

令和元年6月5日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08405

研究課題名(和文)新規薬剤性肝障害バイオマーカーの探索および肝障害発症予測システムの確立

研究課題名(英文) Search for novel drug-induced liver injury biomarkers and establishment of liver injury prediction system

研究代表者

北原 隆志 (KITAHARA, Takashi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30380934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品による副作用として肝障害は大きな問題であるが、その予測は困難である。本研究では、臨床上、比較的高い割合で肝障害を引き起こす医薬品と、ほとんど肝障害が報告されない医薬品をヒト肝細胞キメラマウス(肝臓の約80%をヒト肝細胞に置換したマウス)に投与し、重篤な薬剤性肝障害を引き起こす医薬品のみで変動がみられるバイオマーカーの探索を試みた。その結果、肝障害を発症する医薬品投与により血液中に分泌が確認されるmiRNAはmiR-4306およびmiR-3149であった。この2種類のmiRNAは臨床において、重篤な薬剤性肝障害の発症を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上市されてから、薬剤性肝障害は報告されたことで販売中止になったり、緊急安全性情報を発出するケースがある。このように臨床現場において薬剤性肝障害は高頻度であること、また重篤な場合、転帰が予後不良となることから、その早期発見は診療上極めて大きな恩恵をもたらす。また医薬品開発においても、副作用発現による上市後の発売中止は企業にとって大きな損失であり、早期に予測することは非常に有益となる。本研究の成果として得られた2つのmiRNAは、バイオマーカーとして薬剤性肝障害の予測を行うことができ、医薬品開発および臨床現場における医薬品の副作用回避・軽減に、有益な安全性情報をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Drug-Induced Liver Injury (DILI) is a major issue as adverse effect of drugs but the prediction of DILI is too difficult. In this study, we explored miRNAs as novel biomarkers for DILI. We analyzed expression of miRNAs which fluctuated with relatively higher rate of hepatotoxic incidents (hTOX) drugs and negligible hepatotoxic incidents (non-hTOX) drugs using chimeric mice with highly humanized liver (PXB-mice: PhoenixBio Co., Ltd.). In the results, we found that two miRNAs (miR-4306 and miR-3149) secreted into the blood only in hTOX administration. Therefore, the two miRNAs might be useful as biomarkers to predict DILI.

研究分野：毒性学

キーワード：薬剤性肝障害 ヒト肝細胞キメラマウス バイオマーカー miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、miRNA は機能性 RNA として特に脚光を浴びている。miRNA の機能は遺伝子発現抑制 (遺伝子サイレンシング) を引き起こすことにあり、がん領域においては miRNA をターゲットした治療薬の開発や、がんの早期発見のためのバイオマーカーへの応用が研究されている。薬剤性肝障害と miRNA との関係については、アセトアミノフェン誘発性肝障害モデルマウスで miR-192 のバイオマーカーとしての有用性が示唆されている (Wang K, et al, Proc Natl Acad Sci USA 106:4402-4407, 2009)。しかし、ヒトにおいては肝特異的な miRNA である miR-122 の方がバイオマーカーとしての有用性は高いという報告もあり、種差の存在が指摘されており、ヒトにおける肝障害のバイオマーカーとしての miRNA の情報は非常に少ない。一方、薬剤性ヒト肝障害は、臨床上発生頻度の高い副作用の一つであるとともに重症化すると生命の危険に及ぶこと、また予測が不可能であるため臨床上極めて大きな問題となる。さらに医薬品開発においても薬剤性ヒト肝障害から開発中止に至るケースがある。したがって、臨床現場からは、本研究において提唱する薬剤性ヒト肝障害発症リスクに関する新たなバイオマーカーの発見・確立が望まれているとともに、製薬会社においては医薬品開発早期での副作用発現の可能性の精度の高い予測が期待されている。

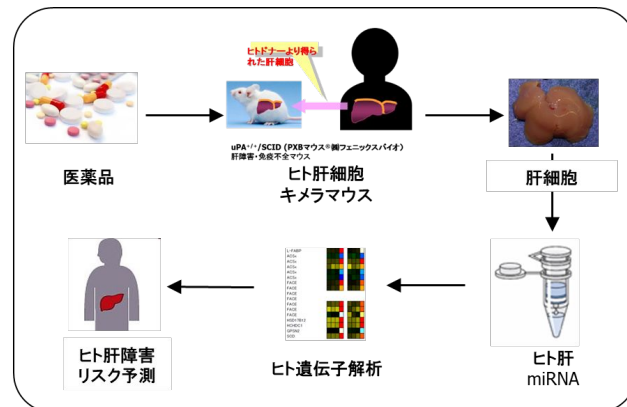
2. 研究の目的

医薬品開発早期段階での副作用リスク回避および実臨床使用時での肝障害リスク管理に資する安全性情報を構築・発信するため、医薬品由来のヒト肝障害発症リスクに関する新たなバイオマーカーの発見・確立を目指し、被験薬物の薬剤性ヒト肝障害の発症リスクが示唆されている医薬品を対象に、実験動物 (ヒト肝細胞キメラマウス) や細胞を用いた基礎実験を先行させ、その結果を基に患者血液を用いた臨床研究へと発展させ、肝障害バイオマーカーとして有用な miRNA を見出すことを目的とした。そこで本研究では、

(1) 薬剤性ヒト肝障害の発症リスクが示唆されている医薬品を対象に、ヒト肝細胞キメラマウスを用いたヒト肝細胞の遺伝子発現解析 (in vivo 試験) を行い、miRNA の発現変動を調べ、肝障害バイオマーカーとなり得る分子を明らかにする。

(2) (1)のヒト肝遺伝子発現解析に基づく実験情報から、肝障害に関連する生物学的経路と肝臓系副作用との関係を明らかにした上で、さらに肝障害発症のメカニズムをヒト肝キメラマウス由来の新鮮ヒト肝細胞を用いたヒト肝遺伝子発現解析 (in vitro 試験) を行うことで明らかにする。

(3) 上記の動物実験及び細胞実験の結果を基に、患者血液検体を用い、選定した miRNA が実臨床においてもバイオマーカーとして利用可能かを解析し、新規 miRNA バイオマーカーによる薬剤性ヒト肝障害リスク予測システムを確立する。



3. 研究の方法

(1) 被験医薬品の選択とヒト肝細胞キメラマウスを用いたヒト肝由来 miRNA 発現解析 (in vivo 試験)

臨床において薬剤性ヒト肝障害の発症リスクが示唆されている医薬品を対象とした。これまでに、肝障害の発症リスクが高いポジティブコントロール薬物としてメトトレキサート (抗リウマチ薬) についてヒト肝細胞キメラマウスを用いたヒト肝遺伝子 (メッセンジャーRNA; mRNA) 発現解析を行い、ヒト肝障害リスクを予測する目的でヒト肝キメラマウスとトキシコゲノミクスの手法を用いる安全性評価法を研究協力者の中嶋らが確立している。今回、この手法を応用し、miRNA の発現解析を行う。対象薬物としてはポジティブコントロールとしてメトトレキサートをを用い、他に薬剤性ヒト肝障害発症リスクが示唆されているアミオダロン、アセトアミノフェン、チクロピジン、テルピナフィン、バルプロ酸、ジクロフェナック、ベンゾプロマロンの7種とした。対象医薬品を粉砕し、0.5%メチルセルロース溶液に懸濁して、ヒト肝細胞キメラマウスに1日1回3日間経口投与した。最終投与の24時間後にキメラマウスの下大静脈から採血及び肝臓を採取した。得られた血液は遠心分離法により血漿試料を調製した。得られた肝臓より100 mg程度の小片を採取して、冷却したRNALater ICE (Ambion製) 中で細断し、-20°C前後で16時間以上保管し、各肝RNA試料をRNeasy Mini kit (キアゲン社製) またはmiRNeasy Mini Kit (キアゲン社製) を用いて調製した。肝臓における薬物代謝・解毒に関連するmRNAの発現変動をGeneChip® (Human Genome U133 Plus 2.0 Array) により解析し、miRNAの発現変動をGeneChip® (miRNA 3.0 Array) により解析した。また、血漿中のmRNA及びmiRNAの発現解析も肝組織と同様の手法で行った。それぞれの組織で発現変動が大きい遺伝子を網羅的に解析し、肝障害マーカーと成り得る遺伝子が検討した。

miR-3149であった。この2種類のmiRNAは実臨床において患者血液検体を用いて検査できると考えられ、薬剤性肝障害を早期に発見するバイオマーカーとなる可能性が示された。当初の研究計画では実際に患者血液検体を用い、選定したmiRNAが実臨床においてもバイオマーカーとして利用可能かを解析する予定であったが、再現性のあるデータを得るための実験条件設定に難航したこと、また研究代表者である北原が最終年度である平成30年に所属施設を異動したことから、自施設での研究実施体制の再構築に時間を要したため、患者検体での解析まで至らなかった。本研究は今後も継続して行い、当初の予定通り、選定したmiRNAが実臨床においてもバイオマーカーとして利用可能かを解析し、新規miRNAバイオマーカーによる薬剤性ヒト肝障害リスク予測システムを確立する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

北原隆志、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた重篤な薬剤性肝障害マーカーの探索、第46回日本毒性学会学術年会、2019.

Takashi Kitahara, Identification of MicroRNA as Possible Risk Marker for Drug-induced Liver Injury using Chimeric PXB-Mouse® with Highly Humanized Liver, 52nd European Congress of the European Societies of Toxicology, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中嶋 幹郎

ローマ字氏名：NAKASHIMA, Mikiro

研究協力者氏名：柳原 克紀

ローマ字氏名：YANAGIHARA, Katsunori

研究協力者氏名：島田 卓

ローマ字氏名：SHIMADA, Takashi

研究協力者氏名：長塚 伸一郎

ローマ字氏名：NAGATSUKA, Shinichiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。