

学位論文内容要旨

氏名： 岡本 ひとみ 印

【題目】

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

【背景・目的】

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半世紀にわたり使用されている薬剤である。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。チオプリン製剤の使用に関しては、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、*NUDT15* 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髓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。そこで本研究では、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。

【方法】

組換え NUDT15 は大腸菌に発現させ精製した。細胞内 NUDT15 酵素活性測定には、細胞回収後、界面活性剤処理により抽出した細胞抽出液を使用した。ヒト血液試料には遺伝子多型検査によって *NUDT15* Arg139 遺伝子型が既知のチオプリン製剤非服用のドナーより単離した末梢血単核細胞 (PBMCs) から調製した細胞抽出液を用いた。精製組換え NUDT15 タンパク質の酵素活性測定には無機ピロリン酸 (PPi) アッセイを用いた。NUDT15 酵素と 6-thio-GTP を 37°C で

10 分間反応させ、NUDT15 酵素活性を測定した。反応速度パラメーターは、ラインウィーバー・バークプロットを用いて算出した。6-thio-GTP 代謝物の定量には、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) による MRM 解析を用いた。内部標準物質 (IS) には Thymidine- $^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_2$ 5'-monophosphate を用いた。精製組換え NUDT15 酵素および細胞抽出液を 100 μM の 6-thio-GTP と 37°C で反応させ、MRM 解析により得られた波形のピーク面積を測定し 6-thio-GTP およびその代謝物を定量した。LC-MS/MS を用いた測定法のバリデーションは、厚生労働省医薬食品局より発布されているガイドラインに基づき、分析対象物質の選択性、検量線の直線性、Quality Control (QC) 試料の真度および精度、マトリックス効果、および 4°C における短期保存安定性を評価した。検量線の直線性は R ソフトウェアを用いて $1/x$ の重み付き最小二乗法による回帰分析を行い、決定係数を算出した。ヒト血液試料を用いた検討は、北里大学北里研究所病院の臨床研究倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: 21045)。

【結果】

アジア系人種において *NUDT15* Arg139Cys 変異は、チオプリン製剤による重度の副作用発現と相関する。また、Arg139 野生型の患者においてもチオプリン製剤によって重度の副作用を起こすことがあり、その原因は明らかになっていない。*NUDT15* 遺伝子は Arg139Cys 以外にもいくつかの多型が報告されており、これらの遺伝子多型がチオプリン代謝に影響を与えている可能性がある。そこで、変異を有する種々の精製組換え NUDT15 タンパク質の酵素活性を測定した。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。そのため、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、Val18Ile、Val18_19insGlyVal、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

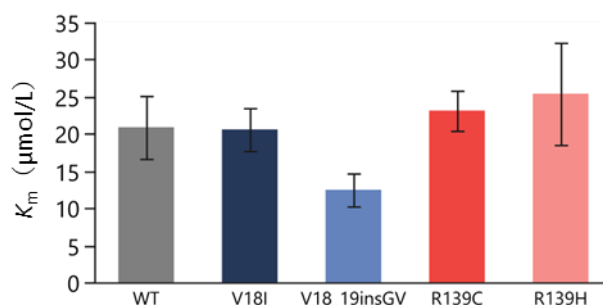


Fig. 1 精製組換えNUDT15タンパク質における酵素活性

(Fig. 1)。したがって、精製タンパク質の解析では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となった。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 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。そこで、LC-MS/MS を用いた測定法の構築を目指すこととした。6-thio-GTP、6-thio-GDP および

6-thio-GMP を分析対象物質として各分析物を検出すると、それぞれ溶出時間 0.78 分、0.84 分、1.33 分にシングルピークが得られた。次に、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代謝物を測定した。その結果、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は、患者検体を用いて NUDT15 酵素活性を測定する必要がある。そこで、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 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 (Fig. 2)。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 (Fig. 2)、酵素活性も測定可能だった。また、既報の通り 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。以上のことから、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。

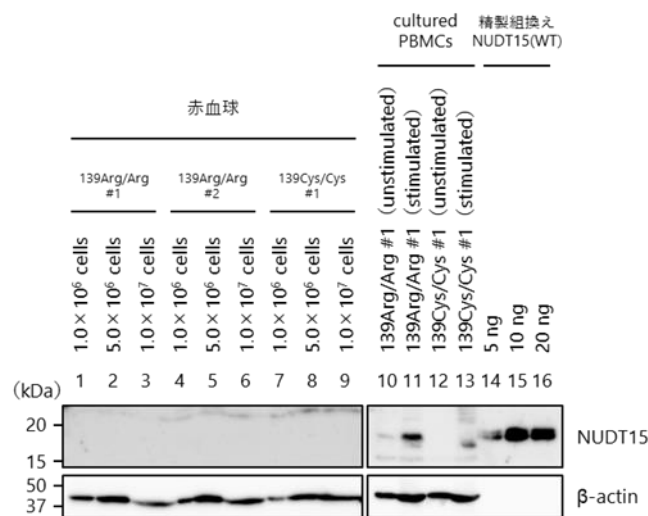


Fig. 2 赤血球およびPBMC抽出液におけるNUDT15発現量

次に、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た。ドナーより単離した PBMC 抽出液をマトリックスとして分析物の非存在下で解析を行うと、いずれの分析物に対しても干渉ピークは出現しなかった。各分析物の標準溶液を用いて検量線を作成したところ、すべての分析物において直線性が得られた。4 つの異なる濃度の QC 試料を用いた検討の結果、真度、精度ともにおおむねガイドラインの範囲内に収まっていた。各分析物の定量においてマトリックスによる影響はなく、測定試料の安定

性にも問題は見られなかった。以上の結果より、本測定法は厚生労働省のガイドラインで定められた基準値をほぼ満たしており、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。

次に、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 (27 検体) および Arg139Cys ヘテロ多型 (5 検体)、ホモ多型 (3 検体) の各ドナーより単離した PBMC 抽出液を用いて *NUDT15* 酵素活性を測定した。その結果、野生型、ヘテロ多型およびホモ多型における 6-thio-GMP 生成量の平均値はそれぞれ 7.86、5.21、3.29 $\mu\text{M/h}/10^6$ PBMCs であり、Arg139 遺伝子型に依存して *NUDT15* 酵素活性が有意に減少した (Fig. 3)。また、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見られた。

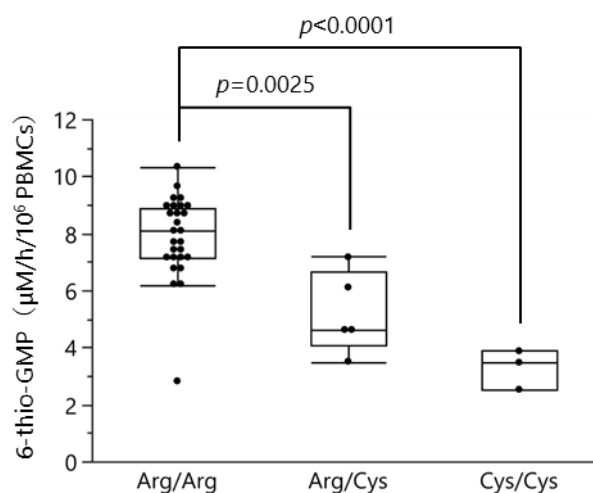


Fig. 3 PBMC抽出液における*NUDT15*酵素活性

【考察・結論】

本研究では、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た。本測定法では Arg139 遺伝子型依存的な *NUDT15* 酵素活性の差異を検出できた。野生型で見られた酵素活性のばらつきは、Arg139 以外の部位における変異が影響していることも考えられ、患者個々のチオプリン製剤の至適用量のばらつきと相関する可能性がある。しかし、本実験ドナーはチオプリン製剤を服用していないため、投与量と酵素活性との相関を明らかにすることができなかった。そのため今後は、本実験ドナーの Arg139 以外の遺伝子多型検査を実施するとともに、チオプリン服用中の患者の血液試料を用いてチオプリン製剤の維持投与量と *NUDT15* 酵素活性との相関を調査する予定である。

本研究により、LC-MS/MS を用いて 6-thio-GTP 代謝物を定量し、細胞内の *NUDT15* 酵素活性を測定する方法を構築した。本測定法を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貢献するものと考えている。

以上