

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

薬物誘発性肝障害患者のゲノム解析と
発症機構研究

平成 20 年度
総括研究報告書

主任研究者 鈴木 洋史

分担研究者 矢富 裕

分担研究者 後藤 順

分担研究者 吉田 晴彦

平成 21 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
薬剤誘発性肝障害患者のゲノム解析と発症機構研究	1
II. 添付資料	24
添付資料 1：イトラコナゾール誘発性 DILI に関する資料	24
添付資料 2：DILI 患者のゲノム解析に関する資料	32
添付資料 3：血中薬物濃度測定系に関する資料	37
添付資料 4：ヒポキサンチンによる肝障害改善作用に関する資料	38

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

研究課題：薬物誘発性肝障害患者のゲノム解析と発症機構研究
課題番号：H19-ゲノム一般-004

主任研究者：

○鈴木 洋史（東京大学医学部附属病院・薬剤部教授・部長）

分担研究者：

○矢富 裕（東京大学医学部附属病院・検査部教授・部長）

○後藤 順（東京大学医学部附属病院・神経内科・講師）

○吉田 晴彦（東京大学医学部附属病院・消化器内科・講師）

【研究要旨】

本研究は、東京大学医学部附属病院（以下当院）における薬物誘発性肝障害（DILI）発症症例を集積し、患者の臨床所見、薬物血中濃度、遺伝子変異を網羅的に解析することにより、原因薬剤やDILI発症に関わる遺伝的要因を解明するとともに、DILIの原因薬剤と疑われた薬剤を用いた、*in vivo*および*in vitro* 実験を実施することで、DILIの発症メカニズムを解明し、患者個人に対する適切な薬物治療法を提唱すること、そして創薬プロセスにおける肝毒性評価法を提案することを主たる目的として平成19年度より3年計画で実施されている。

平成20年度には平成19年度に引き続きDILI症例を集積するとともに、HLA遺伝子を中心とした遺伝子解析、並びに血清検体中の薬物濃度分析、メタボローム解析を実施した。遺伝子解析の結果、HLA-B遺伝子座に関し、一般集団ではほとんど検出されないHLA-B*2704 およびHLA-B*2705 が1例ずつ検出された。これらはいずれもHLA-B*27に分類される表現型を示すことから、DILI発症に影響を及ぼす可能性が考えられた。また、薬物濃度分析の結果、DILIの被疑薬としてリストアップされたイトラコナゾール（ITCZ）を対象とした検討の結果、ITCZが胆汁成分の分泌輸送担体を阻害し、胆汁うっ滞を誘発することを示唆する結果が得られ、ITCZによるDILI発症機構を解明することができた。また、DILI患者の血清検体を用いたメタボローム解析の結果、血清中ヒポキサンチン濃度が肝障害の進展に伴い減少することを見出し、さらにヒポキサンチンの肝障害治療薬としての応用に関して有望な結果を得た。

これらの結果を踏まえ、平成21年度には、DILI症例集積してさらに遺伝子解析を進め、臨床情報を蓄積し、データベース化を図る。また、ITCZを用いた検討結果を足掛かりとして、さらに研究を発展させ、DILI発症メカニズムの一端を解明するとともに、構築した実験系の肝毒性スクリーニング系としての有用性に関して検討を加える。さらに、本研究において見出したヒポキサンチンの肝障害治療薬としての可能性を詳細に検討する。これらの検討により、臨床的に問題となっているDILIに対し、①関連する遺伝的背景を解明することによるDILI発症リスクの低減、②肝毒性スクリーニング系を提案することによる安全性試験の高精度化、③DILI発症時の治療法の提案、という3つのアプローチから解決を図ることが可能となることが期待され、より安全な医療の実現や、より安全性の高い創薬の活性化につながるものと期待している。

A. 研究目的

全米の統計では、薬物の有害作用による死亡者は年間 10 万人超と、死因の第 4 位を占めており、医療上のみならず、医療経済学的にも大きな問題となっている。一般に薬物誘発性毒性は肝障害として現れることが多く、我々の所属する東京大学医学部附属病院（以下当院）においても、薬物誘発性肝障害（DILI）発症患者は、年間約 100 名程度と見積られるが、臨床の現場では治療が優先されるために、肝障害が生ずる傾向にあれば直ちに治療薬が変更され、再投与されることは実際にはない。従って、DILI であるかどうかの鑑別は難しく、原因薬も特定されないことが殆どである。薬物療法の安全性を確保する上でも、また後述のように、安全な医薬品を効率よく開発する上でも、DILI が惹起された患者の遺伝情報を解析し、どのような遺伝的背景が、どの薬物に対する障害性を増強させるのかに関する情報の蓄積が急務である。

本研究では、当院にて生じた DILI を中心とする薬剤性有害反応を対象とし、各患者の血中薬物濃度解析から原因薬を推定するとともに、網羅的な遺伝子解析を行う。そして、遺伝的要因と薬物性肝障害発症等の関係を明らかとし、データベース化することにより、有効かつ安全な薬物治療を目的とした個別化医療を実践する基盤を築くことを目的としている（図 1）。



図 1 薬物性肝障害データベースの概念図

構築されたデータベースは匿名化され、当院のみならず、他院にても使用可能であり、あまねく国民の福祉向上に貢献できるものとなることが期待される。併せて、原因と推定される薬物については、*in vitro* 実験や動物実験を実施し、毒性発現の機構を探るとともに、現在の創薬のプロセスの肝毒性評価基準が妥当なものであるかを検証することも目的としている（図 2）。



図 2 本研究の全体像

研究の 2 年度目である平成 20 年度は、平成 19 年度に整備した、DILI 発症症例を効率的に抽出するための症

例報告システムに基づき、DILI 症例の集積を継続するとともに、集積された DILI 患者検体を対象として薬物血中濃度測定・遺伝子解析を実施した。また、慶應義塾大学先端生命科学研究所・曾我朋義教授の協力の下、DILI 患者検体のメタボローム解析も実施した。

さらに、以上の臨床検体の解析により得られたデータを基に実施した基礎研究から、DILI の発症メカニズムの解明や治療法の開発につながる新規知見を得た。

B. 研究方法

1) DILI 症例を含む薬剤副作用症例の収集

平成 19 年度に、分担研究者・吉田晴彦講師（当院消化器内科）の協力を得て、消化器内科のコンサルテーション記録検索に基づく症例収集システムを構築した。また、分担研究者・矢富裕教授（当院検査部）の協力のもと、同意取得を行った DILI 発症患者の入手可能な残余検体をすべて回収するための枠組みを構築した（図 3）。

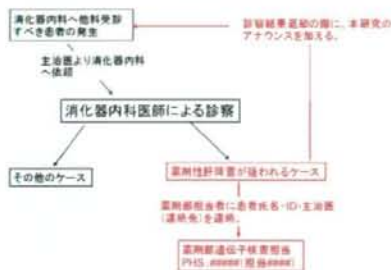


図 3 消化器内科のコンサルトを利用した DILI 報告システムの概要

平成 20 年度には、上述のシステムに基づき、DILI 症例の収集を実施する一方、癌分子標的薬のように副作用頻度の高い薬剤を服用している患者症例を効率的に収集するため、呼吸器内科、呼吸器外科、皮膚科、肝胆膵外科などに直接働きかけ、症例収集を開始した。

2) DILI 症例および薬剤副作用症例のゲノム解析

DILI の発症メカニズムには、薬物の代謝活性化が重要な役割を担うとの仮説が一般に受け入れられている。

そこで、本研究ではまず、分担研究者・後藤順講師（当院神経内科）の協力のもと、収集した患者検体から、DILI 症例 24 症例、薬剤性脳症疑い症例 2 症例、およびチロシンキナーゼ阻害薬による有害作用発症症例 3 症例、薬剤性皮膚障害疑い症例 1 症例を対象として DNA チップ（affymetrix 社製 DMET Plus）を用いた薬物動態関連遺伝子の既知 SNPs の網羅的解析を実施した。なお、検出には平成 19 年度にアップグレードを完了した affymetrix 社製の GeneChipScanner 3000TG を用いた。

一方、体質特異的な副作用の発症には、抗原提示に関わるヒト白血球抗原（HLA）遺伝子群、特に細胞障害性 T 細胞への抗原提示に関わる HLA-A, B, C といったヒト主要組織適合遺伝子複合体クラス I（MHC-I）遺伝子群が重要との報告も多い。そこで、湧永製薬株式会社バイオ事業開発部・松下正毅研究員の協力を得て、収集した患者検体から、DILI 症例 24 症例、薬剤性脳症疑い症例 2 症例、およびチロシンキナーゼ阻害薬による有害作用発症症例 3 症例、薬剤性皮膚障害疑い症例 1 症例を対象に、HLA-A, B, C 遺伝子座（MHC クラス I）および DQ, DP, DR 遺伝子座（MHC クラス II）の遺伝子解析を実施した。

3) 血清中薬物濃度定量系の構築

平成 19 年度に引き続き、賃貸借している LC-MS/MS を用いて、DILI の被疑薬の血清中濃度定量系の構築を行った。

基本的にはアセトニトリルを用いた除蛋白法により前処理を行った血清を測定対象とするが、一部検出感度の面から、測定困難な薬物においては、減圧乾燥器を用いた濃縮などを試みた。

4) DILI 症例患者の血清検体を用いたメタボローム解析

近年、血清中の内因性小分子代謝産物を一斉に分析するいわゆるメタボローム解析が、疾患のバイオマーカー発見や原因の解明において目覚ましい成果を上げている。本研究で特に着目している DILI に関しても、ラットを用いた検討において、アセトアミノフェン誘発性肝障害ではオフタルミン酸という物質の血清中濃度が著しく上昇することが示されている。

そこで、本研究においては、DILI の発症から回復に至る経時的な血清サンプルが保管されている症例が多いことを利用し、それらの検体のメタボローム解析を実施した。

血清検体に適切な内部標準物質を添加し、さらにクロロホルムを加えて除蛋白した後に減圧乾燥した。乾燥したサンプルを超純水に再溶解後、慶應義塾大学先端生命科学研究所・曾我朋義教授が開発したキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS/MS) を用

いて分析を行った (図 4)。なお、本研究で用いている CE-MS/MS 法により約 400 種類に上る化合物の分離同定が可能である。

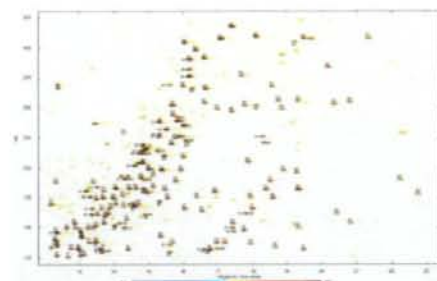
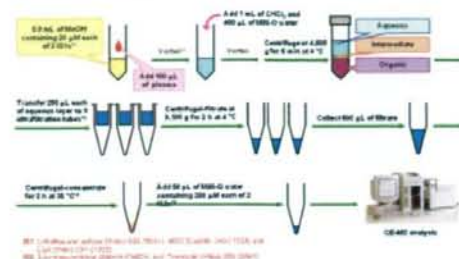


図 4 (上) ヒト血清サンプルの前処理手順 (下) メタボローム解析結果の一例

5) イトラコナゾール誘発性 DILI の
発症メカニズムに関する基礎研究

平成 19 年度から継続している DILI 発症患者の服用薬剤の解析結果、3 症例において抗真菌剤であるイトラコナゾール (ITCZ) が DILI の原因薬として強く疑われた。また、その内の 2 症例における ITCZ のトラフ濃度は 1,500~2,000ng/mL であり、また、肝機能マーカーの中で ALP 値およびビリルビン値が上昇していることから、これらの症例では胆汁うっ滞が起こっていることが示唆された (添付資料 1-1~3)。両患者の ITCZ 服用量は 200mg/日であったが、この濃度は一般的な血中濃度推移と比較して数倍程度の高値であった (添付資料 1-4)。これらの臨床情報から、ITCZ 誘発性 DILI 発症メカニズムの少なくとも一部は ITCZ が濃度依存的に胆汁分泌を阻害することによる、との仮説を立て、以下の検討を実施した。

a) ラットに、ITCZ を定速静注し、胆汁流量、並びに胆汁中の胆汁酸およびリン脂質の濃度を経時的に測定した (添付資料 1-5)。

b) 胆汁への胆汁酸およびリン脂質の排泄に重要な役割を担うトランスポーターである BSEP、ABCB4、の発現系を構築し、これらトランスポーターの機能に対する ITCZ の影響を検討した (添付資料 1-7)。

6) ヒポキサンチンによる肝障害治療
効果に関する基礎的研究

3) に述べたメタボローム解析の結果、肝障害の進展と共に血清中ヒポキサンチン濃度が低下する傾向を見出した (結果の項に詳述)。また同一症例内で肝障害の発症から治癒までを経時的に追跡した結果、ヒポキサンチン濃度は ALT 値上昇に並行して低下し、ALT 値の正常化に先行して回復する傾向が認められた。血清中のヒポキサンチンは肝臓由来とされているが、この結果は、肝障害発症時は肝臓内ヒポキサンチン濃度が低下していることを示唆すると考えられた。そこで、肝障害発症時にヒポキサンチンを外因性に補充することで、肝障害の進行を抑制できると仮説を立て、以下の検討を実施した。

a) 典型的な肝障害モデルである α -naphthyl isothiocyanate (ANIT) および Carbon tetrachloride (CCl_4) 投与ラットを用いた検討を実施した。すなわち、ANIT (50mg/kg) あるいは CCl_4 (25 μ L/kg) を単独、またはヒポキサンチンあるいは関連物質であるイノシン (2.5mg/kg を 6hr 毎に 5 回) と共に投与した。薬物投与後 48hr での血清中 ALT 値およびビリルビン値を測定した。また、同様の検討をプリン誘導体であるアデノシン、アデニン、グアノシン、グアニン (2.5mg/kg を 6hr 毎に 5 回) についても実施した。

b) ヒポキサンチンは、図 5 に示すよ

うにキサンチンオキシダーゼ (XO) およびヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) によりそれぞれキサンチンおよびイノシンモノリン酸 (IMP) に代謝されることが知られている。ヒポキサンチンに認められた肝障害改善作用は、ヒポキサンチンの直接作用であるか、代謝物を介した間接作用であるかを明らかにするため、a)で述べた実験系に XO 阻害剤であるアロプリノールあるいは HGPRT 阻害剤である 6-メルカプトプリンを併用した際の血清中 ALT 値、ビリルビン値の変動を検討した。

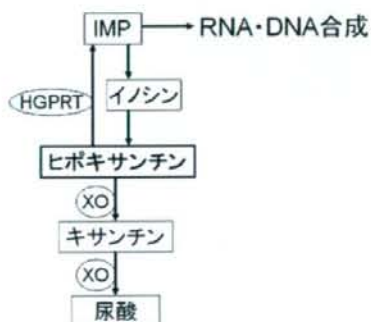


図5 ヒポキサンチンの代謝経路

(研究の倫理的側面への配慮)

臨床研究の実施にあたっては、厚生労働・文部科学・経済産業省合同の「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した。下記の項目の倫理的配慮を適切に行うため、研究計画書および患者説明文書を作成し、東京大学医学部のヒトゲノム・遺伝子解析

研究倫理審査委員会の承認を受け、研究を進めた。

- 遺伝子試料は匿名化し、個人情報を個人が特定できる形で研究機関の外部に持ち出すことを禁止した。
- 文書にて研究の目的および方法を十分に説明し了解を得た後、提供者の自由意思に基づき書面によるインフォームド・コンセントを得て試料の提供を受けた。
- 必要に応じて遺伝子カウンセリングの体制を構築した。

また、動物実験の実施にあたっては、東京大学医学部動物実験委員会によりプロトコールの承認を受けたうえで、東京大学医学部動物実験指針を遵守して研究を進めた。

C. 研究結果

1) DILI 症例を含む薬剤副作用症例の収集

本研究開始から現在までに図#に示すシステムにより DILI 症例 25 症例を集積した。本システムにより集積された症例は、1) 専門医の診断を基に DILI 症例を抽出することから、従来単に GOT、GPT といった肝機能マーカー変動を基準とした症例抽出と比較して、診断の正確性が高いと期待されること、2) DILI 発症時から最大 3 週間分の同一患者の血清検体が回収可能であるため、DILI 発症に至る過程での薬物血中濃度やその他のバイオマーカーの変動を解析することが可能である、などの点から、過去に類を見ないものである。また、後述する基礎的研究はすべて、この特徴を最大限に活用した結果、得られたものであると考えている。

一方、DILI 以外の副作用としては、薬剤性脳症疑い症例 2 症例、薬剤性皮膚障害疑い 1 症例を収集した。また、本年度より、チロシンキナーゼ阻害薬（癌分子標的薬）による副作用症例を、呼吸器内科・胸部外科との共同で収集を開始し、13 症例より同意を取得済である。

2) DILI 症例および薬剤副作用症例のゲノム解析

分担研究者・後藤順講師（神経内科）の協力のもと、DILI 症例 24 症例、薬剤性脳症疑い症例 2 症例、およびチロシンキナーゼ阻害薬による有害作用

発症症例 3 症例、薬剤性皮膚障害疑い症例 1 症例を対象として実施した、DMET Plus を用いた薬物動態関連遺伝子の既知 SNPs の網羅的解析では、ほとんどの症例において、SNPs 判定の call rate（正確に判定が可能な SNPs の割合）は 98% 以上であり、良好な SNPs 判定が可能であった。添付資料 2-1 には、実際に判定を行った 225 遺伝子（1932 SNPs）を示した。また、判定した SNPs の中から、機能的に特に重要なものを選択し、その頻度を添付資料 2-2 に示した。遺伝子変異の頻度には、コントロール群と明確な差は認められなかった。

一方、DILI 症例 24 症例、薬剤性脳症疑い症例 2 症例、およびチロシンキナーゼ阻害薬による有害作用発症症例 3 症例、薬剤性皮膚障害疑い症例 1 症例を対象に実施した、HLA-A, B, C 遺伝子座 (MHC クラス I) および DQ, DP, DR 遺伝子座 (MHC クラス II) の遺伝子解析結果を添付資料 2-3a, b にまとめた。注目すべき点として、DILI 症例 24 症例の解析において、一般的な日本人集団にはきわめて稀である HLA-B*2704、*2705 および *5504 が 1 症例ずつ検出されている点が挙げられる。

3) 血清中薬物濃度測定系の構築

本研究において賃貸借している Waters 社製 Quattro Premium XE システムを用いて、血清中薬物濃度測定系の構築を昨年度に引き続き実施した。研究協力者・樋坂章博特任准教

授のリーダーシップの下、前処理法、使用カラム、検出条件などを最適化し、現在までに添付資料 3 に示す約 90 種類の薬剤について血清中濃度測定が可能となった。なお、平成 19 年度時点で測定可能であった薬剤は約 30 種類である。本年度は、減圧乾燥器 (SpeedVac) を用いた検体の濃縮に加え、Waters 社製の Xbridge-HILIC カラムが使用可能となったことにより、比較的低濃度の薬物および水溶性が高い薬物の測定が実施可能となったことが大きな進歩であると考えている。

4) DILI 症例患者の血清検体を用いたメタボローム解析

DILI 症例患者を対象としたメタボローム解析の結果、肝障害の進行に伴い、特徴的な変動を示した小分子代謝物の血清中濃度と、肝障害の重症度の関係を図 6,7 に示す。

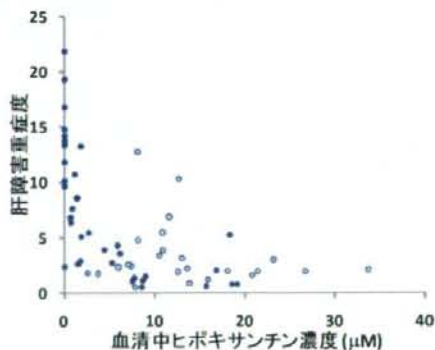


図 6 肝障害重症度と血清中ヒポキサンチン濃度の関係

なお、肝障害重症度とは、ALT 値、AST 値、ALP 値および γ -GTP 値の正

常上限値との比率の中で最も高値な値を意味する。図 6 に示すように、バラつきは大きいものの、肝障害の重症化に伴い、血清中ヒポキサンチン濃度は低下する傾向が認められた。

一方で、ヒポキサンチンとは逆に、肝障害時には、血清中のオフタルミン酸関連物質 (特許申請の都合上、具体的な物質名は伏せる) の濃度が上昇する傾向にあることが明らかとなった (図 7)。

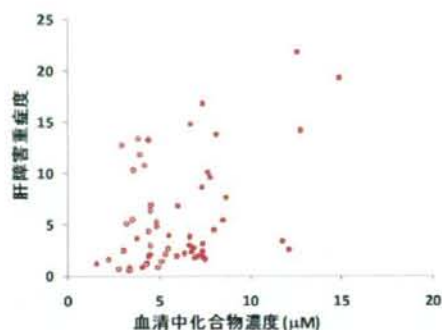


図 7 肝障害重症度とオフタルミン酸関連物質の濃度の関係

マウスを用いた検討で、オフタルミン酸は酸化ストレスがかかった場合に血清中濃度が上昇することが示されていることから、この結果は、ヒトにおいても、DILI 発症時に肝臓に何らかの形で酸化ストレスがかかっていることを示唆するものと考えている。

5) イトラコナゾール誘発性 DILI の発症メカニズムに関する基礎研究
動物実験における ITCZ 投与量は、ITCZ 誘発性 DILI が疑われた 2 症例において観察された ITCZ のトラフ濃度 (1,500~2,000ng/mL) を基に算出したピーク濃度 (7,000 ~ 8,000ng/mL) を保つことを目標として設定した。

ラットに ITCZ を初回負荷量として 43mg/kg で投与し、その後 7.3mg/kg/hr で持続点滴を行うことで、定常状態 ITCZ 濃度は 7,700ng/mL となった (添付資料 1-5)。ITCZ 投与下で、胆汁流量を測定したところ、胆汁流量はコントロール群の約 40%まで低下した。一方、胆汁組成に関しても検討したところ、胆汁酸排泄量に比較して、リン脂質排泄量の方が ITCZ 投与により顕著に低下することが明らかとなった (添付資料 1-6)。

これらの結果は、ITCZ が、胆汁生成・分泌に関わるトランスポーターの内、リン脂質の排泄に関わるトランスポーターである ABCB4 を主に阻害することを示唆するものと考えられた。そこで、ABCB4 (MDR3) を強制発現させた LLC-PK1 細胞を用いて、*in vitro* リン脂質輸送測定系を構築し、ITCZ の影響を検討したところ、*in vivo* 実験において観察された ITCZ 濃度範囲において、ITCZ は MDR3 によるリン脂質の排出を阻害することが示された (添付資料 1-7,8)。一方、胆汁中への胆汁酸の排泄に関わる BSEP および NTCP を共発現させた

LLC-PK1 細胞を用いて、*in vitro* 胆汁酸輸送測定系を構築し、同様に ITCZ による阻害を検討したところ、胆汁酸輸送に対する ITCZ の阻害作用は弱いことが示された。

6) ヒポキサンチンによる肝障害治療効果に関する基礎的研究

ANIT あるいは CCl₄ の投与により、ラットにおいて肝障害を誘発することが可能であった。肝機能マーカーの変動から、CCl₄ 投与ラットでは肝細胞障害型の、ANIT 投与ラットでは胆汁うっ滞型の肝障害が発症していることが示唆された。またいずれの肝障害モデルラットにおいてもヒポキサンチンおよびイノシンの血清中濃度低下が認められ、DILI 症例患者の血清検体で認められたヒポキサンチン濃度の低下も再現できているものと考えられた (添付資料 4-1)。

ANIT 投与時にヒポキサンチンあるいはイノシンを併用したラットでは、コントロール群に比べ、ALT 値ならびにビリルビン値の上昇は大幅に抑制され、ANIT 投与後 48hr における ALT 値およびビリルビン値はほぼ ANIT 投与前と同じレベルであった (添付資料 4-2)。一方、CCl₄ 投与ラットにおいては、ヒポキサンチンは血清 ALT 値上昇を一部抑制したが、イノシンでは血清 ALT 値上昇の有意な抑制作用は認められなかった (添付資料 4-3)。なお、グアニン、グアノシン、アデニン、アデノシンを併用したラットにおいては、ヒポキサンチンおよび

イノシンに認められたような肝障害改善作用は認められなかった。

次に、ヒポキサンチンが肝障害改善作用を発揮するメカニズムを明らかにするため、ヒポキサンチンの代謝に関与する酵素（XO および HGPRT）の阻害剤であるアロプリノールおよび6-メルカプトプリンが、ヒポキサンチンの肝障害改善作用に与える影響を、ANIT 誘発肝障害ラットを用いて検討した。まず、XO の阻害剤であるアロプリノールを併用した実験においては、アロプリノール+ヒポキサンチン投与群とヒポキサンチン投与群ではほぼ同程度の肝障害改善作用を示した。また、ヒポキサンチンは XO により代謝されキサンチンとなるが、キサンチン投与では肝障害改善作用は認められなかった（参考資料 4-3）。

一方、ヒポキサンチンのもう一つの代謝経路である HGPRT を介したイノシンモノリン酸に異化される過程がヒポキサンチンの肝障害改善作用の発揮に関与する可能性を検証する目的で、HGPRT 阻害剤である 6-メルカプトプリンを併用した際の影響をアロプリノールと同様、ANIT 誘発肝障害ラットを用いて検証した。その結果、HGPRT の併用によりヒポキサンチンの肝障害改善作用は減弱することが明らかとなった（添付資料 4-3）。

D. 考察

1) DILI 症例を含む薬剤副作用症例の収集

平成 20 年度は、平成 19 年度に構築した DILI 症例の効率的な収集システムに基づき、症例集積を継続した。現在までに集積された DILI 症例は 25 症例と予測に比して少数であるものの、結果の項に述べたように、非常に診断精度が高く、また、DILI の進展に沿った経時的な血清サンプルが得られており、ITCZ による肝障害発症メカニズムの解明や、ヒポキサンチンによる肝障害改善作用の発見といった、きわめて重要な知見を得るための重要な臨床データとなった。しかしながら、次項に述べるように、ゲノム解析により明確な結論を得るためには、症例数が不足していることは否めず、平成 21 年度以降には、より効率的に DILI 症例をリクルートするシステムを構築する必要があると考えられた。これまでのコンサルト歴の調査では、チクロピジン、ポリコナゾールといった肝障害発症頻度の高いと思われる薬剤によるものと鑑別された症例はごく少数であった。おそらく、実臨床においては、専門医でなければ鑑別が困難な症例のみが消化器内にコンサルトされており、たとえばポリコナゾールやチクロピジン、ボセンタンなど DILI 発症のスクが高いことがよく知られている薬剤使用には、専門医でなくとも鑑別は可能であることから、敢えて消化器内科へのコンサルトは行わないものと思われる。こういった潜

在的な DILI 症例もリクルートするため、院内セミナーを開催して医師への周知を図る予定である。

一方、DILI 以外の副作用症例については、呼吸器内科・胸部外科の協力もあり、現時点で分子標的薬服用患者を中心に 16 症例を収集し、今後さらに皮膚科からも DIES (Drug induced epidermal syndrome) 発症患者が紹介される予定であり、順調に進行していると考えている。

2) DILI 症例および薬剤副作用症例のゲノム解析

今回の DMET Plus を用いた薬物動態関連遺伝子の網羅的 SNPs 解析の結果、主要な薬物代謝酵素、薬物トランスポーターに関しては、DILI を含めた薬物副作用発症患者群と報告されている日本人一般集団との間で SNPs 頻度に明確な差は認められなかった。特に、GSTM1 および GSTT1 に関しては、トログリタゾン誘発性 DILI との関連が指摘されて以来、アルコール性肝障害、カルバマゼピン誘発性 DILI 等との関連性が報告されており、肝障害発症にある程度一般的に関与する可能性があると考えられたが、今回の検討の結果からは、GSTM1 および GSTT1 の欠損のみでは、一般的な DILI の発症を説明できないことが示唆された。

一方、HLA の解析においては、添付資料 2-3a,b に示すように、DILI 患者症例 24 例の解析で、HLA-B*2704、*2405 および *5504 が 1 例ずつ検出さ

れた。特に、HLA-B*2704 および *2705 は過去の研究においても日本人健康人集団にはほとんど見出されておらず、軸策硬化症といった特殊な疾患においてのみ認められることが報告されている。なお、*2704 および *2705 が検出された患者カルテにはこのような疾患の記録は認められなかった。従って、本研究で集積された DILI 症例 24 例の中に *2704 および *2705 が見出されたことは、これらの HLA はプロタイプが DILI 発症に関与していることを示唆している可能性があると考えられる。実際、HLA-B*27 はプロタイプは、欧米人において HIV 感染から AIDS 発症までの期間が長い患者や、ベーチェット病の重症症例に多く認められることが報告されており、免疫系に影響を与えている可能性が考えられる。従って、HLA-B*27 ハプロタイプを有することで、薬剤に対する免疫反応が変化し、DILI 発症のリスクが上昇することは十分に想定される仮説であると考えている。今後は、HLA-B*27 がどのように免疫応答性を変化させるかを解明していく必要があると考えられる。

3) 血清中薬物濃度測定系の構築

減圧乾燥機 (SpeedVac) による濃縮や X-bridge HILIC カラムの使用などにより、添付資料 3 に示すように 90 種類もの薬剤が測定可能となった。特に X-bridge HILIC カラムは通常の ODS カラムとはほぼ正反対の分離特性を示し、本カラムの導入により核酸

系薬物や水溶性の抗生物質を有機溶媒の割合が高い移動相で溶出させることが可能となり、検出感度が大幅に向上した。今後は速やかに、未分析の臨床検体の測定に移る予定である。

4) DILI 症例患者の血清検体を用いたメタボローム解析

DILI 患者の血清検体のメタボローム解析の結果、DILI 発症時には多くの症例で血清中のオフタルミン酸関連物質の濃度が上昇していることが示された。オフタルミン酸関連物質の濃度上昇と、DILI の被疑薬の化学構造や、DDW-J2004 による薬物性肝障害分類による DILI の分類型との関連性は認められなかった。マウスを用いた検討において、オフタルミン酸は肝臓に酸化ストレスがかかった場合に上昇することが示されていることから、これらの結果は、ヒトにおける DILI においては、ある程度一般的に、肝臓への酸化ストレスが発生していることを示唆するものと考えられた。一方、今回のメタボローム解析の結果得られたもう一つの重要な発見は、DILI 進展に伴うヒポキサンチン濃度の変動であった。この発見は後述する、DILI の新規治療法の開発に関わる基礎的研究を着想するに至る重要な臨床的知見となった。

5) イトラコナゾール誘発性 DILI の発症メカニズムに関する基礎研究
 ITCZ 誘発性 DILI 患者において ITCZ トラフ濃度が一般的な日本人平均値より数倍程度高値 (1,500 ~ 2,000ng/mL) であったことから、本研究においては、ラットを用いて、トラフ値より推定される ITCZ のピーク濃度 (7,700ng/mL) を持続させた場合の胆汁分泌の変化を検討した。ラット *in vivo* おいて認められた胆汁流量の低下および、リン脂質の胆汁分泌の低下のメカニズムの少なくとも一部は、ITCZ による MDR3 を介したリン脂質の分泌阻害で説明可能であることが、*in vitro* のトランスポーター発現系を用いた検討により示された。本研究の結果より示唆される ITCZ の肝障害発現メカニズムを図 8 に示す。

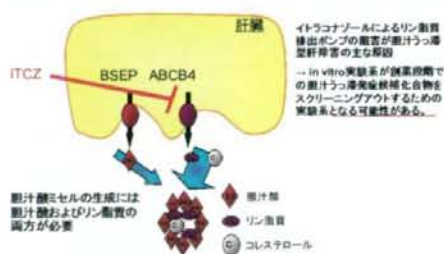


図 8 本研究から推定された ITCZ による肝障害の発症メカニズム

今回の検討においては、予測されるピーク濃度を維持した場合の影響のみを検討しているため、今後は、より低濃度で同様の MDR3 阻害作用が認められるかを検討する必要があると考えている。また、ITCZ による MDR3 の阻害様式が可逆的なものか、非可逆

的なものかは明らかでないが、もし非可逆的なものであれば、一時的に高濃度の ITCZ にさらされるだけで、持続的な胆汁分泌の低下を引き起こす可能性が考えられ、今回の臨床症例を説明することが可能となると考えられる。

更なる検討は必要であるが、本研究で用いた胆汁酸およびリン脂質の輸送評価系は、新薬開発時のリード化合物の胆汁うっ滞リスクの評価に有用であると考えられた。

6) ヒポキサンチンによる肝障害治療効果に関する基礎的研究

本研究で実施したメタボローム解析の結果、ヒトにおいては DILI の進展に伴い、血清中ヒポキサンチン濃度が低下する傾向が認められた、血清中のヒポキサンチン、イノシンの大部分は肝細胞由来であるため、血清中濃度低下は肝細胞内プールの枯渇を示していると考えられる。そこで、これらの化合物を外部から補うことで、肝障害の進展を抑制することができる可能性を想定して検討を行った。その結果、ANIT 誘発肝障害に対して、ヒポキサンチンおよびイノシンは強力な抑制作用を示した。また、 CCl_4 誘発性肝障害に対してもヒポキサンチンは効果は弱いものの、有意な抑制効果を示した。一方、同時に検討したグアニン、グアノシン、アデニン、アデノシンにおいては肝障害改善作用は認められなかったことから、これらの作用はヒポキサンチンおよびイノシンに

特異的に認められるものと考えられた。文献的にはANITは胆汁うっ滞を引き起こし、 CCl_4 は肝細胞障害を引き起こすことが知られていることから、これらの結果は、肝障害のタイプに関わらず、ヒポキサンチンは肝障害抑制作用を有することを示唆していると考えられる。なお、 CCl_4 誘発性肝障害に対してヒポキサンチンおよびイノシンの肝障害抑制効果が弱かった原因としては、 CCl_4 による肝障害が極めて重度であり、ヒポキサンチンおよびイノシンでは完全に抑制できなかった可能性が考えられる。実際 ANIT (50mg/kg) 投与群では 48hr 後の ALT 値は 800IU/L 程度であるが、 CCl_4 (25 μ L/kg) 投与群では 2,400IU/L に達しており、 CCl_4 投与群ではより重篤な肝障害が起きていると考えられる。今後は、 CCl_4 の投与量を減量し、ANIT (50mg/kg) 投与群と同程度の ALT 値上昇を示す投与量で同様の実験を実施する必要があると考えている。

上述の検討で明らかとなったヒポキサンチンあるいはイノシンによる肝障害改善効果がヒポキサンチンの直接作用であるのか、もしくはその代謝物による間接作用であるのかを検討する目的でヒポキサンチンの代謝経路阻害実験を行った。ヒポキサンチンは XO によりキサンチンに、HGPRT によりイノシンモノリン酸 (IMP) に代謝されることが知られており、本検討では XO 阻害剤としてアロプリノール、HGPRT 阻害剤として

6-メルカプトプリンを用いた。検討の結果、アロプリノール併用時でもヒポキサンチンの効果は認められた一方で、6-メルカプトプリン併用時では改善効果が消失したことから、ヒポキサンチンが肝障害改善効果を発揮するには HGPRT による IMP 酸への代謝過程が重要であることが明らかとなった。また、アロプリノール単独投与においても肝障害改善作用が認められているが、これは、アロプリノールが XO を阻害することで、内因性ヒポキサンチンのキサンチンへの代謝が阻害された結果、相対的にヒポキサンチンが IMP へ代謝される割合が増大したことによると考えられる。

IMP は、DNA 合成に必要なプリン塩基 (AMP および GMP) の重要な前駆物質であり、ことから、ヒポキサンチンの肝障害改善作用としては、肝細胞内 IMP 濃度を上昇させることにより RNA およびタンパク質合成が亢進し、障害された細胞期間修復が効率的に進行することが寄与していると考えられた (図 9)。

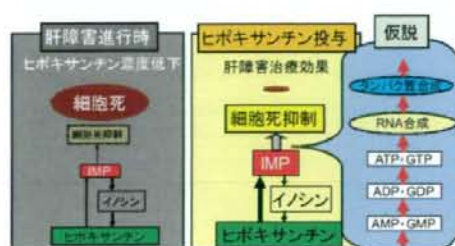


図9 ヒポキサンチンによる肝障害改善作用の発現メカニズムの仮説

本仮説を実証するためには、放射性同位体標識ヒポキサンチンを投与した後に肝細胞に RNA として取り込まれた放射活性を測定するなど実験を実施する必要があると考えている。

今後、より詳細なメカニズムの検証が必要ではあるが、これらの結果はヒポキサンチンあるいはイノシンが DILI の治療薬として有望であることを示唆していると考えられる。

7) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義および今後の展開

本研究の最も特徴的な点は、DILI 発症患者の遺伝子解析を行うと同時に、DILI 発症前後の血清検体も収集し、薬物血中濃度測定およびメタボローム解析を実施する点である。すなわち遺伝学的な視点に限らず、薬物動態学的視点、メタボローム解析の観点からも、DILI の発症機構解明に迫ろうとする点に学術的な特色を見出すことができる。このような研究は国際的にもほとんど行われておらず、本研究により得られる知見の学術的・国際的意義は極めて高いものと確信している。事実、上述の ITCZ 誘発性 DILI の発症メカニズムの解析や、ヒポキサンチンおよびイノシンによる肝障害改善作用の発見は、国際的に見ても類を見ない独創的な研究成果であるが、本研究において、DILI の発症から回復に至る経時的な血清検体の収集が可能であったからこそ達成可能であったと確信している。

一方で、ゲノム解析研究に関しては、

DILI 患者において、日本人での発現頻度の極めて低い HLA-B*27 が 24 例中 2 例について検出され、当該遺伝子型と DILI の関連性が示唆されるなど興味深い知見も得られ始めている。

平成 20 年度には、上述のように、DILI の発症メカニズムの解明、および DILI の治療法の提案、という観点から、当初の予測を上回る実験結果が得られている。一方、ゲノム解析に関しては、重要な知見が得られつつあるものの、症例数が少ない事実は否めない。

このような状況を踏まえ、平成 21 年度には、DILI 症例の収集の更なる効率化を図り、少なくとも 100 症例程度を目標として DILI 症例のリクルートを進める予定である。遺伝子解析については、現在行っている DMET Plus を用いた薬物動態関連遺伝子の網羅的解析および HLA 遺伝子座の解析といった対象遺伝子がある程度絞り込んだアプローチに加え、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) によるより広範な遺伝子の関与の解析も検討している。一方、順調に検討が進んでいる ITCZ 誘発性 DILI のメカニズム解析およびヒポキサンチンによる肝障害改善効果の検討については、さらに詳細な検討を行い、より強固な結論を導く予定である。

さらに、現在症例が集まりつつある DILI 以外の副作用症例に関しても、DILI 症例と同様の遺伝子解析、血清中薬物濃度分析ならびにメタボローム解析を実施していく予定である。

E. 結論

平成 20 年度には、DILI 患者から得られた血清検体を対象とした薬物濃度分析並びにメタボローム解析から得られた結果を基に基礎的検討を重ね、①ITCZ 誘発性 DILI の発症メカニズムの一部を解明し、*in vitro* 胆汁酸輸送およびリン脂質輸送評価系が、創薬における肝障害のリスク評価に応用し得ることを示し、②ヒポキサンチンおよびイノシンが DILI の治療薬として有望であることを肝障害モデルラットを用いて示すなど、臨床的な観点からも極めて重要な知見を得ることができた。また、ゲノム解析の結果、日本人においては極めて稀な HLA-B*27 が DILI 患者群に 2 症例見出されるなど興味深い知見も得られている。これらの知見が得られたことから、図 10 に示すように、臨床的に問題となっている DILI に対し、①関連する遺伝的背景を解明することによる DILI 発症リスクの低減、②肝毒性スクリーニング系を提案することによる安全性試験の高精度化、③DILI 発症時の治療法の提案、という 3 つのアプローチから解決を図る戦略が描けてきたことが平成 20 年度の研究成果である。

平成 21 年度には、さらに DILI も含めた薬剤副作用症例の収集に努めるとともに、得られた臨床データに基づいた基礎研究を充実させる必要があると考えられる。



図 10 DILI を克服するための 3 方向からのアプローチ

F. 健康危険情報

該当ありません。

G. 研究発表

主任研究者：鈴木洋史

以下には 2008 年度に出版された、または 2009 年に出版される予定の論文のリスト、および 2008 年度に行った学会発表のリストを示す。

【原著論文】

1. Kozawa M, Honma M, Suzuki H. Quantitative prediction of *in vivo* profiles of CYP3A4 induction in humans from *in vitro* results with reporter gene assay. Drug Metab Dispos 2009 in press.
2. Minami S, Ito K, Honma M, Ikebuchi Y, Anzai N, Kanai Y, Nishida T, Tsukita S, Sekine S, Horie T, Suzuki H. Posttranslational regulation of Abcc2 expression by SUMOylation system. Am J

Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009; 296: G406-413.

3. Koh S, Takada T, Kuku I, Suzuki H. FIC1-mediated stimulation of FXR activity is decreased with PFIC1 mutations in HepG2 cells. *J Gastroenterol* 2009. In press.
4. Kobayashi K, Ito K, Takada T, Sugiyama Y, Suzuki H. Functional analysis of nonsynonymous single nucleotide polymorphism type ATP-binding cassette transmembrane transporter subfamily C member 3. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18: 823-833.

【総説・著書】

1. Takada T, Suzuki H. Mechanisms of regulation of bile acid transport in the small intestine. "Bile Acid Biology and Therapeutic Actions" (edited by D. Keppler, U. Beuers, A. Stiehl and M. Trauner, Springer 社) 2009 in press.
2. 大野能之, 樋坂章博, 鈴木洋史. 添付文書+α の処方支援: 薬物間相互作用の危険性を見逃さないために (1) CYP の阻害による相互作用の予測. *月刊薬事* 2009 inpress.
3. 高田龍平, 鈴木洋史. NPC1L1・ABCG5/ABCG8 によるコレステロール輸送と創薬. *最新創薬学* 2009 (株式会社メディカルドゥ) 2009: 231-236.
4. 伊藤晃成, 鈴木洋史. 薬物動態関連トランスポーターと ERM タンパク質. *最新創薬学* 2009 (株式会社メディカルドゥ) 2009: 83-88.
5. 高田龍平, 鈴木洋史. 消化管コレステロールトランスポーター NPC1L1 と高脂血症治療薬. *膜* 2008年5月; 33: 88-93.
6. 樋坂章博, 鈴木洋史. ポピュレーション・ファーマコキネティクス. *分子薬物動態学* 2008; 第15章.
7. 山本武人, 鈴木洋史. *Pharmacogenomics* と小児医療. *小児内科* 2008; 40: 18-23.

【学会発表】

1. 千葉厚, 本間雅, 山本武人, 鈴木洋史. 薬物性肝障害に対する治療法の検討. 日本薬学会第129年会 2009年3月26日~28日; 京都.
2. 小沢政成, 本間雅, 徳田篤志, 鈴木洋史. In vitro 抗癌剤毒性試験からの in vivo 末梢 CD4+T 細胞数減少の定量的予測. 日本薬学会第129年会 2009年3月26日~28日; 京都.
3. 佐々木優, 樋坂章博, 鈴木洋史. ヒトシトクロム P450 酵素の LC-MS/MS による一斉定量分析法の開発. 日本薬学会第129年会 2009年3月26日~28日; 京都.
4. 高田龍平, 鈴木洋史. コレステロールトランスポーターNPC1L1 による胆汁中への蛋白分泌制御. 日本薬学会第129年会 2009年3月26日~28日; 京都.
5. 吉門崇, 高田龍平, 山本武人, 山道寛子, 伊藤晃成, 三田智文, 鈴木洋史. イトラコナゾールによる胆汁脂質輸送体阻害の検討. 日本薬学会第