

- 29 Mukherjee S, Banerjee SK, Maulik M, Dinda AK, Talwar KK, Maulik SK. Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF-alpha expression. *BMC Pharmacol* 2003; **3**: 16.
- 30 Gilliam LA, St Clair DK. Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle: the role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2011; **15**: 2543–63.
- 31 Ariga M, Neitzert B, Nakae S *et al.* Nonredundant function of phosphodiesterases 4D and 4B in neutrophil recruitment to the site of inflammation. *J Immunol* 2004; **173**: 7531–8.
- 32 Stephensen CB, Borowsky AD, Lloyd KC. Disruption of Rxra gene in thymocytes and T lymphocytes modestly alters lymphocyte frequencies, proliferation, survival and T helper type 1/type 2 balance. *Immunology* 2007; **121**: 484–98.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Quantile–quantile plots of 17 genome-wide association studies of drug-induced or drug subgroup-induced severe neutropenia and their corresponding lambda (λ) value.

Fig. S2. (a) Manhattan plot for genome-wide association study of cyclophosphamide and paclitaxel + carboplatin induced severe neutropenia/leucopenia. (b) Manhattan plot for genome-wide association study of severe neutropenia/leucopenia induced by all types of platinum-based agents, cisplatin, or carboplatin. (c) Manhattan plot for genome-wide association study of severe neutropenia/leucopenia induced by all types of anthracycline-based agents, doxorubicin, or epirubicin. (d) Manhattan plot for genome-wide association study of severe neutropenia/leucopenia induced by all types of antimetabolite agents, 5-fluorouracil, or gemcitabine. (e) Manhattan plot for genome-wide association study of severe neutropenia induced by all types of antimicrotubule agents, paclitaxel, or docetaxel. (f) Manhattan plot for genome-wide association study severe neutropenia/leucopenia induced by all types of topoisomerase inhibitors, camptothecin, or etoposide.

Table S1. Genome-wide association study of each chemotherapy regimen with $P < 1 \times 10^{-4}$.

Table S2. Weighted genetic risk score of each genome-wide association study of specific chemotherapeutic-based induced severe neutropenia/leucopenia.

Table S3. Association study of cancer patients who do not develop any adverse drug reaction and those who developed neutropenia/leucopenia after being given combination treatment with paclitaxel and carboplatin.

Table S4. Association of previously reported SNPs that associated with gemcitabine induced hematological toxicity.

第 77 回 ゲノム医学の新情報⑤
II. 遺伝子解析による薬物反応性

(2) 有害事象 —ゲノムワイド関連解析による ゲムシタビン副作用関連遺伝子の同定

1. 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター
2. 理化学研究所ゲノム医科学研究センター
3. 札幌医科大学医学部外科学第一講座
4. 呉共済病院泌尿器科
5. 和歌山県立医科大学外科学第二講座

前佛 均¹・清谷 一馬²・宇野 智子³・木村 康利³
Hitoshi Zembutsu Kazuma Kiyotani Satoko Uno Yasutoshi Kimura
 (講師)

薙田 泰誠²・光畑 直喜⁴・伊奈志乃美⁵・鬼原 史³
Taisei Mushiroda Naoki Mitsuhashi Shinomi Ina Chikashi Kihara
 (診療部長)

山上 裕機⁵・平田 公一³・中村 祐輔¹
Hiroki Yamaue Koichi Hirata Yusuke Nakamura
 (教授) (教授) (センター長)

はじめに

現在、多くの悪性腫瘍に対する治療薬として適応となっているゲムシタビンは骨髄抑制をはじめ、有害事象の発生頻度が決して少なくない薬剤であるが、その副作用の発現を規定する遺伝的要因についてはいまだ十分に解明されていない。生命の設計図ともいわれるヒトの遺伝情報(ゲノム配列)は個人間でわずかな違いが存在することが知られており、遺伝子多型(一塩基多型)と呼ばれる塩基配列の個人差を比較することで、副作用の発現と関係する遺伝子を同定しようとする解析が進んできており、一部は日常臨床に応用されている^{1)~4)}。近年、ゲノム全体にわたり一塩基多型を genotyping する技術が進歩し、ゲノムワイド関連解析(genome-wide association study ;

Surgery Frontier 20(2) : 86-89, 2013

GWAS :「ジーワス」と呼ばれることが多い)という方法により、これまで副作用との関連が全く知られていなかった新たな副作用関連遺伝子を発見する試みがなされるようになってきた⁵⁾。

ゲノムワイド関連解析による ゲムシタビン骨髄抑制関連 候補遺伝子の同定

ゲムシタビン投与により骨髄抑制(> grade 3)が認められた21例と、投与により有害事象を認めなかった58例を用いて、ゲノム全体にわたり610,000個の遺伝子多型(single nucleotide polymorphism ; SNP)を genotyping した。得られた各症例の610,000 SNP の genotype 情報を用いて case-control 関連解析を行った結果、最も副作用と強い関連を示した SNP は $P = 0.000006690$ を示した。図1に

ゲノム全体にわたるマーカー SNP とゲムシタビン骨髄抑制との関連の強さをグラフで表したもの(マンハッタンプロット)を示すが、ゲムシタビンの副作用と関係する SNP は、ゲノム全体にわたり散在している可能性を示している。

ゲムシタビンによる 骨髄抑制関連候補遺伝子の replication study

ゲノムワイド関連解析の結果の再現性を確認するために、有意差上位100 SNP について33例の case および62例の control を用いて関連解析を行った。100 SNP に対する replication study の結果 $P < 0.05$ を示す4 SNP が同定された(表1)。4 SNP とゲムシタビンによる骨髄抑制との関連はそれぞれ9番染色体上の rs11141915 が $P = 2.77 \times 10^{-3}$ 、2番染色体上の

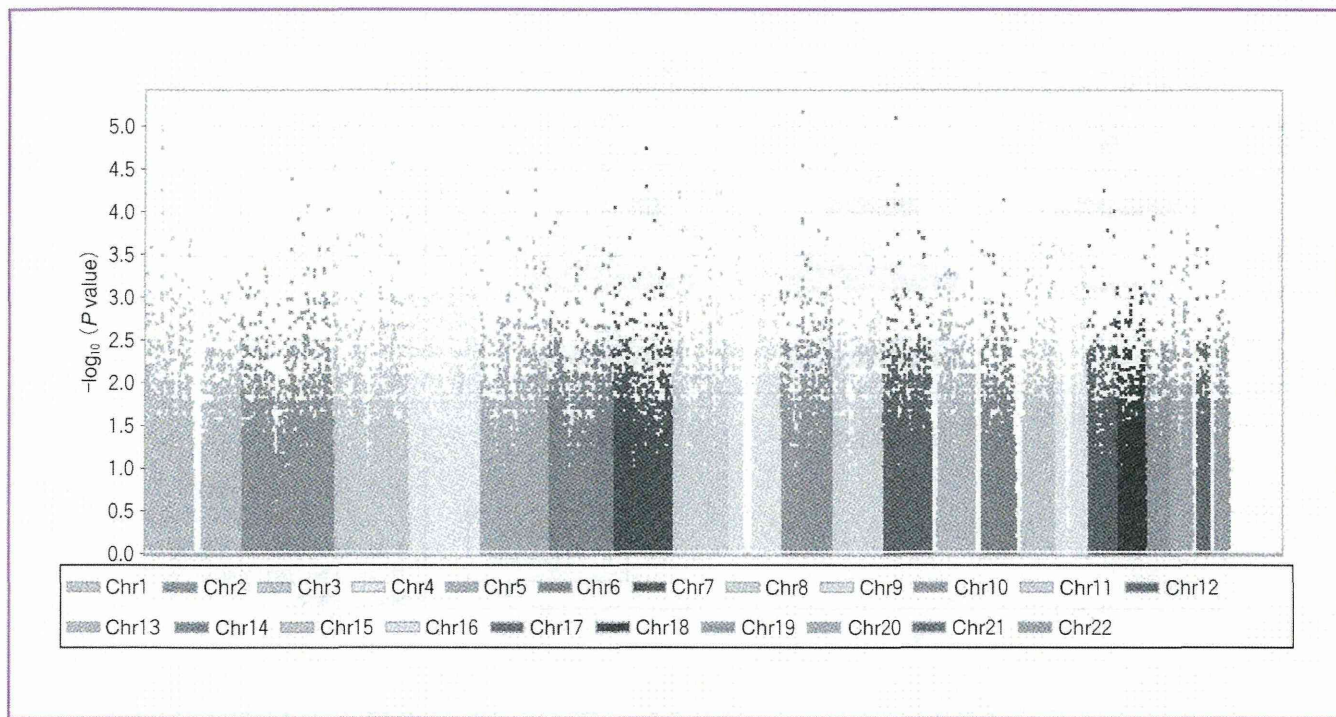


図1 マンハッタンプロット

ゲノム全体のマーカー SNP (点) について各染色体を横軸に、ゲムシタピンによる骨髄抑制との関連の強さを縦軸に表示している。ほとんどの SNP (点) が下方に位置し関連が認められない一方で、いくつかの SNP は強い関連がある可能性が示されている。

(カラーグラビア p7 写真 6 参照)

表1 ゲムシタピン副作用遺伝子の関連解析の結果

SNP	染色体	遺伝子	アレルの定義 1/2 (リスク)	ステージ	骨髄抑制群				コントロール群				P値			オッズ比 (95%CI)
					11	12	22	リスクアレル頻度	11	12	22	リスクアレル頻度	アレルモデル	優性モデル	劣性モデル	
rs11141915	9	DAPK1	T/G (T)	GWAS	18	3	0	0.93	21	30	7	0.62	1.27×10^{-4}	1.04×10^{-4}	1.80×10^{-1}	7.94(2.32-27.25)
				replication	22	11	0	0.83	23	31	8	0.62	2.77×10^{-3}	9.23×10^{-3}	4.73×10^{-2}	3.05(1.45-6.41)
				Combined	40	14	0	0.87	44	61	15	0.62	1.27×10^{-6}	6.91×10^{-6}	6.11×10^{-3}	4.10(2.21-7.62)
rs1901440	2	No gene	A/C (C)	GWAS	11	3	7	0.40	31	27	0	0.23	4.42×10^{-2}	1.00×10^{-0}	4.01×10^{-3}	60.52(5.45-632.87)
				replication	20	8	5	0.27	42	19	1	0.17	1.30×10^{-1}	5.05×10^{-1}	1.82×10^{-2}	10.89(1.22-97.64)
				Combined	31	11	12	0.32	73	46	1	0.20	1.44×10^{-2}	7.39×10^{-1}	3.11×10^{-5}	34.00(4.29-269.48)
rs12046844	1	PDE4B	T/C (C)	GWAS	1	5	15	0.83	12	32	14	0.52	3.93×10^{-4}	1.95×10^{-4}	1.67×10^{-1}	7.86(2.56-24.12)
				replication	4	10	19	0.73	7	34	21	0.61	1.50×10^{-1}	3.09×10^{-2}	1.00×10^{-0}	2.65(1.11-6.31)
				Combined	5	15	34	0.77	19	66	35	0.57	3.05×10^{-4}	4.56×10^{-5}	3.43×10^{-1}	4.13(2.10-8.14)
rs11719165	3	No gene	C/T (C)	GWAS	9	10	2	0.67	5	27	26	0.32	1.15×10^{-4}	3.49×10^{-3}	1.21×10^{-3}	4.27(2.01-9.05)
				replication	9	16	8	0.52	7	31	24	0.36	4.61×10^{-2}	1.78×10^{-1}	8.12×10^{-2}	1.87(1.02-3.42)
				Combined	18	26	10	0.57	12	58	50	0.34	5.98×10^{-5}	3.26×10^{-3}	3.66×10^{-4}	2.60(1.63-4.14)

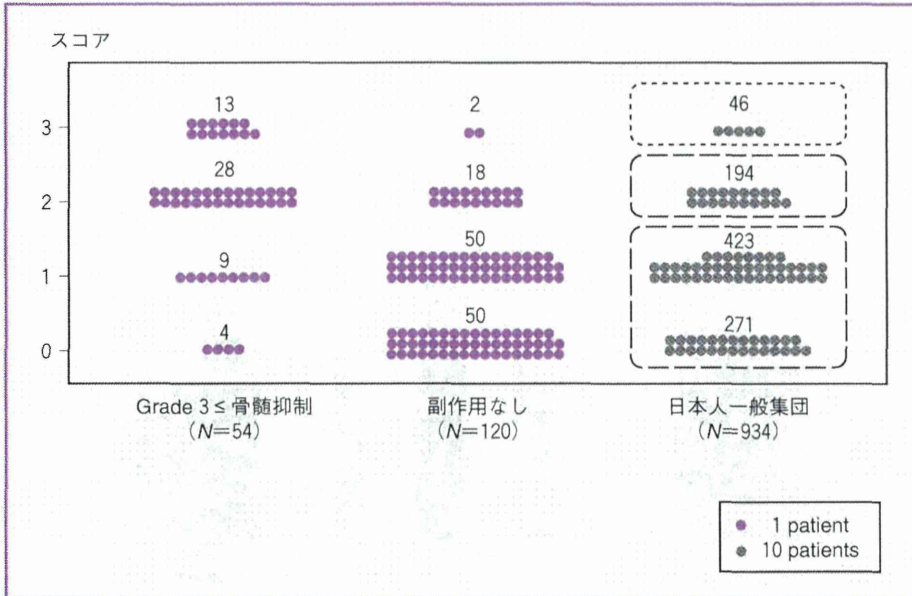


図2 4つの遺伝情報を用いたゲムシタピン骨髄抑制予測診断システム
4つのSNPについて骨髄抑制リスクジェノタイプの合計数に応じて各症例をスコアリングした場合の分布図。

rs1901440 は $P = 1.82 \times 10^{-2}$, 1 番染色体上の rs12046844 は $P = 3.09 \times 10^{-2}$, 3 番染色体上の rs11719165 は $P = 4.61 \times 10^{-2}$ を示した。さらに、この 4 SNP について GWAS で用いた case および control 症例をそれぞれ加えて解析した結果、9 番染色体上の rs11141915 は $P = 1.27 \times 10^{-6}$, オッズ比 4.10 (95% CI : 2.21-7.62), 2 番染色体上の rs1901440 は $P = 3.11 \times 10^{-6}$, オッズ比 34.00 (95% CI : 4.29-269.48), 1 番染色体上の rs12046844 は $P = 4.56 \times 10^{-5}$, オッズ比 4.13 (95% CI : 2.10-8.14), 3 番染色体上の rs11719165 は $P = 5.98 \times 10^{-5}$, オッズ比 2.60 (95% CI : 1.63-4.14) を示し、この 4 SNP を含む遺伝領域はゲムシタピンによる骨髄抑制となんらかの関連を示す結果となった。また、4 遺伝領域のなかで 9 番染色体につい

ては death-associated protein kinase 1 (DAPK1), 1 番染色体上の領域については phosphodiesterase 4B (PDE4B) という既知の遺伝子を含んでいた。

遺伝子多型情報を用いたゲムシタピンによる骨髄抑制予測診断モデル

ゲムシタピンによる骨髄抑制と関連が示唆された 4SNP を用いた骨髄抑制予測診断システムについて検討を行った。4つの SNP について骨髄抑制リスクに働くと考えられる genotype を有する SNP に各 1 点を与え、各症例合計点数別に骨髄抑制発現群 (case) と副作用を認めなかった群 (control) で分布を調べた結果が図 2 である。スコア 0 または 1 を示した 113 例中骨髄抑制群は 11.5%, スコア 2 については

60.9%, スコア 3 については 86.7% が骨髄抑制発現群であり、コントロール群に比べ有意に高いスコアを示すことが確認された (trend test $P = 1.31 \times 10^{-11}$)。さらに日本人一般集団をこのスコアリングシステムに当てはめた場合の分布を検討した結果、0 点が 29.0%, 1 点が 45.3%, 2 点が 20.8%, 3 点が 4.9% になることが示され、このスコアリングシステムをゲムシタピン治療開始前に応用することで、骨髄抑制の危険性が少なく、より安全かつ適切な治療選択に有用となる可能性が示された (図 2)。

おわりに

最後に、今回同定された 4 つの遺伝子多型を含む遺伝領域はゲムシタピンによる骨髄抑制となんらかの関連があ

ることが示唆され、さらにこの4つの遺伝子多型情報を用いた骨髄抑制予測システムにより、ゲムシタビン治療を行う前に骨髄抑制のリスクを回避できる可能性が考えられる。このようなゲノム情報に基づいた適切かつ安全な治療は今後ゲムシタビンに限らず、多くの薬剤についても応用されていくものと考えられる⁶⁾⁻⁸⁾。

文 献

- 1) Mackey JR, Yao SY, Smith KM, et al : Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *J Natl Cancer Inst* 91 : 1876-1881, 1999
- 2) Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, et al : Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside co-transporter proteins (hCNT₃ and mCNT₃) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system *cib*). *J Biol Chem* 276 : 2914-2927, 2001
- 3) Mackey JR, Mani RS, Selner M, et al : Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 58 : 4349-4357, 1998
- 4) Plunkett W, Huang P, Gandhi V : Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs* 6 (Suppl 6) : 7-13, 1995
- 5) Kiyotani K, Mushiroda T, Tsunoda T, et al : A genome-wide association study identifies locus at 10q22 associated with clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients in Japanese. *Hum Mol Genet* 21 : 1665-1672, 2010
- 6) Okazaki T, Javle M, Tanaka M, et al : Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin Cancer Res* 16 : 320-329, 2010
- 7) Yonemori K, Ueno H, Okusaka T, et al : Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphism of the cytidine deaminase gene in a Japanese cancer patient treated with gemcitabine plus cisplatin. *Clin Cancer Res* 11 : 2620-2624, 2005
- 8) Soo RA, Wang LZ, Ng SS, et al : Distribution of gemcitabine pathway genotypes in ethnic Asians and their association with outcome in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 63 : 121-127, 2009

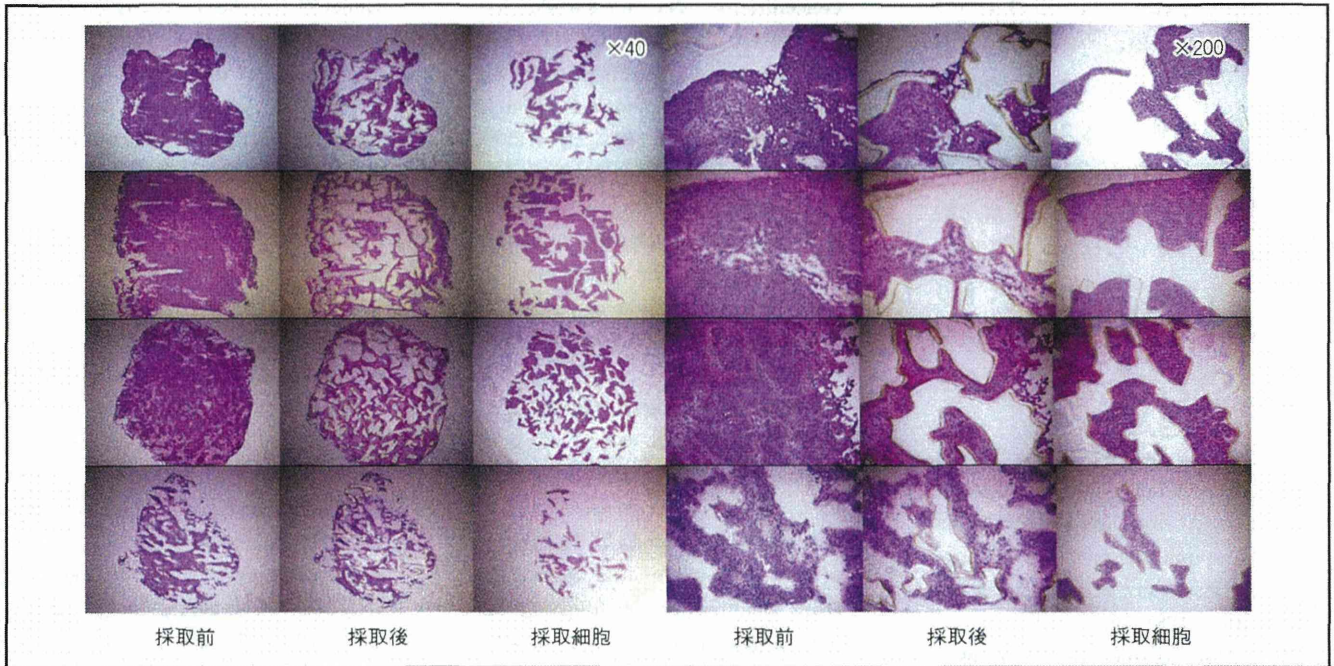


写真5 レーザーマイクロビームマイクロダイセクション (laser microbeam microdissection ; LMM) 法による膀胱癌細胞の選択的採取

→ p83

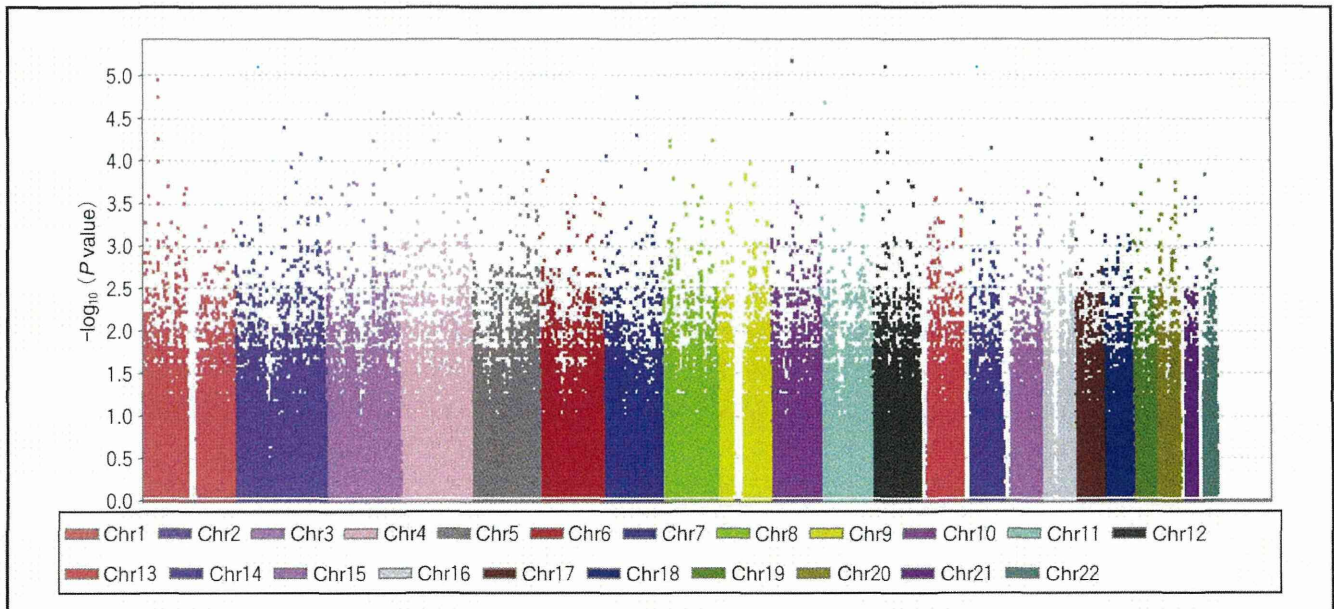


写真6 マンハッタンプロット

→ p87

(1) 抗腫瘍効果 — 浸潤性膀胱癌に対する術前化学療法 感受性予測システムの構築

1. 岩手医科大学泌尿器科学講座

2. 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター

加藤陽一郎¹・高田 亮¹・岩崎 一洋¹

Yoichiro Kato

Ryo Takata

Kazuhiro Iwasaki

(講師)

(講師)

小原 航¹・藤岡 知昭¹・前佛 均²・中村 祐輔²

Wataru Obara

Tomoaki Fujioka

Hitoshi Zembutsu

Yusuke Nakamura

(講師)

(教授)

(センター長)

はじめに

局所浸潤性膀胱癌に対する術前化学療法は局所の癌細胞数を死滅させ、腫瘍量を減少させるのみならず、画像上明らかでない微小転移を抑制することが報告されている¹⁾。

しかし、化学療法が施行された患者のなかには著効を示す患者もいる一方で、何ひとつ効果を示さず重篤な副作用にのみ苦しむ患者もいる。そこで、治療前に感受性を予測することが可能であれば、個々の患者に適切な治療を提供することが可能となる。

岩手医科大学では2005年より東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターとの共同研究により、網羅的遺伝子発現解析に基づく化学療法の感受性を予測し、化学療法における奏効率を高めるべく、予測システムの開発・研究を行っている。ここでは、局所筋層浸潤性膀胱癌を対象とした薬剤反応性

の研究について概説する。

膀胱癌に対する術前 CaG 療法

局所浸潤性膀胱癌患者 (Stage2-3) 37例を用いた。全例に対し術前化学療法としてゲムシタビン、カルボプラチン (CaG) 療法2コースを施行し、施行後の画像所見から腫瘍縮小率60%をカットオフラインとして、感受性群・非感受性群の2群に分類した。この2群からCaG療法に対して感受性を予測する遺伝子を同定するために、それぞれ9例ずつ計18例を学習症例として解析に用い、残りの19例は予測システムが正確に機能するかどうかを検証するためのテスト症例として用いた。

レーザーマイクロビーム マイクロダイセクション

解析に用いた37例全例から化学療法開始前に膀胱鏡下で生検を施行した。

得られた癌組織から、間質や炎症性細胞といった癌細胞以外の組織による組織学的不均一性を回避することが可能となる。レーザーマイクロビームマイクロダイセクション (laser microbeam microdissection ; LMM) 法を施行した。この操作によって、癌細胞の正確な遺伝子発現プロファイリングを得ることが可能となる (図1)。LMMによって得られた癌細胞からtotal RNAを抽出しT7増幅法 (Affymetrix GeneChip[®] 3'IVT Express Kit 使用) を用いてmRNAを増幅させ、マイクロアレイ解析 (Affymetrix GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays 使用) を全37例に行い、38,500遺伝子における体系的遺伝子発現プロファイルを作成した。

次に、感受性群9例・非感受性群9例の学習症例を用いて、マイクロアレイから得られた遺伝子発現情報を用いて、2群間で有意に異なる遺伝子をrandom permutation testを用いてスクリーニングした。このスクリーニング

Surgery Frontier 20(2) : 82-85, 2013

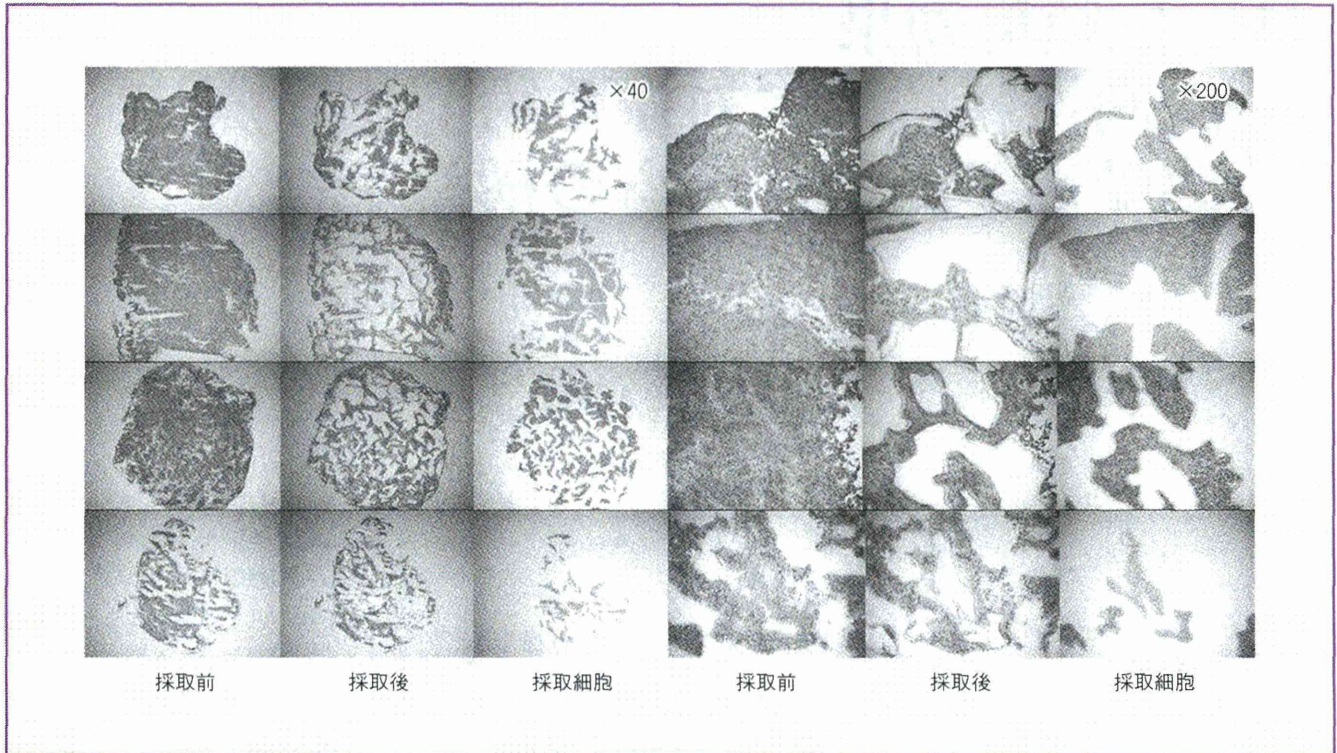


図1 レーザーマイクロビームマイクロダイセクション (laser microbeam microdissection ; LMM) 法による膀胱癌細胞の選択的採取
 各症例に対して癌組織を生検しているが、ほぼ同じ大きさの生検組織でも癌細胞数が症例ごとで大きく異なっていることが認められる。
 (カラーグラビア p7 写真5 参照)

表1 感受性予測 12 遺伝子

No.	Gene Symbol	Gene Title	group	p-value
1	IPO7	importin 7	(-)	3.96E-07
2	LOC613266	hypothetical LOC613266	(+)	8.38E-07
3	SPRY1	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)	(-)	5.34E-06
4	OSBPL11	oxysterol binding protein-like 11	(+)	1.81E-05
5	ZNF107	zinc finger protein 107	(+)	1.96E-05
6	AI025829	CDNA clone IMAGE : 5287121	(-)	2.45E-05
7	AF090916	Clone HQ0312	(+)	2.90E-05
8	LIN7C	lin-7 homolog C (<i>C. elegans</i>)	(-)	3.18E-05
9	WDR90	WD repeat domain 90	(+)	3.19E-05
10	SLC22A18	solute carrier family 22, member 18	(-)	3.30E-05
11	PNPO	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	(-)	4.75E-05
12	CRKL	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	(+)	6.92E-05

group : (+) 感受性群で上昇している遺伝子, (-) 非感受性群で上昇している遺伝子。
 12 遺伝子のうち感受性群・非感受性群で発現量の高い遺伝子はそれぞれ6 遺伝子認められた。

結果から感受性予測遺伝子を抽出するために、leave-one-out cross validation test により感受性予測遺伝子として 12 遺伝子を抽出した²⁾³⁾(表 1)。

CaG 感受性予測遺伝子

抽出された感受性予測遺伝子 12 遺伝子を用いて、19 例のテスト症例の薬剤感受性を予測した。その結果、実際に非感受性と判定され薬剤感受性を示した 1 例を除いた 18 例は、薬剤感受性を正しく予測することができた。これにより本予測システムの精度は陽性反応的中率が 100% (10/10 例)、陰性反応的中率は 88.9% (8/9 例)であった(図 2)。

CaG 感受性・耐性メカニズムとオーダーメイド医療への応用

われわれは浸潤性膀胱癌症例における術前 CaG 療法感受性予測システムを、マイクロアレイの手法を用いて網羅的遺伝子解析により構築した。CaG 療法感受性予測 12 遺伝子のなかのいくつかの遺伝子においては、すでに薬剤の耐性にかかわる報告のある遺伝子も認められた。たとえば、IPO7 (importin 7) がコードする蛋白は extracellular signal-regulated kinase (ERK) を核内に輸送することが知られており、ERK のシグナル伝達経路は肝臓癌、膵癌、胆嚢癌におけるゲムシタピンへの治療抵抗性に関係していることが報告されている。これより膀胱癌に対するゲムシタピンへの抵抗性

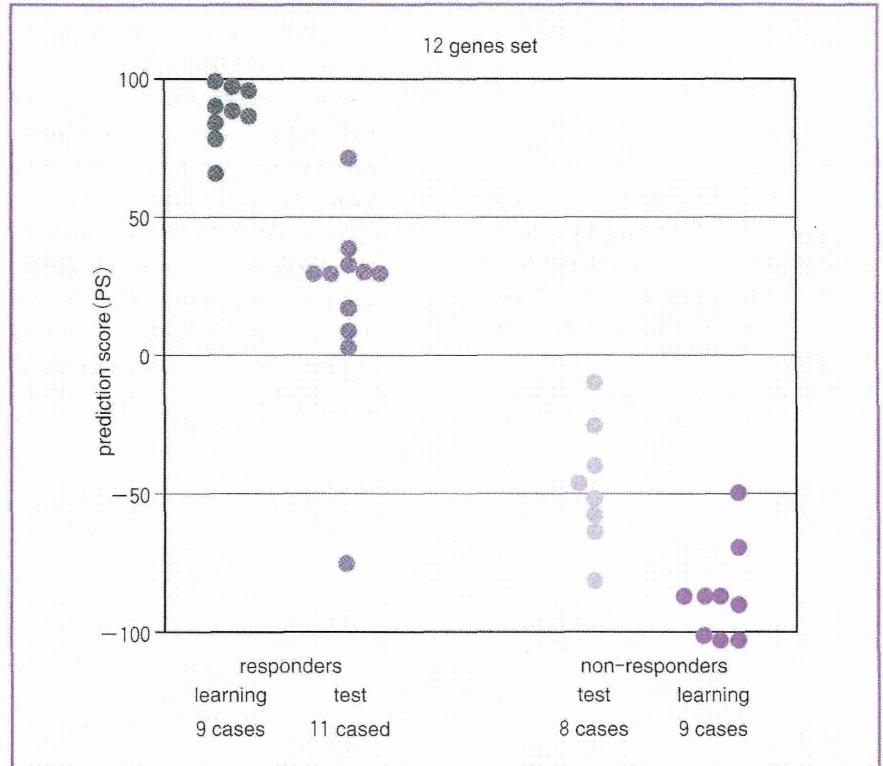


図 2 学習症例・テスト症例におけるそれぞれの感受性予測スコア

予測スコア (PS) が 0 以上の症例を感受性症例、未満を非感受性症例で示している。19 例のテスト症例については感受性と予測された 1 例を除き、18 例が正しく治療反応性に応じた予測スコアを示した。

が推測される⁴⁾⁵⁾。

しかしながら、そのほとんどの遺伝子はいまだその機能が解明されていない。今後、残りの遺伝子については CaG 治療抵抗性との関連を調べる機能解析の研究が行われることが期待される。

癌細胞のみを抽出する LMM の技術を用いた網羅的遺伝子解析に基づき、構築された薬剤感受性予測システムによって、CaG 薬剤感受性を比較的高い精度で予測することが可能であった(図 2)。

今回の CaG 感受性予測診断システ

ムが比較的高い予測精度を有した原因のひとつとして、LMM により正確な膀胱癌遺伝子発現情報を用いた解析がなされた点が挙げられる。

またこの結果は、われわれが以前に構築した M-VAC 感受性予測システムとほぼ同程度の精度であったことから²⁾、この手法によって精度の高い薬剤感受性予測システムが構築可能であることが示唆された。

現在、M-VAC と CaG の予測システムを併用することにより、予測結果に応じてその患者にあった治療法の使い分けを可能とすることで、われわれ

の目指すオーダーメイド医療の実現を目標としている。

文 献

- 1) Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, et al : Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med* 349 : 859-866, 2003
- 2) Takata R, Katagiri T, Kanehira M, et al : Predicting response to methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for bladder cancers through genome-wide gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 11 : 2625-2636, 2005
- 3) Kato Y, Zembutsu H, Takata R, et al : Predicting response of bladder cancers to gemcitabine and carboplatin neoadjuvant chemotherapy through genome-wide gene expression profiling. *Exp Ther Med* 2 : 47-56, 2011
- 4) Matsumoto K, Nagahara T, Okano J, Murawaki Y : The growth inhibition of hepatocellular and cholangiocellular carcinoma cells by gemcitabine and the roles of extracellular signal-regulated and checkpoint kinases. *Oncol Rep* 20 : 863-872, 2008
- 5) Yokoi K, Fidler IJ : Hypoxia increases resistance of human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine. *Clin Cancer Res* 10 : 2299-2306, 2004