

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 13 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460192

研究課題名(和文) 遺伝子多型と薬物体内動態を指標とした関節リウマチにおける戦略的薬物療法の構築

研究課題名(英文) Development of the strategic pharmacotherapy using the genetic polymorphisms and the pharmacokinetics in the rheumatoid arthritis

研究代表者

林 秀樹 (Hayashi, Hideki)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00419665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)では、メトトレキサート(MTX)がアンカードラッグとして広く用いられているが、効果や副作用の個人差が大きく、患者毎に適切な投与量を設定するための方法論確立が期待されている。本研究では、日本人RA患者を対象に、MTXの動態関連遺伝子の発現量と治療効果との関係について評価した。末梢血単核球におけるReduced folate carrier1 mRNA発現量と疾患活動性との間に有意な相関関係が認められ、RFC1遺伝子発現量を解析することでMTXの薬効予測ができる可能性が示唆された。また、生物学的製剤の血漿中濃度やMTXや活性体の赤血球中濃度を用いたモニタリングも試みた。

研究成果の概要(英文)：Responsiveness to methotrexate (MTX), the "anchor drug" for treating rheumatoid arthritis (RA), varies among individual patients. In this study we investigated the effects of folate transporter gene expression levels on disease activity in the Japanese patients with RA who were undergoing MTX therapy. The mRNA expression levels of reduced folate carrier 1 (RFC1) in PBMCs from these patients were determined. There were large individual differences in RFC1 mRNA expression levels in both RA patients. RFC1 mRNA expression levels and RA disease activity scores were significantly negatively correlated, as disease activity scores were lower for patients with higher RFC1 mRNA expression levels. Thus, the clinical efficacy of MTX for Japanese RA patients was associated with the expression level of a folate transporter gene. We also attempted the therapeutic drug monitoring using measurement of the biological preparation in plasma and methotrexate and its active metabolite in red blood cells.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：関節リウマチ メトトレキサート 個別化医療 遺伝子解析 葉酸トランスポーター TDM

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)は、多発する関節炎と進行性関節破壊を主症状とし、関節外症状として肺、腎臓、皮下組織などにも病巣が広がる全身性炎症疾患である。RAの薬物療法では、非ステロイド系抗炎症薬(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)や副腎皮質ホルモン、疾患修飾性抗リウマチ薬(disease modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs)が広く使用されている。代表的なDMARDsとして葉酸代謝拮抗薬であるメトトレキサート(methotrexate, MTX)がある。MTXのRAに対する有用性はこれまでも数多く確認されている。MTXは痛みや炎症を抑えるだけでなく、骨破壊も抑制し、長期的にRAの自然経過を改善することが臨床試験で示されており、価格や費用対効果などの面で現在でもRAの最も重要な薬物の一つであるとされている。しかし、MTXの有効投与量の個人により大きく異なることが報告されており、一方で間質性肺炎や骨髄抑制などの重篤な副作用を起こす可能性もあることから投与量設定の難しい薬剤の一つである。また、生物学的製剤も積極的に導入され、関節リウマチの治療に画期的な進歩をもたらし、寛解も夢ではなくなってきたが、薬価が高く患者に経済的負担を与えることが大きな課題となっている。

2. 研究の目的

近年、患者の遺伝的背景を踏まえた上で治療を行う「オーダーメイド医療」が注目されている。薬物代謝酵素やトランスポーターをコードする遺伝子に存在する多型や、血中薬物濃度の変化によって、薬物の効果や副作用発現が影響を受けることが知られている。薬物を投与する前に薬剤応答性に関与する遺伝子の多型や発現量解析を行い、投与中も血中薬物濃度がモニターできれば、個人ごとの副作用への対処を事前に準備でき、薬物治療を安全かつ効果的に行うことができると期待されている。

RA治療の第一選択薬であるMTXは化学構造が葉酸ときわめて類似しているため、その小腸での吸収や組織分布に葉酸輸送系が関与することが古くから知られていた。MTXを標的細胞内に取り込む葉酸トランスポーターの代表例として、血液産生細胞に豊富に発現しているreduced folate carrier 1(RFC1)に依存していると考えられている。1994年にクローニングされた葉酸トランスポーター遺伝子の遺伝子発現系による機能解析から、MTXはRFC1に認識され、プロトン依存的に輸送されていることが実証された。しかし、RFC1の発現はリウマチ部位に特異的ではなく、他のトランスポーターも

同時に関与しているのではないかと考えられている。一方、2006年にヘムトランスポーターとして同定されたPCFTがプロトン依存的葉酸トランスポーターとしての性質を有し、葉酸と同様にMTXも効率よく輸送することが見出されている。RFC1と同様MTXをプロトン依存的に輸送することが示されているが、PCFTは、最適pHや基質特異性などにおいてRFC1とは明らかに異なる特性を持っている。PCFTの発現は消化管上部に特異的であり、他では肝臓に発現が見られる程度であるが、リウマチ部位におけるMTX輸送に関わる機能性分子は極めて重要と見られ、現在更なるメカニズム解明のための研究が進められている。

薬物の吸収に関する生物薬剤学的研究の進歩とともに、薬物輸送におけるトランスポーターを介した吸収の重要性の認識も高まっている。従って、トランスポーターの機能及び輸送メカニズムを解明することは医薬品の開発、新しい投与経路の選択及び薬物吸収障害の改善などに対して臨床的に重大な意義を持っていると考えられる。近年では特にRFC1の遺伝子多型とMTXの薬効の関連が多く研究され、我々もこれまでにRFC1 80G>A SNPがRAにおいて抗炎症状態をモニタリングするための有用な因子であることを報告した。

本研究では、PBMCと滑膜細胞における葉酸トランスポーター遺伝子発現レベルを解析し、MTXの有効性との関連について調査した。MTXのターゲットはリンパ球及び滑膜細胞であり、それらの活性をMTXにより抑えることで疾患活動を低下させる。ターゲット細胞における葉酸トランスポーター遺伝子発現レベルと薬効の関連を見出すことでMTXの効果を予測することができる。また、PBMC中と滑膜細胞中の葉酸トランスポーター遺伝子発現レベルに関連があればPBMCにおける葉酸トランスポーター遺伝子発現レベル解析により簡易に薬効の予測をすることが可能となる。

最近の報告では、RA患者においてMTXの投与量よりも赤血球のMTX活性体であるポリグルタミル体(MTX-PGs)濃度と疾患活動性の間に関連があることが示唆されており、赤血球中のMTX-PGs濃度は疾患活動性MTX非応答患者よりもMTX応答患者で有意に高いと報告されている。本研究では、日本人RA患者において、1年間以上継続的に赤血球中MTX(MTX-PG1)及びMTX-PGs(MTX-PG2~7)濃度を分離定量した。

また、MTXで効果が不十分の場合、腫瘍壊死因子(TNF)やインターロイキン-6(IL-6)などの炎症性サイトカインを標的とする生物学的製剤が用いられる。抗TNFヒト型抗体アダリムマブや抗IL-6受容体(IL-6R)抗体トシリズマブ(TCZ)などの抗体医薬品は、MTX抵抗性の患者に高い治療効果を発揮している。抗体医薬品などの生物学的製剤は概

して、薬効の持続性が高く、副作用が少ないといった特徴が挙げられる。しかし、そのPKとPDは低分子医薬品に比べて非常に複雑である。血中移行前の異化、標的抗原への結合、及び輸送に関わる neonatal Fc receptor (FcRn)の影響により、ほとんどの抗体医薬品は濃度依存的で非線形の薬物動態を示す。現在、抗体医薬品におけるPKとPDの関連を示した報告は少なく、患者毎の最適な用法及び用量の設定が困難である。

本研究では、ヒト化抗ヒトIL-6Rモノクローナル抗体であるTCZの血中薬物濃度モニタリングも試みた。

3. 研究の方法

(1) 関節リウマチ患者

JA 静岡厚生病院リウマチ科において治療中である日本人RA患者のうち、文書による同意を得られ、MTX単剤治療にて治療効果が安定している患者56名を対象とし、PBMC中の遺伝子発現量解析を行った。また、1年以上継続的にMTXを服用しており臨床検査値の変化を追跡調査できる187名の患者を選択し、赤血球中薬物濃度モニタリングの対象とした。

RAの診断は、米国リウマチ学会の基準に従った。MTXの薬効に影響を与えることが知られている免疫抑制剤(タクロリムス、レフルノミド、ミゾリピン)を併用している患者は除外した。

さらに、TCZモニタリング対象患者として、新規にTCZが投与される日本人RA患者21名から文書による同意を取得し、21名のうち、TCZ治療開始時に非寛解である16名を測定対象とした。

(2) 健常人

文書による同意が得られた健常人ボランティア被験者のうち、日本人15名を本研究の対象とし、関節リウマチ患者群のPBMC中遺伝子発現量に対するコントロール群とした。

(3) 同意取得および倫理的配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言および文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、静岡県立大学倫理委員会研究倫理審査部会およびJA静岡厚生病院倫理委員会の審査・承認のもと実施した。すべての被験者に研究の内容を説明し、文書により同意取得を行った。得られた個人情報、連結可能匿名化を行い管理者が厳重に保管した。

(4) 遺伝子多型解析

- 80 で保存していた血液からゲノムを抽出し、*RFC1* 80G>A 遺伝子型解析はPCR-RFLP法で行った。

(5) リアルタイムPCR

PCFT 及び *RFC1* の mRNA 発現量は、TaqMan® gene expression assay を用いたリアルタイムPCR法によって解析した。内在性コントロールには *rS18RNA* を使用した。PBMCにおいて最も遺伝子発現量が少なかった検体を1とし、CT法にて比較した。

(7) 赤血球中MTX-PG濃度測定

赤血球中MTX-PG濃度測定は高速液体クロマトグラフ-質量分析法にて行った。

(8) 血漿中TCZ濃度測定

ファージディスプレイ法を用いて、TCZ抗イディオタイプrFabを作成し、ELISAによる血漿中TCZ濃度迅速測定法を構築した。

(9) 治療効果指標

本研究では、RAの疾患活動性の指標としてDAS28を用いた。患者情報として年齢、体重、性別、MTX処方量、治療経過及び各検査値などをJA静岡厚生病院の診療録より取得した。

(10) 統計

遺伝子発現量と疾患活動性との相関にはSpearmanの順位相関係数、滑膜中とPBMC中の遺伝子発現量の相関にはPearsonの順位相関係数を用いた。遺伝子型頻度について、Hardy-Weinberg平衡式による予測値と実測値の比較には²検定を用いた。各遺伝子多型の遺伝子発現量の比較にはKruskal-Wallis検定を用いた。赤血球中MTX-PGs濃度と検査値及び疾患活動性との相関にはSpearmanの相関係数を用いた。多変量解析は、多重ロジスティック回帰分析を行った。有意水準は5%とし、すべての統計解析はPASW statistics 18を使用して行った。

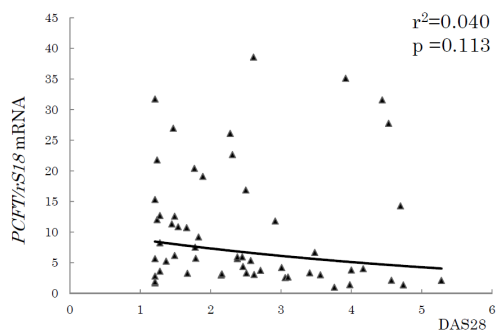
4. 研究成果

結果

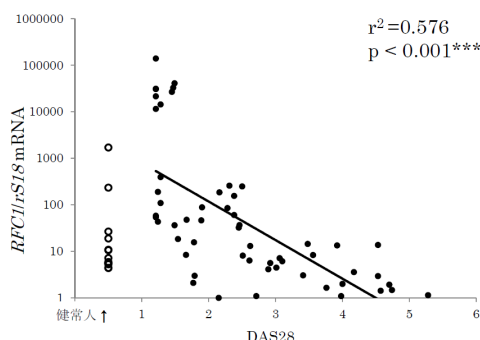
(1) 疾患活動性と葉酸トランスポーター発現量の関連

PBMC中の*PCFT*及び*RFC1*mRNA発現量とDAS28による疾患活動性の相関を図1に示した。*PCFT*mRNA発現量と疾患活動性には相関がなかった($r^2=0.040$, $p=0.113$)。*RFC1*mRNA発現量は*PCFT*mRNA発現量に比べ患者間のばらつきが大きく、有意に疾患活動性と相関していた($r^2=0.576$, $p<0.001$)。*RFC1*mRNA発現量が多いと疾患活動性が有意に低下していた。有意に相関があった*RFC1*mRNA発現量にはコントロールとして健常人の*RFC1*mRNA

のデータを加えた。健常人間でも mRNA 発現量に大きなばらつきがあった。



(a) RA 患者における PBMC 中の PCFT mRNA 発現量と疾患活動性との相関



(b) RA 患者と健常人における PBMC 中の RFC1 mRNA 発現量と疾患活動性との相関

図 1. PCFT 及び RFC1 mRNA 発現量と疾患活動性との関連 (Spearman の順位相関係数)

(2) 赤血球中 MTX-PGs 濃度と薬効の関係

赤血球中 MTX-PGs 濃度を継時的に測定した MTX 単剤治療群 96 名の全 676 ポイントにおける赤血球中 MTX-PGs 濃度と疾患活動性との関連を解析した。赤血球中 MTX 及び MTX-PGs 濃度は投与量補正のため測定ポイント時の投与量で割った値で評価した。MTX、MTX-PG₄、MTX-PG₄₋₇ 濃度は増加すると疾患活動性が低減する傾向にあった。また、各濃度が寛解値である DAS28=2.3 に達する濃度を ROC 曲線にて解析し、結果を表 1 に示した。

表 1. 寛解値に対する MTX-PGs 濃度の ROC 解析

	カットオフ値	AUC(95%CI)	p 値
MTX conc./dose (nmol/L/mg)	6.990	0.545 (0.500 - 0.590)	0.011
MTX-PG ₄ conc./dose (nmol/L/mg)	0.121	0.558 (0.514 - 0.602)	0.017
MTX-PG ₄₋₇ conc./dose (nmol/L/mg)	0.938	0.558 (0.513 - 0.602)	0.012

(3) 血漿中生物学的製剤濃度モニタリング

TCZ 治療前から治療開始 6 ヶ月後の DAS28 の変化量 (DAS28(0-6)) と治療開始

6 ヶ月後の TCZ 濃度において、回帰分析を行った。結果、 DAS28(0-6) と 6 ヶ月後の TCZ 濃度との間に負の相関傾向が認められた ($r^2=0.3190$, $p=0.0226$) (図 2)。

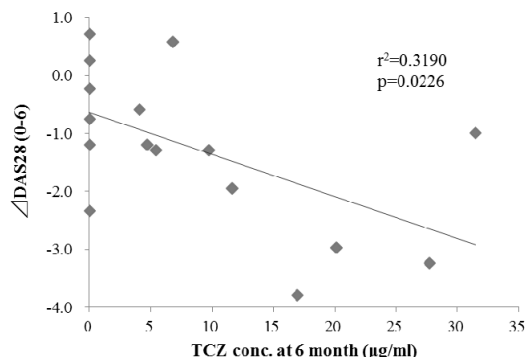


図 2. TCZ 投与 6 ヶ月後の血漿中濃度と疾患活動性の変化

考察

本研究では、MTX 治療を受ける RA 患者を対象に、葉酸トランスポーター遺伝子発現レベルと疾患活動性における MTX の薬効との関連を解析した。RFC1 は細胞外液から葉酸と MTX を取り込むための主要トランスポーターである。本研究において、RFC1 遺伝子発現レベルと DAS28 に基づく疾患活動性との間に有意な相関関係を見出した。RA 患者間の PBMC において RFC1 の遺伝子発現レベルに大きな個人差があった。RA 患者の免疫細胞において RFC1 発現が増加することにより MTX の取り込みが増加し、それにより RA の疾患活動性の低下が引き起こされるのではないかと考える。また、MTX 投与量と DAS28 との間にも相関はなく、疾患活動性と RFC1 遺伝子発現レベルの関連の重要性が示された。また、RFC1 の遺伝子発現レベルに大きな個人差が存在することから、MTX の有効性には個人差があることに関連することも考えられた。更に、健常人の PBMC における RFC1 の遺伝子発現レベルの量には個人差があった。その個人差により MTX への応答性を予測することができるとは考えられないと考える。

今後、RA における MTX 治療の有効性向上のために、遺伝子発現レベルに影響を与える要因を解明する更なる解析が必要である。

本研究では、赤血球中 MTX-PGs 濃度のモニタリングを行った。赤血球中 MTX-PGs 濃度を測定した全ポイントにおける DAS28 と、赤血球中 MTX-PGs 濃度の関連を検討したところ、MTX、MTX-PG₄、MTX-PG₄₋₇ 濃度は増加すると疾患活動性が低減する傾向にあった。また、各濃度が寛解値に達する濃度を解析したところ、MTX 投与量 1 mg あたりの MTX 濃度が 6.99 nM、MTX-PG₄ 濃度が 0.12 nM、MTX-PG₄₋₇ 濃度が 0.94 nM となった。

さらに、本研究では TCZ 濃度迅速測定法を構築し、血漿中 TCZ 濃度と臨床効果との関係を明らかにした。TCZ 治療開始 6 ヶ月後の TCZ 濃度と DAS28(0-6)との間に負の相関傾向が認められた ($r^2=0.3190$, $p=0.0226$)。このことから TCZ 濃度が低値の場合、IL-6R の一部が阻害されず、治療効果を得られにくいことが考えられた。

今後は、RA における薬物治療において、RFC1 遺伝子の多型のみならず、遺伝子発現量を解析し、MTX の細胞内蓄積量を赤血球中濃度を用いて解析することで、適切な投与量設定の有益な情報となるかもしれない。さらに、生物学的製剤においても治療薬モニタリングを実施することで、安全かつ効果的な薬物療法の実施が可能となることが期待できる。これらの RA における戦略的な薬物療法は中長期的には、治療に関する費用の削減など医療経済学的にも有用と考えられる。

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 1 件)

Tazoe Y, Hayashi H, Tsuboi S, Shioura T, Matsuyama T, Yamada H, Hirai K, Tsuji D, Inoue K, Sugiyama T, Itoh K. Reduced folate carrier 1 gene expression levels are correlated with methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, (peer reviewed) 30(3): 227-230. 2015
DOI: 10.1016/j.dmpk.2015.02.001.
(YT and HH contributed equally to this work and are co-first authors.)

[学会発表](計 8 件)

林 秀樹、田添 唯、坪井声示、松山耐至、杉山 正、伊藤邦彦、薬物動態インフォメーションを活用した臨床薬理研究の動向と新展開 関節リウマチ治療薬メトトレキサートの薬効に影響する葉酸トランスポーターの遺伝子多型、第 30 回日本薬物動態学会シンポジウム(東京)、2015 年 11 月 12 日

林 秀樹、伊藤邦彦、杉山 正、PK/PGx を用いたハイリスク薬による有害事象への介入 薬学教育における薬剤師主導型臨床薬理研究の実践、第 1 回日本医薬品安全性学会シンポジウム(福山)、2015 年 7 月 4 日

大鹿雄美、山宮 翔、田添 唯、林 秀樹、松山耐至、坪井声示、轟木堅一郎、井上和

幸、辻 大樹、山田 浩、豊岡利正、伊藤邦彦、抗体医薬の TDM 関節リウマチ患者における検討、日本薬学会第 134 年会(熊本)、2014 年 3 月 29 日

宮内千恵美、轟木堅一郎、田添 唯、林 秀樹、関 俊哲、井之上浩一、伊藤邦彦、豊岡利正、赤血球中メトトレキサートポリグルタメートの LC-MS/MS 分析法の開発、日本薬学会第 134 年会(熊本)、2014 年 3 月 29 日

田添 唯、林 秀樹、坪井声示、松山耐至、大鹿雄美、小菅和仁、山田 浩、辻 大樹、井上和幸、伊藤邦彦、関節リウマチにおけるメトトレキサートの薬効と葉酸トランスポーター遺伝子発現量との関連、第 34 回日本臨床薬理学会学術総会(東京)、2013 年 12 月 4 日

豊田耕司、轟木堅一郎、林 秀樹、坪井声示、松山耐至、関 俊哲、井之上浩一、伊藤邦彦、豊岡利正、トリプシン消化 LC/MS/MS による血漿中抗体医薬品の分析、新アミノ酸分析研究会第 3 回学術講演会(東京)、2013 年 12 月 2 日

Tazoe Y, Hayashi H, Tsuboi S, Matsuyama T, Ohshika Y, Kosuge K, Yamada H, Tsuji D, Inoue K, Itoh K. Effect of folate transporter gene expression level on methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis, Asian Federation for Pharmaceutical Sciences Conference 2013 (Jeju, Korea), 2013 年 11 月 22 日

大鹿雄美、林 秀樹、轟木堅一郎、坪井声示、松山耐至、辻 大樹、井上和幸、豊岡利正、山田 浩、伊藤邦彦、抗イディオタイプリコンビナント Fab を用いた生物学的製剤の血中濃度測定法の構築、第 59 回日本薬学会東海支部総会(名古屋)、2013 年 7 月 6 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀樹 (HAYASHI, Hideki)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：00419665
(2014 年 3 月まで静岡県立大学・薬学部)

(2) 研究分担者

轟木 堅一郎 (TODOROKI, Kenichiro)
静岡県立大学・薬学部・准教授
研究者番号：70341451

山田 浩 (YAMADA, Hiroshi)
静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号： 40265252

伊藤 邦彦 (ITOH, Kunihiko)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号： 90221770

(3)研究者協力者

田添 唯 (TAZOE, Yui)
静岡県立大学大学院・大学院生

坪井 声示 (TSUBOI, Seiji)
JA 静岡厚生病院・副院長

松山 耐至 (MATSUYAMA, Taiji)
JA 静岡厚生病院・薬局長