

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 3 月 20 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18932

研究課題名(和文)ゲノムワイド関連解析による小児白血病の薬剤感受性に関する遺伝因子の解明

研究課題名(英文)Evaluation of genetic factors for drug sensitivity in childhood leukemia by genome wide association analysis

研究代表者

田中 庸一 (Yoichi, Tanaka)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：40525341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本人小児急性リンパ性白血病において使用される薬剤による有害事象や薬物動態の変動に関連する因子を網羅的に調べるために、小児ALL患者の治療時の臨床情報とマイクロアレイ解析で得られた遺伝子多型の情報の関連性をゲノムワイド関連解析によって検討した。維持療法で使用される6-メルカプトプリンの投与量は、患者の持つ13番染色体にコードされている、MED4やNUDT15、1番染色体にコードされるNEGR1の遺伝子多型に統計的に有意な関連性があることが明らかとなった。高用量メトトレキサート投与後の血中メトトレキサート濃度の遅延因子としてはMTHFRの遺伝子多型が関連する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia treatment is used combined several anti-cancer drugs. We analyzed the association between genetic variants and the therapy related clinical information, which are drug-induced toxicities, allergy and drug concentration, by genome wide association study (GWAS). We found that 6-MP tolerability during maintenance therapy was significantly associated with the genetic variation of MED4 and NUDT15, and NEGR1 was possible association factor of tolerability. The MTHFR variant was possible association factor of delaying methotrexate level after high dose methotrexate treatment.

研究分野：ファーマコジェネティクス

キーワード：ゲノムワイド関連解析 抗悪性腫瘍薬 小児急性リンパ性白血病 感受性 6-メルカプトプリン

1. 研究開始当初の背景

小児急性リンパ生白血病 (ALL) は小児がんの中で最も発症割合の高いがんであるが、薬物治療への感受性が高く、85%以上の5年生存率が得られている。複数の抗悪性腫瘍剤を併用し、治療は1年~2年間行われる。その中で、予後を改善する目的で6-メルカプトプリン (6-MP) とメトトレキサート (MTX) による治療が行われる。6-MP の感受性に関わる因子はこれまでに多くの報告があり、Thiopurine S-methyl transferase (TPMT) の酵素活性を低下させる遺伝子多型が感受性に影響をおよぼす遺伝要因として知られている。欧米では、TPMT の酵素活性に応じた6-MP 投与量の設定がガイドラインとして提案されている。しかし、日本人ではTPMT 活性低下の割合が約1%であり、欧米人の約8%に比べて少ない。また、TPMT 活性が欠損している患者は非常に稀である。そのため、日本人においては、TPMT 以外の要因が6-MP 感受性に及ぼす影響が多いと考えられる。

また、小児 ALL の治療で使用される薬剤によって標準的な治療を行った際に、毒性やアレルギーが発現することで、治療の中断やスケジュールの変更が必要になる場合も少なくない。そのため、欧米では毒性やアレルギーの発現や、薬物動態の変動に関連する遺伝子の検索も行われているが、日本を含むアジアからは、関連する遺伝子の報告はない。

2. 研究の目的

欧米では小児 ALL で使用する薬剤による毒性やアレルギー、薬物動態の変動に関連する遺伝子多型の探索が行われてきているが、アジアからはその様な報告がない。遺伝要因に関わる場合、人種により、遺伝子の多型頻度が異なっているため、欧米人で関連がある遺伝子多型が日本人を含むアジア人では関連性が見られないこともある。また、欧米とアジアでは、治療プロトコルが異なることから、実際に臨床で治療を行ったアジア人で発現した有害事象や臨床情報を基に、関連遺伝子を検討する必要がある。そこで本研究では、日本人小児 ALL 患者の臨床情報と患者の特性である遺伝要因の関連性を網羅的に解析するために、マイクロアレイで得られた遺伝子多型の情報をもとに、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) の手法を用いて、次のことを明らかにする。

- 1) 小児 ALL 患者の遺伝子多型が維持療法中の6-MP と MTX 投与量、副作用の発現に影響を及ぼすかを検討し、日本人に特徴的な薬剤投与量決定因子となる薬剤感受性遺伝子を明らかにする
- 2) 維持療法以外に使用される薬剤による有害事象の発現や薬物動態に影響を及ぼす因子を明らかにする
 - 2-1) L-Asp による過敏症
 - 2-2) L-Asp による重症膵炎

2-3) 高用量 MTX (HD-MTX) 投与後の MTX 薬物動態

3. 研究の方法

東京小児がん研究グループにおいて治療を行った小児 ALL 患者 527 例のマイクロアレイによる遺伝子多型解析の結果を用いて、薬剤による治療を行った際の臨床情報との関連性について、GWAS を実施した。

1) 維持療法で使用する6-MP および MTX の感受性に影響を及ぼす遺伝要因の探索
維持療法中に使用した6-MP および MTX の投与量、Grade3 以上の毒性の発現について臨床情報が得られた240例の患者を対象にゲノムワイド関連解析を行った。P < 10⁻⁵ の遺伝子多型について、異なる75例の集団でバリデーション解析を行った。

2) 維持療法以外で使用される薬剤による有害事象の発現や薬物動態の変化に関連する遺伝子多型の探索

小児 ALL の治療で主要な薬剤であるL-アスパラギナーゼ (L-Asp) に対する過敏症や投与に伴う重症膵炎との関連性について472例の患者において、GWAS を実施した。また、欧米人より報告されている遺伝子多型について、関連性を検証した。

HD-MTX 投与に伴う薬物動態の変動について、171例で検討を行った。MTX 投与開始後の MTX 濃度が高濃度で遷延する頻度や NONMEM によって薬物動態パラメータを推定し、その値との関連性について、GWAS により検討を行った。

4. 研究成果

1) 維持療法で使用する6-MP および MTX の感受性に影響を及ぼす遺伝要因

維持療法で使用する6-MP 服用量と遺伝子多型の関連性について、GWAS により線形回帰で検討を行った。P < 5 x 10⁻⁸ の遺伝子多型は13番クロモソームにコードされている *MED4* の遺伝子領域に1つの多型が該当した。また、関連性の高い候補遺伝子として P < 10⁻⁵ の遺伝子多型は162あり、その中でエクソン領域の遺伝子多型は *NEGR1*, *CCSER1*, *MLL3*, *CUX2*, *SUCLA2*, *NUDT15*, *MED4*, *SYN3* の遺伝子領域にあった。これらの遺伝子多型について、他の母集団75例でバリデーションを実施した。その結果、*MED4*, *NUDT15* および *NEGR1* の遺伝子多型については、統計的に有意な関連性がみられた (P < 0.001)。さらに、GWAS を実施した母集団とバリデーションを実施した母集団を合わせて、関連性について統計解析を行ったところ、P < 10⁻⁸ であり、有意差のある関連性がみられた。*MED4* は MEDIATOR COMPLEX SUBUNIT 4 をコードする遺伝子であり13番クロモソームにある。*MED4* の遺伝子多型の多くは *NUDT15* 遺伝子多型と連鎖不均衡の関係にある。近年、*NUDT15* 遺伝子多型については6-MP の感受性や投与量との関連性が報告されている。*NUDT15* は NUDIX

HYDROLASE 15 酵素をコードしている遺伝子であり、リン酸化された 6-MP 代謝物を基質として、脱リン酸化する酵素である。そのため、6-MP の効果発現に大きな影響を及ぼす。そのため、*NUDT15* 遺伝子多型を持つ場合に *MED4* の遺伝子多型を同時に持ち、関連性が高くなっていると考えられる。*NGFR1* は、神経成長因子の受容体の遺伝子であるが、肥満との関連性が報告されている遺伝要因である。6-MP 投与を受けている患者の体組成が薬物動態に影響を及ぼしている可能性があると考えられるが、今後、さらに検討を重ねる必要があると考えられる。一方で、GWAS では欧米人において 6-MP の感受性に関連する遺伝子多型である *TPMT* 遺伝子多型は統計的に有意な関連性はなかった。そのため、人種によって遺伝子多型頻度が異なることから、主要な関連因子が異なると考えられる。

維持療法中に発現した Grade4 以上の白血球減少や肝機能障害 (ALT 上昇) との関連性について GWAS により logistic 解析を行ったが、 $P < 10^{-8}$ となる統計的に有意な関連した遺伝要因は明らかにならなかった。これは、6-MP および MTX の投与量調節が治療を担当する担当医に委ねられており、Grade4 に至る前に調節が行われていた可能性があることが、明確に差が見られなかった可能性がある。

2) 維持療法以外で使用される薬剤による有害事象の発現や薬物動態の変化に関連する遺伝子多型

2-1) L-Asp による過敏症

小児 ALL において、L-Asp の投与に伴う過敏症の発現に関連する遺伝子多型の解析を 472 例について評価を行った。47 例が L-Asp 投与に伴い過敏症 (皮膚の紅斑や呼吸抑制等) を発現していた。L-Asp による過敏症の発現に関連する遺伝子多型の探索を GWAS により logistic 解析の手法で行った。 $P < 10^{-8}$ となるような統計的に有意な遺伝子多型は見つからなかった。 $P < 10^{-5}$ の遺伝子多型としては、*KCNQ5*, *ALDH1L1*, *STX18*, *NTM*, *RBFOX1*, *GPR176*, *EIF2AK4* の遺伝子多型があったが、過敏症やアレルギー反応の発現に関連する遺伝子多型は含まれていなかった。そのため、欧米より L-Asp のアレルギーに関連がある *NFATC2* について、関連性を検討した。*NFATC2* rs6021191 のホモ多型を持つことで、アレルギーの頻度は 30%と、野生型の 10%に比べて高くなっている傾向があったが、統計的に有意な差はなかった。

今後、症例数を増やして検討するとともに、各遺伝子の機能より可能性があるものについて、過敏症に関わる機能解析を行っていく必要があると考えられる。

2-2) L-Asp による重症膵炎

L-Asp の投与に伴う過敏症の発現に関連する遺伝子多型の解析を 474 例について評価を行った。10 例が L-Asp 投与に伴い重症膵炎を

発現していた。L-Asp による重症膵炎の発現に関連する遺伝子多型の探索を GWAS により logistic 解析の手法で行った。 $P < 10^{-8}$ となるような統計的に有意な遺伝子多型は見つからなかった。 $P < 10^{-5}$ の遺伝子多型としては、*PLD5*, *TENM2*, *SNX30*, *CYP46A1*, *DNAH9*, *PRKG1*, *COBL*, *RAP1GAP2*, *VPS13D*, *DEPTOR* の遺伝子多型があったが、膵炎や膵疾患の発現に関連する遺伝子多型は含まれていなかった。重症膵炎に関連する遺伝子多型は欧米から *CPK2* が報告されているが、多型頻度が非常に低く、今回の症例には含まれていなかった。今後、全ゲノム解析を行い、多型頻度が低い遺伝子多型を含めた発現に関連する遺伝子多型を探索する必要がある。

2-3) HD-MTX 投与後の MTX 薬物動態

HD-MTX 投与時の MTX 薬物動態を変動させる遺伝要因について、MTX を 24 時間持続点滴にて投与された 184 例 (540 コース) において、検討を行った。MTX 投与開始後、48 時間後、72 時間後の MTX 濃度遷延が毒性発現と関連するため、临床上の問題であり、その有無に関連する遺伝要因について、GWAS にて logistic 解析を行った。その結果、 $P < 10^{-8}$ となる遺伝子多型は存在しなかった。症例数が少ないことも影響するため、これまでに報告されている遺伝子多型を候補遺伝子として関連性の有無を検討したところ、*MTHFR* rs1801131 に遺伝子多型を持つことで、投与開始 72 時間後の MTX 濃度遷延の頻度が高くなっていた ($P = 1.1 \times 10^{-5}$)。

また、小児 ALL における HD-MTX 投与後の MTX 体内動態を明らかにするために、MTX を 24 時間で投与した患者で、投与後に 2 回以上、MTX 濃度測定を行った患者について、MTX 薬物動態パラメータを母集団薬物動態解析を行うソフトウェアである NONMEM7 を用いて推定し、薬物動態パラメータの変動と遺伝子多型の関連性を GWAS により線形回帰分析で解析した。その結果、*MTHFR* rs1801131 に遺伝子多型を持つことでパラメータが有意に変動していることが明らかとなった ($P = 0.0003$)。

候補遺伝子の検討として、HD-MTX 後の MTX 薬物動態に影響を及ぼす因子として *MTHFR* の遺伝子多型が関連のある因子であることが明らかとなった。*MTHFR* は葉酸の代謝に関連する酵素であり、MTX の薬物動態に直接的に影響を与える因子ではないと考えられる。今後、さらに検討を行い、*MTHFR* の MTX 薬物動態に及ぼす影響について、解明していきたいと考える。

以上、本研究において日本人小児 ALL を対象にして、治療中に用いられる抗がん薬の中で、有害事象により治療の中断や投与量の調節が行われる 6-MP、MTX、L-Asp について、有害事象の発現に関連する遺伝要因の検討を GWAS により行った。今回の検討では GWAS

で統計的有意差のある $P < 10^{-8}$ となる遺伝要因は有害事象においては見られなかった。特に HD-MTX による MTX 濃度の遷延や L-asp によるアレルギーや膀胱炎については、発現頻度が低いため、今回の症例数では統計的に有意差が得られなかったものと考えられる。今後、症例数を増やし検討する必要がある。統計的に有意差は得られないものの、 $P < 10^{-5}$ と傾向が見られた因子については、異なる母集団において、バリデーションを実施し、臨床的意義を確認する予定である。

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 1 件)

Tanaka Y, Nakadate H, Kondoh K, Nakamura K, Koh K, Manabe A. Interaction between NUDT15 and ABCC4 variants enhances intolerance of 6-mercaptopurine in Japanese patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics Journal*, 査読有, 18, 275-280, 2018

〔学会発表〕(計 7 件)

田中庸一ら. NUDT15 ハプロタイプの 6-メルカプトプリン感受性への影響, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年.

田中庸一ら. 高用量メソトレキセート療法におけるメソトレキセート濃度に影響を与える遺伝要因の検討, 第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2017 年.

田中庸一ら. 小児急性リンパ性白血病患者における高用量メソトレキセート投与後の血中濃度に影響を与える因子の検討, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年.

田中庸一ら. 日本人小児 ALL の L-アスパラギナーゼアレルギー発現における NFATC2 rs6021191 多型の影響, 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2016 年.

Yoichi Tanaka et al. The association between L-asparaginase hypersensitivity and genetic variants in Japanese childhood ALL patients, 58th ASH annual meeting, 2016 年.

Yoichi Tanaka et al. Homozygous NUDT15 variant caused severe 6MP-induced myelotoxicity in a 4-year-old girl with ALL, 第 77 回日本血液学会学術集会, 2015 年.

Yoichi Tanaka et al. Susceptibility to 6-MP toxicity related with NUDT15 and MRP4 variants in Japanese childhood ALL, 第 77 回日本血液学会学術集会, 2015 年.

〔その他〕

ホームページ等

北里大学研究者情報管理システム

<http://kerid-web.kitasato-u.ac.jp/Profile/43/0004288/profile.html?lang=ja#ronb>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 庸一 (TANAKA, Yoichi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号: 40525341