

201010003A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤村 昭夫

平成23（2011）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データベースの構築	7
安藤 仁 簗田清次 鈴木光明 森田辰男 草間幹夫 志賀 剛	
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 牛島健太郎	
4. 腎障害を早期に診断するための新規バイオマーカーの同定	18
安藤 仁 細畑圭子	
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	22
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	25
興水崇鏡 藤原葉子	

資料（総括・分担研究報告共通）

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」 遺伝子解析研究変更許可申請書および許可決定通知書（3組） 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・腎癌患者用・三叉神経痛患者用〕 遺伝子発現解析研究への協力についての同意書および同意撤回文書	28
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」 遺伝子解析研究変更許可申請書および許可決定通知書 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および同意撤回文書	
資料 3	研究課題名「アミオダロンによる肺障害の予測法の開発」 遺伝子解析研究許可申請書および許可決定通知書（自治医科大学） 遺伝子解析研究計画書（自治医科大学） 倫理委員会審査申請書（東京女子医科大学） 臨床試験実施計画書（東京女子医科大学） 同意説明文書および同意書	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	130
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	131
-----------------	-----

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 13 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 600 以上の検体を収集し、遺伝子発現解析結果をデータベース化した。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、有害反応を早期に検出するバイオマーカーの同定や有害反応軽減法の開発を行った。今後はこれらのマーカーおよび軽減法の臨床的有用性を評価していく予定である。

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 講師
森田 辰男 自治医科大学泌尿器科学
教授
養田 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
志賀 剛 東京女子医科大学循環器
内科学 准教授

たし、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した。

B. 研究方法

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

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、自治

医科大学さいたま医療センター泌尿器科または東京女子医科大学病院循環器内科を受診し、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）
- エベロリムス（間質性肺炎）
- カルバマゼピン（肝障害・腎障害）
- アミオダロン（間質性肺炎）

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、これまでに構築したデータベースを利用し、薬物による心毒性予防法の開発、薬物性腎障害・肝障害を早期に検出するためのバイオマーカーの同定を実施した。

（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た。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査を経て、自治医科大学学長の許可を得ており（資料1、2、3）、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、3）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、3）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。

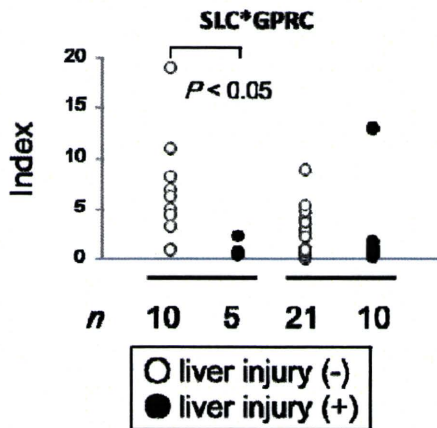
C. 研究結果

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 日より検体採取を開始し、平成 23 年 3 月 31 日までに、「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 625 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 35 サンプル、計 660 サンプルを収集した。このうち、現在までに 181 サンプルの遺伝子発現解析を行い、その情報をデータベース化した。

このデータベースを用い、フルタミドによる肝障害を認めた 5 名と 6 ヶ月以上肝障害を認めなかった 10 名の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 種類見出し、その中から real-time PCR でも有意差のある遺伝子を 3 種類同定した。次に、これらの遺伝子のバイオマーカーとしての妥当性を異なる患者集団（フルタミドによる肝障害あり 10 名、肝障害なし 21 名）で評価したところ、2 種類の遺伝子（SLC47A1 および GPRC5D）の発現量に乗じたインデックスにより肝障害の出現を高感度（感受性 90%）に予測することが可能であった（図 1）。

図 1 フルタミドによる肝障害を予測するインデックス（15 名および 31 名の結果）



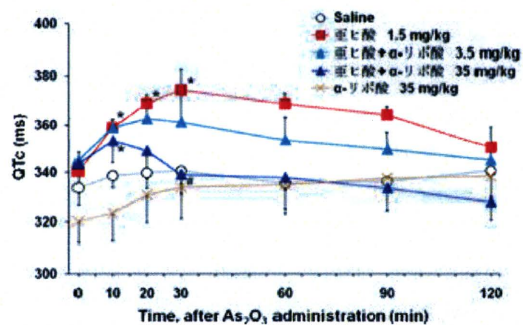
②培養細胞および動物を用いたトキシコゲノミクス研究

《三酸化ヒ素の心毒性予防法の開発》

白血病治療薬である三酸化ヒ素（亜ヒ酸）は、有害反応として QT 延長をはじめとする心電図異常を認めるためにしばしば臨床使用が制限される。これまでにわれわれは、ラットでは α -リポ酸の前投与が亜ヒ酸による急性心毒性（心電図 ST-T 変化）を予防することを明らかにした。そこで、モルモットを用い、亜ヒ酸の QT 延長作用に対する α -リポ酸の効果を検討した。

雄性 Hartley モルモットに亜ヒ酸を単回腹腔内投与すると、投与 10 分後から 60 分後まで用量依存的に QTc 値が延長した。この QT 延長は、 α -リポ酸の前投与（3.5 mg/kg、腹腔内、10 分前単回投与）により有意に抑制された（図 2）。したがって、 α -リポ酸は亜ヒ酸の QT 延長に対しても予防効果があることが判明した。

図 2 亜ヒ酸および α -リポ酸投与後の QTc 値の変化



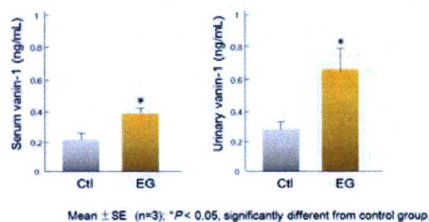
* および # は、それぞれ同時点の vehicle 群、亜ヒ酸 1.5 mg/kg 群に対し、 $P < 0.05$ (ANOVA, Bonferroni/Dunn test) を示す。各群 $n = 3$ 。

《薬物性腎障害早期検出マーカーの同定》

腎障害性物質である有機溶媒を暴露したヒトプライマリ腎尿細管細胞の遺伝子発現データベースをもとに、ヒト近位尿細管由来セルライン HK-2 においても有機溶媒に

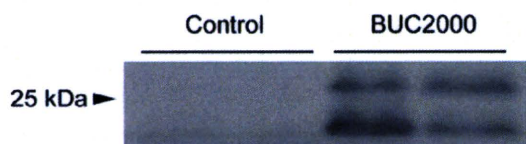
より発現が変動する遺伝子 *VMI* を見出した。エチレングリコールを3週間投与した Wistar ラットでは、組織学的に顕著な尿細管障害を認めたが、既存の腎障害マーカーである血清クレアチニン、BUN、クレアチニンクリアランス、尿中アルブミン、NAG には有意な変化を認めなかった。この時点において、腎尿細管における *vanin-1* の発現は顕著に増加し、尿中および血中濃度は有意に上昇していた (図3)。これらのことより、*vanin-1* は早期尿細管障害マーカーになることが示唆された。

図3 エチレングリコール投与による血中および尿中 *vanin-1* の増加



また、昨年度までにモデル作製に成功したブシラミン腎障害マウスの腎における遺伝子発現解析を行い、ブシラミン腎障害時に mRNA 量が増加する 49 遺伝子を同定した。このうち、*Lcn2* は real-time PCR でもブシラミン腎障害により mRNA 量が対照群の約 4 倍になることを確認し、さらに尿中にも検出されることを見出した (図4)。したがって、*Lcn2* は新たな薬物性腎障害マーカーとなる可能性がある。

図4 ブシラミン腎障害マウスにおける尿中 lipocalin 2 の増加

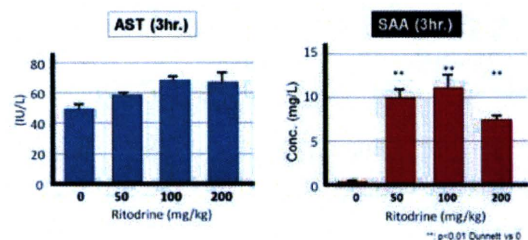


《薬物性肝障害早期検出マーカーの同定》

リトドリン投与中には高頻度に肝障害を認めることが知られている。そこで、リトドリンを14日間反復投与した C57BL/6J マウスの肝の遺伝子発現を GeneChip で解析したところ、serum amyloid A (SAA) 遺伝子の顕著な発現上昇を認めた。さらに、血中の SAA 蛋白も増加することを確認した。

次に、リトドリン単回投与後の血中 SAA 濃度の推移を、既存の肝障害マーカーである AST、ALT とともに検討した。その結果、AST、ALT と同様に、SAA はリトドリン投与後 12 時間をピークとした一過性の上昇を認めた。さらに、血中 SAA 濃度は、AST、ALT が上昇しない低濃度のリトドリン投与時にも増加することが判明した (図5)。したがって、SAA はリトドリンによる肝障害の鋭敏なマーカーとなる可能性がある。

図5 リトドリン単回投与3時間後の血中 AST および SAA 濃度



D. 考察

本研究では、まず、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を収集し、世界的にも貴重な臨床検体のトキシコゲノミクスデータベースを構築した。このデータベースは、有害反応予測マーカーの探索や有害反応発現機序の解明に役立つことが期待できる。実際、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

を見出すことが可能であった。

次に、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軽減法の開発を実施した。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、新たな臓器障害マーカーを見出すとともに、亜ヒ酸の心毒性予防法を開発した。

今後は、今回見出したインデックス/バイオマーカー測定や有害反応軽減法が、実際の臨床において薬物療法の安全性および有効性の向上にどの程度有用であるかについて、臨床研究を実施して明らかにする予定である。また、構築したデータベースを活用し、薬物療法の向上に寄与するさらなるバイオマーカーの探索、有害反応軽減法の開発等を行いたい。

E. 結論

重篤な有害反応をきたすことが知られている 13 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、フルタミドによる肝障害を投与前に予測可能なインデックスを作成した。また、培養細胞や動物を用いた薬物性臓器障害モデルの遺伝子発現解析結果をもとに、新たな腎障害マーカーとして vanin-1 および lipocalin 2、肝障害マーカーとして serum amyloid A を同定し、さらに α -リポ酸の QT 延長克服作用を見出した。今後はこれらのマーカーや治療法の臨床における有用性を明らかにしていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumazaki, M., Ando, H., Sasaki, A., Koshimizu, T., Ushijima, K., Hosohata, K., Oshima, Y., and Fujimura, A., Protective effect of α -lipoic acid against arsenic trioxide-induced acute cardiac toxicity in rats. *J Pharmacol Sci*, 115(2): p. 244-8. (2011).
2. 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).
3. 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).
4. Fujiwara, Y., Tanoue, A., Tsujimoto, G., and Koshimizu TA, The roles of V1a vasopressin receptors in blood pressure homeostasis: A review of studies on V1a receptor knockout mice. *Clin Exp Nephrol* in press.

2. 学会発表

1. 安藤 仁、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. 2011年2月, 東京.
2. Keiko Hosohata, Hitoshi Ando, Akira Sasaki, Yasuo Oshima, and Akio Fujimura. Benzene hexachlorides induce TOP2A expression in human primary renal tubular cells. 9th International ISSX Meeting. September 2010, Istanbul.
3. Keiko Hosohata, Hitoshi Ando, Akira

Sasaki, Yasuo Oshima, and Akio Fujimura. Vanin-1 as a predictive marker of acute kidney injury. JSSX Meeting 2010, October 2010, Tokyo.

4. 藤村昭夫. トキシコゲノミクス研究による毒性発現機序の解明とその対処法の探索. 第 31 回日本臨床薬理学会. 2010 年 12 月, 京都.
5. 細畑圭子, 安藤 仁, 佐々木 晃, 大島康雄, 藤村昭夫. ヒトプライマリ腎細胞を用いた急性腎障害診断のための新規バイオマーカーの探索. 第 31 回日本臨床薬理学会. 2010 年 12 月, 京都.
6. 土屋裕義, 藤原葉子, 藤村昭夫, 奥水崇鏡. リトドリン投与による体重の増加と血中グルコース濃度の減少. 第 84

回日本薬理学会年回. 2011 年 3 月, 横浜.

7. 藤原葉子, 谷口淳一, 土屋裕義, 藤村昭夫, 奥水崇鏡. Lipocalin 2 はブシラミン誘発性腎障害のバイオマーカーである. 第 84 回日本薬理学会年回. 2011 年 3 月, 横浜.

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データベースの構築

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
研究分担者	志賀 剛	東京女子医科大学循環器内科学	准教授

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、薬物療法を実施する患者の末梢血における遺伝子発現情報をデータベース化した。重篤な有害反応をきたすことのある 13 種類の薬物を選択し、それらの薬物を投与する前後において末梢血を採取した。また、実際に有害反応を生じた患者からも検体を収集した。収集した検体の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより解析し、臨床におけるトキシコゲノミクスデータベースを構築した。

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方法を用いて、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、自治医科大学さいたま医療センター泌尿器科または東京女子医科大学病院循環器内科を受診し、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）

エベロリムス（間質性肺炎）
カルバマゼピン（肝障害・腎障害）
アミオダロン（間質性肺炎）

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22年度よりエベロリムス、カルバマゼピン、アミオダロン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ヵ月以内）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、アミオダロンの投与後の採血は1回、リトドリン、リュープロレリンの最終採取日は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。

遺伝子発現解析は、パクスジーンRNA採血管に採取した検体よりRNAを単離し、グロビン除去後にcDNA合成、ラベリングを行い、Affymetrix社GeneChipを用いて行った。

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実施した。自治医科大学附属病院の4診療科および東京女子医科大学病院循環器内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た。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、3）、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相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、3）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、3）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 8 月 22 日より検体採取を開始し、平成 23 年 3 月 31 日までに、「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 625 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 35 サンプル、計 660 サンプルを収集した。そのうち、現在までに 181 サンプルの遺伝子発現解析を行い、その情報をデータベース化した。

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た。さらに、臨床経過より遺伝子発現解析を実施する意義が低いと判断された検体を除き、順次、遺伝子発現解析を実施中である。今後は本データベースを活用し、有害反応の機序解明やバイオマーカー探索を推進していく予定である。

E. 結論

倫理面に十分に配慮した上で、重篤な有

害反応を来すことのある薬物を投与する患者よりその投与前後で血液検体を収集した。さらに、収集した検体の遺伝子発現解析を行い、トキシコゲノミクス研究を推進する上で有用な臨床における遺伝子発現情報をデータベース化した。

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による毒性発現機序の解明とその対処法の探索. 第 31 回日本臨床薬理学会. 平成 22 年 12 月, 京都.

2. 安藤 仁、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 23 年 2 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 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、フルタミドを投与予定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で遺伝子発現量に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種類選出した。次に、これらの遺伝子のバイオマーカーとしての妥当性を、異なる31例（うち肝障害は10例）において評価した。3遺伝子のmRNA量の平均値はいずれも両群間で有意差を認めなかったものの、2遺伝子を用いたインデックスにより感受性90%で肝障害の予測が可能であった。このインデックスによる肝障害予測法は、臨床において有用であることが期待できる。

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、临床上、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予定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 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た。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相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、施設した場所に厳重に管理した。

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 ヶ月以上継続したが、6 名は投与開始後にトランスアミナーゼ値が基準値の 2 倍以上となり、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	59日	91	268
2006	有	7日	95	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

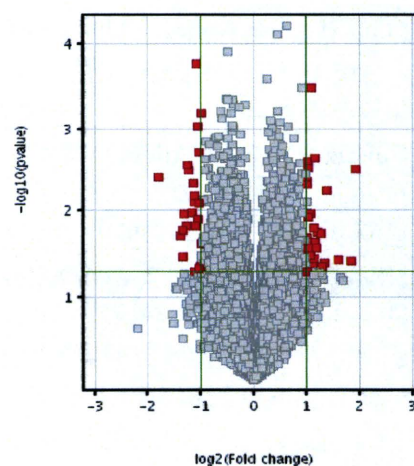
n	肝障害なし		肝障害あり	
	10	5		
年齢(歳)	72 ± 6	73 ± 4		
BMI(kg/m ²)	23.6 ± 2.7	24.2 ± 2.0		
体表面積(m ²)	1.61 ± 0.15	1.59 ± 0.07		
現在の喫煙	3(30%)	1(25%)		
現在の飲酒	3(30%)	2(40%)		
病期(1-4)	2.6 ± 0.7	3.2 ± 0.8		
Gleason score(2-10)	7.4 ± 1.0	7.8 ± 1.3		
PSA(ng/mL)	15.1	26.8		
Cr(mg/dL)	0.82 ± 0.15	0.93 ± 0.26		
推算GFR(mL/min/1.73m 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		
Pits(×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ΔΔCt法においても両群間で発現量に有意差を認める3種類の遺伝子

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 < 0.001
FC all	31228	1657	619	306	149	25
FC > 1.1	16437	1642	616	306	149	25
FC > 1.5	1175	366	177	102	51	9
FC > 2.0	197	55	32	20	15	4
FC > 3.0	7	4	2	2	2	0
Expected b.		1561	624	312	156	31

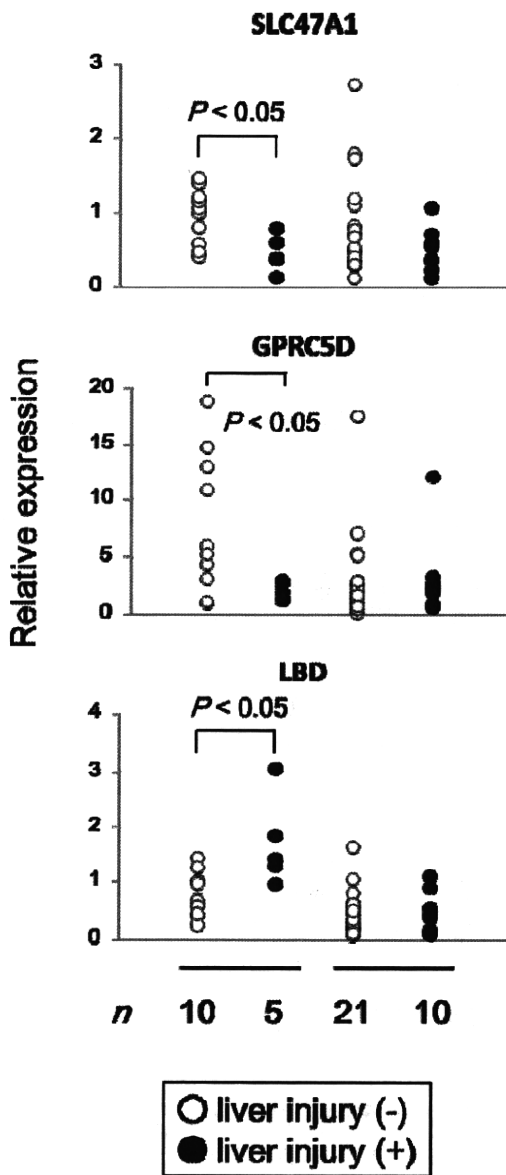


* ■は両群間で2倍以上、p < 0.05の差異を認めた遺伝子

(SLC47A1、GPCR5D、LBD)を同定した(図2)。

次に、これらの遺伝子のバイオマーカーとしての妥当性を異なる患者集団で評価した。平成21年3月より平成22年10月の間に37名の患者より同意を取得し、肝障害以外の原因によりフルタミドの投与を中止した2名、肝障害とフルタミドの関連性が明らかでなかった4名を除外した31名で解析を行った。その結果、3遺伝子のmRNA量の平均値はいずれも肝障害が出現しなかった群と出現した群間で有意差を認めなかった(図2)。特にLBDに関しては、mRNA量が15名では肝障害あり群で増加したが、31名ではむしろ低下しており、バイオマーカーとしては不適切と考えられた。一方、SLC47A1とGPCR5Dに関しては、31名においても発現量が高値の患者では肝障害

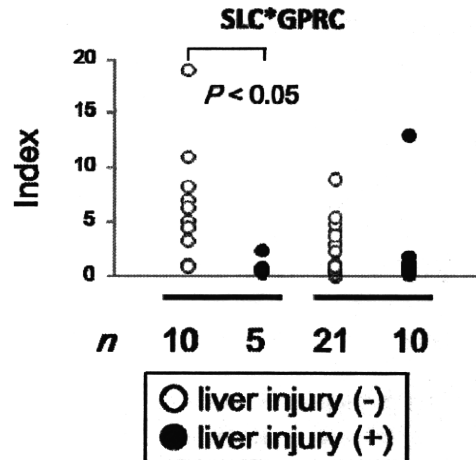
図2 リアルタイムPCRにより解析した2群間における3遺伝子の発現量の差異 (15名および31名の結果)



が出現しにくいことが示唆された。

そこで次に、これらの遺伝子発現量に乗じたインデックスの有用性を評価した (図3)。31名の結果では、それぞれの遺伝子発現量と同様に、インデックスの平均値にも有意差は認めなかった。しかし、このインデックス (カットオフ値 1.8) を用いること

図3 2群間におけるインデックスの差異 (15名および31名の結果)



により、フルタミドによる肝障害の出現が感受性 90%、特異性 38%、正確度 55%で予測可能であった。なお、15名と31名を合わせた46名でこのインデックスの有用性を評価した場合には、感受性 87%、特異性 52%、正確度 63%であった。

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判明した。今回見出したインデックスは、特異性および正確度は高くないものの、優れた感受性を有していた。現在、臨床において前立腺癌治療に用いられている抗アンドロゲン薬はフルタミドとビカルタミドであるが、これまでの臨床使用経験上、一方の薬物に耐性を認めた場合にも他方が有効であることがあり、さらに、一方で有害反応を認めた場合にも他方では認めない場合が多いことが示唆されている。したがって、本インデックスを測定することにより、前立腺癌に対する抗アンドロゲン薬療法全体の有効性および安

全性を向上が期待できる。すなわち、インデックスが高値の患者には抗アンドロゲン薬をフルタミドから開始し、効果が減弱した場合にビカルタミドに変更する。一方、インデックスが低値の患者にはビカルタミドを投与しフルタミドは投与しないことにより、フルタミドの有害反応を来たすことなく、両薬物を最大限効果的に使用することが可能になると予想される。今後は、前向き無作為化比較試験を実施し、このストラテジーの臨床的有用性を明らかにする予定である。

今回、肝障害予測バイオマーカーとして同定した SLC47A1 と GPRC5D は、それぞれ薬物トランスポーターと G タンパク共役型受容体をコードする遺伝子である。したがって、フルタミドによる肝障害の機序にはこれらのタンパクが関与している可能性がある。現在のところ、SLC47A1 が実際にフルタミドあるいはその代謝物を輸送するか否か、GPRC5D がどのような細胞内シグナルを伝達しどのような機能を調節しているのかは不明であり、これらも今後の検討課題である。

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インデックスを見出した。今後はその臨床的有用性と機序について、さらに検討を進める予定である。

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による毒性発現機序の解明とその対処法の探索. 第 31 回日本臨床薬理学会. 平成 22 年 12 月, 京都.

2. 安藤 仁、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 23 年 2 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

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 奥水崇鏡 自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門 准教授
研究分担者 牛島健太郎 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 講師

研究要旨

白血病治療薬である三酸化ヒ素（亜ヒ酸）は、有害反応として QT 延長をはじめとする心電図異常を認めるためにしばしば臨床使用が制限される。これまでに、ラットでは α -リポ酸の前投与が亜ヒ酸による急性心毒性（心電図 ST-T 変化）を予防することを明らかにした。そこで本研究では、モルモットを用い、亜ヒ酸の QT 延長作用に対する α -リポ酸の効果を検討した。亜ヒ酸を単独投与したモルモットは投与後早期から QTc 値の延長を認めたが、 α -リポ酸を前投与したモルモットでは亜ヒ酸による QT 延長が用量依存的に抑制された。したがって、 α -リポ酸は亜ヒ酸の QT 延長に対しても予防効果があることが判明した。

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。特に、亜ヒ酸による心電図異常は临床上大きな問題となっており、致死的な心室性不整脈を生じた症例も報告されている。よって、亜ヒ酸による心毒性を予防する薬の発見は、その治療の安全性を飛躍的に高めることが期待される。これまでにわれわれは、亜ヒ酸によるラットの急性心毒性（心電図 ST-T 変化）に対して、 α -リポ酸が予防効果を発揮することを明らかにした。そこで、今年度は、モルモットを用い、亜ヒ酸を臨床で用いる際に最も問題となる有害反応の一つである QT 延長に対しても α -リポ酸が予防効果を発揮するか否かを検討した。

B. 研究方法

①亜ヒ酸による心電図 QT 延長モデル動物

の作製

雄性 Hartley モルモット（日本 SLC）を 6 週齢で購入し、1 週間馴化後に実験に供した。イソフルラン吸入麻酔下で、モルモットに心電図計（PowerLab, ADInstruments）を装着し、vehicle または亜ヒ酸を単回腹腔内投与した：(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）、各群 n = 3。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 QT 延長に対する α -リポ酸の効果

①で確立したモルモットモデルに対し、亜ヒ酸投与 10 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）を腹腔内投与した：(1) 対照群 vehicle（生理食塩液）、(2) 亜ヒ酸 1.5

mg/kg、(3) 亜ヒ酸 1.5 mg/kg + α -リボ酸 3.5 mg/kg、(4) 亜ヒ酸 1.5 mg/kg + α -リボ酸 35 mg/kg、(5) α -リボ酸 35 mg/kg、各群 n = 3。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腹腔内投与して安楽死を行った。

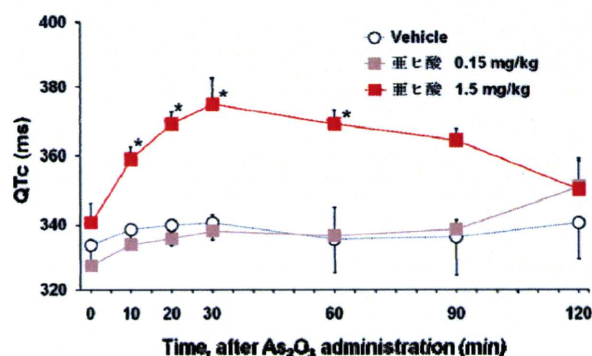
C. 研究結果

臨床では亜ヒ酸による QT 延長が多数報告されていることから、Hartley モルモットに亜ヒ酸を単回投与し 120 分後まで QTc 値を観察した。その結果、高用量(1.5 mg/kg)の亜ヒ酸を投与した際の QTc 値は投与 10 分後から 60 分後まで vehicle 群に比べて有意な延長を認めた(図 1)。なお、本モデルでは、低用量(0.15 mg/kg)の亜ヒ酸を投与した群では、明らかな QTc 値の延長を認めなかったことから、以後の実験では亜ヒ酸 1.5 mg/kg を陽性対照群とすることにした。

次に、 α -リボ酸の前投与により、亜ヒ酸による QT 延長を予防できるか否かを検討した。その結果、亜ヒ酸 1.5 mg/kg の単回投与により惹起された QTc 延長は、 α -リボ酸 3.5、35 mg/kg の前投与により用量依存的に抑制され、特に 35 mg/kg 群では有意な

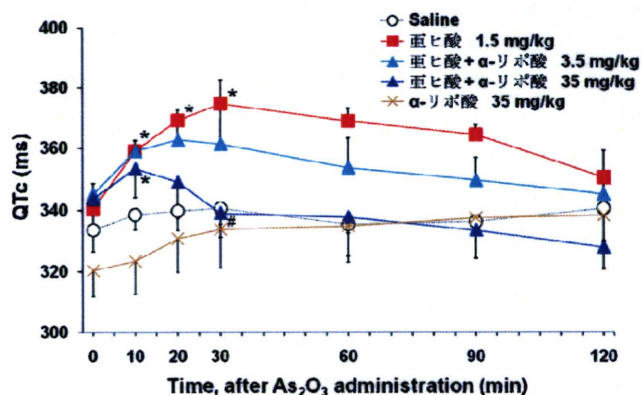
QTc 延長抑制が示された(図 2)。なお、 α -リボ酸自体は vehicle 群に比べて有意な変化を示すことは無かった。また、本実験においては各群間の心拍数値に有意な違いは無かった(Data not shown)。

【図 1】 亜ヒ酸単回腹腔内投与後の QTc 値変化



* は同時点の vehicle 群に対し、 $P < 0.05$ (ANOVA, Bonferroni/Dunn test) を示す。各群 n = 3。

【図 2】 亜ヒ酸および α -リボ酸投与後の QTc 値変化



* および # は、それぞれ同時点の vehicle 群、亜ヒ酸 1.5 mg/kg 群に対し、 $P < 0.05$ (ANOVA, Bonferroni/Dunn test) を示す。各群 n = 3。

D. 考察

ラットにおいて、亜ヒ酸の単回投与後の心電図変化を検討したところ、一過性のST-T変化を認めたものの、QT値に変化は認めなかった。そこで今回は、モルモットを用いて同様の検討を行ったところ、モルモットでは、ヒトと同様に、亜ヒ酸による有意なQT延長を認めることが明らかになった。このことから、モルモットは、亜ヒ酸のQT延長に対する予防法を開発するモデルとして適切であること判明した。

さらにこのモデルを用いて α -リポ酸の効果を検討したところ、 α -リポ酸は用量依存的に亜ヒ酸のQT延長作用を抑制することが明らかとなった。したがって、 α -リポ酸は、臨床においても亜ヒ酸のQT延長克服薬となる可能性がある。

今後は、まず、動物モデルにおいて α -リポ酸が亜ヒ酸の薬効（抗腫瘍効果）を抑制しないことを確認し、さらにヒトにおいても α -リポ酸が亜ヒ酸のQT延長予防に有用か否かを検討する予定である。

E. 結論

亜ヒ酸によりQT延長をきたすモルモットモデルを確立し、その予防に α -リポ酸が有用であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumazaki, M., Ando, H., Sasaki, A., Koshimizu, T., Ushijima, K., Hosohata, K., Oshima, Y., and Fujimura, A., Protective effect of α -lipoic acid against arsenic trioxide-induced acute cardiac toxicity in rats. *J Pharmacol Sci*, 115(2): p. 244-8. (2011).

2. 学会発表

1. 藤村昭夫. トキシコゲノミクス研究による毒性発現機序の解明とその対処法の探索. 第31回日本臨床薬理学会. 平成22年12月, 京都.

2. 安藤 仁、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23年2月, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

腎障害を早期に診断するための新規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
研究協力者 細畑圭子 自治医科大学薬理学講座臨床薬理学部門 助教

研究要旨

既存の腎障害マーカーは感度と特異性が低く、腎障害の早期診断はしばしば困難である。そこで本研究は、これまでに構築したヒトプライマリ腎細胞における腎障害性物質曝露時遺伝子発現データベースを利用し、感度の高い腎障害バイオマーカーを同定することを目的とした。有機溶媒曝露時のデータベースより見出した vanin-1 は、ヒト近位尿細管由来セルライン HK-2 においても 5 種類の有機溶媒に共通して mRNA 発現が増加し、ラットモデルでは既存の腎障害マーカーに変化を認めない時点において尿中および血中タンパク濃度が増加した。したがって、vanin-1 は臨床において有用な早期腎障害検出マーカーになる可能性がある。

A. 研究目的

薬物性腎障害は様々な薬物に認められる有害反応の一つであり、診断が遅れた場合にはしばしば重症化する。現在、腎障害の診断には血清クレアチニンや BUN が広く用いられているが、これらのマーカーは糸球体濾過量 (GFR) が 50% 以下に低下してはじめて上昇し始めるために、腎障害を早期に検出することは困難である。そこで本研究は、これまでに構築したヒトプライマリ腎細胞における腎障害性物質曝露時遺伝子発現データベースを利用し、より感度の高い薬物性腎障害検出バイオマーカーを見出すことを目的とした。

B. 研究方法

データベース化した腎障害性物質のうち、本年度は有機溶媒（アリルアルコール、エチレングリコール、クロロホルム、フェノール、ホルムアルデヒド）について検討を行った。まず、Affymetrix 社 GeneChip を用いた遺伝子発現解析により、ヒトプライマリ腎細胞において各有機溶媒に共通して発現が変動した遺伝子を抽出した。

使用したヒトプライマリ腎細胞は主に近位尿細管細胞由来であることから、次に、ヒト近位尿細管由来セルライン HK-2 にお

ける各有機溶媒の候補遺伝子の遺伝子発現への影響を検証した。各遺伝子の mRNA 発現量は、TaqMan プローブ (Life Technologies) を用いた定量的リアルタイム PCR にて解析した。

さらに、候補分子がバイオマーカーとなり得るか否かを生体内にて検討した。7 週齢の Wistar ラットを代謝ケージで飼育し、3 日間の馴化後に 0.75% エチレングリコールの飲水投与を開始した。3 週間後に尿、血液、腎、肝を採取し、生化学検査、遺伝子発現解析を行うとともに、候補分子の尿中または血中への漏出を ELISA にて定量した。また、腎については PAS 染色により組織学的検討を行い、免疫染色により候補分子の局在についても解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、各法令および自治医科大学動物実験規程を遵守し、動物実験委員会の承認を得た上で、動物の苦痛を最小限に止める様に配慮し実施した。

C. 研究結果

1) ヒトプライマリ腎細胞トランスクリプトーム解析

コントロール群と比し、有機溶媒曝露群