

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460220

研究課題名(和文) ヒト肝キメラマウスと大規模有害事象情報を用いた薬剤性ヒト肝障害リスク予測法の確立

研究課題名(英文) Study of risk assessment of drug-induced liver injury using chimeric mice with highly humanized liver and large-scale adverse drug reactions database

研究代表者

中嶋 幹郎 (NAKASHIMA, Mikiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：00260737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：同一薬効成分を有するものの製剤中の添加剤が異なる医薬品をヒトに使用する場合の薬剤性肝障害の発症リスクを予測する評価系(T-LEX法)開発研究を深化させ、ヒト肝キメラマウスを用いたスタチン等の基礎実験の結果を医薬品の大規模ヒト有害事象データベース解析に基づく臨床情報と関連づけることで本評価法を確立した。そして、T-LEX法を用いた研究により、安全性情報が欠如している後発医薬品の薬剤性肝障害リスクに関する様々な科学的情報を発信した。

研究成果の概要(英文)：A novel method for risk prediction of drug-induced liver injury in human using toxicogenomic analyses and chimeric mice with highly humanized liver has been developed, and was named the Toxicity of Liver Examination method (T-LEX method). In this study, it was established by relating a result of the toxicogenomic experiment in chimeric mice with highly humanized liver after administration of statins to clinical information based on a large-scale drug reactions database. Various safety information about liver injury induced by generic drugs were possible to indicate as a result of study of T-LEX method.

研究分野：医療系薬学

キーワード：後発医薬品 薬剤性肝障害 ヒト肝キメラマウス ファーマコビジランス 製剤品質評価 トキシコゲノミクス T-LEX

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では、新薬(先発医薬品)と同じ薬効成分を有する医薬品(後発医薬品)の使用環境の整備と医療機関における利用促進が図られている。厚生労働省は平成25年(2013年)4月に「後発医薬品のさらなる使用促進のためのロードマップ」を策定し、平成30年(2018年)3月末までに数量シェアを60%以上とする新たな目標値を設定した。しかしながら、臨床現場では、いまだ後発医薬品の安全性や有効性に関する科学的情報の不足から、後発医薬品の信頼性の低さを指摘する意見がある。

後発医薬品の安全性と有効性に関しては、先発医薬品の使用実績で確認されていると仮定されるため、生物学的同等性試験等を実施し基準をクリアすれば、後発医薬品の品質等は先発医薬品と同等であると評価され、その製造は許可される。したがって、後発医薬品には、製剤に用いられる添加剤が先発医薬品と異なっているにもかかわらず、先発医薬品に対して義務づけられている毒性試験データは存在しない。そこで、先発医薬品と同じ薬効成分を有する後発医薬品の各製剤間相互の品質等を評価・比較する場合には、製剤の溶出性等に係わる情報が提供されている「医療用医薬品品質情報集」いわゆる「日本版オレンジブック」を参考にするしかない。しかし、これまで先発医薬品との同等性を危惧する情報が相次いで発表されていることから、製薬会社により製剤化が異なる後発医薬品を、ヒトへ投与する場合の安全性や有効性を判断できる科学的情報は十分に整備されているとは言い難い状況である。この実情は国外でも同様だ。

一方、肝臓は薬物の代謝・解毒を制御する重要な臓器である。したがって、ヒトへ医薬品を投与した時の薬剤性肝障害の発症リスクを予測する情報は、後発医薬品を選択・使用する場合においても極めて重要な安全性情報といえる。しかし、後発医薬品の製造承認から販売時までの短期間に、臨床試験を実施し製剤の肝障害リスクに関する情報を整備することは困難である。

このような背景から、臨床現場からは本研究において提唱する臨床試験とは異なるアプローチにより、後発医薬品のヒト肝障害発症リスク予測の評価が可能となる試験法の開発が求められている。

そこで、研究代表者らはT-LEX(toxicity of liver examination)法(商標登録第5617856号:2013年9月取得)を開発した。本法は、マウスの肝細胞をヒトに置き換えた“ヒト肝キメラマウス”と“トキシコゲノミクス”の技術を用いることで、先発医薬品と後発医薬品投与時のヒト肝障害リスクの予測を可能とした新規評価法である。

一方、最近、世界中のファーマコビジランス(医薬品安全性監視)のデータベース入手が可能となったことから、米国FDAの医薬品

有害事象報告データベースを用いたデータマイニング解析による医薬品と有害事象との統計的な関連性に関する研究が精力的に展開されるようになった。

## 2. 研究の目的

本研究は、同一薬効成分を有するものの製剤中の添加剤が異なる医薬品をヒトに使用する場合の薬剤性肝障害の発症リスクを予測する評価系(T-LEX法)開発研究を深化させ、基礎実験から得られた医薬品の薬剤性肝障害リスク予測に関する結果を、医薬品の大規模ヒト有害事象データベース解析に基づく臨床情報と関連づけることで、後発医薬品の薬剤性肝障害リスク予測に関する科学的情報の構築・発信を行うことが目的である。そのため、薬剤性ヒト肝障害の発症リスクが示唆されている先発医薬品とその後発医薬品を対象に、(1)ヒト肝キメラマウスを用いたヒト肝遺伝子発現解析を行うことで、遺伝子レベルにおける薬剤性ヒト肝障害の発症リスクを予測し、そのメカニズムを精査すること、(2)肝障害に関する有害事象情報との関連性の比較解析を行うこと、(3)安全性情報が欠如している後発医薬品の肝障害リスク予測に関する科学的情報を構築・発信することに取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) 被験医薬品の選択

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薬物の先発医薬品とその後発医薬品を対象とした。高脂血症治療薬のプラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチン、ロスバスタチン、セリバスタチンの7種類のスタチン類の錠剤、クエン酸モサプリド、塩酸フェキソフェナジン、パラシクロビル、エンテカビルの4種類の錠剤、エダラボン、イリノテカンの2種類の注射剤、ツロブテロールのテープ剤など多数の先発医薬品とその後発医薬品(東和薬品)を被験製剤に選んだ。

### (2) 被験動物

ヒト肝キメラマウスは、ヒト肝細胞の置換率が70%以上と安定して高いPXBマウス(フェニックスバイオ)を用い、積水メディカルの技術協力の下、医薬品の投与からヒト肝細胞の摘出まで一貫した試験条件で実施した。

### (3) ヒト肝キメラマウスを用いたヒト肝遺伝子発現解析と肝障害リスク予測評価

被験製剤が錠剤の場合は、粉碎後0.5%メチルセルロース懸濁液としてPXBマウスに1日1回高用量を3日間連続投与した。コントロール群には製剤を含まない0.5%メチルセルロース溶液を投与した。最終投与の24時間後にPXBマウスを断頭放血致死させ、肝臓を採取した。得られた肝臓より100mg程度の小片を採取して、氷冷したRNALater(Applied Biosystem Japan)中で細断し、4

で 24 時間保管した。ヒト肝細胞の肝 Total RNA 試料は RNeasy Kit (キアゲン) を用いて調製した。マイクロアレイの手法により、薬物の代謝・解毒に関連するヒト遺伝子 (約 30,000 個) の発現変動を GeneChip (Human Genome U133 Plus 2.0 Array) を用いて網羅解析した。そこから、医薬品投与群とコントロール群の遺伝子発現量の比 FC (fold-change) を算出し、その対数変換値を先発医薬品と後発医薬品の投与群間で比較することで、両剤の遺伝子発現変動量に相関性があるか否かを検討した。さらに、ヒト肝障害に関わる遺伝子群について同様の解析を行った。

#### (4) ヒト有害事象情報を用いた被験医薬品と肝臓系副作用との関連性解析

7 種類のスタチン類について米国 FDA の AERS (adverse event reporting system: 大規模有害事象自発報告システム) のデータ (1997 ~ 2013 年) を入手し、重複報告の削除、データエラーの修正を行い、解析に用いるデータの整備を行った。被験医薬品と有害事象との因果関係の解析には、FDA を始めとする 4 つの公的機関で採用されているシグナル検出手法と検出基準を用いた。データマイニング解析により、臨床レベルにおける被験医薬品と肝臓系副作用との関連性を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) スタチン類の T-LEX 法による薬剤性肝障害リスク予測データと臨床での肝障害に関する有害事象情報との関連性解析

7 種類のスタチン類を対象に、ヒト肝キメラマウスを用いたヒト肝遺伝子発現変動データを解析し、それらを比較した。その結果、各スタチンの後発医薬品と先発医薬品のヒト肝障害関連遺伝子群の発現変動に製剤同等性が認められたことから、両剤間におけるヒト肝障害リスクは同程度であることが示された。さらに、17 種類の主要なヒト肝障害関連代謝経路に関して、その遺伝子群の発現変動パターン変化を調べたところ、医薬品ごとで傾向が異なることが示された。T-LEX 法の試験データを精査することで、各スタチンの遺伝子レベルにおける肝障害リスクの特徴を予測できる可能性が示された。

次に、T-LEX 法によるヒト肝遺伝子情報を、AERS データを用いたデータマイニング解析による肝障害に関する有害事象情報と比較し、その関連性の解析を試みた。肝障害に関する有害事象情報を 7 種類のスタチン類で比較したところ、セリバスタチンを除く 6 種類のスタチン類相互の組合せでは高い相関性が認められた。セリバスタチンは、他のスタチン類と AERS データの相関性が低く、また副作用の発現率が最も高かったことから、他のスタチン類とは異なる肝臓系副作用の発症に留意する必要があることが示唆された。同様に、T-LEX 法によるヒト肝遺伝子情報を 7 種類のスタチン類で比較した。その結果、

スタチン類相互の組合せにおける相関性は、AERS データでの相関性に比べて高値を示し、セリバスタチンを含めた全てのスタチン類相互の組合せで高い相関性が認められた。

これらの結果から、ヒト肝キメラマウスを用いたヒト肝遺伝子発現変動データは、医薬品の大規模ヒト有害事象情報と同様に薬剤性ヒト肝障害リスク予測の解析用データベースとして有用であることが示唆された。

##### (2) 注射剤・テープ剤等の経口固形製剤以外の医薬品安全性評価並びに新規開発中の新規製剤の安全性試験への T-LEX 法の応用

T-LEX 法を用いて錠剤とは異なる剤形の後発医薬品の安全性評価並びに新規開発中の後発医薬品の安全性試験を行った。平成 28 年度に試験した新規開発中の後発医薬品 (B 型肝炎ウイルス治療薬エンテカビル) のヒト肝障害リスクに関する結果を示す。先発医薬品と後発医薬品を投与した時に FC が有意に増大もしくは減少した遺伝子は全体の約 1 割の 2569 個で、両剤間のヒト肝障害関連遺伝子群の発現パターン変化を比較したところ、全ての代謝経路でほぼ一致したパターン変化を示し、相関係数は 0.85 以上の値であった (表 1)。発現変動した全遺伝子の相関係数は 0.97 となり、両剤間におけるヒト肝障害リスクは同程度であることが示された。

表 1. ヒト肝障害関連代謝経路でのエンテカビル製剤投与時の遺伝子発現変動の相関性

経路	相関係数
NF2 関連酸化ストレス経路	0.94
HIF1 関連低酸素症経路	0.94
EIF2 関連ストレス反応	0.93
炎症 (NF- $\kappa$ B シグナル経路)	0.90
アポトーシス	0.93
細胞周期	0.95
TGF- $\beta$ シグナル経路	0.94
AHR シグナル経路	0.97
核内受容体および薬物代謝酵素	0.93
脂肪酸合成	0.92
酸化	0.94
コレステロール合成	0.93
ステロイド代謝	0.94
葉酸代謝経路	0.85
脂肪性肝炎	0.94
胆汁うっ滞	0.96
肝線維化	0.89

また、経口固形製剤以外の各種剤形の後発医薬品についても肝障害リスクに関する製剤同等性の予測が可能であった。

##### (3) 既存薬からの未知の作用機序探索への T-LEX 法の応用

当初計画には無かった研究の成果として、T-LEX 法で評価した医薬品のヒト肝 mRNA 発現量に関する網羅的データ解析結果から、肝線維化の促進因子である CTGF や TGF- $\beta$  の mRNA 量を大幅に低下させる既存医薬品成分を見出すことができた。

T-LEX 法は、臨床試験とは異なるアプローチにより、製剤由来のヒト肝障害発症リスク

の予測が可能のため、販売時に十分な規模の臨床試験データの提供が困難な後発医薬品を臨床現場で安心して使用するための極めて有益な新技術である。今後は、ドラッグリポジショニング創薬の成功率を高める医薬品探索研究分野への応用も可能である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計3件)

Hatsune Enomoto, Hidehisa Tachiki, Takashi Shimada, Shin-Ichiro Nagatsuka, Mikiro Nakashima, Transcriptome analysis of human liver in chimeric PXB-Mouse® for risk marker identification associated with drug-induced liver injury, Toxicology Letters, 査読無、258S、S90 (2016)

Hatsune Enomoto, Hidehisa Tachiki, Takashi Shimada, Shin-Ichiro Nagatsuka, Mikiro Nakashima, Identification of possible biomarker genes for drug-induced liver injury using chimeric PXB-Mouse® with highly humanized liver, Toxicology Letters, 査読無、238S、S250 (2015)

Mikiro Nakashima, Hatsune Enomoto, Hidehisa Tachiki, Takashi Shimada, Shin-Ichiro Nagatsuka, Effects of irinotecan on hepatic gene expression in chimeric PXB-Mouse with highly humanized liver, Toxicology Letters, 査読無、229S、S235 (2014)

##### [学会発表](計11件)

Kaname Ohyama, Mikiro Nakashima, Reliable screening for drug repositioning study against liver disease and toxicology by gene expression analysis of a model mouse transplanted with human liver, 56<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology, March 12-16, 2017, Baltimore, USA

大山 要, 中嶋幹郎, ヒト肝細胞キメラマウスの遺伝子発現解析による肝疾患治療薬のドラッグリポジショニング的探索研究, 第26回日本医療薬学会年会, 2016年9月17-19日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

西村奈緒恵, 中嶋幹郎, T-LEX法を用いた抗がん剤のヒト肝障害リスク予測に関する研究, 第25回日本医療薬学会年会, 2015年11月21-23日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Hatsune Enomoto, Mikiro Nakashima, Identification of possible biomarker genes for drug-induced liver injury

using chimeric PXB-mouse® with highly humanized liver, 51<sup>st</sup> Eurotox, September 13-16, 2015, Porto, Portugal

中嶋幹郎, 薬学教育における「ジェネリック医薬品の安全性・副作用情報ビデオ」の効果の検証, 日本ジェネリック医薬品学会第9回学術大会, 2015年6月13-14日, アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

中嶋幹郎, T-LEX法を用いたテブ剤の肝障害リスクに関する製剤同等性予測試験, 日本薬学会第135年会, 2015年3月25-28日, 神戸学院大学(兵庫県・神戸市)

中嶋幹郎, T-LEX法を用いたジェネリック医薬品のヒト肝障害リスク予測に関する研究, 第47回日本薬剤師会学術大会, 2014年10月12-13日, 山形市民会館(山形県・山形市)

中嶋幹郎, ヒト肝細胞キメラマウスを用いたバラシクロビル製剤のヒト肝臓遺伝子発現への影響解析, 第24回日本医療薬学会年会, 2014年9月27-28日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Mikiro Nakashima, Effects of irinotecan on hepatic gene expression in chimeric PXB-Mouse with highly humanized liver, 50<sup>th</sup> Eurotox, September 7-10, 2014, Edinburgh, UK

中嶋幹郎, T-LEX法による薬剤性肝障害リスク予測データと臨床での薬剤性肝障害発生頻度データの比較解析, 日本ジェネリック医薬品学会第8回学術大会, 2014年7月12-13日, ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)

中嶋幹郎, ジェネリック医薬品の薬剤性肝障害リスク評価, 日本病院薬剤師会東北ブロック第4回学術大会, 2014年5月31-6月1日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中嶋 幹郎 (NAKASHIMA, Mikiro)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授  
研究者番号: 00260737

##### (2) 連携研究者

佐々木 均 (SASAKI, Hitoshi)  
長崎大学・病院(医学系)・教授  
研究者番号: 00170689

栄田 敏之 (SAKAEDA, Toshiyuki)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00304098

##### (3) 研究協力者

島田 卓 (SHIMADA, Takashi)

長塚 伸一郎 (NAGATSUKA, Shin-Ichiro)

立木 秀尚 (TACHIKI, Hidehisa)