

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08946

研究課題名(和文) ゲノム薬理的解析とプロテオーム解析を用いた薬剤性中枢神経障害の病態解明

研究課題名(英文) Analysis for pathogenesis of drug-induced neurotoxicity by using pharmacogenomics and proteomics technique.

研究代表者

柳町 昌克 (Yanagimachi, Masakatsu)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00608911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：メソトレキセート(MTX)脳症を発症した1症例のMTX脳症発症前後の髄液と大量MTX療法を施行した4症例の治療前後の髄液のプロテオミクス解析を施行し、MTX脳症発症前後で100倍以上上昇する髄液タンパク質を6種類同定した。4例の大量MTX療法の前後の検体で、これらは上昇していることを確認した。それらのタンパク質についてELISA法により、多数例の検体において、薬剤性中枢神経障害のバイオマーカー候補タンパク質の推移と臨床症状や画像所見との関連性の検討を行った。一つのタンパク質は大量MTX療法/MTX髄腔内投与を重ねるごとに髄液濃度が上昇し、MTXの白質障害のマーカーとなりうることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは薬剤性中枢神経障害を発症した患者さんの髄液で増加するタンパク質をプロテオーム解析で同定しました。我々が発見したタンパク質は、薬剤が原因の中枢神経障害である白質脳症などの中枢神経のダメージを予測するマーカーとなる可能性があります。このマーカーが治療中に上昇するようであればその結果は、治療計画の変更や画像フォローアップ方法の工夫に役立つ可能性があり、薬剤性中枢神経障害の予防や症状軽減に役立つと考えられます。そしてそのような中枢神経障害を起こしやすい遺伝学的特徴の有無を検討しています。

研究成果の概要(英文)：We performed proteomic analysis of spinal fluid before and after onset of methotrexate (MTX) leukoencephalitis or high-dose MTX therapies. We identified 6 proteins more than one hundredfold increasing after MTX leukoencephalitis in one patient. These proteins also increased after high-dose MTX therapies in 4 patients. We validated these finding in several patients who were treated with high-dose MTX therapies or intrathecal MTX therapies by using ELISA and studied the association between spinal fluid level of these proteins and clinical symptoms and imaging findings. We found that the one protein may be a biomarker for leukoencephalitis, because repeating high-dose MTX therapies or intrathecal MTX therapies led to a proportional increase in the concentration of the protein in spinal fluid

研究分野：臨床薬理学

キーワード：薬剤性中枢神経障害 プロテオーム ゲノム薬理 抗がん剤

## 1. 研究開始当初の背景

Methotrexate(以下 MTX)は、小児の急性リンパ性白血病(以下 ALL: acute lymphoblastic leukemia)の治療の key drug であり、特に中枢神経白血病的の予防や治療に重要な役割を果たす。中枢神経系(髄液)への MTX の移行のために大量 MTX 療法(2-5g/m<sup>2</sup>/24-36h 持続静注)が施行される。MTX 関連白質脳症は、MTX 投与後 2-14 日後に生じ、脳卒中様症状や痙攣などを引き起こし、頭部 MRI 画像で特徴的な所見を示す疾患である。時に MTX 髄腔内投与(髄注)療法後にも MTX 関連白質脳症を発症することもある。

MTX 関連白質脳症の発症機序は、中枢神経の葉酸代謝の破綻やホモシステインを始めとした物質の神経毒性が原因と推定されているが、いまだ解明されていない(Pediatr Blood Cancer 2009;52(1):26-32)(JCO 2003;21(16):3084-3091)。

発症頻度は大量 MTX 療法施行例の 3-15%で、画像所見は 40%の症例で残存し、後遺障害に関するまとまった報告はない。しかし治療中に MTX 関連白質脳症が生じると ALL に対する治療を一時(時に長期間)中止せざるを得ない状況となり、MTX 関連白質脳症による治療中断は ALL に対する治療強度を弱めることになり再発に繋がらう。従って MTX 関連白質脳症の病態解明と発症予防と発症リスクの同定が望まれる。特に MTX 関連白質脳症発症の遺伝的リスク因子や経時的に変化する白質脳症発症予想バイオマーカーが同定できれば治療内容の変更などを含め、より安全でより有効な ALL のテーラーメイド治療法の開発に繋がると考えられる。

バイオマーカー研究においては、プロテオーム解析技術の進歩があり、Data-independent analysis (DIA)法などの少量の検体量で複数検体の解析を行えるようになり、本研究にも DIA 法によるプロテオーム解析を応用することとした。

## 2. 研究の目的

MTX 関連白質脳症の遺伝的リスク因子の抽出と、MTX 関連白質脳症発症症例や大量 MTX 療法や MTX 髄注療法前後の血清や髄液をプロテオーム解析し、蛋白質濃度の変動に有意差が認められた蛋白質の発現・機能解析を行うことで MTX 関連白質脳症の病態解明を行うことを研究の目的とする。

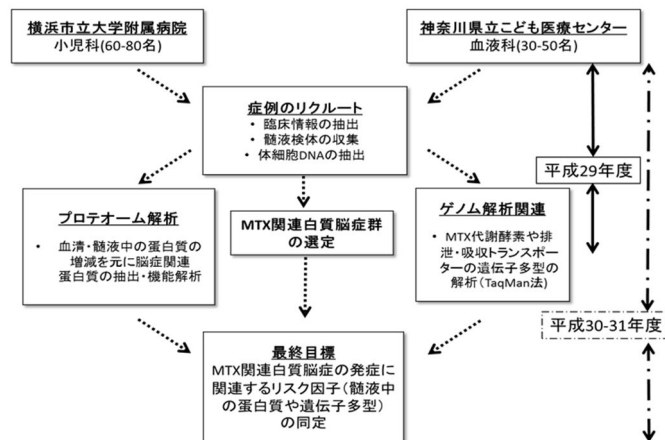
## 3. 研究の方法

東京医科歯科大学附属病院小児科、横浜市立大学附属病院小児科および神奈川県立こども医療センター血液・再生医療科で大量 MTX 療法や MTX 髄注療法を施行された急性リンパ性白血病や脳腫瘍などの患者の髄液・血清を通常の髄液検査や血液検査の際に採取する。

- ・患者の診療録や検査所見から MTX 関連白質脳症の有無を評価し 2 群に分類する。
- ・ MTX 関連白質脳症の有無の

2 群の患者の大量 MTX 療法施行中とそれ以外の時点の髄液をプロテオーム解析し、白質脳症関連蛋白質を抽出する。それらの蛋白質の機能解析を行う。またアデノシンの代謝酵素や排泄・吸収 transporter の遺伝子多型に着目し候補遺伝子解析の手法を用いて、MTX 関連白質脳症の発症と関連を認める遺伝子多型を同定する。

図1 研究フォローチャート

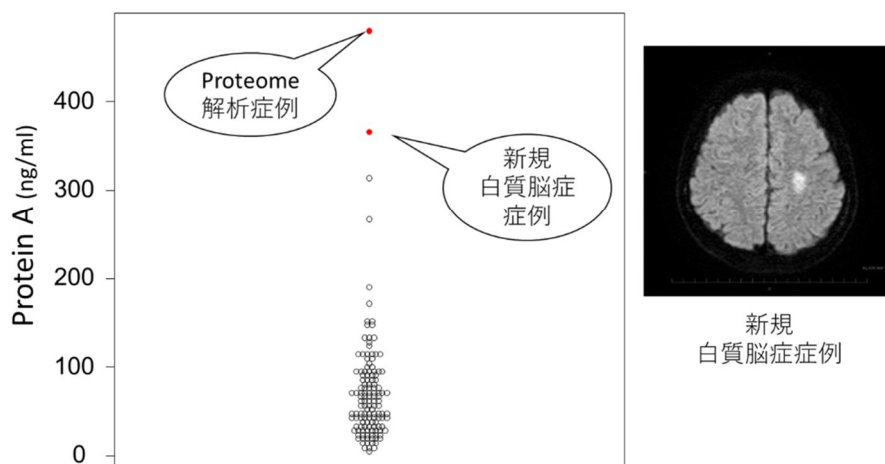


#### 4. 研究成果

本研究の3か所の共同研究施設において、中枢神経系への化学療法(大量MTX療法やMTX髄注療法など)を施行した症例について、研究期間中に58症例342ポイントでの髄液検体と臨床データの蓄積を行った。

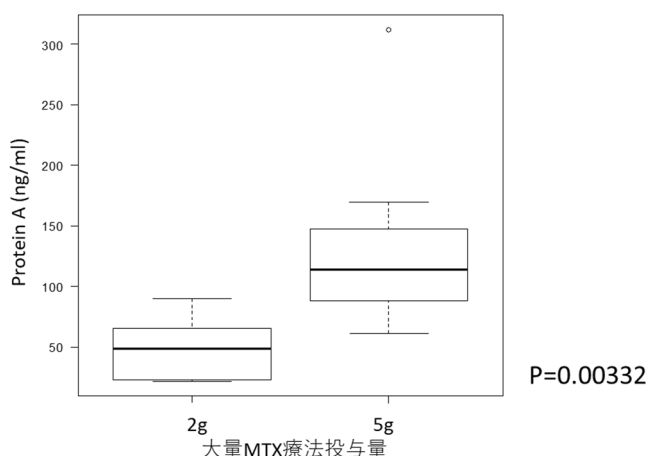
それらの症例の中で、MTX関連白質脳症を発症した1症例のMTX白質脳症発症前後の髄液のDIA法によるプロテオミクス解析を施行し、1000種類以上の蛋白質に対する14000種類以上のペプチドを検出した。その中でMTX白質脳症発症前後で100倍以上上昇する髄液蛋白質を6種類同定した。大量MTX療法を施行した4症例の治療前後の髄液のプロテオミクス解析結果でも再現性をもって、これらの蛋白質は上昇していることを確認した。これらの蛋白質の一部はすでに中枢神経損傷との関連性が報告されているものであり、解析方法の妥当性は確かであると推察される。

図2 Protein Aの髄液濃度分布



それらの蛋白質についてELISA法により、多数例の検体において、これら6種類の候補蛋白質の髄液濃度の推移と臨床症状や画像所見との関連性の検討を行ったところ、一つの蛋白質(Protein A)は大量MTX療法/MTX髄注療法を重ねるごと、また大量MTX療法の投与量に相関して、髄液濃度が上昇しており、MTXの白質障害のマーカーとなりうることを確認した(図2,3)。

(図3) Protein Aは大量MTXの投与量(2g/5g)で髄液濃度に差がある



MTX以外にも中枢神経障害の副作用を示す抗がん剤の投与前後や白質脳症に対してステロイドパルス療法を施行した前後の髄液のプロテオミクス解析も終了しており、MTX投与前後のプロテオミクスのプロファイルと比較することで共通の障害機序と薬剤特異的な障害機序についての検討も継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高木 正稔  (Takagi Masatoshi)  (10406267)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授    (12602)	
研究分担者	相田 典子  (Aida Noriko)  (20586292)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・部長    (82729)	
研究分担者	竹内 正宣  (Takeuchi Masanobu)  (60515477)	横浜市立大学・医学部・助教    (22701)	
研究分担者	後藤 裕明  (Goto Hiroaki)  (90347295)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・部長    (82729)	