

関節リウマチにおけるメトトレキサートの個別化療法を指向した
遺伝子および薬物動態解析

Genetic and pharmacokinetic analyses of methotrexate
in rheumatoid arthritis patients for personalized therapy.

本論文は静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士論文である

2015年3月
(March, 2015)

静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府

博士後期課程 薬科学専攻 臨床薬効解析学教室

田添 唯
Tazoe, Yui

目次

緒言.....	1
第1章 葉酸代謝関連タンパク遺伝子多型とメトトレキサートの薬効に関する検討.....	4
第1節 序論.....	4
第2節 対象および実験方法.....	5
1-2-1 関節リウマチ患者.....	5
1-2-2 同意取得および倫理的配慮.....	5
1-2-3 末梢静脈からの採血および血球分離.....	5
1-2-4 遺伝子多型解析.....	6
1-2-4-1 <i>DHFR</i> 19bp deletion 遺伝子型解析.....	6
1-2-4-2 <i>TS</i> (28bp tandem repeat, 6bp deletion) 遺伝子型解析.....	6
1-2-4-3 <i>ATIC</i> 347C>G 遺伝子型解析.....	7
1-2-4-4 <i>RFC1</i> 80G>A 遺伝子型解析.....	7
1-2-4-5 <i>GGH</i> (-401C>T, -453G>T, 452C>T) 遺伝子型解析.....	8
1-2-5 治療効果指標.....	10
1-2-6 統計解析.....	10
第3節 結果.....	11
1-3-1 患者背景.....	11
1-3-2 遺伝子多型頻度分布.....	11
1-3-3 多変量解析.....	16
第4節 考察.....	17
第2章 末梢血単核球および滑膜における葉酸トランスポーター遺伝子発現量の解析.....	18
第1節 序論.....	18
第2節 対象および実験方法.....	19
2-2-1 関節リウマチ患者.....	19
2-2-2 健常人.....	19
2-2-3 変形性関節症患者.....	19
2-2-4 同意取得および倫理的配慮.....	19
2-2-5 末梢静脈からの採血および血球分離.....	19
2-2-6 滑膜組織検体の処理.....	20
2-2-7 遺伝子多型解析.....	20
2-2-7-1 <i>PCFT</i> 928A>G 遺伝子型解析.....	20
2-2-7-2 <i>RFC1</i> -43T>C 遺伝子型解析.....	20
2-2-8 葉酸トランスポーターmRNA 発現解析.....	23
2-2-8-1 RNA 抽出.....	23
2-2-8-2 cDNA 合成.....	23
2-2-8-3 リアルタイム PCR.....	23

2-2-9	治療効果指標.....	23
2-2-10	統計解析.....	23
第3節	結果.....	24
2-3-1	末梢血単核球における葉酸トランスポーター遺伝子発現量解析.....	24
2-3-1-1	患者背景.....	24
2-3-1-2	疾患活動性と葉酸トランスポーター発現量の関連.....	24
2-3-1-3	遺伝子多型と葉酸トランスポーター発現量の関連.....	26
2-3-2	滑膜組織における葉酸トランスポーター遺伝子発現量解析.....	29
2-3-2-1	患者背景.....	29
2-3-2-2	疾患活動性と葉酸トランスポーター発現量の関連.....	30
2-3-2-3	滑膜組織と末梢血単核球の 葉酸トランスポーター遺伝子発現量の関連.....	32
第4節	考察.....	33
第3章	日本人リウマチ患者におけるメトトレキサートの治療薬物モニタリング.....	35
第1節	序論.....	35
第2節	対象および実験方法.....	36
3-2-1	関節リウマチ患者.....	36
3-2-2	同意取得および倫理的配慮.....	36
3-2-3	末梢静脈からの採血および血球分離.....	36
3-2-4	遺伝子多型解析.....	36
3-2-5	赤血球検体の処理.....	36
3-2-6	高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量.....	37
3-2-7	治療効果指標.....	38
3-2-8	統計解析.....	39
第3節	結果.....	40
3-3-1	高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量結果.....	40
3-3-2	MTX 単剤治療群と生物学的製剤併用治療群の比較.....	41
3-3-2-1	患者背景.....	41
3-3-2-2	多変量解析.....	44
3-3-3	治療効果および臨床検査値と遺伝子多型の関連.....	44
3-3-4	治療効果の解析.....	46
3-3-4-1	治療効果への影響因子の解析.....	46
3-3-4-2	疾患活動性と赤血球中 MTX-PGs 濃度の関連.....	47
3-3-5	臨床検査値の解析.....	50
3-3-5-1	臨床検査値への影響因子の解析.....	50
3-3-5-2	多変量解析.....	53
3-3-5-3	臨床検査値と赤血球中 MTX-PGs 濃度の関連.....	54
第4節	考察.....	56

総括.....	58
謝辞.....	60
参考文献.....	61

本論文中に用いた略語は以下の通りである。

3'-UTR: 3'-untranslated region

5'-UTR: 5'-untranslated region

5,10-CH₂THF: 5,10-methylenetetrahydrofolate

ABC: ATP-binding cassette

ACR: american college of rheumatology

AICAR: aminoimidazole carboxamide ribonucleotide

ALT: alanine transaminase

AST: aspartate transaminase

ATIC: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase

ATP: adenosine triphosphate

AUC: area under the blood concentration-time curve

BUN: blood urea nitrogen

Bp: base pair

CAD: collision gas

Ccr: creatinine clearance

CE: collision energy

CRP: C-reactive protein

CUR: curtain gas

CXP: collision cell exit potential

DAS: disease activity score

DHF: dihydrofolate

DHFR: dihydrofolate reductase

DMARDs: disease modifying anti-rheumatic drugs

DMHA: N,N-dimethylhexylamine

DP: declustering potential

dTMP: deoxythymidine monophosphate

dUMP: deoxyuridine monophosphate

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EP: entrance potential

ESI: electrospray ionization

ESR: erythrocyte sedimentation rate

EULAR: the european league against rheumatism

FAICAR: 5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribotide

FP: focusing potential

FPGS: folylpolyglutamate synthase

GGH: γ -glutamyl hydrolase
HBSS: Hank's balanced salt solution
IS: ion spray voltage
KL-6: sialylated carbohydrate antigen KL-6
LC/MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MCH: mean corpuscular hemoglobin
MCV: mean corpuscular volume
MMP-3: matrix metalloproteinase-3
MTX: methotrexate
MTX-PGs: methotrexate polyglutamates
NEB: nebulizer gas
NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs
OA: osteoarthritis
PBMC: peripheral blood mononuclear cell
PCFT: proton-coupled folate transporter
PCR: polymerase chain reaction
PD: pharmacodynamics
PK: pharmacokinetics
PLT: platelet count
QOL: quality of life
RA: rheumatoid arthritis
RBC: red blood cells
RF: rheumatoid factor,
RFC1: reduced folate carrier1
RFLP: restriction fragment length polymorphism
rs: reference SNP ID
SLC: solute carrier family
SNP: single nucleotide polymorphism
SPE: solid phase extraction
TDM: therapeutic drug monitoring
THF: tetrahydrofolate
TS: thymidylate synthase
VAS: visual analogue scale
WBC: white blood cell
以上 アルファベット順

緒言

関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)は、多発する関節炎と進行性関節破壊を主症状とし、関節外症状として肺、腎臓、皮下組織などにも病巣が広がる全身性炎症疾患である¹⁾。世界の人口の約1%がRAに罹患しており、現在、日本国内のRA患者は70~100万人といわれ、その数は高齢化に伴って年々増加する傾向にある¹⁾。男女の割合は1:5~6と圧倒的に女性に多く、発症年齢は30~50歳代、特に40歳代の働き盛りの女性に発症のピークがある¹⁾。RAは全身性エリテマトーデスやベーチェット病と同様に自己免疫性疾患の一つであり、完治が困難なため、生涯にわたって治療が必要となることが多い。RAによる関節破壊は進行性であるため、特に高齢となったRA患者では重度の身体的障害を有する 경우가多く、社会の高齢化が課題となる中、深刻な問題となっている。RAについては現在までに様々な自己抗原が同定され、免疫異常からなる慢性炎症性自己免疫疾患であることはこれまでの研究で明らかとなっている。自己免疫異常を生じると、まず関節の囲む滑膜に炎症が起き、滑膜が異常に増殖する。その後増殖した滑膜や免疫細胞が炎症性サイトカインを放出することで関節全体に炎症が広がり、軟骨や骨が破壊されて、関節が変形する。しかし、未だに自己抗原のメカニズムや、RAの詳しい病因、病態は明らかでない。

RAの治療は、基礎療法、薬物療法、手術療法、リハビリテーションの4つに大別されるが、RAの基本病態である免疫反応亢進と、それに伴う腫脹、疼痛を抑える基礎的治療は薬物療法による場合が多い。RAの薬物療法では、非ステロイド系抗炎症薬(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)や副腎皮質ホルモン、疾患修飾性抗リウマチ薬(disease modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs)が広く使用されている^{2,3)}。代表的なDMARDsとして葉酸代謝拮抗薬であるメトトレキサート(methotrexate, MTX, 商品名:リウマトレックス®他)がある。MTXのRAに対する有用性はこれまでも数多く確認されている²⁻⁵⁾。MTXは痛みや炎症を抑えるだけでなく、骨破壊も抑制し、長期的にRAの自然経過を改善することが臨床試験で示されており⁶⁾、価格や費用対効果などの面で現在でもRAの最も重要な薬物の一つであるとされている。MTXは週1回の間欠投与(12時間おき3回投与後5日間休薬)で、日本国内での投与量は週1回6~8mgが主流とされている^{3,7)}が、2011年2月に16mg/weekまで保険適用となり⁷⁾、日本人RA患者においてMTXの週8mgを超えた使用の有効性と安全性の確立が検討されている⁸⁾。以上の通りMTXの有効性は明らかであるが、有効投与量は個人により大きく異なることが報告されており⁹⁾、American College of Rheumatology (ACR)における20%改善度に基づけば、その効果は46~65%とばらつきがみられる¹⁰⁾。またMTXによる有害事象は少なくとも10~30%が有害事象のため中止せざるを得ない。MTXの副作用としては肝機能不全、腎機能不全、間質性肺炎、骨髄抑制や感染症、血球減少による口内炎、貧血、などがある^{7,11)}。これらの副作用を防ぐために定期的な臨床検査値のモニタリングが実施されるが、我が国においては検査費用が高額であるため頻繁に検査ができない項目もあり、そういった理由からMTXは投与量設定の難しい薬剤の一つである。MTXは主にreduced folate carrier 1 (RFC1; solute carrier family (SLC) 19A1) およびproton-coupled folate transporter (PCFT; SLC46A1)を介し能動輸送メカニズムによって細胞内に取り込まれる。RFC1は葉酸の吸収に関与する糖タンパクで、MTXの細胞膜透過においても重要な役割を担っており、MTXや葉酸以外にもイリノテカンなどの物質も細胞内に取り込むこ

とが報告されている¹²⁾。また、近年ヘムトランスポーターとして同定された PCFT も RFC1 とは違う特性を持ち、MTX を効率よく輸送することが見出されている¹³⁾。細胞内に取り込まれた後、MTX は folylpolyglutamate synthase (FPGS) によってポリグルタミル化される。ポリグルタミル化された MTX は、グルタミル酸が連続的に 6 個付加し、活性体 MTX-PGs に変換され¹⁴⁻¹⁶⁾ (図 I)、MTX の標的タンパク質へと薬効を及ぼす。MTX の標的タンパク質としては、dihydrofolate reductase (DHFR)、thymidylate synthase (TS)、5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase (ATIC) の存在が知られている。DHFR は、ジヒドロ葉酸(dihydrofolate, DHF)からテトラヒドロ葉酸(tetrahydrofolate, THF)への還元反応を触媒する酵素で、葉酸サイクルにおいて重要な役割を担っている。葉酸と類似した構造を持つ MTX によって DHFR が阻害されると、DHF から THF への反応が低下するため、結果的に核酸の合成が低下する¹⁷⁾。TS は、5,10-methylene tetrahydrofolate (5,10-CH₂-THF) から DHF への反応を触媒する酵素で、同時に dUMP から dTMP への反応を担い、ピリミジン合成に関与する酵素である^{18,19)}。ATIC は、プリン合成に関与する酵素で、aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) から 5-formamido-imidazole-4-carboxamide ribotide (FAICAR) への反応を触媒する^{20,21)}。MTX-PGs は薬効を現した後、 γ -glutamyl hydrolase (GGH) によって脱ポリグルタミル化され、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターによって能動的に細胞外へと排出される。GGH は、細胞内リソソームに存在するペプチド加水分解酵素であり、MTX-PGs を MTX へと変換することによって、細胞内からの MTX 排出を促進する^{22,23)}。MTX の細胞外への排出には主に ABCC1~ABCC4 および ABCG2 が寄与している^{24,25)}(図 II)。また RA 治療には生物学的製剤も積極的に導入され、画期的な進歩をもたらし、寛解も夢ではなくなってきたが、薬価が高く患者に経済的負担を与えることが大きな課題となっている²⁶⁾。

近年、患者の遺伝的背景を踏まえた上で治療を行う「オーダーメイド医療」が注目されている。薬物代謝酵素やトランスポーターをコードする遺伝子に存在する多型や、血中薬物濃度の変化によって、薬物の効果や副作用発現が影響を受けることが知られている²⁷⁻³³⁾。薬物を投与する前に薬剤応答性に関与する遺伝子の多型や発現量解析を行い、投与中も血中薬物濃度がモニターできれば、個人ごとの副作用への対処を事前に準備でき、薬物治療を安全かつ効果的に行うことができると期待されている。既に医薬品添付文書に遺伝子情報に関する記載がされている薬剤もある³⁴⁻⁴¹⁾。しかし、そのような薬剤は少数であり、今後は様々な薬剤、特に抗 RA 薬のように薬効や副作用の個人差が大きな薬剤において、遺伝子や血中薬物濃度と薬効・副作用に関する臨床研究が必要とされている。現在までに RA における MTX の薬効や毒性に関しては、患者個人の遺伝的背景²⁷⁻²⁹⁾や、血中薬物濃度³⁰⁻³³⁾などをマーカーとした様々な研究が行われているが、日本人 RA 患者において、それらと薬効や副作用との関連については網羅的に研究している例はほとんどない。そこで本研究では、第 1 章で RA 患者における葉酸代謝系に関わるタンパク質の遺伝子多型頻度と MTX の抗炎症効果との関連について検討した。また、第 2 章では MTX を細胞へ取り込む葉酸トランスポーターに注目し、末梢血単核球と滑膜細胞における葉酸トランスポーター遺伝子発現量を解析し、薬効との関連を検討した。さらに第 3 章では MTX 治療を受けている日本人 RA 患者の赤血球中 MTX および MTX の活性体である MTX ポリグルタメート(MTX polyglutamates, MTX-PGs)濃度を継続的に測定し、薬効や臨床検査値との関連について検討した。

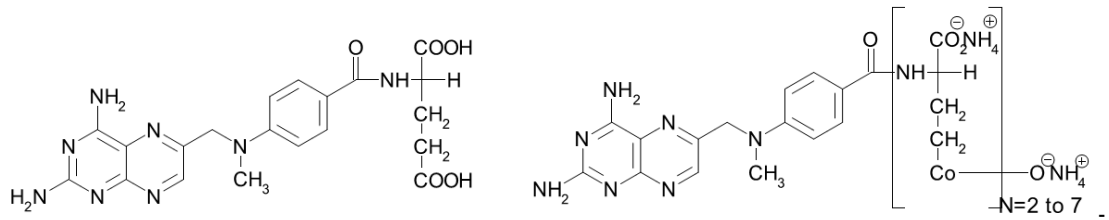


図 I . MTX (左)と MTX-PGs (右)

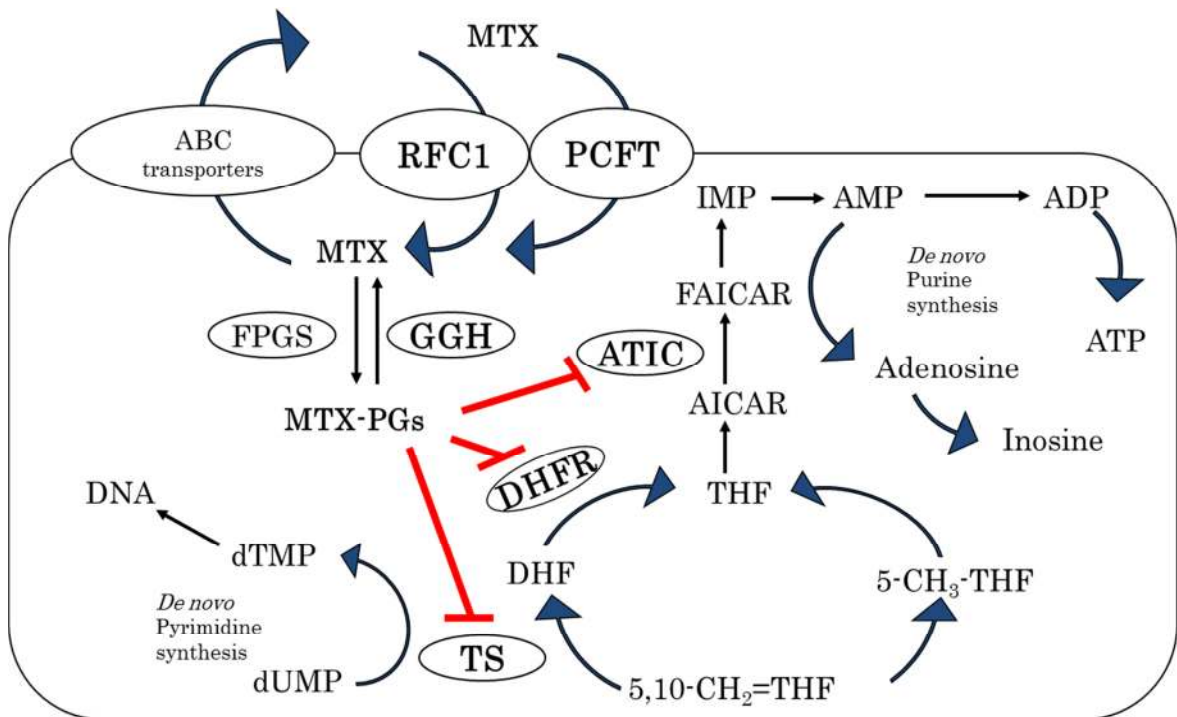


図 II . MTX の細胞内動態

第 1 章 葉酸代謝関連タンパク遺伝子多型とメトトレキサートの薬効に関する検討

第 1 節 序論

RA の治療薬として多く処方される葉酸代謝拮抗剤 MTX⁴²⁾は、RFC1 を介し細胞内に入る。RFC1 遺伝子のエクソン 2 に存在する 80G>A 一塩基多型(single nucleotide polymorphism,SNP) (rs1051266) により、RFC1 タンパク質の 27 番目のアミノ酸であるヒスチジン(His)がアルギニン(Arg) に変異する。このアミノ酸は最初の膜貫通ドメインに存在し、RFC1 の活性に影響する可能性があると考えられている⁴³⁾。

GGH は MTX-PGs を脱ポリグルタミル化し MTX に変換する加水分解酵素であるが、GGH 遺伝子には複数の SNPs が同定されており、プロモーター領域に存在する -401C>T (rs3758149) 、 -354G>T (rs719235) の 2 つの SNPs はいずれも GGH 遺伝子のプロモーター活性を上昇させることにより GGH の発現レベルを上昇させ、MTX のポリグルタメート体レベルに影響を与えることが知られている⁴⁴⁾。また、GGH 遺伝子のエクソン 5 に存在する 452C>T SNP (rs11545078) により、127 番目のアミノ酸であるスレオニン(Thr)がイソロイシニン(Ile)に変異する⁴⁵⁾。これにより、GGH による長鎖 MTX-PGs に対する水解活性が有意に変化し、MTX-PGs が細胞内に蓄積しやすくなり、有害反応が起こりやすいと考えられている⁴⁶⁾。

また、MTX の標的タンパク質には DHFR、TS、ATIC が存在する。DHFR 遺伝子のイントロン 1 には 19bp deletion (rs70991108)の存在が知られており、欠損する 19bp の塩基配列の中に転写因子 Sp1 の結合部位が存在するため、DHFR の発現量に影響すると考えられている¹⁷⁾。TS 遺伝子の 5'-非翻訳領域(5'-untranslated region,5'-UTR)には、28 bp の繰り返し配列多型 (rs45445694)の存在が知られている。この 28 bp の塩基はエンハンサーとして働くため、繰り返し配列の数が増えると mRNA の発現量が増加することが報告されている^{47,48)}。また、3'-非翻訳領域(3'-untranslated region,3'-UTR)には 6 bp deletion (rs34489327) の存在が知られている。6 bp deletion 型では wild 型に比べて mRNA の安定性が低下し、タンパク質レベルで TS の発現量が低下すると考えられている⁴⁹⁾。また、ATIC 遺伝子のエクソン 5 に存在する 347 C>G SNP (rs2372536) によって、ATIC タンパク質の 116 番目のアミノ酸であるスレオニン(Thr)がセリン(Ser)に変異する。この SNP が ATIC の活性に及ぼす影響についてはまだ不明な部分が多いが、MTX の治療効果や毒性発現との関連についていくつかの報告がある⁵⁰⁻⁵²⁾。

以上のことから、RFC1 80G>A、GGH -401C>T、-354G>T、452C>T は細胞内での MTX の薬物動態 (pharmacokinetics, PK)を反映し、MTX のターゲット分子 DHFR、TS、ATIC の遺伝子多型である DHFR 19 bp deletion、TS 28 bp tandem repeat、6 bp deletion、ATIC 347C>G は MTX の薬力学 (pharmacodynamics, PD)を反映すると予想される。本章では、日本人 RA 患者におけるこれらの遺伝子多型と MTX の治療効果との関連について研究を行った。

第2節 対象及び実験方法

1-2-1 関節リウマチ患者

2010年6月から2013年12月の期間に、JA静岡厚生病院リウマチ科において治療中である日本人RA患者のうち、MTXおよび生物学的製剤を使用している437名から文書による同意を得た。RAの診断は、米国リウマチ学会の基準に従った⁴²⁾。それらの患者のうち、2ヶ月以上MTXを服用しており、2013年12月までに2回以上採血をしていて臨床検査値の変化を追跡調査できる170名の患者を選択し、本研究の対象とした。170名の患者のうち、MTX単独による治療を行っている患者群(MTX単剤群)は89名、生物学的製剤を併用している患者群(生物学的製剤併用群)は81名であった。MTXの薬効に影響を与えることが知られている免疫抑制剤(タクロリムス水和物(商品名:プロGRAF®)、レフルノミド(商品名:アラバ®)、ミゾリビン(商品名:ブレディニン®))を併用している患者は除外した。

1-2-2 同意取得および倫理的配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言および文部科学省・厚生労働省・経済産業省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、静岡県立大学研究倫理審査委員会およびJA静岡厚生病院倫理委員会の審査・承認のもと実施した。すべての被験者に研究の内容を説明し、文書により同意取得を行った。得られた個人情報、連結可能匿名化を行い管理者が厳重に保管した。

1-2-3 末梢静脈からの採血および血球分離

RA患者から文書による同意取得後、EDTA-2Naベノジェット真空採血管(テルモ株式会社、東京)を用いて末梢静脈血5mLを採取した。採取した血液検体は、ただちに匿名化を行い、個人情報および血液検体は、別々にして厳重に管理した。血液検体は、JA静岡厚生病院検査科において4℃、1,400×gで5分間遠心して血漿を単離した後、静岡県立大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学講座にて赤血球(red blood cell, RBC)と末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)の単離・精製を行った。

PBMCについては、バフィーコートを手動でHank's balanced salt solution (HBSS) 2 mLに懸濁し、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) 2 mLに重層して、室温、400×gで25分間遠心した。得られたPBMC層をHBSS 4 mLに懸濁して、室温、2,000×gで10分間遠心した。その後、上清を捨て、HBSS 1 mLに懸濁して、室温、660×gで10分間遠心し、上清を捨てて-80℃で保存した。

RBCは、2倍量の氷冷したHBSSを加えて転倒混和した後、4℃、1,000×gで10分間遠心して上清を捨てる操作を2回繰り返し、室温、20,000×gで10分間遠心を行った後、上清を捨てて-80℃にて保存した。

1-2-4 遺伝子多型解析

−80℃で保存していた血球画分から、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)の血液スピンプrotocolに従って、白血球由来のゲノム DNA を抽出し、−20℃で保存した。

1-2-4-1 *DHFR* 19 bp deletion 遺伝子型解析

DHFR 19 bp deletion は、polymerase chain reaction (PCR) 法により解析した。PCR 反応液 (15 μL)には、ゲノム DNA 30~50 ng、1.5 mM MgCl₂、各 0.5 μM フォワードプライマーおよびリバースプライマー (ファスマック、神奈川)、各 200 μM dNTP 混合液 (Life Technologies, Carlsbad, CA)、HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen) 0.5 units、Q-solution (Qiagen) を加えた。増幅は、サーマルサイクラー (iCycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を用いて 95℃5分に続き 94℃15秒、64℃15秒、72℃30秒を 40 サイクル行い、その後 72℃10分の最終伸長反応を行った。得られた PCR 産物 (100 bp あるいは 119 bp)について、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン、東京)を添加した 3.5%アガロースゲル (Agarose S)で電気泳動を行い、UV 照射により産物を確認した。遺伝子型は、PCR 産物のサイズによって決定した(図 1-1)。また、いくつかのサンプルの遺伝子多型は、PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いたダイレクト・シーケンシング法にてバリデーションを行った。なお、使用したプライマーの配列、PCR 条件および参考文献は表 1-1 に示した。

1-2-4-2 *TS* (28 bp tandem repeat、6 bp deletion) 遺伝子型解析

TS 28 bp tandem repeat は、PCR 法により解析した。PCR 反応液 (15 μL)には、ゲノム DNA 30~50 ng、1.5 mM MgCl₂、各 0.5 μM フォワードプライマーおよびリバースプライマー (ファスマック)、各 200 μM dNTP 混合液 (Life Technologies)、HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen) 0.5 units、Q-solution (Qiagen) を加えた。増幅は、サーマルサイクラー (iCycler)を用いて 95℃5分に続き 94℃10秒、60℃30秒、72℃30秒を 40 サイクル行い、その後 72℃10分の最終伸長反応を行った。得られた PCR 産物について、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン)を添加した 3.5%アガロースゲル (Agarose S)で電気泳動を行い、UV 照射により産物を確認した。遺伝子型は、各遺伝子型特異的 PCR 産物の有無によって決定した (図 1-1)。なお、使用したプライマーの配列、PCR 条件および参考文献は表 1-1 に示した。

TS 6 bp deletion は、アレル特異的 PCR 法により解析した。PCR 反応液 (15 μL)には、ゲノム DNA 30~50 ng、1.5 mM MgCl₂、各 0.3 μM wild アレル特異的または del アレル特異的フォワードプライマーおよびリバースプライマー (ファスマック)、各 200 μM dNTP 混合液 (Life Technologies)、HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen) 0.5 units を加えた。増幅は、サーマルサイクラー (iCycler)を用いて 95℃5分に続き 94℃10秒、60℃20秒、72℃30秒を 40 サイクル行い、その後

72°C 10 分の最終伸長反応を行った。得られた PCR 産物について、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を添加した 2.5% アガロースゲル (Agarose S) で電気泳動を行い、UV 照射により産物を確認した。遺伝子型は、各アレル特異的 PCR 産物の有無によって決定した (図 1-1)。また、いくつかのサンプルの遺伝子多型は、PRISM 310 (Applied Biosystems) を用いたダイレクト・シーケンス法にてバリデーションを行った。なお、使用したプライマーの配列、PCR 条件および参考文献は表 1-1 に示した。

1-2-4-3 *ATIC* 347C>G 遺伝子型解析

ATIC 347G>C の SNP は、アレル特異的 PCR 法により解析した。PCR 反応液 (15 μ L) には、ゲノム DNA 30~50 ng、1.5 mM MgCl₂、各 0.3 μ M フォワードプライマーおよび G アレル特異的または C アレル特異的リバースプライマー (ファスマック)、各 200 μ M dNTP 混合液 (Life Technologies)、HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen) 0.5 units、Q-solution (Qiagen) を加えた。増幅は、サーマルサイクラー (iCycler) を用いて 95°C 5 分に続き 94°C 15 秒、52°C 30 秒、72°C 45 秒を 45 サイクル行い、その後 72°C 10 分の最終伸長反応を行った。得られた PCR 産物について、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を添加した 2.5% アガロースゲル (Agarose S) で電気泳動を行い、UV 照射により産物を確認した。遺伝子型は、各アレル特異的 PCR 産物の有無によって決定した (図 1-1)。また、いくつかのサンプルの遺伝子多型は、PRISM 310 (Applied Biosystems) を用いたダイレクト・シーケンス法にてバリデーションを行った。なお、使用したプライマーの配列、PCR 条件および参考文献は表 1-1 に示した。

1-2-4-4 *RFC1* 80G>A 遺伝子型解析

RFC1 80G>A の SNP は、PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法により解析した。PCR 反応液 (15 μ L) には、ゲノム DNA 30~50 ng、1.5 mM MgCl₂、各 0.3 μ M フォワードプライマーおよびリバースプライマー (ファスマック)、各 50 μ M dNTP 混合液 (Life Technologies)、HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen) 0.5 units、Q-solution (Qiagen) を加えた。増幅は、サーマルサイクラー (iCycler) を用いて 95°C 5 分に続き 95°C 15 秒、60°C 30 秒、72°C 45 秒を 45 サイクル行い、その後 72°C 10 分の最終伸長反応を行った。得られた 231 bp の PCR 産物に、10 U *Hha* I (New England Biolabs, Beverly, MA)、10 \times NE buffer 4、10 \times BSA を加え全量 10 μ L として、37°C で一晩反応させ、制限酵素処理を行った。その後、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を添加した 2.5% アガロースゲル (Agarose S) で電気泳動を行い、UV 照射により切断産物を確認した。遺伝子型は、PCR 産物の切断パターンによって決定した (図 1-1)。また、いくつかのサンプルの遺伝子多型は、PRISM 310 (Applied Biosystems) を用いたダイレクト・シーケンス法にてバリデーションを行った。なお、使用したプライマーの配列、PCR 条件および参考文献は表 1-1 に示した。

1-2-4-5 *GGH*(-401C>T, -354G>T, 452C>T) 遺伝子型解析

GGH -401C>T および-354G>T, 452C>T の SNPs は、PCR-RFLP 法により解析した。*GGH* -401C>T および-354G>T の 2 つの SNPs は、PCR 反応液(20 μ L)に、ゲノム DNA 30~50 ng、1.5 mM MgCl₂、各 0.5 μ M フォワードプライマーおよびリバースプライマー (ファスマック)、各 50 μ M dNTP 混合液 (Life Technologies)、HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen) 0.5 units、Q-solution (Qiagen) を加えた。増幅は、サーマルサイクラー (iCycler)を用いて 95°C 5 分に続き 94°C 15 秒、63°C 30 秒、72°C 45 秒を 40 サイクル行い、その後 72°C 10 分の最終伸長反応を行い、196 bp の PCR 産物を得た。

GGH -401C>T の SNP は、得られた 196 bp の PCR 産物に、10 U *Bs*II (New England Biolabs)、10 \times NE buffer 3 を加え全量 15 μ L として、37°C で 3 時間反応させ、制限酵素処理を行った。

GGH -354G>T の SNP は、得られた 196 bp の PCR 産物に、10 U *Afl*II (New England Biolabs)、10 \times NE buffer 4、10 \times BSA を加え全量 10 μ L として、37°C で 3 時間反応させ、制限酵素処理を行った。

GGH 452C>T の SNP は、PCR 反応液(15 μ L)に、ゲノム DNA 30~50 ng、1.5 mM MgCl₂、各 0.5 μ M フォワードプライマーおよびリバースプライマー (ファスマック)、各 50 μ M dNTP 混合液 (Life Technologies)、HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen) 0.5 units、Q-solution (Qiagen) を加えた。増幅は、サーマルサイクラー (iCycler)を用いて 95°C 5 分に続き 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 45 秒を 40 サイクル行い、その後 72°C 10 分の最終伸長反応を行い、286 bp の PCR 産物を得た。得られた 286 bp の PCR 産物に、10 U *Ase* I (New England Biolabs)、10 \times NE buffer 3 を加え全量 10 μ L として、37°C で一晩反応させ、制限酵素処理を行った。

各々の制限酵素処理を行った後、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン)を添加した 4%アガロースゲル (Agarose S)で電気泳動を行い、UV 照射により切断産物を確認した。遺伝子型は、PCR 産物の切断パターンによって決定した (図 1-1)。また、いくつかのサンプルの遺伝子多型は、PRISM 310 (Applied Biosystems)を用いたダイレクト・シーケンス法にてバリデーションを行った。なお、使用したプライマーの配列、PCR 条件および参考文献は表 1-1 に示した。

表 1-1. 各遺伝子多型解析の条件

遺伝子	多型	プライマー配列	アニーリング 温度	制限酵素	制限酵素 反応温度	参考文献
<i>DHFR</i>	19 bp deletion	F:5'-TCAGGTATCTGCCGGGCC-3' R:5'-CGCAAGTCTGGCCCCATC-3'	64°C	—	—	37)
<i>TS</i>	tandem repeat	F:5'-CGTGGCTCCTGCGTTTCC-3' R:5'-GAGCCGGCCACAGGCAT-3'	60°C	—	—	47)
	6 bp deletion	F:5'-TGTAGAGTGTGGTTATGAACTTTG <u>A</u> -3' (for wild allele) F:5'-TGTAGAGTGTGGTTATGAACTTTG <u>T</u> -3' (for del allele) R:5'-TTAGGAAGGAACTGAGCAGATAAGT-3'	60°C	—	—	49)
<i>ATIC</i>	347C>G	F:5'-CCTAGATAGCTGTAAACCAC-3' R:5'-ACAGCCTCCTCAACGG <u>G</u> -3' (for C allele) R:5'-ACAGCCTCCTCAACGG <u>C</u> -3' (for G allele)	52°C	—	—	—
<i>RFC1</i>	80G>A	F:5'-AGTGTACCTTCGTCCCCTC-3' R:5'-CTCCCGCGTGAAGTTCTT-3'	60°C	<i>Hha</i> I	37°C	53)
<i>GGH</i>	-401C>T	F:5'-TAGAATCCCCTGCCAGCCTCCTCG-3' R:5'-TAAGCGGAGACTCTGGAAACGACT-3'	63°C	<i>Bs</i> I	55°C	45)
	-354G>T	F:5'-TAGAATCCCCTGCCAGCCTCCTCG-3' R:5'-TAAGCGGAGACTCTGGAAACGACT-3'	63°C	<i>Afl</i> II	37°C	45)
	452C>T	5'-GTGCCTATTTGGTTATGACA-3' 5'-CTACTTACTAATCCTGCCCA-3'	55°C	<i>Ase</i> I	37°C	45)

F: forward primer, R: reverse primer

1-2-5 治療効果指標

本研究では、RA の疾患活動性の指標として disease activity score (DAS) 28⁵⁴⁾を用いた。DAS28 は、疼痛関節数、腫脹関節数、C-reactive protein (CRP) 値、患者の健康状態をスコア化した visual analogue scale (VAS) を用い、以下の式で計算した。

$$\text{DAS28} = 0.568 \sqrt{\text{疼痛関節数}} + 0.28 \times \sqrt{\text{腫脹関節数}} + 0.36 \times \text{LN}\{\text{CRP} + 1\} + 0.014 \times \text{VAS} + 0.96$$

また、クレアチニン・クリアランス (Creatinine Clearance, Ccr)は以下のような Cockcroft-Gault 式によって計算した⁵⁵⁾。

$$\text{Ccr} = \frac{(140 - \text{年齢}) \times \text{体重(kg)}}{72 \times \text{血清クレアチニン濃度(mg/dL)}} \quad (\text{女性の場合は} \times 0.85)$$

糖質コルチコイドの投与量については、5 mg の prednisolone が、20 mg の hydrocortisone、750 µg の dexamethasone、750 µg の betamethasone と等量として、prednisolone 換算量として算出した⁵⁶⁾。

患者情報として年齢、身長、体重、性別、MTX 処方量、治療経過などを JA 静岡厚生病院の診療録より取得した。

1-2-6 統計解析

遺伝子型頻度について、Hardy-Weinberg 平衡式による予測値と実測値の比較および MTX 治療群と生物学的製剤併用治療群の各遺伝子多型の頻度分布の比較には χ^2 検定を用いた。患者背景における性別の比較は χ^2 検定を用いて行い、その他の項目については Mann-Whitney 検定を用いて行った。多変量解析は、多重ロジスティック回帰分析を行った。有意水準は 5%とし、すべての統計解析は PASW statistics 18 (SPSS, Chicago, IL) を使用して行った。

第3節 結果

1-3-1 患者背景

RA 患者 170 名 (MTX 単剤群 89 名、生物学的製剤併用治療群 81 名) の患者背景を表 1-2 に示した。

表 1-2. 患者背景

	RA 患者		p 値 ^{a)}
	MTX 群 (n=89)	生物学的製剤 併用群 (n=81)	
年齢 (歳)	66 (28-85)	56 (30-84)	<0.001
性別 (男性/女性)	12/77	12/69	0.803
体重 (kg)	50.0 (34.5-84.0)	52.0 (39.0-85.0)	0.072
罹病期間 (年)	11.0 (1.0-28.0)	10.5 (2.0-32.0)	0.523
クレアチニン・クリアランス (mL/min)	72.7 (32.4-133.5)	90.3 (42.4-181.5)	<0.001
MTX 投与量 (mg/week)	6.0 (2.0-10.0)	8.0 (4.0-12.0)	0.003
経口糖質コルチコイド投与量 [†] (mg/day)	0.0 (0.0-10.0)	0.0 (0.0-7.5)	0.209
DAS28	2.31 (1.23-4.87)	2.35 (1.23-4.57)	0.552

性別の項目以外は、中央値(範囲)で示した。

[†]全ての糖質コルチコイド用量をプレドニゾロン用量に換算した。

a) MTX 単剤群と生物学的製剤併用群の比較(Mann-Whitney 検定)

1-3-2 遺伝子多型頻度分布

遺伝子多型解析結果におけるアガロース電気泳動の結果を図 1-1 に示した。MTX 治療群 89 名および生物学的製剤併用治療群 81 名における MTX の標的タンパクにおける遺伝子多型(*DHFR* 19 bp deletion、*TS* 6 bp deletion、28 bp tandem repeat、*ATIC* 347C>G)の解析結果を表 1-3 に示し、細胞内葉酸代謝に関わる2つのタンパク質の計4つのSNPs (*RFC1* 80G>A、*GGH* -401C>T、

– 354G>T、452C>T) の解析結果を表 1-4 に示した。両群におけるすべての分布は Hardy-Weinberg 平衡に従っていた。両群間における遺伝子型の分布を比較したところ、*RFC1* 80G>A SNP においてのみ有意差が認められた ($p=0.014$)。

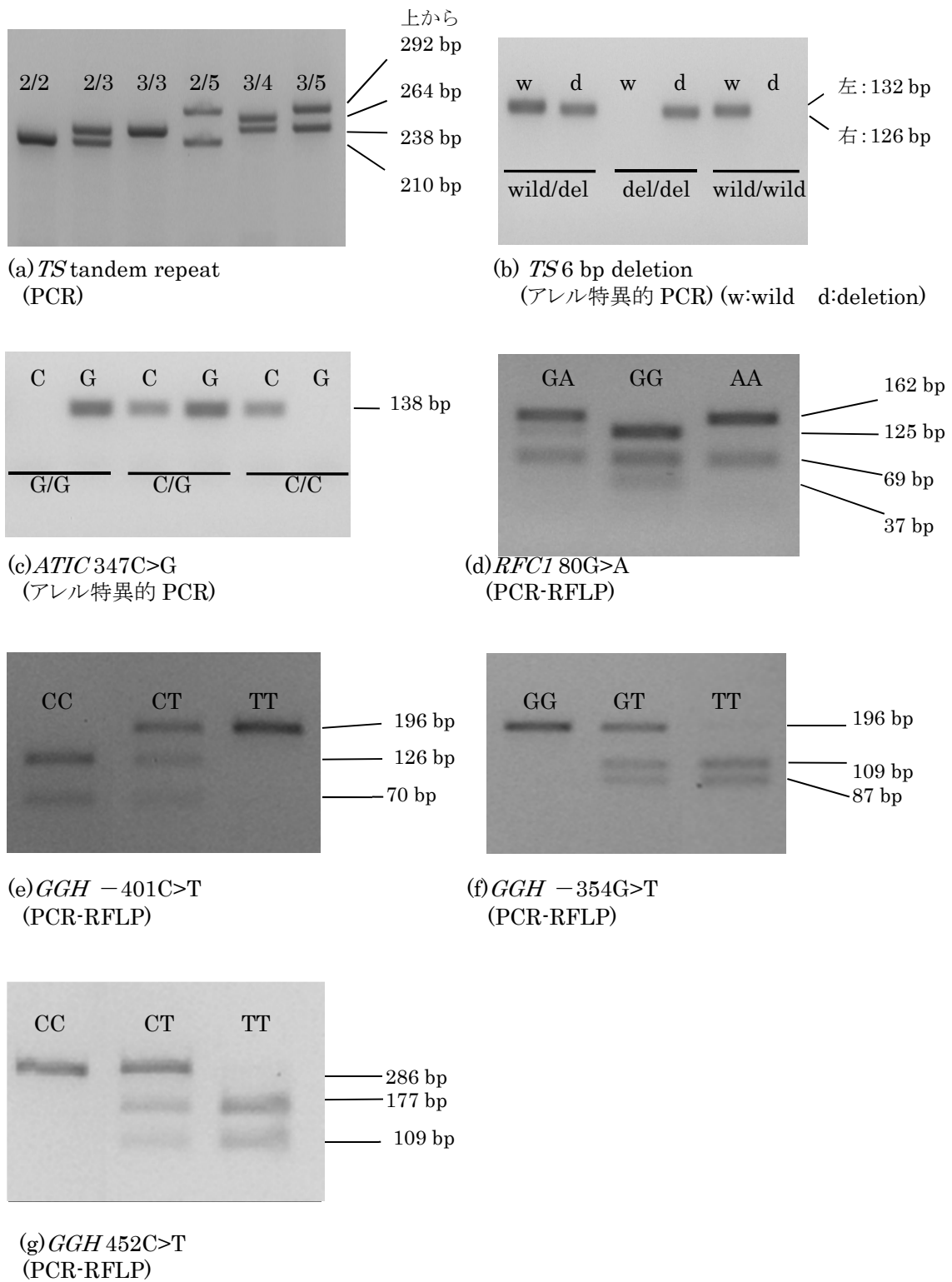


図 1-1. 各遺伝子多型解析におけるアガロース電気泳動結果

表 1-3. MTX の標的タンパクにおける遺伝子多型の解析結果

		遺伝子型	人数	頻度(%)	アレル頻度	<i>p</i> 値 ^{a)}	<i>p</i> 値 ^{b)}			
<i>DHFR</i> 19bp deletion	MTX 群	wild/wild	10	11.2	wild 0.287	0.751	0.751			
		wild/del	31	34.8						
		del/del	48	53.9	del 0.713					
		計	89							
	生物学 的製剤 併用群	wild/wild	10	11.8	wild 0.321	0.818				
		wild/del	32	37.6						
		del/del	39	45.9	del 0.679					
		計	81							
		<hr/>								
		m : 変異アレル								
<i>TS</i> tandem repeat	MTX 群	2/2	27	30.3	2 0.478	0.124	0.141			
		2/m	31	34.8						
		m/m	31	34.8	m 0.522					
		計	89							
	生物学 的製剤 併用群	2/2	15	17.6	2 0.358	0.274				
		2/m	28	32.9						
		m/m	38	44.7	m 0.642					
		計	81							
		<hr/>								
		m : 変異アレル								
<i>TS</i> 6bp deletion	MTX 群	wild/wild	12	13.5	wild 0.348	0.948	0.461			
		wild/del	38	42.7						
		del/del	39	43.8	del 0.652					
		計	89							
	生物学 的製剤 併用群	wild/wild	12	14.1	wild 0.401	0.948				
		wild/del	41	48.2						
		del/del	28	32.9	del 0.599					
		計	81							
		<hr/>								
		<i>ATIC</i> 347C>G	MTX 群	C/C	41			46.1	wild 0.685	0.941
C/G	40			44.9						
G/G	8			9.0	del 0.315					
計	89									
生物学 的製剤 併用群	C/C		43	50.6	wild 0.747	0.674				
	C/G		35	41.2						
	G/G		3	3.5	del 0.253					
	計		81							

a) Hardy-Weinberg 平衡式による予測値と実測値の比較(χ^2 検定)

b) MTX 群と生物学的製剤併用群の頻度の比較(χ^2 検定)

表 1-4. 細胞内葉酸代謝に関わるタンパク質における遺伝子多型の解析結果

		遺伝子型	人数	頻度(%)	アレル頻度	<i>p</i> 値 ^{a)}	<i>p</i> 値 ^{b)}
<i>RFC1</i> 80G>A	MTX 群	G/G	14	15.7	G 0.410	0.953	0.014
		G/A	45	50.6			
		A/A	30	33.7	A 0.590		
		計	89				
	生物学的製剤併用群	G/G	23	27.1	G 0.562	0.676	
		G/A	45	52.9			
		A/A	13	15.3	A 0.438		
		計	81				
<i>GGH</i> -401C>T	MTX 群	C/C	65	73.0	C 0.843	0.588	0.368
		C/T	20	22.5			
		T/T	4	4.5	T 0.157		
		計	89				
	生物学的製剤併用群	C/C	52	61.2	C 0.802	1.000	
		C/T	26	30.6			
		T/T	3	3.5	T 0.198		
		計	81				
<i>GGH</i> -354G>T	MTX 群	G/G	79	88.8	G 0.944	1.000	0.359
		G/T	10	11.2			
		T/T	0	0.0	T 0.056		
		計	89				
	生物学的製剤併用群	G/G	68	80.0	G 0.920	0.828	
		G/T	13	15.3			
		T/T	0	0.0	T 0.080		
		計	81				

a) Hardy-Weinberg 平衡式による予測値と実測値の比較(χ^2 検定)

b) MTX 単剤群と生物学的製剤併用群の頻度の比較(χ^2 検定)

1-3-3 多変量解析

単変量解析の結果、MTX 単剤群と生物学的製剤併用群の両群間で違いが認められた年齢、体重、クレアチニン・クリアランス、MTX 投与量、*RFC1 80G>A* について、多変量解析を実施した。上記 5 種類の項目を独立変数とし、尤度比による変数増加法を用いた多重ロジスティック回帰分析を行った (表 1-5)。事前に変数の散布図を観察し、著しく直線関係を示すような変数は存在しないことを確認した。モデル χ^2 検定の結果は $p<0.01$ で有意であった。回帰式の適合性を示す Hosmer-Lemeshow の検定結果は $p = 0.966$ であった。判別率的中率は 72.0% であった。体重、クレアチニン・クリアランスおよび MTX 投与量は p 値が各々 0.453、0.751、0.125 であったため、回帰式には含まれなかった。

表 1-5. MTX 群と生物学的製剤併用群における多変量解析

	偏回帰係数	オッズ比(95%CI)	p 値
年齢	-0.078	1.082 (1.048-1.116)	<0.001
<i>RFC1 80G>A</i>	0.821	2.273 (1.358-3.804)	0.002
体重	—	—	0.453
クレアチニン・ クリアランス	—	—	0.751
MTX 投与量	—	—	0.125
モデル χ^2 検定 $p<0.01$			
判別率的中率 72.0%			

第4節 考察

MTX は関節リウマチのアンカードラッグとして用いられる葉酸代謝拮抗薬である。その有効性は明らかであるが、薬効には個人差があることが知られ、その原因として葉酸の取り込みや細胞内葉酸代謝に関わる酵素群、MTX の標的タンパク質群の遺伝子多型が報告されている^{50-52,57-61})。これまで複数の研究グループによって、葉酸の取り込みおよび代謝に関わるタンパク質の遺伝子多型や MTX の標的タンパク質の遺伝子多型と MTX の薬効や毒性との関連が研究されてきた。しかし、MTX の薬効に関与すると考えられる遺伝子多型は非常に数多いため、現在までに、RA 治療における MTX の反応性の予測に役立つ信頼できる遺伝子マーカーは確立されていない。

本章では MTX の薬効の指標として DAS28 を用い、MTX 群と生物学的製剤併用群において、患者背景、MTX の標的タンパク質遺伝子 *DHFR*、*TS*、*ATIC* および葉酸代謝関連タンパク質遺伝子 *RFC1*、*GGH* の遺伝子多型が MTX の薬効に与える影響について検討を行った。MTX 群と生物学的製剤併用群の DAS28 の中央値はそれぞれ 2.31 と 2.35 であり、統計学的有意差は無く、両群とも同程度の治療効果が得られていた。また、罹病期間も同程度であった。これらの患者群に対して多重ロジスティック回帰分析による多変量解析を行った結果、生物学的製剤の併用には年齢と *RFC1* 80G>A が影響していることが示された。以上のことから、*RFC1* 80GG を有する患者は MTX による治療効果が十分に認められない可能性があるため、*RFC1* 80GG を有する患者に対しては早い段階で生物学的製剤の併用を考慮することで、関節炎症の抑制、ならびに関節破壊の抑制効果が期待でき、患者のクオリティ・オブ・ライフ(quality of life, QOL)の改善につながるものと考えられた。

RFC1 は、葉酸や MTX を細胞内に取り込む際のトランスポーターである。*RFC1* 80G>A SNP により膜貫通ドメインでのアミノ酸変異が起これ、細胞内への MTX の取り込みが促進されると報告されている^{62,63})。これまでも *RFC1* 80G>A SNP と MTX の効果^{60,61,64-68})や毒性^{60,64,67,69,70})との関係が広く報告されており、*RFC1* 80G>A SNP が MTX 治療患者において抗炎症状態をモニタリングするための有用な因子であることが報告されている⁶⁶)。特に Drozdziak らおよび James らによる臨床研究では、MTX 治療を受け寛解と診断された RA 患者群 (レスポンドー群)と MTX 治療による効果が見られなかった患者群 (ノンレスポンドー群)における *RFC1* 80G>A 遺伝子多型頻度分布を比較した結果、レスポンドー群において *RFC1* 80AA 遺伝子型を持つ患者の割合が有意に高かったと報告されている^{60,61})。今回対象とした患者のうち、生物学的製剤を併用している患者は MTX 治療による効果が認められなかったノンレスポンドー群であることが考えられる。これらのことを考慮すると、今回の研究における結果はこれらの報告と一致すると考えられた。しかし、Wessels らや Takatori らの臨床研究では *RFC1* 遺伝子型と MTX の効果や毒性との間に関連は見られなかったということが報告されている^{63,72})。*RFC1* 80G>A SNP は MTX の抗炎症効果に影響する可能性が高く、今後、臨床応用に向け、葉酸トランスポーター遺伝子に注目した更なる検討が必要であると考えられる。

第2章 末梢血単核球および滑膜における葉酸トランスポーター遺伝子発現量の解析

第1節 序論

RA治療の第一選択薬であるMTXは化学構造が葉酸ときわめて類似しているため、その小腸での吸収や組織分布に葉酸輸送系が関与することが古くから知られていた⁷³⁻⁷⁵⁾。MTXを標的細胞内に取り込む葉酸トランスポーターの代表例として、血液産生細胞に豊富に発現しているRFC1が挙げられる^{76,77)}。1994年にクローニングされた葉酸トランスポーター遺伝子の遺伝子発現系による機能解析から、MTXはRFC1に認識され、プロトン依存的に輸送されていることが実証された⁷⁸⁻⁸²⁾。しかし、RFC1の発現はリウマチ部位に特異的ではなく、他のトランスポーターも同時に関与しているのではないかと考えられている。一方、2006年にヘムトランスポーターとして同定されたPCFTが、プロトン依存性葉酸トランスポーターとしてMTXを輸送することが判明している¹³⁾。RFC1と同様にMTXをプロトン依存的に輸送することが示されているが、PCFTは、最適pHや基質特異性などにおいてRFC1とは明らかに異なる特性を持っている⁸³⁻⁸⁵⁾。PCFTの発現は消化管上部に特異的であり、他では肝臓に発現が見られる。MTXの細胞内輸送に関わる重要な分子であるとされているが、未だ詳細が不明であり現在さらなるメカニズム解明のための研究が進められている。

近年、医薬品研究においてトランスポーターの機能および輸送メカニズムの解明が重要視されており、MTXについては特にRFC1の遺伝子多型と薬効の関連が多く研究され、これまでにRFC1 80G>A SNPがRAにおいて抗炎症状態をモニタリングするための有用な因子であることが報告されている^{70,86)}。MTXはリンパ球及び滑膜細胞の活性を抑えることで疾患活動を低下させる。従ってそれらの細胞における葉酸トランスポーター遺伝子発現レベルと薬効の関連を見出すことでMTXの効果を予測することができると考えられる。また、PBMC中と滑膜細胞中の葉酸トランスポーター遺伝子発現レベルに関連があれば、PBMCにおける葉酸トランスポーター遺伝子発現レベル解析により簡易に薬効の予測をすることが可能となる。本章では、PBMCと滑膜細胞における葉酸トランスポーター遺伝子発現レベルを解析し、MTXの有効性との関連について調査した。

第2節 対象および実験方法

2-2-1 関節リウマチ患者

2010年6月から2013年12月の期間に、JA 静岡厚生病院リウマチ科において治療中である日本人 RA 患者のうち、文書による同意を得られ、MTX 単剤治療にて治療効果が安定している患者 56 名を対象とし、PBMC 中の遺伝子発現量解析を行った。また、2014年4月から12月の期間に JA 静岡厚生病院リウマチ科において治療中である日本人 RA 患者のうち、文書による同意を得られ、関節置換手術により滑膜の提供が可能な RA 患者 8 名を対象とし、滑膜組織中の遺伝子発現量解析を行った。RA の診断は、米国リウマチ学会の基準に従った⁴²⁾。MTX の薬効に影響を与えることが知られている免疫抑制剤（タクロリムス水和物（商品名：プロGRAF®）、レフルノミド（商品名：アラバ®）、ミゾリピン（商品名：ブレディニン®））を併用している患者は除外した。

2-2-2 健常人

文書による同意が得られた健常人ボランティア被験者のうち、日本人 15 名を本研究の対象とし、RA 患者群の PBMC 中遺伝子発現量に対するコントロール群とした。

2-2-3 変形性関節症患者

2014年4月から12月の期間に JA 静岡厚生病院リウマチ科において治療中である日本人変形関節症 (osteoarthritis, OA) 患者のうち、文書による同意を得られ、関節置換手術により滑膜の提供が可能な OA 患者 13 名を対象とし、RA 患者群の滑膜組織中遺伝子発現量に対するコントロール群とした。

2-2-4 同意取得および倫理的配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言および厚生労働省による「臨床研究に関する倫理指針」に従い、静岡県立大学研究倫理審査委員会および JA 静岡厚生病院倫理委員会の審査・承認のもと実施した。すべての被験者に研究の内容を説明し、文書により同意取得を行った。得られた個人情報、連結可能匿名化を行い管理者が厳重に保管した。

2-2-5 末梢静脈からの採血および血球分離

すべての RA 患者、OA 患者及び健常人から文書による同意取得後、EDTA-2Na ベノジェット真空採血管（テルモ）を用いて末梢静脈血 5 mL を採取した。採取した血液検体は、第1章と同様の方法にて処理した。

2-2-6 滑膜組織検体の処理

滑膜は手術後にて摘出後生理食塩水で濯ぎ、5mm 四方の断片に切り刻み RNA later (Life Technologies) に浸け-80°Cで保存した。保存していた滑膜断片を解凍後、数片の組織断片を Buffer RLT (Qiagen) 500uL 中でポリロンホモジナイザー (KINEMATICA, Luzern, Switzerland) にて破碎した。滑膜組織検体は同量に 2 本ずつ作製し、それらを平均化することで組織カ所による差を均等化した。

2-2-7 遺伝子多型解析

-80°Cで保存していた血球画分から第1章と同様の方法でゲノムを抽出した。*RFC1* 80G>A 遺伝子型解析は第1章と同様の方法で行った。加えて、下記の遺伝子多型を解析した。

2-2-7-1 *PCFT* 928A>G 遺伝子型解析

PCFT 928A>G の SNP は、アレル特異的 PCR 法により解析した。PCR 反応液 (15 μ L) には、ゲノム DNA 30~50 ng、1.5 mM MgCl₂、各 0.3 μ M フォワードプライマーおよび A アレル特異的または G アレル特異的リバースプライマー (ファスマック)、各 200 μ M dNTP 混合液 (Life Technologies)、HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen) 0.5 units を加えた。増幅は、サーマルサイクラー (Thermal cycler) を用いて 95°C 5 分に続き 94°C 15 秒、70°C 30 秒、72°C 45 秒を 49 サイクル行い、その後 72°C 10 分の最終伸長反応を行った。得られた PCR 産物について、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を添加した 3.0% アガロースゲル (Agarose S) で電気泳動を行い、UV 照射により産物を確認した。遺伝子型は、各アレル特異的 PCR 産物の有無によって決定した (図 2-3)。また、いくつかのサンプルの遺伝子多型は、PRISM 310 (Applied Biosystems) を用いたダイレクト・シーケンス法にてバリデーションを行った。なお、使用したプライマーの配列、PCR 条件および参考文献は表 2-1 に示した。

2-2-7-2 *RFC1* -43T>C 遺伝子型解析

RFC1 -43T>C の SNP は、PCR-RFLP 法により解析した。PCR 反応液 (15 μ L) には、ゲノム DNA 30~50 ng、1.5 mM MgCl₂、各 0.3 μ M フォワードプライマーおよびリバースプライマー (ファスマック)、各 50 μ M dNTP 混合液 (Life Technologies)、HotStarTaq Plus DNA polymerase (Qiagen) 0.5 units を加えた。増幅は、サーマルサイクラー (Thermal cycler, Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA) を用いて 95°C 5 分に続き 94°C 1 分、70°C 1 分、72°C 1 分を 44 サイクル行い、その後 72°C 10 分の最終伸長反応を行った。得られた 215 bp の PCR 産物に、5 U *Hpy*CH4III (New England Biolabs)、10 \times NE buffer 4、10 \times BSA を加え全量 10 μ L として、37°C で 2 時間反応させ、制限酵素処理を行った。その後、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を添加した 3.0% アガロースゲル (Agarose S) で電気泳動を行い、UV 照射により切断産物を確認した。遺伝子型は、PCR 産物の切断パターンによって決定した (図 2-3)。また、いく

つかのサンプルの遺伝子多型は、PRISM 310 (Applied Biosystems)を用いたダイレクト・シーケンス法にてバリデーションを行った。なお、使用したプライマーの配列、PCR 条件および参考文献は表 2-1 に示した。

表 2-1. 各遺伝子多型解析の条件

遺伝子	多型	プライマー配列	アニーリング温度	制限酵素	制限酵素反応温度	参考文献
<i>PCFT</i>	928A>G	F: 5'-GGAACGGCTAGATCAGCAATGCC-3'	70°C	—	—	—
		R: 5'-CAGGCCCATGAAGAGAGGCATCTCTT-3' (for A allele)				
		R: 5'-CAGGCCCATGAAGAGAGGCATCTCTC-3' (for G allele)				
<i>RFC1</i>	-43T>C	F: 5'-GTTTTGCGGGGTAGGGAGGCCTG-3' R: 5'-AGCAAAGGTAGCACACGAGGTGC-3'	70°C	<i>HpyCH4III</i>	37°C	65)

F: forward primer, R: reverse primer

2-2-8 葉酸トランスポーターmRNA 発現解析

2-2-8-1 RNA 抽出

−80℃で保存していた PBMC 及びホモジナイズした滑膜細胞から、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) のスピンプロトコールに従って、Total RNA を抽出した。

2-2-8-2 cDNA 合成

抽出した Total RNA から、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) のプロトコールに従い cDNA 合成を行った。転写反応はサーマルサイクラー (Thermal cycler) を用いて 25℃10 分に続き 42℃60 分、99℃5 分で行った。

2-2-8-3 リアルタイム PCR

PCFT および *RFC1* の mRNA 発現量は、TaqMan® gene expression assay (Applied Biosystems) を用いたリアルタイム PCR 法によって解析した。内在性コントロールには *rS18* RNA (Applied Biosystems) を使用した。リアルタイム PCR には 7500 fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用し、反応は 50℃2 分、95℃10 分に続き 95℃15 秒、60℃1 分を 40 サイクルで行った。PBMC および滑膜細胞中において最も遺伝子発現量が少なかった検体を 1 とし、 $\Delta\Delta$ CT 法にて比較した。

2-2-9 治療効果指標

本研究では、RA の疾患活動性の指標として DAS 28⁵⁴⁾を用い、第 1 章と同様に計算した。また、クレアチニン・クリアランスも第 1 章と同様に計算した。患者情報として年齢、体重、性別、MTX 処方量、治療経過および各検査値などを JA 静岡厚生病院の診療録より取得した。

2-2-10 統計解析

遺伝子発現量と疾患活動性との相関には Spearman の順位相関係数、滑膜中と PBMC 中の遺伝子発現量の相関には Pearson の順位相関係数を用いた。遺伝子型頻度について、Hardy-Weinberg 平衡式による予測値と実測値の比較には χ^2 検定を用いた。各遺伝子多型の遺伝子発現量の比較には Kruskal-Wallis 検定を用いた。有意水準は 5%とし、すべての統計解析は PASW statistics 18 (SPSS) を使用して行った。

第3節 結果

2-3-1 末梢血単核球における葉酸トランスポーター遺伝子発現量解析

2-3-1-1 患者背景

PBMC中の葉酸トランスポーター遺伝子発現量解析対象RA患者56名の患者背景を表2-2に示した。

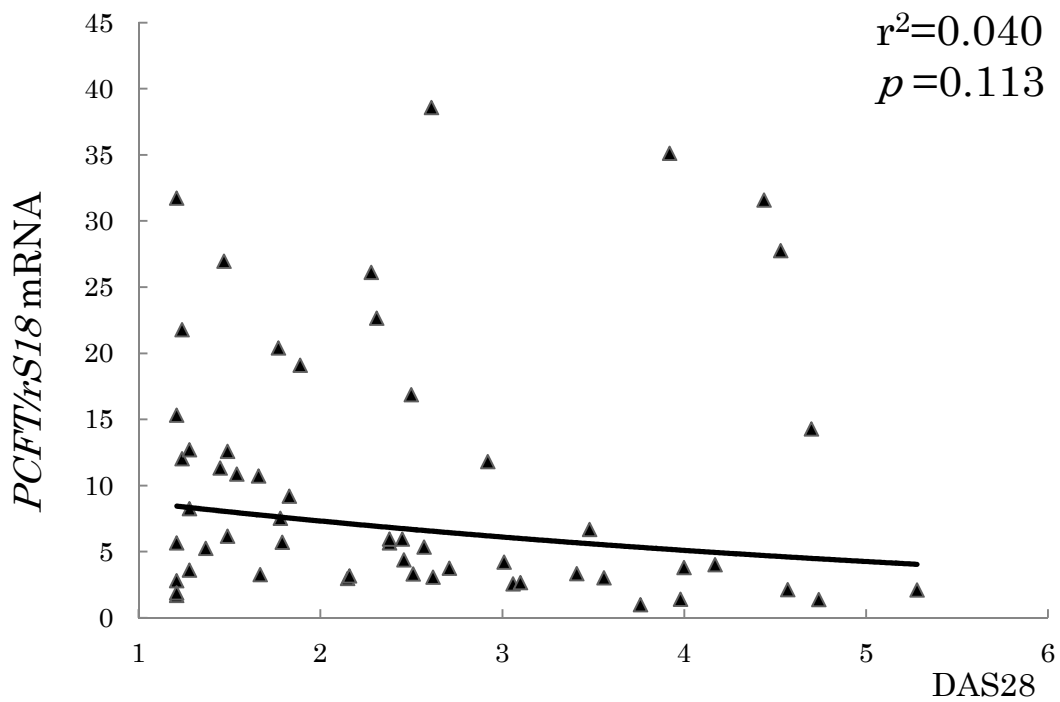
表 2-2. 患者背景

	RA 患者 (n=56)
年齢 (歳)	66.0 (37-72)
性別 (男性/女性)	9/47
体重 (kg)	50.5 (34-95)
罹病期間 (年)	5.9 (0.6-34)
クレアチニン・クリアランス (mL/min)	73.62 (30.70-165.78)
MTX 投与量 (mg/week)	6.0(2.0-10.0)
DAS28	2.35 (1.21-5.28)
MMP-3 (ng/mL)	72.00 (21.80-723.10)

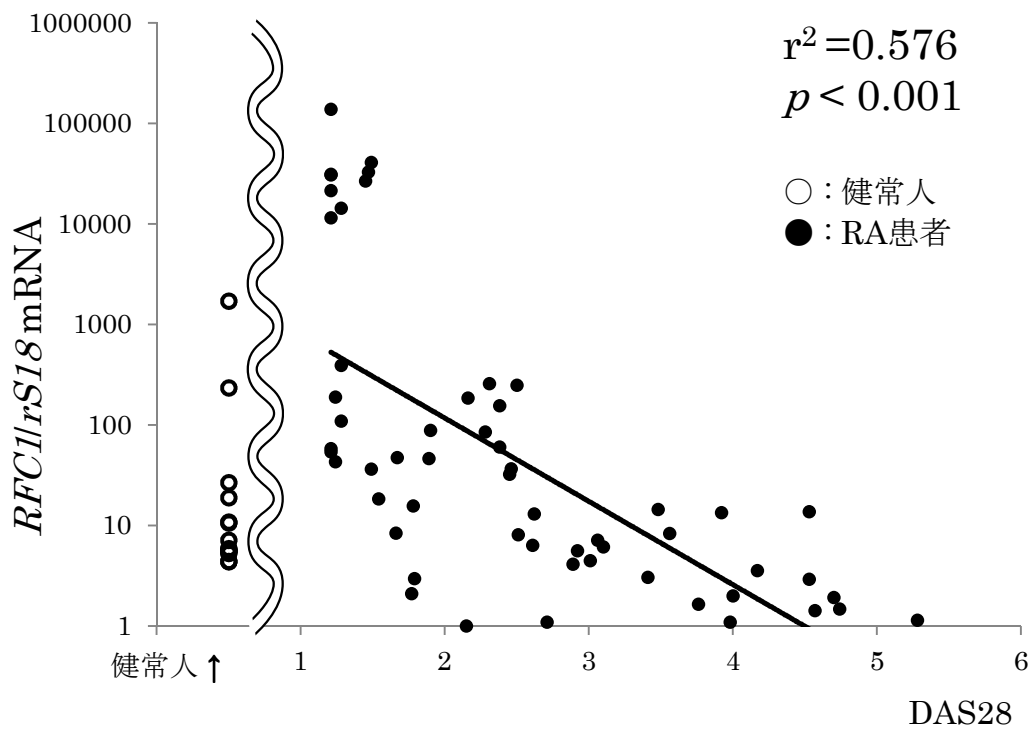
性別の項目以外は、中央値(範囲)で示した。

2-3-1-2 疾患活動性と葉酸トランスポーター発現量の関連

PBMC中のPCFTおよび*RFC1* mRNA発現量とDAS28による疾患活動性の相関を図2-1に示した。*PCFT* mRNA発現量と疾患活動性には相関が認められなかった ($r^2=0.040$, $p=0.113$)。*RFC1* mRNA発現量は*PCFT* mRNA発現量に比べ患者間の個人差が大きく、また有意に疾患活動性と相関していた ($r^2=0.576$, $p<0.001$)。*RFC1* mRNA発現量が多い場合疾患活動性が有意に低値であった。有意な相関が認められた*RFC1* mRNA発現量にはコントロールとして健常人の*RFC1* mRNA発現量のデータを加えた。健常人の間における*RFC1* mRNA発現量にも大きな個人差が認められた。また、*RFC1* mRNA発現量と投与量(体重補正值)との関連を解析したが(図 2-2)、相関は認められなかった ($r^2=0.047$, $p=0.108$)。



(a) RA 患者における PBMC 中の *PCFT* mRNA 発現量と疾患活動性との相関



(b) RA 患者と健常人における PBMC 中の *RFC1* mRNA 発現量と疾患活動性との相関

図 2-1. *PCFT* および *RFC1* mRNA 発現量と疾患活動性との関連 (Spearman の順位相関係数)

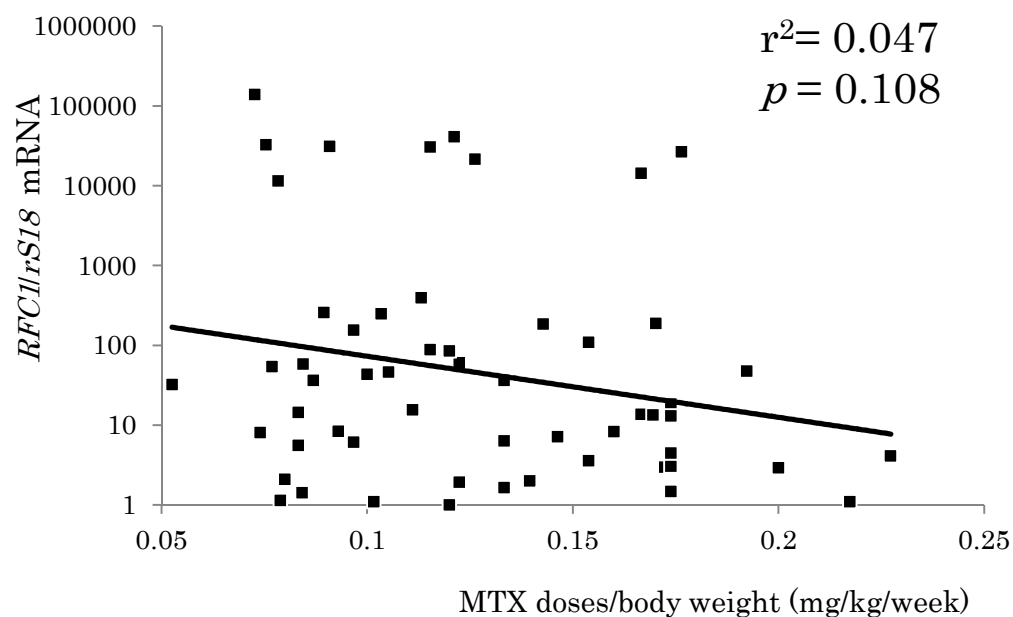


図 2-2. RA 患者における *RFC1* mRNA 発現量と投与量との相関 (Spearman の順位相関係数)

2-3-1-3 遺伝子多型と葉酸トランスポーター発現量の関連

遺伝子多型解析結果におけるアガロース電気泳動の結果を図 2-3 に示した。*PCFT* および *RFC1* の遺伝子多型解析結果を表 2-3 に示した。両群におけるすべての分布は Hardy-Weinberg 平衡に従っていた。また、*PCFT* および *RFC1* の遺伝子多型と各々の mRNA 発現量との関連を解析した結果を図 2-4 に示した。遺伝子多型毎の mRNA 発現量の差は認められなかった。

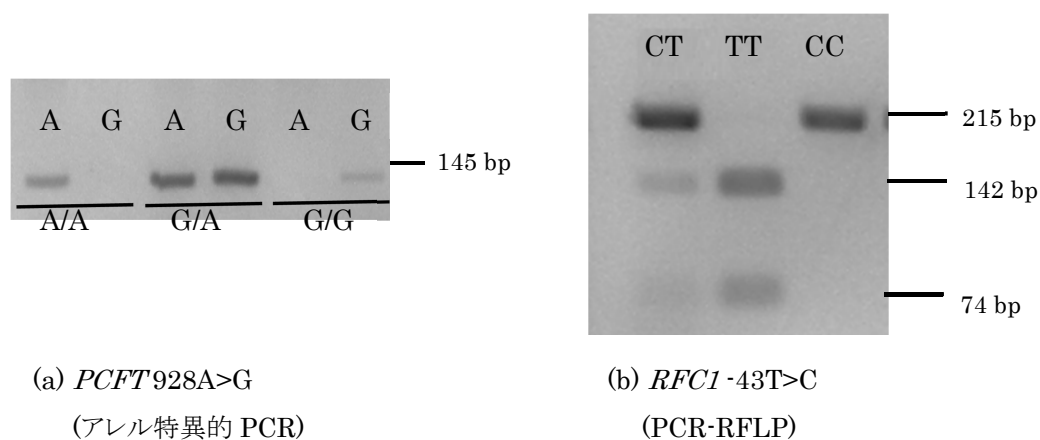
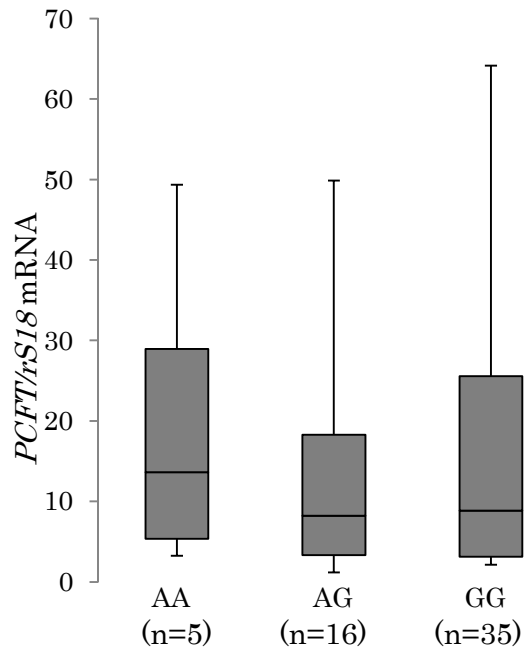


図 2-3. 各遺伝子多型解析におけるアガロース電気泳動結果

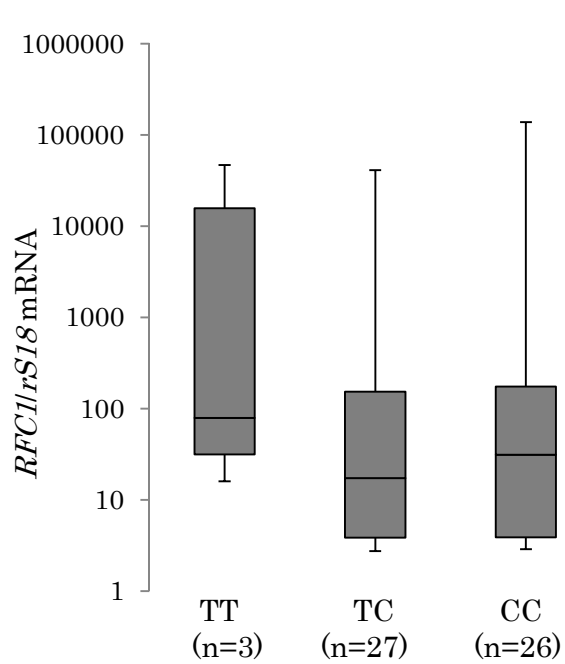
表 2-3. 葉酸トランスポーター遺伝子多型の解析結果

	遺伝子型	人数	頻度(%)	アレル頻度	<i>p</i> 値 ^{a)}
<i>PCFT</i> 928A>G	A/A	5	8.9	A	0.232
	A/G	16	28.6		0.332
	G/A	35	62.5	G	
	計	56			
<i>RFC1</i> -43T>C	T/T	3	5.4	C	0.295
	C/T	27	48.2		0.489
	C/C	26	46.4	T	
	計	56			
<i>RFC1</i> 80G>A	G/G	10	17.9	G	0.411
	G/A	26	46.4		0.954
	A/A	20	35.7	A	
	計	56			

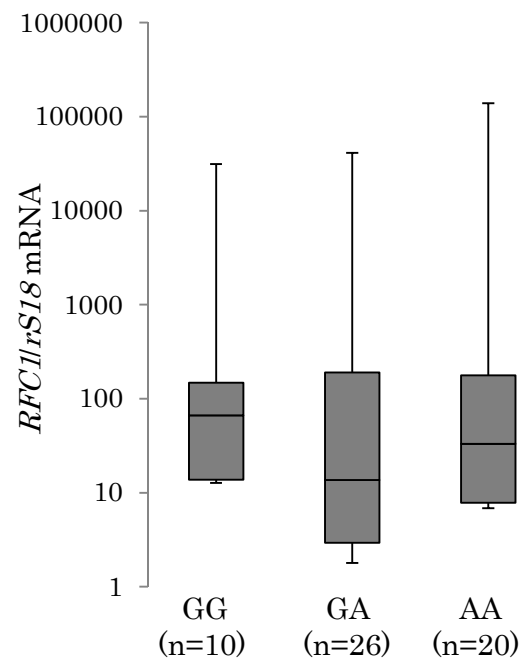
a) Hardy-Weinberg 平衡式による予測値と実測値の比較(χ^2 検定)



(a) *PCFT* 928A>G 多型毎の
PCFT mRNA 発現量



(b) *RFC1* -43T>C 多型毎の
RFC1 mRNA 発現量



(c) *RFC1* 80G>A 多型毎の
RFC1 mRNA 発現量

図 2-4. 葉酸トランスポーター遺伝子多型毎の mRNA 発現量
中央値±範囲で表した。

2-3-2 滑膜組織における葉酸トランスポーター遺伝子発現量解析

2-3-2-1 患者背景

滑膜組織中の *RFC1* mRNA 発現量解析対象 RA 患者 8 名と OA 患者 13 名の患者背景を表 2-4 に示した。

表 2-4. 患者背景

	RA 患者 (n=8)	OA 患者 (n=13)
年齢 (歳)	72.5 (51.0 – 85.0)	77.0 (55.0 – 86.0)
性別 (男性/女性)	1 / 7	0 / 13
体重 (kg)	54.6 (36.5 – 61.0)	54.4 (42.0 – 66.0)
罹病期間 (年)	7.5 (0.7-11.9)	0.4 (0.3 – 0.4)
クレアチニン・クリアランス (mL/min)	58.33 (49.25 – 90.08)	62.25 (15.43 – 149.84)
MTX 投与量 (mg/week)	6.0 (6.0 – 8.0) (n=6)	—
生物学的製剤 使用者内訳	トシリズマブ (商品名:アクテムラ) n=1 エタネルセプト (商品名:エンブレル) n=1	—
DAS28	1.72 (1.49 – 2.69)	—
MMP-3 (ng/mL)	174.55 (88.80 – 287.90)	—

性別と生物学的製剤使用者内訳の項目以外は、中央値(範囲)で示した。

2-3-2-2 疾患活動性と葉酸トランスポーター発現量の関連

OA 患者の滑膜組織中 *RFC1* mRNA 発現量および、RA 患者の滑膜組織中 *RFC1* mRNA 発現量と DAS28 による疾患活動性との関連を図 2-5 に示した。患者間で *RFC1* mRNA 発現量に個人差が認められた。MTX を使用している RA 患者において、滑膜組織中 *RFC1* mRNA 発現量と疾患活動性の間には有意な相関が認められ ($r^2=0.760$, $p=0.041$)、*RFC1* mRNA 発現量が高いと疾患活動性が有意に低下した。

また、滑膜組織中 *RFC1* 遺伝子発現量解析対象 OA 患者の PBMC 中 *RFC1* mRNA 発現量および、RA 患者の PBMC 中 *RFC1* mRNA 発現量と DAS28 による疾患活動性との関連を図 2-6 に示した。患者間で *RFC1* mRNA 発現量に個人差が認められた。MTX を使用している RA 患者において、滑膜組織中 *RFC1* mRNA 発現量と疾患活動性の間には有意な相関が認められ ($r^2=0.810$, $p=0.037$)、*RFC1* mRNA 発現量が高いと疾患活動性が有意に低下した。

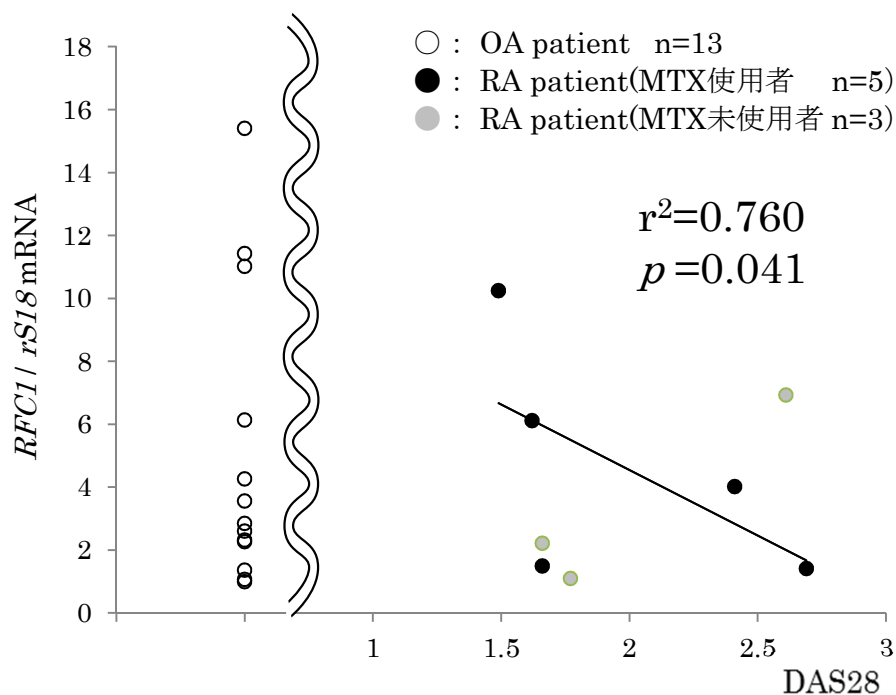


図 2-5. OA 患者および RA 患者の滑膜細胞中 *RFC1* mRNA 発現量と疾患活動性との関連 (Spearman の順位相関係数)

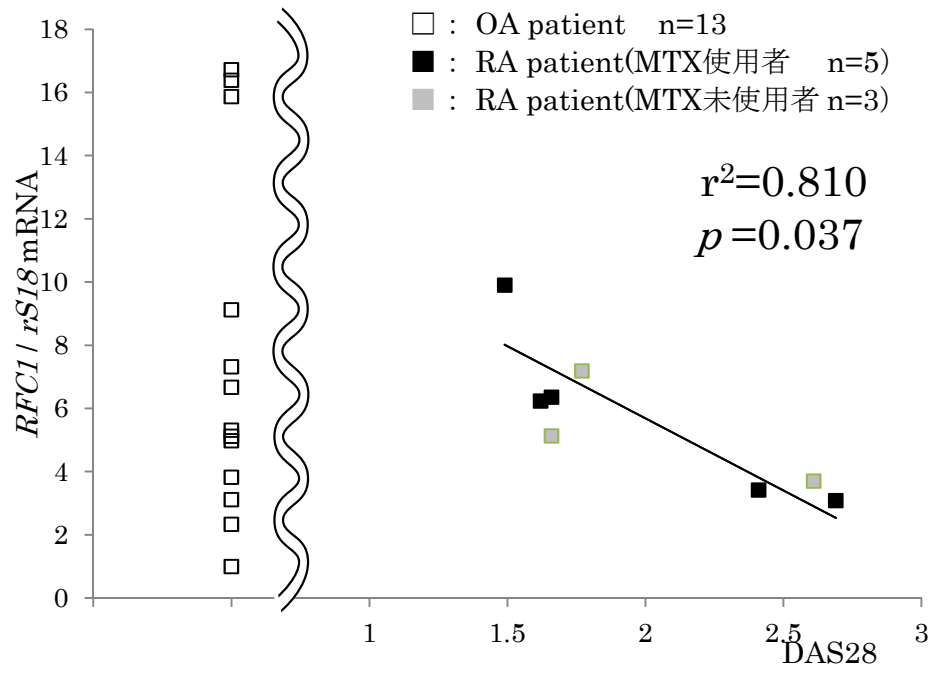


図 2-6. OA 患者および RA 患者の PBMC 中 *RFC1* mRNA 発現量と疾患活動性との関連
 (Spearman の順位相関係数)

2-3-2-3 滑膜組織と末梢血単核球の葉酸トランスポーター遺伝子発現量の関連

滑膜組織中 *RFC1* 遺伝子発現量解析対象 OA 患者および RA 患者の滑膜組織中 *RFC1* mRNA 発現量と PBMC 中 *RFC1* mRNA 発現量の相関を図 2-7 に示した。滑膜組織中と PBMC 中の *RFC1* mRNA 発現量は有意な相関が認められた ($r^2=0.573$, $p<0.001$)。

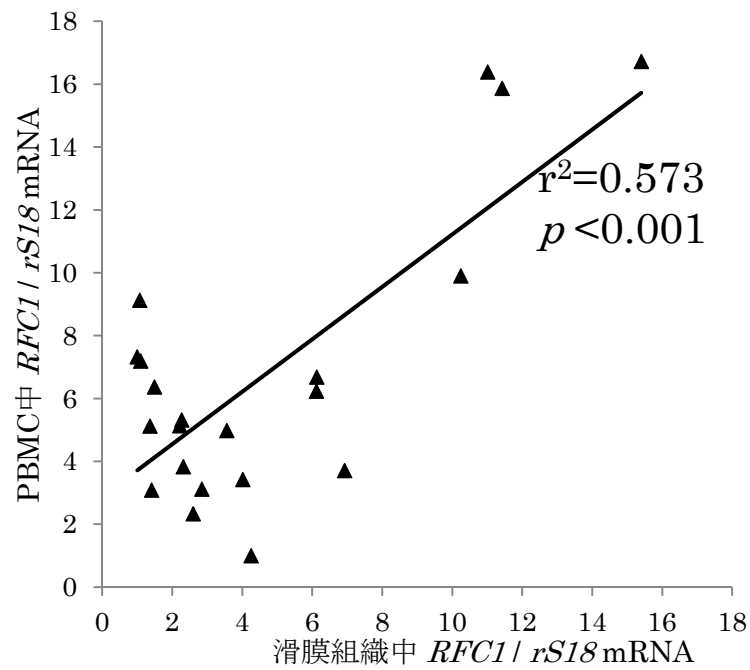


図 2-7. 滑膜組織中と PBMC 中の *RFC1* 遺伝子発現量の相関 (Pearson の順位相関係数)

第4節 考察

本章では、MTX 治療を受ける RA 患者を対象に、葉酸トランスポーター遺伝子発現レベルと疾患活動性における MTX の薬効との関連を検討した。RFC1 は細胞外液から葉酸と MTX を取り込むための主要トランスポーターである。本研究において、RFC1 遺伝子発現レベルと DAS28 に基づく疾患活動性との間に有意な相関関係を見出した。RA 患者間の PBMC において RFC1 の遺伝子発現レベルに大きな個人差が認められた。また、RFC1 遺伝子発現レベルと MTX 投与量の間には相関が認められなかった。従って、MTX 投与量に関わらず、RA 患者の免疫細胞において RFC1 遺伝子発現レベルが高いほど MTX の取り込みが活性化し、それにより RA の疾患活動性の低下が引き起こされるのではないかと考える。MTX 投与量と DAS28 との間にも相関は認められず、疾患活動性と RFC1 遺伝子発現レベルの関連の重要性が示された。また、RFC1 の遺伝子発現レベルに大きな個人差が存在することから、MTX の有効性には個人差があることに関連することも考えられた。さらに、健常人の PBMC における RFC1 の遺伝子発現レベルの量には個人差が認められた。これらの個人差により MTX への応答性を予測することが可能となることが考えられる。近年、特に RFC1 80G>A SNP と MTX の効果や毒性との関係が広く研究されている。RFC1 80G>A と GGH-401C>T の SNP が RA で MTX 治療患者において抗炎症状態をモニタリングするための有用な因子であることが報告されている⁵⁹⁾。また、第1章でも述べたとおり、RFC1 80G>A SNP は、MTX と生物学的製剤の併用投与における必要性和関連していた⁸⁶⁾。RFC1 は 80G>A SNP により膜貫通ドメインでのアミノ酸変異が起り、細胞内への MTX の取り込みが促進されると報告されている^{62,63)}。PCFT は近年同定された葉酸トランスポーターであり、MTX の効果的な輸送体として作用することが報告されている⁸³⁾。PCFT928A>G SNP は、赤血球中の MTX の濃度と相関するという報告もある⁸⁷⁾。しかし、本研究において、PBMC 中の PCFT 遺伝子発現レベルと疾患活動性に相関が認められなかった。よって PCFT 遺伝子は MTX の薬効において影響力が低いことが考えられる。Bilits らは、炎症状態の下で、RA 患者の PBMC における DHFR および GGH の遺伝子発現レベルが顕著にアップレギュレートしたことを報告した。MTX 治療により、正常レベルまで葉酸代謝を回復させるが、RFC1 と PCFT の遺伝子発現量レベルに有意差は認められなかった⁸⁸⁾。よって、RFC1 遺伝子発現レベルは炎症によって影響されないため、薬物の有効性を予測するためのマーカーとして有用であることが考えられる。

さらに、RFC1 及び PCFT の遺伝子発現量レベルに影響を与える SNPs をいくつか解析したが、影響を与える因子は見出されなかった。RFC1 -43T>C の SNP の非野生型対立遺伝子は、RFC1 タンパク質発現レベルの低下に関連していることが示されている⁶⁴⁾。本研究では、RFC1 mRNA 発現レベルが野生型において若干高い傾向はあったものの、統計学的有意差は認められなかった。mRNA 発現とタンパク質発現のメカニズムには違いがあり、mRNA 発現には他の遺伝的多型または薬力学的因子が関与するのではないかと考える。

また、滑膜を提供可能な RA 患者と OA 患者において PBMC と滑膜組織中の RFC1 遺伝子発現レベルを解析した。RA 患者、OA 患者のそれぞれにおいて発現量に個人差が認められた。MTX 治療患者においては PBMC、滑膜組織共に RFC1 遺伝子レベルと疾患活動性との間に相関が認められた。さらに RA 患者、OA 患者において PBMC と滑膜組織中の RFC1 遺伝子発現レベルに相関があることを見出した。従って、MTX 治療をする際に PBMC の RFC1 遺伝子発現レベルを解析することで薬効の予測が可能で

あることが示唆された。RA 患者の滑膜における MTX 関連遺伝子の発現量を解析した例では Stamp らの研究があるが⁸⁹⁾、疾患活動性や PBMC 中の遺伝子発現量との関連を示した例はこれまでに報告がない。

本研究では RA 患者における PBMC 中の *RFC1* の遺伝子発現レベルと疾患活動性との相関関係を見出し、*RFC1* 遺伝子発現レベルが有用な MTX 薬効予測因子となる可能性が示された。今後、RA における MTX 治療の有効性向上のために、*RFC1* の発現レベルに影響を与える要因を解明するさらなる検討が必要である。

第3章 日本人リウマチ患者におけるメトトレキサートの治療薬物モニタリング

第1節 序論

MTX は RA のアンカー薬として用いられる葉酸代謝拮抗薬である。MTX は細胞内でポリグルタミン化され活性体 MTX-PGs に変換され、主要な標的酵素である DHFR を強力に阻害することで葉酸代謝を阻害し免疫細胞の増殖を抑制する。また、MTX は潜在的な抗炎症物質であるアデノシンの蓄積を促進することも報告されている⁹⁰⁾。

最近の報告では、RA 患者において MTX の投与量よりも赤血球中の MTX-PGs 濃度と疾患活動性の間に関連があることが示唆されており、赤血球中の MTX-PGs 濃度は疾患活動性 MTX 非応答患者よりも MTX 応答患者で有意に高いと報告されている³¹⁾。赤血球中 MTX-PGs 濃度測定については、以前よりいくつかの報告がされている⁹¹⁻⁹⁹⁾。高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用い蛍光検出器で定量する方法⁹³⁻⁹⁵⁾や、蛍光偏光免疫測定法を用いた方法が報告されている⁹⁷⁾。Dervieux らは MTX-PGs を分離定量できる HPLC 蛍光測定法を開発し⁹⁸⁾、Haandel らは高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) を用いて低用量の MTX-PGs を分離定量する方法を開発した⁹⁹⁾。しかし、日本人患者において定期的に MTX-PGs 濃度をモニターした例はほとんどない。赤血球中 MTX-PGs 濃度と薬効や副作用との関連が明らかになれば、赤血球中 MTX-PGs 濃度をモニターし、MTX の効果や副作用のマーカーとして臨床応用できる可能性がある。

本研究では Haandel らの報告を改変した方法⁹⁹⁾で LC/MS/MS を用い、日本人 RA 患者において、1 年間以上継続的に赤血球中 MTX (MTX-PG₁) 及び MTX-PGs (MTX-PG₂₋₇) 濃度を分離定量し、MTX の薬効や臨床検査値との関連を明らかにすることを目的とした。本研究より得られる成果を基に、赤血球中 MTX-PGs 濃度を薬効や副作用のマーカーとして、MTX 投与量の調節や併用薬の適切な選択を行うことができれば、より効果的で副作用の少ない RA 治療の実現が可能となり、患者の QOL の向上に大きく貢献するものと期待される。

第2節 対象および実験方法

3-2-1 関節リウマチ患者

2010年6月から2013年12月の期間に、JA 静岡厚生病院リウマチ科において治療中である日本人 RA 患者のうち、MTX および生物学的製剤を使用している 437 名から文書による同意を得た。RA の診断は、米国リウマチ学会の基準に従った⁴²⁾。それらの患者のうち、1年以上継続的に MTX を服用しており臨床検査値の変化を追跡調査できる 187 名の患者を選択し、本研究の対象とした。187 名の患者のうち、MTX 単独による治療を行っている患者群 (MTX 群) は 96 名、生物学的製剤を併用している患者群 (生物学的製剤併用群) は 91 名であった。MTX の薬効に影響を与えることが知られている免疫抑制剤 (タクロリムス水和物(商品名:プログラフ®)、レフルノミド(商品名:アラバ®)、ミゾリビン(商品名:ブレディニン®)) を併用している患者は除外した。

3-2-2 同意取得および倫理的配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言および厚生労働省による「臨床研究に関する倫理指針」に従い、静岡県立大学研究倫理審査委員会および JA 静岡厚生病院倫理委員会の審査・承認のもと実施した。すべての被験者に研究の内容を説明し、文書により同意取得を行った。得られた個人情報、連結可能匿名化を行い管理者が厳重に保管した。

3-2-3 末梢静脈からの採血および血球分離

RA 患者から文書による同意取得後、MTX 濃度がトラフ値となるタイミングで、2 か月に 1 度、1 年間以上継続的に EDTA-2Na ベノジェクト真空採血管 (テルモ) を用いて末梢静脈血 5 mL を採取した。採取した血液検体は、第 1 章と同様の方法にて処理した。

3-2-4 遺伝子多型解析

-80°C で保存していた血球画分から第 1 章と同様の方法でゲノムを抽出した。*RFC1* (80G>A、-43T>C)、*GGH* (-401C>T、-354G>T、452C>T) 遺伝子型解析は第 1 章、2 章と同様の方法で行った。

3-2-5 赤血球検体の処理

MTX 及び各種 MTX-PGs の指定薬物標準品として、Methotrexate、4-amino-10⁻-methylpteroyl-diglutamic acid (MTX-PG2)、4-amino-10⁻-methylpteroyltriglutamic acid (MTX-PG3)、4-amino⁻-10⁻-methylpteroyltetraglutamic acid (MTX-PG4)、4-amino⁻-10⁻-methylpteroylpenta⁻-glutamic acid (MTX-PG5)、4-amino-10⁻-methylpteroylhexa⁻-glutamic acid (MTX-PG6)、4-amino-10⁻-methylpteroylheptaglutamic acid (MTX-PG7) (Schircks Laboratories, Jona,

Switzerland)、内部標準物質として重水素化ラベルされた安定同位体の methotrexate-d3 (Toronto Research Chemicals, Ontario, Canada) を用い、各々 0.1 N 水酸化カリウム (和光純薬工業) にて 10 mM 溶液とした後、超純水装置 Direct-Q® 3 UV (Millipore, Billerica, MA) にて精製した超純水で必要濃度まで希釈した。-80°C で保存していた RA 患者の赤血球画分 250 µL に、内部標準物質溶液 0.1 µM を加えジルコニアビーズ破碎チューブで 1 分間強く攪拌し、溶血させた。また、-80°C で保存していた健常人 (38 歳、男性) の赤血球画分から 250 µL を分注し、同量の MTX 及び各種 MTX-PGs の指定標準品溶液 0.1 µM、0.05 µM、0.01 µM と内部標準物質溶液 0.1 µM を加え、同様に処理して標準品添加血液サンプルとした。さらに、溶血させた赤血球サンプルに 70% 過塩素酸 (和光純薬株式会社、大阪) 50 µL を加え、直ちに 20 秒間強く攪拌し、18,000 ×g で 5 分間遠心し、上清を採取した。上清 250 µL に 3% アンモニア水 (和光純薬) 250 µL と水を加え 3 mL のサンプルとした。その後、solid phase extraction (SPE) カラムによる固相抽出を行った。SPE には Oasis® HLB 3 cc Extraction Cartridges (Waters, Milford, MA) を用いた。SPE カラムを 100% メタノール (和光純薬) で洗浄し、0.1% 酢酸水溶液 (和光純薬) で平衡化した。その後、3 mL のサンプルをロードし、倍量の 0.1% 酢酸水溶液で洗浄した後、100% メタノール:3% アンモニア水 (8:2) 混液 2 mL で溶出し、40°C で窒素乾固した後、-20°C で遮光保存した。測定をする直前に移動相 50 µL を加え再溶解し、Syringe Driven Filter Unit 0.20 µm (Millipore) を用いて濾過後、HPLC オートサンプラ用ガラスバイアルに注入した。

3-2-6 高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量

HPLC 条件として、分析カラムに極性基によるエンドキャップ処理が施されている Synergi Hydro-RP LC 逆相 C18 カラム 50 × 1.00 mm, 4 µm (Phenomenex, Torrance, CA)、ガードカラムに、AQ C18 4 × 2.0 mm Security Guard Cartridges (Phenomenex) を 2 個直列に設置した Security Guard (Phenomenex) を用い、KrudKatcher Classic HPLC In-Line Filter (Phenomenex) を付属して、カラムオープン は 40.0°C とした。移動相は (A) 5 mM N,N-dimethylhexylamine (DMHA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を含む ammonium bicarbonate (Sigma Aldrich) にて作成した 10 mM 炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 7.5) と (B) 5 mM DMHA (Sigma Aldrich) を含む アセトニトリル (HPLC 用, Sigma Aldrich) を用い、流速は 0.2 mL/分、分析時間は 18 分で測定した。測定はリニアグラディエント域、A を 93 % で 1 分間後、9 分間で A を 70 % とし 3 分間ホールドした後、5 分間で A を 93 % に再平衡した。サンプルの注入量は 20 µL とし、ニードルは水:アセトニトリル (9:1) 混合液で洗浄した。

LC 装置は Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を、MS 装置は API 3000 (Applied Biosystems) を用い、イオン化はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法により測定した。キャピラリー温度は 500°C とし、イオンモードはポジティブモードとし、スキャンタイプは MRM とした。precursor ion、product ion、declustering potential (DP)、focusing potential (FP)、entrance potential (EP)、collision energy (CE)、collision cell exit potential (CXP) の値は Tune モードによる最適化にて決定し、各々の値を表 3-1 に示した。また、ソース/ガスの値はすべて共通で、collision gas (CAD) 12、curtain gas (CUR) 10、nebulizer gas (NEB) 12、ion spray voltage (IS) 5500 V で設定した。また、自動解析用ソフトとして Analyst® Software Version 1.4.1 (Applied Biosystems) を使用した。MTX および各種

MTX-PGs の赤血球中濃度は、ピーク面積を用いた内部標準法により検量線を作成し、この回帰直線から算出した。MTX および MTX-PGs 濃度を各々で評価し、また、MTX, MTX-PG₂, MTX-PG₃, MTX-PG₄, MTX-PG₅, MTX-PG₆, MTX-PG₇ の合算総濃度を Total MTX-PGs 濃度、MTX-PG₂, MTX-PG₃, MTX-PG₄, MTX-PG₅, MTX-PG₆, MTX-PG₇ の合算総濃度を MTX-PG₂₋₇ 濃度、MTX-PG₃, MTX-PG₄, MTX-PG₅, MTX-PG₆, MTX-PG₇ の合算総濃度を MTX-PG₃₋₇ 濃度、MTX-PG₄, MTX-PG₅, MTX-PG₆, MTX-PG₇ の合算総濃度を MTX-PG₄₋₇ 濃度と表記し評価した。

表 3-1. MTX および各種 MTX-PGs、MTX-d3 の MS/MS の設定域

	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
MTX	455.3	308.2	40.6	239.6	10.0	29.5	20.5
MTX-PG ₂	585.4	308.2	50.6	315.0	8.9	39.1	20.8
MTX-PG ₃	713.2	308.0	52.5	334.3	13.0	50.8	21.1
MTX-PG ₄	842.6	308.3	55.0	280.7	14.0	57.1	20.6
MTX-PG ₅	971.3	308.3	50.0	330.0	10.3	67.3	20.6
MTX-PG ₆	1100.6	308.5	50.8	255.0	12.9	77.2	20.0
MTX-PG ₇	1229.7	308.2	50.9	200.5	8.0	85.1	20.1
MTX-d3	458.3	311.3	66.0	300.0	10.0	27.0	18.0

3-2-7 治療効果指標

本研究では、患者情報として年齢、体重、性別、MTX 処方量、治療経過、疼痛関節数、腫脹関節数および各検査値(反応性蛋白(C-reactive protein, CRP)、赤血球沈降速度(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、マトリックスメタロプロテアーゼ-3(matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、赤血球数(red blood cell, RBC)、平均赤血球色素量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均赤血球容積(mean corpuscular volume, MCV)、白血球数(white blood cell, WBC)、血小板数(platelet count, PLT)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(aspartate transaminase, AST)、アラニンアミノ基転移酵素(alanine transaminase, ALT)、血清クレアチニン濃度(creatinine, CRE)、血液尿素窒素(blood urea nitrogen, BUN)、シアル化糖鎖抗原 KL-6 (sialylated carbohydrate antigen KL-6, KL-6)、リウマチ因子(rheumatoid factor, RF))を JA 静岡厚生病院の診療録より取得した。RA の疾患活動性の指標とし

て DAS 28⁵⁴⁾を用い、第 1 章と同様に計算した。また、クレアチニン・クリアランスも第 1 章と同様に計算した。糖質コルチコイドの投与量についても第 1 章と同様に算出した。

3-2-8 統計解析

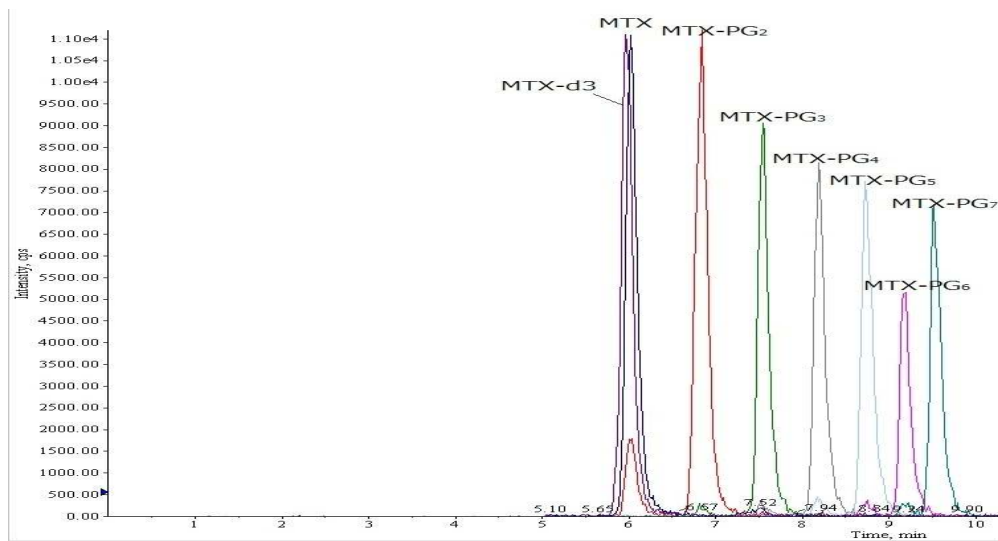
患者背景における性別の比較と、遺伝子型頻度における Hardy-Weinberg 平衡式による予測値および実測値の比較には χ^2 検定を用いて行った。MTX 治療群と生物学的製剤併用治療群との比較および検査値、疾患活動性の群毎の赤血球中 MTX-PGs 濃度および因子の比較については Mann-Whitney 検定を用いて行った。また、各遺伝子多型の比較には Kruskal-Wallis 検定を用いた。赤血球中 MTX-PGs 濃度と検査値および疾患活動性との相関には Spearman の相関係数を用いた。多変量解析は、多重ロジスティック回帰分析を行った。有意水準は 5%とし、すべての統計解析は PASW statistics 18 (SPSS) を使用して行った。

第3節 結果

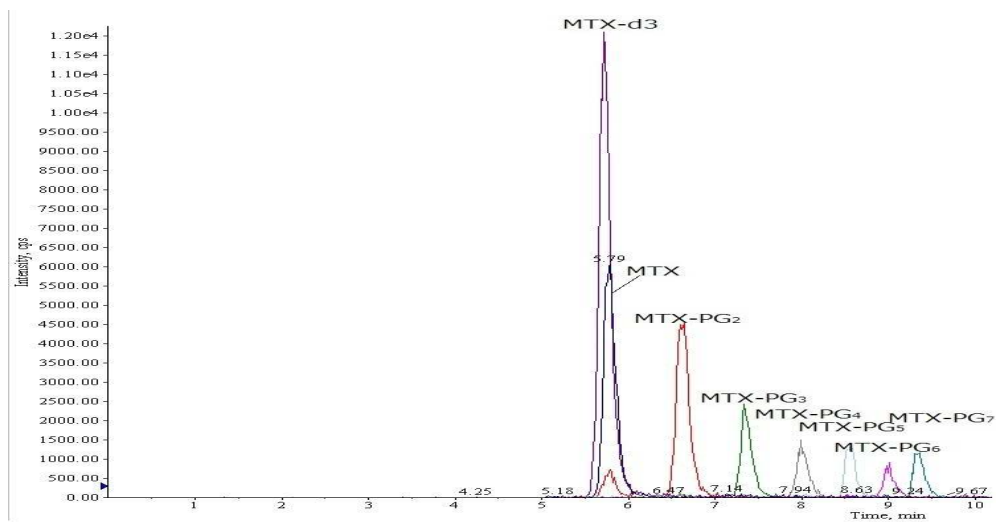
3-3-1 高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計

標準品添加血液サンプルと RA 患者血液サンプルのクロマトグラムを図 3-1 に示した。赤血球中 MTX および各種 MTX-PGs を 10 分以内に分離定量することが可能であった。

全患者の赤血球中 MTX-PGs 濃度はそれぞれ MTX 43.8 (± 2.0) nM、MTX-PG₂ 37.6 (± 2.3) nM、MTX-PG₃ 22.8 (± 2.3) nM、MTX-PG₄ 2.0 (± 0.4) nM、MTX-PG₅ 0.3 (± 0.1) nM、MTX-PG₆ <0.1 nM、MTX-PG₇ <0.1 nM、MTX-PGs 合計 106.5 (± 6.1) nM (平均値 \pm 標準誤差)であり、定量限界は 0.1 nM であった。



(a) 標準品添加血液サンプルのクロマトグラム



(b) RA 患者血液サンプルのクロマトグラム

図 3-1. LC/MS/MS によるクロマトグラム

3-3-2 MTX 単剤治療群と生物学的製剤併用治療群の比較

3-3-2-1 患者背景

赤血球中 MTX および MTX-PGs 濃度を測定した 187 名 (MTX 群 96 名、生物学的製剤併用群 91 名)の患者背景を表 3-2 に示した。赤血球中 MTX および MTX-PGs 濃度は、測定した期間中の濃度を以下のように Area under the curve (AUC) /day で算出した。

濃度 AUC/day=

$$\frac{\left\{ \frac{(t_2 \text{ MTX 濃度} + t_1 \text{ MTX 濃度}) \times (t_2 - t_1)}{2} \right\} + \left\{ \frac{(t_3 \text{ MTX 濃度} + t_2 \text{ MTX 濃度}) \times (t_3 - t_2)}{2} \right\} + \dots + \left\{ \frac{(t_{n-1} \text{ MTX 濃度} + t_n \text{ MTX 濃度}) \times (t_n - t_{n-1})}{2} \right\}}{t_n - t_1} \text{ (nM/day)}$$

(t_1 =1 回目の採血日, t_2 =2 回目の採血日, t_n =最終採血日)

表 3-2. MTX 単剤治療群とバイオ製剤併用治療群における患者背景

	RA 患者		p 値
	MTX 単剤群 (n=96)	生物学的製剤併用群 (n=91)	
年齢 (歳)	66.0 (34.0 — 85.0)	58.0 (24.0 — 84.0)	<0.001**
性別 (男性/女性)	14 / 82	15 / 76	0.924
体重 (kg)	50.0 (34.0 — 95.0)	53.0 (39.0 — 85.0)	0.038**
罹病期間 (年)	11.0 (1.0 — 25.0)	9.0 (2.0 — 32.0)	0.327
MTX 投与量 (mg/week)	6.0 (2.0 — 11.4)	8.0 (2.7 — 14.0)	<0.001**
MTX conc. (nM)	44.199 ± 1.945 42.045 (11.409 — 104.994)	44.545 ± 3.329 43.434 (7.630 — 278.467)	0.457
MTX-PG ₂ conc. (nM)	34.369 ± 1.988 30.776 (2.344 — 119.614)	38.658 ± 2.836 31.596 (4.522 — 223.915)	0.163

MTX-PG ₃ conc. (nM)	18.875 ± 1.479 15.047 (0.000 — 79.928)	22.295 ± 2.237 17.021 (0.000 — 126.817)	0.350
MTX-PG ₄ conc. (nM)	2.050 ± 0.313 0.950 (0.000 — 19.560)	2.292 ± 0.358 1.353 (0.000 — 18.343)	0.395
MTX-PG ₅ conc. (nM)	0.418 ± 0.109 <0.001 (0.000 — 6.195)	0.469 ± 0.117 <0.001 (0.000 — 6.096)	0.319
MTX-PG ₆ conc. (nM)	0.072 ± 0.037 <0.001 (0.000 — 2.454)	0.020 ± 0.012 <0.001 (0.000 — 0.760)	0.718
MTX-PG ₇ conc. (nM)	0.015 ± 0.015 <0.001 (0.000 — 1.483)	0.007 ± 0.007 <0.001 (0.000 — 0.680)	0.976
Total MTX-PGs conc. (nM)	99.998 ± 4.977 88.466 (14.192 — 270.815)	112.287 ± 8.106 96.820 (16.892 — 638.513)	0.224
MTX-PG ₂₋₇ conc. (nM)	55.799 ± 3.442 46.475 (2.344 — 186.036)	63.742 ± 5.137 52.107 (6.360 — 360.047)	0.178
MTX-PG ₃₋₇ conc. (nM)	21.430 ± 1.737 17.638 (0.000 — 100.579)	25.084 ± 2.534 19.020 (0.000 — 136.131)	0.426
MTX-PG ₄₋₇ conc. (nM)	2.555 ± 0.387 1.078 (0.000 — 20.651)	2.788 ± 0.415 1.449 (0.000 — 23.975)	0.320
経口糖質コルチコイド 投与量 [†] (mg/day)	0.0 (0.0 — 10.0)	0.0 (0.0 — 6.5)	0.521
DAS28	2.14 (1.21 — 4.29)	1.90 (1.21 — 4.15)	0.224
Number of Swelling Site (points)	1.0 (0.0 — 14.0)	1.0 (0.0 — 9.0)	0.605
Number of Pain Site (ponts)	0.0 (0.0 — 2.5)	0.0 (0.0 — 5.0)	0.638

CRP (mg/dL)	0.20	0.10	0.010**
	(0.10 — 8.62)	(0.10 — 5.00)	
ESR (mm/hr)	15.5	10.0	0.016**
	(3.0 — 86.5)	(2.0 — 70.0)	
MMP-3 (ng/mL)	75.05	57.40	0.067*
	(23.60 — 1370.05)	(16.20 — 547.85)	
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	3.84	3.90	0.300
	(2.76 — 4.87)	(3.11 — 5.29)	
MCH (pg)	32.33	32.00	0.861
	(22.20 — 36.50)	(18.80 — 38.30)	
MCV (fl)	96.25	95.50	0.818
	(71.90 — 108.90)	(64.90 — 112.20)	
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	5.58	5.20	0.010**
	(3.95 — 10.85)	(2.20 — 11.40)	
PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	233.5	218.5	0.253
	(106.0 — 433.0)	(106.5 — 383.5)	
AST (IU/L)	23.0	24.0	0.263
	(12.0 — 72.0)	(12.0 — 72.5)	
ALT (IU/L)	17.7	22.0	0.144
	(8.0 — 86.0)	(6.0 — 94.0)	
Ccr (mL/min)	83.49	106.68	<0.001**
	(38.06 — 210.69)	(38.65 — 231.48)	
BUN (mg/dL)	15.63	13.80	<0.001**
	(9.00 — 27.50)	(7.00 — 22.85)	
KL-6 (U/mL)	228.45	251.68	0.211
	(81.60 — 660.45)	(10.30 — 712.90)	
RF (IU/mL)	40.0	41.0	0.625
	(6.0 — 550.5)	(4.50 — 1506.0)	

性別と赤血球中 MTX-PGs 濃度の項目以外は、中央値(範囲)で示した。

赤血球中 MTX、MTX-PGs 濃度は平均値 \pm 標準誤差および中央値(範囲)で示した。

†全ての糖質コルチコイド用量をプレドニゾロン用量に換算した。

a) MTX 単剤治療群と生物学的製剤併用群の比較 (Mann-Whitney 検定)

* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$ で示した。

3-3-2-2 多変量解析

単変量解析の結果、両群間で $p<0.1$ となった因子について多変量解析を実施した。 $p<0.1$ となった 10 種類の項目を独立変数とし、尤度比による変数増加法を用いた多重ロジスティック回帰分析を行った (表 3-3)。事前に変数の散布図を観察し、著しく直線関係を示すような変数は存在しないことを確認した。モデル χ^2 検定の結果は $p<0.01$ で有意であった。判別率的中率は 69.1%であった。

表 3-3. MTX 治療群と生物学的製剤併用治療群における多変量解析

	偏回帰係数	オッズ比(95%CI)	p 値
年齢	-0.066	1.068 (1.036 – 1.100)	<0.001
モデル χ^2 検定 $p<0.01$			
判別率的中率 65.7%			

3-3-3 治療効果および臨床検査値と遺伝子多型の関連

赤血球中 MTX-PGs 濃度を測定した 187 名のうち MTX 単剤治療群 96 名を対象に、細胞内葉酸代謝に関わる 2 つのタンパク質の計 5 つの SNPs (*RFC1* -43T>C、80G>A、*GGH* -401C>T、-354G>T、452C>T) の頻度分布を表 3-4 に示した。両群におけるすべての分布は Hardy-Weinberg 平衡に従っていた。また、各遺伝子多型と疾患活動性および検査値について単変量解析を行い、 $p<0.1$ となった因子を表 3-5 に示した。*RFC1* -43T>C 遺伝子多型で $p<0.1$ となる因子は認められなかった。*RFC1* 80G>A 多型において、MTX-PG₄ 濃度に有意な差が認められた($p=0.045$)。

表 3-4. 細胞内葉酸代謝に関わるタンパク質における遺伝子多型の頻度分布

	遺伝子型	人数	頻度(%)	アレル	頻度	<i>p</i> 値 ^{a)}
<i>RFC1</i> -43T>C	T/T	5	5.2	T	0.240	0.910
	C/T	36	37.5			
	C/C	55	57.3	C	0.760	
	計	96				
<i>RFC1</i> 80G>A	G/G	16	16.7	G	0.417	0.962
	G/A	48	50.0			
	A/A	32	33.3	A	0.583	
	計	96				
<i>GGH</i> -401C>T	C/C	61	63.5	C	0.797	1.000
	C/T	31	32.3			
	T/T	4	4.2	T	0.203	
	計	96				
<i>GGH</i> -354G>T	G/G	79	82.3	G	0.906	0.983
	G/T	16	16.7			
	T/T	1	1.0	T	0.094	
	計	96				
<i>GGH</i> 452C>T	C/C	85	88.5	C	0.943	0.838
	C/T	11	11.5			
	T/T	0	0.0	T	0.057	
	計	96				

a) Hardy-Weinberg 平衡式による予測値と実測値の比較(χ^2 検定)

表 3-5. 細胞内葉酸代謝に関わるタンパク質における遺伝子多型の解析

	<i>RFC1</i> 80G>A			<i>p</i> 値 ^{a)}
	GG (n=16)	GA (n=48)	AA (n=32)	
MTX 投与量 (mg/week)	6.0 (4.0 – 10.0)	6.7 (2.0 – 11.4)	6.0 (2.0 – 10.0)	0.007**
MTX-PG ₄ conc. (nM)	1.235 ± 0.650 0.184 (0.000 – 8.582)	2.941 ± 0.603 1.940 (0.000 – 19.560)	2.249 ± 0.600 1.416 (0.000 – 13.026)	0.045**
Number of Pain Site (point)	0.0 (0.0 – 2.5)	0.0 (0.0 – 2.5)	0.0 (0.0 – 1.5)	0.057*

<i>GGH-401C>T</i>				
	CC	CT	TT	<i>p</i> 値 ^{a)}
	(n=61)	(n=31)	(n=4)	
RF (IU/mL)	30.5 (6.0 – 414.0)	97.5 (22.0 – 246.0)	41.0 (26.0 – 56.0)	0.010**
<i>GGH-354G>T</i>				
	GG	GT	TT	<i>p</i> 値 ^{a)}
	(n=79)	(n=16)	(n=1)	
ESR (mm/hr)	13.0 (3.0 – 86.5)	24.0 (3.5 – 57.0)	36.0	0.010**
<i>GGH 452C>T</i>				
	CC	CT	TT	<i>p</i> 値 ^{a)}
	(n=85)	(n=11)	(n=0)	
CRP (mg/dL)	0.21 (0.10 – 8.62)	0.10 (0.10 – 2.74)	—	0.057*

中央値(範囲)で示した。

a) 遺伝子多型と各因子の比較 (Kruskal-Wallis 検定) * $p < 0.1$, ** $p < 0.05$ で示した。

3-3-4 治療効果の解析

3-3-4-1 治療効果の影響因子の解析

MTX 単剤治療群 96 名を対象に、DAS28 に基づく疾患活動性、DAS28 に組み込まれる腫脹および疼痛関節数への影響因子の解析を行った。疾患活動性の分類は The European League Against Rheumatism (EULAR) の基準に従い DAS28<2.3 を寛解群、DAS28 \geq 2.3 を未寛解群とした。腫脹、疼痛関節数は中央値をカットオフ値とし、低値と高値の 2 群に分けた。以上の条件で単変量解析を行い、 $p < 0.1$ となった因子を表 3-6 に示した。DAS28 と疼痛関節数に影響を与える因子は認められなかった。DAS28 と赤血球中 MTX-PGs 濃度の関連に統計学的有意差は認められなかったが、腫脹関節数が少ない群では赤血球中 MTX-PG₄ 濃度が有意に高かった。

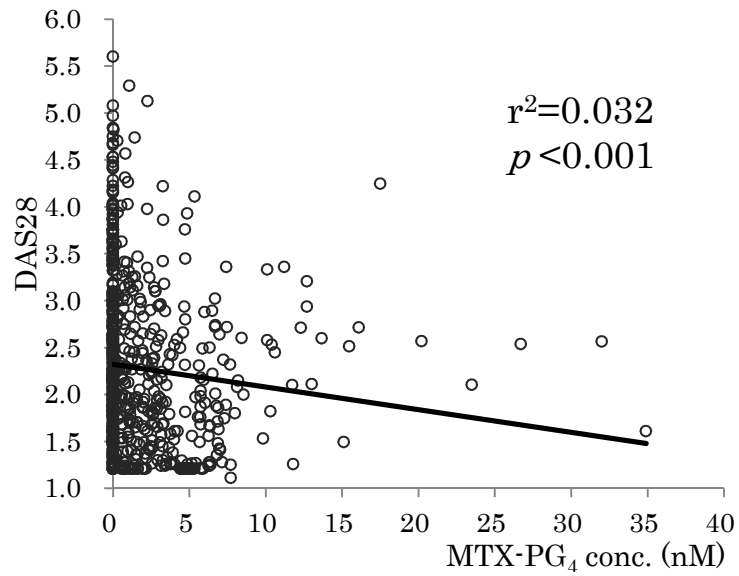
表 3-6. 治療効果の影響因子

	Number of Swelling Site (points)		p 値 ^{a)}
	Low(<1) (n=50)	High(\geq 1) (n=46)	
年齢 (歳)	63.0 (34.0 – 84.0)	68.0 (41.0 – 85.0)	0.029**
体重 (kg)	52.0 (34.0 – 92.5)	48.0 (34.5 – 95.0)	0.044**
MTX-PG ₄ conc. (nM)	3.086 ± 0.484 2.070 (0.000 – 13.026)	1.834 ± 0.515 0.950 (0.000 – 19.560)	0.013**

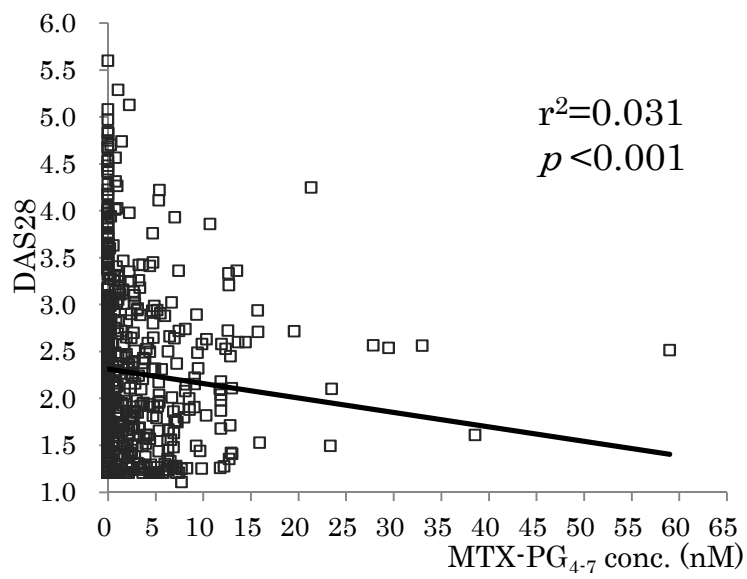
a) 腫脹関節数における各因子の比較 (Mann-Whitney 検定) **p<0.05 で示した。

3-3-4-2 疾患活動性と赤血球中 MTX-PGs 濃度の関連

赤血球中 MTX-PGs 濃度を継時的に測定した MTX 単剤治療群 96 名の全 676 ポイントにおける赤血球中 MTX-PGs 濃度と疾患活動性との関連を解析した。MTX-PG₄、MTX-PG₄₋₇ 濃度は増加すると疾患活動性が低減する傾向にあった (図 3-2)。また、各濃度が寛解値である DAS28=2.3 に達する濃度を ROC 曲線にて解析し、結果を表 3-7 に示し、ROC 曲線を図 3-3 に示した。



(a) 疾患活動性と赤血球中 MTX-PG₄濃度の相関

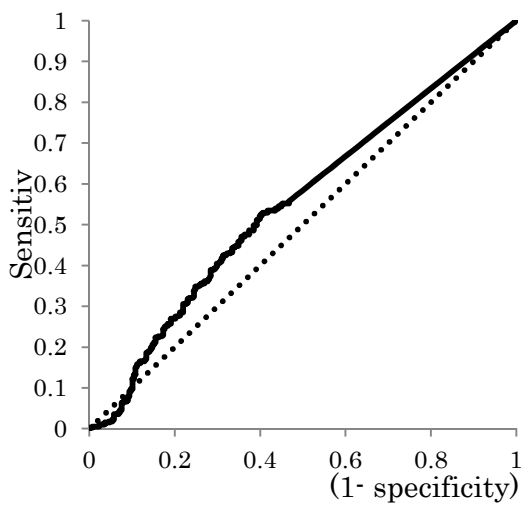


(b) 疾患活動性と赤血球中 MTX-PG₄₋₇濃度の相関

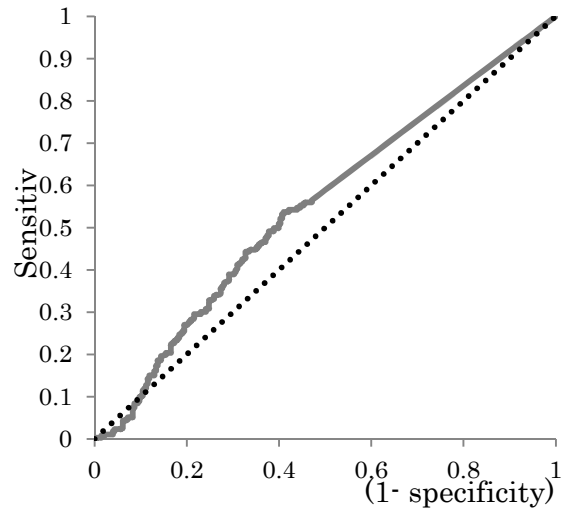
図 3-2. 各測定ポイントにおける疾患活動性と赤血球中 MTX-PGs 濃度の相関
(Spearman の順相関係数)

表 3-7. 寛解値に対する MTX-PGs 濃度の ROC 解析

	カットオフ値	AUC(95%CI)	<i>p</i> 値
MTX-PG ₄ conc. (nM)	0.431	0.554 (0.510 – 0.598)	0.017
MTX-PG ₄₋₇ conc. (nM)	0.313	0.553 (0.508 – 0.597)	0.020



(a) 寛解値に対する MTX-PG₄ の ROC 曲線



(b) 寛解値に対する MTX-PG₄₋₇ の ROC 曲線

図 3-3. 寛解値に対する各濃度の ROC 曲線

3-3-5 臨床検査値の解析

3-3-5-1 臨床検査値の影響因子の解析

MTX-PGs 濃度を測定した MTX 群 96 名を対象に、MTX に関する臨床検査値を、カットオフ値を中央値として分けた 2 群間で単変量解析を行い、 $p < 0.1$ となった因子を表 3-8 に示した。赤血球中 MTX および MTX-PGs 濃度は、3-3-2 と同様に AUC /day で算出した。

表 3-8. MTX に関する臨床検査値に影響する因子

	CRP (mg/dL)		<i>p</i> 値 ^{a)}
	Low(<0.2) (n=48)	High(\geq 0.2) (n=48)	
年齢 (歳)	63.5 (34.0 – 82.0)	68.5 (38.0 – 85.0)	0.034**
	ESR (mm/hr)		<i>p</i> 値 ^{a)}
	Low(<16) (n=48)	High(\geq 16) (n=48)	
年齢 (歳)	64.0 (34.0 – 83.0)	67.0 (41.0 – 85.0)	0.030**
	MMP-3 (ng/mL)		<i>p</i> 値 ^{a)}
	Low(<76.0) (n=48)	High(\geq 76.0) (n=48)	
年齢 (歳)	63.0 (34.0 – 78.0)	68.0 (38.0 – 85.0)	0.006**

	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)		<i>p</i> 值 ^{a)}
	Low(<3.8)	High(≥ 3.8)	
	(n=48)	(n=48)	
MTX conc. (nM)	50.211 \pm 2.978 47.043 (11.847 – 104.994)	38.187 \pm 2.212 35.647 (11.409 – 93.564)	0.002**
MTX-PG ₂ conc. (nM)	40.039 \pm 3.368 34.273 (2.344 – 119.614)	28.698 \pm 1.809 26.407 (3.158 – 70.046)	0.008**
MTX-PG ₃ conc. (nM)	23.454 \pm 2.579 17.596 (0.000 – 79.928)	14.296 \pm 1.140 13.552 (0.955 – 35.408)	0.002**
Total MTX-PGs conc. (nM)	116.759 \pm 8.381 108.302 (14.192 – 270.815)	83.237 \pm 4.234 76.546 (16.101 – 153.356)	0.001**
MTX-PG ₂₋₇ conc. (nM)	66.547 \pm 5.963 54.928 (2.344 – 186.036)	45.050 \pm 2.726 41.173 (4.692 – 91.918)	0.005**
MTX-PG ₃₋₇ conc. (nM)	26.508 \pm 3.066 19.869 (0.000 – 100.579)	16.353 \pm 1.304 14.857 (1.534 – 40.769)	0.004**
年齢 (歳)	70.0 (38.0 – 84.0)	62.0 (34.0 – 85.0)	<0.001**
体重 (kg)	46.0 (34.0 – 63.0)	52.0 (40.0 – 95.0)	<0.001**

	MCV (fl)		<i>p</i> 值 ^{a)}
	Low(<96.3)	High(≥ 96.3)	
	(n=48)	(n=48)	
年齢 (歳)	62.0 (34.0 – 85.0)	68.0 (44.0 – 84.0)	0.063*

	AST (U/L)		<i>p</i> 値 ^{a)}
	Low(<24) (n=51)	High(≥ 24) (n=45)	
MTX conc. (nM)	40.074 ± 2.589 38.716 (11.847 – 101.571)	48.874 ± 2.805 45.604 (11.409 – 104.994)	0.019**
MTX-PG ₅ conc. (nM)	0.513 ± 0.246 <0.001 (0.000 – 5.469)	1.028 ± 0.285 0.394 (0.000 – 6.195)	0.050*
Total MTX-PGs conc. (nM)	91.981 ± 6.436 80.694 (14.192 – 256.226)	109.083 ± 7.563 97.228 (16.101 – 270.815)	0.047**

	ALT (U/L)		<i>p</i> 値 ^{a)}
	Low(<18) (n=48)	High(≥ 18) (n=48)	
年齢 (歳)	62.0 (34.0 – 85.0)	67.5 (48.0 – 84.0)	0.027**
体重 (kg)	52.0 (34.5 – 95.0)	49.0 (34.0 – 92.5)	0.035**

	Ccr (mL/min)		<i>p</i> 値 ^{a)}
	Low(<83.5) (n=48)	High(≥ 83.5) (n=48)	
MTX 投与量 (mg/week)	6.0 (2.0 – 11.4)	6.4 (2.0 – 10.0)	0.028**

	BUN (mg/dL)		<i>p</i> 値 ^{a)}
	Low(<15.6) (n=48)	High(≥ 15.6) (n=48)	
年齢 (歳)	63.0 (34.0 – 78.0)	67.5 (38.0 – 85.0)	0.053*

赤血球中 MTX-PGs 濃度の項目以外は、中央値 (範囲)で示した。

赤血球中 MTX、MTX-PGs 濃度は平均値±標準誤差および中央値 (範囲)で示した。

a) 各検査値群における因子の比較 (Mann-Whitney 検定) **p*<0.1,***p*<0.05 で示した。

3-3-5-2 多変量解析

単変量解析の結果、MTX に関する臨床検査値について高値群、低値群の両群間で違いが $p<0.1$ となった因子が複数ある項目について、多変量解析を実施した。各々の項目を独立変数とし、尤度比による変数増加法を用いた多重ロジスティック回帰分析を行った（表 3-9）。事前に変数の散布図を観察し、著しく直線関係を示すような変数は存在しないことを確認した。モデル χ^2 検定の結果は全てにおいて $p<0.01$ で有意であった。判別的中率はそれぞれ示した。AST においては回帰式が組まれなかった。

表 3-9. MTX に関する臨床検査値における多変量解析

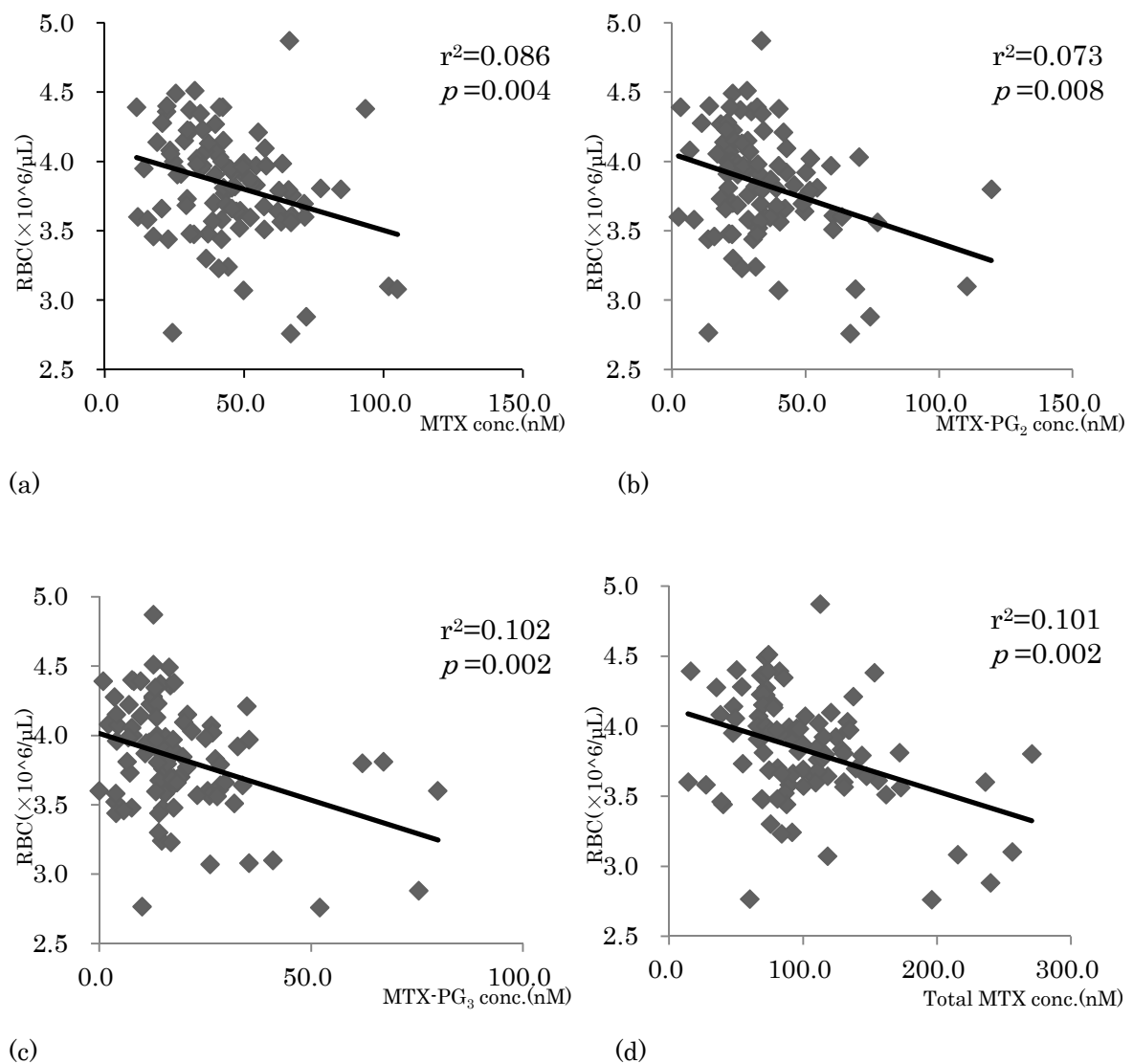
CRP			
	偏回帰係数	オッズ比(95%CI)	p 値
年齢	0.044	1.045 (1.002 – 1.089)	0.039
判別的中率 : 58.5%			
ESR			
	偏回帰係数	オッズ比(95%CI)	p 値
年齢	0.057	1.058 (1.008 – 1.111)	0.022
<i>GGH-354G>T</i>	1.947	7.009 (1.644 – 29.888)	0.009
判別的中率 : 67.4%			
RBC			
	偏回帰係数	オッズ比(95%CI)	p 値
体重	0.105	1.122 (1.049 – 1.201)	0.001
MTX conc.	-0.05	1.051 (1.017 – 1.086)	0.003
判別的中率 : 68.5%			

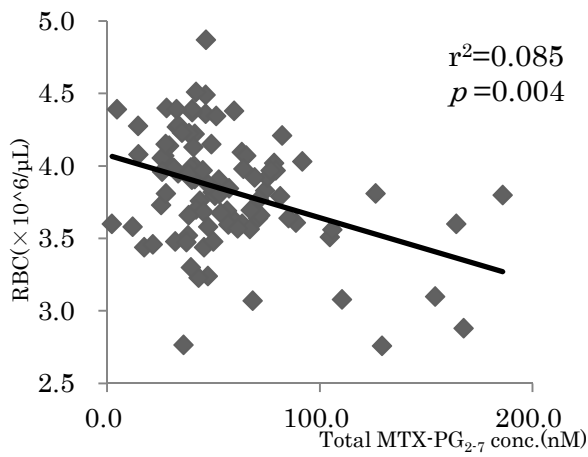
ALT			
	偏回帰係数	オッズ比(95%CI)	p 値
体重	0.043	1.044 (1.000 – 1.089)	0.049

判別的中率 : 61.8%

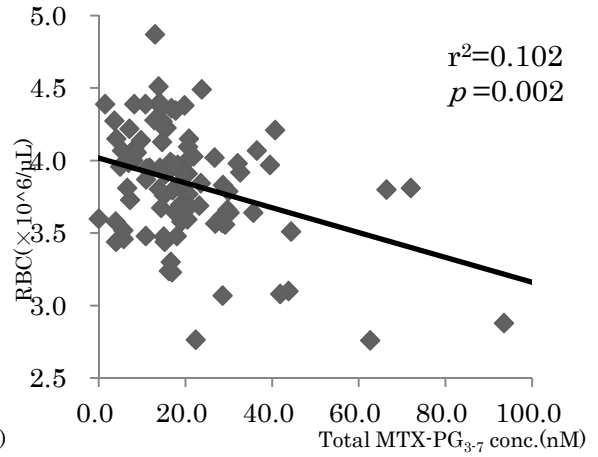
3-3-5-3 臨床検査値と赤血球中 MTX-PGs 濃度との関連

MTX-PGs 濃度を測定した MTX 群 96 名において、検査値と赤血球中 MTX-PGs 各濃度と MTX-PGs 総和濃度との相関を解析した。赤血球中 MTX および MTX-PGs 濃度は 3-3-2 と同様に AUC/day で算出した。赤血球中 MTX または MTX-PGs 濃度の増加に伴い、RBC が減少し、AST が増加する傾向が認められた (図 3-4)。





(e)



(f)

図 3-4-1. RBC と(a) MTX (b) MTX-PG₂ (c) MTX-PG₃ (d) Total MTX-PGs (e) MTX-PG₂₋₇ (f) MTX-PG₃₋₇ 濃度の相関

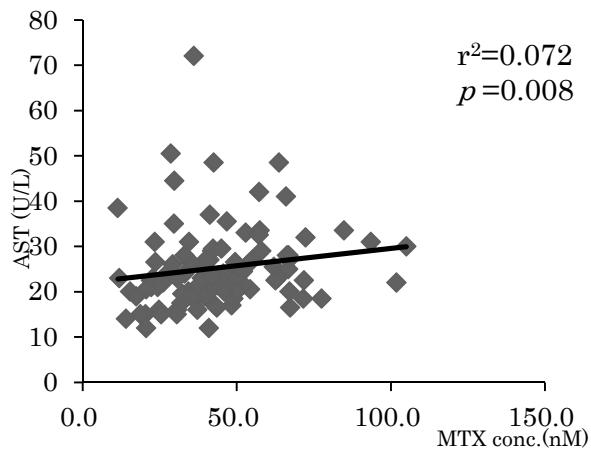


図 3-4-2. AST と MTX 濃度の相関

図 3-4. 検査値と赤血球中 MTX-PGs 濃度の相関 (Spearman の順相関係数)

第4節 考察

MTX は、抗がん剤や抗炎症薬として広く用いられている薬剤の一つである。低用量の MTX は、1 週間毎のパルス療法として経口で投与され、RA の治療に広く用いられている^{100,101)}。MTX は細胞内で、MTX-PGs に変換されてから葉酸代謝の関連酵素に結合し酵素活性を阻害する¹⁰²⁾。MTX 投与中の患者では、しばしば肝機能不全や骨髄抑制、間質性肺炎のような副作用が見られるため、MTX の治療薬物モニタリング (therapeutic drug monitoring, TDM) は抗がん剤として MTX を大量に投与中の患者に対し臨床的に行われている。血清中 MTX 濃度は MTX を投与中および投与後、定期的にモニターされるが、低用量 MTX 療法を受けている RA 患者においては、血清中 MTX の蓄積性はほとんどなく、血清中濃度を TDM に用いることは困難である。血清中 MTX 濃度の代わりに、赤血球中に蓄積した MTX-PGs が MTX の効果や副作用のマーカーとして応用できる可能性が示唆されている³¹⁾が、日本人における報告はほとんどない。多くの研究者が赤血球中 MTX-PGs 濃度の定量法を報告している⁹¹⁻⁹⁹⁾が、継続的に MTX-PGs をモニターしている例は少なく、臨床応用にも至っていない。

本章では、Haandel らの方法⁹⁹⁾を改変し、LC/MS/MS を用いて、継続的に MTX-PGs をモニターすることを試みた。極性エンドキャップ C18 カラムを用い、移動相をグラディエントモードで最適化することで、10 分以内に MTX-PGs を定量限界 0.1 nM で分離定量することを可能とした。MTX 単剤治療群と生物学的製剤併用治療群で比較をしたところ、MTX 単剤治療群の方が、MTX 投与量が有意に少ないのに対し赤血球中 MTX-PGs 濃度に統計学的に有意な差は認められなかった。多変量解析においては生物学的製剤の使用に年齢が影響していることが示された。主に年齢の若い患者が生物学的製剤を使用していることが示され、近年、早期から生物学的製剤を積極的に使用することで寛解を目指すことが可能となってきたことや、以前は高齢者における生物学的製剤の安全性が確立されていなかったことなどの時代背景によるものであると考えられた。

また、MTX 単剤治療の患者を対象に遺伝子多型や薬効、臨床検査値と赤血球中 MTX-PGs 濃度の関連を検討した。*RFC1* 80G>A SNP においては、AA 群では投与量が他の群より少ないが、疼痛関節数が少なくなる傾向にあった。また、GG 群は GA 群や AA 群と比べ赤血球中 MTX-PG₄ 濃度が有意に低値であった。*RFC1* 80G>A SNP の AA 多型は MTX の薬効に関連することが以前にも報告されており^{71,86)}また本研究において MTX-PG₄ が疾患活動性に影響を与えることが示唆され、*RFC1* 80GG 群では MTX-PG₄ 濃度が低いため MTX の効果が低下することが考えられた。また、*GGH* -401C>T SNP では他の群に比べ CC 群において RF が低かった。*GGH* -354G>T SNP の GG 群では ESR が低く、*GGH*452C>T SNP の CC 群において CRP が高かった。これまでに、*GGH* -401C>T SNP において TT 群では CC 群、CT 群に比べ CRP が高いという報告がされている⁷¹⁾。RA 患者の抗炎症薬物療法において CRP および RF 値の減少と臨床的な改善が関連していたことから¹⁰³⁾、CC 群では RF が低いことで炎症が低下することが考えられた。*GGH* -354G>T は *GGH* のプロモーター活性を上昇させることにより *GGH* の発現レベルを上昇させ、MTX-PGs レベルに影響を与えることが知られており⁴⁴⁾、また *GGH*452C>T SNP はアミノ酸変異が起こり⁴⁵⁾MTX-PGs が細胞内に蓄積しやすくなるため、そのようなメカニズムが炎症に影響を与えるのではないかと考える。MTX-PGs 濃度と MTX の細胞内動態に関わる遺伝子多型との関連性の報告はいくつかあるが^{44,46,87,95,97,99,104)}、MTX-PGs

濃度と遺伝子多型の関連はあまり明らかになっていない。Dervieux らは RA 患者において、*RFC1* 80AA 遺伝子型の患者では、他の遺伝子型を持つ患者に比べて赤血球中 MTX-PGs レベルが高いことを報告している⁵¹⁾。また、抗がん剤として MTX による治療を受けている小児白血病患者を対象とした Laverdiere らの報告では、*RFC1* 80AA 遺伝子型を持つ患者は GG、GA 遺伝子型の患者と比較して血漿中 MTX 濃度が高いことが示されている¹⁰⁵⁾。本研究でも *RFC1* 遺伝子多型における MTX-PG₄ 濃度の差による疾患活動性への影響を示した。

疼痛、腫脹関節数と赤血球中 MTX-PGs 濃度の関連を検討したところ、腫脹関節数が少ない群では赤血球中 MTX-PG₄ 濃度が有意に高いことが認められた。また、赤血球中 MTX-PGs 濃度を測定した全ポイントにおける DAS28 と、赤血中 MTX-PGs 濃度の関連を検討したところ、MTX-PG₄、MTX-PG₄₋₇ 濃度は増加すると疾患活動性が低減する傾向にあった。さらに、各濃度が寛解値に達する濃度を解析したところ、MTX-PG₄ 濃度が 0.431nM、MTX-PG₄₋₇ 濃度が 0.313nM となった。

また、MTX に関する臨床検査値への MTX-PGs 濃度等の影響を検討した多重ロジスティック解析分析の結果、臨床検査値に与える影響がほとんどの場合体重や年齢であった中、赤血球数には MTX 濃度が影響していた。よって、MTX 投与量を増やす際には MTX 濃度の上昇を考慮することで貧血を抑えられる可能性があることが期待された。更に、赤血球中 MTX や MTX-PGs 濃度が増加すると、赤血球数が減少し、AST が増加する傾向が認められた。赤血球中 MTX および各種 MTX-PGs 濃度をモニタリングすることで、貧血や肝障害を未然に防ぐことができる可能性が示された。

各種 MTX-PGs 濃度に注目してみると、活性体となった MTX-PGs の中でも付加するポリグルタミン酸が長鎖である MTX-PG₄₋₇、特に MTX-PG₄ が高濃度だった患者では良好な治療効果が得られていることが認められた。海外の治療では、RA の疾患活動性の高い群に比べて低い群では MTX-PGs 濃度が著しく高いという報告があり³⁰⁾、赤血球中 MTX-PGs 濃度が 50 nM 以上の患者では、良好な治療反応があるという報告もある³¹⁾。また、MTX 投与量が多い患者は、比較的長鎖の MTX-PGs 濃度が高いといった報告や^{32,33)}、特に MTX-PG₅ が疾患活動性の改善に重要である報告がされている¹⁰⁶⁾。本研究においても長鎖の MTX-PGs が薬効に影響することを示した。また、比較的高用量の MTX を投与されている患者は総 MTX-PGs 濃度に対する長鎖の MTX-PGs (MTX-PG₄₋₇) の濃度の割合が高くなることが認められたため、MTX 非応答者でも、MTX を増量することで炎症が改善される可能性が考えられた。投与直後の血清中の MTX モニタリングにより肝毒性や血球減少を検出する報告や¹⁰⁷⁾赤血球中 MTX-PGs 濃度が副作用を持つと高くなる傾向がある報告がある³¹⁾。また、RA 治療において MTX-PGs 濃度と副作用との関連はなかったという報告もあるが^{58,108)}、RA における赤血球 MTX-PGs 濃度と副作用の関連を示す報告は未だ少ない。

赤血球中 MTX-PGs 濃度は変動や個人差が大きく、副作用との関連も不明な点が多いため、引き続きさらなる研究が必要である。日本人 RA 患者の低用量 MTX 療法における効果と毒性のマーカーとしての MTX-PGs 濃度モニタリングの実用性を評価するためには、臨床応用に向けたさらなる大規模な解析を行う必要があると考えられる。

RA は医療が発展した現在社会においても今なお予防や完治することは困難であり、明確な原因が不明の自己免疫疾患である。進行性関節破壊が主要な病態であるため、高齢化が進む現在の日本において、RA による身体障害を有する高齢患者が今後増加していくことが懸念される。RA 患者の QOL を向上させるためには、早期に RA を診断し、治療を開始し、早期に完全寛解に持って行き寛解を維持することが重要である。RA では現在 MTX がアンカードラッグとして位置づけられており、低用量パルス療法が広く用いられている^{2,3)}。さらに我が国においては 2011 年には 16mg/週まで投与可能となり、第1選択として投与できるようになった。しかし MTX は、効果や副作用に個人差が大きく、投与量設定の難しい薬剤の一つである。MTX は複雑な細胞内動態をたどり、さらに薬物応答性の個人差の原因としてその動態に関わるタンパク質の遺伝子が注目されており、MTX を用いた薬物治療ではそれらの遺伝子の多型や発現量と MTX の効果・毒性との関連の重要性が示唆されている^{9,71,89,109-116)}。また、RA 患者において赤血球中 MTX-PGs 濃度と疾患活動性の間に関連があることも報告されている³⁰⁻³³⁾。MTX による薬物治療開始時に、RA 患者において MTX 治療に影響を与える遺伝子多型情報の解析や、投与中の治療薬物モニタリングを行い、それらを臨床応用することができれば、個々の患者に対してより効果的かつより安全な薬物治療を行うことができる。このような個別化薬物治療は、患者によりよい治療を施し、QOL を改善できるだけでなく、医療経済学的にも多大なメリットがあると考えられる。また RA 治療においては、代表的な病態である炎症や、肝障害、感染症などの有害事象におけるモニタリングが重要である。これまでも様々なマーカーが RA における炎症のモニタリングに使用されているが、他の炎症性疾患によっても上昇するようなマーカーが多く、RA の本質的要因によって上昇するようなバイオマーカーが求められている。また RA による炎症に特異的なバイオマーカーが発見されれば、RA の病因解明につながることも考えられる。

本研究では、日本人 RA 患者における赤血球中 MTX-PGs 濃度ならびに葉酸代謝関連タンパク質遺伝子多型や葉酸トランスポーター遺伝子発現量と、MTX の薬効や毒性に関する研究を行った。第1章では、葉酸の取り込みおよび代謝に関わる遺伝子多型のうち、MTX の薬理作用に直接影響する因子として *DHFR* 19 bp deletion、*TS* 28 bp tandem repeat、6 bp deletion、*ATIC* 347C>G、および MTX の細胞内での動態に影響を与える因子として *RFC1* 80G>A、*GGH* -401C>T、-354G>T、452C>T と RA 患者における薬効との関連について検討した。その結果、MTX の薬効が十分に認められるレスポンドー群と、MTX の薬効が不十分のため、バイオ製剤を併用しているノンレスポンドー群では *RFC1* 80G>A の頻度分布が有意に異なり、レスポンドー群では A アレルを有する割合が高いことが示唆された。MTX による治療効果が不十分な患者に対しては、バイオ製剤を早期使用することで関節炎症の抑制だけでなく、関節破壊の抑制も期待でき、患者の QOL の向上につながると考えられた。

第2章では、MTX を細胞へ取り込む葉酸トランスポーターの *RFC1*、および近年同定された *PCFT* に注目し、MTX 単剤にて治療している RA 患者において、末梢血単核球における遺伝子発現量を解析し、薬効との関連を検討した。*PCFT* mRNA 発現量と疾患活動性には関連は認められなかったが、*RFC1* mRNA 発現量は *PCFT* と比べ個人差が大きく、*RFC1* mRNA 発現量と疾患活動性との間に有意な相関関係が認められた。*RFC1* mRNA 発現量と MTX 投与量、また疾患活動性と MTX 投与

量の間には相関が認められなかったため、疾患活動性と *RFC1* 遺伝子発現量の重要な関連性が示唆された。健常人の末梢血単核球における *RFC1* mRNA 発現量にも大きな個人差が存在したため、個人の *RFC1* 遺伝子発現量を解析することにより MTX の薬効が予測できる可能性が考えられた。また、滑膜組織中と末梢血単核球中の *RFC1* mRNA 発現量を解析したところ有意な相関が認められた。従って、滑膜組織における病変が末梢血単核球に反映されているため、末梢血単核球中における *RFC1* 遺伝子発現量を解析することで滑膜組織の病変を含めた薬効予測ができる可能性が示された。

第 3 章では、RA 患者の赤血球中 MTX および MTX-PGs 濃度を継続的に測定し、薬効および臨床検査値との関連について検討した。*RFC1* 80G>A 遺伝子多型において赤血球中 MTX-PG₄ 濃度の有意差が認められた。MTX 単剤治療患者において、赤血球中 MTX および MTX-PGs 濃度と疾患活動性の関連を解析した結果、MTX-PG₄、MTX-PG₄₋₇ 濃度が増加すると疾患活動性が低下する傾向が認められた。また、臨床検査値との関連を解析したところ、赤血球中 MTX や MTX-PGs 濃度が増加すると、赤血球数が減少し、AST が増加する傾向が認められた。MTX を増量しポリグルタミル酸が長鎖に付加する MTX-PG₄₋₇ 濃度を上昇させることで効果が得られ、MTX-PGs 濃度をモニタリングすることにより肝障害や血球数減少を未然に防ぐ可能性が考えられた。

本研究の結果は、RA 患者の遺伝的背景を考慮した薬物動態解析ならびに個別化 MTX 投与設計を行うことで MTX 療法の最適化に重要な情報を提供するものである。今後、RA における個別化薬物療法の実現のため、さらに大規模な臨床研究において遺伝子解析や血中濃度等の、様々な要因を組み合わせた、エビデンスレベルの高い検討を実施することが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご親切なるご指導、ご鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 臨床薬効解析学講座 教授 伊藤邦彦先生に厚く感謝の意を表します。

数々のご指導、ご協力をいただきました岐阜薬科大学 実践薬学大講座 実践社会薬学研究室 准教授 林 秀樹先生、静岡県立大学大学院薬学研究院 臨床薬効解析学講座 講師 井上和幸先生、助教 辻 大樹先生、助教 平井啓太先生に深く感謝の意を表します。

また、本論文の作成にあたり、ご高閲、ご助言を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院 臨床薬剤学講座 教授 賀川義之先生、分子病態学講座 教授 森本達也先生、医薬品情報解析学 教授 山田 浩先生に感謝致します。

本研究において、診断および治療のすべてを通してご協力いただきましたJA静岡厚生連静岡厚生病院 副院長 坪井声示先生、同病院 リウマチ科 診療副部長 塩浦朋根先生、同病院 リウマチ科 医師 小川久美子先生ならびに同病院 薬局長 松山耐至先生に厚く感謝致します。

本研究をおこなうにあたりご協力いただきました静岡県立大学大学院薬学研究科 臨床薬効解析学講座の皆さまに深く感謝の意を表します。

実験および論文作成にご協力頂きました堀野雅人氏、森下茉莉子氏、荒井輝久氏、大鹿雄美氏に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたりご協力いただきました静岡県立大学大学院薬学研究院 臨床薬効解析学講座の皆さんに深く感謝の意を表します。

最後に、貴重な検体を提供していただきました患者の皆様ならびに健常人ボランティアの皆様には深く感謝致します。

参考文献

1. 治療ガイドライン第 1 章－総論,関節リウマチの診療マニュアル(改訂版)－診断のマニュアルと EBM に基づく治療ガイドライン,ed.by 厚生労働省研究班,財団法人日本リウマチ財団., 東京, pp.58-62, (2004).
2. Kawabata D. and Mimori T., [Disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs): an overview]. *Nihon Rinsho.*, **63 Suppl 1**, 489-492 (2005).
3. 三森経世,治療ガイドライン第 5 章－抗リウマチ薬,関節リウマチの診療マニュアル (改訂版)－診断のマニュアルと EBM に基づく治療ガイドライン,ed.by 厚生労働省研究班,財団法人日本リウマチ財団,東京., pp.84-98, (2004)
4. Suzuki Y., Wakabayashi T. and Jackson K., [Methotrexate for therapy of rheumatoid arthritis]. *Nihon Rinsho.*, **63 Suppl 1**, 498-502 (2005).
5. Shinde CG., Venkatesh MP., Kumar TM. and Shivakumar HG., Methotrexate: a gold standard for treatment of rheumatoid arthritis. *J Pain Palliat Care Pharmacother.*, **28**, 351-358 (2014).
6. Weinblatt ME., Polisson R., Blotner SD., Sosman JL., Aliabadi P., Baker N. and Weissman BN., The effects of drug therapy on radiographic progression of rheumatoid arthritis. Results of a 36-week randomized trial comparing methotrexate and auranofin. *Arthritis Rheum.*, **36**, 613-619 (1993).
7. ファイザー株式会社,リウマトレックス®カプセル 2mg 添付文書(第 18 版), 東京, (2015).
8. Yamanaka H., Inoue E., Tanaka E., Nakajima A., Taniguchi A., Terai C., Hara M., Tomatsu T. and Kamatani N., Influence of methotrexate dose on its efficacy and safety in rheumatoid arthritis patients: evidence based on the variety of prescribing approaches among practicing Japanese rheumatologists in a single institute-based large observational cohort (IORRA). *Mod Rheumatol.*, **17**, 98-105 (2007).
9. Ranganathan P. and McLeod HL., Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **54**, 1366-1377 (2006).
10. Bathon JM., Martin RW., Fleischmann RM., Tesser JR., Schiff MH., Keystone EC., Genovese MC., Wasko MC., Moreland LW., Weaver AL., Markenson J. and Finck BK., A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.*, **343**, 1586-1593 (2000).
11. Kivity S., Zafir Y., Loebstein R., Pauzner R., Mouallem M. and Mayan H., Clinical characteristics and risk factors for low dose methotrexate toxicity: A cohort of 28 patients. *Autoimmun Rev.*, **13**, 1109-1113 (2014).
12. Ganapathy V., Smith SB. and Prasad PD., SLC19: the folate/thiamine transporter

- family. *Pflugers Arch.*, **447**, 641-646 (2004).
13. Qiu A., Jansen M., Sakaris A., Min SH., Chattopadhyay S., Tsai E., Sandoval C., Zhao R., Akabas MH. and Goldman ID., Identification of an intestinal folate transporter. and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell.*, **127**, 917-928 (2006).
 14. Goldman ID., Lichtenstein NS. and Oliverio VT., Carrier-mediated transport of the folic acid analogue., methotrexate., in the L1210 leukemia cell. *J Biol Chem.*, **243**, 5007-5017 (1968).
 15. Shane B., Folylpolyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitam Horm.*, **45**, 263-335 (1989).
 16. Zhao R. and Goldman ID., Resistance to antifolates. *Oncogene.*, **22**, 7431-7457 (2003).
 17. Johnson WG., Stenroos ES., Spsychala JR., Chatkupt S., Ming SX. and Buyske S., New 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR): a risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy? *Am J Med Genet A.*, **124A**, 339-345 (2004).
 18. Brandt DS. and Chu E., Future challenges in the clinical development of thymidylate synthase inhibitor compounds. *Oncol Res.*, **9**, 403-410 (1997).
 19. Van Triest B. and Peters GJ., Thymidylate synthase: a target for combination therapy and determinant of chemotherapeutic response in colorectal cancer. *Oncology.*, **57**, 179-194 (1999).
 20. Dervieux T., Brenner TL., Hon YY., Zhou Y., Hancock ML., Sandlund JT., Rivera GK., Ribeiro RC., Boyett JM., Pui CH., Relling MV. and Evans WE., De novo purine synthesis inhibition and antileukemic effects of mercaptopurine alone or in combination with methotrexate in vivo. *Blood.*, **100**, 1240-1247 (2002).
 21. Allegra CJ., Drake JC., Jolivet J. and Chabner BA., Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **82**, 4881-4885 (1985).
 22. Rhee MS., Lindau-Shepard B., Chave KJ., Galivan J. and Ryan TJ., Characterization of human cellular gamma-glutamyl hydrolase. *Mol Pharmacol.*, **53**, 1040-1046 (1998).
 23. Panetta JC., Wall A., Pui CH., Relling MV. and Evans WE., Methotrexate intracellular disposition in acute lymphoblastic leukemia: a mathematical model of gamma-glutamyl hydrolase activity. *Clin Cancer Res.*, **8**, 2423-2429 (2002).
 24. Hooijberg JH., Broxterman HJ., Kool M., Assaraf YG., Peters GJ., Noordhuis P., Scheper RJ., Borst P., Pinedo HM. and Jansen G., Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.*, **59**, 2532-2535 (1999).
 25. Volk EL., Farley KM., Wu Y., Li F., Robey RW. and Schneider E., Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer*

- Res.*, **62**, 5035-5040 (2002).
26. 山中寿,治療ガイドライン第 6 章ー抗リウマチ薬,関節リウマチの診療マニュアル (改訂版)ー診断のマニュアルと EBM に基づく治療ガイドライン,ed.by 厚生労働省研究班,財団法人日本リウマチ財団, 東京, pp.99-104, (2004)
 27. Weinshilboum R. and Wang L., Pharmacogenomics: bench to bedside. *Nat Rev Drug Discov.*, **3**, 739-748 (2004).
 28. Marsh S., Pharmacogenetics: global clinical markers. *Pharmacogenomics.*, **9**, 371-373 (2008).
 29. Brockmüller J. and Tzvetkov MV., Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol.*, **64**, 133-157 (2008).
 30. Hobl EL., Jilma B., Erlacher L., Duhm B., Mustak M., Bröll H., Högger P., Rizovski B. and Mader RM., A short-chain methotrexate polyglutamate as outcome parameter in rheumatoid arthritis patients receiving methotrexate. *Clin Exp Rheumatol.*, **30**, 156-163 (2012).
 31. Angelis-Stoforidis P., Vajda FJ. and Christophidis N., Methotrexate polyglutamate levels in circulating erythrocytes and polymorphs correlate with clinical efficacy in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.*, **17.**, 313-320 (1999).
 32. Becker ML., Gaedigk R., van Haandel L., Thomas B., Lasky A., Hoeltzel M., Dai H., Stobaugh J. and Leeder JS., The effect of genotype on methotrexate polyglutamate variability in juvenile idiopathic arthritis. and association with drug response. *Arthritis Rheum.*, **63**, 276-285 (2011).
 33. Becker ML., van Haandel L., Gaedigk R., Lasky A., Hoeltzel M., Stobaugh J. and Leeder JS., Analysis of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with juvenile idiopathic arthritis: effect of route of administration on variability in intracellular methotrexate polyglutamate concentrations. *Arthritis Rheum.*, **62**, 1803-1812 (2010).
 34. 株式会社ヤクルト本社,カンプト®点滴静注 40mg、カンプト®点滴静注 100mg 添付文書(第 17 版), 東京, (2013).
 35. 三共株式会社,イスコチン®末 100%、イスコチン®錠 100mg 添付文書(第 13 版), 東京, (2011).
 36. 第一三共株式会社,イスコチン®注 100mg 添付文書(第 11 版), 東京, (2011).
 37. エーザイ株式会社,ワーファリン®錠 0.5mg、ワーファリン®錠 1mg、ワーファリン®錠 5mg 添付文書(第 22 版), 東京, (2014).
 38. アストラゼネカ株式会社,オメプラール®錠 10、オメプラール®錠 20 添付文書(第 26 版), 大阪, (2015).
 39. アストラゼネカ株式会社,オメプラール®注用 20 添付文書(第 14 版), 大阪, (2015).
 40. 武田薬品工業株式会社,タケブロン®静注用 30mg(第 18 版), 大阪, (2013).

41. アステラス製薬株式会社, セレコックス®錠 100mg、200mg(第10版), 東京, (2014).
42. Guidelines ACoRSoRA., Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum.*, **46**, 328-346 (2002).
43. Chango A., Emery-Fillon N., de Courcy GP., Lambert D., Pfister M., Rosenblatt DS. and Nicolas JP., A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene. and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab.*, **70**, 310-315 (2000).
44. Dervieux T., Kremer J., Lein DO., Capps R., Barham R., Meyer G., Smith K., Caldwell J. and Furst DE., Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier. and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics.*, **14**, 733-739 (2004).
45. Chave KJ., Ryan TJ., Chmura SE. and Galivan J., Identification of single nucleotide polymorphisms in the human gamma-glutamyl hydrolase gene. and characterization of promoter polymorphisms. *Gene.*, **319**, 167-175 (2003).
46. Cheng Q., Wu B., Kager L., Panetta JC., Zheng J., Pui CH., Relling MV. and Evans WE., A substrate specific functional polymorphism of human gamma-glutamyl hydrolase alters catalytic activity and methotrexate polyglutamate accumulation in acute lymphoblastic leukaemia cells. *Pharmacogenetics.*, **14**, 557-567 (2004).
47. Lincz LF., Scorgie FE., Garg MB. and Ackland SP., Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the thymidylate synthase 2R allele. *Int J Cancer.*, **120**, 1930-1934 (2007).
48. Horie N., Aiba H., Oguro K., Hojo H. and Takeishi K., Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct.*, **20**, 191-197 (1995).
49. Ulrich CM., Bigler J., Velicer CM., Greene EA., Farin FM. and Potter JD., Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, **9**, 1381-1385 (2000).
50. Wessels JA., Kooloos WM., De Jonge R., De Vries-Bouwstra JK., Allaart CF., Linssen A., Collee G., De Sonnaville P., Lindemans J., Huizinga TW. and Guchelaar HJ., Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **54**, 2830-2839 (2006).
51. Dervieux T., Furst D., Lein DO., Capps R., Smith K., Walsh M. and Kremer J., Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier., aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase., and thymidylate

- synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **50**, 2766-2774 (2004).
52. Warren RB., Smith RL., Campalani E., Eyre S., Smith CH., Barker JN., Worthington J. and Griffiths CE., Outcomes of methotrexate therapy for psoriasis. and relationship to genetic polymorphisms. *Br J Dermatol.*, **160**, 438-441 (2009).
 53. Hassell AB., Davis MJ., Fowler PD., Clarke S., Fisher J., Shadforth MF., Jones PW. and Dawes PT., The relationship between serial measures of disease activity and outcome in rheumatoid arthritis. *Q J Med.*, **86**, 601-607 (1993).
 54. Aletaha D., Smolen JS., The definition and measurement of disease modification in inflammatory rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am.*, **32.**, 9-44 (2006)
 55. Cockcroft DW. and Gault MH., Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron.*, **16**, 31-41 (1976).
 56. Souverein PC., Berard A., Van Staa TP., Cooper C., Egberts AC., Leufkens HG. and Walker BR., Use of oral glucocorticoids and risk of cardiovascular and cerebrovascular disease in a population based case-control study. *Heart.*, **90**, 859-865 (2004).
 57. Inoue S., Hashiguchi M., Takagi K., Kawai S. and Mochizuki M., Preliminary study to identify the predictive factors for the response to methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Yakugaku Zasshi.*, **129**, 843-849 (2009).
 58. Dervieux T., Greenstein N. and Kremer J., Pharmacogenomic. and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **54**, 3095-3103 (2006).
 59. Hayashi H., Tazoe Y., Horino M., Fujimaki-Katoh C., Tsuboi S., Matsuyama T., Kosuge K., Yamada H., Tsuji D., Inoue K. and Itoh K., An artifact derived from a pseudogene led to the discovery of microRNA binding site polymorphism in the 3'-untranslated region of the human dihydrofolate reductase gene. *Drug Metab Pharmacokinet.*, **27**, 263-267 (2012).
 60. Drozdziak M., Rudas T., Pawlik A., Gornik W., Kurzawski M. and Herczynska M., Reduced folate carrier-1 80G>A polymorphism affects methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.*, **7**, 404-407 (2007).
 61. James HM., Gillis D., Hissaria P., Lester S., Somogyi AA., Cleland LG. and Proudman SM., Common polymorphisms in the folate pathway predict efficacy of combination regimens containing methotrexate and sulfasalazine in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*, **35**, 562-571 (2008).
 62. Whetstone, J. R., Gifford, A. J., Witt, T., Liu, X. Y., Flatley, R. M., Norris, M., Haber, M., Taub, J. W., Ravindranath, Y., et al.: Single nucleotide polymorphisms in the human

- reduced folate carrier: characterization of a high-frequency G/A variant at position 80 and transport properties of the His(27) and Arg(27) carriers. *Clin Cancer Res.*, **7**: 3416-3422 (2001).
63. Wessels JA., de Vries-Bouwstra JK., Heijmans BT., Slagboom PE., Goekoop-Ruiterman YP., Allaart CF., Kerstens PJ., van Zeben D., Breedveld FC., Dijkmans BA., Huizinga TW. and Guchelaar HJ., Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum.*, **54**, 1087-1095 (2006).
 64. Stamp LK., Chapman PT., O'Donnell JL., Zhang M., James J., Frampton C., Barclay ML., Kennedy MA. and Roberts RL., Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenet Genomics.*, **20**, 367-376 (2010).
 65. Chatzikyriakidou A., Georgiou I., Voulgari PV., Papadopoulos CG., Tzavaras T. and Drosos AA., Transcription regulatory polymorphism -43T>C in the 5'-flanking region of SLC19A1 gene could affect rheumatoid arthritis patient response to methotrexate therapy. *Rheumatol Int.*, **27**, 1057-1061 (2007).
 66. Bohanec Grabar P., Logar D., Lestan B. and Dolzan V., Genetic determinants of methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms affecting methotrexate transport and folate metabolism. *Eur J Clin Pharmacol.*, **64**, 1057-1068 (2008).
 67. Dervieux T., Wessels JA., van der Straaten T., Penrod N., Moore JH., Guchelaar HJ. and Kremer JM., Gene-gene interactions in folate. and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics.*, **19**, 935-944 (2009).
 68. Owen SA., Hider SL., Martin P., Bruce IN., Barton A. and Thomson W., Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J.*, **13**, 227-234 (2013).
 69. Cáliz R., del Amo J., Balsa A., Blanco F., Silva L., Sanmarti R., Martínez FG., Collado MD., Ramirez MeC., Tejedor D., Artieda M., Pascual-Salcedo D., Oreiro N., andreu JL., Graell E., Simon L., Martínez A. and Mulero J., The C677T polymorphism in the MTHFR gene is associated with the toxicity of methotrexate in a Spanish rheumatoid arthritis population. *Scand J Rheumatol.*, **41**, 10-14 (2012).
 70. Samara SA., Irshaid YM. and Mustafa KN., Association of MDR1 C3435T. and RFC1 G80A polymorphisms with methotrexate toxicity and response in Jordanian rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther.*, **52**, 746-755 (2014).
 71. Hayashi H., Fujimaki C., Daimon T., Tsuboi S., Matsuyama T. and Itoh K., Genetic

- polymorphisms in folate pathway enzymes as a possible marker for predicting the outcome of methotrexate therapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Pharm Ther.*, **34**, 355-361 (2009).
72. Takatori R., Takahashi KA., Tokunaga D., Hojo T., Fujioka M., Asano T., Hirata T., Kawahito Y., Satomi Y., Nishino H., Tanaka T., Hirota Y. and Kubo T., ABCB1 C3435T polymorphism influences methotrexate sensitivity in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.*, **24**, 546-554 (2006).
 73. Schron CM., Washington C. and Blitzer BL., The transmembrane pH gradient drives uphill folate transport in rabbit jejunum. Direct evidence for folate/hydroxyl exchange in brush border membrane vesicles. *J Clin Invest.*, **76**, 2030-2033 (1985).
 74. Strum WB., A pH-dependent, carrier-mediated transport system for the folate analog, amethopterin, in rat jejunum. *J Pharmacol Exp Ther.*, **203**, 640-645 (1977).
 75. Strum WB., Characteristics of the transport of pteroylglutamate and amethopterin in rat jejunum. *J Pharmacol Exp Ther.*, **216**, 329-333 (1981).
 76. Matherly LH., Hou Z. and Deng Y., Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology. and therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, **26**, 111-128 (2007).
 77. Matherly LH. and Hou Z., Structure and function of the reduced folate carrier a paradigm of a major facilitator superfamily mammalian nutrient transporter. *Vitam Horm.*, **79**, 145-184 (2008).
 78. Dixon KH., Lanpher BC., Chiu J., Kelley K. and Cowan KH., A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. *J Biol Chem.*, **269**, 17-20 (1994).
 79. Williams FM., Murray RC., Underhill TM. and Flintoff WF., Isolation of a hamster cDNA clone coding for a function involved in methotrexate uptake. *J Biol Chem.*, **269**, 5810-5816 (1994).
 80. Moscow JA., Gong M., He R., Sgagias MK., Dixon KH., Anzick SL., Meltzer PS. and Cowan KH., Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **55**, 3790-3794 (1995).
 81. Wong SC., Proefke SA., Bhushan A. and Matherly LH., Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.*, **270**, 17468-17475 (1995).
 82. Said HM., Nguyen TT., Dyer DL., Cowan KH. and Rubin SA., Intestinal folate transport: identification of a cDNA involved in folate transport. and the functional expression and distribution of its mRNA. *Biochim Biophys Acta.*, **1281**, 164-172 (1996).

83. Nakai Y., Inoue K., Abe N., Hatakeyama M., Ohta KY., Otagiri M., Hayashi Y. and Yuasa H., Functional characterization of human proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1 heterologously expressed in mammalian cells as a folate transporter. *J Pharmacol Exp Ther.*, **322**, 469-476 (2007).
84. Inoue K., Nakai Y., Ueda S., Kamigaso S., Ohta KY., Hatakeyama M., Hayashi Y., Otagiri M. and Yuasa H., Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **294**, G660-668 (2008).
85. Visentin M., Unal ES., Zhao R. and Goldman ID., The membrane transport. and polyglutamation of pralatrexate: a new-generation dihydrofolate reductase inhibitor. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **72**, 597-606 (2013).
86. Hayashi H., Tazoe Y., Tsuboi S., Horino M., Morishita M., Arai T., Ohshima M., Matsuyama T., Kosuge K., Yamada H., Tsuji D., Inoue K. and Itoh K., A single nucleotide polymorphism of reduced folate carrier 1 predicts methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug Metab Pharmacokinet.*, **28**, 164-168 (2013).
87. Kato T., Hamada A., Mori S. and Saito H., Genetic polymorphisms in metabolic and cellular transport pathway of methotrexate impact clinical outcome of methotrexate monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Drug Metab Pharmacokinet.*, **27**, 192-199 (2012).
88. Blits M., Jansen G., Assaraf YG., van de Wiel MA., Lems WF., Nurmohamed MT., van Schaardenburg D., Voskuyl AE., Wolbink GJ., Vosslander S. and Verweij CL., Methotrexate normalizes up-regulated folate pathway genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **65**, 2791-2802 (2013).
89. Stamp LK., Hazlett J., Highton J. and Hessian PA., Expression of methotrexate transporters and metabolizing enzymes in rheumatoid synovial tissue. *J Rheumatol.*, **40**, 1519-1522 (2013).
90. Chan ES. and Cronstein BN., Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res* **4**, 266-273 (2002).
91. Kamen BA., Takach PL., Vatev R. and Caston JD., A rapid., radiochemical-ligand binding assay for methotrexate. *Anal Biochem.*, **70**, 54-63 (1976).
92. Kamen BA. and Winick N., Analysis of methotrexate polyglutamate derivatives in vivo. *Methods Enzymol.*, **122**, 339-346 (1986).
93. Schröder H. and Heinsvig EM., Enzymatic assay for methotrexate in erythrocytes. *Scand J Clin Lab Invest.*, **45**, 657-659 (1985).
94. Vijayanathan V., Smith AK., Zebala JA., Kamen BA. and Cole PD., High-performance

- liquid chromatography separation of aminopterin-polyglutamates within red blood cells of children treated for acute lymphoblastic leukemia. *Transl Res.*, **150**, 367-373 (2007).
95. Dervieux T., Furst D., Lein DO., Capps R., Smith K., Caldwell J. and Kremer J., Pharmacogenetic and metabolite measurements are associated with clinical status in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate: results of a multicentred cross sectional observational study. *Ann Rheum Dis.*, **64**, 1180-1185 (2005).
 96. Hroch M., Tuková J., Dolezalová P. and Chládek J., An improved high-performance liquid chromatography method for quantification of methotrexate polyglutamates in red blood cells of children with juvenile idiopathic arthritis. *Biopharm Drug Dispos.*, **30**, 138-148 (2009).
 97. Inoue S., Hashiguchi M., Kawai S. and Mochizuki M., Erythrocyte methotrexate-polyglutamate assay using fluorescence polarization immunoassay technique: application to the monitoring of patients with rheumatoid arthritis. *Yakugaku Zasshi.*, **129**, 1001-1005 (2009).
 98. Dervieux T., Orentas Lein D., Marcelletti J., Pischel K., Smith K., Walsh M. and Richerson R., HPLC determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates after low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem.*, **49**, 1632-1641 (2003).
 99. van Haandel L., Becker ML., Leeder JS., Williams TD. and Stobaugh JF., A novel high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for improved selective and sensitive measurement of methotrexate polyglutamation status in human red blood cells. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **23**, 3693-3702 (2009).
 100. Andersen PA., West SG., O'Dell JR., Via CS., Claypool RG. and Kotzin BL., Weekly pulse methotrexate in rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects in a randomized., double-blind study. *Ann Intern Med.*, **103**, 489-496 (1985).
 101. Weinblatt ME., Coblyn JS., Fox DA., Fraser PA., Holdsworth DE., Glass DN. and Trentham DE., Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.*, **312**, 818-822 (1985).
 102. Ranganathan P., Eisen S., Yokoyama WM. and McLeod HL., Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis.*, **62**, 4-9 (2003).
 103. Cush JJ., Lipsky PE., Postlethwaite AE., Schrohenloher RE., Saway A., Koopman WJ., Correlation of serologic indicators of inflammation with effectiveness of nonsteroidal antiinflammatory drug therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **33**, 19-28 (1990).
 104. den Boer E., de Rotte MC., Pluijm SM., Heil SG., Hazes JM. and de Jonge R.,

- Determinants of erythrocyte methotrexate polyglutamate levels in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*, **41**, 2167-2178 (2014).
105. Jansen G., Mauritz R., Drori S., Sprecher H., Kathmann I., Bunni M., Priest DG., Noordhuis P., Schornagel JH., Pinedo HM., Peters GJ. and Assaraf YG., A structurally altered human reduced folate carrier with increased folic acid transport mediates a novel mechanism of antifolate resistance. *J Biol Chem.*, **273**, 30189-30198 (1998).
 106. Ando Y., Shimada H., Matsumoto N., Hirota T., Oribe M., Otsuka E., Ishii K., Morimoto T., Ohashi K. and Ieiri I., Role of methotrexate polyglutamation and reduced folate carrier 1 (RFC1) gene polymorphisms in clinical assessment indexes. *Drug Metab Pharmacokinet.*, **28**, 442-445 (2013).
 107. Gilani ST., Khan DA., Khan FA. and Ahmed M., Adverse effects of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *J Coll Physicians Surg Pak.*, **22**, 101-104 (2012).
 108. Stamp LK., O'Donnell JL., Chapman PT., Zhang M., James J., Frampton C. and Barclay ML., Methotrexate polyglutamate concentrations are not associated with disease control in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate therapy. *Arthritis Rheum.*, **62**, 359-368 (2010).
 109. Hider SL., Bruce IN. and Thomson W., The pharmacogenetics of methotrexate. *Rheumatology (Oxford)*, **46**, 1520-1524 (2007).
 110. Ranganathan P., Pharmacogenomics in rheumatoid arthritis. *Methods Mol Biol.*, **448**, 413-435 (2008).
 111. Krajcinovic M. and Moghrabi A., Pharmacogenetics of methotrexate. *Pharmacogenomics.*, **5**, 819-834 (2004).
 112. Ranganathan P., An update on methotrexate pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics.*, **9**, 439-451 (2008).
 113. Fujimaki C., Hayashi H., Tsuboi S., Matsuyama T., Kosuge K., Yamada H., Inoue K. and Itoh K., Plasma total homocysteine level and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T genetic polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Biomarkers.*, **14**, 49-54 (2009).
 114. Ponchel F., Burska AN. and Vital EM., Pharmacogenomics in rheumatoid arthritis: how close are we to the clinic? *Pharmacogenomics.*, **15**, 1275-1279 (2014).
 115. Suthandiram S., Gan GG., Zain SM., Bee PC., Lian LH., Chang KM., Ong TC. and Mohamed Z., Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies. *Pharmacogenomics.*, **15**, 1479-1494 (2014).
 116. Zhu H., Deng FY., Mo XB., Qiu YH. and Lei SF., Pharmacogenetics and

pharmacogenomics for rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate treatment: the 2013 update. *Pharmacogenomics*, **15**, 551-566 (2014).