

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461477

研究課題名(和文) 関節リウマチのメトトレキサート療法における薬理遺伝学的検討

研究課題名(英文) Pharmacogenetic study of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis.

研究代表者

川合 眞一 (KAWAI, Shinichi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：70129401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 関節リウマチ(RA)治療の標準薬であるメトトレキサート(MTX)の効果や副作用には患者ごと、国ごとに大きく異なり、例えばわが国の平均用量は7～9 mg/週であるのに対し、米国では15 mg/週以上である。MTXは細胞内でポリグルタメート化(PGs)するが、PGs効率は副作用を合併した患者で低かった。また、PGsに重要な酵素であるfolylpolyglutamate synthaseの遺伝子多型はPGs効率に強く影響し、米国白人の方が日本人よりPGs効率が増す変異が有意に多いことが用量の民族差の原因の一部と考えられた。(掲載論文：Sci Rep. 6, 35615)

研究成果の概要(英文)： Methotrexate (MTX) is an essential drug for treatment of rheumatoid arthritis (RA). However, the response and tolerability to this drug is known to vary among patients and ethnics. In fact, MTX doses in clinical settings were approximately 7-9 mg/week and >15 mg/week in Japanese and Caucasian RA patients, respectively. We then focused to the intracellular polyglutamates (PGs) of MTX in patients with RA. Efficiency of PGs was lower in patients with MTX adverse events. Genotypes of folylpolyglutamate synthase (FPGS) significantly influenced to the concentration of MTXPGs, resulting in the increased efficiency of PGs in a Caucasian population when compared to our Japanese RA patients.

In conclusion, differences in allele frequencies of FPGS gene between different ethnic populations may suggest the significant differences in tolerable doses to MTX between these cohorts. (Appeared in Sci Rep. 6, 35615)

研究分野：内科学、リウマチ学、臨床薬理学

キーワード：メトトレキサート 関節リウマチ 細胞内代謝 遺伝子多型 薬理遺伝学 民族差

## 1. 研究開始当初の背景

近年の日米欧のガイドラインでは、メトトレキサート (methotrexate, MTX) は関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) 治療の第一選択薬・標準薬として使われている。しかし、有効性と耐薬性については患者毎で、また民族間で大きく異なることが知られている。実際の臨床現場では、例えば我が国の MTX の平均用量は概ね 7~9 mg/週であるのに対し、米国では 15 mg/週以上が投与されており、単に体重差のみでは説明できない違いとされてきた。

MTX は葉酸 transporter である solute carrier family 19, member 1 (SLC19A1) により細胞内に取り込まれ、次に folylpolyglutamate synthetase (FPGS) によりポリグルタメート化 MTX (MTXPGs) となって細胞内に留まり、MTX としての作用を発揮するとされている。一方、MTXPGs は gamma-glutamyl hydrolase (GGH) により脱グルタメート化されて adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette transporters によって細胞外に排出される。

そこで我々は MTX の細胞内代謝動態の違いにより有効性や副作用の個体差・民族差が生じる可能性を考え、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

MTX 治療中の患者において細胞内 MTXPGs 濃度と薬物反応性との関連、および種々の MTX 細胞内代謝関連分子の遺伝子多型との関連を検討し、MTX 用量の個体差・民族差の原因を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

東邦大学医療センター大森病院において MTX 治療中の RA 患者 271 例を対象とした。188 例は安定して MTX 治療を受けていたが、83 例は用量依存性副作用 (口内炎、悪心、肝酵素異常など) によって MTX 減量の既往があった。いずれの患者も採血前 3 か月以上は MTX の同じ用量で治療されていた。各患者の臨床背景は診療録から調査した。

赤血球内 MTXPGs 濃度を LC-MS/MS 法にて MTXPG1 (MTX そのもの) から MTXPG6 まで測定したが、MTXPG6 はいずれの試料からも検出されなかった。それぞれの MTXPGs 濃度とともに、ポリグルタメート化効率を MTXPG3-5/1-2 比で検討した。

患者 DNA から SLC19A1 (rs1051266)、FPGS (rs10106, rs1054774, rs1544105)、GGH (rs719235, rs1800909, rs3758149, rs11545078, rs12681874) の 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) を調べ、MTXPGs 濃度や MTXPG3-5/1-2 比との関連を検討した。さらにこれらの SNPs について International HapMap project (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) から日本人および米国白人 (Caucasian) の一般人

口のアレル頻度を調べ、対象の RA 患者の結果と比較した。

## 4. 研究成果

各 RA 患者の MTX 服用量で層別した平均 MTXPGs 濃度を図 1 に示した。赤血球内 MTXPGs 濃度は MTX 服用量依存性に増加したが、10 mg/週以上の投与患者では一定となる傾向がみられた。

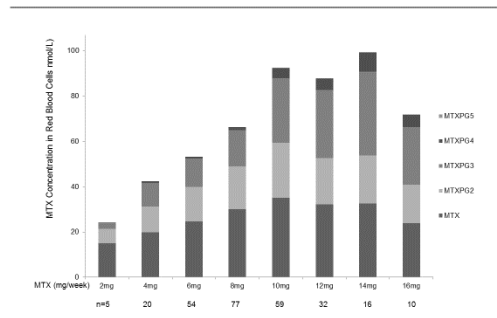


図1. MTX治療中のRA患者における赤血球内濃度

MTX の用量依存性副作用によって減量した既往のある RA 患者群 [adverse event, AE(+)] とそうした既往のない AE(-) 群とで MTXPGs 濃度および MTXPG3-5/1-2 比を比較したところ、図 2 のように MTXPGs 濃度については両群間に差がなかったが、AE(+) 群の MTXPG3-5/1-2 比は AE(-) 群のそれに比べて有意に低く、副作用既往群はポリグルタメート化効率が悪い可能性が示唆された。

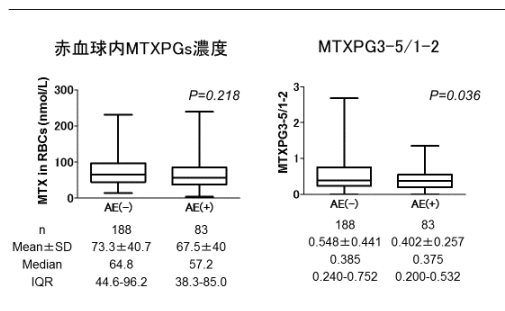


図2. 副作用の有無と赤血球内MTXPGs濃度

MTXPGs の細胞内代謝に関連したトランスポーターである SLC19A1、およびポリグルタメート化に関わる酵素である FPGS と GGH の SNPs と MTXPG3-5/1-2 比の関連を調べたところ、表 1 に示したように FPGS の 3 か所の SNPs により MTXPG3-5/1-2 比が有意に異なることが明らかとなった。これに対し、SLC19A1 および GGH の SNPs では MTXPG3-5/1-2 比に有意な違いは認めなかった。

これら遺伝子変異について、対象患者のアレル頻度と HapMap project から引用した日米一般人口のアレル頻度を表 2 にまとめた。対象患者と日本人一般人口とはいずれの A

レル頻度も有意差がなかったが、対象患者と米国白人と比較すると2か所のSNPsで有意差が認められた。このアレル頻度の違いは表1の遺伝子多型によるMTXPG3-5/1-2比の違いと合わせるとポリグルタメート化効率が低い変異であった。

表1. MTX3-5/1-2比と細胞内代謝に関わる分子の遺伝子多型

SNP	rs No.	genotype	n	Minor Allele Frequency	Median [IQR]	P value
SLC19A1	rs1051266	GG	94	0.479±0.356	0.367 [0.250-0.607]	p=0.475
		AG	130	0.556±0.406	0.427 [0.234-0.794]	
		AA	47	0.445±0.334	0.338 [0.157-0.707]	
		AA	130	0.457±0.375	0.345 [0.201-0.597]	
		AG	116	0.503±0.394	0.396 [0.235-0.636]	
		GG	28	0.714±0.465	0.672 [0.364-0.927]	
FPGS	rs1054774	TT	113	0.552±0.404	0.428 [0.264-0.743]	p=0.606
		AT	122	0.463±0.396	0.350 [0.201-0.562]	
		AA	36	0.417±0.362	0.319 [0.161-0.568]	
		CC	128	0.424±0.372	0.347 [0.202-0.595]	
		CT	120	0.506±0.391	0.390 [0.235-0.700]	
		TT	23	0.747±0.489	0.634 [0.385-1.030]	
rs119235	CT	CC	216	0.591±0.389	0.385 [0.238-0.652]	p=0.862
		CT	47	0.486±0.376	0.385 [0.184-0.633]	
		TT	8	0.645±0.702	0.382 [0.205-0.839]	
		CC	223	0.495±0.397	0.397 [0.220-0.634]	
		CT	36	0.524±0.401	0.255 [0.255-0.668]	
		TT	12	0.444±0.226	0.375 [0.292-0.710]	
GGH	rs3758149	GT	27	0.552±0.422	0.381 [0.240-0.809]	p=0.889
		TT	12	0.441±0.241	0.385 [0.274-0.697]	
		TT	233	0.495±0.391	0.376 [0.234-0.634]	
		CT	37	0.558±0.437	0.430 [0.232-0.702]	
		CC	1	0.151	0.151	
		GG	41	0.423±0.332	0.362 [0.235-0.694]	
rs12681874	AG	AG	134	0.600±0.472	0.442 [0.254-0.812]	p=0.070
		AA	60	0.493±0.418	0.345 [0.197-0.687]	

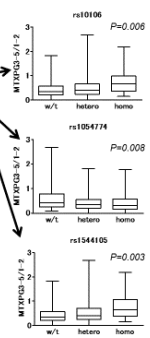


表2. MTX細胞内代謝関連酵素アレル頻度の日米比較

SNPs	No of rs	genotype	Minor Allele Frequency			P value	
			Our study	Japanese	Caucasian		
SLC19A1	rs1051266	80G>A	0.698 / 0.302 *	0.512 / 0.488	0.438 / 0.562 *	p=0.210	
		rs10106	1994A>G	0.693 / 0.307	0.727 / 0.273	0.450 / 0.550	p<0.01
FPGS	rs1054774	11694T>A	0.360 / 0.640 *	0.330 / 0.670	0.342 / 0.658 *	p=0.471	
		rs1544105	2572C>T	0.717 / 0.283	0.727 / 0.273	0.342 / 0.658 *	p<0.01
GGH	rs719235	452C>T	0.892 / 0.108	0.895 / 0.105	0.677 / 0.323	p<0.01	
		rs1800909	-401C>T	0.850 / 0.150	0.727 / 0.273	0.342 / 0.658	p=0.478
		rs3758149	-354G>T	0.799 / 0.201 *	0.640 / 0.360	0.692 / 0.308 *	p=0.549
		rs11545078	16T>C	0.952 / 0.048	0.856 / 0.144	0.925 / 0.075	p=1
		rs12681874	14269G>A	0.638 / 0.362	0.533 / 0.467	0.890 / 0.110	p<0.01

以上をまとめると、MTXの副作用は細胞内でのポリグルタメート化効率が悪いと発現しやすい。MTXのポリグルタメート化効率にはFPGSが強く影響し、米国白人の遺伝子多型のアレル頻度は日本人に比べてポリグルタメート化効率を高める変異が有意に多く、そのことがMTX用量の個体差・民族差の一部を説明することが示唆された。

なお、本研究結果の一部は〔雑誌論文〕6 (Sci Rep. 2016 Oct 18; 6:35615)に掲載された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

### 〔雑誌論文〕(計14件、全て査読有)

1. Kawazoe M, Kaneko K, Shikano K, Kusunoki N, Nanki T, Kawai S. Glucocorticoid therapy causes contradictory changes of serum Wnt signaling-related molecules in systemic autoimmune diseases. Clin Rheumatol. (in press) (doi:10.1007/s10067-017-3689-3)
2. Miyabe C, Miyabe Y, Komiya T, Shioya H, Miura NN, Takahashi K, Ohno N, Tsuboi R, Luster AD, Kawai S, Miyasaka N, Nanki T. A sphingosine

1-phosphate receptor agonist ameliorates animal model of vasculitis. Inflamm Res. (in press) (doi:10.1007/s00011-016-1018-y)

3. Nanki T, Imai T, Kawai S. Fractalkine/CX3CL1 in rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. (in press) (doi:10.1080/14397595.2016.1213481)
4. Shindo E, Nanki T, Kusunoki N, Shikano K, Kawazoe M, Sato H, Kaneko K, Muraoka S, Kaburaki M, Akasaka Y, Shimada H, Hasunuma T, Kawai S. The growth factor midkine may play a pathophysiological role in rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. 2017; 27(1):54-59. (doi:10.1080/14397595.2016.1179860)
5. Fujio N, Masuoka S, Shikano K, Kusunoki N, Nanki T, Kawai S. Apparent hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression via reduction of interleukin-6 by glucocorticoid therapy in systemic autoimmune diseases. PLoS ONE. 2016 Dec 8; 11(12): e0167854. (doi:10.1371/journal.pone.0167854)
6. Yamamoto T, Shikano K, Nanki T, Kawai S. Folylpolylglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis. Sci Rep. 2016 Oct 18; 6:35615. (doi: 10.1038/srep35615)
7. Tanaka N, Masuoka S, Kusunoki N, Nanki T, Kawai S. Serum resistin level and progression of atherosclerosis during glucocorticoid therapy for systemic autoimmune diseases. Metabolites. 2016 Sep 16; 6(3). pii: E28. (doi: 10.3390/metabo6030028)
8. Shikano K, Kaneko K, Kawazoe M, Kaburaki M, Hasunuma T, Kawai S. Efficacy of vitamin K2 for glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with systemic autoimmune diseases. Intern Med. 2016; 55(15): 1997-2003. (doi: 10.2169/internalmedicine.55.6230)
9. Hasunuma T, Tohkin M, Kaniwa N, Jang IJ, Cui Y, Kaneko M, Saito Y, Takeuchi M, Watanabe H, Yamazoe Y, Uyama Y, Kawai S. Absence of ethnic differences in the pharmacokinetics of moxifloxacin, simvastatin, and meloxicam among three east Asian populations and Caucasians. Br J Clin Pharmacol. 2016; 81(6):1078-1090. (doi:10.1111/bcp.12884)
10. Ogata A, Amano K, Dobashi H, Inoo M,

- Ishii T, Kasama T, Kawai S, Kawakami A, Koike T, Miyahara H, Miyamoto T, Munakata Y, Murasawa A, Nishimoto N, Ogawa N, Ojima T, Sano H, Shi K, Shono E, Suematsu E, Takahashi H, Tanaka Y, Tsukamoto H, Nomura A; MUSASHI Study Investigators. Longterm safety and efficacy of subcutaneous tocilizumab monotherapy: results from the 2-year open-label extension of the MUSASHI study. *J Rheumatol.* 2015;42(5):799-809. (doi: 10.3899/jrheum.140665)
11. Takeuchi T, Miyasaka N, Kawai S, Sugiyama N, Yuasa H, Yamashita N, Sugiyama N, Wagerle LC, Vlahos B, Wajdula J. Pharmacokinetics, efficacy and safety profiles of etanercept monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis: review of seven clinical trials. *Mod Rheumatol.* 2015;25(2):173-186. (doi:10.3109/14397595.2014.914014)
  12. Takeuchi T, Kawai S, Yamamoto K, Harigai M, Ishida K, Miyasaka N. Post-marketing surveillance of the safety and effectiveness of tacrolimus in 3,267 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2014;24(1):8-16. (doi:10.3109/14397595.2013.854074)
  13. Yamamoto T, Hasunuma T, Takagi K, Akimoto K, Shikano K, Kaburaki M, Muraoka S, Kitahara K, Tanaka N, Kaneko K, Kusunoki Y, Endo H, Kawai S. A feasibility study assessing tolerability of daily versus twice weekly trimethoprim-sulfamethoxazole regimen for prophylaxis against *Pneumocystis pneumonia* in patients with systemic autoimmune diseases on glucocorticoid therapy. *Jpn J Clin Pharmacol Ther.* 2014; 45(3):89-92.
  14. Hirayama A, Tanahashi N, Daida H, Ishiguro N, Chachin M, Sugioka T, Kawai S; on behalf of all ACCEPT study investigators in Japan. Assessing the cardiovascular risk between celecoxib and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a 3-year nationwide comparative observational study in Japan (ACCEPT). *Circ J.* 2014;78(1):194-205. (doi:10.1253/circj.CJ-12-1573)
- 【学会発表】(計 17 件)**
1. 川合眞一「免疫・炎症・疼痛制御における臨床薬理学の進歩」第 37 回日本臨床薬理学会学術総会/教育講演 (EL8) 長谷川純一会長, 2016 年 12 月 1-3 日, 米子 (米子コンベンションセンター)
  2. 川合眞一「バイオシミラー普及における臨床上の課題」第 6 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会/シンポジウム 11 (S-11-4) 橋田 充会長, 2016 年 9 月 9-10 日, 東京 (一橋大学一橋講堂)
  3. 川合眞一「ステロイドの使い方: 臨床薬理と注意点」第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会/教育研修講演 (EL14) 織田弘美会長, 2016 年 4 月 21-23 日, 横浜 (パシフィコ横浜)
  4. 川合眞一「公知申請制度による適応外医薬品の承認: 我が国の歴史と現状」第 89 回日本薬理学会年会/シンポジウム 36 (3-S-12-2) 石井邦雄会長, 2016 年 3 月 9-11 日, 横浜 (パシフィコ横浜会議センター)
  5. 川合眞一「自己免疫疾患に対する薬剤開発における臨床薬理学の意義」第 89 回日本薬理学会年会/日本医学会連合共催シンポジウム(1-PMS-3)石井邦雄会長, 2016 年 3 月 9-11 日, 横浜 (パシフィコ横浜会議センター)
  6. Kawai S. “Low molecular weight immunosuppressant therapy of autoimmune diseases.” 12th World Congress on Inflammation. (Symposium 24: Biological and Non-Biological Therapies of Autoimmune Diseases) Aug 8-12, 2015, Boston, USA.
  7. 川合眞一「炎症とアディポカイン」第 36 回日本炎症・再生医学会/教育講演 (EL-9) 坪田一男会長, 2015 年 7 月 22 日, 東京 (虎の門ヒルズフォーラム)
  8. Sato H, Muraoka S, Kusunoki N, Kawazoe M, Masuoka S, Shindo E, Fujio N, Shikano K, Kaburaki M, Tanaka N, Kaneko K, Yamamoto T, Hasunuma T, Kawai S. “Resistin directly stimulates chemokine gene expressions in rheumatoid synovial fibroblasts: DNA microarray analysis.” EULAR 2015. (P3/0007). Rome, Italy, 10-13 June 2015
  9. Fujio N, Muraoka S, Shikano K, Kaburaki M, Kawazoe M, Shindo E, Sato H, Masuoka S, Tanaka N, Kaneko K, Yamamoto T, Kusunoki N, Hasunuma T, Kawai S. “Suppression of adrenal function is obvious when compared to that of pituitary function in patients with systemic autoimmune diseases after glucocorticoid therapy.” EULAR 2015. (P3/0026). Rome, Italy, 10-13 June 2015
  10. 川合眞一「関節リウマチの実診療における臨床薬理学の進歩」第 37 回日本臨床薬理学会学術総会/教育講演 (EL8) 長谷川純一会長, 2016 年 12 月 1-3 日, 米子 (米子コンベンションセンター)

るメトトレキサートの使い方 ABC」第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会/教育研修講演 (EL20) 山本一彦会長, 2015 年 4 月 23-25 日, 名古屋 (名古屋国際会議場)

11. 川合眞一「膠原病治療におけるステロイドの使い方」第 112 回日本内科学会総会・講演会/教育講演 4. 三嶋理晃会長, 2015 年 4 月 10-12 日, 京都 (京都市勧業館)
12. Shikano K, Kaneko K, Kawazoe M, Masuoka S, Sato H, Shindo E, Fujio N, Kaburaki M, Muraoka S, Tanaka N, Yamamoto T, Takagi K, Kusunoki N, Hasunuma T, Kawai S. “Significance of serum sRANKL and osteoprotegerin concentration in patients with rheumatoid arthritis.” 2014 ACR/ARHP Annual Meeting. (PO-232) Nov 14-19, 2014, Boston, USA.
13. Kawazoe M, Shikano K, Kaneko K, Masuoka S, Sato H, Shindo E, Fujio N, Muraoka S, Kaburaki M, Tanaka N, Yamamoto T, Takagi K, Kusunoki N, Hasunuma T, Kawai S. “Significance of serum marker levels of Wnt/β-catenin signaling pathway in patients with systemic autoimmune diseases under glucocorticoid therapy: a prospective study.” 2014 ACR/ARHP Annual Meeting. (PO-233) Nov 14-19, 2014, Boston, USA.
14. Shindo E, Hasunuma T, Masuoka S, Kawazoe M, Sato H, Fujio N, Shikano K, Kaburaki M, Muraoka S, Tanaka N, Kaneko K, Yamamoto T, Takagi K, Kusunoki N, Kawai S. “Midkine, a growth factor, may play a pathophysiological role in patients with rheumatoid arthritis.” 2014 ACR/ARHP Annual Meeting. (PO-1460) Nov 14-19, 2014, Boston, USA.
15. Kaburaki M, Kaneko K, Shikano K, Kawazoe M, Shindo E, Sato H, Hasunuma T, Fujio N, Muraoka S, Tanaka N, Yamamoto T, Kusunoki N, Kawai S, Masuoka S. “Changes in serum soluble RANKL and osteoprotegerin levels after teriparatide administration in rheumatic disease patients with glucocorticoid-induced osteoporosis.” 2014 ACR/ARHP Annual Meeting. (PO-2259) Nov 14-19, 2014, Boston, USA.
16. Kawai S, Yamamoto T. “Gamma-glutamyl hydrolase gene polymorphisms provide for intracellular methotrexate

concentration on patients with rheumatoid arthritis.” WCP2014( 17th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology ) (PO-225) July 13-18, 2014, Cape Town, South Africa.

17. 川合眞一「DMARDs の適応と使い方」第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会/教育研修講演 (EL1) 高崎芳成会長, 2014 年 4 月 24-26 日, 東京 (グランドプリンスホテル新高輪)

#### 【図書】(計 1 件)

1. Kusunoki N, Kojima F, Kawai S. Effects of adipokines on prostaglandin E2 production by rheumatoid synovial fibroblasts. In: O’Keefe JM (Ed) Arachidonic Acid: Sources, Biosynthesis and Health Effects., pp 199 [165-183], Nova Science Publishers, Inc., New York, 2014. [ISBN: 978-1-63117-619-7] [ISBN: 978-1-63117-620-3 (eBook)]

#### 【産業財産権】

出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)

#### 【その他】

ホームページ  
東邦大学医学部内科学講座膠原病学分野 (大森) の教育・研究業績データベース :  
<http://gyoseki.toho-u.ac.jp/thuhp/KgApp?kozac=22010024&year=2016>

#### 6 . 研究組織

- (1) 研究代表者  
川合 眞一 (KAWAI, Shinichi)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号 : 70129401
- (2) 研究分担者  
山本 竜大 (YAMAMOTO, Tatsuhiko)  
東邦大学・医学部・助教  
研究者番号 : 40459805  
(平成 27 年度より連携研究者)