

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870099

研究課題名(和文) 遺伝子多型に基づいた膵癌薬物療法の効果・副作用発現を予測するアルゴリズムの開発

研究課題名(英文) Pharmacogenomics study for prediction of treatment effects and side effects in pancreatic cancer

研究代表者

佐藤 泰憲 (SATO, YASUNORI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90536723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：切除不能進行膵癌を対象に、自らの先行研究に基づく候補遺伝子解析及びゲノム網羅的解析を行った。先行研究で候補になった3つの薬物代謝酵素関連の遺伝子多型の検証を行った。その結果、SLC01B1のrs4149086は治療効果予測因子であり、rs4149086がAGまたGGを有する患者は、塩酸ゲムシタピンよりも経口フッ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤を中心とした治療を行うと効果が期待できることからわかった。また、ゲノム網羅的関連解析から膵癌の予後や有害事象と関連する候補SNPsを同定した。さらに、ゲノム網羅的関連解析を実施する新たな統計手法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：We employed genome-wide pharmacogenomics studies to identify candidate polymorphisms that could influence overall survival (OS) or adverse effects (AEs) in advanced pancreatic cancer (PC) patients. As a result, advanced PC patients with the rs4149086 AG or GG genotype may obtain good clinical results when treated with S-1 containing regimens. Additionally, we detected the candidate SNPs which could influence OS or AEs in genome-wide association study (GWAS). And also, we developed a new statistical method for detecting candidate SNPs in a GWAS.

研究分野：生物統計

キーワード：膵癌 ゲノム網羅的解析 ファーマコゲノミクス バイオマーカー 薬剤反応性遺伝子 生物統計手法

1. 研究開始当初の背景

最近、個々の患者背景や病状を考慮した有効で副作用の少ない個別化医療が、臨床現場で求められており、その実現のためには薬剤反応性の個体差の原因となる遺伝子多型等の諸因子を探索し、臨床的意義との関連を調べる研究が世界中で盛んに実施されている。しかしながら、これらの遺伝子の機能や臨床アウトカムとの関連については未だ十分に解明されておらず、治療前に個々の患者に対する薬剤の有効性や副作用を予測することは困難な状況である。

本研究で対象とする膵癌は、我が国のがん死因の第5位を占め、膵癌の5年生存率は6.7%と、突出して予後が悪いがんである。この状況は欧米でも同様であり、約80%を占める切除不能症例の内科的治療成績の向上が急務となっている。切除不能膵癌の標準治療はゲムシタピン単独療法(GEM)と考えられているが、その生存期間中央値(MST)は約6ヶ月に留まっている。様々な併用療法が検討されているが、その中でも我が国で開発され、後期第II相試験でMST 9.2ヶ月を示したティーエスワン(TS-1)を含む治療法が有望である。我が国発のこの薬剤とGEM、及びGEM+TS-1の併用療法の3群の第相ランダム化比較試験GESTが世界的にも注目されている。

これまでに、研究代表者はGEMを初回投与した切除不能進行膵癌患者を対象に、全生存期間と代謝酵素関連遺伝子及びゲノム網羅的に関連を調べたところ生命予後と関連する多型を持つ遺伝子を同定し報告した。しかしながら、これらの結果は単群の観察研究であり、治療選択バイアスを伴う可能性が否定できない。バイオマーカを用いて、生命に影響を与える予後因子や薬物治療に対する効果予測因子を同定するためには、最高位のエビデンスレベルにある第相ランダム化比較試験でこれらの結果を検証することが必要不可欠であるため、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、第相ランダム化比較試験GEST参加者にヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針適用の別研究として、別途説明を行い同意が得られた188名を対象とした。既に末梢血由来DNA及び血漿試料が匿名化されて保管されており、自らの先行研究に基づく候補遺伝子解析(理化学研究所で同定された5033個の薬物代謝関連遺伝子多型)と、最新のSNPアレイ(Illumina OmniExpress BeadChip、約73万個の遺伝子多型)を用いたゲノム網羅的解析を行った。本研究では、上記の遺伝子多型解析データとGESTから提供された匿名化された臨床データ(全生存期間、無増悪生存期間、腫瘍縮小効果及び有害事象等)を利用して、ゲノム薬理学的・統計学的視点により、下記の3つの課題に取り組み、研究期間内に明らかにする。

- (1) 膵癌薬物療法の効果予測因子・予後因子の探索、同定を行う。
- (2) ゲノム網羅的研究から得られた膨大なデータから膵癌の薬剤反応性遺伝子を同定するためのバイオインフォマティクス及び生物統計手法を開発する。
- (3) 上記の解析の結果、患者背景因子及びバイオマーカを組み合わせ、膵癌薬物療法に対する効果及び安全性を予測するアルゴリズムを構築する。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子多型解析データとGESTから提供された匿名化された臨床データをゲノム薬理学的・統計学的解析により、以下の課題に取り組む。

- (1) 膵癌薬物療法の効果予測因子・予後因子の探索、同定を行う。

自らの先行研究に基づく候補遺伝子解析と、ゲノム網羅的解析のデータを対象として、生命予後と遺伝子多型との関連を調べる。具体的には、生存時間解析を行い、Coxモデルで治療法と遺伝子多型との交互作用を評価し、同定された多型を予後因子、効果予測因子に分ける。

有害反応に影響を与える遺伝子多型を調べるために、ロジスティック回帰分析を行い、治療法と遺伝子多型との交互作用を評価する。また、マンハッタンプロットを作成し、結果の視覚化を図る。

- (2) ゲノム網羅的研究から得られた膨大なデータから膵癌の薬剤反応性遺伝子を同定するためのバイオインフォマティクス及び生物統計手法を開発する。

ゲノム網羅的研究のデータ解析において、標本変動による偽陽性及び偽陰性を少なくするために、基準とする統計量と判定限界値の多くの組合せについて、生物統計学的考察と計算機シミュレーション実験を通じた検討を行う。

- (3) 上記の解析の結果、患者背景因子及びバイオマーカを組み合わせ、膵癌薬物療法に対する効果及び安全性を予測するアルゴリズムを構築する。

4. 研究成果

切除不能進行膵癌188名を対象に、自らの先行研究に基づく候補遺伝子解析及びゲノム網羅的解析を行った。先行研究で候補になった3つの薬物代謝酵素関連の遺伝子多型の検証を行った。その結果、ゲムシタピン群でSLC01B1の遺伝子多型(rs4149086)AG+GGを有する被験者の生存期間中央値(MST)は6.7ヶ月、AAを有する患者のMSTは9.6ヶ月で有意差があった(HR=3.75 [95% CI: 1.30-10.8], p=0.008; 図1)。一方、経口フッ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤(TS-1)群では、AG+GGを有する被験者のMSTは14.4ヶ月、AAのMSTは10.7ヶ月で有意差はなかった(HR=0.77 [95% CI: 0.33-1.81], p=0.55;

図 2)。ゲムシタピンと TS-1 群の併用群(GS 群)では、AG+GG の MST は 15.9 ヶ月、AA の MST は 10.8 ヶ月で有意差はなかった(HR = 1.18 [95% CI: 0.46 - 3.00]、p = 0.72; 図 3)。

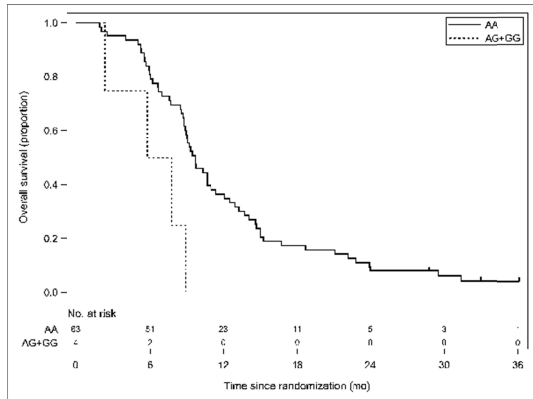


図 1 GEM 群における SLC01B1 の生存曲線

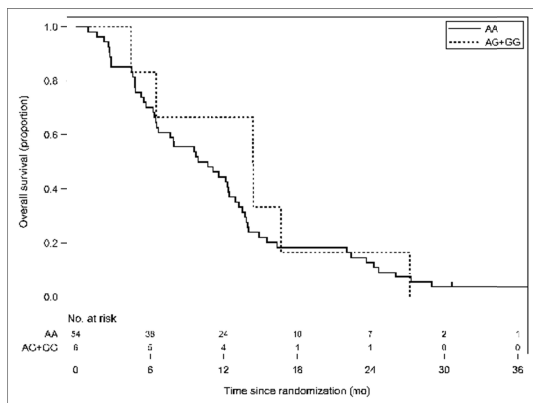


図 2 TS-1 群における SLC01B1 の生存曲線

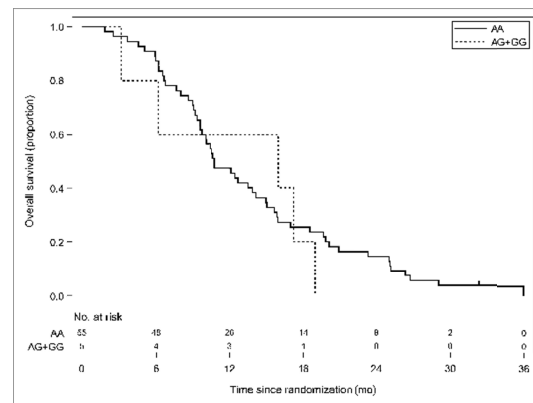


図 3 GS 群における SLC01B1 の生存曲線

したがって、SLC01B1 の rs4149086 は治療効果予測因子であり、rs4149086 が AG または GG を有する患者は、塩酸ゲムシタピンよりも経口フッ化ピリミジン系抗悪性腫瘍剤を中心とした治療を行うと効果が期待できることからわかった。

さらに、最新の SNP アレイ (Illumina OmniExpress BeadChip、約 73 万個の遺伝子多型) を用いたゲノム網羅的解析を行った。全生存期間、腫瘍縮小効果や有害事象と遺伝子多型との関連解析をマンハッタンプロットなどでスクリーニングを実施し、それらの

アウトカムと関連する候補遺伝子を同定した。主要評価項目である全生存期間と 73 万 SNPs との関連を調べた結果、3 つの SNPs が同定された($p < 10^{-7}$; 図 4)。

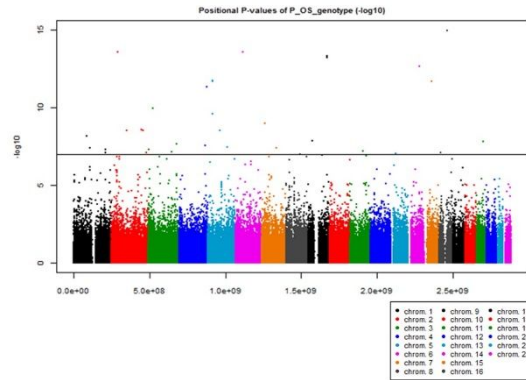


図 4 全生存期間のマンハッタンプロット

これらの SNPs とその主な結果は、第 3 染色体上の genome SNP (rs1915948; CC[n=4] の MST は 3.7 ヶ月、CT + TT [n=184] の MST は 10.4 ヶ月、 $p = 6.9 \times 10^{-8}$)、SPATA31E1 の synonymous SNP(rs12238266; CC[n=102] の MST は 12.2 ヶ月、CT [n=74] の MST は 8.6 ヶ月、TT [n=12] の MST は 21.4 ヶ月、 $p = 1.0 \times 10^{-7}$)、VIT の intron SNP(rs721348; TT [n=9] の MST は 10.6 ヶ月、CT+TT [n=179] の MST は 5.5 ヶ月; $p = 1.0 \times 10^{-7}$)であった。Cox 回帰分析で治療法と遺伝子多型の交互作用を評価したところ、これらの SNPs の交互作用は有意でなかったことから、予測因子ではなく予後因子としての機能を果たすと考えられた。

副次評価項目である無再発生存期間や腫瘍縮小効果と 73 万 SNPs との関連を Cox 回帰分析及びロジスティック回帰分析を用いて実施した。その結果、全生存期間と関連があった 3 つの SNPs はこれらの評価項目とは関連が見られなかった。

同様に、副次評価項目である有害事象 (Grade 3 以上の血液毒性、及び非血液毒性) と 73 万 SNPs との関連を Exact ロジスティック回帰分析で解析を行った。スクリーニングの有意水準を 1.0×10^{-6} とした。

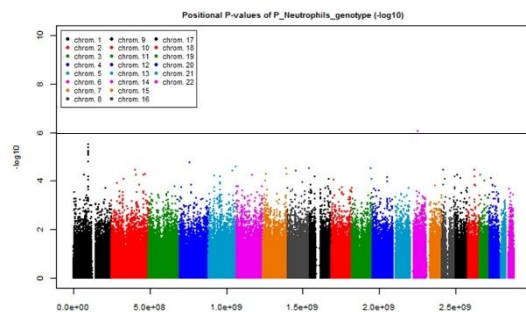


図 5 好中球減少症のマンハッタンプロット

その結果、非血液毒性は有意な項目はなかったが、血液毒性は ALT 上昇と関連する rs4074123($p = 7.1 \times 10^{-7}$)、AST 上昇と関連する rs711441($p = 4.2 \times 10^{-7}$)、ヘモグロビン減

少と関連する rs4661553 ($p = 6.4 \times 10^{-7}$)、好中球減少と関連する rs11629344 ($p = 9.2 \times 10^{-7}$; 図 5)、4 つの候補 SNPs を同定した。これらの SNPs は全生存期間や無増悪生存期間とは直接関連しないことから、有効性と安全性を同時に考慮した予測モデルを本データから構築することは困難であった。

膵癌の予後や有害事象と関連があると報告された SNPs を本データから同様の結果が確認できるか検討をおこなった。しかし、既報の SNPs は Illumina BeadChip アレイに搭載されていないものが多く、Imputation 法を適用し、それらの遺伝子型の推定を行った。シミュレーションにより、fastPHASE 法、IMPUTE2 法、Minimac3 法の 3 つの手法の比較を行い、一致率が一番高い推定法を最良な推定法と評価した。その結果、fastPHASE 法が遺伝子型の一致率が 90%以上と最も高かった。白人集団で同定された WWOX 遺伝子の SNP (rs11644322; G/A) に対して、fastPHASE 法を本データに適用し推定したところ、日本人集団ではすべて G アレルのホモ接合と推定された。このため白人で観察された rs11644322 の遺伝子型と進行性膵癌患者の予後や治療反応性との関連について検証されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Sato Y, Goshio M, Nagashima K, Takahashi S, Ware JH, Laird NM. Statistical methods in the Journal — an update. *New England Journal of Medicine* 2017; 376 (11) : 1086–1087. DOI: 10.1056/NEJMc1616211. (査読有)
2. 佐藤泰憲, 五所正彦. 臨床研究における生物統計学の基礎. 日本小児アレルギー学会誌. 2015. 29 (1), 79-85. (査読有)
3. 佐藤泰憲, 高橋翔, 長島健悟. 臨床試験の計画: 試験デザインとデータ解析. 日本小児アレルギー学会誌. 2015. 29 (2), 214-221. DOI: 10.3388/jspaci.29.79 (査読有)
4. 佐藤泰憲, 長島健悟, 高橋翔. 疫学研究の計画: 研究デザインとデータ解析. 日本小児アレルギー学会誌 2015;29(3):312–317. DOI: DOI: 10.3388/jspaci.29.312. (査読有)
5. 佐藤泰憲, 長島健悟, 高橋翔. 医学・薬学データの統計解析 I: 推定と検定. 日本小児アレルギー学会誌 2015;29(5):718–723.

DOI: 10.3388/jspaci.29.718. (査読有)

6. 佐藤泰憲, 長島健悟, 高橋翔. 医学・薬学研究における統計モデル解析. 日本小児アレルギー学会誌 2016;30:190-197. DOI: 10.3388/jspaci.30.580. (査読有)
7. 佐藤泰憲, 長島健悟, 高橋翔. 医学・薬学研究における症例数設計. 日本小児アレルギー学会誌 2016;30:580-586. DOI: 10.3388/jspaci.30.190. (査読有)
8. 佐藤泰憲, 長島健悟, 高橋翔. 医学・薬学研究における生存時間データの統計解析. 日本小児アレルギー学会誌 2016; 30:659–665. DOI: 10.3388/jspaci.30.659. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Nagashima K, Sato Y. Information criterion for Firth-type penalized partial likelihood in Cox regression. The 27th International Biometric Conference. Firenze, Italy. 2014 July 6-11.
2. 佐藤泰憲. これだけは知っておきたい! 生物統計と臨床研究の基本. 第 51 回日本小児アレルギー学会. 招待講演. 四日市. 2014 年 11 月 8~9 日
3. 佐藤泰憲. 臨床研究には生物統計が何故必要か? ~ 医療系データ解析の基本とピットフォール ~ 第 63 回日本感染症学会 東日本地方会総会学術集会 教育講演. 2014 年 10 月 29~31 日
4. 佐藤泰憲. 生物統計家とのコミュニケーション. 第 130 回関東連合産婦人科学術集会. 招待講演. 幕張メッセ. 2015 年 10 月 24~25 日
5. 佐藤泰憲. 統計の基礎 プロバビリティーカーブ, カットオフとは? 第 64 回日本アレルギー学会学術集会(招待講演)グランドプリンスホテル高輪 2015 年 5 月 26~28 日

〔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

研究紹介

<http://www.m.chiba-u.jp/class/biostat/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 泰憲 (SATO YASUNORI)
千葉大学・医学研究院・准教授
研究者番号：90536723

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

吉田 輝彦 (YOSHIDA TERUHIKO)
奥坂 拓志 (OKUSAKA TAKUSHI)
上野 秀樹 (UENO HIDEKI)
レアード ナン (Laird Nan)