

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 19 年度～ 21 年度
総合研究報告書

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. 総合研究報告書	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
添付資料	32
添付資料 1：DILI 患者の基礎情報に関する資料	32
添付資料 2：DILI 患者のゲノム解析に関する資料	34
添付資料 3：血中薬物濃度測定系に関する資料	50
添付資料 4：イトラコナゾール誘発性肝障害のメカニズム解明と in vitro 肝毒性評価に関する資料	51
添付資料 5： γ -Glu-ペプチドに関する研究に関する資料	65
添付資料 6：ヒポキサンチンによる肝障害改善作用に関する資料	104
II. 添付資料	105
研究成果の刊行に関する一覧表	105

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

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年計画で実施されたものである。

本研究においてはまず、DILI発症患者から同意を取得し、DMET Plus（薬物動態関連遺伝子）やHLA遺伝子解析、GWASといった遺伝子解析を実施した。また、DILI患者の血清検体を対象として薬物濃度測定およびメタボローム解析を行い、そこで得られた知見を糸口にDILIの発症メカニズムを解明するための基礎研究を行った。

遺伝子解析の結果、DILI のリスクに関連する可能性のある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、イトラコナゾール誘発性 DILI が疑われた患者の血中イトラコナゾール濃度が上昇していたことを手がかりに基礎的検討を行い、リン脂質輸送の障害が発症の原因の一つであり、*in vitro* リン脂質輸送評価系がリスク評価に応用し得ることを示した。また、メタボローム解析により DILI の進行に伴い血清中 γ -Glu-ペプチド濃度は上昇し、逆にヒポキサンチン濃度は低下することを見出した。この知見を基に検討を進めた結果、 γ -Glu-ペプチド濃度の上昇は肝臓内のグルタチオン濃度低下を示唆しており、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、DILI モデルラットを用いた検討により、ヒポキサンチンが临床上用いられる薬剤に起因する DILI に対する治療薬として有望であることを示した。

本研究の実施により、DILI の遺伝的素因や DILI の発症メカニズムの本質を解明する上で極めて重要な知見が得られた。これらの成果は、世界的にも類を見ないものであり、DILI の克服に直接貢献すると共に、広く国内外の研究者に発信することで、DILI 研究をさらに加速させる役割をも担う、極めて重要な研究成果であると確信している。

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。そのため、アセトアミノフェン（AAP）などごく一部の薬物を除き、DILI の発症メカニズムは不明な点が多く、効果的な予防や医薬品開発段階における効率的なスクリーニングは極めて困難であるのが現状である。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、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を蓄積すると共に、患者の血中薬物濃度の分析等により DILI の発症メカニズムを明らかにすることは临床上重要かつ緊急の課題である。

この重要な課題を解決すべく、本研究は平成 19 年度より 3 年計画で実施さ

れている。まず、当院にて発症した DILI 患者を対象とし、LC-MS/MS を用いて各患者の血中薬物濃度を一齐に解析し、原因薬を推定するとともに、DNA Chip 等を用いた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で、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)。

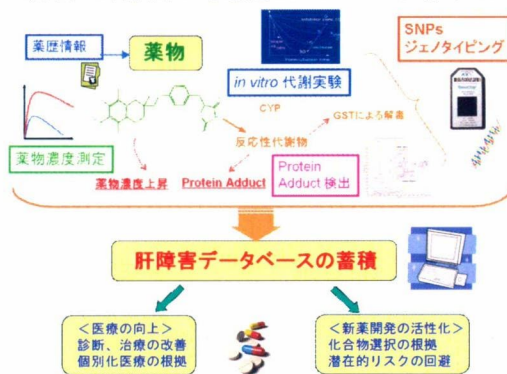


図 1 薬物性肝障害データベース

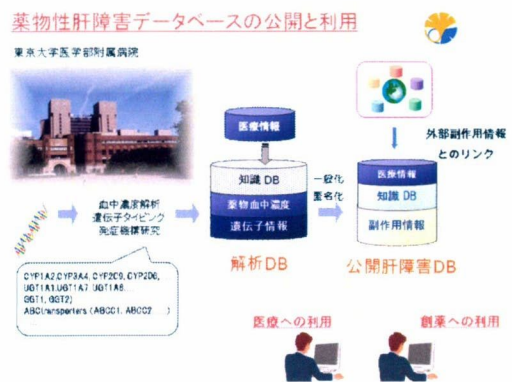


図 2 薬物性肝障害データベースの公開と共同利用のイメージ図

構築されるデータベースは匿名化され、当院のみならず、他院にで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重要な目的となっている。

これらの目的を達成するため、本研究においては以下に示す検討を実施した。

- 1) 当院にて発症する DILI 患者からの同意取得と検体採取
- 2) DILI 患者を対象とした網羅的な遺伝子解析

- 3) 薬物血中濃度一斉分析系の構築と血中濃度測定の実施
- 4) イトラコナゾール誘発性 DILI のメカニズム解析と *in vitro* 肝毒性スクリーニング系の構築
- 5) DILI 患者由来の血清検体を用いたメタボローム解析
- 6) ヒポキサンチンによる肝障害治療に関する研究

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。

B. 研究方法

1) DILI 症例エントリーおよび遺伝子検体・血清検体の採取

1.1.DILI 患者の抽出方法

本研究においては分担研究者・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。

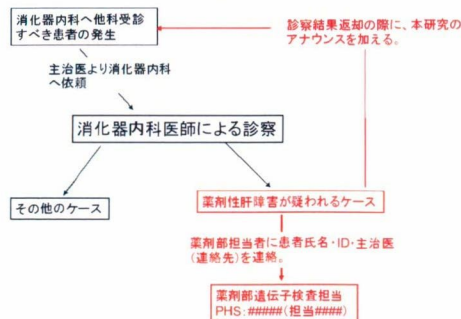


図 3 消化器内科のコンサルトを利用した DILI 報告システムの概要

二つのシステムを並用することで、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 症例も含めて効率的に抽出することが出来

る。

1.2.同意取得および検体採取

担当医の同意の下、DILI 発症患者から書面による同意を取得後に遺伝子解析用に血液 2mL を採取した。採取した血液より市販のキットを使用してゲノム DNA を抽出した。一方、同意が得られた DILI 患者については、検査部に保管されている生化学検査後残検体を全て回収し、薬物血中濃度測定およびメタボローム解析に供した。なお、遺伝子検体、血清検体は全て -80℃ に保管した。

2) DILI 患者の網羅的ゲノム解析

2.1.薬物動態関連遺伝子の網羅的解析

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、まず薬物代謝酵素・薬物トランスポーター等の薬物動態関連遺伝子に焦点をあてて解析を実施した。分担研究者・後藤順講師（当院神経内科）の協力のもと、同意を取得した DILI 患者 64 症例を対象として DNA Chip (affymetrix 社製 DMET Plus) を用いて、薬物動態関連遺伝子の既知 SNPs の網羅的解析 (225 遺伝子、約 2,000SNPs、添付資料 2-1) を実施した。

2.2.HLA 遺伝子座の解析

一方、スティーブン・ジョンソン症候群 (Steven Johnson Syndrome: SJS) 等の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、同意を取得した DILI 患者検体 64 検体の内、54 検体を対象に、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。

2.3.DILI 患者を対象とした GWAS

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、Affymetrix 社製 SNP Array 6.0 を用いてゲノム上の約 900,000 SNPs の網羅的解析を行った。DILI 患者検体の解析結果 (Case 群) を、既に他の研究において得られている健常成人 184 名の解析結果 (Control 群) を対照群として関連解析を行った。

3) 薬物血中濃度一斉分析系の構築と

血中濃度測定の実施

3.1.薬物血中濃度一斉分析系の構築

本研究を効率的に遂行するためには、以下の a)~c)の条件を満たす薬物血中濃度一斉測定系が必要となる。

- a) 広範な薬物を特異的かつ高感度に検出可能であること。
- b) 複数薬剤の同時定量が可能であること。
- c) 必要に応じて、親化合物のみならず、活性代謝物の定量・同定にも応用が可能であること。

以上を満たす分析装置として質量分析計を接続した高速液体クロマトグラフィー (LC-MS/MS) を導入し、血中薬物濃度測定系の構築を行った。

なお、検体の前処理には、原則として広範な化合物に対して高い回収率が見込める有機溶媒 (アセトニトリル等) による除タンパク法を採用したが、一部回収率の十分でない薬物においては、減圧遠心濃縮機 (Speed Vac システム) やディスポーザブル固相抽出カラム (Waters 社製 Oasis シリーズ) 等を用いた濃縮も試みた。また、抗生物質は DILI を起こす薬剤としては主要なものであるが、一般的な逆相クロマトグラフィーでは分離定量が極めて困難であるため、逆逆相分析カラム (Waters 社製 X-Bridge HILIC column、Amide column 等) の使用なども検討した。測定対象薬物の選定は、当院における過去の DILI 症例における被疑薬や、同意が得られた DILI 発症患者の服薬歴等を基に、DILI の起

因薬として可能性の高い薬物を優先して検討を行った。

3.2. DILI 患者検体の測定

上記の検討により、後述するように約 90 種類の薬物の分析を可能とした（添付資料 3-1）。構築した薬物血中濃度分析系を用いて、DILI 患者の血清検体を対象として薬物血中濃度を測定した。

4) イトラコナゾール誘発性 DILI のメカニズム解析と *in vitro* 肝毒性スクリーニング系の構築

4.1. 本検討の背景

DILI 患者の血清中薬物濃度測定の結果、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 3 症例のうち 2 症例における ITCZ のトラフ濃度は 1,500~2,000 ng/mL と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こと、胆道系の酵素に上昇が認められたことから（添付資料 4-1、4-2）、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。

4.2. ラットを用いた胆汁分泌阻害試験

SD 系ラットに、ウレタン麻酔下で胆管カニューレおよび大腿動静脈カテーテルを挿入した。胆汁回収開始 30 min 後に ITCZ を初回負荷投与 (43mg/kg *i.v.*) し、直後から定速静注 (7.3mg/kg/hr) を開始した。なお、投与量は定常状態の血清中 ITCZ 濃度が、DILI 症例で測定されたトラフ値

より推定されるピーク濃度 (7,000~8,000 ng/mL 前後) となるように設定した。ITCZ 投与開始から 2 hr まで、30 min 毎に胆汁流量を測定し、胆汁中の胆汁酸およびリン脂質の濃度を市販のキット（和光純薬社製 テストワコー）を用いて測定した（添付資料 4-3）。また、同様のタイムポイントで大腿動脈から採血を行い、血清中 ITCZ 濃度を LC-MS/MS を用いて測定した。

4.3. *in vitro* 実験系による ITCZ の胆汁酸、リン脂質輸送阻害作用の検討

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。

ABCB4 によるリン脂質輸送に対する阻害作用は次のように検討した（図 4 および添付資料 4-4）。まず、ABCB4 を発現する LLC-PK1 細胞に [¹⁴C] コリンを添加すると、細胞内に取り込まれた [¹⁴C] コリンは [¹⁴C] フォスファチジルコリン (PC) に変換され ABCB4 により細胞外に排出される。排出された [¹⁴C] PC を薄層クロマトグラフィーで分離し定量することで ABCB4 の機能を測定した。この *in vitro* 実験系に ITCZ を 0.04~5.0 μM（臨床濃度域：~2 μM 程度）で添加し、[¹⁴C] PC の排出量の変化により ITCZ の阻害作用を評価した。

BSEP による胆汁酸排泄に対する阻害作用は次のように検討した（図 5）。

まず、血管側膜で胆汁酸の取り込みを担うトランスポーターである NTCP と BSEP を共発現する LLC-PK1 細胞を図5に示すようにトランスウェル上で培養し、血管側（下側）に³H]タウロコール酸（TC）を添加すると、³H]TC が経細胞的に管腔側に排出され、BSEP の機能を評価することが可能である。この in vitro 実験系において管腔側に ITCZ を 0.04~5.0 μM で添加し、³H]TC の排出量の変化により ITCZ の阻害作用を評価した。

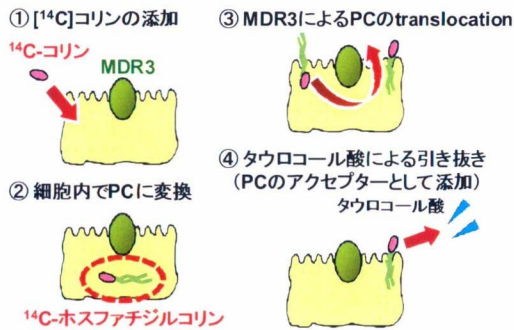


図 4 ABCB4 発現系を用いたリン脂質（ホスファチジルコリン）輸送の評価

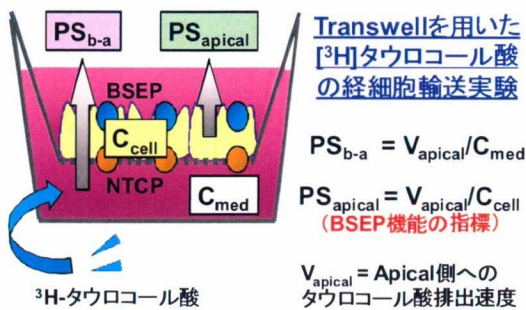


図 5 BSEP/NTCP 共発現系を用いた胆汁酸（タウロコール酸）輸送の評価

4.4.リン脂質の排出阻害に着目した肝毒性スクリーニング系に関する検討

結果・考察に詳述するが、上記の検

討により、ITCZ は胆汁流量を約 60% 低下させ、また、胆汁中へのリン脂質排泄量も顕著に低下させることが明らかとなった。また、in vitro 輸送評価系を用いた検討により、ITCZ は ABCB4（リン脂質の輸送担体）を濃度依存的に阻害する一方で、BSEP(胆汁酸の輸送担体) への阻害作用は弱いことが明らかとなり、in vitro と in vivo の結果が良好に一致した。この検討結果から、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。

そこで、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い、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。

まず、表 1 に示した 19 薬物（および ITCZ を加え合計 20 薬物）を対象として、ABCB4 によるリン脂質輸送評価系を用いて、ITCZ と同様に 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 倍以内程度に設定した。

表 1 胆汁うっ滞誘発薬物のリスト

薬名	種類	原料	会社名	胆汁うっ滞		胆汁うっ滞		胆汁うっ滞	胆汁うっ滞
				胆汁うっ滞	胆汁うっ滞	胆汁うっ滞	胆汁うっ滞		
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	4	5	7	50	40	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	7	9	4	80	55	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	6	7	80	70	
トウモロコシ	阻害剤	片断抽出	C	4	10	2	70	51	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	9	9	14	70	57	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	9	9	10	70	57	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	5	5	7	70	56	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	3	1	2	67	40	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	6	6	7	67	48	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	3	2	65	35	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	3	2	65	35	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	3	2	2	63	36	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	9	6	61	31	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	9	9	10	61	31	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	2	2	60	40	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	2	2	60	40	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	1	2	60	40	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	1	2	60	40	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	1	2	60	40	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	1	2	60	40	
アロプリロン	阻害剤	片断抽出	C	2	1	2	60	40	

次に、*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（添付資料 4-6）、BSEP による胆汁酸の輸送への影響も検討した上で、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 30 min 毎に胆汁を採取し、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（添付資料 4-7）。

5) DILI 症例患者の血清検体を用いたメタボローム解析

5.1. 背景情報

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

い成果を上げています。本研究の研究対象である DILI に関しても、ラットを用いた検討において、AAP 誘発性肝障害ではオプ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報告されている。しかしながら、ヒト臨床において DILI 患者のメタボローム解析を実施した報告は皆無であった。

そこで、本研究において得られた DILI 患者の血清検体を対象にメタボローム解析を実施した。本研究への同意が得られた DILI 患者のほとんどで、DILI 発症から回復に至る経時的な血清サンプルが多く得られていることは、メタボローム解析を実施する上で非常に大きなアドバンテージである。

5.2. 少数検体による検討

まず、DILI 症例 19 例から得られた血清検体 60 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水相を分取して減圧乾燥した。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 6）。なお、CE-MS/MS 法により約 400 種類に上る水溶性の内因性化合物の分離同定が可能である。

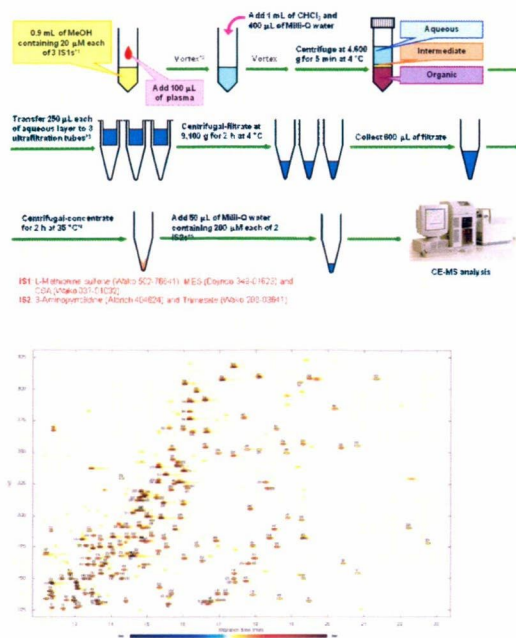


図6 (上) メタボローム解析のためのヒト血清サンプルの前処理手順 (下) メタボローム解析結果の一例

5.3.多検体 DILI の新規バイオマーカー候補物質の定量分析

後述するが、前項に示した少数検体によるメタボローム解析の結果、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) 濃度は上昇する傾向が認められた。

そこで、さらに多数の DILI 症例において傾向を確認するため、同意の得られた DILI 患者 36 症例の DILI 発症前から回復後まで経時的に採取された血清検体 301 検体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 (特許申請中のため、具体名は開示しないが、少数で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})

s) を選択している)。

なお、CE-MS/MS を用いたメタボローム解析は、1 検体当たり 1 時間程度を要し、多数の検体を処理するには不適である。そこで、以下の手順で LC-MS/MS による血清中ヒポキサンチン濃度、および γ -Glu-X_{1~8} 濃度測定を実施した。

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 (MES 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 を加えてよく攪拌した後、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 (Speed Vac システム) を用いて乾固させた。残渣を 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 LC-MS/MS に注入して分離・定量を行った。

5.4.DILI 患者の血清検体中サイトカイン X 濃度の測定

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 の投与による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、特許申請を予定しているため、具体名は開示しない) の血清中濃度を測定した。

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

6.1.背景情報

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 (結果の項に記載)。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 (添付資料 5-3)。教科書的には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。

6.2.ANIT および CCl₄ 誘発肝障害モデルラットにおける検討

典型的な肝障害モデルである α -naphthyl isothiocyanate (ANIT) および Carbon tetrachloride (CCl₄) 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 CCl₄ (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。

ヒポキサンチンは、図 7 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、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 (6-MP) 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。

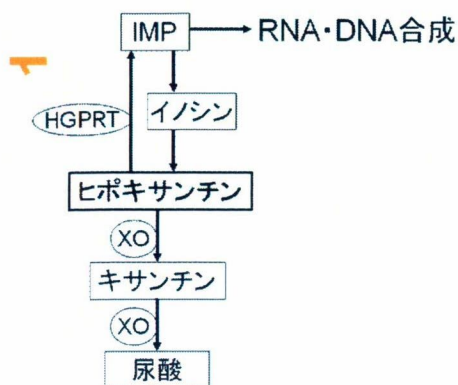


図7 ヒポキサンチンの代謝経路

6.3.ヒポキサンチンによる DILI 治療効果に関する検討

後述するように、上記の検討により、ヒポキサンチンは 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 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、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 AAP (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、AAP 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、AAP 投与と同時に 6-MP (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) を AAP 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。

6.4.ヒポキサンチン投与による肝臓内 ATP 濃度の変動の検討

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 濃度に変化が起これば、AAP 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 AAP (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。

7) 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 症例エントリーおよび遺伝子検体・血清検体の採取

研究期間終了までに計 64 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。被疑薬が完全絞り込めない症例もあるが、全体的な傾向として、抗生物質、特に ST 合剤等が鑑別に挙がるケースが多かった。

2) DILI 症例のゲノム解析

2.1.薬物動態関連遺伝子の網羅的解析

本研究において同意を取得した DILI 患者 64 症例を対象として、DMET Plus を用いた薬物動態関連遺伝子の網羅的解析を実施した結果、ほとんどの検体において、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 2-2 には、機能的に特に重要な SNPs について、allele 頻度および 95%信頼区間、ならびに日本人における報告値を示した。添付資料 2-2 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。

2.2.HLA 遺伝子座の解析

一方で、DILI 患者検体の内 54 症例の 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 2-3 にまとめた。ゲノム DNA の濃度や保存状態が必ずしも良好で無かったため、MHC クラス I 遺伝子座では 1 検体、MHC クラス II 遺伝子座では 2 検体が判定不可能であったため、最終的なサンプルサイズはそれぞれ 53 症例、52 症例となった。

ほとんどのハプロタイプでは日本人における報告値と概ね一致した頻度であったが、日本人においてはほとんど検出されないハプロタイプである HLA-B*2704、*2705 および*5504 がそれぞれ 1 allele ずつ検出された (添付資料 2-4)。

2.3.DILI 患者を対象とした GWAS

添付資料 2-5 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) 薬物血中濃度一斉分析系の構築と血中濃度測定の実施

3.1.薬物血中濃度一斉分析系の構築

本研究において要求される性能に最も近い機能を有する Waters 社製 Quattro Premium XE システムを選

定し、血清中薬物濃度測定系の構築を行った。詳細な検討過程は割愛するが、前処理法、使用カラム、検出条件などを最適化し、添付資料 3-1 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。分析結果の典型例を図 8 に示すが、良好な分離・定量が可能である。

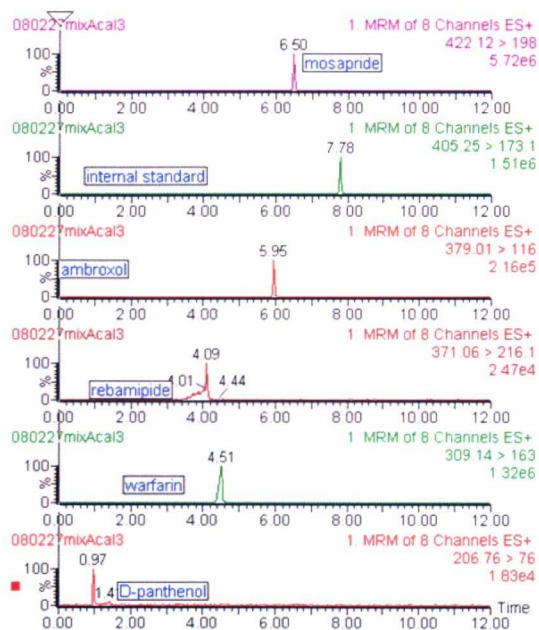


図 8 代表的なクロマトグラム

3.2.DILI 患者検体の測定

添付資料 4-1 には、血中薬物濃度を測定した症例の中で、3 名の ITCZ 服用患者の測定結果を、肝機能マーカーの変動と共に時系列で示した。これらの症例では ITCZ が臨床濃度域より高い値を推移し、かつ ITCZ の濃度が肝機能マーカーとほぼ同期して推移していることが観察された。

4) イトラコナゾール誘発性 DILI のメカニズム解析と in vitro 肝毒性

スクリーニング系の構築

4.1.ラットを用いた胆汁分泌阻害試験

添付資料 4-3 に、ラットを用いた胆汁分泌阻害試験の結果を示す。本検討における ITCZ 血清中濃度は定常状態で約 7,700ng/mL となり、ほぼ設定値 (7,000~8,000 ng/mL) にコントロールされていた (添付資料 4-3)。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、胆汁組成につい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 4-3)。

4.2.in vitro 実験系による ITCZ の胆汁酸、リン脂質輸送阻害作用の検討

上記の in vivo 実験の結果は、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 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 ABCB4 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 4-4)。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 (Data not shown)。

4.3.リン脂質の排出阻害に着目した肝毒性スクリーニング系に関する検討

本研究において ABCB4 による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 4-5 にまとめた。添付資料 4-5 に示すように、7 種類の薬物について *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 (論文投稿準備中のため、具体的な化合物名は開示しない)。

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 4-6)、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、チクロピジン投与により、肝臓中のグルタチオン濃度が大きく減少することが明らかとなった (添付資料 4-8)。

5) DILI の新規バイオマーカー候補物質の定量分析

5.1.少数検体による検討

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 9 に示す。

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。

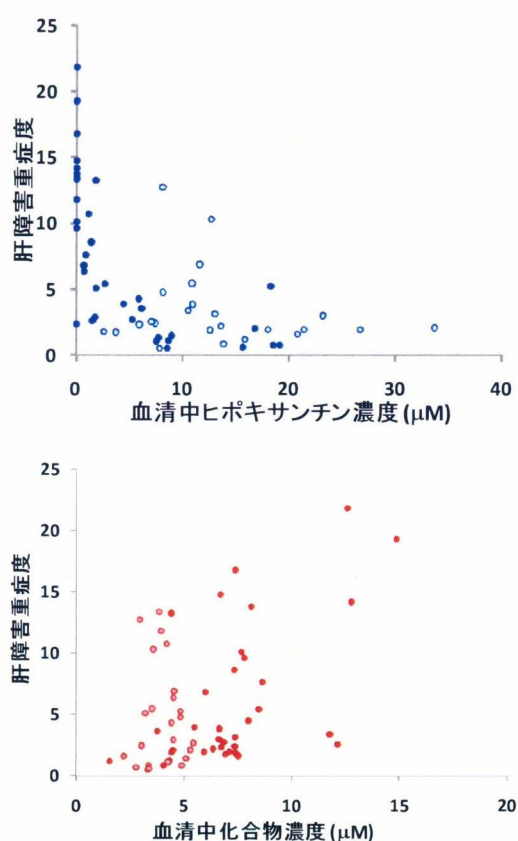


図 9 (上) 肝障害重症度と血清中ヒポキサンチン濃度の関係、(下) 肝障害重症度と総 γ -Glutamyl peptides (γ -Glu-Xs) の濃度の関係。肝障害重症度とは、AST、ALP、 γ -GTP 値の正常上限値との比率の中で最も高値な値を意味する。

5.2.多検体 DILI の新規バイオマーカー候補物質の定量分析

添付資料 5-1 に LC-MS/MS による γ -Glu-Xs およびヒポキサンチンの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 \sim 1 μ M、ヒポキサンチンでは 10nM であった。

添付資料 5-2 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 \pm 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、少数検体での検討と同様の結果が得られた。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 5-3 には、分析を行った DILI 患者 36 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)。

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

6.1. ANIT および CCl₄ 誘発肝障害モデルラットにおける検討

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と考えられ、これまでの報告と一致した傾向であった。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 6-1)。

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 6-2)。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 6-2）。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-MP 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（添付資料 6-3）。

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-MP 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 6-3）。

6.2.ヒポキサンチンによる DILI 治療効果に関する検討

添付資料 6-4 には、24 時間絶食後に LPS(7.4 mg/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 (50 mg/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 6-5）。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 6-6）。

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 6-7）。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（添付資料 6-7）。

6.3.ヒポキサンチン投与による肝臓内 ATP 濃度の変動の検討

添付資料 6-8 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。