

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06756

研究課題名(和文) 小児白血病におけるメルカプトプリンによる治療のDNA中代謝物濃度による個別化

研究課題名(英文) Personalized therapy for mercaptopurine by measuring metabolites in DNA in children with leukemia

研究代表者

田中 庸一 (Tanaka, Yoichi)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・主任研究官

研究者番号：40525341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性リンパ性白血病の維持療法で用いる6-メルカプトプリン(6-MP)を患者個々に合わせて使用するために、赤血球や白血球中のDNAに取り込まれた6-MP代謝物濃度を測定し、濃度の違いに影響を及ぼす因子や6-MPの作用を発現する6-MP代謝物濃度について検討した。細胞を用いた検討では、DNAへ取り込まれた6-MP代謝物量と細胞死に関連があった。6-MPが投与された患者では、DNAに取り込まれた6-MP代謝物量はNUDT15遺伝子多型の影響を受けていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児急性リンパ性白血病における6-MPによる治療の感受性には、DNAに取り込まれた6-MP代謝物量に関連している。また患者の持つNUDT15遺伝子多型によって、DNAへの取り込まれやすさが異なる。患者の持つNUDT15遺伝子多型および6-MP代謝物濃度の測定を併せて検討する事で、治療効果が期待できるが副作用が少ない患者個々に合わせた6-MPによる治療を提供することができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To adjust 6-mercaptopurine (6-MP) therapy for children with acute lymphoblastic leukemia, we measured 6-MP metabolite in blood cells and DNA during maintenance therapy and evaluated the association among 6-MP metabolite levels, genetic variations of 6-MP metabolism enzymes and 6-MP dose. 6-MP metabolite levels were associated with 6-MP intolerance in each cells. And 6-MP metabolite level inserted into DNA was influence on NUDT15 genetic variants.

研究分野：医療薬学

キーワード：6-メルカプトプリン 白血病 小児 DNA deoxy thioguanosine NUDT15

1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病 (ALL) は小児がんの中で、最も発症頻度が高く、我が国では年間 600 人程度の新規患者が発生している。小児 ALL は薬物療法への感受性が高く、先進国では 90% 程度の長期生存率が得られるようになっている。一方で、薬物療法による有害事象の発現により治療の中断や、継続不能になることがあり、有害事象の軽減は小児 ALL のさらなる治療成績の向上に不可欠である。小児 ALL の治療は寛解導入療法、強化療法、維持療法の各治療期において、複数の薬剤が併用して用いられる。この中で維持療法は 6-メルカプトプリン (6-MP) とメトトレキサート (MTX) によって約 2 年間の治療が必要であり、毒性や治療効果の程度により、主に 6-MP 投与量の変更が必要となる。

近年、ゲノム薬理学の進歩により、患者の 6-MP の感受性に遺伝子多型が関連することが明らかになってきている。6-MP による毒性は 6-MP の代謝酵素の活性を低下させる遺伝子多型を持つことで頻度が高くなり、重篤化する事が報告されている。欧米人では Thiopurine S-methyl transferase (TPMT) が低下する *TPMT* 遺伝子多型がリスク因子となり、アジア人では Nudix Hydrolase15 (NUDT15) の活性が低下する *NUDT15* 遺伝子多型が毒性のリスク因子となる。

さらに、日本人小児 ALL の治療に用いられる 6-MP の標準投与量は 40~50 mg/m²/day であり、欧米人に対する標準投与量の 75 mg/m²/day に比べると少ない。一方で、日本人と欧米人では治療成績が同等であり、日本人では治療に用いる薬剤の感受性や薬物動態が異なる可能性がある。

2. 研究の目的

これまでに小児 ALL に対する維持療法において、患者の人種や遺伝要因と薬剤感受性の関連性について検討されてきている。しかし、治療を受けている患者の 20% 程度は、これまでに報告されている因子では薬剤感受性が説明できない。そのため、6-MP の作用部位である DNA 中の 6-MP 代謝物濃度と作用発現の関連性を明らかにすることによって、小児 ALL の治療の国際比較や国際標準化に繋がる。本研究では、小児 ALL の 6-MP による維持療法において、DNA 中の 6-MP 代謝物濃度の治療域を明らかにし、投与方法の個別化に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 6-MP 代謝物測定方法の確立

6-MP は体内で代謝されることによって、細胞内で thioguanine nucleotides (TGNs) となり、DNA や RNA に取り込まれることによって細胞毒性を示す。TGNs うち、thioguanosine triphosphate が蓄積する事で DNA や RNA に取り込まれる量が増加する。本研究では、細胞の DNA に取り込まれた deoxy thioguanosine (dTG) 量と赤血球細胞内の 6-MP 代謝物である TGNs および 6-methyl mercaptopurine (6-MMP) riboside 濃度を超高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計 (UHPLC-MS/MS) で測定する方法を確立した。

DNA に取り込まれた deoxy thioguanosine 量の定量

培養細胞または患者より得た buffy coat より DNA Mini Kit (キアゲン) を利用して DNA を抽出し、P1 ヌクレアーゼおよび alkaline phosphatase を加えた酵素処理によって DNA を分解・脱リン酸化して得られた dTG を UHPLC-MS/MS で測定を行った。内標準物質としては、Methylmercaptopurine-d3 (MMP-d3) を用いた。dTG の測定濃度範囲は、0.125~20 pmol/μL で行い、DNA 1 μg 当たりの量に換算した。

赤血球中 6-MP 代謝物濃度の定量

患者より得た末梢血を遠心分離し、赤血球層を生理食塩液で洗浄した後、-80 で一晩以上静置した後に用いた。赤血球に過塩素酸を加えて除タンパクを行い、上清を加熱して TGNs および 6-MMP riboside を加水分解して thioguanine (TG) および 6-MMP として、UHPLC-MS/MS で測定した。内標準物質は、TG¹³C¹⁵N と MMP-d3 を用いた。測定濃度範囲は TG 0.05~8 μg/mL、6-MMP 0.5~80 μg/mL で行い、濃度は単位赤血球 (8 × 10⁸RBC) 当たりの量に換算した。

(2) 遺伝子多型解析

NUDT15 遺伝子多型解析

培養細胞および患者末梢血より抽出した DNA に *NUDT15* 遺伝子の Exon1 または Exon3 のプライマーを加えて PCR で増幅して得た PCR 産物をサンガーシーケンスで塩基配列を決定した。

6-MP 代謝に関連する遺伝子多型

6-MP の薬物動態に影響を及ぼすことが報告されている遺伝子多型として 6-MP の代謝酵素である *TPMT*、*ITPA* および薬剤排泄トランスポーターである *ABCC4* の遺伝子多型について、TaqMan Probe 法を用いて多型解析を行った。

(2) Cell line を用いた検討

B 前駆細胞性急性リンパ性白血病 (BCP-ALL) 細胞より樹立した 84 株の Cell line を 6-MP または 6-TG の異なる濃度培養液で培養し、AlamarBlue 法により、各細胞株の IC50 を算出した。6-MP または 6-TG を添加した培養液で培養した細胞株より DNA を抽出し、各細胞の DNAdTG 濃度の測定を行った。各細胞の *NUDT15* 遺伝子多型解析を行い、*NUDT15* 遺伝子多型とチオプリン感受性および DNAdTG との関連性について検討を行った。

(3) 小児 ALL 患者における 6-MP 代謝物濃度

ALL に対する維持療法を行っている患児より末梢血 2~4 mL を得た。得られた末梢血を遠心分離し、Buffy coat および赤血球を分取した。Buffy coat より DNA を抽出し、DNAdTG 測定および 6-MP 代謝関連遺伝子多型の解析に用いた。赤血球は 6-TGNs および 6-MMP の測定に用いた。患者情報として、維持療法中の 6-MP・MTX の各投与量および臨床検査値について、収集した。

4. 研究成果

(1) Cell line を用いて 6-MP 代謝物濃度の薬剤感受性への影響に関する検討

84 株の BCP-ALL の細胞株について、チオプリンへの感受性と DNA 中代謝物との関連性を評価した。3 日間培養後の IC50 値は 6-MP 410 μM であったが、7 日間培養後の IC50 値は 0.25 μM と 3 日間培養の 1600 分の 1 であった。この濃度は、小児 ALL 患者の血中濃度 C_{max} 値の濃度範囲である 0.13~2.3 μM と同等であり、長期間の 6-MP への曝露が ALL に対する抗腫瘍効果に有用である事に関連していることを確認した。*NUDT15* 遺伝子多型はチオプリンの感受性に影響があるため、多型毎の 6-MP の IC50 値を比較した。3 日間培養で比較したところ、*NUDT15* bi-allelic 多型では、その他の genotype を持つ細胞株に比べて IC50 の中央値は低い傾向はあったが、統計的に有意な差はなかった。また、7 日間培養では *NUDT15* 多型を持つ細胞株では野生型の細胞株に比べて IC50 値が低値になる傾向があり、野生型と mono-allelic 多型では有意な差があった ($P < 0.01$)。

次に 6-TG 0.1 μM を添加した培養液で 2 日間、細胞株を培養し、DNA 中 dTG 量を測定した。*NUDT15* 多型を持つ数が増える事によって、DNAdTG 量は有意に増加した ($P < 0.05$)。また、0.2 μM を添加した培養液で 2 日間培養した細胞の DNAdTG は 6-MP を添加して 7 日間培養した際の IC50 値と有意な相関を示した ($r^2 = 0.23$, $P < 0.01$)。以上より、細胞株のチオプリン感受性には *NUDT15* 遺伝子多型が関連しており、その要因の 1 つとして DNAdTG 量が関係していることが示唆された。

(2) 患者検体を用いた 6-MP 代謝物濃度と臨床情報との関連性に関する検討

維持療法中の ALL 患児 15 例より、90 ポイントの末梢血を採取し、6-MP 代謝物濃度の測定を行った。*NUDT15* 遺伝子多型は、*1/*1、*1/*2、*1/*3、*3/*3 がそれぞれ 10 例、2 例、1 例、2 例であった。採血ポイントでの 6-MP 投与量の中央値は 45 (1.7-86.4) $\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ であった。DNAdTG の中央値は 215 (56-1040) $\text{fmol}/\mu\text{gDNA}$ であった。赤血球中 TGNs 濃度および MMP 濃度の中央値は、425 (10-1134) $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{RBC}$ および 20,882 (50-65,260) $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{RBC}$ であった。6-MP の投与量は DNAdTG、TGNs および 6-MMP 濃度と統計的に有意に相関していた ($P < 0.01$)。また、DNA-dTG 濃度と TGNs との濃度比は *NUDT15* 多型毎に異なっていた (Figure 1)。6-MP 投与量当たりの TGNs 濃度 ($\text{pmol} \cdot \text{m}^2/8 \times 10^8 \text{RBC} \cdot \text{mg}$) の中央値は *NUDT15* 野生型で 11.4、多型で 6.8 と有意に小さくなっていた。一方で、6-MP 投与量当たりの DNAdTG 量 ($\text{fmol} \cdot \text{m}^2/\mu\text{gDNA} \cdot \text{mg}$) は野生型で 5.7、多型で 10.5 と有意に大きくなっていた。これらの結果より、赤血球中の代謝物濃度および DNA への dTG の取込み量は 6-MP の投与量に相関しており、*NUDT15* 多型の影響で代謝物濃度の投与量に対する比が異なることが示された。また、*NUDT15* 多型を持つことで 6-MP の代謝物が DNA に取り込まれる量が増えることが示された。

次に 6-MP 代謝物濃度と臨床検査値との関連性について、検討を行った。赤血球 TGNs 濃度は、白血球数およびリンパ球数と統計的に有意な相関を示し、高濃度になることで、血球数は低値となっていた。DNAdTG 量は、リンパ球数と統計的に有意な相関を示していたものの、白血球数とは関連性を示さなかった。また赤血球中 6-MMP 濃度は

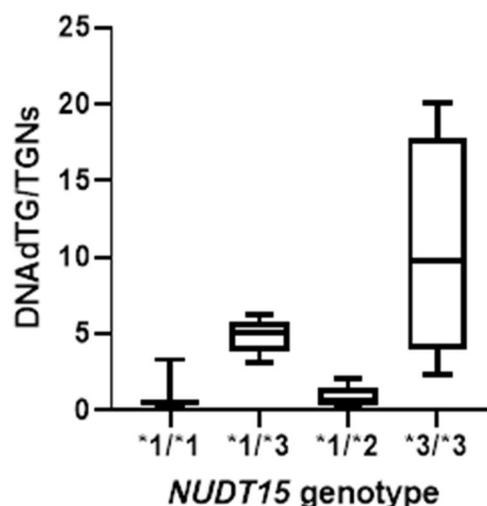


Figure 1 Association between DNAdTG and TGNs in *NUDT15* genotype

AST 値と有意な相関を示し、高濃度となることで AST は高値を示していた。

維持療法における 6-MP 投与量は、白血球数が 1500 ~ 3000/ μ L の範囲に入るように調節されている。範囲内に入っている採血点において、TGNs は $474 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ であり、3000/ μ L 以上では $289 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ RBC}$ であった。一方で、DNAdTG は範囲内 (1500 ~ 3000/ μ L) に入っている採血点において、 $208 \text{ fmol}/\mu\text{gDNA}$ であり、3000/ μ L 以上では $321 \text{ fmol}/\mu\text{gDNA}$ であった。しかし、*NUDT15* *3/*3 では TGNs および DNAdTG は、その他の遺伝子型に比べて低く、傾向が異なっていた。

本研究より、6-MP 投与量と DNAdTG 量は相関しており、6-MP 高用量では DNAdTG は高値を示す。投与量当たりの DNA への取込み量は *NUDT15* 遺伝子多型の影響があり、*NUDT15* 多型を持つことで、投与量当たりの DNAdTG 量は高くなることが明らかとなった。日本人 ALL 患者における DNAdTG は また、細胞株での検討より、低濃度の TG への 2 日間という短期間の曝露では、DNAdTG 量が高い細胞では、IC50 が低い事が示され、細胞の 7 日間曝露後のアポトーシスに DNAdTG が関連していることを示した。そのため、アポトーシスが起きる前には DNAdTG 量は増えていることが示唆される、6-MP で治療している患者においては、DNAdTG が高値になることで患者の血液中に存在する白血球は細胞死しやすくなっていると考えられる。今回の採血は 4 週間以上継続して治療が行われたポイントであり、DNA へ取り込まれた代謝物が細胞死を起こしやすい量に達していたとも考えられる。そのため、DNAdTG が高濃度では細胞が生存できないことから、血液毒性と DNAdTG との間には関連性が見られなかった可能性がある。維持療法中の DNAdTG 量は、小児 ALL の予後に影響を及ぼすことが北欧のグループより報告されている¹。日本人を含むアジア人種は、欧米人と比べて *TPMT* 遺伝子多型の頻度が低いが、*NUDT15* 遺伝子多型を持つ頻度が高い事が知られており、6-MP 代謝物と治療反応性との関連性が異なる可能性がある。ALL に対する 6-MP 代謝物の適切な濃度範囲を決定するためには、予後との関連性を検討する必要がある。今後、日本人小児 ALL を対象とした前向き研究において、6-MP 代謝物濃度と治療効果との関連性を検討する計画である。

< 引用文献 >

1. Nielsen SN, Grell K, Nersting J, Abrahamsson J, Lund B, Kanerva J, et al. DNA-thioguanine nucleotide concentration and relapse-free survival during maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukaemia (NOPHO ALL2008): a prospective substudy of a phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18:515-24.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Somazu S, Tanaka Y, Abe M, Kagami K, Harama D, Murakami Y, Watanabe A, Akahane K, Goi K, Moriyama T, Yang J, Inukai T
2. 発表標題 Association of NUDT15 gene polymorphism with cellular metabolism of thiopurine in BCP-ALL cell lines
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Somazu S, Tanaka Y, Thao N, Kagami K, Kasai S, Tamai M, Murakami Y, Watanabe A, Akahane K, Sato H, Kojika S, Goi K, Inukai T
2. 発表標題 Efficacy of mercaptopurine sensitivity test after long-term exposure of leukemia cells
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中庸一、小野林太郎、足洗美穂、細谷要介、櫻井彩子、渡邊敦、長谷川大輔、斎藤嘉朗
2. 発表標題 6-メルカプトプリン投与小児白血病患者におけるDNA中 deoxythioguanosineの定量と有害事象との関連性に関する検討
3. 学会等名 第141回日本薬学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	犬飼 岳史 (Takeshi Inukai)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------