

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 21 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 22 年 5 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	23
添付資料 1: DILI 患者のサマリーに関する資料	23
添付資料 2: DILI 患者の遺伝子解析結果に関する資料	25
添付資料 3: DILI 患者のメタボローム解析結果に関する資料	40
添付資料 4: 胆汁排泄機能阻害に基づく肝障害発症実験モデルに関する資料	79
添付資料 5: ヒポキサンチンによる肝障害改善実験モデルに関する資料	85

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における薬物誘発性肝障害（DILI）発症症例を集積し、薬物血中濃度測定、遺伝子解析を網羅的に実施することで、原因薬剤やDILI発症に関わる遺伝的要因を解明すると共に、DILIの原因薬剤と疑われた薬剤を用いた、基礎研究を実施することで、DILIの発症メカニズムを解明し、適切な個別化薬物治療法を提唱すること、そして創薬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3年計画で実施されている。

研究最終年度目となる平成21年度には、集積されたDILI症例を対象に、GWASも含めた遺伝子解析を実施した。また、メタボローム解析において、DILI発症時のヒポキサンチンや γ -Glu-ペプチド濃度の変動から、DILIの発症メカニズムに関する重要な示唆が得られたため、それを糸口とした基礎研究を更に推進した。

遺伝子解析の結果、今後さらに症例数を増やした検討が必須であるものの、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、また、GWAS においては DILI のリスクに関連するいくつかの候補遺伝子を見出すなど、興味深い知見が得られている。また、イトラコナゾールおよびチクロピジンを用いた検討により、*in vitro* リン脂質輸送評価系が *in vivo* を反映することを確認し、創薬における胆汁うっ滞型 DILI のリスク評価に応用し得ることを示した。また、 γ -Glu-ペプチド濃度の分析から DILI においては、何らかのメカニズムにより肝臓中グルタミン濃度の低下が起こることが重要である可能性を示した。さらにヒポキサンチンが临床上用いられる薬剤による DILI に対しても治療効果を有することを明らかにした。

平成 21 年度には、臨床的に問題となっている DILI に対し、1) 遺伝的背景の解明による DILI 発症リスクの低減、2) 肝毒性スクリーニング系の提案、3) DILI 発症時の治療法提案、という 3 つのアプローチから研究を進め、それぞれのアプローチで顕著な進捗があった。今後は本研究で得られた知見を学術論文・学会発表・WEB ページへの公開などにより国内外に発信することで、DILI 研究がさらに発展・深化し、DILI を完全に克服することが可能となることを期待したい。

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的にはない。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。

この重要な課題を解決すべく、本研究においては、当院にて発症した DILI 患者を対象とし、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、患者の遺伝的要因と DILI 発症リスクの関連性、薬物血中濃度と DILI 発症の関連性を解析し、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 DILI 患者から同意を取得し網羅的な遺伝子解析を実施している。（図 1、2）。

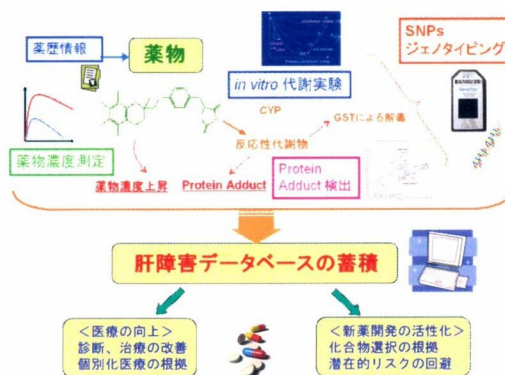


図 1 薬物性肝障害データベースの概念図



図 2 薬物性肝障害データベースの公開と共同利用のイメージ図

構築される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な形で公開を予定しており、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。また、遺伝情報や薬物血中濃度といった情報も入手可能であるため、多くの研究者にとって、DILI に関する調査研究を実施する上で非常に重要な情報基盤

となることが期待される。

一方で、薬物血中濃度分析の結果から、原因と推定された薬物については、*in vitro* 実験や動物実験を実施し、薬物による毒性発現のメカニズムを探るとともに、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、また新たな毒性スクリーニング系の提案を行うことも本研究における重要な目的である。

さらに、本研究の進展に伴い平成 20 年度より開始した DILI 患者のメタボローム解析により、DILI 発症時に特異的に変動する内因性物質（バイオマーカー）を見出し、それを足がかりに DILI の治療法の開発や DILI の本質的な発症メカニズムの解明への糸口がつかめたことから、基礎的研究をさらに深め、DILI を合理的に克服することも目的としている。

これらの研究を統合して、①遺伝子解析による DILI 発症リスクの予測、およびバイオマーカーの確立による DILI の早期発見、②治療法の開発による DILI の予後の改善、③DILI の発症メカニズムを解明し、毒性スクリーニング系を構築することによる DILI リスクの低い医薬品開発、の三方向からのアプローチにより DILI を克服し国民の福祉向上に貢献することが本研究の最終的な目的である。

平成 21 年度の研究の結果、遺伝子解析研究の結果、DILI 発症のリスクと関連している可能性のある遺伝子の候補が見出された。また、薬物血中濃度分析やメタボローム解析に基づ

いた基礎研究から、DILI の発症メカニズムに関する重要な知見が得られ、肝毒性スクリーニングへ応用しうることを示す一方、発症した DILI の治療法の開発につながる重要な知見も得られた。以下に平成 21 年度の研究成果につき、詳述する。

B. 研究方法

1) DILI 症例の収集

平成 21 年度には、研究開始当初に分担研究者・吉田晴彦講師（当院消化器内科）の協力を得て構築した、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（図 3）による症例エントリー、検体収集に加え、分担研究者・矢富裕教授（当院検査部）の協力のもと、検査部に設置された生化学検査結果検索システム（LAINS）を利用した症例エントリーも並行して実施した。すなわち、LAINS を利用して、一定期間内において ALT 値および ALP 値の少なくとも一方が正常上限値の 3 倍以上に上昇した症例を全て抽出し、対象患者の電子カルテ等から肝機能マーカー上昇に関する記載を抽出・精査することで、DILI の可能性が高い症例を選択して同意取得を行った。

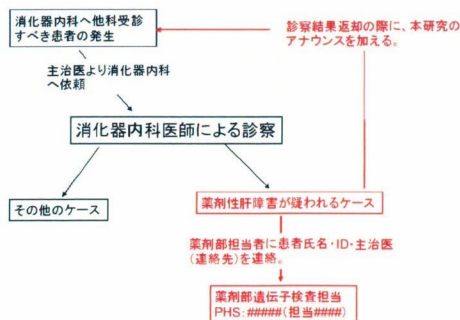


図 3 消化器内科のコンサルトを利用した DILI 報告システムの概要

本システムの並用により、消化器内科にコンサルトされることなく、見落とされていた DILI 症例を効率的に抽出することが出来ると考えられた。

2) DILI 発症患者のゲノム解析

DILI の発症には、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ことから、本研究においては研究当初より薬物代謝酵素に焦点をあてて遺伝子解析を実施してきた。平成 21 年度もその流れに従い、分担研究者・後藤順講師（当院神経内科）の協力のもと、DILI 症例 40 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。

一方、ヒト白血球抗原（HLA）遺伝子群についても、平成 20 年度と同様に、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 DILI 患者検体の内 30 症例を対象として、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。

さらに、薬物動態関連遺伝子、HLA 遺伝子群以外の遺伝子変異が DILI 発症リスクに関連する可能性も否定できないことから、東京大学医学部人類遺伝学教室・徳永勝士教授の指導の下、DILI 患者を対象としたゲノムワイド関連解析（Genome-Wide Association Study: GWAS）を試みた。すなわち、集積された DILI 患者の遺伝子検体 64 検体のなかで、DILI である可能性が極めて濃厚であり、かつ GWAS を実

施するために十分な品質でゲノム DNA が抽出できた 48 検体を対象として、SNP Array (affymetrix 社製 SNP Array 6.0) を用いて解析を行い、既に他の研究において得られている健康成人 184 名の解析データを対照群として関連解析を行った。

3) DILI の新規バイオマーカー候補物質の定量分析

平成 20 年度に実施した、DILI 患者検体のメタボローム解析 (図 4) において、肝障害の進行に伴い、血清中ヒポキサンチン濃度は低下する一方で、 γ -Glutamyl peptides (γ -Glu-Xs) 濃度は上昇することが判明した (図 5)。

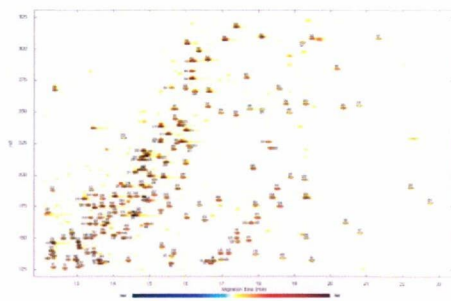
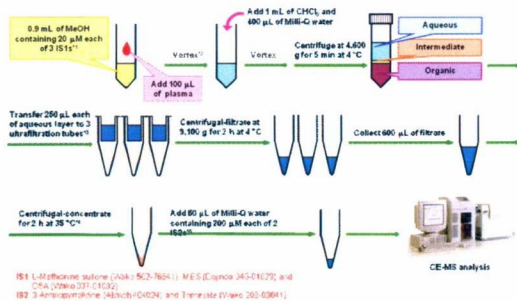


図 4 (上) メタボローム解析のためのヒト血清サンプルの前処理手順 (下) メタボローム解析結果の一例

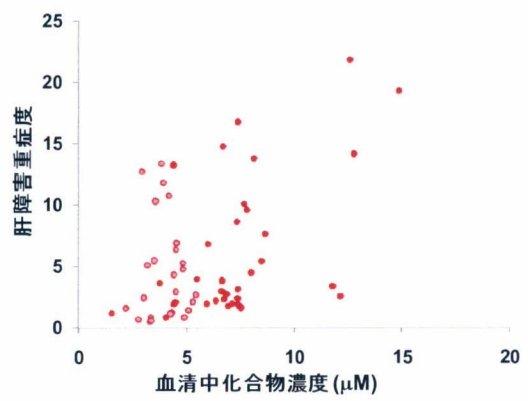
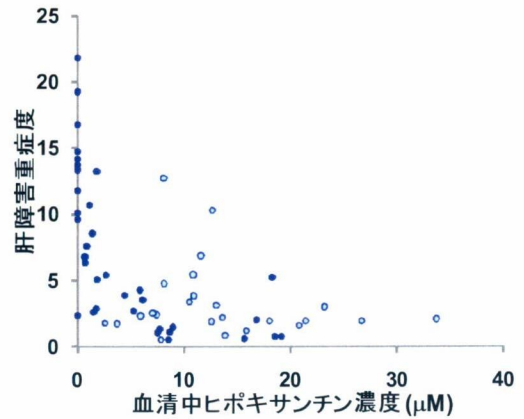


図 5 (上) 肝障害重症度と血清中ヒポキサンチン濃度の関係、(下) 肝障害重症度と総 γ -Glutamyl peptides (γ -Glu-Xs) の濃度の関係。肝障害重症度とは、AST、ALP、 γ -GTP 値の正常上限値との比率の中で最も高値な値を意味する。

そこで、平成 21 年度には、同意が得られた DILI 患者の内、37 症例の血清検体を対象に DILI 発症前から回復後までの経時的サンプル (301 サンプル) の血清中ヒポキサンチン濃度および γ -Glu-Xs 濃度の測定を行った。なお、特許申請中のため、具体名は伏せるが、 γ -Glu-Xs としては昨年度の検討において比較的変動の大きかった 8 種類の γ -Glutamyl peptides (γ

-Glu-X_{1~8}) を選択した。

血清検体の前処理法は以下の通りである。まず、DILI 患者の血清検体 100 μ L を 15mL 遠沈管に採り、内部標準溶液 (Methionine sulfone 5 μ M メタノール溶液) 900 μ L およびメタノール 2ml を加えて攪拌した。そこに超純水 2ml を加えよく攪拌した後、遠心分離 (3500rpm, 15 分) して変性したタンパク質を除去した。上清を新しい 15mL 遠沈管に回収し、クロロホルム 2ml を加えてよく攪拌することで脂溶性物質を除去した。遠沈管を高速遠心分離 (15000rpm, 5 分) して水相とクロロホルム相に分離し、上清 (水相) を 1.5mL ずつ 2本の 2mL エッペンドルフチューブに分取した。これを遠心減圧濃縮機 (SpeedVac) を用いて乾固させた。 γ -Glu-Xs の分析においては超純水/アセトニトリル=1/1 溶液 60 μ L、ヒポキサンチンの分析においては超純水/メタノール=1/9 溶液 100 μ L に再溶解して、5 μ L を UPLC-MS/MS に注入して分離・定量分析を行った。使用した分析カラムや分析条件は添付資料 3-1 に示した (ただし、前述のように γ -Glu-Xs については特許申請中かつ論文投稿中であるため分子量等の情報は伏せた)。

なお、マウスにおける研究結果のアナロジーから、ヒトにおける血清中 γ -Glu-Xs の上昇は肝臓中のグルタチオン濃度の低下を示唆していると考えられる。また、Lipopolysaccharide (LPS) による前感作を行うことで、VRCZ 誘発性 DILI モデルを作成する

ことが可能であるが (5) 項参照)、LPS の投与により肝臓中グルタチオン濃度の低下と血清中サイトカイン濃度の上昇が観察されることが知られている。これらの事実から、ヒト臨床においても DILI の発症・進展にサイトカインも重要な役割を担っていると考えられたため、 γ -Glu-Xs の測定を実施したサンプルを対象に市販の ELISA キットを用いて、あるサイトカイン (サイトカイン X) の血清中濃度を測定した。

4) リン脂質の分泌阻害に着目した肝障害スクリーニング系の検討

平成 20 年度に実施したラットを用いた検討において、アゾール系抗真菌薬であるイトラコナゾール (ITCZ) は、胆汁流量を非投与群の約 40% まで低下させ、また、胆汁中へのリン脂質排泄量も顕著に低下することが明らかとなった。また、我々が構築した胆汁酸、およびリン脂質の *in vitro* 輸送評価系を用いた検討により、ITCZ は胆汁中へのリン脂質の排泄を担うトランスporter である ABCB4 を濃度依存的に阻害する一方で、胆汁酸の排泄を担う BSEP への阻害作用は弱いことが明らかとなった。これらの検討結果から、我々の用いたリン脂質および胆汁酸の *in vitro* 輸送評価系は、薬物による胆汁うっ滞発症のリスク評価に使用しうると考えられた。

この知見に基づき、平成 21 年度は、厚生労働省の「重篤副作用疾患別対応マニュアルー薬物性肝障害」をもとに

検索した胆汁うっ滞誘発性薬物(表 1)についても同様の解析を行うことで、我々が構築した輸送評価系が胆汁うっ滞リスクの評価に有益であるか否か検討を行った。

表 1 胆汁うっ滞誘発薬物のリスト

薬名	種類	作用機	副作用	薬物動態		薬物動態		副作用	副作用
				半減期	血中濃度	半減期	血中濃度		
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.4	5	0.3	0.3	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.6	7	0.9	4	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.6	2	6	7	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.9	4	12	2	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.2	19	2	14	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.1	19	12	12	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.4	5	5	1	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.6	3	1	2	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.1	8	6	7	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.6	2	3	2	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.6	2	3	2	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.8	3	2	2	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.6	2	9	6	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.1	9	13	16	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.2	2	1	2	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.2	2	1	2	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.2	2	1	2	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.2	2	1	2	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.2	2	1	2	0.3	0.3
アロプリジン	胆管薬	胆管薬	胆管薬	0.2	2	1	2	0.3	0.3

まず、表 1 に示した 20 薬物を対象として、ABCB4 によるリン脂質輸送評価系、および BSEP による胆汁酸輸送評価系を用いて in vitro 阻害実験を実施した。なお、薬物の添加濃度は、インタビューフォームなどの記載に基づき、常用量投与時の平均的な血中濃度の 10 倍以上程度に設定した(図 6、7)。

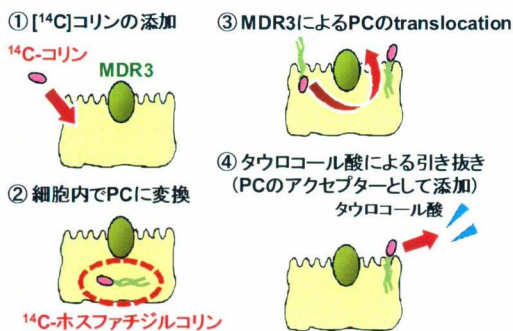


図 6 MDR3 発現系を用いたリン脂質(ホスファチジルコリン) 輸送の評価

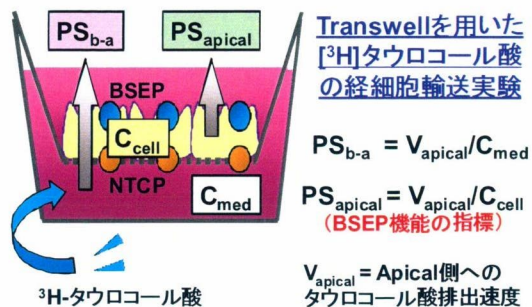


図 7 BSEP/NTCP 共発現系を用いた胆汁酸(タウロコール酸) 輸送の評価

また、in vitro において ABCB4 の阻害が認められたチクロピジンについては、ITCZ 同様にラットに投与して胆汁流量およびリン脂質・胆汁酸排泄量を比較検討した。すなわち、ウレタン麻酔下でラットに胆管および大腿動静脈カニューレを施し、チクロピジンを静脈内持続投与(初回負荷量: 48mg/kg、維持量: 13.3mg/kg/分)をした。投与開始 30 分前から 1 時間おきに胆汁を採取し、胆汁流量を測定した。また、胆汁中の総胆汁酸およびリン脂質濃度を市販の測定キット(テストワコー)を用いて測定した。一方、大腿動脈より経時的に血液を採取し、血漿中チクロピジン濃度を LC-MS/MS により測定した。

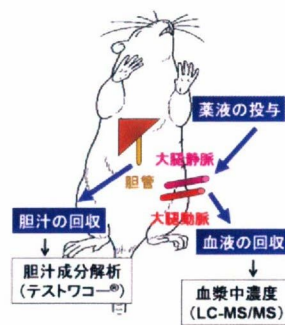


図 6 in vivo 実験の模式図

5) 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

平成 20 年度の検討により、ヒポキサンチンは α -Naphthylisotiocyanate (ANIT) 誘発性肝障害をほぼ完全に抑制することが示され、その作用発現にはヒポキサンチンが hypoxanthin-guanin phosphoribosyl transferase (HGPRT) により代謝されることが必要となることが示唆された。

これらの知見に基づき、平成 21 年度はヒポキサンチンによる肝障害抑制作用が他の一般的に臨床使用される薬物においても観察されるかを確認するため、検討を行った。

まず、DILI 様の肝障害モデルとして知られる LPS 前投与後に薬物を投与したラットを用いた検討を行った。本検討では臨床的にも肝障害を比較的起こしやすいことが知られるポリコナゾール (VRCZ) を用いた。すなわち、24 時間絶食後、LPS(7.4mg/kg) を腹腔投与し、2 時間後に VRCZ (30mg/kg) を頸静脈投与することで VRCZ 誘発性 DILI モデルラットを作成した。また、典型的な DILI 誘発薬物であるアセトアミノフェン (APP、400mg/kg) を腹腔内投与した DILI モデルラットも作成した。これらのモデルラットに対し、薬物投与後 0、6、12、18 時間後にヒポキサンチン (50mg/kg) を皮下投与し、24 時間後に血清中 ALT 値を測定した。

続いて、APP 誘発性 DILI においても、ヒポキサンチンの治療効果が HGPRT による代謝に依存しているか

どうかを検討するため、上記の実験と同様の方法で、APP 投与と同時に 6-メルカプトプリン (6-MP、HGPRT 阻害剤、10mg/kg) を投与下場合のヒポキサンチンの効果を検討した。また、もし、ヒポキサンチンの効果が HGPRT による代謝に依存しているのであれば、尿酸への代謝経路を遮断することで、相対的にヒポキサンチンの IMP への変換効率が上昇し、肝障害抑制作用を示す可能性が考えられたため、同様の実験系で、アロプリノール (200mg/kg、XO 阻害剤) を APP 投与 1 時間前に投与し、ヒポキサンチンを投与しない条件で AAP による肝障害が軽減するかを検討した(図7参照)。

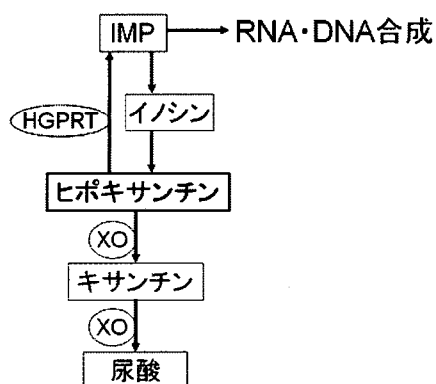


図7 ヒポキサンチンの代謝経路

さらに、ヒポキサンチンは HGPRT により代謝され、最終的には DNA・RNA 合成に利用されることから、ヒポキサンチン投与により肝臓内 ATP 濃度に変化が起こると考え、APP 誘発性 DILI モデルラットを用いて検討を行った。すなわち、24 時間絶食後 APP (400mg/kg) あるいは vehicle を経口投与し、3 時間後にヒポキサンチン

(10mg/kg)あるいはvehicleを静脈内投与した。ヒポキサンチン投与の20分後に肝臓を摘出し、肝臓中のATP濃度をLC-MS/MSを用いて測定した。

6) 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。

- a) 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。
- b) 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。
- c) 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. 結果

1) DILI 症例の収集

LAINS を用いた患者エントリーシステムを運用することにより、効率的な患者抽出が可能となり、研究期間終了までに計 65 例の DILI 患者から同意を取得することが出来た。DILI 患者の平均年齢は 59.5 ± 15.5 歳、男女比は男性：女性=38：26 であった。添付資料 1-1 には、同意が取得できた患者の年齢、性別、診療科、DILI の被疑薬をまとめた。

2) DILI 症例のゲノム解析

平成 21 年度に新たに同意を取得した DILI 症例 40 症例を対象として、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結果、ほとんどの症例において、SNPs 判定の call rate 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、機能的に特に重要な SNPs について、昨年度までに既に解析済みの 24 症例も併せた allele 頻度を示した。資料 2-1 に示すように、SNPs 頻度は一般的な日本人の集団における頻度と明確な差は認められなかった。

一方で、DILI 患者検体の内 30 症例を対象として 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 2-2 にまとめた。平成 20 年度の解析で見出された HLA-B*2704、*2705 および *5504 は検出されず、HLA 遺伝子型において

一般的な日本人における頻度分布と大きな差は認められなかった (添付資料 2-3)。

添付資料 2-4 には、本研究において集積した DILI 患者 65 症例の中で 48 症例を「研究方法」に示した基準により抽出 (Case 群) し、日本人健常人 184 名を対照 (Control 群) として GWAS を実施した結果をまとめた。Case 群においてマーカー多型の判定結果の一部がハーディー・ワインバーグの法則に適合しなかったことから、それらを除いて Control 群との比較を行ったところ、45 種類のマーカー SNPs (22 遺伝子) において Case 群と Control 群の間で有意 ($P < 10^{-4}$) な頻度の差が検出された。

3) DILI の新規バイオマーカー候補物質の定量分析

添付資料 3-1 に LC-MS/MS による γ -Glu-Xs およびヒポキサンチンの分析条件、および典型的な分析結果を示すが、いずれの化合物も良好に分離、定量が可能であった。定量限界は γ -Glu-Xs で 100nM~1 μ M、ヒポキサンチンでは 10nM であった。

添付資料 3-2 には、DILI 発症患者から得られた検体の中で、ALT、AST あるいは ALP の少なくとも一つが正常上限値 (ALT: 40 U/L, AST: 40 U/L, ALP: 350 U/L) の 2 倍以上に上昇した検体における血清中の γ -Glu-X_{1~8} の濃度、および 8 種類の γ -Glu-Xs の合計濃度 (total γ -Glu-X) を示した。なお、コントロール群は別途に同意を

取得した健常成人 (n=10、年齢: 23.9 ± 2.60 歳、男女比 5:5) である。一部測定値のバラツキが大きい γ -Glu-X もあるが、全体的には γ -Glu-Xs は DILI 発症時に上昇している傾向があり、また、total γ -Glu-X もコントロールと比較して上昇する傾向を認めた。このため、以下では total γ -Glu-X を指標として解析を行った。

添付資料 3-3 には、今回分析を行った DILI 患者 37 名の total γ -Glu-Xs 濃度および、ヒポキサンチン濃度の経時的变化を ALT および ALP の経時的变化と並べて示したが、total γ -Glu-Xs 濃度は、肝機能マーカー値と同期、あるいはやや先行して上昇する傾向が見られた。一方で、ヒポキサンチンは逆に肝機能マーカーの上昇に同期、あるいはやや先行して低下する傾向が認められた。

一方で、total γ -Glu-Xs を測定した血清検体の一部について、サイトカイン X の濃度を測定したところ、健常成人に比べて上昇していることが明らかとなった (論文投稿準備中につき詳細なデータは開示しない)。

4) リン脂質の分泌阻害に着目した肝障害スクリーニング系の検討

本研究においてリン脂質の分泌阻害作用のスクリーニングを実施した 20 種類の薬物のリン脂質分泌阻害作用を添付資料 4-1 にまとめた。添付資料 4-1 に示すように、複数の薬物について *in vitro* における ABCB4 を介し

たリン脂質の分泌阻害作用が見出された。

阻害作用が認められた薬物の中で、比較的阻害作用が強く、臨床においても DILI のリスクが高いことで知られる抗血小板薬チクロピジンを用いて、*in vivo* 実験系による検証を行ったところ (添付資料 4-2)、胆汁中へのリン脂質排泄量が大きく低下する一方、胆汁中への胆汁酸排泄量に変化は認められなかった。また、興味深いことに、チクロピジンは胆汁中のグルタチオン分泌を著しく増加させ、結果として肝臓中のグルタチオンは減少することが明らかとなった (添付資料 4-3)。

5) 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

添付資料 5-1 には、24 時間絶食後に LPS (1mg/kg; 3,000,000 EU/kg) を腹腔内投与、VRCZ (30mg/kg) を頸静脈投与、およびその両方を投与した場合の ALT 変化を示した。VRCZ 単独では ALT の上昇は認められず、LPS 単独ではごく軽度の ALT 上昇を認めるのみであり、LPS を前投与した後に VRCZ を投与した場合においてのみ顕著な ALT 上昇が認められた。

次に、VRCZ 誘発 DILI モデルラットに対してヒポキサンチン (2.5mg/kg、6 時間毎に 4 回) を皮下投与したところ、VRCZ による ALT 上昇は強力に抑制された (添付資料 5-2)。一方で、典型的な DILI 誘発薬物であるアセトアミノフェン (APP) を腹腔内投与した DILI モデルラットにおいても、同

様の結果が得られた（添付資料 5-3）。

APP 誘発性 DILI ラットにおいて、6-MP を併用した場合にはヒポキサンチンによる肝障害抑制作用はほぼ消失した（添付資料 5-4）。また、AAP の投与1時間前にアロプリノールを投与した場合、ヒポキサンチンは投与していないにも関わらず、ヒポキサンチンを投与下場合と同等の肝障害改善作用が認められた。さらに、添付資料 5-5 に示すように、APP 投与後 3 時間後には、肝臓中 ATP 量はコントロールラットに比べて低下したが、APP 投与後にヒポキサンチンを投与することで、肝臓中 ATP 濃度はコントロール群と同程度まで回復した。一方、APP と 6-MP を同時に投与したのちヒポキサンチンを投与した場合は、肝臓中 ATP 濃度の回復は認められなかった。

D. 考察

1) DILI 症例の収集

平成 20 年度までの反省点を踏まえ、平成 21 年度より LAINS を用いた患者エントリーシステムの運用を開始したが、今年度のみで約 40 症例の追加エントリーが可能であった。LAINS を用いたシステムにより抽出された DILI 患者のほとんどは消化器内科のコンサルトを受けていなかったことから、LAINS を用いた患者エントリーと研究開始当初より利用して消化器内科コンサルトに基づくシステムを併用することで、より見逃しの少ない患者エントリーが可能となったと考えられる。なお、消化器内科のコンサルトを受けていなかった症例については、別途分担研究者・吉田晴彦講師の監修を受けることで、診断の正確性は確保出来たものと考えている。

本研究において得られた DILI 発症患者の遺伝子試料および血清試料は、診断の確実性が極めて高く、また、多くの症例において DILI 発症前から回復後までの経時的な血清試料が得られていることから、遺伝子解析のみにとどまらず、後述する DILI 発症メカニズムに関する研究への展開が可能であったと考えられる。なお、本研究における分析後の残余検体については全てディープフリーザーにおいて凍結保管されていることから、今後の DILI に関する研究において極めて貴重かつ有用な検体バンクとなると考えられた。

2) DILI 症例のゲノム解析

現在までに集積した DILI 患者の 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、添付資料 2-1 に示すように、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 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 頻度に有意な差は認められなかった。特に、glutathione *S*-transferase (GST) M1 および GSTT1 に関しては、トログリタゾン誘発性 DILI やカルバマゼピン誘発性 DILI 等との関連性が報告されていること、後述するように平成 21 年度の研究において肝臓内グルタチオン濃度の低下が DILI 発症において重要であることが示唆されたこと等から、DILI 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 発症のリスクを説明できないことが示唆された。ただし、グルタチオン合成に関わる γ -グルタミルシステイン合成酵素など、DMET Plus では解析できない遺伝子の多型により肝臓内グルタチオン濃度が変動する可能性もあることから、今後はこれらの遺伝子も解析する価値があると考えられた。

また、HLA の解析においては、昨年度までの DILI 患者 24 名の遺伝子解析において、一般的な日本人集団においては極めて稀な allele である HLA-B*2704、*2405 および*5504 が

1 例ずつ検出され、DILI 発症リスクとの関連性が疑われたが、平成 21 年度に解析が実施された DILI 症例 30 名の遺伝子解析においてこれらの allele は全く検出されなかった。最終的な遺伝子解析結果を添付資料 2-3 に示すが、上述の稀な allele についても偶然検出された可能性が否定できず、現時点においては、DILI の発症リスクとの関連性が強く示唆される HLA allele は見出されていない。しかしながら、HLA-B*27 allele 等も含め、HLA 遺伝子は免疫応答性に極めて深く関与していることから、今後さらに症例数を増やして解析を行うことにより HLA 遺伝子と DILI 発症リスクの関連性が見出される可能性は残されていると思われる。

一方で、GWAS による解析の結果、45 SNPs (22 遺伝子) において、コントロール群に対して有意な頻度の差が認められた。これらの遺伝子 (特許申請の可能性があるため、具体的な名称は伏せる) では、 P 値は $<10^{-4}$ にとどまっていたことから、明確な結論を得るためには、今後さらに症例数を追加し GWAS を行う必要があると考えられた。

3) DILI の新規バイオマーカー候補物質の定量分析

添付資料 3-2 に、DILI 発症患者において、肝機能マーカーが上昇している際には、血清中の γ -Glu-X_{1~8} の濃度、および total γ -Glu-X 濃度は、コントロール群に比べて全体的に上昇

している傾向にあった。この傾向は、平成 20 年度の研究においてメタボローム解析の結果見出された傾向と一致しており、血清中 γ -Glu-Xs が肝機能障害のバイオマーカーとして有望であることを示唆するデータであると考えられる。

また、添付資料 3-3 には、今回解析を行った DILI 患者 37 名の total γ -Glu-Xs 濃度および、ヒポキサンチン濃度の経時的变化を ALT および ALP の経時的变化と並べて示したが、total γ -Glu-Xs 濃度は、肝機能マーカー値と同期、あるいはやや先行して上昇する傾向が見られた。既報のマウスにおける検討結果とのアナロジーから、血清中 γ -Glu-Xs 濃度の上昇は、肝臓内グルタチオン濃度の低下を反映している可能性が高いことから、これらの結果は、DILI 発症時にはある程度一般的に肝臓内グルタチオン濃度の低下が起こっていることを示唆するものと考えられる。また、興味深いことに、DILI 発症者においては、少数の例外はあるものの、肝機能マーカーの上昇が認められない段階においても平均的な total γ -Glu-Xs の濃度は健常人コントロール群の平均値 ($10 \mu\text{M}$ 前後、添付資料 3-3 参照) よりも高い傾向が認められ、DILI を発症する患者では、健常人に比べて肝臓の酸化ストレスが強く係っていることが示唆された。しかしながら、今回の検討では、DILI 患者群とコントロール群で年齢に大きな差があることから (DILI 患者群: 59.5 ± 15.5 歳、コントロール

群：23.9±2.60 歳)、加齢による影響を否定できず、今後高齢の健常人を対象としたコントロール群との比較検討が必要と考えられる。

さらに、DILI 患者においては、血清中サイトカイン X 濃度が健常人に比べて上昇しており、また、total γ -Glu-Xs 濃度と同様に、DILI 発症時にはサイトカイン X も ALT 値や ALP と同期、あるいはやや先行して上昇する傾向が見られた(論文投稿準備中のため、詳細なデータは開示しない)。これらの臨床検体における測定結果と、本研究において、ラットに LPS 前感作後に薬物を投与することで、DILI に非常に類似した肝障害が惹起されることが確認されていること、また、LPS 投与により肝臓内グルタチオン濃度の低下とサイトカイン X も含めた複数のサイトカインの血清中濃度上昇が確認されていることを既報の文献情報を加味して考慮すると、何らかの原因により肝臓内グルタチオン濃度の低下と血清中サイトカイン X 濃度の上昇が起こることで、肝臓が薬物(あるいはその代謝物による酸化ストレス)に対して脆弱になり、DILI が発症する、というスキームを描くことが出来る。しかしながら、これらの臨床データや文献情報のみからでは、この仮説を証明することは不可能であり、今後 DILI モデル動物を利用した基礎的な研究を積み重ねることが必要であると考えられた。

一方で、添付資料 3-3 に示すように、ヒポキサンチンは total γ -Glu-Xs と

は逆に肝機能マーカーの上昇に同期、あるいはやや先行して低下する傾向が認められたが、この測定結果に関する考察は後述のヒポキサンチンによる肝障害治療効果に関する項で述べる。

4) リン脂質の分泌障害に着目した肝障害スクリーニング系の検討

本研究にスクリーニングを実施した 20 種類の薬物の内、7 薬物において、ABCB4 を介したリン脂質の分泌障害作用が見出された。また、in vitro で ABCB4 の障害作用を示す一方、BSEP の障害作用は有しなかったチクロピジンをラットに投与したところ、胆汁流量は有意に低下し、胆汁中へのリン脂質排泄量は有意に低下したが、胆汁酸排泄量に変化は認められず、in vitro と in vivo に良好な対応が認められた。このことは、本研究において構築した ABCB4 を介したリン脂質輸送評価系が、DILI リスクを予測する手法として有望であることを示唆している。もちろん、薬剤が胆汁うっ滞を引き起こすメカニズムとしては ABCB4 の障害以外にも様々なメカニズムがあり、ABCB4 障害作用のみで DILI リスクが予測できる訳ではないが、スクリーニング法の一つとして検討に値するものと確信している。

一方で、添付資料 4-3 に示すように、チクロピジンが胆汁中のグルタチオン分泌を著しく増加させ、肝臓中のグルタチオン濃度が低下することが観察された。この原因は不明であるが、

3)項において記述した考察も併せて考慮すると、チクロピジンによる DILI の発症要因の一つとなっている可能性が考えられることから、今後メカニズムに関する詳細な検討が必要となると考えられる。

5) ヒポキサンチンによる DILI 治療効果に関する基礎的研究

添付資料 5-1 に示すように、LPS による前感作を行った後に VRCZ を投与した場合にのみ ALT に顕著な上昇が認められたことから、本研究で用いた VRCZ 誘発性 DILI モデルラットは臨床における DILI をある程度反映しているモデルであると考えられた。また、VRCZ 誘発 DILI モデルラット、APP 誘発 DILI モデルラットいずれにおいてもヒポキサンチンを皮下投与したところ、ALT 上昇は強力に抑制されたことから (添付資料 5-3)、ヒポキサンチンは临床上使用されている薬物により誘発された DILI に対しても高い治療効果を示すものと考えられた。

一方で、APP 誘発性 DILI ラットにおいて、6-MP を併用した場合にはヒポキサンチンによる肝障害抑制作用はほぼ消失した (添付資料 5-4)。このことから、ヒポキサンチンの DILI 治療作用が発現するためには、ヒポキサンチンが HGPRT により代謝される必要があると考えられた。このことは、XO 阻害剤であるアロプリノールのみを投与下場合においてもヒポキサンチンとほぼ同程度の肝障害改善作用

が認められたことから支持される。すなわち、XO を阻害することにより、ヒポキサンチンの XO を介した代謝が低下することで、相対的に HGPRT を介した IMP の上昇が起こっていることが推察された。さらに、添付資料 5-5 に示すように、APP 投与により低下した肝臓中 ATP 濃度は、APP 投与後にヒポキサンチンを投与することで、コントロール群と同程度まで回復するが、APP と同時に 6-MP を投与した場合、ヒポキサンチンによる肝臓中 ATP 濃度の回復は認められなかったことから、ヒポキサンチンによる DILI の治療効果の発現には HGPRT により代謝されることが必須であると考えられた。

6) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義および今後の活用について

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。すなわち遺伝子解析という静的な観点からのアプローチに加え、薬物動態学的解析、メタボローム解析という動的な観点からのアプローチを加えることで、DILI の発症機構の本質の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。これまでに、DILI 発症患者の経時的な生体内反応の変化を総合的に解析しようとする試みは国際的にも全く例が無く、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、本報告書で述べた胆汁うっ滞型 DILI の発症メカニズムの解析や、ヒポキサンチンによる肝障害改善作用の発見、DILI の発症におけるグルタチオンの役割に関する解析は、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。

今後、本研究の成果は学術論文、国内外の学会発表等の形で公表される予定であるが、これらを基に DILI に関する研究がさらに活性化することが期待される。

E. 結論

平成 21 年度には、平成 20 年度に引き続き 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、①イトラコナゾールおよびチクロピジンを用いた検討により、in vitro リン脂質輸送評価系が in vivo を反映することを確認し、創薬における胆汁うっ滞型 DILI のリスク評価に応用し得ることを示した、②DILI 患者由来の血清検体を大規模に分析することにより、血清中 total γ -Glu-Xs 濃度およびサイトカイン X 濃度が肝機能マーカーの上昇と同時、あるいはやや先行して上昇する傾向があることを見出し、DILI においては、何らかのメカニズムにより肝臓中グルタミン濃度の低下とサイトカイン X の放出が起こることが重要である可能性を示した、③VRC 誘発性 DILI および APP 誘導性 DILI モデルラットを用いた検討から、ヒポキサンチンが DILI の治療薬として有望であることを示した。また、ヒポキサンチンの効果が 6-MP を投与することで消失すること、APP 投与により低下した肝臓中 ATP 濃度がヒポキサンチン投与により回復することから、肝臓が障害を受けている際には肝臓中 ATP 濃度が低下しており、ヒポキサンチンは、体内で ATP に変換され、低下した ATP を補充することで、DILI 治療効果を発揮している可能性を示した、等の臨床的にも極めて重要な研究成果を得た。

一方、DILI 患者を対象として DMET Plus による薬物動態関連因子の網羅的解析、HLA 遺伝子座の解析、および GWAS 等のゲノム解析を実施した結果、今後さらに症例数を増やした検討が必須であるものの、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、また、GWAS においては DILI のリスクに関連するいくつかの候補遺伝子を見出すなど、興味深い知見も得られている。平成 20 年度の成果として、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、②DILI の発症メカニズムの解明・肝毒性スクリーニング系の提案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を挙げたが、平成 21 年度には、上述の様に、これら 3 つのアプローチそれぞれにおいて著しい進展があった。

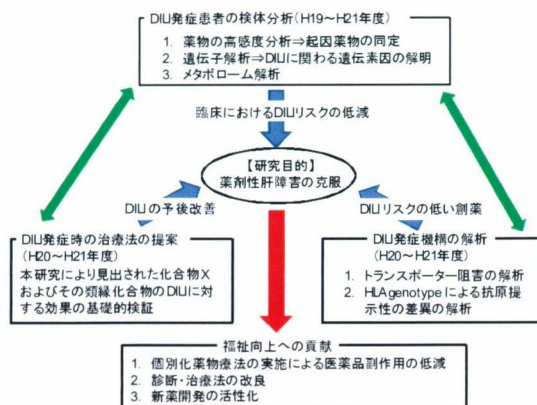


図 10 DILI を克服するための三方向からのアプローチ