

各疾患に汎用される医薬品の種類および処方量等に関する調（Ⅰ）  
（関節リウマチの低用量メトトレキサート療法における赤血球内濃度測定法  
の検討、および細胞内代謝酵素の遺伝子多型に関する研究）

担当責任者 川合 眞一 東邦大学医学部内科学講座膠原病学分野 教授  
研究協力者 山本 竜大 東邦大学医学部内科学講座膠原病学分野 助教

**研究要旨：**

メトトレキサート（MTX）は関節リウマチ（RA）治療のアンカードラッグであるが、わが国と欧米の承認用量に大きな差がある薬剤の1つである。MTXは細胞内でポリグルタメート化されて薬効を発揮するとされるが、その細胞内代謝酵素の活性には遺伝子多型の影響が知られている。我々は赤血球内MTX総濃度を簡便法で測定してきたが、必ずしも十分な成果が得られなかった。そのため、今回は液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS）による赤血球内MTX測定法を検討した。その結果、赤血球内MTX総濃度は2～10mg/週の範囲では用量依存性に細胞内総濃度が増加した。しかし、10mg/週を超える服用量の患者ではほぼ一定の濃度であった。次に、MTXポリグルタメートをグルタメートの数で分けて赤血球内MTXPG3-5/1-2濃度比を検討したところ、副作用のために減量を余儀なくされた例では同濃度比が低かった。しかし、同濃度比は対象RA患者のSLC19A1およびGGHの遺伝子多型とは関連がなかった。今後は他の細胞内代謝酵素の遺伝子多型を検討する必要がある。

**A. 研究目的：**

メトトレキサート（methotrexate: MTX）は、関節リウマチ（rheumatoid arthritis: RA）治療の中心的治療薬として世界中で最も使用されている抗リウマチ薬である。近年生物学的製剤の登場によりRA治療は大きく変貌したが、MTXの併用が重視されており、その臨床的意義はいまだに高い。

MTXは、米国では1988年、わが国では1999年にRAを適応症として認められたが、上限が8mg/週と欧米と比較して極めて少なかった。その後、2011年に16mg/週までの増量および第一選択薬としての使用が公知申請により承認された。しかし、欧米では25-30mg/週が常用量上限となっており、依然としてわが国と海外との承認用量の差が大きな薬剤の1つである。

MTX自体は不活性なプロドラッグであり、細胞内でポリグルタメート化されて保持され、薬効を発揮するとされているが、その細胞内代謝酵素には遺伝子多型の存在が知られている。また、MTXの重篤な副作用として肝障害・骨髄抑制・間質性肺炎があるが、通常用量の投与でも症例によって重篤な副作用が生じ、継続投与困難例が存在する。一方、少量投与で治療効果が得られる例もあれば、最大用量までの増量にも関わらず治療効果が得られない例もある。これらの治療効果の差および副作用の発現には代謝酵素活性が関与している可能性が考えられる。

既に我々は、既報（Inoue S, et al. Yakugaku Zasshi. 2009;129:1001-1005）の簡便法によるMTX赤血球内総濃度の測定法を確立し、RA患者で予備的に測定した。また、葉酸トランスポーター遺伝子であるSLC19A1と細胞内でMTXポリグルタメートからグルタミン酸を分離する酵素であるグルタミルヒドロキシラーゼ遺伝子（GGH）の多型を検討したが、MTX細胞内総濃度とこれらの遺伝子多型との間に明らかな関連性は見出せなかった。その原因の1つとして、簡便法によるMTX細胞内総濃度測定ではこうした細胞内酵素の働きを詳細に検討することはできないことが挙げられた。

そこで本研究では、MTXを投与したRA患者における赤血球内MTX濃度の測定法を、従来行っていた簡便法から液体クロマトグラフィー質量分析法（Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS）に変更してMTXおよびそのグルタメート化代謝産物を同時測定することを試みた。その結果とMTXの副作用などの臨床データとの関連性を検討し、さらにSLC19A1とGGHのいくつかの遺伝子多型との関連を検討した。これらの検討を進めることにより、MTXの承認用量の民族差・個体差の原因を明らかにすることを最終の目的とした。

**B. 研究方法：**  
**対象患者**

東邦大学医療センター大森病院膠原病科を受診した患者のうち、同じ用量の MTX 内服を少なくとも 3 か月以上継続していた者を対象とした。研究内容について十分に説明し、検体の研究的利用に文書にて同意した患者のみを対象とした。また、本研究の対象者は 20 歳以上の本人同意の可能な患者とした。電子カルテ上の診療情報より、MTX 内服歴・併用薬剤・疾患活動性などの情報を抽出した。対象患者より末梢血 7ml (赤血球内濃度測定用 6mL および MTX 細胞内代謝関連遺伝子検討用 1mL) を採取し、以下の検討に用いた。なお、本研究は東邦大学医学部遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得て行った。(承認番号 24-2)

**赤血球内 MTX 濃度の測定**

EDTA Na 添加採血管を用いて採取した血液 6ml を、2500rpm 4 で 10 分間遠心分離して上清の血漿と赤血球分画に分離した。赤血球分画 400  $\mu$ L と注射用水 600  $\mu$ L を混合し、-80 で冷凍保存した。

測定試料 200  $\mu$ L に水/アセトニトリル 20  $\mu$ L を添加し、撹拌した。さらに各試料に水 450  $\mu$ L を添加して撹拌後、60%過塩素酸 100  $\mu$ L を添加した。撹拌後に氷上で 30 分以上静置して遠心した (11,000 rpm、10 min、4  $^{\circ}$ C)。各遠心上清を Oasis HLB  $\mu$ Elution plate にアプライし、2%ギ酸 200  $\mu$ L で洗浄し、2%アンモニア/アセトニトリル 200  $\mu$ L で溶出した。遠心減圧乾固 (1,500 rpm, 60  $^{\circ}$ C) 後、10 mmol/L 重炭酸アンモニウム (pH 10) /メタノール (98/2) 100  $\mu$ L で再溶解し、LC-MS/MS システム (UFLC/TSQ Quantum Ultra) で分析した。

**MTX 細胞内代謝関連遺伝子の SNPs 検索**

得られた末梢血サンプル 1ml から Maxwell 16 DNA Purification Kit (Promega 社製) を用いてゲノム DNA を採取した。採取したゲノム DNA は測定時まで -80 で保存した。

既にいくつかの酵素の遺伝子多型が他の施設で検討されているが、今回は SLC19A1 と GGH に特に注目した。検討した遺伝子多型を表 1 に示した。

**表 1. 今回検討した遺伝子多型**

SLC19A1	80G > A	( rs1051266 )
GGH	16T > C	( rs1800909 )

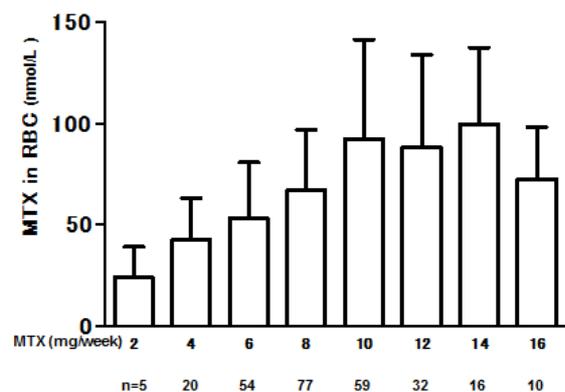
-401C>T	( rs3758149 )
452C>T	( rs11545078 )
-354G>T	( rs719235 )
14269G>A	( rs12681874 )

TaqMan 法による SNPs 同定のためのプライマーペアは AppliedBiosystems 社製を用いた。DNA 2.7  $\mu$ L と Taqman Master Mix 8.5  $\mu$ L と 40  $\times$  プライマー 0.43  $\mu$ L と DDW 5.37  $\mu$ L を加えて反応液を作成し、LihtCycler480 (ロシュ社製) を用いて 95 10 分、92 15 秒 + 60 60 秒を 57 サイクル + 50 5 分で RT-PCR を行い、解析ソフトを用いて解析した。

**C. 研究結果：**

**(1) 赤血球内 MTX 総濃度**

当科外来通院中の RA 患者 273 名を対象に検討を行った。MTX 週間内服用量別の LC-MS/MS 法による赤血球内 MTX 総濃度測定結果を図 1 に示した。赤血球内 MTX 総濃度は 2~10 mg/週の用量範囲では用量依存性に細胞内総濃度の増加を認めた。しかし、10 mg/週を超える服用量の患者ではほぼ一定の濃度であった。また、同じ患者で MTX 服用日と 2 日後、4 日後の赤血球内 MTX 総濃度を測定したところ、ほぼ同濃度であったことから、採血のタイミングによる MTX 濃度への影響はないものと思われた。



**図 1. RA 患者における MTX 週間服用量で層別した赤血球内 MTX 総濃度 (Mean+SD)**

次に、MTX ポリグルタメート (MTXPG) をグルタメートの数により MTXPG1-2 (MTX 原体と 2 分子のグルタメート化 MTX) と、MTXPG3-5 (3~5 分子のグルタメート化 MTX) に分けて検討した。MTXPG6 も測定したが、今回の対象症例では 1 例も検出されなかった。それぞれの赤血球内濃度

は図1のMTX総濃度に類似した用量-濃度関連性を示した。また、対象患者は週間MTX服用量が異なるため、単純に赤血球内濃度と臨床症状または遺伝子多型との関係を検討できない。従って、以下の検討では特にポリグルタメート化の影響を明らかにする目的で、赤血球内MTXPG3-5/1-2濃度比を検討した。

## (2) RA患者の副作用と赤血球内MTX濃度

今回の研究対象はMTX服用中のRA患者のみであったが、MTXを中止せざるを得ない副作用以外の用量依存性副作用のために減量を余儀なくされた例を含んでいた。そのため、副作用を生じたAE(+)群83例と、採血時点の服用量では副作用がなかったAE(-)群190例とで比較した。その結果、副作用のためにMTXを減量した群では副作用がなかった群よりも有意にMTXPG3-5/1-2濃度比が低下していた。

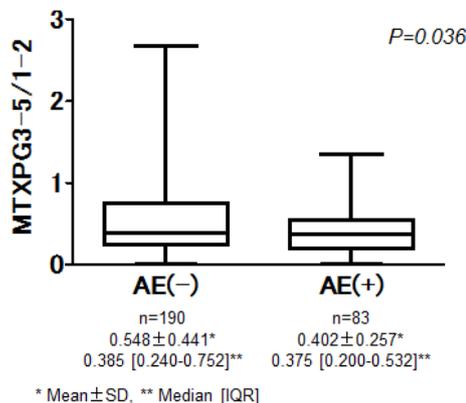


図2. MTX服用中のRA患者を副作用によりMTXを減量した患者[AE(+)]と、採血時までは副作用がなかった患者[AE(-)]群におけるMTXPG3-5/1-2濃度比

## (3) 赤血球内MTX総濃度およびMTXPG3-5/1-2濃度比とMTX代謝関連酵素の遺伝子多型

### SLC19A1

SLC19A1 80G>Aの遺伝子多型のマイナーアレル頻度 (minor allele frequency: MAF) は、0.613/0.387であった。MTXPG3-5/1-2濃度比と

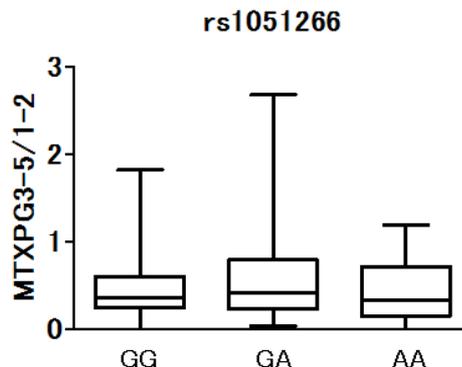


図3. SLC19A1の遺伝子多型によるMTXPG3-5/1-2比

遺伝子多型の関連を検討したが明らかな関係を認めなかった。

### GGH

GGHのMMFは、各々16T>C (rs1800909) 0.850/0.150、-401C>T (rs3758149) 0.778/0.222、452C>T (rs11545078) 0.930/0.070、-354G>T (rs719235) 0.878/0.122、14269G>A (rs12681874) 0.563/0.437であった。

各遺伝子多型をwild type, hetero, homoに分け、MTXPG3-5/1-2濃度比との関係を検討した。その結果、今回検討したGGH遺伝子多型の各群間ではMTXPG3-5/1-2濃度比は変わらなかった(図4)。

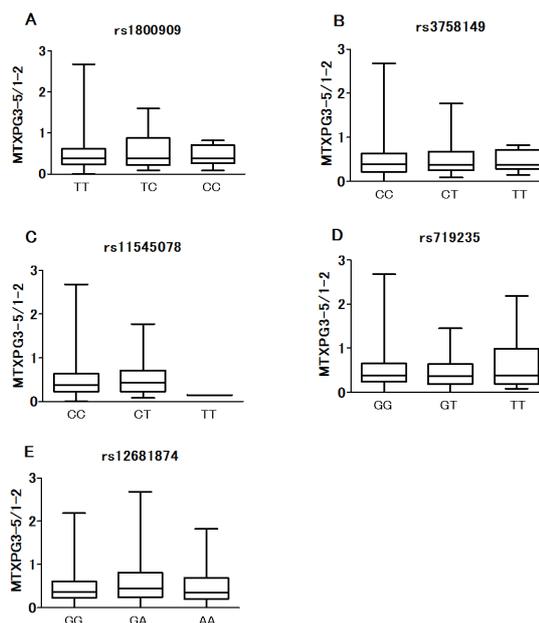


図4. RA患者におけるGGHの遺伝子多型とMTXPG3-5/1-2濃度比

#### D. 考察

我々は、赤血球内 MTX 総濃度を簡便法で測定してきた。本法は抗がん剤として MTX を使用する際に薬物血中濃度を測定している施設であれば比較的容易に測定できるが、この方法では十分な感度や精度が得られないことがあり、さらに MTXPGs のフェノタイプ別濃度を測定できなかった。そこで、LC-MS/MS による MTX およびその細胞内代謝産物の測定法を確立し、赤血球内 MTXPGs のフェノタイプ別濃度を測定することが可能となった。今回、RA 患者の末梢血赤血球内の MTX 原体 (MTXPG1: グルタメート 1 分子を含む) から MTXPG6 まで測定したが、MTXPG6 は今回の対象患者のいずれの赤血球分画からも検出できなかった。

今回の対象症例は実診療における RA 患者であり、いずれも患者と相談した上で主治医の判断で MTX 用量が決められていた。そのため、患者によって用量は広く分布していた。MTX の用量で層別すると、赤血球内 MTX 総濃度およびフェノタイプ別濃度はいずれも用量依存性に増加したが、10 mg/週を超えた用量を服用した患者群ではほぼ一定濃度となった。この原因は明らかではないが、細胞内代謝酵素の反応には限界があり一定濃度以上の MTX を細胞内に保持できない可能性がある。

このように MTX の用量が患者毎に大きく異なることから、赤血球濃度そのもので臨床症状との関連をみることは適切ではない。また、10 mg/週までは用量依存性が認められるが、10 mg/週を超える用量の患者群では MTX 濃度の用量補正は適応困難である。また、今回の研究では MTX 細胞内代謝関連の酵素の遺伝子多型を検討することが主な目的であることから、MTXPG3-5 と MTXPG1-2 の濃度比 (MTXPG3-5/1-2) を計算してポリグルタメート化の臨床的意義を検討することとした。

今回の対象例は全例 MTX 服用中の患者であり、副作用により中止した例は含んでいない。しかし、MTX には減量により継続可能な肝酵素異常、口腔内アフタ、悪心などの用量依存性副作用があることから、それらを副作用あり群 [adverse event, AE(+)] とした。また、副作用が認められなかった群を AE(-) とした。両群で検討したところ、AE(+) では MTXPG3-5/1-2 比が有意に低下していた。今回の結果からは、グルタメート化が少ない MTX 比率が高い患者では副作用が合併しやすいと解釈されるが、なおも詳細な検討を必要としている。

今回の検討では、MTX の細胞内取り込みに関

係するトランスポーターの *SLC19A1* と脱グルタメート化を進める *GGH* のいくつかの遺伝子多型を調べたが、いずれも MTXPG3-5/1-2 比との関連性を見出せなかった。今後はグルタメート化を促進する細胞内酵素である folylpolyglutamate synthetase など、他の酵素の遺伝子多型などについても検討する必要がある。

来年度は MTX の用量に関する市場調査も行う予定である。これらの総合的なアプローチにより、MTX の承認用量の民族差・個体差の原因をより明らかにしたいと考えている。

#### E. 健康危険情報：

該当無し

#### F. 研究発表：

##### 論文発表 (原著)

1. 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 Jun; 45(3):89-92.
2. 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.* [Epub 2014 May 20] (PMID: 24842477) (doi:10.3109/14397595.2014.914014)

##### 著書

1. Kusunoki N, Kojima F, **Kawai S**. Effects of adipokines on prostaglandin E<sub>2</sub> production by rheumatoid synovial fibroblasts. In: O'Keefe JM (Ed) *Arachidonic Acid: Sources, Biosynthesis and Health Effects.*, pp 165-183, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2014. [ISBN: 978-1-63117-619-7] [ISBN: 978-1-63117-620-3 (eBook)]

#### G. 知的財産権の出願・登録状況：

該当無し