

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18961

研究課題名(和文)5-FU系抗癌剤の副作用症例における先天性ピリミジン代謝異常症の診断

研究課題名(英文)Diagnosis of pyrimidine degradation disorder in patients with severe 5-FU side effect

研究代表者

中島 葉子(NAKAJIMA, Yoko)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：70598309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：5-FU系抗癌剤投与により副作用を呈した症例の尿と血液を使用して、ピリミジン代謝異常症の診断を行った。UPLC-MS/MSを用いて尿中のピリミジン代謝物質を定量し、その分析パターンからジハイドロピリミジンデヒドロゲナーゼ(DPD)欠損症、ジハイドロピリミジナーゼ欠損症、 γ -ウレイドプロピオナーゼ欠損症を鑑別した。末梢血単核球中DPD酵素活性測定法を確立し、尿中ピリミジン分析で異常を示さなかった症例で、単核球中DPD活性がコントロールの20%未満であるDPD酵素の部分欠損症を診断した。尿中分析と酵素活性測定を組み合わせることにより5-FU副作用例におけるピリミジン分解異常症の診断が可能であった。

研究成果の概要(英文)：Pyrimidine degradation disorder was diagnosed using urine and blood sample from the patients who presented severe 5-FU side effect. Determination of pyrimidine and pyrimidine metabolite in urine was performed by UPLC-MS/MS. The diagnosis of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency, dihydropyrimidinase(DHP) deficiency, γ -ureidopropionase(UP) deficiency, was made based on the pattern of the result of pyrimidine metabolite analysis. The stable method of DPD activity in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was established. Decreased DPD activity of 20% of control was detected in the patients with normal urinary pyrimidine metabolite analysis. Our procedure of screening test for pyrimidine degradation disorders was successfully worked so it is expected to expanding screening test before 5-FU administration.

研究分野：先天代謝異常症

キーワード：ピリミジン代謝異常症 尿中ピリミジン代謝物分析 5-フルオロウラシル 薬物代謝スクリーニング
UPLC-MS/MS DPD酵素活性測定

1. 研究開始当初の背景

先天性ピリミジン代謝異常症は、ウラシル、チミンを分解する過程に先天性酵素欠損を有する疾患群でジヒドロピリミジン脱水素酵素 (DPD) 欠損症、ジヒドロピリミジナーゼ (DHP) 欠損症、及び α -ウレイドプロピオナーゼ (UP) 欠損症が存在し¹⁾(図 1)、痙攣、精神発達遅滞、小頭症、自閉症など多彩な臨床症状を示すことが知られている。これらの症状は重症度もさまざまに欠け、簡便な検査法が無いことから診断が難しく、原因不明の神経疾患などとして経過観察されている例も多数あることが予想される²⁾。

5-FU はウラシルと類似構造を持つため、その異化代謝も上述の代謝酵素が担っている。そのためピリミジン代謝異常症患者が 5-FU を服用すると、代謝阻害のため 5-FU の血中濃度が上昇し、骨髓機能抑制などの重篤な副作用が発生する場合があります、特に無症状例の場合には、副作用発現が初発症状になる場合もある。ピリミジン代謝異常症のうち DPD 欠損症は、5-FU 系抗癌剤の投与時に致命的/重篤な副作用を呈することが知られており³⁾、添付文書に使用上の注意として記載されている。しかし、簡便なスクリーニング法がなく疾患認知度が低いため 5-FU 副作用を呈していても正確に診断されていない場合や無症状例のため知らずに放置されている症例が多く存在すると考えられる。これまでに申請者らは、超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (UPLC-MS/MS) を用い、尿中ピリミジン代謝産物を一斉に定量し、その定量値からピリミジン代謝異常症の 3 疾患を鑑別するスクリーニングの方法を開発し報告した⁴⁾。また、我々は 2009 年にピリミジン分解経路の 3 番目酵素である UP 欠損症が新生児マススクリーニングのパイロットスタディーで 6000 出生に 1 例と高頻度で発見されたことから⁵⁾、その後、国内で生化学的診断された UP 欠損症全例の遺伝子検査を施行

し、責任遺伝子 *UPB1* に R326Q 変異を高頻度に認め、保因者頻度が約 2%であることを発見した⁶⁾。R326Q 変異と新規遺伝子変異における HEK293 細胞を用いた発現実験を行い、R326Q 変異蛋白の著明な活性低下を確認した⁶⁾。以上より、UP 欠損症では無症状例が多く存在し、日本での疾患頻度が比較的高いことから、5-FU 投与によって副作用が発現した患者の尿中ピリミジン代謝物を定量し、DPD 欠損症だけではなく DHP 欠損症、UP 欠損症を含めたスクリーニング検査をおこなうことで、5-FU による副作用発現とピリミジン代謝異常症の関連を把握する。

2. 研究の目的

5-FU 投与による重篤な副作用発現事例とピリミジン代謝異常症の関連を明らかにする。ピリミジン代謝酵素のうち

DPD は 5-FU を直接代謝する酵素であり (図 2)、米国において、DPD 欠損症患者への 5-FU 投与により重度の白血球減少、血小板減少、口内炎などの副作用を示した例が報告された³⁾。日本人でも 5-FU 投与後、重篤な副作用を呈した症例で DPD 欠損症が発見されており、死亡例も報告されている⁷⁾。DHP および UP は 5-FU の代謝物であるジヒドロ-5-FU や α -フルオロ- β -ウレイドプロピオン酸を代謝する

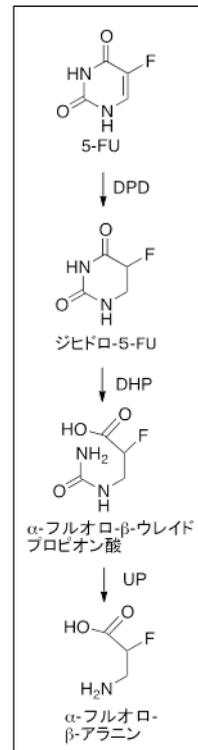


図2 5-FUの代謝経路

酵素であるが、これら酵素の欠損症患者においても 5-FU 代謝が遅延し、血中濃度上昇が予想される。

実際 DHP 欠損症患者における大腸癌の治療中に重篤な副作用を呈し、透析にて救命された例が報告された⁸⁾。UP 欠損症患者に関しては、これまでに 5-FU による重篤な副作用を発生し

た例は報告されていないが、UP 欠損症患者においてはウラシルの代謝遅延を認めるため、5-FU 投与で副作用を起こす可能性が考えられる。また、UP 欠損症は無症状例が非常に多く、見過ごされている例が非常に多いと考えられる⁶⁾。以上から、DPD、DHP、UP の各酵素欠損と5-FU の副作用発生状況を明らかとしピリミジン代謝異常症患者における5-FU 副作用発生を回避できるようにする。

参考文献

- 1) Webster DR *et al.* *The metabolic & molecular bases of inherited disease 8th edition*, 2663-2702. (2001)
- 2) 伊藤哲哉ら 痛風と核酸代謝. **27**, 101-105. (2003)
- 3) Tuchman M *et al.* *N. Eng. J. Med.* **313**, 245-249. (1985)
- 4) 前田康博ら. *JSBMS Letters*, **40**, 4-10 (2015)
- 5) Kuhara T *et al.* *J. Mass. Spectrom.* **44**, 214-221. (2009)
- 6) Nakajima Y *et al.* *J Inherit Metab Dis* **37**: 801-812. (2014)
- 7) Kouwaki M *et al.* *Clin. Cancer Res.* 2999-3004. (1998)
- 8) Hiramatsu M *et al.* *PLoS One* **10** e0124818. (2015)

3. 研究の方法

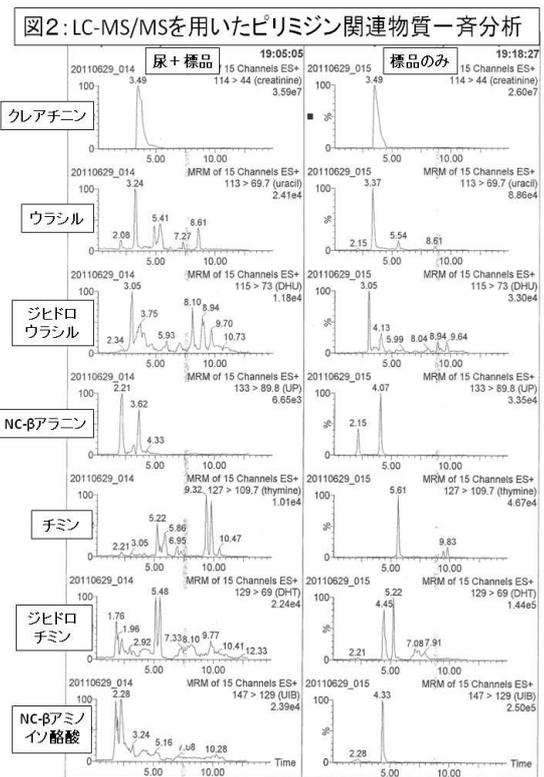
HPLC-MS/MS を用いたスクリーニングから遺伝子診断による確定診断に至る総合的症例発見システムの構築

(1) 5-FU 系抗癌剤投与中に副作用発現のために投薬量を減量したり、投与中止となった患者の尿を採取しピリミジン分析を施行する。分析に使用する尿検体は、分析施行するまで冷凍尿又は尿濾紙として保存する。

(2) UPLC-MS/MS によるピリミジン代謝産物の一斉定量法によるスクリーニング研究
ピリミジン代謝異常症一斉分析のためには GC/MS を用いたウレアーゼ処理法による代謝プロファイル検査が有用で、これまでの症例はほとんどこの方法で発見されているが、検体処理、測定に時間がかかること、コストが

かかること、著しく多数のピークが出現するためその分析、解釈が複雑で、多数の検体への応用は困難である。

申請者らはこれまでに、UPLC-MS/MS によるウラシル、チミンおよびこれらの代謝産物一斉定量を開発し報告しており¹⁾、この方法に5-FU およびその代謝産物を加え、これらの物質の一斉分析法を確立する。各物質を MS/MS で検出するためのパラメーターを決定する。各代謝産物を MS/MS のみで分離することは不可能であるため、液体クロマトグラフィーを利用し、クロマトグラムによる分離分析を行う。液体クロマトグラフィーは、高分解能かつ高速で分析可能な超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)を使用する。分析対象物質を一斉分析するために UPLC に用いるカラム、移動相を検討し、定量するうえで最適なクロマトグラムを得る。分析精度を確認し、定量法を確立する。検体は尿を利用するため、除タンパクフィルターによって前処理する。前処理後の検体を UPLC-MS/MS で分析し各種代



謝産物の濃度を決定する。

(3) 遺伝子診断による確定診断

尿中ピリミジン分析で陽性と判定された患者に対し、同意が得られた場合に遺伝子診断で確定診断を行う。DPD 欠損症、DHP 欠損症、及び UP 欠損症それぞれの責任遺伝子である DPYD、DPYS、UPB1 をサンガー法でシークエンスする。

(4) 酵素活性測定法の検討および活性測定

ピリミジン代謝異常症の診断を確定するための酵素活性測定法を検討する。スクリーニングでは一過性に代謝産物が上昇した場合などで偽陽性の検体が検出されることも考えられる。また、遺伝子検査で保因者と判定された場合や軽症変異を有している場合には、代謝機能の評価として酵素活性測定が有用である。共同研究を継続しているアムステルダム大学の Dr. Van Kuilenburg や研究協力者：名古屋市立大学 薬学部、前田康博らと共に DPD、DHP、及び UP 酵素活性測定法を検討する。これまでに申請者らはリンパ球を用いた有機酸代謝異常症の酵素活性測定法を開発し報告した²⁾。この方法をピリミジン代謝異常症に応用する。以上の結果から、ピリミジン代謝異常症と 5-FU 投与による副作用発現の関連を把握し、将来的には 5-FU 投与前にスクリーニングをおこない、ピリミジン代謝異常症患者における 5-FU の重篤な副作用発生を回避することを目標にする。

参考文献

- 1) 前田康博ら. *JSBMS Letters*, 40, 4-10. (2015)
- 2) Maeda Y *et al.* *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 5281-5286 (2015)

4. 研究成果

5-FU 関連抗癌剤投与により副作用を呈した症例の尿と血液を用いて、ピリミジン代謝異常症を診断した。UPLC-MS/MS を用いて尿中のピリミジンおよびその代謝物質を 6 種類同定、定量し、その分析パターンから、ジハイドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (DPD) 欠損症、ジハイドロピリミジナーゼ (DHP) 欠損症、

-ウレイドプロピオナーゼ (UP) 欠損症を鑑別した。コントロールに対し尿中ウラシルおよびチミンが高濃度である場合には DPD 欠損症、ジヒドロウラシルおよびジヒドロチミンが高濃度であれば DHP 欠損症、-ウレイドプロピオン酸および -ウレイド酪酸が高濃度であれば UP 欠損症についてそれぞれ陽性と判断した。

末梢血単核球中 DPD 酵素活性測定系については、患者及び健常人の血液からリンパ球を分離し、超音波ホモジナイザーで粉砕し酵素液としこれを基質と *in vitro* で反応させ、生成物の濃度を UPLC/MS/MS 法により定量した。患者と健常人での生成物の生成比から患者の酵素活性値を算出する方法を用いた。この反応における基質濃度、リンパ球数、反応時間及び反応温度など反応条件を検討し最も効率よく反応が進行する条件を検討し、安定して測定できる方法を確立した。尿中ピリミジン分析で異常を示さなかった症例で、単核球中 DPD 活性がコントロールの 20% 未満まで低下している症例、すなわち DPD 部分欠損症を診断できた。尿中分析と酵素活性測定を組み合わせることにより、ピリミジン分解異常症の診断が可能であった。

遺伝子検査については尿中ピリミジン分析で陽性と判断された症例がなかったため、5-FU 副作用症例では遺伝子解析を行うことはできなかった。しかし、本研究でセットアップした技術を用いて、小児期の神経症状を来した症例解析し、4 例の DHP 欠損症、1 例の UP 欠損症の遺伝子診断を行った。本欠損症の臨床症状は無症状からけいれんまで様々であるが、神経症状を呈した症例に対して、尿中ピリミジン分析を行い、本欠損症を生化学的に証明し、さらに遺伝子検査で確定するという流れを示すことができた。

今回の検討では 5-FU の副作用を呈した症例数が少なく DHP 欠損症、UP 欠損症における 5FU 副作用発現頻度についての検討が難しかった。

ピリミジン代謝異常症の尿と血液を用いた診断方法は確立できており、また遺伝子解析についてもセットアップすることができた。今後も症例数を重ねることで、日本人における5-FU副作用症例に対して、確実な診断を行うとともに、欧米症例との遺伝子変異の比較、遺伝子型表現型関連なども比較検討していく。

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 2 件)

(1) A Japanese case of -ureidopropionase deficiency with dysmorphic features.

Akiyama T, Shibata T, Yoshinaga H, Kuhara T, Nakajima Y, Kato T, Maeda Y, Ohse M, Oka M, Kageyama M, Kobayashi K.

Brain Dev. 2017 Jan;39(1):58-61.

doi: 10.1016/j.braindev.2016.08.001. 査読あり

(2) Dihydropyrimidinase deficiency in four East Asian patients due to novel and rare DPYS mutations affecting protein structural integrity and catalytic activity.

Nakajima Y, Meijer J, Dobritsch D, Ito T, Zhang C, Wang X, Watanabe Y, Tashiro K, Meinsma R, Roelofsen J, Zoetekouw L, van Kuilenburg ABP.

Mol Genet Metab. 2017 Dec;122(4):216-222.

doi: 10.1016/j.ymgme.2017.10.003. 査読あり

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 葉子 (NAKAJIMA, Yoko)

藤田保健衛生大学・医学部小児科学・講師
研究者番号：70598309

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()