

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子における一塩基変異多型と遺伝子発現に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4576

ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子における一塩基変異多型と 遺伝子発現に関する研究

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 小泉晶一教授)

後 藤 善 則

葉酸代謝拮抗剤、メソトレキセート (methotrexate, MTX) の標的酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydrofolate reductase, DHFR) 遺伝子の一塩基変異多型 (single-nucleotide polymorphism, SNP) を同定した。対象は小児血液腫瘍患者37例、正常対照83例で検索した結果、DHFR遺伝子3'UTRに721TtoAと829CtoTの2つのSNPが同定された。829 C/C, 829 C/T, 829 T/Tが、患者では各々83.8%, 10.8%, 5.4%で、対照では各々74.7%, 19.3%, 6.0%で、患者と対照で頻度に有意差は認めなかった。次に、829CtoTについて正常対照を用いDHFRのmRNA発現量をリアルタイムPCRにて定量した。829 T/Tで829 C/Cおよび829 C/Tに比して有意にDHFRのRNA発現量が増加していた。さらに、829CtoTによるMTXへの反応性の差異を検討した。829 C/Cと829 T/Tの細胞株を樹立し、その細胞株のMTXに対する薬剤感受性を評価したが有意差は検出できなかった。また小児血液腫瘍患者に治療として、MTXを投与した際に出現した関連副作用の重症度を評価したが、今回の少数例の検討ではSNPと副作用の重症度に相関は認めなかった。本研究ではDHFR遺伝子の829のSNPが薬剤感受性に変化をもたらすことを臨床的には証明できなかったが、3'UTRがDHFR遺伝子発現調節に関与している可能性が示唆された。

Key words single-nucleotide polymorphism, dihydrofolate reductase gene, untranslated region, gene expression, methotrexate response

国際的な協力で行われている「ヒトゲノムプロジェクト」によりヒトゲノムの塩基配列が決定されようとしている¹⁾²⁾。これによりヒト疾患の原因遺伝子群の解明が進むと思われるが、情報が蓄積されるにつれ次は「ポストシーケンス」として多型の存在が注目されてきた³⁾⁴⁾。多型情報により疾患関連遺伝子の解明がさらに進むだけでなく、多型が遺伝子発現に影響をおよぼした結果、個人差、民族差の発生に関与するからである⁵⁾。いわゆる「体質」の原因となるのである^{6)~8)}。

一塩基変異多型 (single-nucleotide polymorphism, SNP) はヒト遺伝子DNA配列の多様性の一つであり、100から1,000bpに1つと高頻度に出現する遺伝子マーカーである。蛋白コード領域 (coding regions, CDR) 内に存在するSNPはアミノ酸配列を変化させ酵素自身の活性に質的な差をもたらす。一方、調節領域上のSNPも遺伝子発現量を変化させ、活性に量的な差をもたらすことを予測させることから、このSNPも「体質」を決定づけると考えられている。

実際の臨床の場で疾患に対して薬剤を投与した場合、効果としての患者の応答性には、著効を示すものから全く効果を示さないものと大きな違いがある。また薬剤は効果をもたらす一方、副作用を引き起こす面を併せ持ち、同じ投与量でも副作用の重症度が患者によって異なる。これは薬剤代謝関連酵素の遺伝子多型が原因と考えられ、それが薬剤の代謝、不活化に個人差を

来すことによる。従って、SNPを研究することにより病気にかかりやすい「体質」をつきとめたり、個人の「体質」に合わせたよりよい治療法や薬剤の選択、投与量の決定 (オーダーメイド医療) が可能と推測される。

メソトレキセート (methotrexate, MTX) は小児血液腫瘍疾患の治療において主要な抗癌剤の一つである。プリン、ピリミジン合成に必要な補酵素の葉酸のプテリジン環の4位の水酸基がアミノ基に置換されており、葉酸を活性型の還元型葉酸に変換するジヒドロ葉酸還元酵素 (dihydrofolate reductase, DHFR) に強固に結合しこれを阻害する⁹⁾¹⁰⁾。その結果DNA前駆物質の枯渇、DNA合成の障害を来すことで殺細胞効果がみられる。さらに細胞内でグルタミル化したMTXは、他のプリン合成に関与する酵素に対しても阻害作用があることが明らかにされている。副作用としては、骨髓抑制による汎血球減少、肝障害、消化管粘膜を主とした粘膜障害などがあり、晩期には可逆性の脳深部白質病変が起きると報告されている。

MTXに対する耐性機序については詳細な研究がなされている。腫瘍細胞株を使った研究ではDHFR遺伝子の点変異が報告されており¹¹⁾、点変異の存在がDHFR蛋白自身の触媒作用の亢進やMTXに対する親和性低下をもたらした。また腫瘍細胞のDHFR遺伝子の発現量が、難治性疾患で増加していることが報告されている¹²⁾¹³⁾。

平成13年1月29日受付, 平成13年3月22日受理

Abbreviations: MTX, methotrexate; DHFR, dihydrofolate reductase; SNP, single-nucleotide polymorphism; CDR, coding regions; UTR, untranslated region; LCL, lymphoblastoid cell line

こうしたことはDHFR遺伝子におけるSNPが、MTXに対する個人の反応（有効性、副作用の発現）に影響を及ぼしうることを十分に考えさせる。そこで本研究ではDHFR遺伝子の塩基配列を解析しSNPを同定した。認めたSNPの一つについて、遺伝子発現量の定量化を行った。さらに、試験管内反応として細胞株を樹立しMTXに対する薬剤感受性と、生体内反応として小児血液腫瘍患者に対してMTXを投与した際に出現した関連副作用の重症度を評価することで、このSNPの影響を検討した。

対象および方法

I. 対象

1987年から1997年の間に、金沢大学医学部小児科にて治療管理がなされた小児血液腫瘍患者のうち、説明と同意後、検体採取が可能であった急性リンパ性白血病(ALL) 25名、急性骨髄性白血病(AML) 7名、非ホジキンリンパ腫(NHL) 5名、合計37名を対象とした。また1999年に同科および石川県立中央病院を受診した、血液腫瘍疾患を伴わない小児で、末梢血採取が可能であった83名を正常対照とした。

これら検体は既提供試料であったが、試料を匿名化することで研究結果が提供者等に影響を与えないよう考慮した。また個人情報情報は結果に全く表現されず、保護されている。以上の点については金沢大学医学部等医の倫理委員会の承認を得た。

II. 方法

1. 材料

骨髄液または末梢血からフィコールハイパーク比重遠心法にて単核球を分離した。

2. RNAの抽出

Chomczynski¹⁴⁾の方法を以下のように改良して行った。単核球 5×10^6 個にフェノールとチオシアン酸 Guanidiniumを含むTRIzol (Gibco BRL, USA) 1mlを加え細胞を融解した。0.2mlのクロロホルム（イソアミルアルコールを加えないもの）を加え攪拌し室温で5分間静置後、微量高速冷却遠心器（トミー精工、東京）にて12,000rpm、15分間、4℃で遠心分離した。上層部を採取し、等量のイソプロパノールを加え5分間室温に静置し、RNAを析出させ、12,000rpmで10分間遠心した。沈殿（RNA）を80%冷エタノールで洗浄後、上清を完全に除き室温で5分間放置し乾燥させた。1×Tris-EDTA (TE) 緩衝液（10mM トリスアミノメタン、1mM EDTA, pH6.8）に溶解し260nmの吸光度を測定して総RNA濃度を測定した。また260nm、280nmの吸光度の比を測定しRNAの純度の参考としたが、本法によって得られるRNAはこの比が1.5から2.0と良好であった。

3. 一本鎖cDNAの合成

上記によって得られた総RNAを鋳型としランダムプライマーにて一本鎖cDNAを合成した。まず、総RNA4μgに80mMランダムヘキサヌクレオチドプライマー（宝酒造、東京）3μlを加え、1×TE緩衝液（pH6.8）で総量50μlに調整した。GeneAmp™ PCR System 9600-R（Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, California, USA）を用い65℃で10分間保持後、20分かけて25℃まで冷却した。この過程でRNAの変性とプライマーのアニーリングを行った。引き続き反応液[100mM Tris-HCl (pH8.3), 200mM KCl, 20mM MgCl₂, 20mM ジチオスレイトール (dithiothreitol), 各2mMの4種類のdNTP, 逆転写酵素RAV-2（宝酒造）10単位] 50μlを加え、42℃で60分

Table 1. Primers

Gene	(Location)	Oligonucleotide sequence
DHFR F-1 (38-55)		5'-CTGTCATGGTTGGTTCGC-3'
DHFR F-2 (319-336)		5'-AGTCTAGATGATGCCTTA-3'
DHFR F-3 (608-625)		5'-ATGAAGGTGTTTTCTAGT-3'
DHFR R-1 (979-962)		5'-AAGCTTTTGGTTATTTCCA-3'
DHFR R-2 (623-640)		5'-GGGGGAACAACCTAAACT-3'
DHFR R-3 (319-336)		5'-TAAGGCATCATCTAGACT-3'

間保持しcDNAを合成させた後、90℃、2分間で逆転写酵素を失活させた。反応終了後1×TE緩衝液（pH8.0）100μlを加え総量200μlとした。

4. RT-PCR

ヒトDHFR mRNAの塩基配列はGENBANK ACCESSION No.J00140を引用し、DHFRに特異的なセンスプライマーとしてDHFR F-1 (38-55)（表1）、アンチセンスプライマーとしてDHFR R-1 (962-979)を設計し、合成はフナコシ株式会社（東京）に委託した。PCR反応は調製した一本鎖cDNAのうち5μlを鋳型として、最終0.2μMの各プライマー、各200μMの4種類のdNTP、PCR反応緩衝液（10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂）、Taq DNAポリメラーゼ（Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA）1.25単位を加え全量50μlで行った。反応はGeneAmp™ PCR System 9600-Rを用い、94℃×5分の初期変性の後、95℃×30秒、51℃×30秒、72℃×60秒のサイクルで40回増幅した。

5. PCRダイレクトシーケンス法による塩基配列の確認

PCR反応産物を1.5%アガロースゲル（H14-Takara, 宝酒造）に泳動しエチジウムブロマイド染色後、紫外線照射装置（トランスイルミネーター、フナコシ）上で観察した。QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN, Germany）を用い精製した後、シーケンス反応をCatalyst 800（Applied Biosystems, USA）にて行なった。すなわち、96℃×20秒、50℃×30秒、60℃×4分のサイクルで25回繰り返した。シーケンスプライマーにはRT-PCRのプライマーをそのまま使用した以外に、あらたに設計しmRNA全塩基配列が検索できるようにした。プライマーの塩基配列を表1にまとめて示す。過剰なプライマー、蛍光色素をエタノール沈殿にて除去した後、塩基配列は310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）にて自動解析した。GENBANKに登録された塩基配列を標準対照とし、変異を検索した。

6. 変異アレル特異的制限酵素切断

検出された変異のうち829CtoTについては特異的制限酵素による切断にて、さらに同部位の変異の確認を行なった。すなわち、センスプライマーとしてDHFR F-3 (608-625)（表1）、アンチセンスプライマーとしてDHFR R-1 (962-979)を用い、調製した一本鎖cDNA 5μlを鋳型として、最終0.2μMの各プライマー、各200μMの4種類のdNTP、PCR反応緩衝液、Taq DNAポリメラーゼ 1.25単位を加え全量50μlでRT-PCR反応を行った。反応は94℃×5分の初期変性の後、95℃×30秒、51℃×30秒、72℃×60秒のサイクルで40回増幅した。得られたPCR産物 5μlを、塩基配列5'-NNCAGTGNN-3'を特異的に切断する制限酵素TspRI（New England BioLabs, USA）により至適温度65℃で1時間反応させた。反応後のDNA断片を2.0%アガロースゲルに泳動しエチジウムブロマイド染色後、紫外線照射装置

上で観察した。PCR産物は372bpのサイズであるが、829 CのcDNAは酵素反応後222bpと150bpのサイズに切断されることになる。

7. リアルタイム定量的PCR法によるDHFR遺伝子発現の定量化

1) 原理¹⁵⁾

リアルタイム定量的PCR法はTaqMan DNAポリメラーゼの5'エンドヌクレアーゼ活性を利用し、TaqManプローブと呼ばれる蛍光プローブの蛍光強度の変化、検出に基づいている。TaqManプローブは5'末端にフルオレセイン系の蛍光色素(レポーター色素)が、3'末端にローダミン系の蛍光色素(クエンチャー色素)がラベルされたオリゴヌクレオチドから成り、両プライマー間のターゲット領域に特異的にアニールするように設計されている。レポーター色素とクエンチャー色素は、オリゴヌクレオチドを介して結合している状態ではクエンチャー色素によりレポーター色素の蛍光が抑制されているが、伸長反応が進み5'末端から加水分解が起ると、レポーター色素がクエンチャー色素から離脱し、抑制されていたレポーター蛍光強度が増強する。ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA) でこれをモニターし、Sequence Detection ソフトウェアでレポーター色素による蛍光強度をサイクルごとにプロットすると、PCR反応による増幅産物の増加により蛍光強度は指数関数的に増強してくる。ここでレポーター色素により蛍光が検出されはじめる閾値サイクル数(threshold cycle number, Ct)が、PCR反応開始前の初期量を反映することから、これを算出することになる。

2) Ctの算出

今回はcDNA5 µlを鋳型として、最終0.9 µMの各プライマー、最終200nMのTaqManプローブ、2×Master Mix [8%グリセロール, 1×TaqMan buffer A, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 400 µM dUTP, 0.05U/µl AmpErase uracil N-glycosylase, 5mM MgCl₂, 0.01U/µl Gold Amplitaq DNA polymerase] (Perkin-Elmer) 25 µlを加え全量50 µlでリアルタイム定量的PCR反応を行った。プライマーは、センスプライマーとして5'-AAACTGCATCGTCGCTGTGTC-3' (57-77), アンチセンスプライマーとして5'-ACCCATAATCACCAGATTCTGT-3' (183-204)を設計し、合成はフナコシ株式会社(東京)に委託した。TaqManプローブは、5'-CGTTCCTTGCCGATGCCCATGTTCT-3' (80-103)にレポーター色素としてFAMをクエンチャー色素としてTAMRAをラベルするよう設計し、合成はパーキンエルマー・ジャパン(千葉)に委託した。

PCR反応はABI PRISM 7700 Sequence Detectorを用い、MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (Perkin-Elmer) およびMicroAmp Optical caps (Perkin-Elmer) 内で行った。反応は50℃×2分のAmpErase uracil N-glycosylase処理、95℃×10分の初期変性の後、95℃×15秒、60℃×1分のサイクルで40回増幅した。各サンプルにつき3ウェルを使用し、3ウェルのCtの平均を算出した。このPCR反応は同一検体で3回行なった。

3) 検量線の作成

定量化にはCtから実際に各サンプル内に含まれるコピー数を求める検量線の作成が必要である。今回は標準サンプルに対する各サンプルの発現量の比をもって定量化することとし、PCR反応を行なう際には同時に標準サンプルとなるcDNAも測

定した。すなわち、標準サンプルは合成したDHFRcDNAとその希釈系列とし、それぞれに対するCtから検量線を作成した。この直線に各サンプルのCtをあてはめることで各サンプルの標準サンプルに対する発現量の比を求めた。

4) 内部コントロールによる補正¹⁶⁾

総RNA抽出過程における検体間の精製の質がCtに影響をおよぼすため、内部コントロールとしてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)遺伝子の定量をABI PRISM 7700 Sequence Detectorを用い同様に施行した。すなわち、標準サンプルとその希釈系列をGAPDHでの検量線の作成のために設置し、これに対する各サンプルのGAPDHの発現量の比を求めた。標準サンプルにおけるDHFR/GAPDHを1とし、各サンプルのDHFR/GAPDHを算出することで補正した。

8. Epstein-Barrウイルス形質変換B細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)の樹立

分離した単核球を2-アミノエチルイソチオウロニウムブロマイド(2-aminoethylisothiuroniumbromide) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 処理ヒツジ赤血球を用いてロゼット法とフィコール-ハイパーク比重遠心法によりEロゼット非形成細胞を分離回収した。各々のLCLはEロゼット非形成細胞にB95-8細胞株培養上清を添加して樹立した。この方法により829 C/CのLCLと、829 T/TのLCLを樹立した。さらに培養は10%非働化ウシ胎児血清(fetal calf serum, FCS), 25mM HEPES, 5×10⁵M2-メルカプトエタノール(2-mercaptoethanol), 100U/mlペニシリンG, 10 µg/mlゲンタマイシンを含むRPMI 1640培養液(Gibco Laboratories, Grand Island, USA)に浮遊させ、湿潤37℃, 5%CO₂の条件で培養した。RPMI 1640培養液では葉酸が1.0mg/lと高濃度で含まれ、細胞内のDHFR発現に影響をおよぼすことから、上記RPMI 1640培養液の代わりにRPMI 1640 folate-free培養液(Gibco Laboratories)で調製した培養液を作成し、LCLを同様に培養した。

9. 薬剤感受性試験

1) LCLへのMTX暴露

LCLのMTXに対する感受性は以下の方法により行なった。対数増殖期にある細胞を4×10⁵/mlに調整し、この細胞浮遊液を24穴平底プレート(Costar, Cambridge, USA)に各穴400 µlずつ蒔いた。湿潤37℃, 5%CO₂存在下で24時間後、MTXを加えた培養液400 µlを加えMTXの最終濃度を1nM~100nMとし、コントロールには培養液のみを同量加えた。72時間培養後、各穴から50 µlを採取しPBS (pH 7.2)にて10倍希釈しサンプルとした。

2) ヨウ化プロピジウム取り込み試験

細胞死に至り、細胞膜透過性が亢進した細胞ではDNA結合色素であるヨウ化プロピジウム(propidium iodide, PI)が取り込まれこれを排出することができない。この性質を利用し、不可逆的な細胞死に陥った細胞をPIの赤色蛍光の強さを指標としてフローサイトメトリー法により解析した。解析にはサンプルに1 µl/mlとなるようにPI溶液を添加した。

3) 定時的細胞数測定

フローサイトメトリー法の計測時間を一定にすることにより、一定容量あたりの相対的細胞数の測定が可能である。正常LCLはリンパ球領域に残存するが、細胞死あるいはアポトーシスに陥った細胞は前方散乱の低下をきたすため、リンパ球領域

のみを解析する様に設定することにより正常LCLの細胞数を評価できる。計測時間を60秒とし各サンプルを解析した。

4) 増殖抑制曲線の作成

MTXを加えたウエルの値をコントロールの値に対する比で表し生存率とした。1回の実験は3穴の平均値をもってその実験における生存率の値とした。希釈系列の値をプロットし曲線を作成し薬剤感受性の指標とした。この感受性試験はすべて3回行った。

10. 血液腫瘍患者におけるMTX投与時の副作用

我々の施設は小児白血病・悪性腫瘍治療研究グループ(CCLSG)に参加している。ALL治療プロトコル941にはMTXの中等量投与(225-500mg/m²)が、NHL治療プロトコル960には超大量療法(3-5g/m²)が含まれ、中枢神経系に対しMTXの髄注も施行されている¹⁷⁾¹⁸⁾。今回、MTXを投与した症例で臨床経過を追えたALL19名、NHL3名において、MTXを含むレジメン後の主だった副作用の発症を調べた。なお、副作用の重症度はJapan Clinical Oncology Group(JCOG)のCommon toxicity criteria(CTC)を参照し¹⁹⁾²⁰⁾スコア化すること

で客観性を持たせた。

11. 統計処理法

えられた値はすべて平均値±標準偏差および中央値で表した。829CtoTでグループ分けした各群は標本数が少なく、各群が正規分布しているとの仮定ができないのでノンパラメトリック検定法で行う必要がある。DHFR遺伝子発現の定量化における有意差検定にはKruskal-Wallis検定を用いた。829CtoTに関する対応のない2群の検討にはオッズ比と95%信頼区間を求め、危険率の計算はFisherの直接確率計算法を用いた。危険率5%未満の場合(p<0.05)を統計学的有意差ありと判定した。

成 績

I. DHFR mRNAの塩基配列解析による変異の検出

すべての検体で目的とされるサイズ(942bp)のPCR産物をえた。塩基配列の解析はPCRプライマーとシーケンスプライマーを組み合わせてることにより全塩基を解析することができた。

CDR(43-606)にはGENBANKに登録されている塩基配列と

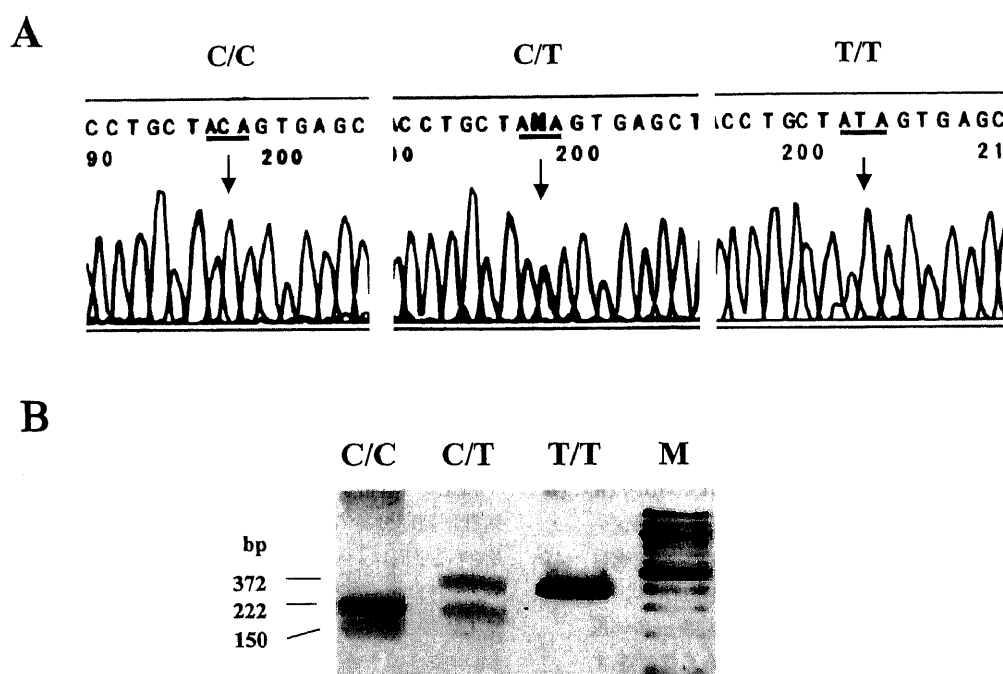


Fig. 1. Identification of DHFR 829CtoT polymorphism. (A) Representative electropherogram of each type of 829 polymorphisms. Double peaks labeled with N and an arrow contain both the C and T peaks and indicate the heterozygous genotype(C/T). (B) Representative PCR-RFLP assays to confirm the variants. Digestion of PCR products with TspRI restriction enzyme produced 222-and 150-bp fragments in prototype C/C, 372-, 222-, and 150-bp fragments in heterozygotes(C/T), and a single band at 372 bp in homozygous variants(T/T).

Table 2. Frequencies of DHFR 829 variant types

Variable	Case (%)	Control (%)	OR*	95% CI	p value**
C/C	31 (83.8)	62 (74.7)	1 ⁺	—	—
C/T	4 (10.8)	16 (19.3)	0.5	0.15-1.62	0.18
T/T	2 (5.4)	5 (6.0)	0.8	0.15-4.36	0.58

⁺, Reference category.

* ORs were calculated in the standard unmatched fashion.

** Fisher's exact probability.

照合し変異は認められなかった。また、3'UTRの全配列が解析可能で、その中に721TtoAと829CtoTの2か所のSNPを検出した。721TtoAは解析した全検体で認めた。829CtoTは27例(患者6例, 対照21例)で認められた。そのうち、7例(患者2例, 対照5例)は変異をもつ829 Tのみを発現し、20例(患者4例, 対照16例)は829 TとGENBANKに登録されている829 Cの両方を発現していた(図1A,表2)。すなわち、前者が829 T/T, 後者が829 C/Tとなる。患者群と対照群で829CtoTの分布に統計学的相違はなく、SNPの有無と疾患の関連は認められなかった。(829 C/Tの829 C/Cに対するオッズ比, 95%信頼区間はそれぞれ0.50, 0.15-1.62で、829 T/Tの829 C/Cに対するオッズ比, 95%信頼区間はそれぞれ0.80, 0.15-4.36であった。)

829CtoTについては変異アリル特異的制限酵素切断で塩基を確認した。ダイレクトシーケンス法での表現型と矛盾する検体は認めなかった(図1B)。

II. リアルタイム定量的PCR法によるDHFR発現量の定量化の検討

829CtoTに注目し、このSNPの意義を検討した。829 C/C 15例(対照10例, 患者5例), 829 C/T 12例(対照8例, 患者4例), 829 T/T 10例(対照8例, 患者2例)においてリアルタイム定量的PCR法を施行し、各検体の標準サンプルに対する比でDHFR発現量を定量化した。対照群において、829 C/Cは 0.22 ± 0.11 (中央値0.18), 829 C/Tは 0.40 ± 0.08 (0.41), 829 T/Tは 2.54 ± 1.48 (2.53)であり、829 T/Tで有意にDHFR遺伝子発現の増加

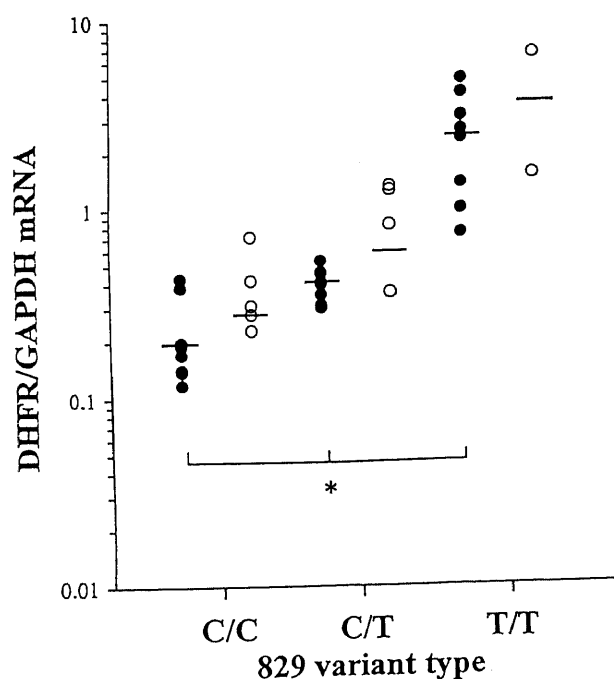


Fig. 2. DHFR mRNA expression in the 829 variant types. The levels of DHFR and GAPDH(internal control) mRNA were quantified by a real-time PCR method in each of samples with 829 variants from non-hematologic controls(closed circles) and leukemic patients(open circles). The ratio of relative quantity of DHFR and GAPDH expressions(DHFR/GAPDH normalized) was compared in each type. Median values were indicated as horizontal bars. Kruskal-Wallis test indicated statistical significance(* $p<0.05$) in the expression of DHFR mRNA.

が認められた ($p<0.05$) (図2)。一方、患者群においては検体数が少なく統計学的検討はできないが、やはり829 T/Tの2例でDHFR遺伝子発現が増加していた。

III. LCLを用いた薬剤感受性の検討

MTXによるLCLの増殖抑制曲線を示した(図3A, 3B)。生体に近い葉酸低濃度での培養で、高濃度での培養に比べMTXによる細胞増殖抑制が強い傾向がみられたが、829 C/Cと829 T/Tの間での細胞増殖抑制の差は葉酸の濃度に関係なく認めら

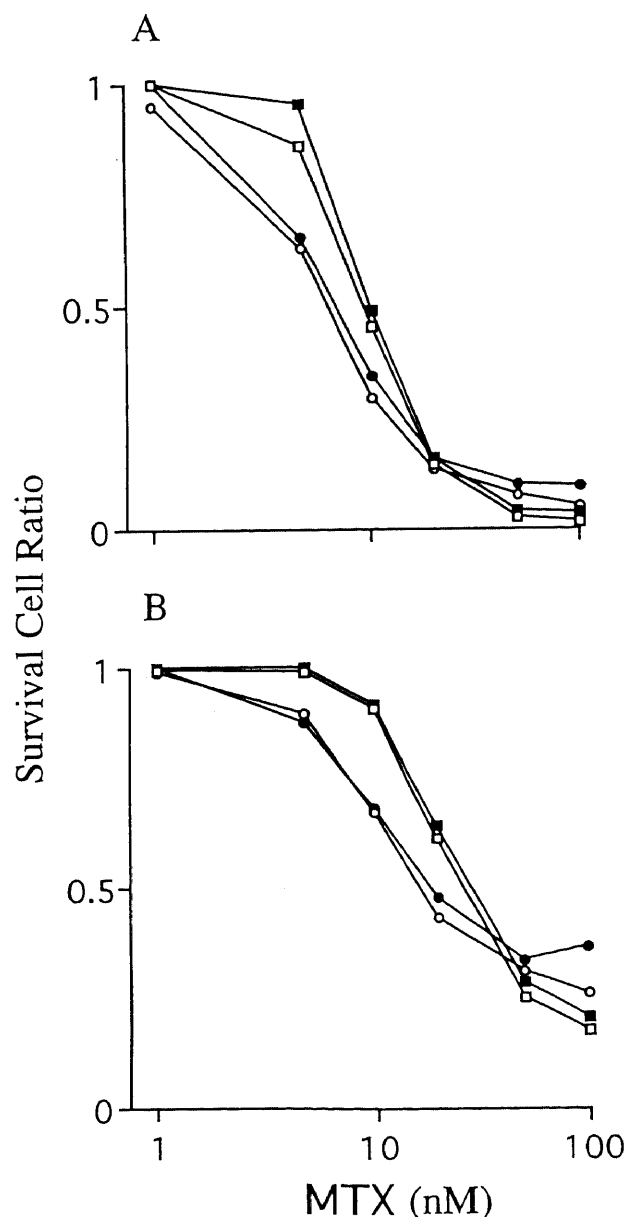


Fig. 3. Cytotoxicity assays in the 829 variant types used by LCL. Survival cell ratio was determined by comparing with the survival cell cultured without MTX. (A) Cytotoxicity of MTX was measured by the cell count. (B) Cytotoxicity of MTX was measured by PI(propidium iodide) expression. □, 829 C/C(medium 1); ■, 829 T/T(medium 1); ○, 829 C/C(medium 2); ●, 829 T/T(medium 2) (SD was not shown.) Medium 1 included substantial concentration of folic acid benefiting cell growth, while medium 2 included low concentration of the agent.

Table 3. Patient characteristics

Case	Age (year)	Sex	Diagnosis	Toxicities	Grade	Outcomes
829 C/C						
1	2	M	CALL	Neutropenia	4	Died
2	8	M	CALL	Liver injury	3	Alive
3	3	M	CALL	Neutropenia	4	Alive
4	8	M	CALL	Liver injury	3	Alive
5	2	F	CALL	Liver injury	3	Alive
6	14	F	CALL	Anemia	3	Relapse
7	4	M	Pre-B ALL	Neutropenia, Stomatitis	3	Alive
8	4	F	Pre-B ALL	Liver injury	3	Alive
9	1	F	Pre-B ALL	Liver injury	3	Died
10	9	F	TALL	Liver injury	4	Alive
11	6	M	TALL	Neutropenia	3	Alive
12	14	M	TALL	Neutropenia	4	Alive
13	0	F	Infant. ALL	Pancytopenia	4	Relapse
14	2	F	NHL	Neutropenia	4	Died
15	9	M	NHL	Neutropenia	4	Relapse
16	11	M	NHL	Renal injury	3	Alive
829 C/T						
17	2	F	CALL	Liver injury	4	Alive
18	2	F	CALL	Neutropenia	3	Alive
19	12	F	CALL	NA	NA	Died
20	1	M	Pre-B ALL	Anemia	4	Alive
829 T/T						
21	10	F	TALL	Pancytopenia	4	Alive
22	13	M	TALL	Infection	4	Alive

CALL, common acute lymphocytic leukemia; F, female; M, male; NA, not available; NHL, non-Hodgkin lymphoma; Pre-B ALL, B-cell precursor ALL; TALL, T-cell ALL.

れなかった。生存率はPI法と細胞数計測法の2つの方法で算出したが、方法によりこの結果が異なることはなかった。

Ⅳ. 血液腫瘍患者におけるMTX投与時の副作用の検討

829番目の変異の有無によりMTXを投与した症例をグループ分けすると、829 C/C 16例、829 C/T 4例、829 T/T 2例となった(表3)。多剤併用療法であることからMTX単独の反応性、副作用の出現の評価は困難であるが、グループ間で予後に明らかな差は認めなかった。副作用の発症として、肝障害、腎障害、口腔内を主とした粘膜障害、汎血球減少およびそれに伴う感染症を認めた。重症度のスコアは3から4が多いが、直接死亡の原因となるものはなかった。グループ間で副作用の発症部位や重症度の相違は明かではなかった。

考 察

本研究ではMTXが阻害する標的酵素DHFR遺伝子におけるSNPを検索した。GENBANKに登録されている塩基配列を標準対照として比較したが、CDRにSNPおよび点変異は認めなかった。CDR上の変異はアミノ酸配列を変化させる結果、酵素機能を失活させる。細胞の生命維持に必須な酵素であるDHFR遺伝子でこのような状態が起こることは出生、生存そのものに結びつき、ありえないのかもしれない。実際、今までに報告されたCDRの点変異は全て細胞株のみでの報告であった⁹⁾¹⁰⁾。

本研究では3'UTRに2か所のSNPを認めた。741TtoAは今回調べた検体全例で認め、民族特異的なSNPである可能性が考えられた。一方、829CtoTは今回調べた検体でも多様性を認めた。両アレルからの遺伝子発現が同じであるとすればゲノムDNAにおける遺伝子頻度は0.142となる。

3'UTRはストップコドン(これ自体は3'UTRに含まれない)か

らポリAまでの領域と定義され、5'UTRとともにcDNAには含まれるが蛋白へは翻訳されない。現在までの研究からmRNAの安定性(stability)あるいは分解(degradation)の制御を司ると考えられている²¹⁾。mRNAの分解の現象としてポリAの短縮化や3'UTRの切断が認められており²²⁾、UTR領域に存在する繰り返し配列や、特異的機能を持つとされる配列も近年報告されている²³⁾。従って、今回同定したSNPも遺伝子の発現調節に影響を及ぼし、結果として細胞さらには個人における多様性をもたらしめている可能性がある。

829CtoTについては、リアルタイム定量的PCR法を用い、単核球におけるmRNA発現量を定量化した。829T/Tで有意に発現量が多いことが示され、829CtoTが本酵素の安定性に影響をおよぼすことを示唆する興味深い結果であった。

DHFR遺伝子発現の増加はMTXに対する薬剤耐性機構の一つとして報告されている¹²⁾。正常細胞に比較し腫瘍細胞でDHFRが増加し、さらに、予後の良いB前駆細胞性ALLに比較して難治性であるT-ALLでDHFRが増加しているという。そこで今回の829CtoTが果たしてMTX耐性に有意差をもたらすか、すなわち829番目の塩基が薬剤耐性獲得の容易な「体質」であることを予測させるかを検討した。

試験管内反応として、樹立した2種類のLCLにMTXを暴露させることで細胞死を誘導した。各濃度でのMTXによるLCLの増殖抑制を指標としたが、829CtoTにより有意差は認められなかった。その理由の一つとして、すでにLCLが自己増殖能を獲得し、細胞内のDHFR遺伝子発現が末梢血単核球に比較し著しく増加していたことが影響しているのかもしれない。

生体内反応として、小児血液腫瘍患者におけるMTXの治療効果を実際の臨床上で判定するのがよいが、これにはいくつかの問題点を含む。癌化学療法は多剤併用療法が中心であり、

MTX単独の治療効果の評価は難しい。また、前述したようにDHFR遺伝子発現は腫瘍細胞の表現型によりすでに増減しており¹³⁾、腫瘍細胞の細胞周期の影響も強い。さらに、MTXに対する耐性機序にはDHFRだけでなく、葉酸ポリグルタミン酸合成酵素 (folylpolyglutamate synthetase, FPGS) や γ -グルタミル加水分解酵素 (γ -glutamyl hydrolase) も関与している²⁴⁾。今回調べた患者検体の829 T/Tは2例とも難治性といわれるT-ALLであったが、正しい評価には大きな母集団が必要であろう。

従って本研究では、腫瘍細胞も正常細胞も薬剤の代謝系は同じであり、腫瘍細胞に対して殺細胞効果を示す程度が強力であればあるほど、一方で、正常細胞である組織、臓器に重篤な副作用を引き起こすであろうと考え、患者のMTX投与後に発症した副作用の重症度を調査した。DHFR遺伝子発現の少ない829 C/Cの症例で重篤な副作用の発症が多いことが推測されたが、829CtoTの因子のみで副作用の発症部位や重症度に統計学的有意差は認められなかった。

このように単核球で認められた829CtoTによるDHFR遺伝子発現の差は、試験管内反応あるいは生体内反応として想定した検討では薬剤反応の差として認められなかった。今回は単核球を使用した。単核球はB細胞、T細胞、単球などの細胞分画からなり、患者検体では腫瘍細胞が大部分を占めることから、今後各系統細胞分画でのDHFR遺伝子発現量の確認が必要と思われる。これは副作用の発現部位となる各種臓器細胞でDHFR遺伝子発現量の相違を検討する必要があるという点でも同様である。

SNPプロジェクトは世界的規模で進められている。SNPによる遺伝子発現量調節が確認された今回の結果は、今後多数の疾患関連遺伝子や薬剤感受性関連遺伝子のSNP情報を蓄積することで、それぞれの患者に適したオーダーメイド医療が実現可能になることを支持する。さらに将来的にはSNP情報が予防医学に応用されるかもしれない。

結 論

小児血液腫瘍疾患の治療で使用する葉酸代謝拮抗剤、MTXの標的酵素であるDHFRのmRNAの変異を血液腫瘍37例、正常対照83例で検索した。

1. CDRに変異は認められず、3'UTRに2箇所のSNP (721TtoA, 829CtoT) を認めた。721TtoAの遺伝子頻度は1.000であったが、829CtoTの遺伝子頻度は0.142と今回の検体において多様性を認めた。

2. 正常対照の末梢血単核球におけるDHFR遺伝子のmRNA発現量を、リアルタイム定量的PCR法にて測定し、829 T/Tで有意に増加していた。この変異がmRNAの安定性に関与することを示唆する結果であった。

3. 829 C/Cと829 T/TのLCLを樹立し薬剤感受性試験を行ったが、明らかな増殖抑制の差、言い換えれば耐性の獲得は観察されなかった。

4. 血液腫瘍患者におけるMTX投与後の反応 (副作用の出現) を評価したが、今回の小規模研究からは829CtoTにより効果や毒性が増強するとは言えなかった。

5. 以上より、本研究ではDHFR遺伝子の829のSNPが臨床的に薬剤感受性に関与することを直接証明はできなかったが、3'UTRがDHFR遺伝子発現調節に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科学講座小泉晶一教授に深甚なる感謝の意を表します。また直接御指導を賜りました犀川太講師に心から感謝いたします。さらに本研究に多大の御協力を賜りました金沢大学小児科学講座の諸先生方ならびに技術補助員の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) Olson MV. A time to sequence. *Science* 270:394-396, 1995
- 2) Rowen L, Mahairas G, Hood L. Sequencing the human genome. *Science* 278:605-607, 1997
- 3) Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278:1580-1581, 1997
- 4) Cavalli-Sforza LL. How can one study individual variation for 3 billion nucleotides of the human genome? *Am J Hum Genet* 46:649-651, 1990
- 5) Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science* 274:536-539, 1996
- 6) Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-2048, 1994
- 7) Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-1517, 1996
- 8) Nickerson DA, Taylor SL, Weiss KM, Clark AG, Hutchinson RG, Stengard J, Salomaa V, Vartiainen E, Boerwinkle E, Sing CF. DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nature Genetics* 19:233-240, 1998
- 9) Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 309:1094-1104, 1983
- 10) Werkheiser WC. The biochemical, cellular, and pharmacological action and effects of the folic acid antagonists. *Cancer Res* 23:1277-1285, 1963
- 11) Biedler JL, Spengler BA. Metaphase chromosome anomaly: association with drug resistance and cell-specific products. *Science* 191:185-187, 1976
- 12) Matherly LH, Taub JW, Ravindranath Y, Proefke SA, Wong SC, Gimotty P, Buck S, Wright JE, Rosowsky A. Elevated dihydrofolate reductase and impaired methotrexate transport as elements in methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85(2):500-509, 1995
- 13) Matherly LH, Taub JW, Wong SC, Simpson PM, Ekizian R, Buck S, Williamson M, Amylon M, Pullen J, Camitta B, Ravindranath Y. Increased frequency of expression of elevated dihydrofolate reductase in T-cell versus B-precursor acute lymphoblastic leukemia in children. *Blood* 90(2):578-589, 1997
- 14) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987
- 15) Marcucci G, Livak KJ, Bi W, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Detection of minimal residual disease in patients with *AML1/ETO*-associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Leukemia* 12:1482-1489, 1998

- 16) Peters UR, Tschan MP, Kreuzer KA, Baskaynak G, Lass U, Tobler A, Fey MF, Schmidt CA. Distinct expression patterns of the p53-homologue *p73* in malignant and normal hematopoiesis assessed by a novel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay and protein analysis. *Cancer Res* 59:4233-4236, 1999
- 17) Masters JN. A human dihydrofolate reductase pseudogene and its relationship to the multiple forms of specific messenger RNA. *J Mol Biol* 167:23-26, 1983
- 18) Goker E, Waltham M, Kheradpour A, Trippett T, Mazumdar M, Elisseyeff Y, Schnieders B, Steinherz P, Tan C, Berman E, Bertino JR. Amplification of the dihydrofolate reductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gene mutations. *Blood* 86(2):677-684, 1995
- 19) 日本癌治療学会・治療効果判定基準委員会. 日本癌治療学会薬物有害反応判定基準の改訂について. *日癌治* 32:61-65, 1997
- 20) Tobinai K. Toxicity grading criteria of Japan Clinical Oncology Group. *Jpn J Clin Oncol* 23:250-257, 1993
- 21) Sachs AB. Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 74:413-421, 1993
- 22) 西沢和久. 真核細胞 mRNA の安定制御. *蛋白質核酸酵素* 40(9):1092-1099, 1995
- 23) Pesole G, Liuni S, Grillo G, Ippedico M, Larizza A, Makalowski W, Saccone C. UTRdb: a specialized database of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 27:188-191, 1999
- 24) Rots MG, Pieters R, Peters GJ, Noordhuis P, van Zantwijk CH, Kaspers GJ, Hahlen K, Creutzig U, Veerman AJ, Jansen G. Role of folypolyglutamate synthetase and folypolyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylation in childhood leukemia. *Blood* 93(5):1677-83, 1999

A Single-nucleotide Polymorphism in the 3' Untranslated Region Affects the Human Dehydrofolate Reductase Gene in Gene Expression Yoshinori Goto, Department of Pediatrics, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. J. Med. Soc.*, **110**, 191-198 (2001)

Key words single-nucleotide polymorphism, dihydrofolate reductase gene, untranslated region, gene expression, methotrexate response

Abstract

Methotrexate (MTX) acts as a tight-binding inhibitor of dehydrofolate reductase (DHFR). A single-nucleotide polymorphism (SNP) of the human DHFR gene transcript was identified in the study population of 37 patients with childhood leukemia/lymphomas and 83 healthy Japanese children. There are two SNPs in the 3' untranslated region, 721TtoA and 829CtoT. Frequencies of DHFR 829 C/C, 829C/T, and 829T/T genotypes were 83.8%, 10.8%, and 5.4%, respectively in the cases and 74.7%, 19.3%, 6.0% in the controls, showing no significant difference in genotype frequencies between the cases and the controls. When determined by a real-time quantitative RT-PCR analysis, the highest expression of DHFR transcript was demonstrated in the samples with a DHFR 829T/T polymorphism ($p < 0.05$). However, in vitro cytotoxicity assay of lymphoblastoid cell lines after 72 hrs-incubation with MTX revealed no significant difference between 829 C/C and 829 T/T genotypes. In addition, correlation of the presence of SNP with the MTX-related adverse events in the clinical setting of each patient was not demonstrated in this limited analysis. These data suggest that the novel DHFR 829 polymorphism was associated with a positive role in gene expression and provide evidence of functional SNP in the 3' regulatory region of the gene.