

201235059A

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床
適用に関する評価要件の確立研究
(H24-医薬-指定-028)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：斎藤 嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部
研究分担者：熊谷 雄治 北里大学 医学部 附属臨床研究センター
鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部
前川 京子 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

目 次

I. 総括研究報告書

血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の 確立研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
齋藤 嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）	

II. 分担研究報告書

副作用バイオマーカーの動向調査およびヒト副作用試料の収集・バ ンク化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	17
熊谷 雄治（北里大学 医学部 附属臨床研究センター）	

動物実験および尿中プロテオーム解析によるバイオマーカーの検出 およびその評価法の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	20
鈴木 孝昌（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部）	

動向調査、ヒト副作用試料のバンク化およびイオン性メタボローム 解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	32
齋藤 嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）	

脂溶性メタボロームバイオマーカー探索・検証のためのヒト血液試 料の採取及び保管に関する要件の検討・・・・・・・・・・・・・・・・	38
前川 京子（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表と別刷

研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・	45
--------------------------------	----

I. 総括研究報告書

血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 斎藤 嘉朗
研究分担者 北里大学医学部 附属臨床研究センター 熊谷 雄治
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 鈴木 孝昌
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 前川 京子

研究要旨：

現在の臓器障害バイオマーカーについて、各診療領域専門家との協議、文献的調査、北里大のデータベース検索等を行った。腎障害の L-FABP のような障害に特異的なマーカーを除き、多くのマーカーは比較的的非特異的であった。また近年、肝障害や腎障害を中心に数種の蛋白質や代謝物がマーカーになりうると報告されているが、多くのケースでは、副作用特異性が不明で、かつ別群での検証がされていない。また採取条件の影響も検討されていない。

血液および尿に関し、採取条件によるマーカー濃度への影響を明らかにし、安定的に測定しうる試料の採取要件を明確化するため、まず絶食後のヒト血液試料に関し、内在性代謝物濃度への採取・背景条件（性別、年齢、血漿・血清）及び保管条件（凍結融解）の影響を、網羅的に明らかにした。その結果、イオン性及び疎水性代謝物共に、一部の分子種では、そのレベルが血漿・血清間で大きく異なることが明らかになり、これらの分子種ではマーカー探索において、いずれかへの統一を早期にすべきであると示された。またアミノ酸等の一部のイオン性代謝物に関しては、凝固に伴い濃縮され感度良く、かつ数回の凍結融解後も安定に測定できる血清が適していること、一方、脂質分子種に関しては、機能脂質レベルが凝固反応の影響を受けない血漿が適していると示唆された。さらに一部の代謝物では、性別や年齢によりレベルが大きく異なることから、探索したバイオマーカーが、これらに該当する場合には、バイオマーカーとしての選択や診断の際に注意を要すると示唆された。プロテオームに関しては、マーカー同定に低レベル蛋白質の同定・定量が必要と考えられたため、抽出系の改良を行い、一回の分析で 700 以上の蛋白質を同定しうる系を構築した。この手法を用いて、性差、絶食の有無、採血時間など基本的な実験条件がラット尿プロテオーム発現解析に与える影響を検討した。その結果、雌雄間で最も大きな差が見られ、雄または雌特異的に発現している蛋白質を同定した。絶食に関しては大きな影響は認められなかった。

副作用発生時および回復時の血液・尿試料を収集しバンク化するため、北里臨床研究センター内に臨床研究事務局を設置し、学内各診療領域の専門家を含め臨床研究体制を構築し、試験計画書作成を開始した。また別途、国立衛研でも重篤副作用試料の収集を開始した。

A. 研究目的：

バイオマーカーは、臨床的な最終評価指標を、早期に、簡便に、かつ頑健に反映するサロゲート（代替え）マーカーとしての利用が医薬品開発において始まっている。医薬品の有効性の確保および安全性の向上のための指標となり、医薬品開発が効率化されるため、バイオマーカーを利用した世界の臨床試験年間登録数は急増している。医薬品開発において、理想的なバイオマーカーは、

- 1) 食事や運動等の環境要因に影響を受けない、
- 2) 非臨床・臨床段階で種差なく共通して変化、
- 3) 医薬品の有効性および安全性と、早期から感度・特異度高く相関、

するものと考えられる。しかしバイオマーカーの利用はまだ緒に就いたばかりであり、行政的にも

米国における組織学的知見を陽性対照とした概略的ガイダンス案しかなく、実データを反映した明確な上記項目に関する評価要件がないため、その探索・検証・利用は個別に模索している状態である。

医薬品開発において、遺伝子多型等のヒトに固有であるゲノム DNA 関連以外のバイオマーカーは、非臨床試験（動物）段階で見出され臨床試験（ヒト）に応用される。しかし、診断に多用される血液や尿では、マーカー候補となる蛋白質や内在性代謝物レベルの一部に雌雄差、日内変動、食事影響等が報告されており、その影響には種差がある可能性もある。従って、これら測定用試料の採取に関する要件を、科学的根拠を基に明確化することがまず必要である。また動物からヒトへの外挿

に関する評価要件は、非臨床段階でのマーカー分子の選択に大きく寄与する情報となる。本研究は、バイオマーカーの医薬品開発における利用を促進するための評価要件案作成の一環として、血液・尿中バイオマーカーに関し、特に問題となる測定用試料の採取条件、および非臨床動物で見出されたバイオマーカーのヒトへの外挿、に関する評価要件案の作成を目的とする。

初年度となる今年度は、バイオマーカーの開発動向調査を行うと共に、測定用血液・尿の採取に関する要件の明確化のため、試料採取条件（血漿・血清差）、試料背景（年齢差、男女（雌雄）差）、食事影響、及び試料保管条件（凍結融解の有無）の影響を、プロテオーム解析（対象：蛋白質）およびメタボローム解析（同：内在性代謝物）を用いて網羅的に解析した。また、重篤副作用試料の収集体制を構築し、一部は試料収集を開始した。

B. 研究方法：

1) バイオマーカーの開発動向調査

薬剤性臓器障害が出現した症例の診療状況、障害検出および病勢の判断に試用されているバイオマーカーの種類等について各診療領域専門家から聴取を行った。また、文献的調査およびこれまでにを行った臨床研究により蓄積してきた臨床検査データベース検索等を並行して実施し、診断の現状について検討した。さらに、ソウル国立大学にて、同大臨床研究センター In-Jin Jang 教授および延世大学臨床試験センター長 MinSoo Park 教授と、重篤副作用のゲノムバイオマーカー、肝障害や腎障害のメタボロームバイオマーカー等について情報交換を行った。

2) ヒト血液・尿の採取

健康白人の血漿・血清（14 時間以上の絶食下で採取）およびその際の尿を、ProMedDx 社（Norton, MA, USA）より購入した。若年男性、若年女性、老年男性、老年女性からなる 4 群とし、各群 15 名とした。本研究に用いた被験者の情報、及び検体の種類を表 1 に示した。試料は納品後、1 回融解して、分注した後、再度凍結（計 2 回）した。また、若年男性の血漿及び血清に関しては、別途、凍結融解を累計 10 回となるよう行った。

3) ラット血液・尿の採取

10 週齢および 30 週齢の SD ラットより、16 時間の絶食後、採血し、血漿・血清を調整した。10 週齢の雌と同雄、30 週齢の雌と雄、各 10 匹の 4 群に加え、絶食していない 10 週齢の雄、また同じ時間の絶食を行ったが試料採取時間（午前と午

後）が異なる 2 群も収集した。またこれら計 7 群について、蓄尿による尿の収集も行った。

4) プロテオーム解析

ショットガンプロテオミクス法では、トリプシン消化後に蛋白質およびペプチド混合試料を、液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS）で分析するが、尿中には高濃度の蛋白質があり、そのため微量の蛋白質は検出できない。そこで、雄ラット尿を用いて、高濃度蛋白質の除去に関する前処理条件の検討をまず行なった。

まず種々の濃度の有機溶媒（アセトン、エタノール等）により尿を処理した際の、蛋白質沈殿条件について検討した。有機溶媒添加後、遠心して形成した沈殿を洗浄し、0.1% Rapigest (Waters) に溶解させた。さらに、トリプシンによる消化を促進するため、dithiothreitol による S-S 結合の還元とヨードアセトアミドによるアルキル化処理を行なった。トリプシン溶液を加え、37°C で一晚消化した溶液を、ZipTip C18-P10 (Millipore) にて精製後、LC-MS 解析に用いた。

ナノ LC として、ADVANCE S Nano LC System (Michrome) を、質量分析装置としては、ESI-ion trap/FT 型 LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher) を用い、通常は、ポジティブモードで使用した。質量分析データは Xcalibur を用いて解析し、基本的にデータ依存的 MS/MS 測定を同時に行った。また、定量比較のための解析ソフトウェアとして Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics) を比較プロテオーム解析に利用した。MS/MS 測定から得られたフラグメントイオンパターンより、ペプチドマスフィンガープリンティング法による蛋白質の同定を行うための解析ソフトである MASCOT (Matrix Science) を用いて、SwissProt プロテインデータベースを検索した。同定の信頼性には、MASCOT のデフォルト値である、 $p < 0.05$ を用い、切断ミス許容数 1 にて検索を行った。

5) イオン性メタボローム測定

委託先であるメタボロン社での測定に供した。測定試料はメタボロン社標準手法によって抽出され、液体クロマトグラフ-リニアイオントラップ型質量分析計及びガスクロマトグラフ-四重極リニアイオントラップ型質量分析計によって解析された。アミノ酸及びその代謝物 73 化合物、ペプチド 29 化合物、糖及びその代謝物 21 化合物、エネルギー関連代謝物 5 化合物、小分子脂質及びその代謝物 144 化合物、核酸及びその代謝物 11 化合物、補因子・ビタミン及びその代謝物 14 化合物、計 297 化合物を測定対象とした。

質量分析データは、メタボロン社ライブラリーに基づき、代謝物の同定を行った。同定した代謝物は性質により大項目（アミノ酸・脂質等）、及び細かい性質と代謝経路により小項目（アラニン・アスパラギン酸代謝等）として分類した。老年女性検体群の1検体に関しては、血清中にEDTA-2Kを検出したことから解析から除外した。イオン性代謝物のレベルはイオンピーク値により定量を行い、日間による測定値の変動を補正した。測定限界以下の代謝物のレベルは、全検体中で測定可能であった最低値を代入し統計解析を行った。各検体群間のイオン性代謝物レベルの違いにつき、paired t-tests（血漿・血清間の比較、及び反復凍結融解の有無による比較）または、Welch's t-tests（男女間、及び年齢間の比較）等による統計解析を行い、 $p < 0.05$ を有意な差、 $0.05 < p < 0.1$ をそれに準ずる差と判定した。全検体間におけるイオン性代謝物の包括的比較は直交部分最小二乗法判別分析（OPLS-DA）モデルを用いて行った。

6) 疎水性メタボローム解析

ヒト血清・血漿を用いて、内部標準物質 (IS) 存在下、中性条件で Bligh & Dyer 法により脂溶性代謝物を抽出し、下層（有機層）及び上層（水層）を分取した。グリセロリン脂質

（Glycerophospholipids, GPL）・スフィンゴ脂質（Sphingolipids, SP）・中性脂質等の脂溶性の高い代謝物を含む下層は、超高性能液体クロマトグラフー飛行時間型質量分析計（UPLC-TOFMS、超高性能液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC、飛行時間型質量分析計は Waters 社 LCT Premier XE）を用いて、脂質代謝物を網羅的に相対定量した。並行して、GPL、SP の脂肪酸の組成を同定する目的で、超高性能液体クロマトグラフーリニアイオントラップ型質量分析計（UFLC-LTQ、超高性能液体クロマトグラフは島津 Prominence UFLC、リニアイオントラップ型質量分析計は、サーモフィッシャーサイエンティフィック社 Finnigan LTQ）を用いて、同定された脂質代謝物の構造解析を行った。

酸化脂肪酸（oxidative fatty acids, oxFA）を含む上層は、さらに Oasis HLB Vac RC cartridge（Waters 社）を用いて固相抽出を行い、ギ酸メチル画分を分取し、サンプルとした。超高速液体クロマトグラフー三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計（UPLC-MS/MS、高速液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC、三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計は AB SCIEX 社 QTRAP5500）を用いたネガティブイオンモードでの多重反応モニタリング法にて測定した。

UPLC-TOFMS により得られたデータは、2DICAL（三井情報（株））を用いてピークを抽出し、UPLC-TOFMS の保時時間、精密質量及びマススペクトル、さらに UFLC-LTQ の構造解析のデータに基づき、代謝物の同定を行った。相対定量には、IS により補正を行った全ピークの height 値を用い、Wilcoxon signed-rank test（血漿と血清間の比較、及び凍結融解の回数による比較）または、Mann-Whitney U-test（男女差、及び年齢差の比較）による統計解析を行い、 $p < 0.01$ を有意な差と判定した。

UPLC-MS/MS より得られたデータは、MultiQuant ソフトウェア（AB SCIEX 社）を用いて検出された代謝物ピークの面積値を求めた後、IS により補正を行い、Wilcoxon signed-rank test（血漿と血清間の比較、及び凍結融解の回数による比較）または、Mann-Whitney U-test（男女差、及び年齢差の比較）による統計解析を行い、 $p < 0.01$ を有意な差と判定した。

7) 重篤副作用試料の収集

バイオマーカーに関する調査結果に基づき、北里大学内に試料収集体制を構築した。また別途、国立衛研では、重症薬疹、横紋筋融解症、間質性肺障害を対象に、発症患者からの血液の収集とゲノム DNA の抽出を行った。

（倫理面での配慮）

本研究のうち、重篤副作用試料の収集に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき、機関研究倫理審査委員会の承認を得て遂行した。また健常ボランティア試料のメタボローム解析は、ProMedDx 社から市販されている血漿、血清を使用した研究である。ProMedDx 社において被験者から適切な同意を取得後、採取された試料であり、個人情報と連結不可能匿名化されていることから、機関研究倫理審査委員会において、審査の非該当とされた。

動物実験の実施に際しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「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」等の関連規定に則った、国立衛研の「動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守し、研究実施の承認を得て行った。その際には、可能な限り、苦痛の軽減等に努めた。

C. 研究結果：

1) バイオマーカーの開発動向調査

薬物有害反応の診断バイオマーカーとして使用されているものは、肝障害に関しては血中ビリ

ルビン、AST、ALT、 γ -GTP など、腎障害については血清クレアチニン、シスタチン C、尿中 NAG、 β 2 ミクログロビン、L-FABP など、間質性肺障害では臨床症状、X 線所見、等であった。腎障害の L-FABP のような障害に特異的なマーカーを除き、多くのマーカーは比較的非特異的なマーカーであった。最近、腎障害マーカーとしては、Kim-1 も有用であることが報告されている。さらに抗がん剤ゲムシタピンによる重篤な血液毒性（好中球減少および血小板減少）の発症と血中のハプトグロビンのレベルが有意に相関すること、血清中のアポリポ蛋白質 E のレベルが 89%の正確性で肝障害患者と健常人を区別しうること等が報告されている。代謝物マーカーとしては、肝障害に関して ALT+ γ -グルタミルシトルリンのレベルがマーカーとなりうること、急性腎障害患者の血清を対象とした研究でアシルカルニチンや数種のアミノ酸レベルの増加やリゾフォスファチジルコリンの減少が報告されている。

また韓国での調査では、臨床研究/試験において使用されているバイオマーカーはある程度バリデーションされたものが主であり、探索的な使用はされていないのが現状であり、日本と幾分異なる傾向も見られた。Jang 教授は、現時点では遺伝子の検索よりむしろメタボロミクスによるバイオマーカーの発見が有望であり、臓器障害のタイプによるバイオマーカーの違いについても精力的にデータを収集するべきであると強調されていた。今後の共同研究についてどのような形での協力があり得るか、さまざまな方向性を議論したが、現状では情報の共有、有望なバイオマーカーを発見した場合の前向きな研究などが実施可能性が高いと考えられた。

2) プロテオーム解析

2-1) 条件検討

まず予備試験を行った。標準的な解析法であるアセトン 80%、 -20°C 、1 時間処理による蛋白質の沈殿を行い、トリプシン消化後、LC-MS/MS 測定を行ったところ、多数のペプチドスポットが検出されたが、幾つかのピークに関しては存在量が多いため、テーリングを起こしていた。また、最も同定されたペプチド数の多かったのが、雄特異的蛋白質とされる major urinary protein (MUP)であった。この他、上位にランクされた蛋白質として urinary protein 1,2 3 (UP1, UP2, UP3)があり、これらのペプチドが 3 次元グラフ上の濃いスポットに相当することが確認できた。通常 LC-MS 測定におけるエレクトロナノスプレーによるイオン化では、イオン化できるペプチドの量に制限があるため、こうした高発現量の蛋白

質由来のペプチドと同時に溶出する他のペプチドのイオン化が抑制されるため、微量ペプチドの検出が難しくなる。そこで、安価で簡便に特定の蛋白質を除去できる手法として蛋白質の有機溶媒による沈殿法に着目し、高発現量の蛋白質の除去のための条件検討を行った。

異なる終濃度のアセトンおよびエタノールを用いた際に、LC-MS 解析で得られた総ペプチド数および同定蛋白質数の結果において、最も良い結果が得られたのがエタノール 50%を用いた場合であり、ペプチド数として約 25,000、同定蛋白質数として 455 が検出、同定された。一方、この際の蛋白質の回収率は、有機溶媒濃度が下がるにしたがって減少し、エタノール 50%においては、回収率 14.1%であった。回収率は低いものの、高発現量の蛋白質の除去効果により、検出できるペプチドの総数が増えたと考えられる。以上の結果より、今後の検討には、エタノール 50% (終濃度)にて沈殿させることにより、尿蛋白質を回収することとした。沈殿生成時のインキュベーション温度、振とうの有無、事前の蛋白質変性操作に関しても検討を行ったが、有機溶媒濃度ほど大きな変化は見られなかった。そこで、操作の簡便性からも、インキュベーションは、室温にて 1 時間、振とうなし、事前変性処理なしの条件を標準プロトコールとして採用することにした。尿サンプルの必要量は、通常 LC-MS へのインジェクションに適切なペプチドサンプル量 4 μg を得るために、初期蛋白質量として、オスの場合は 300 μg を設定した。この量の蛋白質を得るために必要な尿サンプルの容量は、平均約 250 μl であった。一方、メスの場合には 200 μg に設定し、平均必要尿量は 430 μl であった。

2-2) ラット尿中プロテオーム解析

30 週齢の群を除く、10 週齢の 5 群のラットから得られた LC-MS データの定量比較を行った。得られたデータを統合して、群ごとのばらつきおよび類似性を評価するため、主成分分析 (PCA) を行ったところ、同一群内の個体からのデータは、比較的まとまりを持ってプロットされた。なかでも類似性が高く平均的な位置にプロットされたのが雄、22 時間絶食、午後採血のグループであった。この群だけ、午後の採血であるが、尿の採取は 22 時間行っているため、他群に比べてデータのばらつきが少なかった原因は不明である。

比較的ばらつきが大きかったのが、雄、非絶食、午前採血群であるが、この群においてはサンプルの品質が悪かった。現時点のデータでは絶食を行った方が、ばらつきの少ないデータが得られるという結論になるが、絶食と非絶食群の間には PCA

上大きな差異は見られず、メタボローム解析と異なり、食事の影響は受けにくいことが明らかになった。

雌雄間の比較においては、予想されたように差が認められた。詳しく検討を行った結果、図 1 に示すように、雌雄共通して発現する蛋白質の種類は 909 であるのに対し、雄のみで発現する蛋白質は 544、雌のみで発現する蛋白質は 533 と、どちらも同定蛋白質数の約 1/3 程度を占めた。雄特異的蛋白質としては、前立腺や精巣など雄特異的臓器にて発現する蛋白質が含まれており、妥当な結果といえる。雌特異的蛋白質には、BRCA1,2, IP₃ 受容体など、機能的に注目される蛋白質も含まれており、性特異性との関連が注目される。

また採尿のタイミングに関しては多少の差が見られたが、昼夜の排尿のタイミングによる個体差をなくす意味では、今回は検討しなかったが 24 時間尿を採取することが望ましいと考えられる。

週齢の影響については、現在 30 週齢のサンプル解析を行っており、まだ結果が得られていないため、来年度に報告を行う。

3) ヒト血液のイオン性メタボローム解析

OPLS-DA モデルによって、全検体間のイオン性代謝物を包括的に比較したところ、血漿・血清間の差異が最も大きく、次いで年齢差・男女差であり、反復凍結融解の有無の差異はほとんど認められなかった。また、血漿・血清どちらに関しても、年齢差・男女差は同様に認められ、年齢差は女性において、男女差は若年において大きく認められた。反復凍結融解の有無の差異は、血清と比べ血漿において大きく認められた。

血漿・血清間のイオン性代謝物レベルの差異は、年齢間及び男女間でほぼ同様の結果を示した。解糖系産物である糖・エネルギー関連代謝物、及び血液凝固反応により分解されるポリペプチドは血漿中で、血液凝固反応の産物である小分子脂質等、及び血液凝固に伴う蛋白質分解産物であるアミノ酸・ジペプチド等は血清中で有意に高いレベルを示した。血漿と血清間で 2 倍以上の差があった代謝物は、若年男性で 27 種、老年男性で 25 種、若年女性で 32 種、老年女性で 38 種、であった。

年齢間のイオン性代謝物レベルの差異は、血漿・血清間でほぼ同様の結果を示した。年齢間においてレベルに有意な差のある代謝物は男性よりも女性で多く認められた。男性では、クエン酸回路に関わる代謝物が老齢で有意に高いレベルを示した。男性において若年または老年において有意に高いレベルを示した代謝物は、上記以外の各代謝経路において特徴ある分布が認められなかった。女性では、脂肪酸及び黄体ホルモン代謝

物が若年において、アミノ酸及び胆汁酸代謝物・小分子中性脂質が老年において有意に高いレベルを示した。また、メチル基供給源であるジメチルグリシン、蛋白質の分解の指標である C-マンノシル化トリプトファン、フェニルアラニンの腸内細菌による異化産物と考えられるフェニルアセチルグルタミン等のレベルが、性別及びマトリックスに関係なく、若年と比較して老年で有意に高かった。若年と老年間で 2 倍以上の差があった代謝物は、男性血漿で 11 種、男性血清で 13 種、女性血漿で 11 種、女性血清で 12 種、それぞれ認められた。

男女間のイオン性代謝レベルの差異は、血漿・血清間でほぼ同様の結果を示した。男女間においてレベルに有意な差のある代謝物は老年よりも若年で多く認められた。若年では、アミノ酸が男性において、脂肪酸が女性において有意に高いレベルを示した。またホルモン類に関しては男性ホルモン代謝物が男性で、黄体ホルモン代謝物が女性において有意に高いレベルを示した。老年では、男性ホルモン代謝物が男性において有意に高いレベルを示した。本代謝物群以外に、老齢において、男性または女性で有意に高いレベルを示した代謝物は認められたが、特定の代謝経路に集中した変化は見られなかった。男女間で 2 倍以上の差があった代謝物は、若年血漿で 7 種、老年血清で 8 種、若年血漿で 5 種、老年血清で 2 種、であった。

凍結融解処理 2 回と 10 回間のイオン性代謝レベルの差異は、血清と比べ血漿で大きく認められた。ヘモグロビン・ポルフィリン代謝物は血漿・血清どちらにおいても変化が認められ、ポリペプチド・プリン代謝物は血漿のみ変化が認められた。反復凍結融解前後で 2 倍以上の差が認められた代謝物は、血漿で 8 種、血清で 4 種であった。

検出率及び同一試料背景内の差異であるが、まず、今回測定した一部のイオン性代謝物は血漿または血清のみで検出された。また、血漿・血清どちらについても検出率 80% を超える代謝物は全体の 75% 程度であった。また、同一試料背景内における個体差についても代謝物により異なり、同一試料背景内の RSD (relative standard division) が 0.5 以下の代謝物は血漿・血清どちらについても全体の 55% 程度であった。

4) ヒト血液の疎水性メタボローム解析

年齢及び性別の異なる 60 名の血漿・血清からなる 120 サンプルから、Bligh & Dyer 法の下層 (有機層) において 229 種の脂質代謝物が同定された。一方、上層のギ酸メチル画分から 25 種の脂肪酸

代謝物が同定された。主な結果を表 2 に示す。

血漿・血清間の脂質代謝物レベルの比較では、数種のリゾフォスファチジルコリン (LPC) 及びジアシルグリセロール (DG) 分子種が、男女及び年齢に関わらず、血漿に比較して血清中で有意に高いレベルを示した。1.5 倍以上の違いを示した具体的な分子種として、16:0LPC (1.6 倍、若年男性の血漿に対する同血清の比) 等が同定された。一方で、検出された脂質代謝物のうち、上記以外には、血漿・血清間において、全 4 群に共通して、レベルの違いを認める分子種は見出せなかった。一方、脂肪酸代謝物のうち、血漿に比較して血清中でレベルの増加が認められた分子種として、アラキドン酸 (AA) の代謝物である 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE、同 1.6 倍)、Thromboxane B₂ (TXB₂、同 1.7 倍) 等が見出された。逆に、血漿に比較して血清中でレベルの減少が認められた分子種としては、8-HETE (0.4 倍) 等が見出された。

男女間の脂質代謝物レベルの比較では、マトリックス・年齢に関わらず、多くのスフィンゴミエリン (SM) 分子種が男性と比較して女性で有意に高いレベルを示した。違いが認められた分子種として、36:2SM (1.7 倍、若年男性血漿に対する若年女性血漿の比) 等が挙げられた。さらに、老年では SM 分子種に加え、ドコサペンタエン酸 (DPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) を含むグリセロリン脂質・コレステロールエステルのレベルに有意な男女差が認められた。違いが認められた分子種として、40:6 フォスファチジルコリン (PC、18:0/22:6PC、1.6 倍、老年男性血漿に対する老年女性血漿の比) 等が挙げられ、いずれも老年男性と比較して老年女性で有意に高いレベルを示した。さらに、高度不飽和脂肪酸を含むと推定される一部のトリアシルグリセロール (TGs) のレベルが老年男性と比較して老年女性で高かった。脂肪酸代謝物では、老年において男女差を示す代謝物が見出され、18-HETE (0.5 倍、老年男性血漿に対する老年女性血漿の比) 等が老年男性と比較して老年女性で有意にレベルが低かった。

若年・老年間の脂質代謝物レベルの比較では、男女を問わず、20:5 コレステロールエステル (ChE) レベル (若年男性血漿に対する老年男性血漿の比、1.5 倍) の差が認められた。上記に加え、男性血漿では、36:5PC (16:0/20:5 PC、同 1.4 倍) が、女性血漿では、多くの LPC 分子種、DPA 及び DHA を含む PC 及び ChE、さらに多くの TG 分子種のレベルが有意な年齢差を認めた。脂肪酸代謝物では、男性において 5-hydroxyeicosapentaenoic acid (5-HEPE、2.2 倍、血漿の比) が若年と比較して老年で顕著に増加し

た。一方、女性では、18-HETE (0.6 倍、血漿の比) が若年と比較して老年で有意に低下した。

凍結融解を 10 回繰り返したサンプルでは、凍結融解を 2 回行ったサンプルと比較して、血漿・血清を問わず、コレステロールのレベルが減少し (0.7 倍、若年男性血漿における、凍結融解 2 回に対する 10 回の比)、ChE のレベルが増加した (18:2ChE で同 1.3 倍)。さらに DG 分子種のレベルが反復凍結融解により減少し、34:1 DG で 0.5 倍に減少した。一方、ほぼすべての GPL・SM、及び多くの TG 分子種は、凍結融解により、20% 程度のレベルの減少が認められた。脂肪酸代謝物では、すべての分子種のレベルが反復凍結融解により 0.7 倍程度に低下した。

5) 重篤副作用試料の収集

各臓器障害は多くの診療科で発生しているが、多くの症例は専門診療科へ紹介され診断治療を受けている。このことから、消化器内科、腎臓内科、呼吸器内科などの各疾患領域の専門家が参加する臨床研究事務局を北里臨床研究センター内に設置した。

また、新しいマーカー検索のための具体的な検体の採取・取り扱い手順を踏まえた試験計画書作成を開始した。本臨床研究体制は以下の通りである。

・事務局

- 北里大学医学部臨床研究センター
- ・CRC 派遣 (IC 取得補助、検体採取)
- ・CRF 作成
- ・データベース作成・管理

・研究参加診療科

- 消化器内科: 薬物性肝障害
- 腎臓内科: 薬物性腎障害
- 呼吸器内科: 間質性肺障害

研究計画書の概要

- ・参加診療科内または参加診療科へコンサルティンクされた薬剤性臓器障害を発症した患者を対象。
- ・説明と同意の手順
- ・血液採取、保管、輸送
- 臓器障害発生時の採取、利用可能な既存試料の取り扱い。検体発送時の匿名化。
- ・背景情報の収集、管理
- 電子カルテから、背景、原疾患、各種検査データ、併用薬等の情報収集。連結可能匿名化の手順。
- ・フィードバックされるプロテオミクス・メタボロミクス情報の種類と管理

- ・データベースの作成と管理
- ・成果の公表と個人情報管理
- ・関連法規の遵守

また、試料収集数の確保の観点から、別途、国立衛研でも、重篤副作用試料の収集を行った。成果としては、間質性肺障害 33 例、横紋筋融解症 13 例、重症薬疹 1 例に関し、発症患者からのインフォームドコンセントの取得後、血液の収集およびゲノム DNA の抽出を行った。ゲノム DNA については、分注後、 -80°C で保存した。

D. 考察：

1) バイオマーカーの開発動向調査

調査した範囲で、Kim-1 等を除く多くのケースでは、副作用特異性が不明で、検証もなされておらず、臨床現場での利用に至っていない。さらに、多くのケースでは、採取条件の影響も不明であった。また今後、バイオマーカーの探索が特に必要と思われる副作用は、発症予測が難しく、劇症化する場合がある薬物性肝障害と間質性肺障害であると考えられた。

2) ラット尿のプロテオーム解析

プロテオーム解析によるバイオマーカー開発の成否を決める最も重要な要素としては、検出系の感度を高めることがあげられる。これまで、2次元電気泳動を中心にして多くのバイオマーカー候補が見つけれられてきたが、その大部分は高発現量の蛋白質であり、真に有用なバイオマーカーとなるものは少なかった。各種サイトカインや腫瘍マーカー等のバイオマーカーは、その発現量が少ないことが多く、これらの発現量まで解析系の検出感度を高めることが必要とされる。その点、尿中蛋白質は、高発現量の蛋白質が血液中ほど顕著ではないため、解析がしやすいという利点がある。また、安定性、採取のしやすさという観点からも、バイオマーカー探索のための生体試料として好都合である。

しかし、血液中ほどではないもののやはり尿中にも比較的発現量の高い蛋白質があり、さらに検出感度を高めるためには、これらを除く前処理が必要である。そこで、ラット尿中において高発現する MUP および UP を適当な有機溶媒による選択的沈殿という比較的簡便な方法で取り除く方法を開発した。この方法を用いて、今年度はラットの性差、絶食の影響などについて検討し、基本的なデータを得た。特に性差に関しては予想されたように差異が見られ、尿において性特異的に発現する蛋白質を同定した。一般に、バイオマーカーとしては性差の影響を受けにくいものが望まれ、

これらの蛋白質は適切ではないと考えられるが、性特異的なレスポンスを反映するマーカーとしては、むしろ有望である可能性がある。いずれにしても、バイオマーカー候補を同定した場合には、性差に関する情報を得ておくことも重要であると考えられる。

今年度はこうした基本的実験条件による尿中プロテオーム発現の変化に関して検討したが、PCA 解析の結果得られた情報として、同一群内の個体間のばらつきが PC1 方向に認められる傾向があった。PC1 として寄与の大きい蛋白質に関して今後検討が必要であるが、こうした個体差の大きい分子はバイオマーカーとしては望ましくない。群内のバラツキという観点においては、午後に採血を行った群が最も小さかったが、採尿を午後に終えるという行為がどのように影響するかについては今後の検討が必要である。来年度は、ヒトへの外挿へ向けた種間での比較プロテオーム解析を行っていく。

3) ヒト血液のイオン性メタボローム解析

今回の比較対象において、測定したイオン性代謝物全般における差異のうち血漿・血清間の差異が最も大きいものであった。また、血漿・血清どちらの検体についても、年齢差・男女差が同様に認められた。さらに、血漿・血清いずれの検体についても、同様の検出率及び同一試料背景内における個体差を示した。以上の結果から、一般的にイオン性内在性代謝物をバイオマーカーとして測定する場合には、血漿・血清のいずれもマトリックスとして利用可能であることが示唆された。しかし、一部のイオン性代謝物は血漿・血清間において検出率が異なっており、特定の代謝物を測定する場合、血漿・血清のうち、検出率の高い試料採取を選択する必要があると考えられた。また、本研究では、食事制限及び同一採血時間で検討を行っているため、食事及び採血時間については今後の検討課題である。

今回の試料背景間の比較において、年齢差においては男性と比べ女性、男女差については老年と比べ若年において測定したイオン性代謝物全般における差異が大きく認められた。これらのことから、イオン性代謝物をバイオマーカーとして測定する場合には、年齢差・男女差のうち、若年女性に対する差異について特に注意する必要があると示唆された。一方、本研究では、同一人種で検討を行っているため、人種差については今後の検討課題である。

女性における年齢差については若年において脂肪酸が、老年においてアミノ酸が高いレベルを示した。これらの代謝物について、女性における

年齢差が大きく認められた原因については現在のところ明らかではない。しかしながら、老年女性と比べ若年女性において代謝物が高いレベルを示した黄体ホルモンは、糖類からの脂質合成を促進することが報告されている。一方、黄体ホルモンが低下する老年では、糖類よりアミノ酸が合成される割合が高くなるため、アミノ酸レベルが高い可能性が考えられた。これらのことから、黄体ホルモンの影響が、女性において年齢差が大きく認められた原因の1つであると考えられた。

若年における男女差については男性においてアミノ酸が、女性において脂肪酸が高いレベルを示した。一方、老年においてはこれらの差異は認められなかった。黄体ホルモン代謝物は若年のみにおいて男性と比べ女性で高いレベルを示しており、若年において認められた男女差についても黄体ホルモンが関わっていることが考えられた。

今回検討した試料保管条件である反復凍結融解の影響は、測定したイオン性代謝物全般における差異がほとんど認められなかった。したがって、反復凍結融解のイオン性内在性代謝物への影響は小さいことが示唆された。一方、血清と比べ血漿において、代謝物レベルに有意な差のある代謝物が多く認められた。また、ヘモグロビン・ポルフィリン代謝物に関しては、血漿・血清に関わらず、代謝物レベルが凍結融解により変化していた。このことから、血漿を用いる場合、及びバイオマーカーとしてヘモグロビン・ポルフィリン代謝物を選択する場合には凍結融解の影響を注意する必要が考えられた。凍結融解と共に、採血後の血液保存温度（例えば常温保存時間等）は採取病院間における統一が難しいため、その影響は今後の検討課題である。

4) ヒト血液の疎水性メタボローム解析

網羅的脂質メタボローム解析システムにより、ヒト血漿及び血清から合計で229種の脂質代謝物と25種の脂肪酸代謝物を同定した。検出された分子種は、GPL、SM、TG、ChE等の主要な脂質分子種の他、生理活性脂質であるリゾリン脂質(LPL)やセラミド、セレブノシド、DG、oxFA等であった。すでにSM、20-HETE等は、文献レベルでそれぞれ疾患及び医薬品の副作用のバイオマーカーとなりうる事が報告されており、これらの分子種を対象に、その血中レベルに対する試料採取条件、及び試料保管条件の影響を明らかにすることは有用と考えられた。

ヒト血漿と血清間の比較において、血清中の数種のLPC及びDG分子種が、男女及び年齢に関わらず、血漿と血清間でレベルの違いを認めた。また、AAの代謝物(12-HETE、TXB₂、8-HETE等)の

レベルが、血漿と血清中では異なることが示された。これは、血清中では、血液凝固反応に伴い、ホスホリパーゼCが活性化してアラキドン酸カスケードが進行し、血小板由来の代謝物が血清中に放出されたためと考えられる。よって、これらの代謝物がバイオマーカー候補となる場合は、より生体内の濃度を反映すると考えられる血漿の方が、測定用試料として優れていると考えられる。一方、ほとんどのGPL、SPやTG、及びChEには、血漿・血清間でレベルの差は認められなかったことから、両マトリックスで安定に測定が可能と考えられた。

男女間の脂質代謝物レベルの比較では、多くのSM分子種が男性と比較して女性において1.5倍以上の高値を示し、SMの代謝に関与する酵素の発現と性ホルモンとの関連性が示唆された。また、DPA及びDHAを含むGPL及びChEは、老年においてのみ男性と比較して女性の方が高いレベルを示した。老年のみで差が認められる理由は不明であるが、すでに報告がある lipoprotein-associated phospholipase A2の活性は女性の方が男性より低いことが一因と考えられた。同様に、アラキドン酸のP450代謝物である18-HETEのレベルが、老年女性で老年男性より低いことが示された。基質となるアラキドン酸には有意な男女差が認められなかったことから、合成酵素(CYP4A、4F等)活性の性差が示唆された。以上より、血漿・血清中に存在する脂質の一部は、そのレベルが1.5倍以上の男女差を示すこと、若年と比べ老年では男女差を示す脂質分子種の数が増加すること、が明らかになった。

若年・老年間の脂質代謝物レベルの比較では、20:5ChEのレベルが、男女に関わらず、若年と比較して老年で増加したが、その機序は不明である。男性血漿では、エイコサペンタエン酸(EPA)を含む36:5PC(16:0/20:5PC)やEPAの酸化代謝物である5-HEPEも若年と比較して老年でそのレベルが高く、食事内容の変化も含めて加齢とEPAとの関連が示唆された。また、女性血漿では、多くのLPC分子種、DPA及びDHAを含むPC及びChE、及び多くのTG分子種のレベルに有意な年齢差が認められ、女性ホルモンの減少に伴い、脂質代謝物が増加することが示唆された。以上より、血漿・血清中に存在する脂質の一部には、若年(25-33歳)と老年(55-64歳)間で1.5倍以上のレベル差を示す分子種が存在すること、男性と比較し、女性では、年齢差を示す脂質分子種が多いこと、が明らかになった。

最後に、凍結融解が脂質代謝物レベルに与える影響に関しては、ほとんどの脂質代謝物は、凍結融解による有意なレベルの変化が認められ、分解、

もしくは氷上で融解時に酵素反応が進行したことが示唆された。よって、イオン性代謝物に比べ、脂質バイオマーカー測定用試料の保管の際には、分注操作等を行い、過度な凍結融解を避けるべきことが示された。

5) 重篤副作用試料の収集

北里大学にて、今回構築した臨床研究体制により、各診療領域におけるヒト副作用試料が患者背景情報・副作用情報とともに収集可能となる。今後、副作用発生時および回復時（一部は、副作用発生前）の血液・尿試料を収集する可能性、今後の測定法の発展なども考慮すると、データおよび試料のバンク化が必要である。現時点では一部の臓器障害を目的とした研究体制であるが、診療領域を拡大すること、マーカーの探索範囲を広げることなども考慮に値すると思われる。

また国立衛研では、別途、死亡率が高い、QOLの低下を伴う後遺症が残り安い重篤副作用である3種について、患者試料の収集を開始した。特に間質性肺障害に関しては、1年間で多くの症例を集積することができた。しかし、被疑薬は多様であり、より多くの症例の集積が必要である。

E. 結論

バイオマーカー開発動向調査を行うと共に、薬剤性臓器障害の早期発見・病勢判断のための感度、特異度の高いマーカー検索を行う臨床研究体制を構築した。また重篤副作用患者試料の収集とバンク化を開始した。

血液および尿に関し、採取条件によるマーカー濃度への影響を明らかにし、安定的に測定しうる試料の採取要件を明確化するため、ヒト血液試料およびラット尿に関し、内在性蛋白質および代謝物濃度への採取・背景条件（性別、年齢、血漿・血清）及び保管条件（凍結融解）の影響を、網羅的に明らかにした。

ラット尿プロテオーム解析において、バイオマーカー探索に十分なレベルの感度を持った試験系を確立した。尿中蛋白質で、最も大きな差異を示す要因は雌雄差であり、性ホルモンによる性特異的蛋白質の発現差に基づくと考えられる。バイオマーカーの探索においても、性差を十分考慮に入れる必要があることが示唆された。一方、食事の影響は小さいものであった。

またヒト血液に関し、食事制限下の試料を対象にイオン性および疎水性メタボローム解析を行い、血清・血漿間、男女間、年齢間で、異なるレベルを示す内在性代謝物を明らかにした。それぞれの条件で2倍以上の差が認められた代謝物は、

探索・診断の際に十分注意すべきである。

臨床におけるバイオマーカー診断に際しては、検体を選択することは不可能であり、検体間において普遍的なバイオマーカーが求められる。したがって、内在性代謝物をバイオマーカーとして測定する際には、1) 血液試料として、血漿・血清のいずれでも利用可能だが、イオン性代謝物の場合は凍結融解の影響を考慮すると血清が望ましく、疎水性代謝物の場合は、血液凝固過程の影響を受けにくい血漿が望ましいこと、2) 検出率が高く、試料背景間及び試料背景内における差異の小さい代謝物をバイオマーカーとして選択すること、3) 以上を満たせない場合には、これら背景の差異に対する、病気や薬剤反応性などによる差異の相対的な大きさを考慮すること、が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表：

1. 論文発表

- 1) 熊谷雄治：国内臨床試験における心臓安全性評価の現状と将来。谷本学校毒性質問箱、14、20-35、2012。
- 2) 斎藤嘉朗、前川京子、鹿庭なほ子：日本人を対象にしたゲノム・メタボローム解析によるバイオマーカー探索。Pharmstage、2012.9、1-4、2012。
- 3) 熊谷雄治：早期臨床試験の国際展開の中で日本の進むべき方向性：臨床評価、40、288-295、2013。
- 4) 斎藤嘉朗、前川京子、田島陽子、児玉進、黒瀬光一：市販後安全性確保に係るバイオマーカーと診断。レギュラトリーサイエンス学会誌。3、43-55、2013。
- 5) Watanabe T, Suzuki T, Natsume M, Nakajima M, Narumi K, Hamada S, Sakuma T, Koeda A, Oshida K, Miyamoto Y, Maeda A, Hirayama M, Sanada H, Honda H, Ohyama W, Okada E, Fujiishi Y, Sutou S, Tadakuma A, Ishikawa Y, Kido M, Minamiguchi R, Hanahara I, Furihata C: Discrimination of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by statistical analysis based on gene expression profiling in the mouse liver as determined by quantitative real-time PCR. Mutat Res., 747, 164-175, 2012。
- 6) Suenaga K, Takasawa H, Watanabe T, Wako Y,

- Suzuki T, Hamada S, Furihata C: Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis *Mutat Res.*, 751, 73-83, 2013.
- 7) Ishikawa M, Tajima Y, Murayama M, Senoo Y, Maekawa K, Saito Y: Plasma and serum from nonfasting men and women differ in their lipidomic profiles. *Biol Pharm Bull.*, 36, 682-685, 2013.
2. 学会発表
- 1) 鈴木孝昌: Omics approach for the biomarker of genotoxicity by aristolochic acid. 韓国毒性学会、公衆衛生学会合同国際シンポジウム (2012. 6、ソウル)
- 2) 鈴木孝昌、田邊思帆里、山口鉄生、鈴木和博: MYBPC2 はヒト骨格筋芽細胞の筋分化マーカーとなる。第 11 回日本再生医療学会総会 (2012. 6、横浜)
- 3) 斎藤嘉朗、鹿庭なほ子、杉山永見子、黒瀬光一、前川京子: 臨床的に重要な副作用のゲノム解析に関する取り組みの現況と今後のメタボロミクス解析の必要性等について。第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012. 7、仙台)
- 4) 鈴木孝昌、小原有弘、松本真理子、広瀬明彦、林 真、本間正充: ジメチルアニリン異性体のマウスでの変異原性。日本環境変異原学会 第 41 回大会 (2012. 11、静岡)
- 5) 熊谷雄治: 非臨床試験データからのヒト安全性の予測。日本薬物動態学会第 27 回年会 (2012. 11、東京)
- 6) 斎藤嘉朗、前川京子、佐井君江、鹿庭なほ子、黒瀬光一: ヒト試料を用いたバイオマーカー研究の現状と問題点。第 33 回日本臨床薬理学会学術総会 (2012. 11、沖縄)
- 7) 熊谷雄治: 早期臨床試験における安全性バイオマーカー。第 33 回日本臨床薬理学会学術総会 (2012. 12、沖縄)
- 8) 石川将己、田島陽子、村山真由子、妹尾勇弥、前川京子、斎藤嘉朗: 非食事制限下におけるヒト血液中の脂質代謝物レベルに対する試料採取要件の検討。第 85 回日本生化学会 (2012. 12、福岡)
- 9) 石川将己、前川京子、妹尾勇弥、田島陽子、浦田政世、村山真由子、脇坂真美、熊谷雄治、斎藤嘉朗: ヒト血液中脂質代謝物レベルの血漿・血清差、男女差、年齢差に関する網羅的検討。日本薬学会第 133 年会 (2013. 3、横浜市)
- 10) 斎藤嘉朗、佐井君江、鹿庭なほ子、田島陽子、石川将己、最上(西巻)知子、前川京子: バイオマーカー探索研究とその臨床応用に向けての課題。日本薬学会第 133 年会 (2013. 3、横浜市)
- H. 知的財産権の出願・登録状況:
1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 本研究に用いた被験者の情報と検体の種類

Groups	[1] Young male	[2] Young female	[3] Elderly male	[4] Elderly female	Statistical significance
Gender	Male	Female	Male	Female	
Number	15	15	15	15	
Median age [range]	29 [25-33]	28 [25-34]	59 [55-64]	59 [55-63]	
Median Weight (Kg) [range]	78 [52.2-113.9]	93.4 [59.9-147.4]	75.6 [63.5-116.1]	90.7 [62.6-114.3]	[1] vs. [2] {N.S.}, [3] vs. [4] {N.S.}, [1] vs. [3] {N.S.}, [2] vs. [4] {N.S.}
Median height (cm) [range]	172.7 [154.9-185.4]	162.6 [149.9-182.9]	177.8 [165.1-190.5]	162.6 [152.4-175.3]	[1] vs. [2] {p=0.017}, [3] vs. [4] {p=0.0003}, [1] vs. [3] {p=0.022}, [2] vs. [4] {N.S.}
Median BMI [range]	26.2 [18.0-36.6]	35.4 [24.9-49.7]	24.5 [19.5-34.9]	32.7 [26.1-43.3]	[1] vs. [2] {p=0.042}, [3] vs. [4] {p=0.0008}, [1] vs. [3] {N.S.}, [2] vs. [4] {N.S.}
matrices	plasma/serum	plasma/serum	plasma/serum	plasma/serum	
freeze-thaw (plasma and serum)	2 and 10 times	2 times	2 times	2 times	

N.S: not significant

図1 ラット雄および雌の尿において同定された蛋白質とその重複

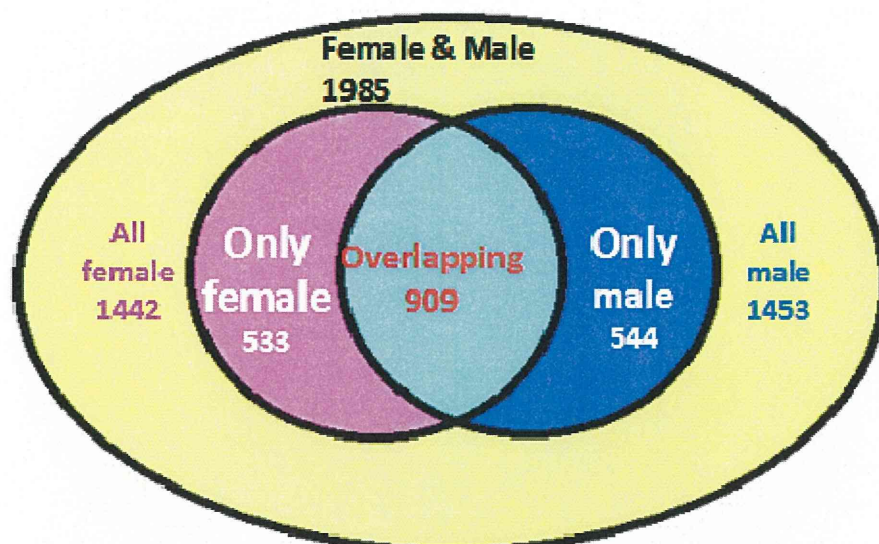


表2 ヒト血液試料における脂質代謝物レベルに対する試料採取条件の影響

①血漿と血清間の脂質代謝物レベルの比較	
血漿・血清間で有意かつ1.5倍以上のレベル変化(血漿で増加)	血漿・血清間で有意かつ1.5倍以上のレベル変化(血清で増加)
◆ Oxidative fatty acids* (8-HETE, 10-HDoHE, 20-HDoHE)	◆ Lysophosphatidylcholines ◆ Diacylglycerols ◆ Oxidative fatty acids* (12-HHT, 12-HETE, 5,6-diHETrE, Thromboxane B ₂ , 4-HDoHE, 14-HDoHE)
②男女間の脂質代謝物レベルの変化	
男女間で有意かつ1.5倍以上のレベル変化(男性で増加)	男女間で有意かつ1.5倍以上のレベル変化(女性で増加)
◆ Oxidative fatty acids* (18-HETE, 老年のみ)	◆ Sphingomyelins ◆ Glycerophospholipids and Cholesterol esters containing docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid (老年のみ) ◆ Triacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids (老年のみ)
③若年・老年間の脂質代謝物レベルの変化	
若年・老年間で有意かつ1.5倍以上のレベル変化(老年で減少)	若年・老年間で有意かつ1.5倍以上のレベル変化(老年で増加)
◆ Oxidative fatty acids* (18-HETE, 女性のみ)	◆ 20:5Cholesterol ester ◆ Oxidative fatty acids* (5-HEPE, 男性のみ) ◆ Lysophosphatidylcholines (女性のみ) ◆ Phosphatidylcholines and Cholesterol esters containing docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid (女性のみ) ◆ Triacylglycerols (女性のみ)

*HHT, hydroxy-heptadecatrienoic acid; HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; diHETrE, dihydroxyeicosatrienoic acid; HDoHE, hydroxydocosahexaenoic acid; .HEPE, hydroxyeicosapentaenoic acid.

II. 分担研究報告書

副作用バイオマーカーの動向調査およびヒト副作用試料の収集・バンク化

研究分担者 熊谷 雄治 北里大学医学部 教授

研究要旨：

薬物有害反応の中で、肝、腎等への臓器障害は薬物治療の上で重要であり、早期発見・病勢判断のための感度、特異度の高いマーカーが望まれる。このことから、一般診療における薬剤性肝障害・腎障害発現時のマーカー利用の状況の調査を行い、それに基づいて有害反応出現時のヒト試料収集のための組織形成、研究計画の作成を行った。さらに、民族的に類似していると考えられる東アジアにおける類似の研究の可能性について検討した。一般的に試用されているバイオマーカーは、腎障害の L-FABP のような障害に特異的なマーカーを除き、比較的非特異的なものであった。有害反応が発現した患者の多くは専門科で診療を受けることが多いため、各疾患領域の専門家が参加する臨床研究事務局を設置し、新しいマーカー検索のための具体的な検体の採取・取り扱い手順を踏まえた研究体制を構築した。この体制により、各診療領域におけるヒト副作用試料が患者背景情報・副作用情報とともに収集可能であり、薬剤性臓器障害の早期発見・病勢判断のための感度、特異度の高いマーカー検索が可能となる。また、将来的な国際共同研究体制について検討を行い、その可能性を確認した。さらに、アジアにおける適正薬物療法の確立のために東アジア領域の国際共同研究の可能性を検討した。

A. 研究目的：

薬物有害反応の中で、肝、腎等への臓器障害は死に至る可能性、後遺障害を残す可能性があり、その早期発見は薬物治療の上で重要であり、感度、特異度の高いマーカーを見いだすことは重要である。このことから、一般診療における薬剤性肝障害・腎障害発現時のマーカー利用の状況の調査を行い、それに基づいて有害反応出現時のヒト資料収集のための組織形成、臨床試験計画書作成を行う。さらに、民族的に類似していると考えられる東アジアにおける類似の研究の可能性について検討する。

B. 研究方法：

1) 薬剤性臓器障害が出現した症例の診療状況、障害検出および病勢の判断に試用されているバイオマーカーの種類等について各診療領域専門家から聴取を行った。また、文献的調査およびこれまでに行った臨床研究により蓄積してきた臨床検査データベース検索等を平行して実施し、診断の現状について検討した。

2) ソウル国立大学にて、同大臨床研究センター In-Jin Jang 教授および延世大学臨床試験センター長 MinSoo Park 教授と以下の項目について討論を行った。

Genomic biomarkers of serious ADR
Metabolomic biomarkers of drug induced liver injury.
Metabolomic biomarkers for drug induced kidney injury.
Discussion for collaborative research

(倫理面での配慮)

将来的に薬剤性臓器障害を発現した患者から検体採取を行うことから、ヘルシンキ宣言および臨床研究の一般指針を遵守した臨床研究計画を作成し、倫理委員会への承認を得る予定である。今年度の計画作成にあたり、十分な倫理的な配慮を計画書へ反映した。

C. 研究結果：

1) 調査の結果、薬物有害反応の診断バイオマーカーとして使用されているものは、肝障害に関しては血中ビリルビン、AST、ALT、 γ -GTP など、腎障害については血清クレアチニン、シスタチン C、尿中 NAG、 β 2 ミクログロビン、L-FABP など、間質性肺炎は臨床症状、X 線所見などであった。腎障害の L-FABP のような障害に特異的なマーカーを除き、多くのマーカーは比較的非特異的なマーカーであった。それぞれの障害は多くの診療科で発生しているが、多くの症例は専門診療科へ紹介され診断治療を受けており、これらの症例を対象

に血液資料を採取し新しいバイオマーカーを検出することは現実的に可能であると判断された。このことから、消化器内科、腎臓内科、呼吸器内科などの各疾患領域の専門家が参加する臨床研究事務局を北里臨床研究センター内に設置した。また、新しいマーカー検索のための具体的な検体の採取・取り扱い手順を踏まえた試験計画書作成を開始した。本臨床研究体制は以下の通りである。

・事務局

- 北里大学医学部臨床研究センター
- ・CRC 派遣 (IC 取得補助、検体採取)
- ・CRF 作成
- ・データベース作成・管理

・研究参加診療科

- 消化器内科： 薬剤性肝障害
- 腎臓内科： 薬剤性腎障害
- 呼吸器内科： 間質性肺炎

研究計画書の概要

・参加診療科内または参加診療科へコンサルティングされた薬剤性臓器障害を発症した患者を対象。

- ・説明と同意の手順
- ・血液採取、保管、輸送
 - 臓器障害発生時の採取、利用可能な既存資料の取り扱い。検体発送時の匿名化。
- ・背景情報の収集、管理
 - 電子カルテから、背景、原疾患、各種検査データ、併用薬等の情報収集。連結可能匿名化の手順。
- ・フィードバックされるメタボロミクス情報の種類と管理
- ・データベースの作成と管理
- ・成果の公表と個人情報管理
- ・関連法規の遵守

2) Jang 教授は韓国厚生省の助成を受け運営されている pharmacogenomic research center of ADR (Adverse Drug Effect) の責任者であり、薬物有害反応の発現に関する遺伝子の検出を行っている。一部の医薬品による薬疹は欧米人とアジア人で遺伝的背景が異なり、さらに中国人は日本人・韓国人と異なるという方向性が見え始めているが、これについての前向き研究を両国で行うのはどうかという提案があった。日本の研究、臨床試験における安全性バイオマーカーの状況を熊谷から説明し、同時に韓国の状況についても説明を受けた。韓国においてもメタボロミクスによる研究は開始されているが、大規模に組織化された

ものではなく、個々の研究者によるものが主体のようであった。測定は自施設で行うものが通常である。臨床研究/試験において使用されているバイオマーカーはある程度バリデーションされたものが主であり、探索的な使用はされていないのが現状であり、日本と幾分異なる傾向も見られた。Jang 教授は、現時点では遺伝子の検索よりむしろメタボロミクスによるバイオマーカーの発見が有望であり、臓器障害のタイプによるバイオマーカーの違いについても精力的にデータを収集するべきであると強調されていた。今後の共同研究についてどのような形での協力があり得るか、さまざまな方向性を議論したが、現状では情報の共有、有望なバイオマーカーを発見した場合の前向きな研究などが実施可能性が高いと考えられた。

D. 考察：

1) 今回構築した臨床研究体制により、各診療領域におけるヒト副作用試料が患者背景情報・副作用情報とともに収集可能となる。今後、副作用発生時および回復時（一部は、副作用発生前）の血液・尿試料を収集する可能性、今後の測定法の発展なども考慮すると、データおよび試料のバンク化が必要である。現時点では一部の臓器障害を目的とした研究体制であるが、診療領域を拡大すること、マーカーの探索範囲を広げることなども考慮に値すると思われる。

2) 民族的に類似している東アジア諸国、特に韓国との協力体制の構築は薬効評価の分野で盛んに行われ、新薬開発に多大な貢献をしている。安全性評価についても、有害反応の類似あるいは相違を明らかにしていくことは、アジアにおける適正薬物療法の確立に与するものであり、検討・推進の価値があると考えられる。

E. 結論

薬剤性臓器障害の早期発見・病勢判断のための感度、特異度の高いマーカー検索を行う臨床研究体制を構築した。また、将来的な国際共同研究体制について検討を行い、その可能性を確認した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表：

1. 論文発表

- 1) 熊谷雄治：国内臨床試験における心臓安全性評価の現状と将来。谷本学校毒性質問箱、14, 20-35, 2012.
- 2) 熊谷雄治：早期臨床試験の国際展開の中で日本の進むべき方向性：臨床評価、40, 288-295, 2013.

2. 学会発表

- 1) 熊谷雄治：非臨床試験データからのヒト安全性の予測。日本薬物動態学会第27回年会（2012.11、東京）
- 2) 熊谷雄治：早期臨床試験における安全性バイオマーカー。第33回日本臨床薬理学会学術総会（2012.12、沖縄）

H. 知的財産権の出願・登録状況：

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

動物実験および尿中プロテオーム解析によるバイオマーカーの検出およびその評価法の確立

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 室長 鈴木 孝昌

研究要旨：

尿中バイオマーカーの検出のため、ラットを実験モデルとして、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクスによる高感度分析法を確立した。プロテオミクスを用いたバイオマーカー検索においては、よりスループットを上げ網羅性を高めることにより、発現レベルが低い分子までをターゲットとすることが成功への鍵となる。これまでの検討より、ラット尿中では Major urinary protein (MUP) 等の発現量の多い一部のタンパク質の存在がより発現量の低いタンパク質の検出の障害となつていると考えられた。そこで、検出可能なペプチドの数を向上させることを目的として、これら高発現量のタンパク質をサンプルの前処理により除くことを試みた。尿サンプル中のタンパク質を沈殿させる際に用いる有機溶媒としてアセトンおよびエタノールの濃度を 60% 以下に抑えることにより、収率は落ちるものの比較的分子量 (21KD) の MUP を除くことができた。これにより、その後の LC-MS による解析において、検出されるピーク数が大幅に増加し、エタノール 60% を用いた場合には 1 回の分析で 4 万を超える数のペプチドピークを検出することができた。さらに、同時に行った MS/MS 測定によるタンパク同定率も向上し、1 度の分析で 700 以上のタンパク質を同定でき、ほぼ満足のいくスループットの向上を達成できた。この手法を用いて、性差、絶食時間、採血時間、週令差など基本的な実験条件がラット尿プロテオーム発現解析に与える影響を検討した。その結果、雌雄間で最も大きな変化が見られ、雄、および雌特異的に発現しているタンパク質を同定した。絶食に関しては大きな変化はなかった。週令差については現在解析中である。

一方、国内外における血液・尿中バイオマーカーの開発動向調査として、米国で開かれた次世代型診断薬サミットに参加し、最新の情報を入手した。特にバイオマーカー開発と関係して、関心の高いコンパニオン診断薬の開発を巡る企業側および規制側の動向を知ることができた。今後この分野におけるバイオマーカーの利用が加速すると予想され、信頼性、有効性評価のための基本要件の作成が必要となっている。

A. 研究目的：

個別化医療の推進、コンパニオン診断薬の利用、並びに予防的治療介入による先制医療の実現に向け、各種バイオマーカーの開発と診断への利用が課題となっている。近年、制癌剤の領域を中心として、分子標的薬の開発が盛んとなり、薬剤ターゲットとして同定された分子標的自体が治療薬選択のための診断バイオマーカーとなるケースも増えてきている。また、新薬開発における患者の感受性予測のための新規バイオマーカーの同定と、コンパニオン診断薬としての同時承認に向けた開発は今後一気に加速すると見られ、オミックス的手法を用いて開発されたいわゆる次世代型のバイオマーカーが今後ますます重要となる。これら、新規バイオマーカーの有効性は、薬剤の有効性に直接結びつき、治療の可否を左右する重要な役割を担うことになる。よって、これらバイオマーカーの有効性を担保し、その品質を保証する上で、評価要件の確立が急務となっている。

通常取りうるアプローチとして、動物実験等の非臨床試験で得られた知見およびヒトでの臨床試験データから個々のバイオマーカーの有用性を評価することになるが、今のところそれを目的とした評価要件は国内外を含め確立されていない。そこで、新規バイオマーカーの評価要件の作成を目的として、非臨床および臨床検体を用いたバイオマーカーの検出に関わる基本要件の検討のため、生体試料の採取方法および性差年齢等の因子が与える影響等に関して基礎的なデータを取得するとともに、実験動物でのバイオマーカーの開発とヒトへの外挿による臨床応用にむけたスキームの妥当性に関する評価要件に関しても検討を行った。

我々はこれまでに、バイオマーカーの開発手法として尿中プロテオーム解析に注目し、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクス法による網羅的定量プロテオーム解析に関する研究を行ってきた。この手法を応用し、尿中バイオマーカー

に関する基礎的知見を得るために、今年度はまず実験動物としてラットを用いて、性差、年齢、絶食、サンプリングタイムなどの試料採取条件が与える影響に関して基礎的な知見を得ることを目的とした。

また、国内外におけるバイオマーカーの臨床応用に関する開発動向調査として、特にコンパニオン診断薬におけるバイオマーカーの開発と臨床応用に関する課題、およびコンパニオン診断薬をめぐる規制動向に注目をして、最新情報の収集を行った。

B. 研究方法：

①ラット尿中プロテオーム解析の高感度化に向けた試料前処理方法と LC-MS/MS 測定条件の最適化および定量的解析法の確立

ショットガンプロテオミクス法においては、タンパク質およびペプチド混合試料を LC-MS で分析するために、トリプシン等の消化酵素を用いて適当なサイズのペプチドへと消化する必要がある。また、尿中には、微量なタンパク質およびペプチドの他に、尿素等の多種多様の化学物質および塩が高濃度で存在し、測定の妨げとなるため、これらを前処理により除去する必要がある。また、以前の検討により、ラット尿中には高発現量のタンパク質があり、これが原因となって検出感度が落ちている可能性があり、前処理によりそれらを除くことによる高感度化が期待された。そこで、複数個体をプールした雄ラット尿サンプルを用いて、これらの前処理条件について検討を行なった。

1) タンパク質の沈殿および消化条件

(タンパク質画分の調製)

尿からのタンパク質画分の抽出、精製の手法として、有機溶媒（アセトン、アセトニトリル、エタノール）によるタンパク質の沈殿条件について検討した。

(タンパク質の沈殿)

尿を 2000xg、5 分間遠心分離を行い、不溶性物質を除去した後、QubitTM spectrometer (Invitrogen) にてタンパク質濃度を測定した。タンパク 15 μ g 相当量の尿をとり、所定量の有機溶媒を加え、タンパク質を沈殿させた。この際の、温度、時間についても検討を加えた。

その後 14,000xg にて 15 分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 500 μ l の同一溶媒で洗浄した。

(タンパク質の可溶化)

再び 14,000xg にて 15 分間遠心分離後、上清を除き、沈殿を 15 μ l の 0.1% Rapigest (Waters) に溶解させた。

(還元アルキル化)

タンパク質画分の調製後、トリプシンによる消化を促進するために、以下の条件にてタンパク質 S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。タンパク溶液 30 μ l に、30 μ l の 10mM dithiothreitol を加え、60°C で 30 分間反応させて還元後、室温に戻した後、60 μ l の 30mM ヨードアセトアミド溶液を加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。

(トリプシン消化)

還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液 (Trypsin Gold, Promega) を 4.6 μ l (0.25 μ g/ μ l) 加え、37°C で一晩消化した。消化液を、ZipTip C18-P10 (Millipore) にて精製後、LC-MS 解析に用いた。

2) LC-MS 測定条件

ナノ LC として、ADVANCE S Nano LC System (Michrome) を使用した。オートサンプラーにて試料を導入し、配管には内径 50 μ m のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (AMR, ZAPLOUS) およびトラップカラム (CERI, L-column micro) を使用した。移動相は A (水 0.1% ギ酸) , B (アセトニトリル, 0.1% ギ酸) の 2 種類の組成の溶媒を用い、B2% から B98% へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。サンプルの必要量、最適なグラジエント組成、流速等の測定条件について検討を行なった。

質量分析装置としては、当研究所にて共同利用機器として使用可能な ESI-ion trap/FT 型 LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher) を用い、前述のナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブモードを使用した。ESI ナノスプレー用チップとして、KYA 社製 (内径 300 μ m) および New Objective 社製スプレーチップ (内径 150 μ m) を使用した。ZAPLOUS 逆相 C18 カラム (AMR 製 HiQ sil C18 0.1 mm x 150 mm) にてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェース (Captive Spray, AMR) にて質量分析装置へと導入した。

質量分析装置の設定に関しては、基本的に以下の項目に関して最適な MS 測定条件を検討した。

・MS 質量範囲	350-2000 m/z
・Total Analysis Time	150 min
・Resolution	30,000
・Accumulation time	Normal (0.1-0.3 sec.)
・Spray Voltage	1600-2000 V
・MS/MS 測定条件	上位 3 ペプチド(2 価以上)を自動選択。
・LC 流速	150-300 nl/min
・LC グラジエント	A 溶媒 (水, 0.1% ギ酸) と B 溶媒 (アセトニトリル, 0.1% ギ酸) に