

(資料)

厚生労働科学研究費補助金

(小児疾患臨床研究:小児疾患臨床研究分野 若手医師・協力者活用等に要する研究チーム)

薬理遺伝学的検査の実施における臨床データ利用の効率化に関する検討

高橋孝雄 (慶應義塾大学医学部小児科 教授)

研究要旨

薬理遺伝学的研究を円滑に進めるためには、患者のゲノム情報を的確に解析するとともに、臨床情報を確実に集積することが必要である。昨年度の研究では、集積の際に、個人情報保護のためのシステム開発を推進した。本年度は電子診療録から、抗癌剤の副作用発症に関する時系列データを系統的に抽出するプログラム・モジュールを開発した。本プログラムはとくに化学療法後の特定のイベントの発生の有無を評価する生存分析のための前処理に有用である。

研究協力者

森鉄也 慶應義塾大学医学部小児科 専任講師
嶋田博之 慶應義塾大学医学部小児科 助手

A. ソフトウェア開発の目的

薬理遺伝学的研究では、薬効や副作用を評価するために多重回帰モデル・ロジスティック回帰モデル・生存分析など多種の統計モデルが使用される。統計解析において患者のゲノム情報は、説明変数の一つに位置づけられる。統計解析の実施にあたっては、各種の臨床情報が説明変数・非説明変数となり、これらの情報を確実かつ正確に集積することが必要である。

昨年度の研究では、集積の際に、個人情報保護のためのシステム開発を推進し、多重回帰分析(CYP2C19 多型とクロバザム薬物動態に関する研

究)・ロジスティック回帰分析(葉酸代謝酵素多型とメソトレキセートによる副作用発症に関する研究)を行った。イベント発症までの時間を解析項目に含む生存分析においては、非説明変数のダイナミックな動きを追い、打ち切り症例の同定など複雑な時系列処理が必要である。本研究では、治療開始後の各種臨床パラメータの経時変化を系統的に表示するためのプログラム・モジュールを開発した。

B. ソフトウェア開発の概要

白血病の化学療法後の副作用の発症には、二値的に定義できる事象と、閾値により定義しなければならない事象の二種類がある。後者の例は末梢血検査値・生化学的検査の検査値である。イベントの発生を統一的に扱うためには、治療中の検査中の推移を明示することが必要である。

以下に、移植細胞数の推移を例に取り、システム運用の実際を例示する。

<ソフトウェアの操作手順>

1 検索条件の設定

移植細胞数の推移 v1.0.0

移植細胞数の推移

出力条件の指定: 自動※推奨

患者名: _____

生年月日: _____

薬剤名: _____

病名: _____

投与量: _____ ml/kg

出力先: C:\

出力開始(O) 終了(E)

図 I.1 メイン画面

2 作業画面の説明

本システムでは、移植細胞数の推移データのエクセル出力が可能。

移植細胞数の推移 v1.0.0

移植細胞数の推移

出力条件の指定: 自動※推奨

患者名: 田中 太郎

生年月日: 1958/4/23

薬剤名: シクロスポリン

病名: 自己免疫疾患

投与量: 300 ml/kg

出力先: C:\

出力開始(O) 終了(E)

正常起動(移植細胞の推移)

図 I.2 作業画面

出力条件を入力してから「出力開始ボタン」をクリックすることで、統計データがエクセルファイルに出力される。

定。

3 出力の実施

患者名:対象となる患者氏名を入力。

生年月日:対象となる患者生年月日を入力。

薬剤名:対象となる薬剤名を選択。

病名:対象となる病名を選択。

投与量:対象となる薬剤の投与量を入力。

※ 全てAND条件。いずれか一つは必ず指定。

出力先:エクセルファイルの出力先ディレクトリを指

定。エクセルファイルへの出力を行うには「出力開始ボタン」をクリックする。

画面下に表示される進行ゲージが右端まで到達すれば処理は完了。

自動的に出力されたエクセルファイルが起動し、次のような統計グラフが表示される。

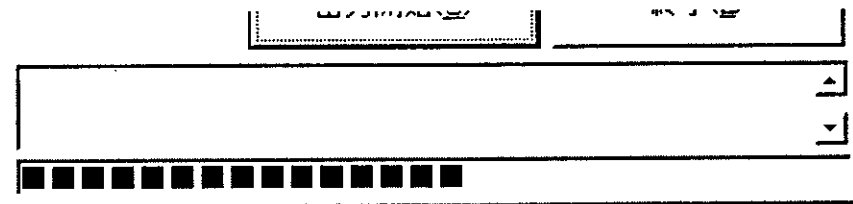


図 I.3.1 進行ゲージ

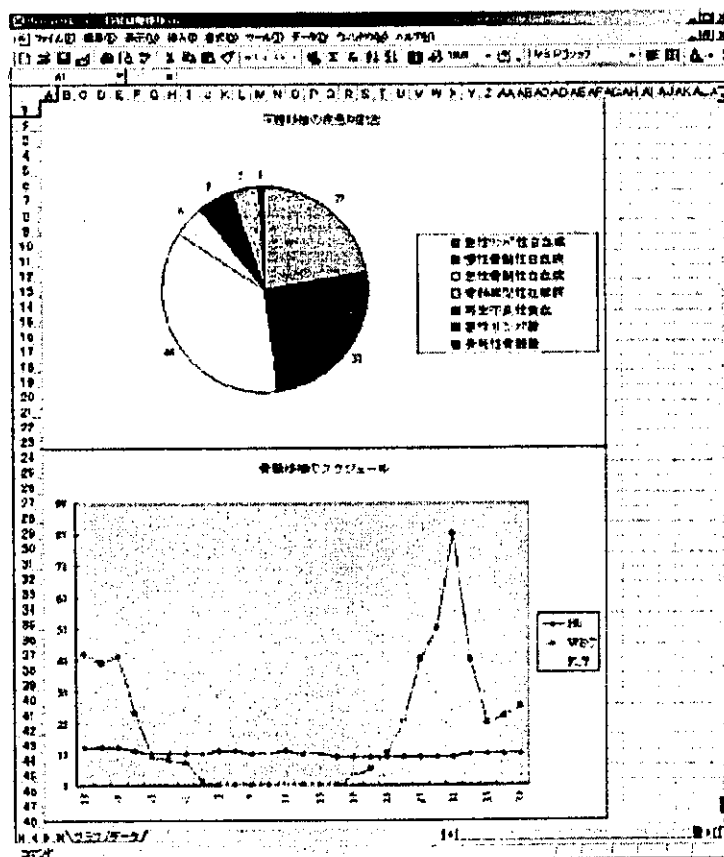


図 II.3.2 出力結果

2 から5はそれぞれ独立したデータベースとして管理されており、ID 項目を介して、各表が対応している。出力されるデータには個人情報は一切含まれない。原データより抽出されたデータに対しては昨年開発したモジュールを用いて連結可能匿名化を行い、患者の個人情報が保護されるように留意した。

C. 考察

上記ソフトウェアの開発により、化学療法後の副作用の発症に関する各種パラメータの時系列解析が促進された。特に、時系列解析・生存分析が不可欠である血液腫瘍学分野の薬理学遺伝学的検討に極めて有用である。悪性腫瘍の治療プロトコルには同一薬剤が複数回使用されることが多いので、複数回実施される。複数試行される場合の拡張型ロジスティック回帰分析は、Generalized estimating equation(GEE)解析である。今後、GEE 解析を円滑に進めるために、複数回の治療を行った際の各種パラメータの変動を重ね合わせて(overlay)表示する機能を加える必要がある。

F. 参考資料

Frank Harrell, Ph.D. (see Harrell, FE. Regression Modeling Strategies, Springer-Verlag, NY, 2001

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」文部科学省・厚生労働省・経済産業省. 2001 (<http://www2.ncc.go.jp/elsi/>)

「ヒト遺伝子検査受託に関する倫理指針」社団法人日本衛生検査所協会. 2001 (<http://www.jrcla.or.jp/news.html>)

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products - EMEA

Committee for proprietary Medicinal Products - CPMP

Position Paper on Terminology in Pharmacogenetics, 2003

(資料)

厚生労働科学研究費補助金

(小児疾患臨床研究：小児疾患臨床研究分野 若手医師・協力者活用等に要する研究チーム)

Hapmap 計画データの有効活用による多型解析の効率化

谷川原 祐介 (慶應義塾大学医学部 薬剤部部長・教授)

研究要旨 本研究ではこれまで日本人小児を対象とし、薬物代謝酵素の遺伝子多型を効果的に解析するため多くの手法を利用するためにコンピュータ環境を整備してきた。薬物代謝関連遺伝子の既知多型の解析ばかりでなく、既知遺伝子の未知多型のスクリーニングや薬効・副作用の発症が示されていない新規候補遺伝子の多型スクリーニングが不可欠である。この際に非常に数多くの SNPs を解析対象とする必要があった。特に SNPs 情報が整っていない遺伝子においては、独自の連鎖不平衡地図の作成や、日本人において多型頻度が高い SNPs を限定することなどが、研究を推進する上でのボトルネックとなっていた。

本薬理遺伝学プロジェクトと時期を同じくして進められている国際 Hapmap 計画

(<http://hapmap.jst.go.jp/>) では、この遺伝子多型基盤情報が国際的かつ大規模に整備されている。そこで本年度に我々は、Hapmap 計画により得られている多型データを薬理遺伝学研究に応用するためのコンピュータ環境を整備し、多型情報の利用を簡便なものとした。本報告書ではメソトレキセート薬剤有効性に関与する多型解析を具体例として、Hapmap 計画由来のデータの効率的利用法の実際について記載する。

研究協力者

佐藤玲子 慶應義塾大学医学部薬剤部 助手
島崎紀子 慶應義塾大学医学部小児科 医師
鮫島葉月 慶應義塾大学医学部小児科 研究員
泉 幸佑 慶應義塾大学医学部小児科 医師
荒巻道彦 慶應義塾大学医学部小児科 医師

指摘されている ABCC 遺伝子中の多型を効率的に調べるため、国際 Hapmap プロジェクトにて公開されているデータを用いて目的 SNPs を選定し、MTX による副作用発症との関連について検討した。

B. 研究方法

A. 研究目的

メソトレキセート (以下 MTX) は、葉酸 (プリン塩基前駆体) 合成を阻害する抗ガン剤であり、乳幼児の急性白血病、特に急性リンパ性白血病に非常に有効で、広く用いられている薬剤である。メソトレキセートの使用には多くの副作用があるが、個々人の薬剤有効性に、いくつかの遺伝子多型が関与している事が近年になって知られている。本研究では、既に MTX 有効性との関連が

1. 解析対象遺伝子

解析対象は ABCC5 (ATP-binding cassette C5)、トランスポーターファミリーに属する遺伝子である。ATP-binding cassette は、名前の通り ATP が結合すると考えられているドメインを持つタンパク質ファミリーである。またファミリーとして数十の類縁タンパクが存在する。

2. 国際 Hapmap 計画について

ABCC5 遺伝子中に存在する遺伝子多型は数が多いが、また解析対象には、日本人において一定以上の頻度で存在する多型でなければ、MTX との関連性を効果的に解析することはできない。

そのため我々は国際 Hapmap プロジェクトに公

開されている ABCC5 遺伝子の SNPs データを、利用して、解析対象とする SNPs を選定した。

International HapMap Project

国際 HapMap 計画

Home | プロジェクトについて | データ | 文献 | Conference

中文 | English | Français | 日本語 | Yoruba

国際 HapMap 計画は、ヒトの病気や薬に対する反応性に関わる遺伝子を発見するための基盤を整備するプロジェクトです。この計画は、カナダ、中国、日本、ナイジェリア、英国、米国の科学者と各国政府、財団などの協力により行われています。詳細は国際 HapMap 計画についてをご覧ください。

プロジェクトの情報

- プロジェクトについて
- HapMap 文献
- HapMap Conference
- HapMap News メーリングリスト
- 参加施設、参加者
- HapMap 日本のミラーサイト

News

- 2005年02月18日: 第 15 回のデータリリースで Han Chinese, Japanese, Yoruba のサンプルについての情報はここから。ジェノタイプデータの一括ダウンロードはここから。データのサマリーは。

Populations	CEU	HCB	JPT	YRI
Genotyped SNPs	1,050,307	1,015,490	1,015,226	1,003,169

2005年2月7日: 国際 HapMap プロジェクトはハプロタイプ地図をより高密度に作成することとしました。330万ドルの追加予算により、従来想定していたものより高密度に地図を作成できるようになりました。このマップによって、喘息、癌、糖尿病や心臓病といった疾患に関連する遺伝子をより迅速に同定することができますと期待されます。

2004年12月10日: genotype データにアクセスするための clickwrap agreement は必要なくなりました。ユーザーの皆様は、data usage guidelines を要約するようお願ひします。参考までに、以前の...

データ

- Generic Genome Browser
- データ全体のダウンロード
- ENCODE Project
- データ使用に関するガイドライン

リンク

FigA. 国際 Hapmap プロジェクト Web サイト

(<http://www.hapmap.org/> 日本ミラーサイト : <http://hapmap.jst.go.jp/>)

Hapmap プロジェクトは、ヒトの疾患・薬剤に対する反応性に関わる遺伝子を発見するための基盤整備プロジェクトである。染色体上の特定領域に存在する遺伝子について、近傍の遺伝子多型のアレル頻度・遺伝子型等のデータが簡便に閲覧できる。また、Hapmap 計画が独自に多型頻度を算出した一部 SNPs に関しては、実際の解析データをダウンロードすることが可能である。したがって独自の実験を行わずに公開されているデータのみからハプロタイプブロックを予測することもできる (C)。ただしその解析データは、遺伝子や人種がかなり限定される

(これら Hapmap 作成のためのサンプルを提供した

母集団に関しては、以下の 4 グループが定義されている。

ナイジェリア:イバダンのヨルバ族 (YRI)

日本:東京の日本人 (JPT)

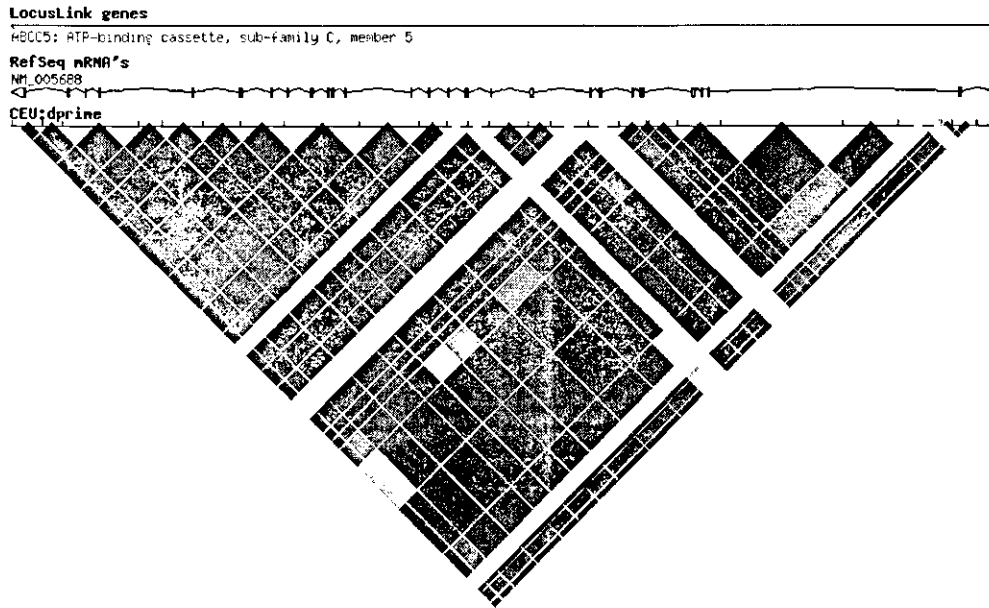
中国:北京の漢民族系中国人 (HCB)

CEPH(北ヨーロッパや西ヨーロッパから来た祖先を持つ米国ユタ州の住民) (CEU)

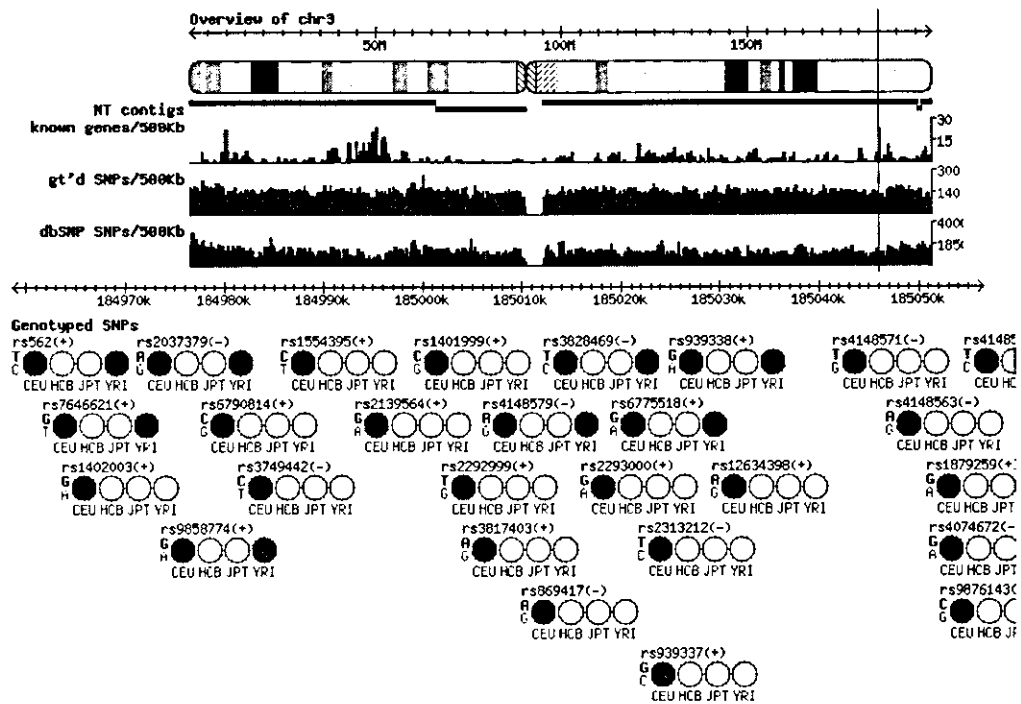
ヨルバ族については、ドナーには祖父母四人が全員ヨルバ族であることが必要とされている。漢民族系中国人については、ドナーは四人の祖父母のうち少なくとも三人が漢民族系中国人であることが必要とされている。日本人については、ドナーには祖先が日本人である人からサンプルを収集することが目的である

旨が伝えられた。CEPH母集団における構成員と基準、ドナーが全員ユタ州の住民であるという以外に

は明記されていない。また、この集団は表現型の情報を収集されていない



FigB.Hapmap 計画による ABCC5 遺伝子連鎖不平衡地図 (LD Map)



FigC.各 SNP s 頻度の独自解析結果

rs#	SNPAlleles	chrom	pos	strand	genome_bu	center	NA18940	NA18942	NA18943	NA18944	NA18945	NA18947
rs3883674	C/T	Chr10	32380	-	ncbi_b34	sanger	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs10751931	C/T	Chr10	49949	+	ncbi_b34	sanger	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs12775203	C/T	Chr10	52277	+	ncbi_b34	sanger	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs2313116	C/T	Chr10	57161	-	ncbi_b34	sanger	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs12218303	A/C	Chr10	58178	+	ncbi_b34	sanger	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs12761585	C/T	Chr10	64658	+	ncbi_b34	sanger	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs7908677	A/G	Chr10	65955	+	ncbi_b34	sanger	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs11253113	C/T	Chr10	67224	+	ncbi_b34	sanger	CT	CT	TT	TT	TT	CT
rs11253178	C/T	Chr10	68164	+	ncbi_b34	sanger	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs4881493	G/T	Chr10	73893	+	ncbi_b34	sanger	GT	GT	GG	GG	GG	GT
rs12413667	A/G	Chr10	73959	+	ncbi_b34	sanger	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs9419537	A/G	Chr10	74660	+	ncbi_b34	sanger	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs12773042	C/G	Chr10	81636	+	ncbi_b34	sanger	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs4242802	C/G	Chr10	87998	+	ncbi_b34	sanger	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs12768206	A/G	Chr10	88767	+	ncbi_b34	sanger	AG	AA	AA	AA	AG	AG
rs7475011	C/G	Chr10	97076	+	ncbi_b34	sanger	CC	CG	GG	GG	CG	CC
rs2379077	C/T	Chr10	99698	+	ncbi_b34	sanger	CT	CT	CC	CC	CC	CT
rs12268912	C/T	Chr10	103173	+	ncbi_b34	sanger	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs7081047	C/T	Chr10	103465	+	ncbi_b34	sanger	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs9419561	G/T	Chr10	108552	+	ncbi_b34	sanger	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs11253553	A/T	Chr10	111441	+	ncbi_b34	sanger	AT	AT	TT	TT	TT	AT
rs4881551	A/G	Chr10	113076	+	ncbi_b34	sanger	AG	AG	GG	GG	GG	AG
rs2379050	A/G	Chr10	116271	+	ncbi_b34	sanger	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs9419418	C/T	Chr10	117536	+	ncbi_b34	sanger	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs9645540	A/C	Chr10	118417	+	ncbi_b34	sanger	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs4372370	C/T	Chr10	122814	+	ncbi_b34	sanger	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs7081782	G/T	Chr10	123560	+	ncbi_b34	sanger	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs4469807	A/G	Chr10	125126	+	ncbi_b34	sanger	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs4880781	C/T	Chr10	129653	+	ncbi_b34	sanger	CT	CT	CC	CC	CT	CC
rs7089889	G/T	Chr10	132434	+	ncbi_b34	sanger	GT	GG	GG	GG	GT	GT
rs11250357	C/G	Chr10	136783	+	ncbi_b34	sanger	CC	CC	CC	CC	CC	CC

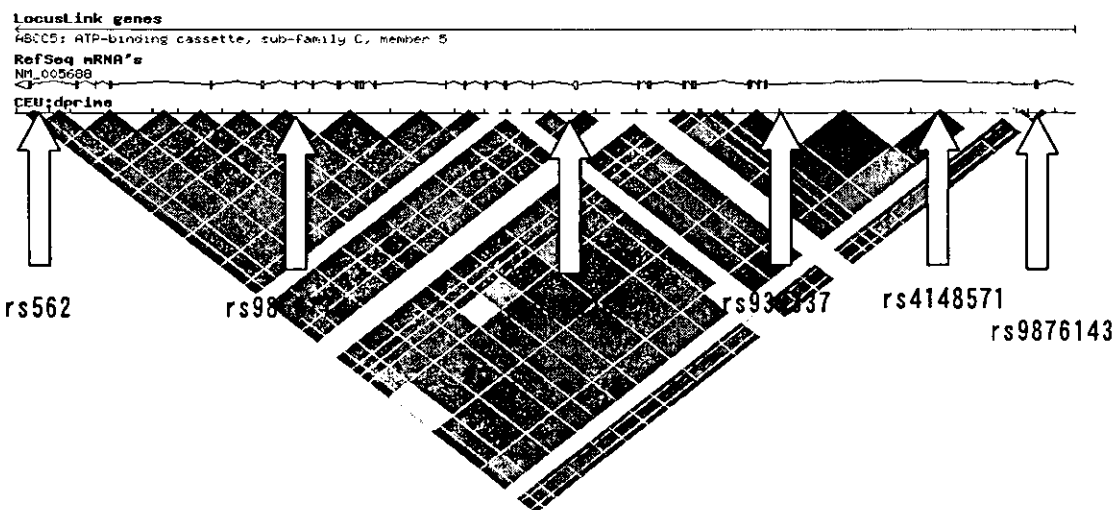
FigD.各 SNPs 頻度に関する生データ

(□データはテキスト形式、gz 圧縮データとしてダウンロード可能。上図はテキストデータをエクセルで表形式に表示している)

3.SNPs の選定

今回解析した ABCC5 遺伝子座位における連鎖不平衡についての日本人の情報は未だに収載されていない。このため、まず白人におけるデータ (CEPH・CEU) を参照した。連鎖不平衡地図 (FigA、

FigE) で値の高い 1 エリアにつき、30%以上の SNPs 頻度を持つ SNPs を 1 ないし 2 箇所選出した (FigC)。



FigE.ABCC5 遺伝子上の SNPs の選定

4. 遺伝子多型解析

上記のごとく選定した SNPs について、白血病患者検体の解析を行った。研究計画について慶應義塾大学医学部倫理審査委員会の審査・承認を得たのち、患者あるいは代諾者からの同意を取得して解析を行った。全血ないし腫瘍細胞からゲノム DNA を抽出し、以下のプライマーを用いて、PCR 増幅を行い、直接シーケンシング法によりジェノタイプングを行った。

解析の各条件は以下の通りである。

PCR Primer

rs562

Foward -TTCCACAAGGTGTTTCAGCAA

Reverse -TGTGTGGTTTGGTGTGTTCC

rs9858774

Foward -CTAGAAGCCCCATTTCCACA

Reverse -gcctggcTCTTCCCATAAAT

rs939336

Foward -CTGGCCTAAAATGGCTGAAA

Reverse -AACAGGTAAGTGGCCTGCTG

rs939337

Foward -ACAGGACATCATCAAAACCATT

Reverse -TTGCAAATGCACTTCTCACTC

rs4148571

Foward -CACATTCATAGACACCTCTGGTATG

Reverse -GAACAACCTGGTTGAATCCTCAG

rs9876143

Foward -CACCACCACACCTCACTAATTT

Reverse

-ACAGGGAATATAAAGCCAATTAAGC

PCR condition

Buffer Parameters

Template DNA: 50 ng Genomic DNA

Polymerase: 0.5 U Platinum Taq Polymerase

High Fidelity, Invitrogen

PCRBuffer: Invitrogen attached buffer

Reaction Vol.: 20.0 ul

Primer 1 conc.: 0.5 uM (dried up in each vial)

Primer 2 conc.: 0.5 uM (dried up in each vial)

MgSO4 conc.: 2mM

dNTPs conc.: 0.2 mM

Other Reagents: None

Cycle program

Initial Denaturation

Denaturation: 95 C, 5:00 mins

TouchDown Cycles

Denaturation: 95 C, 0:30 mins

TD Anneal Start: 63 C, 0:30 mins

Decrement: 0.5 C

Extension: 68 C, 0:30 mins

Cycles: 10

Cycling Conditions

Denaturation: 95 C, 0:30 mins

Anneal: 58 C, 0:30 mins

Extension: 68 C, 0:30 mins

Cycles: 30

Final Extension: 68 C, 10:00 mins

C. 実験結果

ABC トランスポータ遺伝子の多型解析の結果を表 1 にまとめた。解析結果と、MTX 使用による嘔吐の副作用との関連に有意を認めた。結果の詳細については、熊谷分担研究者報告書を参照されたい。

表 1

	アレル頻度	型
Haplotype1	6.7%	TGGCGC
Haplotype2	36.7%	CAGCGC
Haplotype3	26.7%	TGAGTG
Haplotype4	6.7%	CAGCGG
Haplotype5	23.3%	TAGCGC

D. 考察

Hapmap 計画によるコーカソイド系人種の連鎖不平衡地図、および多型頻度のデータを参考にして SNPs を選定し、日本人においても多型性の高い SNPs を同定することが出来た。また、ABCC5 遺伝子上に存在するハプロタイプを5つまで限定することができた。

従来、候補遺伝子と表現型の関連を解析する際には、独自に多型性の高い SNPs を同定し、候補遺伝子近傍の連鎖不平衡地図を作製する必要があった。しかし Hapmap 計画のデータを効果的に用いることで、連鎖不平衡地図の作製に要する時間が短縮された。他の薬剤代謝遺伝子の多型解析の際にも同様の手法を用いることで解析の効率化が期待される。

E. 結論

本薬理遺伝学プロジェクトと時期を同じくして進められている国際 Hapmap 計画 (<http://hapmap.jst.go.jp/>) では、この遺伝子多型基盤情報が国際的かつ大規模に整備されている。われわれは、Hapmap 計画により得られている多型データを薬理遺伝学研究に应用するためのコンピュータ環境を整備し、薬理遺伝学的研究における多型情報の利用を簡便なものとした。

F. 参考文献

A functional study on polymorphism of the ATP-binding cassette transporter ABCG2: critical role of arginine-482 in methotrexate transport.

Mitomo H, Kato R, Ito A, Kasamatsu S, Ikegami Y, Kii I, Kudo A, Kobatake E, Sumino Y, Ishikawa T. *Biochem J.* 2003 Aug 1;373(Pt 3):767-74.

Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system.

Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, Kruh GD. *Cancer Res.* 2002 Jun 1;62(11):3144-50.

The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP.

van Aubel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ, Russel FG. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Mar;13(3):595-603.

Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8.

Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kitamura Y, Kondo K, Harigae S, Osawa S, Nakamura Y. *J Hum Genet.* 2002;47(6):285-310.

Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis.

Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. *Int J Mol Med.* 2003 May;11(5):593-600.

Pharmacogenetics of disease-modifying anti-rheumatic drugs.

Tanaka E, Taniguchi A, Urano W, Yamanaka H, Kamatani N. *Best Pract Res Clin Rheumatol.*

2004 Apr;18(2):233-47.

The International HapMap Project.

The International HapMap Consortium.
Nature 426,789-796(2003)

Integrating ethics and science in the
International HapMap Project.

The International HapMap Consortium. Nature
Reviews Genetics 5, 467 -475 (2004)

Bayesian haplotype inference for multiple
linked single-nucleotide polymorphisms. Niu,
T., Qin, Z.S., Xu, X., and Liu, J.S. (2002) Am J
Hum Genet. 2002 Jan;70(1):157-69

(資料)

厚生労働科学研究費補助金

(小児疾患臨床研究：小児疾患臨床研究分野 若手医師・協力者活用等に要する研究チーム)

DHPLC法を用いた TPMT 遺伝子の全域スクリーニング

小崎 健次郎 (慶應義塾大学医学部 助教授)

研究要旨 本研究では、高感度である DHPLC 法を用いて、TPMT 遺伝子の全域をスクリーニングしうる検出系を開発し、これまでに報告のある全ての 16 種類の TPMT 変異を検出しうることを確認して解析方法の妥当性を確認した。さらに世界各地から集積された 288 名の正常対照の DNA を解析して、新たに 2 種類の新規変異 エクソン 7 の Arg163Cys 変異とエクソン 10 の Arg226Gln 変異を同定した。本スクリーニングシステムの利用により、6-メルカプトプリン治療前に骨髄障害を来しうる患者を同定することが可能になると期待される。

研究協力者

森 鉄也 慶應義塾大学医学部小児科 専任講師
荒巻道彦 慶應義塾大学医学部小児科 医師
宇高 徹 慶應義塾大学医学部小児科 研究員
鳥居千春 慶應義塾大学医学部小児科 研究員
高橋大輔 慶應義塾大学医学部小児科 研究員

A. 研究目的

6-MP は 急性白血病・慢性骨髄性白血病にたいして保険適応が認められており、小児期において最も頻度の高い悪性腫瘍である ALL の治療において、維持療法の中心的薬剤である。維持療法の 2~3 年間の期間中、患者は 6MP とメソトレキセートの組み合わせを内服する。この期間中、患者の骨髄は抑制された状況に置かれ、その程度を参照しつつ薬剤投与のスケジュールが決定される。

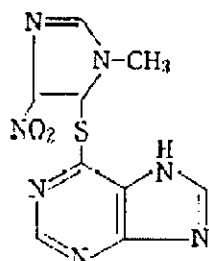
小児期の ALL は治療可能な疾患と考えられているものの、一部の症例は完治しない。治療成績の向上を目指すためには、6MP の複雑な薬理学的特性を理解する必要がある。特に 80% の ALL の再発例は造血組織内で起こっており、骨髄において 6MP が十分に効果を発揮することが重要であ

る。6MP はいわゆるプロドラッグで薬効を発現する前に代謝される必要があり、その抗腫瘍活性は投与量ばかりでなく、6MP から活性中間体への変換効率によっても大きな影響を受ける。まず 6MP は 6-thioinosine monophosphate に変換され、その後、6-thioguanine triphosphate nucleotide (6-TGN) に変換される。6-TGN が DNA に取り込まれることにより、DNA リガーゼ・エンドヌクレアーゼ・ポリメラーゼの阻害により 6-MP の抗腫瘍活性が発揮される。

6-MP は主として肝臓でキサンチンオキシダーゼ (XO) によってチオ尿素 (thiouric acid) に代謝されて尿中に排出される。XO は小腸・肝臓に発現しているが、血球細胞にはほとんど存在しない。また 6-MP は標的臓器である造血細胞中で、ヒポキサンチングアニンホスホリボシル転移酵素 (HGPRT) によりチオグアニン化合物に変換され、薬効と細胞毒性を発揮する。一部の 6-MP はチオグアニン化合物に変換されることなくチオプリン転移酵素 (TMPT) によりメチル化され、不活化される。メチル化した 6MP と 6-TIMP はプリンサルベージ経路を阻害する作用を有するが、毒性効果としては、6-TGN 程重要ではない。

結果として TPMT は 6-TGN 産生量を調節しており、その活性は 6MP の抗腫瘍効果の主たる決定因子となる。

アザチオプリン（商品名：イムラン・アザニン）は体内で非酵素的に 6-メルカプトプリンに変換される。アザチオプリンは腎移植、肝移植、心移植、肺移植の移植における拒絶反応の抑制に保険適応が認められている。



アザチオプリン

TPMT を欠損する患者では 6MP 投与時に強い骨髄抑制が生じる。臨床的経験からは、TPMT 欠損ホモ接合体患者に対する 6MP の至適投与量は常用量の 5 から 10%程度である。赤血球のライセートを用いて、活性を測定し、標的臓器における代謝活性の参照値とすることが行われている。赤血球 TPMT 活性には民族間差が存在する。例えば北ノルウェーの研究によれば、Saami という民族における赤血球の TPMT 活性は同地域に住む白人に比べて、29%高値であった。アメリカの白人に比べて黒人の TPMT 活性は 17-33%低かった。アメリカの黒人や白人の TPMT 活性は 119 人の中国人に比べて、有意に低い。

6MP やアザチオプリンの投与前に赤血球 TPMT 活性を測定して副作用を事前回避する試みが行われているが、輸血すると患者自身の TPMT 酵素活性を測定することが出来なくなる。そこで 6-MP 投与前に遺伝子検査を行ってリスクの高い患者を同定することが出来れば、低用量で治療を開始することにより副作用の発症を防止できると期待される。

B. 研究方法

① 既知変異の検出

既報告の TPMT 変異を site-directed mutagenesis の手法により作成し、プラスミド中にサブクローニングした。作成したプラスミドを鋳型として、PCR 増幅をおこない増幅産物を DHPLC 法により解析した。

Site-directed mutagenesis には splciding by overlap extension 法を用いた。本法の利用により、頻度の低いアレルであっても、人工的に作成し、DHPLC 法による解析法を最適化することが可能となる。具体的なプロトコルについては添付英文論文（Genetic Testing 誌、印刷中）の付表を参照のこと。

② 未知変異の検出

コリエル研究所から 450 名の連結不能匿名化された正常対照検体を購入しうち 288 名分のサンプルを DHPLC 法により解析した。

450 名の内訳は、120 名が白人、120 名が黒人、60 名がヒスパニック、30 名がアメリカインディアン、120 名がアジア人である。96 の倍数を単位として検査を行ったので、450 名全員ではなく、288 名をランダムに選んで解析した。

最適化された DHPLC 解析条件については添付英文論文（Genetic Testing 誌、印刷中）の付表を参照のこと。

C. 実験結果

方法①により作成した既報告の変異を方法②で最適化したプロトコルにより検出可能であった。得られた DHPLC クロマトグラムについては添付英文論文の付図を参照のこと。

また、288 名の正常対照の解析の結果、2 名の新たに 2 種類の新規変異 エクソン 7 の Arg163Cys

変異とエクソン10の Arg226Gln 変異を同定した。得られた DHPLCクロマトグラムについては添付英文論文の付図を参照のこと。

D. 考察

TPMT 遺伝子全域の変異を検出するスクリーニング系を確立した。日本人ばかりでなく世界の他民族における変異を検出することも示した。TPMT 多型のうちこれまでに知られている*3C多型のスクリーニングシステムの臨床利用について小児科診療における効果的薬剤使用のための遺伝子多型スクリーニングシステムの構築に関する研究「TPMT*3Cスクリーニング検査運用

の実際」報告書に記載した。今後は、*3Cばかりでなく、他の変異も包括的に検出するスクリーニング検査の臨床応用が可能になると期待される。

E. 結論

本研究では、高感度である DHPLC 法を用いて、TPMT 遺伝子の全域をスクリーニングする検出型を開発し、これまでに報告のある全ての 16 種類の TPMT 変異を検出した。さらに 288 名お正常対照のスクリーニングにより、2 種類の新規変異を同定した。以上の成績から確認して解析方法の妥当性を確認した。

(Genetic Testing, in press)

Comprehensive Screening of the Thiopurine Methyltransferase Polymorphisms

by Using Denaturing High-performance Liquid Chromatography

TORU UDAKA,¹ CHIHARU TORII,¹ DAISUKE TAKAHASHI,¹ TETSUYA MORI,¹

MICHIHIKO ARAMAKI,¹ RIKA KOSAKI,¹ YUSUKE TANIGAWARA,²

TAKAO TAKAHASHI,¹ KENJIRO KOSAKI¹

¹Departments of Pediatrics and ²Pharmacy, Keio University School of Medicine

Running title: DHPLC-BASED SCREENING OF TPMT POLYMORPHISMS

*Correspondence to: Kenjiro Kosaki, M.D., Ph.D., F.A.C.M.G.

Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine,

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.

Tel: +81-3-3353-1211 ext 62368; Fax: +81-3-5379-1978; E-mail:

kkosaki@sc.itc.keio.ac.jp

ABSTRACT

The drug-metabolizing enzyme thiopurine S-methyltransferase (TPMT) catalyzes the S-methylation of thiopurines like 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, and azathiopurine, which are used as immunosuppressants and in the treatment of acute lymphoblastic leukemia and rheumatoid arthritis. TPMT enzymatic activity is a polymorphic trait and poor metabolizers may develop life-threatening bone marrow failure. To avoid such adverse effects, the TPMT enzymatic activity in patients' RBCs is routinely measured prior to thiopurine administration in a limited number of oncology clinics. In the present study, we took advantage of a highly sensitive and specific automated DHPLC technique that not only detects known polymorphic alleles, but also identifies previously uncharacterized sequence variants. We developed a DHPLC-based protocol to analyze the entire coding region and validated the protocol by detect all 16 previously described variant alleles. We further analyzed the entire coding region of the TPMT gene in 288 control samples collected worldwide and identified two novel amino acid substitutions Arg163Cys (487C>T) and Arg226Gln (677G>A) within exons 7 and 10, respectively. The clinical application of this comprehensive screening system for examining the entire TPMT gene would help to identify patients at risk for bone marrow failure prior to 6-mercaptopurine therapy.

INTRODUCTION

The drug-metabolizing enzyme thiopurine S-methyltransferase (TPMT) (Weinshilboum and Sladek, 1980) catalyzes the S-methylation of thiopurines like 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, and azathiopurine, which are used as immunosuppressants (3) and in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (Lennard et al., 1989) and rheumatoid arthritis. TPMT enzymatic activity is a polymorphic trait (Lennard et al., 1987). One in 300 Caucasians are poor metabolizers of thiopurines, as defined by a low red blood cell [RBC] TPMT activity level (Lennard et al., 1987). Poor metabolizers of thiopurines who exhibit reduced TPMT activities may develop life-threatening bone marrow failure (e.g., pancytopenia) after being treated with standard dosages of thiopurines because of the accumulation of cytotoxic metabolites of thiopurines (McLeod et al., 1993; Schutz et al., 1993). To avoid such adverse effects, the TPMT enzymatic activity in patients' RBCs is routinely measured prior to thiopurine administration in a limited number of oncology clinics (Weinshilboum et al., 1978; McLeod et al., 1995). At present, however, RBC-based enzymatic assays are not commonly applied in clinical settings because the assay protocol is technically demanding and requires rigorous quality control procedures (Armstrong et al., 2004).

The human TPMT locus is relatively polymorphic with 16 known polymorphic alleles, including null and hypomorphic alleles (Krynetski et al., 1995; Szumlanski et

al., 1996; Tai et al., 1996; Otterness et al., 1997; Tai et al., 1997; Loennechen et al., 1998; Otterness et al., 1998; Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998; Hon et al., 1999; Colombel et al., 2000; Hamdan-Khalil et al., 2003; Schaeffeler et al., 2003; Lindqvist et al., 2004). Most Caucasian poor metabolizers have the TPMT*3A (gene frequency of 3.2-5.7%), TPMT*2 (0.2-0.5%) or TPMT*3C (0.2- 0.8%) allele (Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998; Ameyaw et al., 1999; McLeod et al., 1999). The *3C allele is the most frequent variant allele in Asian and African poor metabolizers. Genotyping results for the *2, *3A, and *3C alleles concord with the results of RBC enzymatic assays (Yates et al., 1997; Coulthard et al., 1998). Therefore, genotyping for the hypomorphic alleles of TPMT is considered promising approach for predicting individual response, potentially replacing the RBC TPMT activity assay (Balis and Adamson, 1999; McLeod et al., 2000). Several methods, including PCR-RFLP, allele-specific PCR (Tai et al., 1996; Yates et al., 1997), pyrosequencing (Lindqvist et al., 2004), and direct sequencing have been used to screen for relatively prevalent polymorphic alleles, including the *2, *3A, and *3C alleles. Schaeffeler et al. demonstrated the usefulness of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of exons 5, 7 and 10 of TPMT to discriminate the *2, *3A, and *3C alleles (Schaeffeler et al., 2001).

Recent studies have identified novel mutant alleles of TPMT in Caucasian and non-Caucasian populations (Krynetski et al., 1995; Szumlanski et al., 1996; Otterness et al., 1997; Otterness et al., 1998; Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998; Hon et al., 1999; Colombel et al., 2000; Hamdan-Khalil et al., 2003; Schaeffeler et al., 2003; Lindqvist et al., 2004). Therefore, comprehensive screening of the entire coding region is preferable to a limited screening of previously known variant alleles. In the present study, we took advantage of a highly sensitive and specific automated DHPLC technique (Harvey and Sampson, 2004) that not only detects known polymorphic alleles, but also identifies previously uncharacterized sequence variants. The purposes of the present study are threefold. First, we developed a DHPLC-based protocol to analyze the entire coding region. Second, we tested whether the optimized protocol could detect all 16 previously described variant alleles. Lastly, we analyzed the entire coding region of the TPMT gene in 288 control samples collected worldwide and obtained from the DNA Polymorphism Discovery Resource (Collins et al., 1998).

MATERIALS AND METHODS

Site-directed mutagenesis

PCR amplicons containing all previously described polymorphic alleles of TPMT (Krynetski et al., 1995; Szumlanski et al., 1996; Otterness et al., 1997; Otterness et al.,

1998;Spire-Vayron de la Moureyre et al., 1998;Hon et al., 1999 ;Colombel et al., 2000;Hamdan-Khalil et al., 2003;Schaeffeler et al., 2003) were generated using the 'splicing by overlap extension' PCR method (Horton et al., 1990;Horton et al., 1993). Briefly, two segments of a gene were independently amplified by PCR and then fused together in a subsequent reaction. Mutations were introduced into a targeted region using mutant primers containing mismatches in their central region. Because the mutant primers were complementary, the two overlapping fragments could be fused together in a subsequent extension reaction. Two PCR steps were performed to amplify two separate products using appropriate outer and inner mutated primers. PCR conditions for the primary PCR were 30 cycles of 95°C for 30s, 58°C for 30s and 72°C for 60s using outer forward-inner reverse and inner forward-outer reverse primer pairs (Table 1), respectively. Then, PCR products were purified by desalting column (Qiagen). Secondary PCR was performed using the outer forward and outer reverse primers and an appropriate amount of two primary PCR products as a template, using the same conditions as for the primary PCR. The PCR products were purified using a desalting column (Qiagen), sequence-verified, and used as the positive controls for the DHPLC assay (see below).

Study population

The DNA Polymorphism Discovery Resource (Collins et al., 1998), developed by the National Human Genome Research Institute (NHGRI) in collaboration with the National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) and its Human Genetic Cell Repository, contains cell lines and DNA samples from 450 unrelated individuals (120 European-Americans, 120 African-Americans, 60 Mexican-Americans, 30 Native Americans, and 120 Asian-Americans). Since we planned to use a 96-well PCR plate and wanted to utilize a sample number that was a multiple of 96, we analyzed 288 samples selected randomly from the 450 samples (No. 0108-0187, 0189-0396) in the DNA polymorphism discovery resource panel. The study protocol was approved by the local ethics committee.

PCR amplification of the mutagenesis product and genomic DNA

PCR fragments generated by site-directed mutagenesis or genomic DNA from the control individuals were amplified using the primers. The primer sequences and the specific PCR conditions are listed in Table 2. The primers were designed so that the primer pairs used to amplify each exon would have the same cycling conditions. For exons 3, 4 and 5, non-template GC-clamp was added to the primers (Table 2, shown in uppercase) to detect mutations within the higher melting temperature domain. PCRs

were performed in a volume of 20 μ L containing 30 ng of genomic DNA, 10 pmol of forward and reverse primer, 0.2 mM of dNTPs, 0.5 U of Optimase polymerase (Transgenomic), and the buffer supplied by the manufacturer.

The annealing temperature was decreased by 0.5°C every second cycle beginning at 63°C and decreasing to a 'touchdown' (Don et al., 1991) annealing temperature of 58°C, which was then used for 30 cycles. When analyzing the population control samples, the primer pairs were aliquoted on a 96-well format PCR plate. In this manner, all the exons were amplified simultaneously using a single PCR machine. The PCR products were directly sequenced using the dideoxy sequencing method (BigDye Dideoxy sequencing kit; Applied Biosystems) and an automated sequencer (ABI3100; Applied Biosystems). The sequence-verification primers were the same as the PCR primers.

DHPLC analysis

PCR amplicons from human genomic DNA or PCR amplicons with mutations generated by site-directed mutagenesis were analyzed by DHPLC according to the method developed by Oefner and Underhill (Harvey and Sampson, 2004) using an analysis system purchased from Transgenomic (Omaha, Nebraska). The PCR products were denatured at 95°C for 5min and reannealed by cooling to 25°C with a temperature change of -1.5°C/min. All DHPLC conditions, including the melting temperatures and buffer gradients specific to each PCR amplicon, were determined using melting temperature prediction software (Transgenomic WAVEMAKER). A single temperature condition was used except for exons 3, 4 and 10. Because software predicted these fragments to consist of two different melting temperature domains, two analysis temperatures were needed to scan the entire exon sequence. The samples were applied to a preheated reversed-phase column. The elution gradient was generated by mixing buffer A (0.1 mol/L triethylammonium acetate) and buffer B (0.1 mol/L triethylammonium acetate containing 250 mL/L acetonitrile) in a linear gradient from start to the final %B over a period of 4.5 minutes, as shown in Table 2. Amplicons were then run on the DHPLC at three different temperatures (predicted temperature and 1°C above and 1°C below). When screening the samples, the DHPLC profiles were visually compared with the previously determined profiles of known mutation controls. All the samples with abnormal elution profiles were confirmed to have mutations by direct DNA sequencing.

RESULTS

Optimization of the PCR conditions and DHPLC analysis

The optimized sets of PCR primers are shown in Table 2. All the exons were successfully amplified under a single condition without any artifacts resulting from mispriming or primer-dimer formation (Fig. 1).

Site-directed mutagenesis of known variant alleles and their analysis by DHPLC

PCR amplicons flanking the previously described polymorphic alleles of TPMT were generated using the 'SOE' (splicing by overlap extension) PCR method, and direct sequencing of the mutagenesis products confirmed that the desired mutant fragments had been successfully generated (data not shown). Equimolar quantities of reference wild-type PCR product and mutant PCR product were mixed, re-annealed, and analyzed by DHPLC. Representative DHPLC elution profiles are shown in Fig. 2. The chromatograms of the PCR products generated by site-directed mutagenesis exhibited multiple peaks, whereas those of the PCR products amplified from known wild-type homozygotes exhibited a sharp, single peak. The optimized DHPLC analytic conditions are shown in Table 2.

DHPLC analysis of 288 DNA samples collected worldwide

The genotype distribution is summarized in Table 3. Two novel sequence variants were found within the coding region (Fig. 3): Arg163Cys (487C>T) and Arg226Gln (677G>A) amino acid substitutions within exons 7 and 10, respectively. These sequence variants were only observed once each: one of the 288 individuals from whom a DNA sample was examined was heterozygous for the Arg163Cys (487C>T) variant, whereas another individual was heterozygous for both the newly identified Arg226Gln polymorphism and the previously known Arg115His polymorphism.

DISCUSSION

In the present study, we developed a DHPLC-based method that allows the entire coding region of the TPMT gene to be screened. The ability of the DHPLC-based method to detect all previously described variant alleles supports the notion that the DHPLC protocol described herein is a highly sensitive and specific genotyping method. Furthermore, the identification of two novel polymorphisms, Arg163Cys and Arg226Gln, among 288 control individuals collected world-wide demonstrates the effectiveness of the DHPLC-based TPMT mutation analysis. Whether the new amino acid substitutions result in altered enzymatic activity has yet