数としたロジスティック回帰分析による GWAS を行った。P $<5e-8$ をゲノムワイド有意水準、P $<5e-5$ を候補水準とし、候補水準以上の SNPs について、PLINK Software の Clump 機能を用い、互いに 250kbp 領域内に存在する SNP のうち連鎖不平衡を考慮したうえで同一の相関を示すものをグループ化しその中で最も P 値が低値であるものをその領域の相関を代表する SNP とした。

Replication study では、東北大学病院通院中 IBD 患者 788 例に対し、先行研究で得られたジャポニカアレイによる Genotyping データを使用し¹¹⁾¹²⁾、Discovery GWAS と同じ手法で Genotyping 及び imputation を行った。Discovery GWAS で候補領域の代表 SNP として選択された SNP を対象として性別、PC1、PC2、PC3、PC4、疾患名を共変数としたロジスティック回帰分析を行った。

上述の通り、Discovery GWAS、Replication Study の順に解析を行った後、両群における解析結果を基にメタ解析を行い、 $P_{meta} < 5e-7$ の SNP を候補水準、 $P_{meta} < 5e-8$ の SNP を有意とした。

5) 副作用の遺伝率の推定

メサラジン製剤の不耐症状のうち、発熱、下痢増悪、発熱かつ下痢増悪がそれぞれ遺伝的に説明できる割合(遺伝率)について、MENDEL study 参加 IBD 患者及び東北大学病院通院 IBD 患者のジャポニカアレイによる Genotyping データを利用し、制限付き最尤法(Residual Maximum Likelihood estimation:REML)によって Genome-wide complex trait analysis (GCTA[®])で検討した¹³⁾。遺伝率の計算には共変数として性別と疾患名を使用し、 $P < 0.05$ を満たす副作用を有意とした。

6) PRS(polygenic risk score)モデルの構築

メサラジン製剤の不耐症状のうち、全不耐症状、発熱、下痢増悪、発熱かつ下痢増悪、発熱または下痢増悪に対し、MENDEL study 参加 IBD 患者を Base data として PRS¹⁴⁾ を構築し、東北大学病院通院中 IBD 患者を Target data として PRS の validation study を行った。前述の Discovery GWAS における P 値と連鎖不平衡の結果を元に、PRS 構築のための SNP 選択を行った。SNP 選択のための P 値は以下の 9 通りの閾値を使用し (P=1e-1, 3e-2, 1e-2, 3e-3, 1e-3, 3e-4, 1e-4, 3e-5, 1e-5)、それぞれの P 値の閾値毎に、互いに近い 250 kb に存在する SNP を連鎖不平衡を考慮したうえで領域化し、その中で最も P 値が低値である SNP を各領域の代表 SNP とした。各代表 SNP について、それぞれの SNP が持つメサラジン不耐に対するオッズ比から、各 SNP のメサラジン不耐に対する重み (weight) を作成した。その後、 $PRS = \sum_i^M \text{weight}_i \times \text{genotype}_i(0,1,2)$ を計算式として各患者の PRS を算出した。それぞれ weight_i は各 SNP の重みを表し、 genotype_i は各 SNP 重みに対応するアリルの数を表した。算出された PRS の validation study におけるメサラジン不耐との相関の有無と当てはまりの良さの確認には、ロジスティック回帰分析における PRS の P 値と pseudo R-square (p R2) を使用した。Null model と Full model を構築し、Full model における PRS の P 値をメサラジン不耐との相関の有無の確認に、Full model と Null model における p R2 の差を PRS による p R2 として当てはまりの良さの確認に用いた。Null model では、病型の有無を目的変数とし、共変数は性別、PC1、PC2、PC3、PC4、疾患名とした。

Full model では Null model に加えて PRS を共変数に加えた。結果については、P 値 ≤ 0.05 を有意とした。

また、有意な PRS に対して、PRS の値によって患者のグループ化を行い、それぞれの不耐出現のリスクを比較した。具体的には、算出された PRS の Z 標準化を行い、validation cohort の患者を PRS の 0-20 パーセンタイル、20-40 パーセンタイル、40-60 パーセンタイル、60-80 パーセンタイル、80-100 パーセンタイル群に分類した。対象群は 40-60 パーセンタイル群とし、その他の群とのメサラジン不耐のリスクを計算した。オッズ比の計算にはロジスティック回帰分析を使用した。

また、臨床背景の検討から臨床的因子が不耐と関連していることが分かっているため、Full model の他に臨床的因子（疾患名及び性別）による予測モデルと、臨床的因子と遺伝的因子（疾患名、性別、PRS、PC1-4）のすべてを組み合わせた複合モデルを作成し、PRS によるモデルと比較した。

7) 統計解析

検討 1、検討 2 のいずれにおいても、不耐群、非不耐群の臨床背景についてはその中央値や頻度を t 検定もしくは χ^2 検定で評価した。ゲノム解析は、すべて国立遺伝学研究所スーパーコンピューターシステム上で行った。Imputation には Beagle 5.1¹⁵ を使用し、主成分分析、Identity by descent、ロジスティック回帰分析には PLINK software v1.9 を、その他の統計処理及びプロットには R version 3.6.2 (2019-12-

12) を用いた。Regional Plot の作成には Locus zoom(<http://locuszoom.org/genform.php?type=yourdata>)を用いた。PRS の構築には LDpred v. 1.0.11 を使用した¹⁶⁾。

5. 結果

1) 検討 1. 不耐症状発現例における不耐診断のための DLST の手法及び有用性の検討

① 不耐症状に関連する臨床的背景

DLST を施行した症例全体の患者背景を表 1 に、メサラジン原末群と製剤間比較群のそれぞれの患者背景を表 2 に示す。表 1 において、不耐群では 16 例中 15 例 (93.8%) が UC であった ($P=0.0011$)。また、不耐群の UC では 15 例中 12 例 (80%) が全大腸炎型であり、非不耐群との間で病型に有意差を認めた ($P=0.0257$)。また、不耐群の方が非不耐群に比するとより若年であるという傾向を認めた ($P=0.0232$)。

被疑薬としては、メサラジン原末群ではペンタサ錠®が 4 例、アサコール錠®とリアルダ錠®が各 2 例、ペンタサ顆粒®とメサラジン錠®が各 1 例であり、製剤間比較群ではリアルダ錠®が 3 例、アサコール錠®とペンタサ錠®とペンタサ顆粒®が各 1 例であった。本邦で使用可能な経口メサラジン製剤のうち、サラゾピリン錠®以外のいずれにおいても不耐が確認されていた。また、同一症例において複数の製剤に対し不耐が出現した症例は認めなかった。

②不耐症状の内訳と頻度

いわゆるメサラジンアレルギーと表現され典型的なメサラジン不耐症状とされる発熱と下痢増悪のいずれかもしくは両方について、メサラジン原末群では 10 例中 6 例 (60%)、製剤間比較群では 6 例中 3 例 (50%) と半数以上の症例で認めており、最も高頻度に認められる副作用であることが確認された。他には、メサラジン原末群では 3 例で肺炎、1 例で間質性腎炎を、製剤間比較群では 1 例で肺炎、1 例で膵炎、1 例で心膜炎を認めていた。

③メサラジン原末群における DLST 結果

メサラジン原末群における DLST 結果を表 3 に示す。不耐群 10 例、非不耐群 49 例ともに、擬陽性を含む陽性率は 0%であり、双方における SI 値にも有意差は認められなかった。

④製剤間比較群における DLST 結果

製剤間比較群における DLST 結果を表 4 に示す。不耐群 6 例のうち擬陽性 1 例、陽性 1 例、非不耐群 7 例のうち擬陽性 1 例であり、擬陽性を含む陽性率は不耐群で 33.3%、非不耐群で 14.3%であった。また、不耐群で陽性となった症例は 31 歳男性で、全大腸炎型から右側結腸型に移行した UC であり、被疑薬はリアルダ錠®で不耐症状は心膜炎であった。SI 値がリアルダ錠®で 335%、アサコール錠®で 242%と陽性であり、ペンタ

サ錠®で 188%、ペンタサ顆粒®で 183%と擬陽性であった一方、サラゾピリン錠®で 94%、メサラジン原末で 123%とこの 2 剤では陰性であり、製剤間で異なる結果となっていた(表 5)。

2) 検討 2. 不耐症例の遺伝的背景の検討及び不耐症例事前診断モデルの構築

①患者背景

Discovery GWAS を行った MENDEL study 参加 IBD 患者群 1523 例及び Replication study を行った東北大学病院通院 IBD 患者群 788 例の患者背景について表 6 に示す。副作用と関連する可能性がある臨床的背景を確認するため、典型的な不耐症状である発熱と下痢増悪について、いずれかを発症した症例を不耐例とした場合の臨床背景との関係を確認した(表 7)。MENDEL Study 参加 IBD 患者群と、東北大学病院通院 IBD 患者群でそれぞれ不耐群・非不耐群は 127 例・1396 例、31 例・757 例であり、前者では UC が、後者では CD が多かった。両群とも疾患名と不耐の有無で相関を認め(順に $P=9.27e-5$ 、 $P=6.04e-5$ 、表 7a, b)、また不耐群では非不耐群と比較し UC の頻度が高かった。以上から、疾患名も GWAS において共変数として加えることとした。

②Discovery GWAS

各副作用ごとにロジスティック回帰分析による候補関連領域の抽出のための Discovery GWAS を行った。各副作用別のマンハッタンプロットを図 1 の a-d に示す。

解析対象の計 7,215,027SNPs のうち、候補水準($P < 5 \times 10^{-5}$)を満たした SNP 数は 494~861、それらを Clump したことによる候補領域数は 159~255 であった(表 8)。

③Replication study

Discovery GWAS で限定された候補領域のうち、一部の代表 SNP は低頻度のため Replication study で多型が確認されなかった。候補領域の代表 SNP のうち、Discovery と Replication で相関の方向が同じでかつメタ解析で $P < 5 \times 10^{-7}$ を満たしたものは下痢増悪で 2SNPs、発熱で 4SNPs、発熱かつ下痢増悪で 3SNPs であった(表 8)。それぞれの候補 SNP における Discovery GWAS、Replication study、メタ解析の結果は表 9(下痢)、表 10(発熱)、表 11(発熱かつ下痢増悪)に示す通りであり、メタ解析で $P < 5 \times 10^{-8}$ を満たしたものは「発熱かつ下痢増悪」における 6 番染色体の rs144384547 に代表される 1 領域のみであった($P = 7.32 \times 10^{-9}$)。同領域を含めた「発熱かつ下痢増悪」での候補領域 3 つのそれぞれの近傍における Regional plot は図 2a-c に示す通りであり、同領域は G 蛋白質シグナル伝達 17(regulator of G-protein signaling 17; *RGS17*)の上流に存在し、long non-coding RNA である RP11-306013.1 の近傍に存在していた。同 SNP を保有している症例の 22.0%、保有していない症例の 2.34%の症例で不耐症状の出現を認めていた(表 12)。

④メサラジン不耐症状別の遺伝率の検討

MENDEL Study 参加 IBD 患者および東北大学病院通院中 IBD 患者の全データを使用し、メサラジン不耐症状のうち頻度の多い下痢増悪、発熱、発熱かつ下痢増悪について、遺伝率の推定を行った。その結果、発熱かつ下痢増悪で遺伝率 24.2% ($p=0.0494$) と遺伝要因の有意な関与が示された(表 13)。

⑤PRS による不耐症例予測モデルの構築

各 P 値の閾値における PRS の病型(発熱かつ下痢増悪)に対する P 値と pseudo R square (pR^2)の結果を表 14 と図 3 に示した。 $P \leq 3e-4$ 以下の 610 SNP で構築された PRS が最も強い相関を示し、唯一有意な相関を示した ($pR^2=0.036$, $P=2.5e-02$)。図 4 に $P \leq 3e-4$ 以下の PRS によって層別化された患者群毎のメサラジン不耐のリスクを示した。有意差はないものの、PRS が高い群では不耐症状出現のリスクが高くなる傾向を認めた。 $P \leq 3e-4$ の PRS における受診者動作特性(Receiver Operating Characteristic;ROC)曲線を図 5 に示す。PRS のカットオフ値を 78.1210 点とした場合の感度は 61.5%、特異度は 71.7%であり、ROC 曲線下面積(area under the curve;AUC)は 0.67 であった。臨床的因子によるモデルと遺伝的因子によるモデルを組み合わせた複合モデルでは、PRS によるモデル、臨床的因子のみのモデル(AUC=0.78)のいずれよりも高い AUC を示した (AUC=0.89)。また、複合モデルでの感度は 71.4%、特異度は 90.8%と、いずれも PRS 単体よりも優れた予測精度を示した。

6. 考察

本研究より得られた知見として、検討1よりメサラジン不耐はUC患者に多いこと、メサラジン原末によるDLSTでは陽性が出ないこと、製剤間での比較においてある製剤では陽性でも他の製剤やメサラジン原末では陰性となることが挙げられた。また検討2においてGWASによってメサラジン不耐に関連する遺伝子多型が同定されたこと、種々ある不耐症状のうち典型的なものでいわゆるメサラジンアレルギーと呼ばれる「発熱かつ下痢増悪」について有意な遺伝的背景の関与が示されたことなどが挙げられ、その不耐症状を予測するPRSモデルを確立した。

メサラジン不耐症例の診断は、特にUC患者において苦慮するケースが多い。これはメサラジンが特に初発のUC患者に対して活動期に処方されるためであり、検討1の表1で不耐群が非不耐群に比して若年である傾向であったことにも関連していると考えられた。発熱や下痢増悪といった症状がメサラジン不耐によるものかUCの悪化によるものであるかの鑑別には大腸内視鏡検査が有用な方法の1つであり、前者の場合、後者に比して症状の割に内視鏡上は粘膜面の炎症の程度が低く、病理組織学的にも炎症が軽度のことが多い。しかし、有症状時の内視鏡検査は患者にとって苦痛が大きく、なかなか同意が得られずに施行が難しいという側面があり、その意味でも出来る限り侵襲の低い診断法が望まれる。メサラジンはUCの寛解維持に欠かせない重要な薬剤であることから、不耐かどうかの診断によってUCの予後は大きく左右されるが、その診断法としてのDLSTの有用性には限界があることが確認された。

DLST は特にIV型(遅延型)のアレルギーを検出するものであるが、メサラジン製剤に限らず一般にその陽性率は約40%程度であるとされている¹⁷⁾¹⁸⁾。また、本邦においてはメサラジン製剤増量に伴って下痢や血便が増悪する場合、そのDLST陽性率は47.6%であるとの既報もある¹⁹⁾。

しかし検討1においては、まずメサラジン原末群において不耐群及び非不耐群の双方において擬陽性を含む陽性率は0%であり、製剤間比較群でも不耐群で33.3%、非不耐群で14.3%と低率であった。これについては、本研究では連続倍数希釈で9濃度作成してDLSTを施行したのに対し、前述の他報告⁷⁾においては連続5倍希釈で5濃度作成してDLSTを施行していることから、その濃度の差異が結果に影響した可能性は考えられる。また、メサラジン不耐はメサラジンそのものでなく体内でのメサラジンの代謝物質に反応して出現している可能性や、そもそもメサラジン不耐の発現にはアレルギー以外の機序の方が深く関与している可能性も理由として挙げられる。いずれにしても、検討1の結果からは、メサラジン原末によるDLSTはメサラジン製剤に対する不耐症状の診断方法としての有用性は低いと言わざるを得なかった。

一方で、現状ではメサラジン製剤のいずれかで不耐症状が疑われた場合、DLSTの施行の有無やその結果に関わらず、被疑薬を含めた全てのメサラジン製剤を使用せず、ステロイド製剤やアザチオプリン、生物学的製剤などの他薬剤による治療へと変更することが多いが、製剤間比較群での唯一の陽性例を見ると、製剤によって陽性、擬陽性、陰性が異なる結果として表れていた。このことから、メサラジン不耐症例に対

してはメサラジン製剤のスイッチが有効である可能性が示唆され、実際にメサラジン製剤のスイッチを試みてそれが有効であったとされる報告²⁰⁾²¹⁾もある。これについては前述の通り検討1においてメサラジン原末ではDLSTが陰性であったことから、不耐がメサラジン製剤の添加物による影響である可能性も否定はできないと考えられる。

一方でメサラジン製剤のスイッチは患者にとってチャレンジテストとなり危険を伴う可能性もある²²⁾。また、メサラジン製剤のスイッチ後長期にわたって問題なく内服できていたにも関わらず、数年の経過の後にメサラジン不耐と思われる症状が出現した症例報告もある²³⁾ことから、慎重な検討が必要である。

また、そもそもDLSTは薬剤に対する副作用症状発現後に行われる検査であり、一般的には副作用症状発現後1~2か月程度経過してから行わなければその正確性が損なわれる可能性が高いため、不耐症例を事前に判定する方法としては限界があると言える。不耐発現のメカニズムとして遺伝的背景が関与している可能性が考慮されることから行ったのが、本研究の検討2におけるGWASである。

GWASとはヒトゲノム全体を網羅する1000万ヶ所以上のSNPのうち、数十万から数百万ヶ所程度の遺伝子型を決定し、SNPの頻度や疾患及び量的形質との関連を統計的に調査するものである。2005年にDNAタイピングアレイを用いた最初のGWAS論文が発表されて以降、多数の論文投稿とSNPが報告がされている²⁴⁾。

IBD に関しても、すでに GWAS によりその発症に関わる多数の疾患感受性遺伝子領域が報告されているが²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾、治療薬に関連した GWAS はまだ報告が限定的であり、特にメサラジン不耐の発現に関連した GWAS はほとんど報告がない。その中でメサラジン不耐の発現に関連する候補領域(6 番染色体の rs144384547)が抽出されたことは意義深い。

しかし、大部分の IBD 感受性候補遺伝子領域は未だその詳細が不明であり、また各遺伝子多型が IBD の発症に及ぼすオッズ比は低く、IBD における遺伝要因の約 80% は未解明であるのが現状である。今回メサラジン不耐の発現に関連している可能性が示唆された rs144384547 については、*RGS17* 遺伝子上流に存在していた。*RGS17* はさまざまなシグナル伝達分子との結合領域を持つ蛋白であり、複数の癌において進行や転移を抑制しうること²⁸⁾やその多型がシスプラチンによる神経毒性と関連するという報告²⁹⁾などがあるが、一方で IBD における *RGS17* の役割についての報告はなく、メサラジン不耐の発現における関連性も不明である。また、同 SNP は Long intergenic non-coding RNA である *RP11-306O13.1* の内部に存在していることも判明した。いくつかの Long non-coding RNA は腸管粘膜の再生と上皮バリア機能において重要な役割を果たす³⁰⁾ことが知られているが、この RNA の機能については全く不明であり、同 SNP の多型がどのようにメサラジン不耐症状の発現に関与しているのかは不明である。

また、同 SNP はアレル頻度が低いため、同 SNP を保有していた場合に予測できる副作用症例は極めて限定的であることから、同 SNP はあくまでリスク因子の 1 つに過ぎず、他の様々なリスク因子が積み重なってメサラジン不耐症状を発現させている可能性が高いと考えられた。そもそもメサラジン不耐の発現に遺伝的背景が関与しているかどうかは不明であったが、今回の検討 2 において発熱や下痢増悪及びその両方などそれぞれについて遺伝的背景の関与を遺伝率という形で推定したところ、「発熱かつ下痢増悪」という、IBD の日常診療においてメサラジンで最も典型的でかつ問題となっているいわゆる「メサラジンアレルギー」の症状に対して有意な遺伝率が推定された。このことは、遺伝的背景の検討が不耐発現の予測に有用であることを示唆している。遺伝的なリスクを予測するには、前述のような単一の遺伝子多型のみでは困難であることから、近年各分野で構築されている PRS によるモデルを構築した。PRS では $P \leq 3e-4$ の 610SNP を組み合わせたモデルが最も予測精度が高く、単に相関が確からしい SNP を重み付けなく加えただけのモデルと比較しても明らかに精度が向上した。また、これに臨床因子を加えることで、より高精度の予測モデルを構築することもできた。しかしながら、いずれも独立した別のコホートでの検証がされていないため、今後はこのモデルを用いた前向きな検討が望まれる。

これまで、メサラジン不耐のリスク因子についてははっきりとした知見は示されていなかったが、今回、検討 1、検討 2 とともに IBD では CD より UC であることがメサラジン不耐の強いリスク因子であり、また検討 1 からは UC の中でも全大腸炎型がリス

クであることが示された。このため、前述の GWAS や PRS などでは全て UC であるか否かをモデルに組み込んでの解析を行っている。これらの臨床的リスク因子、遺伝的リスク因子、そして検討 1 の DLST で分かった製剤間での反応性の差異などを基に、さらにメサラジン製剤を投与するタイミング(活動期、非活動期)、用量、病態、併用薬なども今後検討に加え、総合的に考慮したうえでさらなるメカニズムが解明されることが期待される。

本研究の limitation としては、検討 1、検討 2 ともに不耐症例数が限定的であること、またそれに関連して検討 2 の GWAS での有意な相関を認めた SNP の MAF が低く単独 SNP での不耐症例への関与が小さいこと、推定された遺伝率の標準誤差が大きいことなどが挙げられる。しかしながら、前述の通り研究 1 ではメサラジン不耐は UC に多いこと、メサラジン原末による DLST では陽性例が出ないこと、また製剤間での比較においてある製剤では DLST 陽性でも他製剤やメサラジン原末では陰性となること、研究 2 では GWAS によってメサラジン不耐に関連する遺伝子多型が同定されたこと、発熱かつ下痢増悪という特徴的な副作用において有意な遺伝的背景の関与が示されたこと、発熱かつ下痢増悪を予測する PRS モデルを確立したことなど、新たな知見が多数示された。これらのデータを基に、今後基礎的なメカニズムの解明や構築された予測モデルの検証研究などを進めるためにも、さらなる症例の蓄積と解析が望まれる。

7. 結論

検討 1 より、メサラジン不耐症例をメサラジン原末による DLST で診断することは困難であり、メサラジン不耐症状の発現はメサラジンそのものへのアレルギー反応とは異なる機序による可能性が示唆されるとともに、製剤別の反応性の違いから、不耐症例ではメサラジン製剤のスイッチが有効である可能性も示唆された。

検討 2 より、6 番染色体の rs144384547 を含む領域がメサラジン不耐症状の発現に関与している可能性が示唆されたが、同 SNP で予測できる副作用症例は極めて限定的であった。PRS モデルの作成により発熱かつ下痢増悪をきたした症例については遺伝的背景の関与が強く示唆されたが、今後さらなる症例の蓄積による検討が必要であると考えられた。

謝辞

本研究の機会を与えていただきご指導を賜り、また本論文の作成に際し親身なご助言をいただいた消化器病態学分野、正宗淳教授に心より感謝を申し上げます。また本研究の検討及び議論をはじめ、統計解析の手法や論文作成の手引きなどにおいて終始ご指導ご鞭撻を賜った角田洋一先生、またデータ解析において多くのご指導を賜った内藤健夫先生に深く御礼申し上げます。

8. 参考文献

- 1) 日本消化器病学会 炎症性腸疾患 (IBD) 診療ガイドライン 2016
- 2) Matsuoka K, Watanabe M: Ulcerative colitis recent advance in clinical practice and basic research. The Japanese Journal of Gastroenterology 2016;113(3):407-412
- 3) S Hanauer, J Schwartz, M Robinson et al: Mesalamine capsules for treatment of active ulcerative colitis: results of a controlled trial. Pentasa Study Group. The American Journal of Gastroenterology 1993;88:1188-1197.
- 4) 曾野浩治, 菊池秀昌, 岩佐亮太他: 5-ASA 製剤不耐潰瘍性大腸炎に対する IFX の有効性. 日本消化器病学会雑誌 2011;108:A861
- 5) 福島恒男, 中島光一, 辺見英之他: 炎症性腸疾患症例の mesalazine 製剤不耐症に対する脱感作療法. 日本大腸肛門病会誌 2014;67:259-262
- 6) P Oustamanolakis, E Koutroubakis: New desensitization regimen with mesalamine granules in a patient with ulcerative colitis and mesalamine intolerance. Inflammatory Bowel Diseases 2011;17:8-9
- 7) D Saito, M Hayashida, T Sato et al: Evaluation of the drug-induced lymphocyte stimulation test for diagnosing mesalazine allergy. Intestinal Research 2018;16(2):273-281

- 8) Y Kakuta, T Naito, M Onodera et al:NUDT15 R139C causes thiopurine-induced early severe hair loss and leukopenia in Japanese patients with IBD. The Pharmacogenomics journal 2016;16(3):280-285
- 9)Y Kawai, T Mimori, K Kojima et al:Japonica array:improved genotype imputation by designing a population-specific SNP array with 1070 Japanese individuals. Journal of human genetics 2015;60(10):581-587
- 10)Y Kakuta, Y kawai, D Okamoto et al:NUDT15 codon 139 is the best pharmacogenetic marker for predicting thiopurine-induced severe adverse events in Japanese patients with inflammatory bowel disease:a multicenter study. Journal of gastroenterology 2018;53(9):1065-1078
- 11)Y Kakuta, Y Kawai, T Naito et al:A Genome-wide Association Study Identifying RAPIA as a Novel Susceptibility Gene for Crohn' s Disease in Japanese Individuals. Journal of Crohn' s & Colitis 2019;13(5):648-658
- 12)D Okamoto, Y Kawai, Y Kakuta et al:Genetic Analysis of Ulcerative Colitis in Japanese Individuals Using Population-specific SNP Array. Inflammatory Bowel Diseases 2020;26(8):1177-1187
- 13)J Yang, S H Lee ,M E Goddard et al:GCTA:A Tool for Genome-wide Complex Trait Analysis. The American Journal of Human Genetics 2011;88(1):76-82

- 14) L Dancan, H Shen, B Gelaye et al:Analysis of polygenic risk score usage and performance in diverse human populations. Nature communications 2019;3328:1-9
- 15) B L Browning, Y Zhou, S R Browing:A one-penny imputed genome from next generation reference panels. The American journal of human genetics 2018;103(3):338-348
- 16)B J Vilhjalmsen, J Yang, H K Finucane et al:Modeling Linkage Disequilibrium Increases Accuracy of Polygenic Risk Scores. The American journal of human genetics 2015;97(4):576-592
- 17)滝川一:薬物性肝障害とリンパ球刺激試験. 肝臓 2001;42(9):445-447
- 18)武藤美香,河内繁雄,福澤正男他:薬疹におけるリンパ球刺激試験の診断的価値についての検討. 日本皮膚科学会雑誌 2000;110:1543-1548
- 19)本谷聡,下立雄一,田中浩紀他:5-ASA 不耐(メサラジンアレルギー)の潰瘍性大腸炎. IBD Research 2010;4:127-131
- 20)白井孝之,澤本佳奈,横山知子他:メサラジン不耐が疑われた潰瘍性大腸炎に対し経口メサラジン製剤の変更が有効であった2例. 消化器内科 2011;53:331-334
- 21)K C Kapur, G T Williams, M C Allison:Mesalazine induced exacerbation of ulcerative colitis. Gut 1995;37:838-839

22) K Watanabe, T Uchiyama: Successful use of Keihito compounds in patients with ulcerative colitis allergic to 5-ASA : 2 cases showing endoscopic mucosal healing over a 5-year follow up. Progress of Digestive Endoscopy 2016;88:65-68

23) 進藤百合子, 洞口亮, 林克敏他: Mesalazine 長期投与による薬剤性肺障害の1例. 日本呼吸器学会誌 2011;49(11):861-866

24) 茶山一彰, 越智秀典, 三木大樹: 肝疾患の疾患関連遺伝子: GWAS を含めた最近の知見から. 日本消化器病学会雑誌 2013;110:1577-1590

25) A Franke, D P B McGovern, J C Barrett et al: Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. Nature genetics 2010;42:1118-1125

26) 浅野光一, 梅野淳嗣, 松本主之: 炎症性腸疾患におけるゲノム研究の最前線. 日本消化器病学会雑誌 2011;108:1967-1976

27) K M de Lange, L Moutsianas, J C Lee et al: Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. Nature genetics 2017;49(2):256-261

28) Hayes MP, Roman DL. Regulator of G Protein Signaling 17 as a Negative Modulator of GPCR Signaling in Multiple Human Cancers. AAPS J. 2016;18(3):550-

- 29) Trendowski MR, Wheeler HE, El Charif O, et al. Clinical and Genome-Wide Analysis of Multiple Severe Cisplatin-Induced Neurotoxicities in Adult-Onset Cancer Survivors. *Clin Cancer Res.* 2020.
- 30) Xiao L, Gorospe M, Wang JY. Long noncoding RNAs in intestinal epithelium homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019;317(1):C93-C100.

9. 図

図 1. Discovery GWAS におけるマンハッタンプロット

メサラジンによる各不耐症状に関する Discovery GWAS におけるマンハッタンプロット。横軸が染色体番号とその位置、縦軸が $-\log_{10}P$ 値である。青線が候補水準 ($P < 5e-5$)、赤線がゲノムワイド有意水準 ($P < 5e-8$)。 (a) 不耐症状全体、 (b) 下痢増悪、 (c) 発熱、 (d) 発熱かつ下痢増悪。

図 2. 発熱かつ下痢増悪の有無に関する候補領域 3 つのそれぞれの regional plot

Discovery GWAS、Replication Study 及びメタ解析で「発熱かつ下痢増悪」と相関 ($P_{\text{meta}} < 5e-7$) を示した 3 領域それぞれの regional plot。横軸が染色体上の位置、縦軸が $-\log_{10}P$ 値である。 (a) rs144384547 近傍、 (b) rs79301185 近傍、 (c) rs200973787 近傍。

図 3. PRS の validation study における performance

PRS の validation study における performance を示したグラフである。X 軸は PRS の構築のために使用する SNP を選択する際の P 値の閾値を表している。Y 軸はそれぞれの閾値毎の PRS の pR^2 を表している。各バーグラフの上の数字はそれぞれの PRS のメサラジンによる「発熱かつ下痢増悪」に対する P 値を示している。

図 4. PRS のスコア別の副作用オッズ比の比較

PRS 毎によって層別化された患者群毎のメサラジン不耐に対するリスクで、PRS は z 標準化し、オッズ比と P 値は 40 -60 パーセンタイルを比較対象とし、他の 4 群と比較した。X 軸は PRS の層別化に使用したパーセンタイルを表している。Y 軸はオッズ比を表している。オレンジ色の点は各群のオッズ比を示し、上下の線は 95 % 信頼区間を示す。信頼区間の上の数字は P 値を示している。

図 5. $P < 3e-4$ での ROC 曲線

「発熱かつ下痢増悪」の出現を予測する PRS として $P < 3e-4$ を閾値としたモデルを採用した場合の ROC 曲線で、横軸が 1-特異度、縦軸が感度を表している。カットオフ値を 78.1210 点とした場合の感度は 61.5%、特異度は 71.7%であり、AUC は 0.67 であった。なお、疾患名及び性別の臨床的因子のみのモデルでは AUC は 0.78、それに遺伝的因子を組み合わせたモデルでは AUC は 0.89 であり、同モデルでは感度 71.4%、特異度は 90.8%であった。

图 1. (a) 不耐症状全体

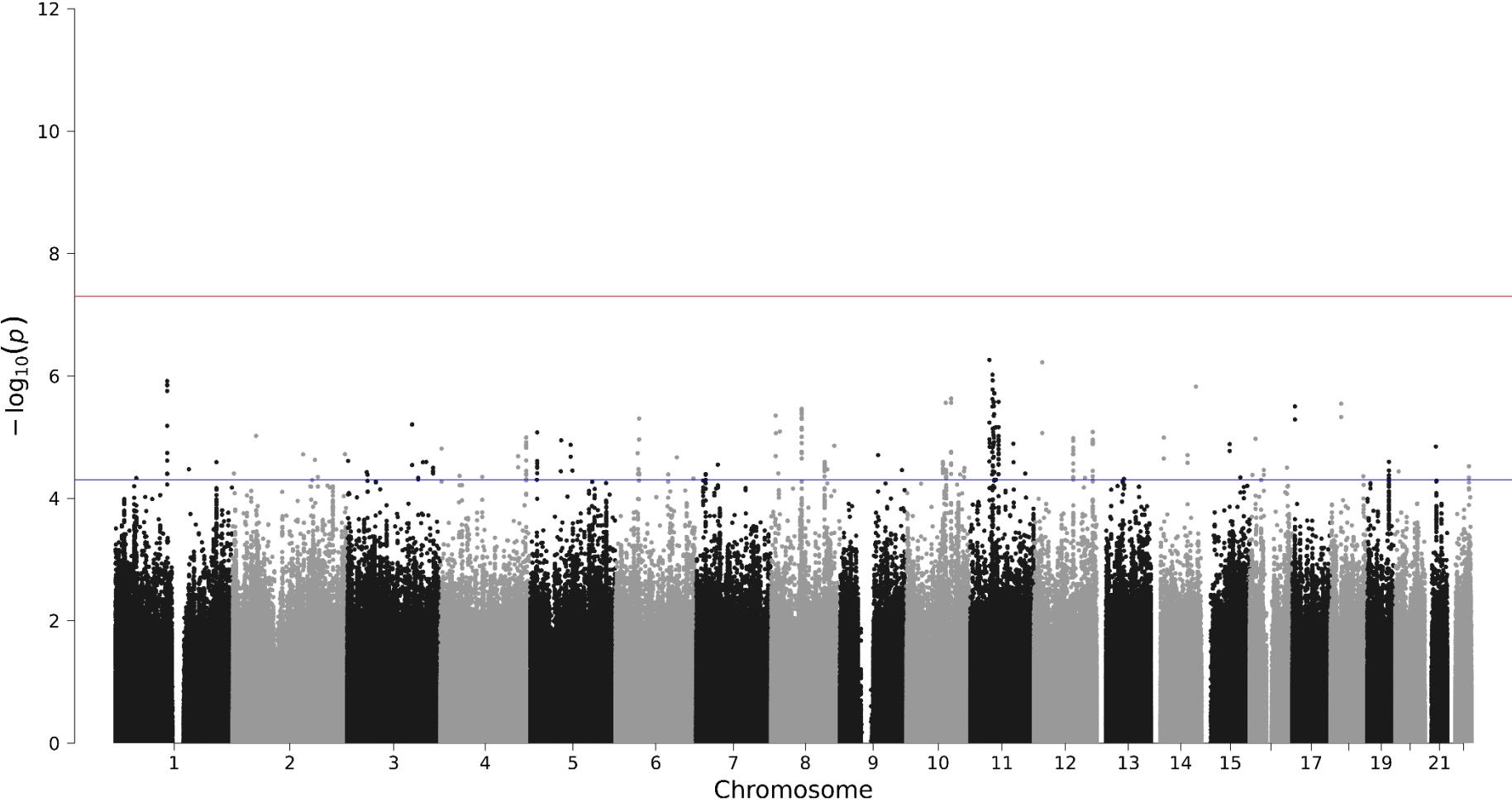


图 1. (b) 下痢増悪

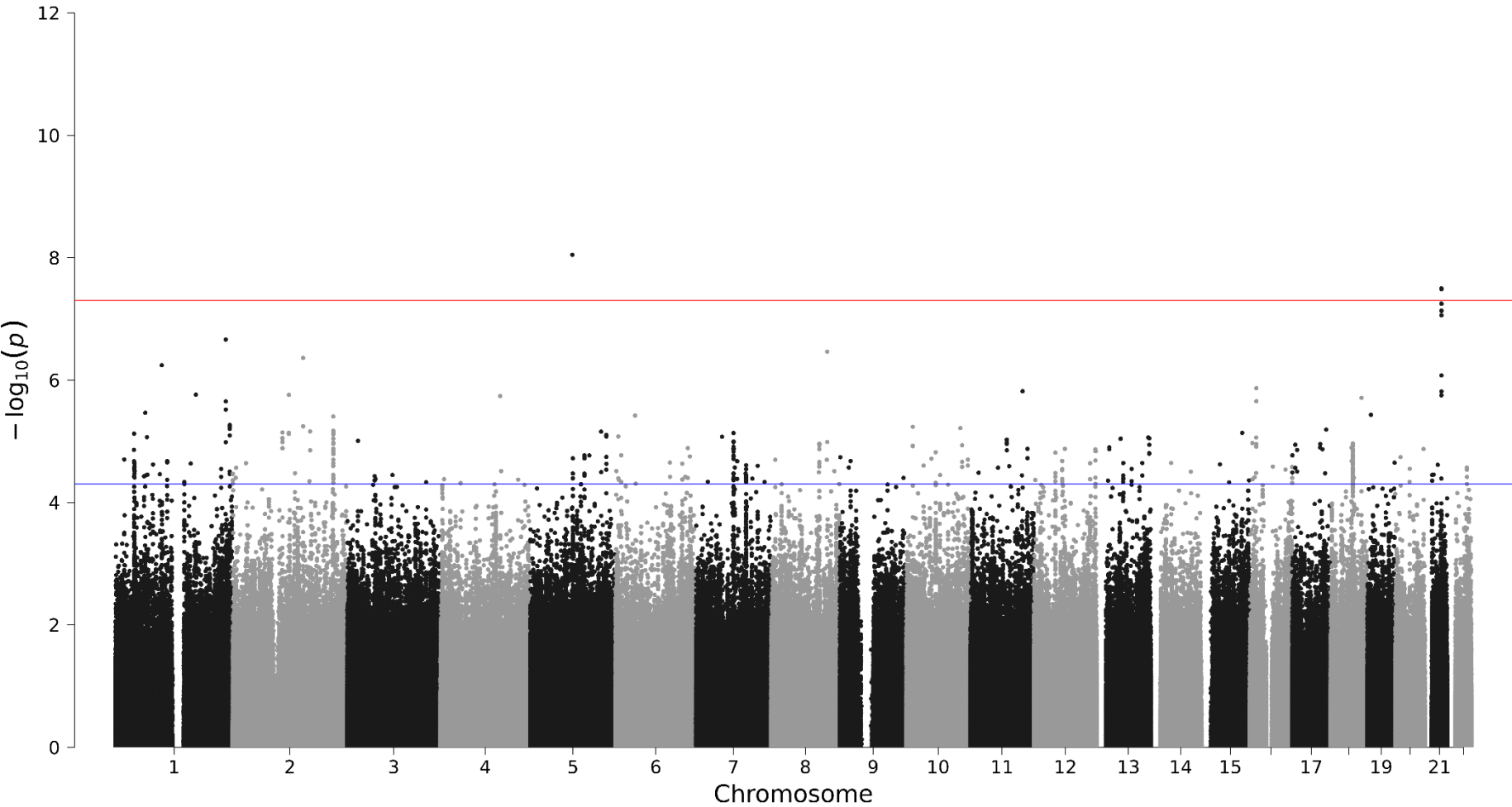


図 1. (c) 発熱

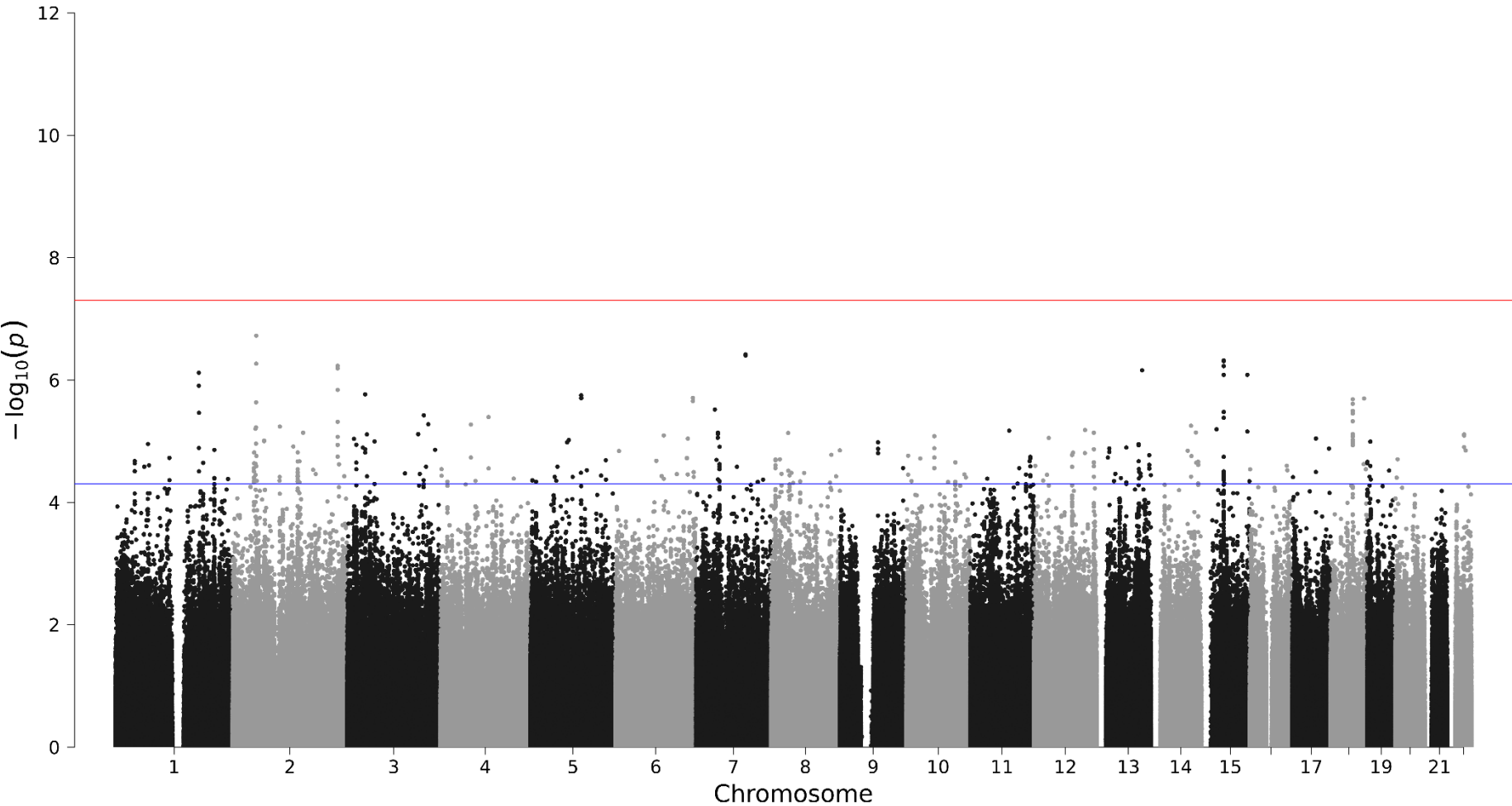


図 1. (d) 発熱かつ下痢増悪

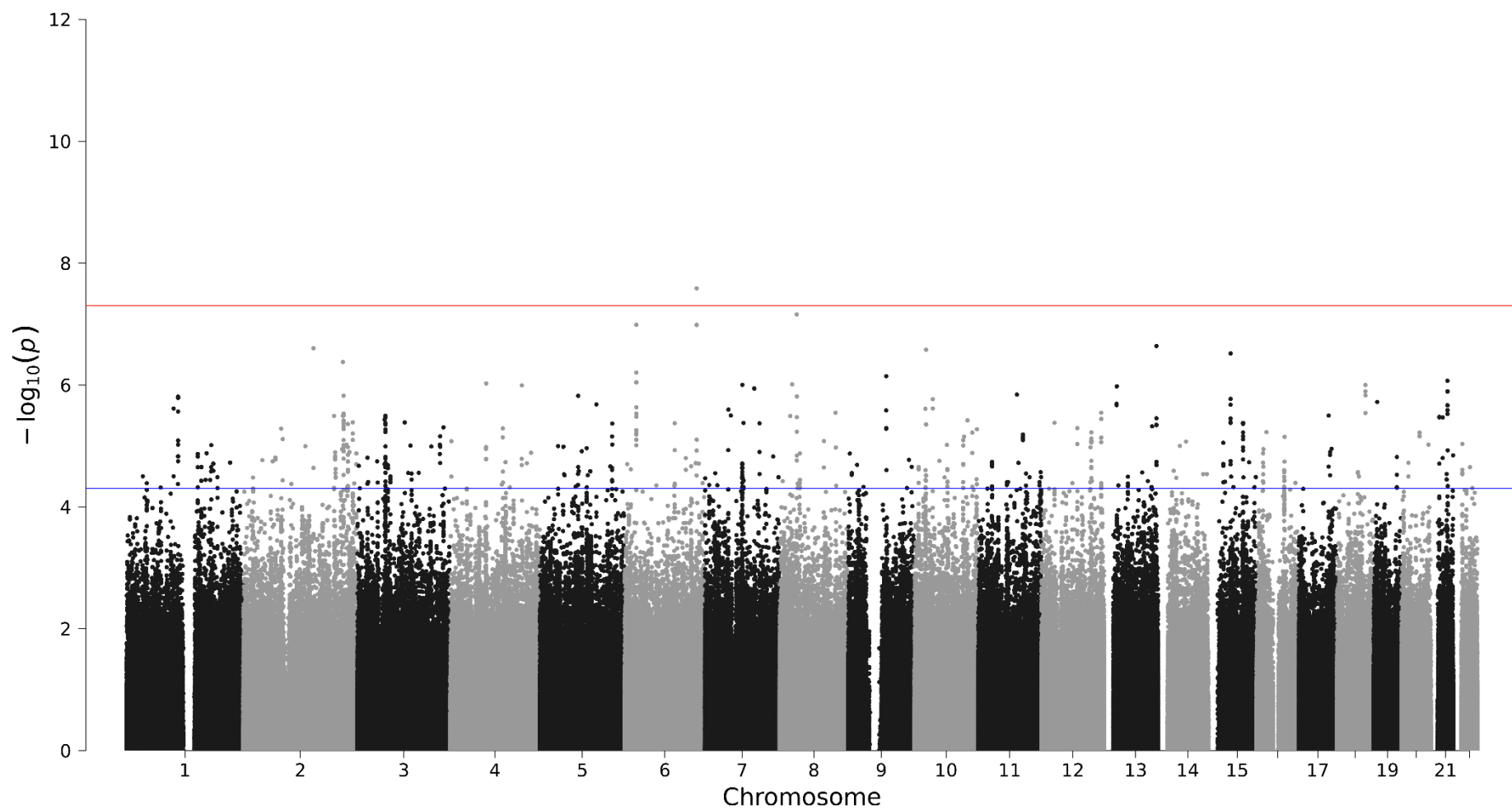
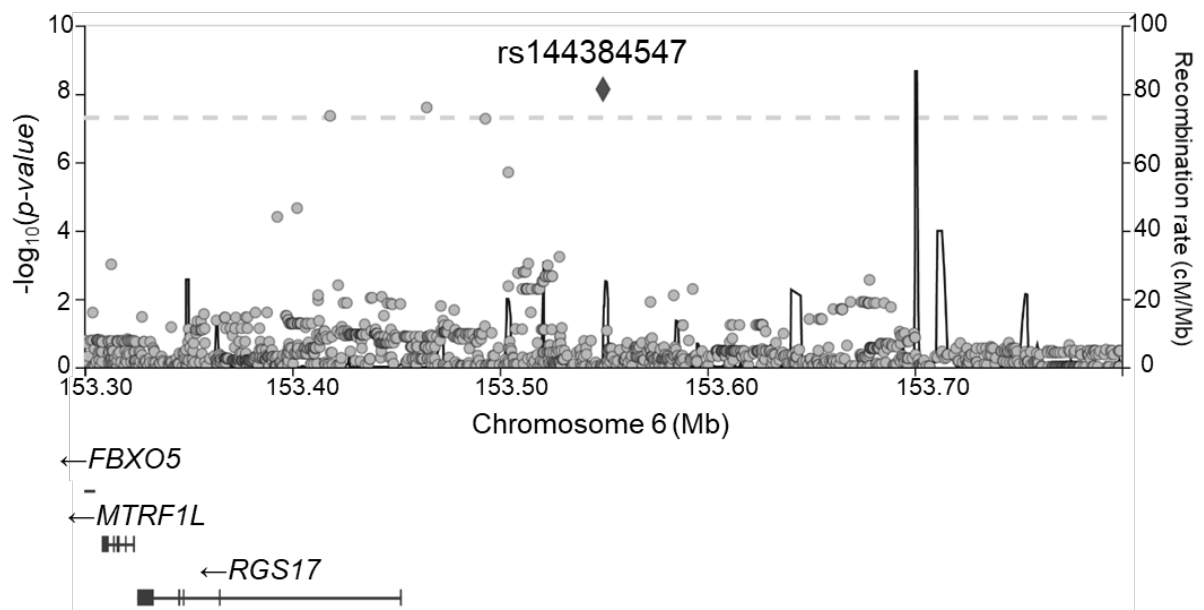
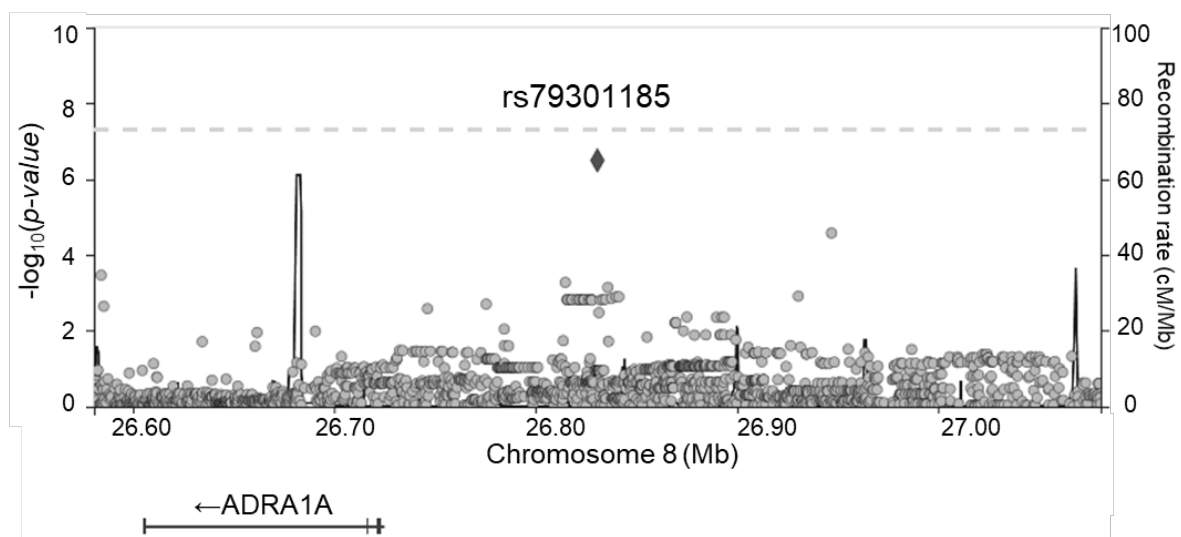


图 2.

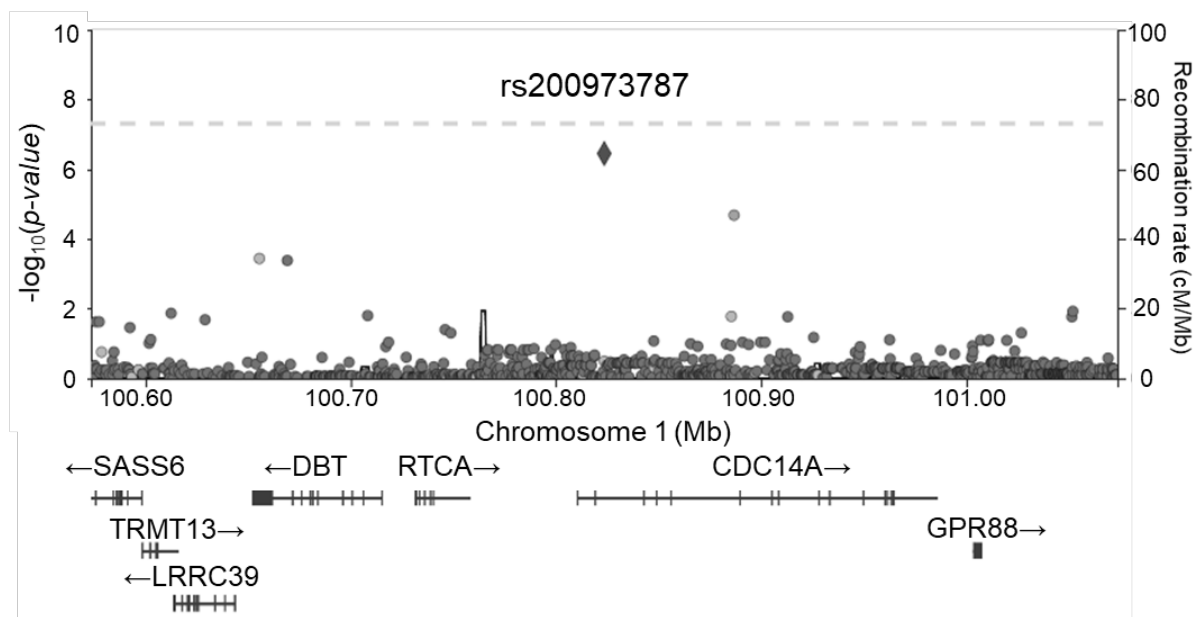
(a) rs144384547 近傍



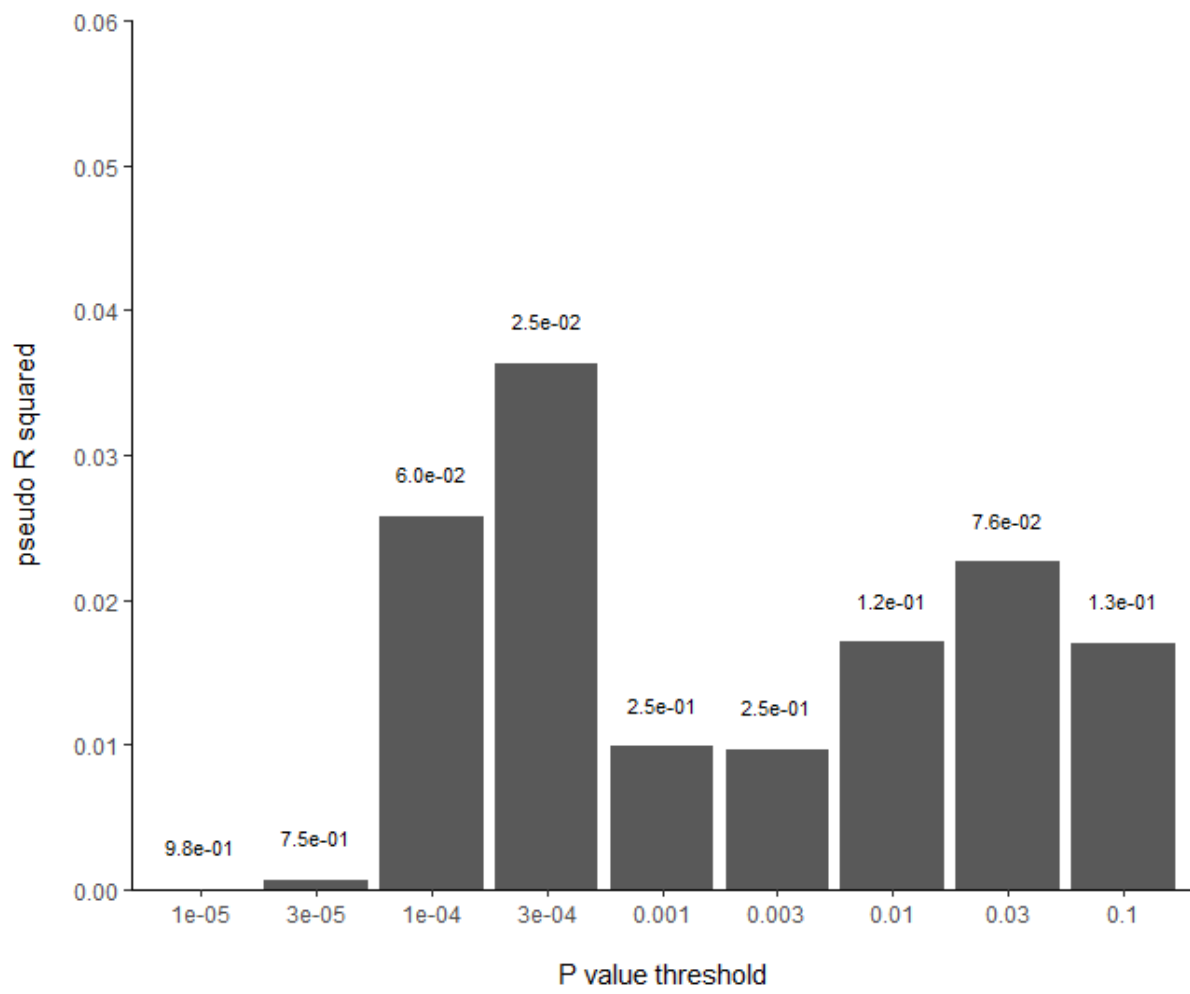
(b) rs79301185 近傍



(c) rs200973787 近傍



☒ 3.



☒ 4

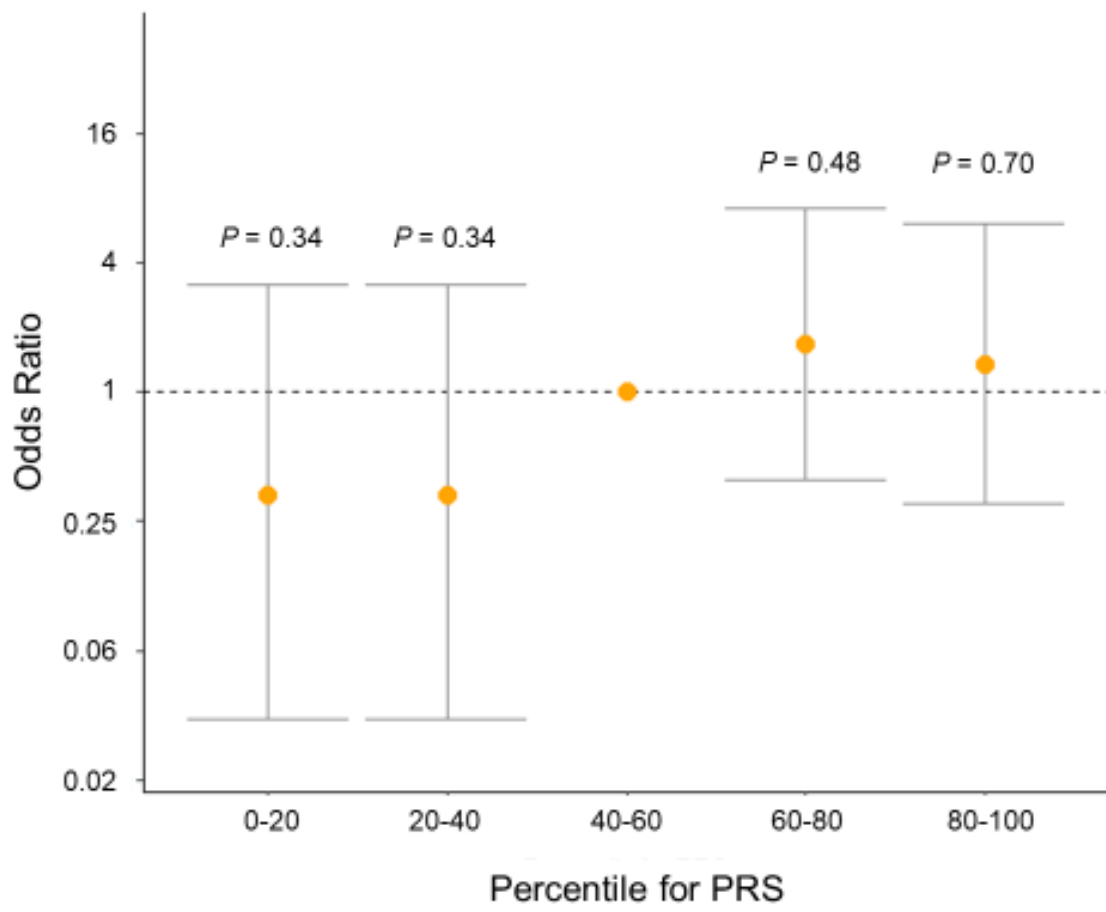
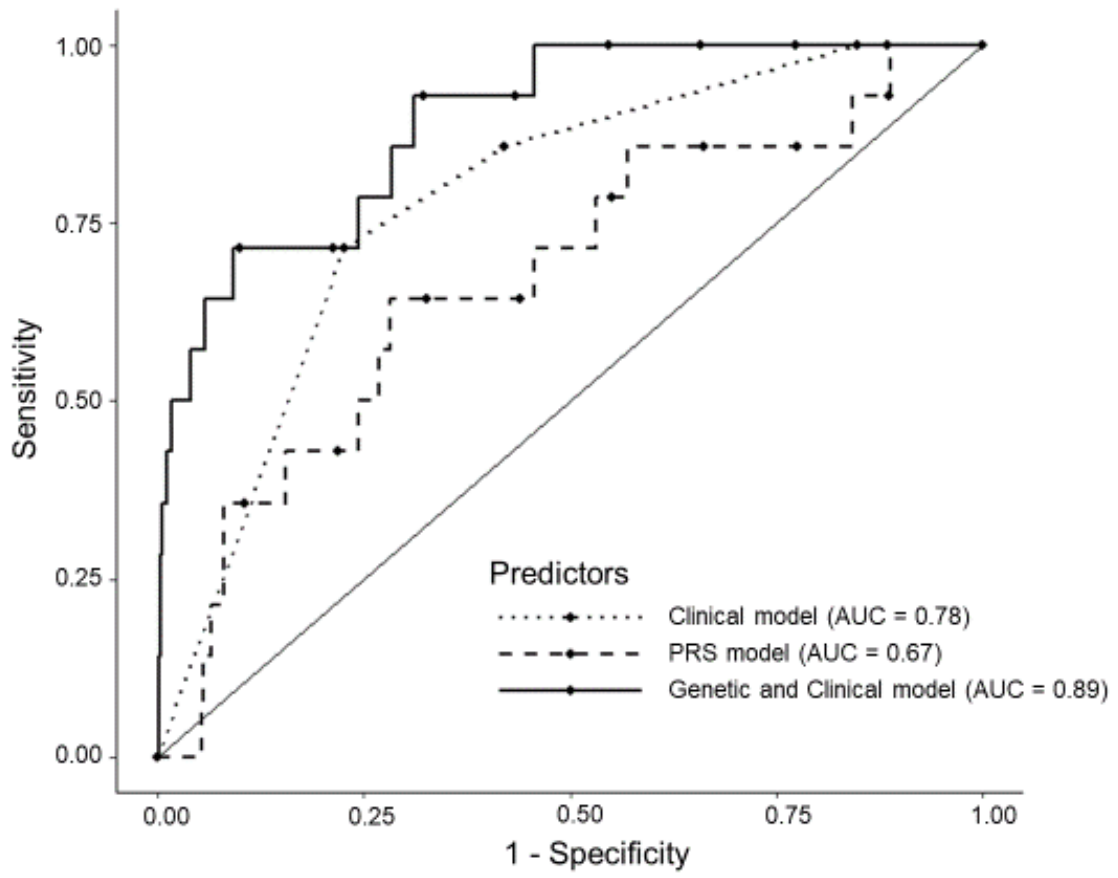


Figure 5



10. 表

表 1. 検討 1 の患者背景

		不耐群 (n=16)	非不耐群 (n=56)	P 値**
年齢	(中央値±SD)	31.5±13.2	43.5±15.6	0.0232
性別	男/女	11/5	36/20	0.7408
疾患	UC/CD/その他*	15/0/1	27/25/4	0.0011
UC	直腸炎型	1	1	0.0257
	左側大腸炎型	2	13	
	全大腸炎型	12	12	
	区域性	0	1	
CD	小腸型		2	
	大腸型		6	
	小腸大腸炎型		17	
被疑薬	メサラジン錠	1		
	ペンタサ錠	5		
	ペンタサ顆粒	2		
	アサコール	3		
	リアルダ	5		
症状	発熱かつ下痢増悪	2		
	発熱	5		
	下痢増悪	2		
	肺炎	4		
	間質性腎炎	1		
	膵炎	1		
	心膜炎	1		

*腸管ベーチェット病・分類不能型腸炎

**Wilcoxon 順位和検定、χ² 乗検定

表 2. 検討 1 のメサラジン原末群と製剤間比較群の患者背景

		メサラジン原末群		製剤間比較群	
		不耐群 (n=10)	非不耐群 (n=49)	不耐群 (n=6)	非不耐群 (n=7)
年齢	(中央値±SD)	33.5±12.0	47.0±15.7	29.0±13.4	33.0±8.5
性別	男/女	7 / 3	35 / 14	4 / 2	1 / 6
疾患	UC/CD/その他*	9 / 0 / 1	23 / 23 / 3	6 / 0 / 0	4 / 2 / 1
UC	直腸炎型	1	1	0	0
	左側大腸炎型	2	11	0	2
	全大腸炎型	6	10	6	2
	区域性	0	1	0	0
CD	小腸型	0	2	0	0
	大腸型	0	6	0	0
	小腸大腸炎型	0	15	0	2
被疑薬	メサラジン錠	1		0	
	ペンタサ錠	4		1	
	ペンタサ顆粒	1		1	
	アサコール	2		1	
	リアルダ	2		3	
症状	発熱かつ下痢増悪	2		0	
	発熱	3		2	
	下痢増悪	1		1	
	肺炎	3		1	
	間質性腎炎	1		0	
	膵炎	0		1	
	心膜炎	0		1	

*腸管バーチエット病・分類不能型腸炎

表 3. メサラジン原末群における DLST の結果

メサラジン量	Stimulation Index (中央値±SD)		
	不耐群(n=10)	非不耐群(n=49)	P 値**
0.5g	125.0±11.2%	132.0±16.0%	0.3119
1g	132.0±9.0%	126.0±16.0%	0.3319
2g	120.0±8.0%	125.0±17.0	0.2794
5g	121.0±12.0%	116.0±16.0%	0.6711
擬陽性を含む陽性率*	0%	0%	

*SI が 180%以上を擬陽性、200%以上を陽性とした場合

**Wilcoxon 順位和検定

表 4. 製剤間比較群における DLST の結果

製剤種	Stimulation Index (中央値±SD)		P 値**
	不耐群(n=6)	非不耐群(n=7)	
メサラジン	118.0±11.1	129.0±14.7	0.4751
ペンタサ顆粒	118.0±26.0	116.0±7.0	0.7206
ペンタサ錠	152.0±24.0	141.0±20.0	0.7206
アサコール	150.0±37.0	128.0±21.0	0.1520
サラゾピリン	115.0±17.0	128.0±9.0	0.3524
リアルダ	131.0±79.0	125.0±9.0	1.0 n.s.
擬陽性を含む陽性率*	33.3%	14.3%	
陽性	1	0	
擬陽性	1	1	0.4164
陰性	4	6	

*SI が 180%以上を擬陽性、200%以上を陽性とした場合

**Wilcoxon 順位和検定、 χ^2 乗検定

表 5. DLST 陽性となった 1 例における製剤別 DLST 検査結果

製剤	Stimulation Index	判定
メサラジン原末	123%	陰性
サラゾピリン	94%	陰性
ペンタサ顆粒	183%	擬陽性
ペンタサ錠	188%	擬陽性
アサコール	242%	陽性
リアルダ	335%	陽性

表 6. ゲノム解析対象患者の患者背景

		MENDEL Study 参加 IBD 患者 (Discovery GWAS) (n=1523)	東北大学病院通院 IBD 患者 (Replication) (n=788)
性別	男/女	927 / 596	520 / 268
疾患	UC	924 (60.7%)	335 (42.5%)
	CD	577 (37.9%)	444 (56.3%)
	その他	22 (1.4%)	9 (1.1%)
副作用 症状	副作用全体	199 (13.1%)	56 (7.1%)
	下痢増悪	86 (5.7%)	23 (2.9%)
	発熱	90 (5.9%)	22 (2.8%)
	発熱または 下痢増悪	127 (8.3%)	31 (3.9%)
	発熱かつ 下痢増悪	49 (3.2%)	14(1.8%)
	皮疹	22 (1.4%)	1 (0.13%)
	膵炎	24 (1.6%)	4 (0.51%)
	肺炎	13 (0.85%)	5 (0.63%)
	腎機能障害	3 (0.20%)	4 (0.51%)
	肝機能障害	7 (0.46%)	6 (0.76%)

※ 同一症例において複数の副作用が発現したものを含む

表 7. ゲノム解析対象患者の発熱または下痢の増悪の副作用と臨床背景との関連

(a) MENDEL Study 参加 IBD 患者 (Discovery GWAS)

		不耐群(n=127)	非不耐群(n=1396)	P 値**
性別	男/女	68 / 59	859 / 537	0.095
疾患	UC	111 (87.4%)	813 (58.2%)	9.27e-5
	CD	15 (11.8%)	562 (40.3%)	
	その他*	1 (0.8%)	21 (1.5%)	

*腸管バークェット病・分類不能型腸炎

** χ^2 乗検定

(b) 東北大学病院通院 IBD 患者 (Replication study)

		不耐群(n=31)	非不耐群(n=757)	P 値**
性別	男/女	26 / 5	494 / 263	0.051
疾患	UC	24 (76.7%)	311 (41.1%)	6.04e-5
	CD	7 (23.3%)	437 (57.7%)	
	その他*	0 (0%)	9 (1.2%)	

*腸管バークェット病・分類不能型腸炎

** χ^2 乗検定

表 8. 副作用別 GWAS の候補 SNP 数

副作用	Discovery GWAS		Replication Study	Meta Analysis	
	候補 SNP 数	Clump 後の 候補領域 (A)	A のうち両群で 相関の方向が同じ であった SNP 数	候補 SNP 数 ($P_{\text{meta}} < 5e-7$)	メタ解析で $P_{\text{meta}} < 5e-8$ のもの
下痢増悪	494	159	92	2	0
発熱	540	177	104	4	0
発熱かつ下痢増悪	861	255	179	3	1

表 9. メサラジンによる下痢増悪の副作用の感受性候補 SNP とメタ解析

ID	Chr	Position*	A1	A2	Cohort	Case			Control			A2Freq		P-values	OR(95%CI)
						A1A1	A1A2	A2A2	A1A1	A1A2	A2A2	Case	Control		
rs76156693	17	6366928	T	C	Discovery	78	8	0	1407	29	1	4.65%	1.08%	1.14E-05	6.67 (2.86-15.6)
					Replication	21	2	0	745	20	0	4.35%	1.31%	5.26E-03	8.52 (1.89-38.3)
					Meta	99	10	0	2152	49	1	4.59%	1.16%	2.06E-07	7.08 (6.34-7.82)
rs4891336	18	65823883	T	C	Discovery	78	8	0	1412	25	0	4.65%	0.87%	1.95E-06	8.98 (3.64-22.2)
					Replication	21	2	0	753	12	0	4.35%	0.78%	3.70E-02	5.61 (1.11-28.4)
					Meta	99	10	0	2165	37	0	4.59%	0.84%	2.31E-07	8.03 (7.24-8.82)

表 10. メサラジンによる発熱の副作用の感受性候補 SNP とメタ解析

ID	Chr	Position	A1	A2	Cohort	Case			Control			A2Freq		P-values	OR(95%CI)
						A1A1	A1A2	A2A2	A1A1	A1A2	A2A2	Case	Control		
rs28360654	6	166082632	T	C	Discovery	18	33	39	421	721	291	61.7%	45.5%	3.20E-05	1.94 (1.42-2.65)
					Replication	1	12	9	239	367	160	68.2%	44.8%	2.10E-03	2.68 (1.43-5.02)
					Meta	19	45	48	660	1088	451	63.0%	45.3%	3.54E-07	2.07 (1.79-2.35)
rs192688594	13	62698015	A	G	Discovery	79	11	0	1397	36	0	6.11%	1.26%	1.27E-05	5.21 (2.48-10.9)
					Replication	19	3	0	744	21	1	6.82%	1.50%	7.00E-03	5.52 (1.59-19.1)
					Meta	98	14	0	2141	57	1	6.25%	1.34%	2.88E-07	5.29 (4.65-5.92)
rs77344822	15	31818379	C	T	Discovery	76	14	0	1366	67	0	7.78%	2.34%	6.37E-06	4.36 (2.30-8.27)
					Replication	18	4	0	731	35	0	9.09%	2.28%	1.95E-03	6.55 (1.99-21.5)
					Meta	94	18	0	2097	102	0	8.04%	2.32%	5.26E-08	4.78 (4.22-5.34)
rs397822879	22	38819944	T	TG	Discovery	61	27	2	1210	216	7	17.2%	8.03%	1.42E-05	2.59 (1.68-3.97)
					Replication	13	7	2	638	124	4	25.0%	8.62%	2.26E-03	3.50 (1.57-7.82)
					Meta	74	34	4	1848	340	11	18.8%	8.23%	1.38E-07	2.76 (2.39-3.14)

表 11.メサラジンによる発熱かつ下痢増悪の副作用の感受性候補 SNP とメタ解析

ID	Chr	Position*	A1	A2	Cohort	Case			Control			A2Freq		P-values	OR (95% CI)	
						A1A1	A1A2	A2A2	A1A1	A1A2	A2A2	Case	Control			
rs200973787	1	100823686	ATCA	A	Discovery	39	10	0	1407	66	1	10.2%	2.31%	2.43e-06	5.97 (2.84–12.5)	
					Location: intron of <i>CDC14A</i>	Replication	10	4	0	724	50	0	14.3%	3.23%	3.38e-02	3.23 (1.09–9.53)
					Genes†: <i>RTCA, DBT, GPR88, LRRC39, TRMT13, SASS6</i>	Meta	49	14	0	2131	116	1	11.1%	2.62%	3.62e-07	4.90 (4.29–5.51)
rs144384547	6	153549799	C	A	Discovery	40	8	1	1453	21	0	10.2%	0.71%	2.59e-08	13.3 (5.34–33.0)	
					Location : intergenic	Replication	13	1	0	763	11	0	3.57%	0.71%	7.58e-02	5.46 (0.84–35.6)
					Genes†: <i>RGS17, MTRFIL, FBXO5</i>	Meta	53	9	1	2216	32	0	8.73%	0.71%	7.32e-09	11.2 (10.4–12.0)
rs79301185	8	26830798	G	A	Discovery	42	7	0	1440	33	1	7.14%	1.19%	9.74e-07	9.05 (3.75–21.8)	
					Location : intergenic	Replication	13	1	0	764	10	0	3.57%	0.65%	1.14e-01	4.70 (0.69–32.1)
					Genes†: <i>ADRA1A</i>	Meta	55	8	0	2204	43	1	6.35%	1.00%	3.23e-07	8.08 (7.27–8.88)

表 12.rs144384547 を保有している場合の発熱かつ下痢増悪の頻度

rs144384547 の ジェノタイプ*	ジェノタイプ頻度	副作用	
		人数	頻度
CC	2269 (98.2%)	53	2.34%
CA	41 (1.8%)	9	22.0%
AA	1 (< 0.1%)	1	100%

表 13. メサラジン製剤の副作用別の遺伝率

副作用症状	遺伝率	P 値
下痢増悪	3.63%	0.401
発熱	18.7%	0.102
発熱かつ下痢増悪	24.2%	0.0494

表 14. PRS の validation study における各 P 値別の結果一覧

P 値閾値	P 値	p R2	N of SNPs
3.00e-04	2.5e-02	0.036	610
1.00e-04	6.0e-02	0.026	251
3.00e-02	7.6e-02	0.023	23024
1.00e-02	1.2e-01	0.017	9512
1.00e-01	1.3e-01	0.017	63727
1.00e-03	2.5e-01	0.001	1573
3.00e-03	2.5e-01	0.001	3710
3.00e-05	7.5e-01	0.001	117
1.00e-05	9.8e-01	5.48e-6	56

P 値; PRS の Full model における病型（発熱かつ下痢増悪）に対する P 値

pR2; Full model と Null model における pseudo R-squared の差

N of SNPs; PRS の構築に使用した SNP の数

