

## 緒言

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、そのためのツール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、血中 alanine aminotransferase (ALT) や aspartate aminotransferase (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/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、血中 ALT/AST が高値を示すケースが散見される。このように血中 ALT/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 cell-free 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。

## 1. 薬剤性肝障害モデルラットを用いたコンセプト確認

各種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 albumin (Alb) 及び  $\alpha$ 1-microglobulin/bikunin precursor (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ガラクトサミンあるいはアセトアミノフェン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 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により確認した。ガラクトサミン誘発性肝障害モデルラットにおいては、末梢血中 Alb mRNA が血中 ALT 及び AST の高値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、局所麻酔薬である塩酸ブピバカイン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中 creatinine kinase (CK) の高値に加えて、骨格筋由来と考えられる血中 ALT 及び AST の高値が認められたが、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。

## 2. 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

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 apolipoprotein h (Apo h) 及び group specific component (Gc) mRNA を新たな肝臓特異的 mRNA として選定した。続いて、Alb、Ambp、Apo h 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 (aflatoxin B1、acetaminophen、bromobenzene、buthionine sulfoximine、lipopolysaccharide 及び N-nitrosomorpholine) 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、各種薬物により肝障害を誘発したラットの血漿中で増加すること、血中 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中 ALT と比較して顕著であることが確認された。さらに、thioacetamide 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。

### 3. 臨床バイオマーカーとしての利用可能性の検証

末梢血中肝臓特異的 mRNA の臨床における利用可能性を検討した。肝障害患者の血漿中 ALB、AMBIP、APOH 及び GC mRNA を健常人と比較した結果、血中 ALT の高値に伴って血漿中の 4 種の肝臓特異的 mRNA の高値が認められた(血漿中 ALB mRNA の定量結果を Figure 1 に示す)。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、肝がん治療のための肝動脈塞栓術(肝がん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 の高値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臨床でも確認された。以上より、末梢血中肝臓特異的 mRNA は、translational な肝障害バイオマーカーであることが示された。

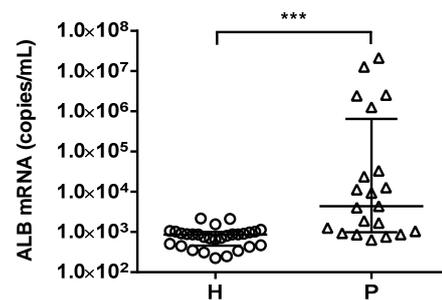


Figure 1. Quantification of ALB mRNA in plasma from healthy donors and patients with liver injury. H and P denote healthy donors and patients with liver injury, respectively. The whisker caps and the horizontal line within the caps indicate the 75th and 25th percentiles and the median, respectively. \*\*\* $p < 0.001$  compared with the healthy donors (Wilcoxon test).

### 結論

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。血中 ALT/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、血中 ALT/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 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 translational 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。

### 本研究の誌上発表

- Miyamoto M, Yanai M, Ookubo S, Awasaki N, Takami K, Imai R. (2008) Detection of Cell-Free, Liver-Specific mRNAs in Peripheral Blood from Rats with Hepatotoxicity: A Potential Toxicological Biomarker for Safety Evaluation. *Toxicological Sciences*. 106(2): 538-45.
- Okubo S, Miyamoto M, Takami K, Kanki M, Ono A, Nakatsu N, Yamada H, Ohno Y, 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. *Toxicological Sciences*. 132(1): 21-31.
- Okubo S, Miyamoto M, Ito D, Takami K, 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.