

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16150

研究課題名（和文）異なる研究レベルの融合による、関節リウマチの個別化医療の開発

研究課題名（英文）Development of personalized medicine for rheumatoid arthritis by integrating different research levels

研究代表者

大西 輝（Onishi, Akira）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：60634269

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ(RA)において、第一選択薬であるメトトレキサート(MTX)の効果・副作用は個人差が大きい。薬剤代謝関連遺伝子一塩基多型(SNP)を網羅的に解析し、臨床因子を含めた、MTXの効果・副作用の予測モデルを構築した。モデルの外的妥当性を高めるため、ポリグルタミル化されたMTX (MTX-PG)濃度を用い、より生物学的なSNPの抽出を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、コンパニオン診断試薬の作成において、基礎と臨床のデータを多角的に利用し、異なる研究レベルのデザインを融合させることを特徴としている。本研究によってより予測能の高い、外的妥当性の高いMTXの有効性、予測モデルを作成することができる。これにより、RAの治療の迅速な適正化・個別化が可能となり、疾患予後を改善させると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In rheumatoid arthritis (RA), the efficacy and side effects of methotrexate (MTX), the first-line drug, vary widely among individuals. We comprehensively analyzed drug metabolism-related gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) and constructed a prediction model of MTX efficacy and side effects, including clinical factors. To enhance the external validity of the model, polyglutamylated MTX (MTX-PG) concentrations were used to extract more biological SNPs.

研究分野：膠原病リウマチ、疫学

キーワード：関節リウマチ 薬剤代謝関連遺伝子一塩基多型 メトトレキサート 予測モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)において、メトトレキサート(MTX)はRA患者の7割以上に使用され、第一選択薬であるが、MTXの効果・副作用は個人差が大きく、投与前に有効例・副作用発現症例を予測するのは難しい。一方で、RAは発症早期より適切な治療を行う必要があり、有効性が得られ副作用を抑えられるMTXの最適量を個々に応じて速やかに設定することは、医学的にも社会経済的にも喫緊の課題である。RAの治療において、MTXの有効性・副作用と関連すると報告されている遺伝子-塩基多型(SNP)、バイオマーカーはいくつか存在する。しかし、これらの関連は、研究間で結果が異なっていたり、関連の程度が非常に小さかったりするため、個々のSNP、単一のバイオマーカーだけでは、MTXの有効性・副作用の予測は困難であり、臨床でのインパクトは小さい。また、統計学的手法のみを用いて選定された、バイオマーカーによる診断・予測研究は、外的妥当性が低いことが指摘されている。つまり、限られた対象では優れた予測能と判断される結果となっても、より大きな集団ではその結果が再現されないことが多い。実臨床での使用においてはより高い予測能が期待されるが、遺伝子情報から有効性・副作用の発現までに遺伝子発現、タンパク機能、細胞機能などの複数のレベルでの現象が関わっている点を考慮し、より生物学的に関連の高いSNPの抽出が必要となる。

2. 研究の目的

モデルの外的妥当性・予測能の向上のため、SNPとMTX-PG濃度との関連を検索し、より生物学的なSNPを抽出し、臨床項目と合わせて、MTXの有効例・副作用発現症例を予測するモデルを作成する。

3. 研究の方法

(1) MTX服用中のRA患者の情報と検体の収集

安定したMTX-PG濃度を測定するため、MTX-PG測定時に1ヶ月以上一定量のMTXを服用しているRA患者を選択し、SNPとMTX-PG濃度を測定した。

(2) 赤血球中MTX-PGn濃度の測定

末梢血から採血後分離した(あるいは -80°C で保存した)RA患者の赤血球画分を除タンパク処理後、固相抽出処理を行った。前処理したサンプルを、高速液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いて定量した。MTXは細胞内でFPGSという酵素により2-5個のグルタミル基を結合しMTX-PGnとなり安定し効果を発揮するので、各種MTX-PGnの赤血球中濃度を内部標準法により検量線を作成し算出した。

(3) 遺伝子型の決定

DMET(Drug Metabolizing Enzymes and Transporters)アレイによる薬物代謝酵素やトランスポーターに関連する225遺伝子上の1936個のSNPと、ダイレクトシーケンシング法によるMTXの副作用・有効性との関連の報告がある、または関連が考慮される17遺伝子37カ所のSNPについて網羅的に解析した。

(4) コホート研究における臨床項目を追加によるClinical genetic modelの作成

予測モデルの更なる予測能を向上させるため、アウトカムと関連のあるSNP、既報でいわれているSNP、MTXPGと関連のあるSNPに加え、臨床項目を含め予測モデルを構築した。臨床項目は単変量解析でスクリーニングし、 $P<0.05$ のものを多変量解析に投入した。SNPと候補となる臨床項目をすべて投入したモデルからAIC基準に基づくモデル選択を行ったのち、さらにブートストラップ法により、モデルの頑健性を評価し、推定が安定し、診断能としての指標となるarea under the curve (AUC)が確保されるものを最終モデルとして選択した。

4. 研究成果

(1) MTX-PGとMTX投与量・肝障害

総PGn濃度は $82.1 \pm 31.7 \text{ nmol/L}$ ($m \pm \text{SD}$)で、MTX投与量と正の相関があったが($r=0.4104$, $p<0.001$)、投与量が同じでも濃度の幅はかなり広がった。GGH c.452C>TはPG1、PG2、総PGと、SLC19A1 c.80G>Aは総PGと、SLC28A3 c.267G>AはPG3との関連が認められた。また、3つのSNP(FPGS c.192T>C, EPHX1 c.357G>A, SLC28A3 c.267G>A)はMTX投与量と関連していた。次に、MTX-PGn濃度維持におけるMTX投与量と9SNPsの役割を重回帰分析により検討した。PG1濃度はGGH c.452C>Tと関連していたが、MTX用量とは関連していなかったため、PG1濃度はCC遺伝子型が $38.2 \pm 19.6 \text{ nmol/L}$ 、CT遺伝子型が $54.8 \pm 21.5 \text{ nmol/L}$ ($P=0.0291$)となった。MTX投与量は、PG3値だけでなく、PG4値とも強い相関があった。MTX-PG3 (nmol/L) = $-0.035 + [2.04 * \text{MTX dose}] + [2.34 * \text{SLC19A1 c.80G>A}] + [-2.01 * \text{FPGS c.*192T>C}]$ で回帰された。しかし、有効量の範囲はかなり広く、MTXの有効性はMTX-PGの濃度だけでなく、MTX-PGに対する反応性にも依存する可能性があることが示唆された。さらに、MTX-PGの総濃度は、肝毒性を有するRA患者40名と有さない患者225名において、それぞれ $141.3 \pm 86.5 \text{ nmol/L}$ と $87.6 \pm 47.8 \text{ nmol/L}$ (平均 $\pm \text{SD}$)となった($p<0.0001$)。ROC解析では、カットオフ濃度 100.0 nmol/L で

最も効率よく 2 群を識別できた (AUC 0.731)

(2) 遺伝子予測モデル

1966 の遺伝子座 (マイクロアレイで 1936 個、ダイレクトシーケンス法で 30 個) の中から、コピー数の変動がある遺伝子座は 5 個、コピー数の変動がある遺伝子座は 1 個であった。性染色体上の 46 座を除外した。多型データの品質を維持するために多型データの品質を維持するために、1297 の遺伝子座を除外した。多型データの品質を維持するため、1297 座を除外した。理由は、ジェノタイプングコール率が 95% 未満 (141 座)、マイナーアレル頻度が 0.01 未満 (141 座) であった。小アレル頻度 < 0.01 (1212 座)、Hardy-Weinberg 平衡 < 0.001 (9 座) のため、1297 座を除外した。平衡 < 0.001 (9 座) のため除外された。最終的に、617 座位がさらなる解析に使用された。有効性については、39 の候補遺伝子座が選択された。その中でそのうち 25 座は P 値 < 0.05 であり、14 座は MTX の有効性や変化と過去に関連があった。また、14 の遺伝子座は MTX の有効性または赤血球の MTX-ポリグルタミン酸濃度の変化と過去に関連した遺伝子座が 14 座あった。ステップワイズモデル選択により段階的なモデル選択を行い、25 の遺伝子座を選択し、MTX の有効性の予測モデルを作成した。このうち 7 つの遺伝子座からなる MTX 有効性予測モデルを ROC で開発した。ブートストラップを用いた ROC 解析により、これらの遺伝子座のうち 7 つからなる MTX 有効性予測モデルを構築した。(AUC: 0.802、95% 信頼区間 (CI): 0.725-0.876、感度: 68.9%、特異度: 75.0% とした (図 1A)。このモデルは、有効性に対して良好な適合性を示し、Hosmer-Lemeshow スコアは Hosmer-Lemeshow スコアは 4.97 (P = 0.76) であった。同様のアプローチを肝毒性モデルにも用いた。モデルにも同様の方法を用いた。30 個の候補遺伝子座が選択され、そのうち 19 個は P 値 < 0.05 を示し、11 個が MTX 毒性との関連が過去に報告されていた。赤血球の MTX-ポリグルタミン酸レベルの変化と関連することが報告されている 11 の遺伝子座があった (図 1B)。ステップワイズモデル選択により段階的なモデル選択を行い、12 座位を選択し、MTX 肝毒性予測モデルこのうち 7 つの遺伝子座からなる MTX 肝毒性予測モデルを開発した。(AUC: 0.783、95% CI: 0.706-0.860、感度: 70.0%、特異度: 80.0%) このモデルは、肝毒性に対して良好な適合性を示しを示し、Hosmer-Lemeshow スコアは 2.50 であった。(P = 0.96)。

(3) 遺伝的・臨床的予測モデル

有効性については、2 つの臨床変数 (DAS28-CRP と葉酸) を遺伝子座に追加した。(AUC: 0.841、95% CI: 0.772-0.901、感度: 86.5%、特異度: 71.4%) (図 1A)。このモデルは良好なキャリブレーションを示した (P = 0.82)。遺伝子モデルに臨床変数を組み込んだところ、全体のカテゴリーフリー-NRI は 0.663 (P < 0.0001 (P < 0.0001)、全体の IDI は 0.083 (P = 0.0009) となった。図 2A は、遺伝子モデル、および遺伝子と臨床因子を組み合わせたモデルによる MTX の有効性を予測する決定曲線である。遺伝子モデルと複合モデルの両方が、すべての閾値確率で有用であった。しかし、両曲線とも、正味の有益性にはほとんど差がない。肝毒性については、12 個の臨床変数を遺伝子モデルに追加した。(AUC: 0.902、95% CI: 0.852-0.951、感度: 78.0%、特異度: 86.7%)。このモデルは良好な較正を示した (P = 0.44)。遺伝子モデルに臨床変数を組み込んだモデルを用いた場合、カテゴリーフリー-NRI は 1.002 となった。(P < 0.0001)、全体の IDI は 0.254 (P < 0.0001) となった。図 2B は、MTX の肝毒性を予測する決定曲線を示している。遺伝子モデルおよび複合モデルの両方が、閾値確率が 0-80% の間で有用であった。0-80% の間で有用であったが、遺伝子モデルよりも複合モデルの方がより有益であった。遺伝的モデルよりも有益であった。

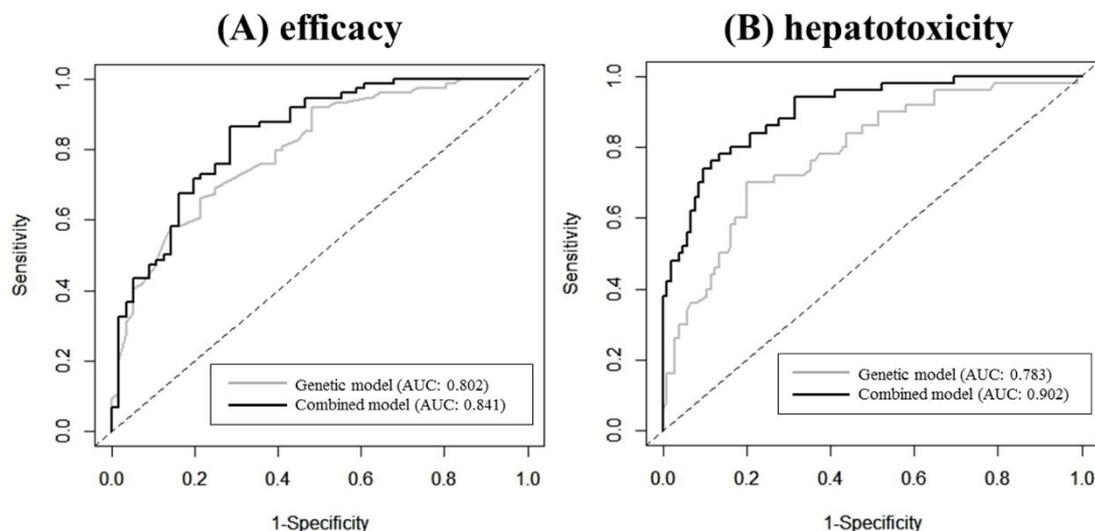
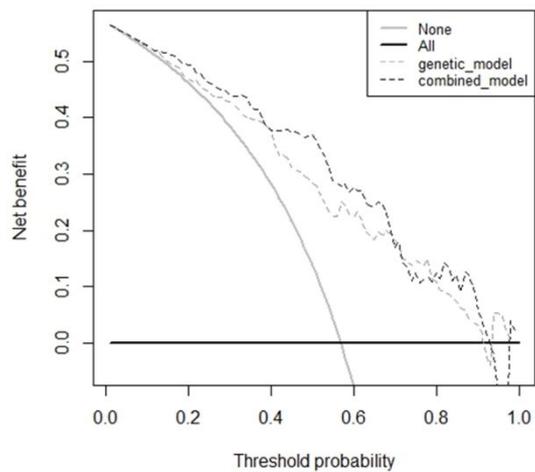


図 1 予測モデルの ROC 解析

(A) efficacy



(B) hepatotoxicity

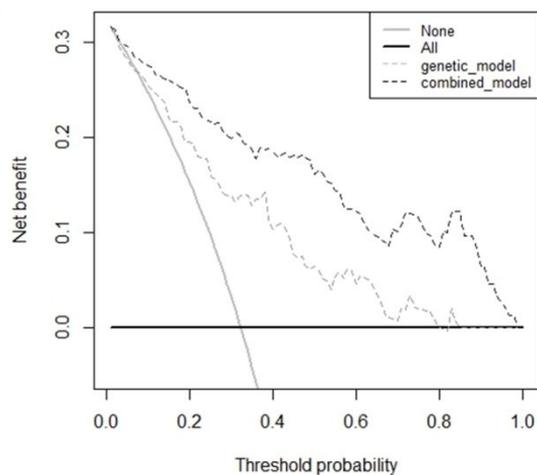


図2 決断曲線解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大西輝、熊谷俊一	4. 巻 1
2. 論文標題 関節リウマチにおけるファーマコジェノミクスによるMTXの反応性、副作用予測	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 49-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onishi Akira, Kamitsuji Shigeo, Nishida Miwa, Uemura Yuko, Takahashi Miho, Saito Toshiharu, Yoshida Yuichiro, Kobayashi Masaki, Kawate Mizuho, Nishimura Keisuke, Misaki Kenta, Nobuhara Yumiko, Nakazawa Takashi, Hatachi Saori, Tsuji Goh, Morinobu Akio, Kumagai Shunichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic and clinical prediction models for the efficacy and hepatotoxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: a multicenter cohort study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Pharmacogenomics Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41397-019-0134-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大西輝、熊谷俊一	4. 巻 2
2. 論文標題 関節リウマチにおけるゲノム情報に基づくメトトレキサートの個別改良の可能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 72-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 A. Onishi* 1, M. Nishida2, M. Takahashi3, Y. Yoshida4, M. Kobayashi4, S. Kamitsuji5, M. Kawate4, K. Nishimura6, K. Misaki7
2. 発表標題 The genetic and clinical prediction models for efficacy and hepatotoxicity of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis
3. 学会等名 EULAR congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------