

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

山本 竜大

東邦大学医学部内科学講座膠原病学分野 (大森)

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には遺伝子多型の影響が知られている。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 folylpolyglutamate 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 271 名 (Mean \pm SD: 58.3 \pm 9.8 歳) を対象とした。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

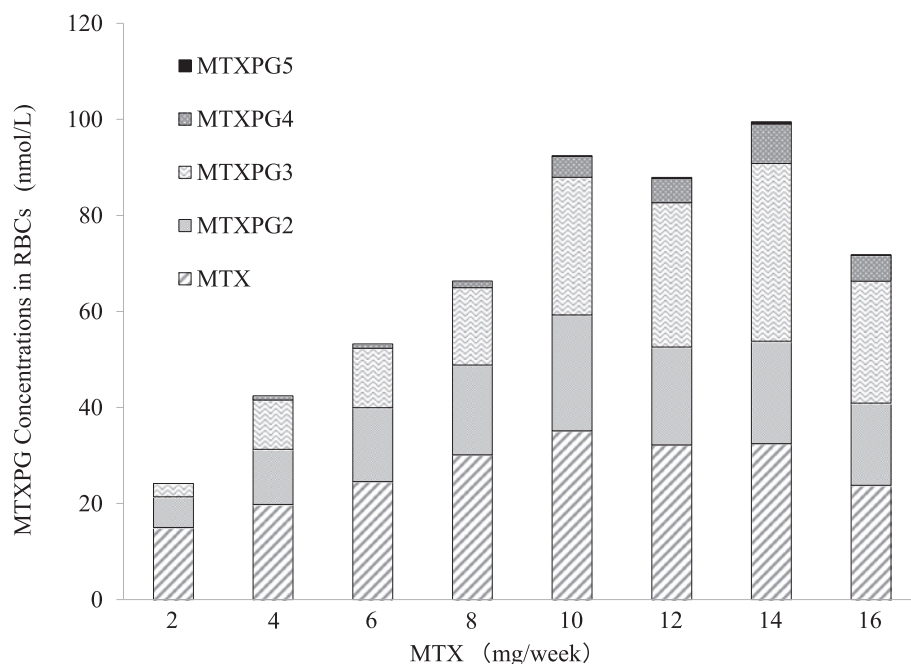


Fig. 1 Concentrations of methotrexate polyglutamates in red blood cells of patients with rheumatoid arthritis on methotrexate therapy. MTX = methotrexate, PG = polyglutamate, RBC = red blood cells

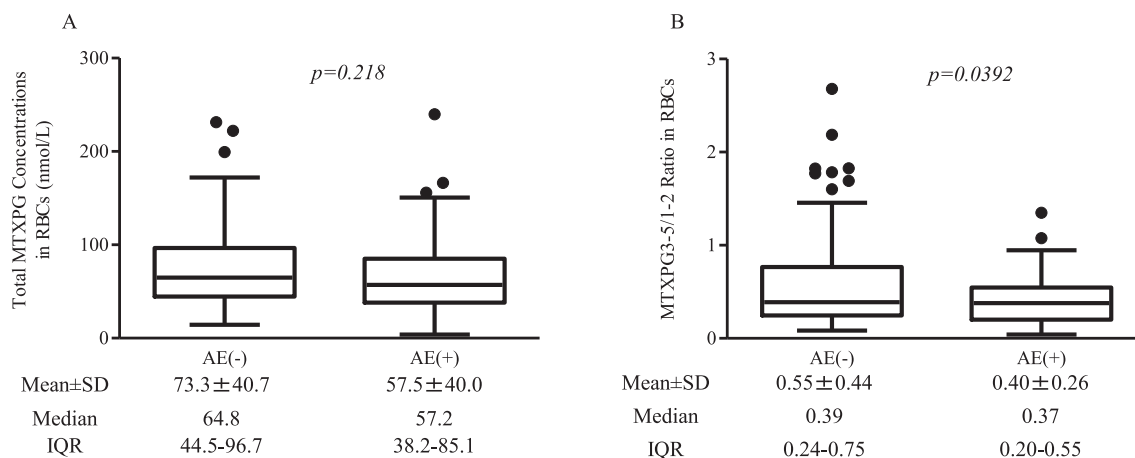


Fig. 2 Total methotrexate concentration and MTXPG3-5/1-2 ratio in red blood cells of rheumatoid arthritis patients with or without adverse events during methotrexate therapy. (A) Total methotrexate concentration. (B) MTXPG3-5/1-2 ratio.

Table 1 Demographic profile of the study population

	(n = 271)	AE (-) group (n = 188)	AE (+) group (n = 83)	P value
Age (years)	60.4 ± 12.6	60.0 ± 13.2	61.4 ± 13.8	<i>P</i> = 0.464
No. of men/women	59/212	48/140	11/72	<i>P</i> = 0.031
Duration (months)	107.3 ± 96.0	103.0 ± 93.9	117.0 ± 98.2	<i>P</i> = 0.176
Dose of MTX (mg/week)	8.7 ± 3.1	9.5 ± 3.0	6.9 ± 2.5	<i>P</i> < 0.001
Stage (I/II/III/IV)	(90/61/46/74)	(68/42/31/47)	(22/19/15/27)	
CRP (mg/dl)	0.22 ± 0.13	0.23 ± 0.35	0.19 ± 0.22	<i>P</i> = 0.942
ESR (mm/hour)	15.8 ± 13.3	15.4 ± 13.0	16.5 ± 15.6	<i>P</i> = 0.671
DAS28-ESR	2.29 ± 1.05	2.35 ± 1.09	2.17 ± 0.95	<i>P</i> = 0.227
CDAI	3.30 ± 4.26	3.80 ± 5.03	3.20 ± 4.88	<i>P</i> = 0.618
SDAI	5.51 ± 5.27	5.12 ± 6.74	5.14 ± 5.45	<i>P</i> = 0.881
BMI	22.0 ± 3.4	21.6 ± 3.6	22.6 ± 3.9	<i>P</i> = 0.889
BW (kg)	55.5 ± 11.2	56.4 ± 9.2	53.4 ± 10.8	<i>P</i> = 0.926
No. of patients using: Prednisolone	83 (30.6%)	53 (28.2%)	30 (36.1%)	<i>P</i> = 0.195
Other DMARDs	51 (18.8%)	24 (12.8%)	27 (32.5%)	<i>P</i> < 0.001
Biological agents	134 (49.4%)	82 (43.6%)	52 (62.7%)	<i>P</i> < 0.001

Data are the mean ± SD, n = number of patients

P values for comparison between the AE (-) and AE (+) groups were evaluated by the Mann-Whitney U test and Fisher's exact test.

MTX: methotrexate, stage: Steinblocker's classification of progression, CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate, DAS: disease activity score, CDAI: clinical disease activity index, SDAI: simplified disease activity index, BMI: body mass index, DMARDs: disease-modifying anti-rheumatic drugs

(rs11545078), 14269G>A (rs12681874) の遺伝子多型を同定した。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。

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

Table 2 Relationship between Polymorphisms of *SCL19A1*, *FPGS*, or *GGH* and the Intracellular MTXPG3-5/1-2 Ratio

SNP	rs No.	genotype	n	Intracellular MTXPG3-5/1-2 ratio		P value
				Mean \pm SD	Median [IQR]	
<i>SLC19A1</i>	rs1051266	wild type	94	0.479 \pm 0.356	0.367 [0.250-0.607]	$p = 0.475$
		hetero	130	0.556 \pm 0.466	0.427 [0.234-0.794]	
		homo	47	0.445 \pm 0.334	0.338 [0.157-0.707]	
<i>FPGS</i>	rs101106	wild type	130	0.457 \pm 0.375	0.345 [0.201-0.567]	$p = 0.006$
		hetero	115	0.503 \pm 0.394	0.396 [0.235-0.656]	
		homo	26	0.714 \pm 0.465	0.672 [0.364-0.957]	
	rs1054774	wild type	113	0.555 \pm 0.404	0.428 [0.264-0.788]	$p = 0.008$
		hetero	122	0.463 \pm 0.396	0.350 [0.201-0.562]	
		homo	36	0.417 \pm 0.362	0.319 [0.161-0.568]	
rs1544105	wild type	128	0.454 \pm 0.372	0.347 [0.202-0.565]	$p = 0.003$	
	hetero	120	0.506 \pm 0.391	0.396 [0.235-0.700]		
	homo	23	0.747 \pm 0.489	0.634 [0.385-1.030]		
<i>GGH</i>	rs719235	wild type	216	0.501 \pm 0.389	0.385 [0.238-0.652]	$p = 0.862$
		hetero	47	0.486 \pm 0.378	0.385 [0.184-0.633]	
		homo	8	0.645 \pm 0.702	0.382 [0.205-0.859]	
	rs1800909	wild type	223	0.495 \pm 0.397	0.397 [0.220-0.634]	$p = 0.882$
		hetero	36	0.524 \pm 0.401	0.255 [0.255-0.668]	
		homo	12	0.444 \pm 0.229	0.375 [0.297-0.710]	
rs3758149	wild type	232	0.498 \pm 0.401	0.383 [0.234-0.616]	$p = 0.889$	
	hetero	27	0.552 \pm 0.422	0.381 [0.240-0.869]		
	homo	12	0.441 \pm 0.241	0.385 [0.274-0.697]		
rs11545078	wild type	233	0.495 \pm 0.391	0.376 [0.234-0.634]	$p = 0.321$	
	hetero	37	0.558 \pm 0.437	0.430 [0.232-0.702]		
	homo	1	0.151	0.151		
rs12681874	wild type	81	0.452 \pm 0.332	0.362 [0.235-0.604]	$p = 0.070$	
	hetero	134	0.600 \pm 0.472	0.442 [0.254-0.812]		
	homo	60	0.493 \pm 0.418	0.345 [0.197-0.687]		

n = number of patients

p values for comparisons among 3 groups were evaluated by the Kruskal-Wallis test.

SLC19A1: reduced folate carrier 1, *FPGS*: folylpolyglutamyl synthase, *GGH*: gamma-glutamyl hydrolase

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、欧米人と比較すると*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

Table 3 Allele frequency in several genotypes of *SLC19A1* *FPGS* and *GGH* in our patients with rheumatoid arthritis and in general populations of Japanese and Caucasian

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

**p* values between our patients and Caucasian data were analyzed by Fisher's test.
SLC19A1: reduced folate carrier 1, *FPGS*: folylpolyglutamyl synthase, *GGH*: gamma-glutamyl hydrolase

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欧米人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。*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。

以上より今回の研究から、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、*MTX* 治療反応性や個体差を説明する因子の一つであることが示唆された。

本講演の要旨は、Scientific Reports 6, 35615, doi:10.1038/srep35615 (2016) に掲載された内容である。

山本竜大先生 略歴



- 平成 17 年 3 月 東邦大学医学部医学科卒業
平成 17 年 3 月 第 99 回医師国家試験合格 (医籍登録第 447744 号)
平成 17 年 4 月 東邦大学医療センター大森病院にて初期研修
平成 19 年 4 月 東邦大学医療センター大森病院膠原病科 レジデント
平成 19 年 4 月 東邦大学医療センター大森病院総合診療・急病センター出向 (平成 20 年 3 月迄)
平成 20 年 9 月 日本内科学会認定医取得 (第 38130 号)
平成 23 年 3 月 日本リウマチ学会リウマチ専門医取得 (第 5475 号)
平成 23 年 4 月 東邦大学大学院医学研究科博士課程 (生体応答系膠原病内科学専攻) 入学 (一般)
平成 25 年 4 月 東邦大学大学院医学研究科博士課程 (生体応答系膠原病内科学専攻) (社会人)
平成 25 年 4 月 東邦大学医療センター大森病院膠原病科 シニア・レジデント
平成 26 年 3 月 東邦大学大学院医学研究科博士課程 (生体応答系膠原病内科学) 退学
平成 26 年 4 月 東邦大学医学部内科学講座膠原病学分野 (大森) 助教
平成 27 年 4 月 足利赤十字病院内科 出向
平成 28 年 4 月 東邦大学医学部内科学講座膠原病学分野 (大森) 助教
平成 28 年 12 月 日本内科学会専門医取得 (第 26946 号)
平成 29 年 3 月 医学博士取得

DOI: 10.14994/tohoigaku.2018-005