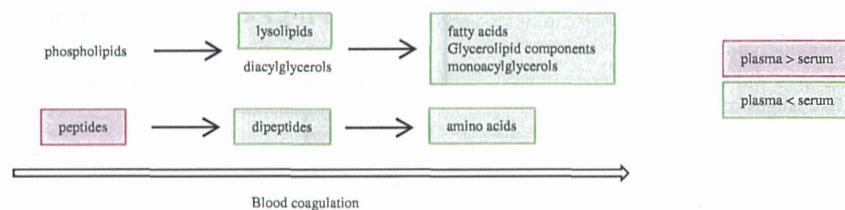
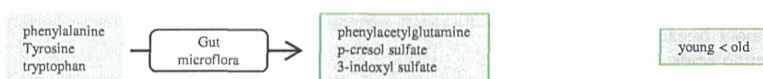


Fig. 6 Highlighted pathways in this study. Highlighted pathways contain specific metabolites showing differences between the subject groups

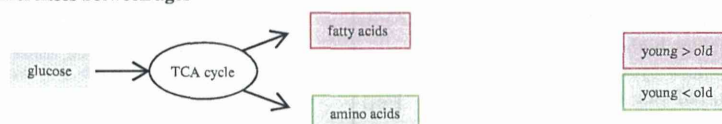
A. Difference between plasma and serum



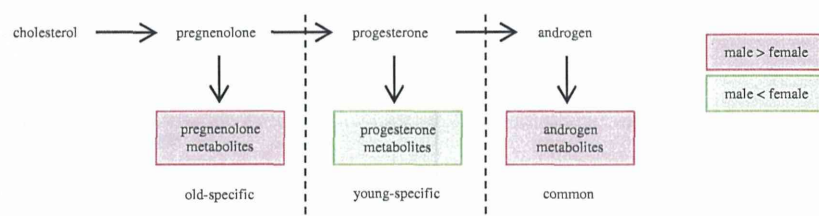
B. Age-related differences



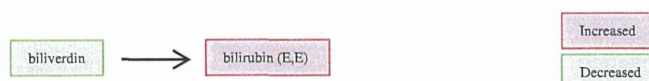
C. female-related differences between ages



D. Common and age-specific differences between sexes



E. Change by numbers of freeze-thaw cycles



As for the changes by freeze–thaw cycles, heme degradation was the only pathway common between plasma and serum (Fig. 6e). Biliverdin and bilirubin were decreased and increased, respectively, by repeated freeze–thaw cycles. While it remains unclear as to whether biliverdin reductase is released into plasma or serum, the enzyme may be activated during freeze–thaw cycles and then catalyze biliverdin to bilirubin. On the other hand, peptides and several types of lipids were increased by more freeze–thaw cycles only in plasma, possibly due to the breakdown of much larger proteins and/or lipids by phospholipases and/or proteases, which may be removed from serum during the coagulation process.

Metabolites whose levels are not highly sensitive to differences in age or gender may have potential as biomarkers. In addition, biomarkers that are easy to detect and show low inter-individual variations might have even greater utility. In this study, we identified a subset of biochemicals sharing the following three characteristics

(Supplemental Fig. 1a): ease of detection (average filled value, more than 80 %), low gender- or age-associated differences (less than 50 % changes and without statistically significant level differences), and low inter-individual variations (RSD, 0.5 or less). Among 297 metabolites detected in this study, 124 passed all three criteria in plasma and/or serum (Supplemental Fig. 1b; Supplemental Table 7). Of these 124 metabolites, 103 were shared by both plasma and serum; therefore, we suggest that these 103 metabolites are well-controlled in healthy adults and may be primary candidates for biomarkers. Alternatively, metabolites whose levels are drastically modulated by diseases or drugs could overcome the limitations of these background variations and serve as biomarkers. In the present study, Caucasians who had an overnight fast were employed as experimental subjects. It has been reported that nutrients and ethnicity also affect the metabolic profiles. For example, it was suggested that fruits and vegetables intake are strongly associated with the levels of

glycerophospholipids and sphingomyelins (Menni et al. 2013). Comparison of northern and southern Chinese populations using an NMR spectroscopy-based metabolome-wide association approach also demonstrated different levels of several amino acids and carbohydrates (Yap et al. 2010). Nevertheless, the differences associated with nutrients and/or ethnicity should also be taken into consideration for the exploration of biomarkers.

5 Concluding remarks

The discovery of biomarkers capable of forecasting disease states and efficacy/toxicity of therapeutic drugs is clinically important. While metabolomics has been applied to many research studies to identify such biomarkers, fundamental information regarding the metabolite profiles of different blood matrices and subject backgrounds is still limited. The findings of this study clearly suggest that plasma and serum are both useful matrices for exploring biomarkers among low-molecular-weight biochemicals and that the metabolites were more stable in serum than plasma. In addition, our results also show that several metabolites were scarcely detectable, had large age- and gender-associated differences, and possessed high RSD values, all of which are characteristics that should be taken into consideration when selecting biomarker candidates. Taken together, our present study provides useful fundamental information for exploring and selecting biomarkers in future clinical studies and may also help establish the regulatory standards for these studies.

Acknowledgments This work was supported by the Health Labour Sciences Research Grants (Grant number 028) from the Ministry of Health, Labour and Welfare, and by the Advanced Research for Products Mining Program (Grant number 10–45) from the National Institute of Biomedical Innovation of Japan.

References

- Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., et al. (2002). Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*, 48737–48744.
- Bjornerem, A., Straume, B., Midtby, M., et al. (2004). Endogenous sex hormones in relation to age, sex, lifestyle factors, and chronic diseases in a general population: the tromso study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*, 6039–6047.
- Bourdonck, K. J., Mitchell, M. W., Nemet, L., et al. (2009). Discovery of metabolomics biomarkers for early detection of nephrotoxicity. *Toxicologic Pathology*, *37*, 280–292.
- Burger, H. G., Dudley, E. C., & Hopper, J. L. (1999). Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *84*, 4025–4030.
- DeHaven, C. D., Evans, A. M., Dai, H., & Lawton, K. A. (2010). Organization of GC/MS and LC/MS metabolomics data into chemical libraries. *Journal of Cheminformatics*, *2*, 9.
- Endo, T., Henmi, H., Goto, T., et al. (1998). Effects of estradiol and an aromatase inhibitor on progesterone production in human cultured luteal cells. *Gynecological Endocrinology*, *12*, 29–34.
- Evans, A. M., DeHaven, C. D., Barrett, T., Mitchell, M., & Milgram, E. (2009). Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Analytical Chemistry*, *81*, 6656–6667.
- Gowda, G. A., Zhang, S., Gu, H., Asiago, V., Shanaiah, N., & Raftery, D. (2008). Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *8*, 617–633.
- He, Y., Yu, Z., Giegling, I., et al. (2012). Schizophrenia shows a unique metabolomics signature in plasma. *Translational Psychiatry*, *2*, e149.
- Hollywood, K., Brison, D. R., & Goodacre, R. (2006). Metabolomics: Current technologies and future trends. *Proteomics*, *6*, 4716–4723.
- Lawton, K. A., Berger, A., Mitchell, M., et al. (2008). Analysis of the adult human plasma metabolome. *Pharmacogenomics*, *9*, 383–397.
- Liu, L., Aa, J., Wang, G., et al. (2010). Differences in metabolite profile between blood plasma and serum. *Analytical Biochemistry*, *406*, 105–112.
- Lorenzo, M., Roncero, C., & Benito, M. (1986). The role of prolactin and progesterone in the regulation of lipogenesis in maternal and foetal rat liver in vivo and in isolated hepatocytes during the last day of gestation. *Biochemical Journal*, *239*, 135–139.
- Menni, C., Zhai, G., Macgregor, A., et al. (2013). Targeted metabolomics profiles are strongly correlated with nutritional patterns in women. *Metabolomics*, *9*, 506–514.
- Mittelstrass, K., Ried, J. S., Yu, Z., et al. (2011). Discovery of sexual dimorphisms in metabolic and genetic biomarkers. *PLoS ONE*, *7*, e1002215.
- Muller, M., Tonkelaar, I., Thijssen, J. H. H., Grobbee, D. E., & Schouw, Y. T. (2003). Endogenous sex hormones in men aged 40–80 years. *European Journal of Endocrinology*, *149*, 583–589.
- Psychogios, N., Hau, D. D., Peng, J., et al. (2011). The human serum metabolome. *PLoS ONE*, *6*, e16957.
- Smith, E. A., & Macfarlane, G. T. (1996). Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *Journal of Applied Bacteriology*, *81*, 288–302.
- Sowers, M. F., Beebe, J. L., McConnell, D., Randolph, J., & Jannausch, M. (2001). Testosterone concentrations in women aged 25–50 years: associations with lifestyle, body composition, and ovarian status. *American Journal of Epidemiology*, *153*, 256–264.
- Wedge, D. C., Allwood, J. W., Dunn, W., et al. (2011). Is serum or plasma more appropriate for intersubject comparisons in metabolomic studies? An assessment in patients with small-cell lung cancer. *Analytical Chemistry*, *83*, 6689–6697.
- Wishart, D. S. (2007). Current progress in computational metabolomics. *Briefings in Bioinformatics*, *8*, 279–293.
- Yap, I. K., Brown, I. J., Chan, Q., et al. (2010). Metabolome-wide association study identifies multiple biomarkers that discriminate north and south Chinese populations at differing risks of

- cardiovascular disease: INTERMAP study. *Journal of Proteome Research*, *9*, 6647–6654.
- Yu, Z., Kastenmüller, G., He, Y., et al. (2011). Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PLoS ONE*, *6*, e21230.
- Yu, Z., Zhai, G., Singmann, P., et al. (2012). Human serum metabolic profiles are age dependent. *Aging Cell*, *11*, 960–967.
- Zineh, I., & Huang, S. M. (2011). Biomarkers in drug development and regulation: A paradigm for clinical implementation of personalized medicine. *Biomarkers in Medicine*, *5*, 705–713.
- Zucker, M. B., & Nachmias, V. T. (1985). Platelet activation. *Arteriosclerosis*, *5*, 2–18.

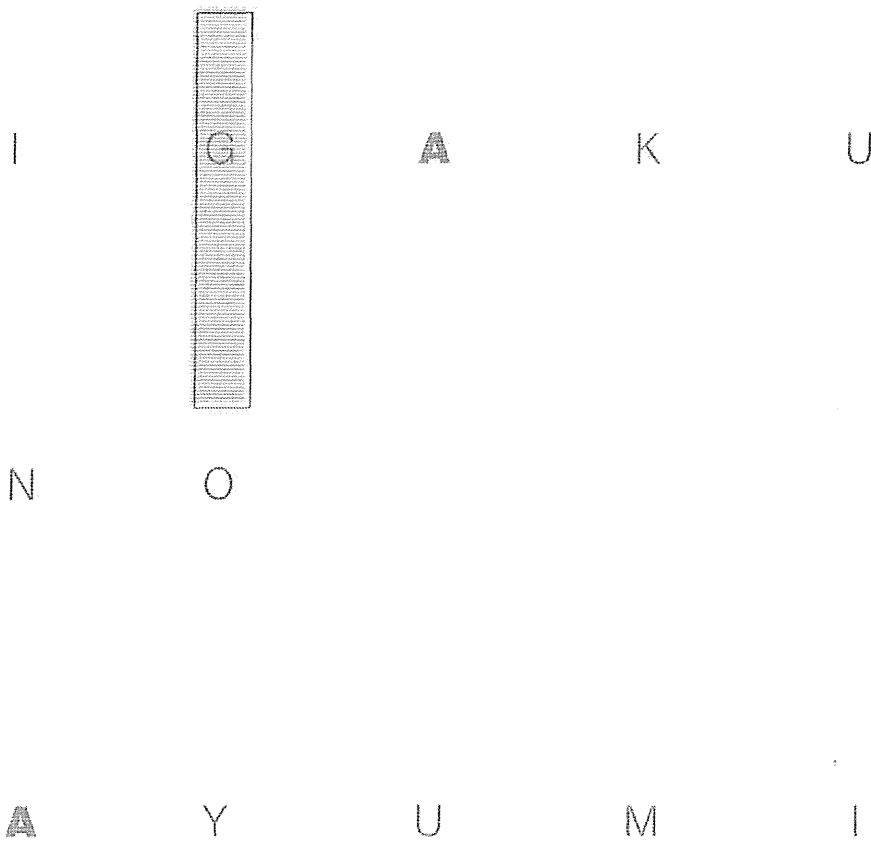
[ISSN 0039-2359 CODEN : IGAYAY]

別冊・医学のあゆみ

内科領域の薬剤性障害 ——肝・肺を中心に

編集 滝川 一 (帝京大学医学部内科主任教授)

久保惠嗣 (長野県立病院機構理事長)



医歯薬出版株式会社

【総論】

薬物性肝障害の遺伝的素因

—ゲノムバイオマーカーを用いた発症予測の可能性

Genetic risk factors of drug-induced liver injury



前川京子(写真) 斎藤嘉朗

Keiko MAEKAWA and Yoshiro SAITO

国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部

◎薬物性肝障害(DILI)はまれな副作用であり、その多くが患者の特異体質によって発症すると考えられているため、発症の予防は困難であるとされてきた。しかし、その障害が重篤であり、肝移植や死亡例が認められること、医薬品の開発段階での中止や、市場からの撤退の主要な原因であることから、近年、欧米を中心に、多施設における発症患者検体の収集、さらにリスク因子の同定のためのコンソーシアムが結成された。その結果、ヒト白血球抗原(HLA)の特定のタイプや薬物動態関連遺伝子の一塩基多型が関連性の高いリスク因子として薬剤別に同定されている。一方で、同定されたゲノムバイオマーカーによる診断では感度、特異度、陰性的中率は比較的高いものの、発症率が低いこともあり陽性的中率は低く、臨床応用には至っていない。本稿では、DILIの遺伝的素因に関して論文報告を中心に紹介しながら、発症機序に関する考察も加えていく。



Key word : 遺伝子関連解析, ヒト白血球抗原(HLA), 一塩基多型, ゲノムバイオマーカー

薬物性肝障害(drug-induced liver injury : DILI)は非常に広範な種類の医薬品によって発症する。DILIの発症機序は“中毒性”と“特異体質性”に大別され、さらにタイプBの副作用に該当する“特異体質性”のDILIは“代謝性”と“アレルギー性”に分類される(「サイドメモ1」参照)。病型には“肝細胞障害型”“胆汁うっ滞型”, および両者の中間的特徴を有する“混合型”が存在する。DILI発症の高リスク患者を薬剤投与前に予測して投薬を回避できれば、重篤な症例を未然に防ぐとともに、真に有用な薬剤の市場からの撤退を阻止する可能性が拓け、さらには発症機序の解明を通じて安全な新薬開発に貢献できる。しかし、DILIの発生率は非常に低く、均一の背景因子(病態・人種・年齢・併用薬など)をもつ患者検体を収集し、再現性のある発症リスク因子を同定することはきわめて困難である。

このため、欧米を中心に検体収集・リスク因子同定のためのコンソーシアムが結成され、多施設

での検体収集が進んでいる¹⁾。代表的なコンソーシアムとして、DILIGEN²⁾、EUDRAGENE³⁾、Spanish DILI Registry⁴⁾、DILIN⁵⁾があげられる(表1)。また、わが国でもDILIの症例収集・検体収集が進行中である⁶⁾。この結果、薬剤別にDILIの発症・進展に關与する遺伝子多型が網羅的または候補的にスクリーニングされ、新規の知見が集積されつつある。また、各種薬剤の臨床試験に参加した患者から収集されたゲノムDNAを用いたDILI発症のリスク因子の探索も行われ、後述するキシメラガトラン、ラパチニブ、ルミラコキシブで成功を取めた¹⁾。

本稿ではDILIの遺伝的素因に関して、論文報告を中心に紹介しながら発症機序に関する考察も加えていく。

ヒト白血球抗原(HLA)のタイプとDILI発症との関連

近年、“アレルギー性特異体質”のDILIの発症

表 1 薬物性肝障害検体収集ネットワーク

名称	ホームページ	主たる地域(団体)	収集開始年	文献
DILIGEN (Drug-Induced Liver Injury Genetics Network)	http://www.bsg.org.uk/research/clinical-trials-updates/idiiosyncratic-drug-induced-liver-injury-study-diligen.html	イギリス(イギリス胃腸病学会)	2004～	2)
EUDRAGENE (European collaboration to establish a case-control DNA collection for studying the genetic basis of adverse drug reactions)	https://www.eudragene.org/	ヨーロッパ (12センター)	2006～	3)
Spanish DILI Registry	http://www.spanishdili.uma.es/index.php?lang=en	スペイン (57センター)	1994～	4)
DILIN (Drug-Induced Liver Injury Network)	https://dil.in.dcri.duke.edu/	アメリカ (9センター)	2004～	5)
JDILI (Drug-Induced Liver Injury in Japan)	—	日本 (24施設)	2009～	6)

に、ヒト白血球抗原(human leukocyte antigen : HLA)の特定のタイプが関連することが多く報告されている(「サイドメモ2」参照)。HLA分子が関与する機序としては以下の2つの説があり、ハプテン仮説では薬物またはその反応性中間代謝物

がハプテンとなり、肝細胞の種々の構成成分と結合し、これが抗原提示細胞に取り込まれ、ヘルパー T 細胞に提示されるとともに、細胞障害性 T 細胞が活性化する。一方、p-i コンセプト(pharmacological interaction with immune receptors concept)では薬剤が共有結合を介さずに直接抗原

サイド
メモ
1

医薬品による副作用

医薬品はその特性上、副作用の発生を完全に回避することは難しい。ほとんどの有害事象は併用薬との相互作用や過量服用によって薬理作用の延長上で発症するか(タイプ A 副作用)、または薬理作用とは無縁であっても薬物の活性からその発生を予測できる(タイプ C 副作用)。しかしなかには、発生頻度は非常に低いが、薬物の意図した標的とはまったく別の臓器で、薬理作用からは類推できない重篤な副作用が発生することがあり、これはタイプ B の副作用と分類される。タイプ A および C の副作用は前臨床試験あるいは治験の段階から発生が予測でき、用量依存性であることから、投与量の調整、治療薬物モニタリングによる血中濃度の調整などにより、患者個人におけるリスクとベネフィットを考慮しながら投薬が可能である。一方、タイプ B の副作用は患者の特異体質によって発症すると考えられており、発生頻度が低いことから、市販後に多くの患者に投与されてからはじめて明らかになる場合が多く、これまでは発症の予防は不可能であるとされてきた。

サイド
メモ
2

ヒト白血球抗原(HLA)

ヒト白血球抗原(human leukocyte antigen : HLA)は白血球の血液型で、自己の生体内分子と、非自己(他人、動物、細菌やウイルスなど)由来の分子とを見分けて、非自己由来の分子を免疫学的に排除する反応の中心的な役割を担っている。大きくクラス I 分子とクラス II 分子に分類され、クラス I 分子は全身の細胞に発現し、細胞質でプロテアソームによって産生されたペプチド断片を CD8⁺T 細胞(細胞傷害性 T 細胞)に提示する。一方、クラス II 分子は抗原提示細胞である樹状細胞、B 細胞、マクロファージに発現しており、エンドサイトーシスによって取り込まれた外来性蛋白質由来のペプチド断片を CD4⁺T 細胞(ヘルパー T 細胞)に提示する。古典的クラス I 分子には、HLA-A、-B、-C が、クラス II 分子には HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP が存在する。抗原ペプチドが結合する各 HLA 分子のポケット部分には、遺伝子多型が非常に多く存在して個人差が大きく、さらに、この多型性の分布には人種・民族間差が認められる。

表 2 薬物性肝障害の発症と関連するHLAタイプ

原因医薬品	HLA 型/ ハプロタイプ	病型	人種 (国民)	ケース群 (保有者数/ 解析数)	コントロー ル群 (保有者数/ 解析数)	オッズ 比	文献
フルクロキサシリン	<i>B*57:01</i>	おもに胆汁うっ滞型	白人	43/51	4/64	80.6	2)
アモキシシリン/クラ バン酸	<i>DRB1*15:01- DRB5*01:01- DQB1*06:02</i>	おもに胆汁うっ滞型・ 混合型	ベルギー 人	20/35	7/60 ^{#1}	10.1	12)
	<i>DRB1*15:01</i>	おもに胆汁うっ滞型・ 混合型	スコット ランド人	14/20	27/134 ^{#1}	9.3	13)
	<i>DRB1*15:01</i>	おもに胆汁うっ滞型・ 混合型	イギリス 人	32/61	57/191 ^{#1}	2.6	14)
	<i>DQB1*06:02</i>	すべての病型	白人	ND/177 ^{#2}	ND/219 ^{#12}	4.2	15)
	<i>A*02:01</i>	すべての病型	白人	ND/177 ^{#2}	ND/219 ^{#12}	2.2	15)
キシメラガトラン	<i>DRB1*07:01 (DQA1*02)</i>	おもに肝細胞障害型	白人	35/74	22/130	4.4	17)
ラバチニブ	<i>DQA1*02:01</i>	おもに肝細胞障害型	おもに 白人	14/35 17/24	58/283 33/155	2.6 9.0	19)
チクロピジン	<i>A*33:03</i>	胆汁うっ滞型	日本人	12/14	12/85	36.5	20)
ルミラコキシブ	<i>DRB1*15:01</i>	おもに肝細胞障害型	おもに 白人	88/137	111/577	7.5	22)
	<i>DQB1*06:02</i>			85/137	111/577	6.9	
	<i>DRB5*01:01</i>			88/137	115/577	7.2	
	<i>DQA1*01:02</i>			101/137	178/577	6.3	
イソニアジド/ピラジナ ミド/リファンピシン	<i>DQB1*02:01</i>	ALT/AST の上昇, あ るいは総ビリルビン 値の上昇	インド人	25/47	84/256	2.2	25)
イソニアジド/ピラジナ ミド/リファンピシン	<i>DRB1*07:01- DQA1*02:01- DQB1*02:01</i>			15/88 ^{#3}	38/458 ^{#3}	2.3	
イソニアジド/ピラジナ ミド/リファンピシン	<i>DQA1*01:02</i>			3/47	68/251	0.2	

^{#1}: コントロールは健常人(無印は医薬品投与耐性患者), ^{#2}ND: 人数に関する詳細は不明, ^{#3}: 保有者数頻度ではなくハプロタイプ頻度.

ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ, AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ.

提示部位に作用し, これを T 細胞が認識して活性化される機序が提唱されている⁷⁾.

1. フルクロキサシリン

抗菌薬フルクロキサシリンは日本では未発売であるが, ヨーロッパを中心に, プドウ球菌感染症の治療に投与されており, とくに, 女性および高齢者において胆汁うっ滞型の DILI の発症が多数報告されている. イギリスにおいて 10 万人の新規使用者当り 8.5 人がフルクロキサシリン治療開始 1~45 日目以内に DILI を発症する推定されている⁸⁾. 北ヨーロッパ由来の白人を対象としてフルクロキサシリンによる DILI 発症患者と本剤服用の耐性患者との関連解析が行われ, *HLA-B*57:*

01 が発症のリスク因子であることが示された(表 2). なお, 23 名の別集団の発症患者を用いた再試験でも強い関連が確認されている²⁾. しかし, *HLA-B*57:01* の保有者 500 人~1,000 人に 1 人が実際に DILI を発症するとされており, バイオマーカーとしての陽性的中率が低く, *HLA-B*57:01* を用いて投与前事前診断を行う意義は確立されていない. 一方, *HLA-B*57:01* は日本人ではほとんど検出されないアレルである(アレル頻度 0.01%). なお *in vitro* 試験により, フルクロキサシリンは p-i コンセプトに従い, *HLA-B*57:01* 特異的に CD8⁺T 細胞を活性化することが証明された⁹⁾.

表 3 薬物性肝障害の発症と関連する遺伝子多型

原因医薬品	遺伝子・アレル	病型	人種(国民)	ケース群 (保有者数/ 解析数)	コントロール群 (保有者数/ 解析数)	オッズ 比	文献
フルクロキサシリン	<i>PXR</i> ・-25385C/T (rs3814055)	おもに胆汁 うっ滞型	白人	29/51 ^{#1}	18/61 ^{#1}	3.4	10)
アモキシシリン/クラ ブラン酸	<i>PTPN22</i> ・ rs2476601C/T	すべての病型	白人	ND/201 ^{#2}	ND/532 ^{#2,3}	2.1	15)
イソニアジド/リファ ンピシシ	<i>NA2</i> ・*5, *6, *7	ALT/ASTの 上昇	日本人	13/14 ^{#4}	36/63 ^{#4}	9.8	24)
イソニアジド/ピラジ ナミド/リファンピシ ン/エタンブトール	<i>TNF-α</i> ・-308G/A	ALT/ASTの 上昇	韓国人	20/77	35/229	1.9	26)
ジクロフェナク	<i>UGT2B7</i> ・-161C/T and 801C/T(*2)	すべての病型	白人 (北ヨーロッパ)	23/24	35/48	8.5	27)
ジクロフェナク	<i>ABCC2</i> ・-24C/T	すべての病型	白人 (北ヨーロッパ)	17/24	15/46	5.0	27)
ジクロフェナク	<i>IL-10</i> ・-627C/A	すべての病型	白人	14/24	16/48	2.8	28)
ジクロフェナク	<i>IL-4</i> ・-590C/T	すべての病型	白人	8/24	51/321 ^{#3}	2.6	28)
トログリタゾン	<i>GSTM1</i> および <i>GSTT1</i> 両欠損	ALT/ASTの 上昇	日本人	10/25	13/85	3.7	29)
パゾパニブ	<i>UGT1A1</i> ・*28	高ビリルビン 血症	白人	18/38 ^{#5}	ND/198 ^{#2}	13.1	30)

^{#1}: recessive model による CC 遺伝子型の保有者数, ^{#2}ND: 人数に関する詳細は不明, ^{#3}: コントロールは健康人(無印は医薬品投与耐性患者), ^{#4}: 前向き収集症例, ^{#5}: recessive model による *28/*28 遺伝子型の保有者数.
ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ, AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ.

さらに、フルクロキサシリンは pregnane X receptor(PXR)のアゴニストであること、さらに PXR のプロモーター領域に存在する多型(rs3814055;-25385C/T)が、フルクロキサシリン誘発性の DILI の発症と有意に関連があることが示された(表 3)、*HLA-B**57:01 保因者で、かつ rs3814055 が CC 遺伝子型である場合、DILI 発症のリスクが増加し、150 人に 1 人が DILI を発症するとされている¹⁰⁾。

2. アモキシシリン・クラブラン酸

アモキシシリン・クラブラン酸はペニシリン系抗生物質アモキシシリンに、β-ラクタマーゼ阻害剤のクラブラン酸を配合し、アモキシシリンの抗菌力、抗菌スペクトルを改善した経口用抗生剤であり、世界中で広く処方されている。クラブラン酸が本合剤の被疑薬と考えられており、欧米では本合剤による、主として胆汁うっ滞型の DILI はつねに上位にあり、10,000 人の処方者当たり 1 人が発症するとされているが、死亡に至る重篤な症

例は少ない¹¹⁾。ベルギーにおける本合剤による黄疸を伴った DILI に関する研究では、HLA クラス II 分子のハプロタイプ(複数の遺伝子多型の組合せ)のうち、*DRB1**15:01-*DRB5**01:01-*DQB1**06:02 の DILI 患者における頻度が、健康人における頻度より有意に高いことが明らかとなった(表 2)¹²⁾。なお、このハプロタイプの日本人における頻度は 5% 程度である。同様の結果がスコットランド人およびイギリス人を対象とした研究からも報告されている(表 2)^{13,14)}。さらに、白人患者を用いた解析において、本合剤による DILI が上記のハプロタイプを構成するアレルのうち、*DQB1**06:02 ともっとも強い相関を示すこと、加えてクラス I 分子である *HLA-A**02:01 も本合剤による DILI のリスク因子であることが確認された(表 2)¹⁵⁾。また、ゲノム網羅的解析において自己免疫疾患関連遺伝子を解析した場合、protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22(*PTPN22*)遺伝子上に存在する rs2476601

が本剤による DILI の発症と関連があることが報告されている(表 3)¹⁵⁾。

3. キシメラガトラン

経口直接トロンピン阻害薬のキシメラガトランはワーファリンに代わる新しい抗凝固剤として開発されたが、DILI の副作用のため、2006 年に開発中止となった。脳卒中や血栓・塞栓予防を目的とした 35 日以上長期使用の臨床試験において、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)が正常値上限の 3 倍以上に一過性に上昇する、主として肝細胞障害型の症例が 6~13% (平均 7.9%) で認められた¹⁶⁾。

本剤による DILI の発症に関与する遺伝的因子を見出すため、後ろ向きの薬理遺伝学的患者対照研究が開始され、白人の発症患者と耐性患者による HLA アレルの解析により *DRB1*07:01*、および本 *DRB1* アレルと同じハプロタイプ上に存在する *DQAI*02* が本剤による DILI の発症のリスク因子であることが示され、別集団の発症患者を用いた再試験においても関連が確認された(表 2)¹⁷⁾。なお、*DRB1*07:01* の日本人におけるアレル頻度は 0.3% 程度である。なお *in vitro* 試験の結果、キシメラガトランおよびその中間代謝産物であるメラガトランエチルは高濃度で、可溶性 *DRB1*07:01* とその抗原ペプチドとの結合を阻害するが、他の主要な *DRB1* アレルと抗原ペプチドとの結合には影響を与えないことが報告されている¹⁷⁾。

4. ラパチニブ

ラパチニブは上皮増殖因子受容体(epidermal growth factor receptor: EGFR)および human EGFR-related 2(HER2)阻害薬であり、わが国では 2009 年に、「HER2 過剰発現が確認された手術不能または再発乳癌患者に対するカペシタピンとの併用療法」を効能・効果として承認された、低分子の経口投与可能な分子標的治療薬である。転移性癌に対する複数の臨床試験のメタ解析結果において、National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0(NCI CTCAE v4.0)に基づくグレード 3 の ALT 上昇と高ビリルビン血症を伴う DILI が、それぞれ 1.6% および 0.2% と報告されている¹⁸⁾。臨床試験に参

加した患者のうち、ALT が一度以上正常上限の 3 倍以上に上昇したケース群と、13 週間以上の投与期間中 ALT が正常範囲であったコントロール群に対し網羅的遺伝子多型解析、候補遺伝子多型解析、HLA 解析が行われた¹⁹⁾。その結果、*DQAI*02:01* が有意に DILI の発症と関連し、この結果は別の臨床試験由来のケース群とコントロール群を用いた再試験においても確認された(表 2)。*DQAI*02:01* をバイオマーカーとして用いて、本剤により ALT が正常上限の 3 倍以上に上昇する患者を予測する場合の陽性的中率は 17%、陰性的中率は 97% であり、母集団におけるアレル頻度が高いために多くの偽陽性を生じることになる。ちなみに本アレル頻度は白人で 25% であるのに対し、日本人では 1% である。

5. チクロピジン

チクロピジンは抗血小板薬であり、胆汁うっ滞型 DILI を誘引することが知られている。日本人を対象に解析を行った結果、*HLA-A*33:03* と胆汁うっ滞型の DILI 発症との強い関連が認められた(表 2)²⁰⁾。さらに、*HLA-A*33:03* の保因者であり、かつチクロピジンの代謝活性化に関与する *CYP2B6* のハプロタイプのうち、酵素発現の増大をもたらす *CYP2B6*1H* と *CYP2B6*1J* を有する患者では、本 *CYP2B6* のハプロタイプを有しない *HLA-A*33:03* の保因者と比較して DILI の発症のリスクが増大することが報告されている²¹⁾。チクロピジン誘因性 DILI の発症頻度は白人よりも日本人において高いことが知られているが、その理由のひとつの可能性として、日本人母集団における *HLA-A*33:03* のアレル頻度(約 7%)が白人(約 0.7%)より高いことがあげられる。

6. ルミラコキシブ

選択的 *cox-2* 阻害剤・非ステロイド性消炎鎮痛薬ルミラコキシブは、重篤な DILI(服用患者 10 万人当たり 6.39 人)のため、2007 年に市場から撤退した(日本では未承認)。白人を主体とした本剤による DILI 発症患者と耐性患者を用いた解析において、DILI 発症と *DRB1*15:01* との間に強い関連性が認められ、このアレルはハプロタイプ *HLA-DRB1*15:01-DQB1*06:02-DRB5*01:01-DQAI*01:02* を構成していた(表 2)²²⁾。

一方、*DRBI*15:01*の陰性的中率は98.9%と
もっとも高いが、母集団におけるアレル頻度が高
いため、陽性的中率は8.0%と低く、発症には他の
要因も関連していると思われる。

薬物動態関連分子の遺伝子多型と DILI発症との関連

薬物代謝酵素およびトランスポーターなどの薬
物動態関連分子をコードする遺伝子の多型は、薬
物の吸収・分布・代謝・排泄の各過程に影響を及
ぼすことにより薬物血中濃度の過度の低下や上昇
を引き起こし、薬効および副作用発現の個体差さ
らに人種差発現の原因となりうるということが知られて
いる。おもに“代謝性特異体質”のDILIを引き
起こす薬剤に関して、その薬物動態に関与する酵
素を中心に、遺伝子多型とDILI発症との関連が
候補遺伝子多型解析により見出されている。

1. 抗結核薬(イソニアジド、ピラジナミド、 リファンピシン)

結核の初回治療にはイソニアジド(INH)、リ
ファンピシン(RFP)、およびピラジナミド(PZA)
3剤に、ストレプトマイシン(SM)、エタンブトール
(EB)のいずれか1剤を加えた4剤併用を初期2
カ月間行う療法が最強かつ最短の治療法として、
すでに世界中に広く普及している。しかし、INH、
RFP、PZAはいずれもDILIを引き起こす可能性
があり、肝不全に至る重篤な症例が報告されてい
る。日本結核病学会が1994~2003年の10年間で
行った調査によると、結核化学療法時の重篤な
DILIは10万対100~500の頻度で発生していると
推定された。発症は治療開始2カ月以内に集中し、
合併症があると重症化しやすく、肝細胞障害型が
大半であり血清ビリルビン値上昇は重篤化の兆候
であることが示されている²³⁾。

イソニアジドは肝で*N*-アセチルトランスフェ
ラーゼ(NAT2)による代謝を受けて、1-アセチ
ル-2-イソニコチルヒドラジン(アセチルイソニ
アジド)となり、さらに加水分解を受けてイソニ
コチン酸とアセチルヒドラジンとなる。イソニコ
チン酸はグリシン抱合体として尿中に排泄され
る。一方、アセチルヒドラジンはNAT2より肝毒
性の低い1,2-ジアセチルヒドラジンに代謝され、

尿中に排泄されるが、一部はCYP2E1によりさら
に肝毒性の強い代謝物に変換される(図1)。
NAT2にはその活性に影響を与える遺伝子多型が
存在し、野生型である*NAT2*4*をホモ接合で有
するヒトはNAT2の活性が高いrapid acetylator
(RA)である。日本人で認められる変異型、*NAT2*
**5*(341 T>C)、*NAT2*6*(590 G>A)、*NAT2*7*
(857 G>A)のホモ接合体あるいは複合ヘテロ接
合体はNAT2の活性が低いslow acetylator(SA)
であり、野生型と変異型のヘテロ接合体はinter-
mediate acetylator(IA)である。日本人の結核患
者で、INHおよびRFPの2剤にSMまたはEBの
投薬を受けた77名に対し、肝機能障害の頻度と
NAT2の遺伝子多型との関係を調べた前向き研究
において、SAではRAと比較して、DILI発症の
相対リスク比が28倍であることが明らかとなっ
た(表3)²⁴⁾。これはNAT2の活性が低い人では
NAT2によるイソニアジドの代謝が遅く、別の代
謝経路によりイソニアジドが加水分解を受けて肝
毒性を有するヒドラジンを産生するためと考えら
れている(図1)。ちなみに、日本人ではNAT2の
SAの頻度は約10%であるのに対し白人では50%
である。

さらに、インド人の結核患者346名を対象とし
た研究において、DILIの発症したケース群は、非
発症のコントロール群と比較して有意に*HLA-*
*DQB1*02:01*の保因者が多く、*DQA1*01:02*
の保因者が少ないことが明らかになり、多変量解
析において高齢、結核の重篤度、治療前の低アル
ブミン血症とともに、上記の2種のHLAアレル
がリスク因子であることが示されている²⁵⁾。さら
に、ハプロタイプ解析の結果では*DRBI*07:01-*
*DQA1*02:01-DQB1*02:01*が有意に抗結核薬
によるDILIの発症と相関することが明らかにな
ったが(表2)、このハプロタイプが前述のキシ
メラガトランによるDILIのリスク因子と重複し
ていることは興味深い。また、韓国人の結核患者
を対象とした研究において、腫瘍壊死因子 α
(tumor necrosis factor- α : TNF- α)遺伝子のプ
ロモーター部位に存在する多型、-308 G>Aが
DILIの発症に関連することが報告されており、抗
結核薬によるDILIに対する免疫系の関与も示唆

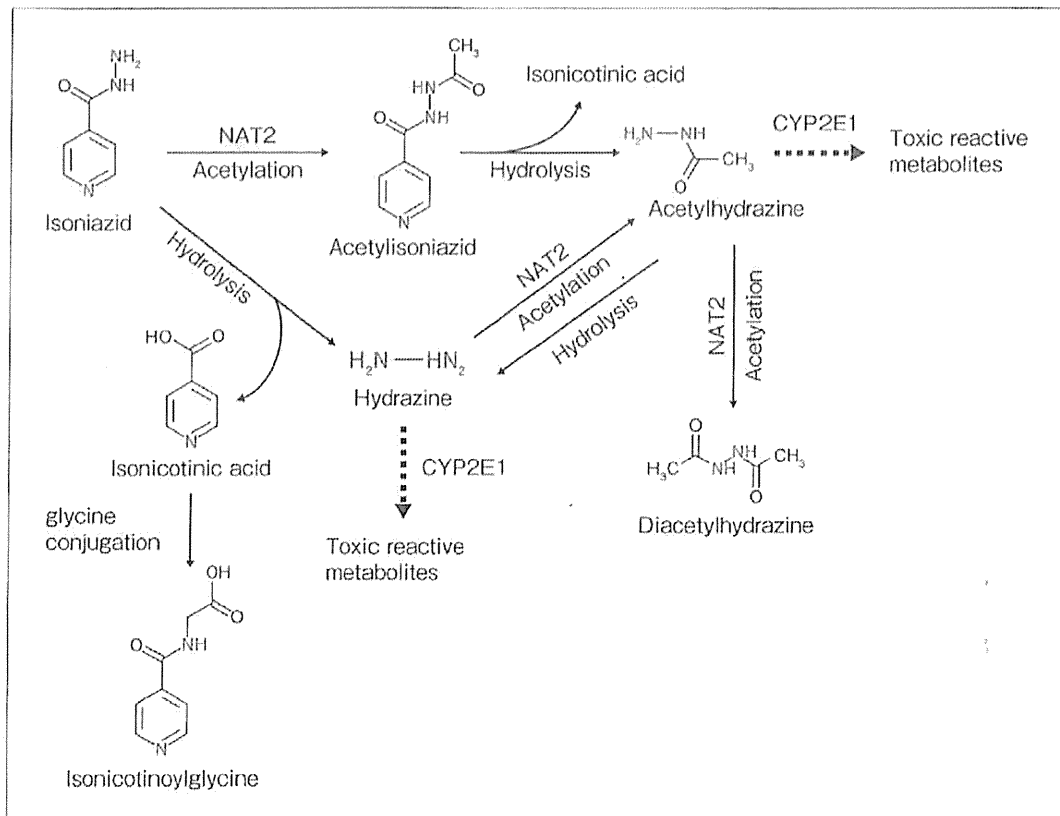


図 1 イソニアジドの代謝

される(表 3)²⁶⁾。

2. ジクロフェナク

本剤は非ステロイド系抗炎症剤として広く用いられているが、代謝性特異体質により DILI を惹起すると考えられている。イギリスにおける調査ではジクロフェナクによる DILI の発症率は 10 万人の服用者当り 6 人と推定されている¹¹⁾。ジクロフェナクはおもに CYP2C9 により 4'-水酸化体にて代謝されるが、一部は UDP-グルクロン酸転移酵素(UDP-glucuronosyltransferase : UGT) の UGT2B7 によりグルクロン酸抱合を受け、活性代謝物のアシルグルクロナイドを生成する。イギリスにおける北ヨーロッパ由来の患者を用いた研究において、ジクロフェナクによる DILI が認められたケース群では、耐性患者からなるコントロール群と比較して有意に UGT2B7*2(-161C/T および 801C/T) の保因者の割合が高いことが示された(表 3)²⁷⁾。これは、本アレルが野生型アレルと比較して酵素発現またはグルクロン酸抱合活性が高く、生成されたアシルグルクロナイドが生体内蛋白と反応し、肝毒性や抗原性を獲得した可能

性が指摘されている。さらに、同一の検体を用いた比較において、肝細胞胆管側膜上に発現される multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2) のプロモーター領域の遺伝子多型 -24C/T が DILI の発症に有意に相関したが(表 3)、本遺伝子多型によりトランスポーターの発現が低下し、アシルグルクロナイドの胆汁排泄が減弱したためと考えられている。また同様に、白人におけるジクロフェナクによる DILI の発症に、IL-10 および IL-4 の発現に影響を与えるプロモーター領域の遺伝子多型が相関しているという報告があり(表 3)、免疫系の関与も示唆される²⁸⁾。

3. トログリタゾン

トログリタゾンは DILI により市場撤退した経口糖尿病薬である。日本人について遺伝子解析が行われた結果、グルタチオン S-転移酵素(glutathione S-transferase : GST) の GSTM1 および GSTT1 両遺伝子の欠損が DILI の発症と有意に関連(表 3)していた²⁹⁾。両遺伝子の欠損者は、グルタチオン抱合による本剤の反応性代謝物の解毒代謝が進行せず、代謝物が細胞内蛋白質に共有結合

することにより細胞障害が惹起されたと考えられる。グルタチオン日本人における GSTM1/T1 両欠損型の頻度は約 25% である。

4. パゾパニブ

パゾパニブはマルチキナーゼ阻害薬であり、わが国では 2012 年に悪性軟部腫瘍の効能・効果で承認された。アメリカにおける転移性腎細胞癌の白人患者を対象にしたフェーズ II のデータの解析結果から、本剤による高ビリルビン血症が UGT1A1 遺伝子の TATA box の存在する遺伝子多型 UGT1A1*28 (TA の繰返しが野生型は 6 回であるのに対し、*28 では 7 回の繰返し) と有意に相関した (表 3)³⁰⁾。ビリルビンは UGT1A1 により代謝されるが、パゾパニブは UGT1A1 の強力な阻害剤であることに加え、UGT1A1 の発現量の低下を引き起こす*28 多型の存在により高ビリルビン血症が引き起こされたと推定される。本症例は ALT の上昇を伴わない症例であり DILI には該当しないが、他の原因で ALT が上昇した際には DILI に進展する可能であるので注意を要する。

おわりに

DILI 発症の回避をめざして、世界的に患者の遺伝的素因の探索が行われた結果、さきに述べたフルクロキサシリンによる DILI の発症に相関する HLA-B*57:01 に代表される関連性の高いリスク因子が薬剤別に同定されてきた。一方で、これらのゲノムバイオマーカーによる診断では感度、特異度、陰性的中率は比較的高いものの、発症率が低いこともあり陽性的中率は低く、臨床応用には至っていない。陽性的中率を上げるためには、数種のバイオマーカーを組み合わせる用いることや、薬剤に依存しない普遍的なリスク因子の同定が必要と考えられる。また、ゲノムのみならず、血液や尿中に検出される蛋白質や体内代謝物などを DILI 発症の診断バイオマーカーとして用いるための研究も進められている^{31,32)}。これらの研究がさらに進展し、DILI 発症の高リスク患者を薬剤投与前に予測できるバイオマーカーが臨床応用されることを期待したい。

文献

- 1) Fontana, R. J. : Drug-induced Liver Disease, 3rd ed (ed. by Kaplowitz, N. and DeLeve, L. D.). Academic Press, New York, 2013, pp.713-723.
- 2) Daly, A. K. et al. : *Nat. Genet.*, **41** : 816-819, 2009.
- 3) Molokhia, M. and McKeigue, P. : *Pharmacogenomics*, **7** : 633-638, 2006.
- 4) Andrade, R. J. et al. : *Gastroenterology*, **129** : 512-521, 2005.
- 5) Fontana, R. J. et al. : *Drug Saf.*, **32** : 55-68, 2009.
- 6) Takikawa, H. et al. : *Hepatol. Res.*, **39** : 427-31, 2009.
- 7) Pichler, W. J. : *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **2** : 301-305, 2002.
- 8) Russmann, S. et al. : *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **60** : 76-82, 2005.
- 9) Wuillemin, N. et al. : *J. Immunol.*, **190** : 4956-4964, 2013.
- 10) Andrews, E. et al. : *Hepatology*, **51** : 1656-1664, 2010.
- 11) de Abajo, F. J. et al. : *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **58** : 71-80, 2004.
- 12) Hautekeete, M. L. et al. : *Gastroenterology*, **117** : 1181-1186, 1999.
- 13) O'Donohue, J. et al. : *Gut*, **47** : 717-720, 2000.
- 14) Donaldson, P. T. et al. : *J. Hepatol.*, **53** : 1049-1053, 2010.
- 15) Lucena, M. I. et al. : *Gastroenterology*, **141** : 338-347, 2011.
- 16) Keisu, M. and Andersson, T. B. : *Handb. Exp. Pharmacol.*, **196** : 407-418, 2010.
- 17) Kindmark, A. et al. : *Pharmacogenomics J.*, **8** : 186-195, 2008.
- 18) Moy, B. et al. : *J. Clin. Oncol.*, **27** : 1043, 2009. (abstract)
- 19) Spraggs, C. F. et al. : *J. Clin. Oncol.*, **29** : 667-673, 2011.
- 20) Hirata, K. et al. : *Pharmacogenomics J.*, **8** : 29-33, 2008.
- 21) Ariyoshi, N. et al. : *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25** : 298-306, 2010.
- 22) Singer, J. B. et al. : *Nat. Genet.*, **42** : 711-714, 2010.
- 23) Shigeto, E. : *Kekkaku*, **82** : 467-473, 2007.
- 24) Ohno, M. et al. : *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **4** : 256-261, 2000.
- 25) Sharma, S. K. et al. : *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **166** : 916-919, 2002.
- 26) Kim, S. H. et al. : *Liver Int.*, **32** : 809-814, 2012.
- 27) Daly, A. K. et al. : *Gastroenterology*, **132** : 272-281, 2007.
- 28) Aithal, G. P. et al. : *Hepatology*, **39** : 1430-1440, 2004.
- 29) Watanabe, I. et al. : *Clin. Pharmacol. Ther.*, **73** : 435-455, 2003.
- 30) Xu, C. F. et al. : *Br. J. Cancer*, **102** : 1371-1377.
- 31) Bell, L. N. et al. : *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **35** : 600-612, 2012.
- 32) Soga, T. et al. : *J. Hepatol.*, **55** : 896-905, 2011.

