

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430138

研究課題名(和文) 遺伝子多型を用いた前立腺癌に対するドセタキセル療法効果予測法の構築

研究課題名(英文) Establishment of response predicting model of Docetaxel for prostate cancer using single nucleotide polymorphism.

研究代表者

高田 亮 (TAKATA, RYO)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：00438467

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)：去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)に対するドセタキセル(DTX)療法の感受性と関連する遺伝子多型(SNP)を同定すべく研究をおこなった。まず55例のCRPC患者の血液よりDNAを採取し、DTXの代謝や輸送に関連する7遺伝子領域に存在する75SNPのタイピングを行った。次いで患者をPSAの低下率に応じて2群に振り分け関連解析を施行すると、4SNPがDTXの感受性と関連する事が明らかとなった。また、4SNPを利用した感受性予測モデルを構築したところ、73%の感度でその感受性を予測可能であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We investigated to identify Polymorphisms (SNPs) which are associated with chemosensitivity of Docetaxel (DTX) therapy for Castration resistant prostate cancer patients. First, we extracted DNA from blood of 55 CRPC patients, and typing was performed for 75 SNPs. 75 SNPs were located in 7 gene loci, which are associated with transportation and metabolism of DTX. Patients was divided two groups according to response of PSA, and association study was carried out. As a result, we clarified 4SNPs which are associated with response of DTX. Moreover, DTX response was accurately predicted with sensitivity of 73%, when we established response predicting model using 4 SNPs.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：感受性予測 ドセタキセル 去勢抵抗性前立腺癌 一塩基多型

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌に対するアンドロゲン除去療法は1941年 Huggins が除睾術もしくは女性ホルモンの投与により前立腺癌が著明に縮小することを報告して以来、前立腺癌に対する主要な治療法の一つとして確立され現在に至っている。しかし治療の過程で、その多くがアンドロゲン受容体の変異などにより「去勢抵抗性前立腺癌 (Castration resistant prostate cancer: CRPC)」とよばれる治療抵抗状態となり、数ヶ月以内に亡くなるという問題が存在した。

一方、2004年に多施設共同第3相無作為臨床試験により、CRPCに対するドセタキセル (Docetaxel: DTX) 療法が予後の延長やQOL・疼痛の改善に有効であることが報告された。本邦でも2008年8月に保険適応が承認され、現在DTXがCRPCに対する治療の第一選択という位置づけとなっている。

しかし、DTXの効果は患者によって大きく異なり、治療によって腫瘍縮小が得られる症例がある一方、治療初期より効果を認めず治療中に癌が進行する症例も存在するのが現状である。化学療法の効果が得られない患者は、有害事象や体力低下により化学療法未施行の自然経過例よりも予後が悪化することが明らかになっており、化学療法投与前に有効例を抽出し適切なDTXの投与をおこなうことと共に、無効例に対しては迅速な代替療法あるいは無治療を選択し予後の改善を図ることは、オーダーメイド医療の時代において急務である。

## 2. 研究の目的

近年様々な薬剤の効果や有害事象が、遺伝子発現や多型によって規定されていることが明らかとなってきた。また、このような遺伝子の変化を用いた薬剤の感受性予測が臨床現場においても実現されてきている。そこでわれわれも、CRPC患者に対するDTX療法の有効性を規定する遺伝子の変化、特に一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) に注目し、これまでにCRPC患者49名のSNP関連解析をおこない、4つのSNPがDTXの感受性と関連を示す可能性を明らかとした。しかし、現在までにBonferroni補正による統計学的な有意差を得るまでは至っていない。今回この先行研究を、追加検体を用いて再検証し、DTX感受性と関連するSNPの新規探索をおこなった上で、多型情報を基に効果を事前に予測する手法を確立すべく本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 検討症例

本学および関連病院、協力施設においてCRPCと診断されてDTX療法を受けた55症例を対象に研究をおこなった。

具体的には対象患者に遺伝子解析のために書面によるインフォームドコンセントをお

こない同意を得た後、末梢血5mlを採取。ゲノムを抽出し、その一部をTE bufferで5ng/ $\mu$ lに溶解した状態で冷蔵保存した。このゲノム溶液を96穴のプレート10枚に3 $\mu$ lずつ分注し、乾燥させて-20で保存した。

### (2) SNP タイピング

DTXの代謝・輸送に関連する7遺伝子領域に存在する75SNPを対象にインベーター法を用いて55症例のタイピングをおこなった。75SNPはHapmapプロジェクトのデータを基に各々独立しているものを選択した。これを25SNPずつに分けて解析をおこなった。

具体的には、各SNPの周辺200-400bの領域を増幅するプライマーとPCR試薬を乾燥させたゲノムが載ったプレート上に分注し、マルチプレックスPCRを施行。増幅されたDNA溶液を15倍に希釈した後、96穴プレートに3 $\mu$ lずつ分注し、乾燥させて室温保存。このプレートに、各SNPのプロブ・プライマーセットと試薬を滴下し、サーマルサイクラーでインベーター反応させた後、リアルタイムPCR機器を用いてSNPのタイピングをおこない、データを保存用コンピューターに保存した。この作業を3回繰り返すことにより、75SNPのデータを得た。

### (3) 統計学的解析 (関連解析)

DTXの効果判定は、治療効果の指標となる血清PSA値を基におこなった。すなわち、治療によるPSAの変化を基に患者を奏効群と非奏効群の2群に振り分けた。

各SNPについて、奏効群と非奏効群の関連解析を施行。解析は、(1)劣性モデル(2)優性モデル(3)加法モデルを用い、前2者に関してはFisher法で、後者はArmitage法で有意差検定をおこなった。また、先行研究ですでに結果の得られている49症例のデータと、Mantel-Haenszel法を用いてメタ解析を施行し、DTXの感受性に関連しているSNPの同定を試みた。

### (4) 感受性予測法の開発

DTXの感受性と関連を認めたSNPを用いて、DTX感受性予測法を開発した。まず、各々のSNPがどのモデルで有意差を示すかによって、感受性を示す多型がHomoの場合のみ、あるいはHomoまたはHeteroの場合、2点を加算する事とした。これをすべてのSNPについておこない、全症例を点数化。感度と特異度を計算した。

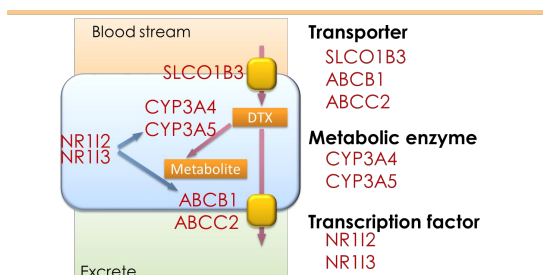
## 4. 研究成果

### (1) 症例の収集とDNA抽出

まず、本学および関連・協力施設においてCRPCと診断され、DTX療法を受けた55例の血液を収集。血液からゲノムDNAを抽出した。全例において、解析に十分量のDNAを抽出可能であった。またDNAのクオリティーもタイピング解析に問題のない状態であることを確認した。

### (2) インベーター法を用いたタイピング

この DNA より、インベーター法を用いて DTX の代謝や輸送に関連する 7 つの遺伝子領域に存在する 75SNP のタイピング作業を行った。75SNP のインベーター法については、先行研究で条件検討し、タイピングが可能であったプライマーとプローブをそのまま利用した。なお、いずれの SNP もこれまでに DTX の感受性との関連は報告されていないことを確認している。



図：研究対象となった 7 遺伝子と DTX の関連  
3 遺伝子は DTX の輸送に関連し、2 遺伝子は代謝に関連している。また 2 遺伝子は、輸送や代謝に関連する遺伝子の転写因子である。

その結果、75SNP 中 10SNP は 90 分のインベーター反応によっても増幅が見られず多型を判別できなかったため、本研究からは除外とした。

一方で、各症例においてタイピング可能であった 65SNP の解析成功率を検討すると、全例 90%以上の効率で SNP を同定可能であったことより、全例を解析対象とした。

### (3) DTX の奏効率の確認

55 症例の臨床情報を収集し、50%以上の PSA 値低下がみられた群を奏効群、見られなかった群を非奏効群として 2 群に振り分けた。まず 2 群の臨床情報を比較すると、年齢、治療前の血清 PSA 値、異型度を示す Gleason score、臨床病期で 2 群に差はみられなかった。一方で、投与サイクル数は奏効群のほうで 16 サイクルと、非奏効群に対して有意に投与回数が多かった。

	Responder	Non-Responder	p
Age, years	69 (60-79)	72 (51-82)	0.51
PSA, ng/ml	24.4 (1.42-3340)	83.4 (0.417-402)	0.23
Gleason Score	≤6: 3 7: 4 ≥8: 19 unknown: 5	0 3 17 4	0.45
Cycles	16 (5-34)	8 (1-50)	0.02
Clinical stage	B: 6 C: 9 D: 13 unknown: 3	1 4 15 4	0.12

表：感受性に応じた 2 群間の臨床背景

### (4) 関連解析

この 2 群で、65SNP の関連解析を施行した。その結果、55 症例単独では、多重検定の補正によって必要とされる有意差を満たす SNP は

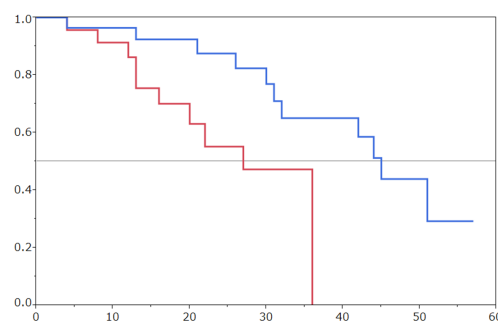
確認できなかった。

また、先行研究で DTX の感受性と関連が考えられた 4SNP (NR112, NR113, ABCB1 遺伝子領域に存在) について、55 症例の関連解析結果と、先行 49 症例の結果のメタ解析を行ったが、関連の強さを示す p 値は 0.03-0.066 と 49 症例の解析時に比べて上昇し、関連が逆に弱くなってしまった。

この問題について検討すると、症例によって総投与量が大きく異なる事が判明したため、さらに患者の受けた DTX 総投与量あるいは体表面積あたりの投与量を算出。これを共変数として、ロジスティック回帰分析によって SNP と臨床効果との関連を検討したが、有意な SNP は検出されなかった。

一方で近年、DTX の効果判定について「3 か月以内に 30%以上の PSA 低下」を満たすか否かによって判別する手法も用いられていることより、われわれもこの基準で患者を 2 群に振り分けて再度解析を行った。

まず、この基準における 2 群の生存率を Kaplan-Meyers 法で検討すると、 $p=0.0017$  と奏効群において有意にその予後が改善することを確認した。



図：奏効群と非奏効群の全生存率  
縦軸は生存率、横軸は生存期間(月)  
青が奏効群、赤が非奏効群を示す

そこで、この 2 群と各 SNP における関連解析を 3 つの遺伝モデルを用いて行った結果、優性モデルで 1SNP、加法モデルで 3SNP の、計 4SNP が DTX の治療効果と関連を示した。このうち、2SNP は ABCB1 遺伝子領域に局在し、残りの SNP は各々 NR112、ABCC2 遺伝子の領域に局在していた。すなわち、主に薬剤輸送に関連している遺伝子の多型が、治療効果と関連している可能性が示された。また、すべての SNP はプロモーターあるいはイントロン領域に局在しており、SNP が遺伝子の発現量に影響している可能性が考えられ、蛋白質の変異には関連していないものと考えられた。加えて、この 4SNP についても DTX 投与量を共変数とした回帰分析での関連解析をおこなったが、こちらでは上記の手法を越える関連を示す事はできなかった。

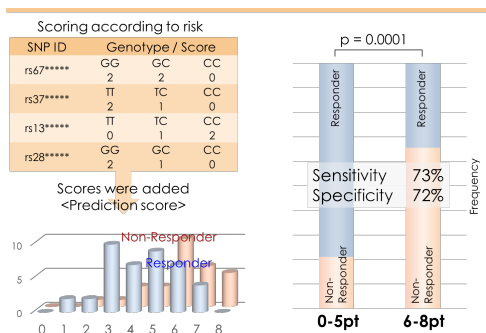
Gene	SNP ID	Min P	オッズ比
NR1I2	rs67****	0.019	4.71
ABCB1	rs37****	0.007	2.55
ABCB1	rs13****	0.013	2.16
ABCC2	rs28****	0.017	3.53

表：DTX の感受性に関連する 4SNP

#### (4) 感受性予測モデルの構築

感受性予測モデルを構築すべく、関連 4SNP を統計モデルに合わせてスコア化した。具体的には、優性モデルで有意差を示した rs67\*\*\*\* は、リスクアレルを持つ場合 2 点、持たない場合を 0 点とした。一方で、加法モデルで有意差を示した 3SNP は、リスクアレルを 2 本持つ場合を 2 点、1 本持つ場合を 1 点、持たない場合を 0 点とし、各症例を 0 - 8 点に振り分けた。

その結果、感受性群と非感受性群の得点分布は下図の様になり、0 - 5 点の低スコア群と 5 - 8 点の高スコア群と比較すると、感度 73%、特異度 72% でその感受性を有意に予測可能であることを立証した。



図：4SNP のアレルを基に構築した DTX 感受性予測法による予測結果

本研究を通して、「3 か月以内に 30% 以上の PSA 低下」を基準とした DTX の感受性に関連する可能性のある 4SNP が同定された。この 4SNP を組み合わせることで、DTX の感受性を投与前に予測できる可能性も実証され、今後この感受性予測法の確立によって CRPC 患者の適切な治療選択に有用となる事が期待された。

#### 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 3 件)

- (1) Kato Y, Sato J, Kato R, Takata R, Obara W. Side effect and supportive care to combination of gemcitabine and cisplatin chemotherapy for the advanced urothelial cancer. Nihon Rinsho. 2015;73:609-613
- (2) Nakagawa H, Akamatsu S, Takata R. Genome-wide association study(GWAS) and genetic risk of prostate cancer.

Nihon Rinsho. 2016;74:34-39

- (3) 高田亮、五十嵐大樹、松浦朋彦、他 高齢者去勢抵抗性前立腺癌に対する標準的薬物治療と注意点 泌尿器外科 2016;29:1-3

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) Ryo Takata Pharmacogenomics for Bladder and Prostate Cancers. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 横浜
- (2) Ryo Takata Impact of polymorphisms in ABCB1 and NR1I2 with docetaxel response for castration-resistant prostate cancer. AUA annual meetings. 2014 年 5 月, オランダ
- (3) Ryo Takata. Personalized medicine of muscle invasive bladder cancer by comprehensive gene expression analysis. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 横浜
- (4) 高田亮、加藤陽一郎、五十嵐大樹、他 尖部処理の工夫によるロボット支援前立腺全摘除術での断端陽性の改善 第 103 回日本泌尿器科学会総会 2015 年 4 月 金沢
- (5) 高田亮、五十嵐大樹、松浦朋彦、他 高齢者去勢抵抗性前立腺癌に対する標準的薬物治療と注意点 第 80 回日本泌尿器科学会東部総会 2015 年 9 月 東京
- (6) 高田亮、ゲノムワイドアソシエーションスタディー(GWAS)における共同研究 基礎研究から臨床研究へ 第 252 回日本泌尿器科学会東北地方会 2015 年 10 月 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高田 亮 (Takata Ryo)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：00438467