

- 1) 自覚症状、他覚所見の発現又は悪化
  - ① 試験薬投与開始前に認められず、新たに出現した症状、所見、疾患等
  - ② 試験薬投与開始前から認められ、悪化した症状、所見、疾患等
  - ③ その他、研究責任医師又は同分担医師が有害事象と判断した事象
  
- 2) 臨床検査値等における異常変動  
当該検査項目の基準範囲を外れた場合を逸脱値とし、異常変動の定義を以下のとおりとする。
  - ① 試験薬投与直前値に比べ基準値逸脱が悪化した場合
  - ② 本計画書中「検査観察項目の詳細」にて定める事象
  - ③ その他、研究責任医師又は同分担医師が有害事象と判断した事象
  
- 3) 重篤な有害事象の定義
  - ① 死亡または死亡につながるおそれ
  - ② 治療のために病院又は診療所への入院又は入院期間の延長が必要とされる症例
  - ③ 障害または障害につながるおそれ
  - ④ その他の医学的に重大な状態(即座に生命を脅かしたり、死や入院には至らなくとも、被験者を危険にさらしたり、上記①～③のような結果に至らぬように処置や治療を必要とするような重大な医学的事象)
  - ⑤ 後世代における先天性の疾病または異常

### 12.1.2 副作用

副作用とは、当該試験薬と有害事象との間の因果関係について、少なくとも合理的な可能性があり、因果関係を否定できない反応を言う。

### 12.1.3 有害事象の重症度

有害事象の重症度判定は、厚生省薬務局安全課長通知薬安第80号「医薬品等の副作用の重篤度分類基準」を参考として判定する。

なお、本通知で規定する「グレード1」は「軽度」、「グレード2」は「中等度」、「グレード3」は「重度」の目安とする。当該通知より重症度を判定することが困難な場合は、以下の基準を参考として判定する。

軽度	:	症状が軽く容易に治癒する程度
中等度	:	重度ではないが、軽度でないもの
重度	:	日常生活に重度の支障をきたす程度

#### 12.1.4 重要な有害事象

重篤な有害事象に該当しないもので、臨床上の重要性から特に注目すべきであると判断された有害事象とする。次のいずれかに該当するものは重要な有害事象として取り扱う。

- 1) 著しい血液学的異常や他の臨床検査値異常を認めたもの
- 2) 試験薬の投与を中止すべきであったもの
- 3) 重要な併用療法の追加を含む処置をせざるを得なかったもの

#### 12.1.5 試験薬との因果関係

関連なし : 臨床検査値異常を含む臨床上の事象で、試験薬投与後、これと関連づけられる時間経過がなく、発現時の疾病、他の医薬品若しくは環境因子等に起因していると考えられるもの

関連あり : 『関連なし』以外の事象

### 12.2 有害事象の取扱い

#### 12.2.1 有害事象の収集及び報告期限

すべての有害事象は、文書による同意取得時から後観察まで収集する。ただし、追跡調査が必要な重篤な有害事象については、後観察を超過しても報告対象とする場合があり、この限りではない。

#### 12.2.2 因果関係の評価

研究責任医師又は同分担医師は、すべての有害事象について因果関係の評価し、記録する。研究責任医師は、試験薬が有害事象を引き起こした、あるいはその一因となった合理的な可能性があるかどうかで判断する。研究責任医師は、試験薬が当該事象を引き起こしたかどうか判断できない場合、「関連あり」として取り扱う。また、原因は不明であるが「関連なし」と判断した場合は、その旨を明確に記録する。

研究責任医師が当該重篤な有害事象は本臨床研究の手順との関連性があると判断した場合、研究責任医師又は同分担医師はこの因果関係をその内容を記録し、重篤な有害事象の報告要件に該当する場合、当該要件にしたがって報告しなければならない。

#### 12.2.3 重篤な有害事象が発生した場合

重篤な有害事象の内容、試験薬との因果関係をもとに、当該事象の発生が本臨床研究の中止基準を満たす場合は、当該被験者の研究を中止する。研究責任医師又は同分担医師は、被験者の安全性を確保するために必要な処置・検査を実施し、その後の経過について必要に応じて追跡調査を実施する。

#### 12.2.4 有害事象の追跡検査及び追跡期間

有害事象が消失又は発現前の状態に回復しない場合は、2 週間を目処に追跡調査を実施する。以降も研究責任医師又は同分担医師が追跡調査継続の必要性があると判断した場合は追跡調査を継続する。ただし、器質的な障害で不可逆な有害事象が認められた場合は、症状・所見が安定又は固定するまでの追跡調査とする。追跡調査を実施した場合、以下の項目について記録する。

- 1) 追跡調査年月日
- 2) 転帰(1. 消失又は回復 2. 軽快 3. 消失せず又は未回復 4. 不明)
- 3) 消失又は投与前の状態に回復するまでの追跡調査が実施できなかった場合の理由

#### 12.2.5 有害事象発生時の通知

研究責任医師は、有害事象を認めたときには、次のように通知を行う。通知方法の詳細は、別途定める手順書に従う。

- 1) 報告の対象となる有害事象  
期間中のすべての重篤な有害事象、試験終了(中止)後に試験薬との関連性が疑われる重篤な有害事象が対象となる。
- 2) 実施医療機関の長への報告  
研究責任医師は、重篤な有害事象の発生を認めたときは、速やかに参加施設の長に報告する。
- 3) 厚生労働大臣への報告  
研究責任医師は、関連性が疑われる、重篤な有害事象を認めた場合、薬事法に定める期間内に厚生労働大臣へ報告する。

#### 12.2.6 効果安全性評価委員会への報告

すべての有害事象を定期的開催される効果安全性評価委員会に報告し、有効性と共に評価し、試験の進行、試験の継続、変更、及び中止又は中断等を判断する。

### 13. 症例報告書

#### 13.1 症例報告書の特定

tRNA 修飾異常に起因した2型糖尿病のコンパニオン診断薬開発を目指した臨床研究症例報告書。

#### 13.2 症例報告書作成の手順

研究責任医師又は同分担医師は、以下のように症例報告書を作成する。

- 1) 観察・検査・評価データを症例報告書に記載し、各被験者の観察期間終了後又は

中止後、速やかに内容を確認して記名押印又は署名（EDC の場合は、電子署名）並びに記載日を記載する。

- 2) 症例報告書と原資料に矛盾がある場合には、その理由を説明する記録を作成するか、症例報告書を変更又は修正する。
- 3) 症例報告書の作成、変更又は修正を行う場合、対応した手引きに従う。
- 4) 以下の条件が満たされている場合には、研究協力者が症例報告書の作成に関与しても差し支えない。
  - ① 研究協力者の作成する範囲が原資料からのデータ転記のみであること。
  - ② 研究責任医師が当該研究協力者の氏名と業務内容を記載した業務分担リストを実施医療機関の長にあらかじめ提出し、その指名を受けていること。
  - ③ 研究協力者が転記する箇所が明確で、試験責任医師がその内容を点検し間違いがないことを確認した上で記名押印又は署名（EDC の場合は、電子署名）並びに記載日を記入記載すること。
- 5) 作成した症例報告書は、研究責任医師が最終確認を行い、記名押印又は署名（EDC の場合は、電子署名）並びに最終確認日を記載する。

### 13.3 症例報告書中の記載内容を原資料とすべき項目の特定

次の項目については、症例報告書を原資料とする。

- ① 併用薬の使用理由、併用療法の実施理由
- ② 有害事象の重症度、重篤度及び試験薬との因果関係
- ③ すべてのコメント

## 14. 原資料等の直接閲覧

### 14.1 原資料の特定

本臨床研究における原資料とは、以下のものをいう。

- 1) 被験者の同意及び情報提供に関する記録
- 2) 診療録、患者日誌、看護記録、検査データ、被験者登録用紙等、症例報告書の元となった記録
- 3) 試験薬の管理に関する記録
- 4) 本臨床研究に関連する試験に係る文書又は記録

### 14.2 直接閲覧の方法

実施医療機関の長は、研究責任医師が指名した者によるモニタリング及び監査、並びに倫理審査委員会及び規制当局による調査の際に、原資料等のすべての試験関連記録を直接閲覧に供する。なお、直接閲覧の方法、実施時期及び閲覧項目等については、直接閲覧実施者と実施医療機関の間で協議する。直接閲覧の実施に際しては、双方の標準業務手順書の調整を行い、必要に応じて別途手順書を作成した上で実施する。

## 15. 統計解析

### 15.1 目標症例数

日本人 2 型糖尿病患者 100 名（リスクアレル保有群を次の A～C のように分ける）

- A) Cdkal1 遺伝子のリスクアレル保有群 : 25 名
- B) ヘテロ・非リスクアレル保有群 : 50 名
- C) ホモ・非リスクアレル保有群 : 25 名

### 15.2 症例数設定根拠

これまでのゲノムワイド関連解析研究の結果より、2 型糖尿病患者における A) 群 : B) 群は : C) 群はおよそ 1 : 2 : 1 であると想定した。なお、既存のデータを基に、期待される試験治療の効果（治療 3 ヶ月後の HbA1c の変化量）をリスクアレル群（A）と非リスクアレル群（B+C）の群間差が 0.7% であると仮定し、検出力が 80% 以上となる症例数を推定した。

以上により、A) 群 : 25 名、B) 群 : 50 名、C) 群 : 25 名の合計 100 例と設定した。既存のデータを基に、期待される試験治療の効果（治療 3 ヶ月後の HbA1c の変化量）をリスクアレル群（A）と非リスクアレル群（B+C）で比較する時、十分に有意差が検出できる例数とした。またこれまでのゲノムワイド関連解析研究の結果より、2 型糖尿病患者における A) 群 : B) 群は : C) 群はおよそ 1 : 2 : 1 であると仮定した。

### 15.3 症例固定

試験依頼者は臨床研究実施計画書からの逸脱、有害事象等の疑義症例、その他検討を必要とする症例について医学専門家と協議し、その解析上の取扱いを決定する。

<症例区分例>

- 1) 不適格例
- 2) 中止例
- 3) 脱落例
- 4) 逸脱（違反）例
- 5) GCP 違反例
- 6) 適切なインフォームド・コンセントが得られていない等、GCP 上、問題のある被験者

### 15.4 解析対象集団

- 1) 有効性評価に関する解析対象集団  
試験薬を割り付けられた症例のうち、中止・脱落症例、服薬率 70%未満の症例、重大な臨床研究実施計画書違反のあった症例を除く、すべての症例。

- 2) 安全性に関する解析対象集団  
試験薬を1回以上服薬したすべての症例。

### 15.5 統計解析計画

詳細な解析方法については、統計解析責任者が作成した統計解析計画書に従う。なお、有意水準は両側検定 5%、片側検定 2.5%とする。ただし、背景因子に関する群間の均衡性の検討では両側検定 15%とする。

### 15.6 有効性の解析

- 1) 主要評価項目  
全被験者における tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)の 37 番目のアデニンのチオメチル化修飾率と HbA1c の変化量の相関性
- 2) 副次的評価項目
  - 1) 投与開始前および 12 週後における次のパラメータについて、各群間で比較する
  - 2) A) 群と B)+C)群間におけるエペリゾン投与開始前から投与終了時までのグリコヘモグロビン (HbA1c) の変化量の差
  - 3) 血糖コントロール指標 (空腹時血糖値、1,5-AG)
  - 4)  $\beta$  細胞機能 (グルカゴン負荷試験、HOMA-B、プロインスリン/インスリン比)
  - 5) 脂質代謝指標 (総コレステロール、LDL-Chol、HDL-Chol、トリグリセリド)

### 15.7 安全性の解析

[解析項目]

- ① 有害事象
- ② 臨床検査
- ③ バイタルサイン

[解析方法]

有害事象は投与群ごとに発現率を算出する。重症度ごとについても同様に行う。また MedDRA に準拠して読み替えて、一覧表を作成する。

その他の解析については別に定める統計解析計画書に従って実施する。

## 16. データの品質管理及び保証

### 16.1 データの品質管理

研究責任医師は、標準業務手順書及び本臨床研究に先立ち定めたモニタリング手順書に従い、本臨床研究の品質管理を行う。

データの品質管理は、データマネジメント担当者が自らの標準業務手順書 (試験依頼者の承認を得たもの) に従って品質管理を行う。

## 16.2 品質保証

研究責任医師は、標準業務手順書及び本臨床研究に先立ち定めた監査手順書及び計画書に従い、本臨床研究の監査を行う。監査担当者は、本臨床研究が、標準業務手順書、臨床研究実施計画書及びあらかじめ定めたその他計画書／手順書等に従って行われたことを確認する。

## 17. 新たな情報の提供

当該試験薬の副作用によるものと疑われる疾病、障害又は死亡の発生、当該試験薬の使用によるものと疑われる感染症の発生、その他、試験薬の品質、有効性及び安全性に関し、試験を適正に行うために重要な情報を知った時は、以下の措置を講ずる。

- 1) 研究責任医師は、速やかに、試験実施医療機関の長及び効果安全性委員に文書で報告し、必要な措置を講ずる。
- 2) 研究責任医師又は同分担医師は、被験者の意思に影響を与えるものと認められる情報を入手した場合には、直ちに当該被験者に情報を提供し、これを文書により記録するとともに、被験者が試験に継続して参加するかどうかを確認する。
- 3) 研究責任医師は、説明文書を改訂する必要があると認めた時は、速やかに説明文書を改訂する。
- 4) 研究責任医師は、説明文書を改訂した時は、その旨を実施医療機関の長に報告する。実施医療機関の長は、当本臨床研究の実施を承諾した際に意見を聴いた倫理審査委員会に当該改訂説明文書の変更について報告し、その結果を研究責任者に通知する。
- 5) 研究責任医師は、説明文書を改訂した場合は、試験の参加の継続について、改めて被験者本人から文書による同意を取得しなければならない。

## 18. 臨床研究実施計画書の遵守、逸脱又は変更並びに改訂

### 18.1 臨床研究実施計画書の遵守

本臨床研究は研究責任医師と実施医療機関の長の合意のもとに臨床研究実施計画書を遵守して実施する。研究責任医師及び実施医療機関の長は、臨床研究実施計画書及び症例報告書の見本の内容とその遵守について合意した旨を証するため、臨床研究実施計画書又はそれに代わる文書にそれぞれ記名押印又は署名し各自日付を記入する。

### 18.2 臨床研究実施計画書の逸脱又は変更

研究責任医師又は同分担医師は次の場合を除き、試験依頼者との事前の文書による合意及び倫理審査委員会の事前の審査に基づく文書による承認を得ることなく、臨床研究実施計画書からの逸脱又は変更を行ってはならない。

- 1) 被験者の緊急の危険を回避する等、医療上やむを得ない場合

## 2) 本臨床研究の事務的事項のみに関する変更である場合

被験者の緊急の危険を回避する等、医療上やむを得ない場合の逸脱の場合、臨床研究実施計画書から逸脱した行為のすべてを、第三者が見てもわかるように記録する。

研究責任医師は、試験の実施に重大な影響を与え、又は被験者の危険を増大させるような試験のあらゆる変更について、実施医療機関の長へ文書により速やかに報告する。実施医療機関の長は、当本臨床研究の実施を承諾した際に意見を聴いた倫理審査委員会に報告し、その結果を研究責任者に通知する。研究責任医師は、臨床研究実施計画書の改訂が適切な場合には、当該臨床研究実施計画書を決められた手順に則って改定する。

### 18.3 臨床研究実施計画書の改訂

研究責任医師は、次の事例があった場合、本臨床研究全体、あるいは個々の被験者における臨床研究実施計画書に基づく本臨床研究実施継続の可否を検討し、必要な場合には臨床研究実施計画書の改訂を行う。臨床研究実施計画書改訂の詳細は、別途定める手順書に従う。

- 1) 試験薬の品質、有効性及び安全性に関する事項、その他の試験を適正に行うために重要な情報を知ったとき。
- 2) 医療上やむを得ない事情により、臨床研究実施計画書の変更が必要となったとき。
- 3) 倫理審査委員会の意見に基づく実施医療機関の長の修正の指示があったとき。
- 4) 臨床研究実施計画書に記載した解析の主要な特徴（主要評価項目及びその解析）を変更するとき。
- 5) 異動等の理由で試験責任医師が変更になったとき。

## 19. 試験の終了

研究責任医師は、当該実施医療機関における最終の被験者に対して臨床研究実施計画書に規定された投与及び観察が終了した後、実施医療機関の長に試験が終了した旨及び試験結果の概要を文書で報告する。

実施医療機関の長は、本臨床研究の実施を承諾する際に意見を聴いた倫理審査委員会に試験の終了を速やかに文書で通知するとともに、研究責任医師から提出された報告書に基づき、試験結果の概要を報告する。

## 20. 倫理

### 20.1 本臨床研究の倫理的な実施

本臨床研究は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、薬事法に規定する基準、個人情報保護に関する法律、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令及びガイドライン等の各法令及び基準等及び、臨床研究実施計画書を遵守して実施する。



## 20.2 倫理審査委員会による審査

本臨床研究の実施に先立ち、倫理審査委員会は、臨床研究実施計画書、症例報告書の見本、同意・説明文書、試験薬概要書、その他倫理審査委員会が必要とする資料を入手し、倫理的、科学的及び医学的妥当性の観点から、試験の実施及び継続等について審査を行い、その意見を実施医療機関の長に文書で通知する。

## 20.3 ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認

本臨床研究の内、CDKALI アレル解析およびチオメチル化修飾解析については、熊本大学大学院生命科学研究部のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会で審査され、承認を得た臨床研究計画書に則り、実施する

## 20.4 被験者のプライバシーの保護

研究責任医師又は同分担医師等は、被験者の機密保持について十分配慮する。症例報告書には、被験者識別コードのみを記入することとし、他の文書・資材(検査伝票、試験薬の包装等)に被験者の氏名が表示されている場合は、当該文書・資材のその氏名を抹消する。また、学術目的等のため試験結果を公表する場合にも、被験者のプライバシー保護に配慮する。開発業務受託機関のモニタリング担当者及び監査担当者等の直接閲覧実施者が本臨床研究に関して職務上知り得た個人の情報を第三者に漏洩してはならない。退職後についても同様とする。

## 20.5 臨床研究の登録

本臨床研究は、第1症例目のスクリーニング検査の実施前までに、試験計画の内容をUMIN臨床試験登録システム(UMIN-CTR)に登録する。

## 20.6 健康被害補償

試験依頼者及び業務受託機関は、試験に関連して被験者に生じた健康被害の治療に要する費用その他の損失補填の履行を確保するために保険その他の措置を講じる。健康被害が発生した場合には、試験依頼者が補償責任を果たすものとする。ただし、以下の理由により健康被害が生じた場合は補償を行わない。

- 1) 実施医療機関の故意又は重過失による健康被害(例えば医師の重大な臨床研究実施計画書からの逸脱による健康被害)
- 2) 被験者の故意・重過失による健康被害
- 3) 機会原因による健康被害(例えば試験に参加するための通院途中で発生した交通事故による健康被害)

## 20.7 金銭の支払い

本臨床研究に係る金銭の支払いについては別途、実施医療機関との合意文書又は契約書に記載する。

## 21. 実施体制等

### 21.1 実施体制等

本臨床研究に関わる者（代表又は担当者）の所属、氏名、所在地、連絡先及び本臨床研究における主な業務範囲を以下に示す。

### 21.2 研究責任者健康被害補償

研究責任者は、試験に関する業務の総括的な指揮・監督をし、試験の円滑な実施についての全責任を負う。

熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学教授 富澤 一仁  
熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1  
電話番号：096-344-2111

### 21.3 医学専門家

医学専門家は、医学的、専門的見地から、試験依頼者へ必要に応じて試験実施計画書作成及びその改訂への助言、試験薬の継続的な安全性評価並びに試験の継続、中止及び中断に対する助言、試験総括報告書案に対する助言と内容の確認等を行う。

熊本大学医学部附属病院 代謝・内分泌内科 教授 荒木 栄一  
熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1  
電話番号：096-344-2111

### 21.4 実施医療機関

試験実施医療機関は、GCP、試験に関わる法令・規制要件及び試験実施計画書を遵守して本臨床研究を行い、また試験期間中の診療録を含む記録及びデータを契約に定める期間にわたって維持管理する。さらに試験実施医療機関は、モニター又は監査担当者、倫理審査委員会、並びに規制当局が全ての記録及び報告を調査及び監査することを許可する。試験実施医療機関、監査で指摘された瑕疵を適切に是正又は対応するための必要な措置をとる。

熊本大学医学部附属病院  
熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1  
電話番号：096-344-2111

### 21.5 モニタリング

本臨床研究に特有のモニタリング手順書及びCROの標準業務手順書に従い、モニタリングを行う。

株式会社 IBERICA  
福岡県福岡市博多区博多駅東 2-18-30 八重洲博多ビル 8F  
電話番号：092-437-1100

モニタリング責任者：三村 享

## 21.6 監査

監査責任者は、熊本大学病院の標準業務手順書に従い、本臨床研究に係る試験システムの適切性及びデータの信頼性等の監査業務を行う

株式会社 IBERICA  
福岡県福岡市博多区博多駅東 2-18-30 八重洲博多ビル 8F  
電話番号：092-437-1100

監査責任者：緒方 壽一

## 21.7 データマネジメント

データマネジメント責任者は、熊本大学病院の標準業務手順書に従い、データマネジメント業務を行う。

熊本大学医学部附属病院 医療情報経営企画部  
熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1  
電話番号：096-344-2111

DM 責任者：教授 宇宿 功市朗

## 21.8 統計解析担当者

統計解析責任者は、熊本大学病院の標準業務手順書に従い、統計解析業務を行う。

株式会社 IBERICA  
福岡県福岡市博多区博多駅東 2-18-30 八重洲博多ビル 8F  
電話番号：092-437-1100

統計解析責任者：鈴木 正志

## 21.9 遺伝子解析機関

試験実施医療機関から回収した血液検体を用い、Cdkal1 遺伝子上の SNP (rs7756992) のアレル解析を行う。

業務受託機関：熊本大学大学院生命科学研究部  
熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1  
電話番号：096-373-5050

測定責任者：魏 范研

#### 21.10 特殊分析

試験実施医療機関から回収した血液検体を用い、tRNA<sup>Lys</sup> (UUU) のチオメチル化修飾解析を行う。

業務受託機関：熊本大学大学院生命科学研究部  
熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1  
電話番号：096-373-5050

測定責任者：魏 范研

#### 21.11 臨床検査測定機関

臨床検査測定機関は、試験契約締結後、スクリーニング検査が行われるまでに試験実施計画書に定める検査項目の正常値を試験責任医師及び試験依頼者に提供する。検体を入手後、所定の検査項目を適切に測定し、結果をすみやかに研究責任者に報告する。

臨床検査測定機関：熊本大学病院 臨床検査部  
熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1  
電話番号：096-344-2111

測定責任者：松井啓隆

## 22. 参考論文

- 1) Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT, Lund University, Novartis Institutes of BioMedical Research, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*. 2007; 316: 1331-6.
- 2) Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*. 2007; 316: 1336-41.
- 3) Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*. 2007; 316: 1341-5.
- 4) Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, et al. Variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2007; 39: 770-5.
- 5) Stancáková A, Pihlajamäki J, Kuusisto J, et al. Single-nucleotide polymorphism rs7754840 of CDKAL1 is associated with impaired insulin secretion in nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects and in a large sample of men with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93: 1924-30.
- 6) Arragain S, Garcia-Serres R, Blondin G, et al. Post-translational modification of ribosomal proteins: structural and functional characterization of Rim0 from *Thermotoga maritima*, a radical S-adenosylmethionine methylthiotransferase. *J Biol Chem*. 2010; 285: 5792-801.
- 7) Wei FY, Suzuki T, Watanabe S, et al. Deficit of tRNA(Lys) modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. *J Clin Invest*. 2011; 121: 3598-608.
- 8) Xie P., Wei FY., Hirata S., et al. Quantitative PCR measurement of tRNA 2-methylthio modification for assessing type 2 diabetes risk. *Clin Chem*. 2013; 59: 51-9.
- 9) Zhou B, Wei FY., Kanai N., et al. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. *Hum Mol Genet*. 2014, in press.
- 10) Chistiakov DA, Potapov VA, Smetanina SA, et al. The carriage of risk variants of CDKAL1 impairs beta-cell function in both diabetic and non-diabetic patients and reduces response to non-sulfonylurea and sulfonylurea agonists of the pancreatic KATP channel. *Acta Diabetol*. 2011; 48: 227-35.

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発

担当責任者 富澤 一仁 熊本大学大学院生命科学研究部・教授

魏 范研 熊本大学大学院生命科学研究部・助教

井上 謙吾 静岡県産業振興財団ファルマバレーセンター・

名誉所長

研究要旨

【目的】本研究では、アジア型2型糖尿病に特有の危険因子 *Cdkal1* に着目し、同酵素による tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断薬を創出する。このコンパニオン診断薬を開発するためには、これまでに我々が開発した tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾測定法を標準化して、キット化する必要がある。そこで本研究では、末梢血から tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)のチオメチル化修飾を測定する技術の標準化を行うことを目的とする。

【必要性】現在上市しているコンパニオン診断薬は、すべてがんとを標的としたものであり、診断の多くは遺伝子変異を標的としている。本研究では、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾という従来に無い新しいコンパニオン診断薬開発を目指す。そのために、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行う必要がある。

【成果】① tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：ヒト末梢血から分離した血球成分から tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行い、末梢血サンプルの保存方法、RNA 精製法の最適化、定量 PCR 機器の設定が完了した。末梢血サンプルは、24 時間、常温で保存していても、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾のデータに影響を及ぼさないことが明らかになった。RNA 精製法は、トリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチオシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピンカラム法のいずれの方法で精製したトータル RNA を献体試料としても、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾のデータに影響を及ぼさないことが明らかになった。定量 PCR 機器のバリデーションについても終了した。

また、2型糖尿病に対する tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の臨床研究計画について PMDA と事前相談を行った。

A. 研究目的

本研究は、2型糖尿病に対する個別化医療の実現化を目指し、タンパク質翻訳精度を向上させる効果を有する2型糖尿病に対する新規治療薬の開発と tRNA<sup>lys</sup>(UUU) のチオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発のための臨床研究を実施することを目的とする。

このうち本業務項目は、tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾のコンパニオン診断技術の確立とキット化を目的とする。今年度は、tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾測定方法の標準化および最適化を行った。

B. 研究方法

① tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：

i. Good Laboratory Practice (GLP) に準拠したコンパニオン診断技術の確立

ヒト末梢血から分離した血球成分からトータル RNA を精製し、ヒト tRNA<sup>lys</sup>(UUU) を直接逆転写し、その逆転写産物を定量 PCR することにより tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行った。まず、採血後の血液保存状態が tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾に及ぼす影響を調査するために、健常人ボランティアから採血した血液を以下の条件で保存した。

- ・氷上で 30 分、1 時間、2 時間、24 時間
- ・室温で 30 分、1 時間、2 時間、24 時間

その後、3,000rpm/分で遠心し、血球成分をトリゾールで可溶化した。そしてトータル RNA を精製し、精製した RNA を従来我々が開発した定量

PCR 法を応用した tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾解析技術を用いて、tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾について比較検討した。

次に RNA 精製法についてトリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチオシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピニング法で、tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾の検出に差が認められるか検討した。健常人ボランティアから採血した血液を直ちに遠心し、血球成分と血清成分に分画した。分画した血球成分から、トータル RNA をトリゾールならびに miRNeasy Mini kit で精製した。その後、tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾解析技術を用いて、tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾について両者で比較検討した。

tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾解析に用いる定量 PCR 機器について、使用する機器によって tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾の測定結果に差があるのか検討した。野生型 (WT) マウスと Cdkal1 欠損 (KO) マウスの肝臓からトリゾールを用いてトータル RNA を精製した。比較検討した機器は、以下の3種類である。

- ・Veriti 96 皿サーマルサイクラー（アップライド・バイオシステムズ社）
- ・サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP800（タカラバイオ社）
- ・サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP870（タカラバイオ社）

ii. tRNA<sup>lys</sup>(UUU) チオメチル化修飾を標的とし

たコンパニオン診断技術に関する臨床研究について PMDA との事前相談

2型糖尿病に対する tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の臨床研究計画について PMDA と事前相談を行い、コンパニオン診断薬開発のための臨床研究プロトコール作成に資した。

（倫理面への配慮）

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発において、健常人ボランティアから末梢血を採血し、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾について検討したが、本研究は熊本大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会で承認された方法（承認番号：ゲノム 159）に則り実施した。またインフォームドコンセントに関しても、同委員会で承認された方法に準じて行った。

### C. 研究結果

① tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発：

i. Good Laboratory Practice (GLP)に準拠したコンパニオン診断技術の確立

a. 血液保存状態が tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾に及ぼす影響について検討するために、以下の保存条件について比較検討した。

・氷上で 30 分、1 時間、2 時間、24 時間

・室温で 30 分、1 時間、2 時間、24 時間の 8 条件で保存した血液から RNA を精製し、チオメチル化修飾について比較検討した。いずれの条件でも tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾に有意な差は認められなかった。

b. RNA 精製法の標準化

トリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピンカラム法で、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾において、有意な差は認められなかった。いずれの方法を用いても、十分な Ct 値が得られた。

c. tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾解析に用いる定量 PCR 機器の選定

・Veriti 96 皿サーマルサイクラー（アップライド・バイオシステムズ社）

・サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP800（タカラバイオ社）

・サーマルサイクラー ダイスレッドシステム TP870（タカラバイオ社）

上記 3 機種 of tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾検出感度について比較検討した。その結果、3 機種間の検出感度に有意な差は認めなかった。

以上の a～c の条件設定の結果を踏まえて tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾解析の手順書を作成した。（資料 2 参照）

### D. 考察

① tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発

採血した血液は、24 時間常温で保存しても、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の結果に影響しないことが明らかになった。このことか



ら、病院で採血後、検査ラボに輸送し、  
tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾について解析することが可能であることが示唆された。  
tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の解析を各病院検査部で実施することは、機器の設置などから困難であることが予想されるため、検査ラボで実施するようになると思われる。その場合、血液サンプルの保管方法と輸送時間に制限があると、検査が困難である。本結果から、本技術は、検査ラボで実施するコンパニオン診断技術として問題無いことが示された。

RNA 精製方法で、トリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチオシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピнкаラム法では、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の解析結果に差は認められなかった。単相溶液精製法のほうが、コストがかからないが、シリカスピнкаラム法を用いたほうが、自動化できるメリットがある。多数検体を一度に効率的に測定できることから、キットでは、シリカスピнкаラム法を用いることとした。

3機種を用いて定量 PCR を行ったが、機器間で解析結果に差はなかった。このことから、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾解析技術は、定量 PCR 解析機器の性状に影響を受けないことが明らかになった。

#### D. 考察

① tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発

採血した血液は、24時間常温で保存しても、

tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の結果に影響しないことが明らかになった。このことから、病院で採血後、検査ラボに輸送し、  
tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾について解析することが可能であることが示唆された。  
tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の解析を各病院検査部で実施することは、機器の設置などから困難であることが予想されるため、検査ラボで実施するようになると思われる。その場合、血液サンプルの保管方法と輸送時間に制限があると、検査が困難である。本結果から、本技術は、検査ラボで実施するコンパニオン診断技術として問題無いことが示された。

RNA 精製方法で、トリゾールを用いたフェノールとグアニジンイソチオシアネートの単相溶液精製法と miRNeasy Mini kit を用いたシリカスピнкаラム法では、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾の解析結果に差は認められなかった。単相溶液精製法のほうが、コストがかからないが、シリカスピнкаラム法を用いたほうが、自動化できるメリットがある。多数検体を一度に効率的に測定できることから、キットでは、シリカスピнкаラム法を用いることとした。

3機種を用いて定量 PCR を行ったが、機器間で解析結果に差はなかった。このことから、tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾解析技術は、定量 PCR 解析機器の性状に影響を受けないことが明らかになった。

E. 結論

① tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を標的としたコンパニオン診断技術の開発:ヒト末梢血から分離した血球成分から tRNA<sup>Lys</sup>(UUU)チオメチル化修飾を定量する技術の標準化を行い、末梢血サンプルの保存方法、逆転写酵素の最適化、定量 PCR 機器の設定が終了した。また、PMDAとの事前相談を行った。

F. 健康危機情報

業務主任者ならびに業務担当者の健康に危機を及ぼすようなことは無かった。

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Zhou, B, Wei, F.-Y., Kanai, N., Fujimura, A., Kaitsuka, T., and Tomizawa, K. Identification of a splicing variant that regulates type 2 diabetes risk factor CDKAL1 level by a coding-independent mechanism in human. **Hum. Mol. Genet.** 23, 4639-4650, 2014.

2. 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し。

## 資料 2

### tRNA<sup>Lys(UUU)</sup>チオメチル化修飾解析手順書

## tRNA<sup>Lys(UUU)</sup> チオメチル化修飾解析手順書

1. ヒト静脈血を抗凝固剤 (EDTA) 入り採血管 (TERUMO®, ベノジェクト II 真空採血管、EDTA-2K、採血管容量 : 5 ml) 内に、1.5 ml 以上採血し、次のステップまで氷上で保存する。  
注 : 採血後 24 時間までの氷上保管は、結果に影響しない。
2. 1.5ml の全血に Buffer EL 7.5 ml (QIAGEN GmbH、D-40724 Hilden、Erythrocyte lysis buffer) を加え、滅菌した 15ml 容量のコニカルチューブ中で混和して、氷上で 15 分間、放置する。放置中、4~6 分毎にボルテックスミキサーで 5~10 秒震盪して混合する。  
注 :
  1. 最適な結果を得るためには、十分にミックスできるように、血液と Buffer EL の全容量がチューブ容量の 3/4 を超えないように、15ml のチューブを使用。
  2. 健康な成人の血液の 1.5ml までが本キットで調整可能。白血球数が 7000 個/ $\mu$ l、より多い血液を使用する場合には、血液量を 1.0 ml に減らす。
  3. 氷上で 15 分間放置して、赤血球の溶解によりインキュベーション中に混濁した懸濁液が透明になったのを確認したら、次のステップに移る。
3. 4°C、400 x g で 10 分間遠心分離後、白血球を含む細胞沈殿物を残して上清を完全に除去する。  
注 : 遠心分離後、白血球がペレットを形成しているのを確認し、上清を除去。赤血球の痕跡によりペレットふぁ赤味を帯びレイル場合も、次に行うステップにより、赤血球は通常除去される。
4. 細胞ペレットに Buffer EL 3 ml (QIAGEN GmbH、D-40724 Hilden、Erythrocyte lysis buffer) を添加し、軽くボルテックスし、細胞を懸濁する。
5. 4°C、400 x g で 10 分間遠心分離後、上清を完全に除去する。
6. 細胞の沈殿物に Trizol 1 ml (Invitrogen、フェノール 50 %) を加え、10 回ピペティングで完全に溶解させてから 1.5ml のエッペンチューブ (WALSON, Human DNA-Free、RNase-Free、DNase-Free) に移す。
7. Chloroform 0.2 ml (Wako、Ethanol 0.3-1.0 %、純度 99.0 %) を添加し 15 秒で激しく混合し、室温で 3 分間放置する。
8. 4°C、12000 x g で 15 分間遠心分離後、上清 0.5 ml を新しいチューブに回収する。
9. 回収した上清に 2-propanol (Wako、純度 99.7 %) 0.5 ml を添加し、完全に混和してから室温