





学位論文審査報告書

報告番号	北里大 甲 第1496号	氏 名	岡 本 ひとみ	
論文審査担当者	(主査)	北里大学教授	尾鳥 勝也	 印
	(副査)	北里大学教授	岡田 信彦	 印
	(副査)	北里大学教授	奥脇 暢	 印
	(副査)	北里大学准教授	小林 昌宏	 印
<p>[論文題目]</p> <p>「チオプリン製剤の投与量設計に向けたヒト血液試料における NUDT15 酵素活性の定量的測定法の開発」</p> <p>[論文審査結果の要旨]</p> <p>チオプリン製剤は小児急性リンパ性白血病や炎症性腸疾患、自己免疫性疾患など様々な疾患に対し使用されている薬剤であるが、用量依存的に発生する重度の白血球減少や全脱毛が度々問題となる。チオプリン製剤は生体内で最終活性代謝物である 6-thioguanine nucleotides (6-TGNs) に代謝され、DNA への取り込みによる細胞毒性や RNA への取り込みによるタンパク質合成の阻害を介し、免疫抑制作用を発揮すると考えられている。チオプリン製剤の代謝酵素の 1 つである Nudix hydrolase 15 (NUDT15) は、最終活性代謝物である 6-thio-(deoxy) guanosine triphosphate (6-thio-(d)GTP) を 6-thio-(deoxy) guanosine monophosphate (6-thio-(d)GMP) に脱リン酸化することで薬理作用を負に制御する。近年のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、<i>NUDT15</i> 遺伝子の Arg139Cys 変異が、アジア人の小児白血病患者や炎症性腸疾患患者におけるチオプリン誘発性骨髄抑制と強い相関があることが明らかとなった。そのため現在日本では治療開始前に Arg139 コドンの遺伝子多型検査が行われ、チオプリン製剤の投与可否および初期投与量の決定に利用される。しかし、Arg139 野生型患者の一部において、低用量のチオプリン製剤によって副作用が発現するケースもあり、Arg139 コドンの遺伝子多型検査だけでチオプリン製剤の投与量設計を行うことは非常に困難である。</p> <p>そこで岡本氏らは、Arg139 コドンの遺伝子多型検査によるチオプリン製剤の投与量設計を補完するための NUDT15 酵素活性の定量的測定法の開発を試みた。まず、変異を有する種々の精製組換え NUDT15 タンパク質を用いて、<i>NUDT15</i> 遺伝子多型による酵素活性への影響について検討した。NUDT15 はチオプリンの活性代謝物である 6-thio-GTP から PPi を遊離させ、6-thio-GMP に代謝する活性を有するため、PPi を簡便に検出するキット (PPi アッセイキット) を用いて、NUDT15 タンパク質の酵素活性を測定した。その結果、遺伝子多型である Val18Ile、Val18_19insGlyVal、</p>				

Arg139Cys、Arg139His の 4 つの精製組換え NUDT15 の酵素活性は、野生型とほぼ同等であった。このことから精製タンパク質の解析では遺伝子多型による影響を正確に評価できないため、細胞を用いた解析系の構築が必要である。細胞抽出液を酵素源とした NUDT15 酵素活性を測定するためには、反応基質である 6-thio-GTP とその代謝物である 6-thio-GMP を定量的に検出する必要があると考え、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた測定法を構築した。

NUDT15 酵素源として 293T 細胞抽出液を用い、6-thio-GTP を基質として反応させてその代謝物を測定した結果、6-thio-GTP および 6-thio-GMP を定量的に検出することができた。この測定法をチオプリン製剤の投与量調節に資する検査系とするために、NUDT15 Arg139 野生型および Arg139Cys ホモ多型の健常ドナーより血液を採取し、赤血球と末梢血単核細胞 (PBMCs) の抽出液をそれぞれ調製して NUDT15 発現量と酵素活性を測定した。その結果、赤血球では NUDT15 酵素の発現がほとんど見られず、PBMCs ではわずかに発現が確認された。また、PBMCs にモノクローナル抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体による増殖刺激を加えると、NUDT15 酵素の発現が上昇し、酵素活性も測定可能であった。また Arg139Cys ホモ多型の検体では、NUDT15 発現量は野生型と比較して著しく低く、6-thio-GTP 代謝活性も野生型と比較して有意に低かったことから、増殖刺激を加えた PBMCs を用いることで、患者個々の NUDT15 酵素活性を測定することが可能であると結論付けた。また、本測定法の信頼性を保証するため厚生労働省のガイドラインに基づきバリデーションを実施し、本ガイドラインで定められた基準値をほぼ満たし、PBMCs を用いた検査系として利用可能であることが示された。

最後に、本測定法が遺伝子型既知の患者検体に応用可能であるか検討した。NUDT15 Arg139 野生型および Arg139Cys ヘテロ多型、ホモ多型の各ドナーより単離した PBMCs 抽出液を用いて NUDT15 酵素活性を測定した。その結果、Arg139 遺伝子型に依存して NUDT15 酵素活性が有意に減少し、野生型およびヘテロ多型ではホモ多型と比較して 6-thio-GMP 生成量にドナー間で差があることを明らかにした。

本研究は、PPi を簡便に検出する測定法の代替法として、LC-MS/MS を用いた信頼性の高い測定法を構築し、Arg139 遺伝子型依存的な NUDT15 酵素活性の差異を検出可能であることを明らかにしたものである。本測定法を現在行われている遺伝子多型検査と併用することで、より正確にチオプリン製剤の投与量を設定することが可能となり、本研究が個別化医療の実現に大いに貢献するものと期待できる。

以上のように岡本氏による本研究は、新規性及び独創性が高く、博士 (薬学) の学位に十分値するものと判断し、学位審査を合格と判定した。