

表1. ヒトプライマリ腎細胞トランスクリプトーム解析

Gene symbol	Gene name	Fold change
GLRA3	glycine receptor, alpha 3	4.48
MTHFD2L	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2-like	3.48
VNN1	vanin 1	2.39
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	-2.90
ATF7IP	activating transcription factor 7 interacting protein	-3.30
HTN1	histatin 1	-4.34

で2倍以上の発現増加もしくは発現減少が認められた遺伝子を6種類同定した(表1)。このうち、主な発現分布が腎外であることが報告されているHTN1を除く5遺伝子について、ヒト尿細管細胞セルラインHK-2細胞を用いてmRNA量を定量した。その結果、マイクロアレイと同様の有意な発現変化を認めた遺伝子はVNN1のみであった。

2) ヒト尿細管細胞セルラインにおける検討

vanin-1は炎症に関与することが報告されていることから、炎症性メディエーターであるKIM-1、MCP-1、fractalkine、MIP-2、IL-6、TNF- α とともに、有機溶媒曝露時のmRNA発現変化をHK-2細胞で比較検討した(図1, 2)。その結果、vanin-1はKIM-1、

図1. 有機溶媒曝露による炎症性メディエーターの発現変化

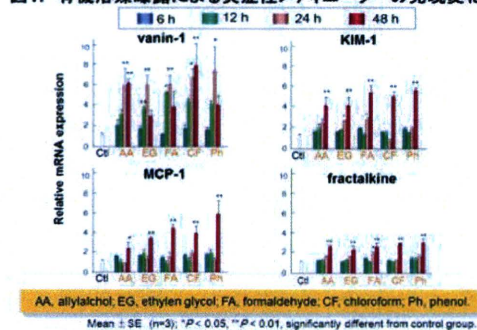
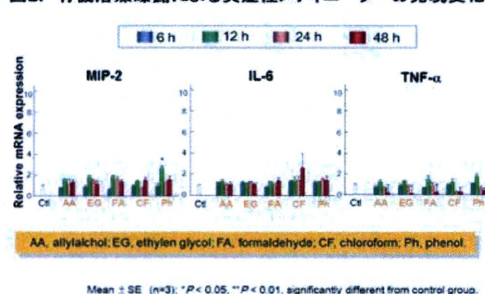


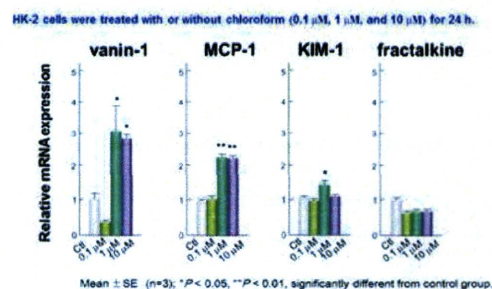
図2. 有機溶媒曝露による炎症性メディエーターの発現変化



MCP-1、fractalkineと同様、曝露後48時間以内にmRNA量が有意に上昇した(図1)。一方、MIP-2、IL-6、TNF- α のmRNA量には変化は認められなかった(図2)。

次に、有機溶媒曝露によるvanin-1ならびにKIM-1、MCP-1、fractalkineのmRNA発現の濃度依存性を検討した。クロロホルムを用い、時間依存性検討で用いた100 μ Mの1/10、1/100、1/1000の濃度で24時間曝露した(図3)。その結果、低濃度においても有意な発現上昇が認められたのは、vanin-1およびKIM-1、MCP-1であった。

図3. 有機溶媒曝露による炎症性メディエーターの発現変化



3) In vivoにおける検討

vanin-1が腎障害のバイオマーカーとなるか否かについてラットを用いて検討した。0.75%エチレングリコールを3週間飲水投与したラットは、組織学的に尿細管の変性および尿細管細胞の空胞化が顕著であり、明らかな腎障害が認められた(図4)。しかしながら、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、いずれもエチレングリコール投与群と対照群で有意差を認めなかった(表2)。

図4. PAS染色による腎組織学的評価

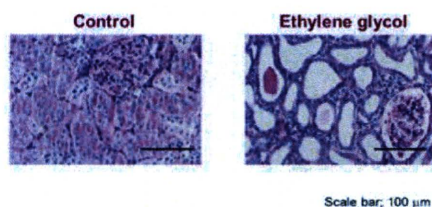


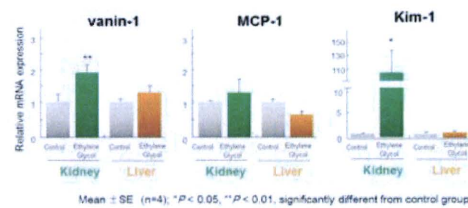
表2. エチレングリコール投与後の腎機能検査値

	Control	EG	P-value
Body weight (g)	397 ± 8	397 ± 3	1.00
Urinary volume (mL/24h)	18.4 ± 2.6	24.3 ± 3.1	0.20
Urinary albumin (mg/dL)	0.61 ± 0.15	1.00 ± 0.29	0.33
SCr (mg/dL)	0.26 ± 0.01	0.39 ± 0.08	0.16
CCr (mL/min)	1.15 ± 0.23	0.93 ± 0.19	0.48
BUN (mg/dL)	24.2 ± 1.4	31.6 ± 4.9	0.20
NAG (U/day)	12.1 ± 4.1	18.9 ± 4.6	0.31
AST (IU/l)	96.0 ± 7.8	87.0 ± 10.0	0.50
ALT (IU/l)	26.5 ± 1.4	25.0 ± 0.8	0.40

Values represent means ± S.E. of 4 rats.
 SCr, Serum creatinine; CCr, creatinine clearance; BUN, blood urea nitrogen; NAG, N-acetyl-D-glucosaminidase; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.
 *P<0.05; **P<0.01, significantly different from control.

次に、腎の mRNA 発現量を検討したところ、MCP-1 には変化が認められなかったが、vanin-1 と Kim-1 の有意な発現上昇を認めた (図 5)。一方、肝の mRNA 発現量は、vanin-1、Kim-1、MCP-1 のいずれにおいてもエチレングリコール投与による影響は認められなかった。

図5. 腎臓および肝臓における炎症性メディエーターの発現



さらに、免疫蛍光法により vanin-1 の腎内発現を検討したところ、vanin-1 は糸球体には少なく、主に尿細管に発現しており、その発現量はエチレングリコール投与により顕著に増加していることが明らかになった (図 6)。ELISA により尿中および血清中の vanin-1 濃度を測定した結果、エチレングリコール投与群では対照群に比し有意な上昇が認められ (図 7)、これらの vanin-1 濃度測定は腎障害の早期検出に有用であることが示唆された。

図6. 免疫蛍光法による vanin-1 の腎内分布

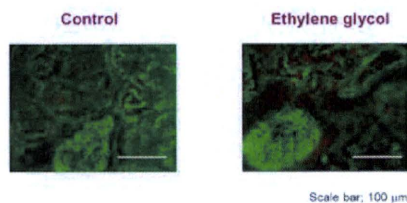
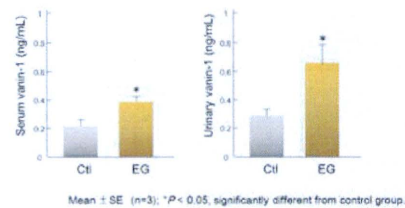


図7. 血中および尿中 vanin-1 の漏出



D. 考察

本研究により、少なくとも一部の腎障害では、vanin-1 は既存の腎障害マーカーであるクレアチニンや NAG で検出し得ない早期に腎障害を検出できる鋭敏なマーカーであることが明らかになった。また、組織学的検討により vanin-1 は腎では主に尿細管に発現することが判明したことから、vanin-1 は尿細管障害マーカーと考えられた。vanin-1 は酸化ストレス応答性に発現が増加することが知られており、有機溶媒などの化学物質のみならず、多くの薬物性腎障害でも発現が増加することが推察される。この点に関しては、今後、様々な腎障害性薬物を投与した動物モデルにおいて尿中・血中 vanin-1 濃度を測定し明らかにしていく予定である。

また、本研究の最大の特徴は、ヒトプライマリ腎尿細管細胞を用いたトキシコゲノミクス解析を出発点としていることである。したがって、今回見出した vanin-1 はヒトにおいても尿細管障害マーカーとなり得る可能性が高い。近年、新たな腎障害マーカーとして注目されている KIM-1 同様、vanin-1 は尿中での測定が可能なることから、vanin-1 は非侵襲性バイオマーカーとしても期待できる。今後は、vanin-1 が臨床においても尿細管障害を早期に検出できるマーカーであるか否かを臨床研究により明らかにする必要がある。

E. 結論

ヒトプライマリ腎尿細管細胞を用い、尿細管障害マーカーとして vanin-1 を見出し

た。vanin-1 は、尿細管障害モデルラットにおいて既存の腎障害マーカーよりも早期に尿中および血中濃度が上昇したことから、早期に尿細管障害が検出可能な新規非侵襲性バイオマーカーとしての臨床応用が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 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.
2. 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.

3. 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.

4. 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評価に関する研究」発表会. 2011年2月, 東京.

G. 知的財産権の出願

なし

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

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
研究協力者 土屋裕義 自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門 助教

研究要旨

現在臨床で使用されている治療薬の中には深刻な有害作用を引き起こすものがあり、薬物治療の幅を狭める原因となっている。そのため有害作用の早期検出、作用機序の解明、対策方法の確立などが早急に求められている。薬剤性肝障害は高頻度に起こる薬物有害作用で治療上の大きな問題の一つである。そのため肝障害の早期検出や患者個々人の副作用発現を事前にスクリーニングするためのバイオマーカー開発が強く求められている。申請者らは今回、マウスによる薬剤性肝障害モデルを用いた解析によりバイオマーカーの候補となる遺伝子を見出した。この遺伝子は既存のAST、ALTといった肝障害マーカーよりも長時間の検出効果を有し、早期発見においても感度が顕著に高かった。この結果は有害作用を早期に検出するためのバイオマーカー開発の上で重要な知見である。

A. 研究目的

薬剤性肝障害は薬物治療時に問題となる副作用の一つであり、肝障害発現により休薬あるいは中止が余儀なくされ治療の幅が狭められる原因となっている。現在、薬剤性肝障害の診断基準として細胞障害型のASTやALT、胆汁鬱滞型と混合型のALPが広く使われている。しかしながら、実際に肝障害発現の分子メカニズムが解明されている薬物は非常に少なく、どのような因子がかかわっているかについて多くが不明である。そこで本研究では、薬物特異的あるいは高感度に肝障害を検出できるバイオマーカーとなる因子の探索、ならびにその有害作用メカニズムとの関連性に注目して解析を進めた。

子宮収縮抑制薬リトドリンは特に臨床問題となる重篤な肝障害の発症が起こることが知られている。肝障害の発生により母体だけでなく胎児に対しても悪影響を与える可能性があることから、保険行政上も留意すべき事例である。以上のことから本研究ではこのリトドリンによる薬剤性肝障害に注目し、その予測法の確立・バイオマーカーの同定と作用機序の解明を目的に行った。

B. 研究方法

・長期投与

8-10 週雌性 C57/BL6J マウスを1週間順化飼育後、200 mg/kg のリトドリン、または生理食塩水を連日 14 日間腹腔内投与し、経過中の体重、食餌量、飲水量をモニターした。最終投与 24 時間後に肝組織、脂肪組織と血清を採取し組織学的解析、トランスクリプトーム解析、生化学検査を行なった。14 日間薬物を投与したマウス肝の DNA マイクロアレイにより得られたデータを gcRNA 法を用いて解析し、発現変動が見られた遺伝子を抽出した。その後定量的 RT-PCR 法で発現変化の再現性を検証した。

・単回投与

長期投与と同様にリトドリン投与後、1, 3, 6, 12, 24 時間後の血中の肝障害マーカーの濃度測定を行った。また、リトドリン濃度を 3 種類 (50, 100, 200 mg/kg) 用いることで各肝障害マーカーの検出感度を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は学内の動物実験委員会の承認を得て実施し、動物愛護の観点から苦痛を最小限に止める様配慮した。ヒト試料は取り扱っていない。

C. 研究結果

1) 肝臓トランスクリプトーム解析

Affymetrix 社 Genechip Mouse Genome 430 2.0 アレイを用いて生食投与群とリトドリン 200 mg/kg 投与群の投与後 14 日目の肝臓の遺伝子発現を比較した。その結果リトドリン投与群で serum amyloid A (SAA) 遺伝子の顕著な発現上昇が観察された (表 1)。また、定量的 RT-PCR でもリトドリン投与後の SAA の発現上昇が再現された。このとき血中の SAA 蛋白質も測定したところ、同様に増加していることも分かった。一方で既存の血中肝障害マーカー (AST, ALT) はどれも生食投与群とリトドリン投与群で有意な変化を示さなかった (図 1)。

2) リトドリン投与急性期の血中 SAA 濃度変化解析

マイクロアレイの結果から新規肝障害マーカー候補として SAA に注目して解析を進めた。リトドリン単回投与時には既存の肝障害マーカーである AST, ALT の血中濃度は投与 12 時間後に一過性のピークが観察される。このとき SAA においても同様に投与 12 時間後に血中濃度のピークが観察された (図 2)。しかしながら、リトドリンの濃度を振って投与し、その感度について検討したところ、AST が上昇しないような低濃度かつ投与初期の段階でも、血中 SAA 蛋白質は有意な増加が誘導されることが分かった (図 3)。

表1 リトドリン投与により発現上昇した遺伝子

Gene Symbol	Gene Title	Fold (log)
Saa1	serum amyloid A 1	3.17
Erd1	erythroid differentiation regulator 1	2.85
8430408G22Rik	RIKEN cDNA 8430408G22 gene	2.55
Per3	period homolog 3 (Drosophila)	2.51
Saa2	serum amyloid A 2	2.45
Orm2	orosomucoid 2	2.31
Gsta1	glutathione S-transferase, alpha 1	2.30
Upp2	uridine phosphorylase 2	2.15
Mt2	metallothionein 2	2.11
Wee1	wee 1 homolog (S. pombe)	2.07
Prom1	prominin 1	2.06
Cyr61	cysteine rich protein 61	1.98
Thrsp	thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus)	1.88
Lcn2	lipocalin 2	1.77
Slc41a2	Solute carrier family 41, member 2	1.70
4833442J19Rik	RIKEN cDNA 4833442J19 gene	1.61
Gstm3	glutathione S-transferase, mu 3	1.58
Dbp	D site albumin promoter binding protein	1.54
Cd36	CD36 antigen	1.45
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	1.42

図1 薬物刺激14日後の肝障害マーカー変動

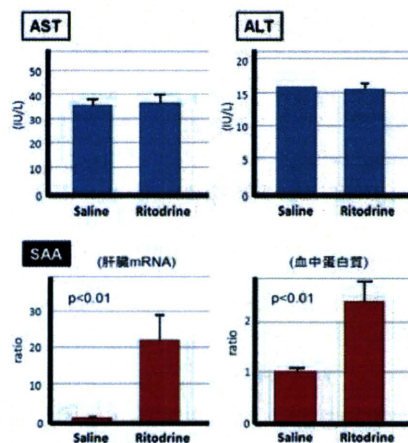


図2 肝障害マーカーの血中変化

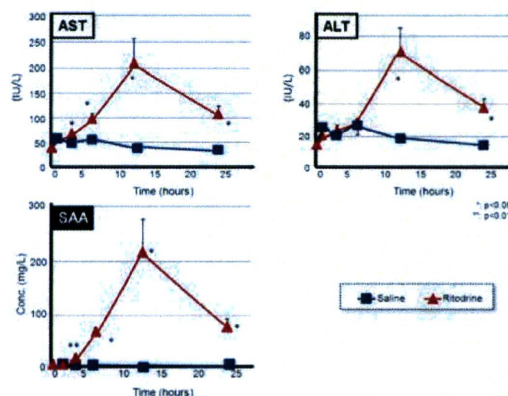
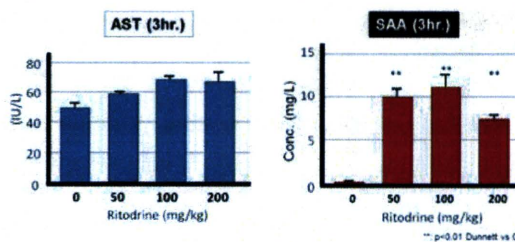


図3 Ritodrine濃度に対する検出感度の検討



D. 考察

子宮収縮抑制薬リトドリンは臨床的に重篤な肝障害の発症が知られているが、その特異的なマーカーならびに作用機序の詳細は明らかとなっていない。本研究のトランスクリプトーム解析により、新規の肝障害マーカー候補として SAA が導出された。

長期的なリトドリン投与の解析から、投与後 14 日後の時点では既存の肝障害マ-

カーである AST や ALT は生食投与群と有意な差が観察されないが、新規バイオマーカー候補の SAA はリトドリン投与群で肝臓での有意な遺伝子発現上昇と血中濃度上昇が依然観察されている。このことは長期に及ぶ薬物投与においても SAA は既存マーカーと異なり検出感度が鈍ること無く維持されることが明らかとなった。

単回投与の実験では SAA はリトドリン投与 3 時間後という非常に早い段階で有意な血中濃度上昇が検出された。この時点では既存マーカーである AST や ALT はいまだ濃度上昇が見られていない。このことは投与最初期の段階でも SAA は検出に優れるマーカーになりうることを示している。また、薬物濃度を少なくしても、血中 SAA は有意な上昇が見られることからその検出感度は非常に高いことが示された。

これらの結果より、現在使われている AST, ALT は薬物投与により確かに濃度上昇が観察されるが、その性能が発揮できない状況も多数存在する。しかしながら、SAA はそんな AST, ALT の検出能力が鈍化する条件においても有意な上昇を維持し続けている。具体的には、薬物の長期投与において、さらには最初期および低濃度下において、今回導出したバイオマーカー候補である SAA は肝障害検出に非常に大きなアドバンテージを持っていることが分かった。

E. 結論

薬剤性肝傷害の新規バイオマーカー候補である SAA はリトドリンの長期投与におい

て既存の肝障害マーカーと異なり検出感度が鈍化することなく維持される。また、投与最初期や低濃度薬物下においても優れた検出感度を持っている。このことから SAA は薬剤性肝障害検出のための有用なバイオマーカーとなることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Koshimizu, T.A., et al., Oxytocin stimulates expression of a noncoding RNA tumor marker in a human neuroblastoma cell line. *Life Sci*, 2010. **86**(11-12): p. 455-60.
1. Koshimizu, T.A., et al., Inhibition of heat shock protein 90 attenuates adenylate cyclase sensitization after chronic morphine treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **392**(4): p. 603-7.

2. 学会発表

1. 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
土屋裕義、藤原葉子、藤村昭夫、奥水崇鏡 第 84 回日本薬理学会年回 横浜 2011 年 3 月

G. 知的財産権の出願

1. 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

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

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
研究協力者 藤原葉子 自治医科大学薬理学講座分子薬理学部門 研究員

研究要旨

薬物による有害作用を早期に発見することは、的確な段階で最適な治療薬を選択することを可能にするとともに、安全性の高い医療を提供することへと繋がる。個々の患者に対する肉体的、時間的、経済的等様々な負担を軽減させる観点から、薬剤性腎障害には特に早期の発見が必要とされている。本研究では、蛋白尿が指標となる薬剤性腎障害モデル動物を新たに作成し、腎臓での網羅的な遺伝子発現解析を行い、腎障害特異的バイオマーカーの検索を行った。本研究の成果により、薬剤性腎障害の発症機序が解明され、新規の腎障害特異的バイオマーカーを臨床応用することが期待される。

A. 研究目的

薬物性腎障害のうち、糸球体障害を誘発する薬物はいくつか報告されているが、疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARDs）もその一つである。現在、腎機能異常の判断は主に蛋白尿を指標としており、DMARDs 使用者の約 10%の頻度で薬物性腎障害が現れ、蛋白尿が出現する。腎障害発症を最低限に抑えるためには、尿所見異常に注意しながら投薬を続ける必要がある。しかしながら、蛋白尿には自覚症状がなく、発見の遅れは病状を悪化させ、腎障害に対する治療を長引かせる原因となる。したがって、副作用のリスクを回避すると同時に、個々に効果的なりウマチ治療薬を選択するには、薬物性糸球体腎障害を予測、あるいは早期発見することのできる有効な手段が必要とされる。

本研究では、これまで報告例のない DMARDs により蛋白尿を呈するモデル動物を新たに作成することに成功した。このモデル動物を用いて腎臓での遺伝子発現解析を行い、薬物投与された腎臓で有意に発現が変動する遺伝子群を抽出した。

B. 研究方法

6 週齢の雄 BALB/c マウスを一週間飼育室で順化させ、片腎摘除を行った。一週間回復させた後、DMARDs の一つであるブシラミンを 2000 mg/kg の用量で毎日経口投与した。対照群には溶媒である 0.5%メチルセルロースを投与した。4 週間後、腎臓と 24 時間尿を採取し、Total RNA の抽出、および GeneChip による遺伝子発現解析と定量的 PCR を行った。また、尿サンプルを用いたウエスタンブロッティングを行った。本研究は学内の動物実験指針に基づいて実施し、動物愛護の観点から苦痛を最小限に止める様配慮した。

C. 研究結果

1)薬物処理による腎臓での遺伝子発現変動
4 週間のブシラミン経口投与を行うと、モデル動物の腎臓では 21 遺伝子の発現上昇、および 28 遺伝子の発現減少が観察された（表 1）。

発現が上昇した遺伝子群のうち、いくつかを抽出し、定量的 PCR を行ったところ、いずれの遺伝子にも有意な変動が見られた（図 1）。

Accession ID	P value	Fold change (log)	Gene Title	RefSeq ID
1423257_at	0.003	3.05	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14	NM_007822
1426547_at	0.004	1.91	group specific component	NM_008096
1427126_at	0.01	1.87	heat shock protein 1B	NM_010478
1427747_s_at	0.005	1.70	lipocalin 2	NM_008491
1423954_at	0.003	1.50	complement component 3	NM_009778
1419579_at	0.004	1.55	solute carrier family 7, member 12	NM_060852
1451065_at	0.004	1.51	asparagine synthetase	NM_012055
1418492_at	0.004	1.46	gremlin 2 homolog, cysteine knot superfamily	NM_011825
1452388_at	0.01	1.40	heat shock protein 1A	NM_010479
1419569_s_at	0.03	1.25	interferon-stimulated protein	NM_001113527
1460042_at	0.01	1.20	solute carrier family 23 (nucleoside transporters), member 3	NM_194333
1416488_at	0.0001	1.19	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1	NM_013467
1443889_at	0.03	1.17	Riken cDNA 9030519P08 gene	NM_001028720
1427453_s_at	0.00004	1.16	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	NM_153565
1416455_s_at	0.02	1.15	crystallin, alpha B	NM_009964
1418001_at	0.003	1.14	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	NM_011921
1426278_at	0.01	1.13	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A	NM_029803
1448995_at	0.01	1.12	platelet factor 4	NM_019932
1423418_at	0.001	1.09	farnesyl diphosphate synthetase	NM_134469
1431422_s_at	0.003	1.06	dual specificity phosphatase 14	NM_019819
1452462_s_at	0.003	1.05	BTG3 associated nuclear protein	NM_001110100
1452752_at	0.0004	-1.73	cDNA sequence BC014505	NM_149232
1436310_at	0.05	-1.67	---	---
1450047_at	0.02	-1.59	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	NM_001977292
1420682_at	0.01	-1.58	zinc finger CCOH type containing 6	NM_178404
1421698_s_at	0.0003	-1.58	collagen, type XIX, alpha 1	NM_007733
1419602_at	0.04	-1.54	UDP glucanose 4-epimerase 2 family, polypeptide 85	NM_009467
1418979_at	0.05	-1.48	aldo-keto reductase family 1, member C14	NM_134072
1419043_s_at	0.05	-1.47	interferon inducible GTPase 1	NM_001148275
1450272_at	0.04	-1.39	ligand dependent nuclear receptor corepressor-like	NM_001163073
1491490_s_at	0.01	-1.36	solute carrier family 22, member 7	NM_144956
1434236_at	0.04	-1.33	zinc finger, DHR-C domain containing 20	NM_029492
1457352_s_at	0.002	-1.31	SV2 related protein homolog (srp)-like	NM_177200
1452397_at	0.05	-1.26	Riken cDNA 2810474C19 gene	NM_020954
1441540_at	0.04	-1.26	Membrane protein, palmitoylated 6	NM_019929
1433914_at	0.001	-1.25	expressed sequence AI747699	NM_001013770
1428301_at	0.02	-1.24	predicted gene	NM_001024712
1420279_at	0.02	-1.22	solute carrier organic anion transporter family, member 1a1	NM_012787
1440490_at	0.05	-1.19	---	---
1431740_at	0.05	-1.18	solute carrier family 7, member 13	NM_028746

表 1.腎臓での遺伝子発現変動
 ブシラミン投与群では、21 遺伝子の上昇および 28 遺伝子の減少がみられた。

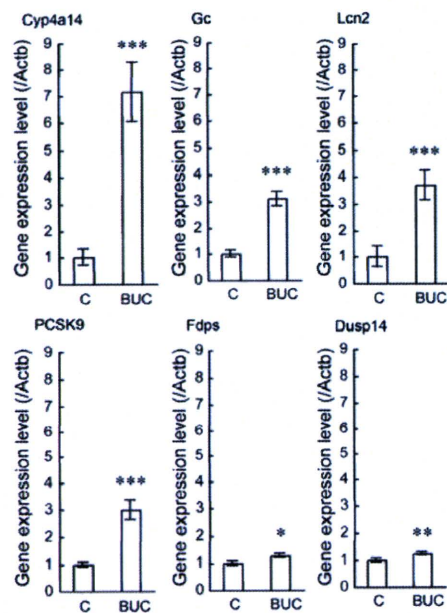


図 1.定量的 PCR による遺伝子発現変化の検出

2)尿中タンパク質の検出

発現が上昇した遺伝子にのうち lipocalin 2 (Lcn2) が尿中蛋白質として検出可能かどうか見当を行った。尿サンプルを用いたウェスタンブロッティングの結果、尿中に Lcn2 が検出されることが明らかとなった (図 2)。

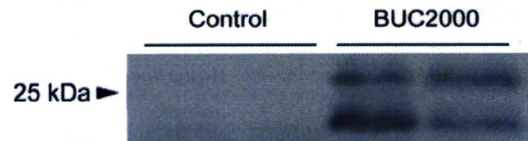


図 2.尿中 Lcn2 の検出

薬物投与群の尿中から Lcn2 が検出された。
 BUC2000, ブシラミン 2000 mg/kg 投与群。

D. 考察

ブシラミン投与動物の腎臓においていくつかの遺伝子発現変化が見られた。その一つに、近年、急性あるいは慢性腎障害の早期発見バイオマーカーとして注目されている Lcn2 があった。Lcn2 は当モデル動物の尿中蛋白質として検出され、これら結果からモデル動物はバイオマーカーを指標にした結果からも腎障害を示すことが分かり、今後新たな腎障害マーカーの探索に有用であることが示唆された。

Lcn2 の産生部位は主として好中球であるが、それ以外でも肝臓にも発現がある。腎臓では近位尿細管に存在し、また 22 kDa と低分子のため、糸球体を通じた血中 Lcn2 は近位尿細管より再吸収される。これらから、尿中 Lcn2 の検出は近位尿細管障害を意味する。しかしながら、肝障害でも尿中で Lcn2 が検出されることから、腎障害に対する特異性に欠けることが指摘されている。また、本研究の蛋白尿を呈する薬剤性腎障害モデル動物は、組織形態観察により糸球体足突起の融合と近位尿細管の損傷が明らかとなっている。モデル動物を用いた更なる解析により、腎臓特異的、そして腎組織中の障害部位をさらに特定できるバイオマーカーとなる遺伝子群の同定が期待される。

E. 結論

本研究により薬剤性腎障害モデル動物を用いた腎障害の解析が可能となった。本研究をさらに展開し、臨床応用可能な薬剤性腎障害バイオマーカーの同定を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 (2011).

2. 学会発表

1. 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
藤原葉子、谷口淳一、土屋裕義、藤村昭夫、奥水崇鏡
第 84 回日本薬理学会年会 横浜
2011 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

別記様式第 4 号 (第 15 条関係)

遺伝子解析研究変更許可申請書

平成 22 年 5 月 12 日

自治医科大学学長 殿

申請者 (研究責任者)

所 属 薬理学講座臨床薬理学部門

職 名 准教授

氏 名 安藤 仁

所属長

職 名 教授

氏 名 藤村 昭夫



※受付番号：第 _____ 号

1 許可履歴	受付番号	許可年月日
	第 遺 08-06 号	平成 20 年 7 月 15 日
第 遺 08-27 号	平成 20 年 12 月 26 日	
第 遺 09-02 号	平成 21 年 5 月 12 日	
2 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	
3 変更する理由	<p>2 種類の試験薬および対象疾患を追加したため。</p> <p>予定期間内の目標症例数到達が困難であることから研究期間を延長したため。</p> <p>研究者の変更が必要になったため。</p>	
4 変更内容の概要 (変更内容を簡潔に箇条書きし、詳細は研究計画書に記入すること)	<p>試験薬としてエベロリムス (腎細胞癌治療薬)、カルバマゼピン (三叉神経痛治療薬) を追加した (試験方法の変更はなし)。</p> <p>研究期間を平成 23 年 3 月 31 日から平成 26 年 3 月 31 日に延長した。</p> <p>研究に参加できなくなった研究者を 18 名削減し、新たに 14 名を追加した。</p> <p>また、一部の研究者の職名に変更があったため、修正した。</p>	

- 注意事項 1 変更した内容が判別できるように記載した新たな研究計画書等及び既に許可された研究計画書等の写しを添付すること。
- 2 ※印は記入しないこと。

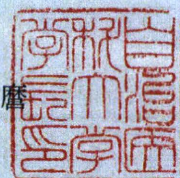
別記様式第5号（第15条関係）

遺伝子解析研究変更許可決定通知書

平成22年 6月22日

申請者（研究責任者）
薬理学講座臨床薬理学部門
安藤 仁 殿

自治医科大学
学長 高久 史 磨



受付番号：第 遺10-07号

課題等名

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09-02の変更）

さきに申請のあった上記の課題について、遺伝子解析研究倫理審査委員会での審議及び審査結果を踏まえ、研究の実施を許可することに決定したので通知します。

なお、遺伝子解析研究倫理審査委員会の判定結果は下記のとおりでした。

記

判定結果	<input checked="" type="radio"/> 承認	<input type="radio"/> 条件付承認	<input type="radio"/> 変更の勧告	<input type="radio"/> 不承認	<input type="radio"/> 中止	<input type="radio"/> その他
理由、条件、勧告 又は意見						

別記様式第4号(第15条関係)

遺伝子解析研究変更許可申請書

平成22年 6月23日

自治医科大学学長 殿

申請者(研究責任者)

所属 薬理学講座臨床薬理学部門

職名 准教授

氏名 安藤 仁

所属長

職名 教授

氏名 藤村 昭夫



※受付番号: 第 _____ 号

1 許可履歴	受付番号	許可年月日
	第 遺08-06 号	平成 20年 7月 15日
第 遺08-27 号	平成 20年 12月 26日	
第 遺09-02 号	平成 21年 5月 12日	
第 遺10-07 号	平成 22年 6月 22日	
2 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	
3 変更する理由	同意説明文書に不備が見つかったため。	
4 変更内容の概要(変更内容を簡潔に箇条書きし、詳細は研究計画書に記入すること)	エベロリムスに関する研究ではリトドリンと同様に検査を外注するため、エベロリムス用の説明文書にはその旨を明記すべきところを、検査を外注しない他の試験薬の説明文書と同様の記載になっていました。そのため、エベロリムス用の説明文書の該当部分をリトドリン用説明文書と同様の記載に変更しました。	

- 注意事項 1 変更した内容が判別できるように記載した新たな研究計画書等及び既に許可された研究計画書等の写しを添付すること。
2 ※印は記入しないこと。

別記様式第5号（第15条関係）

遺伝子解析研究変更許可決定通知書

平成22年 7月26日

申請者（研究責任者）
薬理学講座臨床薬理学部門
安藤 仁 殿

自治医科大学
学長 高久 史 磨



受付番号：第 遺10-15号

課題等名

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10-07の変更）

さきに申請のあった上記の課題について、遺伝子解析研究倫理審査委員会での審議及び審査結果を踏まえ、研究の実施を許可することに決定したので通知します。

なお、遺伝子解析研究倫理審査委員会の判定結果は下記のとおりでした。

記

判定結果	承認	条件付承認	変更の勧告	不承認	中止	その他
理由、条件、勧告 又は意見						

別記様式第4号(第15条関係)

遺伝子解析研究変更許可申請書

平成22年 8月25日

自治医科大学学長 殿

申請者(研究責任者)

所 属 薬理学講座臨床薬理学部門

職 名 准教授

氏 名 安藤 仁

所属長

職 名 教授

氏 名 藤村 昭夫



※受付番号: 第 _____ 号

1 許可履歴	受付番号	許可年月日
	第 遺08-06 号	平成 20年 7月 15日
第 遺08-27 号	平成 20年 12月 26日	
第 遺09-02 号	平成 21年 5月 12日	
第 遺10-07 号	平成 22年 6月 22日	
第 遺10-15 号	平成 22年 7月 26日	

2 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

3 変更する理由
医療センター泌尿器科においても研究を実施したいため。
中間解析の結果、前立腺癌患者の目標症例数を増加する必要が生じたため。

4 変更内容の概要(変更内容を簡潔に箇条書きし、詳細は研究計画書に記入すること)
エベロリムス使用患者数は非常に少ないことから、医療センター泌尿器科の医師5名を研究者に追加し、エベロリムスに関しては医療センター泌尿器科の患者も対象とすることにした。それに伴い、医療センターでの匿名化と対応表の管理方法、検体の保管、輸送方法を追記した。
前立腺癌患者の予定症例数を50名から100名に変更した。

注意事項 1 変更した内容が判別できるように記載した新たな研究計画書等及び既に許可された研究計画書等の写しを添付すること。

2 ※印は記入しないこと。

別記様式第5号（第15条関係）

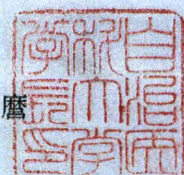
遺伝子解析研究変更許可決定通知書

平成22年10月1日

申請者（研究責任者）
薬理学講座臨床薬理学部門
安藤 仁 殿

自治医科大学

学長 高久 史 磨



受付番号：第 遺10-26号

課題等名

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10-15の変更）

さきに申請のあった上記の課題について、遺伝子解析研究倫理審査委員会での審議及び審査結果を踏まえ、研究の実施を許可することに決定したので通知します。

なお、遺伝子解析研究倫理審査委員会の判定結果は下記のとおりでした。

記

判定結果	承認	条件付承認	変更の勧告	不承認	中止	その他
理由、条件、勧告又は意見						

遺伝子解析研究計画書

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			
研究責任者 (申請者)	所属	薬理学講座臨床薬理学部門	職名	准教授
	氏名	安藤 仁		

1 試料等提供者の選定方針

本学附属病院またはさいたま医療センター泌尿器科で治療中であり、以下の選択基準をすべて満たし、かつ、除外基準のいずれにも該当しない患者

【選択基準】

1. 次の①～⑥のいずれかの疾患であると診断されており、主治医より各試験薬（単独または複数）による治療が必要と判断され、その薬物療法の開始（初回または再開）に同意している。

すでに他の試験薬による治療を受けている場合も除外しない。また、試験薬の再開とは1ヶ月間以上の休薬期間があった場合とする。

①関節リウマチ

試験薬 メトトレキサート ブシラミン
 レフルノミド エタネルセプト

②切迫流・早産

試験薬 リトドリン

③前立腺癌

試験薬 リュープロレリン フルタミド
 ビカルタミド リン酸エストラムスチンナトリウム

④口腔咽頭真菌症

試験薬 イトラコナゾール

⑤腎細胞癌

試験薬 エベロリムス

⑥三叉神経痛

試験薬 カルバマゼピン

2. 年齢：20歳以上

3. 性別：不問

4. 入院，外来：不問

5. 本人から本研究への参加の同意が文書で得られる。

【除外基準】

1. 添付文書上，試験薬の使用が禁忌である。

2. 併用禁忌薬により治療中である場合，その薬物を中止できない。

3. 試験薬による薬物療法の既往があり，その中止後1ヶ月未満である。

4. 高度の貧血（ヘモグロビン濃度<8 g/dL）が確認されている。

5. 多胎妊娠中である。

6. その他，医師により被験者として不相当と判断された。

2 研究の目的、意義、方法、期間、予測される結果・危険・不利益、個人情報の保護の方法

(1) 目的

多くの薬物は重篤な有害反応をきたすことがあり、臨床において重大な問題となっている。現在のところ、薬物の毒性は前臨床（動物実験）や治験の段階でチェックしているが、それだけでは一般臨床で使用する際の薬物有害反応の出現予測は十分に出来ない。そこで本研究では、有害反応が知られている薬物を使用する患者から末梢血を薬物投与前後に採取し、末梢血における薬物有害反応に関連した遺伝子群とその発現パターンを明らかにし、遺伝子発現情報に基づいた正確かつ簡便な新規薬物有害反応予測システムを構築することを目的とする。さらに、遺伝子発現パターンから毒性メカニズムが推測できた場合には、その有害反応の予防法の開発も目指す。

(2) 意義

従来の毒性試験よりも正確かつ詳細な薬物有害反応予測システムを開発することにより、臨床で使用する薬物の安全性が飛躍的に向上する。また、毒性メカニズム解明とその予防法開発により、毒性が危惧される薬物を使用せざるを得ない時の安全性も向上し、有害反応で苦しむ患者を減らすことが可能となる。

(3) 方法

本研究において対象とする薬物とその起こりうる重篤な有害反応は次のとおりである。

関節リウマチ治療薬

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
レフルノミド	—————	肝障害・間質性肺炎
エタネルセプト	—————	間質性肺炎

切迫流・早産治療薬

リトドリン	—————	肝障害
-------	-------	-----

前立腺癌治療薬

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
リン酸エストラムスチンナトリウム	—	肝障害・血栓塞栓症

真菌症治療薬

イトラコナゾール	—————	肝障害
----------	-------	-----

腎細胞癌

エベロリムス	—————	間質性肺炎
--------	-------	-------

三叉神経痛

カルバマゼピン	—————	肝障害・腎障害
---------	-------	---------

主治医より各試験薬による治療が必要と判断され、その薬物療法の開始（初回または再開）に同意した患者より、本研究への協力の同意を文書にて取得し、その後に血液検体を以下の内容およびタイミングで末梢静脈より採取する。

【関節リウマチ患者】 予定人数 各試験薬 50名ずつ 計 200名
附属病院アレルギー・リウマチ科で治療中の患者を対象に、外来、病棟もしくは臨床薬理学教室にて採血を行う。

① 試験薬投与前 (投与開始前1ヶ月以内)

RNA用採血 5 ml および血清保存用採血 5 ml 計 10 ml

一般血液・生化学検査用採血 (血算, 白血球分画, AST, ALT, γ -GTP, ALP, BUN, Cr, UA を含めた主治医の必要と判断する項目) *この検査は保険診療で行う。

② 試験薬投与後 初回の外来再診日 (入院継続中の場合は試験薬投与1ヵ月後)

RNA用採血 5 ml および血清保存用採血 5 ml 計 10 ml

一般血液・生化学検査用採血 (血算, 白血球分画, AST, ALT, γ -GTP, ALP, BUN, Cr, UA を含めた主治医の必要と判断する項目) *この検査は保険診療で行う。

③ 試験薬投与後1ヶ月以上が経過した②以降の外来再診日 (入院継続中の場合は試験薬投与2ヵ月後)

RNA用採血 5 ml および血清保存用採血 5 ml 計 10 ml

一般血液・生化学検査用採血 (血算, 白血球分画, AST, ALT, γ -GTP, ALP, BUN, Cr, UA を含めた主治医の必要と判断する項目) *この検査は保険診療で行う。

ただし, 有害反応等により試験薬の投与を早期に中止する場合には, その時点で同内容の採血を行い終了とする。

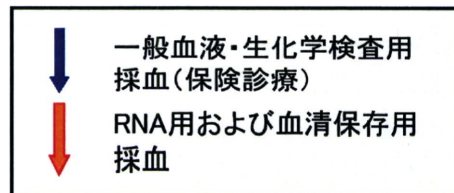
また, 試験薬の追加や変更があった場合には, 被験者より参加中止の申し出がなければ, 継続して新たな試験薬に対する採血 (①~③) を行うこととする (新たな試験薬に対する①がそれまでの試験薬の②や③と重複する場合には採血を追加しない)。

研究担当科: アレルギー・リウマチ科

対象疾患: 関節リウマチ

予定人数: 各試験薬50名ずつ 計200名

試験薬:
 メトトレキサート
 プシラミン
 レフルノミド
 エタネルセプト



* 有害反応等により試験薬の投与を早期に中止する場合には, その時点で ↓ を行い終了とする。

【切迫流・早産患者】 予定人数 50名

附属病院産婦人科で治療中の患者を対象に, 外来, 病棟もしくは臨床薬理学教室にて採血を行う。

① 試験薬投与前 (投与開始前2週間以内)

RNA用採血 5 ml および血清保存用採血 5 ml 計 10 ml

一般血液・生化学検査用採血 (血算, 白血球分画, T-bil, AST, ALT, γ -GTP, ALP, LDH,

CPK, Amy, BUN, Cr, UA) 5 ml *研究費でSRLへ提出する。

- ② 試験薬を経口薬で開始しそのまま継続した場合——試験薬投与開始1～3週間後
 試験薬を静脈内投与で開始した場合——試験薬投与開始1週間後
 (静脈内投与期間が1週間未満の場合も含む)
 試験薬を経口薬で開始し静脈内投与に変更した場合——静脈内投与開始1週間後
 (静脈内投与期間が1週間未満の場合も含む)
 のいずれか

RNA用採血 5 ml および血清保存用採血 5 ml 計 10 ml

一般血液・生化学検査用採血 (血算, 白血球分画, T-bil, AST, ALT, γ -GTP, ALP, LDH, CPK, Amy, BUN, Cr, UA) 5 ml *研究費でSRLへ提出する。

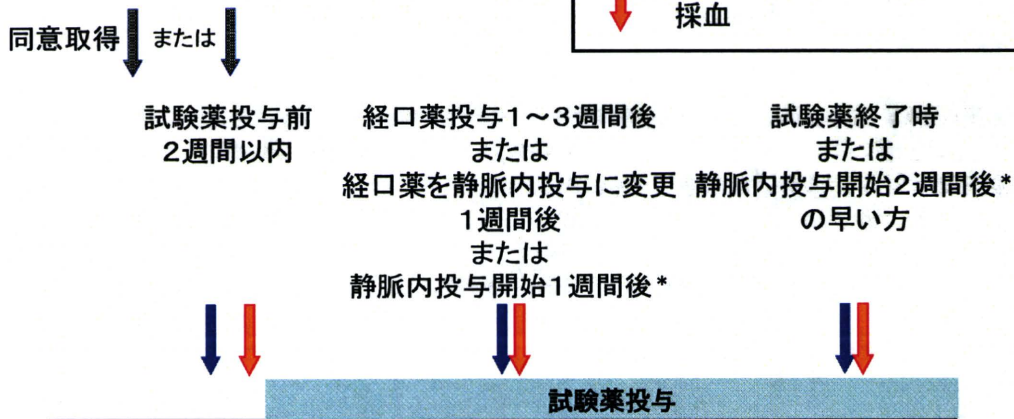
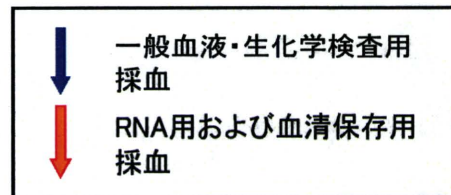
- ③ 試験薬を経口薬で開始しそのまま継続した場合——試験薬投与終了時
 試験薬を静脈内投与で開始した場合——試験薬投与開始2週間後
 (静脈内投与期間が2週間未満の場合も含む)
 試験薬を経口薬で開始し静脈内投与に変更した場合——静脈内投与開始2週間後
 (静脈内投与期間が2週間未満の場合も含む)
 の最も早い時点

RNA用採血 5 ml および血清保存用採血 5 ml 計 10 ml

一般血液・生化学検査用採血 (血算, 白血球分画, T-bil, AST, ALT, γ -GTP, ALP, LDH, CPK, Amy, BUN, Cr, UA) 5 ml *研究費でSRLへ提出する。

ただし、有害反応等により試験薬の投与を中止する場合には、その時点で同内容の採血を行い終了とする。

研究担当科：産婦人科
対象疾患：切迫流・早産
予定人数：50名
試験薬：リトドリン



* 静脈内投与を1週間未満あるいは2週間未満で終了した場合も含む。

●有害反応等により試験薬の投与を早期に中止する場合には、その時点で ↓ ↓ を行い終了とする。

【前立腺癌患者】 予定人数 計 100 名

附属病院泌尿器科で治療中の患者を対象に、外来、病棟もしくは臨床薬理学教室にて採血を行う。

《フルタミドまたはピカルタミドまたはリン酸エストラムスチンナトリウム投与患者》

① 試験薬投与前（投与開始前1ヶ月以内）

RNA用採血 5 ml および血清保存用採血 5 ml 計 10 ml

一般血液・生化学検査用採血（血算、白血球分画、AST、ALT、 γ -GTP、ALPを含めた主治医の必要と判断する項目） *この検査は保険診療で行う。

② 試験薬投与後 初回の外来再診日（入院継続中の場合は試験薬投与1週間後）

RNA用採血 5 ml および血清保存用採血 5 ml 計 10 ml

一般血液・生化学検査用採血（血算、白血球分画、AST、ALT、 γ -GTP、ALPを含めた主治医の必要と判断する項目） *この検査は保険診療で行う。

③ 試験薬投与後1ヶ月以上が経過した②以降の外来再診日（入院継続中の場合は試験薬投与1ヵ月後）

RNA用採血 5 ml および血清保存用採血 5 ml 計 10 ml

一般血液・生化学検査用採血（血算、白血球分画、AST、ALT、 γ -GTP、ALPを含めた主治医の必要と判断する項目） *この検査は保険診療で行う。

ただし、有害反応等により試験薬の投与を中止する場合には、その時点で同内容の採血を行い終了とする。

また、試験薬の変更があった場合には、被験者より参加中止の申し出がなければ、継続して新たな試験薬に対する採血（①～③）を行うこととする（新たな試験薬に対する①がそれまでの試験薬の②や③と重複する場合には採血を追加しない）。

研究担当科：附属病院泌尿器科

対象疾患：前立腺癌

予定人数：前立腺癌患者全体で100名

試験薬：フルタミド

ピカルタミド

リン酸エストラムスチンナトリウム

↓ 一般血液・生化学検査用採血（保険診療）
↓ RNA用および血清保存用採血



* 有害反応等により試験薬の投与を早期に中止する場合には、その時点で ↓ を行い終了とする。

《リュープロレリン投与患者》

④ リュープロレリン投与前（投与開始前1ヶ月以内）

RNA用採血 5 ml および血清保存用採血 5 ml 計 10 ml

一般血液・生化学検査用採血（血算、白血球分画、AST、ALT、 γ -GTP、ALPを含めた