

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890131  
 研究課題名（和文）  
 骨肉腫患者に使用したメソトレキセートの効果・副作用に影響する一塩基多型の検討  
 研究課題名（英文）  
 Single nucleotide polymorphism in folate related genes in patients with osteosarcoma  
 研究代表者  
 森本 裕樹（MORIMOTO YUKI）  
 岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
 研究者番号：00452574

## 研究成果の概要：

骨肉腫患者と健常人における葉酸代謝関連遺伝子である RFC1 と MTHFR の一塩基多型を検討し、日本人の骨肉腫患者では RFC1 の allele80 に AA を持つ群が有意に多いことを発見した。この一塩基多型が骨肉腫の発生に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、メソトレキセートによる治療を受けた骨肉腫患者において RFC1 の一塩基多型とメソトレキセート投与後の肝機能障害、MTHFR allele677 の一塩基多型と生命予後とに相関を認め、予後や副作用の予測に有用であると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,150,000	0	1,150,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,650,000	150,000	1,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟部腫瘍学、薬物代謝酵素・トランスポーター、薬剤感受性

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は予後不良の疾患として治療に苦渋していたが、メソトレキセート（MTX）、シスプラチン、ドキソルビチン、イフォマイドなどを組み合わせた多剤併用療法の導入により 5 年生存率は 70% 近くまで向上した。これらの薬剤のうち、MTX は葉酸代謝を抑制することにより抗腫瘍効果を発揮し、MTX の最高血中濃度が抗腫瘍効果と関連があるため、最高血中濃度をある一定以上に保つ必要があると考えられている。一方で、生体内で重要な葉酸代謝経路を阻害することから、経時的に MTX 血中濃度のモニタリングを行い、副作用の予防と軽減がなされている。他の薬剤と同様に、MTX 血中濃度の推移や副作用の出

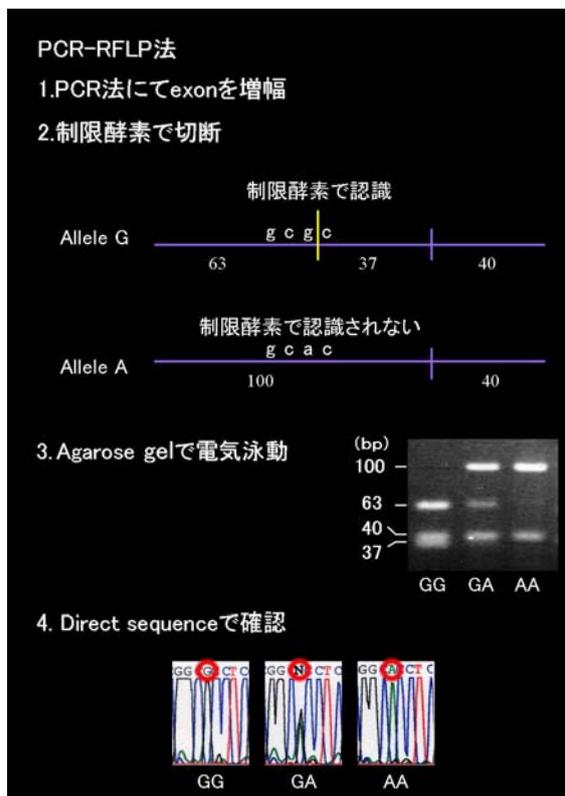
現には個体差があると思われ、蓄積してある経時的な血中濃度と副作用のデータを用いて、葉酸代謝経路における遺伝子の SNPs と関連を検討することを考えた。

## 2. 研究の目的

- (1) 当科で DNA サンプルを保管してあるすべての骨肉腫患者と健常人との間に葉酸代謝に関連する遺伝子群の SNPs を調べ、SNPs の発現頻度に差があるかを検討すること。
- (2) 骨肉腫患者における MTX を含む同一プロトコールで治療された患者の SNPs と MTX 投与後の血中濃度、副作用、抗腫瘍効果および予後との関連について検討すること。

### 3. 研究の方法

(1)1985年から2004年までに、当科において治療した骨肉腫症例のうち、あらかじめ同意を得た上でDNAを採取し保存している85例、およびコントロールとして健常人ボランティアのDNA150例を対象とした。葉酸代謝関連遺伝子のうち、RFC1 allele80、MTHFR allele 677 および1298のSNPsを検討した。目的領域の増幅をサーマルサイクラーによるPCRで行う。PCR産物が増幅されているのを電気泳動でバンドを確認した後、それぞれの部位に適した制限酵素を用いて、SNPs部位の切断を行う。切断されたPCR産物を電気泳動で確認し、SNPsの表現型を各サンプルについて確認した(PCR-RFLP法)。SNPsの表現型を確認するため、一部の症例では電気泳動したバンドの切り出しを行い精製後、シーケンスで表現型とバンドが一致しているのを確認した(図1)。



#### PCR-RFLPの条件

	RFC1 G80A	MTHFR C677T
Primers F	agcggTgagaagcaggl	lgaaggagaaggtgtctgcggga
R	tatcaccctactactctg	aggacggtgcgtagagtg
Tm (°C)	64	62
制限酵素	HhaI	HinfI
バンド長 (bp)	Allele G: 63, 37, 40 Allele A: 100, 40 (Shaw GM., 2002)	Allele C: 198 Allele T: 175, 23 (Yin G., 2004)

図1 SNPの確認

(2)骨肉腫患者と健常人におけるSNPの分布を集計し、この分布が統計学的に問題のないことを確認するために、Hardy-Weinberg平衡が保たれていることを検討した。集計されたSNPが患者群、健常人群の間で分布に差を認めるかを検討した。

(3)骨肉腫患者のMTX投与各回における副作用(肝機能障害、粘膜障害、腎機能障害、骨髄抑制)、経時的なMTX血中濃度をカルテより抽出し、集計した。また、手術時の提出標本の腫瘍壊死率と患者の予後(生死、再発・転移の有無)も同様に集計した。集められたデータを副作用についてはカイ二乗検定、血中濃度についてはstudent-t検定、予後についてはKaplan-Meier法を用いてSNPsの頻度との関連を検討した。健常人と骨肉腫患者のSNPsの頻度の差についてはHardy-Weinberg平衡判定を用いて検討した。

### 4. 研究成果

(1)PCR-RFLP法を用いてRFC1 A80G, MTHFR C677T, MTHFR A1298CのSNPを検出し、Hardy-Weinberg平衡が保たれているかを検討したところ、MTHFR A1298Cについてはコントロール群で保たれていなかったため、この系でのSNPの検出に問題がある可能性がある判断し、検討から除外した。

(2)日本人の骨肉腫患者ではRFC1の80 alleleにAAを持つ群が有意に多かった(オッズ比0.38、95%信頼区間0.19-0.77)(表1)。このことからRFC1のSNPが骨肉腫の発生機序に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。骨肉腫の発生には様々な遺伝子の関与が報告されてきたが、SNPの報告はこれまでなく、今回の結果が新たな骨肉腫の発生起源の解明につながることを期待される。

表1 患者と健常人におけるSNPの分布

		Number (%)		OR (95% CI)
		Cases	Controls	
RFC1	GG	18 (20)	54 (29)	1.00 (referent)
	GA	39 (42)	98 (51)	0.87 (0.48-1.65)
	AA	35 (38)	38 (20)	0.38 (0.19-0.77)
MTHFR	CC	32 (34)	38 (71)	1.00 (referent)
	C677T	CT	49 (53)	46 (86)
	TT	12 (13)	16 (16)	1.16 (0.53-2.58)

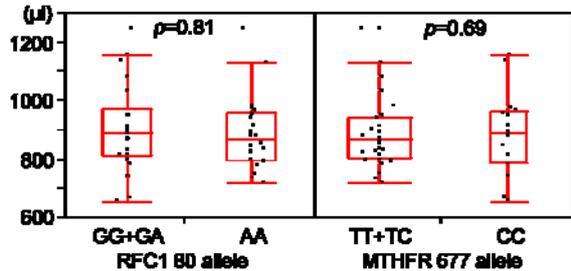
(3)MTXを用いたプロトコールで治療を受けた骨肉腫患者46人を対象にしてMTX投与後の血中濃度および副作用とSNPとの関連を検討した。また42人を対象に手術時の壊死率とSNPとの関連を検討した。肝機能障害grade3以上の出現頻度がRFC1の80alleleにAAを持つ群で有意に高かった(p=0.018)(表2)。MTX投与後の血中濃度、抗腫瘍効果とSNP

の間に関連を認めなかった(表 2、図 2)。肝機能障害はMTXの比較的多い副作用の一つであり、特定のSNPで肝機能障害の発生頻度が高かったことから、MTX投与時に肝機能障害の出現が予測しやすくなり、安全に投与するための指標となりえる。

表 2 腫瘍効果、肝機能障害と SNP

Variable	RFC1 80 allele		p	MTHFR 677 allele		p
	GG+GA	AA		TT+TC	CC	
<b>Histological response</b>						
Good	10	6		11	5	
Poor	11	15	0.20	17	9	0.82
<b>Times of Hepatic adverse effect grade &gt;=3</b>						
>=50%	8	15		17	6	
<50%	16	7	0.018	13	10	0.21
<b>Hepatic adverse effect grade 4</b>						
yes	6	10		11	5	
no	18	12	0.15	19	11	0.71

図 2 MTX 投与 6 時間後の血中濃度と SNP

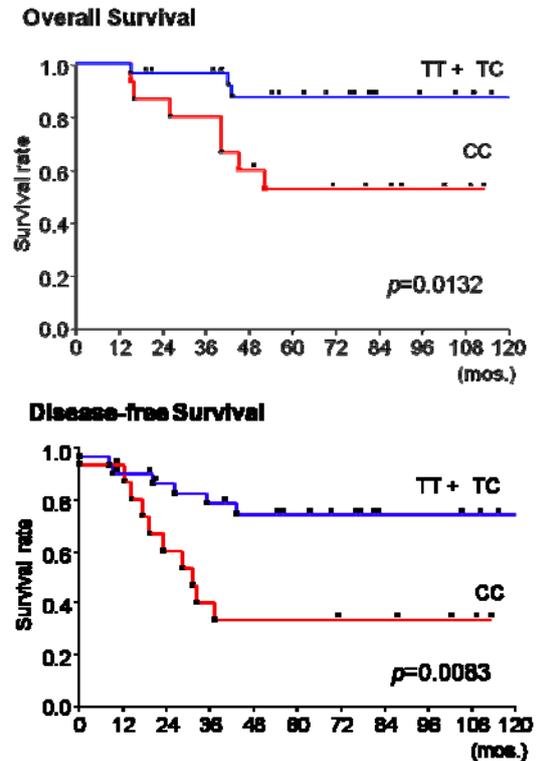


(4)MTXを含むプロトコルで治療した骨肉腫患者46人における予後とSNPの関連について検討した。MTHFR 677 alleleにCCを持つ群で全生存率(p=0.0132)、無病生存率(p=0.0083)ともに有意に予後が悪い結果であった(図3)。RFC1については予後の差を認めなかった。これまで骨肉腫の予後に関与するSNPの報告はなく、MTXを用いた治療における骨肉腫患者の予後を推測するのにMTHFR 677 alleleが有用である可能性が示唆された。

RFC1は葉酸とMTXを細胞内へと輸送するトランスポーターで、この遺伝子のSNPが骨肉腫と健常人で分布に差を認めたことは、MTXの大量療法が他の骨軟部腫瘍と異なり骨肉腫に有用であるという点からも非常に興味深い結果である。またMTXは葉酸代謝阻害剤として抗腫瘍効果を発揮するため、葉酸代謝酵素であるMTHFRのSNPが予後と関連することも興味深い。MTHFRのallele677にCCを持つ腫瘍細胞では、MTXの効果が阻害する機序が働くのであれば、allele677を変更することで、効果を上げたり、耐性を回避したりすることができる可能性がある。今回の研究では術前化学療法後の組織学的効果とSNPとの関連には有意差を認めなかったが、これはMTX単剤でなく、シスプラチンやアドリアマイシンを併用した効果をみて

いるからと考えられた。今後はこのSNPを治療前に検討することで、予後の悪い群のプロトコルを変更するなどのテーラーメイドへと応用が期待され、更に症例数を増やすことや他の人種でのSNPと予後との関連について研究を進めていくことで、さらに葉酸代謝関連遺伝子のSNPと骨肉腫の関連が明らかにされることが期待される。

図 3 骨肉腫患者の予後と SNP



## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4件)

① Yuki Morimoto, Aki Yoshida, Mamoru Ouchida, Toshiyuki Kunisada, Kenji Shimizu and Toshifumi Ozaki, Single Nucleotide Polymorphism of Folic Acid Metabolism Related Genes in Patients with Osteosarcoma, 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 平成 21 年 2 月 22-25 日、Las Vegas (USA)

② 森本裕樹, 吉田晶, 大内田守, 国定俊之, 清水憲二, 尾崎敏文、骨肉腫患者における葉酸代謝関連遺伝子の一塩基多型の検討、第 67 回日本癌学会総会、平成 20 年 10 月 27-30 日、名古屋市

③ 森本裕樹, 吉田晶, 大内田守, 国定俊之, 尾崎敏文、骨肉腫患者における葉酸代謝関連遺伝子の一塩基多型の検討、日本整形外科学会基礎学術集会、平成 20 年 10 月 24 日、京都市

④ Yuki Morimoto, Aki Yoshida, Mamoru Ouchida, Kunihiko Numoto, Shinsuke Sugihara, Toshiyuki Kunisada, Kenji Shimizu and Toshifumi Ozaki, Single nucleotide polymorphism in reduced folate carrier-1 gene and methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with osteosarcoma, 20th Meeting of The European Association for Cancer Research, 平成 20 年 7 月 6-8 日、Lyon (France)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森本 裕樹 (MORIMOTO YUKI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00452574

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし