

臨床研究終了後に特別な対応はありません。通常の診療を受けていただく事となります。

- 8 被験者及の希望により、他の被験者の個人情報の保護や臨床研究の独創性の確保に支障がない範囲内で、臨床研究計画及び臨床研究の方法について資料を入手又は閲覧することができること

研究計画書を入手又は閲覧できます。採血させていただきましたサンプルは、どの患者様のものかわからない形で保管いたしますので、患者様自身のデータのみを特定してお知らせする事はできません。

- 9 個人情報の取り扱い

医師・看護師・薬剤師を含むすべての病院スタッフには、通常の診療業務上知り得た事に関して秘密を守る義務があります。病院スタッフにはこの臨床研究上知った情報について守秘義務が課せられます。

血液サンプルは採血後すぐに個人を特定することのできる情報を取り除く、匿名化と言う作業がなされ、どの患者様のサンプルかわからない状態で保管されます。どの患者様のサンプルかわからないまま解析されます。このように個人情報は研究目的では保管されませんので、個人情報が第三者へ漏れる心配はありません。

- 10 臨床研究の成果により特許権等が生み出される可能性があること及び特許権等が生み出された場合の帰属先

この臨床研究の結果により新たな知見が得られる事があります。本研究を行った結果得られた知的財産に関連する権利は試料提供者（患者様）にはありません。本研究を行った結果得られた知的財産に関連する権利は研究者及び研究施設に帰属します。

- 11 被験者を特定できないようにした上で、研究成果が公表される可能性があること

本研究結果は学術論文・学会発表などの形で公開される可能性があります。この場合も、被験者（参加された患者様）がどなたかわからない形で公表されます。



- 12 臨床研究に係る資金源、起こりうる利害の衝突及び研究者等の関連組織との関わり

本研究は厚生労働省科学研究費補助金を使用して行われます。利害の衝突はありません。

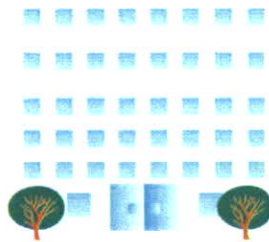
単独施設での研究であり関連組織はありません。

13 臨床研究に伴う補償の有無

補償はありません

14 問い合わせ、苦情等の窓口の連絡先等に関する情報

研究に関するお問い合わせは、下記の研究責任者までご連絡ください。苦情がある場合は、自治医科大学学事課（電話0285-58-7550）で受け付けます。



記

研究責任者：大島康雄

自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門

栃木県下野市薬師寺3311-1（電話 0285-58-7388）

p. 12

2 同意書

研究同意書

自治医科大学附属病院長 殿

「遺伝子発現解析による薬物有害反応の予測」研究について、研究者_____から、説明文書を用いて次の事項について説明を受けました。
(説明者氏名)

※ 理解した項目の□の中にご自身でチェックの印をつけてください。

- 例 理解できた項目にはチェックをつけてください
 理解できなかった項目にはチェックをしないでください

- 研究への参加は任意であること
- 研究への参加に同意しなくても不利益を受けないこと
- 研究への参加に同意した後も、いつでもこれを撤回できること
- 研究協力を依頼された理由
- 研究の意義・目的・方法及び期間
- 研究者等の氏名・職名
- 予想される不快な点・期待される利益
- 臨床研究に関する資料の閲覧
- 患者様の個人情報の保護に関すること
- 臨床研究結果について学術論文等で公開する可能性がある事
- 知的財産権の帰属が患者様でないこと
- 研究は自治医大臨床薬理学および口腔外科学により行われる事
- 臨床研究費は厚生労働省科学研究費補助金により行われる事
- お問い合わせ・苦情等の連絡先に関する情報

以上の説明を理解したので、被験者として研究に参加することに同意致します。

_____年 _____月 _____日

住所 _____

氏名 _____

(氏名は自署、または記名・押印)



別記様式第3号（第8条関係）

遺伝子解析研究許可決定通知書

平成18年12月18日

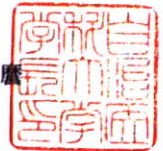
申請者（研究責任者）

薬理学講座臨床薬理学部門

大島康雄 殿

自治医科大学

学長 高久史 殿



受付番号：第 遺06-22号

課題等名

発現解析による薬物副作用の予測

さきに申請のあった上記の課題について、遺伝子解析研究倫理審査委員会での審議及び審査結果を踏まえ、研究の実施を許可することに決定したので通知します。

なお、遺伝子解析研究倫理審査委員会の判定結果は下記のとおりでした。

記

判定結果	承認	条件付承認	変更の勧告	不承認	中止	その他
理由、条件、勧告又は意見						

分担研究報告書

ヒト末梢血中リンパ球を用いたトキシコゲノミクス基盤研究
マイクロアレー実施・バイオインフォマティクスに関する研究

分担研究者 津田英利 自治医科大学臨床薬理学 ポスト・ドクター

研究要旨

当研究室では前年度までに腎障害性薬物を曝露した細胞より得た遺伝子発現データを基に、腎障害性薬物を予測するために必要な遺伝子の組み合わせとアルゴリズムを構築した。臨床の場では薬物による腎障害の他に、肝障害が問題になり、治療の継続を困難にすることがある。そこで、肝障害性薬物の遺伝子発現データを取得し、腎障害性薬物と同様に予測することが可能か否かを検討した。今回は、これまで曝露実験に用いた薬物を、肝障害が報告されているものと、報告の無いものに分けるとともに、新たに曝露した薬物を合わせて解析をした。training setとして34薬物、test setとして51薬物のデータが得られた。training setを基にして、肝障害あり、なしの薬物群間を比較する事により、有意に発現変動した遺伝子を53抽出した。この遺伝子群を用いて、腎障害性薬物予測の手法を参考に予測を行った結果、72.5%の精度で肝障害性を予測することが出来た。

A. 研究目的

臨床の場では薬物による腎障害とともに肝障害が問題になり、治療の妨げとなる事がある。時には重篤な障害となり死亡する事もある。創薬時には前臨床の段階より各化合物を用いた毒性試験が行われているが、ヒトに使用した際の毒性を十分に予測することが出来ない事もこれらの原因の一つとなっている。我々は前年度までに薬物性腎障害を予測するために必要な遺伝子の組み合わせと、それを用いて毒性予測を行うアルゴリズムを構築した。そこで、今回は薬物を肝障害の有りとなしに分類し、腎障害性薬物と同様に予測・分類が可能か否かを明らかにすることを目的とした。

B. 方法

本研究で用いる薬物は、前年度までに曝露した薬物のうち添付文書情報に含まれる重大な副作用の中に、肝障害あるいは劇症肝炎の表記のあるものを肝障害あり、表記のないものを肝障害なしとして抽出し、さらに新たに数種類の薬物を用いて細胞に曝露した。曝露濃度は、腎障害時と同様に臨床で報告されている最高血

中濃度を参照して決めた。曝露細胞はヒト末梢血 B 細胞由来細胞株である HEV0034(RIKEN)とし、薬物を曝露後 24 時間目に細胞を遠心して回収し、RNeasy Mini prep kit (QIAGEN)を用いて RNA を得た。抽出した RNA は-80 度 C に保存し、ラベリングは OVATION Biotin RNA Amplification and Labeling System Ver.1.0 (NuGEN, MebiDic)により行い、得られたピオチンラベル cDNA は GeneChip HG-U133A2.0(Affymetrix) により遺伝子発現データを取得した。

得られた発現データにより GCOS にて RPT ファイルと Pivot データを作製し、RPT ファイルからは品質管理に必要なデータを抽出した。Pivot データは GeneSpring に読み込んだ後、housekeeping gene による per chip normalization を行った。normalization 後のデータは noise reduction を行い、training set の発現データ 34 個を用いて肝障害のあり、なし、で有意な差を持って発現が変動した遺伝子を volcano plot 法により抽出した。ここで得られた遺伝子群を用いて、GeneSpring に内包されている Support Vector Machine に test set と training set をそれぞれセットし、training set で得られた遺伝子群を用いて、training set に対して cross validation を行

いながら、予測値が最大になるように最適なマージンの設定を行った。その後 test set に関する肝障害の情報を伏せて、予測を行った。今回発現データ取得に用いた薬物を表に示す。

表 training set 群 肝障害ありの薬物

一般名	商品名	通常一日使用量 (mg)	曝露濃度 [mcg/ml]
セフトジジム	モダシン	4000	20
ピアベネム	オメガシン	1200	20
塩酸セフェピム	マキシベーム	4000	20
スルピリン	メチロン	1000	20
硫酸ストレプトマイシン	硫酸ストレプトマイシン	2000	20
フルコナゾール	ジフルカン	400	20
テオフィリン	テオドリップ	576	20
アスポキシシリン	ドイル	4000	20
セファゾリンナトリウム	セファメジン α	1000	20
塩酸クロミブラミン	アナフラニール	100	1
フェニトイン	アレビアチン	400	20
ニコランジル	シグマート	72	1
ヒドロキシジン	アタラックスP	200	1
フェノバルビタール	フェノバル	400	20

表 training set 群 肝障害なしの薬物

一般名	商品名	通常一日使用量 (mg)	曝露濃度 [mcg/ml]
エビネフリン	ボスミン	1	0.05
塩酸エフェドリン	エフェドリン	40	1
メシル酸ブリジノール	コンラックス	2	0.05
塩酸ニフェカレント	シンピット	576	20
塩酸ベラパミル	ワソラン	5	0.05
臭化メチルアニトロピン	バルピン	30	1
臭化チメジウム	セスデン	7.5	0.05
カンレノ酸カリウム	ソルダクトン	600	20
塩酸ドブタミン	ドブトレックス	1728	20
塩酸ブレネルフィン	レベタン	0.6	0.05
酢酸フレカイニド	タンボコール	150	1
塩酸プロカインアミド	アミザリン	1000	20
塩酸コルホルシンダロバート	アデール	43.2	1
ジアゼパム	セルシン	4	0.05
ノルエビネフリン	ノルアドレナリン	1	0.05
二硝酸イソソルビド	ニトロール	240	1
塩酸ジフェンヒドラミン・ジプロピリン	トラベルミン	600	20
ジピリダモール	ベルサンチン	30	1
塩酸イソクスプリン	ズファジラン	10	1

塩酸ジフェンヒドラミン	ペナスミン	30	1
-------------	-------	----	---

表 test set 群 肝障害ありの薬物

一般名	商品名	通常一日使用量 (mg)	曝露濃度 [mcg/ml]
スルファメトキサゾール・トリメトプリム	バクタミン注	1200	20
塩酸ヒドララジン	アプレソリン	20	1
メロベネム三水和物	メロベン	2000	20
アミノフィリン	ネオフィリン	500	20
イミベネム・シラスタチンナトリウム	チエナム	2000	20
リン酸クリンダマイシン	ダラシン s	2400	20
テイコブラニン	タゴシッド	200	1
ピペラシリンナトリウム	ベントシリン	4000	20
パニベネム・ベタミプロン	カルベニン	2000	20
塩酸セフメノキシム	ベストコール	4000	20
スルバクタムナトリウム・セフォバゾンナトリウム	スルベラゾン	4000	20
ファモチジン	ガスター	40	1
ラクチオン酸エリスロマイシン	注射用エリスロシン	1500	20
セフトゾキシムナトリウム	エポセリン	7200	20
レボホリナートカルシウム	アイソポリン	375	1
塩酸セフォゾラン	ファーストシン	4000	20
フォロモキセフナトリウム	フルマリン	4000	20
クロルプロマジン	コントミン	50	1
スルピリド	ドグマチール	600	20
カルベリチド	ハンブ	8.64	0.05
コハク酸シベンゾリン	シベノール	168	1

表 test set 群 肝障害なしの薬物

一般名	商品名	通常一日使用量 (mg)	曝露濃度 [mcg/ml]
臭化エチルピペタナート	バンブロール	10	1
ブメタニド	ルネトロン	1	0.05
酒石酸プロチレリン	ヒルトニン	2	0.05
臭化ブチルスコポラミン	ブスコパン	20	1
ピレタニド	アレリックス	12	1
リン酸ジソピラミド	リスモダンP	100	1
塩酸ドパミン	イノバン	1728	20
ノルエビネフリン	ノルアドレナリン	1	0.05
塩酸パバベリン	塩酸パバベリン	200	1
プロキシフィリン	モノフィリン	200	1
塩酸プロメタジン	ヒベルナ	50	1
ブクラデシンナトリウム	アクトシン注	17280	20
レセルピン	アポブロン	2.5	0.05

マレイン酸メチルエルゴメトリン	メテナリン	0.2	0.05
マレイン酸クロルフェニラミン (d1 体)	クロール・トリメトン	20	1
フマル酸ニゾフェノン	エコナール	30	1
アセチル酸ナトリウム	サルソニン	2000	20
塩酸ジフェニルピラリン	ハイスタミン	8	0.05
ジゴキシシン	ジゴキシシン	1	0.05
フロセמיד	ラシックス	20	1
ネオスチグミン	ワグスチグミン	3	0.05
金チオリンゴ酸ナトリウム	シオソール	100	1
臭化カルシウム	プロカル	1200	20
ピペリデン	アキネトン	10	1
レボドパ	ドバストン	600	20
セコバルピタールナトリウム	アイオナールナトリウム	500	20
デスラノシド	ジギラノゲンC	1	0.05
マレイン酸エルゴメトリン	エルゴメトリンF	0.2	0.05
塩酸メキシレチン	メキシチール	125	1

C. 結果

training set として 34 薬物、test set として 51 薬物を曝露し、発現データを取得した。まず training set のデータの質を確認するために、housekeeping gene である β -アクチン、GAPDH の 3' /5' 比と %Present を比較した。その結果、いずれのパラメーターにおいても大きく外れた値は検出しなかった(図1-3)。

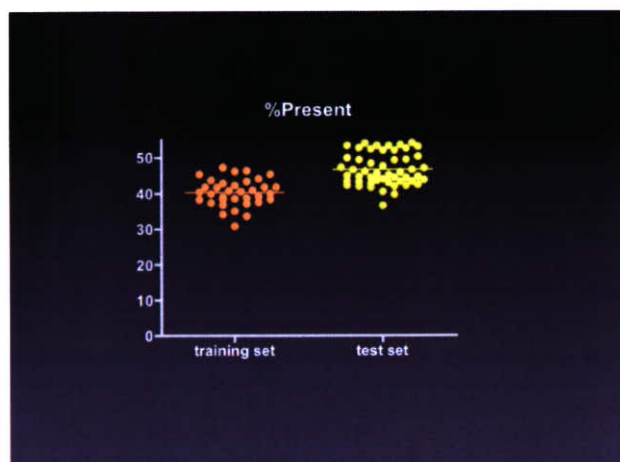


図1 肝障害予測用発現データの %Present 比較

しかし、training set では β -アクチン、GAPDH が test set と比較して低値を示したにもかかわらず、%Present では test set より相対発現遺伝子数が減少するという現象が見られた。



図2 肝障害予測用発現データの β -アクチン 3' /5' 比の比較

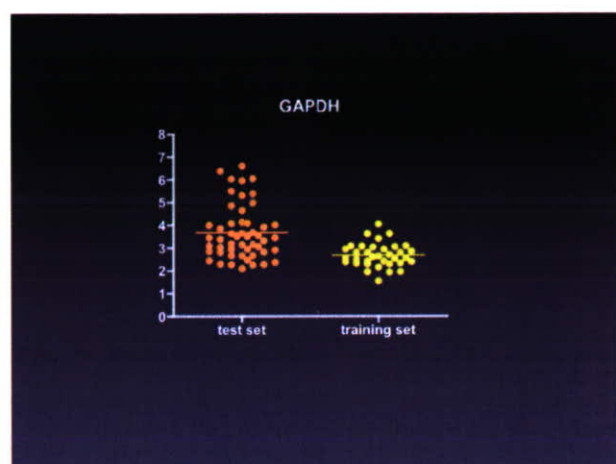


図3 肝障害予測用発現データの GAPDH 3' /5' 比の比較

特に解析から外すべき実験データは見られず、全てのデータを用いて GeneSpring にて per chip normalization を行い、さらに noise reduction を行って肝障害のありとなしで遺伝子発現の比較を行った。その結果、15,716 の遺伝子が絞り込まれた(図4)。

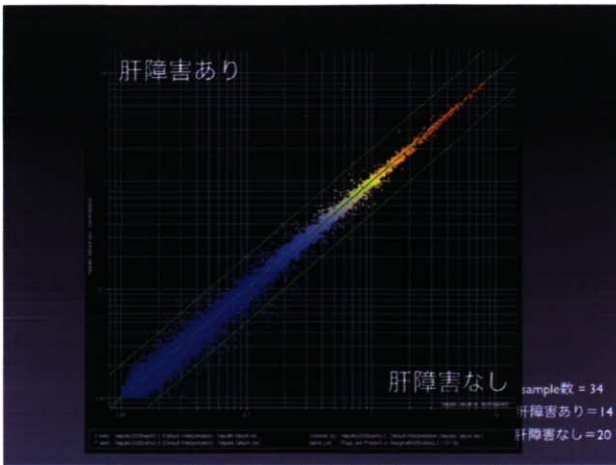


図4 test setにおける肝障害あり群となし群のスキャッタープロット

絞り込まれた遺伝子に対して volcano plot を行った。その結果、2 倍以上の発現変動を示した遺伝子のうち、cut off を P 値=0.05 に設定すると 101 遺伝子が分離され、さらに P 値を 0.01 に設定すると、53 遺伝子に絞り込まれた(図5)。53 遺伝子のリストを表1に示す。

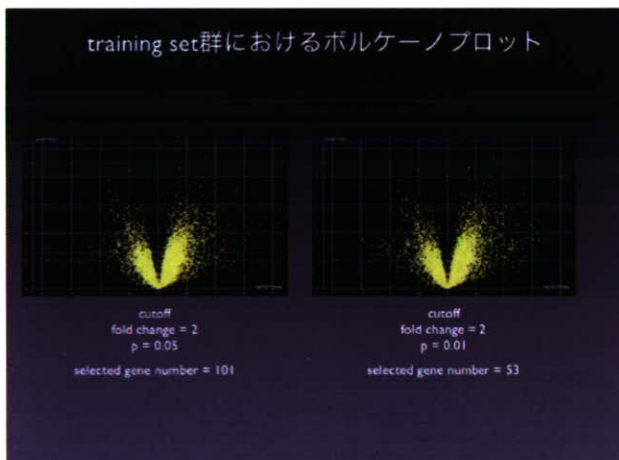


図5 training set 群におけるボルケーノプロット

表1 test set のボルケーノプロットにて分離された 53 遺伝子のリスト

Gene Name	Fold change	Common	Genbank
213355_at	4.142	SIAT10	AK001922
218717_s_at	3.412	LEPREL1	NM_018192
209395_at	3.251	CHI3L1	M80927
215073_s_at	3.075	NR2F2	AL554245
210105_s_at	3.057	FYN	M14333
211734_s_at	3.044	FCER1A	BC005912
202052_s_at	2.988	RAI14	NM_015577

218805_at	2.964	IAN4L1	NM_018384
214036_at	2.897		BE464799
204533_at	2.811	CXCL10	NM_001565
203430_at	2.735	HEBP2	NM_014320
212698_s_at	2.643	10.Sep	BF966021
206134_at	2.61	ADAMDEC1	NM_014479
202436_s_at	2.588	CYP1B1	NM_000104
209396_s_at	2.574	CHI3L1	M80927
201131_s_at	2.565	CDH1	NM_004360
213913_s_at	2.545	KIAA0984	AW134976
220177_s_at	2.543	TMPRSS3	NM_024022
205590_at	2.54	RASGRP1	NM_005739
210942_s_at	2.487	SIAT10	AB022918
220485_s_at	2.484	SIRPB2	NM_018556
219777_at	2.466	hIAN2	NM_024711
218764_at	2.398	PRKCH	NM_024064
217963_s_at	2.392	NGFRAP1	NM_014380
201215_at	2.368	PLS3	NM_005032
205498_at	2.324	GHR	NM_000163
212233_at	2.302	MAP1B	AL523076
209191_at	2.299	MGC4083	BC002654
204464_s_at	2.271	EDNRA	NM_001957
205495_s_at	2.249	GNLY	NM_006433
212543_at	2.245	AIM1	U83115
212771_at	2.143	C10orf38	AU150943
219410_at	2.135	FLJ10134	NM_018004
214599_at	2.111	IVL	NM_005547
219938_s_at	2.099	PSTPIP2	NM_024430
204720_s_at	2.098	DNAJC6	AV729634
208335_s_at	2.097	FY	NM_002036
211367_s_at	2.09	CASP1	U13699
202615_at	2.081	GNAQ	BF222895
212354_at	2.065	SULF1	AW043713
204472_at	2.06	GEM	NM_005261
208025_s_at	2.057	HMGA2	NM_003483
205933_at	2.041	SETBP1	NM_015559

214522_x_at	0.497	HIST1H2AD	NM_021065
203038_at	0.473	PTPRK	NM_002844
218856_at	0.454	TNFRSF21	NM_016629
202552_s_at	0.431	CRIM1	NM_016441
204271_s_at	0.329	EDNRB	M74921

この遺伝子セットを用いて、GeneSpring に内包されているサポートベクターマシンにデータをセットし、training set を用いてパラメーターの最適化を行った。その結果、Kernel Function に Polynomial Dot Product を用い、Diagonal Scaling Factor を 70 にセットした時に、予測精度が最大となった。さらに、このパラメーターを用いて test set の肝障害の有無をブラインド化して予測した。その結果、予測精度は 72.5%であった(図6)。

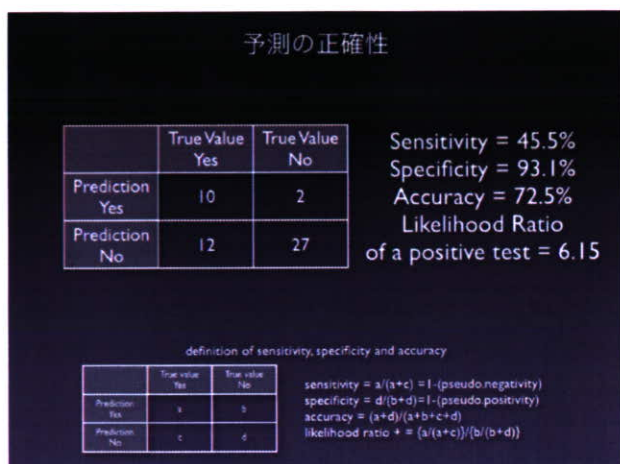


図6 肝障害予測精度の一覧

また、53 遺伝子を調べたところ、腎障害性薬物予測遺伝子セットと共通な遺伝子が 17 遺伝子見つかった。53 遺伝子から、一つの遺伝子で 2 個のプローブセットが分離されたケースが 5 遺伝子について見つかったため、その片方を除き、48 遺伝子に絞った。その後腎障害性薬物予測遺伝子セットを除いた 31 遺伝子と共通遺伝子 17 遺伝子の組み合わせを作成し、それぞれについて、パラメーターの設定と、予測出来る薬物の数を調べた。その結果、53 遺伝子と 48 遺伝子では変わらなかったが、31 遺伝子、17 遺伝子では Diagonal Scaling Factor の値は小さくなったが、予測精度は最初の 53 遺伝子よりも悪くなった(表2)。

表2 各遺伝子リストによる肝障害予測結果の比較

gene list	Diagonal Scaling factor	Kernel Function	number of prediction
53	70	polynomial Dot Product	37/51
48	40	polynomial Dot Product	37/51
31	15	polynomial Dot Product	31/51
17	10	polynomial Dot Product	24/51

D. 考察

今回、薬物を添付文書情報を基にして、肝障害のあり、なしに分類し、遺伝子発現変動の比較を行った。得られた RNA の品質を比較したところ、大きく基準値を外れるサンプルは無かった。training set を用いて、肝障害のありとなしを比較し、有意に発現変動のあった遺伝子を volcano plot を用いて抽出したところ、 $p=0.01$ の有意を持って 2 倍以上の発現変動をした遺伝子を 53 抽出する事が出来た。この中には、腎障害あり・なしで抽出された遺伝子と重複していたものが 17 遺伝子あり、さらに薬物障害で酸化ストレスを受けた時に活動が活発になると報告されている転写因子 NR2 のホモログが含まれていた。したがって、この 17 遺伝子は、障害の部位に係らず、細胞障害が起こる時に変動する遺伝子群ではないかと推測された。また残りの遺伝子に関しては、肝障害時にリンパ球系細胞で発現変動するものと考えられ、これらの遺伝子の中から肝障害特異的なマーカーとなりうる遺伝子が見出される可能性がある。

今回抽出された 53 遺伝子を用いて、training set により、肝障害の有無を最大限に予測出来るパラメーターを試したところ、Kernel Function を Polynomial Dot Product、Diagonal Scaling Factor を 70 にセットした時に最大となった。この設定を用いて、test set をブラインドで予測したところ、72.5%の精度となった。しかし、特異性が 93.1%と高かったのに比して、感受性が 45.5%と低かった点が、腎障害予測の結果と異なるところである。その原因の1つとして、Diagonal Scaling Factor の

値が腎障害予測時と比較して高かった事が考えられる。このパラメータは、それぞれの遺伝子発現をプロットして、肝障害のありなしで境界線を引いた時にどれほどの境界線の幅をもって許容するかという値であるが、この値が大きい場合には許容範囲が広がり、判別器としてのあいまいさが増えたことになる。また腎障害予測に test set として用いた時より薬物数が少なかったことも原因の一つとして考えられる。今後薬物曝露による遺伝子発現データの取得をさらに行い、より精度の高いデータセットと予測パラメータを構築する必要がある。

E. 結論

肝障害性薬物の予測アルゴリズムの構築を試みた結果、72.5%の精度で予測することが出来た。しかし、これは腎障害性薬物の精度 82%と比較すると、まだ低く、精度向上のためさらに遺伝子発現データを取得し、予測に適した training set の組み合わせを検討する必要がある。

F.健康危機情報

なし

G.研究発表

トキシコゲノミクス研究論文 0 報(下記)、学会発表 1 件(下記)特許申請 0 件

[学会]

BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会)「遺伝子発現比較による薬物腎障害予測への応用<トキシコゲノミクスからのアプローチ>(12月14日(金曜日)4P-1192 パシフィコ横浜 アネックスホール ポスター会場)

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

なし

健康危険情報

なし