

機関番号：34521  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20790135  
 研究課題名（和文） 網羅的遺伝子多型解析に基づく小児白血病化学療法時の副作用発現の予測と機序解明  
 研究課題名（英文） Genetic polymorphisms to analyze and predict treatment-related adverse effects in children with acute lymphoblastic leukemia  
 研究代表者  
 中村 任 (NAKAMURA TSUTOMU)  
 姫路獨協大学・薬学部・教授  
 研究者番号：80379411

研究成果の概要（和文）：小児急性リンパ性白血病（ALL）に対しては、プロトコールに従い化学療法を行うものの、抗がん剤に起因する重篤な副作用がしばしば認められる。本研究では、ALL 維持療法中の患者を対象として、重篤な肝障害発現と関連する遺伝子多型について網羅的に解析を行った。その結果、肝障害発現との関連性を認めた遺伝子座 28 カ所を同定した。このうち、Rho GTPase-activating protein 24 (ARHGAP24) 遺伝子上に存在する rs1966862 は肝障害発現と最も関連性が高く、RAS guanyl releasing protein 1 (RASGRP1) rs7403531 遺伝子多型などにも肝障害発現と関連性する遺伝子多型の存在を認めた。これら遺伝子多型および関連遺伝子の機能解析が小児 ALL 維持化学療法中の肝障害発現を予測する上で有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）： Some children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) or lymphoblastic lymphoma (LBL) experience clinically important treatment-related adverse effects. In the present study, to identify novel potential loci influencing the risk of treatment-related hepatotoxicity during the maintenance phase, a genome-wide genotyping analysis was performed in Japanese children with ALL or LBL. Genome-wide genotyping uncovered a total of 28 candidate SNPs. rs1966862, in Rho GTPase-activating protein 24 (ARHGAP24), was the most significant of the candidates, and the genotypes of rs7403531 (RASGRP1) and some genes were also significantly associated with severe hepatotoxicity. This study suggested rs1966862 (ARHGAP24) and the other SNPs to be predictive factors for drug-induced hepatotoxicity during the maintenance phase in pediatric patients with ALL or LBL.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 薬学・医療系薬学

キーワード： オーダーメイド医療

## 1. 研究開始当初の背景

| (1) 急性リンパ性白血病（ALL）は、小児で

最も多く認められる白血病の一つであり、化学療法や骨髄移植による治療が行われている。化学療法では、数種類の抗がん剤やステロイド剤などを組み合わせた多剤併用療法が行われ、80%以上の奏功率を示す。一方で、プロトコールに従い治療を行うものの、抗がん剤に起因する重篤な肝機能障害や血液毒性などの副作用がしばしば認められ、その程度は患者個々に大きく異なることから、個人差を考慮した副作用の発現予測ならびにその発現メカニズムの解明が ALL 治療を進めていく上で極めて重要である。

(2) 抗がん剤の有効性や副作用に関しては、薬物の血中濃度との関連性が強く示唆されており、副作用発現の予測を行う上で薬物の体内動態規定因子の解析は必須である。近年、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターといった薬物の体内動態規定タンパク質をコードする遺伝子に多数の遺伝的多型が存在することが明らかとされ、化学療法の奏功性や副作用の発現頻度や重篤度などの個体差を規定する因子として注目されている。ALL 治療で使用される薬剤の薬物動態関連遺伝子にも遺伝子多型の存在が多数報告されているものの、ALL 化学療法の副作用発現との関連解析は十分に行われていない。

(3) 国際 HapMap プロジェクトの成果やそれを応用した網羅的遺伝子多型解析システムを利用することによって、従来の遺伝子多型に基づく薬物治療の患者個別化に関する研究を発展させることができると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 小児 ALL 治療患者を対象として薬物動態関連遺伝子の多型解析に基づく副作用発現マーカー（遺伝子座）の同定を行う。

(2) 網羅的遺伝子多型解析に基づく副作用発現マーカー（遺伝子座）の同定を行う。

(3) 培養細胞系を用いて副作用発現予測マーカー関連遺伝子が細胞機能に与える影響について明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 書面により同意の得られた患者について副作用情報の収集を行う。副作用としては、重度肝障害に焦点をあて、肝障害の指標として ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ) 活性を用いる。National cancer Institute-Common Toxicity (NCI-CTC) ver. 2.0 基準に基づき重症度を判断し、治療期間中に Grade 3 以上の肝障害が生じた患者を「肝障害群」として、肝障害が発現しなかった患者を「対照群」とする。対象患者のゲ

ノム DNA について、薬物動態関連遺伝子の多型解析を行う。

(2) 対象患者のうち「肝障害群」と「対照群」の同数症例について網羅的遺伝子解析を行い、両群間で明確な差を認めた遺伝子座を副作用発現予測の候補マーカーとする。また、候補マーカーについて、他の遺伝子型判定法を用いることや追加症例に対して遺伝子型判定を行うことによって結果を検証する。

(3) National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベース dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) を利用し、候補マーカーと連鎖する遺伝子型、特に、アミノ酸置換を伴う遺伝子多型およびフレームシフトを引き起こす遺伝子多型について検討を行う。

(4) 候補マーカーについて、細胞系における遺伝子型ならびに対象遺伝子の発現について検討を行う。

## 4. 研究成果

(1) 常法に従い対象患者におけるゲノム DNA を抽出した後、既報を元に ALL 化学療法時に使用される薬物動態関連因子のうち抗がん剤の有効性や安全性との関連性が示唆されている遺伝子多型 (*GSTT1* positive/null, *GSTMI* positive/null, *GSTP1* A313G (rs1695)), *RFC1* G80A (rs1051266), *MTHFR* C677T (rs1801133), *breast cancer resistant protein (BCRP)* C421A (rs2231142) の解析を行った。24 名の対象患児について遺伝子多型の発現頻度は過去に報告されたデータと同様のものであった。しかしながら、維持療法中に発現する重度肝障害との関連性を示唆する遺伝子多型は検出されなかった。

(2) ALT の最高値が 536-3182 IU/L の範囲にある肝障害群から 4 名を、対照群から 4 名を対象として DNA チップ (Illumina Infinium HumanHap300) を用いた網羅的遺伝子多型解析を行った。定めた基準に従い、8 名の網羅的遺伝子多型解析の結果、28 カ所の候補遺伝子座を同定した (Table)。このうち、*ARHGAP24* (rs1966862) と *DMD* (rs5927825, rs741934, rs2047373) 遺伝子多型では、肝障害の発現においてその多型発現頻度に明らかな差を認めた。候補遺伝子多型について対象患児 16 名分の DNA を用いて追加解析を進めたところ、*ARHGAP24* rs1966862 と肝障害発現との間に統計学的に有意な関連性が認められ、この対立遺伝子をホモ接合で有する 6 名の患児すべてにおいて重度の肝障害が発現していた ( $P = .009$ , Table)。他方、3 カ所の遺伝子多型 (rs5927825, rs741934, rs2047373) は

ジストロフィン遺伝子 (*DMD*) 上に存在し、重度の肝障害発現との間に有意な差は認められなかった。したがって、*ARHGAP24* rs1966862 遺伝子多型の関連解析は、小児 ALL に対する維持療法中の肝障害発現予測を行う上での有用な基礎的情報を与えるものと考えられた。

(3) rs1966862 遺伝子多型の近傍に存在する遺伝子あるいは遺伝子多型が重度の肝障害発現と関連している可能性があるため、公的データベースを利用してハプロタイプ代理 (代表) マーカーを選定した。rs1966862 近傍の *ARHGAP24* 遺伝子上に存在するアミノ酸置換を伴う遺伝子多型 (rs36067390, rs35521695) およびフレームシフトを引き起こす遺伝子欠損 (rs35047755) について、また、*ARHGAP24* 遺伝子の近傍領域に存在する *SLC10A6* 遺伝子や *PTPN13* 遺伝子のアミノ酸置換を伴う多型 (rs13106574, rs17694522, rs989902, rs2230600) について、遺伝子型発現頻度を肝障害群と正常群で比較検討したところ、rs36067390, rs35521695, rs35047755, rs13106574 および rs17694522 遺伝子多型については変異アレルが検出されず、また、rs989902 や rs2230600 については肝障害発現との有意な相関を認めなかった。したがって、検討した 7 カ所の遺伝子多型が肝障害と関連する可能性は低いことが明らかとなった (Table)。

(4) 残る候補遺伝子座 17 カ所のうち、14 カ所の遺伝子座はアミノ酸置換を伴わない既知の遺伝子上に存在する多型であり、3 カ所は未知の遺伝子上に存在するものであった。このうち rs13424027, rs1156304, rs10255262, rs381423 および rs7403531 についてはその遺伝子型発現頻度および変異アレル発現頻度ともに重度の肝障害発現との間に有意な相関を認め、rs7601117, rs4701693, rs2227744 および rs167772 に関しては変異アレルの発現頻度において肝障害との有意な相関を認めた。一方、NCI-CTC 基準によって肝障害を定義した場合には rs13424027, rs1156304 および rs2058965 の変異アレル発現頻度において有意な相関を認めた。

(5) 14 種類のヒト癌由来培養細胞より抽出した DNA を対象として候補遺伝子多型について解析を行ったところ、*RASGRP1*、*PARD3B*、*ARHGAP24* の順に多型の発現頻度は小さかった。一方、HepG2 細胞などの肝由来細胞では多型を認めず、多型が遺伝子の安定性に与える影響を考慮せずに薬剤感受性を評価できる細胞系と考えられた。

(6) HeLa 細胞をモデル細胞として *ARHGAP24* 発現を mRNA レベルで解析したところ、

**Table.** Association of candidate genetic polymorphisms in the whole genome with severe hepatotoxicity

SNP	Symbol	Chr. <sup>b</sup>	Severe hepatotoxicity <sup>a</sup>		P <sup>c,d</sup>
			No (N=12)	Yes (N=12)	
rs1966862 (AA/AG/GG)	<i>ARHGAP24</i>	4	0/6/6	6/5/1	<i>.009</i>
rs5927825	<i>DMD</i>	X			
Boys (T/C)			4/2	2/3	n.s.
Girls (TT/TC/CC)			3/2/1	2/3/2	n.s.
rs741934	<i>DMD</i>	X			
Boys (C/T)			5/1	3/2	n.s.
Girls (CC/CT/TT)			3/2/1	4/3/0	n.s.
rs2047373	<i>DMD</i>	X			
Boys (T/C)			4/2	2/3	n.s.
Girls (TT/TC/CC)			3/2/1	2/3/2	n.s.
rs13424027 (CC/CT/TT)	<i>PARD3B</i>	2	0/0/12	3/3/6	<i>.014</i>
rs1156304 (AA/AC/CC)	<i>KCNIP4</i>	4	2/3/7	7/4/1	<i>.027</i>
rs10255262 (AA/AG/GG)	<i>SLC13A1</i>	7	4/5/3	1/1/10	<i>.024</i>
rs381423 (GG/GAAA)	unidentified	10	2/6/4	7/5/0	<i>.031</i>
rs7403531 (CC/CT/TT)	<i>RASGRP1</i>	15	7/5/0	3/4/5	<i>.033</i>
rs7601117 (GG/GAAA)	<i>TCF7L1</i>	2	4/4/4	9/2/1	n.s.
rs14701693 (GG/GAAA)	<i>ADAMTS16</i>	5	8/2/2	2/4/6	n.s.
rs989073 (AA/AC/CC)	<i>ITGA2</i>	5	1/7/4	4/5/3	n.s.
rs4704356 (AA/AC/CC)	<i>IQGAP2</i>	5	5/3/4	1/4/7	n.s.
rs2227744 (GG/GAAA)	<i>F2R</i>	5	3/4/5	6/6/0	n.s.
rs167772 (CC/CT/TT)	<i>AARS2</i>	6	8/3/1	3/4/5	n.s.
rs2058965 (GG/GAAA)	unidentified	7	1/6/5	5/5/2	n.s.
rs1080333 (AA/AG/GG)	<i>KCNB2</i>	8	3/4/5	6/5/1	n.s.
rs1343452 (CC/CA/AA)	<i>LINGO2</i>	9	0/4/8	4/3/5	n.s.
rs2393596 (CC/CA/AA)	<i>ANK3</i>	10	0/7/5	3/2/7	n.s.
rs1377003 (AA/AG/GG)	<i>NELL2</i>	12	4/1/7	3/6/3	n.s.
rs5907206	unidentified	X			
Boys (A/C)			2/4	2/3	n.s.
Girls (AA/AC/CC)			3/2/1	1/3/3	n.s.
rs35047755 (deletion +/-)	<i>ARHGAP24</i>	4	12/0	12/0	n.s.
rs35521695 (CC/CG/GG)	<i>ARHGAP24</i>	4	12/0/0	12/0/0	n.s.
rs36067390 (GG/GAAA)	<i>ARHGAP24</i>	4	12/0/0	12/0/0	n.s.
rs13106574 (TT/TC/CC)	<i>SLC10A6</i>	4	12/0/0	12/0/0	n.s.
rs17694522 (GG/GAAA)	<i>SLC10A6</i>	4	12/0/0	12/0/0	n.s.
rs989902 (AA/AC/CC)	<i>PTPN13</i>	4	5/6/1	4/4/4	n.s.
rs2230600 (AA/AG/GG)	<i>PTPN13</i>	4	7/4/1	4/5/3	n.s.

<sup>a</sup> Severe hepatotoxicity was defined as an elevation of the maximum ALT level of  $\geq 300$  IU/L.

<sup>b</sup> Chr.: Chromosome.

<sup>c</sup> Significant differences are indicated with italicized face and an asterisk.

<sup>d</sup> n.s.: not significant.

*ARHGAP24* mRNA には 3 種類の variant が検出された。このうち、variant 1 の発現量が最も高く、以下、variant 3、variant 2 の順に発現が低かった。遺伝子多型によっては mRNA のスプライシング過程に影響を与えている可能性があり、遺伝子多型とこれら variant の発現量の比、また、各 variant の発現量と抗がん剤感受性について検討することによって ALL 治療薬剤に起因する重篤な肝障害発現機構の解明に繋がるものと考えられた。

## 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 7 件)

- ①T. Nakamura, 他, Effects of *ABCB1* 3435C>T genotype on serum levels of cortisol and aldosterone in women with normal menstrual cycles. *Genet Mol Res.*, 査読有, volume 8, 2009, pp.397-403.
- ②A. Kuwahara, T. Nakamura, 他, Replacement of cisplatin with nedaplatin in a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci.*, 査読有, volume 6, 2009, pp.305-311.
- ③A. Kuwahara, T. Nakamura, 他, Effect of dose-escalation of 5-fluorouracil on circadian variability of its pharmacokinetics in Japanese patients with Stage III/IVa esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci.*, 査読有, volume 7, 2010, pp.48-54.
- ④A. Kuwahara, T. Nakamura, 他, TNFRSF1B A1466G genotype is predictive of clinical efficacy after treatment with a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.*, 査読有, volume 29, 2010, p.100.
- ⑤M. Horinouchi, T. Nakamura, 他, Association of Genetic Polymorphisms with Hepatotoxicity in Patients with Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia or Lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol.*, 査読有, volume 27, 2010, pp.344-354.
- ⑥M. Yagi, T. Nakamura, 他, Effect of *CPS1* 4217C>A genotype on valproic acid-induced hyperammonemia. *Pediatr Int.*, 査読有, volume 52, 2010, pp.744-748.
- ⑦M. Yagi, T. Nakamura, 他, *VEGF* 936C>T is Predictive of Threshold Retinopathy of Prematurity in Japanese Infants with a 30 weeks Gestational age or less. *Res Rep Neonatol.*, 査読有, volume 1, 2011, pp.5-11.

[学会発表] (計4件)

- ①堀之内正則, 中村任, 他, 小児リンパ性白血病患者における肝障害発現関連 SNP の網羅的探索. 第29回日本臨床薬理学会年会, 2008年12月6日, 東京・京王プラザホテル.
- ②M. Horinouchi, T. Nakamura, 他, Genetic polymorphisms associated with hepatotoxicity in patients with Japanese childhood leukemia. 第2回次

- 世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2008年12月21日, 京都・京都大学薬学部.
- ③中村任, 食道癌化学放射線療法における患者個別化への取り組み, 第6回九州山口薬学会ファーマシューティカルケアシンポジウム, 2009年2月15日, 熊本・崇城大学市民ホール.
- ④D. Yamasaki, T. Nakamura, 他, Effects of acid and lactone forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on the induction of MDR1 expression and function in LS180 cells. 日本薬物動態学会第24回年会, 2009年11月27日, 京都・京都国際会館

[図書] (計1件)

- ①中村任, 他, 「製剤学・物理薬剤学 (柴崎正勝, 赤池昭紀, 橋田充 監修, 柴田敏之, 唐澤健, 岡本浩一 編集)」, 廣川書店, pp.251-265, 2009.

[その他] (計1件)

- ①中村任, 遺伝子多型に基づく ALL 化学療法時の副作用発現予測. 薬学研究の進歩, 査読無, volume 27, 2011, pp.91-96.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 任 (NAKAMURA TSUTOMU)  
姫路獨協大学・薬学部・教授  
研究者番号: 80379411