

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15944

研究課題名(和文) 小児急性リンパ性白血病におけるNUDT遺伝子多型のディプロタイプ解析方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of digital PCR for the determination of NUDT15 diplotype in patients with pediatric acute lymphoblastic leukemia

研究代表者

市村 卓也 (Ichimura, Takuya)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10761900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性リンパ性白血病の治療薬である6-メルカプトプリン(6-MP)の至適投与量にNUDT15遺伝子多型の関与が報告されているが、ディプロタイプ解析方法は確立していない。本研究ではNUDT15エクソン1およびエクソン3領域にそれぞれヘテロ接合性多型を有する症例について、デジタルPCRを用いたディプロタイプ解析を行い、複合ヘテロ接合性多型であることを示し、ホモ接合性多型と同程度の6-MP投与量であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにデジタルPCRを用いたNUDT15多型のディプロタイプ解析が可能であった報告はなかったが、本研究ではNUDT15多型の有無に加えてディプロタイプ解析まで必要だった1症例について、デジタルPCRを用いた解析が可能であることを示した。また、複合ヘテロ接合性多型であった場合は、既報告と同様にホモ接合性多型と同程度に6-MPの減量が必要であることを示した。本研究ではNUDT15多型のディプロタイプ解析まで必要だった症例が1例のみであったため、今後さらなる症例を集積し他の多型についても同じ方法で解析が可能かどうかを検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：For the treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia, 6-mercaptopurine (6-MP) is one of the essential drugs. NUDT15 variants were identified as a major determinant of 6-MP intolerance, but the method for NUDT15 variants analysis including diplotype analysis is not established.

We could identify the patient has multiple variants of NUDT15 exon1 and exon 3 as compound heterozygosity by diplotype analysis using digital PCR, and show that it was 6-MP dose at the same level as homozygosity.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：急性リンパ性白血病 6-メルカプトプリン NUDT15 デジタルPCR

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) の治療に用いられる 6-メルカプトプリン (6-mercaptopurine; 6-MP) は、*NUDT15* 多型を有する症例で重度の骨髄抑制を生じることが知られている。特にホモ接合性多型・複合ヘテロ接合性多型では、いずれも *NUDT15* 多型を両アレルに有することで重度の骨髄抑制を生じ、治療成績の低下に關与している可能性がある。

(2) 複数の異なる *NUDT15* 多型を有する場合、複合ヘテロ接合性多型かどうかを証明するためにディプロタイプ解析が必要となるが、その解析方法は確立していない。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究は、日常診療において実用的なディプロタイプ解析の方法を確立させることを目的とする。小児 ALL 症例について *NUDT15* 多型をダイレクトシーケンスで解析し、複数の多型を有する症例に対してデジタル PCR、TOPO クローニング、次世代シーケンスを用いてディプロタイプを解析する。

(2) 本研究によってディプロタイプ解析法が確立することで、*NUDT15* 多型に応じた 6-MP の至適投与量での治療を可能とし、ALL 治療の個別化と最適化へとつながることを目指す

### 3. 研究の方法

(1) 2010 年 1 月から 2021 年 12 月までに ALL と診断され、山口大学医学附属病院小児科において維持療法で 6-MP を投与した 30 症例を対象とした。対象の患者の血液中に含まれる正常白血球から、QIAamp® DNA Blood Mini kit を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて、KAPA2G™ Robust HotStart ReadyMix with dye (2X)、AmpliTaQ Gold® Fast PCR Master Mix を用いて PCR を行い、*NUDT15* エクソン 1 およびエクソン 3 領域をそれぞれ増幅した。PCR 産物の塩基配列を、ダイレクトシーケンス法 (Sanger 法) により *NUDT15* 多型の有無について解析した。

(2) *NUDT15* エクソン 1 およびエクソン 3 領域にそれぞれ多型を有する症例では、対象の患者の血液中に含まれる正常白血球から RNA を抽出し相補的 DNA (cDNA) を合成した後に、Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit を使用してクローニングし、作成したプラスミドをダイレクトシーケンス法 (Sanger 法) にてディプロタイプを決定、*NUDT15* エクソン 1 およびエクソン 3 領域の多型および野生型に結合するプローブを計 4 種類用いたデジタル PCR によりディプロタイプを決定した。

### 4. 研究成果

(1) 対象となった 30 例のうち、末梢血から DNA を抽出して *NUDT15* 多型について解析できたのが 21 例であった。解析した 21 例について、多型なしが 16 例、多型ありが 5 例であった。多型ありの 5 例のうち、3 例は c.415C>T のヘテロ接合性多型であり、1 例は c.415C>T のホモ接合性多型と c.36\_37insGGAGTC のヘテロ接合性多型を有する症例であり、1 例は c.52G>A と c.415C>T の 2 つの多型を有するヘテロ接合性多型であった (表 1)。*NUDT15* 多型の有無と 6-MP

No.	多型	年齢 (歳)	性別	免疫学的分類	細胞遺伝学的分類	リスク	転帰	6-MP 投与量 (mg/m <sup>2</sup> )
1	c.415C>T (ヘテロ)	1	女	B 前駆細胞性	MLL 再構成	SR	CR	27.0
2	c.415C>T (ヘテロ)	1	男	B 前駆細胞性	高二倍体	SR	CR	34.1
3	c.415C>T (ヘテロ)	1	男	T 細胞性	なし	SR	CR	25.8
4	c.52G>A (ヘテロ) c.415C>T (ヘテロ)	2	女	B 前駆細胞性	高二倍体	SR	CR	12.0
5	c.415C>T (ホモ) c.36_37insGGAGTC (ヘテロ)	10	男	T 細胞性	47,XY,+15	HR	CR	4.2

SR: standard risk (標準リスク), HR: high risk (高リスク), CR: complete remission (完全寛解)

表 1: *NUDT15* 多型を有する症例の特徴

MP の平均投与量について解析したところ、1 日の体表面積あたりの 6-MP 平均投与量の中央値は、多型なし群 (39.9 mg/m<sup>2</sup>/日) と比較して、多型あり群 (25.6 mg/m<sup>2</sup>/日) では有意に低値であった (p = 0.0149)。

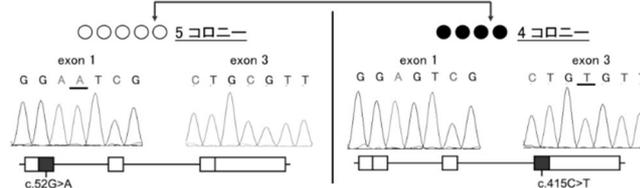
(2) c.52G>A と c.415C>T の 2 つの多型を有するヘテロ接合性多型 (表 1 No.4) については、多型が一方のアレルに 2 つとも存在するディプロタイプと、両方のアレルにそれぞれ 1 つずつ多型が存在するディプロタイプが考えられた。この症例のディプロタイプを同定するために、クローニングを用いた解析、デジタル PCR を用いた解析を行った。まず、正常白血球から抽出した mRNA を用いて cDNA を合成した。

(3) 合成した cDNA を Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit を使用してクローニングし、カナマ

イシン耐性遺伝子を有するベクターを作成した。作成したベクターを TOP10 competent cells に移し、プラスミドを作成した。その後、カナマイシン入り LB 培地で 16 時間培養して、合計 9 個のコロニーが得られた。サンガシーケンスを用いて解析を行った結果、エクソン 1 にのみ多型を有するコロニー 5 つと、エクソン 3 にのみ多型を有するコロニー 4 つに分けることができた。この結果から、本症例で認めた 2 種類の多型は、それぞれ別のアレルに存在することが分かり、複合ヘテロ接合性多型であると分かった (図 1)。

作成したcDNAをZero Blunt® TOPO® Cloning Kitを使用してcloning

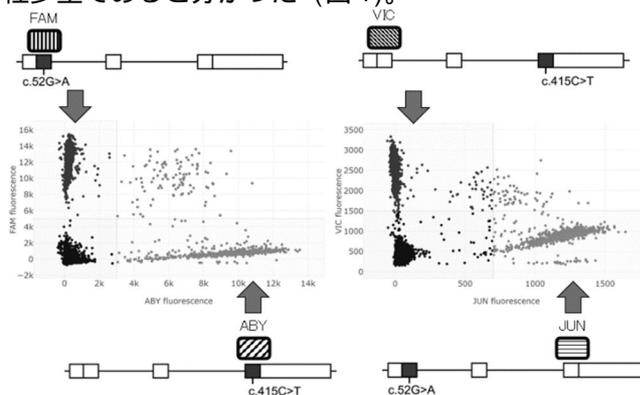
コロニーを9個pick upして、得られたプラスミドDNAについて解析



それぞれ別のアレルに多型を有する(複合ヘテロ接合性多型)

図1: クローニングを用いたディプロタイプ解析

(4) 次に合成した cDNA を QuantStudio™ Absolute Q™ デジタル PCR システムを用いてディプロタイプ解析を行った。使用したプローブについては、c.52G>A の多型に結合するプローブに FAM、c.415C>T の多型に結合するプローブに ABY で標識し解析した結果、2 つの多型は別々のアレルに 1 つずつ存在する複合ヘテロ接合性多型であることを示した (図 2 左)。また、エクソン 1・3 の野生型に結合するプローブを設計し、それぞれ VIC・JUN で標識し解析した場合でも同様の結果を得られ (図 2 右)、デジタル PCR を用いたディプロタイプ解析が可能であることを示した。



それぞれ別のアレルに多型を有する(複合ヘテロ接合性多型)

図2: デジタルPCRを用いたディプロタイプ解析

(5) ディプロタイプ解析の結果を踏まえ、多型あり群の 5 例を、「片アレル多型群」としてヘテロ接合性多型の 3 例と、「両アレル多型群」として複合ヘテロ接合性多型とホモ接合性多型の 2 例との 2 群に分けた。解析した症例 21 例を、野生型 16 例、片アレル多型 3 例、両アレル多型 2 例の 3 群に分けて 6-MP の平均投与量について解析したところ、1 日の体表面積あたりの 6-MP 平均投与量の中央値は、野生型で 39.9 mg/m<sup>2</sup>/日、片アレル多型で 27.0 mg/m<sup>2</sup>/日、両アレル多型で 8.1 mg/m<sup>2</sup>/日となり、いずれの群間も有意差は認めなかったが、野生型、片アレル多型、両アレル多型の順で 6-MP 平均投与量は低値となる傾向であった (図 3)。

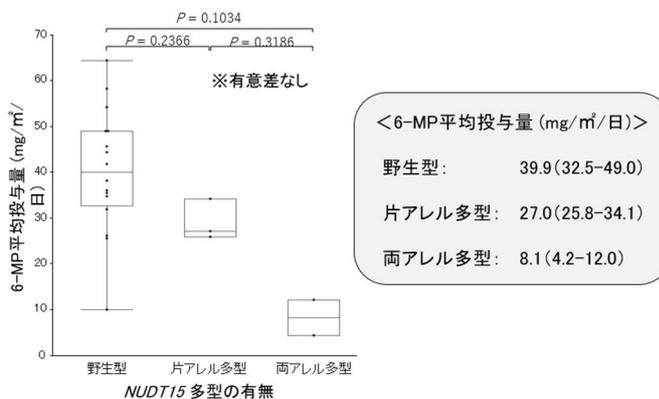


図3: *NUDT15* 多型の有無と6-MP平均投与量

(6) これまでにデジタル PCR を用いた *NUDT15* 多型のディプロタイプ解析が可能であった報告はなかったが、本研究では *NUDT15* 多型の有無に加えてディプロタイプ解析まで必要だった 1 症例について、デジタル PCR を用いた解析が可能であることを示した。また、複合ヘテロ接合性多型であった場合は、既報告と同様にホモ接合性多型と同程度に 6-MP の減量が必要であることを示した。

(7) 本研究では *NUDT15* 多型のディプロタイプ解析まで必要だった症例が 1 例のみであったため、今後さらなる症例を集積し他の多型についても同じ方法で解析が可能かどうかを検討する必要がある。

#### <引用文献>

- 1) Yang SK, et al. A common missense variant in *NUDT15* confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat Genetic*. 2014 Sep;46(9):1017-20.
- 2) Tanaka Y, et al. An international retrospective study for tolerability of 6-mercaptopurine on *NUDT15* bi-allelic variants in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2021 Jul;106(7):2026-2029.
- 3) Tsujimoto S, et al. Diplotype analysis of *NUDT15* variants and 6-mercaptopurine sensitivity in pediatric lymphoid neoplasms. *Leukemia*. 2018 Dec;32(12):2710-2714.

4) Yu CH, et al. Determination of NUDT15 variants by targeted sequencing can identify compound heterozygosity in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Sci Rep.* 2020 Sep ;10(1):14400.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市村卓也
2. 発表標題 小児急性リンパ性白血病におけるNUDT15 多型による6-メルカプトプリン投与量の相関
3. 学会等名 小児血液・がんセミナー in 九州
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯田恵庸、市村卓也
2. 発表標題 Efficacy of digital PCR for the determination of NUDT15 diplotype in patients with pediatric acute lymphoblastic leukemia
3. 学会等名 第65回日本小児血液がん学会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------