

博士論文

末梢血中肝臓特異的 mRNA の安全性バイオマーカー
としての有用性に関する研究

平成 28 年度
大久保 慎吾

目次

略語一覧.....	iii
序論.....	1
第 I 章 薬剤性肝障害モデルラットを用いたコンセプト確認.....	5
第 1 節 緒言.....	5
第 2 節 実験材料と実験方法.....	6
I-2-i) 動物及び処置.....	6
I-2-ii) 血液生化学的検査.....	7
I-2-iii) 病理組織学的検査.....	8
I-2-iv) ラット臓器/組織、全血及び血漿からのトータル RNA 抽出.....	8
I-2-v) Reverse transcription (RT)-PCR による RNA 解析.....	8
第 3 節 結果.....	9
I-3-i) 候補 mRNA の肝臓特異性の確認.....	9
I-3-ii) 薬剤性肝障害ラットの末梢血における Alb 及び Ambp mRNA の検出.....	11
I-3-iii) 骨格筋障害モデルラットの末梢血における Alb 及び Ambp mRNA の解析.....	13
I-3-iv) 末梢血中セルフリーの Ambp mRNA の検出.....	15
第 4 節 考察.....	15
第 5 節 小括.....	19
第 II 章 新規血漿中肝臓特異的 mRNA の選定及び複数の肝毒性物質を用いた定量的評価.....	20
第 1 節 緒言.....	20
第 2 節 実験材料と実験方法.....	21
II-2-i) 動物及び処置.....	21
II-2-ii) 血液生化学的検査.....	24
II-2-iii) ラット臓器/組織及び血漿からのトータル RNA 抽出.....	24
II-2-iv) RT-PCR アッセイによる RNA 解析.....	25
II-2-v) リアルタイム定量 RT-PCR.....	25
II-2-vi) 病理組織学的検査.....	27
II-2-vii) 統計学的解析.....	27
第 3 節 結果.....	27
II-3-i) 新規末梢血中肝臓特異的 mRNA の探索.....	27
II-3-ii) 種々の肝毒性物質を投与したラットの血漿中肝臓特異的 mRNA の定量.....	29
II-3-iii) 血漿中肝臓特異的 mRNA と肝障害の程度の相関.....	33
II-3-iv) ラットにおける血漿中肝臓特異的 mRNA の経時的変化.....	35
第 4 節 考察.....	36
第 5 節 小括.....	40
第 III 章 臨床バイオマーカーとしての利用可能性の検証.....	46
第 1 節 緒言.....	41

第2節 実験材料と実験方法.....	42
III-2-i) 研究対象とした被験者/患者.....	42
III-2-ii) 肝動脈化学塞栓療法 (transcatheter arterial chemoembolization; TACE)及び肝動脈化学療法 (transcatheter arterial infusion; TAI)	43
III-2-iii) ヒト臓器/組織由来トータル RNA を用いた相対発現解析.....	43
III-2-iv) 血漿採取及び血漿からのトータル RNA 抽出	44
III-2-v) リアルタイム定量 RT-PCR による血漿中 mRNA の解析.....	45
III-2-vi) 統計学的解析	45
第3節 結果.....	46
III -3-i) ヒト 10 臓器/組織における肝臓特異的 mRNA の発現	46
III -3-ii) 健常人及び肝障害患者における血漿中肝臓特異的 mRNA の定量	47
III -3-iii) 血漿中肝臓特異的 mRNA と肝障害の程度の相関.....	50
III -3-iv) TACE 施術後の血漿中肝臓特異的 mRNA の変化.....	54
第4節 考察.....	56
第5節 小括.....	63
総括.....	64
本論文内容の誌上発表.....	68
謝辞.....	69
参考文献.....	70

略語一覧

Adh1	Alcohol dehydrogenase 1
AFB1	Aflatoxin B1
Ambp	α 1-microglobulin/bikunin precursor
Alb	Albumin
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
APAP	Acetaminophen
ApoH	Apolipoprotein h
AST	Aspartate aminotransferase
BBZ	Bromobenzene
BPVC	Bupivacaine HCl
BSO	Buthionine sulfoximine
cDNA	Complementary DNA
CK	Creatinine kinase
Cyp2e1	Cytochrome P450 2E1
D-gal	D-galactosamine HCl
DNA	デオキシリボ核酸
DNase	デオキシリボヌクレアーゼ
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
FDA	米国食品医薬品局
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gc	Group specific component
GGT	Gamma-glutamyl transferase

JSCC	日本臨床化学会
LPS	Lipopolysaccharide
MC	メチルセルロース
mRNA	Messenger RNA
NMOR	N-nitrosomorpholine
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	リボ核酸
RNase	リボヌクレアーゼ
RT	Reverse transcription
Serpina1	Serpin peptidase inhibitor A1
TAA	Thioacetamide
TACE	Transcatheter arterial chemoembolization
TAI	Transcatheter arterial infusion
T-Bil	Total bilirubin
ULN	Upper limit of normal
Vtn	Vitronectin
v/v	Volume-to-volume ratio
w/v	Weight-to-volume ratio
ZTT	Zinc sulfate turbidity test

序論

薬剤性肝障害は、医薬品またはその候補化合物の副作用により起こる肝臓への障害であり、ときに重症化し、生体肝移植あるいは死亡にも繋がる可能性があることから (Björnsson and Olsson, 2005)、医薬品を開発する製薬会社、開発並びに使用を規制する当局及び医薬品を処方する医療機関にとって憂慮すべき課題であり、何よりも服薬する患者/被験者にとって極めて大きな問題と言える。また、薬剤性肝障害は、医薬品候補化合物が臨床開発段階で中止になる、あるいは上市された医薬品が市場から撤退する主要な原因のひとつであり (Kaplowitz, 2005; Lee, 2003; Park et al., 2005)、長年にわたり製薬会社、規制当局及び医療機関を悩ませてきた重大な副作用である。多くの医薬品あるいは医薬品候補化合物が薬剤性肝障害を誘発することが知られており、米国食品医薬品局 (FDA)に新規承認される薬剤の約3分の1が、臨床開発中に何らかの肝障害を示唆する所見が認められたが故に、医薬品添付文書における「ブラックボックス警告」にて肝障害ポテンシャルについて言及され、臨床での使用制限に繋がるケースがある (Shi et al., 2015)。また、薬剤性肝障害は米国における急性肝障害の約半数を占めるという報告もある (Ostapowicz et al., 2002)。さらに、より事態を深刻にしているのは、前臨床における動物を用いた安全性試験ではヒトにおける薬剤性肝障害の予測が困難であることであり、臨床開発段階に入って初めて薬剤性肝障害が認められるケースが散見される (Ballet, 2015; Olson et al., 2000)。よって、被験者/患者の安全性確保及び臨床試験における医薬品開発の成功確率の向上に向けて、肝障害を適確にモニターし評価することは、極めて重要な課題である。

この課題を克服するための手段として、バイオマーカーの活用が挙げられる。現在、肝障害を適切に評価するために様々なバイオマーカーが利用されている (Clarke et al., 2016)。中でも、血漿/血清中 alanine aminotransferase (ALT) や aspartate aminotransferase (AST) などの肝逸脱酵素は、肝障害バイオマーカーのゴールドスタンダードとして古くから臨床及び前臨床において汎用されてきた (Senior, 2012)。血漿/血清中 ALT 及び

AST は、測定系が十分に確立されていることに加え、自動分析装置等による安価で簡便かつ迅速な測定が可能である点や、豊富なバックグラウンドデータから正常範囲としての上限値を設定しやすいといったメリットがある (Liu et al., 2014)。一方で、血漿/血清中 ALT 及び AST を肝障害バイオマーカーとして利用する上での欠点として、これらの肝臓特異性の低さが指摘されている。実際、ALT 及び AST は肝臓以外の臓器/組織においても発現が認められるため、骨格筋障害 (Nathwani et al., 2005; Nosaka, 1996)、心筋梗塞 (Giesen et al., 1989)、肥満 (Ruhl and Everhart, 2003)や火傷 (Halkes et al., 2002)など、肝障害以外の種々の要因によっても血漿/血清中で増加し得る。また、前臨床安全性試験においては、肝臓に病理組織学的な傷害性変化が認められないにも関わらず、血漿/血清中 ALT あるいは AST が高値を示すケースが散見される (Wang et al., 2011)。このように、十分な肝臓特異性を有していない血漿/血清中 ALT 及び AST のみをバイオマーカーとして利用する場合、適切な肝障害の検出及び評価が困難になることがある。こうした背景から、肝逸脱酵素マーカーを補足するために様々な肝障害バイオマーカーが開発され、臨床応用を目指した研究が加速している (Robles-Diaz et al., 2016)。例えば、serum F protein、 α -glutathione S-transferase、arginase-1、high mobility group box-1、keratin-18 などは有益な肝障害バイオマーカーとして報告されている (Callaghan et al., 1994; Clarke, et al., 2016; Giffen et al., 2002; Murayama et al., 2007)。しかし、これらの肝臓特異性は依然として十分ではなく、また enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)などの免疫学的な手法による測定を主としていることから、測定における煩雑さや高額なコスト、抗体のアベイラビリティによる検出の動物種間差などがバイオマーカーとしての利用拡大の障壁となっている (Ozer et al., 2008)。従って、被験者/患者の安全管理及び医薬品候補化合物の開発支援を向上させるための新規肝障害バイオマーカーには、十分な肝臓特異性に加え、測定の汎用性や簡便さ、実験動物とヒトとをブリッジング可能であること等が求められる。

Mandel と Metais は、ヒト血漿及び血清中にセルフリーのデオキシリボ核酸 (DNA)が存在することを 1948 年に発表した (Mandel and Metais, 1948)。その後の研究

により、現在では末梢血中に DNA だけでなくリボ核酸 (RNA) も存在することが明らかになっている (Swaminathan and Butt, 2006)。これら RNA は、正常な細胞やアポトーシス/ネクロシス細胞から末梢血中へ放出され (Fleischhacker, 2006; Jahr et al., 2001)、主にエクソソームや shedding microvesicles、アポトーシス小体などの膜成分に内包された状態で存在すると考えられている (Mathivanan et al., 2010)。近年、障害あるいは病態組織由来の末梢血中のセルフリーの核酸、特に RNA をバイオマーカーとして利用する研究が注目されている。癌の分野において、末梢血中セルフリー messenger RNA (mRNA) のバイオマーカーとしての応用可能性が次々と報告された。癌患者の末梢血において、tyrosinase mRNA や heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 mRNA、human epidermal growth factor receptor type2 mRNA などの癌に関連した mRNA が健常人に比べて高濃度で検出され、それらが癌診断のバイオマーカーとして利用できる可能性が示された (Chen et al., 2000; Fleischhacker et al., 2001; Kopreski et al., 1999; Silva et al., 2001)。その後、糖尿病性網膜症の患者の末梢血中で、網膜特異的に発現している rhodopsin mRNA が増加していることも報告された (Hamaoui et al., 2004)。このように、臓器/組織由来の mRNA のうち、臓器/組織特異的に発現しているものは特異性の高いバイオマーカーになることが期待される。さらに、polymerase chain reaction (PCR) による検出が可能であること、ターゲット mRNA の塩基配列さえ既知であれば容易にアッセイ系を確立することができ、抗体を用いた測定で問題となりやすい動物種間の壁を容易に克服できることに加え、近年の遺伝子発現解析技術の飛躍的な向上に伴い、各種臓器/組織で特異的に発現している遺伝子に関する情報を、公共データベース等を通じて容易に入手可能となったことも、これら臓器/組織特異的 mRNA をバイオマーカーとして利用するうえでメリットとなる。

この臓器/組織特異的 mRNA は、薬剤性肝障害のバイオマーカーとしても応用可能と考えられる。つまり、薬物によって障害を受けた肝臓由来の肝臓特異的 mRNA を末梢血中で検出することで、先述のニーズを満たす新規肝障害バイオマーカーとなることが期待される。そこで本研究では、薬剤性肝障害モデルラット及び肝障害患者

の末梢血中肝臓特異的 mRNA を解析し、それらの肝障害バイオマーカーとしての有用性を検証することを目的とした。まず第 I 章では、末梢血中肝臓特異的 mRNA のバイオマーカーとしての可能性を検討するため、遺伝子発現データベース及びラット全身臓器/組織における発現分布解析結果から選定した 2 種の肝臓特異的 mRNA について、薬剤性肝障害を誘発したラットの末梢血における検出を試みた。また、末梢血中肝臓特異的 mRNA の肝障害特異性を検証するため、薬剤性骨格筋障害モデルラットを用いた解析を行った。続いて第 II 章では、新たに 2 種の肝臓特異的 mRNA を選定した後、種々の肝毒性物質を投与したラットの血漿中でそれらを定量的に検出した。さらに、既存の肝障害マーカーである ALT 及び病理組織学的な肝細胞障害スコアとの相関、ならびに肝障害誘発後の血漿中肝臓特異的 mRNA の経時的な推移を調べた。そして第 III 章では、臨床バイオマーカーとしての応用可能性を検証するため、肝障害患者の血漿中肝臓特異的 mRNA を測定した。また、肝癌治療のための手術により肝臓限定的に傷害を受けた患者及び心筋障害患者の血漿を解析することで、ヒトにおいて血漿中肝臓特異的 mRNA の肝障害特異性を検証した。本研究により、末梢血中肝臓特異的 mRNA は、前臨床及び臨床ともに利用可能で、新薬の安全性を従来以上に精度良く評価できるバイオマーカーであることが示されたため、以下に詳述する。

第 I 章 薬剤性肝障害モデルラットを用いたコンセプト確認

第 1 節 緒言

安全性バイオマーカーは、新規医薬候補品の前臨床安全性試験及び臨床試験において、薬剤投与による生体の有害反応をモニターするうえで重要な役目を果たす。中でも、臨床において与えるインパクトが大きい薬剤性肝障害を適切に評価することは極めて重要であり、そのために多くのバイオマーカーが前臨床及び臨床において利用されている。しかし、これらの多くは肝障害を評価するうえで十分な肝臓特異性を有しているとは言い難い。例えば、肝逸脱酵素である血漿/血清中 ALT 及び AST は肝障害のバイオマーカーとして世界中で長年利用されているが、生体内での発現は肝臓特異的ではないことから骨格筋障害など肝障害以外の要因でも増加しうる (Nathwani, et al., 2005; Nosaka, 1996)。さらに、前臨床安全性試験においては病理組織学的に肝臓への影響が認められない場合でも血漿/血清中 ALT/AST が増加しているケースがある (Wang, et al., 2011)。よって、薬剤性肝障害をより適確に検出し、評価するための新しいバイオマーカーの開発が望まれている。

RNA 分子は血漿及び血清中で極めて不安定であると考えられていた (Chan et al., 2003)。ところが、最近になって臓器/組織由来の mRNA が末梢血中で検出可能なレベルで存在することが明らかとなり、臓器/組織障害のバイオマーカーとして利用できる可能性が示された (Hamaoui, et al., 2004)。さらに、近年の遺伝子発現解析技術の目覚ましい発達に伴い、各種臓器/組織において特異的に発現している遺伝子情報のデータベース化が進んでいることから、バイオマーカーの候補となり得る臓器/組織特異的 mRNA に関する情報へ容易にアクセス可能となった。

こうした背景を基に、本研究では末梢血中肝臓特異的 mRNA の肝障害バイオマーカーとしての可能性に着目した。末梢血において肝臓特異的な mRNA を検出することができれば、特異性の高い肝障害バイオマーカーとして利用可能と考えられた。

この可能性について検討するため、まず本章では D-galactosamine HCl (D-gal)及び Acetaminophen (APAP)の 2 種の肝毒性物質を用いて薬剤性肝障害モデルラットを作製し、データベースより選定した albumin (Alb)及び α 1-microglobulin/bikunin precursor (Ambp) mRNA について末梢血における検出を試みた。

第 2 節 実験材料と実験方法

I-2-i) 動物及び処置

雄性 CrI:CD(SD)ラット (10~11 週齢)を日本チャールス・リバー株式会社 (Tokyo, Japan)から購入し、個別にステンレス製金網ケージに入れ、温度 20~26°C、湿度 40~80%に制御された動物室において 12 時間の明暗交代下で飼育した。水および固形飼料として CR-LPF (Oriental Yeast, Tokyo, Japan)を自由摂取させた。全ての動物実験は、実験動物の管理と使用に関する指針に準じて実施され、実験計画は予め武田薬品工業株式会社の動物実験倫理委員会の承認を得た。

正常ラットの各種臓器/組織における遺伝子発現の検討では、ラットをエーテル麻酔下にて腹部大動脈からの放血により安楽死させた後、42 臓器/組織 (Figure I-1)を安楽死後 30 分以内に以下の要領で採材した。骨髄、大腿骨及び全血を除く全臓器/組織は RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA)に浸漬し、total RNA 抽出まで 4°Cで保存した。骨髄は大腿骨よりシリンジと注射針を用いて回収し、QIAzol LS reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)と混合した後、total RNA 抽出まで-80°Cで保存した。大腿骨は、骨髄採取後に RNAlater に 1 時間浸漬した後、付着した骨格筋を除去した。その後、液体窒素にて凍結し、Cryo-Press Frozen Cell Crusher (Microtec, Chiba, Japan)を用いて破碎後、total RNA 抽出まで-80°Cで保存した。全血は PAXgene RNA 採血管 (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland)に採取し、室温で 2 時間静置した後、total RNA 抽出まで-80°Cで保存した。

薬剤誘発性肝障害モデルラットを作製するために、D-gal (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)及び APAP (Wako Pure Chemical Industries) を使用した。D-gal

は生理食塩水に溶解し、800 mg/kg の用量で 10 匹の雄性ラットに単回腹腔内投与した。APAP は 0.5% (weight-to-volume ratio, w/v)メチルセルロース (MC)溶液 (Metolose SM-100; Shin-Etus Chemical, Tokyo, Japan)に懸濁し、1500 mg/kg の用量で 5 匹の雄性ラットに単回経口投与した。対照動物には、生理食塩水 (10 匹)もしくは 0.5% (w/v) MC 溶液 (5 匹)を同様に投与した。投与 2 あるいは 24 時間後に、エーテル麻酔下で腹部大動脈より血液生化学的検査用にヘパリン処理採血管 (Sekisui Medical, Tokyo, Japan)、全血からの total RNA 抽出用に PAXgene RNA 採血管、及び血漿からの total RNA 抽出用にエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)処理採血管 (Vacutainer; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)で採血した後、腹部大動脈を切断し、放血により安楽死させた。肝臓を摘出後、病理組織学的検査用に外側左葉を 10% (volume-to-volume ratio, v/v) 中性緩衝ホルマリン液で固定した。APAP 投与による主要臓器/組織における Ambp 遺伝子発現への影響の検証では、APAP を 1500 mg/kg の用量で 3 匹の雄性ラットに単回経口投与し、13 臓器/組織を上述の方法と同様に採材した。十二指腸、空腸、回腸、盲腸及び結腸の total RNA はプールし、消化管 total RNA とした。

骨格筋傷害モデルラットを作製するために、Bupivacaine HCl (BPVC; LKT Laboratories, St Paul, MN)を使用した。BPVC を生理食塩水に溶解して 0.5% (w/v)とし、12 匹の雄性ラットに 0.4 mL を両肢の前脛骨筋に注射した。投与 2、12 及び 24 時間後に、エーテル麻酔下で腹部大動脈よりヘパリン処理採血管及び PAXgene RNA 採血管で採血した。両肢の前脛骨筋を摘出し、病理組織学的検査用に 10% (v/v)中性緩衝ホルマリン液で固定した。

I-2-ii) 血液生化学的検査

ヘパリン処理採血管に採取したラットの血液を遠心分離し、血漿を得た後、Hitachi 7600 (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)を用いて、日本臨床化学会 (JSCC)標準化法により ALT、AST 及び creatine kinase (CK)を測定した。

I-2-iii) 病理組織学的検査

10% (v/v)中性緩衝ホルマリン液にて固定した肝臓及び骨格筋をパラフィン包埋後、厚さ約 4 μm に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、顕微鏡下で観察した。

I-2-iv) ラット臓器/組織、全血及び血漿からの total RNA 抽出

約 50~200 mg の各臓器/組織から EZ1 RNA Universal Tissue Kit (QIAGEN)及び Bio Robot EZ2 (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。PAXgene RNA 採血管に採取した全血から、PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。EDTA 処理採血管に採取した血液を 7500 \times g、4°C で 10 分間遠心分離し血漿を得た後、孔径 0.2 μm の酢酸セルロース膜 (Advantec Toyo Kaisha, Tokyo, Japan)にてフィルター濾過し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。オプションのデオキシリボヌクレアーゼ (DNase)処理を含めた全ての実験操作は、キットのメーカーの推奨プロトコールに従った。total RNA 濃度は、NanoDrop ND-8000 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)を用いて、波長 260 nm における吸光度で測定した。total RNA サンプルは使用まで-80°Cで保管した。

I-2-v) Reverse transcription (RT)-PCR による RNA 解析

Alb、Ambp 及び glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)の RT-PCR は、臓器/組織、全血及び血漿由来の total RNA 200 ng を用いて実施した。total RNA は ExScript RT reagent Kit (Takara, Shiga, Japan)を用いて逆転写した。Alb、Ambp 及び Gapdh mRNA を検出するための各プライマーは、DNA の検出を避けるためゲノム上の少なくとも一つのイントロンを含む領域で設計した。各プライマーペアの塩基配列を以下に示す：Alb, 5'-GAT GCC GTG AAA GAG AAA GC-3' (forward)及び 5'-CGT GAC AGC ACT CCT TGT TG-3' (reverse)、Ambp, 5'-GCC TCA CTT TGA AGG CTG AC-3' (forward) and 5'-TAC TGG TCA CGC TGA TCT CG-3' (reverse)及び Gapdh,

5'-GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA-3' (forward) 及び 5'-CTA AGC AGT TGG TGG TGC AG-3' (reverse)。PCR は Bca BEST RNA PCR Kit (Takara) 及び PCR Thermal Cycler Dice (Takara) を用いて実施した。これらのプライマーペアによる Alb、Ambp 及び GAPDH の増幅産物の塩基長はそれぞれ、196、207 及び 202 塩基であった。PCR の条件を以下に示す：初期変性 (95°C、5 分)、30~35 サイクルの変性 (95°C、1 分)、アニーリング (61°C、1 分) 及び伸長 (72°C、2 分) 並びに最終伸長 (72°C、5 分)。PCR 増幅産物を 4% アガロースゲルにて電気泳動し、臭化エチジウムにより染色後、紫外線照射下で写真を撮影し可視化した。

第 3 節 結果

I-3-i) 候補 mRNA の肝臓特異性の確認

肝臓特異的遺伝子として最も広く知られている遺伝子の一つである Alb を選択した。また、Human reference database for gene expression analysis (RefExA, <http://refex.dbcls.jp/index.php?lang=en>) 及び文献情報 (Lindqvist et al., 1992; Salier et al., 1993) を参考に、正常な肝細胞で高発現しており、かつ肝臓特異的な遺伝子として Ambp を選択した。Gapdh は RT-PCR アッセイの内部標準として使用した。前臨床安全性試験で標準的に検査される 42 臓器/組織における Alb 及び Ambp mRNA の発現を、RT-PCR アッセイにより調べた。代表例における結果を Figure I-1 に示した。Alb 及び Ambp の増幅産物のバンドは、想定された塩基長 (Alb : 196 塩基対及び Ambp : 207 塩基対) の位置に検出された。Alb mRNA の発現は、予想したとおり肝臓において最も強かったが、肺、胃、十二指腸、胸腺、膵臓、大動脈、食道、甲状腺、乳腺、気管、精巣、褐色脂肪組織、白色脂肪組織及び子宮においてもわずかに検出された。しかし、これら臓器/組織の RT-PCR アッセイにおけるバンドのシグナル強度は肝臓と比較して顕著に弱かった。Ambp mRNA は肝臓において検出され、本実験で調べた他の全ての臓器/組織においては検出されなかった。Gapdh mRNA は、全ての臓器/組織において同程度検出された。以上より、Alb 及び Ambp mRNA の高い肝臓特異性が確認され

た。

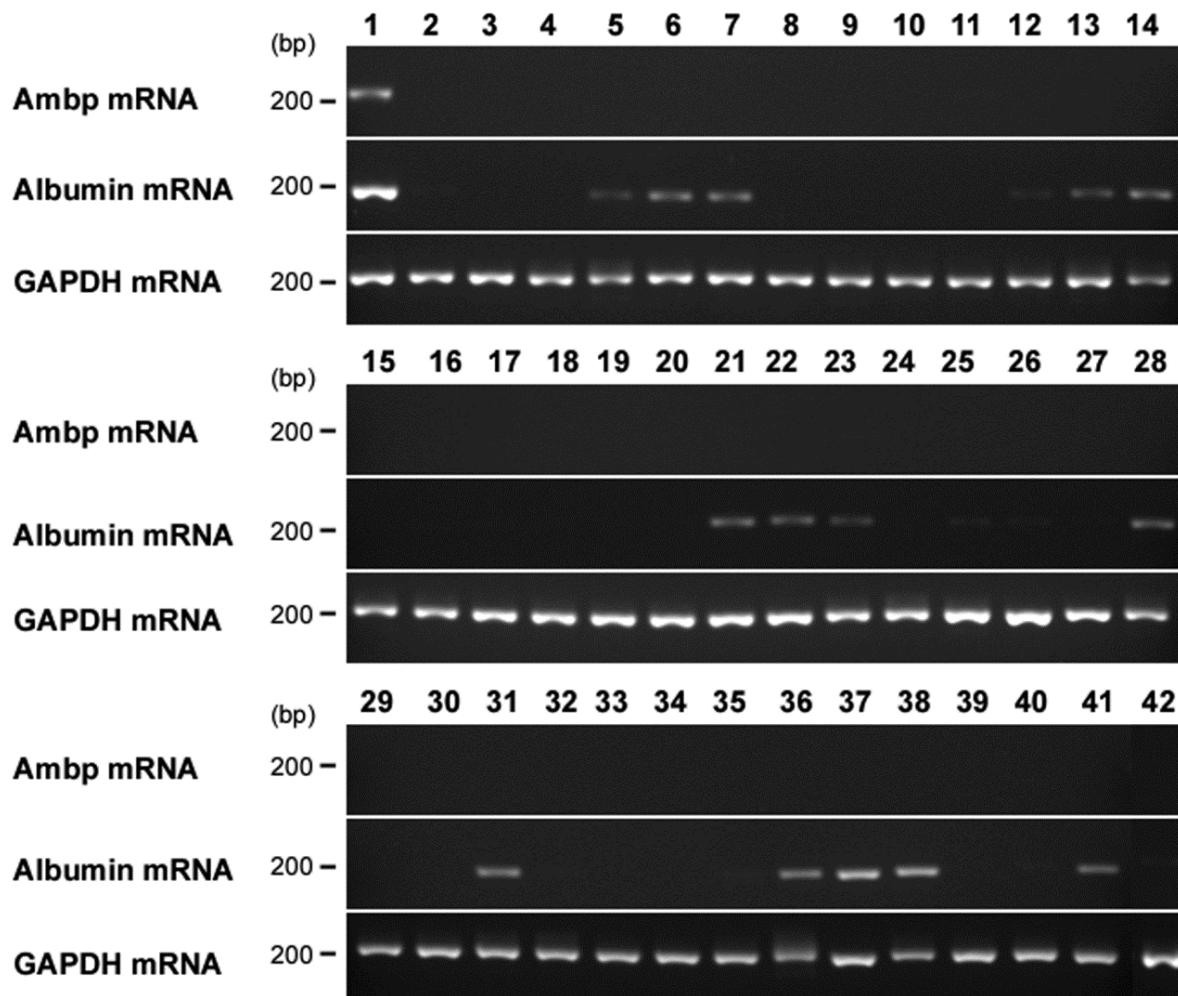


Figure I-1. The expression of Ambp and Alb mRNAs in various rat organs and tissues.

The organs and tissues examined were liver (lane 1), kidney (lane 2), heart (lane 3), spleen (lane 4), lung (lane 5), stomach (lane 6), duodenum (lane 7), jejunum (lane 8), ileum (lane 9), appendix (lane 10), colon (lane 11), submandibular lymph node (lane 12), thymus (lane 13), pancreas (lane 14), submandibular gland (lane 15), sublingual gland (lane 16), Harderian gland (lane 17), eyeball (lane 18), cerebrum (lane 19), cerebellum (lane 20), aorta (lane 21), esophagus (lane 22), thyroid gland (lane 23), hypophysis (lane 24), adrenal gland (lane 25), skeletal muscle (lane 26), dermis (lane 27), mammary gland (lane 28), femur (lane 29), bone marrow (lane 30), trachea (lane 31), urinary bladder (lane 32), prostate (lane 33), epididymis (lane 34), seminal vesicle (lane 35), testis (lane 36), brown adipose tissue (lane 37), white adipose tissue (lane 38), vagina (lane 39), ovary (lane 40), uterus (lane 41), and whole blood (lane 42). The lowest panel shows the detection of GAPDH mRNA as a reference.

I-3-ii) 薬剤性肝障害ラットの末梢血における Alb 及び Ambp mRNA の検出

薬剤性肝障害モデルラットを作製するための薬剤として、汎用される D-gal 及び APAP を使用した。これらは、それぞれ異なるメカニズムによって肝障害を誘発することが知られている (El-Mofty et al., 1975; James et al., 2003)。D-gal 及び APAP 投与 24 時間後において、血漿中 ALT 及び AST が顕著に増加した (Figure I-2A)。薬剤投与 24 時間後の肝臓切片のヘマトキシリン・エオジン染色像を Figure I-3 に示した。D-gal を投与したラットでは、変性、単細胞壊死及び炎症性細胞浸潤が認められた。APAP を投与したラットでは、小葉中心性の肝細胞壊死及び炎症性細胞浸潤が認められた。末梢血を用いた RT-PCR アッセイの結果、D-gal あるいは APAP 投与 24 時間後において Alb 及び Ambp mRNA が全例において検出された (Figure I-2A)。一方、生理食塩水あるいは 0.5% (w/v) MC 溶液を投与した対照動物においては、Alb 及び Ambp mRNA は検出されなかった。APAP を投与した 1 例 (Rat No. 3) では、他の APAP 投与ラットと比較して ALT 及び AST の増加並びに病理組織学的変化の程度は小さかったが、Alb 及び Ambp mRNA が検出された。

続いて、末梢血中 Alb 及び Ambp mRNA が肝障害の初期段階で検出されるか否か検証した。末梢血中 Alb mRNA は、D-gal 投与 2 時間後において検出され、このとき血漿中 ALT 及び AST に変化はなかった (Figure I-2B)。一方、Ambp mRNA は本実験条件においては末梢血中で検出されなかった。

APAP は、腎臓や心臓などの肝臓以外の臓器に対しても毒性変化を誘発することが知られている (Thomas, 1993)。そこで、APAP 投与によって肝臓以外の臓器/組織において Ambp 遺伝子発現が異所的に誘導されていないことを確認するため、APAP を投与したラットの主要 9 臓器/組織における Ambp mRNA レベルを調べた (Figure I-2C)。肝臓において Ambp mRNA は明確に検出され、肺を除く全ての臓器/組織においては検出されなかった。肺では Ambp mRNA はわずかに検出されたが、APAP を投与したラット全例において共通して認められる現象ではなかったことから、Ambp の遺伝子発現誘導を反映した変化ではないと考えられた。Gapdh mRNA は、

全ての臓器/組織において同程度検出された。

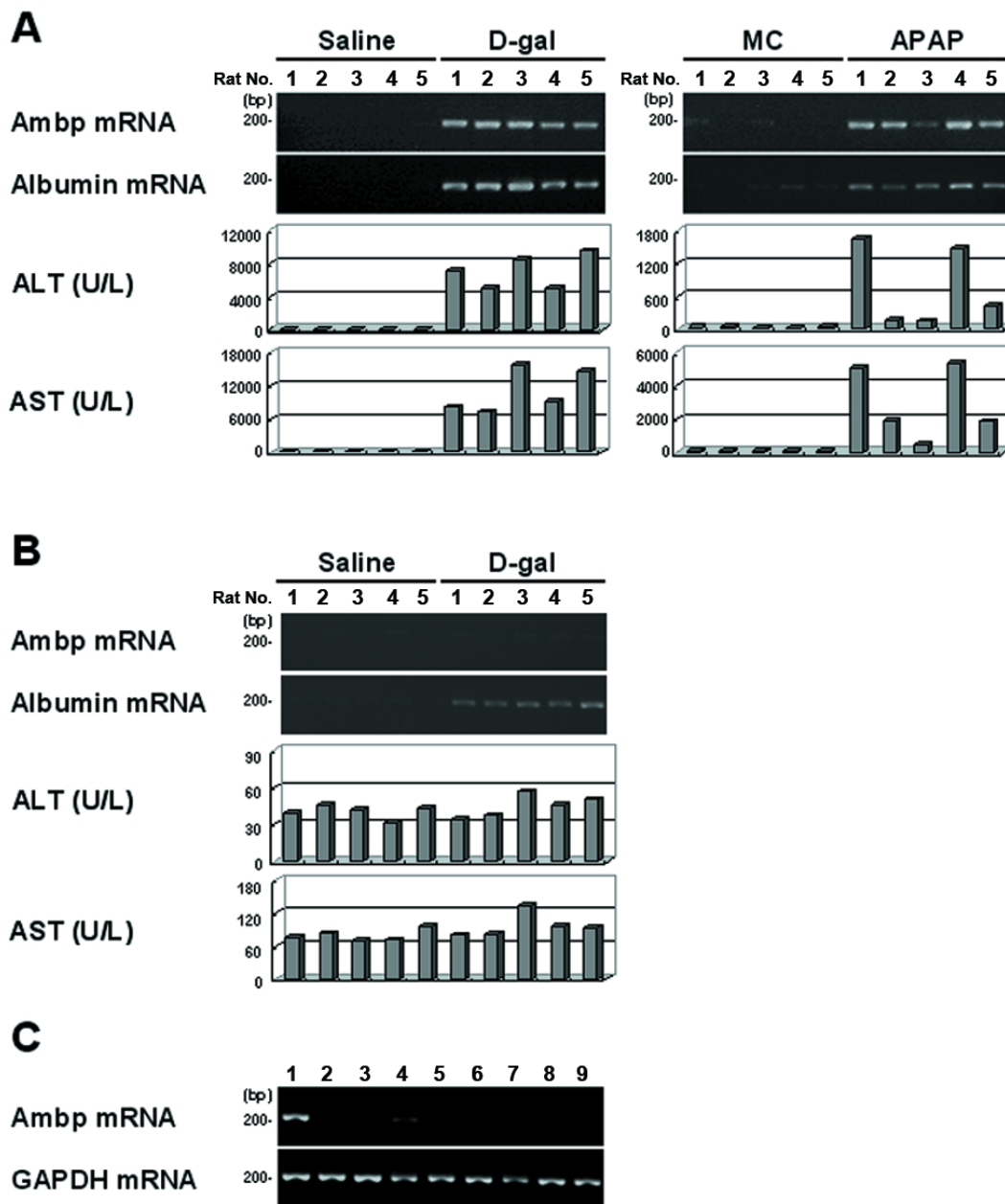


Figure I-2. Detection of Ambp and Alb mRNAs in peripheral blood from rats with chemical-induced hepatotoxicity.

(A) Shows 24 h after administration of either D-gal, 800 mg/kg, or APAP, 1500 mg/kg. MC solution, 0.5% (w/v). (B) Shows 2 h after administration of D-gal, 800 mg/kg. (C) Ambp gene expressions were examined in nine major organs/tissues 24 h after administration of APAP, 1500 mg/kg. Panels show representative results from one animal. The tissues examined were liver (lane 1), kidney (lane 2), heart (lane 3), lung (lane 4), spleen (lane 5), stomach (lane 6), testis (lane 7), skeletal muscle (lane 8), and intestine (lane 9). The lower panel shows the detection of GAPDH mRNA as a reference.

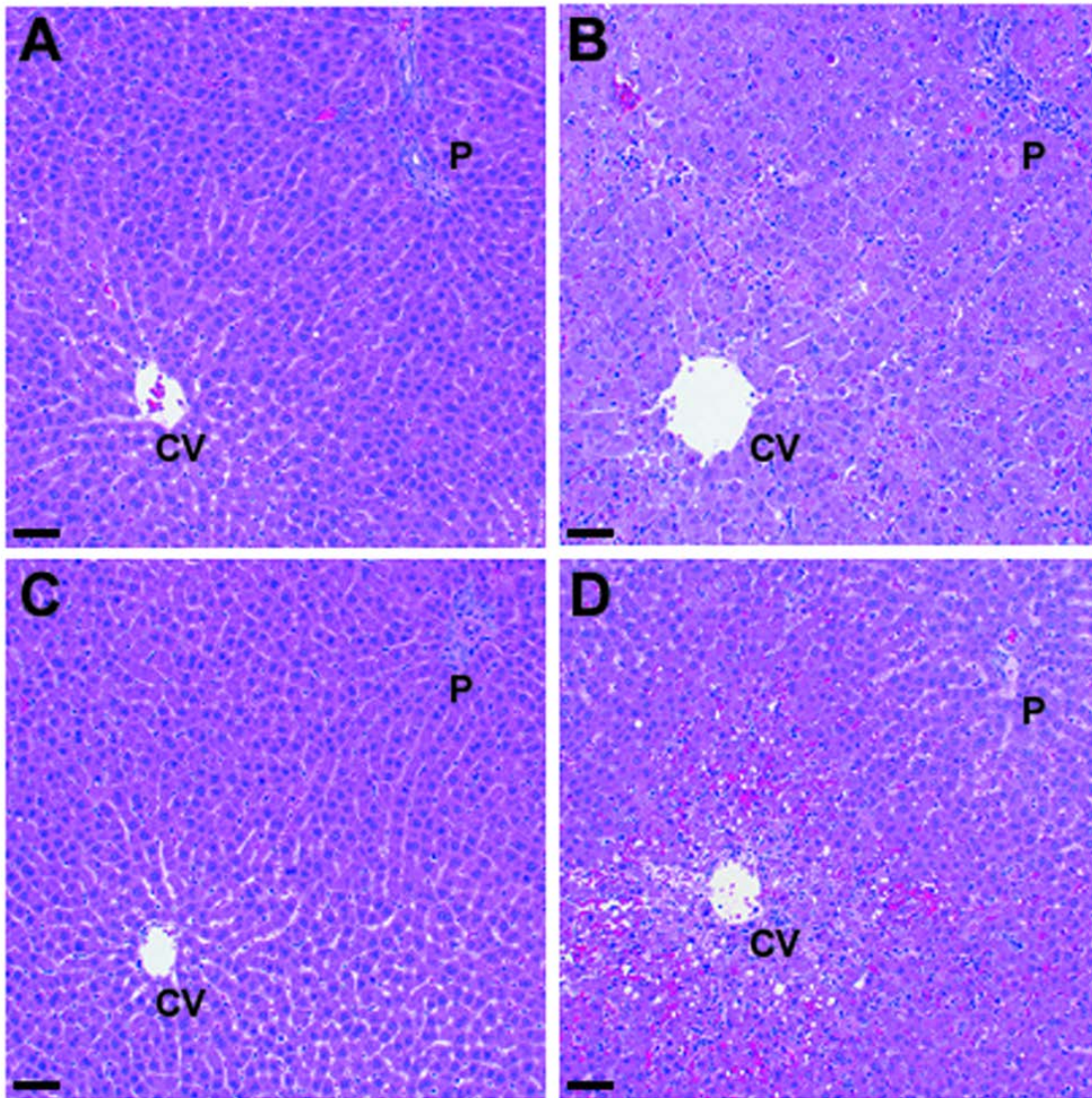


Figure I-3. Hematoxylin- and eosin-stained sections of liver from rats 24 h after administration of saline (A), 800 mg/kg D-gal (B), 0.5% (w/v) MC solution (C), and 1500 mg/kg APAP (D).

CV, central vein; P, portal vein. Bars = 100 μ m.

I-3-iii) 骨格筋障害モデルラットの末梢血における Alb 及び Ambp mRNA の解析

血漿/血清中 ALT 及び AST は、肝障害のみならず、骨格筋障害などの他の要因によっても増加することが知られている。そこで、BPVC 筋肉内投与による骨格筋障害モデルラットにおいて、末梢血中 Alb 及び Ambp mRNA が検出されるか否か検討した。BPVC 投与前、投与 2、12 及び 24 時間後に血液生化学的検査を実施した結果、投与 2 時間後において血漿中 CK が顕著に増加したことから、骨格筋障害が誘発され

ていることが確認された (Figure I-4)。血漿中 CK は、投与 12 時間後以降は正常値を示した。血漿中 ALT 及び AST は、投与 12 時間後に増加のピークが認められた。病理組織学的検査では、BPVC を投与した全例において明確な骨格筋細胞の壊死が認められたが、肝臓への影響は認められなかった (data not shown)。このとき、末梢血中 Alb 及び Ambp mRNA はいずれの時点においても検出されなかった。

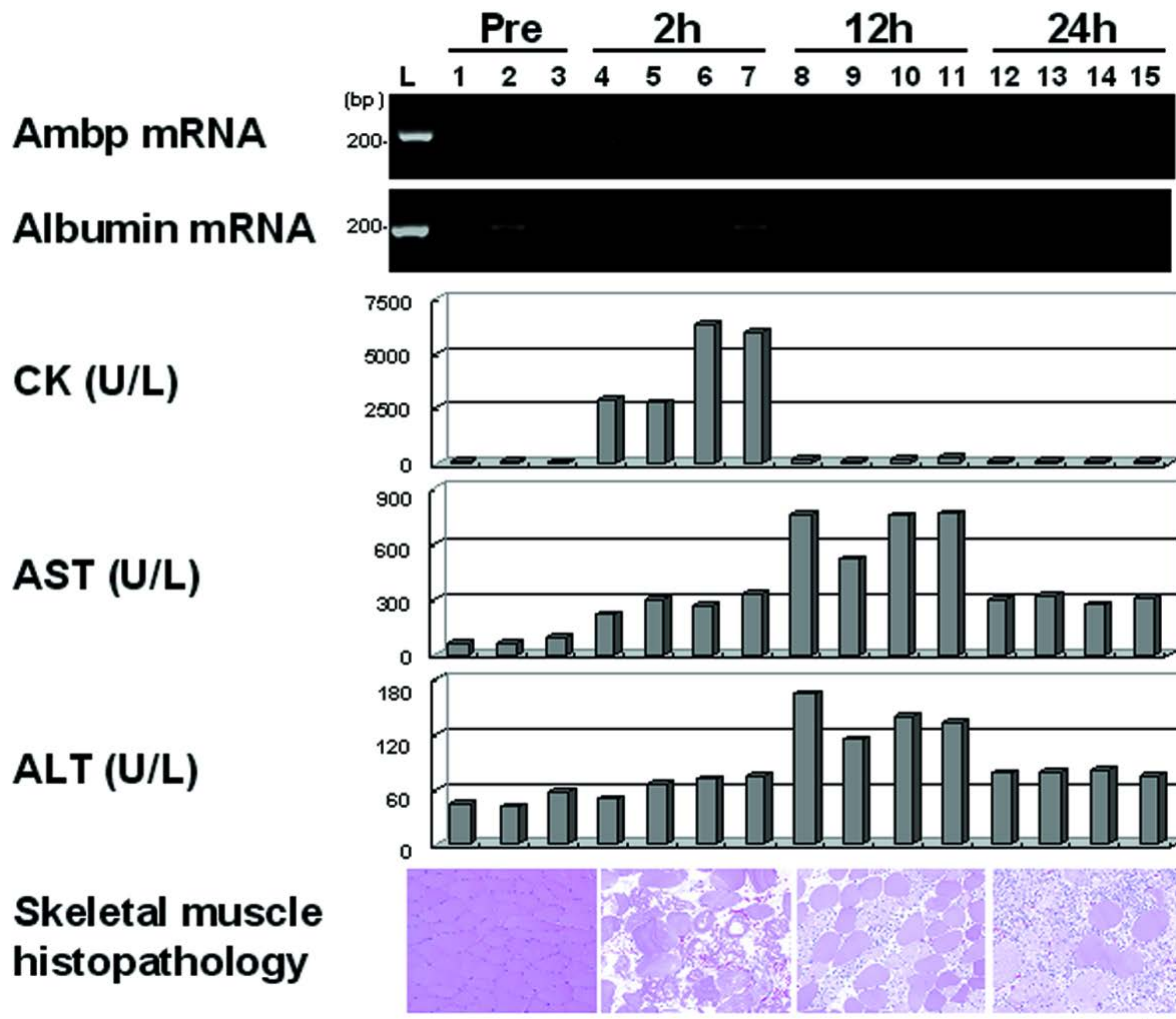


Figure I-4. Undetectable Ambp and Alb mRNAs in peripheral blood from rats with BPVC-induced skeletal muscle damage.

The numbers represent animal number in each group. L, liver. Representative hematoxylin- and eosin-stained sections of tibialis anterior before (pre) and 2, 12, and 24 h after dosing are shown. Bar = 100 µm.

I-3-iv) 末梢血中セルフリーの Ambp mRNA の検出

前項までの実験では、採血後に速やかに RNA を安定化させることが可能な PAXgene RNA 採血管を用いて採取した全血から total RNA を抽出し、mRNA を解析した。しかし、この方法では血漿中セルフリーの mRNA と血球細胞由来の mRNA とを区別せずに解析している。そこで、末梢血における mRNA の存在部位を確認するために、遠心分離により得た血漿を孔径 0.2 μm のフィルターで濾過した後に total RNA を抽出した。0.2 μm の孔径は、血漿に細胞が混入した場合でもそれを除去するのに十分なサイズであると考えられる。Ambp mRNA は、D-gal を投与した全例において、全血及びフィルターろ過した血漿いずれにおいても検出された (Figure I-5)。RT-PCR アッセイにおける Ambp mRNA のシグナル強度は、全血と比較してフィルターろ過した血漿においてわずかに減少した。この結果から、肝障害を誘発したラットの末梢血においてセルフリーの Ambp mRNA が存在することが示唆された。

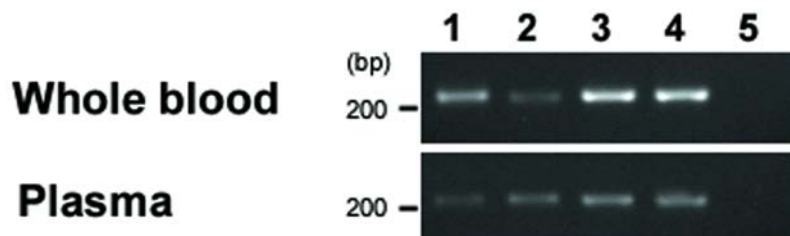


Figure I-5. Detection of Ambp mRNA in whole blood and plasma from D-gal-treated rats.

Ambp mRNA was detected in both whole blood and the filtered plasma from rats (four rats, lanes 1–4) with D-gal-induced liver damage 24 h after dosing. Lane 5 represents a water blank.

第4節 考察

一般的に RNA 分子は、リボヌクレアーゼ (RNase)により容易に分解され、化学的に不安定であることが知られている。従って、セルフリーの RNA は末梢血中に存在し得ないと推測される。しかし、Kopreski らは悪性黒色腫の患者の血清中に tyrosinase mRNA が検出されることを報告している (Kopreski, et al., 1999)。さらに、

Hamaoui らは網膜特異的 rhodopsin mRNA が糖尿病性網膜症の患者の末梢血中で増加していることを見出した (Hamaoui, et al., 2004)。本章では、末梢血中の肝臓特異的 mRNA が、薬剤誘発性肝障害を検出するための安全性バイオマーカーとして利用可能か否か、そのコンセプトを確認することを目的とし、薬剤性肝障害モデルラットの末梢血において肝臓特異的 mRNA の RT-PCR アッセイによる検出を試みた。

Alb 及び Ambp mRNA を肝臓特異的 mRNA バイオマーカーの候補として選定し、メカニズムの異なる 2 種の肝毒性化合物、D-gal 及び APAP を投与したラットの末梢血においてこれらの mRNA が検出されるか否か検証した。既存の血液生化学マーカー及び肝臓の病理組織学的検査の結果から、いずれの化合物によっても肝障害が誘発されていることを確認した。このとき、2 つの肝臓特異的 mRNA は投与 24 時間後において化合物を投与した全例の末梢血中で検出された。興味深いことに、Alb mRNA は D-gal 投与 2 時間後に末梢血中で検出され、この時点では血漿中 ALT 及び AST に変化はみられず、肝臓の病理組織学的検査においても異常は認められなかった。この結果は、肝臓特異的 mRNA は重度の肝障害が惹起された場合にのみ末梢血中で検出されるものではないことを示している。さらに、末梢血中 Alb mRNA は本実験条件において血漿中 ALT 及び AST と比較してより感度の高いバイオマーカーである可能性が示唆された。一方、Ambp mRNA は D-gal 投与 2 時間後においては末梢血中で検出されなかった。これは、肝臓における Alb の遺伝子発現レベルが、Ambp のそれと比べて高いことに起因すると考えられた。ゆえに、安全性バイオマーカーとして末梢血中臓器/組織特異的 mRNA の候補を選定する際には、臓器/組織特異性及びターゲット臓器/組織における遺伝子発現レベルが重要なファクターであると考えられる。このうち臓器/組織特異性に関しては、近年の網羅的遺伝子発現解析技術の飛躍的な進歩により、臓器/組織特異的遺伝子に関するデータが体系的に蓄積されてはいるものの (Ge et al., 2005)、完全に臓器/組織特異的な mRNA を見出すことは困難を極める。本実験で肝臓特異的 mRNA の候補とした Alb mRNA に関しても、肝臓における発現が最も高かった一方で、他のいくつかの臓器/組織においてもわずかながら発現が認

められた。従って、疑陽性の回避及びより精確な毒性標的臓器の推定のために、複数のマーカー mRNA を用いた評価が有益であると考えられる。

既存の肝障害バイオマーカーである ALT 及び AST は、肝障害以外の要因、例えば骨格筋障害によっても血漿/血清中で増加することが知られており (Nathwani, et al., 2005)、これは血漿/血清 ALT 及び AST の変動の意味づけを困難にし得る。それに対して、Alb 及び Ambp mRNA はいずれも骨格筋において発現が認められなかった (Figure I-1)。それゆえ、Alb 及び Ambp mRNA はラットにおいて骨格筋障害が誘発された場合には末梢血中で検出されないと考えられる。本実験では、BPVC を筋肉内投与したラットにおいて投与 2、12 及び 24 時間後に採血した結果、投与 12 時間後に血漿中 ALT 及び AST の増加が認められた一方で、Alb 及び Ambp mRNA はいずれの時点においても末梢血中で検出されなかった。興味深いことに、骨格筋障害のバイオマーカーである血漿中 CK は投与 2 時間後に増加し、投与 12 時間後には正常値に戻っていた。これは、CK の血漿中での半減期が短いことに起因すると考えられた (Nosaka, 1996)。この結果より、例えば BPVC 投与 12 時間後に定型的な血液生化学検査のみを実施した場合、血漿中 ALT 及び AST の増加から肝障害が疑われ、骨格筋障害の診断が困難になると予想される。ここで、末梢血中肝臓特異的 mRNA を同時に評価することにより、肝障害の疑いを否定できる可能性がある。現状では、肝臓特異的 mRNA の解析と比較して、血漿/血清中 ALT 及び AST の測定は非常に迅速かつ簡便ではあるが、これら 2 種を肝障害バイオマーカーとして組み合わせて評価することにより、血漿/血清中 ALT 及び AST の不十分な肝臓特異性を補うことができると期待される。

D-gal を投与したラットにおいて、Ambp mRNA が孔径 0.2 μm のフィルターを用いて濾過した血漿においても検出されたことから、肝障害を誘発したラットの末梢血中にセルフリーの mRNA が存在することが示された (Figure I-5)。フィルター濾過により、Ambp mRNA のシグナルは僅かに減少した。これはサンプルのハンドリング回数が増加したことによる RNA の分解に起因すると考えられた (Ng et al., 2002)。mRNA は分解されやすい不安定なバイオマーカーである可能性があるため、PAXgene

RNA 採血管など、全血中の RNA を安定的に回収することに特化した手法による解析が理に適っていると考えられる。一方、本研究では肝臓から放出されたセルフリーの mRNA をターゲットとしているため、先述の通り血球成分を除いた血漿/血清における解析が理想である。また、非臨床安全性試験及び臨床試験における応用を想定した場合、取り扱いやすさの観点からも血漿/血清を用いた解析が望まれる。今後、血漿/血清の採取条件の検討や血漿/血清中 mRNA の安定性データの取得が課題である。

人工的に合成した RNA を血漿に添加した場合には数秒以内に分解される一方で、内因性の mRNA は末梢血中で安定的に検出される (Tsui et al., 2002)。Hasselmann らは、末梢血中のセルフリー mRNA はアポトーシス小体などの小胞に内包されることで分解を免れていると報告している (Hasselmann et al., 2001)。さらに、細胞外 RNA はタンパク質や脂質と複合体を形成することのよって RNase から保護されているという報告もあり (Rosi et al., 1988; Wiczorek et al., 1985; Wiczorek et al., 1987)、血漿及び血清中 mRNA が RNase による分解から保護されている詳細なメカニズムは、明らかになっていない。末梢血中 mRNA の存在様式の解明は、今後の課題の一つである。

末梢血中肝臓特異的 mRNA は、バイオマーカーに求められるいくつかの条件を満たしている。一つ目は、末梢血中で検出可能であることから、検体を採取しやすく侵襲性が低いことが挙げられる。次に、ターゲットとなる mRNA の塩基配列が既知であれば、容易にかつ短時間で測定系を確立することができる。さらに、齧歯類とヒトで相同なターゲット mRNA が存在し、類似した肝臓特異性を示す場合、両動物種ともにバイオマーカーとして利用可能である。これは、前臨床から臨床へ応用可能なバイオマーカーであることを示唆する有益な特徴である。これに対して、ELISA やウェスタンブロッティング法などの抗体による検出をベースとしたバイオマーカーアッセイは、抗体反応の種交差性の問題から、臨床への応用が制限される場合がある。

本実験では、Alb 及び Ambp mRNA を検出する方法として、十分な測定感度を有する RT-PCR アッセイを採用した。しかしながら、RT-PCR アッセイでは末梢血中の mRNA 量を正確に定量することはできない。一方、安全性バイオマーカーには高い

信頼性、精度及び再現性が不可欠である。従って、末梢血中肝臓特異的 mRNA の新しい安全性バイオマーカーとしての実用化を図るうえで、定量的検出方法を構築することが重要な課題の一つである。

第5節 小括

本章では、Alb 及び Ambp mRNA の2つの mRNA を肝臓特異的 mRNA として選定し、これらが薬剤誘発性肝障害モデルラットの末梢血において検出されることを示した。また、薬剤性肝障害を誘発後、2時間という早期段階において末梢血中 Alb 及び Ambp mRNA が検出された。さらに、骨格筋障害を誘発したラットにおいては、血漿中 ALT 及び AST の増加が認められた一方で、Alb 及び Ambp mRNA は末梢血中で検出されなかった。以上の結果より、末梢血中肝臓特異的 mRNA は、肝臓特異性の高い新規肝障害バイオマーカーとして利用できる可能性が示された。

第II章 新規血漿中肝臓特異的 mRNA の選定及び複数の肝毒性物質を用いた定量的評価

第1節 緒言

先述の通り、血漿/血清中 ALT 及び AST は肝障害バイオマーカーのゴールドスタンダードとして古くから世界中で利用されているが、肝臓特異性の低さが欠点として指摘されている。この血漿/血清中 ALT 及び AST の不十分な肝臓特異性を補うために、近年様々な安全性バイオマーカーが開発されている (Robles-Diaz, et al., 2016)。しかし、それらの肝臓特異性も依然十分ではないことに加えて、検出に必要な抗体の動物種間の反応性の差異や、煩雑な測定方法、高額な測定費用などが、これらのバイオマーカーが普及しない要因と考えられる (Ozer, et al., 2008)。

このような背景から前章では、末梢血中のセルフリー肝臓特異的 mRNA に注目した。薬剤誘発性肝障害モデルラットの末梢血において、肝臓特異的 mRNA である Alb 及び Ambp mRNA が RT-PCR アッセイによって検出されたことから、これらが肝臓特異性の高い新規肝障害バイオマーカーとして利用できる可能性を示した。さらに近年、肝線維症モデルラットにおいて血漿中の Alb mRNA 量が増加していると報告された (Kudo et al., 2008)。また Chan らは、肝癌、肝硬変あるいは慢性 B 型肝炎の患者において、血漿中 Alb mRNA レベルが健常人と比較して高値を示すことを報告している (Chan et al., 2010)。さらに、D-gal あるいは APAP 誘発性肝障害ラットの血漿において、fibrinogen 及び haptoglobin mRNA が検出された (Wetmore et al., 2010)。

本研究における第 I 章の内容も含め、複数の研究グループによって得られた知見から、末梢血中肝臓特異的 mRNA が新規肝障害バイオマーカーとして利用可能であるというコンセプトは確認された。しかし、複数の肝臓特異的 mRNA を用いた評価や、毒性発現メカニズムの異なる様々な肝毒性物質を用いた検証実験は未だ実施されていない。そこで、本章では末梢血中肝臓特異的 mRNA の肝障害バイオマーカーと

しての有用性を検証するために、新たな肝臓特異的 mRNA を選定し（実験 1）、複数の肝毒性物質を投与したラットの血漿においてそれらを定量的に検出した（実験 2）。バイオインフォマティクス及び分子生物学的解析結果を基に、apolipoprotein h (Apo h) 及び group specific component (Gc: 別名 vitamin D-binding protein) mRNA を新たな肝臓特異的 mRNA として選出した。次に、前章でターゲットとした Alb 及び Ambp mRNA と合わせて 4 種の肝臓特異的 mRNA について、既知の肝毒性物質である aflatoxin B1 (AFB1) (Shen et al., 1994)、APAP (Jaeschke et al., 2012)、APAP + buthionine sulfoximine (APAP + BSO) (James et al., 1993)、bromobenzene (BBZ) (Heijne et al., 2004)、lipopolysaccharide (LPS) (Minter et al., 2009) 及び *N*-nitrosomorpholine (NMOR) (Wesierska-Gadek et al., 1999) を投与したラットにおける血漿中のコピー数を定量した。また、血漿中肝臓特異的 mRNA と肝障害の程度との相関及び thioacetamide (TAA) (Mesa et al., 1996) 投与後の血漿中肝臓特異的 mRNA の経時的な推移を解析した。

第 2 節 実験材料と実験方法

II-2-i) 動物及び処置

雄性 Crl:CD(SD)ラット（5～11 週齢）を日本チャールス・リバー株式会社から購入し、個別にステンレス製金網ケージに入れ、温度 20～26℃、湿度 35～75% に制御された動物室において 12 時間の明暗交代下で飼育した。水および固形飼料として CR-LPF もしくは CRF-1 (Oriental Yeast) を自由摂取させた。全ての動物実験の実験計画は、予め武田薬品工業株式会社（実験 1）あるいは国立医薬品食品衛生研究所（実験 2）の動物実験倫理委員会の承認を得た。

肝臓特異的 mRNA 候補の正常ラットにおける遺伝子発現解析では、ラットをエーテル麻酔下で腹部大動脈からの放血により安楽死させた後、10 臓器/組織 (Figure II-1) を 30 分以内に採材し、RNAlater (Ambion) に浸漬し、total RNA 抽出まで 4℃ で保存した。

被験物質は生理食塩水に溶解または MC もしくはコーン油に懸濁し、Table II-1

に示す投与量でラットに単回経口あるいは腹腔内投与した。事前の予備検討結果に基づいて、ラットにおいて肝障害を確実に誘発するために十分な投与量と投与方法を設定した。対照動物には、投与媒体である生理食塩水、MC あるいはコーン油を投与した。各被験物質のメーカー、投与量、投与経路、投与媒体及び投与後の採材時間を **Table II-1** に示した。各採材時間において、エーテル麻酔下で腹部大動脈より、血液生化学的検査用にヘパリン処理採血管 (Sekisui Medical)及び血漿からの total RNA 抽出用に EDTA 処理採血管 (Vacutainer; Becton Dickinson)で採血した後、腹部大動脈を切断し、放血により安楽死させた。

Table II-1. Summary of the test articles and dosing regimens

Test article	Abbreviation	Manufacturer	Dose (mg/kg)	Route	Vehicle	Sacrifice time (h)
Experiment 1						
Thioacetamide	TAA	Wako Pure Chemical Industries	50	ip	Saline	24
Experiment 2						
Aflatoxin B1	AFB1	Alexis Biochemicals	10	po	0.5% MC	24
Acetaminophen	APAP	Sigma Aldrich	1000	po	0.5% MC	24
Bromobenzene	BBZ	Tokyo Chemical Industry	300	po	Corn oil	24
Buthionine sulfoximine	BSO	Wako Pure Chemical Industries	450	ip	Saline	24
Lipopolysaccharide ^a	LPS	Sigma Aldrich	1	ip	Saline	24
<i>N</i> -nitrosomorpholine	NMOR	Sigma Aldrich	600	po	0.5% MC	24
Thioacetamide	TAA	Sigma Aldrich	45	po	0.5% MC	3, 6, 9, 24

^a: Purified from *Escherichia coli* O111: B4, endotoxin level: 3,000,000 units per mg

II-2-ii) 血液生化学的検査

ヘパリン処理採血管に採取した血液を7500 × g、10分間(実験1)あるいは1600 × g、20分間(実験2)、室温で遠心分離し、血漿を得た。Hitachi 7600(実験1)あるいは7170(実験2)(Hitachi High-Technologies)を用いて、JSCC標準化法により血漿中ALTを測定した。

II-2-iii) ラット臓器/組織及び血漿からの total RNA 抽出

RNAlaterに保存した各臓器/組織のうち約20~500 mgから、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。心臓及び骨格筋からのtotal RNA抽出には、RNeasy Fibrous Mini Kit(QIAGEN)を用いた。オプションのDNase処理を含めた全ての実験操作は、キットのメーカーの推奨プロトコールに従った。EDTA処理採血管に採取した血液を7500 × g(実験1)あるいは1100 × g(実験2)、10分間、室温で遠心分離し血漿を得た後、速やかに-80°Cで保管した。本章における「新たな血漿中肝臓特異的mRNAの選出(実験1)」と「複数の肝毒性物質を用いた定量的評価(実験2)」は、それぞれ別施設で独立して実施された。後者は標準プロトコールが確定する以前に血漿サンプルが採取されていたため、両実験間で遠心分離条件が異なっている。前者の遠心分離条件が本研究における標準プロトコールではあるが、2つの遠心分離条件の差異による血漿中肝臓特異的mRNAレベルへの影響がないことは確認済みである(data not shown)。血漿を室温で融解した後、1 mLからmiRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。サンプル間のtotal RNA抽出、逆転写反応及びPCR反応効率の差を補正するための外部標準遺伝子として、コピー数既知のλ polyA plus RNA-A(Takara)を溶解バッファーに添加した。また、total RNAの抽出効率を向上させるためにキャリアーRNAを溶解バッファーに添加した。オプションのDNase処理を含めたその他の実験操作は、キットのメーカーの推奨プロトコールに従った。total RNA濃度は、NanoDrop ND-8000分光光度計(NanoDrop Technologies)あるいはGene Quant pro(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)を用いて、波長260 nmにおける吸光

度で測定した。total RNAサンプルは使用まで-80°Cで保管した。

II-2-iv) RT-PCR アッセイによる RNA 解析

ラットの主要 10 臓器/組織における Apoh、Gc、alcohol dehydrogenase 1 (Adh1)、cytochrome P450 2E1 (Cyp2e1)、serpin peptidase inhibitor A1 (Serpina1)、vitronectin (Vtn) 及び Gapdh の遺伝子発現を、RT-PCR アッセイにより解析した。各臓器/組織由来の total RNA 200 ng を、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)を用いて逆転写した。PCR は、TaKaRa Ex Taq (Takara)及び PCR Thermal Cycler Dice (Takara)を用いて実施した。各 mRNA を検出するためのプライマーペアの塩基配列を Table II-2 に示した。これらのプライマーペアによる増幅産物の塩基長は Apoh : 97 塩基、Gc : 80 塩基、Adh1 : 125 塩基、Cyp2e1 : 195 塩基、Serpina1 : 198 塩基、Vtn : 201 塩基及び Gapdh : 202 塩基であった。PCR の条件を以下に示す : 30~35 サイクルの変性 (98°C、10 秒)、アニーリング (55°C、30 秒) 及び伸長 (72°C、1 分)。PCR 増幅産物を 4%アガロースゲルにて電気泳動し、臭化エチジウムにより染色後、紫外線照射下で写真を撮影し可視化した。

II-2-v) リアルタイム定量 RT-PCR

3~7 μL の total RNA 溶液を、PrimeScript RT reagent Kit (Takara)を用いて逆転写した。各 mRNA に特異的な reverse プライマーを逆転写反応に用いた。逆転写反応によって合成した complementary DNA (cDNA)の増幅は ABI Prism 7900HT Sequence Detection Software version 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)によってモニターした。各 mRNA のコピー数を絶対定量するための検量線標品として、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製した、各増幅産物と同じ塩基配列をもつ一本鎖合成オリゴヌクレオチド (Fasmac, Kanagawa, Japan)の段階希釈系列 (1-10⁶ copies/ μL)を用いた。検量線の下限值である 1 copy/ μL 未満の値は 0 とみなした。定量値は、外部標準遺伝子としてサンプルに添加した λ polyA plus RNA-A の回収率で補正した。血

漿中 mRNA の量は 1 mL あたりのコピー数として表記した。各プライマーペア及び検量線標品の塩基配列を Table II-2 に示した。λ polyA plus RNA-A を検出するためのプライマーは、Real-time primer for λ polyA (Takara)を用いた。

Table II-2. Sequences of primers and calibration standards for each mRNA detection

Gene		Sequences
Alb	Forward primer	5'-gccgagaagcacacaagagt-3'
	Reverse primer	5'-gggaaaaggcaatcaggact-3'
	Calibration standard	5'-ttcgccgaga agcacacaag agtgagatcg cccatcggtt taaggactta ggagaacagc atttcaaagg cctagtcctg attgcctttt cccagt-3'
Ambp	Forward primer	5'-cctcactttgaaggctgacaa-3'
	Reverse primer	5'-ccaggttgaaccattttcca-3'
	Calibration standard	5'-ctgcctcact ttgaaggctg acaatgtgcc aacctgcca gatatccagg ttcaggagaa ctcaatgag gcccggatct atggaaaatg gttcaacctg gcgg-3'
ApoH	Forward primer	5'-gcgctcatcttcttttctgc-3'
	Reverse primer	5'-agggaacaaccacagcaaac-3'
	Calibration standard	5'-ccggcgctca tcttcttttc tgccttctc tgccatgtt ctattgcggg acggacctgt ccgaagccgg atgaactacc gtttgctgtg gttgttccct taa-3'
Gc	Forward primer	5'-ctgctggccttagcctttg-3'
	Reverse primer	5'-gtggagagttctggcaaac-3'
	Calibration standard	5'-ctcctgctgg ccttagcctt tgggcatgcc ctagagagag gccgagatta tgagaaggat aaagtttgc aggaactctc cacgct-3'
Adh1	Forward primer	5'-tctcgactggctatggctct-3'
	Reverse primer	5'-ggctgctcctgctgttttac-3'
Cyp2e1	Forward primer	5'-catggctacaaggctgtcaa-3'
	Reverse primer	5'-ggcctcattaccctgtttcc-3'
Serpina1	Forward primer	5'-ctgtcaactttgccgactc-3'
	Reverse primer	5'-cgtggaagtcagcatcccta-3'
Vtn	Forward primer	5'-gctgaccaagagtcatgcaa-3'
	Reverse primer	5'-cttggtttcctccggtagt-3'
Gapdh	Forward primer	5'-ggtgctgagtatgctgga-3'
	Reverse primer	5'-ctaagcagttggtggtgcag-3'

II-2-vi) 病理組織学的検査

10% (v/v)中性緩衝ホルマリン液にて固定した肝臓をパラフィン包埋後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、顕微鏡下で観察した。肝細胞壊死の程度を各個体それぞれについてスコア化した。スコアのクライテリアは、以下のように設定した：壊死が認められない (-)、小数の肝細胞において壊死が認められる (1+)、多数の肝細胞において壊死が認められ、病変は限局的あるいは肝小葉内の特定の領域に局在している (2+)、ほぼ全ての肝小葉において壊死が認められ、壊死が広範囲に及ぶ(3+)。

II-2-vii) 統計学的解析

Shapiro-Wilk 検定の結果、データが正規分布を示さなかったことから、ノンパラメトリックな手法である Wilcoxon 検定を実施した。有意水準は $p < 0.05$ (*)、 $p < 0.01$ (**)及び $p < 0.001$ (***)とした。統計学的解析は、SAS function PROBMC を用いて実施した。

第3節 結果

II-3-i) 新規末梢血中肝臓特異的 mRNA の探索

Human reference database for gene expression analysis (RefExA, <http://refex.dbcls.jp/index.php?lang.en>)から、データベース上で肝臓特異性が高い遺伝子として Adh1、ApoH、Cyp2e1、Gc、Serpina1 及び Vtn の6つを新たな肝臓特異的 mRNA の候補として選出した。ラットの主要な10臓器/組織(肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、胃、精巣、骨格筋、消化管及び胸腺)における各候補 mRNA レベルを RT-PCR アッセイにより比較した。Gapdh は RT-PCR アッセイの内部標準として使用した。Adh1、Cyp2e1、Serpina1 及び Vtn mRNA は、肝臓以外の多数の臓器/組織においても発現が認められた (Figure II-1A)。これに対して ApoH 及び Gc mRNA は、肝臓において強いシグナルが検出された。これらの mRNA の発現は腎臓においても認められたが、単位 total RNA 量あたりの相対的な発現レベルを比較した結果、腎臓における ApoH 及び Gc mRNA の発現は、肝臓における発現のそれぞれ 0.1 及び 0.01%であった (data not

shown)。Gapdh mRNA は、全ての臓器/組織において同程度の発現が認められた。以上より、ApoH 及び Gc mRNA は高い肝臓特異性を有することが確認された。

続いて、ApoH 及び Gc mRNA が TAA 誘発性肝障害モデルラットの血漿中で増加するか否か検証した。リアルタイム定量 RT-PCR の結果、TAA 投与 24 時間後において、血漿中 ALT の増加に伴って、血漿中 ApoH 及び Gc mRNA 量が生理食塩水を投与した対照群と比較して有意に増加した (Figure II-1B)。

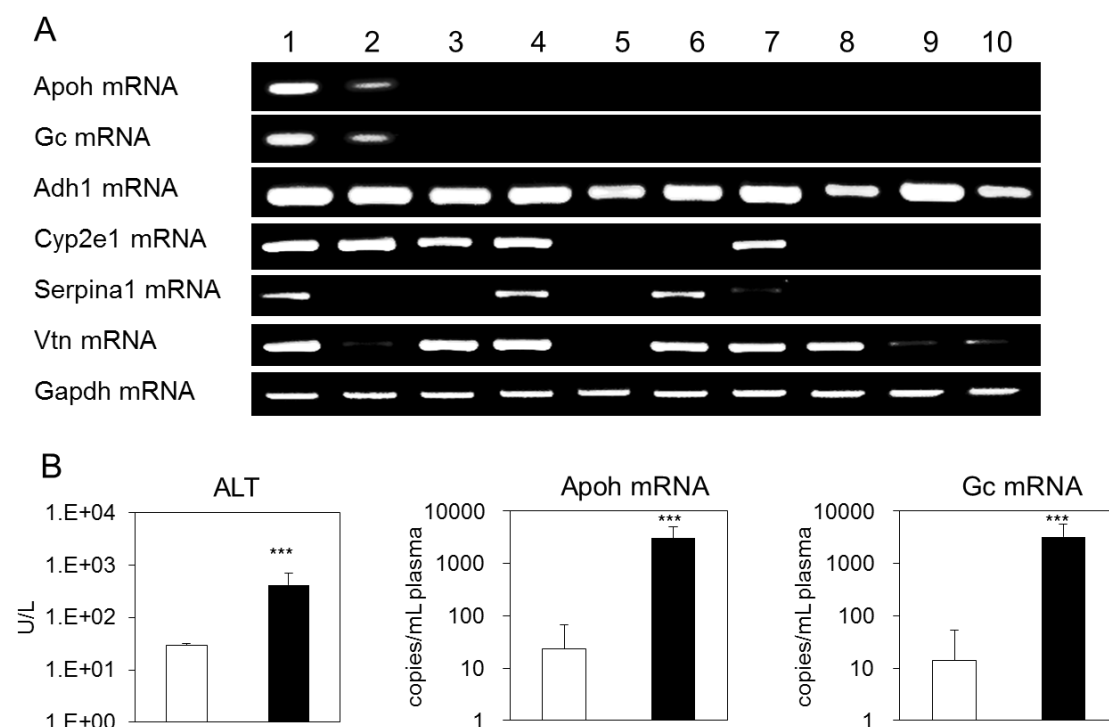


Figure II-1. Identification of novel liver-specific mRNAs in rats.

(A) The expression of ApoH, Gc, Adh1, Cyp2e1, Serpina1 and Vtn mRNAs in the major organs of rat. The organs examined were liver (lane 1), kidney (lane 2), heart (lane 3), lung (lane 4), spleen (lane 5), stomach (lane 6), testis (lane 7), skeletal muscle (lane 8), intestine (lane 9) and thymus (lane 10). Gapdh mRNA was used as a reference. (B) Increased copy numbers of ApoH and Gc mRNAs in the plasma from rats 24 h after administration of TAA. The corresponding change in the ALT value is also shown. White and black bars indicate saline and TAA-treated groups, respectively. Values are expressed as means \pm S. D. for each group (n = 8). *** $p < 0.001$ as compared with the controls.

II-3-ii) 種々の肝毒性物質を投与したラットの血漿中肝臓特異的 mRNA の定量

次に、様々な既知肝毒性物質を用いて作製した複数の肝障害モデルラットにおいて、血漿中肝臓特異的 mRNA の増加が検出されるか否か検証した。AFB1、APAP、APAP + BSO、BBZ、LPS 及び NMOR をそれぞれ単回投与することにより、ラットにおいて肝障害を誘発した。血漿中 ALT は、6 種の肝毒性物質投与 24 時間後において対照群と比較して 3~125 倍に増加した (Figure II-2)。病理組織学的検査において、肝毒性物質投与により肝細胞壊死が認められ、その程度は軽微から重度まで様々であった。肝小葉内の肝細胞壊死が認められた領域は、化合物によって異なっていた。AFB1 は小葉辺縁部に、APAP、APAP + BSO 並びに BBZ は小葉中心部に、及び LPS 並びに NMOR は特定の領域に局在はなく瀰漫性に壊死が認められた。病理組織学的検査における肝細胞壊死のスコアを Table II-3 にまとめた。BBZ、LPS あるいは APAP を投与したラットの肝臓切片のヘマトキシリン・エオジン染色像を、それぞれの媒体を投与した対照動物とともに、Figure II-3 に示した。このとき、血漿中肝臓特異的 mRNA 量は対照群と比較して増加しており、Alb mRNA は 11~397 倍、Ambp mRNA は 30~1572 倍、ApoH mRNA は 18~580 倍及び Gc mRNA は 18~928 倍の増加であった (Figure II-2)。さらに、上述の肝毒性物質投与 24 時間後において、4 種の血漿中肝臓特異的 mRNA 量の相関を調べた。血漿中 Ambp、ApoH 及び Gc mRNA は、代表的な肝臓特異的 mRNA である Alb mRNA と、それぞれ強い相関関係が認められた (Figure II-4)。

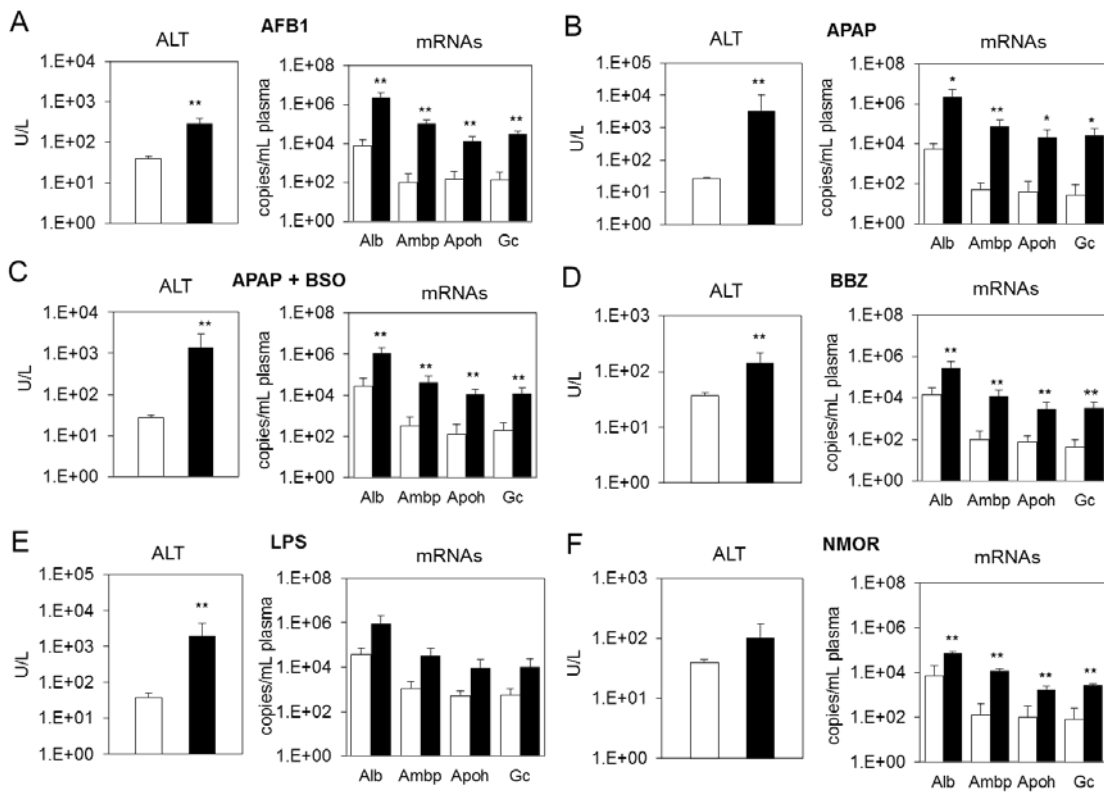


Figure II-2. Quantitative analysis of liver-specific mRNAs in plasma from rats treated with various hepatotoxic compounds.

The copy numbers of 4 mRNAs were determined in plasma from rats 24 h after treatment with AFB1 (A), APAP (B), APAP+BSO (C), BBZ (D), LPS (E) and NMOR (F). The corresponding changes in the ALT value are also shown. White and black bars indicate vehicles and compounds-treated groups, respectively. Values are expressed as means \pm S. D. for each group (n = 5). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with the controls.

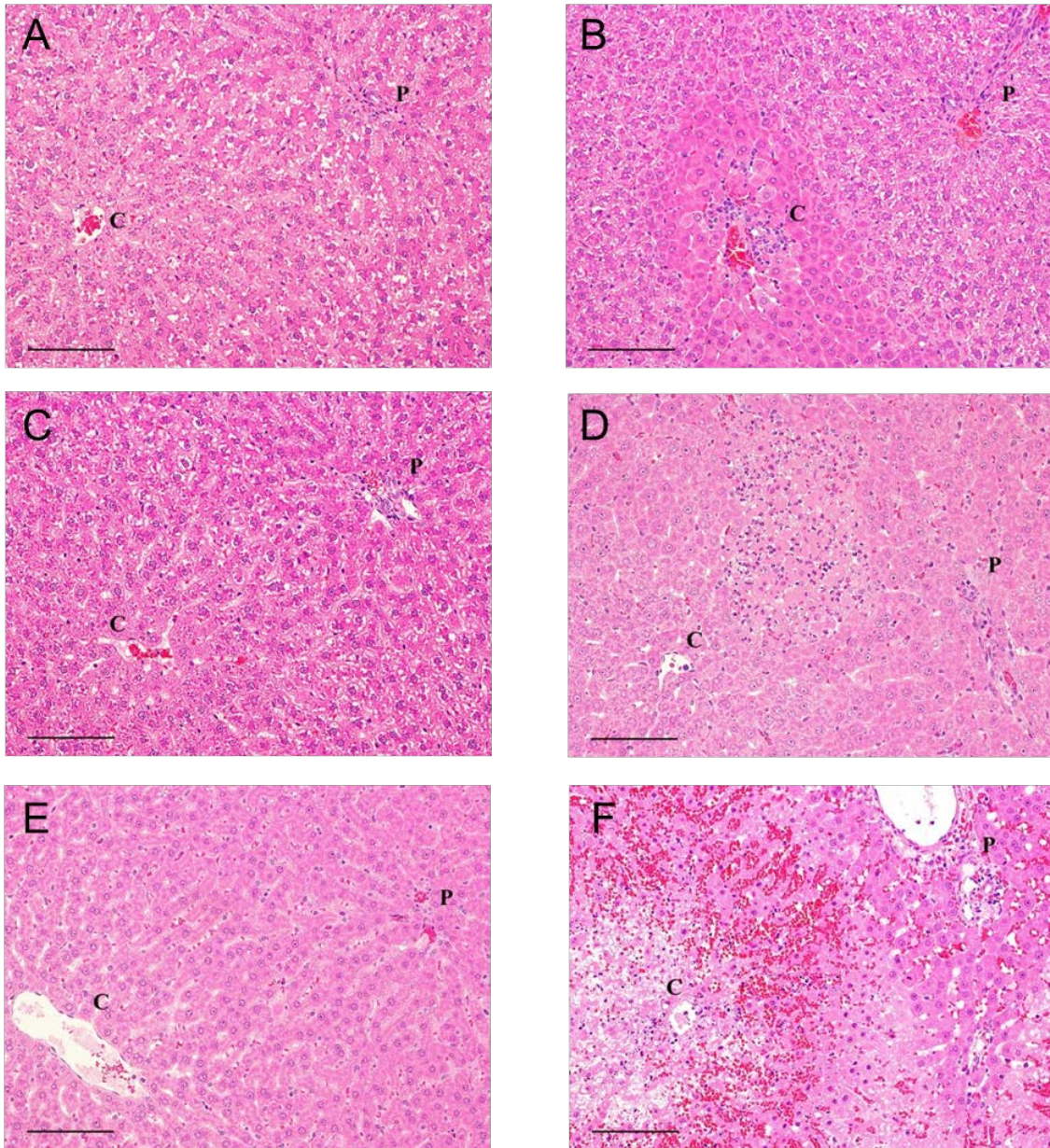


Figure II-3. Representative hematoxylin- and eosin-stained sections of the liver from rats 24 h after treatment with corn oil (A), 300 mg/kg BBZ (B), saline (C), 1 mg/kg LPS (D), 0.5% (w/v) MC solution (E) and 1000 mg/kg APAP (F).

C, central vein; P, portal vein. Bars = 200 μ m.

Table II-3. Summary of hepatocellular necrosis scores in rat liver treated with AFB1, APAP, APAP+BSO, BBZ, LPS, NMOR and TAA

Compound	Sacrifice time (h)	Score ^a	Number of animals							
			Control				Treated			
			-	1+	2+	3+	-	1+	2+	3+
AFB1	24		5	0	0	0	0	1	4	0
APAP	24		5	0	0	0	1	0	2	2
APAP + BSO	24		5	0	0	0	0	0	2	3
BBZ	24		5	0	0	0	0	5	0	0
LPS	24		5	0	0	0	1	0	2	2
NMOR	24		5	0	0	0	0	5	0	0
TAA	3		5	0	0	0	4	1	0	0
	6		5	0	0	0	0	5	0	0
	9		5	0	0	0	0	5	0	0
	24		5	0	0	0	0	3	2	0

^a: Score indications are as follows: necrosis was not found (-), necrosis was observed in a small number of hepatocytes (1+), necrosis was observed in large number of hepatocytes and each lesion was focal or localized in specific hepatic lobular area (2+) and necrosis was observed in almost all of hepatic lobules and massive necrosis was sporadically observed (3+).

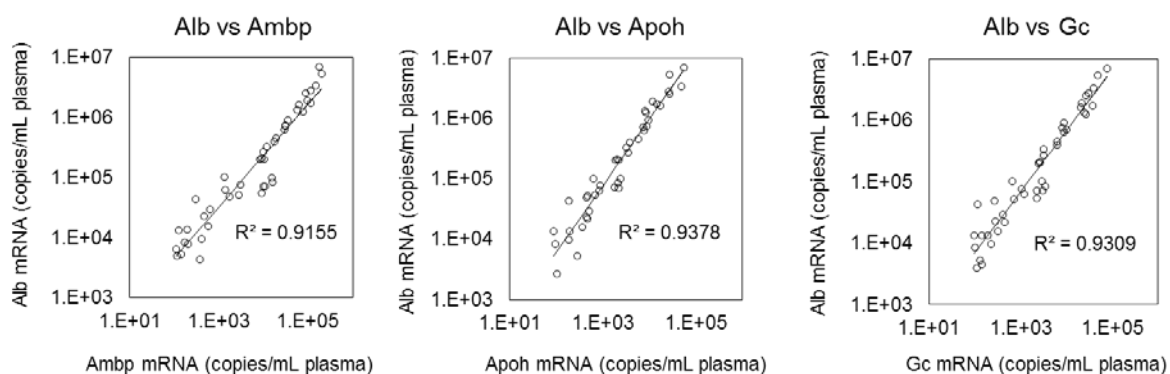


Figure II-4. Correlation between Alb mRNA and the other liver-specific mRNAs in the plasma from rats 24 h after treatment with AFB1, APAP, APAP+BSO, BBZ, LPS and NMOR.

II-3-iii) 血漿中肝臓特異的 mRNA と肝障害の程度の相関

続いて、血漿中肝臓特異的 mRNA 量と肝障害の程度との相関関係を調べた。Figure II-2 で示した全例のデータを解析した結果、血漿中 ALT と Alb mRNA との間には強い相関がみられた (Figure II-5A)。さらに、Figure II-2 で用いた全例を、血漿中 ALT あるいは病理組織学的な肝細胞壊死スコアを基準に 4 つのグループに分けた。Figure II-5B に示した通り、対照群の全例 (n=30) を Group 0 に含め、肝毒性物質を投与した全例 (n=30) を、血漿中 ALT を基準に 10 例ずつ均等に 3 グループに分けた (Group 1、2 及び 3)。Group 0、1、2 及び 3 の血漿中 ALT は、それぞれ 22~58、34~123、169~402 及び 431~15,150 U/L であった。Group 1、2 及び 3 の血漿中 ALT の平均値は、Group 0 と比較してそれぞれ 2.5、7 及び 95 倍であった。このとき、Group 1、2 及び 3 の血漿中 4 種の肝臓特異的 mRNA 量の平均値は、Group 0 と比較してそれぞれ 6.4、52 及び 153 倍 (Alb mRNA)、26、153 及び 298 倍 (Ambp mRNA)、9.3、41 及び 136 倍 (ApoH mRNA) 並びに 12、84 及び 117 倍 (Gc mRNA) であった。Figure II-5C では、肝細胞壊死のスコアを基準に対照群も含めた全例を 4 グループに分けた (Group 0'、1'、2' 及び 3')。Group 0'、1'、2' 及び 3' の例数は、それぞれ 32、11、10 及び 7 例であった。Group 0'、1'、2' 及び 3' の肝細胞壊死のスコアは、それぞれ -、1+、2+ 及び 3+ であった。各スコアのクライテリアは実験材料と実験方法の項に記載した。Group 1'、2' 及び 3' の血漿中 4 種の肝臓特異的 mRNA 量の平均値は、Group 0' と比較してそれぞれ 18、82 及び 166 倍 (Alb mRNA)、62、194 及び 308 倍 (Ambp mRNA)、18、52 及び 164 倍 (ApoH mRNA) 並びに 35、95 及び 118 倍 (Gc mRNA) であった。以上のように、血漿中 ALT 及び肝細胞壊死スコアの増加に伴い、血漿中肝臓特異的 mRNA 量が増加する傾向がみられた。血漿中 ALT 及び肝細胞壊死スコアが高いグループでは、血漿中肝臓特異的 mRNA 量の個体間差が大きい傾向がみられた。

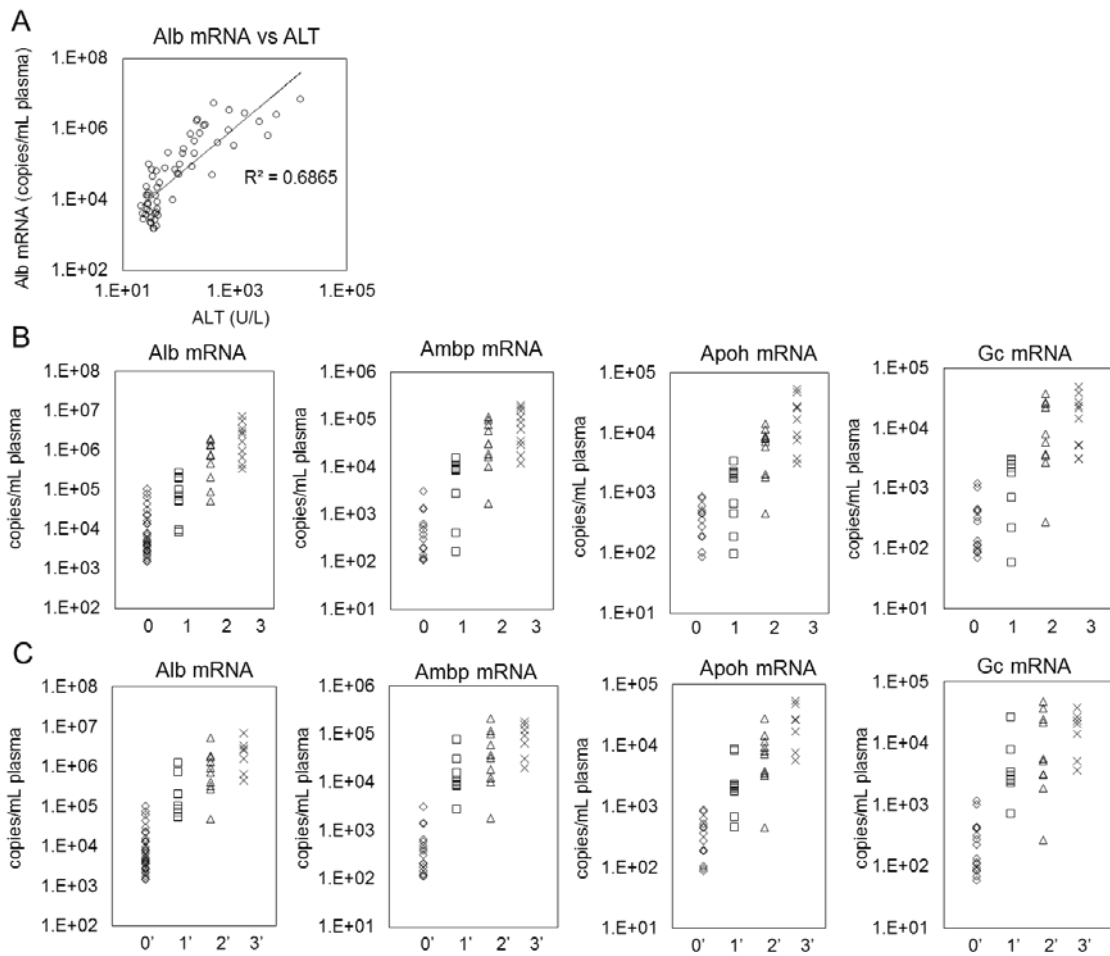


Figure II-5. Correlation between circulating liver-specific mRNAs and severity of liver damage.

(A) Correlation graph of the individual ALT and Alb mRNA values for animals in Figure II-2. (B) All the chemicals-treated animals in Figure II-2 (n=30) were divided equally into three groups of ten animals (Groups 1, 2 and 3) according to the ALT values (Group 1: 34 to 123 U/L, Group 2: 169 to 402 U/L, Group 3: 431 to 15150 U/L). All the control animals were included and shown as group 0. (C) All the animals were divided into four groups of 32, 11, 10 and 7 animals (Groups 0', 1', 2' and 3') according to the necrosis scores on histopathology (Group 0': -, Group 1': 1+, Group 2': 2+, Group 3': 3+). See Materials and Methods for the definitions of the necrosis scores.

II-3-iv) ラットにおける血漿中肝臓特異的 mRNA の経時的変化

肝臓特異的 mRNA が肝障害誘発後に血漿中で増加するタイミングを検討し、血漿中 ALT の変化及び病理組織学的な変化のタイミングと比較するため、TAA を単回投与後 3、6、9 及び 24 時間後に血漿を採取した。血漿中 ALT は、投与 3 及び 6 時間後において統計学的に有意な増加が認められたが、増加の程度は対照群と比較してそれぞれ 1.2 及び 1.8 倍と軽度であった (Figure II-6A)。投与 9 及び 24 時間後においては、血漿中 ALT は対照群と比較してそれぞれ 4.3 及び 22 倍と顕著な増加が認められた。肝臓の病理組織学的検査では小葉中心性の肝細胞壊死が、投与 3 時間後においては TAA を投与した 5 例中 1 例で、投与 6、9 及び 24 時間後においては TAA を投与した全例において認められた (Table II-3)。

リアルタイム定量 RT-PCR 法によって血漿中肝臓特異的 mRNA を定量した結果、血漿中 Alb 及び Gc mRNA は TAA を投与した群でいずれの時点においても有意な増加が認められた (Figure II-6B, E)。投与 3、6、9 及び 24 時間後において、血漿中 Alb 並びに Gc mRNA 量は、それぞれ対照群と比較して 9.9、6.9、7.3 及び 9.1 倍、並びに 13、11、14 及び 12 倍に増加した。血漿中 Ambp 及び Apoh mRNA 量は、投与 3 及び 6 時間において対照群と同等であった (Figure II-6C, D)。投与 9 及び 24 時間後においては、血漿中 Ambp 並びに Apoh mRNA 量は、それぞれ対照群と比較して 15 及び 21 倍、並びに 4.4 及び 10 倍に増加した。

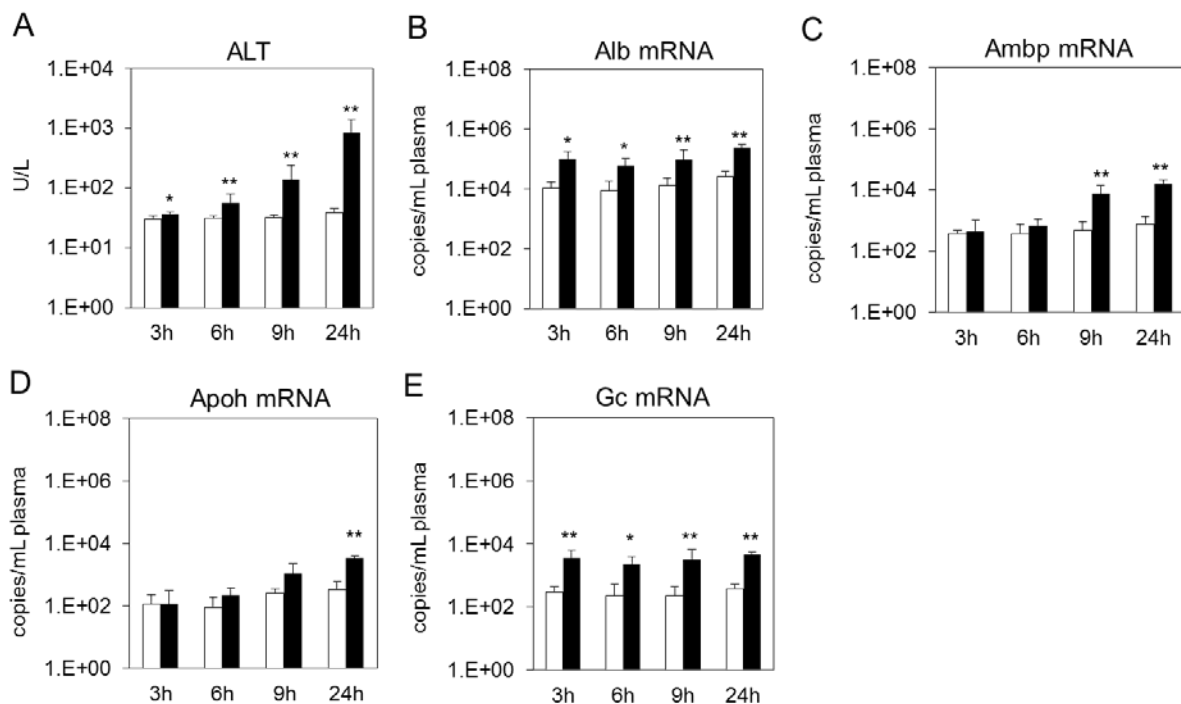


Figure II-6. Time course analysis of liver-specific mRNAs in plasma from rats treated with TAA.

The ALT values (A) and copy numbers of Alb (B), Ambp (C), Apoh (D) and Gc mRNAs (E) in plasma were determined at 3, 6, 9 and 24 h after treatment with TAA. White and black bars indicate 0.5% MC and TAA-treated groups, respectively. Values are expressed as means \pm S. D. for each group (n = 5). * p < 0.05, ** p < 0.01 as compared with the controls.

第4節 考察

血漿/血清中の肝逸脱酵素である ALT 及び AST は、現在最も利用されている標準的な肝障害バイオマーカーであるが、それらの不十分な肝臓特異性が指摘されている。従って、優れた肝臓特異性を有する新たなバイオマーカーを探索しその有用性を確認することは、より信頼性の高い薬剤性肝障害の評価を可能にすると考えられる。前章では、D-gal 及び APAP を投与したラットを用いて、肝臓特異的 mRNA である Alb 及び Ambp mRNA が肝臓特異性の高いバイオマーカーとして利用できる可能性を示した。肝臓特異的 mRNA の種類を増やし、それらをバイオマーカーとして組み合わせることで、より肝障害の評価の精度が向上すると期待される。そこで本章では、はじめに Alb 及び Ambp mRNA 以外の肝臓特異的 mRNA の選定を試みた。ラット主要 10

臓器/組織における RT-PCR アッセイの結果、データベースより選択した肝臓特異的 mRNA 候補のうち、ApoH 及び Gc mRNA の高い肝臓特異性が確認された。このアッセイでは、ApoH 及び Gc mRNA は腎臓において僅かな発現がみられたが、相対的な発現レベルは肝臓と比較して明らかに小さかったことから、これらの mRNA は信頼性の高い肝障害の評価を行ううえで十分な肝臓特異性を有していると判断した。一方、他の候補 mRNA に関しては肝臓以外の多数の臓器/組織においても発現が認められた。従って、データベース上で臓器/組織特異性が高い mRNA であっても、バイオマーカーとしての利用を視野に入れた場合、その特異性を実験的に確認することが望ましい。さらに、評価対象とする動物種に応じて臓器/組織特異性を確認することも推奨される。TAA 誘発性肝障害ラットの血漿において ApoH 及び Gc mRNA が増加していたことから (Figure II-1B)、これら mRNA を新規薬剤性肝障害バイオマーカーとして選定した。

異なるメカニズムによって肝細胞壊死を惹起する様々な化合物をラットに投与した。いずれの肝毒性物質においても、投与 24 時間後に血漿中 ALT の増加及び肝小葉内の異なる部位における肝細胞壊死が誘発され、同時に血漿中肝臓特異的 mRNA 量の増加も認められた (Figure II-2, 3)。LPS あるいは APAP を投与した群の各 1 例においては血漿中 ALT の増加及び肝細胞壊死は認められず、これら例では血漿中肝臓特異的 mRNA 量は対照群と同等であった。以上より、肝臓特異的 mRNA は化合物の種類や肝小葉内の傷害領域に関わらず、肝細胞壊死を誘発したラットの血漿中で増加することが示された。加えて、4 種の肝臓特異的 mRNA の血漿における増加の程度は、いずれも血漿中 ALT と比較して顕著であったことから、血漿中肝臓特異的 mRNA は血漿中 ALT よりも肝障害に対して高い応答性を示すと考えられた。また、肝毒性物質投与 24 時間後において、それぞれの血漿中肝臓特異的 mRNA 量の変化が相関していたことより (Figure II-4)、これらをバイオマーカーのセットとして利用することでより肝障害の評価の精度が増すと考えられた。

肝毒性物質投与 24 時間後のデータについて血漿中 ALT 及び肝細胞壊死スコアを

基準に 4 つのグループに分けた。その結果、血漿中 ALT あるいは病理組織学的な肝細胞壊死のスコアが高くなるに従って、4 種の血漿中肝臓特異的 mRNA 量が増加する傾向が認められた (Figure II-5)。一方、血漿中 ALT 及び肝細胞壊死スコアが高いグループほど、血漿中肝臓特異的 mRNA 量の個体間差が大きかった。この結果は、同程度の肝障害を呈するラットであっても、mRNA の血中への放出速度やタイミング、あるいは肝障害の進行度が異なる可能性を示唆していると考えられた。また、肝細胞壊死スコアが 2+であったグループ (Figure II-5C の Group 2') と、3+であったグループ (Figure II-5C の Group 3') の血漿中肝臓特異的 mRNA 量は同等であった。Group 2' において高い血漿中肝臓特異的 mRNA レベルを示した例は、AFB1 を投与した例と一致していた。これらの例では、同等の肝細胞壊死スコアを示す他の例と比較して肝細胞の変性所見 (主に好酸性変化) の程度が顕著であった (data not shown)。従って、壊死に至る前の変性した肝細胞から放出された肝臓特異的 mRNA が Group 2' における高い血漿中肝臓特異的レベルに寄与した結果、Group 3' と同程度の血漿中肝臓特異的 mRNA 量を示した可能性が考えられた。

TAA をラットの単回投与後、経時的に血漿中肝臓特異的 mRNA を解析した結果、Alb 及び Gc mRNA 量は投与 3、6、9 及び 24 時間後において TAA 投与群で有意な増加が認められた (Figure II-6)。TAA 投与 3 時間後においては、血漿中 ALT は対照群と比較して統計学的に有意な増加を示したものの、増加は軽度であり (約 1.2 倍)、さらに病理組織学的に肝細胞壊死が認められたのは 5 例中 1 例のみであった。重要なことに、血漿中 Alb 及び Gc mRNA 量は TAA 投与 3 時間後において対照群と比較して約 10 倍以上の顕著な増加が認められた。この結果は、Alb 及び Gc mRNA は血漿中 ALT の増加及び病理組織学的な肝細胞壊死の検出に先だって血漿中で増加することを示しており、これらの肝臓特異的 mRNA は、肝障害の初期変化を検出可能な予測性を有したバイオマーカーである可能性が示唆された。一方、Ambp 及び Apoh mRNA は、TAA 投与 3 及び 6 時間後において増加は認められなかった。Figure II-4 に示した通り、肝毒性物質投与 24 時間後においては 4 種の肝臓特異的 mRNA 量はそれぞれ相

関したが、肝障害の初期段階においてはこれらの相関は認められなかった。第 I 章では、D-gal 投与 2 時間後においては末梢血中で Alb mRNA は検出されるが、Ambp RNA は検出されないことが示され、同様の結果が TAA 投与ラットにおいても得られた。血漿中 Ambp 及び Apoh mRNA 量は、血漿中 ALT の増加及び肝細胞における壊死性変化が検出される時点と同時あるいはそれよりも僅かに遅れて増加すると考えられ、肝臓特異的 mRNA の種類によって血漿中で増加するタイミングが異なることが示された。以上より、複数の肝臓特異的 mRNA をバイオマーカーとして組み合わせて評価することで、肝障害のステージを推察することができる可能性が示唆された。血漿中で増加するタイミングを左右する要因として、腎障害バイオマーカーとして知られる尿中 kidney injury molecule-1 のように、組織における遺伝子発現の亢進の可能性が考えられた (Chiusolo et al., 2010; Han et al., 2002)。しかしながら、TAA 投与 3~24 時間後において肝臓中 Alb 遺伝子の発現が抑制されているという報告がある (Bulera et al., 2001)。従って、本実験において認められた TAA 投与後早期段階における血漿中 Alb mRNA 量の増加は、肝臓中 Alb 遺伝子発現の亢進に起因するものではないと推定された。Alb は肝臓において最も高発現している遺伝子であることから (Elmaouhoub et al., 2007)、遺伝子発現が亢進されずとも TAA を投与したラットの血漿中で Alb mRNA 量は増加し得ると考えられた。これに対して、ラット肝臓における Gc mRNA の発現レベルは Alb mRNA と比較して低く、Ambp 及び Apoh mRNA と同程度である (data not shown)。それにも関わらず、Gc mRNA は TAA 投与後、Ambp 及び Apoh mRNA よりも早期に血漿中で増加した。TAA 投与により肝臓中の Gc 遺伝子発現が誘導された可能性が考えられるが、現時点では TAA 投与後初期段階における血漿中 Gc mRNA 量の増加の機作は不明である。

本実験では、主に肝細胞壊死を誘発する薬剤を用いて血漿中肝臓特異的 mRNA の肝障害バイオマーカーとしての有用性を検証した。これら血漿中肝臓特異的 mRNA の有用性をより深く検証するためには、例えば肝細胞壊死以外の肝障害(肝細胞肥大、胆汁鬱滞及び脂肪肝等)のバイオマーカーとしても利用可能か否か検証することが必

要である。このような実験によって得られるデータは、血漿中肝臓特異的 mRNA による肝障害検出の精度を向上させると考えられる。また、現段階ではラットにおける検証に留まっていることから、前臨床安全性試験で使用される動物種やヒトにおけるバイオマーカーとしての利用可能性の検証も求められる。さらに、各動物種における血漿中肝臓特異的 mRNA 量のバックグラウンドデータを蓄積し、正常値の範囲を設定することによって、より精確に肝障害を評価することが可能と考えられる。

第5節 小括

本章では、新たな肝臓特異的 mRNA として Apoh 及び Gc mRNA を選定し、Alb 及び Ambp mRNA を含めた4種の肝臓特異的 mRNA が、7種の肝毒性物質を投与したラットの血漿中で増加することを定量的に確認した。種々の薬剤性肝障害モデルラットにおいて、血漿中肝臓特異的 mRNA 量は血漿中 ALT と比較して顕著な増加を示したことから、これら mRNA の肝障害に対する高い応答性が確認された。また、肝毒性物質投与 24 時間後において、4種の肝臓特異的 mRNA の変動は互いに相関し、血漿中 ALT 及び病理組織学的な肝細胞壊死の重篤度との相関も認められた。さらに、肝障害誘発後経時的に解析した実験では、血漿中 Alb 及び Gc mRNA は血漿中 ALT の増加及び病理組織学的な肝細胞壊死が顕在化する以前に増加したことから、これらの血漿中肝臓特異的 mRNA によって肝障害の早期検出が可能であることが示唆された。以上より、血漿中肝臓特異的 mRNA の新規肝障害バイオマーカーとしての有用性がラットにおいて示された。

第 III 章 臨床バイオマーカーとしての利用可能性の検証

第 1 節 緒言

多くの医薬品あるいはその候補化合物が、肝臓への有害作用、すなわち薬剤性肝障害のポテンシャルを有することが知られている。ゆえに、医薬品添付文書において肝障害の可能性が警告されることにより臨床での使用が制限される、あるいは薬剤性肝障害が原因で市販医薬品が販売中止に至る場合がある。最近では、C 型慢性肝炎治療薬であるソブリアード[®] (一般名:シメプレビルナトリウム) (Sanford, 2015; Vaidya and Perry, 2013)を投与した患者において肝機能障害が発現し死亡に至る例が報告されたことを受け、当該医薬品の添付文書の改訂及び医療機関への注意喚起が、製造販売元に指示された (ソブリアード[®]カプセル 100 mg による高ビリルビン血症について; 厚生労働省 2014 年 10 月発出)。従って、臨床において血液中のバイオマーカーによって肝障害を低侵襲的にモニターすることは、肝疾患の診断や病態把握だけでなく、医薬品あるいはその候補化合物による薬剤性肝障害を検出するために極めて重要である。

傷害された肝細胞から血漿/血清中に漏出する ALT 及び AST は、標準的な肝障害バイオマーカーとして多くの施設で測定されている。しかし、これらの肝逸脱酵素マーカーは骨格筋障害や心筋障害などの要因によっても血漿/血清中で増加しうることから、肝障害を精確にモニターするうえで十分な肝臓特異性を有しているとは言えない。血漿/血清中 ALT 及び AST の不十分な肝臓特異性を補い、より精度の高い肝障害モニターを実現するための新たなバイオマーカーとして、本研究では末梢血中肝臓特異的 mRNA に着目した。第 I 章及び II 章では、ラットにおいて 4 種の末梢血中肝臓特異的 mRNA が肝障害特異性の高い、有用なバイオマーカーとして利用可能であることを示した。これまでに、数種の肝疾患の患者において血漿中 ALB mRNA 量が増加しているという報告がある (Chan, et al., 2010; Zhang et al., 2014)。しかし、末梢血中肝臓特異的 mRNA の臨床における肝障害バイオマーカーとしての性質及び有用性を

示すデータは依然少ない。

そこで本章では、ラットにおいて有用性を確認した 4 種の末梢血中肝臓特異的 mRNA (Alb、Ambp、ApoH 及び Gc mRNA) が、ヒトにおいても肝臓特異性の高いバイオマーカーとして利用可能か否か検証することを目的とした。4 種の肝臓特異的 mRNA のヒトにおける肝臓特異性を確認し、健常人と肝障害患者の血漿中肝臓特異的 mRNA 量を比較した。さらに、既存生化学バイオマーカーとの相関解析に加え、人工的に肝臓限定的な傷害を誘発した前後の血漿中肝臓特異的 mRNA 量の変化及び心筋傷害患者の血漿中肝臓特異的 mRNA を解析した。

第 2 節 実験材料と実験方法

III-2-i) 研究対象とした被験者/患者

大阪府済生会中津病院 (Osaka, Japan)にて肝障害と診断された 21 名の患者から血液サンプルを収集した。患者の診断名を以下に示す：C 型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌 (n=8)、急性もしくは慢性 B 型肝炎ウイルス感染 (n=6)、薬剤性肝障害 (n=4)、慢性 C 型肝炎ウイルス感染 (n=1)、B 型及び C 型肝炎ウイルス陰性肝細胞癌 (n=1)及び自己免疫性肝炎 (n=1)。健常人 30 名分の血液サンプルは武田薬品工業株式会社において収集した。定期的な健康診断にて異常が認められず、収集した血液サンプルにおいて臨床パラメーターが正常値を示す場合に健常であると定義した。血清 ALT、AST 及び CK の高値 (それぞれ 49、72 及び 3,434 U/L) が認められた 1 名は実験から除外したが、骨格筋障害が疑われたため血漿中肝臓特異的 mRNA を解析した。従って、本実験では 29 名の健常人サンプルを用いた。患者及び健常人の血液生化学的パラメーターは、それぞれ大阪府済生会中津病院及び健康科学研究所 (Kanagawa, Japan)にて測定した。心筋梗塞患者の血漿サンプルはベリタス (Tokyo, Japan)より購入した。心筋梗塞患者の血漿中 ALT 及び CK は、それぞれ Alanine Transaminase Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)及び Creatine Kinase Assay Kit (BioAssay Systems)を用い、キットのメーカーの推奨プロトコールに従って測定した。

本実験は、武田薬品工業株式会社及び大阪府済生会中津病院の倫理委員会の承認を得た後、各施設で定められたガイドラインに従って実施された。全ての被験者から、研究実施に関するインフォームドコンセントを得た。

III-2-ii) 肝動脈化学塞栓療法 (transcatheter arterial chemoembolization; TACE)及び肝動脈化学療法 (transcatheter arterial infusion; TAI)

TACE あるいは TAI は、肝細胞癌の患者 9 名に対して Seldinger 法(Seldinger et al., 1953)により実施した。局所麻酔を実施後、大腿動脈より挿入したカテーテルを介して、肝癌組織に最も近接する肝動脈にマイクロカテーテルを留置した。TACE では、抗癌剤を注入後、動脈塞栓物質としてゼラチンを注入した。TAI では、抗癌剤注入後の動脈塞栓は実施しなかった。

III-2-iii) ヒト臓器/組織由来 total RNA を用いた相対発現解析

ヒトの肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、胃、脳、骨格筋、消化管及び胸腺由来の total RNA (Takara) 100 ng を、Prime Script RT Reagent Kit (Takara)により逆転写し、cDNA を合成した。ランダムヘキサマーを逆転写反作用のプライマーとして用いた。cDNA を SYBR Premix ExTaq (Takara)によって増幅し、ABI Prism 7900HT Sequence Detection Software version 2.3 (Applied Biosystems)によって増幅をモニターした。各組織における相対的な mRNA レベルを定量するための検量線標品として、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製した、各増幅産物と同じ塩基配列をもつ一本鎖合成オリゴヌクレオチド (Fasmac)の段階希釈系列を用いた。各プライマーペア及び検量線標品の塩基配列を Table III-1 に示した。各 mRNA の相対発現量は、GAPDH mRNA の相対発現量によって補正した。各 mRNA について、各臓器/組織の発現レベルと肝臓における発現レベルの比率を算出した。

Table III-1. Sequences of primers and calibration standards for each mRNA detection

Gene		Sequences
ALB	Forward primer	5'-tctctttagctcggcttattcc-3'
	Reverse primer	5'-tctttaaccgatgagcaacct-3'
	Calibration standard	5'-ttttctcttt agctcggctt attccagggg tgtgttctgt cgagatgcac acaagagtga ggttgctcat cggtttaaag attt-3'
APOH	Forward primer	5'-gactgtggcccatcaacact-3'
	Reverse primer	5'-cgtatagcgtacggctccat-3'
	Calibration standard	5'-caggactgtg gccatcaac actctgaaat gtacaccag agtatgtcct tttgctggaa tcttagaaaa tggagccgta cgtatacga ct-3'
GC	Forward primer	5'-cttgaccgaagcctgctgtg-3'
	Reverse primer	5'-aggacttggcagacagtgtga-3'
	Calibration standard	5'-ctccttgacc gaagcctgct gtgcggaagg ggctgacct gactgctatg acaccaggac ctgagcactg tctgccaagt cctgtg-3'
AMBP	Forward primer	5'-gaccaccattactgccaag-3'
	Reverse primer	5'-gccatggtgaagatggagtc-3'
	Calibration standard	5'-atggaccac cattactgcc aagetctacg ggcgggccc gcagctgagg gaaactctcc tgcaggactt cagagtgtt gcccagggtg tgggcatccc tgaggactcc atcttcacca tggtga-3'
GAPDH	Forward primer	5'-gcaccgtcaaggctgagaac-3'
	Reverse primer	5'-tggtgaagacgccagtga-3'
	Calibration standard	5'-atggcaccgt caaggctgag aacgggaagc ttgtcatcaa tggaaatccc atcaccatct tccaggagcg agatccctcc aaaatcaagt ggggcgatgc tggcgtgag tacgtcgtgg agtccactgg cgtcttcacc acca-3'

III-2-iv) 血漿採取及び血漿からのトータル RNA 抽出

EDTA-2K 処理された採血管に 6 mL 採血し、血漿を得るために 1300 × g、10 分間、室温で遠心分離した。患者の血漿は大阪府済生会中津病院にて採取し、直ちに -30°C で保存した。その後、ドライアイス氷冷下で武田薬品工業株式会社に送付し、使用まで -80°C で保存した。健常人の血漿は武田薬品工業株式会社に採取し、使用まで -80°C で保存した。血漿からの total RNA 抽出は、第 II 章の II-2-iii に記載した方法と

同様な方法で実施した。サンプル間の total RNA 抽出、逆転写反応及び PCR 反応効率の差を補正するための外部標準遺伝子として、コピー数既知の λ polyA plus RNA-A (Takara) を溶解バッファーに添加した。

III-2-v) リアルタイム定量 RT-PCR 法による血漿中 mRNA の解析

血漿から抽出した total RNA の 3~7 μ L を、PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて逆転写した。各 mRNA に特異的な reverse プライマーを逆転写反応に用いた。逆転写反応によって合成した cDNA の増幅は、実験材料と実験方法 III-2-iii 「ヒト臓器/組織由来 total RNA を用いた相対発現解析」に記載した方法と同様な方法でモニターした。Table III-1 に示した検量線標品の段階希釈系列 ($1-10^6$ copies/ μ L) を用い、各 mRNA のコピー数を絶対定量した。検量線の下限值である 1 copy/ μ L 未満の値は 0 とみなした。定量値は、外部標準遺伝子としてサンプルに添加した λ polyA plus RNA-A の回収率で補正した。血漿中 mRNA の量は 1 mL あたりのコピー数として表記した。 λ polyA plus RNA-A を検出するためのプライマーは、Real-time primer for λ polyA (Takara) を用いた。

III-2-vi) 統計学的解析

統計学的解析は、SAS function PROBMC を用いて実施した。Shapiro-Wilk 検定の結果、データが正規分布を示さなかったことから、健常人と肝障害患者の比較は、ノンパラメトリックな手法である Wilcoxon 検定によって実施した。肝障害患者における血漿中 mRNA 量と血液生化学的パラメーターとの相関解析は、Spearman 順位相関分析によって実施した。本実験では、健常人と肝障害患者の両群間で性別及び年齢の分布に差があったことから、性別及び年齢の群間の差が各パラメーターの群間の差に及ぼす影響を評価するために、群、性別、年齢、群と性別の交互作用及び群と年齢の交互作用の 5 要因からなる重回帰分析を実施した。有意水準は $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), 及び $p < 0.001$ (***) とした。

第3節 結果

III -3-i) ヒト 10 臓器/組織における肝臓特異的 mRNA の発現

公共の遺伝子発現データベース (RefEx, <http://refex.dbcls.jp/index.php?lang.en>) 上の情報では、ターゲットとした ALB、APOH、GC 及び AMBP mRNA は高い肝臓特異性を有していた。しかし、一般的に mRNA の検出感度は測定手法により異なることから、上記 4 種の mRNA についてヒトの主要臓器/組織における発現分布解析を実施し、これらの肝臓特異性を実験的に検証した。4 種の mRNA のヒト主要 10 臓器/組織における相対発現レベルをリアルタイム定量 RT-PCR 法により定量した。全ての mRNA について、肝臓において他の 9 臓器/組織と比較して顕著に高い発現が認められたことから (Figure III-1A-D)、これら mRNA のヒトにおける高い肝臓特異性が確認された。4 種の肝臓特異的 mRNA の肝臓における相対的な発現レベルを比較した結果、APOH、GC 及び AMBP mRNA の ALB mRNA に対する比率はそれぞれ 4.6%、2.2% 及び 2.0% であった (Figure III-1E)。

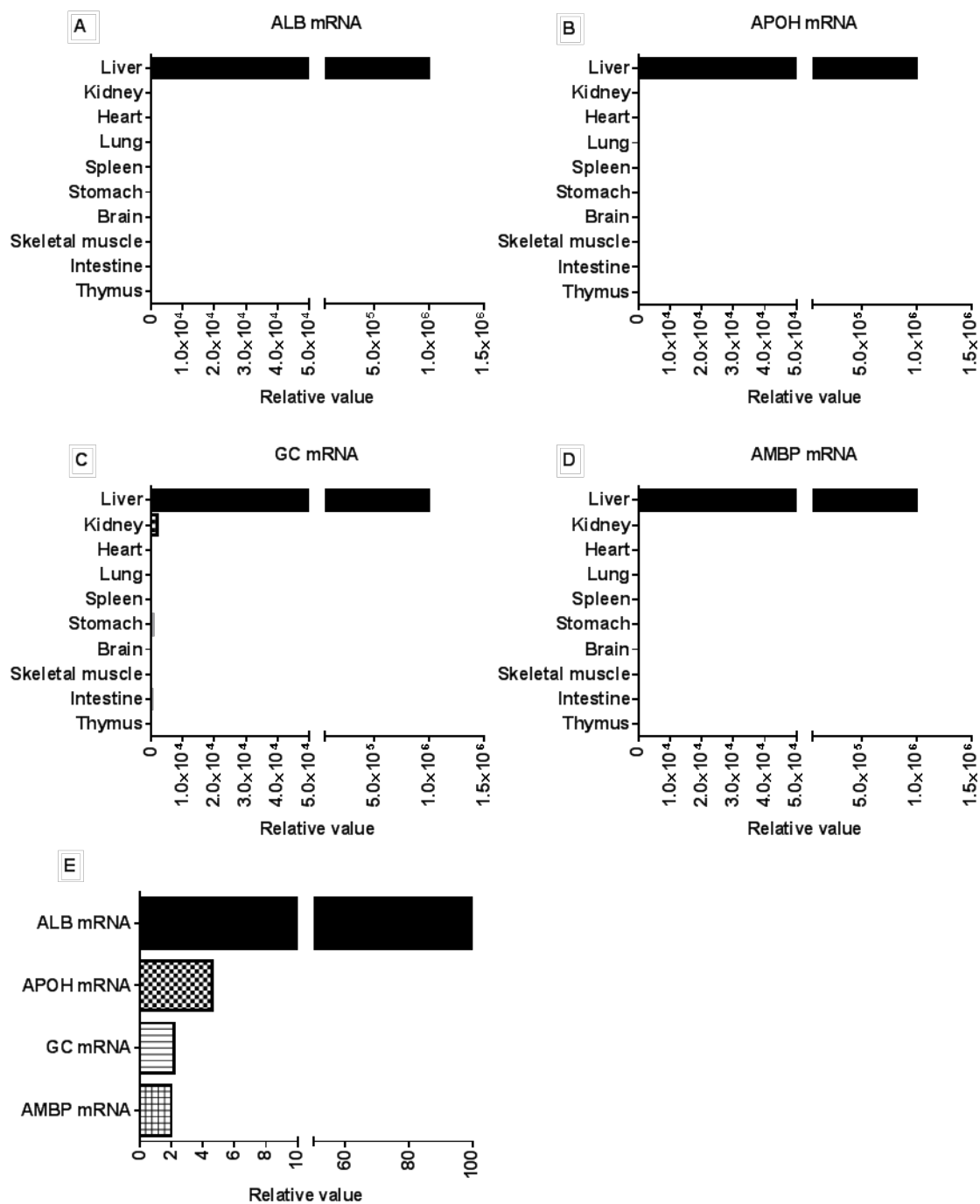


Figure III-1. Expression levels of four liver-specific genes in the major organs and tissues of humans.

(A–D) The relative expressions of ALB, APOH, GC, and AMBP mRNAs in human organs and tissues. GAPDH mRNA was used as a reference for normalization. (E) Comparison of the expression levels of the four target mRNAs in human liver.

III -3-ii) 健常人及び肝障害患者における血漿中肝臓特異的 mRNA の定量

ヒトにおいて、肝障害の有無と血漿中肝臓特異的 mRNA 量の関連を検討した。健常人と肝障害患者において、血漿中の 4 種の肝臓特異的 mRNA を定量した。本実験の全被験者のデータを Table III-2 にまとめた。肝障害患者の診断名は、実験材料と実験方法 III-2-i 「研究対象とした被験者/患者」に記載した。患者の診断名は様々であったが、本実験ではターゲットとした 4 種の mRNA について、特定の肝障害を検出するためのバイオマーカーとしてではなく、ヒトにおいて肝障害を広く検出するためのバイオマーカーとしての可能性を検証することを目的としたため、全ての患者をまとめて肝障害患者群に含めた。Figure III-2 に、健常人及び肝障害患者の血清中 ALT 及び血漿中肝臓特異的 mRNA のコピー数をドットプロットで示した。血清中 ALT は、健常人と比較して肝障害患者において増加していた。ほぼ全ての患者において、血清中 ALT は $1 \times$ upper limit of normal (ULN : 40 U/L、Figure III-2A 中の点線)を超えており、肝障害が示唆された。全ての健常人において、血清中 ALT は ULN 未満であった。このとき、血漿中 ALB、APOH、GC 及び AMBP mRNA 量についても健常人と比較して肝障害患者において増加していた (Figure III-2B-E)。健常人における血漿中 ALB 及び GC mRNA 量の最大値は、それぞれ 2,168 及び 266 copies/mL であった (Table III-2)。APOH 及び AMBP mRNA は健常人の血漿中で検出されなかった。

次に、血清中 ALT を基準に肝障害患者を 3 グループ (Group I、II 及び III)に分類した。各グループの例数及び血清中 ALT の範囲は、それぞれ Group I は 4 例及び ULN 未満、Group II は 7 例及び ULN 以上、ULN の 3 倍未満、ならびに Group III は 10 例及び ULN の 3 倍以上であった。本実験では、血漿中 ALB 及び GC mRNA 量の正常値の基準として健常人で認められた最大値 (それぞれ 2,168 及び 266 copies/mL) を設定した。血漿中 APOH 及び AMBP mRNA はいずれの健常人においても検出されなかったことから、これらの基準値は 0 copies/mL とした。続いて、各グループにおける 4 種の血漿中肝臓特異的 mRNA 量を上述の基準値と比較した (Figure III-3)。血漿中 ALB mRNA 量は、Group I の患者においては全例で基準値未満であり (938-

1,890 copies/mL)、Group II の 7 例中 2 例及び Group III の全例において基準値以上であった (4,039–21,167,631 copies/mL)。血漿中 APOH mRNA 量は、Group I、II 及び III の患者において、それぞれ 4 例中 3 例、7 例中 4 例及び全例で基準値を超えていた (114–662,163 copies/mL)。血漿中 GC 及び AMBP mRNA は、Group I 及び II の患者全例において検出されなかった。血漿中 GC 及び AMBP mRNA 量は、Group III においてはそれぞれ 10 例中 5 例及び 10 例中 4 例で増加していた (GC mRNA: 14,379–323,549 copies/mL, AMBP mRNA: 273–3,317 copies/mL)。血清中 ALT、AST 及び CK の高値 (それぞれ 49、72 及び 3,434 U/L) が認められたために本実験から除外された 1 名の被験者においては、血漿中肝臓特異的 mRNA 量はいずれも基準値未満であった (data not shown)。

Table III-2. Baseline characteristics of the study population ^a

Group	Healthy donors	Patients with liver injury
Individuals, n	29	21
Sex		
Male, n	20	7
Female, n	9	14
Age, years	42 (25–57)	58 (26–85)
Serum chemistry		
ALT, U/L	17 (8–35)	77 (19–2,011)
AST, U/L	21 (13–35)	117 (30–1,197)
Plasma liver-specific mRNAs		
ALB mRNA, copies/mL	865 (225–2,168)	4,373 (640–21,167,631)
APOH mRNA, copies/mL	0 (0–0)	407 (0–662,163)
GC mRNA, copies/mL	0 (0–266)	0 (0–323,549)
AMBP mRNA, copies/mL	0 (0–0)	0 (0–3317)

^a Data for age, serum chemistry parameters, and plasma liver-specific mRNAs are presented as the median (range).

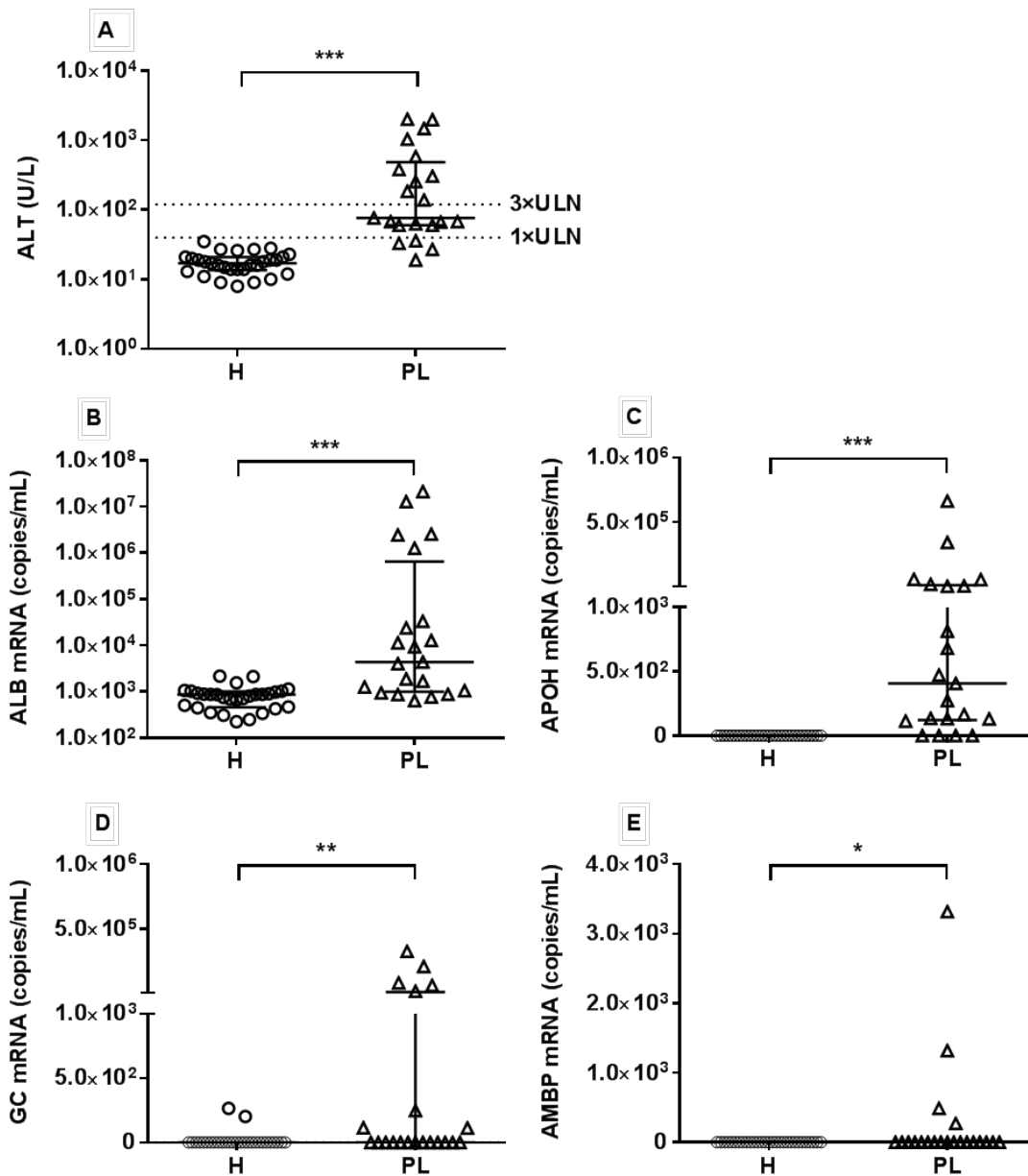


Figure III-2. Quantification of four liver-specific mRNAs in plasma from healthy donors and patients with liver injury.

Serum ALT level (A) in individual subjects and copy numbers of ALB (B), APOH (C), GC (D), and AMBP (E) mRNAs in plasma are plotted. H and PL denote healthy donors and patients with liver injury, respectively. With regard to the patients who received transcatheter arterial chemoembolization (TACE) or transcatheter arterial infusion (TAI), the data before TACE or TAI were used for the analysis. The dotted lines in (A) indicate 1×ULN and 3×ULN of serum ALT. The whisker caps and the horizontal line within the caps indicate the 75th and 25th percentiles and the median, respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with the healthy donors (Wilcoxon test).

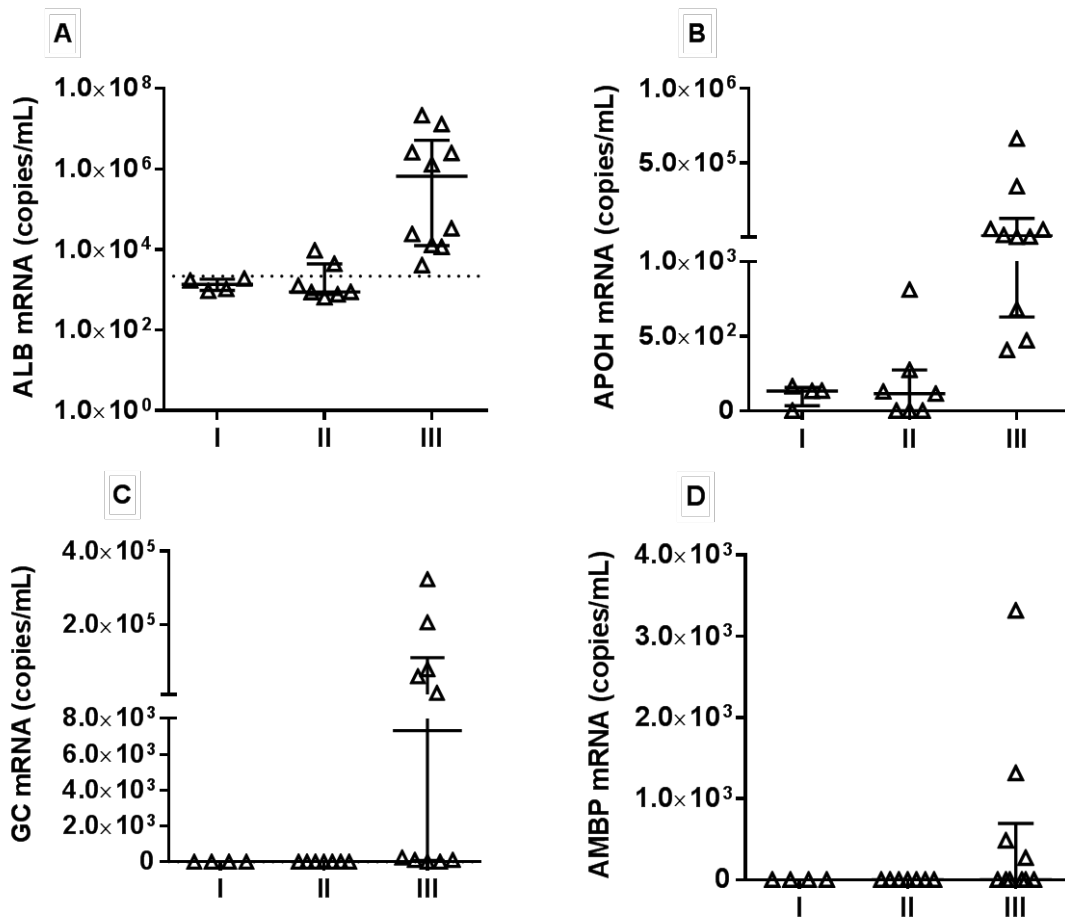


Figure III-3. Plasma levels of four liver-specific mRNAs in patients with liver injury stratified by serum ALT.

All the patients were divided into three groups of 4, 7, and 10 (Groups I, II, and III, respectively) according to sALT levels; Group I: below 1×ULN, Group II: between 1×ULN and 3×ULN, Group III: above 3×ULN. The copy numbers of ALB (A), APOH (B), GC (C), and AMBP (D) mRNAs in plasma are plotted. The dotted lines in (A) and (C) indicate the maximum values in healthy donors (2168 and 266 copies/mL for ALB and GC mRNAs, respectively). The whisker caps and the horizontal line within the caps indicate the 75th and 25th percentiles and the median, respectively.

III -3-iii) 血漿中肝臓特異的 mRNA 量と肝障害の程度との相関

前項では、血漿中 4 種の肝臓特異的 mRNA が健常人と比較して肝障害患者において増加していること、あるいは肝障害患者においてのみ検出されることを示した。次に、血漿中肝臓特異的 mRNA 量が、血清中 ALT 及び AST で評価した場合の肝障害の程度と相関するか否か検証した。血漿中 ALB、APOH 及び GC mRNA は、血清中 ALT 及び AST と有意に相関した (Figure III-4, Table III-3)。血漿中 AMBP mRNA は、血清中 ALT 及び AST と相関する傾向がみられたが、相関係数は他の 3 種の肝臓特異的 mRNA と比較して小さかった。さらに、血漿中肝臓特異的 mRNA 量と、胆汁鬱滞パラメーターである血清中 total bilirubin (T-Bil)、alkaline phosphatase (ALP) 及び gamma-glutamyl transferase (GGT) ならびに肝機能パラメーターである血清中 ALB 及び zinc sulfate turbidity test (ZTT) との相関を解析した。血漿中 APOH mRNA 量と血清 T-Bil はわずかに相関したが、それ以外に 4 種の血漿中肝臓特異的 mRNA と胆汁鬱滞及び肝機能パラメーターとの相関は認められなかった (Table III-3)。

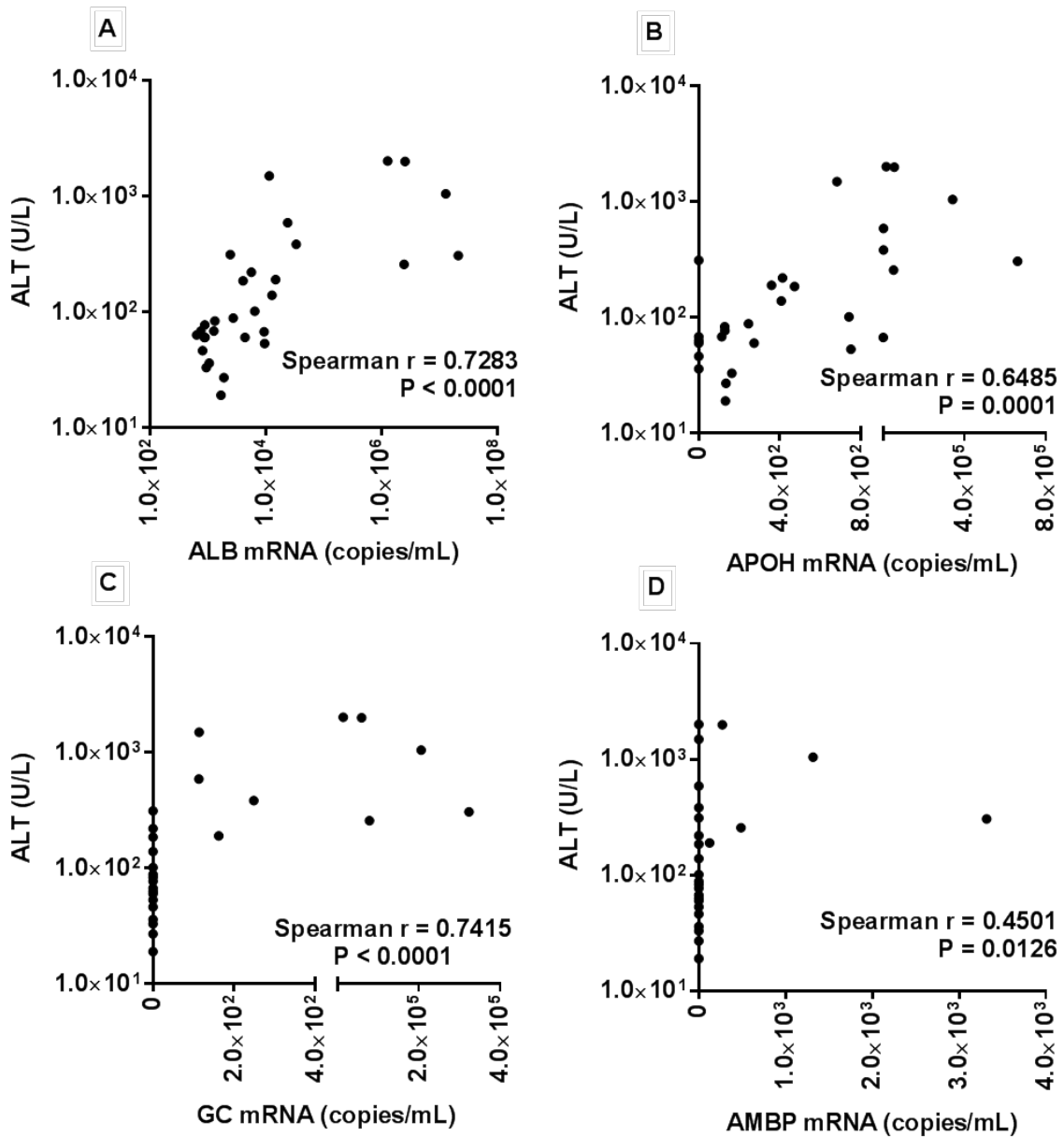


Figure III-4. Correlation between plasma liver-specific mRNAs and severity of liver injury.

Correlations of plasma ALB (A), APOH (B), GC (C), and AMBP (D) mRNA levels with serum ALT levels in patients with liver injury. For patients who underwent TACE or TAI, data obtained both before and after TACE or TAI were used for the analysis.

Table III-3. Correlation of plasma liver-specific mRNAs with serum chemistry parameters

Serum chemistry parameters	ALB mRNA	APOH mRNA	GC mRNA	AMBP mRNA
ALT				
Spearman r	0.7283	0.6485	0.7415	0.4501
P value	< 0.0001	0.0001	< 0.0001	0.0126
AST				
Spearman r	0.6886	0.6325	0.6676	0.4280
P value	< 0.0001	0.0002	< 0.0001	0.0183
T-Bil				
Spearman r	0.3511	0.3795	0.2638	-0.0686
P value	0.0571	0.0386	0.1590	0.7186
ALP				
Spearman r	0.0509	0.0987	-0.1012	-0.1765
P value	0.7892	0.6037	0.5945	0.3509
GGT				
Spearman r	0.3487	0.3276	0.2109	0.1591
P value	0.0590	0.0772	0.2632	0.4010
Alb				
Spearman r	0.1772	0.222	0.1712	-0.0217
P value	0.3487	0.2384	0.3657	0.9094
ZTT				
Spearman r	-0.3046	-0.3531	-0.2703	0.0230
P value	0.1017	0.0556	0.1486	0.9041

III -3-iv) TACE あるいは TAI 施術前後の血漿中肝臓特異的 mRNA 量の変化

血漿中肝臓特異的 mRNA 量の増加が肝臓における障害に起因することを確認するため、肝臓治療のための施術として TACE (7 例) あるいは TAI (2 例) を受けた患者において、施術前後の血漿中肝臓特異的 mRNA を定量した。TACE は、肝臓組織を栄養する肝動脈をゼラチンなどによって塞栓することで、肝臓細胞を虚血壊死させる施術である。本処置により、肝臓細胞だけでなく正常肝臓細胞にも一部傷害を誘発し、血清中 ALT の増加を来することが知られている (Ma et al., 2013)。本実験では、施

術後の測定値が施術前の測定値と比較して2倍以上、かつ施術後の測定値がULN以上であった場合に、TACEあるいはTAI施術による血清中ALTの増加と判断した。血清中ALTは、TACEを受けた患者7例のうち6例において施術後に増加し、1例(subject No. 43)では増加は認められなかった(Figure III-5)。TAIを受けた患者2例においては、施術前後で血清中ALTに変化は認められなかった。血漿中肝臓特異的mRNA量については、施術後の測定値が施術前の測定値と比較して2倍以上、かつ施術後の測定値が健常人で認められる最大値を上回った場合に、TACEあるいはTAI施術による増加と判断した。血漿中ALB及びAPOH mRNA量は、TACEを受けた患者7例のうちそれぞれ5例及び6例において施術後に増加し、その他の患者では増加は認められなかった。TAIを受けた2例の患者においては、施術前後でALB及びAPOH mRNA量に変化は認められなかった。血漿中GC及びAMBP mRNA量は、患者1例のみにおいてTACE施術後に増加したが、他の患者においてはTACEあるいはTAI施術前後で変化は認められなかった。

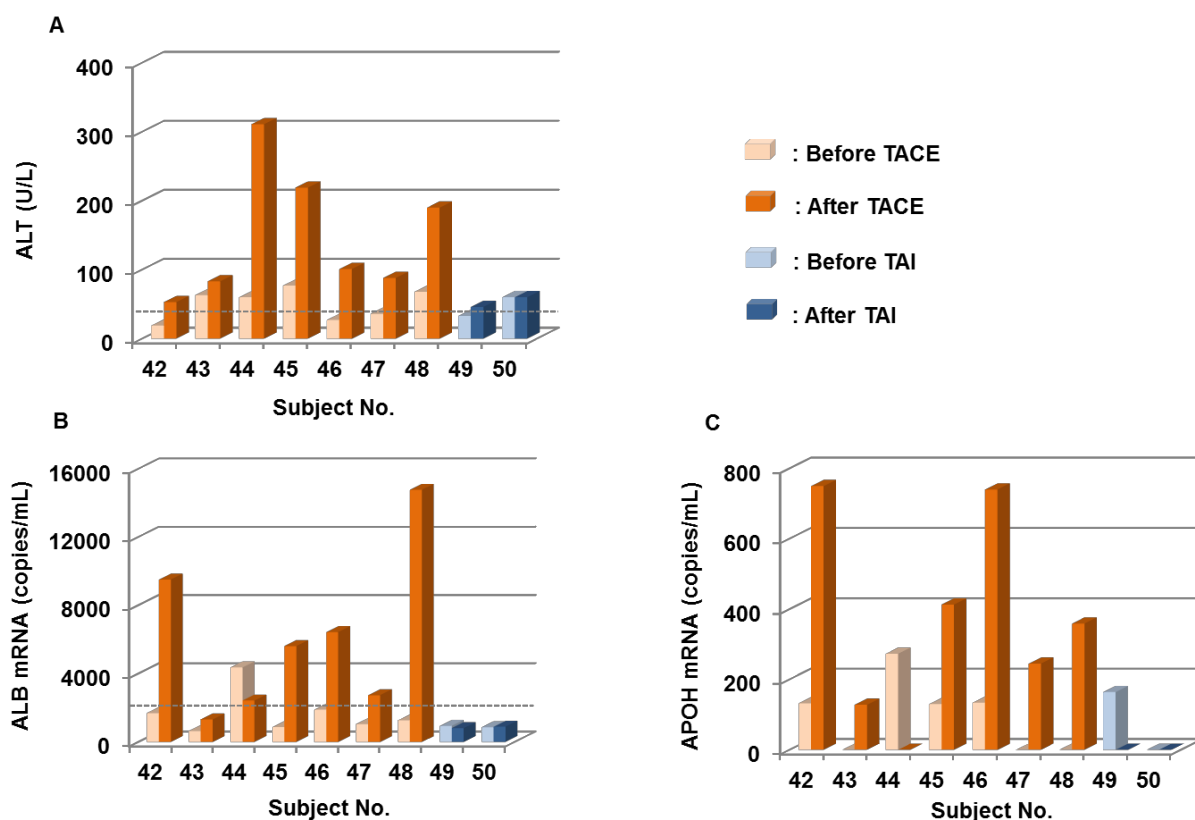


Figure III-5. Effects of transcatheter arterial chemoembolization (TACE) or transcatheter arterial infusion (TAI) on plasma ALB and APOH mRNA levels.

Serum ALT (A) levels in 9 patients and copy numbers of ALB (B) and APOH (C) mRNAs in plasma before and after receiving TACE or TAI. The subject numbers correspond to those shown in Supplementary Table S3. The dotted lines in (A) and (B) indicate 1×ULN of serum ALT and the maximum value of plasma ALB mRNA in healthy donors, respectively.

第4節 考察

肝臓特異性が十分でない既存のバイオマーカーのみによって肝障害を精確にモニターすることは困難な場合があることから、新たな肝臓特異的バイオマーカーの探索とその適格性確認が望まれている。特に医薬品の臨床開発の視点から、血漿/血清中の肝逸脱酵素の増加と肝障害との関連の有無を判断する際に、より肝臓特異性の高いバイオマーカーを評価することは重要な意義をもつ。本章では、ラットにおいて新規肝障害バイオマーカーとしての有用性が示された末梢血中 4 種の肝臓特異的 mRNA (ALB、APOH、GC 及び AMBP mRNA) について、臨床における利用可能性

を検討することでその有用性のさらなる検証を試みた。前述の通り、血漿/血清中肝逸脱酵素は不十分な肝臓特異性が難点として認識されてはいるが、本実験に参加した患者はいずれも何らかの肝疾患と診断され、明らかに肝障害を発症していたことから、これらの肝逸脱酵素を本実験において肝障害の指標として用いることは妥当であると判断した。

ターゲットとした4種の mRNA は、網羅的遺伝子発現データベース上ではヒトにおける肝臓特異性は高い mRNA であったが、これらの肝臓特異性をリアルタイム定量 RT-PCR 法により確認した。第 II 章で論じたように、臓器/組織におけるデータベース上の遺伝子発現情報と実際の発現解析結果が一致しない場合があることから、評価対象とする動物種において実験的に肝臓特異性を確認することが望ましい。ヒト主要臓器/組織における相対発現分布解析の結果、4種のターゲット mRNA が高い肝臓特異性を有することが、ヒトにおいても確認された (Figure III-1A-D)。

血漿中の4種の肝臓特異的 mRNA は、健常人と比較して肝障害患者において増加しており、血漿中のコピー数は ALB、APOH、GC、AMBP mRNA の順で多かった (Table III-2, Figure III-2)。この順位は肝臓における相対的な発現量の順位と一致していた (Figure III-1E)。この結果より、血漿中の肝臓由来 mRNA の検出感度は肝臓における発現量に依存することが示唆された。それゆえ、肝障害患者における血漿中 GC 及び AMBP mRNA 量が、ALB 及び APOH mRNA 量と比較して少なく、軽度な血清中 ALT の増加を示す患者においてこれらが検出されなかったことは妥当な結果であると考えられた。一方、第 II 章で示した通り、種々の薬剤性肝障害を誘発したラットにおいては、血漿中 Gc 及び Ambp mRNA は Apoh mRNA と同等あるいはそれ以上のコピー数を示した。従って、前臨床・臨床ともに利用可能なバイオマーカーの開発を目指す場合、そのバイオマーカー候補の実験動物とヒトの両方における臓器/組織発現レベルを確認することが有益であると考えられる。血漿中 GC 及び AMBP mRNA 量は、血清中 ALT が ULN の3倍以上を示す患者のうち数例においてのみ増加していた (Figure III-3C, D)。これらの結果から、ヒトにおける肝障害をモニターするうえで、

GC 及び AMBP mRNA は十分な検出感度を有していないと考えられた。さらに、血漿中 GC mRNA は健常人においても 29 例中 2 例において検出されたことから、この肝臓特異的 mRNA の測定によって疑陽性の結果が生じる可能性は否定できない。

本実験では、健常人と肝障害患者の両群間で性別及び年齢の分布に差があった。しかし、群、性別、年齢、群と性別の交互作用及び群と年齢の交互作用の 5 要因からなる重回帰分析の結果、性別及び年齢の群間の差は、血漿中 4 種の mRNA 量及び血清中 ALT に対して有意な影響を及ぼさないことが示された (Table III-4)。この結果に基づき、健常人と肝障害患者の群間で上記パラメーターを比較することは可能であると判断した。一方で、群と年齢の交互作用の P 値は他の因子と比較して小さかった (例：ALB mRNA では $p=0.0641$)。本実験において、血清中 ALT で評価した場合の肝障害の程度が強かった患者は、薬剤性肝障害あるいは B 型肝炎ウイルス感染の患者であり、これらは他の患者と比較して年齢が若い傾向がみられた。これに対して、60 歳以上の高齢の患者のほとんどは肝細胞癌あるいは慢性 C 型肝炎ウイルス感染の患者であり、これらの血清中 ALT は比較的低い値を示していた (Table III-5)。また、健常人では年齢の差による各パラメーターへの影響は認められなかった (data not shown)。従って、患者群内における年齢の差よりも肝障害の程度の差が、群と年齢の交互作用における低い P 値に寄与していると考えられた。

Table III-4. Multiple regression analysis including five factors

Variables	P value				
	ALB mRNA	APOH mRNA	GC mRNA	AMBP mRNA	ALT
Group	0.0060	0.0133	0.0037	0.0220	0.0015
Sex	0.5925	0.7319	0.6601	0.9799	0.4579
Age	0.0641	0.0960	0.0503	0.1244	0.0613
Group × Sex ^a	0.5927	0.7319	0.6591	0.9799	0.4716
Group × Age ^b	0.0641	0.0960	0.0505	0.1244	0.0589

^a Interaction between group and sex

^b Interaction between group and age

Table III-5. Individual data for all parameters

Group	Subject No.	Diagnosis	Sex	Age	Plasma mRNA (copies/mL) ^a				Serum chemistry parameters ^b						
					ALB	APOH	GC	AMBP	ALT	AST	T-Bil	ALP	GGT	Alb	ZTT
Heathy donors	1		M	31	873	0	0	0	15	19	0.4	242	22	4.8	5.7
	2		F	42	924	0	0	0	18	18	0.5	166	17	4.5	4.0
	3		M	33	980	0	0	0	28	22	0.7	158	24	4.8	10.7
	4		M	44	427	0	0	0	20	23	0.7	225	18	4.6	6.6
	5		F	55	1031	0	0	0	21	21	0.7	209	22	4.7	10.9
	6		M	29	656	0	0	0	16	19	0.5	182	21	4.7	8.3
	7		M	56	1060	0	0	0	13	16	0.5	240	24	4.4	3.5
	8		F	52	810	0	0	0	26	31	0.7	279	41	4.7	9.5
	9		F	43	510	0	266	0	8	13	0.5	124	11	4.2	8.9
	10		M	29	1033	0	203	0	14	17	0.6	200	23	4.9	6.4
	11		M	47	450	0	0	0	19	22	0.5	178	22	4.6	3.4
	12		F	42	880	0	0	0	27	35	0.6	209	176	4.5	4.3
	13		F	52	225	0	0	0	10	16	0.4	210	13	4.3	7.9
	14		M	54	905	0	0	0	9	16	0.4	201	12	4.5	6.4
	15	NA	F	30	339	0	0	0	11	21	0.5	137	8	4.1	6.8
	16		M	35	471	0	0	0	16	21	1.8	380	18	4.3	8.5
	17		F	35	890	0	0	0	14	21	0.4	137	20	4.5	8.5
	18		M	41	2118	0	0	0	17	17	0.5	255	24	4.4	8.7
	19		M	38	1563	0	0	0	27	24	1.2	186	16	4.5	5.9
	20		M	57	711	0	0	0	19	24	0.6	182	22	4.2	7.2
	21		M	55	694	0	0	0	18	20	1.5	303	26	4.6	4.6
	22		M	43	1141	0	0	0	35	30	0.5	212	32	4.5	8.1
	23		M	36	875	0	0	0	21	21	0.8	214	19	4.5	5.2
	24		F	25	312	0	0	0	9	13	0.4	160	10	4.3	5.2
	25		M	31	2168	0	0	0	12	19	0.3	189	26	4.6	3.8
	26		M	36	865	0	0	0	23	22	0.4	251	37	4.5	7.6
	27		M	33	250	0	0	0	16	15	0.5	259	12	4.5	5.2
	28		M	43	351	0	0	0	14	18	1.9	147	27	4.6	5.4
	29		M	50	753	0	0	0	19	23	1.1	274	29	4.2	7.1
Patients with liver injury	30	Acute DILI	F	43	23811	2890	113	0	586	484	3.7	636	370	4.0	19.0
	31	Acute DILI	F	78	11478	681	114	0	1488	254	3.4	376	153	3.4	4.4
	32	Acute DILI	F	43	9353	813	0	0	67	200	7.0	445	53	3.8	18.7
	33	Acute DILI	F	37	33405	2529	248	0	383	311	4.2	335	88	4.0	12.8
	34	AHB	M	26	12807027	342303	206408	1317	1044	592	5.7	315	79	4.1	12.9
	35	AHB	M	26	1271253	15499	14379	0	2011	1157	18	438	39	4.1	12.0
	36	AHB	F	39	2549477	55583	59570	273	1990	1197	8.9	446	84	3.6	11.2
	37	CHB	F	34	21167631	662163	323549	3317	305	240	0.4	452	241	3.7	23.5
	38	CHB	F	41	2452007	51651	78844	487	257	280	0.9	326	161	2.9	38.1
	39	CHB	F	39	4039	472	0	0	185	64	0.5	254	59	4.6	16.8
	40	CHC	F	60	759	114	0	0	68	47	0.9	292	75	4.1	20.1
	41	AIH	F	60	12785	407	0	0	139	53	1.8	510	509	4.1	12.5
Patients with liver injury (before TACE or TAI)	42	HCC (B-, C-)	M	85	1687	132	0	0	19	30	0.6	598	130	3.7	13.0
	43	HCC (C+)	F	67	640	0	0	0	63	80	0.8	502	59	3.4	18.4
	44	HCC (C+)	M	76	4373	273	0	0	60	117	1.5	465	216	3.2	17.0
	45	HCC (C+)	M	77	880	130	0	0	77	126	1.1	605	60	2.9	39.0
	46	HCC (C+)	M	66	1890	134	0	0	27	49	1.1	354	102	3.2	34.9
	47	HCC (C+)	F	77	1049	0	0	0	36	93	0.5	233	52	3.6	36.9
	48	HCC (C+)	F	77	1264	0	0	0	68	56	0.6	319	25	3.5	28.3
	49	HCC (C+)	M	77	938	164	0	0	33	74	1.6	340	72	3.2	17.4
	50	HCC (C+)	F	78	867	0	0	0	60	105	1.0	457	65	3.8	21.1
Patients with liver injury (after TACE or TAI)	42	HCC (B-, C-)	M	85	9516	750	0	0	53	125	1.3	603	157	3.8	13.8
	43	HCC (C+)	F	67	1324	128	0	0	83	113	1.7	415	60	3.7	19.9
	44	HCC (C+)	M	76	2427	0	0	0	311	387	1.4	440	193	2.9	28.4
	45	HCC (C+)	M	77	5619	413	0	0	219	333	1.2	536	59	2.7	41.1
	46	HCC (C+)	M	66	6438	740	0	0	101	221	1.0	350	95	3.0	27.1
	47	HCC (C+)	F	77	2738	245	0	0	88	263	0.7	258	52	3.5	34.2
	48	HCC (C+)	F	77	14772	359	162	126	190	213	0.6	261	25	3.4	33.9
	49	HCC (C+)	M	77	807	0	0	0	46	68	1.7	332	74	3.6	18.4
	50	HCC (C+)	F	78	896	0	0	0	60	105	1.1	430	65	3.8	22.9

^a The values below the lower limit of quantification were presumed to be 0.^b The unit for each parameter was as follows; ALT, AST, ALP, GGT and CK: U/L, T-Bil: mg/dL, Alb: g/dL, ZTT: Kunkel unit.

M: male, F: female, NA: not applicable, DILI: drug-induced liver injury, AHB: acute hepatitis B, CHB: chronic hepatitis B, CHC: chronic hepatitis C, AIH: autoimmune hepatitis, HCC (B-, C-): hepatocellular carcinoma negative for both hepatitis B and C virus, HCC (C+): hepatocellular carcinoma positive for hepatitis C virus

血漿中肝臓特異的 mRNA と既存の血液生化学的パラメーターとの相関解析を実施した。その結果、興味深いことに血漿中肝臓特異的 mRNA と肝細胞壊死マーカー（血清中 ALT 及び AST）との間には有意な相関関係が認められた一方で、胆汁鬱滞マーカー（血清中 T-Bil、ALP 及び GGT）及び肝機能マーカー（血清中 ALB 及び ZTT）とは相関しなかった (Figure III-4, Table III-3)。従って、血漿中肝臓特異的 mRNA は主に肝細胞壊死を検出するバイオマーカーであることが示された。Figure III-3 の Group II における数例の患者では、血清中 ALT は増加 (ULN 以上、ULN の 3 倍未満) していた一方で、血漿中 ALB mRNA 量は健常人と同等であった。これらは、慢性肝疾患 (C 型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌及び慢性 C 型肝炎ウイルス感染) と診断された患者であった。これまでの研究で、慢性 C 型肝炎の患者において、肝線維化の過程で肝細胞内の ALB 遺伝子の発現が抑制されているという報告がある (Shao et al., 2005)。上述したように、血漿中の肝臓特異的 mRNA 量は、肝臓における mRNA の相対発現レベルを反映する。これより、一部の慢性肝疾患患者において認められた血漿中 ALB mRNA と血清中 ALT の不整合は、肝臓における ALB 遺伝子の発現低下に起因すると考えられた。従って、C 型肝炎ウイルス感染による慢性肝疾患においては、血漿中 ALB mRNA の肝障害バイオマーカーとしての価値は限定される可能性が示唆された。

肝臓における APOH mRNA の相対発現量は、ALB mRNA に対してわずか 4.6% であった (Figure III-1E)。それにも関わらず、ULN 未満あるいは ULN の 3 倍未満の血清中 ALT を示す 11 例の患者 (Figure III-3 の Group I 及び II) のうち 7 例において血漿中 APOH mRNA が検出された。一方、健常人では血漿中 APOH mRNA は検出されなかった (Figure III-1)。最近の報告によると、血漿中 APOH タンパク質の量が C 型肝炎ウイルスの体内クリアランスに関連している (Laird et al., 2014)。Group I 及び II の患者のうち 9 例が C 型肝炎ウイルス陽性であり、このうち 5 例において血漿中 APOH mRNA が検出されたことは注目すべき点である。さらに、血清中 ALT が ULN 未満であり、血漿中 ALB mRNA が健常人と同程度であった Group I の患者 4 例のう

ち3例において血漿中 APOH mRNA が検出された。以上の結果より、特に C 型肝炎ウイルスが関与する肝障害においては、血漿中 APOH mRNA の肝障害バイオマーカーとしての特性は、血漿中 ALB mRNA 及び血清中 ALT とは異なると推察された。異なる性質を有する肝障害バイオマーカーの組み合わせにより、肝障害の検出感度の向上やその原因究明が期待できる。この可能性の検証は、今後の研究の課題である。

人工的に肝臓限定的な傷害を惹起する TACE 施術後に、血漿中 ALB 及び APOH mRNA 量が増加したことは、これら肝臓特異的 mRNA の肝障害特異性を示している (Figure III-5)。TAI を受けた患者 2 例 (Figure III-5 の Subject No. 49 及び 50) では、施術後に血清中 ALT ならびに血漿中 ALB 及び APOH mRNA 量に大きな増加は認められなかった。TAI では、肝癌組織への抗癌剤注入後に肝動脈が塞栓されないため、肝臓への傷害は TACE と比較して弱いことが知られている (Ma et al., 2013)。ゆえに、TAI 施術後に血漿中 ALB 及び APOH mRNA 量が増加しなかったことは、肝臓特異的 mRNA の肝障害特異性をさらに支持している。予想外の結果として、患者 1 例 (Subject No. 44) では、TACE 施術後に血清中 ALT は増加した一方で、血漿中 ALB 及び APOH mRNA 量の増加は認められなかった。TACE は、肝癌細胞のみならず正常な肝細胞にも傷害を与える (Ma, et al., 2013)。Wong らは、ヒトの肝癌細胞における ALB 遺伝子発現が、正常肝細胞と比較して最大 10 分の 1 程度に低下していることを報告している (Wong et al., 2000)。ゆえに、TACE により傷害を受ける肝癌細胞数に対する正常肝細胞数の割合が小さい場合には、TACE 施術後に血漿中 ALB mRNA 量の増加には至らない可能性が考えられる。この患者においては、TACE 施術により傷害を受けた正常肝細胞が少数であったことが、血漿中 ALB mRNA が増加しなかった要因の一つとして推察された。しかしながら、血漿中 APOH mRNA が相応の変化を示さなかった原因は不明である。

臨床における薬剤性肝障害をバイオマーカーによってモニターすることは重要な試みであることから、血漿中肝臓特異的 mRNA の薬剤性肝障害バイオマーカーとしての有用性をより深く検証するために、さらなる臨床研究が必要である。本実験で

は薬剤性肝障害の患者が4例含まれており、これらの患者においては血漿中 ALB 及び APOH mRNA 量の増加が認められた。臨床における薬剤性肝障害は、主に肝細胞壊死、胆汁鬱滞及びその混合型の3つに分類される (Fontana et al., 2010)。これら3つのタイプの患者を含め、より多数の被験者における解析が望まれる。新薬の臨床開発において、“ULN の3倍の血清中 ALT” が薬剤性肝障害のリスクを判定するための重要なクライテリアの一つであるため (Leise et al., 2014)、本実験において ULN の3倍以上の血清中 ALT を示す患者において血漿中 ALB 及び APOH mRNA 量の増加が確実に捉えられたことは特筆すべき点である。しかしながら、血清中 ALT は肝障害以外の要因、例えば心筋障害によっても増加し得る (Giesen, et al., 1989)。そこで、心筋梗塞の患者3例 (患者1~3) における血漿中 ALB 及び APOH mRNA を解析した。患者1、2及び3の血漿中 ALT はそれぞれ 57、90 及び 46 U/L であり、いずれも ULN を上回っていた。また心筋障害のバイオマーカーである血漿中 CK は、それぞれ 722、903 及び 602 U/L であり、本実験における健常人及び肝障害患者と比較して明らかに高い値であった。重要なことに、患者1、2及び3における血漿中 ALB mRNA 量はそれぞれ 1,529、1,783 及び 1,927 copies/mL と健常人と同等であり、血漿中 APOH mRNA はいずれの例においても検出されなかった。これらの結果は、肝障害ではない要因によって血漿/血清中 ALT が増加する場合には、血漿中肝臓特異的 mRNA は増加しないことを示しており、既存マーカーと比較して血漿中肝臓特異的 mRNA の高い肝障害特異性がさらに確認された。今後、骨格筋障害患者も含めたより多数の患者の血漿サンプルを用いた検証が待たれる。既存の血漿/血清バイオマーカーに加えて血漿中肝臓特異的 mRNA を解析することにより、より精度の高い肝障害の評価が可能と考えられる。現時点では、血漿中肝臓特異的 mRNA の測定には、既存の血液パラメーターの測定と比較してより多くの時間と費用を要する。しかし、血漿/血清中肝逸脱酵素の増加が肝障害に由来するか否かを見極める際に、血漿中肝臓特異的 mRNA を測定する価値が発揮される。例えば、新規医薬候補品の臨床試験において認められた血漿/血清中 ALT 及び AST の増加と薬剤性肝障害との関連を、血

漿中肝臓特異的 mRNA の測定によって否定することができれば、新薬の開発を継続できる可能性が増すと考えられる。今後、血漿中肝臓特異的 mRNA を臨床バイオマーカーとして実用化するために、安価で迅速な測定方法の確立が必要である。

第5節 小括

バイオマーカーとしての有用性を決定付ける大きな要因の一つに、臨床への応用可能性が挙げられる。本章では、ラットにおいて新規肝障害バイオマーカーとして見出した4種の肝臓特異的 mRNA (ALB、APOH、GC 及び AMBP mRNA) について、臨床バイオマーカーとしての利用可能性を検証した。ヒトの主要臓器/組織における遺伝子発現分布解析から、4種の mRNA のヒトにおける高い肝臓特異性を確認した。このうち ALB 及び APOH mRNA は、健常人と比較して肝障害患者において血漿中で増加していた。一方、血漿中 GC 及び AMBP mRNA 量の増加は、血清中 ALT が顕著な増加を示した患者のうち数例においてのみ認められた。血漿中肝臓特異的 mRNA は、血清中 ALT 及び AST などの肝細胞壊死性のバイオマーカーとの相関が強かった。さらに、肝癌治療のための手術 TACE により肝臓限定的な傷害を惹起した際に、血漿中 ALB 及び APOH mRNA 量が増加した。また、心筋障害患者においては血漿中 ALT が増加している一方で、血漿中 ALB 及び APOH mRNA の増加は認められなかった。以上より、血漿中 ALB 及び APOH mRNA は臨床において肝臓特異性の高い新規肝障害バイオマーカーとして利用可能であることが示された。

総括

薬剤性肝障害は、ときに生体肝移植や死亡にも繋がることもある重大な問題であり、新薬が臨床試験段階で開発中止になる、あるいは上市後の薬剤が市場から撤退する主要な原因のひとつである。よって、臨床における被験者/患者の安全性確保及び薬剤開発の成功確率の向上に向けて、肝障害を適切にモニターし評価することは重要であり、そのための手段として各種バイオマーカーが利用されている。肝障害のバイオマーカーとしては、血漿/血清中 ALT や AST などの肝逸脱酵素が臨床及び前臨床ともに汎用されてきた。しかし、ALT 及び AST の発現は肝臓特異的ではないため、横紋筋融解症や心筋梗塞の患者においても血中で増加する。また、前臨床毒性試験においては、肝臓に病理組織学的な傷害性変化が認められないにも関わらず、血漿/血清中 ALT 及び AST が高値を示すケースが散見される。このように血漿/血清中 ALT 及び AST の不完全な肝臓特異性は、肝障害の適切な検出及び評価を困難にし得る。

こうした背景から、より精度良く肝障害を評価するために、高い肝臓特異性を有したバイオマーカーの開発が望まれている。近年、末梢血中に臓器由来のセルフリーの RNA が存在することが明らかとなった。さらに、遺伝子発現解析技術の飛躍的な向上に伴い、各種臓器で特異的に発現している遺伝子に関する情報を、公共データベース等を通じて容易に入手可能となったことから、末梢血中の臓器特異的 RNA が臓器特異性の高いバイオマーカーとなり得ることが期待されている。本研究では、薬剤性肝障害モデルラット及び肝障害患者の末梢血中肝臓特異的 mRNA を解析し、それらの新規肝障害バイオマーカーとしての有用性を検証した。

第 I 章では、薬剤性肝障害モデルラットを用いて、末梢血中肝臓特異的 mRNA が新規肝障害バイオマーカーとして利用可能か否か検証した。遺伝子発現データベース及びラット全身臓器/組織における発現分布解析結果から、肝臓特異性の高い mRNA として Alb 及び Ambp mRNA を選定した。続いて、これらの mRNA が既知の

肝毒性物質である D-gal あるいは APAP を単回投与したラットの末梢血において検出されることを、定性的 RT-PCR 法により確認した。D-gal 誘発性肝障害モデルラットにおいては、末梢血中 Alb mRNA が血漿中 ALT 及び AST の増加が認められない投与 2 時間後から検出されたことより、肝障害の初期段階を検出できるマーカーである可能性が示された。一方、局所麻酔薬である BPVC を筋肉内投与した骨格筋障害モデルラットでは、骨格筋障害マーカーである血漿中 CK の増加に加えて、骨格筋由来と考えられる血漿中 ALT 及び AST の増加が認められたが、Alb 及び Ambp mRNA は末梢血中で検出されなかったことから、これら mRNA の高い肝臓特異性が確認された。以上、ラットにおいて末梢血中の Alb 及び Ambp mRNA が肝臓特異性の高い肝障害バイオマーカーとして利用できる可能性が示された。

第 II 章では、新たな末梢血中肝臓特異的 mRNA の選定及び複数の肝毒性モデルラットにおける血漿中肝臓特異的 mRNA の定量的検出により、肝障害バイオマーカーとしての有用性を検証した。ラット主要臓器における発現分布解析及び薬物誘発性肝障害ラットを用いた解析から、上記 2 種に加えて Apoh 及び Gc mRNA を新たな肝臓特異的 mRNA として選定した。続いて、Alb、Ambp、Apoh 及び Gc mRNA の肝障害バイオマーカーとしての有用性を検証するため、種々の肝毒性物質 (AFB1、APAP、APAP+BSO、BBZ、LPS 及び NMOR) を単回投与したラットの血漿を用いて、これら 4 種の肝臓特異的 mRNA をリアルタイム RT-PCR 法により定量的に解析した。その結果、4 種の肝臓特異的 mRNA は、各種肝毒性物質投与により肝障害を誘発したラットの血漿中で増加し、それらの変化は互いに相関することを示した。また、血漿中 ALT 及び病理組織学的な肝細胞壊死スコアと相関すること、及びそれらの増加の程度は血漿中 ALT と比較して顕著であることが確認された。さらに、TAA 単回投与後 24 時間まで経時的に解析した実験では、血漿中 Alb 及び Gc mRNA の増加は、血漿中 ALT の増加及び病理組織学的に肝細胞壊死が明確に捉えられる以前に認められた。以上より、血漿中肝臓特異的 mRNA は肝障害に対する応答性が高く、肝障害の初期段階を検出できるバイオマーカーである可能性が示唆された。

バイオマーカーとしての有用性を左右する重要な要素の一つに、ヒトへの外挿性が挙げられる。そこで第 III 章では、末梢血中肝臓特異的 mRNA の臨床バイオマーカーとしての利用可能性を検証した。肝障害患者の血漿中 ALB、AMBP、APOH 及び GC mRNA 量を健常人と比較した結果、血清中 ALT の増加に伴って血漿中の 4 種の肝臓特異的 mRNA の増加が認められた。既存の生化学マーカーとの比較解析から、血漿中肝臓特異的 mRNA は胆汁鬱滞及び肝機能異常マーカーよりも肝細胞壊死性マーカーとの相関が強かった。また、肝癌治療のための肝動脈塞栓術（肝癌細胞と同時に正常肝細胞にも一部傷害を与えるため、肝臓限定的に障害を惹起）を受けた患者の施術前後における血漿中 ALB 及び APOH mRNA を定量した結果、施術後に増加する傾向が認められた。さらに、血漿中 ALT 及び CK の高値を伴う心筋障害患者の血漿中では肝臓特異的 mRNA の増加は認められなかったことから、これら血漿中肝臓特異的 mRNA の高い肝障害特異性がヒトにおいても確認された。以上より、末梢血中肝臓特異的 mRNA は、ヒトへの外挿が可能な肝障害バイオマーカーであることが示された。

以上、本研究では末梢血中肝臓特異的 mRNA が臨床及び前臨床ともに利用できる有用な肝障害バイオマーカーであることを示した。血漿/血清中 ALT 及び AST 等の従来のバイオマーカーに加えて、末梢血中肝臓特異的 mRNA を解析することで、より精確に肝障害を評価することが可能であると考えられた。例えば、有望な新規医薬候補品の臨床試験において、血漿/血清中 ALT 及び AST の増加が認められた場合に、より高い肝臓特異性を有する末梢血中肝臓特異的 mRNA の測定を追加することで、ALT/AST 増加の肝障害起因性を精査することができる。その結果、肝障害の可能性を否定し、肝障害の懸念による開発中止を回避することができれば、優れた新薬を速やかに患者に届けることが可能となる。さらに、肝臓特異的 mRNA は血漿/血清中 ALT よりも鋭敏かつ早期に血中で検出され得ることから、ヒト特有な薬剤性肝障害が発症あるいは重篤化する前に投薬中止を判断することにより、被験者/患者の危険を

最小限に抑えられる可能性がある。このように、本研究で評価した末梢血中肝臓特異的 mRNA は、新薬の安全性評価をこれまで以上に精度良く行うためのトランスレーショナルなバイオマーカーとして、医薬候補品の開発及び臨床での医薬品の適正使用に大いに貢献できると期待される。

本論文内容の誌上発表

本論文の内容は以下の原著論文に発表した。

Miyamoto M., Yanai M., Ookubo S., Awasaki N., Takami K. and Imai R. (2008) Detection of Cell-Free, Liver-Specific mRNAs in Peripheral Blood from Rats with Hepatotoxicity: A Potential Toxicological Biomarker for Safety Evaluation. *Toxicol Sci* **106**(2), 538-45.

Okubo S., Miyamoto M., Takami K., Kanki M., Ono A., Nakatsu N., Yamada H., Ohno Y. and Urushidani T. (2013) Identification of novel liver-specific mRNAs in plasma for biomarkers of drug-induced liver injury and quantitative evaluation in rats treated with various hepatotoxic compounds. *Toxicol Sci.* **132**(1), 21-31.

Okubo S., Miyamoto M., Ito D., Takami K. and Ashida K. (2016) Albumin and apolipoprotein H mRNAs in human plasma as potential clinical biomarkers of liver injury: analyses of plasma liver-specific mRNAs in patients with liver injury. *Biomarkers* **21**(4), 353-62.

謝辞

本論文は筆者が武田薬品工業株式会社薬剤安全性研究所において、安全性バイオマーカーに関する基盤研究の成果をまとめたものです。稿を終えるにあたり、本論文の主査として、ご審査賜りました昭和薬科大学薬理学研究室教授渡邊泰男先生に謹んで深謝の意を表します。本論文の副査として、ご審査賜りました昭和薬科大学薬物治療学研究室教授水谷颯洋先生および同大学生化学研究室教授伊東進先生に深謝の意を表します。

昭和薬科大学薬物動態学研究室教授山崎浩史先生には、論文作成にあたってご指導をいただくとともに、成果発表の機会を与えていただきました。謹んで深謝の意を表します。昭和薬科大学薬物動態学研究室講師村山典恵先生並びに清水万紀子先生には、論文作成および成果発表にあたって有益なご助言とご支援をいただき、ここに深謝の意を表します。

研究の機会を与えて頂くと共に、終始多大なる御支援と御助言を頂きました武田薬品工業株式会社薬剤安全性研究所所長 永井博文博士、薬剤安全性研究所リサーチマネジャー 奥田照明博士、薬物動態研究所リサーチマネジャー 森脇俊哉博士、薬剤安全性研究所主席研究員 宮本実博士に心から感謝の意を表します。また、本研究にご協力頂いた武田薬品工業株式会社薬剤安全性研究所の多くの皆様に深く感謝いたします。

最後に、本研究に理解を示し、遂行を支えてくれた家族に心より感謝します。

参考文献

- Ballet, F. (2015). Preventing Drug-Induced Liver Injury: How Useful Are Animal Models? *Dig Dis* **33**(4), 477-85.
- Björnsson, E. and Olsson, R. (2005). Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology* **42**(2), 481-9.
- Bulera, S. J., Eddy, S. M., Ferguson, E., Jatkoa, T. A., Reindel, J. F., Bleavins, M. R. and De La Iglesia, F. A. (2001). RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology* **33**(5), 1239-58.
- Callaghan, N., Majeed, T., O'Connell, A. and Oliveira, D. B. (1994). A comparative study of serum F protein and other liver function tests as an index of hepatocellular damage in epileptic patients. *Acta Neurol Scand* **89**(4), 237-41.
- Chan, A. K., Chiu, R. W. and Lo, Y. M. (2003). Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Ann Clin Biochem* **40**(Pt 2), 122-30.
- Chan, R. W., Wong, J., Chan, H. L., Mok, T. S., Lo, W. Y., Lee, V., To, K. F., Lai, P. B., Rainer, T. H., Lo, Y. M. and Chiu, R. W. (2010). Aberrant concentrations of liver-derived plasma albumin mRNA in liver pathologies. *Clin Chem* **56**(1), 82-9.
- Chen, X. Q., Bonnefoi, H., Pelte, M. F., Lyautey, J., Lederrey, C., Movarekhi, S., Schaeffer, P., Mulcahy, H. E., Meyer, P., Stroun, M. and Anker, P. (2000). Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **6**(10), 3823-6.
- Chiusolo, A., Defazio, R., Zanetti, E., Mongillo, M., Mori, N., Cristofori, P. and Trevisan, A. (2010). Kidney injury molecule-1 expression in rat proximal tubule after treatment with segment-specific nephrotoxicants: a tool for early screening of potential kidney toxicity. *Toxicol Pathol* **38**(3), 338-45.
- Clarke, J. I., Dear, J. W. and Antoine, D. J. (2016). Recent advances in biomarkers and therapeutic interventions for hepatic drug safety - false dawn or new horizon? *Expert Opin Drug Saf* **15**(5), 625-34.

El-Mofty, S. K., Scrutton, M. C., Serroni, A., Nicolini, C. and Farber, J. L. (1975). Early, reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. *Am J Pathol* **79**(3), 579-96.

Elmaouhoub, A., Dudas, J. and Ramadori, G. (2007). Kinetics of albumin- and alpha-fetoprotein-production during rat liver development. *Histochem Cell Biol* **128**(5), 431-43.

Fleischhacker, M. (2006). Biology of circulating mRNA: still more questions than answers? *Ann N Y Acad Sci* **1075**, 40-9.

Fleischhacker, M., Beinert, T., Ermitsch, M., Seferi, D., Possinger, K., Engelmann, C. and Jandrig, B. (2001). Detection of amplifiable messenger RNA in the serum of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* **945**, 179-88.

Fontana, R. J., Seeff, L. B., Andrade, R. J., Bjornsson, E., Day, C. P., Serrano, J. and Hoofnagle, J. H. (2010). Standardization of nomenclature and causality assessment in drug-induced liver injury: summary of a clinical research workshop. *Hepatology* **52**(2), 730-42.

Ge, X., Yamamoto, S., Tsutsumi, S., Midorikawa, Y., Ihara, S., Wang, S. M. and Aburatani, H. (2005). Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues. *Genomics* **86**(2), 127-41.

Giesen, P. L., Peltenburg, H. G., de Zwaan, C., Janson, P. C., Flendrig, J. G. and Hermens, W. T. (1989). Greater than expected alanine aminotransferase activities in plasma and in hearts of patients with acute myocardial infarction. *Clin Chem* **35**(2), 279-83.

Giffen, P. S., Pick, C. R., Price, M. A., Williams, A. and York, M. J. (2002). Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity--its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat. *Toxicol Pathol* **30**(3), 365-72.

Halkes, S., van den Berg, A., Hoekstra, M., du Pont, J. and Kreis, R. (2002). Transaminase and alkaline phosphatase activity in the serum of burn patients treated with highly purified tannic acid. *Burns* **28**(5), 449-53.

Hamaoui, K., Butt, A., Powrie, J. and Swaminathan, R. (2004). Concentration of circulating rhodopsin mRNA in diabetic retinopathy. *Clin Chem* **50**(11), 2152-5.

- Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R. and Bonventre, J. V. (2002). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* **62**(1), 237-44.
- Hasselmann, D. O., Rappl, G., Tilgen, W. and Reinhold, U. (2001). Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* **47**(8), 1488-9.
- Heijne, W. H., Slitt, A. L., van Bladeren, P. J., Groten, J. P., Klaassen, C. D., Stierum, R. H. and van Ommen, B. (2004). Bromobenzene-induced hepatotoxicity at the transcriptome level. *Toxicol Sci* **79**(2), 411-22.
- Jaeschke, H., McGill, M. R. and Ramachandran, A. (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* **44**(1), 88-106.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. D. and Knippers, R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* **61**(4), 1659-65.
- James, L. P., Mayeux, P. R. and Hinson, J. A. (2003). Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* **31**(12), 1499-506.
- James, R. C., Harbison, R. D. and Roberts, S. M. (1993). Phenylpropanolamine potentiation of acetaminophen-induced hepatotoxicity: evidence for a glutathione-dependent mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* **118**(2), 159-68.
- Kaplowitz, N. (2005). Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* **4**(6), 489-99.
- Kopreski, M. S., Benko, F. A., Kwak, L. W. and Gocke, C. D. (1999). Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* **5**(8), 1961-5.
- Kudo, Y., Ochi, T., Shimada, H., Ogawa, S. and Shinjo, K. (2008). Utility of plasma circulating mRNA as a marker to detect hepatic injury. *J Vet Med Sci* **70**(9), 993-5.
- Laird, M. E., Mohsen, A., Duffy, D., Mamdouh, R., LeFouler, L., Casrouge, A., El-Daly, M., Rafik, M., Abdel-Hamid, M., Soulier, A., Pawlotsky, J. M., Hezode, C., Rosa, I., Renard, P., Mohamed, M. K., Bonnard, P., Izopet, J., Mallet, V., Pol, S., Albert, M. L. and Fontanet, A. (2014). Apolipoprotein H expression is associated with IL28B genotype and viral clearance in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* **61**(4), 770-6.

- Lee, W. M. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* **349**(5), 474-85.
- Leise, M. D., Poterucha, J. J. and Talwalkar, J. A. (2014). Drug-induced liver injury. *Mayo Clin Proc* **89**(1), 95-106.
- Lindqvist, A., Bratt, T., Altieri, M., Kastern, W. and Akerstrom, B. (1992). Rat alpha 1-microglobulin: co-expression in liver with the light chain of inter-alpha-trypsin inhibitor. *Biochim Biophys Acta* **1130**(1), 63-7.
- Liu, Z., Que, S., Xu, J. and Peng, T. (2014). Alanine aminotransferase-old biomarker and new concept: a review. *Int J Med Sci* **11**(9), 925-35.
- Ma, T. C., Shao, H. B., Xu, Y. and Xu, K. (2013). Three treatment methods via the hepatic artery for hepatocellular carcinoma - a retrospective study. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**(4), 2491-4.
- Mandel, P. and Metais, P. (1948). [Not Available]. *C R Seances Soc Biol Fil* **142**(3-4), 241-3.
- Mathivanan, S., Ji, H. and Simpson, R. J. (2010). Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* **73**(10), 1907-20.
- Mesa, M. L., Carrizosa, R., Martinez-Honduvilla, C., Benito, M. and Fabregat, I. (1996). Changes in rat liver gene expression induced by thioacetamide: protective role of S-adenosyl-L-methionine by a glutathione-dependent mechanism. *Hepatology* **23**(3), 600-6.
- Minter, R. M., Bi, X., Ben-Josef, G., Wang, T., Hu, B., Arbabi, S., Hemmila, M. R., Wang, S. C., Remick, D. G. and Su, G. L. (2009). LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury and mortality in the setting of biliary obstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**(1), G45-54.
- Murayama, H., Ikemoto, M., Fukuda, Y., Tsunekawa, S. and Nagata, A. (2007). Advantage of serum type-I arginase and ornithine carbamoyltransferase in the evaluation of acute and chronic liver damage induced by thioacetamide in rats. *Clin Chim Acta* **375**(1-2), 63-8.
- Nathwani, R. A., Pais, S., Reynolds, T. B. and Kaplowitz, N. (2005). Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* **41**(2), 380-2.
- Ng, E. K., Tsui, N. B., Lam, N. Y., Chiu, R. W., Yu, S. C., Wong, S. C., Lo, E. S., Rainer, T. H., Johnson, P. J. and Lo, Y. M. (2002). Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* **48**(8), 1212-7.

Nosaka, K. (1996). Changes in serum enzyme activities after injection of bupivacaine into rat tibialis anterior. *J Appl Physiol (1985)* **81**(2), 876-84.

Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B. and Heller, A. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* **32**(1), 56-67.

Ostapowicz, G., Fontana, R. J., Schiodt, F. V., Larson, A., Davern, T. J., Han, S. H., McCashland, T. M., Shakil, A. O., Hay, J. E., Hynan, L., Crippin, J. S., Blei, A. T., Samuel, G., Reisch, J. and Lee, W. M. (2002). Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* **137**(12), 947-54.

Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W. and Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* **245**(3), 194-205.

Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M. and Williams, D. P. (2005). The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 177-202.

Robles-Diaz, M., Medina-Caliz, I., Stephens, C., Andrade, R. J. and Lucena, M. I. (2016). Biomarkers in DILI: One More Step Forward. *Front Pharmacol* **7**, 267.

Rosi, A., Guidoni, L., Luciani, A. M., Mariutti, G. and Viti, V. (1988). RNA-lipid complexes released from the plasma membrane of human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* **39**(2), 153-60.

Ruhl, C. E. and Everhart, J. E. (2003). Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* **124**(1), 71-9.

Salier, J. P., Chan, P., Raguenez, G., Zwingman, T. and Erickson, R. P. (1993). Developmentally regulated transcription of the four liver-specific genes for inter-alpha-inhibitor family in mouse. *Biochem J* **296** (Pt 1), 85-91.

Sanford, M. (2015). Simeprevir: a review of its use in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Drugs* **75**(2), 183-96.

Senior, J. R. (2012). Alanine aminotransferase: a clinical and regulatory tool for detecting liver injury-past, present, and future. *Clin Pharmacol Ther* **92**(3), 332-9.

Shao, R. X., Hoshida, Y., Otsuka, M., Kato, N., Tateishi, R., Teratani, T., Shiina, S., Taniguchi, H., Moriyama, M., Kawabe, T. and Omata, M. (2005). Hepatic gene expression profiles associated with fibrosis progression and hepatocarcinogenesis in hepatitis C patients. *World J Gastroenterol* **11**(13), 1995-9.

Shen, H. M., Shi, C. Y., Lee, H. P. and Ong, C. N. (1994). Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* **127**(1), 145-50.

Shi, Q., Yang, X., Mattes, W. B., Mendrick, D. L., Harrill, A. H. and Beger, R. D. (2015). Circulating mitochondrial biomarkers for drug-induced liver injury. *Biomark Med* **9**(11), 1215-23.

Silva, J. M., Dominguez, G., Silva, J., Garcia, J. M., Sanchez, A., Rodriguez, O., Provencio, M., Espana, P. and Bonilla, F. (2001). Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res* **7**(9), 2821-5.

Swaminathan, R. and Butt, A. N. (2006). Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments. *Ann N Y Acad Sci* **1075**, 1-9.

Thomas, S. H. (1993). Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Pharmacol Ther* **60**(1), 91-120.

Tsui, N. B., Ng, E. K. and Lo, Y. M. (2002). Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* **48**(10), 1647-53.

Vaidya, A. and Perry, C. M. (2013). Simeprevir: first global approval. *Drugs* **73**(18), 2093-106.

Wang, T., Papoutsis, M., Wiesmann, M., DeCristofaro, M., Keselica, M. C., Skuba, E., Spaet, R., Markovits, J., Wolf, A., Moulin, P., Pognan, F., Vancutsem, P., Petryk, L., Sutton, J., Chibout, S. D. and Kluwe, W. (2011). Investigation of correlation among safety biomarkers in serum, histopathological examination, and toxicogenomics. *Int J Toxicol* **30**(3), 300-12.

Wesierska-Gadek, J., Bugajska-Schretter, A., Low-Baselli, A. and Grasl-Kraupp, B. (1999). Cleavage of poly(ADP-ribose) transferase during p53-independent apoptosis in rat liver after treatment with N-nitrosomorpholine and cyproterone acetate. *Mol Carcinog* **24**(4), 263-75.

Wetmore, B. A., Brees, D. J., Singh, R., Watkins, P. B., Andersen, M. E., Loy, J. and Thomas, R. S. (2010). Quantitative analyses and transcriptomic profiling of circulating messenger RNAs as biomarkers of rat liver injury. *Hepatology* **51**(6), 2127-39.

Wieczorek, A. J., Sitaramam, V., Machleidt, W., Rhyner, K., Perruchoud, A. P. and Block, L. H. (1987). Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker. *Cancer Res* **47**(23), 6407-12.

Wieczorek, A. J., Rhyner, C. and Block, L. H. (1985). Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(10), 3455-9.

Wong, I. H., Lau, W. Y., Leung, T. and Johnson, P. J. (2000). Quantitative comparison of alpha-fetoprotein and albumin mRNA levels in hepatocellular carcinoma/adenoma, non-tumor liver and blood: implications in cancer detection and monitoring. *Cancer Lett* **156**(2), 141-9.

Zhang, X., Zhang, Z., Dai, F., Shi, B., Chen, L., Zang, G., Zhang, J., Chen, X., Qian, F., Hu, Y. and Yuan, Z. (2014). Comparison of circulating, hepatocyte specific messenger RNA and microRNA as biomarkers for chronic hepatitis B and C. *PLoS One* **9**(3), e92112.

厚生労働省 安全性速報、2014年10月発出：ソブリアード®カプセル 100 mg による高ビリルビン血症について