

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790179

研究課題名(和文) 乳がん術後補助療法の効果を決定する薬物トランスポーターの遺伝子多型の探索

研究課題名(英文) Identification of polymorphisms in drug-transporter genes associated with clinical outcome of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients

研究代表者

清谷 一馬 (KIYOTANI KAZUMA)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・助教

研究者番号：30433642

研究成果の概要(和文)：

本研究では、網羅的な遺伝子多型の解析により、タモキシフェンの術後補助療法の効果および血中濃度と関連する遺伝子多型マーカーを同定を行った。その結果、薬物トランスポーター*ABCC2/MRP2* の遺伝子多型がタモキシフェンの治療効果と有意に関連することを明らかにした。また、ゲノムワイドジェノタイプングにより網羅的に決定し、タモキシフェンの治療効果との関連を検討したところ、*C10orf11* の遺伝子多型とタモキシフェン治療効果との間に有意な関連が認められた。これまでに報告のある *CYP2D6* とこの二つ遺伝子多型のリスクアレルの数の合計が増加するのに伴い、無再発生存期間が有意に短くなることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We screened novel genetic makers determining the efficacy of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients. We identified that single nucleotide polymorphisms in *ABCC2/MRP2* and *C10orf11* showed significantly associated with the clinical outcomes of patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. The number of risk alleles of these two genes and previously-identified maker, *CYP2D6*, had cumulative effects on recurrence-free survival among the breast cancer patients receiving tamoxifen monotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：遺伝子多型，トランスポーター，タモキシフェン，乳がん，GWAS

1. 研究開始当初の背景

乳がんは女性において、罹患率が最も高いがんであり、現在も増加傾向にある。乳がん術後補助療法を目的としたホルモン療法には、第一選択薬としてタモキシフェンが広く

用いられてきた。タモキシフェン療法における5年無病生存率は81.4%であり、約20%の患者は、タモキシフェンの効果が不十分なために再発してしまう。近年、タモキシフェンより優れた治療効果が得られたという知見

に基づき、閉経後乳がんにおいてはアロマターゼ阻害薬が広く用いられている。しかしながら、アロマターゼ阻害薬の長期投与の影響についての知見は少なく、骨折や骨粗鬆症などの副作用との関連も示唆されている。タモキシフェンおよびアロマターゼ阻害薬は2～5年と長期間投与するため、医療経済学的観点からも、特に薬物投与前に治療効果および副作用の発現を予測し、適切な患者に適切な治療を提供することが不可欠な薬物であると考えられる。

申請者らはこれまでに日本人で頻度の高い遺伝子多型である *CYP2D6**10 を有する患者ではタモキシフェン治療効果が低くなることをはじめて明らかにしたが、いずれの検討においても *CYP2D6* のみではタモキシフェン治療効果の個人差を全て説明することはできなかった。いくつかのグループにより *CYP2D6* 以外の薬物代謝酵素 (*CYP3A5*, *SULT1A1*, *UGT2B15* など) について検討が行われているが、いずれも有意な関連は認められていない。タモキシフェンはグルクロン酸抱合または硫酸抱合を受け、胆汁排泄を介して体外に排出されることから、薬物トランスポーターにより輸送されることが予想されるが、タモキシフェンの体内動態および治療効果と薬物トランスポーターの関連については現在までに報告されていない。また、薬物トランスポーターの遺伝子多型とタモキシフェンの治療効果との関連も報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、最終的に、乳がん術後補助ホルモン療法における個別薬物投与設計 (テーラーメイド医療) の確立を目指している。これまでに明らかにした *CYP2D6* 以外のタモキシフェンの体内動態および治療効果と関連する遺伝子多型マーカーの同定を目的としている。

3. 研究の方法

タモキシフェンの体内動態および治療効果と関連する遺伝子多型マーカーを同定するため、タモキシフェンによる術後補助療法を受けている乳がん患者より、血液を採取し、Invader 法およびゲノムワイドジェノタイプングにより、遺伝子多型を網羅的に決定した。タモキシフェンの体内動態および治療効果との関連を (薬物トランスポーターを中心に) 検討した。

(1)患者

対象患者は全て日本人女性で、1986年から2007年の間にホルモン受容体陽性の浸潤性

乳がんと診断され、根治手術を受けた患者である。対象患者の全てから文書による同意を得た。本研究は理化学研究所横浜研究所および各施設の倫理審査委員会の承認を得た上で行った。

遺伝子多型と再発予防効果との関連解析では、乳がん根治手術後に5年間のタモキシフェンによる術後補助療法を受けている462名を対象とした。

遺伝子多型と血漿中濃度との関連解析では、20 mg/日でタモキシフェンを服用中の98名を対象とした。タモキシフェン服用24時間後に血液を採取した。血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェンを HPLC-TOFMS により測定した。このうち51名においては、*CYP2D6* 遺伝子型に基づく用量設定試験を行った。

(2)遺伝子型の判定

CYP2D6 の遺伝子型 (*1-*1, *4, *5, *6, *10, *10-*10, *14, *18, *21, *36-*36 および *41) は TaqMan 法 (Applied Biosystems, Foster City, CA) および real-time Invader 法 (Third Wave technologies, Madison, WI) により判定した。本研究では、*1 および *1-*1 アレルを *wt* アレル、酵素活性を低下または消失させる *4, *5, *10, *10-*10, *14, *21, *36-*36 および *41 を *V* アレルとして解析を行った。

薬物トランスポーター遺伝子については、haplotype-tagging SNPs (tag SNPs) を用いたスクリーニングを行った。Tag SNPs の選択は、international HapMap database の日本人集団 (JPT) の情報を用い、以下の条件で行った: $r^2 \geq 0.8$, マイナーアレル頻度 ≥ 0.1 。 *ABCBI*, *ABCC2* および *ABCG2* 遺伝子でそれぞれ28 SNPs, 11 SNPs および 12 SNPs を選択し、合計51 SNPs を Invader 法により判定した。

さらに、Illumina Human610-Quad BeadChips を用いて、ゲノムワイドジェノタイプングを行った。

4. 研究成果

(1)タモキシフェンの治療効果との関連

検討した282名において *CYP2D6* 遺伝子多型は無再発生存期間と有意な関連を示した (log-rank $P = 0.00020$)。Cox 比例ハザード解析では、*CYP2D6* 遺伝子型はその他の因子とは独立した再発予測因子であり、*wt/V* および *V/V* 遺伝子型を有する患者でのハザード比は *wt/wt* と比較してそれぞれ 4.44 (95%信頼区間, 1.31-15.00) および 9.52 (95%信頼区間, 2.79-32.45)であった。

次に薬物トランスポーターである *ABCBI*, *ABCC2* および *ABCG2* 遺伝子について tag SNPs を選択し、タモキシフェンの再発予防効果との関連を網羅的に検討した。検討した

51 tag SNPsのうち、*ABCC2* 遺伝子の2 SNPs (rs3740065 および rs11190303) は、無再発生存期間と有意な関連を示した (log-rank $P = 0.00020$ および 0.00048). これらの2 SNPs は強い連鎖不平衡にあった ($D' = 0.97$, $r^2 = 0.79$). rs3740065 G/G 患者と比較したとき、rs3740065 A/G および A/A 患者でのハザード比は 3.52 (95%信頼区間, 0.46-26.79) および 10.64 (95%信頼区間, 1.44-78.88; $P = 0.00017$) であった. *ABCB1* および *ABCG2* 遺伝子の tag SNPs はいずれも有意な関連を示さなかった (log-rank $P \geq 0.083$).

(2) タモキシフェン代謝物の血漿中濃度との関連

CYP2D6 および *ABCC2* 遺伝子型と血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェン濃度との関連を検討したところ、血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェン濃度は各 *CYP2D6* 遺伝子型群間で有意に差があった (Kruskal-Wallis $P = 0.0000043$ および 0.00052). *CYP2D6* V/V および wt/V 患者での血漿中エンドキシフェン濃度の中央値はそれぞれ 15.5 および 27.2 ng/mL であり、wt/wt 患者 (35.4 ng/mL) のそれぞれ 43.8% および 76.8% であった. 4-水酸化タモキシフェンについても同様の結果であった. 一方、*ABCC2* rs3740065 遺伝子型では、血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェン濃度いずれとも有意な関連は認められなかった (Kruskal-Wallis $P = 0.68$ および 0.26).

(3) ゲノムワイド関連解析

さらになる遺伝子多型マーカーを探索するため、タモキシフェン服用している乳がん患者 240 検体の遺伝子多型をゲノムワイドジェノタイピングにより網羅的に決定し、タモキシフェンの治療効果との関連を検討した (GWAS). 15 SNPs が $P < 1.0 \times 10^{-7}$ と有意な関連を示した. トランスポーター遺伝子の SNPs の関連は $P \geq 8.59 \times 10^{-5}$ であった. 有意な関連を示した 15 SNPs について、追加の 222 検体を用いて replication study を行ったところ、*C10orf11* 遺伝子上の rs10509373 とタモキシフェン治療効果との間に有意な関連が認められた (GWAS, log-rank $P = 5.19 \times 10^{-8}$; replication study, log-rank $P = 4.18 \times 10^{-4}$; combined, log-rank $P = 1.26 \times 10^{-10}$). rs10509373 のハザード比は 4.51 (95%信頼区間, 2.72-7.51; $P = 6.29 \times 10^{-9}$) であった. 一方、rs10509373 はタモキシフェンの活性代謝物であるエンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェンの血漿中濃度とは有意な関連は示さなかった ($P = 0.89$ および $P = 0.98$). さらに *CYP2D6* および *ABCC2* 遺伝子型との組み合わせの検討を行ったところ、三つの遺伝子のリスクア

レルの数の合計が増加するのに伴い、無再発生存期間が有意に短くなった (log-rank $P = 2.28 \times 10^{-12}$). 以上の結果より、タモキシフェンの術後補助療法の効果関連する遺伝子多型マーカーとして、*ABCC2* および *C10orf11* を同定した.

(4) *CYP2D6* 遺伝子型に基づく用量設定試験

CYP2D6 遺伝子型に基づき、タモキシフェンの投与量と血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェン濃度との関連を検討した. *CYP2D6* の活性の低い V/V および wt/V 群には、それぞれ 40 mg/day および 30 mg/day を、wt/wt には通常の 20 mg/day 投与し、血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェン濃度を HPLC-TOFMS により測定した. 40 mg/day および 30 mg/day に増量することにより、血漿中エンドキシフェンおよび4-水酸化タモキシフェン濃度は上昇し、その値は、wt/wt 群とほぼ同程度であった ($P = 0.076$ および $P = 0.11$). このとき、副作用の発症頻度と増量には関連は認められなかった. したがって、*CYP2D6* 遺伝子型に基づき、タモキシフェンの投与量を変えることは、十分な治療効果を得るためには重要であることが示唆された.

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 12 件)

1. Poh-Yin Yew, Taisei Mushiroda, Kazuma Kiyotani, Gopala Krishnan Govindasamy, Lee-Fah Yap, Soo-Hwang Teo, Paul Vey-Hong Lim, Selvaratnam Govindaraju, Kananathan Ratnavelu, Choon-Kook Sam, Yoke-Yeow Yap, Alan Soo-Beng Khoo, Kin-Choo Pua, Yusuke Nakamura, The Malaysian NPC Study Group, Ching-Ching Ng. Identification of a functional variant in *SPLUNC1* associated with nasopharyngeal carcinoma susceptibility among Malaysian Chinese. *Mol Carcinog* (査読有) (2012) in press.

DOI: 10.1002/mc.21857

2. Kazuma Kiyotani*, Satoko Uno*, Taisei Mushiroda, Atsushi Takahashi, Michiaki Kubo, Naoki Mitsuhashi, Shinomi Ina, Chikashi Kihara, Yasutoshi Kimura, Hiroki Yamaue, Koichi Hirata, Yusuke Nakamura, Hitoshi Zembutsu. A genome-wide association study identifies four genetic markers for hematological toxicities in cancer patients receiving gemcitabine therapy. *Pharmacogenet Genomics* (査読有) 22, 229-235 (2012). *equally contribute.

DOI: 10.1097/FPC.0b013e32834e9eba

3. Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Tatsuhiko Tsunoda, Takashi Morizono, Naoya Hosono, Michiaki Kubo, Yusuke Tanigawara, Chiyo K. Imamura, David A. Flockhart, Fuminori Aki, Koichi Hirata, Yuichi Takatsuka, Minoru Okazaki, Shozo Ohsumi, Takashi Yamakawa, Mitsunori Sasa, Yusuke Nakamura, Hitoshi Zembutsu. A genome-wide association study identifies locus at 10q22 associated with clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients in Japanese. *Hum Mol Genet* (査読有) 21, 1665-1672 (2012).
DOI: 10.1093/hmg/ddr597
 4. Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Chiyo K. Imamura, Yusuke Tanigawara, Naoya Hosono, Michiaki Kubo, Mitsunori Sasa, Yusuke Nakamura, Hitoshi Zembutsu. Dose-adjustment study of tamoxifen based on *CYP2D6* genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* (査読有) 131, 137-145 (2012).
DOI: 10.1007/s10549-011-1777-7
 5. Milimo Maimbo, Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Collen Masimirembwa, Yusuke Nakamura. *CYP2B6* genotype is a strong predictor of systemic exposure to efavirenz in HIV-infected Zimbabweans. *Eur J Clin Pharmacol* (査読有) 68, 267-271 (2012).
DOI: 10.1007/s00228-011-1118-0
 6. Makiko Shimizu*, Kazuma Kiyotani*, Hideo Kunitoh, Tetsuya Kamataki, Hiroshi Yamazaki. Different effects of *TERT*, *TP63*, and *CYP2A6* polymorphism on individual risk of tobacco-related lung cancer in male Japanese smokers. *J Cancer Ther* (査読有) 2, 690-696 (2011). *equally contribute.
DOI: 10.4236/jct.2011.25093
 7. Aritoshi Iida, Atsushi Takahashi, Michiaki Kubo, Susumu Saito, Naoya Hosono, Yozo Ohnishi, Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Masahiro Nakajima, Kouichi Ozaki, Toshihiro Tanaka, Tatsuhiko Tsunoda, Shuichi Oshima, Motoki Sano, Tetsumasa Kamei, Torao Tokuda, Masashi Aoki, Kazuko Hasegawa, Koichi Mizoguchi, Mitsuya Morita, Yuji Takahashi, Masahisa Katsuno, Naoki Atsuta, Hirohisa Watanabe, Fumiaki Tanaka, Ryuji Kaji, Imaharu Nakano, Naoyuki Kamatani, Shoji Tsuji, Gen Sobue, Yusuke Nakamura, Shiro Ikegawa. A functional variant in *ZNF512B* is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Hum Mol Genet* (査読有) 20, 3684-3692 (2011).
DOI: 10.1093/hmg/ddr268
 8. Norihito Shibahara, Yuiko Masunaga, Shunsuke Iwano, Hiroshi Yamazaki, Kazuma Kiyotani, Tetsuya Kamataki. Human cytochrome P450 1A1 is a novel target gene of liver X receptor α . *Drug Metab Pharmacokinet* (査読有) 26, 451-457 (2011).
DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-030
 9. Naoya Hosono, Soranun Chantarangsu, Kazuma Kiyotani, Sadaaki Takata, Yumiko Tsuchiya, Surakameth Mahasirimongkol, Wasun Chantratita, Taisei Mushiroda, Yusuke Nakamura, Michiaki Kubo.: Development of new HLA-B*3505 genotyping method using Invader assay. *Pharmacogenet Genomics* (査読有) 20, 630-633 (2010).
DOI: 10.1097/FPC.0b013e32833ddc0a
 10. Kazuma Kiyotani, Makiko Shimizu, Toshio Kumai, Tetsuya Kamataki, Shinichi Kobayashi, Hiroshi Yamazaki.: Limited effects of frequent *CYP2D6**36-*10 tandem duplication allele on *in vivo* dextromethorphan metabolism in a Japanese population. *Eur J Clin Pharmacol* (査読有) 66, 1065-1068 (2010).
DOI: 10.1007/s00228-010-0876-4
 11. Taku Nagano, Makiko Shimizu, Kazuma Kiyotani, Tetsuya Kamataki, Ryohji Takano, Norie Murayama, Fumiaki Shono, Hiroshi Yamazaki.: Biomonitoring of urinary cotinine concentrations associated with plasma levels of nicotine metabolites after daily cigarette smoking in a male Japanese population. *Int J Environ Res Public Health* (査読有) 7, 2953-2964 (2010).
DOI: 10.3390/ijerph7072953
 12. Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Naoya Hosono, Tatsuhiko Tsunoda, Michiaki Kubo, Fuminori Aki, Okazaki Yutaka, Koichi Hirata, Yuichi Takatsuka, Minoru Okazaki, Shozo Ohsumi, Takashi Yamakawa, Mitsunori Sasa, Yusuke Nakamura, Hitoshi Zembutsu.: Lessons for pharmacogenomics studies: association study between *CYP2D6* genotype and tamoxifen response. *Pharmacogenet Genomics* (査読有) 20, 565-568 (2010).
DOI: 10.1097/FPC.0b013e32833af231
- [学会発表] (計4件)
1. 清谷一馬, 蒔田泰誠, 今村知世, 細野直哉, 角田達彦, 久保充明, 谷川原祐介, 平田公一, 大住省三, 笹三徳, 中村祐輔, 前佛均.: タモキシフェンの乳がん再発予防効果に及ぼす *CYP2D6* および *ABCC2* 遺伝子多型の影響. 第31回日本臨床薬理学会年会. 京都(国立京都国際会館). 2010.12.3.
 2. Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Chiyo K. Imamura, Naoya Hosono, Tatsuhiko Tsunoda, Michiaki Kubo, Yusuke Tanigawara, Fuminori Aki, Koichi Hirata, Yuichi Takatsuka, Minoru Okazaki, Shozo Ohsumi, Takashi

Yamakawa, Mitsunori Sasa, Yusuke Nakamura, Hitoshi Zembutsu.: Association between polymorphisms in *CYP2D6* and *ABCC2* and clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. The American Society of Human Genetics 60th Annual Meeting (ASHG2010). Washington DC. 2010.11.3.

3. 清谷一馬, 蒔田泰誠, 今村知世, 細野直哉, 角田達彦, 久保充明, 谷川原祐介, 安藝史典, 平田公一, 高塚雄一, 岡崎 稔, 大住省三, 山川 卓, 笹 三徳, 中村祐輔, 前佛均.: タモキシフェンの乳がん再発予防効果に関連する薬物トランスポーターの遺伝子多型. 日本人類遺伝学会第 55 回大会. 大宮 (大宮ソニックシティ) . 2010.10.28.
4. Kazuma Kiyotani, Taisei Mushiroda, Chiyo K. Imamura, Naoya Hosono, Tatsuhiko Tsunoda, Michiaki Kubo, Yusuke Tanigawara, Fuminori Aki, Koichi Hirata, Yuichi Takatsuka, Minoru Okazaki, Shozo Ohsumi, Takashi Yamakawa, Mitsunori Sasa, Yusuke Nakamura, Hitoshi Zembutsu.: Effects of polymorphisms in *CYP2D6* and *ABCC2* on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. 日本薬物動態学会第 25 回年会 (東京) .大宮 (大宮ソニックシティ) . 2010.10.8.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清谷 一馬 (KIYOTANI KAZUMA)

徳島大学・疾患ゲノム研究センター・助教

研究者番号：30433642

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：