●特集／臨床応用可能な PG_x

4. Methotrexate (MTX)

慶應義塾大学薬学部医薬品情報学講座

橋 口 正 行 望 月 眞 弓

Pharmacogenetics of Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis

Masayuki HASHIGUCHI Mayumi MOCHIZUKI

Division for Evaluation and Analysis of Drug Information, Keio University Faculty of Pharmacy
1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory disorder that mainly affects the joints. Despite the availability of the new biological agents such as TNF-blocking agents, methotrexate (MTX) remains as the primary agent for the treatment of RA due to the low and broad experience with its use. The efficacy and adverse drug reactions of MTX are variable among patients, and this is partially contributed in genetic difference of drug-metabolizing enzymes, transporters, and receptors

In this review, we described MTX pharmacogenetics that was related to a large interindividual variation on efficacy and adverse drug reactions in RA patients, including MTX transporter pharmacogenetics, MTX glutamation pharmacogenetics, folate pathway pharmacogenetics, and adenosine pathway pharmacogenetics. We also described the clinical implications between their pharmacogenetics and clinical outcomes (efficacy and/or adverse drug reactions of MTX)

Key words : methotrexate, rheumatoid arthritis, pharmacogenetics

1. はじめに

最近は関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) の病態の解明も進んでおり、生物学的製剤の開発からわかるように、炎症性サイトカインが重要な役割を果たしている。このように RA の治療は近年大きく変化しつつあるが、生物学的製剤は高価で、重篤な副作用もあることから、いまなお RA 治療の中心は、安価で使用経験の豊富な抗リウマチ薬 (DMARDs) である。その中でも methotrexate (MTX) は世界中で第一選択薬として最もよく使われている。しかしながら、MTX の効果や副作用には個体差が大きく、これらの原因のひとつに MTX の細胞への取込み、細胞外への排出ならびに作用発現に関連する部位での遺伝子多型の関与が考えられている。このような遺伝的な差を研究する学問として、薬理遺伝学 (pharmacogenetics) がある。

本稿では、MTX の細胞内動態や薬効・毒性発現に関与する輸送担体 (トランスポーター) や酵素の遺伝子多型でリウマチに関する MTX 薬理遺伝学の主なものについて概説する。

2. Methotrexate の細胞内動態と遺伝子多型

MTX の細胞内での動態を Fig. に示す。MTX の細胞内動態や薬効・毒性発現に関与する部位として、1) MTX トランスポーター、2) MTX polyglutamate (MTXPG) の生成と分解過程、3) 葉酸経路、4) アデノシン経路がある。これらの部位で知られている遺伝子多型をまとめたものを Table に示す。

1) MTX トランスポーターに関する遺伝子多型

MTX は solute carrier である SLC19A1 により、能動輸送メカニズムによって細胞内に入り、細胞外への排出はトランスポーターである ABC タンパク質ファミリーによって行われる。ABC タンパク質ファミ

括的評価で MTX への患者反応を検討した報告では、MTX レスポンダーの上側 25 パーセント点の患者において、SLC19A1 SNP のホモ接合体 (80A/A) の患者は、野生型アレル (80G/G) の患者に比べ、MTX に対する反応が大きかった。また、野生型の G アレルをもつ患者と比べて、A アレルのホモ接合体の患者は、MTX レスポンダーの上側 25 パーセント点に 3 倍多く存在していたことから、この SNP が MTX に対する反応性の増加と関係がある可能性を示唆している¹¹⁾。

P-糖タンパク質は、MTX を排出する細胞膜タンパク質であり、ABC タンパク質ファミリーである ABCB1 遺伝子の SNP が P-糖タンパク発現に影響する¹²⁾。SNP の 1 つは、遺伝子のエクソン 26 における C3435T 多型である^{13,14)}。

RA 患者 92 人および健康人コントロール 97 人を対象に C3435T 多型を検討した研究¹⁵⁾では、MTX (7.5-15 mg/week) および prednisone (毎日 5-10 mg) での 6 カ月の治療にもかかわらず活動性疾患の患者 (62 人) と、非活動性疾患の患者を対象とした。ABCB1 遺伝子型の分布は RA 患者および健康人コントロール間で差はみられなかったが、3435CC 遺伝子型と 3435CT 遺伝子型を持った患者は、3435TT 遺伝子型を持った患者と比べて活動性 RA の危険性が 2.89 倍高いことが報告されている。

したがって、SLC19A1 および ABCB1 などのトランスポーターにおける遺伝子変異が RA 患者での MTX に対する反応に影響する可能性がある。

2) 細胞内での MTXPG の生成と分解に関する遺伝子多型

細胞内に取り込まれた MTX は、folylpolyglutamyl synthase (FPGS) によりポリグルタミン酸化され、MTXPG として存在する。MTXPG はグルタミン酸分子 (MTXPG₂₋₇) を 7 個まで持つことができ、細胞内での MTX の保持¹⁶⁾や DHFR の阻害などの重要な機能を有する。また、このポリグルタミン酸は γ -glutamyl hydrolase (GGH) によって切断され、MTX に変換されることによって、細胞内からの MTX 排出を促進する。GGH 遺伝子では、C401T プロモーターに多型があり¹⁷⁾、GGH 401TT 遺伝子型は、他の遺伝子型と比べて、MTXPG レベルが低いことが報告されている¹¹⁾。また、長鎖の MTXPG に対する GGH 結合親和性の変化や低 GGH 活性をもたらす GGH 遺伝子の C452T 多型も報告されている¹⁸⁾。したがって、GGH の多型は、RA 患者の MTXPG レベルに影響を及ぼす

ことが考えられる。

3) 葉酸経路における遺伝子多型

RA での MTX への反応に関連して葉酸経路での MTHFR と TYMS の遺伝子多型についてはよく研究されている。

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) は、MTX により直接は阻害されないが、細胞内の葉酸の蓄積が MTX により影響されるため、MTHFR は間接的に MTX によって影響をうけることになる。

MTHFR 遺伝子においては約 1 ダースの SNP が知られており、その中で C677T と A1298C 変異の 2 つの nonsynonymous SNPs がよく研究されている。C677T 多型は、MTHFR 遺伝子のコドン 222 でアラニンからバリンへの置換を生じ、この変異では、MTHFR が熱不安定性となり、酵素活性が低下する。また血漿中ホモシステインレベルの増加と関係する¹⁹⁾。C677T 変異のホモ接合体は野生型の活性の～30%を、ヘテロ接合体は野生型の～60%の活性を有する。

MTHFR 遺伝子の別の多型である A1298C は、コドン 222 でのグルタミンからアラニンへの置換を導く^{20,21)}。A1298C のホモ接合体およびヘテロ接合体では、MTHFR は熱不安定性とはならないが、MTHFR の酵素活性は低下する。ホモ接合体の遺伝子型は、リンパ細胞において酵素活性の～60%を有する²¹⁾。A1298C 多型は、それ自身では、血漿中ホモシステインレベルに影響を及ぼさないが、C677T と A1298C のヘテロ接合体の個人は、C677T 多型のホモ接合体の個人と同じく低い MTHFR 酵素活性および高い血漿中ホモシステインレベルをもつことが報告されている²⁰⁾。

MTX で治療された RA 外来患者 106 人について、MTHFR C677T および A1298C 多型と MTX の効果または毒性との関連をレトロスペクティブに評価した研究では²²⁾、A1298C 多型がある患者は、多型がない患者に比べて、MTX 服用量が少なく、また、3 カ月後の炎症反応 (C 反応性タンパクレベルおよび赤血球沈降速度) の改善率が大きかった。C677T 多型ではそのような関連性は認められなかった。しかし、この C677T 多型は MTX 毒性と関連があり、副作用の発生頻度は、C677T アレルをもたない患者 (8.6%) より、C677T アレルをもつ患者 (26.9%) で多かった。A1298C 多型は MTX 毒性とは関連はなかった。

MTX を服用している RA 患者 93 人および健康な被験者 377 人 (コントロール) を対象とした横断的研

究²³⁾では、C677T および A1298C SNP の遺伝子型、血清葉酸および血漿中ホモシステインレベル、疾患活動性が評価された。RA 患者での 1298CC 遺伝子型の頻度 (24.7%) は、コントロール (12.8%) に比べて多く、分布に違いがみられている。疾患活動性と 1298 遺伝子型 (AA, AC および CC) のいずれとも関連はなかった。しかし、1298CC 遺伝子型は MTX の副作用発現頻度が低く、野生型の 1298AA 遺伝子型の患者は、MTX の有害事象の発現リスクが 1298CC 遺伝子型の患者より 5 倍高かった。この結果から、1298CC 遺伝子型の RA 患者は、MTX の有害事象が発現しにくい可能性が推測された。この研究では、C677T 多型と MTX の副作用との間に関連はなかった。

MTX を服用している RA 患者 236 人について、C677T SNP の遺伝子型、MTX 毒性および疾患活動性を評価した別の研究²⁴⁾では、19 人の患者 (8%) が C677T のホモ接合体であり、95 人の患者 (40%) がヘテロ接合体であり、122 人の患者 (52%) では、SNP は存在しなかった。有害事象のために MTX 治療を中止するリスクは、ホモ接合体 (T/T) あるいはヘテロ接合体 (T/C) の遺伝子型と関連があり、これらの遺伝子型の患者で 2 倍ほど高く、おもに肝毒性による中止であった。効果に関しては、C677T SNP とは関連がなく、C677T 多型が MTX 毒性、とくに肝毒性発現リスクのパラメータとなりうる可能性を示唆している。

MTHFR 遺伝子の C677T と A1298C SNPs を持つ人では、血漿中ホモシステインレベルがさらに高くなるため、これらの SNPs が MTX 毒性に関与する可能性がある。RA 患者 105 人 (MTX による治療 35 人、sulfasalazine (SSZ) による治療 34 人、MTX+SSZ による治療 36 人) について、血漿中ホモシステインレベルと C677T SNP の遺伝子型を調べた研究では²⁵⁾、MTX を服用している 2 つの治療群は、SSZ のみを服用している群と比較して、血漿中ホモシステインレベルの増加が大きく、MTX+SSZ を服用している群で最も大きかった。C677T SNP のヘテロ接合体およびホモ接合体は、SNP をもたない患者より、血漿中ホモシステインレベルは高かった。血漿中ホモシステインレベルは、消化器系 (GI) の有害事象のない患者と比べ、GI 有害事象がある患者で統計学的に有意な増加があったが、MTHFR 遺伝子型および GI 有害事象の間に直接の関連はなかった。したがって、MTX を服用している RA 患者は血漿中ホモシステインレベルが増大し、C677T SNP によってさらに増大する可能性があり、MTX の GI 毒性に C677T SNP が重要である

ことが考えられる。

このように、A1298C 多型は MTX の効果と、C677T 多型は MTX の毒性と関連するように、MTHFR 遺伝子における両 SNPs は相異なる関連性をもつ。

Dihydrofolate reductase (DHFR) は dihydrofolate (DHF) を tetrahydrofolate (THF) に還元する酵素であり、MTX は DHFR を競合的に阻害する。DHFR の酵素機能または MTX への結合に影響する DHFR 遺伝子多型が、MTX に対する反応に影響を与える可能性がある。2 つの DHFR 多型、-473G>A および 35289G>A が知られているが、MTX の効果や毒性に関連はないらしい²⁶⁾。

Thymidylate synthetase (TYMS) は、チミジル酸 *de novo* 合成において重要な酵素であり、dUMP を dTMP に変換する。TYMS は、MTXPG によって直接阻害され、また MTX による葉酸補因子の枯渇により間接的に阻害される。TYMS の阻害は、dTMP 枯渇および核酸へのウラシル誤挿入の増加を生じ、染色体損傷および細胞死をもたらす。TYMS 遺伝子の 5'-非翻訳領域 (5'-UTR) においてタンDEM反復配列 (5'-UTR での 28-bp 繰返し) をもつ多型が報告されている²⁷⁾。これは *in vitro* で繰返し配列数の増加によって、TYMS メッセンジャー RNA (mRNA) 発現および TYMS 酵素活性が増加することから、エンハンサーとして機能すると考えられる²⁸⁻³⁰⁾。3 つの反復アレルのホモ接合体 (TYMS 5'-UTR 3R/3R) の患者は、2 つの反復アレルのホモ接合体 (TYMS 5'-UTR 2R/2R) の患者より、TYMS mRNA 発現が高いことが報告されている^{29,30)}。TYMS 遺伝子の 3'-UTR のヌクレオチド 1494 で配列 TTAAAG の 6-bp が欠失する多型 (3'-UTR 6-bp 欠失) もあり³¹⁾、この多型の機能はよくはわかっていないが、3'-UTR 6-bp 欠失は TYMS mRNA 安定性の低下および発現の減少に関連しているデータがある^{31,32)}。

日本人 RA 患者 36 名を対象に MTHFR および TYMS の遺伝子型頻度に関する我々の検討では、各アレル頻度の分布は、TYMS 5'-UTR 3R アレル (86%) > 2R アレル (14%)、TYMS 3'-UTR-6 アレル (65%) > +6 アレル (35%)、MTHFR 677C アレル (61%) > T アレル (39%)、MTHFR 1298A アレル (76%) > C アレル (24%) であった。これらのアレル頻度は過去に報告された日本人 RA 患者でのアレル頻度³³⁾とほぼ同じであった。

MTX の効果および毒性と TYMS、MTHFR の遺伝

子型との関連性を日本人 RA 患者 167 人（そのうちの 115 人は低用量の MTX による治療）を対象に検討した報告³³⁾では、TYMS 5'-UTR 28-bp 反復、3'-UTR 6-bp 欠失、MTHFR C677T および A1298C 多型のすべてのアレル頻度は MTX 治療群および非 MTX 治療群の間で同じであった。MTX で 2 カ月以上治療された 93 人について、TYMS 5'-UTR 3R/3R 反復アレルのホモ接合体の患者は、TYMS 5'-UTR 2R/2R 反復アレルの患者と比較して MTX の高用量 (>6 mg/week) を必要とした。血清 CRP レベルで 50% 以上の改善があった割合は、欠失アレルのホモ接合体 (-6 bp/-6 bp) の患者で多かった。タンデム反復多型と同様に、日本人での TYMS 3' UTR での挿入/欠失多型のアレル頻度は、白人と異なっていた。これらの結果から、TYMS 5'-UTR 3' R/3R 多型は TYMS mRNA 発現の増加によって、MTX 効果は低下し、一方、欠失 SNP (-6 bp) では、TYMS mRNA 発現の低下によって、患者の MTX に対する感受性が高まることが推測される。この結果は TYMS 多型についての遺伝子判定は、RA 患者での MTX の至適投与量の決定に有用な指標となるかもしれないことを示唆している。

4) アデノシン経路における遺伝子多型

MTX の抗炎症効果には、内因性の抗炎症性物質のアデノシンの放出が関係すると考えられている。細胞内で MTXPGs は 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase (ATIC) を阻害して、5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) の細胞内蓄積をもたらす。この ATIC に多型が存在することが知られている³⁴⁾。また、その他に AMP deaminase (AMPD) や inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) にも多型があることが知られている。

3. MTX の効果・副作用の評価における MTX 関連の多遺伝子の多型性の考慮の必要性

これまで説明した細胞内での MTX の動態または効果・副作用に関連する輸送担体および酵素には多くの遺伝子多型が存在する。そのため、MTX の効果および毒性を評価するためには、多遺伝子の分析を行い、MTX 効果または副作用との関係を総合的に評価する必要があることは容易に想像がつく。そのような研究がこれまでいくつか報告されている。

日本人 RA 患者 36 名を対象にした、MTHFR、TYMS の遺伝子型と MTX 治療反応性の予測因子を

重回帰分析により検討した我々の報告³⁵⁾では、赤血球中 MTXPG 量、TYMS 3'-UTR (-6/+6) の遺伝子型および MTX 投与直前 ESR 値により、50% CRP 改善用量の個体差の 51% が説明できることが示された。

3 カ月以上 MTX で治療された RA 患者 108 人について MTX の効果に対する SLC19A1、TYMS、ATIC の影響を総合的に評価した研究³⁶⁾では、ATIC における C347G SNP、TYMS 5'-UTR 28-bp 反復多型 (TYMS 5'-UTR 2R/2R)、および SLC19A1 G80A 多型について患者が持っているホモ接合体の変異遺伝子型 (SLC19A1 80 AA、ATIC 347GG および TYMS 5'-UTR 2R/2R) の合計に対応する pharmacogenetic index の算出、赤血球中の長鎖の MTXPG 濃度測定、患者反応の MTX レスポンダー (VAS スコア ≤ 2 cm) および MTX ノンレスポンダー (VAS スコア > 2 cm) への分類を行っている。結果では、MTX の投与量は、MTX の効果と関連がなく、対照的に長鎖 MTXPG の高濃度と高い pharmacogenetic index が圧痛および腫脹関節数の少なさと疾患活動の医師の包括的評価の低スコアと関連があった。赤血球中 MTXPG 濃度 > 60 nmol/L と変異遺伝子のホモ接合体をもつことが、それぞれ、14 倍、3.7 倍 MTX への反応が良かったことが示されている。したがって、これらのアレルのうちの 1 つ以上のホモ接合体は、MTX に対する好ましい“反応遺伝子型”であり、赤血球中 MTXPG 濃度および葉酸経路の多型を調べることは、MTX 療法でのモニタリングに有用であることが考えられる。

Serine hydroxy methyltransferase (SHMT) は、5,10-methylene-THF の合成に重要なビタミン B₆ 依存酵素をコードしている。赤血球中の葉酸レベルに影響するこの酵素遺伝子での C1420T 多型が報告されている³⁷⁾。1 カ月以上 MTX を服用していた RA 患者 214 人について MTX の毒性に対する MTHFR、TYMS、ATIC、SHMT の影響を総合的に評価した研究³⁸⁾では、MTHFR C677T、TYMS 5'-UTR 28-bp 反復 (TYMS 5'-UTR 2R/2R)、ATIC C347G および SHMT C1420T 多型と各遺伝子のホモ接合体の変異の合計を各患者の toxicogenetic index として算出し、1 回受診時での MTX の副作用を調査した。67 人 (31%) が副作用 (消化器系、頭痛、嗜眠、脱毛、咳、呼吸困難) を経験しており、特定の毒性が特定の遺伝子型と関連があった。中枢神経系の副作用 (頭痛、倦怠感) は MTHFR 677TT (OR 3.3) および SHMT 1420CC (OR 2.4) と、消化器系の副作用は ATIC 347GG (OR 3.0) と、脱毛は TYMS 5'-UTR 2R/2R (OR

5.6) および SHMT 1420 CC (OR 3.2) と関連があった。Toxicogenetic index (MTHFR 677TT+SHMT 1420CC+TYMS 5'-UTR 2R/2R+ATIC 347GG) の範囲は 0~3 であり, index 3 は, index 0 に比べて, 副作用を持つ可能性が 7 倍高かった。これらの結果から, 葉酸依存性酵素でのリスク遺伝子型を累積した複合 index は, MTX の副作用が発現しやすい RA 患者のプロファイリングに有用な手段である可能性がある³⁸⁾。

4. おわりに

MTX の効果や副作用の発現の個人差に遺伝的要因が関係することが知られているが, 現在のところ, RA 治療に対する MTX 反応性の予測に役立つ, 信頼できる臨床または分子生物学的マーカーはない。MTX は投与後 24 時間以内に体循環血中から消失するので, RA での標準的治療法である MTX 低用量経口パルス療法では, 薬剤の有効性の評価に血清中 MTX 濃度は利用できない。また, 赤血球中および多形核白血球細胞中の MTXPG レベルは, 臨床効果と相関があるが, MTXPG の分析は技術的に難しく, 一般の施設では行えない。

MTX の効果や副作用に関連すると考えられる薬物輸送担体ならびに酵素遺伝子の多型は数多く, どの多型が MTX の効果や副作用発現に大きく寄与しているのかわかっていない。このように MTX の効果発現あるいは毒性発現に関する個体差に関わる SNPs の影響は複雑であり, 他の薬剤とは大いに異なる。さらに, ゲノム情報を MTX による治療において臨床応用するためには, 1 つの遺伝子多型ではなく, 真に関連する複数の遺伝子多型を組み合わせる総合的に評価する必要がある。そのような研究が現在行われているが, 現時点では, 個別化医療を実現できる段階には至っていない。今後の研究の進展が望まれる。

文 献

- Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002 ; **71** : 537-92.
- Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, et al. Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* 1999 ; **59** : 2532-5.
- Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW, Schneider E. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res* 2002 ; **62** : 5035-40.
- Rothem L, Aronheim A, Assaraf YG. Alterations in the expression of transcription factors and the reduced folate carrier as a novel mechanism of antifolate resistance in human leukemia cells. *J Biol Chem* 2003 ; **278** : 8935-41.
- Rothem L, Stark M, Kaufman Y, Mayo L, Assaraf YG. Reduced folate carrier gene silencing in multiple antifolate-resistant tumor cell lines is due to a simultaneous loss of function of multiple transcription factors but not promoter methylation. *J Biol Chem* 2004 ; **279** : 374-84.
- Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 2000 ; **70** : 310-5.
- Whetstone JR, Witt TL, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is regulated by the AP2 and spl transcription factor families and a functional 61-base pair polymorphism. *J Biol Chem* 2002 ; **277** : 43873-80.
- Whetstone JR, Gifford AJ, Witt T, Liu XY, Flatley RM, Norris M, 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* 2001 ; **7** : 3416-22.
- Laverdière C, Chiasson S, Costea I, Moghrabi A, Krajcinovic M. Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002 ; **100** : 3832-4.
- Dervieux T, Kremer J, Lein DO, Capps R, Barham R, Meyer G, et al. Contribution of common polymorphisms in reduced folate carrier and gamma-glutamylhydrolase to methotrexate polyglutamate levels in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics* 2004 ; **14** : 733-9.
- Dervieux T, Lein DO, Park G, Barham R, Smith K, Walsh M, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the folate/purine synthesis pathway predict methotrexate's effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003 ; **48** Suppl 9 : S438.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene : multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 ; **97** : 3473-8.
- Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001 ; **70** : 189-99.
- Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta : relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001 ; **297** : 1137-43.
- Pawlik A, Wrzesniewska J, Fiedorowicz-Fabrycy I, Gawronska-Szklarz B. The MDR1 3435 polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004 ; **42**(9) : 496-503.
- Galivan J. Evidence for the cytotoxic activity of polyglutamate derivatives of methotrexate. *Mol Pharmacol* 1980 ; **17** : 105-10.
- Chave KJ, Ryan TJ, Chmura SE, Galivan J. Identification of single nucleotide polymorphisms in the human γ -glutamyl hydrolase gene and characterization of promoter polymorphisms. *Gene* 2003 ; **319** : 167-75.
- Cheng Q, Wu B, Kager L, Panetta JC, Zheng J, Pui CH, et al. A substrate specific functional polymorphism of human gamma-glutamyl hydrolase alters catalytic activity and methotrexate polyglutamate accumulation in acute lymphoblastic leukaemia

- cells. *Pharmacogenetics* 2004 ; **14** : 557-67.
- 19) Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalishyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia : a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988 ; **43** : 414-21.
 - 20) Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene : an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998 ; **62** : 1044-51.
 - 21) Winegrad S, Weisberg I. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Circ Res* 1998 ; **83** : 60-72.
 - 22) Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 2002 ; **12** : 183-90.
 - 23) Berkun DL, Rubinow A, Orbach H, Aamar S, Grenader T, Abou Atta I, et al. Methotrexate related adverse effects in patients with rheumatoid arthritis are associated with the A1298C polymorphism of the MTHFR gene. *Ann Rheum Dis* 2004 ; **63** : 1227-31.
 - 24) Van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, Huizinga TW, Haagsma CJ, Giesendorf BA, et al. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene : a genetic risk factor for methotrexate-related elevation of liver enzymes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001 ; **44** : 2525-30.
 - 25) Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D, et al. Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999 ; **58** : 79-84.
 - 26) 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, 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* 2006 ; **54** : 1087-95.
 - 27) Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, 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* 1995 ; **20** : 191-7.
 - 28) Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 1999 ; **19** : 3249-52.
 - 29) Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001 ; **1** : 65-70.
 - 30) DiPaolo A, Chu E. The role of thymidylate synthase as a molecular biomarker. *Clin Cancer Res* 2004 ; **10** : 411-2.
 - 31) Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, Potter JD. Searching expressed sequence tag databases : discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 ; **9** : 1381-5.
 - 32) Merkelbach-Bruse S, Hans V, Mathiak M, Sanguedolce R, Alessandro R, Ruschoff J, et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase gene, the expression of thymidylate synthase mRNA and the microsatellite instability phenotype of colorectal cancer. *Oncol Rep* 2004 ; **11** : 839-43.
 - 33) Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Intl J Mol Med* 2003 ; **11** : 593-600.
 - 34) Chan ES, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res* 2002 ; **4** : 266-73.
 - 35) 井上幸恵, 林智子, 橋口正行, 高木賢治, 川合眞一, 望月眞弓. 関節リウマチに対するメトトレキサート反応性関連因子の特定と反応性の予測. *臨床薬理* 2006 ; **37**(Suppl) : S226.
 - 36) Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, Walsh M, et al. 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* 2004 ; **50** : 2766-74.
 - 37) Heil SG, van der Put NM, Waas ET, Den HM, Trijbels FJ, Blom HJ. Is mutated serine hydroxymethyltransferase (SHMT) involved in the etiology of neural tube defects? *Mol Genet Metab* 2001 ; **73** : 164-72.
 - 38) Weisman MH, Furst DE, Park GS, Kremer JM, Smith KM, Wallace DJ, Caldwell JR, Dervieux T. Risk genotypes in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006 ; **54** : 607-12.