

氏名	はかまた じゅん 袴田 潤
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	博士甲第 4624 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	日本人関節リウマチ患者における個別化療法の確立に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 望月眞弓（医学博士） (副査) 教 授 大谷壽一（博士（薬学）） 准教授 齋藤義正（医学博士）

論文内容の要旨

[序論] RA 治療において、本邦では RA 診療ガイドラインでは、メトトレキサート (MTX) が第一選択として推奨されている。また、RA の病態進行において、TNF α が重要な役割を担うことがわかり、MTX での初期治療で良好な治療反応性が得られない患者に抗 TNF α 製剤を併用することが推奨されている。しかし、MTX と抗 TNF α 製剤は RA 治療において、治療反応性や有害事象の発現に個体差があることが知られている。一般に医薬品の治療反応性や有害事象の発現の個体差の原因として、薬物動態 (PK) や薬力学的作用 (PD) の違いが関係しているといわれている。本研究では、治療反応性と有害事象の発現の影響要因について、遺伝的因子及びそれ以外の患者背景因子も含めて特定し、MTX 及び抗 TNF α 製剤の個別化療法の確立に向けて以下の 3 点について検討を行った。

- ①日本人 RA 患者における MTX に関連する輸送担体や酵素および抗 TNF α 製剤に関連する TNF α のアレル頻度と性差及び人種差の検討
- ②RA 患者コホートを用いた MTX の有効性及び安全性に影響を与える要因の検討
- ③RA 患者コホートにおける母集団薬物動態解析を用いた赤血球中 MTXPGs 濃度に影響を与える要因の検討

第 1 章 日本人 RA 患者における MTX に関連する輸送担体や酵素および抗 TNF α 製剤に関連する TNF α のアレル頻度と性差及び人種差の検討

[目的] RA 患者における MTX に関連する輸送担体や酵素、及び抗 TNF α 製剤に関連する TNF α のアレル頻度、性差及び人種差の検討を行った。

[方法] 2010 年 12 月から 2011 年 3 月において、リウマチ専門診療所に通院治療中の日本人成人 RA 患者を対象とした。患者血液中 DNA を抽出し、real-time PCR 法を用いて、MTX に関連する輸送担体の遺伝子多型 5 種類、酵素の遺伝子多型 5 種類、抗 TNF

α に関連する $\text{TNF } \alpha$ の遺伝子多型 3 種類を解析した。また、アレル頻度の人種差を比較するために MEDLINE、Embase 等を用いて論文を検索した。本研究計画は医療法人相生会の臨床研究審査委員会ならびに慶應義塾大学薬学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて承認された(承認番号:〈薬学部〉G100715-1、G110516-2、G140121-2、G140924-2、〈相生会〉649CP-4)

[結果・考察] 日本人 RA 患者において、RFC1 80G>A と-43T>C 間で、強い連鎖不平衡が得られた。また、MTHFR 1298A>C のアレル頻度においてのみ、性差がみられた。RFC1 80 G>A、RFC1 -43T>C、ABCB1 3435 C>T、ABCC2 IVS23+56 T>C、ABCG 914 C>A、FPGS 1994 G>A、MTHFR 1298A>C、TYMS 3'-UTR (-6/+6)、 $\text{TNF-} \alpha$ -857C/T に関して日本人と Caucasian との間で、 $\text{TNF } \alpha$ -238G/A は日本人と Han Chinese との間で、 $\text{TNF } \alpha$ -308G/A は Caucasian、Han Chinese、Mestizo との間で有意差がみられた。これらのことから、MTX や抗 $\text{TNF } \alpha$ 製剤の治療反応性や有害事象の発現に人種差がある可能性があると考えられた。

第 2 章 RA 患者コホートをを用いた MTX の有効性及び安全性に影響を与える要因の検討

[目的] 日常診療下の RA 患者における MTX の治療反応性及び MTX による肝毒性の発現に影響を与える要因を検討した。

[方法] 第 2 章の RA 患者コホートを対象とした。MTX 治療反応性の検討は MTX 投与開始時 $\text{DAS28} \geq 3.2$ である患者で、生物学的製剤を MTX 投与開始から 4 か月以内に使用している患者及び、MTX 以外の抗 RA 薬を併用している患者を除外し、治療反応性解析用コホートとした。観察期間は 6 ヶ月とし、6 ヶ月時点での $\text{DAS28} < 3.2$ (低疾患活動性)を満たした患者を responder と定義した。影響因子として、年齢、性別、評価部位の遺伝子多型、MTX 開始までの罹病期間、MTX 投与量、葉酸投与量、リウマトイド因子、抗シトルリン酸抗体、eGFR、proton pump inhibitor(PPI)の併用を検討した。一方、MTX による肝毒性の検討では、B 型/C 型肝炎の患者、MTX 投与開始時において $\text{ALT} > 40$ の患者、BMI 及び飲酒データが欠損している患者、イソニアジドを併用している患者、観察期間中の MTX 及び葉酸の投与量推移が不明な患者は除外し、肝毒性解析用コホートを作成した。観察期間は 1 年間とし、① 観察期間内で $\text{ALT} > 40$ 、② 肝機能異常所見の記載がある、③ 医師が葉酸の増量または MTX の減量または両方の処置により ALT が正常化のすべての条件を満たす場合を肝毒性の発現と定義した。影響因子として、性別、年齢、評価部位の遺伝子多型、MTX 投与量、葉酸投与量、BMI、eGFR、飲酒、抗 RA 薬の併用を検討した。両検討で用いる MTX に関連する輸送担体や酵素の 16 遺伝子多型は第 1 章と同様の方法を用いて解析した。また、影響要因の検

討には多重ロジスティック回帰分析を用いた。本研究計画は慶應義塾大学医学部倫理委員会ならびに慶應義塾大学薬学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて承認された（承認番号：〈薬学部〉G151007-1、G161014-1、〈医学部〉20140445）。

[結果・考察] 治療反応性の検討では、対象患者 74 名（男性 7 名、女性 67 名）中、44 名が responder であった。患者背景因子として、MTX 開始までの罹病期間が抽出された。罹病期間は長いほど、MTX の治療反応性が低下する傾向が示された（オッズ比 0.91 [95%信頼区間 0.82-1.01], $p=0.089$ ）。TYMS 5'-UTR 3R/3R を有する患者は、有しない患者より、MTX の良好な治療反応性が得られた（3.44 [1.07-11.0], $p=0.038$ ）。この結果は James らと同様の傾向であったが、Lima らとは逆の結果であった。TYMS の mRNA 発現量は TYMS 5'-UTR の 3R を有するほど増大するため、MTX の作用点である TYMS の抑制効果が 3R/3R を有する患者で強く現れるものと考えられた。RFC1 80G>A の A/A を有する患者では、有しない患者に比べて良好な治療反応性が得られる傾向が見られた（2.64 [0.84-8.37], $p=0.098$ ）。この結果は A/A を有する患者は良好な治療反応性が得られることを示したメタアナリシスの結果を支持する結果であった。

MTX による肝毒性の検討では、対象患者 114 名（男性 17 名、女性 97 名）中、32 名において MTX による肝毒性を発現した。肝毒性の発現に影響を与える要因として、患者背景因子では MTX の投与量（1.34 [1.18 - 1.66], $p<0.001$ ）、eGFR（0.95 [0.92 - 0.98], $p=0.002$ ）が抽出された。MTX 投与量に関しては既知の要因であるが、eGFR は MTX による肝毒性との関連性の報告はない。発現機序から考察すると理にかなっているものであると考えられた。一方、遺伝的因子では ABCB1 3435C>T の T アレル（3.00 [0.975-9.34], $p=0.057$ ）、ATIC 347C>G（2.82 [1.01-7.92], $p=0.043$ ）の C/C が統計学的に有意に肝毒性の発現リスクを増大する要因として抽出された。ABCB1 3435C>T の T アレルを有すると mRNA の発現量が低下することや肝毒性のリスクが増大することを示している既報告を支持する結果が得られた。ATIC 347C>G において、本検討では G アレルと肝毒性との関連性が示されたが、同様の検討をしている成人 RA 患者を対象とした研究がなく、比較ができなかった。感度分析において、ALT>60、>80 では BMI が抽出された。このことから、BMI>25 の肥満患者では、MTX 投与により高度の肝毒性発現を助長する可能性が示された。

第 3 章 RA 患者コホートにおける母集団薬物動態解析を用いた赤血球中 MTX-PGs のクリアランス(CL)に影響を与える要因の検討

[目的] RA 患者の赤血球中 MTX-PGs の CL に影響を与える要因を母集団薬物動態解析により検討した。

[方法] 2015 年 6 月～9 月において、大学病院 RA 専門外来に通院治療中で MTX 服用歴

がある日本人成人 RA 患者を対象とした。採血時点で MTX 服用を中止している患者、及び体重のデータが欠損している患者を除外して、解析用コホートとした。赤血球中 MTX-PGs 濃度を LC-MS/MS を用いて測定した。母集団薬物動態解析を用いて、赤血球中 MTX-PGs 濃度の個体差に影響を与える要因を抽出した。検討した影響因子は、MTX の投与量、葉酸の投与量、体重、eGFR、クレアチニン、MCV、PPI の併用、NSAIDs の併用、10 種類の遺伝子多型を用いた。母集団薬物動態解析では経口 1 コンパートメントモデルを用いた。本研究計画は慶應義塾大学医学部倫理委員会ならびに慶應義塾大学薬学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて承認された（承認番号：〈薬学部〉G151007-1、G161014-1、〈医学部〉20140445）。

[結果・考察] 本検討の選択基準に合致した RA 患者は 268 名であり、全 274 サンプルを用いた。母集団薬物動態解析での最終モデルの CL では、体重、eGFR、PPI の併用の 3 つの共変量が抽出された。体重が重く、また eGFR が高い患者では、赤血球中 MTX-PGs の CL が大きくなることが示された。MTX は腎排泄型の医薬品であることから、腎機能低下により体内の MTX 蓄積量が増大し、各々の細胞や赤血球への移行が増大したことで、見かけ上、赤血球中 MTX-PGs の CL が低下したと考えられた。また、PPI の併用により CL が低下することが示された。PPI の併用により血漿中 MTX の排泄が抑制されたとする過去の報告があるため、体内の MTX 蓄積量が増大すると考えられる。したがって、eGFR 同様、赤血球中への移行が増大し、見かけ上、赤血球中 MTX-PGs の CL が低下したと考えられた。

[総括] 本研究により、日本人における MTX に関連する輸送担体や酵素及び抗 TNF α 製剤に関連する TNF α のアレル頻度と、それらの人種差が明らかになった。また、日本人 RA 患者を対象としたコホート研究及び母集団薬物動態解析から、MTX の治療反応性や有害事象の発現に影響を与えうる遺伝的要因を含む患者背景因子を特定することができた。以上より、本研究結果は、MTX の個別化療法の一助となるものと考えられた。

論文審査結果の要旨

論文発表の後、副査 2 名と研究科委員からの試問ならびに質疑応答を行った。最近の関節リウマチ治療では、アンカードラッグであるメトトレキサート (MTX) と TNF α の抗体製剤 (BIO) がキードラッグとなっている。いずれも多種多様な研究が行われて来ているが、日本人を対象とした研究は限られている。発表者の研究は、日本人における MTX と BIO の治療反応性および副作用発現に関する個体差を日常診療のデータから明らかにしようとするものである。

主な質問として、1) 第 1 章の患者で遺伝的素因と MTX の効果や副作用との関係は評価できなかったのは何故か。2) 肝障害のリスク因子として BMI が新たに抽出されたがその考察はどう考えているか。3) 健康人と患者での遺伝子多型の違いはあったのか。4) 母集団薬物動態によって得た結果は今後どのように臨床につかえるのか。5) サンプルサイズの計算をしているか。6) 慶應義塾病院のカルテデータ (検査値) を使用しているのか。7) eGFR の単位はなぜ、 1.73m^2 を使ったのか。などの質問が出された。これに対して発表者は、自己データを踏まえつつ、他の研究者の情報を引用しつつ、的確に説明した。また、自身の研究で調査できなかった要因などの研究の限界も明確に説明し、研究成果を臨床応用する際の注意点も適切に説明した。

発表者は複数年に亘り 300 症例近くの患者からのインフォームド・コンセントの取得を補佐し、赤血球中 MTX 濃度の LC/MS/MS による測定法を確立し濃度測定を行い、多種類の遺伝子解析を実施した。その結果を統計学的手法を適切に適用し解析し、日本人関節リウマチ治療に有益な情報を提供する論文を作成した。その後の判定会議で、本論文の内容は本学の博士 (薬学) の学位に十分値するものと判定された。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

Hakamata J, Hashiguchi M, Tsuru T, Tanaka T, Irie S, Shimizu M, Mochizuki M: Ethnic and gender differences in genetic polymorphisms of tumor necrosis factor (TNF)- α in a Japanese population; Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther., accepted for publication (Dec. 19, 2016)