

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

大規模生体内分子測定による
薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究

平成 21 年度
総括研究報告書

研究代表者	曾我 朋義
分担研究者	本間 雅
分担研究者	渡部 浩治
分担研究者	奈良岡 準
分担研究者	竹内健一郎

平成 22 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書 大規模生体内分子測定による 薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
III. 研究成果の刊行物・別刷	

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

大規模生体内分子測定による薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究

研究代表者：

○曾我 朋義（慶應義塾大学先端生命科学研究所・教授）

研究分担者：

○本間 雅（東京大学医学部附属病院・助教）

○渡部 浩治（アステラス製薬（株）安全性研究所・室長）

○奈良岡 準（アステラス製薬（株）安全性研究所・主任研究員）

○竹内健一郎（アステラス製薬（株）安全性研究所・研究員）

研究要旨

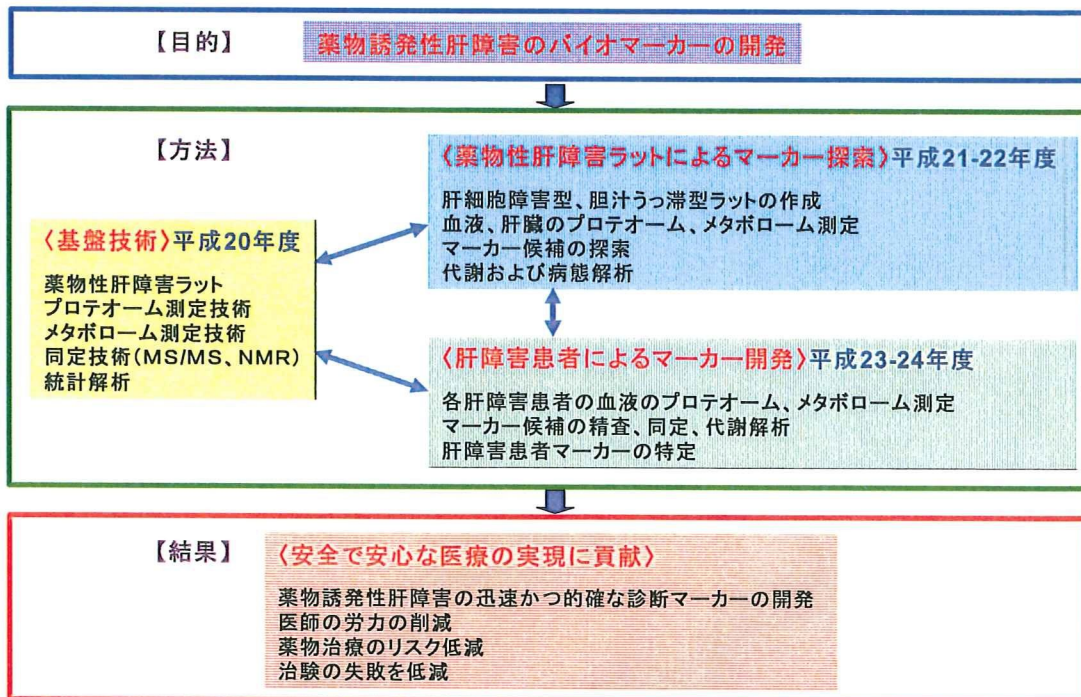
一般に薬物誘発性毒性は肝障害として現れる例が多く、東京大学医学部附属病院においても、薬物性肝障害発症患者は年間約 100 名程度と見積もられている。しかしながら、薬物性肝障害に共通する特徴的な所見は必ずしも無く、現状では確定診断は困難である。また、糖尿病治療薬トログリタゾンのように投与中止後も症状が悪化する例も報告されており、薬物性肝障害の確定診断を可能にする所見の発見は急務である。本研究は、最新の測定技術を用いて生体内の内因性分子を大規模に測定し、薬物性肝障害の早期かつ正確な診断マーカーの開発を目指すものである。平成 20 年度は、低用量リポポリサッカライドの前感作を行うことで、薬物性肝障害モデル動物を作成する手法を確立した。また、各種肝障害患者の検体集積システムを構築し、大規模メタボローム解析の準備も進めた。本年度は、昨年度に確立した技術的基盤をさらに整備すると共に、モデル動物の解析より見出されたバイオマーカー候補物質に関して、ヒト臨床検体を用いて検証を行った。また、薬物性肝障害の発症メカニズムとの関連に関しても検討を加えた。その結果、肝障害に広く共通するバイオマーカーとして、複数のオフタルミン酸関連ペプチドを見出し、またそれらの濃度変動を組み合わせることで、発症原因を峻別診断できる可能性が示された。この結果は同時に、肝臓内グルタチオン・レベルの低下が、肝障害発症に関連する重要なメカニズムの一つとなっている可能性を強く示唆している。この点は、動物モデルを用いた薬物性肝障害の発症メカニズム解析からも、強く支持される結果となった。さらに、薬物誘発性肝障害が急性肝障害であることを反映して、特異的に変動すると考えられるバイオマーカー候補物質を新たに 2 種類見出すことができた。平成 22 年度以降はこれら新規バイオマーカーの変動メカニズムを臨床検体および動物モデルを用いた検討を通じて明らかにし、ヒトにおける診断バイオマーカーの確立・検証に向けた準備を進める予定である。

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例が多く、東京大学医学部附属病院においても、薬物性肝障害発症患者は、年間約 100 名程度と見積もられている。厚生労働省が「重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害」で注意喚起しているように、薬物性肝障害は発症の予測が困難である上に、重篤化して死に至るケースもあり得る重要な薬物有害作用であるため、これを早期に発見し、重症化を予測可能な診断法の開発が強く望まれている。しかしながら、この疾患に対する正確で迅速な診断法は未だ充分には確立されておらず、実臨床で薬物性肝障害が疑われる症例では、従来から用いられている肝機能検査値の他、薬物投与から発症までの期間や、飲酒などの危険因子を考慮したスコアリングにより、薬物性肝障害の診断を行うが、薬物性肝障害に共通する特徴的な所見は必ずしも無く、現状では確定診断は困難である。このため薬物以外の原因を検討した上で消去法的に、「薬物誘発性の肝障害が強く

疑われる」という形で診断されるのが通例である。また、この段階で、疑わしい薬物の投与を中止し経過を観察するのが一般的であり、多くのケースでは症状は軽快に向かうが、中には糖尿病治療薬トログリタゾン（現在は市場撤退）のように投与中止後も症状が悪化する例も報告されており、薬物性肝障害の確定診断を可能にする所見の発見は急務である。また、現在の検査値は肝細胞壊死後に上昇する酵素群であるため、肝細胞壊死前の早期判断は不可能という問題点もある。

本研究では、肝細胞障害型および胆汁うっ滞型の肝障害を誘発するモデル動物をそれぞれ構築するとともに、実臨床で使用される薬物による肝障害を再現する動物モデルの作成を試みる。また、これらの肝障害モデルおよびコントロール動物の肝臓と血清の生体内分子（代謝物、ペプチド、タンパク質）を網羅的に測定し、肝細胞障害型、胆汁うっ滞型の薬物性肝障害のみに検出される薬物性肝障害マーカーを探索する。さらに薬物性肝障害およびウィルス性肝炎の患者および健常人の血液を測定し、肝細胞障害型あるいは胆汁うっ滞型薬物性肝障害を反映し、実臨床において有用な薬物性肝障害マーカーを開発する（図）。



このようなオミクス技術を駆使した大規模なマーカー探索は前例を見ないものであり、薬物性肝障害に特異的なマーカーが発見されれば世界で初めての事例となる。さらに、動物モデルと臨床研究試料の解析結果の比較、および動物モデルでの更なる検討等により、当該バイオマーカーの変動の分子メカニズムの解明も目指しており、これらの研究を通して創薬段階において、肝障害を誘発しうる薬剤の早期発見への道を拓き、また臨床においても、薬物治療のリスクが把握し、投与量や薬剤の変更など治療上取れる

オプションを広げることが可能となり、安全で安心な医療の実現に大きく貢献すると考えている。

研究初年度である平成20年度は、薬物誘発性肝障害モデルの作製を中心に検討を行い、また臨床検体の収集システムの構築も併せて行った。研究開始後2年目に当たる平成21年度は、肝障害モデル動物の解析より見出されていたバイオマーカー候補物質に関して、ヒト臨床検体を用いて検証を行うと共に、薬物誘発性肝障害の発症過程との関連に関して、モデル動物を用いて検討を加えた。

B. 研究方法

1. ヒト肝障害検体を用いた、バイオマーカー候補物質の有用性検証

初年度に構築した患者血清検体の収集システムに従って、東京大学医学部附属病院内で発生した各種肝障害症例を対象に、生化学検査に用いた血清検体の余剰分を解析用の検体として収集した。また、山形大学医学部河田純男先生らのグループにもご協力をいただき、最終的に本年度中に、薬物誘発性肝障害検体 31 検体、B 型ウイルス性肝炎 18 検体、C 型ウイルス性肝炎 58 検体、肝細胞癌 33 検体、非アルコール性脂肪性肝炎 11 検体、単純性脂肪肝 9 検体、健常コントロール 10 検体の収集が完了した。

引き続き、これらの検体に関して、前年度までを含めたこれまでの検討によって、薬物誘発性肝障害の動物モデルにおいて、血清中濃度が上昇することが明らかとなっていたオフタルミン酸関連ペプチド複数種類に特に着目して、高速液体クロマトグラフィ-質量分析計 (LC-MS/MS) の多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring, MRM) 法を用いて高感度に一斉定量し、結果の解析を行った。

2. 肝細胞障害型および胆汁うっ滞型 (混合型) 肝障害モデル動物の確立

薬剤誘発性肝障害の動物モデルとしてはリポポリサッカライドの腹腔

内前感作と、薬物の静脈内投与を組み合わせたラットモデルを用いることとした。また、実臨床で用いられる薬物の中で、肝障害の頻度が高いことが報告されている代表的な薬物としてポリコナゾールおよびジクロフェナクをモデルに用いることとした。水は自由に飲める状態で 24 hr 絶食させた Wistar 系雄ラットに、エーテル麻酔下、リポポリサッカライド (LPS 1mg/kg = 3.0×10^6 EU/kg) もしくはコントロール群として生理食塩水 (5.0 ml/kg) を腹腔内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、LPS 投与 2hr 後に再びエーテル麻酔下固定した状態で、VCZ (30 mg/kg) あるいはジクロフェナク (DCLF, 100mg/kg) を、コントロールとしては生理食塩水を、それぞれ右頸静脈から静脈内投与した。再びケージに戻し、薬物投与 6hr 後からは絶食を解除し、タイムコースに従い採血を行った。肝機能検査値である ALT 値、ビリルビン値は採血後の血清から測定した。エーテル麻酔下、左頸静脈から採血した約 400 μ l の血液をマイクロチューブにアプライし血液が凝固するまで 10 分以上常温静置し、その後スイングローター式の遠心機を用いて遠心分離 (1970g \times 10 min) した。各検体の生化学検査値の測定は、自動分析装置・ディメンション Xpand Plus-HM (シーメンスヘルス

ケア・ダイアグノスティクス(株)製)と、対応する測定試薬キットを用いて行った。

3. 肝障害モデル動物における肝臓内グルタチオン・レベルの変動解析

薬剤誘発性肝障害の発症過程における肝臓内グルタチオン・レベルの影響を解析する目的で、まず LPS 投与後の肝臓内グルタチオン濃度推移の検討を行った。水は自由に飲める状態で 24 hr 絶食させた Wistar 系雄ラットに、エーテル麻酔下、リポポリサッカライド(LPS 1mg/kg = 3.0×10^6 EU/kg)もしくはコントロール群として生理食塩水(5.0 ml/kg)を腹腔内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、LPS 投与後 2 時間、および 14 時間の 2 時点で肝臓を単離し、液体窒素にて急速凍結した後、ステンレス・ビーズを用いた振動ミル法にて破碎し、その後メタノール-クロロホルム-水系を用いた液-液抽出によって、肝臓内グルタチオンを水相側に回収した。得られたサンプルを、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計の多重反応モニタリング法を用いて高感度定量した。

4. 肝臓内グルタチオン・レベルが肝障害発症に与える影響の解析

さらに、グルタチオンまたはその前駆体を投与することで、LPS 前感作に

伴う肝臓内のグルタチオン・レベルの低下を外因性に補った場合、薬剤誘発性肝障害の発症過程にどのような影響が生じるかを検証する目的で検討を行った。水は自由に飲める状態で 24 hr 絶食させた Wistar 系雄ラットに、エーテル麻酔下、リポポリサッカライド(LPS 1mg/kg = 3.0×10^6 EU/kg)もしくはコントロール群として生理食塩水(5.0 ml/kg)を腹腔内投与した。また、LPS 投与の 1 時間前から 1 時間ごとに合計 4 回に渡って、グルタチオン(GSH, 100mg/kg)あるいは N-アセチルシステイン(NAC, 100mg/kg)の皮下投与を行った。また、LPS 投与 2hr 後に VCZ (30 mg/kg) あるいはジクロフェナク(DCLF, 100mg/kg)を、コントロールとしては生理食塩水を、それぞれ右頸静脈から静脈内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、薬物投与 6hr 後からは絶食を解除し、タイムコースに従い採血を行った。肝機能検査値である ALT 値、ビリルビン値は採血後の血清から測定した。エーテル麻酔下、左頸静脈から採血した約 400 μ l の血液をマイクロチューブにアプライし血液が凝固するまで 10 分以上常温静置し、その後スイングローター式の遠心機を用いて遠心分離 (1970g \times 10 min) した。各検体の生化学検査値の測定は、自動分析装置・ディメンション Xpand Plus-HM (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス(株)

製) と、対応する測定試薬キットを用いて行った。

さらに、肝臓内グルタチオン・レベルの低下が薬物投与による肝障害の発症に関わっていることをより直接的に示す目的で、肝臓内グルタチオンの枯渇処理が、肝臓の薬物感受性にどのような影響を与えるか検討を加えた。水は自由に飲める状態で 24 hr 絶食させた Wistar 系雄ラットに、エーテル麻酔下、ジエチルマレエート (DEM, 3mmol/kg) もしくはコントロール群として生理食塩水 (5.0 ml/kg) を腹腔内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、DEM 投与 1hr 後に再びエーテル麻酔下固定した状態で、VCZ (30 mg/kg) あるいはジクロフェナク (DCLF, 100mg/kg) を、コントロールとしては生理食塩水を、それぞれ右頸静脈から静脈内投与した。再びケージに戻し、薬物投与 6hr 後からは絶食を解除し、タイムコースに従い採血を行った。肝機能検査値である ALT 値、ビリルビン値は採血後の血清から測定した。エーテル麻酔下、左頸静脈から採血した約 400 μ l の血液をマイクロチューブにアプライし血液が凝固するまで 10 分以上常温静置し、その後スイングローター式の遠心機を用いて遠心分離 (1970g \times 10 min) した。各検体の生化学検査値の測定は、自動分析装置・ディメンション Xpand Plus-HM (シーメンスヘルス

ケア・ダイアグノスティクス製) と、対応する測定試薬キットを用いて行った。

5. 肝障害モデル動物における炎症性サイトカインの影響評価

さらに、LPS 前感作を用いた薬剤誘発性肝障害動物モデルの妥当性・応用性の検証の一環として、炎症性サイトカインに着目した検討も開始した。低投与量の LPS 腹腔内投与は、特に肝臓クッパー細胞に影響を与え、様々なサイトカイン・ケモカインの発現を誘導することが知られている。これら液性因子の関与を、LPS 前感作肝障害モデルを用いて検証した。水は自由に飲める状態で 24 hr 絶食させた Wistar 系雄ラットに、エーテル麻酔下、リポポリサッカライド (LPS 1mg/kg = 3.0×10^6 EU/kg) もしくはコントロール群として生理食塩水 (5.0 ml/kg) を腹腔内投与した。また、LPS 投与の 1 時間前にサイトカインの合成阻害剤を静脈内に、あるいはモノクローナル中和抗体を皮下に投与した。また、LPS 投与 2hr 後にジクロフェナク (DCLF, 100mg/kg) を、コントロールとしては生理食塩水を、それぞれ右頸静脈から静脈内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、薬物投与 6hr 後からは絶食を解除し、タイムコースに従い採血を行った。肝機能検査値である ALT 値、ビリルビン値は採血後の

血清から測定した。エーテル麻酔下、左頸静脈から採血した約 400 μ l の血液をマイクロチューブにアプライし血液が凝固するまで 10 分以上常温静置し、その後スイングローター式の遠心機を用いて遠心分離（1970g \times 10 min）した。各検体の生化学検査値の測定は、自動分析装置・ディメンション Xpand Plus-HM（シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス(株)製）と、対応する測定試薬キットを用いて行った。

6. 薬物誘発性肝障害ヒト検体におけるサイトカインの変動に関する検討

上述の炎症性サイトカインの薬剤誘発性肝障害発症過程への関与を検証する目的で、患者血清検体中の濃度を、ELISA を用いて測定した。これにより、肝障害の発症段階、あるいは進展段階のいずれに肝臓中グルタチオン濃度の低下、サイトカイン類の曝露が関わっているか検討を行った。

（研究の倫理的側面への配慮）

本研究には、ラットあるいはマウスを用いた動物実験が含まれる。動物実験に関しては、東京大学においては、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 6 月 1 日 文部科学省告示第 71 号）を遵守し

た上で、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のち、東京大学医学部動物実験指針に従い、実験を行っている。また、アステラス製薬（株）安全性研究所においては、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月 厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）を遵守した上で、当該施設の規程に従い、実験を行っている。

また本研究には、ヒト臨床研究も含まれる。ヒトにおける臨床研究については、疫学研究に関する倫理指針（平成 16 年 文部科学省・厚生労働省告示第 2 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）を遵守した上で、東京大学医学部倫理委員会およびアステラス製薬ヒト組織研究倫理審査委員会による承認を得た後、下記の倫理的配慮(a, b)を適切に行い、研究を進めている。

a) 試料は匿名化し、個人情報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する。

b) 文書にて研究の目的および方法を十分に説明して了解を得た後、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る。

C. 研究結果

1. ヒト肝障害検体を用いた、バイオマーカー候補物質の有用性検証

本研究および慶應義塾大学におけるこれまでの検討によって、薬物誘発性肝障害モデル動物においては、オフタルミン酸、およびオフタルミン酸に構造的に類似する複数のペプチドに関して、肝障害の発症に伴って血清中の濃度が著しく上昇することが見出された（論文投稿中のため化合物名は開示しない）（別添 Figure 1）。また、それらのペプチド類の生合成経路はグルタチオンの生合成経路と同一であり、肝細胞中グルタチオン濃度によりフィードバック制御を受けている（別添 Figure 2）。従って、これらのバイオマーカー候補物質の血清中濃度上昇は、種々の機序の肝障害発症に広く共通する事象として、肝臓内グルタチオン・レベルの低下が生じていることを強く示唆している。

また、セロトニン代謝物の血清中濃度が薬物誘発性肝障害患者検体において上昇していること、およびリン脂質代謝物濃度が減少していることが明らかとなった。これらの物質の血清中濃度変動は、いずれも、ウィルス性肝障害を始めとする他の慢性肝障害患者の血清検体においては有意な変動傾向が観察されず、薬物誘発性肝障害に特異的な傾向であった（論文投稿・特許出願中のため化合物名・データは開示しない）。これらの化合物は、薬剤誘発性肝障害の特異的なバイオ

マーカー候補として非常に有力であると考えられた。

2. 肝細胞障害型および胆汁うっ滞型（混合型）肝障害モデル動物の確立

LPS、薬物（VCZ、DCLF）の単独投与では肝障害が起こらなかったのに対して、両者を併用することで肝障害を誘発することが可能であることが確認された。肝機能マーカーの変動から、VCZ 投与ラットでは肝細胞障害型、DCLF 投与ラットでは混合型の肝障害が発症していることが示唆された（別添 Figure 3）。

3. 肝障害モデル動物における肝臓内グルタチオン・レベルの変動解析

LPS による前感作から 2 時間後、すなわち薬物投与時点における肝臓内グルタチオン・レベルを測定した結果、非投与群に比較して約 70%程度までの有意な低下が認められた（別添 Figure 4）。LPS 感作後 14 時間の時点では、肝臓内グルタチオン・レベルはコントロール・レベルまで回復していることも確認された。

4. 肝臓内グルタチオン・レベルが肝障害発症に与える影響の解析

さらに、GSH 及び NAC の事前投与により肝臓内グルタチオン濃度をコントロールまで回復させた場合には、ALT 値・ビリルビン値上昇の有意な抑制が認められた（別添 Figure 5）。

一方で、DEM 処理により一過性に

肝臓中グルタチオンを低下させた場合には、薬物との併用により、LPS 併用モデルと比較して程度は低いものの、肝障害の誘発が認められた。この際に、VCZ・DCLF とともに LPS との併用モデルと同様の肝障害パターンが観察された (別添 Figure 6)。

5. 肝障害モデル動物における炎症性サイトカインの影響評価

また、LPS により発現が誘導されることが知られているサイトカインの一種が、DILI 患者の血清検体中で上昇傾向にあることが観察された。LPS 併用ラット DILI モデルにおいても、このサイトカインに対する産生阻害剤、および受容体に対する中和抗体投与により肝障害は有意に抑制され、GSH 併用により、その抑制効果は更

に顕著に観察された (別添 Figure 7)。なお、GSH 併用による、このサイトカインの血清中濃度に有意な差は観察されなかった。

6. 薬物誘発性肝障害ヒト検体におけるサイトカインの変動に関する検討

次に、複数の薬剤誘発性肝障害患者血清検体に関して、各マーカー値の経時的変化を解析した結果、炎症性サイトカイン濃度は、ALT 値や AST 値、ALP 値などの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。現在、より多数の血清検体を対象に同様の解析を進めている段階である (論文投稿準備中のため、サイトカイン名およびデータは開示しない)。

D. 考察

1. 薬剤誘発性肝障害の発症過程における、炎症性サイトカインの関与

臨床で肝障害が報告されている薬物の多くは、動物実験での再現が困難なケースが多く、特異体質性による作用機序が考えられている。例えば VCZ はトリアゾール系抗真菌薬の中でも特に幅広い抗菌スペクトルを有し、消化管吸収が良いなどの特性もあるため、临床上高頻度で使用される一方で、重篤な肝障害を引き起こす症例が多く報告されている。しかしながら、トリアゾール系抗真菌薬においても、短期間の動物実験によって肝障害を再現することは難しく、肝障害メカニズムの研究はほとんど進んでいない。

昨年度までに、低用量 LPS と VCZ を併用することにより、VCZ 単回投与によって肝細胞障害型の肝障害誘発に成功していた。本年度はこれに加え、DCLF 単回投与によって、胆汁うっ滞を伴う混合型の肝障害誘発モデルの作成にも成功した。Roth らは、単独では肝障害誘発しない程度の低用量 LPS の腹腔内投与と、臨床で肝障害誘発の報告の多い化合物の静脈内投与を併用することにより、モデル動物においても薬物性肝障害の再現が可能であることを既に報告している。また、臨床において肝障害発症頻度の低い薬物では、低用量 LPS との併用で肝障害は誘発されないことから、臨床における薬物性肝障害を反映するモデルとして使用できる可能性が考えら

れている。

低用量 LPS の併用効果に関しては、p38 のリン酸化や TNF α の発現上昇が報告されている。また、低用量 LPS の単独投与では誘導されてこない IL-6 や GM-CSF の mRNA が、trovafloxacin 併用により誘導されることも報告されており、LPS の投与によって肝臓クッパー細胞などの活性化が生じ、これに併用薬物による酸化ストレスが加わって、肝障害が発症・進展するのが本モデルの特徴と考えられた。実際本研究においても、LPS 前感作動物モデルにおいて、炎症性サイトカインの産生阻害剤、あるいは中和抗体によって処理した場合に、薬剤誘発性肝障害の発症抑制が観察されている。

ヒト臨床における肝障害発症過程を考えた場合にも、消化管内の細菌などに由来する LPS にある程度暴露されている可能性は十分に考えられ、このような LPS 暴露に伴う炎症反応が、薬剤誘発性肝障害発症の危険因子となる可能性も考えられる。実際、ヒト臨床検体の解析においても動物モデルと同様に、炎症性サイトカインの濃度上昇が観察されており、その経時変化は、肝障害の発症に同期、あるいはやや先行する傾向が観察された。

2. 薬剤誘発性肝障害の発症過程における、グルタチオンの関与

また、本研究におけるヒト肝障害検体のメタボローム解析の結果、肝臓内

グルタチオン・レベルの低下も、広範な肝障害に共通する要因として同定された。さらに動物モデルを用いた検討から、肝臓グルタチオン・レベルの低下を回復させることで、肝障害の発症はコントロール・レベルに近い状態まで抑制されたことから、肝臓内グルタチオン・レベルも肝障害の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

薬物性肝障害の発症を臨床上予測することは現時点では困難であるが、本研究のこれまでの結果を踏まえると、一因として肝細胞内の GSH 量や、酸化ストレスによる NF κ B の活性化程度など、肝障害に関わる各段階における応答性に、遺伝的要因もしくは環境的要因による個人差がある可能性も考えられた。LPS 前感作モデルにおいても、肝臓中のグルタチオン濃度がコントロール条件下の 70%程度まで低下し、還元型グルタチオンやその前駆体となる NAC を投与してこれを回復させることで、肝障害の発現が抑制された。これらの結果からも、肝臓中のグルタチオン濃度が薬剤誘発性肝障害の発症あるいは進展に関わっていることが示唆される。今回用いた 2 種類の薬物に関しては、DCLF の代謝物の一部がグルタチオン抱合を受けることが知られているものの、それ以外の代謝経路へのグルタチオン抱合代謝の関与は無いものと考えられている。そのため、本モデルでの肝障害の発症は肝臓中グルタチオン濃度低下による抱合代謝不全に直接起因す

るものではなく、機序は未だ不明なものの、薬物に対する感受性がグルタチオン濃度低下によって亢進した結果と考えられた。

3. 薬剤誘発性肝障害の新規バイオマーカー候補物質

セロトニン¹⁾は、マウスを用いた検討より、肝再生に必須であることが報告されており、主に小腸で生合成されるセロトニンを循環血中で運搬する役割を担う血小板は、組織障害に伴う炎症反応に応答してセロトニンを放出することが知られている。ウイルス性肝炎などの慢性肝障害においては、病態の進行と共に肝機能は徐々に悪化していく一方で、薬物誘発性肝障害は急性の肝障害であり、起因薬投与中止後には肝機能が短期間で自然回復することが一般的である。従って、本研究で見出された、薬物誘発性肝障害患者の検体に特異的なセロトニン代謝物の濃度変動は、肝細胞増殖を伴う肝再生過程の活性化を反映している可能性が高いと考えられた。

ヒト慢性肝障害においては数カ月から数年に渡る慢性的な炎症反応に伴って、血小板数の減少や血小板の機能不全が生じることがこれまでに報告されており、慢性肝障害が進行した場合でも、血小板のセロトニン放出応答は、脱感作して十分には機能しないと考えられた。これに対し、薬物誘発性肝障害の発症時においては、正常に機能する血小板が循環血中に十分量存在する状態であるため、肝細胞の急

性の炎症反応に伴って、肝再生機構が機能し得ると考えられた。

一方、リン脂質代謝物は、肝細胞増殖に伴う細胞膜リン脂質の原料消費の上昇を反映している可能性が考えられた。これらの可能性を踏まえ、

①肝組織障害に伴って血小板が活性化され、セロトニンが肝組織近傍で放出される。

②セロトニンが肝細胞膜上セロトニン受容体に結合して肝細胞増殖を活性化する。

③細胞膜合成の増加に伴い細胞膜リン脂質原料の消費が上昇する。

④セロトニン受容体に結合したセロトニンは細胞内に内在化・代謝され、セロトニン代謝物が増加する。

という一連のスキームを仮説として考えている。今後は、新たな動物モデルを用いた検討や、肝移植患者の血清検体を用いた解析を進めることで、この仮説の妥当性と、これら新規バイオマーカー候補分子の、臨床における応用範囲に関して検討を進めていく予定である。

E. 結論

上述のように平成 20 年度に整備した技術的基盤に立脚し、平成 21 年度には、肝障害モデル動物の解析より見出されていたバイオマーカー候補物質に関して、ヒト臨床検体を用いて検証を行うと共に、薬物誘発性肝障害の発症過程との関連についても検討を加えた。その結果、肝障害を伴う疾患に広く共通するバイオマーカーとして、複数のオプタルミン酸関連ペプチドを見出し、またそれらの濃度変動を組み合わせることで、種々の肝障害を区別して診断可能であることが示された。また、新たに薬物誘発性肝障害が急性肝障害であることを反映し、特異的に変動すると考えられるバイオマーカー候補物質を新たに 2 種類見出すことができた。平成 22 年度以降はこれら新規バイオマーカーの変動メカニズムを臨床検体および動物モデルを用いた検討を通じて明らかにし、ヒトにおける診断バイオマーカーの確立・検証に向けた準備を進める予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

5, 2009

1. 論文発表

研究代表者：曾我朋義

1. **Soga, T.**,* Igarashi, K., Itoh, C., Mizobuchi, K., Zimmermann, H., Tomita, M., "Metabolomic Profiling of Anionic Metabolites by Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* **81**, 6165-6174, 2009.

2. 曾我朋義「最新のメタボローム測定技術と診断応用」日本薬学会第130年会、健康、安全、安心のための分析化学、岡山大学津島キャンパス、2010年3月29日

総説

1. **曾我朋義**：メタボロミクスー網羅的代謝物質解析の医学・医療へのあらたな応用「医学のあゆみ」Vol231, Nos.12,13, pp1143, 医歯薬出版株式会社, 2009.

3. 曾我朋義「CE-MSメタボローム測定法の開発と生命科学への応用」分離機能とセンシング機能の化学セミナー2010、日本分析化学東北支部、東北大学片平キャンパス金属材料研究所2号館1階講堂、2010年3月6日

2. 平山明由、**曾我朋義**：ヒト癌組織のメタボローム解析「医学のあゆみ」Vol231, Nos.12,13, pp1145-1149, 医歯薬出版株式会社, 2009.

4. 曾我朋義「最新のメタボローム測定法と生命科学への応用」日本学術会議シンポジウム、メタボロミクス研究の最前線とメタボライトデータベースの役割、日本学術会議講堂、2010年1月15日

3. **曾我朋義**：メタボローム測定装置の発明、「発明 The Invention」Vol106(11) pp.29-31, 発明協会, 2009.

5. **曾我朋義**「メタボロミクスが解き明かす生命のシステム」第32回日本分子生物学会年会、メタボロミクスが解き明かす代謝生物学、パシフィコ横浜、2009年12月9日

2. 学会発表

研究代表者：曾我朋義

1. **Soga, T.**, "Biomarker Discovery by CE-MS Metabolomics" Mass Spec Europe, The Palau Congress De Catalunya, Barcelona, Spain, Nov

6. **曾我朋義**「最先端のメタボローム解析について」慶應義塾生命科学シンポジウム、食と医科学、そして健康長寿、慶應義塾大学

三田キャンパス北館ホール、
2009年12月8日

7. 曾我朋義「CE-TOFMSによる陰イオン性メタボロームの最新測定法」第4回メタボロームシンポジウム、横浜サイエンスフロンティア高校、2009年11月18日
8. 曾我朋義「メタボロミクスが解き明かす生命のシステム」第82回日本生化学会大会、神戸ポートピアホール、2009年10月23日
9. 曾我朋義「CE-TOFMSによる陰イオン性メタボロームの最新測定法」第1回慶應先端生命研CE-MSメタボロミクス研究会、東北公益文化大ホール、2009年10月16日
10. 曾我朋義「Metabolomics in Cancer Research」第68回日本癌学会学術総会、モーニングレクチャー、パシフィコ横浜、2009年10月3日
11. 曾我朋義「メタボロミクスが解き明かす生命のシステム」第61回日本生物工学会大会、名古屋大学東山キャンパス、2009年9月25日
12. 曾我朋義「メタボロミクスが解き

明かすがんのエネルギー代謝」第34回日本医用マススペクトル学会、近畿大学EキャンパスB館101講義室、2009年9月11日

13. 曾我朋義「CE-MSメタボロミクスが解き明かす生命のシステム」平成21年度安定同位体利用技術研究会、東京大学農学部2号館化学第3講義室、2009年9月10日
14. 曾我朋義「メタボロミクスが解き明かす生命のシステム」第296回CBI学会研究講演会、慶應義塾大学薬学部芝共立キャンパス、2009年5月13日
15. 曾我朋義「メタボロミクスが解き明かす生命のシステム」ゲノムテクノロジー第164委員会第30回研究会、慶應義塾大学先端生命科学研究所、2009年4月25日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

研究代表者：曾我朋義

登録

1. 曾我朋義、「シーフロー方式のキャピラリー電気泳動-質量分析計法による陰イオン性化合物の測定装置」特許第4385171号、2009.

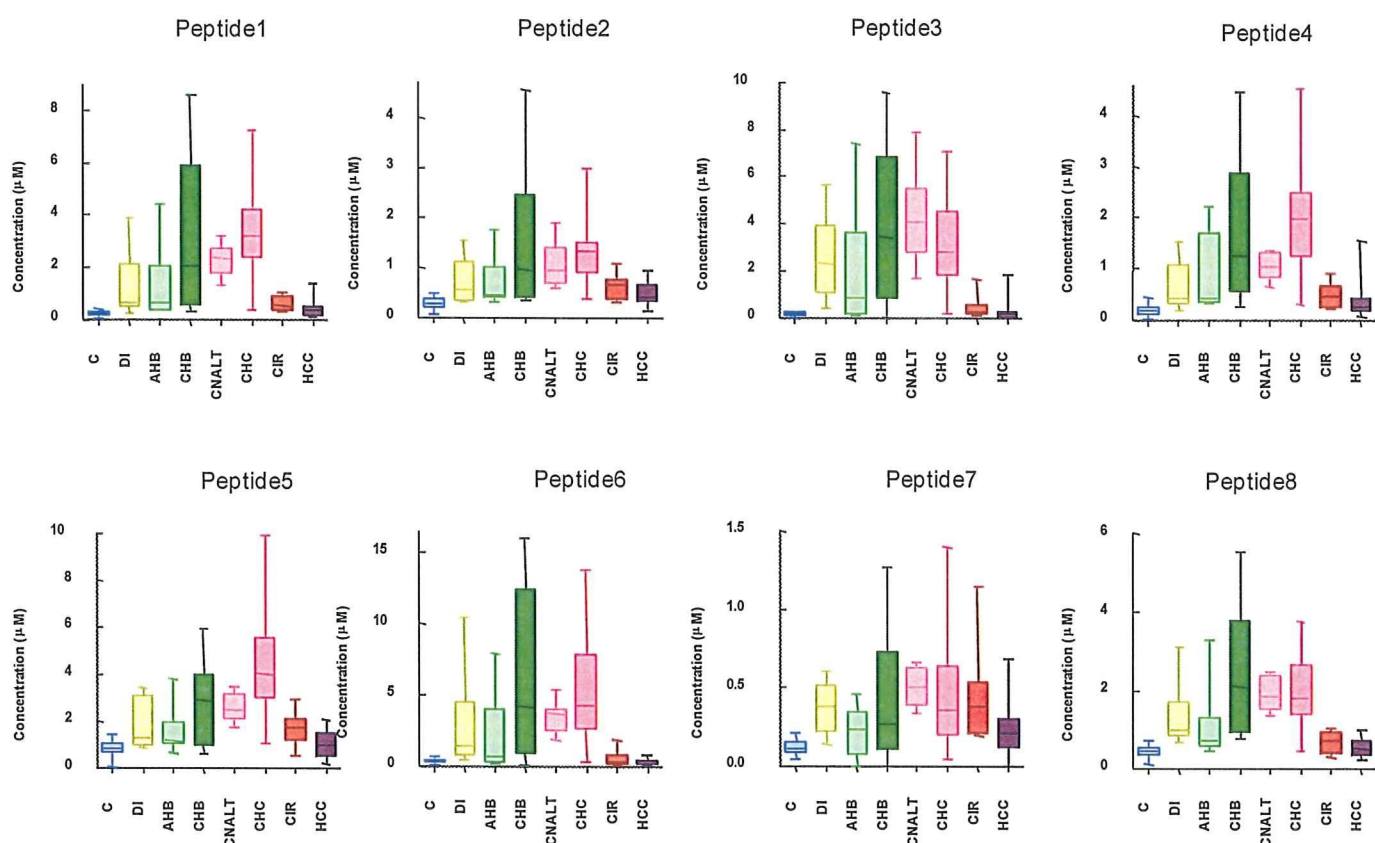
出願中

1. 曾我朋義、杉本昌弘、末松誠、本間雅、山本武人、鈴木洋史「肝臓疾患マーカー、その測定方法、装置及び医薬品の検定方法」出願番号PCT/JP2009/069950.

2. 実用新案登録
なし

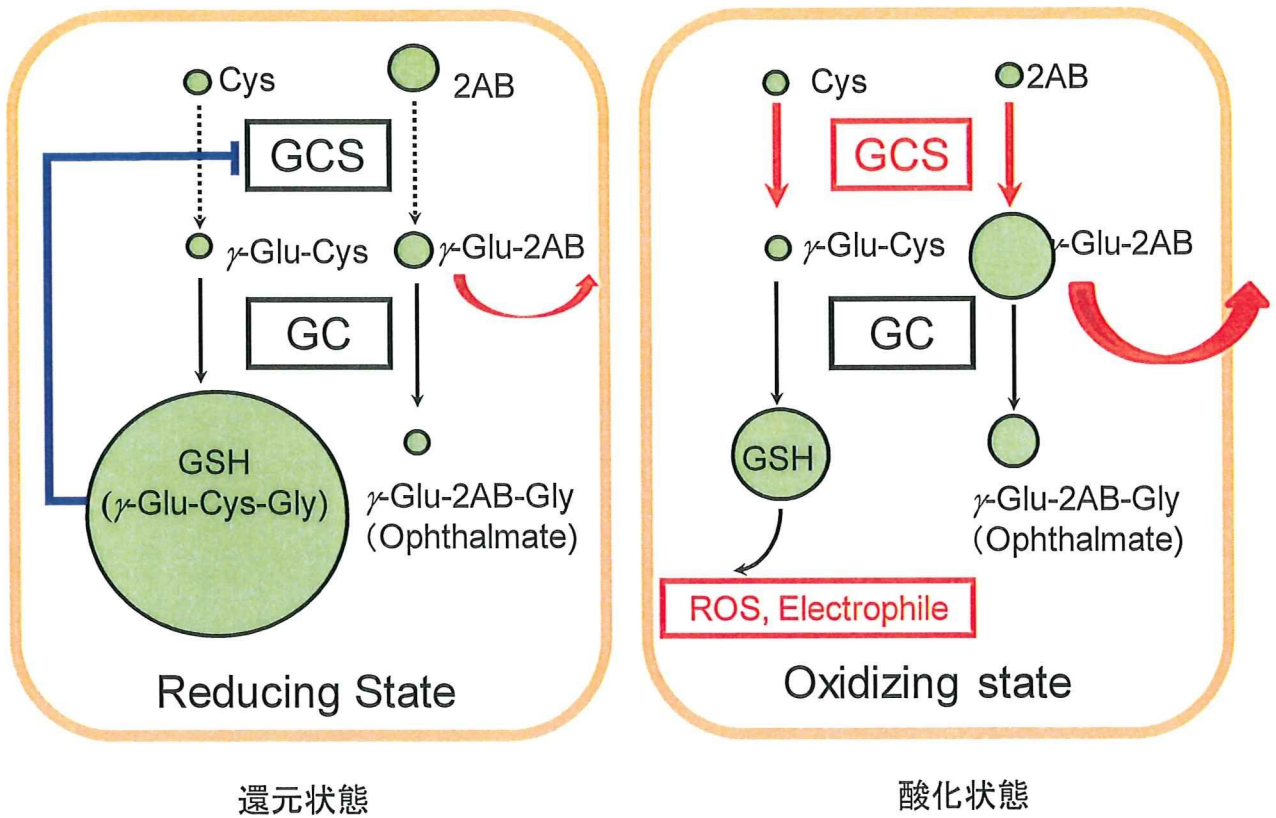
3. その他
なし

別添Figure.1 各種肝臓疾患の血中診断マーカー



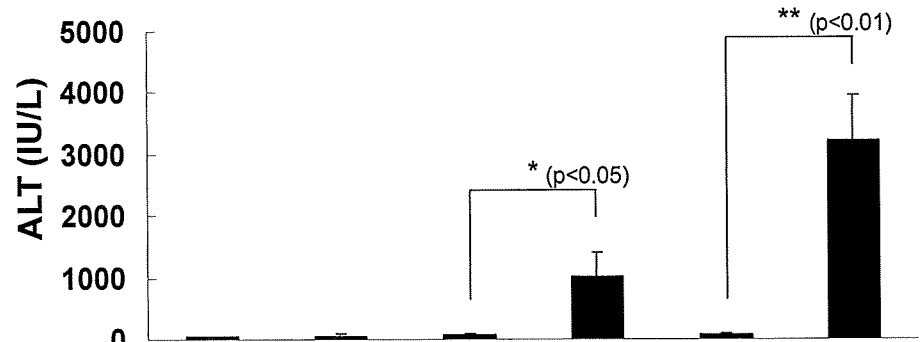
C:健常、DI:薬剤性肝炎、AHB:無症状B型キャリア、CHB: B型慢性肝炎
 CNACT:C型キャリア、CHC:C型慢性肝炎、CIR:C型肝硬変、HCC:C型肝細胞がん

別添Figure.2 グルタチオンとオプタルミン酸の生合成経路

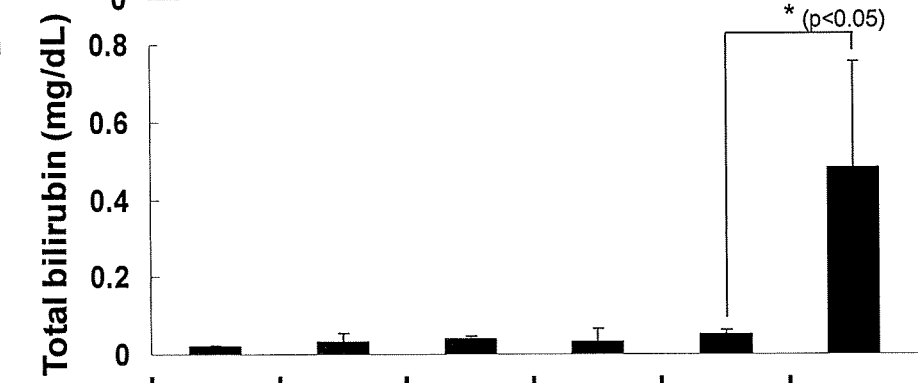


別添Figure. 3 LPS/薬物併用によるDILIモデルラットの構築

(a) ALT



(b) Total bilirubin



LPS	-	+	-	+	-	+
VCZ	-	-	+	+	-	-
DCLF	-	-	-	-	+	+

LPS(1mg/kg, i.p.)投与2時間後にVCZ(30mg/kg, i.v.)もしくはDCLF(100mg/kg, i.v.)を投与。薬物投与12時間後に血清を回収し、(a)ALT、(b)総ビリルビンを測定。