

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 22 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

分担研究者 大村 功

分担研究者 鈴木 謙一

平成 23 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	137
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	228
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・主任研究員）

○大村 功（アステラス製薬（株）安全性研究所・主任研究員）

○鈴木 謙一（アステラス製薬（株）安全性研究所・主管研究員）

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いが、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。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。

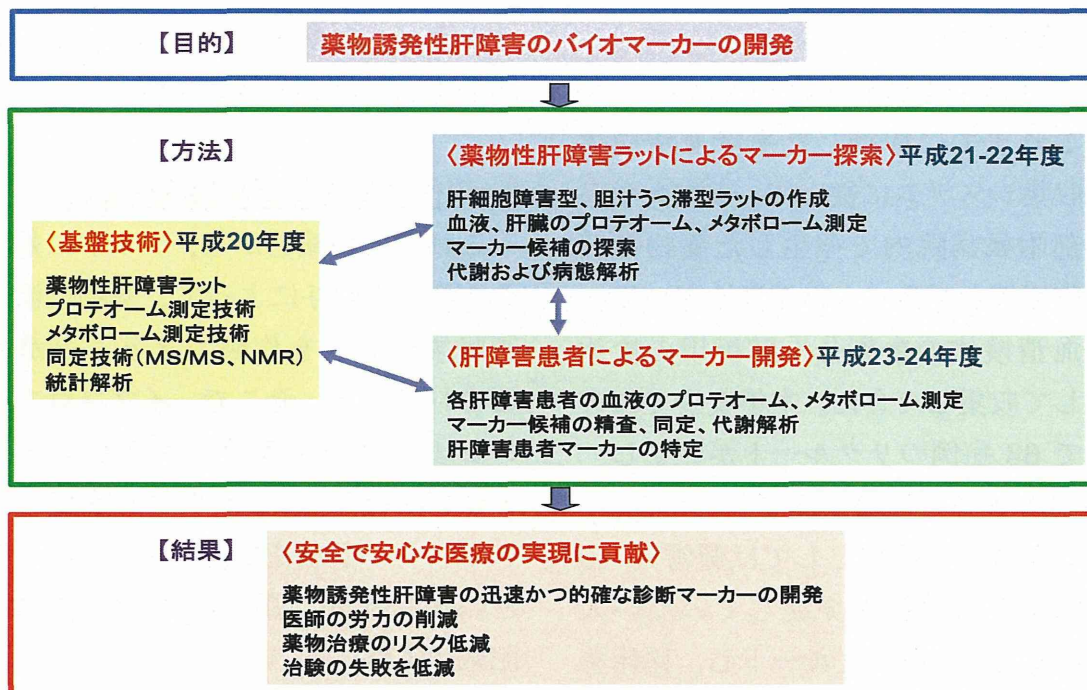
平成 20 年度は、低用量リポポリサッカライドの前感作を行うことで、薬物性肝障害モデル動物を作成する手法を確立した。また、各種肝障害患者の検体集積システムを構築し、大規模メタボローム解析の準備も進めた。平成 21 年度は、モデル動物の解析より見出されたバイオマーカー候補物質に関して、ヒト臨床検体を用いて検証を行い、 γ -Glu-X ジペプチドが肝障害患者において高値を示すバイオマーカーとして見出され、肝臓内グルタチオン・レベルの低下が、肝障害発症に関連する重要なメカニズムの一つとなっている可能性が示唆された。平成 22 年度は、より大規模に集積した薬物性肝障害検体を用いて検証を進めた結果、肝臓内グルタチオン・レベルの低下を反映すると考えられる血清中 γ -Glu-X レベルは、薬物性肝障害発症群においては、肝障害発現以前の段階からすでに高値を示し、肝障害の進展によって大きく変動しないことが見出された。また、炎症性サイトカインである TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 の血清中レベルが、同様に薬物性肝障害発症群において、肝障害発現以前の段階から高値を示し、肝障害の進展に伴う変動は少ないことが明らかとなった。これらの結果に基づいて、特異体質性薬物性肝障害の発症機序に関して、新たな理解が得られる可能性が示唆された。平成 23 年度以降は、特異体質性薬物性肝障害の発症機序に関する検討を中心に進め、ヒトにおける発症予測バイオマーカーとしての運用方法の確立・検証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イ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。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い、 γ -Glu-X ペプチドがバイオマーカー候補として見出された。平成22年度は、より大規模な臨床検体を用いた検証と、薬物性肝障害発症機序の解明を目指した検討を行った。

B. 研究方法

1. ヒト薬物性肝障害検体の分析

これまで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薬物性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てきた。本年度までに合計で 63 症例のリクルートが完了し、約 700 検体の収集が完了した。また、コントロール検体としては健常人 10 人および肝障害を発症していない入院患者 10 例をリクルートし、検体を採集した。

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、薬物性肝障害の発症に伴って変動することが明らかとなった γ -Glu-X ペプチド類に関して、高速液体クロマトグラフィー-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。

また前年度までの検討も含めたこれまでの検討からは、薬物性肝障害発症過程への炎症性サイトカインの関与が考えられた。そこで、代表的な炎症性サイトカインであり、動物モデルにおける LPS 投与に伴って大きく変動することが知られている TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 の 4 種類のサイトカインに関して、その血清中濃度を各サ

イトカインに対する ELISA 法を用いて測定し、結果の解析を行った。

2. 消化管障害モデル動物の解析

これまでの検討から、ラットに対する NSAID 投与によって、薬物性消化管障害モデルを作製できることが確認されていた。そこで、イブプロフェンおよびアセチルサリチル酸をラットに単回投与して、胃および血漿のメタボローム解析を実施した。(特許などの知財問題に関連するため、詳細な記載は省略する。)

3. 薬物性肝障害発症メカニズム解析

本年度の検討も含めたこれまでの検討からは、薬物性肝障害を発症した患者に共通する背景素因として、肝臓内グルタチオンの低下と、血清中炎症性サイトカイン・レベルの上昇が見出されてきた。そこで、肝臓内のグルタチオン低下が、肝障害発症にどのように寄与しているのかを検討することとした。

近年の報告では、薬物による肝障害発症リスクと、反応性代謝中間体が共有結合性に肝細胞内のたんぱく質に結合した、プロテイン・アダクトの生成量の間には相関関係が認められ、アダクト生成量が多いものはリスクが高い傾向が認められている。そこで、放射性標識したジクロフェナクをラットに投与し、肝臓内グルタチオン低

下処理によって、肝臓内でのアダクト生成量に影響が出るかを評価した。

また、炎症性サイトカインが薬物による肝細胞の障害にどのような影響を与えるかを評価する目的で、ラット肝細胞の初代培養系を用いて検討を行った。本研究において関与が見出されている4種類の炎症性サイトカイン TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 に関して、ラットの組み換えタンパク質が入手困難であったため、まずラットの遺伝子クローニングと、大腸菌による組み換えタンパク質発現系の構築を行った。いずれのタンパク質に関しても、His タグ標識を付加したタンパク質として発現させ、Ni レジンをを用いた精製手法によって組み換えタンパク質の単離精製を行った。次いで、得られたタンパク質を混合して、ラット初代培養肝細胞のメディウム中に添加し、ジクロフェナクの暴露に伴う細胞死を、細胞内 ATP 量の定量アッセイによって評価を行った。またこれに合わせて細胞内グルタチオンの枯渇処理をさらに加えた際の効果についても同様に評価した。

(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. ヒト薬物性肝障害検体の分析

本研究におけるこれまでの検討からは、ヒトの薬物性肝障害においては、 γ -Glu-X ジペプチドの血清中濃度の上昇が観察されることが見出されている。動物モデルにおける検討からは、肝臓内のグルタチオン低下に伴って、オフタルミン酸などの γ -Glu-X-Y トリペプチドの肝臓内濃度と血清中濃度に上昇が観察されることが明らかとなっているが、ヒトにおいてはその前駆体である γ -Glu-X ジペプチドの方がより適切な、薬物性肝障害マーカーとなることが考えられた。なお、こ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ことは、動物モデルの解析から明らかとなっている。

本年度は、薬物性肝障害を発症した患者に関し、症例のリクルート継続と検体の集積を進め、最終的には約 700 におよぶ検体の集積が完了した。それらの検体を、古典的な肝障害指標である血清中 ALT 値あるいは ALP 値の上昇を指標として、肝障害の発症以前の検体、検査値のピークを含んで肝障害発症中の検体、検査値が低下傾向に移った後の肝障害発症後の検体の 3 種類に分類を行い、解析を行った。(別添図 1)

その結果、薬物性肝障害を発症した患者においては、 γ -Glu-X ジペプチド

の血清中レベルは、コントロール群の値と比較して、いずれのタイミングにおいても高値を示しており、かつ肝障害発症ピークの前後で大きく変動することは無いことが明らかとなった(別添図 1)。これらの結果は、薬物性肝障害を発症した患者においては、薬物性肝障害の発症によって肝臓内のグルタチオンの消費が生じるのではなく、発症前の段階から何らかの理由で肝臓内のグルタチオン・レベルの低下が生じており、そのことが薬物性肝障害患者に共通する素因となっていることを示唆している。

また、同時に前年度までの検討から薬物性肝障害に伴って特異的に変動する可能性の考えられたセロトニン代謝物に着目した測定も行ったが、これらの代謝物に関しては個人差が非常に大きく有用なバイオマーカーにはなり得ないことが明らかとなったため、以降のこの点に関しては検討を行わないこととした。

さらに、上述の肝障害検体に関して、血清中の炎症性サイトカインのレベルに関する検討を行った。その結果、 γ -Glu-X ジペプチドのケースと同様に、TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 のいずれのサイトカインに関するも、肝障害発症前の段階から、コントロール群と比較して高値を示しており、薬物性肝障害の発症経過に伴って大きな変動を伴わないことが明らかとなった。これらの結果は、薬物性肝障害を発症した患者においては、薬物性肝障害の発症に

よって肝臓が炎症を起こして炎症性サイトカインの血清中レベルが上昇するのではなく、発症前の段階から別の病態的要因によって血清中の炎症性サイトカインのレベル上昇が生じており、このことが薬物性肝障害患者に共通する素因となっていることを示唆している。

これまでの研究においては、薬物性肝障害は特異体質性に発現し、予測は困難であると考えられてきたが、本研究のこれまでの結果を総合すると、薬物性肝障害を発症する患者には発症前の段階から肝臓内グルタチオンの低下と血清中の炎症性サイトカインの上昇という共通する素因を有していることが考えられ、これらのバイオマーカーを事前に測定してから薬物の投与を行うことによって、薬物性肝障害の発症を予測することができる可能性が示唆される。実際、本研究においてリクルートした患者のうち、肝障害発症ピークの10日以上前の検体が得られている42症例に関して、これらのバイオマーカーの測定値をスコア化した（別添図2）。その結果、薬物性肝障害の重症度とスコアの間に関連性が見出された。すなわち、本検討で見出されたこれらのバイオマーカーは発症予測バイオマーカーの可能性が考えられる。また、薬物性肝障害の発症リスクの高い状態の患者にはリスクのある薬剤の投与を避けることで、肝障害の発症を未然に抑制できる可能性が見出された。今後は特にこの点にフォーカスした検討

を進める予定である。

2. 消化管障害モデル動物の解析

NSAIDs 単回経口投与による、ラット消化管障害モデルを用いて、胃および血漿中のメタボローム解析を実施した。その結果、薬物の種類に依らず消化管障害の進展及びその回復に伴って変動するバイオマーカー候補物質が複数見出された。（特許などの知財問題に関連するため、詳細な記載は省略する。）

3. 薬物性肝障害発症メカニズム解析

ラット *in vivo* の検討からは、肝臓内のグルタチオンを枯渇させる処理を行った条件下では、肝臓内におけるジクロフェナクのアダクト形成量が上昇する傾向にある事が判明した。特にミクロソーム画分に共有結合した放射性ジクロフェナクの量は、グルタチオン枯渇処理に伴って有意に増大した（別添図3）。

また、ラット初代培養肝細胞を用いた *in vitro* の実験系においては、4種類のサイトカインである TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 の混合物に暴露された条件においては、肝細胞のジクロフェナクに対する毒性感受性は EC50 値で 10 倍以上と著しく増大することが明らかとなった（別添図4）。

さらに、グルタチオン枯渇処理条件下においては、グルタチオン枯渇処理単独では、ジクロフェナクに対する毒性感受性にほとんど影響を及ぼさない一方で、炎症性サイトカインに対す

る暴露と同時に行った際には、炎症性サイトカインのみへの暴露条件と比較してもさらにジクロフェナクに対する毒性感受性が增大する傾向が観察され、コントロール条件と比較した場合には、EC50 値で 100 倍以上の著しい毒性感受性の増大が生じることが明らかとなった（別添図 4）。

さらに、この条件においてアポトーシスの指標となるミトコンドリアからの cytochrome c の放出を、免疫ブロット法にて確認したところ、グル

タチオン枯渇処理およびサイトカインへの暴露を同時に行ったサンプルにおいては、ジクロフェナクの濃度に依存的に cytochrome c の放出が著しく増大することが確認され、アポトーシスがエンハンスされていると考えられた（別添図 4）。

D. 考察

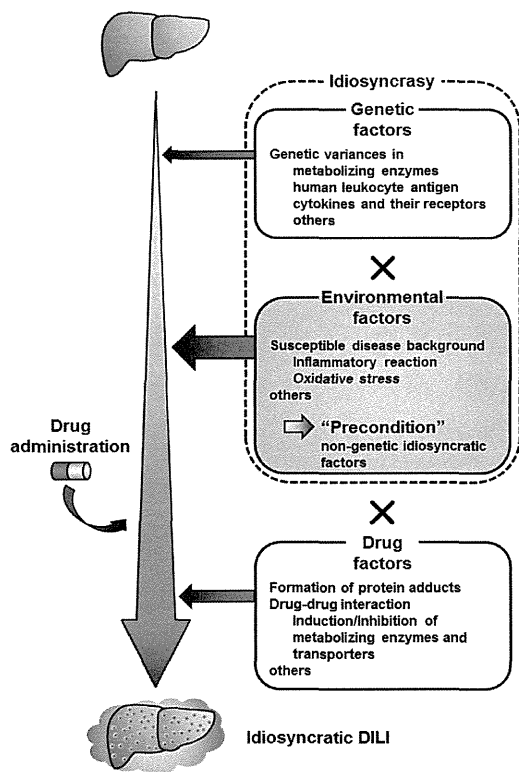
従来、薬物性肝障害の発症メカニズムは、中毒性のものと特異体質性のものに大別されてきた。中毒性の薬物性肝障害としては、アセトアミノフェンの大量服用に伴うものが代表的である。一方、特異体質性の薬物性肝障害は非常に広範な薬物の投与に関連して生じる副作用であり、薬物個々に見た際の発症頻度は低い、広範囲の薬物によって生じうるため、臨床において遭遇する頻度は高い。特異体質性の肝障害の発症機序には不明確な点が多く残されており、また発症の予測は困難であるとされてきた。本研究のこれまでの検討で対象とした薬物性肝障害症例にはアセトアミノフェンによるものは含まれておらず、ほぼ全ての症例が特異体質性機序によるものと考えられる。また、起因となっていると考えられる薬剤も多岐に渡っており、特定の薬剤の服用例が多くみられることも無かった。このような多様な症例を対象にした検討であるにも関わらず、症例に共通した事象として肝臓内グルタチオンの低下と血清中炎症性サイトカインの高値が観察され、またこれらの現象は肝障害発症以前から生じており、肝障害発症に伴って大きな変動は観察されなかった。これらの結果は、肝臓内グルタチオンの低下と血清中炎症性サイトカインの高値が、薬物性肝障害を発症する機序

に関連している可能性を示唆している。

実際、モデル動物や培養肝細胞を用いた検討からは、炎症性サイトカインに暴露された条件で、さらに肝臓内のグルタチオンを枯渇させる処理を加えると、薬物に対する毒性感受性が著しく亢進する結果が見出されている。すなわち、患者が有している基礎疾患などに起因して、血清中の炎症性サイトカインが上昇するような状況にあり、これに加えて肝臓内のグルタチオン消費が上昇して、肝臓内グルタチオン・レベルの低下が生じている場合に、肝臓の薬物に対する毒性感受性が著しく亢進しており、その際にリスクの高い薬物を投与されると最終的に薬物性肝障害が発症するという機序が考えられる。このような複数の要因が複雑に絡み合った結果、薬物性肝障害が発症すると考えれば、個々に見た際の薬物性肝障害の発症頻度が必ずしも高くないこと、および入院患者全体で見ただけでは、数%の頻度で発症例が観察されることなども説明が可能と思われる。

我々は、これらの検討結果に基づき、特異体質性という肝障害の発症機序をとらえ直す必要があるのではないかと考えている。「特異体質性」という言葉のニュアンスも寄与していると考えられるが、従来の特異体質性肝障害の発症素因の研究においては、主

として遺伝的要因にフォーカスした研究が行われている。実際、HLAの遺伝子型などと相関が観察される薬物性肝障害の例は複数報告されているが、あくまでも極一部の薬物に関してだけであり、他の多くの薬物に関しては、特に遺伝子型との相関関係は見出されていない。しかしながら、薬物性肝障害の発症過程は、①患者の遺伝的要因、②患者の病態など、生理的要因、③薬物自体の肝毒性リスクの強さ、の3種類の要因が重なり合うことで発症すると捉えるべきである。



これまでの主には①の遺伝的要因にフォーカスが置かれてきたが、本研究の

これまでの検討では、②の患者の背景疾患に影響される生理的要因が、広範囲の薬物による薬物性肝障害の発症に共通する要因として重要であり、肝臓内グルタチオンの低下と血清中炎症性サイトカインの高値がその条件に該当していることを示唆している。③の薬物自体のリスクに関しては、近年、プロテイン・アダクトの形成能が高い薬物ほど特異体質性肝障害の発症リスクが高いことが報告されている。

E. 結論

以上の結果を踏まえると、特異体質性肝障害の発症は、①～③までの各種リスクを総合的に評価する事である程度予測可能になることが考えられる。もし、本研究で見出されてきた血清中バイオマーカーを事前に測定しておけば、薬物の投与を行う前の段階で、その患者における薬物性肝障害発症リスクを評価する事が出来、結果としてその薬物の投与を行うことが妥当であるかを判断できるようになる、と考えられる。今後はこの点に特にフォーカスして検討を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

研究代表：曾我朋義

1. **Soga, T.**, Sugimoto, M., **Honma, M.**, Mori, M., Igarashi, K., Kashikura, K., Ikeda, S., Hirayama, A., Yamamoto, T., Yoshida, H., Otsuka, M., Tsuji, S., Yatomi, Y., Sakuragawa, T., Watanabe, H., Nihei, K., Saito, T., Kawata, S., Suzuki, H., Tomita, M., Suematsu, M., “Serum Metabolomics Reveals γ -glutamyl Dipeptides as Biomarkers for Differentiation among Different Forms of Liver Disease” **J. Hepatol.** online doi:10.1016/j.jhep.2011.01.031 ,2011
2. Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Suematsu, M., **Soga, T.**, Nozaki, T., “Metabolome Analysis Revealed Increase in S-methylcysteine and Phosphatidylisopropanolamine Synthesis upon L-cysteine Deprivation in The Anaerobic Protozoan Parasite *Entamoeba Histolytica*” **J. Biol. Chem.** **285**, 39160-39170, 2010.
3. Sugimoto, M., Hirayama, A., Robert, M., Abe, S., **Soga, T.**, Tomita, M., “Prediction of metabolite identity from accurate mass, migration time prediction and isotopic pattern information in CE-TOFMS data” **Electrophoresis** **31**, 1-8, 2010.
4. Sugimoto, M., Hirayama, A., Ihiskawa, T., Baran, R., Robert, M., Uehara, K., **Soga, T.**, Tomita, M., “Differential Metabolomics Software for Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Data Analysis” **Metabolomics** **6**, 27-41, 2010.
5. Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Horai, Y. M., Nakanishi, H., Ikeda, K., Akimoto, N., Maoka, T., Takahashi, H., Ara, T., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Neumann, S., Iida, T., Tanaka, K., Funatsu, K., Matsuura, F., **Soga, T.**, Taguchi, R., Saito, K., Nishioka, T., “MassBank: A Public Repository for Sharing Mass Spectral Data for Life Sciences” **J. Mass Spectro.** **45**, 703-714, 2010.

6. 曾我朋義: CE-MS法によるメタボローム解析と医薬への応用「遺伝子医学MOOK19号」, pp66-70, メディカル ドウ, 2011.

7. 曾我朋義: CE-MSメタボロミクスの最新動向「ぶんせき」Vol461, No.11, pp585-590, 日本分析化学会, 2010.

2. 学会発表

研究代表者: 曾我朋義

1. 曾我朋義「メタボロミクスによるがんの代謝解析」BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会、第83回生化学会大会 合同大会)、ワークショップ 癌と代謝 オーガナイザー、神戸ポートアイランド (ポートピアホテル)、2010年12月7日

2. 曾我朋義「メタボロミクスによる新規肝毒性マーカーの同定と機能解明」第31回日本臨床薬理学会年会、国立京都国際会館、2010年12月1日

3. 曾我朋義「最新のメタボローム測定法と医薬研究への応用」第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、東京大学本郷キャンパス、武田先端知ビル5階武田ホール、2010年11月28日

4. 曾我朋義「CE-TOFMSによる陰

イオン性化合物の最新測定法」

第31回キャピラリー電気泳動シンポジウム、長良川国際会議場、2010年11月16日

5. 曾我朋義「がん組織のメタボローム解析」第69回日本癌学会学術総会、シンポジウム網羅的解析、大阪国際会議場、2010年9月24日

6. 曾我朋義「CE-MSメタボローム測定法と生命科学への応用」日本分析化学会第59年会、特別シンポジウムオミクス計測のための分離分析システムの新展開、東北大学川内北キャンパス、2010年9月16日

7. 曾我朋義「メタボロミクスと創薬研究」ゲノム創薬フォーラム第26回談話会～パーソナルゲノム時代の創薬研究、日本薬学会会長井記念ホール、2010年9月6日

8. 曾我朋義「メタボローム測定法の開発と生命科学への応用」第3回研究会講演会ライフサイエンス分野における先端分析技術の開発と応用、京都リサーチパーク東地区1号館4階サイエンスホール、2010年7月30日

9. 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」第23回バイオメディカル
分析科学シンポジウム、ホテル
松島大観荘、2010年7月22日

10. 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3回東京アンチエイジングア
カデミー、東京ステーションコ
ンファレンス、2010年6月5日

11. 曾我朋義「メタボローム研
究の最前線」第64回日本栄養・
食糧学会大会、徳島アスティと
くしま、2010年5月23日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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」特
願 2010-543986

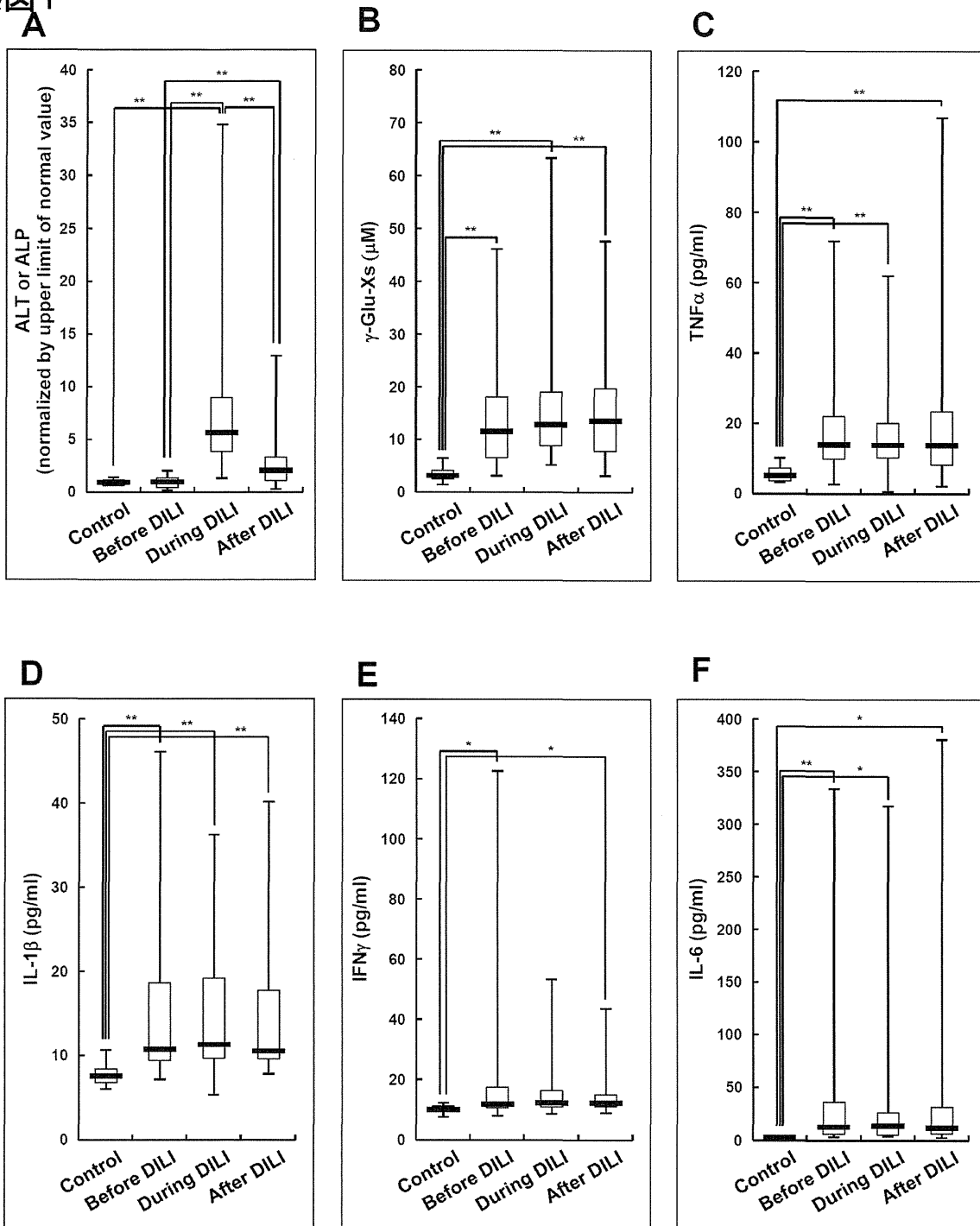
2. 曾我朋義、杉本昌弘、斎藤貴史、
河田純男、本間雅、鈴木洋史「肝
臓疾患マーカー、その測定方法、
装置及び医薬品の検定方法」特
願 2010-102579

3. 曾我朋義、杉本昌弘、末松誠、
斎藤貴史、河田純男「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」特願
2010-139736

2. 実用新案登録
なし

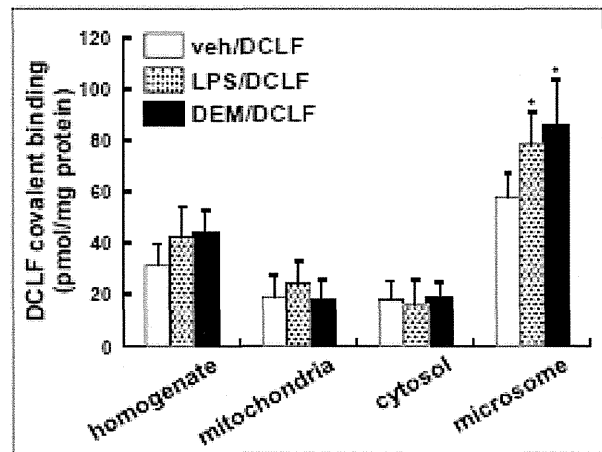
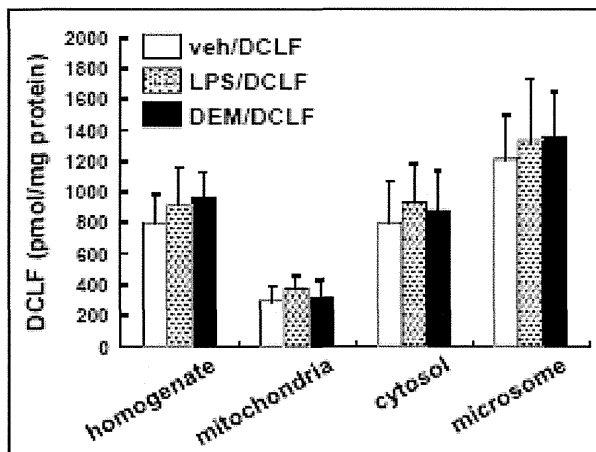
3. その他
なし

別添図1



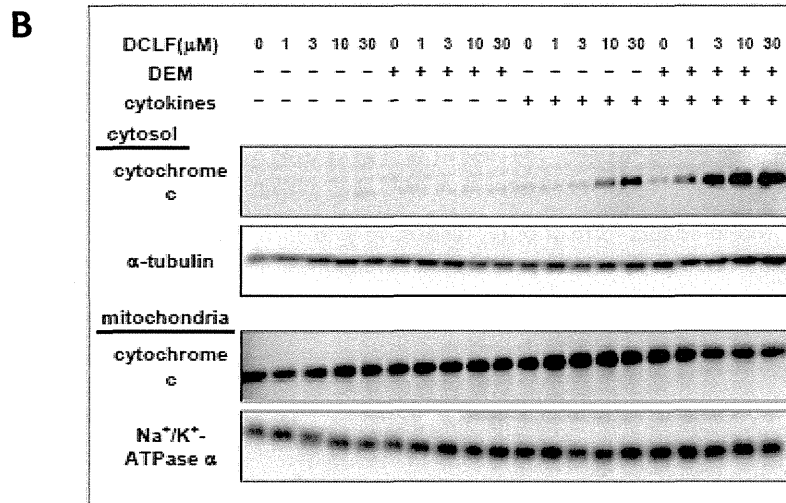
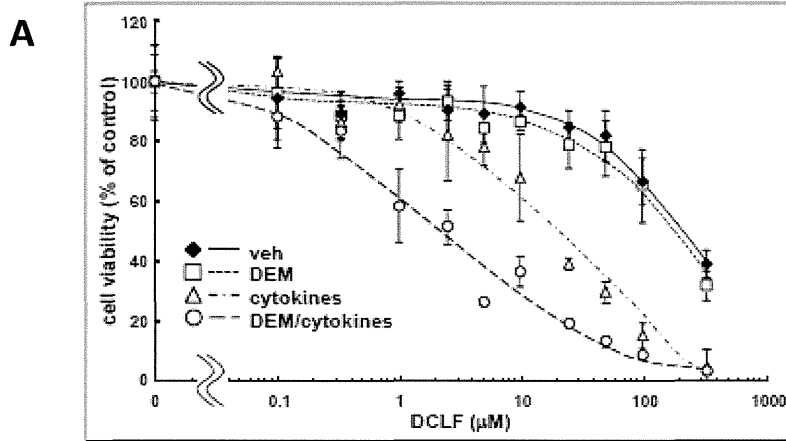
Serum concentrations of substances were determined in patients before the onset of DILI (Before DILI), during DILI (During DILI) and after the recovery of DILI (After DILI). Panel A shows the increase in the concentration of serum liver injury markers normalized by the upper limit of normal values. If $ALT \geq ALP$ or $ALT < ALP$, normalized values of ALT or ALP was selected, respectively. For control subjects, n=15 from 15 patients, whereas for Before DILI, During DILI and After DILI patients, n=281, n=278, and n=446, respectively, from 63 patients. Panel B shows the serum g-Glu-Xs concentrations. For control subjects, n=15 from 15 patients, whereas for Before DILI, During DILI and After DILI patients, n=116, n=140, and n=215, respectively, from 63 patients. Panel C shows the serum concentrations of TNF α . For control subjects, n=15 from 15 patients, whereas Before DILI, During DILI and After DILI patients, n=93, n=114, and n=81, respectively, from 63 patients. Panels D, E and F show the serum concentrations of IL-1 β , IFN γ and IL-6, respectively. In Panels D, E and F, the n for control subjects were 15 from 15 patients, whereas those for Before DILI, During DILI and After DILI patients were 90, 95 and 75, respectively, 63 patients). Each bar and box represents the median and the range from lower to upper median. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significantly different from the respective control groups.

別添図3



The total amount of DCLF and protein-adduct form of DCLF, respectively, in each fraction. Results are given as the mean \pm SD of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significantly different from the respective control group.

別添図4



Rat hepatocytes were cultured in the medium containing DEM, cytokines and DCLF at indicated concentrations for 24 h. (A) Cell viability was normalized by that in the absence of DCLF in each treatment. Closed diamond and open square, triangle and circle represent the results obtained in the presence of vehicle (veh), DEM, cytokines and both DEM and cytokines, respectively. Each approximation curve was drawn according to the least-squares analysis. Results are given as the mean \pm SD of 6 independent determinations. (B) Cytochrome c release from mitochondria to cytosol was determined by Western blotting. After 24 h incubation, fractions of mitochondria and cytosol were prepared from hepatocytes to determine the amount of cytochrome c. As a control protein in each fraction, Na⁺/K⁺-ATPase a and a-tubulin were confirmed in mitochondria and cytosol fraction, respectively. Results are given as the mean \pm SD of 4 independent determinations. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001, significantly different from the control group.

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 23 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 大畠 武二

分担研究者 奈良岡 準

分担研究者 竹内健一郎

分担研究者 大村 功

分担研究者 鈴木 謙一

平成 24 年 4 月