

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 25 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
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

ヒト副作用試料の収集・バンク化・・・・・・・・・・・・・・・・	16
熊谷 雄治（北里大学 医学部 附属臨床研究センター）	

親水性代謝物マーカー探索・検証のための非臨床動物における試料 背景および食餌条件等に関する要件の検討・・・・・・・・	19
齋藤 嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）	

疎水性代謝物マーカー探索・検証のための非臨床動物における試料 背景および食餌条件等に関する要件の検討・・・・・・・・	27
前川 京子（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）	

尿中プロテオーム解析によるバイオマーカーの探索・検証要件、お よびその評価法の確立・・・・・・・・・・・・・・・・	34
鈴木 孝昌（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部）	

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・・・・・・・・・・・・・・・・	51
--------------------------------	----

I. 総括研究報告書

平成 25 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)
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
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 齊藤 公亮

研究要旨：

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している。平成 25 年度は、測定用血液・尿の採取に関する要件の明確化のための、ラットおよびヒト試料を用いた各種試料要件に関する検討、ヒト副作用試料・情報の収集とバンク化、および外挿性に関する実践的検証・検討のための対象副作用の決定を行った。

内在性代謝物に関しては、血液を主たる対象に、代謝物濃度への試料背景（年齢差、性差）及び食餌条件や採血時間（絶食の有無、採血時間、絶食時間）の影響を明らかにすると共に、昨年度の結果と併せて、ヒトへの外挿性を考察した。親水性代謝物および疎水性（脂質）代謝物に関し、各々 314 種および 269 種を定量した。試料背景間の差異に関しては、有意な性差を示す代謝物数が年齢差の場合より多く、特に老齢において性差を示す代謝物数は、測定可能代謝物数の約半数に及んだ。親水性代謝物ではカルニチン等が、脂質代謝物ではトリアシルグリセロール等が年齢によらず共通して性差を示した。ラットにおける試料背景差を昨年度明らかにしたヒトにおける結果と比較したところ、ヒトとラット間で共通して見いだされた代謝物は、親水性で 187 種、脂質では 91 種であった。さらに、食餌条件・採血時間に関しては、食餌の有無により有意な差を示す代謝物数が最も多く、次いで採血時間による差異であり、絶食時間による差異はほとんど認められなかった。以上の結果から、血液中の内在性代謝物に関し、ラット等を対象とする非臨床試験においてバイオマーカーとして探索する際には、1) ヒトと同様に性差や年齢差等の試料背景間差が交絡因子となりうること、2) ヒトにおいて検出可能な代謝物を選択すること、3) ラットにおける性差・年齢差は、スフィンゴミエリンなどの一部の分子種を除き、ヒトへ外挿する場合に考慮する必要性が低いこと、4) 食餌の有無（特に脂質代謝物や炎症性メディエーターを対象とする場合）や採血時間（特に、アミノ酸類の場合）を考慮し、可能な限り統一すべきこと、が示唆された。

内在性タンパク質に関しては、尿を主たる対象に、まず昨年度に遂行が遅れたラット尿の解析を継続し、主成分分析に置いて、老齢の雌が他の 6 群（若齢と老齢の雄、若齢の雌、若齢雄での絶食の有無と採血時間または絶食時間の差）とは異なる分布を示すことを明らかとした。即ち、絶食の有無、採血時間、若齢での性差は大きくタンパク質レベルに影響しないと考えられた。またヒト尿（午前の空腹時尿）に関して検討を行った結果、ラットに比べて各タンパク質レベルの個体差が大きく、明瞭な性差・年齢差は認められなかった。さらに、得られたデータの主成分分析により、肥満度が第二主成分として大きな影響を有することが明らかとなった。一方で、少数ながら性差が認められたタンパク質群（ケラチンの他、近位尿管管蛋白質グルタミルアミノペプチダーゼや活性化酸素除去酵素カタラーゼなど）や年齢差を示すタンパク質群（細胞増殖関連タンパク質であるスルフヒドリル酸化酵素 1 等の 4 種）を同定し、これらをバイオマーカーとして利用する際には注意すべきと考えられた。現在、健常ラットとヒト間での外挿性に関する詳しい解析を行っている。さらに、バイオマーカー候補としての薬剤修飾タンパク質の検出のための方法論の確立に着手した。

ラット副作用モデルおよびヒト副作用試料を用いた外挿性に関する検討につき、対象副作用として薬物性肝障害を選択した。また、消化器内科を始めとする臨床各科の協力の下、北里大学にて薬物性肝障害患者の血液・尿試料（急性期と回復期）の収集を開始し、これまでに 6 例の試料を収集した。

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）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・特異性高く相関、

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要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。

平成 24 年度は、

- 1) 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、親水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親水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、機能脂質レベルが影響を

う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。

- 2) 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、雄または雌特異的に発現している蛋白質を同定した。一方で、絶食に関しては大きな変化は認められなかった。

- 3) 副作用発生時および回復時の血液・尿資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。

平成 25 年度は、代謝物に関しては主としてラットを、タンパク質については主としてヒトを対象に、解析を行った。さらに北里大学にて薬物性肝障害患者の血液・尿試料の収集を開始した。

B. 研究方法：

(1) ヒトおよびラットの血液・尿

昨年度、調製した血液および尿試料を用いた。

ヒトに関しては、健常白人の健常血漿・血清（14 時間以上の絶食下で採取）およびその際の尿（若年男性、若年女性、老年男性、老年女性からなる 4 群、各群 15 名）を用いた。

ラットに関しては、10 週齢および 30 週齢の SD ラットより、16 時間の絶食後、午前 10 時に採血し、血漿・血清を調製した。10 週齢の雌と雄、30 週齢の雌と雄、各 10 匹の 4 群に加え、絶食していない 10 週齢の雄群、また絶食時間が 22 時間の群と、22 時間の絶食を行ったが試料採取時間が異なる（午後 4 時）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。

(2) ラット血清の親水性メタボローム解析

試料は、委託先であるメタボロン社での親水性メタボローム解析に供した。メタボロン社で、検体は抽出まで凍結して保存された。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 86 化合物、ペプチド 17 化合物、糖及びその代謝物 15 化合物、エネルギー関連代謝物 8 化合物、小分子脂質及びその代謝物 158 化合物、核酸及びその代謝物 16 化合物、補因子・ビタミン及びその代謝物 14 化合物、計 314 化合物が測定可能であった。

得られたデータは、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分類（アミノ酸・脂質等）、及び細かい性質と代謝経路により小分類（アラニン・アスパラギン酸代謝等）により分類した。親水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。各検体群間の親水性代謝物のレベル違いにつき、Welch's t-tests による統計解析を行い、 $p < 0.05$ を有意な差と判定した。全検体間における親水性代謝物の包括的比較は OPLS-DA モデル (SIMICA P+, Umetrics, Umea, Sweden) を用いて行った。

(3) ラット血漿の疎水性メタボローム解析

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・スフィンゴ脂質・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。

酸化脂肪酸を含む上層は、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 (三井情報株式会社) を用いてピークを抽出し、UPLC-TOFMS の保持時間、精密質量及びマススペクトルのデータに基づき、代謝物の同定を行った。相対定量には、内部標準物質 (IS) により補正を行った全ピークの height 値を用い、種々の条件（雌雄差、週齢差、食事の有無、採血時間）間の脂質分子種レベルの違いにつき、Welch's t-test

による統計解析を行い、 $p < 0.05$ 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 により抽出操作の補正を行い、補正後のピークにつき、UPLC-TOFMS により得られたデータと同様に Welch's t-test による統計解析を行い、 $p < 0.05$ を有意な差と判定した。

さらに IS により補正を行った全ピークの値を用いて直交部分最小二乗法判別分析 (OPLS-DA) を行い、群内サンプルばらつき、及び群間の類縁性の指標とした。

(4) プロテオーム解析

4-1) ラットおよびヒト尿の一般プロテオーム解析

尿からのタンパク質画分の抽出、精製の手法として、昨年度決定した有機溶媒（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を用いた。尿を遠心分離し、不溶性物質を除去した後、Qubit[™] 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。遠心後、上清を除き、さらに沈殿を洗浄した後、0.1% Rapigest (Waters) に溶解させた。トリプシンによる消化を促進するために、ジチオスレイトールを加えて 60°C で 30 分間反応させて還元後、ヨードアセトアミドを添加して室温で 30 分間反応させ、タンパク質の S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。さらにトリプシン溶液 (Trypsin Gold, Promega) を加え、37°C で一晩消化した。消化液を、ZipTip C18-P10 (Millipore) にて精製後、LC-MS 解析に供した。

ナノ LC として、ADVANCE S Nano LC System (Michrome)、カラムとして C-18 逆相カラム (AMR, ZAPOLOUS) およびトラップカラム (CERI, L-column micro)、質量分析装置として、ESI-四重極/FT 型タンデム質量分析装置 Q-Exactive (Thermo Fisher) を用い、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブイオンモードを使用した。

Q-Exactive による質量分析データは、基本的に付属のソフトウェアである Xcalibur を用いて解析し、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) を採用し、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タンパク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。

4-2) Proteo Miner Kit を用いた高発現タンパク質除去による高感度化

ラットの尿中には比較的高発現量のタンパク質として Major Urinary Protein (MUP) 群があり、低発現量のタンパク質の検出に影響を与えている。さらなる系の高感度化を目指して、ProteoMiner Protein Enrichment Kit (BioRad) を用いた高発現タンパク (ペプチド) の除去を行った。ヒト血清およびラット尿サンプルを用いて一定量の ProteoMiner ビーズとマイクロチューブ内で反応させ、タンパクおよびペプチドを結合させた後、洗浄液にて非結合タンパク (ペプチド) を除いた後、溶出液にて結合したタンパク (ペプチド) を溶出させ、アセトン沈殿後、通常のプロトコールに従って LC-MS 解析を行った。

4-3) プロテインアダクトーム解析

付加体の解析に関しては、タンパクの非酵素的糖付加であるメイラード反応生成物に注目し、通常の LC-MS/MS 測定を行った後、MASCOT によるデータベース検索の際に、この糖付加による質量の増加分 ($+C_6H_{10}O_5=162.052$) を反応する可能性のあるアミノ基を有する以下のアミノ酸の可変修飾として設定し、データベース検索を行うことにより、全てのタンパク質に対する糖付加体の網羅的検出を可能とした。

(5) 重篤副作用試料の収集

北里大学医学部附属臨床研究センターおよび北里大学東病院消化器内科が中心となり、研究計画を作成した。各診療科において発生した薬物性肝障害患者を対象とし、肝障害発生時および回復時の血液・尿検体を採取することとした。採取後の検体をプロテオームおよびメタボローム測定者の所属機関である国立医薬品食品衛生研究所へ匿名化の上送付する手順を作成した。さらに関連する診療科において、研究計画の説明会を行った。また、研究施行に必要な資料をとりまとめたファイル作成、ポケットメモの作成を行い、配布した。

【患者群の選択基準】

1) 薬剤性肝障害と診断された患者

<診断基準>

ALT が正常上限の 2 倍、もしくは ALP が正常上限を超える症例で、新たに薬剤性肝障害が疑われた者

2) 本研究への参加の意思があり、文書による同意が得られた患者

【患者群の除外基準】

- 1) 急性・慢性ウイルス肝炎、無症候性キャリア、アルコール性肝障害、過栄養性脂肪肝、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、胆石症、閉塞性黄疸、ショック肝などの疾患を有する者
- 2) DDWJ-2004 スコア 4 点以下の者
- 3) 医師が本臨床研究の対象として不適格と判断した者

また別途、国立衛研において、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)

北里大学における薬物性肝障害試料収集については、ヘルシンキ宣言および臨床研究指針を遵守し、北里大学医学部病院および国立医薬品食品衛生研究所の倫理審査委員会の承認を受けて研究を行っている。また、国立衛研における重篤副作用試料の収集に関しては、同宣言および「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への申請は非該当とすることが認められている。

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、本研究所の「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) ラット血清の親水性メタボローム解析

1-1) 性差、年齢差

OPLS-DA モデルによって、試料背景間の親水性代謝物を包括的に比較したところ、性差 (特に年齢) が第 1 主成分として分離され、次いで年齢差が第 2 主成分として分離された。全 314 代謝物のうち、性別間において有意差を示したものは 10 (若齢) および 30 週齢 (老齢) においてそれぞれ

れ 119 及び 154 代謝物であった (表 1)。このうち 77 代謝物 (65 及び 50%) が共通していた。一方、年齢間において有意差を示したものは雄および雌においてそれぞれ 109 及び 93 代謝物であった (表 1)。このうち 38 代謝物 (35 及び 41%) が共通していた。また、30 週齢における性差では、雌で高いレベルを示す代謝物が多く、雄における年齢差では、10 週齢で高いレベルを示す代謝物が多かった。

性差としては、脂質代謝に関わるカルニチン及びアシルカルニチンについて 10 および 30 週齢共に性差が認められた。カルニチン及び短鎖脂肪酸-カルニチンは雄で有意に高いレベルを示し、長鎖脂肪酸-カルニチンは雌で有意に高いレベルを示した。一方、遊離脂肪酸 (ステアリン酸、オレイン酸) は 30 週齢のみ雌で有意に高いレベルを示した。なお、2 倍以上の差を示した代謝物数は若齢で 10 種、老齢で 15 種であった。

年齢差としては、ヒト老化マーカーとして報告されているアミノ酸 (チロシン) 及び核酸 (5, 6-ジヒドロウラシル) とその関連代謝物が雄雌共に年齢差が認められた。チロシン及び N-アセチルチロシン、ウラシル、5, 6-ジヒドロウラシルは 10 週齢で有意に高いレベルを示した。一方、遊離脂肪酸 (パルミチン酸、パルミトオレイン酸) は雌のみ 30 週齢で有意に高いレベルを示した。なお、2 倍以上の差を示した代謝物数は雄で 26 種、雌で 3 種であった。

非臨床動物からヒトへの外挿性に関する予備的な知見を得るために、ラットにおける親水性代謝物レベルの性差・年齢差と平成 24 年度に行ったヒトにおける結果を比較した。測定代謝物はヒト及びラットにおいてそれぞれ 297 及び 314 代謝物であり、うち 187 代謝物が共通していた。共通して測定可能であった 187 代謝物のうち、ヒト・ラット間で共通して性差が認められた代謝物は 11 代謝物であった。一方、共通して年齢差が認められた代謝物は 2 代謝物のみであった。一方、ヒトとラットで、性差および年齢差の両方が認められなかった代謝物の中、共通する代謝物数は、20 であった。

1-2) 食餌条件

OPLS-DA モデルによって、異なる食餌条件下の親水性代謝物を包括的に比較したところ、食餌の有無が第 1 主成分として分離され、次いで採血時間差が第 2 主成分として分離された。一方絶食時間差 (16 時間及び 22 時間) は主成分として分離されなかった。全 314 代謝物のうち、食餌の有無において有意差を示したものは 156 代謝物であった。これらのうち 90 代謝物は絶食によって有意に増加し、69 代謝物は絶食によって有意に減少した。

一方、異なる採血時間において有意差を示したものは 47 代謝物であった。これらのうち 23 代謝物が午前採血で、24 代謝物が午後採血で、それぞれ有意に高いレベルを示した。

食餌の有無の比較では、遊離脂肪酸 (ステアリン酸) 及び炎症性メディエーター (12, 13-ジヒドロキシオクタデセノイン酸 (12, 13-DiHOME)、コルチコステロン等) が絶食によって高いレベルを示した。一方、食事由来代謝物 (ブドウ糖、フルクトース等) が絶食によって低いレベルを示した。なお、2 倍以上の差を示した代謝物数は 38 種であった。

採血時間の差 (午前と午後) では、有意差を示した 47 代謝物のうち 21 代謝物がアミノ酸及びその代謝物であった。これらのうち、ロイシン、ジメチルアルギニン等が午前採血で、セリン、スレオニン等が午後採血で有意に高いレベルを示した。なお、2 倍以上の差を示した代謝物数は 1 種であった。

(2) ラット血漿の疎水性メタボローム解析

2-1) 性差、年齢差

Bligh & Dyer 法の下層 (有機層) において 227 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 42 種の脂肪酸代謝物が同定された。脂質クラスごとにラット血漿で同定された分子種数を、昨年度実施したヒト血漿で同定された分子種数と共に表 2 に示した。ヒトとラットの血漿で同定された代謝物と比較すると、総代謝物数は、ヒト 251 種、ラット 269 種とほぼ同程度であったが、ヒトではエーテル型のホスファチジルコリン (PC) が 20 種同定されたのに対し、ラットでは 3 種の分子種のみ同定された。一方、コレステロールエステル (ChE) やトリアシルグリセロール (TG) は、ラットの方がヒトより多くの分子種が検出された (表 2)。性別 (雄と雌) 及び週齢 (10 週齢と 30 週齢) が異なる 4 群に関し、これら全 269 化合物による OPLS-DA 解析を行ったところ、ラットの性差による群間の判別が第一主成分に、週齢差による群間の判別が第二主成分に認められ、ラット血漿中には性別と週齢の違いにより濃度の異なる脂肪酸代謝物が含まれることが示唆された。

性差としては、総検出代謝物のうち、若齢 (10 週齢) で有意に性差を示した代謝物が 112 種 (42%)、老齢 (30 週齢) で性差を示した代謝物は 146 種 (54%) 見出され、うち 81 種 (30%) の代謝物が若齢・老齢に共通して性差を示した。数種の TG 分子種が週齢に関わらず、雄と比較して雌で有意に低いレベルを示し、スフィンゴミエリン (SM) 及び ChE 分子種が、週齢に関わらず、

雄と比較して雌で有意に高いレベルを示した。雌雄で顕著にレベルが異なる具体的な分子種としては、58:8TG (若齢の雄に対する雌の変化率 0.36 倍、及び老齢の雄に対する雌の変化率 0.49 倍)、36:1SM (同上 2.4 倍、及び 2.6 倍)、20:4ChE (同上 1.6 倍、及び 1.6 倍) が挙げられた。昨年度実施したヒト血漿においても SM 及び ChE 分子種は、同様の性差が認められたが、TG 分子種に関してはヒトではラットと同様の性差は認められなかった。

週齢差としては、老齢においてのみ雌雄差が認められる代謝物として、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 及びその代謝物が見出され、雌で高いレベルを示した。顕著にレベルが異なる具体的な分子種としては、EPA (老齢の雄に対する雌の変化率 3.3 倍)、及び 17,18-ジヒドロキシエイコサテトラエン酸 (17,18-diHETE、同上 2.6 倍) が挙げられたが、ヒトとの外挿性は認められなかった。

非臨床動物からヒトへの外挿性に関する予備的な知見を得るために、今回明らかにしたラットにおける疎水性代謝物レベルの性差・年齢差と平成 24 年度に行ったヒトにおける結果を比較した。総検出代謝物のうち、有意に週齢差を示した代謝物は、雄性ラットで 79 種 (29%)、雌性ラットで 90 種 (33%) 見出され、雌雄に共通して週齢差を示した代謝物は 13 種 (5%) と少なかった。一方、ヒトとラットで共通して見いだされた代謝物は 91 種であった。

雄のみで週齢差を示す代謝物として数種の EPA 及び DHA 代謝物が見出され、15-ヒドロキシエイコサペンタエン酸 (15-HEPE、若齢の雄に対する老齢の雄の変化率 0.19 倍)、18-HEPE (同上、0.29 倍) 等、老齢では若齢と比較して有意に低いレベルを示した。ヒトとラットでこれらの代謝物の外挿性は認められなかった。

雌のみで週齢差を示す代謝物として数種の TG 及び ChE 分子種が見出され、昨年度実施したヒトにおいても同様の結果であり、ラットとヒト間で外挿性が示された。22:6ChE (若齢の雌に対する老齢の雌の変化率 1.7 倍) 及び 52:6TG (1.6 倍) が顕著な変化を示した。

2-2) 食餌条件

10 週齢の雄性ラットにおいて、食事の有無、及び採血時間が異なる 4 群に関する OPLS-DA の結果では、食事の有無による群間の判別が第一主成分であり、絶食・非絶食の違いが、多くの脂肪酸代謝物の濃度に影響することが示唆された。しかしながら、採血時間の違いによる群間の判別は認められなかった。

10 週齢の雄性ラットにおいて、16 時間絶食群と非絶食群間で有意に変動する代謝物は、186 種 (69%) であり、絶食により増加する代謝物は 37 種 (14%) であり、絶食により減少する代謝物が 149 種 (55%) であった。絶食により、一部を除くリン脂質・中性脂質全般が有意に減少した。特に、32:1PC (非絶食群に対する絶食群の変化率 0.19 倍)、36:2DG (同上 0.23 倍)、50:1TG (同上 0.04 倍) は、顕著に絶食により減少した。

絶食により有意に増加する代謝物として、アラキドン酸 (AA)、及びそのリポキシゲナーゼ (LOX) 系代謝物、高度不飽和 TG が見出された。具体的な代謝物として、AA (非絶食群に対する絶食群の変化率 2.4 倍)、8-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (8-HETE、同上、2.4 倍)、60:12TG (同上、4.4 倍) が挙げられた。また 22 時間絶食群は、16 時間絶食群と同様の結果を示した。

絶食により変動しない代謝物として 83 種 (31%) が見出されたが、これらはエーテル型 PC (36:4ePC, 36:5ePC 等)、SM (34:0SM, 34:1SM 等)、コレステロール、DHA・DPA 含有コレステロールエステル (22:5ChE, 22:6ChE) であった。

採血時間の差 (午前と午後) では、22 時間絶食時の 10 週齢の雄性ラットにおいて、午前採血群と午後採血群で有意に変動する代謝物は、269 種の総代謝物のうち 17 種 (6%) であり、今回検討した条件のうち、最も変動の少ない要件であった。一部のホスファチジルイノシトール (PI) は、午前採血と比較して、午後採血で有意にレベルの減少が認められたが、変化率は小さかった。顕著な変化を示した代謝物として 38:5PI (午前採血に対する午後採血の変化率 0.74 倍) が挙げられた。

(3) プロテオーム解析

3-1) ラットおよびヒト尿の一般プロテオーム解析

3-1-1) ラット尿プロテオーム解析における週齢差の影響

昨年度の実験で、未解析であった老齢試料について解析し、全データの主成分分析を行った。その結果、図 1 に示すように、各群内で比較的まとまったパターンを示すことがわかった。群内でのばらつきは第一主成分方向に観察された。雌雄各群において週齢差の影響を検討したところ、雄は比較的近いパターンを示したのに対し、雌の老齢群においては比較的他と違うパターンを示していた。

3-1-2) ヒト尿のプロテオーム解析

試料は正常白人由来の尿であり、男女各 15 サンプルに対して、25-35 歳の若年群と、55-65 歳

の老年群とを設定した。

ヒト尿サンプルの場合、主成分分析によりラットに見られたような群内でのまとまりは見られず、ランダムなばらつきの大い傾向を示し、性差や年齢差を越えて個体間のバラツキが大いことがわかった。そこでこのバラツキの要因に関して考察を加える目的で、サンプルのドナー情報として利用可能であった身長および体重のデータを元に BMI の値を算出し、これを基準に正常体重 (Normal weight)、過体重 (Overweight)、肥満 (Obese) の 3 群に分類した。この群分けによる情報を主成分分析プロットに導入すると、図 2 に示したように、肥満度によって群分けがされる傾向が認められた。即ち、肥満度によって第二主成分 (PC2) 方向に分類される傾向にあり、肥満群のサンプルは全てグラフの上半分に位置した。個体間のばらつきは、第一主成分方向に広がっており、ラットの場合と合わせ、第一主成分即ち個体差の要因となっているタンパク質の解明が今後の課題である。

性特異的な発現を示すタンパクを調べた結果、男性特異的なタンパク質のうち半数以上がケラチン類であったが、これは尿な採取にあたって、男性の場合ケラチンの混入が多いことを示している。トップヒットした Glutamyl aminopeptidase は腎近位尿細管上皮に発現するタンパク質であり、性差を示す点は興味深い。Bromodomain testis-specific protein については、その名の示すとおり男性特異的であるが、活性酸素除去酵素である Catalase が性差を示した点は注目される。尿中カタラーゼは尿路感染や炎症のマーカーとして用いられており、注意が必要である。女性特異的な発現を示すタンパク質も同様にリストアップされたが、トップヒットである alpha-2-macroglobulin-like protein は alpha-2-macroglobulin 自体が最近アルツハイマー病の進行にかかわる女性特異的なバイオマーカーとして報告されている点で注目される。

年齢差に関しては、明らかな差を示すタンパクは少なく、若年群で発現の高いタンパク質として CD59、Interferon induced protein with tetratricopeptid repeats 2、multimerin-1、sulphydryl oxidase-1 の 4 種類のみが同定された。CD59 は赤血球の膜抗原であり、その他のタンパク質についても、主に血液由来であると考えられる。

さらに、肥満度により発現差の見られたタンパク群は 460 と多数見られた。これらのタンパク質は肥満の影響を受けやすい点で注意が必要であるが、逆に肥満が誘発する疾患のバイオマーカーとなりうることも期待できる。

3-2) ProteoMiner Kit を用いた高発現タンパク質除去による高感度化

今後、血清を対象にプロテオーム解析を行うためには、血清中ではアルブミンなどの高発現量のタンパク質の占める割合が高く、よりこれらの除去が重要な課題となる。従来血清中の主要な高発現タンパクは、それらに対する抗体を結合したカラムを用いた除去法が検討されてきたが、その有用性は不十分であった。一方、ProteoMiner kit は、特定の抗体を用いるのではなく、ランダムに合成したペプチドを担体に結合させたもので、低用量のペプチドを含めて親和性のあるペプチドを普遍的かつ量的な制約を持って結合させることにより、高発現量タンパク質を除き、低発現量タンパクの相対的な割合を増やすことにより検出ペプチド数を増やすという従来とは逆の発想による手法を用いている。本キットの LC-MS 解析への適用のため、スケールダウンを検討した。

まず、高発現量タンパクがより問題となるヒト血清を用いて、検出されるペプチド数の変化を検討した。未処理群と比較して、1/5 スケールでの処理群では、検出される総ペプチド数、Mascot にて同定された総タンパク数、取得 MS/MS スペクトル数のいずれも増加が見られた。次に、同様の検討をラット尿サンプルに対しても検討したところ、我々が開発した 50%エタノールを用いる方法と比較し、濃縮処理を行った場合に MS/MS スペクトルの取得数の若干の増加が見られたが、総ペプチド数および総タンパク数に明らかな向上は見られず、ラット尿に関しては 50%エタノールによる選択的沈殿法で十分であった。

3-3) プロテインアダクトーム解析

MASCOT によるタンパク同定の際に未同定のタンパク質の多くは、何らかの修飾タンパクである可能性も考えられる。血糖値のマーカーとしてのヘモグロビンの糖化アダクト A1c に代表されるように、付加体として存在するタンパク質がバイオマーカーとなる事例もあり、今後のバイオマーカー探索において、こうした付加体も考慮できるように、プロテオーム解析における付加体の網羅的解析に関する基礎的な検討を開始した。

まず、既知の修飾の例として、ヘモグロビンの末端アミノ酸糖化ペプチド (HbA1c) の LC-MS による検出を試みた。ヒトおよびラットヘモグロビンサンプルを用いて、通常の LC-MS による解析を行い、Mascot による同定の際に、糖付加により予測される質量変化分を可変修飾として考慮して検索を行った結果、いずれの場合も、末端のバリン残基に糖修飾されたペプチド断片が同定された。このペプチドは、対応する非修飾のペプチド

と同じ溶出時間に検出されており、MS/MS スペクトルの帰属からも糖修飾ペプチドであることが確認された。

さらに、HbA1c と同様に血糖値のマーカーとなることが知られているアルブミンの糖修飾に関しても、ヒト尿サンプルデータを用いて網羅的な解析を行った結果、10 種の糖化ペプチド候補が同定された。

(4) 重篤副作用試料の収集

薬剤性肝障害について臨床医とともに臨床研究計画を作成し、北里大学医学部病院および国立医薬品食品衛生研究所の倫理委員会の承認を受けた。研究実施のために必要な資材の準備、関連各部門との打ち合わせなどを行い、症例発生に基づく組み入れを開始した。本研究は肝障害を担当する消化器内科のみでなく、院内諸診療科の協力も得て行うものであり、症例数の確保を行っている。現在、6 名の薬剤性肝障害患者が登録され、主として肝障害時の検体が採取されている状況である。

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 2 例（累計 35 例）、横紋筋融解症 16 例（累計 29 例）、重症薬疹 3 例（累計 4 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。

(5) 動物モデルおよびヒトバンク試料を用いた外挿性に関する実践的検証・検討

ラット副作用モデルおよびヒト副作用試料を用いた外挿性に関する検討につき、現行のマーカー (AST 等) の臨床的有用性の不十分さ、および多くのタンパク質や代謝物が肝臓機能に関連しており、外挿性の評価系に有用と考えられることから、対象副作用として薬物性肝障害を選択した。上記、ヒトにおける副作用試料の収集と合わせて、ラット副作用モデルの構築を開始した。

D. 考察：

(1) ラット血清の親水性メタボローム解析

1-1) 親水性代謝物の試料背景差 (性差・年齢差)

今回の試料背景間の比較において、有意にレベルの異なる親水性代謝物数は、性差の場合の方が年齢差よりも多く、30 週齢における性差が最も顕著であった。ラットの系統及び飼育条件は同様であるにも関わらず、性差・年齢差が認められる代謝物は約 100 代謝物にわたり、親水性代謝物から

非臨床試験におけるバイオマーカーを探索する場合において、性差・年齢差が交絡因子となることが考えられた。

カルニチン及びアシルカルニチンの性差については、10 週齢及び 30 週齢において共通して認められた。カルニチン及び短鎖脂肪酸-カルニチンは雄で高く、長鎖脂肪酸-カルニチンは雌で高いレベルを示した。これらの差異をもたらす生物学的背景として、カルニチンは脂肪酸の β 酸化に関与することから、脂質代謝における性差の関与が考えられた。

遊離脂肪酸に関しては、30 週齢のみで性差が認められ、雌において高いレベルを示した。また、遊離脂肪酸は雌のみで年齢差が認められ、30 週齢において高いレベルを示した。一方、10 週齢から 30 週齢における体重増加は、雄で大きく (65% 増)、雌で小さかった (33% 増)。遊離脂肪酸は脂肪組織に取り込まれて、中性脂質として蓄積することから、脂肪組織における脂肪酸の取り込みに性差が存在し、体重増加や血中遊離脂肪酸レベルに影響を与えていることが考えられた。

1-2) ラットにおける試料背景差とヒトにおける試料背景差の比較

今回測定した代謝物のうち、3 分の 1 の代謝物に関しては同様の測定系にも関わらず、ヒトでは測定できなかった代謝物であった。このことから、同様の系を用いた場合においても、ヒトと実験動物間において測定可能な親水性代謝物が一部異なることが考えられる。したがって、非臨床動物を用いたバイオマーカー探索においては、ヒトで測定可能な代謝物を選択する必要があると考えられた。また、今回明らかにしたラットにおける試料背景差のうち、ヒトにおいて試料背景差が共通して認められた親水性代謝物は非常に限られていた。このことから、少なくともラットにおける性差・年齢差はバイオマーカー探索時に考慮する必要性は低いと考えられた。

1-3) 親水性代謝物レベルにおける食餌の有無・採血時間・絶食時間の影響

親水性代謝物に対する食事影響の検討において、食餌の有無による差異が最も大きく、次いで採血時間による差異であり、絶食時間の長さに関してはほとんど認められなかった。このことから、親水性代謝物から非臨床試験におけるバイオマーカーを探索する場合において、食餌の有無は大きな交絡因子となることが考えられた。次に、親水性代謝物を対象とする場合には、採血時間についても注意する必要があることが考えられた。一方、本研究から、一定期間以上 (本研究では 16 時

間)の絶食については、絶食時間の長さを考慮する必要は低いと考えられた。ヒトにおいては肉食・菜食等、個人間において食事の趣向もあることから、食餌の有無による差異はさらに大きくなる可能性があり、今後はヒトにおける食餌の有無による差異を検討する必要が考えられた。

絶食によって食事由来代謝物が低いレベルを示す一方で、遊離脂肪酸及び炎症性メディエーターが高いレベルを示した。このことから、絶食による脂肪酸β酸化の活性化やストレスが、それぞれ血中の遊離脂肪酸及び炎症性メディエーターのレベルを増加させていると考えられた。これまでに、コルチコステロンがうつ病のバイオマーカーとして報告されているように、炎症性メディエーターは疾患等のバイオマーカーとして有力視されている。しかしながら、本研究から、これらの炎症性メディエーターをバイオマーカーとして用いる際には絶食による影響を考慮する必要が考えられた。

(2) ラット血漿の疎水性メタボローム解析

2-1) 疎水性代謝物の試料背景差(性差・年齢差)、及びヒトとラットの外挿性について

ラット血漿で同定された疎水性代謝物の30%が、若齢・老齢に共通して雌雄差によりレベルが有意に変化した。SM及びChE分子種等はヒトとラットで同様の性差が認められたが、各疎水性代謝物の変化率は、概してラットの方がヒトより大きかった。一方、TG分子種やEPA・DHA代謝物に認められ雌雄差はヒトでは認められず、ラットの雌雄差に関してヒト性差と外挿が可能な分子種とそうでない分子が存在することが明らかになった。外挿が可能な分子種は、ヒトとラットで同様の合成調節をうけている可能性があり、バイオマーカーとして望ましいと考えられた。

ラット血漿には、週齢によりレベルが有意に変化する疎水性代謝物が雄性ラットで総同定代謝物の29%、雌性ラットで33%見出されたが、雌雄で共通して週齢差を示す代謝物は5%であり、雌雄で週齢差を考慮しなければならない疎水性代謝物が異なることが示唆された。また、TG及びChE分子種等の雌で認められた週齢差に関して、ヒトで外挿可能な分子種が存在した。一方、EPA及びDHA代謝物等の雄で認められた週齢差は、ヒトへの外挿性が認められず、代謝物生成に関わる酵素の制御様式がヒトとラットで異なることが示唆された。

2-2) 疎水性代謝物レベルにおける食餌の有無・採血時間・絶食時間の影響

ラット血漿中の疎水性代謝物の69%が食事の

有無で有意に変動したことから、バイオマーカー探索・検証時には、食事制限は、最も考慮すべき要因と考えられた。さらに、絶食時には、非絶食時と比較してアラキドン酸のLOX代謝物のレベルが有意に高く、これらは炎症・抗炎症のマーカーでもあることから、探索するバイオマーカーの用途によっては、非絶食下での試験が望ましい場合があることが示唆された。

またラット血漿で、採血時間の違いにより変動する疎水性代謝物は少なく、変化率も低いことから、今回検出された疎水性代謝物に関しては、試料要件として採血時間を考慮する必要性は低いと考えられた。

(3) ヒト尿のプロテオーム解析

ヒト尿のプロテオーム解析により得られたデータは、ヒトでの個体差の大きさを示していたが、ラットが実験動物として比較的均一な遺伝的背景を持つことを考えると妥当な結果であるといえる。ただし、性差および年齢差を超えて個体間のばらつきの方が大きかった点は意外であり、この個体差の要因解析が重要な課題となった。そのため、肥満度による相関を調べたところ、性差、年齢差には認められなかったグループ化が主成分分析の第二主成分方向に認められたことより、ヒトの尿プロテオームに関する個体差の要因の一つとして、肥満度が重要なファクターとなることが分かった。つまり、ヒト尿プロテオームにおいては、性差、年齢差以上に肥満度の差が個体差の原因となることが明らかになった。今後は肥満度の影響を受けにくいバイオマーカーの探索が重要であるとともに、主成分分析の第一成分方向に認められた個体差の要因の究明が課題である。

新たに修飾ペプチドを対象とした「プロテインアダクトーム解析」の確立にめどがついた。今後は糖化以外の修飾に関する検討を行い、一般化を行いたい。今回解析した糖付加においては、トリプシン消化部位であるリジンおよびアルギニン残基が反応の標的となるため、修飾を受けたペプチドの消化が妨げられるという問題が生じた。このため、Glu-Cプロテアーゼを用いた検討を行っている。

(4) 重篤副作用試料の収集

北里大学において、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った。今後、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。

E. 結論

薬剤性肝障害の早期発見・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、検体採取を開始した。現在の症例数はまだ少数であるが、順調な集積が期待される。

血液中の内在性代謝物に関し、ラット等を対象とする非臨床試験においてバイオマーカーとして探索する際には、1) ヒトと同様に性差や年齢差等の試料背景間差が交絡因子となりうること、2) ヒトにおいて検出可能な代謝物を選択すること、3) ラットにおける性差・年齢差は、スフィンゴミエリンなどの一部の分子種を除き、ヒトへ外挿する場合に考慮する必要性が低いこと、4) 食餌の有無（特に脂質代謝物や炎症性メディエーターを対象とする場合）や採血時間（特に、アミノ酸類の場合）を考慮し、可能な限り統一すべきこと、が示唆された。

また同様に尿中の内在性蛋白質については、1) ラットとヒトでは、同様に性差や年齢差等の試料背景間差が交絡因子となりうるが、影響されるタンパク質は代謝物に比して少数であること、2) ヒトにおいて検出可能なタンパク質を選択すること、3) ラットにおける背景因子差は、ヒトへ外挿する場合に考慮する必要性が低いこと、4) 食餌の有無や採血時間も考慮する必要性が小さいこと、が示唆された。

以上、非臨床試験から臨床試験へのバイオマーカーの外挿性に関する評価要件作成に直接利用可能な成果を得ることができた。また、ヒトとラット間で共通して測定された代謝物・タンパク質の情報は、非臨床試験で見いだされたバイオマーカー候補を、ヒト臨床試験で外挿する場合の、非臨床段階における候補選定に活用できると考えられた。平成 27 年度は、薬物性肝障害マーカーを具体的な対象にラットからヒトへの外挿性に関する検討を行うと共に、評価要件案の作成を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表：

1. 論文発表

1) 斎藤嘉朗, 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治,

鈴木孝昌 タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて. *国立医薬品食品衛生研究所報告*, 131, 20-24. 2013.

- 2) 中村里香, 酒井信夫, 齋島由二, 福井千恵, 鈴木孝昌, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 安達玲子, 手島玲子: ショットガンプロテオミクスによる加水分解小麦とその原料であるグルテンに含まれるタンパク質の網羅的解析. *国立医薬品食品衛生研究所報告*, 131, 50-57. 2013.
- 3) 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. *薬学雑誌*, 133: 1373-1379, 2013.
- 4) 鈴木孝昌: 網羅的な発現をみるマイクロアレイ解析との比較を例に. *実験医学別冊 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド* (羊土社) 111-121. 2013.
- 5) Saito K, Maekawa K, Pappan KL, Urata M, Ishikawa M, Kumagai Y, Saito Y: Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations. *Metabolomics*, 10 : 402 - 413, 2014.
- 6) Ishikawa M, Maekawa K, Saito K, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Tajima Y, Kumagai Y, Saito Y: Plasma and Serum Lipidomics of Healthy White Adults Shows Characteristic Profiles by Subjects' Gender and Age. *PLoS One* 9: e91806, 2014.

2. 学会発表

- 1) Suzuki T., Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y.: Basic factors that influence the rat urinary proteome. The XIII International Congress of Toxicology (2013. 7, Seoul, Korea).
- 2) 斎藤嘉朗, 鹿庭なほ子, 佐井君江, 花谷忠昭, 中村亮介, 前川京子: ゲノミクスおよびメタボロミクス解析によるバイオマーカー探索. 第 16 回日本医薬品情報学会学術大会. (2013. 8, 名古屋).
- 3) 田島陽子, 前川京子, 妹尾勇弥, 浦田政世, 石川将己, 村山真由子, 頭金正博, 斎藤嘉朗: ヒト尿中脂質代謝物の基本的性質(性差および年齢差, 安定性)に関する網羅的検討. 第 86

- 回日本生化学会大会。(2013.9、横浜)。
- 4) 石川将己, 前川京子, 妹尾勇弥, 田島陽子, 齊藤公亮, 浦田政世, 村山真由子, 脇坂真美, 熊谷雄治, 斎藤嘉朗: バイオマーカー探索・検証のための、ヒト血液中高度不飽和脂肪酸代謝物レベルに関する基盤的検討。第86回日本生化学会大会。(2013.9、横浜)。
 - 5) Suresh T., Oshizawa T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y., Suzuki T.: Improvement of Rat Urinary Proteomics by a Differential Precipitation of Proteins. Human Proteome Organization 12th World Congress (2013.9、横浜)。
 - 6) Saito K., Maekawa K., Pappan K. L., Urata M., Ishikawa M., Kumagai Y., Saito Y.: The difference in the metabolite profiles between plasma and serum, ages or sexes, and their inter-individual variations in human subjects. 10th international ISSX meeting (2013.10、カナダ・トロント市)。
 - 7) Ishikawa M, Maekawa K, Senoo Y, Tajima Y, Saito K, Urata M, Murayama M, Kumaga Y, Saito Y: Lipidomic profiles in blood from fasted healthy adults vary between plasma and serum and by subject's genders and ages. 10th international ISSX meeting. (2013.10、カナダ・トロント市)。
 - 8) Saito K., Maekawa K., Pappan K. L., Urata M., Ishikawa M., Kumagai Y., Saito Y.: The difference in the hydrophilic metabolite profiles between plasma and serum in human subject. 28th JSSX meeting (2013.10、東京)。
 - 9) 前川京子, 石川将己, 妹尾勇弥, 田島陽子, 齊藤公亮, 浦田政世, 村山真由子, 熊谷雄治, 斎藤嘉朗: バイオマーカー探索・検証のためのヒト血液中脂質代謝物レベルに関する網羅的検討。日本薬物動態学会第28回年会。(2013.10、東京)。
 - 10) スレッシュ ティルパッティ, 斎藤嘉朗, 本間正充, 佐藤陽治, 鈴木孝昌: ヘモグロビンアダクトーム; 環境変異原に対する暴露マーカーとしての新しいアプローチ。日本環境変異原学会第42回大会(2013.11、岡山)。
 - 11) 降旗千恵, 櫻井幹也, 渡辺貴志, 鈴木孝昌: Toxicogenomics/JEMS・MMS V: クリセン投与48時間後までのマウス肝臓における遺伝子発現変化。日本環境変異原学会第42回大会(2013.11、岡山)。
 - 12) 齊藤公亮, 前川京子, 浦田政世, 村山真由子, 妹尾勇弥, 石川将己, 田島陽子, 中津則之, 山田弘, 斎藤嘉朗: メタボロミクスを用いた肝臓性リン脂質症の血中バイオマーカー探索。第34回日本臨床薬理学会学術総会(2013.12、東京)。
 - 13) 齊藤公亮, 前川京子, 浦田政世, 村山真由子, 妹尾勇弥, 石川将己, 中津則之, 山田弘, 斎藤嘉朗: 脂質メタボロミクスを用いた薬剤性リン脂質症の肝バイオマーカー探索。第34回日本薬学会年会(2014.3、熊本)。
 - 14) 石川将己, 前川京子, 齊藤公亮, 浦田政世, 田島陽子, 村山真由子, 妹尾勇弥, 熊谷雄治, 斎藤嘉朗: ラット血清中の内因性代謝物レベルの雌雄差に関する網羅的検討。第134回日本薬学会年会(2014.03、熊本)。
 - 15) 前川京子, 齊藤公亮, 山田弘, 斎藤嘉朗: 動物モデルを用いた医薬品化合物によるリン脂質症の脂質メタボローム解析。第134回日本薬学会年会(2014.03、熊本)。
- 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 試料背景差（性差・年齢差）により異なるレベルを示した代謝物のまとめ

Statistical Comparisons				
	Gender comparison		Age comparison	
	Young	Old	Male	Female
Number of statistically different levels of metabolites P < 0.05	119	154	109	93
Direction of differences and metabolite numbers	↑ in Male / ↑ in Female	↑ in Male / ↑ in Female	↑ in Young / ↑ in Old	↑ in Young / ↑ in Old
	73/46	48/106	93/16	36/57
Common	38・39 (Male・Female)		29・9 (Young・Old)	

表2 ラット及びヒト血漿で検出された各脂質クラス別数の比較

脂質クラス	LPC	LPE	PC	PCe	PE	PEe	PI	PG	SM	Cer	HexCer
ヒト(白人)	9	2	34	20	9	9	8	0	22	7	8
ラット	9	1	41	3	4	3	7	1	14	5	1

NLs/oxFAs	Ch	CoQ	DG	TG	ChE	AAm	EPAm	DHAm	計
ヒト(白人)	1	1	7	79	12	13	4	6	251
ラット	1	1	10	101	25	22	9	11	269

LPC, リゾホスファチジルコリン; LPE, リゾホスファチジルエタノールアミン;
 PC, ホスファチジルコリン; PCe, エーテル型ホスファチジルコリン; PE, ホスファチジルエタノールアミン; PEe, エーテル型ホスファチジルエタノールアミン;
 PI, ホスファチジルイノシトール; PG, ホスファチジルグリセロール; SM, スフィンゴミエリン; Cer, セラミド; HexCer, ヘキソシルセラミド;
 Ch, コレステロール; CoQ, コエンザイムQ; DG, ジアシルグリセロール; TG, トリアシルグリセロール; ChE, コレステロールエステル;
 AAm, アラキドン酸代謝物; EPAm, エイコサペンタエン酸代謝物; DHAm, ドコサヘキサエン酸代謝物

図1 ラット尿プロテオーム解析全データの主成分分析

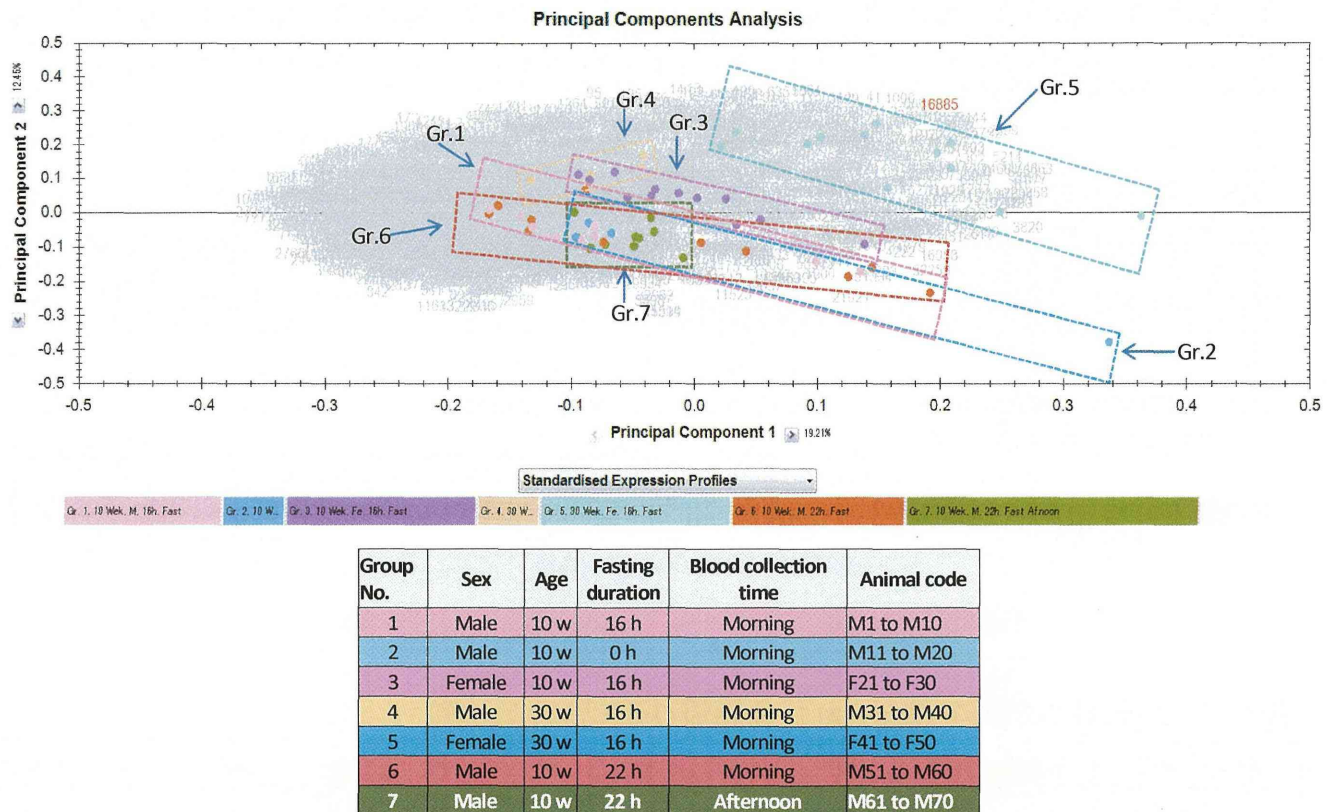
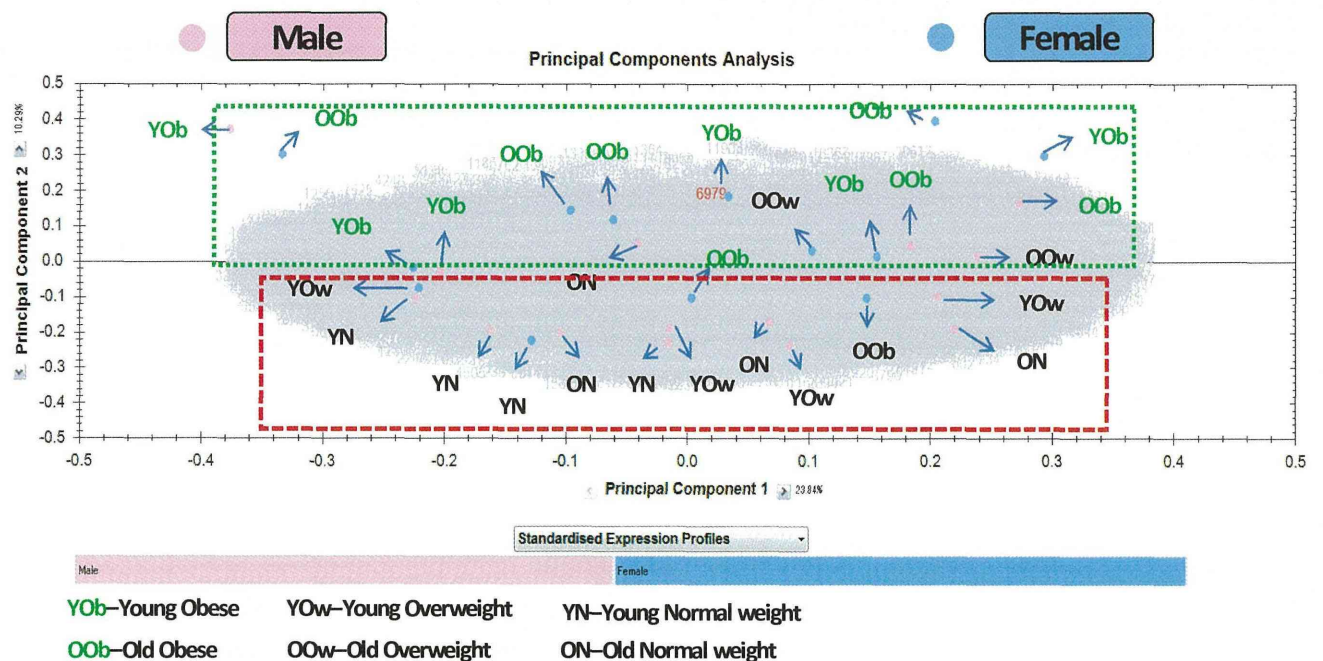


図2 肥満度によるヒト尿サンプルプロテオーム解析データの主成分分析結果の評価



II. 分担研究報告書

平成 25 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

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な課題であり、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、昨年度までに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、これに基づいて、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。臨床研究事務局は消化器内科専門医と協力の下に薬剤性肝障害におけるバイオマーカー探索のための試験計画書、複数診療科にわたる試験を効率的に施行するための資料作成を行い、研究を開始した。この体制は薬剤性肝障害のみではなく、各診療領域におけるヒト副作用試料を患者背景情報・副作用情報とともに収集可能にするものであり、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ことが期待される。

A. 研究目的：

薬物有害反応の中で、肝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るが、現在使用されているマーカーは疾患特異性に関して問題があり、感度、特異度ともに高いマーカーが求められている。今回はこれまでにを行った調査、組織形成をもとにして、試験計画を作成し、複数診療科にまたがる研究体制を構築することとした。

2) 本研究への参加の意思があり、文書による同意が得られた患者

【患者群の除外基準】

- 1) 急性・慢性ウイルス肝炎、無症候性キャリア、アルコール性肝障害、過栄養性脂肪肝、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、胆石症、閉塞性黄疸、ショック肝などの疾患を有する者
- 2) DDWJ-2004 スコア 4 点以下の者
- 3) 医師が本臨床研究の対象として不適格と判断した者

B. 研究方法：

1) 薬剤性肝障害発症時における新規バイオマーカー開発に関する探索的研究計画の作成

北里大学医学部附属臨床研究センターおよび北里大学東病院消化器内科が中心となり、計画を作成した。各診療科において発生した薬剤性肝障害患者を対象とし、肝障害発生時および回復時の血液・尿検体を採取することとした。また、検体をプロテオームおよびメタボローム測定者の所属機関である国立医薬品食品衛生研究所へ匿名化の上送付する手順を作成した。被験者の選択基準、除外基準は以下の通りである。

本研究は消化器内科日高中央医師を臨床研究責任者とし、北里大学・病院倫理委員会および国立医薬品食品衛生研究所・研究倫理審査委員会の審査を受け、施行を承認された。

2) 円滑な施行のための体制整備

関連する診療科において、研究計画の説明会を行った。また、研究施行に必要な資料をとりまとめたファイル作成、ポケットメモの作成を行い、配布した。

本臨床研究体制は以下の通りである。

【患者群の選択基準】

1) 薬剤性肝障害と診断された患者

<診断基準>

ALT が正常上限の 2 倍、もしくは ALP が正常上限を超える症例で、新たに薬剤性肝障害が疑われた者

・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

G. 研究発表：

なし