

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09743

研究課題名(和文) 薬剤性難聴の感受性遺伝子検索による個人差および発症機序の解明

研究課題名(英文) Identification of susceptibility genes to elucidate the pathogenesis of drug-induced hearing loss.

研究代表者

守本 倫子 (MORIMOTO, NORIKO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・小児外科系専門診療部・診療部長

研究者番号：40286555

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)：本研究では、小児固形腫瘍の治療に対して広く使用されている白金製剤で生じる難聴の原因について検討することを目的とした。同じ条件で白金製剤を使用しても難聴の程度に個人差があり、その原因が遺伝子多型に関連するのではないかと考えた。そこで白金製剤使用と難聴誘発の有無、海外で報告されている白金製剤に対する薬剤感受性遺伝子多型(TPMT, COMR, ACYP2)の有無について解析を行った。小児例123例のうち、TPMTは4人(難聴あり)とACYP2が6人(難聴あり2人)に認められ、ロジスティック回帰分析モデルでは遺伝子多型+薬剤投与量+低年齢が最も難聴に関連していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年は化学療法後の生存率も高くなり、治療後の社会生活を豊かに過ごすことが求められているものの、白金製剤による難聴のために生活に支障をきたすことも少なくない。難聴の程度にも個人差が明らかであるため、本研究では難聴の原因が遺伝子多型に関連するのではないかと考えた。結果として遺伝子多型があり、低年齢で薬剤投与量も多かった場合に難聴の危険性が高まることが明らかになった。この結果は将来を見据えて、治療として化学療法の選択をする際に資するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the etiology of hearing loss caused by platinum agents, which are widely used in the treatment of pediatric solid tumors. Hearing loss varied among individuals even when platinum drugs were used under the same conditions, and we hypothesized that the cause of hearing loss might be related to genetic polymorphisms. We analyzed the use of platinum drugs, the presence or absence of hearing loss induction, and the presence of drug susceptibility polymorphisms (TPMT, COMR, ACYP2) reported in other countries. Among 123 pediatric patients, TPMT was found in 4 patients (with hearing loss) and ACYP2 in 6 patients (2 with hearing loss), and the logistic regression analysis model suggested that gene polymorphism + drug dosage + younger age were most associated with hearing loss.

研究分野：小児難聴

キーワード：薬剤感受性遺伝子 シスプラチン難聴

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児固形腫瘍に対する化学療法で使用される白金製剤(シスプラチン、カルボプラチン)は、特に小児に使用されることで難聴をきたしやすいことが知られている。しかし、我々の先行研究でも、80例中33例のみ難聴が発症するなど同じ用法、用量で投与されているにもかかわらず、聴力が変化しない例もあれば高度難聴を来す例もあるなど個人差があり、その発症は予測が不可能である。小児の内耳は薬物などの影響を強く受けやすいことは知られており、特にアミノグリコシド系の薬物など一部の薬物に対する感受性が異なるために難聴になる症例があることがわかっている。すでに、海外では薬剤に対する感受性が遺伝的な要因が関係していることが指摘されており、近年の報告では、S-methyltransferase (TPMT)、catechol O-methyltransferase (COMT)、といった蛋白や酵素に関係した遺伝子多型が関係しているのではないかとの報告もある。日本人はより白金製剤による耳毒性の影響を受けやすいという報告もあることから、人種なども含めた遺伝的要因やそのほかの環境要因が複数関わることで難聴が生じている可能性は高い。これらを解析することにより白金製剤による難聴発症機序の解明が可能となり、治療方法の開発につながることも期待できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、小児固形腫瘍に対して使用される白金製剤(シスプラチン、カルボプラチン)による難聴発症に寄与する原因を検索し、さらに個人差を生じさせている難聴感受性遺伝子(遺伝子多型)を明らかにする。まず海外で報告されているTPMT、COMT、ACYP2を検索し、その後他に関連していると考えられる遺伝子多型を検索する。それにより、白金製剤による難聴発症のリスクを明らかにし、薬剤副作用による難聴を併発する可能性を最小限にとどめたオーダーメイドの化学療法を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

検査方法:

対象

2010年から2023年に小児医療センター(成育医療センター、千葉こども病院、静岡こども病院、兵庫こども病院)に通院し、肝芽腫、髄芽腫、網膜芽細胞腫、胚細胞腫瘍および神経芽細胞腫などの小児固形腫瘍のためになどのシスプラチンやカルボプラチンなどの白金製剤を用いて化学療法を行った18歳以下の小児128例を対象とした。書面による同意を得て2mlの採血により検体採取した。

収集した情報

患者の情報は性別、年齢、腫瘍の種類、白金製剤(シスプラチン、カルボプラチン)の積算使用量、頭蓋内照射、その他の耳毒性薬物の使用、聴力検査結果について解析を行った。治療内容が不明瞭な場合や聴力評価が不完全な場合、および外耳や中耳にototoxicity以外に聴力に影響する要因がある場合などは本研究から除外した。

聴力評価

初回のcisplatinが投与される前の聴力と3回または5回の投薬クールが終了直後に聴力検査を行った。聴力変動はCHANG分類を用いて評価を行った。

DNA抽出

患者および両親の血液または唾液を採取した。末梢血からQIAamp DNA Mini Kitを用いてgDNAを抽出した(QIAGEN)。プレートgDNAとして10ngを用い、プライマー最終濃度2μM、TAKARA ExTaq (TAKARA)でPCR増幅反応を行った(Denature; 94、40秒、アニーリング; 60、40秒、伸長反応; 72、60秒、34サイクル)。PCR産物をアガロースゲルにて確認後、ダイレクトシーケンスによりジェノタイプを確認した(ABI3130)。

多型解析

海外で感受性に関わる可能性が報告されている遺伝子多型(ACYP2, COMT, TPMT, LRP2)について、日本人一般集団での多型頻度の調査も含め、関連性の検討を行う。全例について次世代シーケンサー、マイクロアレイ(ジャポニカアレイなど)等を用いて、感受性候補遺伝子全長(全領域)の多型解析、網羅的多型タイピングを行う。これら多型における、易感受性との関連解析を行った。次世代シーケンサーで判明した多型については、一般集団での頻度調査も行った。

臨床情報を用いた解析:

難聴を生じた群と聴力正常の群にわけ、認められた遺伝子多型、固形腫瘍の種類、治療方法の違

Gene	Target	Forward primer	Reverse primer	MgCl
COMT	rs9332377	GATGTCAGAACTGACCCCA	TCTCAGAGTATCCATCCCTTAGA	1
TPMT	rs12201199	TTTGGGAGCTAACCAAGACAAA	TTGGGGAACATTCATTGTACT	1.
ACYP2	rs1872328	TCACGGTTCATGTGGCTTT	GAGCCTCATTCATCCATTT	1.

いについて関連を検討した。

4. 研究成果

128 例中 ACYP2, COMT, TPMT の発現が認められたのはそれぞれ 6 例、0 例、4 例のみであった。遺

伝子多型が認められた 10 例は全例軽度以上の難聴が認められた。この 3 つの遺伝子多型を日本人が有する頻度は表のとおりであり、海外に比較して日本人における発

現頻度は非常に少ないものであった。難聴あり (HL) と難聴なし (NHL) に分け、遺伝子多型の有無と 6 つの危険因子が 1 つ

または 2 つ関連したときの難聴発症の予測モデルの当てはまりの良さを示す pseudoR² およびモデルの予測能を示す ROC-

AUC(Receiver Operating Characteristic-Area Under Curve)をロジスティック回帰分析により検討を行った。その結果、遺伝子多型または 6 つの危険因子それぞれを変数とした場合、遺伝子多型の有無と 6 つの危険因子の 2 つを変数した場合、遺伝子多型の有無 + シスプラチン投与量 + 化学療法を行った月齢の 3 つを変数とした場合、とで検討したところ、Cross Validation ROC-AUC はどれも非常に低く、1 つの変数では CDDP 投与量が多かった場合のみ、2 つの変数でも遺伝子多型があつて CDDP 投与量が多

かった場合のみでようやく、0.612, 0.617 とかろうじて 0.6 をこえる予測性能が認められた。しかし、0.8 以下であるため、予後予測モデルの性能としても十分とは言えない結果であった。遺伝子多型があり、CDDP 投与量が多く、さらに化学療法の年齢を変数として検討したところ、0.660 (95%CI: 0.476-0.843) と予測性能は最も上昇した。

海外で報告されている遺伝子多型はすべて総人口内で 20%以上に認められているものであるが、日本人やアジア人では非常に低い頻度で認められるものである。本研究で遺伝子多型が原因として強くなかつた理由はこうした人種差によるものが多く関係していると考えられた。現在他の遺伝子多型も検索しており、関連している可能性のある多型はいくつか挙げられているものの、N 数がまだ足りないことと、機能解析が必要なことから明らかにはできていない。これについては今後さらに検討が必要と考えている。

	一般	日本人	欧州	米国	アフリカ	東アジア
ACYP2 (rs1872328:A)	0.072	0.014	0.039	0.043	0.199	0.011
TPMT (rs12201199:T)	0.163	0.019	0.049	0.12	0.484	0.023
COMT (rs9332377:T)	0.172	0.00	0.151	0.127	0.361	0.003

各遺伝子多型の日本人における頻度 (1000 ゲノム解析)

Model No.	Risk factor	Pseudo-R ²	ROC-AUC (95%CI)	CV ROC-AUC (95%CI)
1	TPMT/ACYP2 + Chemo age	0.038	0.542 (0.375-0.708)	0.479 (0.324-0.635)
2	TPMT/ACYP2 + Sex	0.025	0.532 (0.404-0.661)	0.472 (0.350-0.593)
3	TPMT/ACYP2 + Cisplatin dose	0.079	0.651 (0.505-0.798)	0.617 (0.429-0.805)
4	TPMT/ACYP2 + Carboplatin dose	0.040	0.588 (0.466-0.710)	0.519 (0.377-0.662)
5	TPMT/ACYP2 + Radiation	0.027	0.553 (0.417-0.689)	0.469 (0.331-0.607)
6	TPMT/ACYP2 + Renal dysfunction	0.030	0.547 (0.474-0.620)	0.517 (0.434-0.601)
7	TPMT/ACYP2 + Chemo age + Sex	0.038	0.454 (0.288-0.619)	0.481 (0.314-0.648)
8	TPMT/ACYP2 + Chemo age + Cisplatin dose	0.124	0.712 (0.568-0.855)	0.660 (0.476-0.843)
9	TPMT/ACYP2 + Chemo age + Carboplatin dose	0.067	0.640 (0.478-0.801)	0.544 (0.358-0.730)
10	TPMT/ACYP2 + Chemo age + Radiation	0.038	0.542 (0.375-0.708)	0.456 (0.288-0.624)
11	TPMT/ACYP2 + Chemo age + Renal toxicity	0.042	0.442 (0.279-0.605)	0.496 (0.336-0.657)
12	TPMT/ACYP2 + Sex + Cisplatin dose	0.080	0.649 (0.501-0.798)	0.591 (0.403-0.778)
13	TPMT/ACYP2 + Sex + Carboplatin dose	0.040	0.442 (0.287-0.597)	0.474 (0.317-0.632)
14	TPMT/ACYP2 + Sex + Radiation	0.027	0.556 (0.409-0.704)	0.442 (0.288-0.596)
15	TPMT/ACYP2 + Sex + Renal toxicity	0.030	0.539 (0.408-0.670)	0.479 (0.350-0.608)
16	TPMT/ACYP2 + Cisplatin dose + Carboplatin dose	0.080	0.639 (0.488-0.790)	0.576 (0.395-0.757)
17	TPMT/ACYP2 + Cisplatin dose + Radiation	0.088	0.653 (0.506-0.799)	0.580 (0.403-0.758)
18	TPMT/ACYP2 + Cisplatin dose + Renal toxicity	0.079	0.653 (0.506-0.800)	0.598 (0.407-0.788)
19	TPMT/ACYP2 + Carboplatin dose + Radiation	0.046	0.637 (0.499-0.775)	0.488 (0.322-0.655)
20	TPMT/ACYP2 + Carboplatin dose + Renal toxicity	0.044	0.610 (0.483-0.738)	0.525 (0.367-0.684)
21	TPMT/ACYP2 + Radiation + Renal toxicity	0.032	0.555 (0.417-0.693)	0.465 (0.325-0.606)

難聴危険因子についてのロジスティック回帰分析モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yanagi Kumiko, Morimoto Noriko, Iso Manami, Abe Yukimi, Okamura Kohji, Nakamura Tomoo, Matsubara Yoichi, Kaname Tadashi	4. 巻 66
2. 論文標題 A novel missense variant of the GNAI3 gene and recognisable morphological characteristics of the mandibula in ARCND1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-021-00915-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 守本倫子
2. 発表標題 小児難聴診療と多職種連携
3. 学会等名 耳鼻咽喉科臨床学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 守本倫子
2. 発表標題 小児の急性感音難聴－診断と治療
3. 学会等名 第31回日本耳科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 松本 公一、富澤 大輔、石黒 精	4. 発行年 2022年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 280
3. 書名 明日から使える！小児がん治療のオキテ有害事象マネジメントいろいろ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	要 匡 (Kaname Tadashi) (40264288)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・部長 (82612)	
研究 分担者	柳 久美子 (Yanagi Kumiko) (90294701)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・研究員 (82612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------