

200909003A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

トキシコゲノミクス研究の臨床への展開

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤村 昭夫

平成22（2010）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

トキシコゲノミクス研究の臨床への展開 -----	1
藤村昭夫	

II. 分担研究報告

1. 患者検体を用いたトキシコゲノミクス研究 -----	7
安藤 仁 簗田清次 鈴木光明 森田辰男 草間幹夫	
2. フルタミドの肝障害予測バイオマーカーの同定 -----	10
安藤 仁 森田辰男 中野一彦	
3. 三酸化ヒ素の心毒性の機序解明と予防法の開発 -----	15
安藤 仁 興水崇鏡	
4. ブシラミンの腎障害性のin vitroにおける検討 -----	19
牛島健太郎 津田英利	
5. 薬剤性肝障害を早期に検出するための安全性バイオマーカーの開発 -----	30
興水崇鏡 土屋裕義	
6. 薬剤性腎障害に対する早期発見可能なバイオマーカーの開発 -----	33
興水崇鏡 藤原葉子	

資料（総括・分担研究報告共通） ----- 36

資料 1	研究課題名「末梢血遺伝子発現解析を用いた薬物安全性バイオマーカーの検索」 遺伝子解析研究許可決定通知書・遺伝子解析研究変更許可申請書・ 遺伝子解析研究許可決定通知書（再）・遺伝子解析研究計画書・ 同意説明文書〔関節リウマチ患者用・切迫流早産患者用・前立腺癌患者用・ 口腔咽頭真菌症患者用〕 遺伝子発現解析研究への協力についての同意書・ 遺伝子解析研究への協力の同意撤回文書
資料 2	研究課題名「末梢血遺伝子発現解析による薬物有害反応の機序解明」 遺伝子解析研究許可決定通知書・遺伝子解析研究変更許可申請書・ 遺伝子解析研究許可決定通知書（再）・遺伝子解析研究計画書・ 同意説明文書 遺伝子発現解析研究への協力についての同意書・ 遺伝子解析研究への協力の同意撤回文書

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 103

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 104

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

トキシコゲノミクス研究の臨床への展開

研究代表者 藤村昭夫 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 教授

研究要旨

薬物療法の安全性を向上させることを目的として、これまでの成果をもとにトキシコゲノミクス研究を臨床へ展開した。まず、重篤な有害反応をきたすことが知られている 10 種類の薬物を選択し、いずれかの薬物を使用する患者よりその使用前後で末梢血をサンプリングした。これまでに約 400 検体を収集し、順次、網羅的遺伝子発現解析結果をデータベース化している。次に、このデータベースを利用し、薬物性肝障害を投与前に予測するインデックスを作成した。さらに、臨床研究と並行して培養細胞および動物を用いた研究も実施し、有害反応出現機序の解析や有害反応軽減法の開発を行った。今後はこれらの臨床データと基礎データを照合し、薬物療法における安全性バイオマーカーの同定および有害反応軽減法の確立を目指す。

研究分担者

安藤 仁 自治医科大学薬理学講座
臨床薬理学部門 准教授
興水 崇鏡 自治医科大学薬理学講座
分子薬理学部門 准教授
牛島健太郎 自治医科大学薬理学講座
臨床薬理学部門 助教
森田 辰男 自治医科大学泌尿器科学
教授
簗田 清次 自治医科大学アレルギー
膠原病学 教授
鈴木 光明 自治医科大学産婦人科学
教授
草間 幹夫 自治医科大学歯科口腔
外科学 教授

安全性を確保するための方策の 1 つとしてトキシコゲノミクスが注目されている。これまでわれわれは、平成 14-16 年度（厚生労働省、萌芽的先端医療技術推進研究事業）にプライマリーヒト細胞を用いたトキシコゲノミクス研究を行い、研究基盤を整備し、次いで、平成 17-19 年度（厚生労働省、創薬基盤推進研究事業）にヒト末梢血液細胞を用いたトキシコゲノミクス研究手法を確立した。そこで本研究では、これまでの研究成果を生かしてトキシコゲノミクス研究を臨床に展開し、薬物療法の安全性バイオマーカーを見出すこと、さらに、有害反応発現機序を解明し、有害反応軽減法の開発や有害反応の生じにくい薬物の開発につなげることを目的とする。

A. 研究目的

多くの薬物の中には、臨床開発時あるいは一般臨床で使用中に重篤な有害反応を来し、開発や使用が中止されるものがある。このような薬物を早期に見出し、より高い

B. 研究方法

①患者検体を用いたトキシコゲノミクス研究

自治医科大学附属病院の 4 診療科を受診し、重篤な有害反応をきたすことが知られ

ている以下の薬物を新たに使用することになった成人患者のうち、文書で研究への参加の同意が得られた者を対象に、薬物投与前後で末梢血を採取した（括弧内は重篤な有害反応の種類）。

メトトレキサート（肝障害・腎障害・間質性肺炎）
ブシラミン（肝障害・腎障害・間質性肺炎）
エタネルセプト（間質性肺炎）
レフルノミド（肝障害・間質性肺炎）
リトドリン（肝障害）
リュープロレリン（肝障害・間質性肺炎）
フルタミド（肝障害・間質性肺炎）
ビカルタミド（肝障害・間質性肺炎）
エストラムスチン（肝障害）
イトラコナゾール（肝障害）

また、薬物や有害反応の種類は限定せずに、実際に有害反応をきたした患者より、有害反応出現時、有害反応軽減時の両方または一方で末梢血を採取した。

網羅的遺伝子発現は GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) を用いて解析し、データ解析は GeneSpring GX10 (Agilent) を用いて行った。

②培養細胞および動物を用いたトキシコゲノミクス研究

臨床研究で得られたデータを解析する上で、培養細胞や動物を用いたデータを利用することは有用と考えられる。本年度は、これまでに網羅的遺伝子発現解析を行ったブシラミン、三酸化ヒ素、リトドリンについて、有害反応機序の解析、有害反応軽減法の開発、安全性バイオマーカーの検証を実施した。また、疾患修飾性抗リウマチ薬 (DMARDs) による腎障害を解析するための動物モデルも確立した。

（倫理面への配慮）

臨床研究は、ヘルシンキ宣言（2008年ソウル総会で修正）の趣旨に則り、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号・平成20年厚生労働省告示第415号）および自治医科大学の定めるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する取扱規程を遵守し実施している。各臨床研究の計画は、自治医科大学生命倫理委員会設置規定および遺伝子解析研究倫理審査委員会設置規定の定める遺伝子解析研究倫理審査委員会の審議および審査を経て、自治医科大学学長の許可を得ており（資料1、2）、許可後に試験を開始した。

同意の取得は、倫理審査委員会および学長の承認を得た同意説明文書（資料1、2）を用いて行い、研究への参加に同意が得られた場合には、同意書（資料1、2）に説明を行った医師名を記載し、試料等提供者に同意年月日、住所の記載と、氏名の自署または記名押印をしていただいた。また、同意書の写しとともに、同意の撤回が容易にできるように同意撤回文書（資料1、2）を手渡した。

動物実験は、動物の愛護及び管理に関する法律（昭48年法律第105号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年文部科学省告示第71号）、日本学術会議が策定した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」および自治医科大学動物実験規程に基づき、動物実験委員会の承認を得て実施した。動物愛護の観点から、実験は動物の苦痛をできる限り軽減するように努め、臓器の採取は十分な麻酔下で行った。

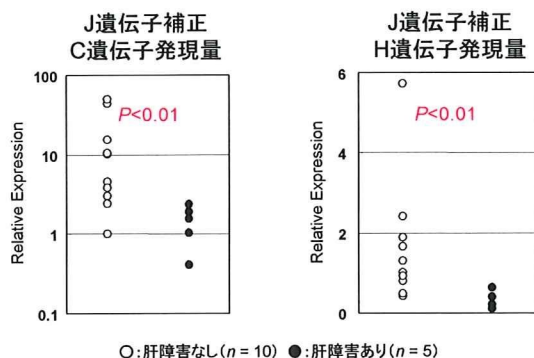
C. 研究結果

①患者検体を用いたトキシコゲノミクス研究

平成 20 年 8 月 22 日より検体の採取を開始し、平成 22 年 3 月 8 日現在までに、「有害反応をきたすことの知られている薬物を投与後の遺伝子発現変化の解析」のための検体を 386 サンプル、「有害反応が出現した患者の遺伝子発現解析」のための検体を 7 サンプル、計 393 サンプルを収集した。

これらの患者のうち、フルタミドが投与された 15 名中 5 名にフルタミドによる肝障害を認めため、肝障害を投与開始後 6 カ月以上認めなかった 10 名と、投与前の遺伝子発現プロフィールを比較した。その結果、GeneGhip で発現量に有意差を認めた遺伝子を 55 種類検出し、これらのうち real-time PCR でも有意差のある遺伝子を 3 種類同定した。現在、これらの遺伝子の発現量を用いた肝障害予測インデックス (図 1) の有用性を検証中である。

図 1 フルタミドによる肝障害を予測する候補インデックス

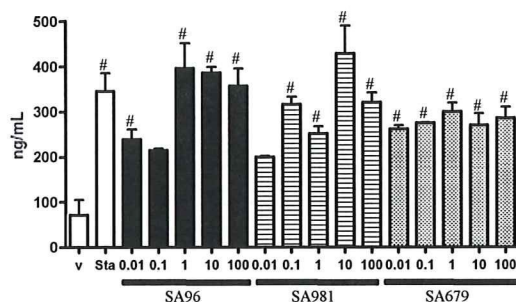


②培養細胞および動物を用いたトキシコゲノミクス研究

《ブシラミンの腎障害発現機序の解析》
HEK293 細胞にブシラミン (SA96) およ

びその代謝物である SA981、SA679 を暴露し、ATP 量を指標に細胞毒性を検討したところ、いずれの化合物も同等の濃度依存的に毒性を認めた。網羅的遺伝子発現解析の結果、ミトコンドリア関連遺伝子の発現変化を認めた。いずれの化合物も、低濃度から細胞内シトクロム c の増加をきたし (図 2)、ミトコンドリア膜電位を低下させたことから、その毒性にはミトコンドリア障害が関与していることが示唆された。

図 2 ブシラミンおよびその代謝物を HEK293 細胞に 24 時間曝露した際の細胞内シトクロム c 量の変化



v; vehicle, Sta; 1 μ M staurosporine
mean \pm SE, n = 3, #; p < 0.01 vs vehicle

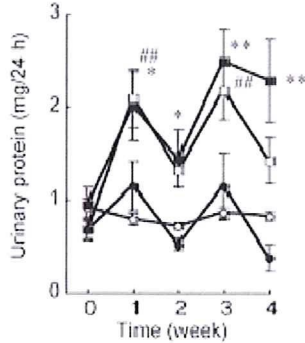
《DMARDs による腎障害モデルマウスの確立》

DMARDs による腎障害発現機序を生体内で解析するために、腎障害モデルマウスの作製を試みた。

7 週齢の BALB/c マウスより片腎を摘出し、1 週間の回復期間後に薬物 A (1000 mg/kg、2000 mg/kg)、および薬物 B (2000 mg/kg) を 1 日 1 回、4 週間経口投与した。その結果、薬物 A に関してはタンパク尿の出現 (図 3) や糸球体への IgG 沈着が確認され、薬物性腎障害モデルの作製に成功した。

現在、本モデルマウスの腎における遺伝子発現を網羅的に解析中である。

図 3 薬物投与開始後の尿タンパク量の推移



■;薬物 A 1000 mg/kg 群、□;薬物 A 2000 mg/kg 群、●;薬物 B 2000 mg/kg 群。同週の対照群に対し、* P<0.05、** P<0.01 (薬物 A 1000 mg/kg 群)、## P<0.01 (薬物 A 2000 mg/kg 群) を示す。

《リトドリンの肝障害発現機序の解析》

C57BL/6J マウスにリトドリン 200 mg/kg を連日 14 日間腹腔内投与し、GeneChip を用いて遺伝子発現データを取得した。vehicle 投与群と比較し有意に 2 倍以上の発現変動を認めた遺伝子をそのオントロジーに従って順位付けをしたところ、発現が上昇した群も低下した群も脂質・ステロイド代謝に関連する遺伝子が顕著に変化していることが明らかになった (図 4)。リトドリンはマウスの糖代謝に実際に影響することも確認しており、これらの遺伝子の中から有用なバイオマーカーを同定できる可能性がある。

《三酸化ヒ素の心毒性予防法の開発》

これまでの in vitro 研究により、三酸化ヒ素 (亜ヒ酸) による腎毒性には酸化ストレスが関与し、抗酸化作用を有する α -リポ酸はその毒性を減弱させることを見出した。そこで、亜ヒ酸の心毒性にも酸化ストレスが関与するかどうかをラットモデルを用いて検討した。

図 4 リトドリンによる発現変化が大である遺伝子オントロジー

Increase □ GO involved in lipid and cholesterol

Term	Count	%	P-Value
cellular lipid metabolic process	25	7.6	2.70E-06
lipid metabolic process	26	7.8	9.80E-06
metabolic process	148	44.2	1.50E-05
electron transport	20	6	4.60E-05
cofactor metabolic process	13	3.9	1.00E-04
generation of precursor metabolites and energy	22	6.6	1.00E-04
lipid transport	8	2.4	3.80E-04
carboxylic acid metabolic process	19	5.7	4.20E-04
coenzyme metabolic process	11	3.3	4.20E-04
organic acid metabolic process	19	5.7	4.30E-04
monocarboxylic acid metabolic process	12	3.6	5.00E-04
alcohol metabolic process	13	3.9	8.60E-04
cellular metabolic process	120	38.2	1.20E-03
water-soluble vitamin biosynthetic process	4	1.2	2.40E-03
intracellular signaling cascade	31	9.3	2.60E-03
fatty acid metabolic process	9	2.7	3.30E-03
vitamin biosynthetic process	4	1.2	3.30E-03
lipid biosynthetic process	11	3.3	4.20E-03
biological regulation	86	25.7	4.90E-03
regulation of small GTPase mediated signal transduct	9	2.7	5.10E-03

Decrease □ GO involved in lipid and cholesterol

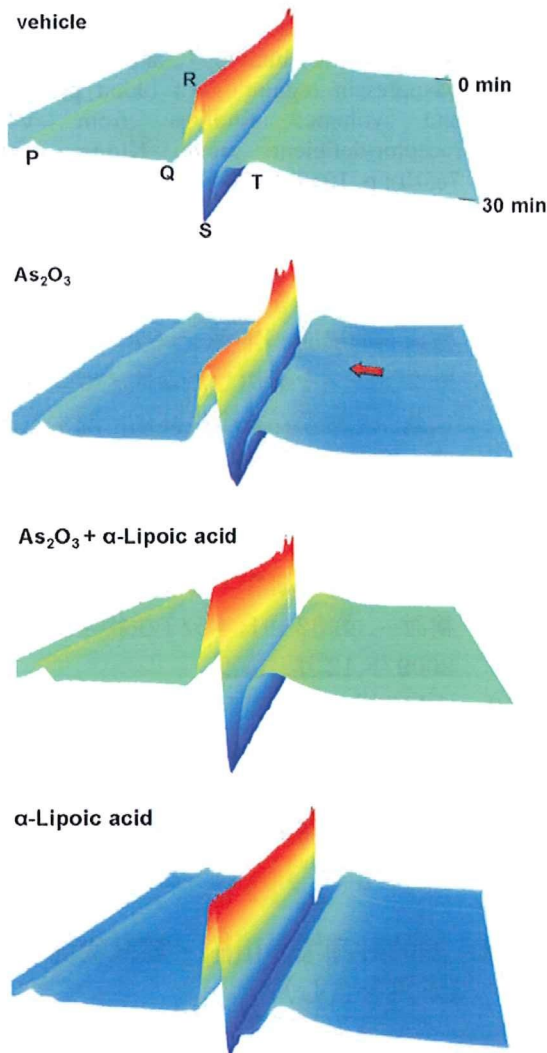
Term	Count	%	P-Value
steroid biosynthetic process	11	2.2	6.70E-10
cholesterol biosynthetic process	10	2	1.00E-09
alcohol metabolic process	25	5.1	1.50E-08
steroid biosynthetic process	13	2.7	5.70E-08
biosynthetic process	60	12.3	9.30E-08
isoprenoid biosynthetic process	8	1.6	9.30E-08
metabolic process	224	45.8	9.60E-08
steroid metabolic process	13	2.7	1.10E-07
steroid metabolic process	17	3.5	3.10E-07
cholesterol metabolic process	12	2.5	3.30E-07
isoprenoid metabolic process	9	1.8	8.80E-07
lipid metabolic process	36	7.4	1.10E-06
cellular lipid metabolic process	31	6.3	8.80E-06
lipid biosynthetic process	19	3.9	1.50E-05
apoptosis	33	6.7	5.10E-05
cell death	34	7	6.10E-05
death	34	7	6.40E-05
primary metabolic process	194	39.7	6.50E-05
programmed cell death	33	6.7	7.10E-05
cellular metabolic process	192	39.3	1.60E-04

Wistar ラットに亜ヒ酸 5 mg/kg を単回静脈内投与すると、投与後早期 (5~15 分) に一過性の ST-T 変化を認めた (図 5)。一方、 α -リポ酸 (70 mg/kg) を前投与したラットでは心電図変化を認めなかった。したがって、亜ヒ酸の心毒性にも酸化ストレスが関与し、 α -リポ酸はその予防薬になることが示唆された。

D. 考察

本研究では、まず第一に、重篤な有害反応をきたすことのある薬物を投与する前後で患者末梢血の遺伝子発現変化を解析した。昨年ひき続き本年度も 200 以上の検体を収集し、世界的にも貴重な臨床検体の遺伝

図 5 亜ヒ酸および α -リポ酸投与後の心電図変化 (Waterfall plot)



子発現データベースを拡充した。また、このデータベースを用いて、フルタミドによる肝障害発現を投与前に予測するインデックスを作成した。このインデックスの臨床的有用性についてはまだ明らかではないが、薬物によっては投与前の遺伝子発現プロファイルが有害反応予測バイオマーカーになるとともに、それらの遺伝子の機能解析をもとに有害反応発現機序を明らかにできる可能性がある。

本研究では、第二に、実験動物や培養細胞を用いた安全性バイオマーカーの検出および有害反応発現機序の解析も実施した。これらの実験系では、末梢血のみの解析では見出すことのできない障害臓器（細胞）自体の遺伝子発現変化や病理学的・生理学的変化を解析することが可能である。今年度も、この手法を用いてブシラミンやリトドリンの臓器障害機序を解析し、さらに、これまでの解析結果をもとに亜ヒ酸の心毒性予防法を見出した。

今後は、臨床検体遺伝子発現データベースのさらなる拡充を図るとともに、それらのデータと基礎実験のデータとの照合を行い、ヒト（臨床）における、有用な安全性バイオマーカーの確立、有害反応発現機序の解明、および有害反応軽減法の開発を進めていく予定である。

E. 結論

重篤な有害反応をきたすことが知られている 10 種類の薬物を投与する前後で患者より末梢血を採取し、その遺伝子発現変化をデータベース化した。このデータベースを利用し、薬物性肝障害を投与前に予測するインデックスを作成した。また、これらのデータを適切に解析するために、培養細胞や動物を用いた薬物性臓器障害モデルを作製し、これらの実験系での検討も行っている。今後は臨床検体のデータと基礎実験のデータを照合し、ヒトにおける安全性バイオマーカーの同定および有害反応軽減法の開発を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koshimizu, T., Tsuchiya, H., Tsuda, H., Fujiwara, Y., Shibata, K., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., and Fujimura, A., Inhibition of heat shock protein 90 attenuates adenylate cyclase sensitization after chronic morphine treatment. **Biochem Biophys Res Commun**, 392(4): p. 603-7. (2010).
2. Koshimizu, T., Fujiwara, Y., Sakai, N., Shibata, K., and Tsuchiya, H., Oxytocin stimulates expression of a noncoding RNA tumor marker in a human neuroblastoma cell line. **Life Sci**, 86(11-12): p. 455-60. (2010).
3. Stojilkovic, S.S., He, M.L., Koshimizu, T., Balik, A., and Zemkova, H., Signaling by purinergic receptors and channels in the pituitary gland. **Mol Cell Endocrinol**. 314(2): p. 184-91. (2010).
4. Ushijima, K., Tsuruoka, S., Tsuda, H., Hasegawa, G., Obi, Y., Kaneda, T., Takahashi, M., Maekawa, T., Sasaki, T., Koshimizu, T., and Fujimura, A., Cranberry juice suppressed the diclofenac metabolism by human liver microsomes, but not in healthy human subjects. **Br J Clin Pharmacol**, 68(2): p. 194-200. (2009).
5. Koshimizu, T. and Tsujimoto, G., New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: vasopressin and pain perception. **J Pharmacol Sci**, 109(1): p. 33-7. (2009).
6. Kojima, Y., Sasaki, S., Oda, N., Koshimizu, T., Hayashi, Y., Kuniwa, M., Tsujimoto, G., and Kohri, K., Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha(1)-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. **Prostate**, 69(14): p. 1521-8. (2009).
7. Hara, T., Hirasawa, A., Sun, Q., Sadakane, K., Itsubo, C., Iga, T., Adachi, T.,

Koshimizu, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., and Tsujimoto, G., Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 380(3): p. 247-55. (2009).

8. Aoyagi, T., Koshimizu, T., and Tanoue, A., Vasopressin regulation of blood pressure and volume: findings from V1a receptor-deficient mice. **Kidney Int**, 76(10): p. 1035-9. (2009).

2. 学会発表

1. 藤村昭夫. トキシコゲノミクス研究の臨床への展開。「トキシコゲノミクスデータベースを活用した毒性メカニズムに基づく医薬品安全性評価に関する研究」発表会. 2009年12月, 東京.
2. 津田英利, 奥水崇鏡, 安藤仁, 藤村昭夫. 抗リウマチ薬ブシラミンのトキシコゲノミクス研究—in vitro における検討—. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月, 横浜.
3. 土屋裕義, 津田英利, 藤村昭夫, 奥水崇鏡. β 2作動薬 Ritodrine 刺激後の肝臓での網羅的遺伝子発現解析. 第19回日本循環薬理学会. 2009年11月, 京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許申請準備 1件

学内審査; 名称 新規創薬バイオマーカーの発見. 発明者; 奥水崇鏡, 土屋裕義, 山田俊幸, 藤村昭夫

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

患者検体を用いたトキシコゲノミクス研究

研究分担者 安藤 仁 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 准教授
研究分担者 簗田清次 自治医科大学アレルギー膠原病学 教授
研究分担者 鈴木光明 自治医科大学産婦人科学 教授
研究分担者 森田辰男 自治医科大学泌尿器科学 教授
研究分担者 草間幹夫 自治医科大学歯科口腔外科学 教授

研究要旨

薬物の有害反応の予測法の開発および毒性機序の解明を目的に、患者の末梢血を用いたトキシコゲノミクス研究を実施中である。重篤な有害反応をきたすことのある 10 種類の薬物を選択し、それらを投与する前後における遺伝子発現プロファイルの変化を解析中である。また、実際に有害反応を生じた患者も対象として検体を収集している。

A. 研究目的

臨床で使用されている薬物には重篤な有害反応をきたすものが少なくなく、個々の患者の治療を行う上で重大な問題となっている。また、薬物の開発には莫大な費用や時間を要するが、有害反応の出現により販売が中止された薬物も少なくない。したがって、有害反応の予測・予防法の確立や有害反応のない薬物の開発が切に望まれている。そこで本研究は、これまでにわれわれが確立してきたトキシコゲノミクス研究手法を用いて、有害反応をきたすことの知られている薬物が患者の遺伝子発現におよぼす影響を網羅的に解析し、薬物の安全性バイオマーカーの同定および毒性発現機序の解明を行うことを目的とした。

B. 研究方法

①有害反応をきたすことの知られている薬物を投与後の遺伝子発現変化の解析

自治医科大学附属病院の 4 診療科を受診し、重篤な有害反応をきたすことが知られ

ている以下の薬物を新たに使用することになった成人患者を対象とした（括弧内は重篤な有害反応の種類）。

メトトレキサート（肝障害・腎障害・間質性肺炎）

ブシラミン（肝障害・腎障害・間質性肺炎）

エタネルセプト（間質性肺炎）

レフルノミド（肝障害・間質性肺炎）

リトドリン（肝障害）

リュープロレリン（肝障害・間質性肺炎）

フルタミド（肝障害・間質性肺炎）

ビカルタミド（肝障害・間質性肺炎）

イトラコナゾール（肝障害）

リン酸エストラムスチンナトリウム（肝障害・血栓塞栓症）

培養細胞や実験動物と異なり、患者ではその背景因子が多様であることから、使用頻度が比較的高い薬物を選択した。なお、平成 21 年度よりリン酸エストラムスチンナトリウムを対象薬に追加した。

対象者より文書にて同意を取得後、試験薬の投与前（投与開始 1 ヶ月以内）と投与後に静脈血を採取した。試験薬投与後の採

血は2回行い、外来患者の場合は、通常、試験薬投与開始後の次回再診日と次々回再診日とした（ただし、リトドリン、リュウプロレリンの場合のみ、最終採取日をそれぞれ試験薬終了時、試験薬投与後6ヵ月～1年後とした）。採取した全血は、直ちにパクスジーン RNA 採血管に注入し、RNA を安定化させた上で-80℃に保存した。また、全血の一部より血清を分離し、-80℃に保存した。

現在、パクスジーン RNA 採血管に採取した検体より、RNA の単離、cDNA 合成、ラベリングを行い、Affymetrix 社 GeneChip を用いた遺伝子発現解析を逐次行っている。

②有害反応が出現した患者の遺伝子発現解析

①とともに、実際に有害反応をきたした患者を対象としたサンプリングも開始した。4診療科で治療中の患者のうち、現在または以前に何らかの薬物で有害反応をきたした患者を対象に、有害反応出現時、有害反応軽減時の両方または一方で静脈血を採取し保存している。検体数がある程度集まった時点で、①と同様の解析を行う予定である。

(倫理面への配慮)

これらの臨床研究は、ヘルシンキ宣言（2008年ソウル総会で修正）の趣旨に則り、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号・平成20年厚生労働省告示第415号）および自治医科大学の定めるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する取扱規程を遵守し実施している。各臨床研究の計画は、自治医科大学生命倫理委員会設置規定および遺伝子解析研究倫理審査委員会設置規定の定

める遺伝子解析研究倫理審査委員会の審議および審査を経て、自治医科大学学長の許可を得ており（資料1、2）、許可後に試験を開始した。

試料等提供者の不利益や危険性をできる限り排除するため、対象は本研究への参加の同意が文書で得られる成人患者のみとし、高度の貧血がある者や医師により不適当と判断された者は除外した。また、研究用の採血は保険診療用の採血時に合わせてなるべく行い、保険診療で一般血液検査を行わない場合には本研究費よりその費用を支出することにより、試料等提供者の精神的、肉体的、経済的負担を生じさせないようにした。

同意の取得は、倫理審査委員会および学長の承認を得た同意説明文書（資料1、2）を用いて行い、研究への参加に同意が得られた場合には、同意書（資料1、2）に説明を行った医師名を記載し、試料等提供者に同意年月日、住所の記載と、氏名の自署または記名押印をしていただいた。また、同意書の写しとともに、同意の撤回が容易にできるように同意撤回文書（資料1、2）を手渡した。

個人情報の保護のため、研究者は提供者のエントリー後に直ちに識別コードを付し、試料、臨床データ等の匿名化を行った。なお、個人情報の電子化は行わず、匿名化の対応表は手書きのノートの上に記載し、施錠した場所に厳重に管理している。

C. 研究結果

平成20年8月22日より検体採取を開始し、平成22年3月8日現在までに、「①有害反応をきたすことの知られている薬物を投与後の遺伝子発現変化の解析」のための検体を386サンプル、「②有害反応が出現した患者の遺伝子発現解析」のための検体を7サンプル、計393サンプルを収集した。

D. 考察

トキシコゲノミクス研究のための貴重な臨床サンプルの収集を実施している。今後も継続的にサンプル数を増やし、遺伝子発現データベースをさらに充実させていく予定である。

E. 結論

倫理面に十分に配慮した上で、患者の血液検体のサンプリングを実施し、順調に遺伝子発現データをデータベース化している。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 藤村昭夫. トキシコゲノミクス研究の臨床への展開. 「トキシコゲノミクスデータベースを活用した毒性メカニズムに基づく医薬品安全性評価に関する研究」発表会. 平成 21 年 12 月, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

フルタミドの肝障害予測バイオマーカーの同定

研究分担者 安藤 仁 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 准教授
研究分担者 森田辰男 自治医科大学泌尿器科学 教授
研究協力者 中野一彦 自治医科大学泌尿器科学 臨床助教

研究要旨

フルタミドの肝障害を投与前に簡便かつ正確に予測するバイオマーカーを見出すことを目的に、フルタミドを投与前の患者より採取した末梢血液細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。まず、フルタミドによる肝障害を認めた5例と肝障害を認めなかった10例を比較し、GeneChipの遺伝子発現量に2倍以上の有意差を認める遺伝子を55種類見出した。このうち、リアルタイムPCRでも有意差を認める遺伝子を3種類選出し、2種類の肝障害予測インデックスを作成した。次に、これらのインデックスの妥当性を異なる11例において評価した。11例中肝障害を認めた2例ではいずれのインデックスも肝障害のリスクが高いと予測される値であったことから、例数は少ないものの、これらの妥当性が示唆された。今後は、その有用性と肝障害予測機序についてさらに検討していく予定である。

A. 研究目的

わが国における前立腺癌の罹患率は年々増加しており、2020年には前立腺癌が肺癌に次いで男性癌の2番目になると予想されている。前立腺癌の治療には外科治療、放射線療法、薬物療法があるが、特に抗アンドロゲン薬を用いた内分泌療法は、限局性前立腺癌の進行予防、根治術後の再発予防、進行性前立腺癌の予後改善に効果があることから、様々な前立腺患者に広く用いられている。代表的な抗アンドロゲン薬であるフルタミドは薬物性肝障害を高頻度（約10%~30%）に惹起し、まれながら重篤化することもあるため、臨床上、この有害反応が大きな問題となっている。フルタミドの肝障害を投与前に予測する方法としては、これまでのところ、フルタミドの主要代謝酵素であるチトクロームP450（CYP）1A2の活性をカフェイン負荷試験により評価する方法が報告されており、CYP1A2活性が

低い患者では肝障害が生じやすいことが示されている。しかしながら、それ以外には肝障害を予測する方法はなく、簡便な方法もない。そこで本研究では、フルタミド内服前の患者の末梢血を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、フルタミドの肝障害を正確かつ簡便に予測するバイオマーカーを見出すことを目的とした。

B. 研究方法

自治医科大学附属病院泌尿器科を受診し、前立腺癌治療のためにフルタミドが投与前となった患者を対象とした。対象者より文書にて同意を取得後、フルタミドの投与前（投与前開始当日または前日）に静脈血を採取した。採取した全血は、直ちにパクスジーンRNA採血管（日本ベクトン・ディッキンソン）に注入し、RNAを安定化させた上で-80℃に保存した。後日、パクスジーン Blood RNA Kit（Qiagen）を用いてRNA

を単離後、GLOBINclear Systems (Applied Biosystems) によりグロビン mRNA を除去し mRNA を精製した。

網羅的遺伝子発現解析は、精製した mRNA より Ovation RNA Amplification System V2 (NuGEN) を用いて cDNA の合成・増幅を行い、FL-Ovation V2 による cDNA ラベリング・断片化を行った後、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) へ hybridization し蛍光イメージを取得した。データの解析は GeneSpring GX10 (Agilent) を用いて行った。

定量的リアルタイム PCR は、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成後、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を使用し実施した。なお、すべてのプライマー・プローブセットは TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を使用した。

(倫理面への配慮)

これらの臨床研究は、ヘルシンキ宣言 (2008年ソウル総会で修正) の趣旨に則り、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、臨床研究に関する倫理指針 (平成16年厚生労働省告示第459号・平成20年厚生労働省告示第415号) および自治医科大学の定めるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する取扱規程を遵守し実施している。各臨床研究の計画は、自治医科大学生命倫理委員会設置規定および遺伝子解析研究倫理審査委員会設置規定の定める遺伝子解析研究倫理審査委員会の審議および審査を経て、自治医科大学学長の許可を得ており (資料1)、許可後に試験を開始した。

試料等提供者の不利益や危険性をできる限り排除するため、対象は本研究への参加

の同意が文書で得られる成人患者のみとし、高度の貧血がある者や医師により不適当と判断された者は除外した。また、研究用の採血は保険診療用の採血時に合わせてなるべく行い、保険診療で一般血液検査を行わない場合には本研究費よりその費用を支出することにより、試料等提供者の精神的、肉体的、経済的負担を生じさせないようにした。

同意の取得は、倫理審査委員会および学長の承認を得た同意説明文書 (資料1) を用いて行い、研究への参加に同意が得られた場合には、同意書 (資料1) に説明を行った医師名を記載し、試料等提供者に同意年月日、住所の記載と、氏名の自署または記名押印をしていただいた。また、同意書の写しとともに、同意の撤回が容易にできるように同意撤回文書 (資料1) を手渡した。

個人情報の保護のため、研究者は提供者のエントリー後に直ちに識別コードを付し、試料、臨床データ等の匿名化を行った。なお、個人情報の電子化は行わず、匿名化の対応表は手書きのノートのみに記載し、施錠した場所に厳重に管理している。

C. 研究結果

平成20年9月より平成21年2月の間に、16名の患者より同意を取得し検体を採取した。16名中10名はフルタミドを6ヵ月以上継続したが、6名は担当医が薬物性肝障害と判断したためにフルタミドを中止した (表1)。6名中5名では、フルタミドの中止後に速やかな肝機能値異常の改善を認めており、フルタミドによる肝障害と診断した。一方、残りの1名については肝障害とフルタミドの関連性が明らかではなかった。

フルタミドによる肝障害を認めた5名 (肝障害あり群) と肝障害を認めなかった

10名（肝障害なし群）では、年齢、体格・肥満度、喫煙・飲酒、病期、病理学的悪性度、PSA値、腎機能、肝機能値などの臨床背景には差異を認めなかった（表2）。

表1 16名の肝障害の有無

被験者No.	フルタミドによる肝障害	中止までの投与日数	最大AST (IU/L)	最大ALT (IU/L)
2001	無	6か月以上継続	44	30
2005	無	6か月以上継続	26	39
2007	無	6か月以上継続	20	15
2008	無	6か月以上継続	26	12
2009	無	6か月以上継続	19	20
2012	無	6か月以上継続	31	26
2014	無	6か月以上継続	18	15
2016	無	6か月以上継続	20	17
2017	無	6か月以上継続	36	36
2019	無	6か月以上継続	36	24
2004	有	56日	91	268
2006	有	7日	96	219
2010	有	63日	138	44
2015	有	119日	136	200
2018	有	28日	78	58
2013	有?	6か月後	33	35

表2 15名の臨床背景

	肝障害なし	肝障害あり
<i>n</i>	10	5
年齢(歳)	72 ± 6	73 ± 4
BMI(kg/m ²)	23.6 ± 2.7	24.2 ± 2.0
体表面積(m ²)	1.61 ± 0.15	1.59 ± 0.07
現在の喫煙	3(30%)	1(25%)
現在の飲酒	3(30%)	2(40%)
病期(1-4)	2.6 ± 0.7	3.2 ± 0.8
Gleason score(2-10)	7.4 ± 1.0	7.8 ± 1.3
PSA(ng/mL)	15.1	26.8
Cr(mg/dL)	0.82 ± 0.15	0.93 ± 0.26
推算GFR(mL/min/1.73m ²)	72.6 ± 13.2	65.9 ± 18.4
AST(IU/L)	23 ± 5	28 ± 16
ALT(IU/L)	17 ± 5	21 ± 10
ALP(IU/L)	224 ± 40	290 ± 184
WBC(×10 ³ /μL)	6.8 ± 1.8	6.2 ± 2.3
Hb(g/dL)	14.0 ± 0.8	12.8 ± 2.4
Plts(×10 ⁴ /μL)	23.4 ± 6.2	23.7 ± 5.3

Data are mean ± SD, median, or n(%).

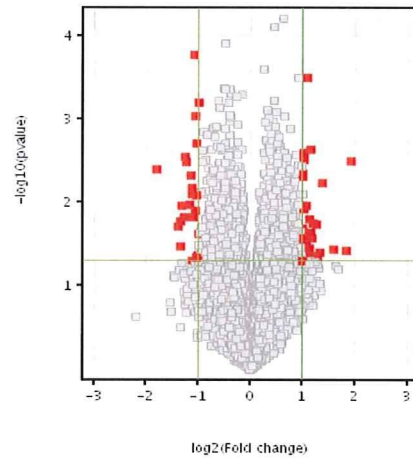
一方、網羅的遺伝子発現解析では、末梢血液細胞における遺伝子発現量に両群間で2倍以上の有意差 ($p < 0.05$) のある遺伝子を55種類見出した（図1）。このうち、annotationがありp値が小である上位26遺伝子についてリアルタイムPCRを施行したところ、GAPDHを内因性コントロールとした $\Delta\Delta Ct$ 法においても両群間で発現量に有意差を認める遺伝子を3種類同定

図1 GeneChipにより解析した2群間の遺伝子発現量の差異（Volcano plot）

Test Description
Selected Test: T Test unpaired
p-value computation: Asymptotic
Multiple Testing Correction: No Correction

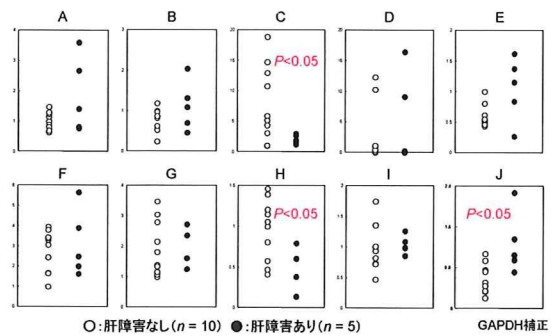
Result Summary

	P all	P < 0.05	P < 0.02	P < 0.01	P < 0.0050	P < 0.0001
FC all	31228	1657	619	306	149	25
FC > 1.1	16437	1642	616	306	149	25
FC > 1.5	1175	386	177	102	51	9
FC > 2.0	137	55	32	20	15	4
FC > 3.0	7	4	2	2	2	0
Expected b...		1561	624	312	156	31



* ■は両群間で2倍以上、 $p < 0.05$ の差異を認めた遺伝子

図2 リアルタイムPCRにより解析した2群間の遺伝子発現量の差異



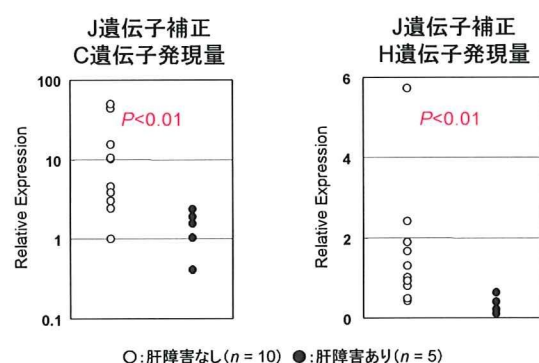
* 図には10遺伝子の結果を提示

した（図2）。この3遺伝子中2遺伝子（遺伝子C、H）は、肝障害なし群と比べ肝障害あり群では発現量が少なく、1遺伝子（遺伝子J）では反対に発現量が多かった。そこで、内因性コントロールの影響を除外す

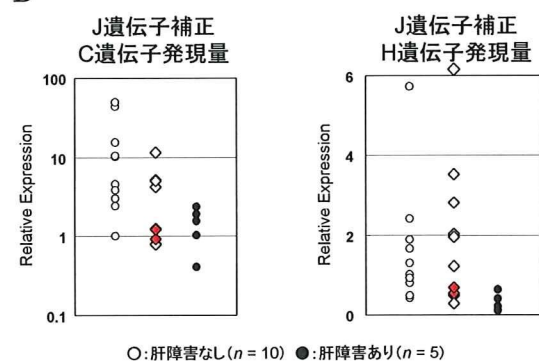
る目的も併せ、C 遺伝子発現量および H 遺伝子発現量を J 遺伝子発現量で補正した $\Delta\Delta Ct$ 値を算出した。その結果、両群間の有意差はさらに顕著になった (図 3A)。

図 3 フルタミドによる肝障害を予測する候補インデックス

A



B



* インデックスの妥当性を検討した 11 名 (◇) 中、フルタミドによる肝障害を認めた 2 名 (◇) のインデックスはともに低値であった。

次に、このインデックスの妥当性を評価するために、平成 21 年 3 月より平成 21 年 8 月の間に、さらに 12 名の患者より同意を取得し検体を採取した。12 名中 9 名はフルタミドを 6 ヶ月以上継続したが、3 名は肝障害の出現によりフルタミドを中止した。3 名のうち 1 名は、肝障害がごく軽度であり、フルタミド中止後も肝機能値に変化がなか

ったことより、フルタミドによる肝障害とは診断できなかった。残りの 2 名は、経過よりフルタミドによる肝障害と考えられた。図 3B に示すごとく、これらの肝障害を認めた 2 名ではフルタミド内服前の 2 種類のインデックスがともに低値であり、例数は少ないものの、これらの肝障害予測インデックスの妥当性が示唆された。

D. 考察

本研究により、末梢血液細胞の特定の遺伝子の mRNA 発現量を測定することによりフルタミドの肝障害を投与前に予測することが可能であることが示唆された。現在のところ、今回作成したインデックスの有用性 (感度・特異度・精度) は不明であり、今後、症例数を十分に増やして検証を行う必要がある。また、今回同定した遺伝子はそれぞれフルタミドの肝障害発症に関連すると推察されることから、各遺伝子の発現量が肝障害と関連する機序についても検討する必要がある。本研究では、ひき続いて症例数を積み重ね、同定した各遺伝子の機能解析も実施する予定である。

E. 結論

末梢血液細胞の遺伝子 mRNA 発現量を測定することにより、フルタミドの肝障害を投与前に予測するマーカー遺伝子候補を見出した。今後はその有用性と機序について、さらに検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 藤村昭夫, トキシコゲノミクス研究の

臨床への展開.「トキシコゲノミクスデータベースを活用した毒性メカニズムに基づく医薬品安全性評価に関する研究」発表会.
平成 21 年 12 月, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

なし

三酸化ヒ素の心毒性の機序解明と予防法の開発

研究分担者 安藤 仁 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 准教授
研究分担者 興水崇鏡 自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門 准教授

研究要旨

これまでに、三酸化ヒ素（亜ヒ酸）による腎毒性には酸化ストレスが関与し、抗酸化作用を有する α -リポ酸はその毒性を減弱させることを見出した。そこで本研究では、亜ヒ酸の心毒性にも酸化ストレスが関与するか否かをラットモデルを用いて検討した。亜ヒ酸を単独投与したラットでは投与後に一過性のST-T変化を認めたが、 α -リポ酸を前投与したラットでは亜ヒ酸による心電図変化を認めなかった。したがって、亜ヒ酸の心毒性にも酸化ストレスが関与し、 α -リポ酸はその予防薬になることが示唆された。

A. 研究目的

急性前骨髄性白血病（APL）の治療薬である亜ヒ酸は、有害反応の発現頻度が80%以上と非常に高く、有害反応により臨床での使用が制限されることが少なくない。亜ヒ酸は、白血病細胞のみならず、各種正常細胞に対しても毒性を有するため、腎障害や肝障害を生じることがある。さらに、亜ヒ酸は心電図変化を惹起することが多く、致命的な心室性不整脈を生じた症例も報告されていることから、その心毒性は臨床で大きな問題となっている。これまでに著者らの教室では、亜ヒ酸による腎毒性には酸化ストレスが関与しており、抗酸化作用を有する α -リポ酸は亜ヒ酸の細胞毒性を軽減することを*in vitro*において明らかにした。そこで、本研究では、亜ヒ酸による心毒性にも酸化ストレスが関与しているか否かを明らかにする目的で、亜ヒ酸による心電図変化におよぼす α -リポ酸の効果をラットを用いて検討した。

B. 研究方法

①亜ヒ酸による心電図変化モデルの作製

雄性Wistarラット（日本SLC）を8週齢で購入し、1週間馴化後に実験に供した。60%ウレタン麻酔下で、ラットに心電図計（PowerLab, ADInstruments）、薬物注入手用カテーテル（大腿静脈）を装着し、vehicleまたは亜ヒ酸を単回投与した：(1) 対照群 vehicle（生理食塩液）、(2) 亜ヒ酸 0.15 mg/kg（ヒトの臨床用量に相当）、(3) 亜ヒ酸 1.5 mg/kg（ヒトの臨床用量の10倍に相当）、(4) 亜ヒ酸 5 mg/kg、各群 n=4。心電図の変化は薬物投与後120分間計測し、専用の解析ソフト（MLS360 ECG 解析モジュール, ADInstruments）を用いて解析した。QTc値はBazettの式により算出した。

②亜ヒ酸による心電図変化に対する α -リポ酸の効果

①で確立したラットモデルに対し、亜ヒ酸投与5分前に以下の条件により α -リポ酸（NaOHおよびHClにてpH 7.4に調製）を静脈内投与した：(1) 対照群 vehicle（生理食塩液）、(2) 亜ヒ酸 5 mg/kg、(3) 亜ヒ酸 5 mg/kg + α -リポ酸 70 mg/kg、(4) α -リポ酸 70 mg/kg、各群 n=4。心電図の変化は

薬物投与後 120 分間計測し、同様に解析を行った。

(倫理面への配慮)

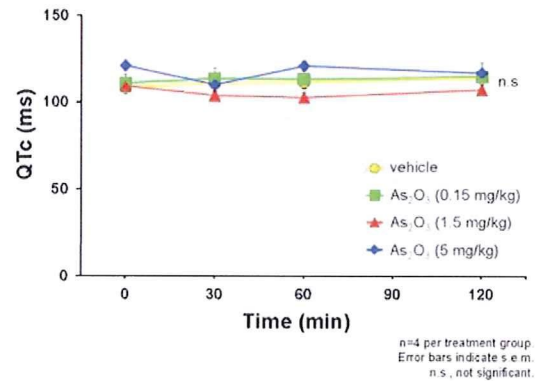
動物実験は、動物の愛護及び管理に関する法律（昭 48 年法律第 105 号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年環境省告示第 88 号）、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年文部科学省告示第 71 号）、日本学術会議が策定した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」および自治医科大学動物実験規程に基づき、動物実験委員会の承認を得て実施した。動物愛護の観点から、実験は動物の苦痛をできる限り軽減するように努め、実験後はウレタンを静脈内投与して安楽死を行った。

C. 研究結果

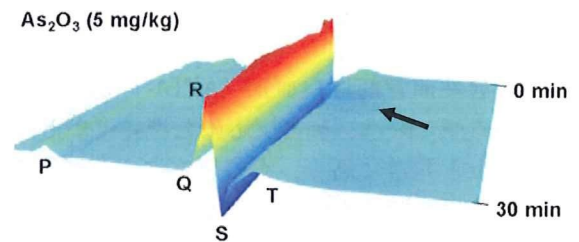
臨床では亜ヒ酸による QT 延長が報告されていることから、ラットに亜ヒ酸を単回投与し 120 分後まで QTc 値を観察した。しかし、高用量（5 mg/kg）の亜ヒ酸を投与した場合にも QTc 値の延長は認めなかった（図 1）。一方、高用量の亜ヒ酸を投与したラットでは、全例で投与後早期（5～15 分）に ST-T 変化を認め（図 2、矢印部分；特に T 波の平坦化が著明である）、この変化は投与後 30 分までに消失した。

次に、 α -リポ酸の前投与により、亜ヒ酸による ST-T 変化を予防できるか否かを検討した。この検討においても、亜ヒ酸 5 mg/kg の単回投与は一過性の ST-T 変化を惹起した（図 3・図 4、赤矢印部分）。一方、 α -リポ酸を前投与したラットでは ST-T 変化は全く認めなかった（図 3、青矢印部分・図 4）。なお、 α -リポ酸自体は心電図に影響を及ぼさなかった（図 3・図 4）。

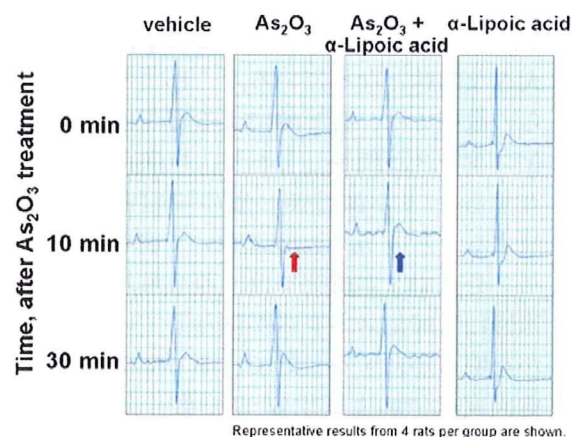
【図 1】亜ヒ酸単回投与後の QTc 値変化



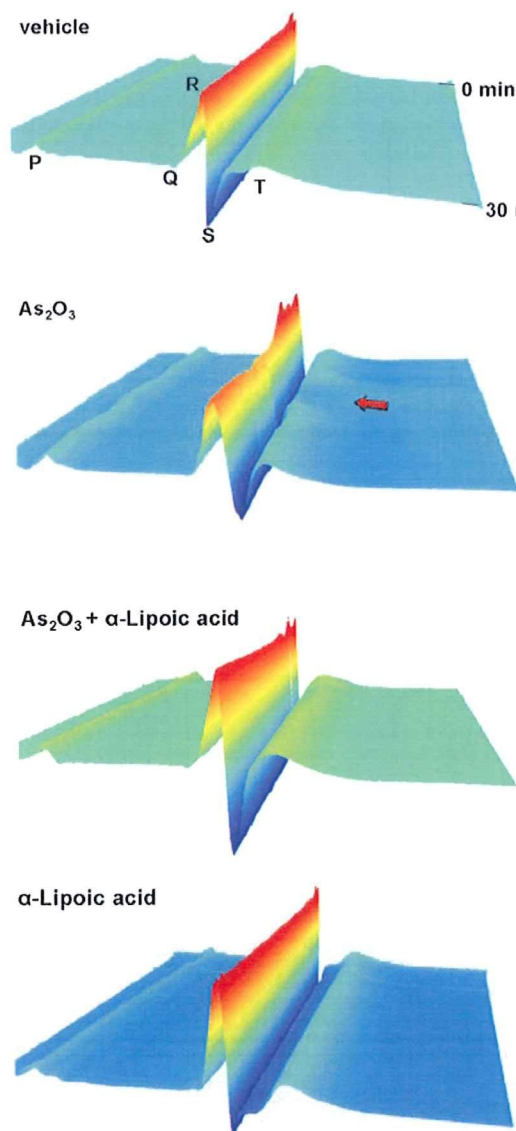
【図 2】亜ヒ酸 5mg/kg 投与後の心電図変化 (Waterfall plot)



【図 3】亜ヒ酸および α -リポ酸投与後の心電図変化 (亜ヒ酸投与後 0、10、30 分)

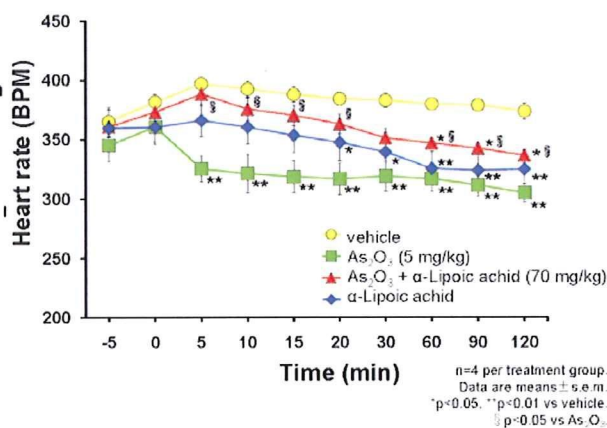


【図 4】 亜ヒ酸および α -リポ酸投与後の心電図変化 (Waterfall plot)



また、心拍数の変化についても解析した結果、亜ヒ酸 5 mg/kg を静脈内投与したラットは vehicle 群に比べて有意な心拍数低下を示したが ($p < 0.01$)、この心拍数低下は α -リポ酸の前投与により有意に抑制された ($p < 0.05$) (図 6)。

【図 6】 亜ヒ酸および α -リポ酸投与ラットの心拍数変化



D. 考察

亜ヒ酸は、ラットの QTc 値を延長させることはなかったが、一過性ながら ST-T 変化を惹起し、ラットにおいても心毒性を有することが示唆された。この毒性は α -リポ酸の前投与により明確に予防することができたことから、腎毒性と同様に酸化ストレスが関与しているものと考えられた。今後は、ヒトにおいても α -リポ酸が亜ヒ酸の心毒性予防に有用か否かを明らかにする必要がある。

E. 結論

亜ヒ酸による心毒性モデルラットを確立し、その予防に α -リポ酸が有効であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

[1] 藤村昭夫. トキシコゲノミクス研究の臨

床への展開。「トキシゲノミクスデータベースを活用した毒性メカニズムに基づく医薬品安全性評価に関する研究」発表会。平成 21 年 12 月，東京。

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

なし