

## 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 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790170

研究課題名（和文）小児白血病患者における代謝酵素遺伝子解析を用いた 6-メルカプトプリン療法の適正化

研究課題名（英文）Pharmacogenetics of 6-mercaptopurine maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia in Japanese

研究代表者

田中 庸一 (YOICHI TANAKA)

北里大学薬学部・助教

研究者番号：40525341

研究成果の概要（和文）：小児白血病に対する 6-メルカプトプリン（6-MP）を用いた治療において、6-MP の代謝に関連する Thiopurine S-methyl transferase(TPMT)および Inosine triphosphate pyrophosphatase(ITPA)の遺伝子変異は治療中に発現する白血球減少および肝機能障害の発現頻度が高いことを明らかとした。また、6-MP を細胞外に排泄する Multi-drug resistance protein 4 (MRP4) の遺伝子変異は白血球減少の頻度が高くなることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：The genetic polymorphisms of Thiopurine S-methyl transferase (TPMT) and Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) were risk factor for increasing frequencies of adverse effects, which are leukopenia and liver toxicity, during maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Japanese. The genetic mutation of multi-drug resistance protein 4 was increasing frequency of leukopenia during maintenance therapy for ALL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：ファーマコジェネティクス、6-メルカプトプリン、小児白血病

## 1. 研究開始当初の背景

小児白血病は化学療法に感受性が高く、80%を超える5年生存率が得られているが、副作用が原因で治療を中断しなければならない症例が多く存在している。治療中断は予後に影響を及ぼすため、解決すべき問題となっている。欧米人では TPMT や ITPA 遺伝子多型が重篤な骨髄抑制に関連しているとの報告があるが、日本人では明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

小児白血病薬物療法において次の項目を検討し、遺伝子多型解析による 6-MP 投与量の個別化を目指す。

(1) 6-MP による副作用が起こりやすい遺伝子変異を明らかとする。

(2) 6-MP 関連遺伝子多型と服用量の関連性を明らかとする。

### 3. 研究の方法

東京小児がん研究グループに所属する研究協力施設にて治療を継続または終了した小児白血病患者で、インフォームド・コンセントが得られた者を対象とした。対象患者から、末梢血を採取し、DNA を抽出後、TaqMan プローブアッセイにより、遺伝子多型解析を行った。対象患者の臨床データは匿名化した状態で研究共同施設より得た。副作用については有害事象共通用語基準を用いて Grade3 以上の副作用発現状況を調査した。臨床情報や 6-MP 服薬状況と遺伝子多型の関連性について統計的手法を用いて検討を行った。

### 4. 研究成果

小児白血病患者が 121 例エントリーし、そのうち維持療法を終えた患者 73 例を対象に解析を行った。

#### (1) TPMT 遺伝子多型による維持療法中の副作用および投与量への影響

TPMT は 6-MP およびその活性代謝物をメチル化することにより代謝し、無毒化する酵素である。そのため、TPMT 酵素活性が低下することにより 6-MP の作用増強が考えられる。TPMT 遺伝子多型解析を TPMT 酵素活性に影響を及ぼす一塩基多型である TPMT G238C、G460A、A719G において行った。遺伝子多型は TPMT A719G にヘテロ変異型が 2 例であったが、G238C、G460A では変異は見られなかった。

維持療法中に白血球減少が TPMT 野生型の患者群では 32%であったが、TPMT A719G 変異のあるすべての患者に発現していた。また、肝酵素上昇は TPMT 野生型の患者群では 55%であったが、TPMT A719G 変異のあるすべての患者に発現していた。TPMT 遺伝子変異は維持療法中の白血球減少や肝酵素上昇の頻度が高くなる因子であると示唆された。

TPMT A719G 遺伝子変異がある患者群では維持療法中の 6-MP 平均投与量は中央値が 33.9 mg/m<sup>2</sup> であり、野生型は 37.0 mg/m<sup>2</sup> と差がなく、日本人小児白血病患者では投与量の変更を必要とする明らかな因子ではなかった。

#### (2) ITPA 遺伝子多型による維持療法中の副作用および投与量への影響

ITPA は 6-MP の代謝物の 1 つである Thioinosine triphosphate を Thioinosine monophosphate へ変換

ITPA 遺伝子多型解析を ITPA 酵素活性に影響を及ぼす一塩基多型である ITPA 94C>A、IVS2+21A>C において行った。ITPA 94C>A ヘテロ変異型は 21 例、ホモ変異型が 2 例であったが、IVS2+21A>C では変異が見られなかった。

維持療法中に白血球減少が TPMT 野生型およびヘテロ変異型の患者群では約 30%であったが、ITPA94C>A ホモ変異のあるすべての患

者に発現していた。また、肝酵素上昇は ITPA94C>A 野生型、ヘテロ変異型、ホモ変異型の患者群でそれぞれ 43%、74%、100%となっており、A アレルの数が増えるにつれて、頻度が高くなっていった。ITPA 遺伝子ホモ変異は維持療法中の白血球減少や肝酵素上昇の頻度が高くなる因子であった。さらに、ITPA94A アレルは維持療法中の肝酵素上昇リスクになることが明らかとなった。

ITPA94C>A 遺伝子ホモ変異がある患者群では維持療法中の 6-MP 平均投与量は中央値が 19 mg/m<sup>2</sup> であり、野生型およびヘテロ変異型は 37.2 mg/m<sup>2</sup> であった。ITPA94C>A 遺伝子ホモ変異は維持療法中に 6-MP を標準投与量である 40 mg/m<sup>2</sup> の半量に減らす必要があると考えられた。

#### (3) Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) 遺伝子多型による維持療法中の副作用および投与量への影響

MTHFR は生体内で葉酸の代謝に関連する酵素である。MTHFR は 6-MP およびその代謝物が TPMT によってメチル化を受ける際に必要なメチル基供与体である S-adenosyl methionine の生成に関与しているため、TPMT の働きに影響を及ぼす因子であると考えられる。

MTHFR 遺伝子解析を MTHFR 酵素活性に影響を及ぼす一塩基多型である MTHFR C677T および A1298C を解析した。MTHFR C677T 遺伝子変異はヘテロ変異型が 26 例、ホモ変異型が 12 例であった。また、MTHFR A1298C はヘテロ変異型が 12 例、ホモ変異型が 2 例であった。MTHFR C677T と A1298C の各一塩基多型の組み合わせにより、MTHFR の活性値への影響に変化があることが報告されているため、ハプロタイプ別に活性値が高い群と低い群に分けて解析を行った (表 1)。

表 1. MTHFR ハプロタイプと活性

MTHFR 酵素活性	C677T	A1298C
MTHFR 高活性	CC	AA
	CC	AC
	CT	AA
MTHFR 低活性	CC	CC
	CT	AC
	TT	AA

維持療法中の白血球減少の頻度は MTHFR 高活性群で 44%と低活性群の 15%に比べ、頻度が高くなっていった。肝酵素上昇については Grade4 の割合が MTHFR 低活性群で高活性群に比べて高くなっていった。そのため、MTHFR 活性値に影響を及ぼすハプロタイプにより、維持療法中に発現する副作用の種類やその重篤度が異なることが明らかとなった。

MTHFR ハプロタイプごとに維持療法中の 6-MP 平均投与量を比較したところ、各群の中

中央値は共に 40mg/m<sup>2</sup> であり、その投与量に違いは見られなかった。そのため、MTHFR 遺伝子変異は 6-MP 投与量に及ぼす影響は少ない因子であることが示唆された。

#### (4) 薬剤排出トランスポーター遺伝子多型による維持療法中の副作用および投与量への影響

Multi-drug resistance protein 4 は 6-MP およびその代謝物を細胞外に排出するトランスポーターであり、その機能が変化することによって、6-MP 作用に影響を及ぼすと考えられる。MRP4 遺伝子多型による機能変化はこれまでに報告が少ないが、日本人において遺伝子多型頻度が高いことが報告されている一塩基多型について解析を行い、副作用の発現および投与量への影響を検討した。MRP4 遺伝子多型には MRP4 G2269A, C912A, G559T がある。MRP4 G2269A はヘテロ変異型 14 例、ホモ変異型 2 例であった。MRP4 C912A はヘテロ変異型 27 例、ホモ変異型 5 例であった。MRP4 G559T はヘテロ変異型 16 例、ホモ変異型 1 例であった。MRP4 G2269A に変異がある患者では維持療法中に白血球減少が有意に高い頻度で発現していた。しかし、他の遺伝子多型においては、野生型と変異型の患者群で副作用発現頻度の頻度に違いが見られなかった。MRP4 G2269A に遺伝子変異があると、そのタンパク発現量に変化があることが報告されているため、機能に変化が生じ、白血球減少が起こりやすくなる因子になると考えられる。

MRP4 遺伝子多型ごとに維持療法中の 6-MP 平均投与量の中央値を比較したところ、MRP4 G2269A に変異がある患者群では 30mg/m<sup>2</sup> 野生型の患者群の 40mg/m<sup>2</sup> に比べて 6-MP 投与量を減量している傾向がみられた。しかし、その他の遺伝子多型においては、維持療法中の 6-MP 投与量に差は見られなかった。そのため、MRP4 G2269A は投与量減量を予測する因子の候補になる可能性があることが示唆された。

以上、本研究の結果より、日本人小児 ALL 患者の維持療法における 6-MP による副作用発現因子としては、白血球減少は TPMT A719G 変異型、ITPA 94C>A ホモ変異型、MTHFR 高活性のハプロタイプ、MRP4 G2269A 遺伝子変異であることが示唆された。また、肝機能障害の発現因子としては、白血球減少は TPMT A719G 変異型、ITPA 94C>A 変異型、MTHFR 低活性のハプロタイプであることが示唆された。

維持療法中の 6-MP 投与量減量が必要な因子は TPMT A719G 変異型、ITPA 94C>A ホモ変異型、MRP4 G2269A 遺伝子変異であることが示唆された。

得られた知見より、小児 ALL に対する薬物

療法開始前に 6-MP 関連遺伝子多型解析を行うことで、患者に発現する副作用を予測でき、対策を事前に行うことで、重篤化を防ぐことができる。また、6-MP 投与量を遺伝情報によって個別化することにより、治療初期の重篤な副作用を予防することが可能になり、治療中断の無い効果的な治療を患者に提供することが可能となる。

遺伝子多型頻度は人種によって差があり、異なる人種で得られた結果を引用し利用することは難しいと考えられる。そのため本研究は、日本人小児 ALL 患者における 6-MP 代謝に関わる遺伝子多型とその影響を明らかにしており、治療に応用していくための重要な情報が得られたと考えられる。

6-MP 減量が必要な患者は治療を受けている小児 ALL 患者全体の 45% 程度存在している。本研究で明らかとなった 6-MP 投与量減量要因となる遺伝子多型を持つ患者は、対象患者の 25% であり、減量が必要な患者の約 60% において予測が可能であると考えられる。この結果を臨床の治療で活用することで、治療中に発現する副作用頻度の低減、治療中断の減少により治療強度を保ち効果の向上が達成できると考えられる。さらには、治療中の患者 QOL につながると期待できる。

しかし、治療を受けた約 40% の小児 ALL 患者の 6-MP 減量の要因は明らかとはならず、さらに薬物動態に影響を及ぼす因子以外の要因についても検討していく必要があると考えられ、今後、網羅的遺伝子解析を含め計画をしている。

#### 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, Manabe A, Nakadate H, Kondoh K, Nakamura K, Koh K, Utano T, Kikuchi A, Komiyama T. The activity of the inosine triphosphate pyrophosphatase affects toxicity of 6-mercaptopurine during maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia in Japanese children. *Leukemia research*, 査読有, 36, 2012, 560 – 564.

doi: 10.1016/j.leukres.2011.11.015

[学会発表] (計 7 件)

- ① 田中庸一、小児急性リンパ性白血病の維持療法における副作用発現および投与量への MRP4 遺伝子多型の影響、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、横浜
- ② 田中庸一、MRP4 遺伝子多型の小児急性

リンパ性白血病に対する維持療法の臨床経過への影響、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012 年 12 月 2 日、横浜

- ③ 田中庸一、小児リンパ性白血病治療における Methylene tetrahydrofolate reductase 遺伝子解析の有用性、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 31 日、札幌
- ④ 田中庸一、急性リンパ性白血病の維持療法における 6-メルカプトプリン関連副作用発現への TPMT,ITPA,MTHFR 遺伝子型の影響、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、前橋
- ⑤ 歌野智之、小児急性リンパ性白血病の維持療法におけるメルカプトプリン/メトトレキサート投与量に影響を及ぼす因子の検討、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、前橋
- ⑥ 高橋寛吉、葉酸還元酵素 MTHFR の遺伝子多型解析が MTX/6MP の投与量調節に有用であった急性リンパ性白血病の一例、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、2011 年 11 月 25 日、前橋
- ⑦ Tanaka Y, TPMT, ITPA, MTHFR polymorphisms influence on 6-mercaptopurine toxicities in maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia, St. Jude-VIVA Forum in Pediatric Oncology, 2011 年 3 月 21 日、シンガポール

[その他]

ホームページ等

<http://kerid-web.kitasato-u.ac.jp/Profiles/43/0004288/profile.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北里大学薬学部・助教

田中 庸一 (YOICHI TANAKA)

研究者番号：40525341