

*MTHFR* 遺伝子多型は小児リンパ性悪性腫瘍患者  
の生命予後と関連していた

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

福島紘子



# 目次

略語一覧	.... 1
第 I 章 序章	.... 3
I-1 小児がん発生頻度・概要	.... 3
I-2 小児がん治療の進歩	.... 3
I-3 小児がんと遺伝子多型	.... 4
第 II 章 小児リンパ性悪性腫瘍患者における MTX と、MTX の作用機序	.... 5
II-1 小児がん患者治療における MTX の重要性	.... 5
II-2 MTX の薬物動態・作用機序	.... 5
第 III 章 小児急性リンパ性白血病患者における weekly high-dose MTX 中の有害事象と遺伝子多型との関連	.... 7
III-1 小児がん患者治療における MTX の重要性	.... 7
III-2 遺伝子多型と治療中有害事象との関連	.... 7
III-3 目的	.... 9
III-4 対象	.... 9
III-5 治療法および有害事象評価	....10
III-6 遺伝子多型同定法	....10
III-7 統計学的解析	....11
III-8 結果	....12
III-9 考察	....14
III-10 結論	....16

第 IV 章 小児リンパ性悪性腫瘍患者における無病生存率と遺 伝子多型の関連	....17
IV-1 <i>MTHFR</i> 遺伝子多型と生命予後との関連	....17
IV-2 目的	....17
IV-3 対象	....18
IV-4 遺伝子多型同定法	....18
IV-5 統計学的解析	....19
IV-6 結果	....19
IV-7 考察	....20
IV-8 結論	....22
まとめと結論	....23
謝辞	....24
参考文献	....25
図、表	....31

## 略語一覽

6-MP	: 6-mercaptopurine
ABC	: ATP-binding cassette
ALL	: acute lymphoblastic leukemia
BCP	: B cell precursor
CR	: complete remission
CTCAE	: Common Terminology Criteria for Adverse Event
DHFR	: dihydrofolate reductase
DLBCL	: diffuse large B-cell lymphoma
EFS	: event-free survival
GeMDBJ	: Genome Medicine Database of Japan
GWAS	: Genome-wide association study
HWE	: Hardy-Weinberg 平衡
MTHFR	: methylenetetrahydrofolate reductase
MTX	: methotrexate
NHL	: non-Hodgkin lymphoma
OATP	: Organic anion-transporting polypeptide
OS	: overall survival
PCR	: polymerase chain reaction
RFC-1	: replication factor C 1
SLCO1B1	: solute carrier organic anion transporter family member 1B1
TCCSG	: Tokyo Children's Cancer Study Group
THF	: tetrahydrofolate

TMP : thymidine monophosphate  
TS : thymidylate synthase  
UGT1A1 : uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1  
UMP : uridine monophosphate

## 第 I 章 序章

### I-1 小児がん発生頻度・概要

小児がんはまれな疾患であり、15 歳未満人口 70,000 人あたり 1 人の割合で発生し[1, 2]、国内におけるすべての小児がん患者の年間発生数はわずか 2,000 ～2,500 人程度と推計されている（厚生労働省 <http://www.mhlw.go.jp>）。

小児がんの中で最も頻度が高く、全体の約 3 割を占める急性リンパ性白血病 (ALL) であっても、国内の年間発症人数は 500 例程度と推定されている。

### I-2 小児がん治療の進歩

小児がんはその希少性から、治療法が確立していないものも多いが[3-5]、一部の疾患では 1960 年代以降の予後の改善が目覚ましい[1]。特に ALL や悪性リンパ腫を含むリンパ性悪性腫瘍は、1960 年代には 10 年生存率が 10% に満たなかったものが、1990 年代には、世界の先進国における長期生存率が 80% 程度となった[1, 2, 6, 7]。この多くは、診断技術の向上とリスク分類に基づく治療方針の層別化、頭蓋照射、大量メソトレキセート (MTX) 療法、骨髄移植などの治療法や支持療法の進歩等による[1, 8, 9]。

目覚ましい治療成績の改善が得られた一方、一部の予後不良患者に対しては治療法、診断法、および支持療法の開発によって、更に生存率の向上を目指すことが急務である。同時に、合併症や 2 次発がんの回避等のための個別化医療が求められている[9-11]。小児 ALL では、これまでの光学顕微鏡による骨髄寛解の判定に加え、治療経過中の flow cytometry や PCR 法を用いた分子生物学的評価により残存病変評価を行う（微小残存病変）など、新たな予後不良因子

の検討がなされているが、いずれも現在利用している予後因子を上回るほどの有用性はない。

### I-3 小児がんと遺伝子多型

近年小児がん患者の治療成績向上を目標として、これまで行われてきた診断技術・治療法・支持療法等と異なるアプローチとして、宿主要因、特に胚細胞系の遺伝子多型による危険因子の関連研究が注目をされている[12-15]。米国における小児急性リンパ性白血病治療において、人種による生存率の差異が報告されている[16-18]。

また、欧米の一部の研究グループでは遺伝子多型によって、6-mercaptopurine (6MP) の内服量を変更させることが標準治療として採用され[12, 19]、一方では、MTX の葉酸代謝経路の多型によって投薬量を変更させることで、より安全に強化した治療が行えたとの報告がある[20]。

しかしながら、日本人を対象にした小児がん治療の有効性・安全性と遺伝子多型との関連調査は限られている[21-23]。遺伝子多型との関連調査は人種による差異が大きいと推察されることから[24]、日本人を対象とした調査が必須である。



## 第 II 章 小児リンパ性悪性腫瘍患者における MTX と、MTX の作用機序

### II-1 小児がん患者治療における MTX の重要性

小児 ALL 治療においては、予防的頭蓋放射線照射により長期寛解をもたらすという画期的な報告[25] が示されて以降、中枢神経再発予防を目的として、1980 年代までは全例に頭蓋照射を行っていた。しかし近年、長期生存者における知的障害等の中枢神経合併症や二次性脳腫瘍が一定の割合で報告されるようになり、生存率は改善したものの、患者の生活の質を悪化させる結果となっていた[26, 27]。

しかしながら MTX を  $3 \text{ g/m}^2$  と大量に投与することにより、髄腔内濃度が上昇し、最低治療濃度である  $0.5 \mu\text{mol/L}$  に達することが報告され[28]、大量 MTX や MTX 髄腔内注射等の導入によって、頭蓋放射線照射をせずに中枢神経再発の抑制が可能になった。以降メソトレキセート (MTX) は ALL 治療において必須の薬剤となり、大量療法や髄腔内投与を通じて治療成績を飛躍的に向上させた[1, 7, 29, 30]。

### II-2 MTX の薬物動態・作用機序

体内に取り込まれた MTX は肝臓で活性体となる。また replication factor C 1

(RFC-1) による能動輸送によって細胞内に取り込まれ、ATP-binding cassette (ABC) 輸送タンパクによって細胞外へ排出される[31]。投与された MTX は主として腎臓からの排泄によって体内から消失する。排泄能は腎機能に依存し個人差が大きく、米國小児 ALL 患者における大量 MTX 時のクリアランス

スの平均値は各コースで異なるが 106~133 ml/min/m<sup>2</sup> であり、各コースにおける個人間のクリアランスの差異は 50 ml/min/m<sup>2</sup> 程度であった[31, 32]。

MTX 作用機序・有害事象出現率は少量投与と大量投与の場合に若干異なるが、いずれの場合も MTX 血中濃度が 0.1 μmol/L を上回っている時間に影響される [33]。細胞内において、MTX は主として 2 つの酵素を阻害することによって葉酸による DNA 新生を阻害する[34, 35] (図 1)。第一に、葉酸アナログとして MTX は強力な dihydrofolate reductase (DHFR) の競合阻害因子として働く [35, 36]。DHFR は葉酸を活性体であるテトラヒドロ葉酸塩 (THF) に変換させ、THF はチミジル酸生成酵素 (TS) の基質となる。TS はデオキシウリジン-5-リン酸をデオキシチミジン-5-リン酸に変換させ、最終的に DNA を合成する。第二に、ポリグルタミン酸化 MTX は TS の活性を直接阻害する[36, 37]。

## 第 III 章 小児急性リンパ性白血病患者における weekly high-dose MTX 療法中の有害事象と遺伝子多型との関連

### III-1 小児がん患者治療における大量 MTX 療法

前述 (II-1) の通り、小児リンパ性腫瘍において、大量 MTX 療法は必須の治療であり [7, 38]、先進国における ALL、non-Hodgkin lymphoma (NHL) 治療計画では大量 MTX 療法はほぼ全ての治療に組み込まれている [7, 38-40] 一方で、その有害事象は時に治療中断や死の転帰をたどるなど重篤な場合もある [31, 41-43]。

### III-2 遺伝子多型と治療中有有害事象との関連

近年大量 MTX 療法において、MTX の血中からの消失や有害事象の発現に個人差・人種差があることが報告されている [44]。葉酸経路の酵素である *MTHFR* 遺伝子多型と MTX 療法中の有害事象の発現の有無について研究がなされ [44, 45]、米国・欧州で小児 ALL 患者において輸送タンパクである *SLCO1B1* の遺伝子多型が MTX の血中からの消失に関連があったと Genome-wide association study (GWAS) によって報告された [32, 46, 47]。

#### ■ methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*)

*MTHFR* は 5,10-メチレン-THF を 5-メチル-THF へ変換する重要な酵素であり、5,10-メチレン-THF は DNA 新生の酵素の TS の基質である [48] (図 2)。*MTHFR* の遺伝子多型のうち、よく報告がなされているものは、rs1801133 (c.677C>T, p.Ala222Val) と rs1801131 (c.1298A>C, p.Glu429Ala) であり、

*MTHFR*c.677C>Tはエクソン4に位置し、*MTHFR* 共因子である flavin adenine dinucleotide との結合部位に位置している。また、*MTHFR*c.1298A>C はエクソン7に位置していて、*MTHFR* の S-adenosyle methionine 制御因子をコードする部位にあり[49]、遺伝子多型を有していると酵素活性が低下する[50]。

既報では *MTHFR* c.677C>T と ALL 治療による有害事象との関連調査では、T アレルを有するもので MTX 排泄遅延や、肝機能異常・消化管障害・白血球数低下などの有害事象が増加するとの報告がある[45, 51]。一方、有害事象とは無関係との報告がある[14]。また、*MTHFR*c.1298A>C と ALL 治療中の関連調査では、有害事象とは無関係とするものもある[14]。更に、長期認知機能との関連を報告したものがある[52]。このように欧米を中心として *MTHFR* 遺伝子多型と MTX 投与による有害事象発現頻度との関連を指摘する報告は多いが、アジア人、特に日本人患者を対象としたものは限られている[21, 22, 45]。

#### ■ solute carrier organic anion transporter family member 1B1 (*SLCO1B1*)

輸送タンパクの一部は MTX 排泄と関連し[31, 53]、は Organic anion-transporting polypeptide (OATP)の一つである *SLCO1B1* は、肝細胞類洞側や腸細胞に存在する (図3)。*SLCO1B1* を遺伝子導入した細胞は MTX 等の物質を取り込む[46, 54-56]一方で、*SLCO1B1* 遺伝子多型アレル(rs56101265 の C, rs4149056 の C, rs55901008 の A)を持った細胞では基質の取り込みが障害されることが示されている[46, 57]。米国において小児 ALL 患者に対して行われた大量 MTX 療法で MTX 排泄能と *SLCO1B1* 遺伝子多型との関連が報告されたが、対象に含まれるアジア人種の数のごく少数であった[47, 55]。これらの多型はスペインの小児 ALL 患者における大量 MTX 投与後 72 時間の MTX 血中濃度との関連が報告された[58]。日本では、成人リウマチ患者において検討され

た報告があるのみで、結果として *SLCO1B1* 多型 (rs4149056 と rs2306283 (c.388A>G, p.N432D)) と MTX の治療効果や有害事象の出現頻度との関連は示されなかった[59]。

人種によってアレル頻度が異なることや、同様の治療を行っても人種による治療成績の差があることを考慮すると、これら多型と治療との関連は各人種・地域によって異なってくると推察される[16, 60, 61]。

### III-3 目的

日本人小児 ALL 患者における *MTHFR* および *SLCO1B1* 遺伝子多型 (*MTHFR*c.677C>T, c.1298A>C, *SLCO1B1* c.1865+4846T>C, c.521T>C) と MTX 単剤投与中の有害事象並びに血中濃度との関連を調査する。

### III-4 対象

MTX 投与中の有害事象並びに血中濃度と遺伝子多型との関連をより正確に調査をするため、同一の MTX 単剤療法 (weekly 大量 MTX 療法) を受けた ALL 患者 (標準・高危険群) のみを対象とした。weekly 大量 MTX 療法は、week1, 2, 3 の day0 にそれぞれ MTX 髄腔内投与および MTX 3 g/m<sup>2</sup> の持続静注を行う治療計画である。有害事象など特別な理由がない限り 7 日ごとに計 3 回投与するように計画されたものである。

患者は 1993 年 11 月～2012 年 11 月に筑波大学附属病院および茨城県立こども病院で診療を受けたもので、筑波大学附属病院の定める倫理規定に則り同意の得られた症例を本研究の対象とした。本研究は筑波大学倫理委員会に平成 23 年 12 月 19 日付で承認された。(通知番号は第 218 号、研究課題名は「薬物代謝

に關与する酵素遺伝子の多型・変異が及ぼす臨床経過への影響に關する研究」)。

### III-5 治療法および有害事象評価

すべての患者は東京小児がん研究グループ (TCCSG) L99-15[62]に則って治療が行われた。MTX を  $3 \text{ g/m}^2$  を 12 時間か 24 時間持続投与し、ロイコボリンレスキューとして活性型葉酸の補充を行うもので、代表的な投与法は  $15 \text{ mg/m}^2$  を MTX 開始後 36 時間から開始し、6 時間毎、合計 6 回である。

大量 MTX 投与後の MTX 血中濃度は 48 時間後から連日  $0.1 \text{ }\mu\text{mol/L}$  を下回るまで、あるいは担当医が必要と判断した時に測定された。投与後 48 時間値で  $1.0 \text{ }\mu\text{mol/L}$ 、72 時間値で  $0.1 \text{ }\mu\text{mol/L}$  以上の時に血清 MTX は高値と判断した。

評価項目としての有害事象は嘔吐、下痢、ALT 値、血清ビリルビン値、血清クレアチニン値とし、Cancer Therapy Evaluation Program of the National Cancer Institute (<http://ctep.cancer.gov/>)より提唱されている Common Terminology Criteria for Adverse Event (CTCAE) v4.0 に沿って格付けした。有害事象の評価は、各 weekly MTX コース中の最悪値をそれぞれ用いた。各コース中に血清クレアチニン値の上昇が 1.5 倍以上、ALT の上昇が CTCAEv.4.0 grade2 以上、血清総ビリルビン値が  $1.5 \text{ mg/dl}$  以上となる有害事象が一つでも認められたものを、「global toxicity がある」と判定した。

毎週投与されるべき weekly MTX が有害事象出現等の理由で 5 日を越えて延長した時に、有意な投与の遅延と判定した。

### III-6 遺伝子多型同定法

DNA は寛解期の  $0.5\sim 2\text{ml}$  の末梢血か骨髓血、もしくはパラフィン包埋され

た寛解期骨髓検体より Genomic DNA Isolation Kit (QiAamp DNA Blood Mini Kit, QiAamp DNA Blood Midi Kit または QIAamp DNA FFPE Tissue: Qiagen, Veal, Netherlands)を用いて抽出した。抽出法は製品指示書に従った。

*MTHFR* (c.677 C>T, c.1298 A>C)と *SLCO1B1* (c.1865+4846 T>C, c.521 T>C) は TaqMan Assay-on-Demand SNP Typing System (Applied Bio Systems, Foster City, CA, USA) を用いて製品指示書に従い同定した。

Taqman PCR の遺伝子型同定 PCR は 5 ng の DNA を 384 穴のプレートを用い、ABI PRISM 7900HT (version 2.2.2, Applied Biosystems) で既報通り同定した[63]。

### III-7 統計学的解析

Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) は  $\chi$  二乗検定で行った。

日本人対照データは HapMap database (HapMap JPT, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 及び Genome Medicine Database of Japan (GeMDBJ, <https://gemdbj.nibio.go.jp/dgdb/index.do>) を用い、症例-対照解析は  $\chi$  二乗もしくは Fisher の正確確率検定を用いた。

有害事象と遺伝子多型との関連は  $\chi$  二乗検定を用いた。

MTX 血中濃度を有害事象マーカーとして妥当かどうか評価を行うため、global toxicity の有無、大量 MTX 投与後の血清 MTX 血中濃度 48/72 時間値との関連を  $\chi$  二乗検定もしくは Fisher の正確確率検定を用いた。

解析は SPSS (version 12.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

### III-8 結果

患者背景を表 1 に示す。対象は 58 例の ALL 患児（男性 26 例、女性 33 例）であり、投与された大量 MTX 療法、計 149 コースで解析を行った。年齢の中央値は 6.50 (1.58-15.83) 歳であった。初発時白血球数 20,000 / $\mu$ L 未満が 49 例、20,000~50,000 / $\mu$ L が 5 例、50,000~100,000 / $\mu$ L が 4 例であった。100,000 / $\mu$ L 以上は MTX 単独療法を受けなかったため、今回の対象には含めなかった。TCCSG の定める危険群別患者数は、標準危険群 29 例、高危険群 29 例（表 2） [62]。患者転帰は第 1 寛解期 51 例、第 2・3 寛解期 6 例、原病死 1 例、観察期間中央値は 66.5 (10.2-188.8) か月であった。すべての患者が初日に MTX の髄腔内投与と 3 g/m<sup>2</sup> の MTX の持続投与を受け、うち 12 時間持続投与が 19 コース、24 時間持続投与が 130 コースであった。

患者遺伝子多型および対照群遺伝子多型を表 3 に示す。患者群における HWE は平衡に達しており、*MTHFR*c.677C>T, c.1298A>C, *SLCO1B1* c.1865+4846T>C, c.521T>C でそれぞれ p=0.390、p=0.801、p=0.519、p=0.968 であった。患者 - Hapmap JPT 間のアレル頻度は差がなく、 $\chi$  二乗検定でそれぞれ *MTHFR*c.677C>T, c.1298A>C, *SLCO1B1* c.1865+4846T>C, c.521T>C で p=0.398、p=0.918、p=0.874、p=0.098 であった。患者 - GeMDBJ 間では *MTHFR*c.677C>T, c.1298A>C, *SLCO1B1* c.521T>C で p=0.327、p=0.872、p=0.674 であった。

遺伝子多型と大量 MTX 療法中の有害事象との関連を表 4 に示す。

MTX 血中濃度と遺伝子多型：*MTHFR*c.1298A>C の AA ホモアレルと MTX 48 時間値の高値 (>1.0  $\mu$ mol/L) とに関連がある傾向があったが、統計学的有意差には至らなかった。

ALT 上昇と遺伝子多型：*MTHFR* c.677C>T の CC ホモアレル患者に施行された 49 コース中 9 コース (18.3%) で ALT 上昇 (CTCAE v.4.0 grade2 以上) があったのに対し、少なくとも 1 つの多型を有している患者に対して施行され



た 100 コース中 41 コース (41%) で ALT 上昇が認められ、統計学的に有意差が認められた ( $p=0.006$ )。同様に、*MTHFR* c.1298A>C の AA ホモアレル患者に施行された 96 コース中 38 コース (39.6%) で ALT 上昇 (CTCAE v.4.0 grade2 以上) があったのに対し、少なくとも 1 つの C アレルを有している患者に対して施行された 52 コース中 11 コース (21.9%) でしか ALT 上昇が認められず、有意差が認められた ( $p=0.036$ )。

治療計画の遅延：評価可能な 101 コースで評価を行った。治療計画では 7 日ごとに投与される weeklyMTX 療法が有害事象出現等で 5 日を超えて遅延投与された例が *MTHFR* c.677C>T の CC ホモアレル患者に施行された 32 コース中 8 コース (25.0%) のみであったのに対し、T アレルを一つでも有する患者に施行された 69 コース中 33 コース (48.2%) で遅延を認め、統計学的有意差が認められた ( $p=0.030$ )。

一方で、*SLCO1B1* 多型 (c.1865+4846T>C, c.521T>C) と有害事象や治療計画の遅延との関連は認められなかった。

次に血清 MTX 濃度と有害事象との関連を表 4 に示す。MTX 血中濃度 (48 時間値、72 時間値) が高値であった群は投与前後におけるクレアチニン上昇が 1.5 倍以上であったものが多かった (各々  $p<0.001$ ,  $p=0.003$ )。また、MTX 血中濃度 (48 時間値) が高値であった群では 7 日ごとに投与されるよう計画されている次の投与が 5 日以上遅延した ( $p=0.013$ )。大量 MTX 療法中に 1 例の患者が血液透析を要するような腎障害を併発した。この患者の血清 MTX48 時間値は 42.71  $\mu\text{mol/L}$ 、72 時間値は 15.65  $\mu\text{mol/L}$  で、血清クレアチニン値は投与前値と比し 11.9 倍に上昇したため、以降の大量 MTX 療法は行われなかった。この患者の遺伝子多型は *MTHFR* c.677 CC、*MTHFR* c.1298 AA、*SLCO1B1* c.1865+4846TT、*SLCO1B1* c.521 TT であり、全て野生ホモ型であった。

### III-9 考察

大量 MTX は種々の悪性腫瘍に有効な薬剤であり、小児リンパ性悪性腫瘍患者 (ALL/NHL) の治療におけるキードラッグの一つであるが、その有害事象は時に重篤であり、その発生の程度に個体差・人種差があることが知られている[41, 44]。Kishi らは 240 例の小児 ALL 患者 (黒人 44 例、白人 167 例、アジア人 1 例、そのほか 28 例) において、治療中の黄疸の頻度を黒人と白人で比較すると、黒人での頻度が高く、体質性黄疸で最も多い Gilbert 症候群の遺伝子 *UGT1A1* の多型で補正を行っても優位であった[17]と報告した。また、米国において小児 ALL 患者 434 例に対して投与された 3,014 コースの解析では人種によるメソトレキセートの排泄差異が報告され、アフリカ系アメリカ人において有意に排泄能が高かった[45]。これらのことから、宿主因子の解析においては人種毎の解析が必須と考えられる。

これまでによく研究されている葉酸代謝サイクルの酵素である *MTHFR* の多型 c.677C>T はヘテロ変異で約 30%、c.1298A>C はヘテロ変異で約 60%程度に酵素活性が減弱し[50]、ホモシステイン値が高値となることが報告されている[64]。白人成人 ALL82 例において *MTHFR* c.677C>T および c.1298A>C と無病再発期間と有害事象との関連を調査した報告では、*MTHFR*c.677C>T の T アレルは MTX を用いた維持療法中に肝機能異常や骨髄抑制などの有害事象が強いことや[65]、卵巣癌患者において TT ホモアレルを有する患者群で 40 倍有害事象発現頻度が高かったと報告されている[66]。一方、主として白人小児 ALL 患者において、大量 MTX 療法中の有害事象発現に差がなかったとする報告もあり[60]、評価は定まっていない[67]。

これまでに日本人小児を対象とした報告は少ない。Imanishi らは 20 例の小児 ALL および 6 例の NHL に対して投与された大量 MTX 療法 (3 g/m<sup>2</sup>) の解

析を行っており、*MTHFR*c.677C>T の TT ホモアレルにおいて MTX 投与後 48 時間血中濃度が有意に高く、肝機能異常とは無関係と報告した[45]。これは本研究の結果と異なるが、対象患者が ALL と NHL と複数であり、前後における治療法が異なること、MTX 単独療法と明記されていないことから患者群や治療法が統一されていないことなどが推察される。

Shimasaki らは小児 ALL もしくは NHL 患者 15 例に対して投与された大量 MTX (3 g/m<sup>2</sup>) 43 コースを対象とし解析し、*MTHFR*c.677C>T の T アレルと肝機能異常、消化管障害、嘔吐、クレアチニン値の上昇などの有害事象や MTX 血中濃度との間に相関は見られなかったと報告した[21]。

MTX 血中濃度と *MTHFR* 多型との関連調査では、Shimasaki らと本研究とも有意差を持った結果とはならず、Imanishi らの結果と矛盾した。また、肝機能異常と *MTHFR* 多型との関連調査では本研究では有意な関連を認めたが、前述の 2 研究とも有意差を持った関連を認めず、本研究と異なる結果であった。この理由として、患者の均一性とコホートサイズの違いがあげられる。

我々は茨城県内で小児がんの治療を行っている限定された 2 施設での調査を行ったが、本 2 施設では月に一度合同カンファレンスを開催し、頻繁に医師・患者の相互交流があり、患者管理・治療プロトコールはほぼ統一されていると考えられる。また、本研究では小児 ALL54 例に対し、のべ 149 コース施行された MTX 単剤療法 (3 g/m<sup>2</sup>) の評価を行ったことから、患者背景および治療法がより均一なものとなった。このことから遺伝子多型と有害事象・血中濃度との関連を正確に評価できたと考えられた (表 1、表 3~5)。しかし、我々の解析でも人数が少数であったことから年齢・性別等との多変量解析は行えておらず、正確な判定のためには均一な患者集団で、より大規模な研究が必要である。

我々は茨城県内で発生するほぼ全例の小児がん症例を診療する 2 施設で小児

ALL 患者群を対象として評価を行ったところ、*MTHFR*c.677C>T の T アレルが血清 ALT 値の上昇、治療の遅延の双方との関連を認めた。これは日本人で同様の治療を受ける者にとって、有害事象を予見する一つの指標（リスク因子）となりうるだろう。

一方、米国 St. Jude Research Hospital において 434 例の小児 ALL 患者に施行された大量 MTX3,014 コースにおける MTX 排泄能と 500,568 か所の SNP の関連を調査した研究で、*SLCO1B1* 多型が MTX 排泄能低下と関連がある ( $p=8.2 \times 10^{-11}$ ) と報告された[32, 55]。この研究結果に関しては、主として白人を対象に追試が行われ、関連性が報告されていた[47, 58]。一方、われわれの研究では関連があるとの結果には至らず、これは人種差または治療プロトコールの差異によるものが考えられ、日本人における GWAS 研究が待たれる。本研究では 48 時間後の MTX 血中濃度が有意にクレアチニン値の上昇や治療間隔の延長と相関していたが、この MTX 血中濃度高値を予測する因子は特定されなかった。

### III-10 結論

*MTHFR*c.677C>T の T アレルは、日本人小児 ALL 患者で大量 MTX 療法中の血清 ALT 高値と関連し、次投薬の遅延と関連した。

主として白人コホートをを用いた GWAS 研究で MTX 排泄能遅延と関連が報告された *SLCO1B1* 遺伝子多型は、我々のコホートでは関連性が示されなかった。

## 第 IV 章 小児リンパ性悪性腫瘍患者における無病生存率と遺伝子多型の関連

### IV-1 *MTHFR* 遺伝子多型と生命予後との関連

近年、第 II 章で記載したような MTX 療法における有害事象発現頻度の差異のみならず、小児 ALL 患者における予後と遺伝子多型との関連報告がある。*MTHFR*c.677C>T の T アレルを有する症例の再発率が上昇するとの米国の小児がん研究グループからの報告がある[60]一方、*MTHFR*c.677C>T の T アレルまたは *MTHFR*c.1298A>C の A アレルを持つ症例の全生存率が高いとのブラジルからの報告や[48]、*MTHFR*c.677C>T の T アレルまたは *MTHFR*c.1298A>C の C アレルを有する症例の無病生存期間が短いとの報告がある[68]。III-2 で前述の通り、多くの *MTHFR* 遺伝子多型と小児 ALL 患者における遺伝子多型と予後との関連報告の多くは白人を対象としており、アジア人を対象にしたものは限られ、特に日本人患者を対象とし、予後因子としての解析を行ったものはない[21, 22, 45]。

### IV-2 目的

大量MTX療法を施行された日本人小児ALL及びNHL患者における *MTHFR* および *SLCO1B1* 遺伝子多型 (*MTHFR*c.677C>T, c.1298A>C, *SLCO1B1* c.1865+4846T>C, c.521T>C) と治療成績との関連を調査する。

### IV-3 対象

患者は 1993 年 11 月～2012 年 11 月に筑波大学附属病院および茨城県立こども病院で診療を受けた小児 ALL 及び NHL 患者で、大量 MTX 療法 (3 g/m<sup>2</sup> もしくは 5 g/m<sup>2</sup>) を受け、筑波大学附属病院の定める倫理規定に則り同意の得られた 103 例である。本研究は筑波大学倫理委員会に平成 23 年 12 月 19 日付で承認された。通知番号は第 218 号、研究課題名は「薬物代謝に関与する酵素遺伝子の多型・変異が及ぼす臨床経過への影響に関する研究」である。

### IV-4 遺伝子多型同定法

DNA は寛解期の 0.5～2ml の末梢血か骨髓血、もしくはパラフィン包埋された寛解期骨髓検体より Genomic DNA Isolation Kit (QiAamp DNA Blood Mini Kit, QiAamp DNA Blood Midi Kit か QIAamp DNA FFPE Tissue: Qiagen, Veal, Netherlands)を用いて抽出した。抽出法は製品指示書に従った。

*MTHFR* (c.677 C>T, rs1801133, c.1298 A>C, rs1801131)と *SLCO1B1* (c.1865+4846 T>C, rs11045879, c.521 T>C, rs4149056) は TaqMan Assay-on-Demand SNP Typing System (Applied Bio Systems, Foster City, CA, USA) を用いて製品指示書に従い同定された。

Taqman PCR の遺伝子型同定 PCR は 5 ng の DNA を 384 穴のプレートを用い行い、ABI PRISM 7900HT (version 2.2.2, Applied Biosystems) で同定した。

*MTHFR* c.1298 A>C の遺伝子型の同定は、再発・死亡症例の全例と、第 1 寛解期患者の一部において、Sanger 法を用いても同定を行った。用いたプライマーは 5'-TTTGGGGAGCTGAAGGACTA-3' (forward) 及び 5'-CTTTGTGACCATTCGGTTT-3' (reverse)で、既報の通りに増幅を行い[22]、

BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析を行った。

#### IV-5 統計学的解析

Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) は  $\chi$  二乗検定で行った。

日本人対照データは HapMap database (HapMap JPT, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 及び Genome Medicine Database of Japan (GeMDBJ, <https://gemdbj.nibio.go.jp/dgdb/index.do>) を用い、症例-対照解析は  $\chi$  二乗もしくは Fisher の正確確率検定を用いた。有害事象と遺伝子多型との関連は  $\chi$  二乗検定を用いた。

再発・死亡をイベントとし、無イベント率の解析を行う際に、治療終了 1 か月以内に肺高血圧症で死亡した 1 例は除外した。

解析は SPSS (version 12.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

#### IV-6 結果

対照患者を表 6、7 に示す。小児 ALL 患者 82 例 (B-cell precursor 69 例、T-lineage 9 例、そのほか 4 例) で、初発時白血球数 20,000 / $\mu$ L 未満が 61 例、20,000  $\geq$  50,000 / $\mu$ L 未満が 8 例、50,000 以上 100,000 / $\mu$ L 未満が 8 例、100,000 / $\mu$ L 以上が 5 例であった。TCCSG の定める初期リスク分類 (表 2) では標準危険群が 30 例、高危険群が 29 例、超高危険群が 18 例、そのほか 5 例であった。

NHL 患者は全 21 例 (Burkitt 10 例、T-lineage 5 例、Diffuse large B cell lymphoma 2 例、そのほか 4 例) であった。初診時の Murphy 分類 (表 8) [69] では stage I が 1 例、stage II が 4 例、stage III が 7 例、stage IV が 9 例であった。

ALL と NHL を合わせた全対象患者の合計は 103 例であり、第 1 寛解期を維持しているものが 89 例、第 2/3 寛解期 8 例、死亡例 6 例（内 1 例は肺高血圧症による死亡[70]）であった[34]。発症時年齢の中央値は 7.4 (0.2-19.2) 歳で男児 62 例、女児 41 例、観察期間は中央値 59.9 (2.1-188.8) か月であった。

患者遺伝子多型別人数および対照群遺伝子多型別人数を表 9 に示す。患者群における HWE は平衡に達しており、*MTHFR*c.677C>T, c.1298A>C, *SLCO1B1* c.1865+4846T>C, c.521T>C でそれぞれ p=0.049、p=0.633、p=0.495、p=0.686 であった。患者 - Hapmap JPT 間のアレル頻度は差がなく、 $\chi^2$  二乗検定でそれぞれ *MTHFR*c.677C>T, c.1298A>C, *SLCO1B1* c.1865+4846T>C, c.521T>C で p=0.442、p=0.924、p=0.896、p=0.066 であった。患者 - GeMDBJ 間では *MTHFR*c.677C>T, c.1298A>C, *SLCO1B1* c.521T>C で p=0.885、p=0.765、p=0.408 であった。*SLCO1B1* c.1865+4846T>C は GeMDBJ ではデータがなく、検証を行わなかった。

遺伝子多型別に第一寛解期を維持している患者人数と、死亡あるいは再発した患者人数別に表 7 に示した。*MTHFR* c.1298A>C の C アレルを少なくとも 1 つ持つ患者 35 例は全例第一寛解期を維持していたが、AA ホモアレル患者 67 例中 13 例が再発し、そのうち 5 例が原病死をしていた (p=0.004)。無イベント生存率の表を図 2 に示す。

#### IV-7 考察

直接的な MTX 治療中の影響の有無にかかわらず、*MTHFR* 多型は葉酸代謝経路の酵素であることから、DNA・RNA 新生や、DNA 修復またはメチル化に影響を与える可能性がある[49]。

また、神経管欠損は先天奇形の一つであるが、葉酸の補充が神経管欠損症の発症を抑制すること、*MTHFR*c.677C>T の T アレルを持つ胎児・母親において、



胎児の神経管欠損症の発生の増加と関連があるとの報告があり[71]、*MTHFR* 多型そのものが独立して中枢神経系への治療毒性等と関連する可能性がある。

また、*MTHFR* 多型とがん発症との関連を調査した複数の論文が発表されているが、Izmirli らは、一定した見解が得られていないとしている[49]。即ち、乳がんでは 17 報の有意な関連を占めず論文がある一方で 17 報の有意な関連がないとする報告があり、肝癌では 3 報の有意な関連と 1 報の有意な関連がないとする論文があったとしている。

また、Koppen らは 1999 年～2009 年の間に報告された小児 ALL の発症頻度と遺伝子多型との関連調査で 14 の報告をとりあげ解析を行っているが、多型があると発症頻度が上昇すると報告しているものが 2 報、不変であるとしたものが 7 報、減少するとしたものが 9 報であった[72]。このように *MTHFR* 多型は発がん性や DNA 修復に何らかの影響を与えている可能性があるが、評価は定まっていない。

小児 ALL 患者と *MTHFR* 多型との関連は、主として白人を対象とした研究で多く報告されている。Aplenc らは 520 例の小児 ALL 患者の *MTHFR* 遺伝子多型 (c.677、c.1298) を同定し、*MTHFR*c.677C>T の遺伝子型別の無再発率は CC ホモで 78.9%、CT アレルで 71.1%、TT ホモアレルで 66.6%であり、T アレルを有する群の無病生存率が有意に低くその危険率は 1.82 であったと報告した[60]。一方、ブラジル人小児 ALL 患者 126 例において *MTHFR*c.677C>T の C アレルを有する群の EFS が低いとの報告[73]がある。また、白人小児 ALL 患者 201 例において *MTHFR* の遺伝子多型別に無イベント率の比較を行ったところ、*MTHFR*c.677C>T の T アレルと c.1298A>C の A アレルを持つ者は 77.8%、持たないものは 89.3%であり、優位に *MTHFR*c.677Tc.1298A アレルを有する者のイベント発生率が高く、その危険度は 2.2 であったと報告した[48]。以上より、

その臨床的意義は一定せず、特に人種を越えた拡大解釈は慎重になるべきである。我々は *MTHFR*c.1298A>C 多型が生命予後と統計学的有意差をもって関連することを示したが、検索範囲内では日本人小児 ALL 及び NHL の生存率との関連を調査した報告はないことから、日本人小児 ALL 及び NHL 治療における意義は大きいと考える。

#### IV-8 結論

小児リンパ性悪性腫瘍患者 (ALL 及び NHL) において、葉酸代謝酵素である *MTHFR*c.1298A>C 多型で少なくとも 1 つ C アレルを持つ症例には再発・原病死が見られず、予後良好因子となりうることが示唆された。

## まとめと結論

*MTHFR* c.677C>T の T アレルは、日本人小児 ALL 患者で大量 MTX 療法中の血清 ALT 高値と関連し、次投薬の遅延と関連した。また、*MTHFR* c.1298A>C の A アレルは血清 ALT 高値と関連した。このことは、高ホモシステイン血症が生じ、血管障害などが起こることによるものと推察される。

一方、IV 章で示した通り、小児リンパ性悪性腫瘍患者（ALL 及び NHL）において、葉酸代謝酵素である *MTHFR* c.1298A>C 多型で少なくとも 1 つ C アレルを持つ症例には再発・原病死が見られなかった。

これは、*MTHFR* 酵素活性が低下することにより、5,10-methylene-THF 及び TS が増加、ついで DNA 新成が増加し、全治療経過においては有害事象の軽減につながった可能性がある。

つまり *MTHFR* の座位は異なるものの、いずれも酵素活性を低下させる多型を有する患者において、大量 MTX 療法中の有害事象の増多と次投薬の遅延がみられたものの、最終的な予後は良好因子になりうるという一見矛盾した結果が得られた。しかし ALL 及び NHL に対する治療は MTX 以外にも複数の薬剤を組み合わせ、最長 3 年間治療を行う複雑な治療計画となっている。よって、*MTHFR* の多型は MTX 療法中の有害事象の増多をきたすが、そのほかの治療計画中には有害事象の軽減が得られ、結果的に治療の遅延を回避できていた可能性が考えられるが、今回は MTX 単独療法以外の治療中の有害事象との関連調査は行っておらず、今後更なる検討が必要と考えられた。

また、今回の検討では *SLCO1B1* (c.1865+4846 T>C, c.521 T>C) 多型は MTX 単独療法中の有害事象や再発・原病死との関連は見られなかった。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導を賜りました筑波大学医学医療系小児科学 須磨崎亮 教授、福島敬 准教授に心から御礼申し上げます。

本研究の実験デザイン及び常日頃から実験について多大なるご指導、ご教示を賜りました筑波大学医学医療系遺伝医学 野口恵美子 准教授、統計解析について多大なるご指導、ご教示を賜りました筑波大学医学医療系 臨床試験・臨床疫学 高橋秀人 准教授に厚く御礼を申し上げます。

研究にあたり、実験の実際的な手技・手法についてご指導いただきました筑波大学次世代医療研究開発・教育統合センター 根本範子博士に感謝いたします。

研究の遂行に当たりご援助と貴重なる意見をいただいた茨城県立こども病院 土田昌広 病院長、小池和俊 小児専門診療部長に御礼を申し上げます。

終始温かい励ましの言葉をかけて精神的な支えとなっていた小児科診療グループ、遺伝医学研究グループ、筑波大学スタッフの皆様、友人・家族に感謝いたします。

最後に、本研究における検体及び情報の提供にご協力いただきました、小児がん患者の皆様及びそのご家族の皆様に心から感謝いたします。

## 参考文献

1. O'Leary, M., et al., *Progress in childhood cancer: 50 years of research collaboration, a report from the Children's Oncology Group*. *Semin Oncol*, 2008. **35**(5): p. 484-93.
2. Johnston, W.T., et al., *Childhood cancer survival: a report from the United Kingdom Childhood Cancer Study*. *Cancer Epidemiol*, 2010. **34**(6): p. 659-66.
3. Fukushima, H., et al., *An infant with life-threatening hemangioma successfully treated with low-dose cyclophosphamide*. *Pediatr Int*, 2011. **53**(6): p. 1073-5.
4. Fukushima, H., et al., *Central nervous system lesions due to juvenile myelomonocytic leukemia progressed in a boy undergoing first line chemotherapy*. *Int J Hematol*, 2012. **95**(5): p. 581-4.
5. 藤代準., et al., *小児進行副腎皮質癌の1例*. *日小外会誌*, 2013. **49**(2): p. 246-50.
6. Bollard, C.M., et al., *Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: non-Hodgkin lymphoma*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(6): p. 979-84.
7. Moricke, A., et al., *Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000*. *Leukemia*, 2010. **24**(2): p. 265-84.
8. Jastaniah, W., M.B. Abrar, and T.M. Khattab, *Improved outcome in pediatric AML due to augmented supportive care*. *Pediatr Blood Cancer*, 2012. **59**(5): p. 919-21.
9. Fukushima, H., et al., *Continuous regional arterial infusion effective for children with acute necrotizing pancreatitis even under neutropenia*. *Pediatr Int*, 2013. **55**(2): p. e11-3.
10. Flohr, T., et al., *Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2008. **22**(4): p. 771-82.
11. Mahmoud, S.S., et al., *Persistent low level Epstein-Barr virus DNAemia in childhood cancer survivors*. *Pediatr Hematol Oncol*, 2013. **30**(3): p. 216-25.
12. Relling, M.V., et al., *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing*. *Clin Pharmacol Ther*, 2011. **89**(3): p. 387-91.
13. Evans, W.E. and M.V. Relling, *Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics*. *Nature*, 2004. **429**(6990): p. 464-8.
14. Aplenc, R. and B. Lange, *Pharmacogenetic determinants of outcome in acute lymphoblastic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2004. **125**(4): p. 421-34.

15. Johnson, L.A. and J.A. Ross, *Host factors and consequence of chemotherapy in pediatric cancer patients*. *Pediatr Blood Cancer*, 2008. **51**(3): p. 320-6.
16. Kadan-Lottick, N.S., et al., *Survival variability by race and ethnicity in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Jama*, 2003. **290**(15): p. 2008-14.
17. Kishi, S., et al., *Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity*. *Blood*, 2007. **109**(10): p. 4151-7.
18. Davidsen, M.L., K. Dalhoff, and K. Schmiegelow, *Pharmacogenetics influence treatment efficacy in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2008. **30**(11): p. 831-49.
19. Krynetski, E.Y. and W.E. Evans, *Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase: molecular mechanisms and clinical importance*. *Pharmacology*, 2000. **61**(3): p. 136-46.
20. Salazar, J., et al., *Methotrexate consolidation treatment according to pharmacogenetics of MTHFR ameliorates event-free survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia*. *Pharmacogenomics J*, 2012. **12**(5): p. 379-85.
21. Shimasaki, N., et al., *Effects of methylenetetrahydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 polymorphisms on high-dose methotrexate-induced toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia or lymphoma*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2006. **28**(2): p. 64-8.
22. Shimasaki, N., et al., *Influence of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicities during maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia or lymphoma*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2008. **30**(5): p. 347-52.
23. Tanaka, Y., et al., *The activity of the inosine triphosphate pyrophosphatase affects toxicity of 6-mercaptopurine during maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia in Japanese children*. *Leuk Res*, 2012. **36**(5): p. 560-4.
24. Kishi, S., et al., *Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2004. **103**(1): p. 67-72.
25. Aur, R.J., et al., *Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1971. **37**(3): p. 272-81.
26. Schmiegelow, K., et al., *Second malignant neoplasms after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(19): p. 2469-76.
27. van Dijk, I.W., et al., *Dose-effect relationships for adverse events after cranial radiation therapy in long-term childhood cancer survivors*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013. **85**(3): p. 768-75.
28. Lippens, R.J. and B. Winograd, *Methotrexate concentration levels in the*

- cerebrospinal fluid during high-dose methotrexate infusions: an unreliable prediction.* *Pediatr Hematol Oncol*, 1988. **5**(2): p. 115-24.
29. Camitta, B., et al., *Intensive intravenous methotrexate and mercaptopurine treatment of higher-risk non-T, non-B acute lymphocytic leukemia: A Pediatric Oncology Group study.* *J Clin Oncol*, 1994. **12**(7): p. 1383-9.
30. Djerassi, I. and J.S. Kim, *Methotrexate and citrovorum factor rescue in the management of childhood lymphosarcoma and reticulum cell sarcoma (non-Hodgkin's lymphomas): parolnged unmaintained remissions.* *Cancer*, 1976. **38**(3): p. 1043-51.
31. Schmiegelow, K., *Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review.* *Br J Haematol*, 2009. **146**(5): p. 489-503.
32. Trevino, L.R., et al., *Germline genetic variation in an organic anion transporter polypeptide associated with methotrexate pharmacokinetics and clinical effects.* *J Clin Oncol*, 2009. **27**(35): p. 5972-8.
33. Chabner, B.A. and R.C. Young, *Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA synthesis in normal and tumorous target tissues.* *J Clin Invest*, 1973. **52**(8): p. 1804-11.
34. Fukushima, H., et al., *Polymorphisms of MTHFR associated with higher relapse/death ratio and delayed weekly MTX administration in Pediatric Lymphoid Malignancies.* *Leuk Res Treatment*, 2013. doi: 10.1155/2013/238528.
35. Huang, L., et al., *Polymorphisms in folate-related genes: association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia.* *Leukemia*, 2008. **22**(9): p. 1798-800.
36. Bailey, L.B. and J.F. Gregory, 3rd, *Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement.* *J Nutr*, 1999. **129**(5): p. 919-22.
37. Chiusolo, P., et al., *The role of MTHFR and RFC1 polymorphisms on toxicity and outcome of adult patients with hematological malignancies treated with high-dose methotrexate followed by leucovorin rescue.* *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012. **69**(3): p. 691-6.
38. Tsuchida, M., et al., *Long-term results of Tokyo Children's Cancer Study Group trials for childhood acute lymphoblastic leukemia, 1984-1999.* *Leukemia*, 2010. **24**(2): p. 383-96.
39. Kikuchi, A., et al., *Outcome of childhood B-cell non-Hodgkin lymphoma and B-cell acute lymphoblastic leukemia treated with the Tokyo Children's Cancer Study Group NHL B9604 protocol.* *Leuk Lymphoma*, 2008. **49**(4): p. 757-62.

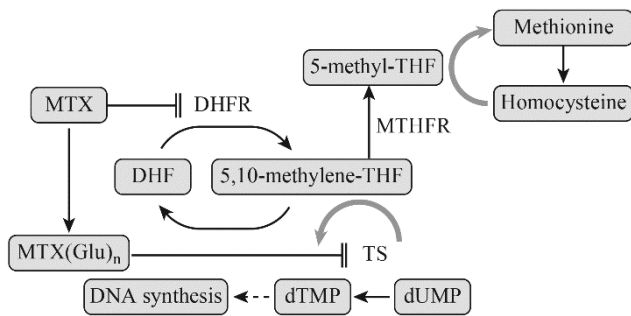
40. Hunger, S.P., et al., *Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(6): p. 957-63.
41. Csordas, K., et al., *Comparison of pharmacokinetics and toxicity after high-dose methotrexate treatments in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Anticancer Drugs*, 2013. **24**(2): p. 189-97.
42. Widemann, B.C. and P.C. Adamson, *Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity*. *Oncologist*, 2006. **11**(6): p. 694-703.
43. Widemann, B.C., et al., *High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma*. *Cancer*, 2004. **100**(10): p. 2222-32.
44. Evans, W.E., et al., *Conventional compared with individualized chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(8): p. 499-505.
45. Imanishi, H., et al., *Genetic polymorphisms associated with adverse events and elimination of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma*. *J Hum Genet*, 2007. **52**(2): p. 166-71.
46. Tirona, R.G., et al., *Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(38): p. 35669-75.
47. Radtke, S., et al., *Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2013. **121**(26): p. 5145-53.
48. Krajcinovic, M., et al., *Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Pharmacogenomics J*, 2004. **4**(1): p. 66-72.
49. Izmirlı, M., *A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk*. *Mol Biol Rep*, 2013. **40**(1): p. 625-37.
50. Weisberg, I., et al., *A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity*. *Mol Genet Metab*, 1998. **64**(3): p. 169-72.
51. Ongaro, A., et al., *Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival*. *Haematologica*, 2009. **94**(10): p. 1391-8.
52. Kamdar, K.Y., et al., *Folate pathway polymorphisms predict deficits in attention and processing speed after childhood leukemia therapy*. *Pediatr Blood Cancer*, 2011. **57**(3): p. 454-60.
53. Chen, Z.S. and A.K. Tiwari, *Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases*. *FEBS J*, 2011. **278**(18): p. 3226-45.



54. Abe, T., et al., *LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers*. *Gastroenterology*, 2001. **120**(7): p. 1689-99.
55. Trevino, L.R., et al., *Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Nat Genet*, 2009. **41**(9): p. 1001-5.
56. Niemi, M., M.K. Pasanen, and P.J. Neuvonen, *Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake*. *Pharmacol Rev*, 2011. **63**(1): p. 157-81.
57. Kameyama, Y., et al., *Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1\*5, SLCO1B1\*15 and SLCO1B1\*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells*. *Pharmacogenet Genomics*, 2005. **15**(7): p. 513-22.
58. Lopez-Lopez, E., et al., *Polymorphisms of the SLCO1B1 gene predict methotrexate-related toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Pediatr Blood Cancer*, 2011. **57**(4): p. 612-9.
59. Kato, T., et al., *Genetic Polymorphisms in Metabolic and Cellular Transport Pathway of Methotrexate Impact Clinical Outcome of Methotrexate Monotherapy in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis*. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2012. **27**(2): p. 192-199.
60. Aplenc, R., et al., *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2482-7.
61. Pui, C.H., et al., *Treatment outcomes in black and white children with cancer: results from the SEER database and St Jude Children's Research Hospital, 1992 through 2007*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(16): p. 2005-12.
62. Manabe, A., et al., *Significance of the complete clearance of peripheral blasts after 7 days of prednisolone treatment in children with acute lymphoblastic leukemia: the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15*. *Haematologica*, 2008. **93**(8): p. 1155-60.
63. Saito, M., et al., *Association of adiponectin polymorphism with cord blood adiponectin concentrations and intrauterine growth*. *J Hum Genet*, 2012. **57**(2): p. 109-14.
64. Weisberg, I.S., et al., *The 1298A->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine*. *Atherosclerosis*, 2001. **156**(2): p. 409-15.
65. Chiusolo, P., et al., *MTHFR polymorphisms' influence on outcome and toxicity in*

- acute lymphoblastic leukemia patients*. Leuk Res, 2007. **31**(12): p. 1669-74.
66. Toffoli, G., et al., *Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism on toxicity and homocysteine plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients*. Int J Cancer, 2003. **103**(3): p. 294-9.
67. Krajcinovic, M. and A. Moghrabi, *Pharmacogenetics of methotrexate*. Pharmacogenomics, 2004. **5**(7): p. 819-34.
68. Karas Kuzelicki, N., et al., *5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) low activity genotypes reduce the risk of relapse-related acute lymphoblastic leukemia (ALL)*. Leuk Res, 2009. **33**(10): p. 1344-8.
69. Murphy, S.B., *Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults*. Semin Oncol, 1980. **7**(3): p. 332-9.
70. Miyata, D., et al., *Fatal pulmonary veno-occlusive disease after chemotherapy for Burkitt's lymphoma*. Pediatr Int, 2011. **53**(3): p. 403-5.
71. van der Linden, I.J., et al., *Genetic variation in genes of folate metabolism and neural-tube defect risk*. Proc Nutr Soc, 2006. **65**(2): p. 204-15.
72. Koppen, I.J., F.J. Hermans, and G.J. Kaspers, *Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol, 2010. **148**(1): p. 3-14.
73. de Deus, D.M., et al., *Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T, A1298C, and G80A Polymorphisms on the Survival of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia*. Leuk Res Treatment, 2012. **2012**: p. 292043.

## 図・表



参考文献 (Fukushima H, et.al,2013) より抜粋

図 1 葉酸代謝における MTX の阻害機構

MTX は 2 つの機構で葉酸サイクルによる DNA 新成を阻害している。第一に DHF を 5,10-methylene-THF に変換する DHFR を阻害し、第二に MTX-ポリグルタミン酸が dUMP を dTMP に変換する TS を直接的に阻害することによって DNA 新成を阻害している。MTHFR の多型によって 5-methyl-THF の生合成が低下し、Homocysteine が上昇する。

略語 : DHF: dihydrofolic, DHFR: dihydrofolate refuctase, MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase, MTX: methotrexate, THF: tetrahydrofolate, TMP: thymidine monophosphate, TS: thymidylate synthase, UMP: uridine monophosphate

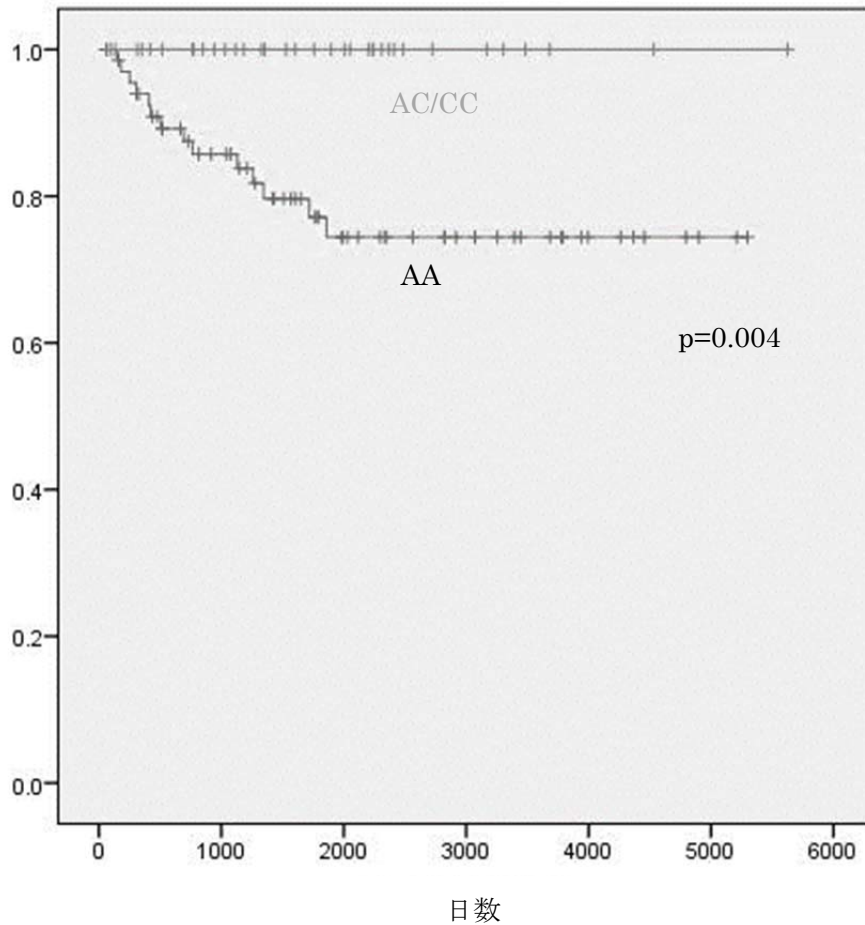


図 2 *MTHFR*c.1298 の多型別無イベント生存率

患者群を *MTHFR* c.1298 AA 群と AC もしくは CC 群で分けた時の event free survival をグラフで示す。治療終了後 1 か月以内に肺高血圧症で死亡した一症例は除いている。統計学的に差を認めた ( $p=0.004$ ) .

表 1 第 III 章の対象患者背景. すべて ALL (標準危険群・高危険群) で対象全 149 コース.

患者背景 (N=58)		
診断	BCP	56
	その他	2
初発時白血球数 ( $l\mu$ L)	<20,000	49
	20,000~50,000	5
	50,000~100,000	4
	$\geq$ 100,000	0
性別	男:女	25 : 33
診断時年齢 (歳)		6.50 (1.58-15.83)
リスク分類	標準	29
	高	29
第一寛解/再発生存/死亡		51/6/1
大量 MTX コース (N=149)		
12 時間持続		19
24 時間持続		130

表 2 TCCSG 初期リスク分類. 初診時末梢血数及び年齢により区分.

末梢血白血球数 (/ $\mu$ L)	年齢		
	1~6 歳	7~9 歳	10 歳~
<20,000	標準	高	高
20,000~50,000	高	高	超高
50,000~100,000	高	高	超高
$\geq$ 100,000	超高	超高	超高

文献 59 より引用・一部改変

表3 アレル頻度. 各アレル頻度の相違は $\chi^2$ 乗検定を施行.

遺伝子	参照 SNP ID	遺伝子型	本研究 (n=58)	HWE p	HapmapJPT † (n=172)	p	GeMDBJ ‡
<i>MTHFR</i> c.677 C>T	rs1801133	CC	18		68		864
		CT	33		84		1123
		TT	7	0.390	20	0.398	388
<i>MTHFR</i> c.1298 A>C	rs1801131	AA	39		112		952
		AC	18		56		435
		CC	1	0.801	4	0.918	41
<i>SLCO1B1</i> c.1865+4846T>C	rs11045879	TT	25		70		n.d.
		TC	23		74		n.d.
		CC	10	0.519	28	0.874	n.d.
<i>SLCO1B1</i> c.521 T>C	rs4149056	TT	40		138		1048
		TC	16		30		347
		CC	2	0.968	4	0.098	32

† NCBI Hapmap JPT: 公開情報 National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

NCBI に登録された SNP 番号はそれぞれ *MTHFR*C677T は ss65837366, *MTHFR*A1298C は ss76885974, *SLCO1B1*rs11045879

及び *SLCO1B1* T521C は ss15510724. ‡ GeMDBJ: Genome Medicine Database of Japan (<https://gemdbj.nibio.go.jp/dgdb/index.do>)



表 4 評価可能な大量 MTX (3 g/m<sup>2</sup>)コース、全 149 における有害事象と遺伝子多型

遺伝子	遺伝子型別 評価コース数	MTX 血中濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ )		Cre 上昇 >1.5	ALT 上昇 CTCAE grade 2 以上	T Bil (mg/dl) $\geq 1.50$	投与間隔の延長	
		48 時間値 $\geq 1.00$	72 時間 値 $\geq$ 0.10				評価可能 コース数	5 日を超える延長 コース数
<i>MTHFR</i>	CC	4	17	8	9	11	32	8
C677T	CT/TT	11	32	11	41	15	69	33
	p	0.774	0.742	0.360	0.006	0.272	p	0.030
<i>MTHFR</i>	AA	13	36	14	38	13	67	30
A1298C	AC/CC	2	13	5	12	13	34	11
	p	0.060	0.107	0.367	0.036	0.096	p	0.230
<i>SLCO1B1</i>	TT	6	21	9	25	11	45	18
c.1865+4846 T>C	TC/CC	9	28	10	25	15	56	23
	p	0.687	0.805	0.773	0.319	0.796	p	0.913
<i>SLCO1B1</i>	TT	9	30	12	35	14	68	28
T521C	TC/CC	6	19	7	15	12	33	13
	p	0.567	0.284	0.694	0.594	0.120	p	0.864

表 5 MTX 血中濃度 (48/72 時間値) と ALT/Cre/T-Bil 値の関連解析

MTX 血中濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	MTX 血中濃度別 コース数	Cre の上昇 >1.5	ALT 上昇		T Bil (mg/dl) $\geq 1.50$	投与間隔の延長	
			CTCAE grade 2 以上	コース数		評価可能 コース数	5 日を超える延長
48 時間	<1.0	10	46	20	87	31	
	$\geq 1.0$	8	3	5	12	9	
	p	<0.001	0.248	0.138	p	0.013	
72 時間	<0.1	7	34	13	61	22	
	$\geq 0.1$	12	16	13	41	19	
	p	0.003	0.870	0.044	p	0.252	

表 6 第 IV 章の対象患者、全 103 例の背景. ALL 並びに NHL で大量 MTX 療法を受けた患者.

全患者 (N=103)		
診断	ALL	68
	BCP	9
	T	5
	その他	5
	NHL	10
	Burkitt	2
	DLBCL	5
	T	4
	その他	4
性別 (男 : 女)	62 : 41	
診断時年齢 (歳)	7.43 (0.2-19.2)	
第一寛解 / 再発生存 / 死亡	89 / 8 / 6	
観察期間 (か月)	59.9 (2.1-188.8)	

表7 第IV章における疾患別の患者背景. 用いた分類法はALLでTCCSGの定めるリスク分類(表2)、NHLはMurphy分類.

ALL (N=82)		
初発時白血球数 (/ $\mu$ L)	<20,000	61
	20,000~50,000	8
	50,000~100,000	8
	$\geq$ 100,000	5
初期リスク分類	標準	30
	高	29
	超高	18
	その他	5
NHL (N=21)		
stage I		1
stage II		4
stage III		7
stage IV		9

表 8 悪性リンパ腫患者の病期分類. (Murphy et al [65]より引用・一部改変)

stage I	1) 単一の節外性病変または単一のリンパ節領域内に局在した病変 (但し縦隔と腹部病変は除く)
stage II	1) 単一の節外性病変で領域リンパ節の浸潤を伴うもの 2) 横隔膜の同一側にある (2a) 2 箇所以上のリンパ節領域の病変 (2b) 2 箇所の単一の節外性病変 (所属リンパ節浸潤の有無は問わない) 3) 肉眼的に全摘された消化管原発病変 (通常回盲部) (隣接する腸間膜リンパ節への浸潤の有無は問わない)
stage III	1) 横隔膜の両側にある 2 箇所の単一の節外性病変 2) 横隔膜の両側にある 2 箇所以上のリンパ節領域の病変 3) 胸郭内 (縦隔、胸膜、胸腺) の病変 4) 腹部原発の広範囲に及ぶ病変で、全摘不能であったもの 5) 傍脊髄または硬膜外の病変 (ほかの病変部位の有無は問わない)
stage IV	1) 発症時に中枢神経系または骨髄 (腫瘍細胞が 25%未満) に浸潤があるもの (原発巣は上記いずれでもよい)

\* 3 箇所以上の節外性病変が存在する場合は、部位にかかわらず stage III に分類する

\*\* 腹部原発腫瘍を摘出しても、残存リンパ節に病理学的に腫瘍が証明された場合は stage III とする

表 9 小児リンパ性悪性腫瘍患者におけるアレル頻度 (n=103) . 各アレル頻度の相違は  $\chi^2$  乗検定を施行.

遺伝子	参照 SNP ID	遺伝子 型	本研究 (n=103)	HWE p	HapmapJPT		GeMDBJ †	
					† (n=172)	p	( <i>MTHFR</i> c.677C>T: n=2,375 <i>MTHFR</i> c.1298A>C: n=1,428 <i>SLCO1B1</i> c.521T>C: n=1,427)	p
<i>MTHFR</i> c.677 C>T	rs1801133	CC	32		68		864	
		CT	61		84		1123	
		TT	10	0.049	20	0.442	388	0.885
<i>MTHFR</i> c.1298 A>C	rs1801131	AA	68		112		952	
		AC	31		56		435	
		CC	4	0.633	4	0.924	41	0.765
<i>SLCO1B1</i> c.1865+4846T>C	rs11045879	TT	42		70		n.d.	
		TC	43		74		n.d.	
		CC	18	0.495	28	0.896	n.d.	n.d.
<i>SLCO1B1</i> c.521 T>C	rs4149056	TT	73		138		1048	
		TC	26		30		347	
		CC	4	0.686	4	0.066	32	0.408

n.d.: not done

† NCBI Hapmap JPT: 公開情報 National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

NCBI に登録された SNP 番号はそれぞれ ss65837366 *MTHFR* C677T, ss76885974 *MTHFR* A1298C, ss15510724 *SLCO1B1* rs11045879 及び ss105439952 *SLCO1B1* T521C

‡ GeMDBJ: Genome Medicine Database of Japan (<https://gemdbj.nibio.go.jp/dgdb/index.do>)

表 10 遺伝子多型別の予後。再発・死亡者は全て *MTHFR* c.1298AA 遺伝子型 (p=0.004)

遺伝子	遺伝子型	患者数	再発/死亡例
<i>MTHFR</i>	c.677C>T	32	5
	CT/TT	70	8
		p	0.540
<i>MTHFR</i>	c.1298A>C	67	13
	AC/CC	35	0
		p	0.004
<i>SLCO1B1</i>	c.1865+4846T>C	42	6
	TT	60	7
		p	0.696
<i>SLCO1B1</i>	c.521T>C	73	8
	TC/CC	29	5
		p	0.511