

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461912

研究課題名(和文) サイトカイン遺伝子多型に基づいた化学療法副作用の予測システムの開発

研究課題名(英文) Development of prediction system for chemotherapy-induced side effects based on cytokine gene polymorphism

研究代表者

坂本 和彦 (SAKAMOTO, Kazuhiko)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50420526

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)：癌患者における抗癌剤治療の際のサイトカイン遺伝子多型と副作用発症との関連について検討した。1997年から2005年までの患者64例においてまず検討を行い、2006年から2013年までの患者106例においてその結果を再検討、評価することとした。単変量解析の結果、TNF- α (rs1799964)のTT多型はTC/CC多型よりも口内炎発症(Grade 1-4)において有意に高い相関を認めた。次に評価群106例においても同様の検討を行ったところ、TT多型は口内炎と有意な相関を認めた。TNF- α (rs1799964) TT多型は化学療法関連口内炎の予測因子となりうる事が証明された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the association between cytokine polymorphisms and side effect from chemotherapy for patients with cancer. The experimental group comprised 64 patients who received chemotherapy for esophageal cancer between 1997 and 2004; a total of 106 patients between 2005 and 2013 were investigated as the validation group. Univariate analysis of the experimental group revealed that the TT genotype of TNF- α rs1799964 was significantly higher in patients with grade 1-4 OM compared with the TC/CC genotypes. Similarly, univariate analysis of the validation group revealed that the percentage of the TT genotype was significantly higher in patients with grade 1-4 OM compared with the TC/CC genotypes. This difference in risk was replicated in the validation cohort. Thus, the TT genotype of TNF- α rs1799964 may be a predictor of chemotherapy-induced OM in patients with esophageal cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：サイトカイン 遺伝子多型 化学療法 副作用

1. 研究開始当初の背景

癌に対する化学療法による治療の際、その有効性と副作用の個人差は、臨床診療の場では重大な問題である。その個人差は、様々な薬物代謝または薬物レセプターの発現に關与する遺伝的要因によることが多いとされる。近年、DNA のおよそ 1000 ~ 2000 塩基に 1 カ所程度で個人間での差が認められこの遺伝暗号の違いを遺伝子多型という。

薬物代謝酵素の遺伝子多型によりその活性が変化し、毒性や抗腫瘍効果に個人差があることが明らかになっている。

すでに我々は消化器癌の代表的抗癌剤である「イリノテカン」の代謝酵素の遺伝子多型による副作用の発生危険度を判定する方法の開発に成功している。(特許取得：特許第 4884899)

薬物代謝酵素の多型はその薬物の血中濃度を規定する因子であるが、抗癌剤に対する宿主感受性を規定するものではない。

そこで我々は細胞間伝達物質であるサイトカインのプロモーター領域の多型によって、その発現量が異なる事に着目し、消化器系癌の治療のためにしばしば投与される抗癌剤の 1 つである「5FU」と、5-FU の細胞障害性を増強する「CDDP」を用いた化学療法時の生体反応との関連を解析した。その結果、TNF 多型と口内炎、L-1 多型と血小板減少、IL-6 多型と白血球/血小板減少との間に関連があることを明らかにした。

(Sakamoto K, Oka M, et al. Relation between cytokine promoter gene polymorphism and toxicity of 5-fluorouracil plus cisplatin chemotherapy. *Oncol Rep.* 2006 Aug;16(2):381-7)

サイトカイン遺伝子多型と抗癌剤副作用との間には関連があることより、適切な抗癌剤の投与量や副作用対策を講じることができると可能性が示唆された(図 1)。(特許取得：特許第 4787956)

	白血球減少		好中球減少		血小板減少		口内炎	
	Grade	P	Grade	P	Grade	P	Grade	P
	0	1-4	0	1-4	0	1-4	0	1-4
TNF- α -1031								
CG+GT	9	22	11	20	14	17	24	7
TT	22	47	25	44	32	37	36	33
								<0.05
IL-1 β -511								
CG	11	22	13	20	21	12	18	15
GT+TT	20	47	23	44	25	42	<0.05	42 25
IL-6 -634								
CG	24	32	27	29	36	20	30	26
CG+GG	7	37	9	35	10	34	<0.05	30 14

図 1

また、我々の研究機関は企業(東洋鋼鉄)との共同研究の結果、予測システムに必要な遺伝子群を用いて安価な遺伝子マイクロアレイ用のミニチップを開発、実用に至っている。同様の技術を用いて、我々はすでに企業との共同開発で「イリノテカン」の代謝酵素の複数の遺伝子多型を同時に測定できる遺伝子多型チップの開発に成功している。そのため今回目的とする多くのサイトカイン遺伝子多型を同時に診断できるチップの作成も開発可能である。

これまでに切除不能・進行大腸癌に対して使用されるイリノテカンの毒性予測として代謝酵素の UGT1As family の遺伝子多型により毒性予測が可能であることを報告してきた。しかしこの予測はイリノテカンに特化したものであり、すべての癌腫、薬剤に適用されるものではない。これまでに個々の患者のサイトカイン遺伝子多型を用いて化学療法後のさまざまな生体反応(副作用)を予測する評価法はなく、これを用いる事によって抗癌剤の種類(代謝酵素の種類)によらず血球減少や消化管毒性などのリスクの高い個体が予測できればテーラーメイド化された抗癌剤治療が可能となり患者にとってより安全で、しかもより経済的な副作用管理が可能で極めて有用である。

また多くの遺伝子多型を網羅的に解析する事で、より精密な生体反応の予測が出来ると考えられる。現在、遺伝子多型解析は一般的には PCR 法を用いて行うが、これら多数の遺伝子多型を 1 つ 1 つ PCR 法で測定するのは設備、コスト、時間を要し、一般的ではない。多数の遺伝子多型を一度に診断可能なチップを開発することによって、検査の簡便化、コスト削減が可能となる。さらに特別な設備のない施設でも多型の検索が可能となり、すべての病院で容易に副作用予測システムが導入できる。

2. 研究の目的

化学療法前に生体反応の主体であるサイトカインの遺伝子多型を解析することによって個々の化学療法の副作用を治療前に予測するシステムを構築する。

多くの遺伝子多型を網羅的に診断できる、安価な遺伝子多型測定チップを開発、作成する。

3. 研究の方法

(1)化学療法副作用リスクの予測システムを

開発

各種消化器関連癌（胃癌、大腸癌、肝臓癌、食道癌など）に対する化学療法を受ける患者から7種類のサイトカイン遺伝子多型（前炎症性サイトカインである IL-1・TNF、IL-1 の受容体に拮抗する IL-1RA、炎症性サイトカインである IL-6、抗炎症性サイトカインである IL-10、抗腫瘍性サイトカインである IL-18、マクロファージ遊走阻止因子である MIF (macrophage migration inhibitory factor))のサイトカイン産生に關与するプロモーター領域の多型を測定する。多型の解析は我々の施設ですでに確立された方法である対立遺伝子特異的PCR法(ARMS-PCR法)を用いて行う

(Okayama N, Hinoda Y, et al. Evaluation of a new efficient procedure for single-nucleotide polymorphism genotyping: tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction. Clin Chem Lab Med 2004; 42: 13-6.)

ARMS-PCR 法は現有設備である ABI-9700 Avant Genetic Analyzer により解析する。遺伝子多型解析に関しては、書類による承諾書を得た後、サンプルを匿名化し、プライバシー保護を行う。

術前の患者の状態（年齢、性別、合併症（心疾患・呼吸器疾患・糖尿病の有無など）、原疾患名、癌進行度など）、使用した抗癌剤（5FU, CDDP, イリノテカンなど）、放射線治療併用の有無、化学療法による副作用（貧血、白血球減少、血小板減少、口内炎、下痢など）、その程度（Grade 0-4:有害事象共通用語基準 v4.0 日本語訳-JCOG 版より判定）を可能な限り収集、記録する。

レトロスペクティブに集積した症例の遺伝子多型データ、臨床検査データを用いて、各種の副作用出現に關連する危険因子を統計学的に解析する。過去の症例（100例）と合わせ解析する症例数は200例を目標とする。

また山口大学工学部との共同作業で、測定した複数の臨床病理学的因子、遺伝子多型の組み合わせにより各種副作用がどのくらいの確率で発症するのかを計算する予測システムを開発する。

その後、さらに症例を集積し(100例以上)、開発した予測システムを用いて prospective study を行いシステムの感度、特異度を検証する。

(2)遺伝子多型測定チップの開発

本研究の進行に合わせて企業（東洋鋼鉄）との共同研究により安価な「遺伝子多型測定チップ」の開発を進める。チップが開発できた場合、ARMS-PCR 法にて測定した遺伝子多型を開発した遺伝子多型測定チップで再測定を行い遺伝子多型の判別精度が100%である事を確認する。判別精度100%が達成出来た場合、実用化を目指す。

4. 研究成果

5-FU と CDDP による抗癌剤治療を受けた食道癌患者において副作用とサイトカイン遺伝子多型との間の關連性について検討した。

症例 170 例の症例を集積し 1997-2004 までの 64 症例を Experimental group (Ex-group)、2005-2013 までの 106 症例を Validation group (Val-group) とし、それぞれ副作用とサイトカイン遺伝子多型を含む臨床学的因子との關連を解析した(図 2)。

図 2

Characteristics	Experimental group (n=64)	Validation group (n=106)	P-value
Age, years	62 (27-82)	64 (40-81)	0.18
Gender			0.15
Male	60 (93.8)	92 (86.8)	
Female	4 (6.3)	14 (13.2)	
BMI, kg/m ²	20.2 (12.6-28.8)	19.2 (14.1-31.2)	0.21
Purpose of chemotherapy			<0.01
Postoperative	35 (54.7)	30 (28.3)	
Preoperative	0 (0.0)	45 (42.5)	
Progression/recurrence	29 (45.3)	31 (29.2)	
Radiotherapy			0.59
Yes	18 (28.1)	34 (32.1)	
No	46 (71.9)	72 (67.9)	
Regimen of chemotherapy			<0.01
Low-dose FP	64 (100.0)	16 (15.1)	
Standard-dose FP	0 (0.0)	90 (84.9)	
Genotype of TNF-α rs1799964			0.32
TT	44 (68.8)	78 (73.6)	
CT	16 (25.0)	26 (24.5)	
CC	4 (6.2)	2 (1.9)	
Oral mucositis			0.84
Grade 0	38 (59.4)	66 (62.3)	
Grade 1	12 (18.7)	17 (16.0)	
Grade 2	8 (12.5)	14 (13.2)	
Grade 3	4 (6.3)	8 (7.6)	
Grade 4	2 (3.1)	1 (0.9)	

Ex-group において単変量解析の結果、TNF-遺伝子多型と口内炎 (Grade 1-4) 発症との間に有意な關連を認めた。他の臨床学的因子との間には關連を認めなかった。他の副作用については、IL-6 遺伝子多型と白血球 (Grade 1-4)、血小板 (Grade 1-4) との間に有意な關連を認めた。IL-1 遺伝子多型と血小板 (Grade 1-4) との間に有意な關連を認めた。

これを Val-group で同様の解析を行った結果、TNF- 遺伝子多型と口内炎 (Grade 1-4) 発症との間に同様の関連を認めた(図 3)。

Characteristics	Experimental group (n=64)			Validation group (n=106)		
	OR	95% CI	P-value	OR	95% CI	P-value
Age	1.02	0.97-1.1	0.49	0.98	0.93-1.03	0.33
Gender						
Male vs. female	0.67	0.09-5.1	0.7	0.4	0.13-1.3	0.12
BMI	1.1	0.9-1.3	0.47	0.8	0.69-0.94	<0.01
Purpose of chemotherapy						
Postoperative vs. preoperative/progression/recurrence	1.3	0.45-3.4	0.69	1.4	0.59-3.3	0.46
Radiotherapy						
Yes vs. no	0.9	0.3-2.8	0.86	2.1	0.92-4.9	0.076
Regimen of chemotherapy						
Low- vs. standard-dose FP				1.8	0.63-5.3	0.28
TNF- α rs1799964 genotype						
TT vs. CT+CC	4.0	1.2-13.9	0.029	2.8	1.03-7.8	0.043

図 3

Ex-group において確認された IL-6 遺伝子多型と白血球 (Grade 1-4) 血小板 (Grade 1-4) IL-1 遺伝子多型と血小板 (Grade 1-4) の有意な相関は、Val-group においては有意な相関は認められなかった。

口内炎の副作用について、Ex-group と同様の結果が Val-group でも得られたことにより食道癌患者における TNF- 多型 (rs1799964) は化学療法関連口内炎発症の予測因子となりうる事が証明された。

また、他の消化器癌については十分な症例数が集積できなかった (150 例未満)。今回、食道癌患者において、副作用予測に有用な遺伝子多型は 1 つのみであったため、さらに解析する多型の種類を増やすと同時に症例の集積を重ね、再度評価を行う予定である。

この結果をもとに、山口大学工学部にデータを解析してもらい予測システムを構築してもらっているが今回の症例数、期間では十分な予測式を確立させることは困難であった。

遺伝子多型測定チップの開発は途中であり、現在も鋭意研究中である。

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 1 件)

Kazuhiko Sakamoto et al, Association of tumor necrosis factor- α polymorphism with chemotherapy-induced oral mucositis in patients with esophageal cancer, MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY, 2017, 125-129(査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

坂本和彦 他、食道癌化学療法有害事象とサイトカイン遺伝子多型との関連、第 70 回日本消化器外科学会、2015/7/15-17、アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 和彦 (SAKAMOTO, Kazuhiko)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50420526

(2) 研究分担者

岡山 直子 (OKAYAMA, Naoko)
山口大学・医学部附属病院・副臨床検査技師長
研究者番号：40420541

(3) 連携研究者

藤田 悠介 (FUJITA, Yusuke)
山口大学・大学院創成科学研究科・准教授
研究者番号：40509527

(4) 研究協力者

なし