

厚生労働科学研究費補助金
医薬品等規制調和・評価研究事業

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 26 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
斎藤 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と新規バイオマーカー探索に向けた効率的な
医療情報基盤の構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
熊谷 雄治（北里大学 医学部 附属臨床研究センター）

- 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27
鈴木 孝昌（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部）

- イオン性代謝物バイオマーカー探索・検証のための血液試料要件の
確立、及び薬物性肝障害のバイオマーカー探索にかかる実践的検討
・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45
斎藤 嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）

- 脂質バイオマーカー探索・検証のための血液試料要件の確立、及び
薬物性肝障害のバイオマーカー探索にかかる実践的検討・・・・ 52
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 63

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 部長 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 教授 熊谷 雄治
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 室長 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 室長 前川 京子
研究協力者 北里大学医学部附属臨床研究センター 特任助教 田中 理英子
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 主任研究官 齊藤 公亮

研究要旨：

バイオマーカーは、既存の臨床評価項目だけでは判断がつかない診断を可能とするサロゲートマーカーとして、臨床においてその重要性が増している。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を最終目標として、試料・臨床情報収集、および性差、年齢差、人種差等の検討を行い、評価要件とすべき項目を抽出した。

試料・臨床情報収集に関しては、副作用発現資試料の収集を行うと共に、臨床研究が複数の医療機関もしくは多科に渡る場合に、情報書式の均質化を図り、高品質かつ効率的な情報管理を可能とするため、収集している薬物性肝障害を対象に、IT 技術を用いた新たなデータベース構築を行った。

蛋白質バイオマーカーに関しては、尿を用いた検出のため、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクス法による高感度分析により、日本人由来試料の解析を行い、白人と同様個人差が大きいことを確認するとともに、個人差の原因となっていた蛋白質の検討を行った。その結果、性差、年齢差を示す蛋白質を同定すると共に、個人間のばらつきに大きな影響を与える蛋白質群を網羅的に同定した。これらの蛋白質はバイオマーカーとしては不適と考えられる。さらに、薬物性肝障害を起こした患者の尿サンプルを用いて、肝障害時と回復時の比較から、肝障害に特異的な蛋白質の探索を行った。その結果、肝障害時に共通して変化した複数のバイオマーカー候補物質を同定した。このうちの一つは、炎症反応の初期段階に誘発されることが知られている Leucine-rich α 2-glycoprotein であり、肝障害早期の尿中バイオマーカーとして期待される。

代謝物バイオマーカーに関しては、イオン性代謝物につき血清を用いて解析を行い、日本人の性・年齢差及び、人種差を明かにした。約 500 種のイオン性内在性代謝物(アミノ酸、等)を定量し、31%が若年層(25-35 歳)において、25%が老年層(55-65 歳)において性差を示し、23%が男性において、24%が女性において年齢差を示した。また、日本人、白人、及び黒人における人種差では、約 50%以上の代謝物が、日本人と比べ白人、黒人において差異が認められた。特にアシルカルニチンは、全般的に日本人との人種差が白人、及び黒人に認められた。一方、白人と黒人間において人種差を認めた代謝物は 10%以下であった。また脂質代謝物に関しては、血漿で 128 種のグリセロリン脂質・スフィンゴ脂質を測定した。有意に異なるレベルを示した代謝物の割合は、男女間、若齢・老齢間、及び人種間それぞれの比較 2 群間の最大で、総同定代謝物数の 16% (男女差)、31% (年齢差)、及び 47% (人種差) であり、年齢差と人種差において 2 倍以上のレベル差を認める代謝物が存在した。さらに、日本人における薬物性肝障害患者の発症期と回復期の血中代謝物レベルを比較したところ、イオン性代謝物で 49 種が有意な差異を認めた。これらの代謝物のうち、4 種は性・年齢・人種いずれによっても、そのレベルに影響を受けないことから、適切な候補と考えられた。また脂質代謝物に関しては、7 種のグリセロリン脂質・スフィンゴ脂質と、6 種の酸化脂肪酸代謝物が肝細胞障害性の薬物性肝障害のマーカー候補であることを見出した。これらの 13 種のうち 4 種は、性、年齢、人種の影響を受けにくいものであった。

3 年間の研究結果から、臨床試験においてバイオマーカーを探索する際には、性、年齢、人種、凍結融解の回数等の試料背景が交絡因子となりうることが示唆された。バイオマーカーの探索・検証における評価要件として、各因子の影響を明確に示すことが必要である。さらに本研究では、各分子毎にその影響の大きさを明らかにしたことから、今後、論文発表後に国立衛研のホームページ上に公開してバイオマーカー探索時に広く利用頂く予定である。

A. 研究目的：

バイオマーカーは、臨床的な最終評価指標(エンドポイント)を、早期に、簡便に、かつ頑強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は始まっている。特に、既存の臨床評価項目だけでは判断が困難であった、疾患・副作用等の早期発見や病勢判断に関わる感度・特異度の高い新規バイオマーカーの探索に注目が集まっている。医薬品の有効性及び安全性の指標となり、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この10年間で約30倍に増えている。しかしながら、バイオマーカーの利用はまだ緒についたばかりであり、その適格性(確立)に関する評価要件のガイドラインは、1例の概要案を除き世界的にない。

バイオマーカー探索研究においては、質の高い臨床情報が不可欠であるが、複数の機関から異なる書式の臨床情報を収集し、統合することは非常に煩雑な作業が必要となる。一般的には解析を行う研究者がその作業を担当しデータセットの作成と解析を行うが、そのデータセットに後から情報を追加する場合や、別の研究者が違った目的で解析する際には、その度にデータの収集、整理が必要となり、時間や労力の消費の面で多くの問題を抱えていた。そこで、複数の病院をまたいだ臨床情報の一元化を目的とし、平成25年度より北里大学病院の消化器内科を中心として資試料の収集を行っている「薬物性肝障害」に焦点を当て、効率的な医療情報管理基盤を構築する。

また、バイオマーカー測定用試料としては、低侵襲的に採取でき、臨床現場に多用される血液及び尿が汎用される。実際、血中ビリルビン、AST、ALT、 γ -GTPなどは、薬物性肝障害の診断バイオマーカーとして、また、尿中NAG、 β 2ミクログロビン、L-FABPなどは腎障害の診断バイオマーカーとして臨床で用いられている。しかし、さらにバイオマーカーの探索・検証・実用化を推進するためには、その適格性に関して、実データを反映した評価要件の明確化が必要である。

蛋白質に関しては、バイオマーカーの探索用試料として尿を対象に、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を行い、ラット及びヒトに関して、性、年齢、絶食、採取時間等の試料採取条件が与える影響に関して知見を得ると共に、ラットからヒトへの外層性に関して考察を行った。今年度は、日本人尿プロテオーム解析における、性差、年齢差、個人間のばらつきの要因となる蛋白質に関して、検討を行った。さらに臨床検体として実際に薬物

性肝障害を起こした患者の尿サンプルを用いて、バイオマーカー候補蛋白質の探索を行った。

また内在性代謝物に関しても、これまでにラット及びヒト血液を用いて、性、年齢、絶食、採取時間等の試料採取条件が与える影響に関して知見を得ると共に、ラットからヒトへの外層性に関して考察を行った。例えば、イオン性代謝物では、1)凍結融解の有無による差異は血清と比べ血漿において大きく認められたことから血清の方が望ましいこと、2)白人の血液を用いた解析から、性差・年齢差が代謝物レベルに影響を与えること、3)性・年齢差はヒトとラットで分子の種類として相関しないこと、等を明らかにしている。しかし、本邦におけるバイオマーカー利用を考慮すると、日本人における性差・年齢差や、日本人と白人または黒人との人種差を明らかにすることが求められる。そこで本年度は、日本人における性・年齢差及び人種差を明らかにするとともに、これらのデータを基に、薬物性肝障害に対するバイオマーカーを実践的に探索した。

B. 研究方法：

1) ヒト資試料の収集とシステム構築

1-a) ヒト副作用資試料の収集

ヒト薬物性肝障害に関しては、2-bに詳細に記載しているとおり、北里大学病院及び国立医薬品食品衛生研究所等にて、またそれ以外の副作用に関しては、国立医薬品食品衛生研究所にて、それぞれ行った。

1-b) データベースシステム構築

サーバは本学医学部情報センター内に設置した。入力項目は、表1に示した。個人情報保護の観点から、データベースに入力される被験者の情報は、連結可能匿名化された被験者IDを用いた。データベースへのアクセス権限は以下の通りとした。

システム管理者:北里大学臨床研究センター

データ入力者:北里大学病院消化器内科 医師

北里大学東病院消化器内科 医師

閲覧者:国立医薬品食品衛生研究所

データの流れとしては、まず各医療機関で連結匿名化された臨床情報がデータベース上に入力される。各研究者は、オンライン上のサーバにアクセスすることにより、入力されたデータの閲覧が可能となる。なお、データセットはタブ区切りのtxt.ファイルとしてエクスポートが可能である。概念図を図1に示した。

2) 臨床試料の収集

2-a) 健常日本人試料の収集

健常日本人血液・尿は臨床試験機関に委託して収集した。年齢・性別の異なる日本人の健常ボランティア 60 名を対象に、採取の前日の午後 8 時より、採取当日の午前 10 時まで食事制限（水のみ可）を行い、14 時間以上の絶食下で、午前 10 時に採取を行った。被験者は、年齢（若年・老年）及び性別（男・女）により、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。健常ボランティアの募集条件として、①日本人であること（自己申告において、祖父母までが日本人であることにより判断）、②年齢が 30±5 歳（若年）、または 60±5 歳（老年）で、出来るだけ、BMI で、18.5 以上 25 未満、③直近一週間、医薬品の投与なし、とした。本研究に用いた被験者の情報及び種類を表 2 に示した。

白人・黒人血液は ProMedDx 社 (Norton, MA, USA) より購入した。25-33 歳までの白人または黒人の男性健常ボランティア各 15 名を対象に、採血の前日の午後 8 時より、採血当日の午前 10 時まで食事制限（水のみ可）を行い、14 時間以上の絶食下で、午前 10 時に採血を行った。本研究に用いた被験者の情報、及び検体の種類を表 3 に示した。なお、白人若年男性血液は、平成 24~25 年度に試料採取条件の検討に用いた血漿・血清試料と同様の個人から採血した試料を用いた。

検体は、ドライアイス詰めにて国立衛研に輸送後、1 回融解して分注作業を行い、再度凍結し、2 回目に融解した検体を測定用試料とした。

2-b) 薬物性肝障害試料の収集

薬物性肝障害を発症した患者の血液および尿を収集した。薬物性肝障害の診断基準は、2 病院では、ALT が正常上限の 2 倍、もしくは ALP（アルカリアルカリホスファターゼ）が正常上限を超える症例で、新たに薬物性肝障害が疑われ、DDWJ-2004 (Digestive Disease Week -Japan 2004) スコア 4 点以上（可能性あり 以上）の患者とした。他の 1 病院は、ALT が 150 IU/L もしくは ALP が基準上限の 2 倍以上の症例とした。採血・採尿は、薬物性肝障害の発症を確認した時点（急性期）と改善を確認した時点（回復期）とし、入院患者は早朝空腹時に、外来患者は随時実施した。検体は、ドライアイス詰めにて国立衛研に輸送後、1 回融解して分注作業を行い、再度凍結し、2 回目に融解した検体を測定用試料とした。

3) プロテオーム測定

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)にて蛋白質濃度を測定した。蛋白質 15 μ g 相当量の尿をとり、2 倍容量のアセトンを加え、蛋白質を沈殿させた。その後遠心分離後、上清を除き、沈殿を洗浄した。再び遠心分離後、上清を除き、沈殿を 15 μ l の 0.1% Rapigest (Waters)に溶解させた。さらにトリプシンによる消化を促進するために、以下の条件にて蛋白質 S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。蛋白質溶液 30 μ l に、30 μ l の 10mM DDT を加え、60°C 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。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 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、0.1%トリフルオロ酢酸にて 25 倍に希釈した後、LC-MS 解析に用いた。

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、ESI-四重極/FT 型タンデム質量分析装置 Q-Exactive (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。ZAPLOUS 逆相 C18 カラム (AMR 製 0.1 mm x 50 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。

データ解析は、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) を用いた。

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。MASCOT の検索パラメーターとしてはデフォルト値を用い、固定修飾としてシステインのカルバミドメチル化を、可変修飾として、メチオニンの酸化、およびセリン、スレオニン、チロシン

のリン酸化を設定した。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。

日本人正常尿サンプルのプロテオーム解析では、日本人由来正常ヒト尿サンプル 60 検体中、5 種に関しては、十分な質のデータが得られなかったため、解析からは除外した。また解析は、 $BMI < 20$ 、 $20 \leq BMI \leq 23$ 、 $BMI > 23$ の 3 群に分けて行った。

薬物性肝障害尿サンプルのプロテオーム解析では、男女各 3 名、6 名の患者より得られた肝細胞障害型の試料を使用した。患者の年齢は 53~80 歳と比較的高齢であった。また陰性対象として比較的年齢の近い日本人正常尿サンプルを用いて、肝障害発症時に特徴的に変化を示す蛋白質の検索を行った。

4) イオン性メタボローム測定

メタボロン社に受け取られた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測定された後、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。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、全検体中の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のレベルの違いにつき、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。性・年齢・人種差におけるイオン性代謝物の包括的比較は主成分分析により行った。

5) 脂質メタボローム測定

ヒト血漿（各 100 μ L）から、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（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。超高速度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、種々の条件間の脂質分子種レベルの違いにつき、Mann-Whitney U-test（男女差、年齢差、人種差の比較）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、同定できた全ピークを用いて、部分最小二乗法判別分析 (PLS-DA) を行い (SIMCA-P+ 12, Umetrics, Umea, Sweden)、群間の類縁性や個体間変動を把握した。

薬物性肝障害患者の血漿サンプルでは、UPLC-TOFMS のネガティブイオンモードで検出されたすべてのピークを用いて急性期と回復期の 2 群間で直交部分最小二乗法判別分析 (OPLS-DA) を行い (SIMCA-P+ 12)、スコアプロットより群間の類縁性や個体間変動を把握した。OPLS-DA 解析の S-プロットにより、2 群の判別に寄与するピークを抽出し、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。Mann-Whitney U-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、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、 $p < 0.05$ を有意な差と判定した。

（倫理面での配慮）

健常日本人の血液試料を用いた研究は、研究実施機関である国立医薬品食品衛生研究所、及び研究実施医療機関等の研究倫理審査委員会の承認のもと実施した。本研究は、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守した。全ての健常ボランティアには、説明・同意文書にて、本研究の内容や同意撤回の権利等を十分説明した後、自由意志により文書で同意を得た。また全ての生体試料および情報は委託先の医療機関で連結不可能匿名化されてから国立衛研に提供された。

白人・黒人の血液試料を用いた研究は、

ProMedDx 社から市販されている血漿を使用した。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、個人情報に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。

薬物性肝障害をはじめとする副作用患者試料の収集は、国立医薬品食品衛生研究所、北里大学等の各医療施設の倫理審査委員会の承認のもとで行っており、被験者の同意も適正に得て行った。「臨床研究に関する倫理指針」の他、一部は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行った。個人識別情報は、連結可能匿名化された資試料とは完全に切り離されているため、個人情報の漏洩の問題はない。

C. 研究結果：

1) ヒト資試料の収集とシステム構築

1-a) ヒト副作用資試料の収集

ヒト薬物性肝障害に関しては、3例を追加し、累計12例となった。また、他の重篤副作用に関しては、間質性肺障害1例（累計36例）、横紋筋融解症5例（累計34例）、重症薬疹3例（累計7例）の資試料収集をそれぞれ行った。

1-b) データベースシステム構築

データベースを構築した。現在、「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」において登録された被験者5例の情報がテストデータとして格納されている。例数は少ないものの、構築したデータベースは順調に機能していることが確認された。

2) 蛋白質に関する解析

2-a) 日本人由来正常尿プロテオーム解析

データが得られた55サンプルに関して解析した結果、検出された総ペプチド数は、218,755個であり、得られたMS/MSスペクトル情報を基に、MASCOTによるデータベース検索をした結果、1,282蛋白質が同定された。

同定された蛋白質の情報を基に主成分分析(PCA)を行ったところ図2のような結果が得られた。年齢および性別により分けられた4群を色分けしてローディングプロットしたが、明らかな傾向は得られず、ランダムなばらつきが認められた。次に、肥満度との相関を見るために、BMI値により全体を3群に分け、同様の解析をしたところ、図3に示すように、昨年度白人サンプルに見られたような明らかな傾向は認められなかった。

次に、性別および年齢差に特徴的な動きを示す蛋白質の抽出を行った。その結果、まず男性に特異的な発現を示す蛋白質の例として、 β -microseminoprotein が同定された(図4)。これは前立腺にて分泌され精液に含まれる蛋白質のため、女性では全く発現が見られない。逆に、女性特異的に発現している蛋白質の例として、Annexin A1、Protein S100-A11、Protein S100-A7、Annexin A2が同定された(図5)。このうち、Annexin A1とA2は、昨年度の白人サンプルの解析においても、女性特異的蛋白質として見つかった。

次に、年齢の影響を受ける蛋白質として、高齢者で発現が増加する蛋白質の例として、N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase のデータを図6に示す。さらに、特定の群に特異的に発現する蛋白質として、男性高齢者群に高発現を示す蛋白質が認められた。

なお、図2に示したとおり、全同定蛋白質を用いて主成分分析を行った場合には、性差や年齢差による傾向とは無関係に、特に第一主成分(PC1)方向にデータがばらついていることが分かる。このPC1スコアを正および負の方向へ導く要因となっているペプチドは、主成分分析図の背景上にプロットされており、水平方向の左右それぞれ両極端の位置に存在する。そこで、主成分分析グラフより、最も右側と左側に位置するペプチドをリストアップした(表4)。このリストを、先に得られている白人でのデータ(表5)と比較することにより、共通した要因となっているペプチドをまとめた。黄色い印をつけたペプチドが両者に共通のものであり、それらを表6にまとめた。さらに、GO解析においてそれぞれの蛋白質が示す分子機能(Molecular Function)に関する情報を加えた。

2-b) 薬物性肝障害患者由来の尿サンプルの解析によるバイオマーカー探索

発症時6サンプル、回復時4サンプルが利用可能であった。尿プロテオーム解析の常法に従って検討を行ったところ、検出された総ペプチド数は、271,873個であり、得られたMS/MSスペクトル情報を基に、MASCOTによるデータベース検索をした結果、1,274蛋白質が同定された。日本人由来正常コントロール尿を対照として使用し、肝障害発症時に特異的に発現変化する蛋白質を検索した。

最上位にランクされた Leucine-rich α 2-glycoprotein は、炎症反応に関与する蛋白質として最近注目されているが、薬物による肝障害が自己免疫反応等の炎症を伴うメカニズムで

誘導されていると考えると興味深い。ただし、この蛋白質はコントロールデータの解析より、男性高齢者に特異的に高い発現が見られており、肝障害のマーカーとして使えるかどうかは、さらに検討が必要である。その他、肝障害発現時に特異的に発現が上昇する蛋白質として、 α -crystallin B chain、 α/β hydrolase domain-containing protein 14B 等が、発現減少する蛋白質として、Hemicentin-1、Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta が同定された。

3) 内在性代謝物に関する解析

3-1) 日本人における代謝物レベルの性差

イオン性代謝物に関しては、性差によって統計的に有意差が認められた代謝物は、若年及び老年においてそれぞれ 158 (31%) 及び 130 代謝物 (25%) であった。このうち 61 代謝物 (12%) が共通しており、その主な代謝物はガンマグルタミルアミノ酸に属するガンマグルタミルバリンやガンマグルタミルトリプトファン等、ステロイドに属する 2 硫化アンドロスタンジオール等であった。一方、若年における性差を示す代謝物として、アシルカルニチン群に属するラウリルカルニチンやデカノイルカルニチン等が、老年における性差を示す代謝物として、グリシンやスレオニン等が認められた。

脂質代謝物に関しては、若年で 10 種が、老年で 20 種が有意な性差を示した (表 7)。平成 24 年度に実施した白人と同様、スフィンゴミエリン

(SM) 分子種の性差が日本人においても認められたが、白人と比較して日本人では有意差を認めた分子種数は少なく、変動倍率は小さかった。すなわち、白人では同定された 22 種の SM 分子種のうち、若年で 8 種、老年で 19 種が性差を示した (有意差を示した分子種の男性に対する女性の変動倍率 1.24-1.89 倍) が、日本人では、同定された 26 種のうち、若年で 1 種、老年で 11 種のみが性差を示した (変動倍率 1.15-1.39 倍)。さらに、老年では、SM 以外に、高度不飽和脂肪酸を含有すると予想されるホスファチジルコリン(PC) 分子種、ホスファチジルエタノールアミン(PE) 分子種が性差を示し、本結果は白人の老年男女から得られた性差の結果と一致した。老年で日本人・白人ともに性差を認めた代表的な分子種として、41:2 SM (日本人の老年男性血漿に対する老年女性血漿の比 1.39 倍、白人の老年男性血漿に対する老年女性血漿の比 1.67 倍) や 40:6PE (同 1.39 倍、1.60 倍) が挙げられた。脂肪酸代謝物では、老年においてのみ性差を示す代謝物が 1 種見出され、17-HDoHE (老年男性血漿に対する老年女性血漿の

比 0.74 倍) 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。また、日本人男女間で有意差を示した酸化脂肪酸代謝物は、平成 24 年度に実施した白人男女間で有意差を示した代謝物とは一致しなかった。

3-2) 日本人における代謝物レベルの年齢差

イオン性代謝物に関し、若年と老年間で統計的に有意差が認められた代謝物は、男性及び女性においてそれぞれ 119 (23%) 及び 122 代謝物 (24%) であった。このうち 47 代謝物 (9%) が共通しており、その主な代謝物はステロイドに属する男性ホルモン誘導体である 1 硫化アンドロスタンジオールや黄体ホルモン誘導体である水酸化プレグナノロングルクロナイド等であった。一方、男性における年齢差を示す代謝物として、TCA 回路群に属するクエン酸やマレイン酸等が、女性における年齢差を示す代謝物として、ガンマグルタミルアミノ酸に属するガンマグルタミルロイシンやガンマグルタミルチロシン等が認められた。

脂質代謝物に関しては、若年男女の比較では 40 種が、老年男女の比較では 31 種が、有意な年齢差を示し (表 7)、その大多数は、男女を問わず、若年と比較して老年で増加が認められた。一方、エーテル PC (ePC) は、男性で 3 種、女性で 6 種が、若年と比較して老年で減少した。代表的な分子種として、38:4ePC (男性若年血漿に対する男性老年血漿の比 0.72 倍、女性若年血漿に対する女性老年血漿の比 0.56 倍) が挙げられた。ePC 分子種の老年での減少は、白人では認められず、日本人に特有であった。脂肪酸代謝物では、男性で 9 種、女性で 7 種が若年・老年間で有意なレベルの違いを示し、うち 7 種の代謝物は、男女共通して年齢差を示した。これらの代謝物は、エイコサペンタエン酸 (EPA) またはドコサヘキサエン酸 (DHA) のリポキシゲナーゼ代謝物であり、すべての代謝物で、若年と比較して老年で有意に高いレベルを示した。特に 8-hydroxyeicosapentaenoic acid (8-HEPE、若年に対する老年の比、男性で 1.57 倍、女性で 2.19 倍) は、若年と比較して老年で顕著に増加した。平成 24 年度に実施した白人と比較すると、白人・日本人で一致して年齢差を示した代謝物は 5-HEPE のみであり、男性において、若年と比較して老年で有意に高いレベルを示した (白人で 2.24 倍、日本人で 1.79 倍)。

3-3) 代謝物レベルの人種差

イオン性代謝物に関しては、日本人、白人、及び黒人間の人種差を包括的にみるために、主成分分析をおこなったところ、日本人とそれ以外の人

種が分離した(図 7)。一方、白人と黒人は分離しなかった。日本人と比べ白人及び黒人において統計的な有意差が認められた代謝物はそれぞれ、248(48%)及び238(46%)代謝物であった。このうち192代謝物(37%)が共通しており、その主な代謝物は、アシルカルニチン群に属するオクタノイルカルニチンやラウリルカルニチン等、モノアシルグリセロール群に属するオレイルグリセロールやパルミトイルグリセロールであった。一方、白人と黒人間において統計的な有意差が認められた代謝物は、主成分分析によって分離が認められなかったことと相関して、わずか43代謝物(8%)であった。

脂質代謝物に関しては、測定した128種のグルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質を用いて、日本人、白人、黒人の若年男性(JMY, CMY, AMYと略す)各15名からなる3群を対象にしたPLS-DAの結果を図8に示す。日本人と白人・黒人間で明確な群間の分離が認められたが、白人と黒人間の分離は不明瞭であった。白人と日本人間の比較では45種が、黒人と日本人間の比較では60種が、有意な差を示した(表7)。日本人と比較して、白人または黒人で有意な増減を示した分子種は、白人・黒人間で共通するものが多かった。変化率が最大の分子種としては、日本人と比較して、白人及び黒人で有意に高いレベルを示した分子種が40:5 PC(18:0/22:5 PC, 日本人に対する白人の比2.03倍、日本人に対する黒人の比2.58倍)であり、白人及び黒人で有意に低いレベルを示した分子種が36:5 PC(16:0/20:5PC, 日本人に対する白人の比0.27倍、日本人に対する黒人の比0.36倍)であった。

3-4) 薬物性肝障害のバイオマーカーの実践的探索

薬物性肝障害のバイオマーカーを探索するために、発症期と回復期において薬物性肝障害患者の血中代謝物を測定した。

イオン性代謝物に関しては、発症期と回復期の比較において、49代謝物が有意な変化を示した。次に、これまでの血中イオン性代謝物レベルに関する基礎データを基にバイオマーカー候補の絞り込みを行った(図9)。具体的には、まず、性・年齢・人種それぞれの差異に関して、非有意かつ群間の差異50%以下となるような代謝物を選択した。その結果、全ての影響を受けにくい代謝物として54代謝物が選抜された。これら54種中、発症期と回復期の比較において有意な変化が認められた49代謝物のうち4種が見いだされた。このうち2種は発症期においてレベルが低下し、残りの2種は発症期においてレベルが増加していた

(図10)。

脂質代謝物に関して、肝細胞障害型試料を用いたS-プロットから、急性期と回復期の判別に寄与するピークとして、 $|p| > 0.05$ かつ $|p(\text{corr})| > 0.6$ の範囲にあるピークを抽出したところ、11種のピークが見出された。このうち、8種が同定可能であり、統計学的有意差を認めなかった1種のピークを除く7種のピークにおいて回復期のレベルが急性期のレベルより高かった(図11)。酸化脂肪酸解析では、急性期と回復期の2群間で有意にレベルが異なる代謝物が6種見出された(図12)。

D. 考察:

1) ヒト資試料の収集とシステム構築

今回のデータベース構築により、質の高い均質なデータの蓄積、多施設共同試験の効率化、遠隔から閲覧可能、データ集計の簡便化がなされ、バイオマーカー探索研究に大いに貢献ができる可能性が示唆された。その一方、ユーザーがシステムに慣れる必要がある、データのセキュリティ保障、データベース維持のランニングコストなどの問題点も挙がってきた。今後は、利用者のトレーニングや、長期的な運用を見通した支援体制の検討が必要である。

2) 蛋白質に関する解析

2-a) 日本人由来正常尿プロテオーム解析

昨年度の白人サンプルでのヒト尿プロテオームデータの取得に続き、今年度は日本人コントロールでのデータを同様に取得したが、白人と同様に、性差、年齢差を上回る個人差によるばらつきが認められた。そこで、白人、日本人両者において、主成分分析における第一主成分のばらつきへの寄与の大きいペプチドを検索した。多くのペプチドが共通する蛋白質由来であり、これらの蛋白質の変動が、プロテオームプロファイルの個人差を導く要因となっていることが示唆された。これらの蛋白質の分子機能という観点から考察を加えたところ、“binding”、“catalytic activity”、“receptor activity”の3つの機能が抽出された。

日本人のコントロールデータにおいて、性差に特徴的な蛋白質の検索を行ったところ、男性および女性特異的に発現する蛋白質が同定された。男性特異的に発現する蛋白質

β -microseminoproteinは前立腺にて産生される蛋白質である。女性特異的な発現を示した蛋白質は、Annexin A1, A2, S100-A7, A11と類似した二つの蛋白質群であり、それぞれの発現に関連性が存在する可能性が考えられる。Annexinについては

白人サンプルでも女性特異的蛋白質としてすでに検出されており、再現性が確認できた。S100 蛋白質群はカルシウム結合蛋白質であり、女性特異性の原因に関しては不明である。

次に、年齢差を示した蛋白質に関しては、男女とも高齢者で上昇するものとして PGRP2 が同定された。一方、男性高齢者のみに特異的に発現する蛋白質は多く、特に Leucine-rich α 2-glycoprotein は、肝障害の検索においてバイオマーカー候補として同定されてきており、男性高齢者のサンプルを用いた影響が懸念される。

2-b) 薬物性肝障害患者由来の尿サンプルの解析によるバイオマーカー探索

薬物性肝障害患者の尿サンプルは、発症時と回復時のサンプルをセットで入手できたので、両者の比較から肝障害特異的なバイオマーカーの探索を試みた。被疑薬に関しては多岐にわたるため、肝障害において共通して変化する蛋白質を標的とし、10 種類の蛋白質をバイオマーカー候補蛋白質としてリストアップした。統計的有意性、変化率、同定スコアなどの観点から順位付けした結果、最も有望な蛋白質として、Leucine-rich α 2-glycoprotein が同定された。本蛋白質は関節リウマチやクローン病、ベーチェット病などの自己免疫疾患における新規の炎症マーカーとなることが報告されており、薬物性肝障害の原因を自己免疫疾患に基づくと考えた場合には、同様のマーカーとして有効である可能性は十分にある。これまでは主に血液中での検出であったが、同様に尿中でも検出可能であれば、検査のしやすさからも有用性は高いと期待できる。すでに本蛋白質に関しては抗体を用いた市販の ELISA 検査キットが利用可能である。

3) 内在性代謝物に関する解析

3-1) 日本人における代謝物レベルの性差・年齢差と白人との比較

イオン性代謝物に関しては、日本人における性差・年齢差の比較において、有意に差異のある代謝物は、性差の方が年齢差よりもわずかに多く、若年における性差が最も顕著であった。性差及び年齢差を示す代謝物は 20-30%におよび、これらの代謝物に関してはバイオマーカー探索の差異の交絡因子となることが考えられた。ガンマグルタミルアミノ酸は性差、及び女性における年齢差を示した。ガンマアミノグルタミン酸の機能に関してはまだ不明な点が多いが、最近ではガンマグルタミルアミノ酸の 1 種であるガンマグルタミルシトルリンが肝障害のマーカー候補として報告されている。したがって、ガンマグルタミルシトル

リンのバイオマーカーとしての利用には性差・年齢差を加味する必要があることが考えられた。

アシルカルニチン群は若年において性差が認められた。こ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。

TCA 回路に属する代謝物は男性において年齢差が認められた。この差異をもたらす生物学的背景として、TCA 回路はミトコンドリアの重要な機能であり、酸化ストレス等の老化によって機能が低下する。したがって、その TCA 回路に属する代謝物が老化マーカーとなることが考えられた。

測定・解析手法の改良により今回測定可能であった代謝物が 516 代謝物であったのに対し、以前に白人において性差・年齢差を検討するために測定した代謝物は 297 代謝物であったため単純な比較はできないが、いくつかの代謝物に関しては同様の傾向が認められた。例えば、ステロイドホルモン類に関して、男性ホルモンは男性において高いレベルを示した。また、TCA 回路に属する代謝物に関しては、男性において年齢差を示し、老齢で高いレベルを示していた。

一方、日本人における性差・年齢差と白人における性差・年齢差が異なった代謝物も存在した。例えば、白人においては脂肪酸（ミリストレイン酸・リノレン酸等）に女性において年齢差が認められたが、日本人においては、年齢差は認められなかった。その原因としては、人種的な影響と、食習慣の影響が主に考えられる。

脂質代謝物に関しては、グルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質のうち、日本人で有意な性差を示した代謝物の割合は、若年及び老年で、それぞれ 7.8% (10/128 種) 及び 15.6% (20/128 種) であり、有意差を示した代謝物の変動倍率は、0.75 倍～1.64 倍の範囲にあった。検出された代謝物が一部異なるため、白人と日本人間の厳密な比較は難しいが、平成 24 年度に実施した白人において性差を示した代謝物の割合は、若年及び老年でそれぞれ 10.9% (14/128 種) 及び 35.9% (46/128 種) であり、変動倍率は、0.60 倍～1.89 倍の範囲にあったことから、日本人の血漿中のグルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質代謝物の性差は、白人より小さく、交絡因子としての影響は小さいことが示唆された。また、若年において性差を示した代謝物は、白人と日本人で全く一致しなかったが、老年で性差を示した代謝物は、SM 分子種や不飽和度の高い PE, PC 分子種で一部、一致が認められた。

また日本人で有意な年齢差を示した代謝物の割合は、男性及び女性で、それぞれ 31.3% (40/128

種)及び24.2% (31/128種)であり、有意差を示した代謝物の変動倍率は、0.56倍~2.28倍の範囲にあった。平成24年度に実施した白人において性差を示した代謝物の割合は、若年及び老年でそれぞれ0.8% (1/128種)及び25.8% (33/128種)であり、変動倍率は、2.04倍(老年で増加する代謝物のみ)の範囲にあったことから、日本人の血漿中のグルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質代謝物の年齢差は、白人より大きいことが示唆された。男性及び女性で年齢差を示した代謝物は、一部、日本人と白人で一致していたが、ePC分子種の老年での減少は、白人では認められず、日本人に特有であった。

また、血漿中の酸化脂肪酸代謝物についても、そのレベルが性差・年齢差を示す代謝物が見出されたが、これらは、日本人と白人でほとんど一致しなかった。

以上より、日本人においても、一部の血中代謝物レベルは、性差・年齢差を示すことが明らかになり、バイオマーカー探索・検証の際に注意を要することが示唆された。

3-2) 内在性代謝物の人種差

人種差の比較において、日本人とそれ以外の人種における差異が顕著であった。

イオン性代謝物に関しては、日本人と白人または黒人間で、有意に差異のあるイオン性代謝物は、50%近く認められた。近年では、国際共同治験なども積極的に行われるようになってきている。そのような際には、これらの代謝物に関して、バイオマーカー探索の差異の交絡因子となることが考えられた。日本人とそれ以外の人種において、アシルカルニチン類及びモノアシルグリセロール類に顕著な人種差が認められた。その差の意義は不明であるが、カルニチンは脂肪酸のβ酸化に関与し、モノアシルグリセロールは脂肪蓄積・分解等に関与している。また、グルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質のうち、日本人と白人または黒人間で有意な性差を示した代謝物の割合は、日本人と白人の間では35.2% (45/128種)、日本人と黒人の間では46.9% (60/128種)であり、有意差を示した代謝物の変動倍率は、0.27倍~2.58倍の範囲にあった。一方、白人と黒人間の人種差はほとんど認められなかった。

過去の文献では、性別、年齢をコントロールしていないが、白人、黒人、及びヒスパニックを比較し、イオン性代謝物レベルには人種差があまりないことが報告されている。当該文献ではアメリカで同時に検体を集めており、これらの人種においてはあまり食習慣に差異が無かったと考えられる。実際に食習慣が脂質代謝に影響を与えるこ

とも示唆されている。したがって、更なる検討が必要であるが、今回認められた日本人とそれ以外の人種における人種差は、遺伝的背景の違いよりも、むしろ食習慣、腸内細菌叢等に大きく影響をうけると考えられ、本邦のバイオマーカー探索には、日本人の内在性代謝物濃度に関する基礎データが必要であることが強く示唆された。また、海外の論文等で報告された代謝物バイオマーカーを日本人で検証する際には、基準となる健常人のレベルが異なる場合があることを念頭に置くべきと考えられた。

3-3) 薬物性肝障害のバイオマーカー候補

すでに、薬物性肝障害に関して血清中ALTとγ-グルタミルシトルリンのレベルの組み合わせが、他の肝臓疾患と薬物性肝障害を判別できる疾患バイオマーカーであることが報告されている(J Hepatol 2011, 55: 896-905.) また、アセトアミノフェン(APAP)多量服用による肝障害発症小児患者では、健常小児やAPAPを治療投与量範囲内で服用して肝障害非発症小児患者と比較して、血清中のアシルカルニチンの濃度が高いことも報告されている(Biomark Med 2014, 8(2), 147-159.)。

今回、薬物性肝障害の発症期及び回復期において差異が認められたイオン性代謝物は、49代謝物認められた。これらの代謝物のうち、4種は性・年齢・人種いずれにおいても影響を受けにくい代謝物であった。したがって、これら4代謝物は薬物性肝障害の有用なバイオマーカー候補となることが示唆された。一方、これまでに肝障害マーカー候補として提唱されている、ガンマグルタミルシトルリン、3-水酸化ブチレート及びピルビン酸は、性・年齢・人種いずれかの影響を受けていた。したがって、これらのマーカー候補の実用化には、影響する試料背景について注意する必要がある。

脂質代謝物に関しては、肝細胞障害型の薬物性肝障害の急性期と回復期を判別可能なバイオマーカー候補を探索したところ、7種のグルセロリン脂質・スフィンゴ脂質と、6種の酸化脂肪酸が見出された。これらの13種には、日本人健常人で性差を認めた代謝物が2種、年齢差を認めた代謝物が1種、人種差を認めた代謝物が9種含まれていた。一方で、今回のバイオマーカー探索のデザインでは、急性期と回復期の血液は原則として同一人物から採取しており、欠損値を考慮した場合も急性期と回復期の2群間では患者の性別及び年齢に有意な偏りはなかった。6種の酸化脂肪酸代謝物は急性期でレベルが高く、いずれも炎症反応に進展に関与していることが示唆される代謝

物であった。

E. 結論

複雑な臨床情報をデータベースとしてサーバに格納することで、高品質かつ均一な情報管理と効率化を目的とした医療情報管理基盤を確立できた。この事は、今後の新規バイオマーカー探索研究の効率と発展に大きく寄与すると考えられる。

試料採取要件の違いが、尿中蛋白質及び血中代謝物レベルに与える影響を明らかにするため、食事制限下で収集した、性別・年齢の異なる日本人試料を対象に解析を行った。尿プロテオーム解析で、性差、年齢差を示す蛋白質を同定すると共に、個人差の要因となる蛋白質を網羅的に同定した。また、大多数の代謝物は、性別・年齢により、そのレベルが大きく変化することはなかったが、一部の代謝物は、若年・老年間で2倍以上のレベル差が認められ、バイオマーカー探索及び検証時において、選定した分子が、これらに該当する場合には、試料選択において注意を要することが示唆された。また、性差・年齢差を示す代謝物は、日本人と白人で一致する分子種も認められたが、一部、日本人特有の分子種も認められた。さらに、日本人、白人、黒人の若年男性の人種差を解析した結果、日本人と黒人または白人の間では、代謝物プロファイルが大きく異なることが示され、日本人のバイオマーカー探索には、日本人の基礎データの蓄積が重要と考えられた

薬物性肝障害発症時に特異的な発現を示す蛋白質・代謝物を探索し、いくつかの候補物質を得た。蛋白質では、炎症のマーカーとして知られるLeucine-rich α 2-glycoproteinの変動が認められた。代謝物では、49種のイオン性代謝物中4種が、性・年齢・人種の影響を受けない候補分子として選定された。また、13種の脂質代謝物中4種が、同様に性・年齢・人種の影響を受けない肝細胞障害型薬物性肝障害のバイオマーカー候補であることを見出した。

3年間の研究結果から、臨床試験においてバイオマーカーを探索する際には、性、年齢、人種、凍結融解の回数等の試料背景が交絡因子となりうることを示唆された。バイオマーカーの探索・検証における評価要件として、各因子の影響を明確に示すことが必要である。さらに本研究では、各分子毎にその影響の大きさを明らかにしたことから、今後、論文発表後に国立衛研のホームページ上に公開してバイオマーカー探索時に広く利用頂く予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表：

1. 論文発表

- 1) Saito K, Maekawa K, Ishikawa M, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Nakatsu N, Yamada H, Saito Y.: Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. *Toxicol Sci.*, 2014; 141: 377-386.
- 2) Saito K, Ishikawa M, Murayama M, Urata M, Senoo Y, Toyoshima K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y. Effects of sex, age, and fasting conditions on plasma lipidomic profiles of fasted sprague-dawley rats. *PLoS One.*, 2014; 9: e112266.
- 3) 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*, 2014; 10: 402-413.
- 4) 前川京子, 斎藤嘉朗, 薬物性肝障害の遺伝的素因, 別冊「医学のあゆみ」内科領域の薬剤性障害 肝・肺を中心に 2014年11月: 11-18.
- 5) Nishikawa K, Iwaya K, Kinoshita M, Fujiwara Y, Akao M, Sonoda M, Thirupathi S, Suzuki T, Hiroi S, Seki S, Sakamoto T. Resveratrol increases CD68+ Kupffer cells co-localized with adipose differentiation-related protein (ADFP) and ameliorates high-fat-diet-induced fatty liver in mice. *Mol Nutr Food Res.* in press
- 6) 鈴木孝昌 コンパニオン診断薬の現状と課題 「最先端バイオマーカーを用いた診断薬/診断装置開発と薬事対応」 p271-275 (技術情報協会) 2015.

2. 学会発表

- 1) Suresh T., Maekawa K., Saito Y., Sato Y., Suzuki T. Individual variations in the human urinary proteome in relation to rat. The 3rd International Conference on Personalized Medicine (2014.6、チェコ・プラハ市)
- 2) Maekawa K., Saito K., Pappan K.L., Ishikawa M., Urata M., Tajima Y., Inoue M.,

Kumagai Y., Saito Y.: IMPACT OF GENDER, AGE AND FED/FASTED STATE OF RATS ON THEIR SERUM HYDROPHILIC METABOLITES 29th JSSX/19th NA-ISSX meeting (2014.10、米国・サンフランシスコ市)

なし

3. その他

なし

- 3) Saito Y., Saito K., Ishikawa M., Urata M., Tajima Y., Inoue M., Kumagai Y., Pappan K.L., Maekawa K.: Metabolomic profiles in rat blood vary between genders, ages and fasting conditions, and their qualitative comparisons with human samples. 2014 AAPS annual meeting (2014.11、米国・サンディエゴ市)
- 4) Maekawa K., Saito K., Ishikawa M., Minamino N., Kumagai Y., Saito Y.: Metabolomic biomarker exploration highlights issues of species specificity. KSCPT-JSCPT Joint Symposium (2014.11、韓国・プサン市)
- 5) 斎藤嘉朗, 齊藤公亮, 児玉進, 熊谷雄治, 前川京子 ヒト試料を用いたバイオマーカー研究のためのレギュラトリーサイエンス。第35回日本臨床薬理学会学術総会 (2014.12、愛媛県松山市)
- 6) スレッシュ テイルパッティ、斎藤嘉朗、本間正充、佐藤陽治、鈴木孝昌 変異原暴露モニタリング手法としてのタンパクアダクトミクス日本環境変異原学会第43回大会 (2014.12、東京)
- 7) Suzuki T., Suresh T. Protein adductome analysis for the human exposure monitoring to mutagens. The 4th Asian Conference on Environmental Mutagens (2014.12、インド・コルカタ市)
- 8) Saito Y., Maekawa K., Saito K.: Safety Biomarker Exploration by Metabolomics. 3rd Annual Seoul-Kitasato Joint Symposium (2015.1、東京)
- 9) 鈴木孝昌 医薬品開発においてヒト内在性物質を測定する際の定量分析法に関する留意点(案)の概要:規制の重要性と今後の課題 第6回JBFシンポジウム (2015.2、東京)
- 10) 斎藤嘉朗, 齊藤公亮, 前川京子 Metabolomicsの安全性バイオマーカー研究への応用。第21回HAB研究機構学術年会 (2015.5、東京)

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

表1 データベース入力項目

調査項目	検査・観察・評価項目
患者背景	性別, 年齢, 体温, 血圧, 身長, 体重, 飲酒歴, 喫煙歴, 常用薬, 現病歴, 既往歴, 合併症, 薬剤性肝障害の既往有無, アレルギー体質, 海外渡航歴, 薬剤性肝障害家族歴の有無
臨床症状	発熱, 発疹, 掻痒感, 関節痛, 全身倦怠感, 黄疸, 嘔気, 嘔吐, 腹痛, 食欲不振
薬歴	
薬剤性肝障害診断関連項目	診断日時, 原因薬物名, 原因薬物投与開始日, 原因薬物投与中止日, DDWJスコア, RUCAMスコア
検査関連項目	最終食事時間, 採血時間, 採尿時間, 血液:凍結保存開始時間, 尿:凍結保存開始時間, ALT or ALP上昇確認日, 症状出現日時
血液検査	血液一般, 白血球分画, 血液生化学, IgM HA抗体, HBs抗体, HCV抗原, IgM CMV抗体, IgM EB VCA抗体, IgG, IgM, ANA, AMA, DLST
尿検査	定性(糖, 蛋白, ウロビリノーゲン, ケトン体, 潜血), 尿沈渣

表2 日本人被験者情報

検体群	若年男性	老年男性	若年女性	老年女性
検体数	15	15	15	15
年齢(中央値) [検体値・幅]	32 [25-35]	60 [55-64]	32 [25-35]	60 [55-65]
BMI(中央値) [検体値・幅]	21.98 [18.53-23.52]	23.11 [20.21-25.15]	20.30 [18.64-24.98]	21.27 [18.36-24.68]

表3 人種差の比較に用いた被験者情報

検体群	日本人	白人	黒人
検体数	15	15	15
年齢(中央値) [検体値・幅]	32 [25-35]	29 [25-33]	29 [26-33]
BMI(中央値) [検体値・幅]	21.98 [18.53-23.52]	26.15 [18.01-36.64]	22.24 [17.77-34.03]

表4 日本人のコントロールサンプルのばらつきの要因となるペプチドとその同定スコア

	Prot Description Right side PCA	Score	Accession		Prot Description - Left side PCA	Score	Accession
1368	Alpha-1B-glycoprotein	68.41	A1BG_HUMAN	2025	Amyloid beta A4 protein	48.5	A4_HUMAN
4046	Alpha-amylase 1	86.35	AMY1_HUMAN	12159	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan	51.98	PGBM_HUMAN
1094	Alpha-amylase 2B	57.22	AMY2B_HUMAN	6813	Bone morphogenetic protein 3B	41.54	BMP3B_HUMAN
15586	Alpha-N-acetylglucosaminidase	54.66	ANAG_HUMAN	4324	GD320 antigen	53.84	GD320_HUMAN
1616	Apolipoprotein D	108.02	APOD_HUMAN	571	CD44 antigen	42.46	CD44_HUMAN
4092	Biotinidase	94.95	BTD_HUMAN	149	CD59 glycoprotein	83.94	CD59_HUMAN
9042	Complement C1r subcomponent-like protein	40.23	C1RL_HUMAN	6153	Collagen alpha-1(I) chain	75	CO1A1_HUMAN
11384	Cubilin	50.12	CUBN_HUMAN	17495	Collagen alpha-1(XXVIII) chain	56.67	COSA1_HUMAN
8912	Endonuclease domain-containing 1 protein	43.37	ENDD1_HUMAN	7602	Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor 3	63.2	DNER_HUMAN
5205	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	64.62	SOXE_HUMAN	1779	Ecto-ADP-ribosyltransferase 3	53.13	NAR3_HUMAN
1173	Fibrinogen alpha chain	50.88	FIBA_HUMAN	180	Extracellular sulfatase Sulf-2	85.3	SULF2_HUMAN
5060	Galectin-3-binding protein	47.51	LG3BP_HUMAN	6359	IGF-like family receptor 1	46.5	IGFR1_HUMAN
1116	Hemopexin	51.37	HEMO_HUMAN	4033	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeats	48.95	ISLR_HUMAN
303	Ig gamma-4 chain C region	71.4	IGHG4_HUMAN	9131	Integrin beta-1	49.65	ITB1_HUMAN
186	Ig kappa chain C region	66.85	IGKC_HUMAN	3725	Kunitz-type protease inhibitor 2	42	SPIT2_HUMAN
4480	Ig kappa chain V-I region Roy	41.95	KV116_HUMAN	2468	Membrane protein FAM174A	45.04	F174A_HUMAN
7390	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	40.04	KV309_HUMAN	216	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1	69.04	P3IP1_HUMAN
3552	Ig kappa chain V-III region WOL	50.22	KV305_HUMAN	8895	Plasma protease C1 inhibitor	57.84	ICI_HUMAN
625	Ig lambda chain V-III region LOI	46.42	LV302_HUMAN	10320	Platelet-derived growth factor subunit B	63.46	PDGFB_HUMAN
172	Ig lambda-2 chain C regions	86.08	LAC2_HUMAN	12762	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	52.61	LRP1_HUMAN
10615	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	58.45	ITIH4_HUMAN	8801	Prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	53.37	PE2R3_HUMAN
6326	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	48.77	A2GL_HUMAN	11811	Protein HEG homolog 1	52.28	HEG1_HUMAN
39577	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1	46.31	LRP2_HUMAN	1186	Protein NOV homolog	111.46	NOV_HUMAN
3934	Monocyte differentiation antigen CD14	51.21	CD14_HUMAN	6919	Protein YIPF3	58.67	YIPF3_HUMAN
21072	Neogenin	47.4	NEO1_HUMAN	916	Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein	40.38	SRCH_HUMAN
6864	Neuronal growth regulator 1	58.58	NEGR1_HUMAN	4161	Sodium/nucleoside cotransporter 1	65.71	S28A1_HUMAN
1580	Pancreatic alpha-amylase	88.92	AMYP_HUMAN	1102	Syndecan-1	81.24	SDC1_HUMAN
22566	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	41.02	PTPRG_HUMAN	4109	Tenascin-X	80.07	TENX_HUMAN
22079	Sialate O-acetyltransferase	44.91	SIAE_HUMAN	1273	Thrombospondin-1	96.9	TSP1_HUMAN
9035	Sulfhydryl oxidase 1	46.02	QSOX1_HUMAN	1177	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1	83.76	TNR16_HUMAN
681	Vesicular integral-membrane protein VIP36	80.83	LMAN2_HUMAN	5437	Tumor-associated calcium signal transducer 2	63.93	TACD2_HUMAN
				289	WAP four-disulfide core domain protein 2	89.2	WFDC2_HUMAN
				8627	Xylosyltransferase 1	50.04	XYLT1_HUMAN

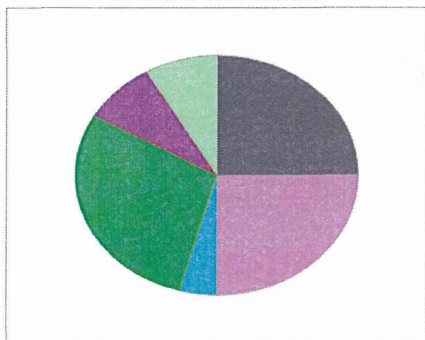
表5 白人コントロールのばらつきの要因となるペプチドとその同定スコア

	Prot Description - Right side PCA	Score	Accession		Prot Description - Left side PCA	Score	Accession
7861	Alpha-1-antichymotrypsin	62.06	AACT_HUMAN	8084	Amyloid beta A4 protein	72.93	A4_HUMAN
9755	Alpha-1B-glycoprotein	116.16	A1BG_HUMAN	14097	Asialoglycoprotein receptor 1	79.5	ASGR1_HUMAN
16254	Alpha-N-acetylglucosaminidase	53.6	ANAG_HUMAN	4051	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan	79.67	PGBM_HUMAN
8290	Biotinidase	94.15	BTD_HUMAN	11803	Basigin	52.94	BASI_HUMAN
10024	Complement C1r subcomponent-like protein	54.41	C1RL_HUMAN	20304	Cadherin-2	43.14	CADH2_HUMAN
6496	Corticosteroid-binding globulin	75.73	CBG_HUMAN	7551	CD209 antigen	59.53	CD209_HUMAN
6001	Endonuclease domain-containing 1 protein	59.78	ENDD1_HUMAN	65	CD59 glycoprotein	61.29	CD59_HUMAN
7819	Gamma-glutamyltranspeptidase 2	61.13	GGT2_HUMAN	10352	CD99 antigen-like protein 2	68.88	C99L2_HUMAN
7704	Hemopexin	71.29	HEMO_HUMAN	4260	Collagen alpha-1(I) chain	72.45	CO1A1_HUMAN
1235	Ig alpha-1 chain C region	99.2	IGHA1_HUMAN	1387	Complement decay-accelerating factor	67.86	DAF_HUMAN
803	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	67.47	KV309_HUMAN	10156	Desmoglein-1	82.21	DSG1_HUMAN
2731	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	69.15	ITIH4_HUMAN	2552	Dihydrolypopyllisine-residue succinyltransferase component 1	62	ODO2_HUMAN
360	Kininogen-1	60.13	KNG1_HUMAN	2359	Di-N-acetylchitinase	42.43	DIAC_HUMAN
2792	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	58.84	A2GL_HUMAN	575	Endosialin	49.96	CD248_HUMAN
7357	Plasma protease C1 inhibitor	108.1	ICI_HUMAN	117	Extracellular sulfatase Sulf-2	71.82	SULF2_HUMAN
2569	Polymeric immunoglobulin receptor	66.99	PIGR_HUMAN	7598	Fibroblast growth factor receptor 1	74.79	FGFR1_HUMAN
4297	Pro-epidermal growth factor	43.17	EGF_HUMAN	24890	Fibronectin	112.91	FN1_HUMAN
1521	Serotransferrin	100.48	TRFE_HUMAN	15569	Homerin	74.97	HORN_HUMAN
4441	Transferrin	72.28	TTFY_HUMAN	27629	Junction plakoglobin	49.88	PLAK_HUMAN
3621	Vasorin	84.63	VASN_HUMAN	1959	Membrane protein FAM174A	50.89	F174A_HUMAN
834	Vesicular integral-membrane protein VIP36	60.43	LMAN2_HUMAN	22770	Multimerin-2	56.91	MMRN2_HUMAN
				4339	Neurosecretory protein VGF	61.87	VGF_HUMAN
				1322	Peptidase inhibitor 15	51.18	PI15_HUMAN
				44	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1	115.93	P3IP1_HUMAN
				21693	Prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	58.78	PE2R3_HUMAN
				1704	Protein shisa-5	69.38	SHSA5_HUMAN
				2044	Secretogranin-1	94.85	SCG1_HUMAN
				9049	Sodium/nucleoside cotransporter 1	58.24	S28A1_HUMAN
				16909	Sulfhydryl oxidase 1	41.62	QSOX1_HUMAN
				1556	Syndecan-1	63.94	SDC1_HUMAN
				11789	Tenascin-X	74.88	TENX_HUMAN
				3068	Thrombospondin-1	110.26	TSP1_HUMAN
				26043	Thrombospondin-4	59.71	TSP4_HUMAN
				1882	Trefoil factor 3	48.86	TFF3_HUMAN
				2537	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1	76.3	TNR14_HUMAN
				12541	Tumor-associated calcium signal transducer 2	63.56	TACD2_HUMAN

表6 白人と日本人で共通してばらつきの要因となったペプチドとその Molecular Functions

Molecular Function			Molecular Function		
Prot Description - Right Side PCA	Score	Accession	Prot Description - Left Side PCA	Score	Accession
1368 Alpha-1B-glycoprotein	68.41	A1BG_HUMAN	2025 Amyloid beta A4 protein	48.5	A4_HUMAN
15586 Alpha-N-acetylglucosaminidase	54.66	ANAG_HUMAN	12159 Basement membrane-specific heparan sulfate proteogly	51.98	PGBM_HUMAN
4092 Biotinidase	94.95	BTD_HUMAN	149 CD59 glycoprotein	83.94	CD59_HUMAN
9042 Complement C1r subcomponent-like protein	40.23	C1RL_HUMAN	6153 Collagen alpha-1(I) chain	75	CO1A1_HUMAN
8912 Endonuclease domain-containing 1 protein	43.37	ENDD1_HUMAN	180 Extracellular sulfatase Sulf-2	85.3	SULF2_HUMAN
1116 Hemopexin	51.37	HEMO_HUMAN	2468 Membrane protein FAM174A	45.04	F174A_HUMAN
7390 Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	40.04	KV309_HUMAN	216 Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1	69.04	P3IP1_HUMAN
10615 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	58.45	ITI4_HUMAN	8801 Prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	53.37	PE2R3_HUMAN
6326 Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	48.77	A2GL_HUMAN	4161 Sodium/nucleoside cotransporter 1	65.71	S28A1_HUMAN
681 Vesicular integral-membrane protein VIP36	80.83	LMAN2_HUMAN	1102 Syndecan-1	81.24	SDC1_HUMAN
			4109 Tenascin-X	80.07	TENX_HUMAN
			1273 Thrombospondin-1	96.9	TS1P1_HUMAN
			1177 Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	83.76	TNFR16_HUMAN
			5437 Tumor-associated calcium signal transducer 2	63.93	TACD2_HUMAN

GO Molecular Function
Total # Genes: 24 Total # function hits: 24



- binding (GO:0005488)
- catalytic activity (GO:0003824)
- receptor activity (GO:0004872)
- structural molecule activity (GO:0005198)
- transporter activity (GO:0005215)
- enzyme regulator activity (GO:0030234)
- receptor activity (GO:0004872)

表7 グリセロリン脂質・スフィンゴ脂質のうち、性差・年齢差・人種差を示した代謝物の内訳とその増減

Statistical Comparisons						
Mann whitney t -Test	Gender Comparison: 14h fast, AM collection		Age comparison: 14h fast, AM collection		Ethnic comparison: 14h fast, AM collection	
	JFY JMY	JFO JMO	JMO JMY	JFO JFY	CMY JMY	AMY JMY
Total biochemicals <i>p</i> ≤ 0.05	10 (7.8%)	20 (15.6%)	40 (31.3%)	31 (24.2%)	45 (35.2%)	60 (46.9%)
Biochemicals (Increase Decrease)	10 0 (7.8%) (0%)	18 2 (14%) (1.6%)	37 3 (29%) (2%)	24 7 (19%) (5%)	15 30 (12%) (23%)	39 21 (30%) (16%)
LPC (6 in total)	0 0	0 2	1 0	2 0	1 1	4 1
PC (35 in total)	3 0	3 0	16 0	6 0	4 6	9 5
ePC (19 in total)	2 0	0 0	1 3	1 6	3 5	10 2
PE (7 in total)	1 0	3 0	1 0	3 0	2 2	4 2
ePE (16 in total)	0 0	1 0	5 0	5 0	3 6	9 5
PI (9 in total)	3 0	0 0	8 0	1 0	2 2	2 1
SM (26 in total)	1 0	11 0	1 0	6 0	0 6	1 5
Cer (4 in total)	0 0	0 0	4 0	0 0	0 1	0 0
CB (6 in total)	0 0	0 0	0 0	0 1	0 1	0 0
Common Biochemicals (Increase Decrease)	1 0 (0.8%) (0%)		13 3 (10%) (2%)		15 19 (12%) (15%)	

図1 データベースの概念図

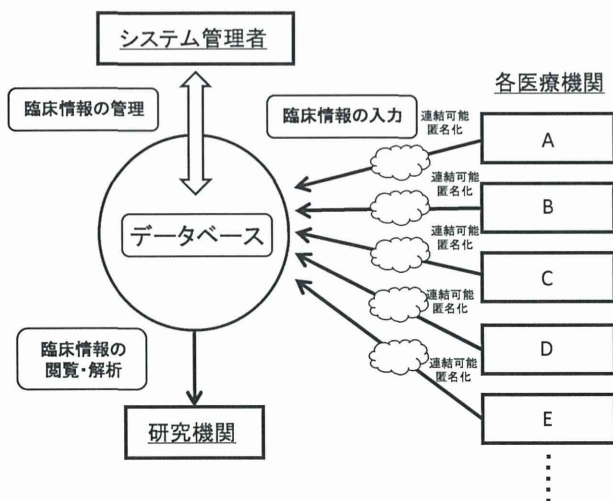


図2 同定された蛋白質の発現情報に基づく全サンプルの主成分分析

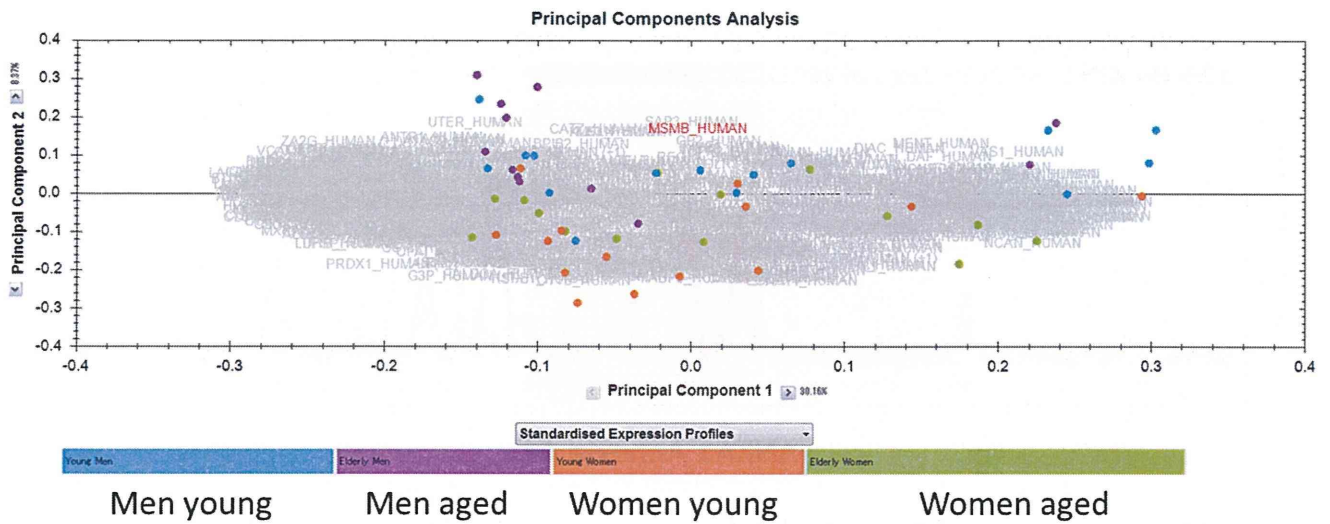


図3 主成分分析における肥満度によるクラス分けの影響

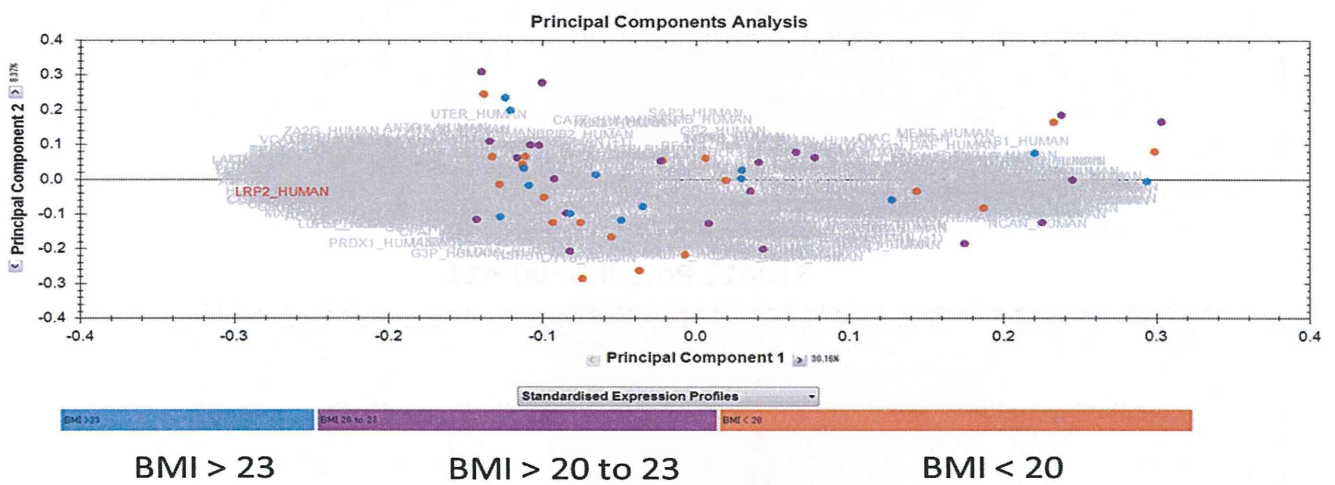


図4 男性特異的な発現を示す蛋白質の例

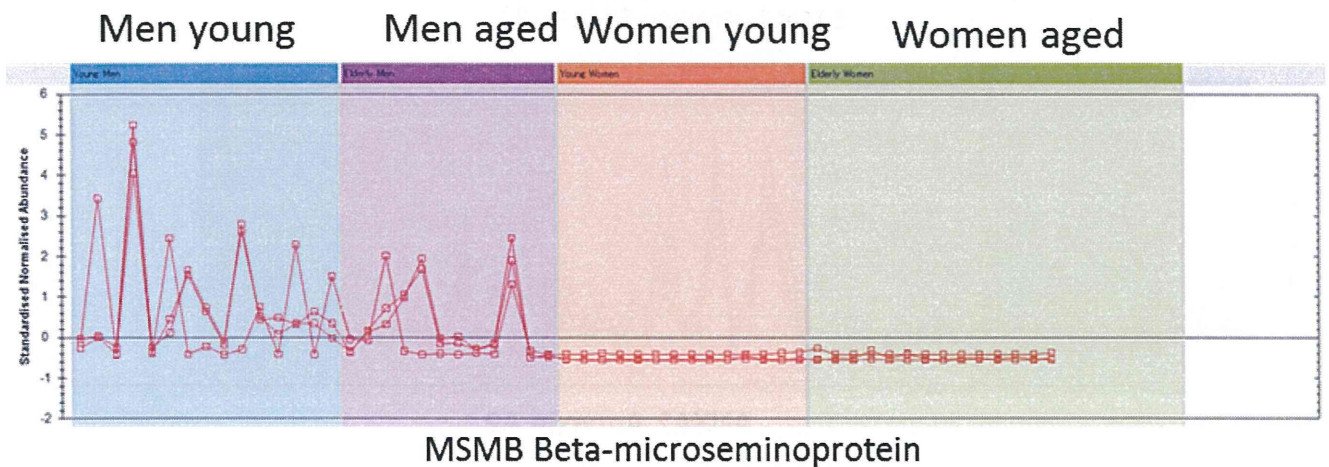


図5 女性特異的な発現を示す蛋白質の例

