

平成30年 5月28日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14999

研究課題名(和文) 分子標的薬の副作用回避miRNA-SNPマーカーの探索と個別化療法最適化への挑戦

研究課題名(英文) miRNA-SNP analysis as potential biomarkers of adverse reactions by molecular-targeted agents

研究代表者

中島 美紀(Nakajima, Miki)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：70266162

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)：日本人におけるmiRNA-SNPを網羅的に解析し、健常人における遺伝子頻度の人種差が認められるか、がん患者における分子標的薬の副作用または罹患リスクのバイオマーカーとしてmiR-SNPを利用できるか、明らかにすることを目的とした。約1,900種類のpre-miRNAを対象としたNGS解析の結果、平均して一人あたり150種類のmiRNA-SNPが認められ、既報の遺伝子頻度と比較して人種差が認められるもの存在した。健常人と非細胞肺癌、大腸がん、成人T細胞白血病/リンパ種患者で遺伝子頻度に有意差が認められるmiRNA-SNPも複数認められ、がんの罹患マーカーとして利用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the miRNA-SNPs in Japanese subjects targeting 1,900 pre-miRNAs to investigate whether there are ethnic differences in their allele frequencies, and to identify biomarkers, which are useful to predict adverse reactions of anti-cancer drugs or incidence of cancers. Approximately 150 miRNA-SNPs were found in a person on average for healthy subjects and cancer patients. We found several miRNA-SNPs whose frequencies were significantly different with in global populations, suggesting ethnic differences. We identified miRNA-SNPs whose frequencies were different between healthy subjects and non-small cell lung cancer, colorectal cancer, or adult T-cell / leukemia patients. These miRNA-SNPs can be biomarkers of incidence of each cancer.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：マイクロRNA SNP 遺伝子多型 バイオマーカー 個人差

1. 研究開始当初の背景

白血球減少や吐き気・嘔吐などの副作用が高頻度に認められる従来の化学療法薬に代わり、がん細胞の特定の分子に作用する分子標的薬の利用ならびに医薬品開発が活発化している。Pharmacodynamics に基づいたコンパニオン診断により投与対象患者が選択されるが、手足症候群、間質性肺炎、皮膚障害、血圧上昇など分子標的薬特有の副作用が発現することも少なくない。分子標的薬の副作用は個人差が極めて大きく、その副作用発現を予知・回避するためのバイオマーカー探索が必要とされている。

申請者は薬物代謝酵素の発現を制御する microRNA (miRNA) の役割を先駆的に研究し、シトクロム P450 (CYP) が miRNA によって制御されることが、薬の体内動態の個人差の原因となっていること、がんのイニシエーションやプロモーションを制御していること、内因性物質のホメオスタシスに関わっていること、などを明らかにしてきた。Pharmacogenetics 研究は主に薬物代謝酵素を中心に発展してきたが、miRNA をコードする遺伝子上にも一塩基多型 (SNP) が存在する。miRNA-SNP は、miRNA そのものや標的遺伝子の発現量を変化させ、さまざまな疾患の発症と関わることもわかってきた。近年、pri-miR-26a に SNP を有するがん患者では 5-FU とイリノテカンによる無憎悪期間が短いことが報告された (Pharmacogenomics J., 11: 429-36, 2011) が、分子メカニズムは不明であり、日本人での解析もなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、日本人における miRNA-SNP を網羅的に解析し、健常人における遺伝子頻度の人種差が認められるかどうか、分子標的薬の投与により治療中のがん患者と健常人における遺伝子頻度の比較により、副作用または罹患リスクのバイオマーカーとして miRNA-SNP を利用できる可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 健常人およびがん患者からのゲノム DNA 抽出

ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得た上で、健常人28名、非小細胞肺癌患者44名、大腸がん患者33名および成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) 患者31名を対象として、末梢血よりゲノムDNAを抽出した。また、ATLL患者6名については、唾液DNAも抽出した。

(2) miRNA-SNP の網羅的解析

約1,900種類の pre-miRNA をコードする領域

をターゲットとして、次世代シーケンス解析 (NGS) により miRNA-SNP を網羅的に解析した。UCSC hg19 をリファレンスとしてアライメントし、hg19 と同じ塩基配列を野生型、異なる塩基配列を変異型として、遺伝子変異を同定した。

4. 研究成果

(1) 健常人における miRNA-SNP

28名の健常人より、延べ442種類の miRNA-SNP が同定された。これらのうち、143種類は dbSNP に登録されていないものであったことから、日本人特有の新規遺伝子変異である可能性が示唆された。平均して、一人あたり約150種類の miRNA-SNP を保有していることを明らかにした (図1)。認められた遺伝子変異は miRNA が標的 mRNA の認識に重要な seed 配列上に存在するものは全体の1割程度で、ほとんどは pre-miRNA 上に存在するものであった (図2)。

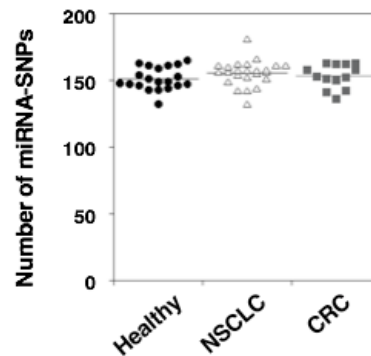


図1. 一人あたり認められる miRNA-SNP の数
Healthy: 健常人、NSCLC: 非小細胞肺癌、CRC: 大腸がん



	Seed (%)	Mature (%)	Precursor (%)
Healthy subjects	1.5	4.7	15.8
dbSNP	7.0	19.6	55.1
	/ 2500	/ 2500	/ 1900

図2. miRNA-SNP が存在する領域

dbSNP に登録されている miRNA-SNP と一致した 229 種類の miRNA-SNP の minor allele frequency (MAF) と global MAF とを比較した。その結果、33 種類の miRNA-SNP は両者の間に 20% 以上もの差が認められたことから、他の人種と比べて日本人で多い、または少ない遺

伝子変異であることが示唆された。

(2) がん患者における miRNA-SNP

各がん患者においても、平均して一人あたり約 150 種類の miRNA-SNP が認められ、健常人との間に有意差は認められなかった。分子標的薬による副作用の重篤度と関連する miRNA-SNP の解析に先立ち、健常人と比較することで、がんの罹患マーカーとなり得る miRNA-SNP が同定できるかどうか解析した。健常人と各がん患者で遺伝子頻度に有意差が認められる miRNA-SNP を探索したところ、肺がん患者で 14 種類、大腸がん患者で 11 種類、ATLL 患者で 13 種類同定された(図3)。これらの遺伝子変異パターンを主成分分析したところ、健常人ならびに各がん患者をグループ分けすることができたことから、これらは罹患マーカーとして有用であることが示唆された。

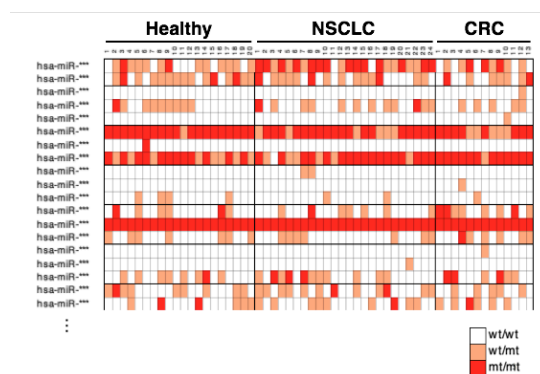


図3. 健常人とがん患者におけるmiRNA-SNP分布の比較

(3) ATLL 患者における末梢血由来 DNA と唾液由来 DNA を用いた miRNA-SNP の比較

ATLL 患者において、HTLV-1 ウイルス感染量が低い時期の血液サンプルを用いてゲノム DNA を抽出したものの、germline mutationに加えて somatic mutation も検出される可能性が考えられる。その可能性を検証するために、すでに NGS で解析済みの 6 名の ATLL 患者から唾液由来 DNA を抽出し、NGS により miRNA-SNP 解析を行い、血液由来 DNA を用いた結果と比較した。その結果、唾液由来 DNA では認められず血液由来 DNA でのみ認められた変異が、非常にわずかであるが存在したことから、それらは somatic mutation である可能性が示唆された。しかし、大多数の変異については両者の DNA サンプルで結果が一致したことから、ATLL 患者の血液由来 DNA で認められた変異はほぼ germline mutation と判断された。

<引用文献>

① Tsuchiya Y, Nakajima M, Takagi S, Taniya T, Yokoi T. Current knowledge of microRNA-mediated regulation of drug

metabolism in humans. *Cancer Res.*, 66:9090-8, 2006.

② Nakajima M, Yokoi T. MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy: regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors. *Pharmacol. Ther.*, 131:330-7, 2011.

③ Yokoi T, Nakajima M. microRNAs as mediators of drug toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 53: 377-400, 2013.

④ Boni V, Zarate R, Villa JC, Bandrés E, Gomez MA, Maiello E, Garcia-Foncillas J, Aranda E. Role of primary miRNA polymorphic variants in metastatic colon cancer patients treated with 5-fluorouracil and irinotecan. *Pharmacogenomics J.*, 44: 429-36, 2011.

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)

[学会発表] (計 9 件)

① Tokumitsu S, Fukami T, Nakajima M, Post-transcriptional regulation of human AADAC by miR-222-3p, 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日, タワーホール船堀 (東京)

② Senshu M, Nakano M, Fukami T, Nakajima M, Potential of human miR-316-5p as a master regulator of oxidative stress, 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日, タワーホール船堀 (東京)

③ 中島美紀, microRNA と薬物動態・医薬品毒性との関わり, 広島大学特別講義, 2017 年 6 月 2 日, 広島大学 (広島)

④ 中島美紀, 薬物応答性・医薬品毒性を制御する microRNA, 日本ベーリンガーインゲルハイム医薬研究所講演会, 2017 年 3 月 3 日, 日本ベーリンガーインゲルハイム神戸医薬研究所 (神戸)

⑤ 中島美紀, 毒性予測および個別化医療への microRNA バイオマーカーの利用, 薬物動態談話会第 39 回年会, 2016 年 11 月 10 日, オークラクトシティ浜松, (浜松)

⑥ 中島美紀, 薬物応答性・医薬品副作用と microRNA, 国立医薬品食品衛生研究所特別講演会, 2016 年 9 月 16 日, 国立医薬品食品衛生研究所, (東京)

⑦ 中島美紀, 薬物応答または副作用予測とマイクロ RNA, 薬物動態談話会第 38 回年会, 2015 年 11 月 30 日, オークラクトシティ浜松, (浜松)

⑧ Katayama K, Gotoh S, Fukami T, Ishida H, Kubota Y, Kusumoto S, Fujita K, Sasaki Y, Nakajima M, Comprehensive analysis of miRNA-variants in Japanese healthy subjects, non-small cell lung carcinoma and colorectal cancer patients, 日本薬物動態学会第 30 回年会,

2015年11月12日, タワーホール船堀(東京)

- ⑨ 中島美紀, 医薬品毒性に関わる
miRNA-SNP 網羅的解析, 日本薬物動態学
会第30回年会, 2015年11月12日, タワ
ーホール船堀 (東京)

[その他]

ホームページ等

[http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/
index.html](http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 美紀 (NAKAJIMA Miki)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号: 70266162

(2) 分担研究者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

片山浩樹 (Katayama Koki)

中嶋志門 (Nakashima Shimon)