

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790140
 研究課題名 (和文) リウマチ患者の生活の質向上を目指したオーダーメイド薬物療法の開発
 研究課題名 (英文) Establishment of tailor-made drug therapy that aims at improvement of quality of life in patients with rheumatoid arthritis
 研究代表者
 林 秀樹 (HAYASHI HIDEKI)
 静岡県立大学・薬学部・講師
 研究者番号：00419665

研究成果の概要 (和文)：

本研究では RA 治療の個別化薬物療法の確立を目的として、MTX の細胞内動態に影響を与える遺伝子多型と MTX 投与中の RA 患者における C-反応性タンパク質(CRP)濃度-時間曲線下面積(AUC)との関連について検討した。その結果、年齢、MTX 投与量および Reduced folate carrier(RFC) 80G>A と γ -Glutamyl hydrolase(GGH) -401C>T の 2 つの SNPs、さらに RFC 80AA と GGH -401CT/TT の交互作用効果が CRP-AUC に有意に影響を与えていることが明らかとなった。また血漿中ホモシステイン濃度が炎症マーカーと関連がみられることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We evaluated the association of possible factors with the cumulative value of C-reactive protein in Japanese patients with RA. Polymorphisms of the reduced folate carrier gene (RFC) G80A and of the gamma-glutamylhydrolase gene (GGH) C-401T were more closely associated ($\beta = 2.1194$, $P = 0.0017$) than other polymorphisms, with the anti-inflammatory response to MTX. Plasma homocysteine levels in patients with the MTHFR 677TT genotype were significantly higher than in those with the 677CC genotype ($p < 0.05$). In addition, plasma homocysteine levels were increased along with the elevation of general inflammatory markers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：臨床薬理学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：関節リウマチ、メトトレキサート、オーダーメイド医療、遺伝薬理学、TDM

1. 研究開始当初の背景

慢性の疾患を抱えている患者のクオリティ・オブ・ライフ (quality of life, QOL) の維持・向上は、薬学における重要な課題であり、今後ますますの高齢化が進んでいくことが予想されている我が国においては、社会的にも重要な問題である。これらの患者における QOL の低下は、患者本人のみならず、家族などの介護者にも身体的、精神的に大きな負担となっている。また、中長期的な医療費適正化の観点からも、特に慢性疾患の患者における QOL の向上は急務であると考えられる。慢性疾患の中でも、関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) や全身性エリテマトーデス、ベーチェット病などの自己免疫・リウマチ性疾患は、病因の多くの側面が明らかになってきている。しかし、これらの疾患の誘因や正確な病態生理は不明な点が多く、完治が困難であり生涯にわたり治療が必要となることが多く、慢性疾患発症の早期から適切な治療を施し、病気の進行を抑えることが重要である。

RA は、多発する関節炎と進行性関節破壊を主症状とする全身性炎症疾患である。全人口の 1% が RA に罹患すると言われており、35～50 歳の女性に多く発症する疾患で、少なくとも 10% の患者が最終的には重度の障害者になるとされている。RA の治療は、基礎的治療としての患者教育、薬物療法、手術療法、リハビリテーションの 4 本柱からなる。近年の RA における薬物治療は、罹病早期から切れ味のよい疾患修飾性抗リウマチ薬 (disease modifying anti rheumatoid drugs, DMARDs) を使って寛解を導入したのち、副作用の少ない薬剤に切り替えていく、ステップダウンブリッジ方式が一般化されている。DMARDs は、ほぼ全ての RA 患者において適応があり、疾患の進行を遅らせるとされている。中でも、葉酸代謝拮抗薬であるメトトレキサート (methotrexate, MTX) の有効性は、短期的にも長期的にも多くの無作為化比較対照試験およびメタ分析で確認されており、最もエビデンスの明確な DMARDs の一つである。MTX は古くから抗がん剤として大量療法で使われてきた。DMARDs としては低用量で週 1 回の間欠投与 (12 時間おきに 2～3 回に分割投与) で用いるが、副作用による死亡例も報告されている。また、MTX は薬効や副作用に個人差があり、いわゆる「匙加減の難しい薬」の一つである。

近年、患者間の個人差を踏まえて治療を行うオーダーメイド医療が注目されている。薬物療法においても、患者個人の遺伝的背景を考慮した患者個別化薬物治療が注目されつつあり、薬物代謝酵素や薬物トランスポーター、薬物標的分子をコードする遺伝子の多型が薬物治療のアウトカムに影響を与えることが報告されている。薬物治療を開始する前に、薬剤応答性に関する遺伝子解析を行い、薬効や副作用を事前に予測できれば、薬物治療を安全かつ効果的に行うことができる。さらに、効かない薬を漫然と投与することが避けられるため、医療経済的にも有用であると考えられる。薬物の感受性に関わる遺伝子多型の頻度は人種により異なるため、日本人患者の薬物治療を最適化するためには、日本人における遺伝子多型の頻度を明らかにし、日本人患者の薬物応答性と遺伝子多型の関連を解析していくことが重要となる。

2. 研究の目的

低用量の MTX は、非ステロイド系抗炎症薬等に反応しない RA 患者の治療のファーストラインとして、1 週間毎に間欠的に経口投与される。しかし、RA 治療において MTX は低用量で用いるにもかかわらず、骨髄抑制や間質性肺炎など重篤な副作用が問題となっている。また、低用量 MTX への反応性は RA 患者間において個人差が存在することが知られているが、MTX への反応性を決定する因子はほとんど解明されていない。

一般的に、薬剤投与量の個人差は、薬物動態学的または薬力学的パラメーターにおける個人差に依存することが多い。MTX の細胞への取り込みは、主に reduced folate carrier (RFC) に支配されており、MTX で治療されている白血病患者において RFC 遺伝子の SNP G80A が MTX の血漿中濃度と関連があることが報告されている。また、RFC 80AA の遺伝子型を持つ RA 患者では 80GG の患者と比較して、MTX の治療効果が高かったとの報告がある (odds ratio = 3.32)。細胞内に入った MTX は、FPGS によってグルタミン酸が連続的に 6 個まで付加され、MTX-PGs に変換される。MTX-PGs は dihydrofolate reductase (DHFR) の強力な阻害剤であり、結果的に thymidylate synthase の cofactor である還元型葉酸の欠乏を引き起こす。GGH は、lysosome に存在する peptidase で γ -linked polyglutamates の脱離を触媒し、長鎖 MTX-PGs を短鎖 MTX-PGs へ変換し、最終的には MTX へと変換することで ATP-binding cassette transporters による一次能動輸送により MTX を細胞外へ排出させる。GGH 遺伝子では複数の SNPs (C-401T、G-354T、C452T など) が同定されている。Cheng らは、GGH C452T (Thr127Ile) SNP は、GGH による長鎖 MTX-PGs に対する水解活性を有意に変化させ、高用量の MTX で治療中の患者の ALL 芽細胞に MTX-PGs を高濃度に蓄積させることを報告している。この SNP のアレル頻度は人種間で有意に異なり、本研究では日本人母集団での遺伝子型分布およびアレル頻度を解析した。GGH 遺伝子におけるプロモーター領域の SNPs は GGH の発現量を増加させることが報告されている。GGH C-401T は、MTX で治療されている RA 患者において MTX-PGs の細胞内蓄積量を減少させることが示されている。

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) は、葉酸代謝で重要な役割を持ち、5,10-methylene-tetrahydrofolate (methyl-donor in thymidine monophosphate synthesis) を 5-methyltetrahydrofolate (carbon donor required for methionine synthesis) へ変換する。さらに、MTHFR 遺伝子の 2 つの SNPs (C677T および A1298C) は MTX の効果や毒性に影響することが見出されている。

現在の MTX 投与量決定法は RA 患者の遺伝的背景は考慮されていないが、これらの遺伝子多型は相互に MTX への反応性に影響していることが考えられる。本研究では、日本人 RA 患者における低用量 MTX 療法での抗炎症効果に対するこれらの SNPs や年齢、性別等の様々な患者背景因子の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

倫理的配慮

本研究計画は、静岡厚生農業協同組合連合会 静岡厚生病院 (JA 静岡厚生病院) 倫理委員会および静岡県立大学倫理委員会研究倫理審査部において承認されている。研究に先立ち、対象患者には研究目的と方法を説明した後、書面にてインフォームド・コンセントを取得した。本研究を実施するに当たり、「ヘルシンキ宣言」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年文部科学、省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 17 年 6 月 29 日一部改正)」を遵守した。

患者

本研究では、JA 静岡厚生病院リウマチ科において外来受診した患者のうち、12ヶ月以上 MTX の治療を受けており、過去 12ヶ月間に少なくとも 2ヶ月に 1度の血液検査を受けている 87名の RA 患者を登録した。RA の診断は、米国リウマチ学会の基準に従った。MTX の投与量に影響することが知られている薬剤 (infiximab, etanercept, tacrolimus, cyclosporine など) を併用している患者は除外した。年齢、性別、体重、既往歴、合併症、併用薬、検査値について調査し、RFC、GGH、MTHFR の遺伝子解析のため静脈から 5mL 採血した。本研究では、RA における炎症状態のマーカーとして血清 C 反応性タンパク質 (C-reactive protein, CRP) を用いた。MTX で治療中の 12ヶ月間の炎症状態を定量するため CRP 値の曲線下面積 (C-reactive protein-area under the curve, CRP-AUC) を計算した。CRP は炎症に対して高感度で、性別、年齢や他のタンパク質による影響が少なく、CRP-AUC は、RA 治療のアウトカムと関連していることが報告されている。Creatinine clearance は Cockcroft-Gault 式に従って計算した。糖質コルチコイドの投与量については、5mg の prednisolone が、20mg の hydrocortisone、750µg の dexamethasone、750µg の betamethasone と等量として、prednisolone 換算量として算出した。

遺伝子型解析

白血球ゲノム DNA を QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて全血から抽出した。遺伝子多型は、PCR-RFLP およびアレル特異的 PCR (AS-PCR) 法を用いて解析した。PCR 産物と制限酵素切断産物を ethidium bromide を含む 2-4% agarose gel 電気泳動し、UV 照射で確認した。

データ解析

CRP-AUC と関連する因子を同定するため、年齢、性別、体重、creatinine clearance、MTX 投与量、糖質コルチコイド投与量、葉酸代謝に関わる 3つの酵素をコードする遺伝子群の 6箇所の SNPs に対して多変量解析を行った。CRP-AUC については分布が左に歪んでいたため、対数変換を行った。単変量解析で CRP-AUC に有意に関連していた因子を多変量モデルに組み込み、因子の効果を調整するため、多重線形回帰を用いた。SNPs の組み合わせの影響を評価するために、SNPs の主効果項および一次交互作用効果項を回帰モデルに組み込んだ。統計解析モデルにおいて、1つの因子が他の因子の影響から独立しているとき、主効果項を使用した。2つ以上の因子の影響を単純に合算できないときには、交互作用効果項を使用した。交互作用効果項は、1つの因子の影響が他の 1つ以上の因子に依存することを示す。p 値が両側検定で 0.05 未満のとき統計学的に有意とした。統計解析には、統計解析プログラム R-2.6.2 を用いた。

4. 研究成果

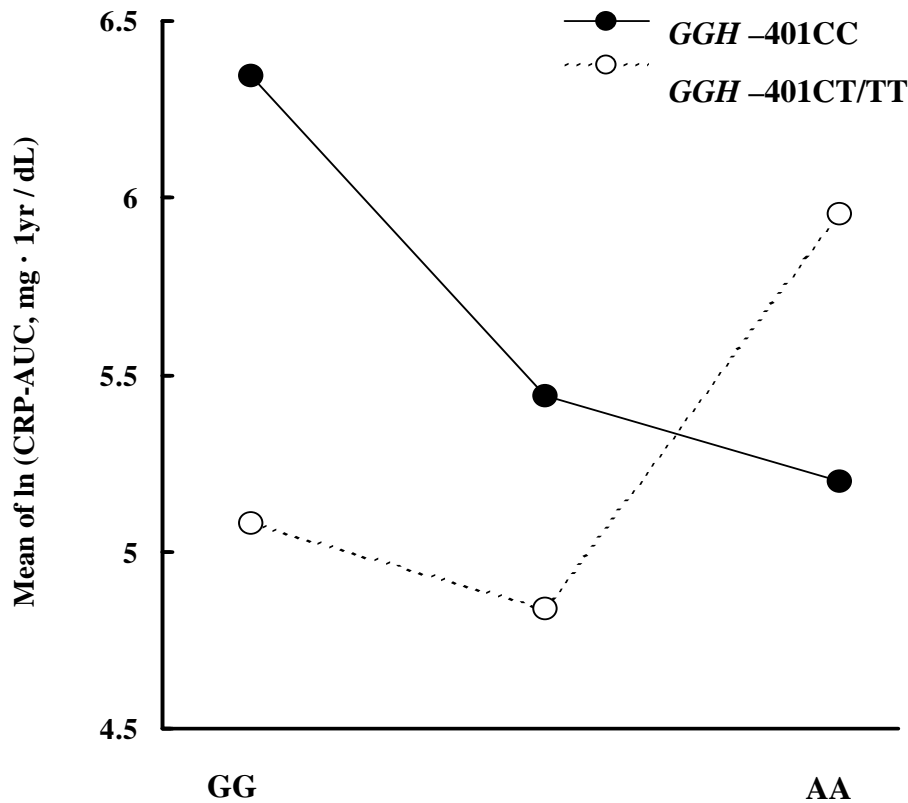
本研究では、MTX による抗炎症効果の指標の一つとして CRP-AUC における葉酸代謝関連タンパク遺伝子、RFC、GGH、MTHFR の SNPs を含む各生体内因子の影響を解析した。

結果から、年齢、MTX 投与量、RFC 80AA と GGH -401CT/TT 遺伝子型間の交互作用効果は、低用量 MTX を投与されている RA 患者において CRP-AUC に有意に影響を与えている因子であることが示された。これらの知見から、高齢患者では若年患者より CRP-AUC が高く、RFC 80AA 遺伝子型を持つ患者では、GGH -401CT/TT 遺伝子型を持つ患者で CC 型を持つ患者より CRP-AUC が高くなることが示唆された。

表. 多変量解析結果

Factors	Estimate of regression parameter	P
Sex (Male vs. Female)	0.3990	0.2858
Age	0.0216	0.0495*
Methotrexate dose	0.1431	0.0205*
Glucocorticoids dose	0.0603	0.3083
RFC 80GA	-1.2527	0.0906
RFC 80AA	-1.7036	0.0243*
GGH-401CT/TT	-1.6594	0.0129*
MTHFR 677CT	-0.4829	0.5036
MTHFR 677TT	0.1437	0.8656
RFC 80GA : GGH-401CT/TT	0.8156	0.2066
RFC 80AA : GGH-401CT/TT	2.1194	0.0017*
RFC 80GA : MTHFR 677CT	0.2300	0.7834
RFC 80AA : MTHFR 677CT	0.7300	0.3772
RFC 80GA : MTHFR 677TT	0.0561	0.9522
RFC 80AA : MTHFR 677TT	0.5917	0.6083
GGH-401CT/TT : MTHFR 677CT	0.6842	0.2473
GGH-401CT/TT : MTHFR 677TT	0.3992	0.5889

The colon (:) denotes an interaction effect term. *Significance of ($P < 0.05$).



RFC 80 genotype

図. Interaction plot showing the effects of *GGH* C-401T genotype and *RFC* G80A genotype on the mean of the natural logarithm of CRP-AUC in patients with RA receiving low-dose, weekly pulse of MTX. The closed symbol denotes *GGH*-401CT/TT genotype, whereas the open symbol denotes *GGH*-401CC genotype.

本研究では、日本人 RA 患者における血漿中ホモシステイン濃度と MTHFR 677C>T SNP との関連、および血漿中ホモシステイン濃度と炎症の程度との関連も調査した。

MTHFR 677C>T SNP の各遺伝子型における血漿中ホモシステイン濃度は、677CC 遺伝子型で $21.1 \pm 7.3 \mu\text{M}$ 、677CT 遺伝子型で $21.0 \pm 8.5 \mu\text{M}$ 、677TT 遺伝子型で $26.3 \pm 9.6 \mu\text{M}$ であった。統計学的有意差は見られなかったものの、ホモ変異型である MTHFR 677TT 遺伝子型では、677CC 遺伝子型や 677CT 遺伝子型と比べて、血漿中ホモシステイン濃度が高値である傾向が見られた ($p = 0.084$)。

各種炎症マーカー (CRP 濃度、ESR および MMP-3 濃度) と血漿中ホモシステイン濃度との関連を、下記グラフで示した。いずれのグラフでも、各種炎症マーカーが高値であるほど、血漿中ホモシステイン濃度も上昇していた。このことから、血漿中ホモシステイン濃度は、RA 患者における炎症の重症度を反映する可能性が考えられた。

総括

RA は医療が発展した現代社会においても今なお明確な原因が不明であり、完治困難な自己免疫疾患である。進行性関節破壊が主要な病態であるため、高齢化が進む

現在の日本において、RA による身体障害を有する高齢患者が今後増加していくことが懸念される。RA の治療の中心は薬物療法であり、免疫抑制作用を有する DMARDs、中でも抗がん剤としても使用される MTX が有効な薬剤として広く用いられている。

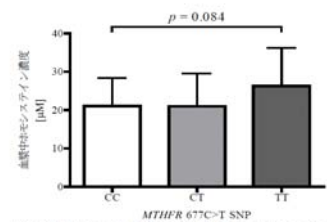


図. MTHFR 677C>T SNP と血漿中ホモシステイン濃度
血漿中ホモシステイン濃度は平均値 + SD で示した。

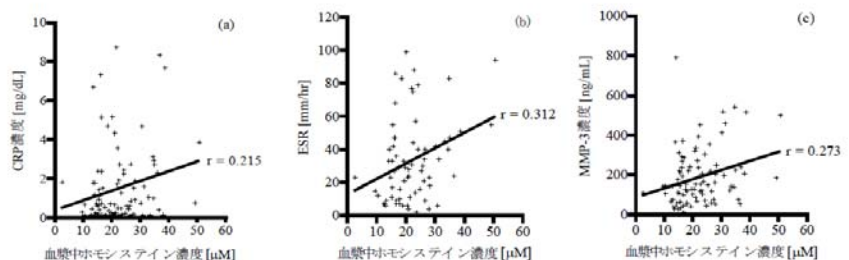


図. 各種炎症マーカーと血漿中ホモシステイン濃度 (μM)

- (a) CRP 濃度 (mg/dL) と血漿中ホモシステイン濃度 ($n = 92$) $r = 0.215, p = 0.039$
- (b) ESR (mm/hr) と血漿中ホモシステイン濃度 ($n = 70$) $r = 0.312, p = 0.009$
- (c) MMP-3 濃度 (ng/mL) と血漿中ホモシステイン濃度 ($n = 89$) $r = 0.273, p = 0.01$

しかし、MTX の効果には個人差が大きく、投与量設定の難しい薬剤の一つである。MTX は複雑な細胞内動態をたどり、さらにその動態に関わるタンパク質には多くの遺伝子多型の存在が知られていることから、MTX を用いた薬物治療ではそれらの遺伝子多型と MTX の効果・毒性との関連の重要性が示唆されている。MTX による薬物治療開始時に、RA 患者において MTX 治療に影響を与える遺伝子多型情報を解析し利用することができれば、個々の患者に対してより効果的かつより安全な薬物治療を行うことができる。このような個別化薬物治療は、患者によりよい治療を施し、生活の質(Quality of life, QOL)を改善できるだけでなく、医療経済学的にも多大なメリットがあると考えられることから、社会的にも期待されている。また RA 治療においては、代表的な病態である炎症や、肺障害など RA に伴う有害事象のモニタリングが重要である。これまでも様々なマーカーが RA における炎症のモニタリングに使用されているが、他の炎症性疾患によっても上昇するようなマーカーが多く、RA の本質的要因によって上昇するようなバイオマーカーが求められている。また RA による炎症に特異的なバイオマーカーが発見されれば、RA の病因解明につながることも考えられる。

本研究では、抗 RA 薬としての MTX に着目し、低用量 MTX 治療における個別化薬物療法を目的とした臨床研究、並びに炎症を反映するバイオマーカーとしてのホモシステインに関する研究を行った。まず、葉酸の取り込みおよび代謝に関わる遺伝子多型のうち、MTX の細胞内での動態に影響する因子として RFC 80G>A、GGH -401C>T、-354G>T、452C>T、および葉酸サイクルにおいて重要な MTHFR 677C>T、1298A>C の計 6 つの SNPs と MTX 投与中の RA 患者における CRP-AUC との関連、また MTX の PD に直接影響する因子として DHFR-T 829C>T SNP と MTX 投与量との関連について検討した。その結果、RFC 80G>A および GGH -401C>T の 2 つの SNPs が RA 患者の CRP-AUC に有意に影響を与えていることが明らかとなった。RFC は MTX の細胞内への取り込みに、GGH は MTX の活性体である MTX-PGs から MTX への脱ポリグルタメート化を触媒する酵素である。また、これらの SNPs の交互作用を検討した結果、RFC 80AA 遺伝子型と GGH-401CT/TT 遺伝子型の交互作用効果が低用量 MTX 投与を受けている RA 患者において CRP-AUC に有意に影響を与えていることが示唆された。つまり、RFC 80AA 遺伝子型および GGH-401T アレルを持つ患者では、GGH -401T アレルを持たない患者と比べ、MTX に対する反応性が低下していることが明らかとなった。つぎに、RA 患者における血漿中ホモシステイン濃度とその代謝に影響を与えるとされている MTHFR 677C>T SNP との関連、また血漿中ホモシステイン濃度と現在 RA 治療モニタリングに用いられている 3 種の炎症マーカー (CRP 濃度、ESR および MMP-3 濃度)との関連について検討した。その結果、RA 患者において MTHFR 677C>T SNP が血漿中ホモシステイン濃度に影響を与えていること、血漿中ホモシステイン濃度が RA 患者における 3 種の炎症マーカーの上昇との関連がみられることが明らかとなった。MTHFR はホモシステインがメチオニンに代謝される際にメチル基供与体となる 5-CH₃ THF の生成に関与しており、MTHFR の熱不安定化の原因と考えられている 677C>T SNP がその活性低下に関わると考えられている。またホモシステインはメタボリックシンドロームとの関連だけでなく、免疫-炎症賦活化との関連が近年示唆されている物質である。今回の研究では、MTHFR 677C>T SNP と炎症レベルとの間に直接的な関連は認められなかったものの、MTHFR677C>T SNP はホモシステインを介して間接的に炎症に影響を与えていることも考えられる。今後 RA の病態に対するホモシステインの影響が解明できれば、長年不明とされてきた RA の病因解明につながる可能性も考えられる。RA 治療における血漿中ホモシステイン濃度測定の臨床応用に関して、さらなる研究が必要であると考えられる。

本研究では、代表的な DMARDs である MTX の薬効に影響を与えている可能性のある遺伝子多型とその組み合わせについて明らかにした。また、RA におけるバイオマーカーとしてホモシステインの臨床応用の可能性を示した。本研究により得られた結果は、今後の RA における個別化薬物療法を目指した研究において、重要な情報を与えるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Hayashi H, Horino M, Morishita M, Tazoe Y, Tsuboi S, Matsuyama T, Kosuge K, Yamada H, Tsuji D, Inoue K, Itoh K
Dihydrofolate reductase gene intronic 19-bp deletion polymorphisms in a Japanese population
Drug Metab. Pharmacokinet., in press (2010)

Hayashi H, Fujimaki C, Daimon T, Tsuboi S, Matsuyama T, Itoh K
Genetic polymorphisms in folate pathway enzymes as a possible marker for predicting the outcome of methotrexate therapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis.
J. Clin. Pharm. Ther., **34**, 355-361 (2009)

Fujimaki C, Hayashi H, Tsuboi S, Matsuyama T, Kosuge K, Yamada H, Inoue K, Itoh K
Plasma total homocysteine level and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T genetic polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis
Biomarkers, **14** 49-54 (2009)

[学会発表] (計 6 件)

林 秀樹, 藤巻千裕, 坪井声示, 大門貴志, 松山耐至, 井上和幸, 伊藤邦彦
関節リウマチ患者におけるメトトレキサートの薬効に影響する遺伝的因子
第 18 回日本医療薬学会年会 2008 年 札幌

林 秀樹, 藤巻千裕, 坪井声示, 松山耐至, 井上和幸, 伊藤邦彦
関節リウマチ患者における血漿中メトトレキサート濃度測定
第 54 回日本薬学会東海支部総会・大会 2008 名古屋

林 秀樹, 藤巻千裕, 坪井声示, 松山耐至, 原田直人, 伊藤邦彦
ホモシステインと疾患活動性 ～関節リウマチにおける検討～ ハイライト集収載

日本薬学会 第 128 年会 2008 横浜

藤巻千裕, 林 秀樹, 松山耐至, 坪井声示, 井上和幸, 伊藤邦彦
関節リウマチ患者におけるテーラーメイド薬物療法の実現を目指した遺伝子多型解析研究
第 23 回静岡県病院薬剤師会学術大会 2009 静岡

林 秀樹, 藤巻千裕, 松山耐至, 坪井声示, 井上和幸, 伊藤邦彦
関節リウマチ患者における赤血球中メトトレキサート活性体濃度測定
第 23 回静岡県病院薬剤師会学術大会 2009 静岡

堀野雅人, 林 秀樹, 藤巻千裕, 森下茉莉子, 小菅和仁, 坪井声示, 松山耐至, 山田 浩, 井上和幸, 辻 大樹, 伊藤邦彦
関節リウマチにおける methotrexate 反応性予測因子としての dihydrofolate reductase 遺伝子多型
日本薬学会 第 130 年会 2010 岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀樹 (HAYASHI HIDEKI)

研究者番号: 00419665