

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) アロプリノールの適正使用のためのゲノム診断系の構築
(英語) Development of pharmacogenomic diagnostic system for proper use
of allopurinol

研究開発実施期間：令和2年7月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 塚越 絵里
(英語) Eri Tsukagoshi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 研究員
(英語) National Institute of Health Sciences, Division of Medicinal Safety Science, Resercher

II 研究開発の概要

医薬品の副作用では、特異体質性のものが、予測が難しく医薬品の安全対策上、重要である。特にステイアーヴンス・ジョンソン症候群及び中毒性表皮壊死症 (SJS/TEN) や、薬剤性過敏症症候群等の重症薬疹は、副作用被害救済制度において最上位を占め、最も対策が求められている。SJS/TENは、発症頻度としては稀ではあるが、皮膚および粘膜上皮の水疱形成と剥離を特徴として、視力低下などの後遺症をも引き起こす重篤な副作用である。SJS/TENについては、原因薬と発症に関連する遺伝子多型 (ヒト白血球抗原: HLA等) が多く報告されている。たとえば、一般薬としても用いられ常に副作用報告の上位に上がっている、高尿酸血症治療薬のアロプリノールによる SJS/TEN の発症について、*HLA-B*58:01* との関連が報告されている。現在、台湾やタイの医薬品添付文書では、アロプリノール処方前に患者の *HLA-B*58:01* 対立遺伝子を検査することが推奨されている。このように、HLA型は重症薬疹の発症の予測マーカーとなり得るが、HLA型解析は時間と費用がかかるため、遺伝子診断としては広く臨床応用されていない。したがって、臨床の現場で使用するには、検査法が簡便で迅速であること、また、汎用性が高く低コストであることが求められている。そこで、本研究では、アロプリノールによる SJS/TEN の発症と関連が報告されている *HLA-B*58:01* と絶対連鎖不平衡にある一塩基多型 (rs9263726 G>A) を代替マーカーとして用い、核酸クロマトグラフィ

一法による、より簡便で迅速な遺伝子診断法を構築することを目的とした。また、構築した測定系の分析法としてのバリデーションを行った。

1. 核酸クロマトグラフィー法の構築

厚生労働省、医薬品医療機器総合機構、日本製薬団体連合会の協力の下、全国症例収集ネットワークシステムを通じて日本人の SJS/TEN 発症患者の臨床情報とゲノム DNA を収集した。本研究期間で収集した新規試料と既存試料を合わせると、これまでに、計 349 例の症例が集められている。本研究では、このうち、アロプリノールが処方されてから重症薬疹の発症までに 8 週間以内の 28 例を解析対象とした。この 28 例のゲノム DNA について、HLA 型解析と、既存法である TaqMan 法による rs9263726 のジェノタイピング解析による検討後を行い、核酸クロマトグラフィー法による解析を行った。

① HLA 型解析と TaqMan 法による rs9263726 のジェノタイピング解析

HLA 型解析では、アロプリノールによる SJS/TEN 症例 28 例のうち、15 例が *HLA-B*58:01* 陽性でヘテロ接合型であった。残りの 13 例については、*HLA-B*58:01* 陰性であった。TaqMan 法を用いて rs9263726 の遺伝子型を解析したところ、15 例の *HLA-B*58:01* のヘテロ接合型患者は全て、rs9263726 の遺伝子型はヘテロ接合型 (G/A) であった。一方、*HLA-B*58:01* を保有していない 13 例は、野生型ホモ接合型 (G/G) であった。これらの結果から、*HLA-B*58:01* 陽性患者における遺伝子多型 (rs9263726 : 変異型 (A)) の保有が、100%一致した。

② 核酸クロマトグラフィー法による rs9263726 のジェノタイピング解析

核酸クロマトグラフィー法では、遺伝子多型に特有の長さの増幅断片となるようにプライマーを設計し、PCR 増幅後メンブレンストリップに展開するため、各対立遺伝子に特異的に結合するシングルタグ DNA 付の PCR プライマー (Reverse-Primer の 5' 末端にタグ DNA 付加) とビオチンラベルプライマー (Forward-Primer の 5' 末端にビオチンを付加) を作成し、非特異増幅のないプライマーを選定して行った。野生型 (G) と変異型 (A) を増幅するそれぞれの Reverse-Primer に付加する DNA タグ配列は、それぞれ異なるものにした。まず、PCR の増幅領域を完全に内包するように作成した人工遺伝子 (標準品) を用いて PCR 増幅を行った (PCR に要する時間は約 60 分)。PCR 後、増幅産物をアビジンコート青色ラテックスビーズと混合してメンブレンストリップに展開すると、ライン状に固相化された相補配列オリゴ DNA とプライマーに付加したタグ DNA の強いハイブリダイゼーション反応により PCR 増幅産物がトラップして可視化され、rs9263726 の各塩基 (G または A) に対応してチップ上に異なる位置でバンドを検出した (可視化に要する時間は約 15 分)。核酸クロマトグラフィー法による rs9263726 のジェノタイピング解析結果は、15 人の *HLA-B*58:01* 陽性患者と 13 人の *HLA-B*58:01* 陰性患者に対して TaqMan 法の結果と完全に一致した (感度と特異度はともに 100%)。

2. 核酸クロマトグラフィー法の分析法バリデーション

医薬品開発としてのジェノタイピング法のバリデーションに関する公式ガイドラインは存在しないため、核酸クロマトグラフィー法の分析法バリデーションは、FDA Foods Program (2020) と、厚生労働省 新型コロナウイルス感染症の PCR 検査等の精度管理マニュアル (2021) に記載の評価方法を参考にした。すなわち、検出感度については、代表的な試料の 3 倍の希釈系列 (0.04~90 ng) を作成し、暫定的な検出限界を決定し、正確な検出限界を求めるため、28 例の試料 (0.37~30 ng) の各濃度について、95% が検出される最低濃度を検出限界とした。また、3 回の反復測定による室内再現性と、PCR 試薬、プライマー濃度、アニーリング温度等に軽微な変更を加えて、分析法の頑健性の評価を行った。さらに、サーマルサイクラーの種類による影響も明らかにした。

① 検出限界 (感度)

代表的な試料の 3 倍の希釈系列 (0.04~90 ng) を作成し、暫定的な検出限界を試験した結果、試料のゲノム DNA 量が 1.11 以上で変異型 (A) が検出された。28 例の試料について、0.37~30 ng の各濃度で、野生型 (G/G) の平均値+6SD をカットオフ値として、変異型 (G/A) の検出を行ったところ、0.37 ng の陽性検出率は 93.3%、1.11 ng の陽性検出率は 100%であった。この結果から、*HLA-B*58:01* を保有する 15 例のうち 95%が陽性となる最小濃度は 1.11 ng であり、本診断法の検出限界は 1.11 ng となった。一方で、国立医薬品衛生研究所に勤務する 20 代から 60 代のボランティア 30 名によって目視による判定を行ったところ、陽性検出率が 95%以上となるためには、10ng のゲノム DNA が必要であった。実際の臨床現場では、目視にて判定することを想定しているため、本診断法は、10 ng を最適化されたゲノム DNA 量とした。

② 再現性 (精度)

精度については、まず標準品を用いた試験と、既存法 (TaqMan 法) による解析を行い、得られた結果の一致性を確認した。また、3 回の反復測定による室内再現精度は、1 回目、2 回目、3 回目はそれぞれ 23.5%、19.7%、21.4%であった。3 回の反復測定によるバンド濃度の室内再現精度の平均は 23%であり、参考にした基準値 (25%) 未満であった。変異型を検出する再現性は高く、偽陽性、偽陰性は認められなかった (感度と特異度は 100%)。

③ 頑健性

頑健性の評価では、アニール温度を最適化条件 (66°C) から±1°C変化させたところ、65°Cの場合はバンドが強くなり、67°Cの場合は弱くなることがわかった。また、アニール温度 65°Cと 67°Cでは、それぞれ野生型 (G/G) の偽陽性と変異型 (G/A) の偽陰性が増加する傾向であった。マスターミックス量 (±5%)、プライマー濃度 (±30%)、サーマルサイクラーの種類を変更した場合の影響を検討したところ、アニーリング温度を 66°Cに保つ限り、遺伝子型判定結果に変化はなかった。これらの結果から、この試験法の再現性は高く、アニーリング温度の変化 (±1°C) が結果に強く影響するため、温度制御に優れたサーマルサイクラーが必要と考えられた。

本研究では、*HLA-B*58:01* と絶対連鎖不平衡の rs9263726 について、アレル特異的な PCR 法を用いた核酸クロマトグラフィー法による遺伝子診断法を開発した。また、本診断法の分析法バリデーションを実施し、その信頼性を確認した。構築した rs9263726 を検出する核酸クロマトグラフィー法は、感度、特異度、再現性が高く、検出感度の鋭敏な優れた試験法であった。また、PCR 増幅からチップの検出まで迅速 (約 75 分) に結果を判定することができ、特別な機器を必要としないため汎用性も高く、低コストであった。本診断法は、*HLA-B*58:01* の代替マーカー検出法として有用であることが示唆された。

比較的重篤副作用の発症頻度が高い高尿酸血症治療薬のアロプリノールに関し、このような簡便なゲノム診断系を構築することは、これを用いた将来の臨床研究による有用性の検証と、当該結果に基づく臨床応用に供することが可能となり、医薬品投与前診断による重篤副作用の発症回避につながると期待される。

Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis (SJS/TEN) are rare but severe cutaneous adverse drug reactions. The onset of SJS/TEN is difficult to predict due to its idiosyncratic reactivity; however, certain human leukocyte antigen (HLA) types have been associated with SJS/TEN onset. Although HLA types can be good predictive biomarkers for SJS/TEN, HLA typing is time-consuming and expensive; thus, it is not commonly used in clinical situations. Therefore, a rapid, simple, versatile, and low-cost method is needed for use in clinical situations. In the present study, we developed a new method for genotyping the surrogate single-nucleotide polymorphism (SNP:rs9263726G>A) linked with *HLA-B*58:01* using the single-stranded tag hybridization chromatographic printed-array strip (STH-PAS), and

performed an analytical validation.

1. Development of the STH-PAS

349 Japanese SJS/TEN patients were collected from participating institutes of the Japan Severe Adverse Reactions research group and via a nationwide blood-sampling network system for SJS/TEN patients. Among these patients, 28 were prescribed allopurinol for a maximum of 8 weeks before the onset of SJS or TEN. HLA type was determined and rs9263726 was genotyped using TaqMan SNP Genotyping Assay or STH-PAS.

① HLA types and genotyping of rs9263726 using TaqMan SNP Genotyping Assay

We found that 15 of 28 allopurinol-related SJS/TEN cases were positive for *HLA-B*58:01*. Using a TaqMan SNP Genotyping Assay as a conventional genotyping method, we genotyped rs9263726 in allopurinol-related SJS/TEN patients; 15 of 28 cases had the G/A genotype of rs9263726, whereas the genotypes of all other cases were G/G. All heterozygotes of rs9263726 were found to be *HLA-B*58:01* positive, and the wild-type homozygotes were all negative; thus, the concordance rate of rs9263726 as a surrogate marker for *HLA-B*58:01* was 100% in this cohort.

② Genotyping of rs9263726 using STH-PAS

The results of genotyping rs9263726 using STH-PAS correlated well with those obtained using the TaqMan SNP Genotyping Assay for 15 *HLA-B*58:01*-positive and 13 *HLA-B*58:01*-negative patients (analytical sensitivity and specificity were both 100%).

2. Analytical validation of the STH-PAS

① Detection limit of genomic DNA

A cutoff value of mean + six SDs of image densities in wild-type (G/G) was used to detect variant (G/A) in the image analysis. The positive detection rate of 0.37 ng was 93.3% and that of 1.11 ng was 100%. The minimum concentration at which 95% of all 15 *HLA-B*58:01*(+) cases tested positive was 1.11 ng, meaning that the detection limit of this system was 1.11 ng, which suggested that approximately 10 times the amount of genomic DNA was required for reliable diagnosis by eye. Therefore, 10 ng of genomic DNA was set as the optimized template amount.

② Reproducibility

The accuracy was evaluated first by the consistency of positive and negative controls and the genotypes of rs9263726 revealed by a TaqMan assay. Indeed, there was a 100% match in the TaqMan genotyping results for rs9263726. The reproducibility of the intra-laboratory repeatability was performed with three independent measurements. Image analysis revealed the densities of visible bands in the variant line area to be highly reproducible, and the precision values (SD/mean) for the intensity were 23.5%, 19.7%, and 21.4% for the first, second, and third runs, respectively. No false-positive or false-negative results were observed, and the clinical sensitivity, specificity, and accuracy were 100% for all samples.

③ Robustness

For the robustness evaluation, we changed the annealing temperature by $\pm 1^\circ\text{C}$ from the optimized condition (66°C) and found that the bands became stronger and weaker (but still visible) in the case of 65°C and 67°C , respectively. However, at annealing temperatures 65°C and 67°C , a false positives of wild-type (G/G) and false negatives of variant (G/A) were increased, respectively. We also evaluated effects of changes in the master mix volume ($\pm 5\%$), the primer concentration ($\pm 30\%$), and type of the thermal cycler, but resulting in no changes in the genotyping results as long as the annealing temperature was kept at 66°C .

Although the test was highly reproducible, the thermal cycler with excellent temperature control was thought to be needed because the changes in annealing temperature ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) strongly affected the results. In conclusion, we developed an STH-PAS method that can be used to identify genetic variant rs9263726, which is linked with *HLA-B*58:01*, using multiplex single-tube PCR and a membrane stick. We also performed analytical validation of this method and confirmed its reliability.