

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10128

研究課題名(和文) 5-FUによる効果・有害事象を規定する薬理遺伝学的バイオマーカーの同定と機能解析

研究課題名(英文) Pharmacogenomic analysis of biomarker that predict adverse events associated with 5-fluorouracil

研究代表者

大沼 忍 (Ohnuma, Shinobu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70451565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：5-FUを投与した胃癌、大腸癌患者の末梢血を用い5-FU代謝関連遺伝子の遺伝子多型と副作用の関連を解析した。結果、DPYD c.496G>A, C.1905+1G>A, C.2303C>Aのいずれかを有する患者(5.3%)に有意に有害事象が発現していた。その中でも全身倦怠感の発症と有意に相関していた。さらに、MTHFRのc.1298A>Cをもつ患者(17%)は有意に好中球減少症を発症していた。今回同定した遺伝子多型を、5-FU投与前にスクリーニングすることで有害事象の発現を予測できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the association between 5-fluorouracil (5-FU)-related adverse events (AEs) in Japanese patients with gastrointestinal cancer treated with 5-FU and the patient genotypes DPYD, MTHFR, OPRT, and TYMS. Methods: Sequence analyses of 33 gene polymorphisms in four genes were performed using genomic DNA extracted from peripheral blood mononuclear cells of 88 patients with gastric (n = 30) or colorectal (n = 58) cancer. The associations between the incidence of AEs and each genotype were statistically analyzed. Results: The patients carrying any one of three DPYD SNPs (c.496A>G, c.1905+1G>A, and c.2303C>A) showed statistically significant associations with the incidence of AEs, especially fatigue, and the MTHFR SNP c.1298A>C was significantly associated with the incidence of neutropenia. Conclusion: These findings suggest that the genetic polymorphisms of DPYD and MTHFR may be predictive factors for the occurrence of severe 5-FU-related AEs.

研究分野：消化器外科

キーワード：DPYD MTHFR OPRT TYMS 5-FU splicing

## 1. 研究開始当初の背景

5-FU は消化器癌の治療において広く用いられる抗癌剤である。一方、5-FU は時に重篤な有害事象発現の原因となり、治療の延期、中止だけでなく患者生命が危険に晒されることもある。しかし、その副作用の発現を投与前に予測することは困難である。近年、有害事象発現の一因として、5-FU 代謝酵素の活性低下をもたらす遺伝子多型が注目されている。これまで、日本人種における 5-FU 代謝関連酵素遺伝子多型と副作用発現を解析した報告は少なく、さらに複数の遺伝子多型を患者毎に副作用と比較解析した報告例はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本人種における 5-FU による副作用発現を規定する 5-FU 代謝関連酵素の遺伝子多型を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

東北大学病院で 5-FU 系薬剤の投与を受けた胃癌、大腸癌患者の計 103 名を対象とした。解析遺伝子は、5-FU 代謝に関わる DPYD, MTHFR, OPRT, TYMS の 4 遺伝子、計 33 遺伝子多型とした。同意取得のもと、末梢血を採取し DNA を抽出、Direct Sequence 法、PCR-RFLP 法、MassARRAY のいずれかを用い遺伝子多型を同定した。同定した遺伝子多型と有害事象 (CTCAE: グレード 3 以上) の発現頻度を統計学的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子型判定結果

103 人の対象患者に対して、4 個の対象遺伝子計 33 遺伝子多型についてゲノム DNA 配列解析を行った結果、計 6 個の SNPs を同定した。同定した 6 個の SNPs は DPYD に関して 3 SNPs: c.496A>G, c.1905+1G>A, c.2303C>A、MTHFR に関して 2 SNPs:

677C>T, 1298A>C、OPRT に関して 1 SNP: c.638G>C である。

### (2) DPYD c.1905+1G>A ヘテロ接合体の mRNA 配列解析結果

DPYD のゲノム DNA 配列解析により、c.1905+1G>A のヘテロ接合体を 1 例同定した。同 SNP はスプライシングの障害を来すことが知られているため、同検体に対して mRNA の配列解析を行った。cDNA を再抽出しダイレクトシーケンス法にて配列を確認した結果、正常なバンド由来の cDNA は参照配列と同様の配列であったが、異常なバンド由来の cDNA ではエクソン 14 のスキッピングを生じていた。

### (3) 副作用と遺伝子型の関連解析結果

副作用とそれぞれの遺伝子型との関連性を解析するにあたって、DPYD の遺伝子型については SNPs を有する群 (SNP (+) 群: c.496A>G, c.1905+1G>A, c.2303C>A を有する個体群) と SNPs を持たない群 (SNP (-) 群: 上記 3 個の SNPs を持たない個体群) の 2 群に分類した。DPYD SNP (+) は SNP (-) に比べ、有意に全副作用の発症に相関していた (前者: 12/19, 63.2%、後者: 37/138, 26.8%) (p=0.003, OR=4.68, 95% CI: 1.71-12.8)。また、MTHFR c.1298A>C SNP (+) は SNP (-) に比べ、有意に好中球減少症の発症に相関していた (前者: 15/45, 33.3%、後者: 12/112, 10.7%) (p=0.002, OR=4.17, 95% CI: 1.76-9.86)。さらに DPYD SNP (+) は SNP (-) に比べ、有意に全身倦怠感の発症に相関していた (前者: 5/19, 26.3%、後者: 7/138, 5.1%) (p=0.007, OR=6.68, 95% CI: 1.87-23.9)。その他の遺伝子多型を含めた多重ロジスティック回帰分析では、DPYD SNP (+) は有意に全副作用の発症、及び全身倦怠感の発症に相関しており (p=0.001, OR=5.28, 95% CI: 1.93-15.5、

及び  $p=0.006$ ,  $OR=6.68$ ,  $95\% CI: 1.78-23.9$ ) MTHFR c.1298A>C SNP (+) は有意に好中球減少症の発症に相関していた ( $p=0.0002$ ,  $OR=6.81$ ,  $95\% CI=2.48-20.3$ )

#### (4) 結論

5-FU 代謝酵素の DPD、MTHFR について、DPD の遺伝子多型である c.496A>G (rs2297595) c.1905+1G>A (rs3918290) c.2303C>A (rs56005131) は 5-FU 投与に伴うグレード 3 以上の副作用発現、特に全身倦怠感の発症と、MTHFR の遺伝子多型である c.1298A>C (rs1801131) はグレード 3 以上の副作用、特に好中球減少症と有意に相関した。また、アジア人には存在しないと考えられていた DPD の c.1905+1G>A (rs3918290) を、日本人種で初めて同定した。5-FU 投与癌患者において、同定した遺伝子多型を 5-FU 投与前にスクリーニングすることは、重篤な副作用を防ぐ上で有用であると思われる。

#### 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 20 件)

Hirashima T, Ohnuma S, Karasawa H, Watanabe K, Imoto H, Aoki T, Kudoh K, Tanaka N, Nagao M, Musha H, Motoi F, Kamei T, Naitoh T, Unno M, Endoscopy-Assisted Partial Duodenal Resection for Duodenal Adenoma in a Patient with Familial Adenomatous Polyposis, *Gan To Kagaku Ryoho*, 査読, 45(3), 2018, 518-520, <http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/45030/518>

大沼 忍, 内藤 剛, 村上 恵, 鈴木 秀幸, 井本 博文, 山村 明寛, 唐澤 秀明, 神山 篤史, 青木 豪, 渡辺 和宏, 田中 直樹, 武者 宏昭, 元井 冬彦, 亀井 尚, 海野 倫明, 【究極のこだわり 直腸癌に対する腹腔鏡下手術】 男性狭骨盤症例の腹腔鏡下低位前方切除術, *消化器外科*, 査読無, 40 巻 13 号, 2017, 1765-1771, <https://www.herusu-shuppan.co.jp/g201712/>

Karasawa H, Ohnuma S, Watanabe K, Tsuchiya T, Imoto H, Aoki T, Kudoh K, Tanaka N, Nagao M, Abe T, Musha H, Motoi F, Kamei T, Naitoh T, Unno M. Multidisciplinary Treatment for Squamous Cell Carcinoma of the Anal Canal, *Gan To Kagaku Ryoho*, 査読有, 44(12), 2017, 2009-2010, <http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/44120/2009>

Mochizuki Y, Karasawa H, Shimodaira H, Ohnuma S, Watanabe K, Maeda S, Nagao M, Aoki T, Kudo K, Tanaka N, Musha H, Motoi F, Kamei T, Naitoh T, Unno M, A Case of Curatively Resected Ascending Colon Cancer with Ovarian Metastasis and Peritoneal Dissemination after Chemotherapy, *Gan To Kagaku Ryoho*, 査読有, 44(12), 2017, 1711-1713, <http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/44120/1711>

Tsuchiya T, Tanaka N, Nagao M, Watanabe K, Imoto H, Ohnuma S, Musha H, Watanabe M, Murakami K, Fujishima F, Motoi F, Naitoh T, Unno M, A Case of Leiomyosarcoma of the Small Intestine with Intestinal Hemorrhage Due to Intraluminal Penetration, *Gan To Kagaku Ryoho*, 査読有, 44(12), 2017, 1068-1070, <http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/44120/1068>

Takahashi H, Takahashi M, Ohnuma S, Unno M, Yoshino Y, Ouchi K, Takahashi S, Yamada Y, Shimodaira H, Ishioka C, microRNA-193a-3p is specifically down-regulated and acts as a tumor suppressor in BRAF-mutated colorectal cancer, *BMC Cancer*, 査読有, 17(1), 2017, 723. doi: 10.1186/s12885-017-3739-x

Ishida M, Sakata N, Ise I, Ono T, Shimura M, Ishii K, Murakami M, Takadate T, Aoki T, Kudo K, Ohnuma S, Fukase K, Ohtsuka H, Mizuma M, Hayashi H, Nakagawa K, Morikawa T, Motoi F, Naitoh T, Unno M, The comparative anatomy of the folds, fossas, and adhesions around the duodenojejunal flexure in mammals. *Folia Morphol (Warsz)*, 査読有, 2017, doi: 10.5603/FM.a2017.0089

金原 圭吾, 大沼 忍, 唐澤 秀明, 渡辺 和宏, 工藤 克昌, 石田 晶玄, 佐藤 聡子,

元井 冬彦, 内藤 剛, 海野 倫明, 腸腰筋浸潤を伴う進行虫垂粘液嚢胞腺癌に対し根治切除を施行した 1 例、日本消化器外科学会雑誌、査読有、50 巻 9 号、2017、754-761、[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjgs/50/9/50\\_2016.0158/article-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjgs/50/9/50_2016.0158/article-char/ja/)

Murakami M, Ohnuma S, Fukuda M, Chufan EE, Kudoh K, Kanehara K, Sugisawa N, Ishida M, Naitoh T, Shibata H, Iwabuchi Y, Ambudkar SV, Unno M. Synthetic Analogs of Curcumin Modulate the Function of Multidrug Resistance-Linked ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2, Drug Metab Dispos、査読有、45(11), 2017, 1166-1177, doi:10.1124/dmd.117.076000

Funayama R, Taniguchi H, Mizuma M, Fujishima F, Kobayashi M, Ohnuma S, Unno M, Nakayama K. Protein arginine deiminase 2 suppresses proliferation of colon cancer cells through protein citrullination. Cancer Sci、査読有、108(4),2017,713-718. doi:10.1111/cas.13179

Toyama S, Kudoh K, Ohnuma S, Sato S, Tanaka N, Aoki T, Imoto H, Karasawa H, Watanabe K, Nagao M, Abe T, Musha H, Motoi F, Naitoh T, Unno M, A Case of Undifferentiated Carcinoma of the Sigmoid Colon That Responded to Paclitaxel and Carboplatin Chemotherapy, Gan To Kagaku Ryoho、査読有、43(12)、2016、2295-2297、<http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/43120/2295>

Sato Y, Karasawa H, Aoki T, Imoto H, Tanaka N, Watanabe K, Abe T, Nagao M, Ohnuma S, Musha H, Takahashi M, Motoi F, Naitoh T, Ishioka C, Unno M, Resection of a Huge Gastrointestinal Stromal Tumor of the Stomach Following Neoadjuvant Chemotherapy with Imatinib, Gan To Kagaku Ryoho、査読有、43(12)、2016、2216-2218、<http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/43120/2216>

Sato J, Karasawa H, Maeda S, Ohnuma S, Watanabe K, Nagao M, Abe T, Musha H, Motoi F, Naitoh T, Unno M, A Successful Case of Conversion Therapy after Chemotherapy for Advanced Rectal Cancer with Inguinal Lymph Node Metastasis. Gan To

Kagaku Ryoho、査読有、43(12)、2016、2145-2147、<http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/43120/2145>

Kobayashi M, Funayama R, Ohnuma S, Unno M, Nakayama K, Wnt- $\beta$ -catenin signaling regulates ABCC3 (MRP3) transporter expression in colorectal cancer. Cancer Sci、査読有、107(12)、2016、1776-1784. doi:10.1111/cas.13097

Matsuda Y, Miura K, Yamane J, Shima H, Fujibuchi W, Ishida K, Fujishima F, Ohnuma S, Sasaki H, Nagao M, Tanaka N, Satoh K, Naitoh T, Unno M, SERPINI1 regulates epithelial-mesenchymal transition in an orthotopic implantation model of colorectal cancer. Cancer Sci、査読有、107(5),2016,619-28. doi:10.1111/cas.12909

Ohnuma S, Toshima M, Miura K, Kudoh K, Ishida M, Karasawa H, Musha H, Motoi F, Naitoh T, Unno M, Single-nucleotide polymorphisms of DPYD predict adverse events associated with 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer. Annals of Oncology、査読有、26, Issue suppl\_9, 2015, Pagesix11, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv518.13>

Obara M, Ohnuma S, Karasawa H, Watanabe K, Kudoh K, Ishida M, Imoto H, Aoki T, Tanaka N, Nagao M, Abe T, Musha H, Motoi F, Naitoh T, Unno M, Total Pelvic Exenteration for Local Recurrence of Rectal Cancer Appearing 12 Years after Curative Operation--A Case Report. Gan To Kagaku Ryoho、査読有、42(12)、2015、2337-9、<http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/42120/2337>

Naitoh T, Morikawa T, Tanaka N, Aoki T, Ohtsuka H, Okada T, Sakata N, Ohnuma S, Nakagawa K, Hayashi H, Musha H, Yoshida H, Motoi F, Katayose Y, Unno M, Early experience of robotic surgery for type I congenital dilatation of the bile duct. J Robot Surg、査読有、9(2)、2015、143-8. doi:10.1007/s11701-015-0504-5

Katayama K, Kapoor K, Ohnuma S, Patel A, Swaim W, Ambudkar IS, Ambudkar SV, Revealing the fate of cell surface human P-glycoprotein (ABCB1): The lysosomal degradation

pathway. *Biochim Biophys Acta*, 査読有、1853(10 Pt A)、2015、2361-70. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.06.001

Kajiwara T, Miura K, Ohnuma S, Shimada M, Komura T, Toshima M, Kohyama A, Kudoh K, Haneda S, Musha H, Naitoh T, Shirasaka T, Unno M. Gastrointestinal toxicities of 5-fluorouracil increase the proportion of regulatory T cells in intestinal tract: advantages of alternate-day S-1 administration. *Int J Clin Oncol*, 査読有, 20(5), 2015, 913-21, doi: 10.1007/s10147-015-0791-x

〔学会発表〕(計 20 件)

大沼 忍 他、家族性大腸腺腫症に対する腹腔鏡下大腸全摘術、第 30 回日本内視鏡外科学会総会、2017 年 12 月 7 日、京都国際館(京都市)

大沼 忍 他、直腸神経内分泌腫瘍に対する手術症例の検討、第 72 回日本大腸肛門病学会学術集会、2017 年 11 月 7 日福岡国際会議場(福岡市)

大沼 忍 他、原発性小腸癌に対する化学療法の現況、第 55 回日本癌治療学会学術集会、2017 年 10 月 20 日、パシフィコ横浜(横浜市)

杉沢 徳彦 大沼 忍 他、抗癌剤感受性の増強を目指した P-glycoprotein に対する新規抑制剤の開発、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28 日、パシフィコ横浜(横浜市)

村上 恵 大沼 忍 他、新規合成クルクミン誘導体における抗癌剤耐性 ABC トランスポーターの抑制効果、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28 日、パシフィコ横浜(横浜市)

大沼 忍 他、Stage IV 大腸癌の外科治療戦略、第 72 回日本消化器外科学会総会、2017 年 7 月 20 日、石川県立音楽堂(金沢市)

大沼 忍 他、遠隔転移を有する大腸癌に対する外科治療戦略、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017 年 4 月 27 日、パシフィコ横浜(横浜市)

Obara M, Ohnuma S 他、Synthetic Analogs of Curcumin as Modulators of Multidrug Resistance-Linked ABC Transporters, AACR Annual Meeting, 2017 年 4 月 4 日、ワシントン DC(アメリカ)

Sugisawa N, Ohnuma S 他、Discovering Potent ABCB1 Inhibitors by High-Throughput Screening from 5760 Compounds in Tohoku University Chemical Library, Gordon Research Conference: Multi-Drug Efflux Systems, 2017 年 3 月 27 日、ガ

ルベストン(アメリカ)

Ohnuma S 他、Surgical treatments for patients with Familial adenomatous polyposis: A Single-Institute Experience、China-Japan-Korea colorectal cancer symposium, 2016 年 12 月 3 日、北京(中国)

大沼 忍 他、Stage IV 大腸癌の治療戦略、第 71 回日本大腸肛門病学会学術集会、2016 年 11 月 19 日、三重県営サンアリーナ(伊勢市)

大沼 忍 他、直腸癌骨盤内再発に対する治療戦略 直腸癌局所再発に対する骨盤内臓全摘術、第 78 回日本臨床外科学会総会、2016 年 11 月 24 日、京王プラザホテル(新宿)

大沼 忍 他、直腸癌に対する治療戦略 直腸癌局所再発切除例に対する周術期放射線療法の意義、日本消化器病学会 2016 年 11 月 4 日、神戸コンベンションセンター(神戸)

Ohnuma S 他、The Role of Surgical Treatments for Patients with Stage IV Colorectal Cancer、International College of Surgeons, 2016 年 10 月 25 日、京都国際会議場(京都市)

大沼 忍 他、直腸癌局所再発に対する骨盤内臓全摘術、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年 4 月 16 日、大阪国際会議場(大阪市)

Ohnuma S 他、Single-nucleotide polymorphisms of DPYD predict adverse events associated with 5-fluorouracil in patients with gastrointestinal cancer, ESMO Asia, 2015 年 12 月 18 日、シンガポール(シンガポール)

大沼 忍 他、直腸肛門部悪性腫瘍に対する腹腔鏡下直腸切断術の短期治療成績、第 28 回日本内視鏡外科学会総会、2015 年 12 月 12 日、大阪国際会議場(大阪市)

大沼 忍 他、肛門管癌に対する会陰再建術 腹直筋皮弁作成における術中 ICG 造影の有用性、日本臨床外科学会、2015 年 11 月 27 日、福岡国際会議場(福岡市)

大沼 忍 他、直腸癌局所再発に対する外科治療、第 70 回日本大腸肛門病学会学術集会、2015 年 11 月 14 日名古屋観光ホテル(名古屋)

大沼 忍 他、大腸がん手術療法の多様な視点 家族性大腸腺腫症に対する手術成績、日本癌治療学会誌、2015 年 10 月 30 日、プリンスホテル京都(京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

大沼 忍 (OHNUMA, Shinobu)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号：70451565

##### (2)研究分担者

内藤 剛 (NAITOH, Takeshi)  
東北大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：50291258

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )