

山本竜大より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2711 号

学位申請者 : 山 本 竜 大

学位審査論文: Folylpolylglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis

(葉酸ポリグルタメート合成酵素は、関節リウマチ患者の細胞内メトトレキサートポリグルタメート濃度を調整する主要な因子である)

著 者 : Tatsuhiro Yamamoto, Kotaro Shikano, Toshihiro Nanki, Shinichi Kawai

公 表 誌 : Scientific Reports DOI:10.1038/srep35615

論文内容の要旨 :

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) 治療の中心的治療薬であるメトトレキサート (methotrexate: MTX) は細胞内でポリグルタメート (PGs) 化されて薬効を発揮するとされ、その細胞内代謝酵素の活性化によって PGs の細胞内濃度が調節されることが明らかになっている。そこで、我々は赤血球内 MTXPGs 濃度を測定し、細胞内への MTX 輸送蛋白である solute carrier family 19 member 1 (SLC19A1)、また MTX をグルタメート化する蛋白である folylpolylglutamate synthase (FPGS)、および MTX から脱グルタメートする蛋白である gamma-glutamyl hydrolase (GGH) の遺伝子多型との関連につき検討した。

東邦大学医療センター大森病院リウマチ膠原病センターを受診した患者のうち、MTX の用量を変えずに少なくとも 3 か月以上内服継続し、文書にて同意を得られた RA 患者 271 名 (Mean±SD; 58.3±9.8 歳) を対象とした。赤血球内 MTX 濃度測定は、PG 数によって MTXPG1 から MTXPG6 までの各々の濃度を高速液体クロマトグラフィー法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) にて測定した。遺伝子多型の検討は、患者から得た末梢血からゲノム DNA を抽出し、TaqMan 法にて *SLC19A1* 80G >A (rs1051266) と *FPGS* 1994A>G (rs10106)、2572C>T (rs1054774)、16444A>C (rs1544105) と *GGH*-401C>T (rs719235)、-354G>T (rs1800909)、16T>C (rs3758149)、452C>T (rs11545078)、14269G>A (rs12681874) の遺伝子多型を同定した。

総赤血球内 MTX 濃度は 108±12.4 nmol/L であり、患者の内服用量依存性に細胞内濃度の増加を認めた。しかし、同じ用量の

患者群でも MTX 濃度は個々の患者で大きく変動した。そこで、PG 化の効率を評価するために、MTXPG3-5/1-2 比を求め、前述の遺伝子多型との関連を検討した。MTXPG3-5/1-2 比は、SLC19A1 と GGH の遺伝子多型では明らかな変動を認めなかったものの FPGS の遺伝子多型により優位に変動した。このことは、細胞内における MTXPG 化において、細胞内輸送蛋白である SLC19A1 や MTX 脱 PG 化蛋白である GGH よりも、細胞内 MTXPG 化蛋白である FPGS 酵素活性が主要な規定因子であることを強く示唆した。

次に MTX による副作用が出現するも減量にて内服継続しえた 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 188 例とで比較した。その結果、総濃度、MTXPG1-2 濃度、MTXPG3-5 濃度はいずれも明らかな差を認めなかった。これに対し、MTXPG3-5/1-2 濃度は、AE(+) 群において AE(-) 群よりも有意に低下していた。また、我々は、遺伝子多型の有無そのものと副作用出現の関連につき検討したが、遺伝子多型の有無と副作用の出現の間には明らかな有意差を認めず、遺伝子多型そのものは副作用の出現に影響を及ぼさなかった。

さらに、我々は、allele frequency を HapMap project のデータを用いて自験例と比較検討を行った。健常な日本人と今回の我々 RA 患者群の allele frequency は、2 群間に有意な差を認めず、RA の発症と遺伝子多型の有無は関連がないと考えられた。次に、Caucasian と比較すると FPGS 遺伝子 1994A>G、2572C>T の遺伝子変異の分布は有意に異なっていた。その他の遺伝子多型においては有意差を認めなかった。分布に有意差を認めた FPGS 遺伝子 1994A>G、2572C>T の遺伝子変異は、今回の研究において MTXPG3-5/1-2 濃度が有意な上昇を認めていた。すなわち、FPGS の遺伝子多型として 1994GG および 2572TT は、より高い FPGS 活性を有しており、MTXPG3-5/1-2 比率に反映されるとともに Caucasian との用量差を説明する一つの因子である可能性が示唆された。

MTX は、細胞内で dihydrofolate reductase と強く結合してその作用を阻害し、tetrahydrofolate (THF) の生成を抑制する。THF は DNA 合成に必須であるほか、セリン-グリシンの相互転換やメチオニン合成などのアミノ酸代謝にも必須な補酵素として働く。また MTX は、aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformilase (ATIC) も阻害し、aminoimidazole carboxamide ribonucleotide が細胞内に蓄積される。これが、アデノシン代謝系の酵素を阻害し、抗炎症作用を発揮するとされている。MTXPGs は MTX 自体より強く DHFR と ATIC と結合してその作用を阻害することが示されている。しかし、MTX の用量依存性副作用の機序は未だ明確ではなかった。しかしながら、我々は、MTXPG3-5/1-2 比率が AE (+) 群で有意に減少することを明らかにした。すなわち、MTXPG1-2 濃度が用量依存性副作用の一因である可能性が示唆された。

今回の研究から、細胞内 MTXPGs 濃度を調整する主な因子は、FPGS であることが示された。また、その遺伝子多型は、MTX 治療反応性や個体差を説明することが明らかとなり、MTX の用量の民族差の原因の一つと考えられた。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2711 号	氏 名	山 本 竜 大
学位審査担当者	主 査	杉 山 篤
	副 査	亀 田 秀 人
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	赤 坂 喜 清

学位審査論文の審査結果の要旨 :

申請者は、メトトレキサートポリグルタメート (MTXPG) 3-5/1-2 比率が solute carrier family 19 member 1 (SLC19A1) または  $\gamma$ -グルタミルヒドロラーゼ (GGH) の遺伝子多型には影響されず葉酸ポリグルタメート合成酵素 (FPGS) の遺伝子多型により変動することを見出し、細胞内における MTXPG 化において細胞内輸送蛋白である SLC19A1 や MTX 脱 PG 化蛋白である GGH よりも細胞内 MTXPG 化蛋白である FPGS 酵素活性が主要な規定因子であることを報告した。MTXPGs は、MTX 自体より強く葉酸代謝関連酵素を阻害して薬理作用を発現するが、用量依存性副作用の発生機序は不明のままであった。申請者は、MTXPG3-5/1-2 比率が AE (+) 群で有意に減少することを見だし、MTXPG1-2 濃度が用量依存性副作用の一因である可能性を示唆した。また、SLC19A1, FPGS, GGH の minor allele frequency は、試験対象 RA 患者群と健常日本人との間に明らかな差を認めず、関節リウマチの発症との関連はないことを示した。しかし、FPGS の SNPs のうちで、rs10106 と rs1544105 の minor allele frequency は、試験対象 RA 患者と健常欧米人との間で有意差を認め、この遺伝子多型を有する群において、MTXPG3-5/1-2 比率が高いことを見いだした。FPGS の遺伝子多型としての 1994GG および 2572TT は、より高い FPGS 活性を有しており、MTXPG3-5/1-2 比率に反映されるとともに個人差および欧米人との用量差を説明する一つの因子であることを示した。研究要旨の発表後、質疑応答がなされた。主な質問としては、MTX が RA に対する作用機序は何か。SLC19A1 は葉酸を取り込むか。MTXPG を 3-5/1-2 に分けた根拠は何か。PG 化すると細胞内により貯留するのか。リンパ球ではなく赤血球で測定した理由は何か。遺伝子中での SNP の位置はどこか、MTX の濃度測定の方法を説明してほしい。酵素活性と SNP との関係は、横断的検査で副作用に大きな差があるのか。前向き研究も含まれているのではないか。後ろ向き研究なので途中で試験から脱落した患者は含まれていないのではないか。3-5 と 1-2 のどちらが重要なのか。副作用は MTX の on target か off target のどちらに分類されるか、等の質問が主査・副査から出た。それらすべての質問に対して申請者は適切に返答した。以上より、本論文は、葉酸ポリグルタメート合成酵素は、関節リウマチ患者の細胞内メトトレキサートポリグルタメート濃度を調整する主要な因子であり、治療反応性の違いなどに影響を与えている可能性を明らかにしたすぐれた論文であり、審査委員全員一致で学位授与に相当すると判断し、学位審査会を終了した。