

ボセンタンによる肝機能障害関連  
バイオマーカーの探索に関する研究

2019

臨床薬学講座

依藤 健之介



# 目 次

## 序 論

1. 肺高血圧症について.....	7
2. 第 1 群 肺動脈性肺高血圧症について .....	7
3. 肺動脈性肺高血圧症の疫学.....	9
4. 肺動脈性肺高血圧の治療薬.....	12
5. エンドセリン受容体について .....	13
6. エンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンについて .....	14
6-1 ボセンタンの特徴.....	14
6-2 ボセンタンの副作用.....	16
7. 臨床的な課題 .....	17

## 第 1 章 ボセンタンによる肝機能障害発症に関わる遺伝子マーカーの 同定と予測モデルの構築

緒 言 .....	18
第 1 節 実験材料および方法 .....	20
第 1 項 対象患者の抽出.....	20
第 2 項 DMET™ puls について .....	21
第 3 項 DMET アレイによる網羅的遺伝子解析 .....	23
1) 遺伝子の抽出 .....	23
2) mPCR 反応 .....	24
3) アニーリング .....	26
4) 増幅によるアッセイプレートの準備.....	27
5) PCR Clean-up と PCR の Quality control (QC) 確認.....	30
6) フラグメンテーションと二回目の QC 確認 .....	31
7) ラベリング.....	33
8) ハイブリダイゼーション .....	34

9) アレイの読み取り .....	35
第 4 項 統計解析 .....	36
1) 個体の QC・SNP の QC .....	36
2) Jonckheere-Terpstra trend 検定 .....	38
3) 多重共線性の排除 .....	38
4) ステップワイズ選択法 .....	38
5) ROC 解析 .....	39
第 2 節 結 果 .....	40
第 1 項 対象患者 .....	40
第 2 項 個体の QC・SNP の QC .....	44
第 3 項 Jonckheere-Terpstra trend 検定 .....	45
第 4 項 多重共線性の排除 .....	55
第 5 項 ステップワイズ選択法 .....	57
第 6 項 ROC 解析・候補遺伝子の選択 .....	58
第 7 項 ボセンタンによる肝機能障害の予測モデル構築 .....	62
第 3 節 考 察 .....	64
第 4 節 小 括 .....	68
第 2 章 ボセンタンによる肝機能障害発症の予測モデルの妥当性検証	
緒 言 .....	69
第 1 節 実験材料および方法 .....	71
第 1 項 対象患者の抽出 .....	71
第 2 項 リスク遺伝子の評価 .....	72
第 3 項 予測モデルの妥当性検証に必要な症例数 .....	73
第 2 節 結 果 .....	74
第 1 項 対象患者 .....	74
第 2 項 リスク遺伝子の評価と予測モデルへの適用 .....	78
第 3 項 予測モデルの予測性能 .....	80
第 4 項 検証に必要な症例数 .....	80

第 3 節 考 察 .....	81
第 4 節 小 括 .....	85
總 括 .....	86
謝 辞 .....	87
参考文献 .....	88

## 略語表

AC	Adenylate cyclase
ALT	Alanine aminotransferase
ASD	Atrial septal defect
AST	Aspartate aminotransferase
BA	Bioavailability
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor type 2
BNP	Brain natriuretic peptide
BSA	Body surface area
C4ST-3	Chondroitin 4-sulfotransferase-3
C6ST-1	Chondroitin 6-sulfotransferase-1
Ca	Calcium
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CHD	Congenital heart disease
CHST13	Carbohydrate sulfotransferase 13
CHST3	Carbohydrate sulfotransferase 3
CI	Cardiac index
COX	Cyclooxygenase
CS	Chondroitin sulfate
CTD	Connective tissue disease
CTEPH	Chronic thromboembolic pulmonary hypertension
CYP	Cytochrome P450
DS	Dermatan sulfate
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
ERA	Endothelin receptor antagonist
ET	Endothelin
GAG	Glycosaminoglycan
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalactosamine
GlcA	Glucuronic acid

GSTA4	Glutathione S-transferase alpha 4
GTP	Guanosine triphosphate
HPAH	Heritable pulmonary arterial hypertension
HS	Heparan sulfate
Hya	Hyaluronic acid
I/HPAH	Idiopathic/Hereditary pulmonary arterial hypertension
IPAH	Idiopathic pulmonary arterial hypertension
LHD	Left heart disease
MCTD	Mixed connective tissue disease
mPAP	Mean pulmonary artery pressure
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
PAH	Pulmonary arterial hypertension
PAPS	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate
PCH	Pulmonary capillary hemangiomas
PDE-5	Phosphodiesterase type-5
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PoPH	Portal pulmonary hypertension
PPHN	Persistent pulmonary hypertension of the newborn
PVOD	Pulmonary veno-occlusive disease
PVR	Pulmonary vascular resistance
RAP	Right atrial pressure
ROC	Receiver operating characteristic
SED	Spondyloepiphyseal dysplasia
sGC	Soluble guanylate cyclase
SLC10A2	Solute carrier family 10 member 2
SLC13A1	Solute carrier family 13 member 1
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Systemic sclerosis

TAZ/PIPC	Tazobactam/Piperacillin
UGT	Uridine diphosphate glucuronosyltransferase
ULN	Upper limit of normal
VCM	Vancomycin
WHO	World health organization



## 序 論

### 1. 肺高血圧症について

肺高血圧症は、様々な原因で肺動脈圧が上昇し、種々の症状を呈する進行性の予後不良な疾患である。安静時の右心カテーテル検査で実測した肺動脈圧 (Pulmonary arterial pressure: PAP) の平均値 (Mean PAP) が 25 mmHg 以上の場合に肺高血圧症と診断され、肺動脈圧が上昇する原因疾患によって臨床的に 5 群に分類される<sup>1</sup> (表 1)。

臨床的に表出する自覚症状は、労作時息切れが最も特徴的で多くのケースで比較的早期に現れる。その他にも、易疲労感や胸痛、失神、動悸や咳嗽、喀血などを認めることもある。病状が進行すると肝うっ血や消化管浮腫に伴う腹部膨満感、早期の満腹感、食欲不振などの消化器症状、下腿浮腫などの右心不全症状を示し、最終的に死に至る<sup>1</sup>。

治療の基本は、基礎疾患のない特発性肺動脈性肺高血圧症では肺血管拡張薬による肺動脈圧を低下させることだが、基礎疾患の状態によって行うべき治療は異なり、非常に複雑である。そのため、専門医による適切な診断と治療が必須である。

### 2. 第 1 群 肺動脈性肺高血圧症について

肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary arterial hypertension: PAH) は、肺動脈そのものに主要な病変が存在する肺高血圧症の総称で、肺高血圧症の特徴が最も典型的に具象化された疾患群であるが、その発症機序は十分に解明されていない。PAH の病態の主体は、肺動脈内腔の狭窄で、主として 3 つの要因により生じる。1 つ目は、血管拡張因子と血管収縮因子の不均衡による「血管収縮」である<sup>2</sup>。2 つ目は、血管内皮細胞および平滑筋細胞などの過剰増殖とアポトーシス抵抗性による「血管リモデリング」であり<sup>3</sup>、3 つ目は、凝固系異常による病変部での「血栓形成」である<sup>4</sup>。これらの要因により肺血管抵抗が上昇し、肺動脈圧の上昇や右心不全を引き起こすと考えられている。

表 1 肺高血圧症の臨床分類

第 1 群 肺動脈性肺高血圧症
1.1 特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH)
1.2 遺伝性肺動脈性肺高血圧症 (HPAH)
1. <i>BMPR2</i> 変異      2. 他の遺伝子変異
1.3 薬物・毒物誘発性肺動脈性肺高血圧症
1.4 各種疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症
1. 膠原病性      2. HIV 感染症      3. 門脈肺高血圧症
4. 先天性短絡性疾患      5. 住血吸虫症
1' 肺静脈閉塞性疾患 (PVOD)/肺毛細血管腫 (PCH)
第 1'' 群 新生児遷延性肺高血圧症 (PPHN)
第 2 群 左心疾患に伴う肺高血圧症
2.1 左室収縮不全      2.2 左室拡張不全      2.3 弁膜疾患
2.4 先天性 / 後天性の左心流入路 / 流出路閉塞および先天性心筋症
第 3 群 肺疾患および/または低酸素血症に伴う肺高血圧症
3.1 慢性閉塞性肺疾患      3.2 間質性肺疾患
3.3 拘束性と閉塞性の混合障害を伴う他の肺疾患      3.4 睡眠呼吸障害
3.5 肺泡低換気障害      3.6 高所における慢性曝露      3.7 発育障害
第 4 群 慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH)
第 5 群 詳細不明な多因子のメカニズムに伴う肺高血圧症
5.1 血液疾患: 慢性溶血性貧血      骨髄増殖性疾患      脾摘出
5.2 全身性疾患: サルコイドーシス      肺組織球増殖症      リンパ脈管筋腫症
5.3 代謝性疾患: 糖原病      ゴーシェ病      甲状腺疾患
5.4 その他: 腫瘍塞栓      線維性縦隔炎      慢性腎不全      区域性肺高血圧症

### 3. 肺動脈性肺高血圧症の疫学

本邦における特発性／遺伝性肺動脈性肺高血圧症（Idiopathic/Heritable-PAH: I/H-PAH）患者数は増加傾向にあり、厚生労働省特定疾患呼吸不全調査研究班による年次推移調査では、平成27年3月31日時点の患者数は2,946人であった。I/H-PAH患者数の年次推移を示す（図1）。

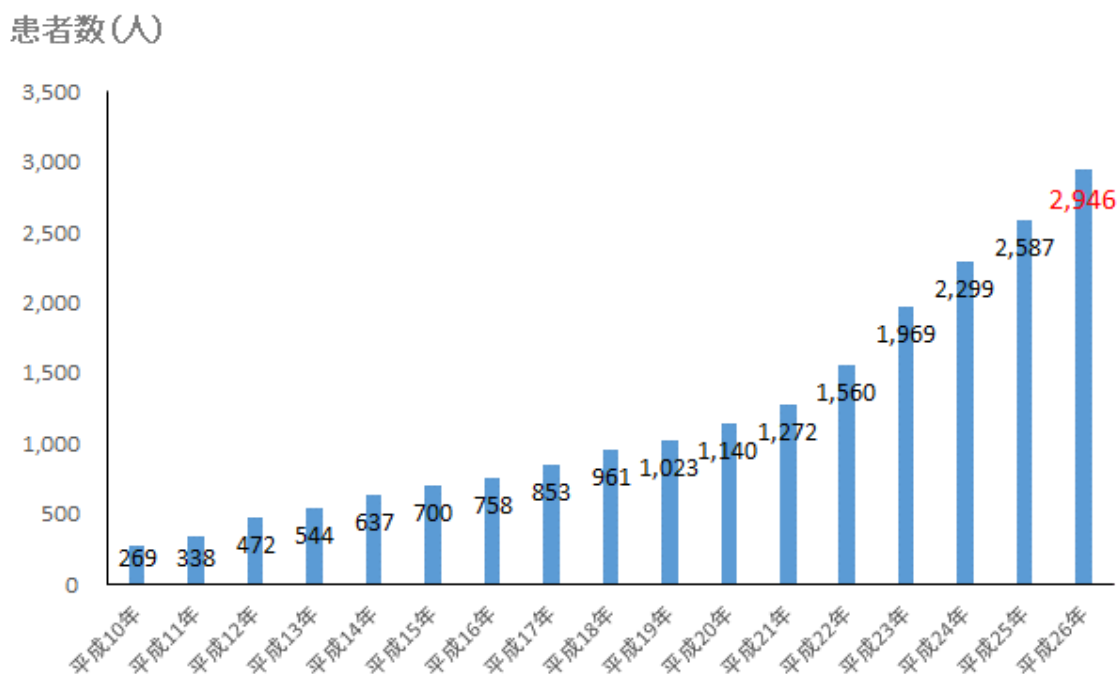


図1 特発性／遺伝性肺動脈性肺高血圧症患者数の年次推移

難病情報センターHP< <http://www.nanbyou.or.jp/entry/171>>より著者作成

特異的 PAH 治療薬の開発以前である 1981 年から 1985 年にかけて米国 National Institutes of Health (NIH) 主導により行われた I/H-PAH の自然予後に関する調査では、対象となった 187 例の平均生存期間は 2.8 年、1 年生存率 68%、2 年生存率 48%、3 年生存率 34%であり、未治療での予後は極めて悪いことが示された (図 2)。また、その死因としては突然死、右心不全、喀血が多いとされた<sup>5</sup>。2006 年から 2009 年にかけて米国で行われた REVEAL 登録研究では、I/H-PAH の 1 年生存率 91%、3 年生存率 74%、5 年生存率 65%、7 年生存率 59%であった<sup>6</sup> (図 2)。この生命予後改善は、現在使用可能な特異的 PAH 治療薬が一部開発されたことによる影響が大きいと考えられている。

また、2008 年から 2013 年に本邦で肺高血圧治療の専門施設を対象として行われた登録研究では、5 年生存率 92%と諸外国と比較して極めて良好な結果であった<sup>7</sup> (図 3)。これは、特異的 PAH 治療薬が複数開発されたことに加え、疾患の認知に伴い早期診断および早期治療介入が可能となったこと、さらには本邦では特定疾患として医療費が公的に補助されることにより、患者負担をそれほど考慮せず、積極的な薬物併用療法が可能であることが大きく寄与していると考えられている。

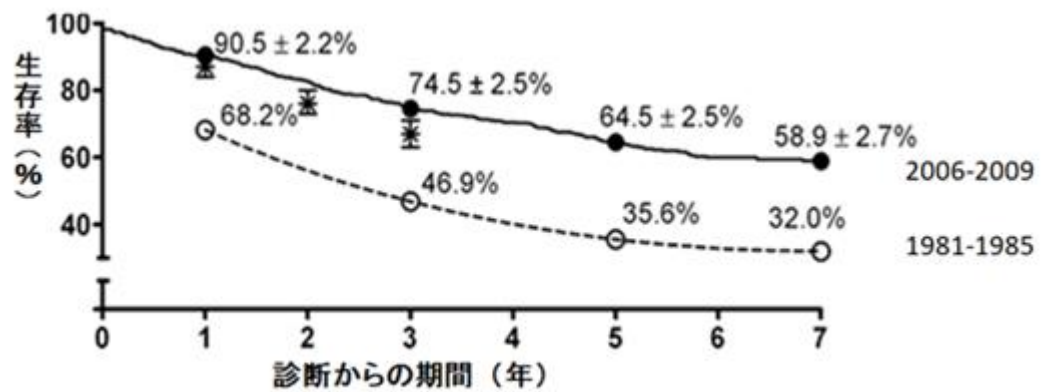


図 2 特異的肺高血圧症治療薬がなかった時代（1981年-1985年）の肺高血圧症自然歴と一部治療薬が使用できるようになった時代（2006年-2009年）の治療介入予後

文献追加 6 より 著者作成

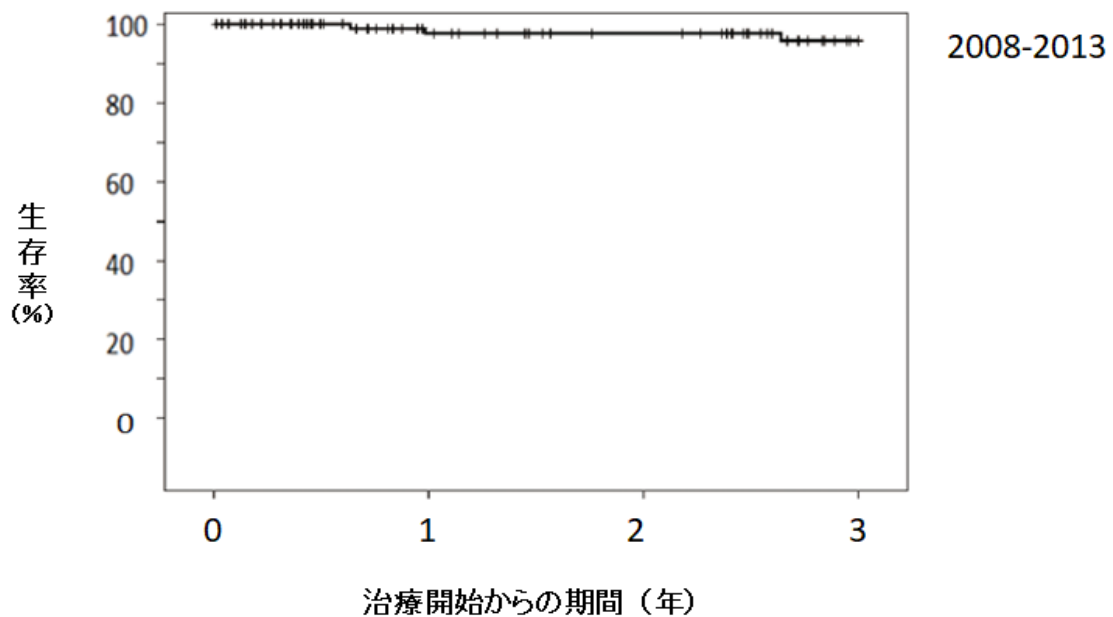


図 3 本邦における肺高血圧症専門施設の治療予後（2008年-2013年）

文献 7 より 著者作成

#### 4. 肺動脈性肺高血圧の治療薬

近年、肺高血圧症治療薬の開発は飛躍的に進歩している。肺高血圧症の治療薬はプロスタサイクリン（PGI<sub>2</sub>）経路、一酸化窒素（NO）経路、エンドセリン経路に介入する3系統の薬剤に分類することができ、それぞれの系統について複数の製剤が上市されている。本邦で使用可能な肺高血圧治療薬を表2に示す。3系統の薬剤の作用機序を図4に示す。

表2 本邦で使用可能な肺高血圧治療薬

分類	一般名（発売年）
PGI <sub>2</sub> 経路	ベラプロスト（1999年） ベラプロスト徐放剤（2007年）
	エポプロステノール（1999年）
	トレプロスチニル（2014年） イロプロスト（2016年）
	セレキシパグ（2016年）
NO経路	シルデナフィル（2008年） タダラフィル（2009年）
	リオシグアト（2014年）
エンドセリン経路	ボセンタン（2005年） アンブリセンタン（2010年）
	マシテンタン（2015年）

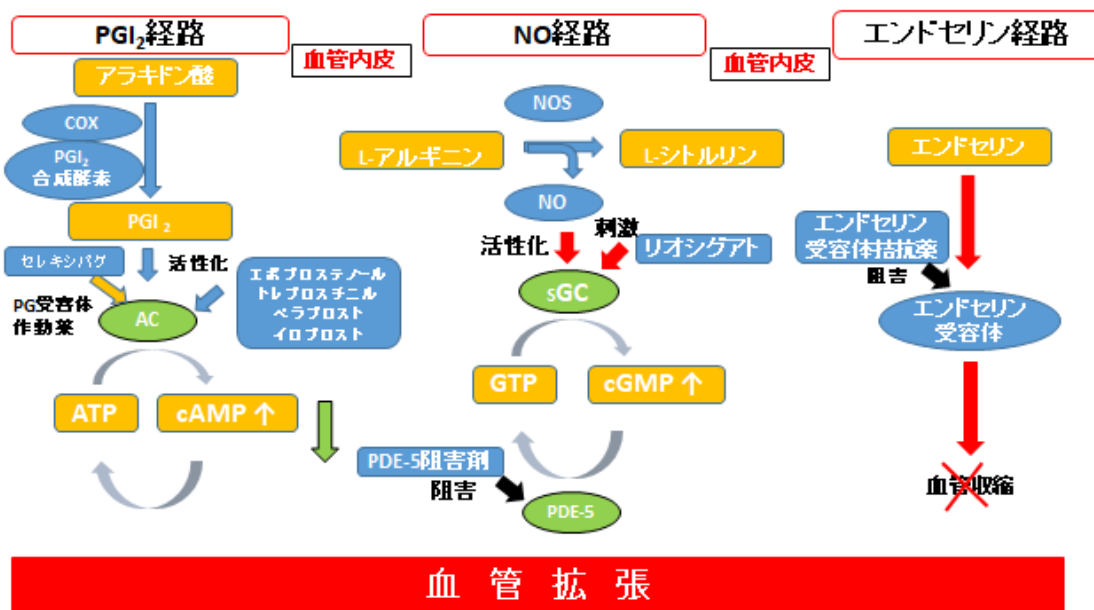


図 4 肺血管拡張薬の作用機序

## 5. エンドセリン受容体について

強力な血管収縮作用を有する血管内皮細胞由来ペプチドであるエンドセリン (Endothelin: ET) は、PAH における肺動脈リモデリングを進行させる一因として考えられている<sup>8</sup>。そのため、エンドセリン受容体拮抗薬 (Endothelin receptor antagonist: ERA) は、PAH の病態に直接介入できる治療薬として期待されている。エンドセリン受容体には、エンドセリン A (ET<sub>A</sub>) 受容体およびエンドセリン B (ET<sub>B</sub>) 受容体の 2 つのサブタイプが存在している<sup>9</sup>。血管系において、ET<sub>A</sub> 受容体は血管平滑筋に発現し、血管収縮と血管平滑筋細胞の遊走・増殖に関与する。一方、ET<sub>B</sub> 受容体は生理条件下では血管内皮に多く発現し、一酸化窒素 (NO) の産生などを通じて代償的に血管拡張反応などを引き起こすが、PAH においては血管平滑筋での発現が増え、血管収縮と血管平滑筋細胞の増殖に関与するようになる<sup>10</sup>。このことは、非選択的受容体拮抗薬も治療薬として有用であることの裏付けとなっている。

## 6. エンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンについて

### 6-1 ボセンタンの特徴

ボセンタンは ERA で最初に使用可能となった  $ET_A \cdot ET_B$  非選択的エンドセリン受容体拮抗薬である<sup>11</sup>。本邦では 2005 年に保険収載された。単剤治療で WHO 機能分類Ⅲ・Ⅳの中等症から重症例において生命予後改善が実証されており<sup>12</sup>、WHO 機能分類Ⅱの軽症例に対する血行動態改善効果も証明されている<sup>13</sup>。そのため、本邦では WHO 機能分類Ⅱ・Ⅳに対する保険適用が認められており、幅広い症例で用いられている。

ボセンタンは薬物相互作用のため、シクロスポリン、タクロリムスおよびグリベンクラミドは併用禁忌である<sup>14,15</sup>。また、臨床的に併用されることの多いホスホジエステラーゼ-5 (PDE-5) 阻害剤であるシルデナフィルの血中濃度を低下させることが知られている<sup>16</sup>。

ボセンタンは PAH に加えて本邦で、「全身性強皮症における手指潰瘍の発症抑制」に保険適用がある唯一の ERA である。

有効成分の構造式および物理化学的性質を示す (図 5)。



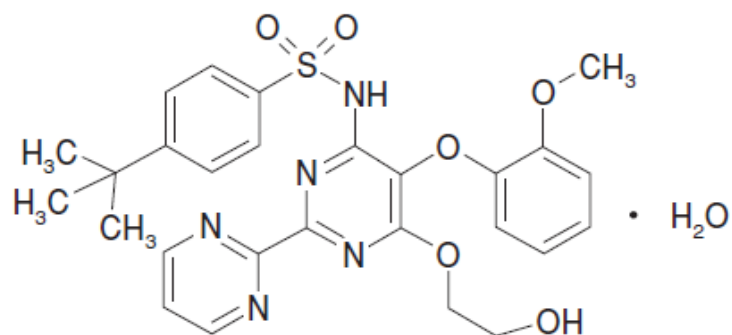


図 5 ボセンタンの構造式

一般名：ボセンタン水和物 Bosentan Hydrate

化学名：4-（1,1-Dimethylethyl）-*N*- [ 6-（2-hydroxyethoxy）-5-（2-methoxyphenoxy）-2-（pyrimidin-2-yl）pyrimidin-4-yl ] benzenesulfonamide monohydrate

分子式：C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S · H<sub>2</sub>O

分子量：569.63

性状：ボセンタン水和物は白色～やや黄色の粉末である。アセトニトリル、ジクロロメタン、*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解やすく、エタノール（99.5）にやや溶解やすく、メタノールに溶解にくく、水にほとんど溶けない。

酸解離定数：pKa = 5.1

分配係数：1.7（オクタノール/水系）

## 6-2 ボセンタンの副作用

ボセンタンによる国内臨床試験において、安全性解析対象例では 40 例中 26 例（65.0%）に副作用が認められた。主な副作用は、肝機能異常 9 例（22.5%）、頭痛 8 例（20.0%）、倦怠感 3 例（7.5%）、筋痛 3 例（7.5%）、貧血 2 例（5.0%）などであった<sup>17</sup>。臨床的に患者が自覚する副作用は頭痛、ほてり、嘔気など軽微な場合が多いが、海外での大規模な市販後調査では、肝機能障害が約 10%と高率で起こることが知られている<sup>18</sup>。また、本邦の市販後調査では、全中止例のうち 13%が肝機能障害に起因する中止であり<sup>17</sup>、海外の成績とほぼ同等であった。ボセンタンによる肝機能障害は、用量依存的であり、ほとんどのケースで中止や減量により改善するが、治療の妨げとなる<sup>19</sup>。肝機能障害の発現時期は様々で予測は困難である<sup>19</sup>。

ボセンタンは、SLCO1B1、SLCO1B3 によって肝細胞内に取り込まれる。肝細胞内でボセンタンは、肝胆側膜に存在する ABCB11 や ABCC2 などの胆汁酸の排泄に関わるトランスポーターを阻害する<sup>20</sup>。その結果、胆汁酸の排泄が滞り、胆汁うっ滞が起こることが肝機能障害に一部関与すると言われているが<sup>20</sup>、ボセンタンによる肝機能障害の発現機序は十分に明らかにされていない。また、ボセンタンは肝臓のチトクロム P450（CYP）3A4 および CYP2C9 で代謝され、両酵素を誘導することが知られている<sup>21</sup>。肝細胞でボセンタンとの関連が知られているトランスポーターおよび代謝酵素を図 6 に示す。

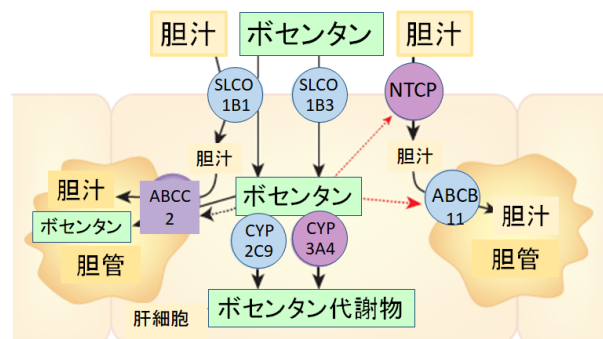


図 6 肝細胞でボセンタンとの関連が知られているトランスポーターおよび代謝酵素

## 7. 臨床的な課題

PAH といふかつては非常に生命予後の不良な疾患が、積極的なスクリーニングや薬物治療で、現在では制御可能な慢性疾患として位置づけられるようになってきた<sup>7</sup>。しかし、現在の PAH 治療について全く問題がないわけではない。著者はこれまでも、PAH 治療薬を導入しても副作用を制御できずに、十分に効力のある治療を提供できるまでに、長い期間を要する症例を数多く経験してきた。PAH 診療においては、有効な治療の提供が遅れることは、患者の生命予後の悪化に直結することが知られている<sup>13, 22</sup>。

もし、PAH 治療開始前に患者の副作用の予測が可能となれば、副作用リスクの高い薬剤を他剤で代替するなど、患者ごとに最適な治療設計を行える可能性がある。つまり、次に解決すべき臨床的な課題は、患者の遺伝的背景・生理的状态・疾患の状態などを考慮して、患者個々に最適な治療法を設定し、最大の治療効果と最小の副作用の治療目標を達成する、いわゆる個別化医療の実現と言える。

## 第 1 章 ボセンタンによる肝機能障害発症に関わる遺伝子マーカーの 同定と予測モデルの構築

### 緒 言

ボセンタンの肝機能障害は、PAH 治療においてしばしば治療の妨げとなるため、非常に重要な副作用である<sup>18</sup>。そのため、これまでもボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子を探索する試みがいくつか行われている。Markova らは、56 名（白人 61%、アジア人 15%、スペイン人 15%、アフリカ系アメリカ人 5%）の患者を対象にした試験を行った。標的遺伝子は、ボセンタンの代謝に関連する *CYP2C9*、胆汁酸の排泄トランスポーターでボセンタンによって阻害されることが知られている *ABCC2* および *ABCB11*、ボセンタンの肝細胞への取り込みに関与している *SLCO1B1* および *SLCO1B3* などのボセンタンとの関連が既知の遺伝子が選択された。結果として、*CYP2C9\*2* 遺伝子が AST（Aspartate aminotransferase）および ALT（Alanine aminotransferase）の上昇と有意に関連しており、ボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子として使用できる可能性が示唆された<sup>23</sup>。

しかし一方で、Roustit らは、23 例の患者を対象とした試験を実施し、Markova らと同様に *CYP2C9*、*SLCO1B1*、*SLCO1B3*、*ABCB11* などの遺伝子の影響を確認したところ、いずれの遺伝子もボセンタンによる肝機能障害との関連は認められなかった<sup>24</sup>。

以上より、ボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子は、意見の一致をみていない。

そこで著者は、日本人におけるボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子の探索を試みることを計画した。その遺伝子探索の手法としてマイクロアレイを用いることとした。その理由は 2 つある。1 つ目は、過去の報告はボセンタンとの関連が既知の候補遺伝子を標的とした研究であった。しかし、マイクロアレイを用いることで、従来、ボセンタンとの関連が知られていない、もしくは調べられていない遺伝子も

対象とし、網羅的に肝障害関連遺伝子の探索を行うことが可能となるためである。もう 1 つの理由は、ボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子の可能性が示唆されている *CYP2C9\*2* の遺伝子多型は、日本人には発現しない遺伝子多型であることが知られている<sup>25, 26</sup>。しかしながら、本邦においてもボセンタンによる肝機能障害は諸外国と同様の頻度で発生している。そのため、日本人で網羅的遺伝子探索を行うことで、これまで報告されていない日本人特有のボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子を抽出することが可能となると考えた。

ボセンタン関連肝機能障害のリスク遺伝子を同定することができれば、患者に投薬を開始する前に、患者の遺伝子の特徴を調べることでボセンタンによる肝機能障害が発生するか否かを予測することができる可能性がある。そして、ボセンタン関連肝機能障害のハイリスク患者に対しては、他の薬剤を選択することで、副作用による治療の中止・中断や、不十分な強度の治療期間が生じるリスクも、低下させることができることが期待される。そこで著者は、ボセンタン関連肝機能障害の探索に関する研究を開始することとした。

## 第 1 節 実験材料および方法

### 第 1 項 対象患者の抽出

ボセンタン関連肝機能障害のリスク遺伝子を探索するために、2006 年 8 月から 2013 年 7 月までに神戸大学医学部附属病院もしくは医療法人社団神鋼会神鋼病院（現 社会医療法人神鋼記念会神鋼記念病院）に通院中の肺高血圧症患者で、1 年以上ボセンタンを継続投与しており、定期的に血液検査を行っている患者を対象とした。

肝機能障害の定義を AST もしくは ALT を施設基準値の 1.5 倍以上（ULN (Upper limit normal)  $\times$  1.5）とした。ボセンタン投与開始から 1 年以内に、AST もしくは ALT の上昇を認めた患者を肝機能障害あり群、認めなかった患者を肝機能障害なし群とし、ボセンタン投与以外の要因による AST・ALT の上昇や、ボセンタン投与開始時にすでに高値の症例は除外することとした。

なお、本研究を遂行するにあたり、プロトコールを神戸大学医学部附属病院および神鋼病院の倫理審査委員会に提出し、承認を得た。また、すべての患者に口頭と書面による十分な説明を行い、書面による同意を得て行った。

## 第 2 項 DMET™ puls について

今回の実験系では、遺伝子探索にはアフィメトリクス社の DMET™ puls マイクロアレイを用いた。

DMET™ puls は、薬物代謝酵素やトランスポーターに関連する遺伝子や遺伝子マーカーを 1 枚のアレイで網羅的に測定可能としている。得られた薬剤応答性の個人情報に基づき、ファーマコゲノミクスの臨床応用に向けた研究を促進するために作製されたマイクロアレイである。

その特徴として、サンプルコール率およびサンプル再現率で優れた性能を発揮し、正確なハプロタイプ解析が実現できる。そのため、薬理学的研究やトランスレーショナル臨床研究、全臨床研究および開発や臨床研究など幅広く用いることが可能となる。

他の技術では容易に検出できない多くの遺伝的変異を含む 231 遺伝子上（表 1-1）の 1,936 個の薬物代謝マーカーの解析が可能となり、FDA によって評価されているほとんどの遺伝子マーカーを搭載している。231 遺伝子の内訳は、第 1 相代謝酵素 76 種、第 2 相代謝酵素 62 種、トランスポーター 52 種、その他 41 種である。

表 1-1 DMET™ puls 搭載遺伝子

ABCB1	ALDH2	COMT	CYP4F3	EPHX2	MAOA	RPL13	SLC22A14	TBXAS1
ABCB4	ALDH3A1	CROT	CYP4F8	FAAH	MAOB	RXRA	SLC25A27	TPMT
ABCB7	ALDH3A2	CYP1A1	CYP4F11	FMO1	MAT1A	SERPINA7	SLC28A1	TPSG1
ABCB11	AOX1	CYP1A2	CYP4F12	FMO2	METTL1	SLC5A6	SLC28A2	TYMS
ABCC1	APOA2	CYP1B1	CYP4Z1	FMO3	NAT1	SLC6A6	SLC28A3	UGT1A1
ABCC2	ARNT	CYP2A6	CYP7A1	FMO4	NAT2	SLC7A5	SLC29A1	UGT1A3
ABCC3	ARSA	CYP2A7	CYP7B1	FMO5	NNMT	SLC7A7	SLC29A2	UGT1A4
ABCC4	ATP7A	CYP2A13	CYP8B1	FMO6	NQO1	SLC7A8	SLCO1A2	UGT1A5
ABCC5	ATP7B	CYP2B6	CYP11A1	G6PD	NR1I2	SLC10A1	SLCO1B1	UGT1A6
ABCC6	CA5P	CYP2B7	CYP11B1	GSTA1	NR1I3	SLC10A2	SLCO1B3	UGT1A7
ABCC8	CBR1	CYP2C8	CYP11B2	GSTA2	NR3C1	SLC13A1	SLCO2B1	UGT1A8
ABCC9	CBR3	CYP2C9	CYP17A1	GSTA3	ORM1	SLC15A1	SLCO3A1	UGT1A9
ABCG1	CDA	CYP2C18	CYP19A1	GSTA4	ORM2	SLC15A2	SLCO4A1	UGT1A10
ABCG2	CES2	CYP2C19	CYP20A1	GSTA5	PGAP3	SLC16A1	SLCO5A1	UGT2A1
ABP1	CHST1	CYP2D6	CYP21A2	GSTM1	PNMT	SLC19A1	SPG7	UGT2B4
ADH1A	CHST2	CYP2E1	CYP24A1	GSTM2	PON1	SLC22A1	SPN	UGT2B7
ADH1B	CHST3	CYP2F1	CYP26A1	GSTM3	PON2	SLC22A2	SULT1A1	UGT2B11
ADH1C	CHST4	CYP2J2	CYP26C1	GSTM4	PON3	SLC22A3	SULT1A2	UGT2B15
ADH4	CHST5	CYP2S1	CYP27A1	GSTM5	POR	SLC22A4	SULT1A3	UGT2B17
ADH5	CHST6	CYP3A4	CYP27B1	GSTO1	PPARD	SLC22A5	SULT1B1	UGT2B28
ADH6	CHST7	CYP3A5	CYP39A1	GSTP1	PPARG	SLC22A6	SLUT1C2	UGT8
ADH7	CHST8	CYP3A7	CYP46A1	GSTT1	PPP1R9A	SLC22A7	SULT1C4	VKORC1
AHR	CHST9	CYP3A43	CYP51A1	GSTT2	PRSS53	SLC22A8	SULT1E1	XDH
AKAP9	CHST10	CYP4A11	DCK	GSTZ1	PTGIS	SLC22A11	SULT2A1	
ALB	CHST11	CYP4B1	DPYD	HMGCR	QPRT	SLC22A12	SULT2B1	
ALDH1A1	CHST13	CYP4F2	EPHX1	HNMT	RALBP1	SLC22A13	SULT4A1	



### 第 3 項 DMET アレイによる網羅的遺伝子解析

#### 1) 遺伝子の抽出

解析対象となった 66 名の患者の全血検体より DNA 抽出を行った。DNA の抽出には、QuickGene DNA whole blood kit S（倉敷紡績株式会社）を用いた。

まず、RNase-free water で溶解済みのキット添付の前処理酵素 30  $\mu\text{L}$  を 1.5 mL マイクロチューブの底に添加した。全血 200  $\mu\text{L}$  を添加し、直ちにキット添付の溶解液 250  $\mu\text{L}$  を添加し、ピペットを用いて混和した。

2,500 rpm で 15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。数秒間遠心して回収した。

56 度で 2 分間恒温保管した。

特級エタノール (> 99%) を 250  $\mu\text{L}$  添加し、2,500 rpm で 15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。数秒間遠心して回収した。本操作で溶解液完成となる。

QuickGene-810（倉敷紡績株式会社）を用いて遺伝子の抽出を行った。調製した溶解液の全量をカートリッジへ添加した。抽出モードは、「DNA WHOLE BLOOD」モードを選択し、本体を起動させた。本体停止後に、パネルが正常終了していることを確認して DNA を回収した。Nano Drop 2000（Thermo Fisher Scientific 社）で得られた DNA 量を確認し、60 ng/ $\mu\text{L}$  に調製した。

## 2) mPCR 反応

DMET™ puls の遺伝子抽出の準備を進めた。

Genomic Plate 1 (GP1) の準備を行った。まず、60 ng/μL に調製したサンプルと標品検体を準備した。標準検体は DMET Plus Premier Pack Kit (Affymetrix 社) に添付されている検体を使用した。

DNA サンプルをボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。調製した DNA サンプルおよび標準検体を 17 μL ずつ 96 well プレートにセットした。96 well プレートを被覆材で保護し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して氷上で保管した。

次に、Genomic Plate 2 (GP2) の準備を行った。1×TE Buffer, pH 8.0 (タカラバイオ社) を準備した。別の 96 well プレートに 10 μL ずつ 1×TE Buffer を入れた。GP1 で準備したサンプルから 2 μL を GP2 に加えていった。軽くピペットを用いて混和した後に被覆材で保護し、ボルテックスミキサーで攪拌した。2,000 rpm で 30 秒間遠心して氷冷した。

mPCR Master Mix の準備を行った。QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN 社) をボルテックスミキサーで攪拌し、遠心して氷冷した。Q-Solution (QIAGEN 社) を準備した。RNase-free water と mPCR Primer Mix (QIAGEN 社) を混合し、遠心して氷冷した。チューブに、QIAGEN Multiplex PCR Master Mix 1,500 μL、mPCR Primer Mix 300 μL、5×Q-Solution 300 μL、RNase-free Water 600 μL 加え、ピペットを用いて混和し氷冷した。

mPCR プレートの恒温保管を行った。新しい 96 well プレートに mPCR Master Mix を 45 μL と GP2 から 5 μL を加え、軽くピペットを用いて混和し、被覆材で保護し、ボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。サーマルサイクラー Life Pro

(Bioer Technology 社) を用いて、室温下で図 1-1 の設定 mPCR を行った。

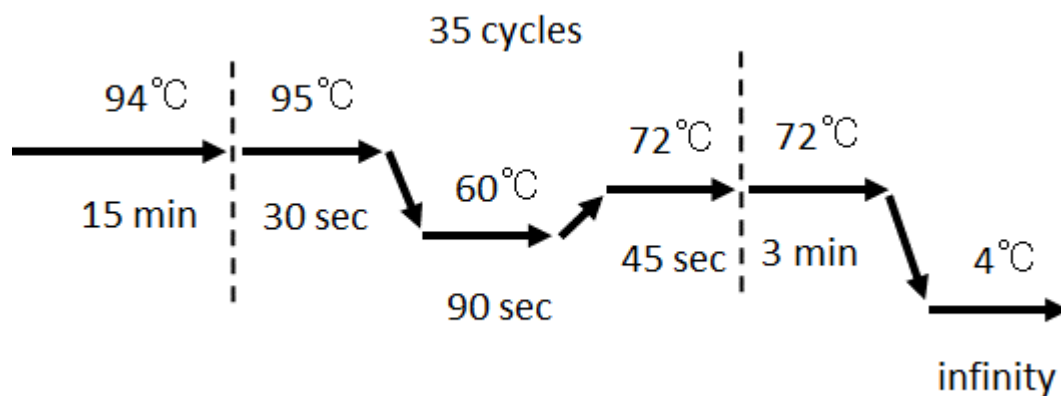


図 1-1 サーマルサイクラーの設定

mPCR 終了後のプレートをサーマルサイクラーから取り出し、2 分間氷冷し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。希釈用の新しい 96 well プレート (DP1、DP2) を準備し、混和した PCR Dilution Buffer を 153  $\mu\text{L}$  ずつ加えた。

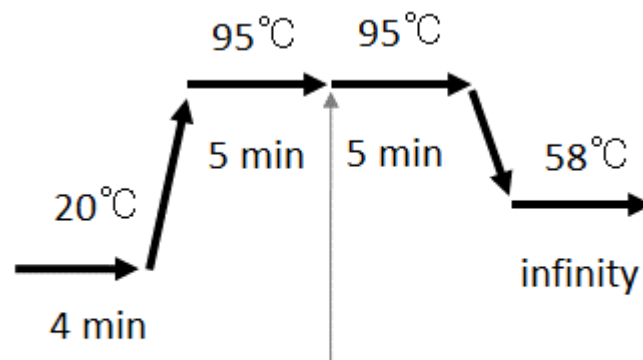
DP1 プレートには、mPCR 生成物を 5  $\mu\text{L}$  ずつ加え、全量 158  $\mu\text{L}$  とし、ピペットを用いて混和した。次に DP1 生成物から 5  $\mu\text{L}$  秤取し、DP2 プレートに加え、全量 158  $\mu\text{L}$  とし、ピペットを用いて混和した。DP2 のプレートを被覆材で保護し、氷冷した。

### 3) アニーリング

次に Anneal Master Mix の準備を行った。DMET™ Plus Premier Pack に添付されている Pre-Amp Water 996  $\mu\text{L}$ 、Buffer A 300  $\mu\text{L}$ 、Enzyme A 3.8  $\mu\text{L}$  をチューブに入れ氷冷した。

GP1 プレートを 2,000 rpm で 30 秒間遠心して氷冷した。Anneal Master Mix を 21.7  $\mu\text{L}$  ずつ新しいプレートに入れ、GP1 から mPCR 生成物を 13.4  $\mu\text{L}$  ずつ加え、ピペットを用いて混和し、被覆材で保護した。

作製したアニーリングパネルをボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。図 1-2 のプログラムでサーマルサイクラーを設定し、起動させた。温度が 20 度に達する時にアニーリングパネルをセットし、蓋を閉めた。最初の 95 度保持時間が終わる時点で、サーマルサイクラーを停止させ、アニーリングパネルを取り出し、2 分間氷冷する。アニーリングパネルを氷冷しながら、12 本のチューブに DMET Plus Panel Kit box に添付されている DMET MIP Panel を等分した。アニーリングパネルに 5  $\mu\text{L}$  の DMET MIP Panel を加え、ピペットを用いて混和した。被覆材で保護してボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。プレートをサーマルサイクラーに戻し、再開した。サンプルを 16 時間恒温保管した。



### 5 $\mu\text{L}$ DMET MIP Panel をセットする

図 1-2 アニール工程でのサーマルサイクラーの設定

#### 4) 増幅によるアッセイプレートの準備

Gap Fill Mix の準備を行った。DMET Plus Pre-Amp Kit box に添付されている Gap Fill Mix1 および Gap Fill Mix 2 を遠心し、Gap Fill Mix 2 を 190  $\mu\text{L}$  ずつチューブに分け、Gap Fill Mix1 を 10  $\mu\text{L}$  ずつ加え、ピペットを用いて混和した。作製した Gap Fill Mix を 14  $\mu\text{L}$  ずつチューブに分け、氷冷した。

アニールしたプレートをサーマルサイクラーから取り出し、氷冷して 2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。サンプルに Gap Fill Mix を 2.5  $\mu\text{L}$  ずつ加え、ピペットを用いて混和した。被覆材で保護し、ボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。新しい 96 well プレートに 12  $\mu\text{L}$  ずつ加え、被覆材で保護し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。サーマルサイクラーを図 1-3 に設定し、起動させた。温度が 58 度に達したらプレートをセットし、反応を開始させた。

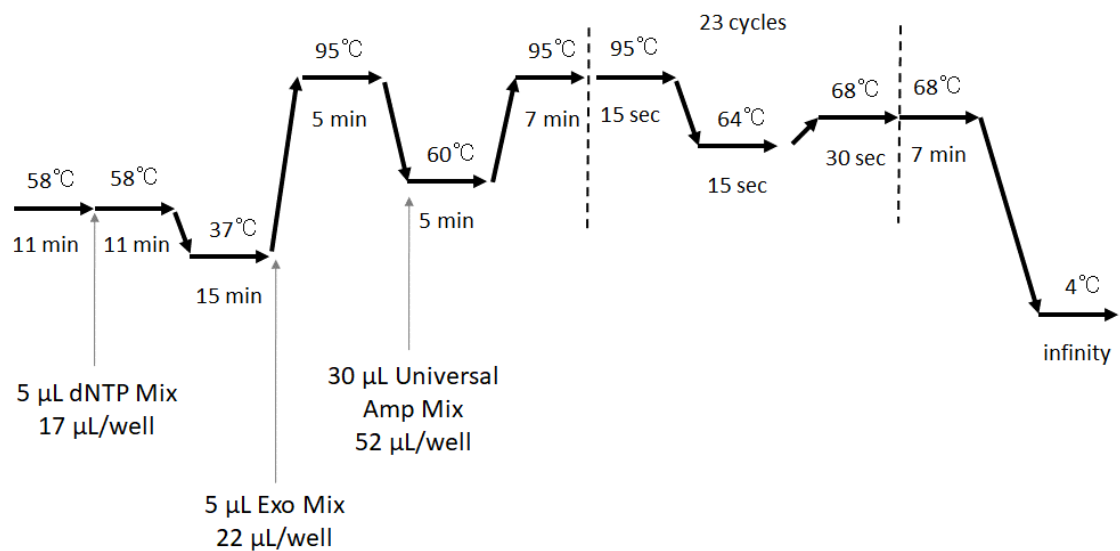


図 1-3 アッセイプレート準備工程でのサーマルサイクラーの設定

dNTP の準備を行った。DMET Plus Pre-Amp Kit box に添付されている dNTP Mix を遠心して回収し、氷冷した。58 度を保持して 11 分が経過した時点で、サーマルサイクラーを停止させ、アッセイプレートを取り出した。2 分間氷冷させ 2,000 rpm で 30 秒間遠心し、dNTP を 5 µL ずつ加え、ピペットを用いて混和した。被覆材で保護し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収し、サーマルサイクラーに戻し、反応を再開させた。

DMET Plus Pre-Amp Kit box に添付されている Exo Mix を準備した。サーマルサイクラーの温度が 37 度になった時点で、サーマルサイクラーを停止させ、アッセイプレートを取り出し、2 分間氷冷し、2,000 rpm で 30 秒間遠心した。サンプルに Exo Mix を 5 µL ずつ加え、ピペットを用いて混和した。被覆材で保護し、ボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心し、プレートをサーマルサイクラーに戻し、再開させた。

サーマルサイクラーが 95 度で 5 分間保持している間に、DMET Plus Pre-Amp Kit box に添付されている Universal Amp Mix を準備した。

Cleavage Enzyme と TITANIUM Taq Polymerase を取り外し、Universal Amp Mix をボルテックスミキサーで攪拌し、遠心した。Cleavage Enzyme と TITANIUM Taq Polymerase は遠心し、回収のみ行った。Universal Amp Mix に Cleavage Enzyme を 25  $\mu$ L 加えた。さらに、TITANIUM Taq Polymerase を 70  $\mu$ L 加え、ピペットを用いて混和した。95 度の保持時間が終わり 60 度となった時点で、サーマルサイクラーを停止させ、アッセイプレートを取り出した。2 分間氷冷し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。サンプルに用意した Universal Amp Mix を 30  $\mu$ L ずつ加え、ピペットを用いて混和した。被覆材で保護し、ボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心し、サーマルサイクラーに戻し、反応を再開させた。

## 5) PCR Clean-up と PCR の Quality control (QC) 確認

次に PCR Clean Up Mix の準備を行った。DMET Plus Labeling Kit box に添付されている PCR Clean Up Mix を氷冷し、サンプルに PCR Clean Up Mix 2.5  $\mu$ L ずつ加え、ピペットを用いて混和した。被覆材で保護し、ボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収し、サーマルサイクラーに戻し、図 1-4 に設定して起動させた。

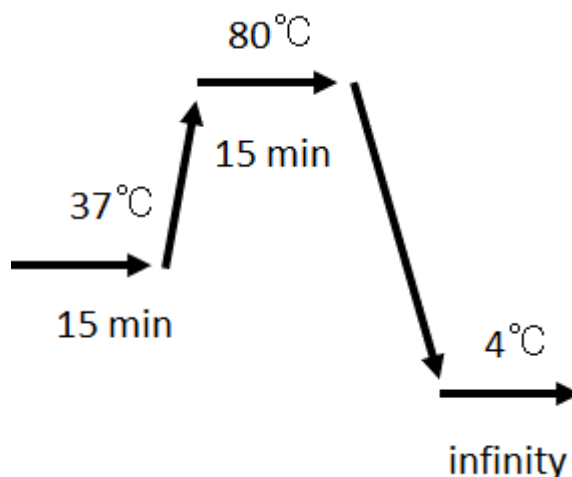


図 1-4 Clean-Up 工程でのサーマルサイクラーの設定

サーマルサイクラー停止後、アッセイプレートを取り出し、2,000 rpm で 30 秒間遠心した。TE Buffer 8  $\mu$ L と Loading Buffer 2  $\mu$ L とアッセイプレート生成物 2  $\mu$ L を加え、ピペットを用いて混和した。被覆材で保護し、十分に混和し、3%アガロースゲルに 10  $\mu$ L を充填して 120 V で 20 分間電気泳動した。全てのサンプルにおいて PCR の QC は問題ないことを確認した。



## 6) フラグメンテーションと二回目の QC 確認

次に、Fragmentation Master Mix の準備を行った。氷の上にセットした新しいチューブに、DMET Plus Labeling Kit box に添付されている Fragmentation Buffer 60  $\mu\text{L}$  と Post-Amp Water 536  $\mu\text{L}$  を加え、5 分間氷冷した。DMET Plus Labeling Kit box に添付されている Fragmentation Reagent をフリーザーから取り出し、3 秒間遠心して、すぐに氷冷し、Fragmentation Reagent 4.1  $\mu\text{L}$  をチューブに加えた。ボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm、3 秒間遠心して回収し、すぐに氷冷した。

アッセイプレートから 25  $\mu\text{L}$  ずつ新しいプレートに移し、氷冷した。Fragmentation Master Mix を 45  $\mu\text{L}$  チューブにとり、10  $\mu\text{L}$  ずつアッセイプレートに加え、ピペットを用いて混和した。被覆材で保護し、ボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。サーマルサイクラーにセットし、図 1-5 の設定をした。

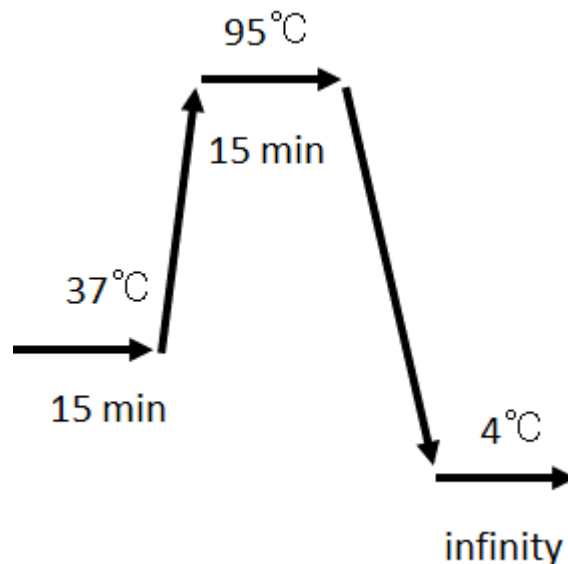


図 1-5 フラグメンテーションの工程でのサーマルサイクラーの設定

フラグメンテーション反応を終えたプレートから 10  $\mu\text{L}$  ずつ新しいプレートに移した。反応後のプレートは再び被覆材で保護した。新しいプレートの反応液に Loading Buffer を 2  $\mu\text{L}$  ずつ加え、ピペットを用いて混和した。被覆材で保護し、ボルテックスミキサーで 3 秒間攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。10  $\mu\text{L}$  の反応液を 3% アガロースゲルに装填し、120 V で 24 分間電気泳動した。50 bp に集中するバンドで、断片が < 120 bp であることを確認した。全てのサンプルにおいてフラグメンテーション後のサンプルの QC は問題ないことを確認した。

## 7) ラベリング

次に、Labeling Master Mix の準備を行った。DMET Plus Labeling Kit box に添付されている Post-Amp Water 24  $\mu\text{L}$ 、DNA Labeling Reagent 54  $\mu\text{L}$ 、5 $\times$  TdT Buffer 420  $\mu\text{L}$ 、TdT Enzyme 102  $\mu\text{L}$  を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 3 秒間遠心して氷冷した。

45  $\mu\text{L}$  の Labeling Master Mix をチューブにとり、10  $\mu\text{L}$  ずつ反応液に加えた。ピペットを用いて混和し、被覆材で保護してボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心した。プレートをサーマルサイクラーに戻し、図 1-6 に設定して起動させた。

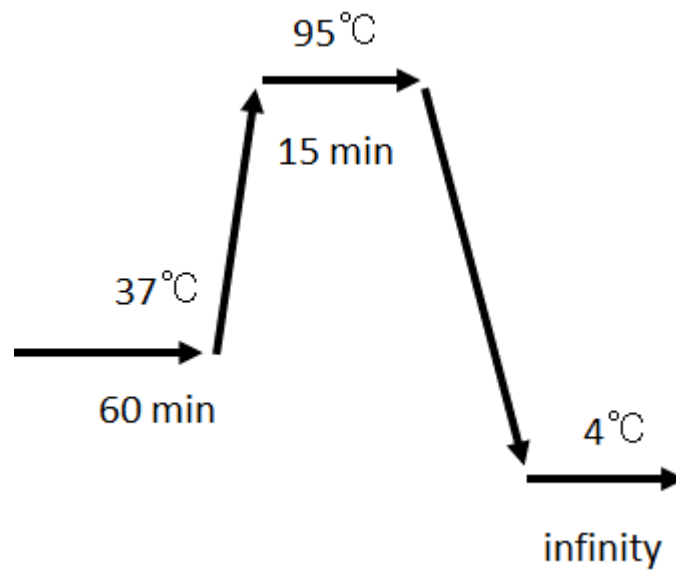


図 1-6 ラベリング工程でのサーマルサイクラーの設定

## 8) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションオーブンを起動させ、49 度に設定し、35 rpm で回転させた。DMET Plus Hyb-Stain Kit box に添付されている Hybridization 溶剤と Oligo Control Reagent をベンチ最上部に配置して、室温で解凍した。解凍しているのを確認して、Oligo Control Reagent は氷冷した。ベンチの一番上の段でアレイを開封した。10 分間室温でアレイを温めた。200  $\mu\text{L}$  のピペットチップをアレイ右上にセットした。ハイブリダイゼーションマスターミックスの準備として、50  $\mu\text{L}$  の Oligo Control Reagent を直接ハイブリダイゼーション溶剤に加えた。10 回転倒混和し、混ぜ合わせた。reagent reservoir にハイブリダイゼーションマスターミックスを加え、氷冷した。次に、ハイブリダイゼーション用 96 well プレートを用意し、氷冷した。サンプルのプレートを 2,000 rpm で 30 秒間遠心し、氷冷した。92  $\mu\text{L}$  ずつハイブリダイゼーションマスターミックスをハイブリダイゼーション用プレートに入れた。そこに、サンプルを 8  $\mu\text{L}$  ずつ加え、ピペットを用いて混和した。被覆材で保護し、ボルテックスミキサーで攪拌し、2,000 rpm で 30 秒間遠心した。サーマルサイクラーを図 1-7 に設定し、95 度になった時点で停止し、プレートをセットして起動させた。

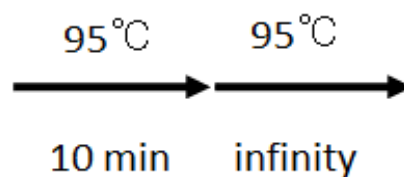


図 1-7 ハイブリダイゼーション工程でのサーマルサイクラーの設定

10 分間恒温保管を行った後に、プレートを取り出し、2 分間氷冷した後、2,000 rpm で 30 秒間遠心して回収した。95  $\mu\text{L}$  を吸い出し、アレイに注入した。ハイブリダイゼーションオーブんにアレイをセットし、49 度 35 rpm で 16 時間恒温保管した。

## 9) アレイの読み取り

アレイの読み取りは、Affymetrix GeneChip® Command Console を用いて行った。DMET Plus Hyb-Stain Kit box に添付されている Stain Buffer、Hold Buffer と DMET Plus Premier Pack Reagent Kit box に添付されている Wash Solution A、Wash Solution B を準備した。操作はパソコン上で行い、アレイの洗浄と焼き付けおよび読み込みを行う。1 セットの洗浄と焼き付けが完了したら、そのアレイを取り出し、スキャナーにセットして、パソコンを操作し、読み込みを行った。洗浄操作に 6 時間ほど、読み込み時間は 6-7 時間を要した。結果は、保存用のフォルダーに取り込みを行った。

## 第4項 統計解析

DMET™ puls によって得られた患者の遺伝子情報を肝機能障害あり群と肝機能障害なし群に分けて統計解析手法で解析を行った。

### 1) 個体の QC・SNP の QC

まず、個体の QC (Quality control) を確認する目的で、個体の Call rate を確認した。個体の Call rate とは、1,936 変異の中で遺伝型が Call された数の割合を示している。各個体について計算し、Call rate が 95%未満の個体については解析対象から除外、あるいは再タイピングした。

次に、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) の QC を確認した。66 検体すべての遺伝子情報の中から monomorphic SNP (多型とならない SNP、すべてホモ接合体) を除外する必要がある、アレル頻度 0.001 以下となる遺伝子は解析から除外することとした。

次に、ハーディー・ワインベルグ (HWE) 平衡を確認し、HWE 法則への適合度検定を実施した。HWE 平衡とは、

1. 集団のサイズが充分大きい
2. この遺伝座に関して、雌雄間の交配がランダム (任意交配) である
3. この遺伝子座に新たな突然変異が生じない
4. 他集団から、あるいは、他集団への移住がない
5. この遺伝子座に関して自然選択がない、つまり、遺伝子型間で適応度に差がない

という仮定条件下の集団において、ある遺伝子座に対立遺伝子 A、B が、それぞれの頻度 p、q にて存在する時、各遺伝子型頻度が

$$A/A = p^2$$

$$A/B = 2pq$$

$$B/B = q^2$$

となる法則を示している。

解析対象遺伝子の実測の遺伝子型を A/A、A/B、B/B の 3 群に分け、それぞれの出現頻度を算出した。次に、それぞれの出現率をパーセントに変換した。次に、HWE の法則から各遺伝子型の出現期待値を算出した。一例を示す。

実測遺伝子型 A/A	50 名
実測遺伝子型 A/B	13 名
実測遺伝子型 B/B	3 名

実測遺伝子型 A/A 割合①	75.8 %
実測遺伝子型 A/B 割合②	19.7 %
実測遺伝子型 B/B 割合③	4.5 %

実測遺伝子型 A 割合	85.6 %
実測遺伝子型 B 割合	14.4 %

上記  $A/A = p^2$ 、 $A/B = 2pq$ 、 $B/B = q^2$  の法則にあてはめ、各遺伝子型の出現期待値を算出した。

HWE の法則からの A/A 出現期待値④	73.3 %
HWE の法則からの A/B 出現期待値⑤	24.6 %
HWE の法則からの B/B 出現期待値⑥	2.1 %

HWE 法則への適合度検定の  $\chi^2_{\text{hwe}}$  値は、下記となる。

$$\chi^2_{\text{hwe}} = (① - ④)^2 / ④ + (② - ⑤)^2 / ⑤ + (③ - ⑥)^2 / ⑥$$

この方法で各遺伝子の  $\chi^2_{\text{hwe}}$  値を算出した。  $\chi^2$  分布表を参照し、  $\chi^2_{\text{hwe}}$  値 13.82 以上となる場合に、HWE 法則への適合度検定  $P < 0.001$  となるため、それらの遺伝子を除外した。

## 2) Jonckheere-Terpstra trend 検定

次に、解析対象となった 670 変異を対象に、変異アレル数の比に線形傾向（トレンド）を認めるか検証するために、Jonckheere-Terpstra trend 検定を行った。

まず、遺伝子の（A/A、A/B、B/B）を（0、1、2）と数値に変換した。肝機能障害あり群と肝機能障害なし群に分けて、Jonckheere-Terpstra trend 検定を実施し、 $P < 0.05$  を有意差ありとした。

## 3) 多重共線性の排除

次に、Jonckheere-Terpstra trend 検定で  $P < 0.05$  となった遺伝子を対象に、Spearman の順位相関係数を用いて多重共線性を確認した。多重共線性とは、説明変数間で相関が非常に高い変数を複数同時に解析に入れて多変量解析を行うと、正しい推計に悪影響を及ぼすことが知られている。そのため、相関係数が高い説明変数の組み合わせは、一方を削除する必要がある。

Spearman の順位相関係数の絶対値が 0.9 以上の組み合わせのうち、片方を削除することとした。

## 4) ステップワイズ選択法

Spearman の順位相関係数を確認し、残った遺伝子を対象にステップワイズ選択法（変数増加法）を行った。ステップワイズ選択法とはロジスティック回帰モデルを検討する際の変数選択法であり、逐次選択法とも呼ばれる。説明変数の絞り込みを行う際に頻用される手法である。

なお、今回得られている遺伝子は、背景に差のある患者集団から得られている。そのため、患者背景を補正する目的で、背景に有意差のあった年齢および血清クレアチニン値を説明変数に加えて、解析を行うこととした。



## 5) ROC 解析

推定精度を悪化させる要因となりうる説明変数として、一方の群のアレル頻度が 0.000 である説明変数を解析から除外した。

次に、得られた遺伝子および年齢・クレアチニン値を用いて ROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を行い、肝機能障害予測モデルの作成を行った。

ROC 曲線から

(1) 真陽性 (TP: true positive 病変ありを観察して、正しく「病変がある」と答える)

(2) 偽陰性 (FN: false negative 病変ありを観察して、誤って「病変がない」と答える)

(3) 偽陽性 (FP: false positive 病変なしを観察して、誤って「病変がある」と答える)

(4) 真陰性 (TN: true negative 病変なしを観察して、正しく「病変がない」と答える)

上記 4 分類を分けるカットオフ値から感度、特異度を算出する。感度、特異度は下記で算出した。

感度 = 真陽性 / (真陽性+偽陰性)

特異度 = 真陰性 / (偽陽性+真陰性)

カットオフ値は、「感度 - (1 - 特異度)」が最大値となる組み合わせから算出する Youden Index を用いて算出した。

これらの解析は、R (R-2.7.0) および JMP10 (SAS Institute Inc) を用いて行った。

## 第2節 結果

### 第1項 対象患者

対象患者は69名であった。肝機能障害あり群は26名、肝機能障害なし群は43名であった。そのうち、肝機能障害あり群の3名を除外した。その理由は、1名はボセンタン投与開始19日目に心筋梗塞を発症し、 $AST = 4.61 \times ULN$   $ALT = 0.68 \times ULN$ となった。次の1例は、自己免疫性肝炎があり、投与開始時にすでに $AST = 9.58 \times ULN$   $ALT = 10.26 \times ULN$ と上昇が見られた。最後の1例も慢性的に肝酵素上昇があり、ボセンタン投与開始時にすでに $AST = 2.35 \times ULN$   $ALT = 2.21 \times ULN$ と上昇が見られたために、解析から除外した。

解析対象となった患者に、肝炎ウイルス感染症や脂肪肝など病理学的にボセンタンによる肝機能障害に影響する要因がないことを確認した。

解析対象となった患者背景を表1-2に示す。患者背景では、年齢および血清クレアチニン値に両群間で有意な差があった。

ボセンタン導入後に肝機能障害が発生した時の状況とその後の対応について表1-3にまとめる。肝機能障害あり群は、ボセンタン投与による肝機能障害から全例回復した。 $AST \cdot ALT$ が $ULN \times 1.5$ 以下まで回復するために要した平均期間は、 $26.9 \pm 20.7$ 日であった。その後のボセンタンの継続・減量・中止の区分を表1-4にまとめる。

表 1-2 患者背景

患者背景	肝機能障害 あり群	肝機能障害 なし群	P 値
患者数 (n)	23	43	-
年齢 (範囲) 年	65.0 (50-75)	54.8 (14-84)	P = 0.012 *
男性/女性	4/19	11/32	P > 0.05
体表面積 (範囲) m <sup>2</sup>	1.48 (1.19-1.84)	1.57 (1.19-2.42)	P > 0.05
ボセンタン投与量 (mg)	188.86 (62.5-250)	213.66 (62.5-250)	P > 0.05
I/HPAH (%)	4 (17.4%)	9 (20.9%)	P > 0.05
CTD-PAH (%)	6 (26.1%)	12 (27.9%)	P > 0.05
CHD-PAH (%)	0 (0.0%)	4 (9.3%)	P > 0.05
PoPH (%)	1 (4.3%)	0 (0.0%)	P > 0.05
LHD-PH (%)	1 (4.3%)	1 (2.3%)	P > 0.05
Lung-PH (%)	2 (8.7%)	4 (9.3%)	P > 0.05
Others (%)	9 (39.1%)	13 (30.2%)	P > 0.05
mPAP (mmHg)	34.9 (12-55)	40.4 (13-78)	P > 0.05
PVR (dyne*sec/cm <sup>5</sup> )	610.8 (46-1362)	718.3 (34-2771)	P > 0.05
CI (L/min/m <sup>2</sup> )	2.57 (1.44-6.29)	2.53 (1.39-4.29)	P > 0.05
AST (IU/L)	23.2 (14-44)	21.2 (10-38)	P > 0.05
ALT (IU/L)	17.6 (8-30)	16.7 (8-38)	P > 0.05
BNP (pg/mL)	167.7 (9.11-856.87)	132.0 (5.53-527.08)	P > 0.05
血清クレアチニン (mg/dL)	0.66 (0.42-1.07)	0.79 (0.44-1.41)	P = 0.011 *
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	76.8 (43.6-110.3)	71.8 (39-157)	P > 0.05
WHO 機能分類 (範囲)	2.7 (2-4)	2.86 (2-4)	P > 0.05

\* : Unpaired t-test,

表 1-3 肝機能障害あり群の肝機能障害発生状況とその後の対応

患者	肝機能障害発生時のボセンタ投与量 (mg)	AST/ALTピークまでの日数 (days)	× ULN of AST	× ULN of ALT	肝障害発生後の対応	認容できなかったボセンタ投与量 (mg)
1	250	43	1.68	2.21	中止	-
2	250	56	12.0	21.2	中止	-
3	62.5	49	4.55	7.85	中止	-
4	125	145	7.26	3.59	中止	-
5	250	55	3.48	3.15	減量	125
6	250	215	2.74	4.38	継続	250
7	250	41	4.90	3.44	減量	125
8	62.5	26	2.26	3.09	中止	-
9	250	49	3.68	3.44	中止	-
10	187.5	91	15.3	12.6	中止	-
11	62.5	13	1.77	1.76	中止	-
12	250	59	1.35	1.97	減量	125
13	187.5	25	1.77	1.94	継続	125
14	250	51	1.90	3.15	継続	250
15	187.5	54	2.48	1.59	継続	250
16	187.5	116	2.74	1.65	中止	-
17	125	135	2.48	1.71	継続	125
18	93.75	70	10.7	18.0	中止	-
19	187.5	155	1.77	2.65	継続	250
20	250	358	7.48	4.47	継続	250
21	125	28	2.65	2.88	継続	125
22	250	295	1.74	1.79	継続	250
23	250	280	1.97	2.44	継続	250

表 1-4 肝機能障害発生後の対応と回復までの期間

肝障害発生後の対応	回復するまでの期間 (日)	患者
中止	21	1
中止	42	2
中止	20	3
中止	12	4
中止	7	8
中止	21	9
中止	10	10
中止	14	11
中止	66	16
中止	29	18
減量	35	5
減量	28	7
減量	26	12
継続	6	6
継続	7	13
継続	14	14
継続	49	15
継続	14	17
継続	93	19
継続	14	20
継続	21	21
継続	42	22
継続	27	23

## 第2項 個体のQC・SNPのQC

DMET™ puls によって得られた患者の遺伝子情報を肝機能障害あり群と肝機能障害なし群に分けて統計解析手法で解析を行った。

まず、個体のQC (Quality Control)を確認する目的で、個体の Call rate つまり 1,936 変異の中で遺伝型が Call された SNP 数の割合を確認した。今回得られた遺伝子では全ての個体の Call rate が 95%以上であり、解析対象から除外すべき個体はなかった。

次に、SNP の QC を確認した。66 検体すべての遺伝子情報の中からすべてホモ接合体で多型とならない SNP、つまりアレル頻度 0.001 以下となった 1,237 変異の説明変数を除外した。

次に、HWE 平衡を確認し、HWE 法則への適合度検定を実施した。

まず、解析対象遺伝子の実測の遺伝子型を A/A、A/B、B/B の 3 群に分け、それぞれの出現頻度を算出した。次に、それぞれの出現率をパーセントに変換した。次に、HWE の法則から各遺伝子型の出現期待値を算出した。

HWE 法則への適合度検定の  $\chi^2_{\text{hwe}}$  値 13.82 以上、つまり HWE 法則への適合度検定  $P < 0.001$  となるため、不適合の 29 変異を除外し、それ以外の 670 変異を抽出した。

### 第3項 Jonckheere-Terpstra trend 検定

解析対象となった 670 変異を対象に、変異アレル数の比に線形傾向（トレンド）を認めるか検証するために、Jonckheere-Terpstra trend 検定を行った。

まず、遺伝子型の（A/A、A/B、B/B）を（0、1、2）と数値に変換した。肝機能障害あり群と肝機能障害なし群に分けて、Jonckheere-Terpstra trend 検定を実施し、 $P < 0.05$  を有意差ありとした。Jonckheere-Terpstra trend 検定で 16 遺伝子多型が選択された（表 1-5）。Jonckheere-Terpstra trend 検定で選択された遺伝子を表 1-6 に、ヒートマップを図 1-8 に示す。Jonckheere-Terpstra trend 検定の  $P$  値を示す（表 1-7）。

表 1-5 Jonckheere-Terpstra trend 検定で選択された遺伝子の情報

遺伝子	Rs番号	SNP	P 値
<i>SLC13A1</i>	rs6962039	<i>SLC13A1_c.*1214C&gt;T</i>	0.0141
<i>CHST3</i>	rs4148953	<i>CHST3_c.*4770G&gt;A</i>	0.0182
<i>CHST13</i>	rs6783962	<i>CHST13_c.180+1473T&gt;G</i>	0.0191
<i>CHST13</i>	rs1873397	<i>CHST13_c.180+2676G&gt;C</i>	0.0191
<i>ABCB4</i>	rs8187791	<i>ABCB4_c.696C&gt;T(A232A)</i>	0.0208
<i>GSTA4</i>	rs7496	<i>GSTA4_c.*429G&gt;A</i>	0.0328
<i>SLC10A2</i>	rs188096	<i>SLC10A2_c.511G&gt;T(A171S)</i>	0.0361
<i>POR</i>	rs2286824	<i>POR_c.*372G&gt;A</i>	0.0373
<i>SLC10A2</i>	rs279941	<i>SLC10A2_c.*315G&gt;T</i>	0.0395
<i>CYP2C18</i>	rs41291550	<i>CYP2C18_c.204T&gt;A(Y68X)</i>	0.0402
<i>CYP2C19</i>	rs4986893	<i>CYP2C19*3_17948G&gt;A(W212X)</i>	0.0402
<i>ABCC2</i>	rs3740066	<i>ABCC2_c.3972C&gt;T(I1324I)</i>	0.0412
<i>CHST13</i>	rs4305381	<i>CHST13_c.98-5237A&gt;C</i>	0.0451
<i>GSTA4</i>	rs405729	<i>GSTA4_c.*487G&gt;A</i>	0.0481
<i>GSTA4</i>	rs367836	<i>GSTA4_c.*137A&gt;C</i>	0.0481
<i>PPARG</i>	rs1152003	<i>PPARG_c.*1411G&gt;C</i>	0.049

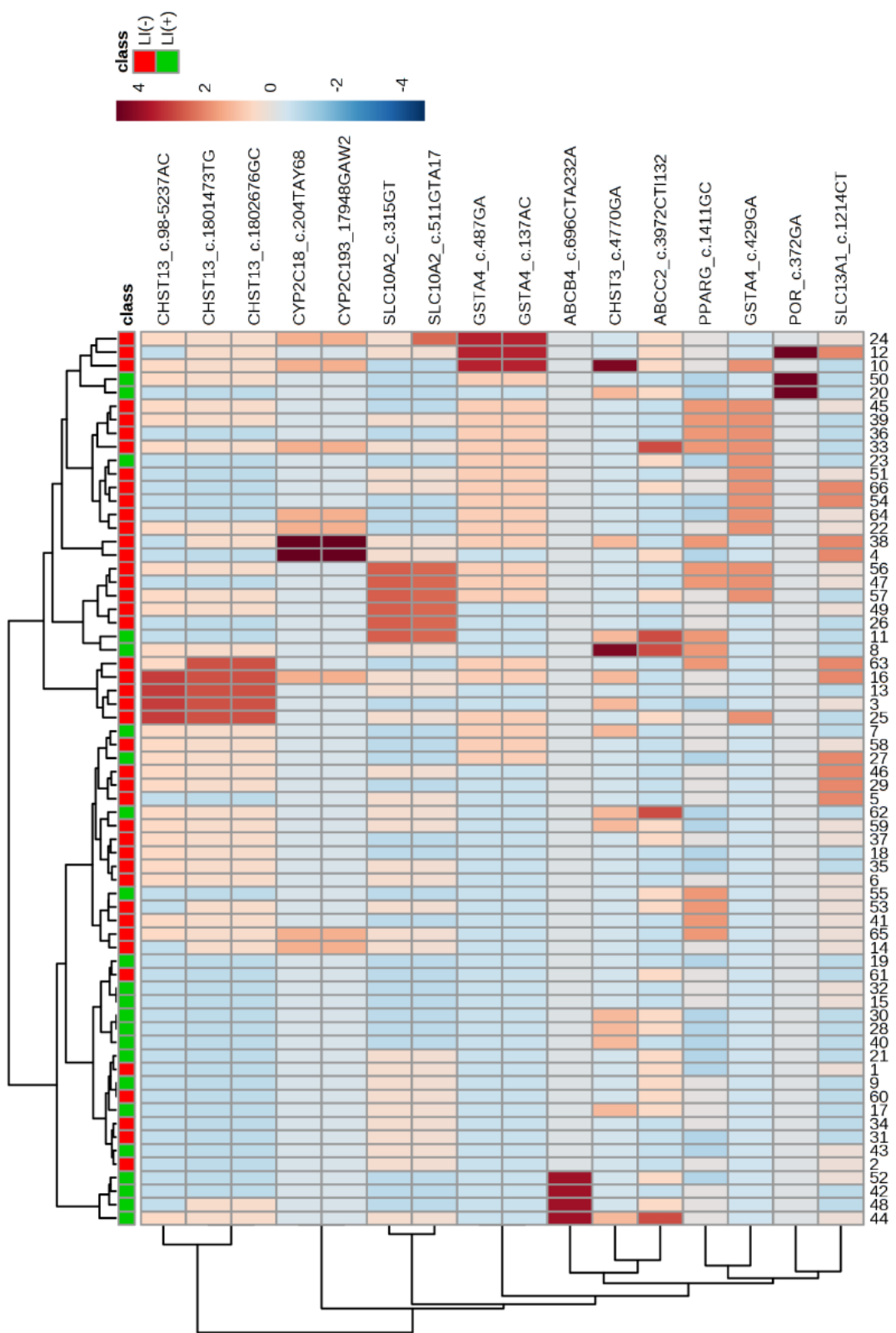


図 1-8 Jonckheere-Terpstra trend 検定で選択された遺伝子のヒートマップ



表 1-6 Jonckheere-Terpstra trend 検定で選択された遺伝子

患者番号	肝機能障害	SLC13A1_c.*1214C>T	CHST3_c.*4770G>A	CHST13_c.180+1473T>G	CHST13_c.180+2676G>C	ABCB4_c.696C>T(A232A)	GSTA4_c.*429G>A	SLC10A2_c.511G>T(A171S)	POR_c.*372G>A	SLC10A2_c.*315G>T	CYP2C18_c.204T>A(Y68X)	CYP2C19*.317948G>A(W212X)	ABCC2_c.3972C>T(I1324I)	CHST13_c.98-5237A>C	GSTA4_c.*487G>A	GSTA4_c.*137A>C	PPARG_c.*1411G>C
1	なし	C/T	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	G/G
2	なし	C/T	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	C/G
3	なし	C/T	A/G	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	C/C	G/G	A/A	G/G
4	なし	T/T	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	A/A	A/A	C/T	A/A	G/G	A/A	G/G
5	なし	T/T	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	C/G
6	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	A/C	G/G	A/A	C/G
7	あり	C/C	A/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/C	A/G	A/C	C/G
8	あり	C/C	A/A	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	T/T	A/C	G/G	A/A	C/C
9	あり	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	A/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	C/G
10	なし	C/C	A/A	G/T	C/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	A/T	A/G	C/T	A/C	A/A	C/C	C/G
11	あり	C/C	A/G	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	G/G	T/T	T/T	G/G	T/T	A/A	G/G	A/A	C/C
12	なし	T/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	A/G	G/T	T/T	G/G	C/T	A/A	A/A	C/C	C/G
13	なし	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	C/C	G/G	A/A	C/G
14	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	A/T	A/G	C/C	A/A	G/G	A/A	C/G
15	あり	C/T	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	C/G
16	なし	T/T	A/G	G/G	C/C	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	A/T	A/G	C/C	C/C	A/G	A/C	C/G
17	あり	C/C	A/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/T	NoCall	G/T	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	C/G
18	なし	C/C	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/C	G/G	A/A	G/G
19	あり	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/G	NoCall	G/G	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	G/G
20	あり	C/C	A/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/G	A/G	G/G	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	G/G
21	あり	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	G/G
22	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	A/G	G/G	G/G	G/G	A/T	A/G	C/C	A/C	A/G	A/C	C/G
23	あり	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	A/G	G/G	NoCall	G/G	T/T	G/G	C/T	A/A	A/G	A/C	G/G
24	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	T/T	G/G	G/T	A/T	A/G	C/T	A/C	A/A	C/C	C/G
25	なし	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C	A/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/T	C/C	A/G	A/C	C/G
26	なし	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	T/T	G/G	T/T	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	C/G
27	あり	T/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/C	A/G	A/C	G/G
28	あり	C/C	A/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	G/G
29	なし	T/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/C	G/G	A/A	C/G
30	あり	C/C	A/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	G/G
31	なし	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	G/G
32	あり	C/T	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/G	NoCall	G/G	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	C/G
33	なし	C/C	G/G	G/T	C/G	C/C	A/G	G/T	G/G	G/T	A/T	A/G	T/T	A/C	A/G	A/C	C/C
34	なし	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	C/G
35	なし	C/C	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	A/C	G/G	A/A	G/G
36	なし	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	A/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/A	A/G	A/C	C/C
37	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/T	A/C	G/G	A/A	C/G
38	なし	T/T	A/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	A/A	A/A	C/C	A/A	A/G	A/C	C/C
39	なし	C/C	G/G	G/T	C/G	C/C	A/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	A/C	A/G	A/C	C/C
40	あり	C/C	A/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	G/G
41	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/C	G/G	A/A	C/C
42	あり	C/C	G/G	T/T	G/G	C/T	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	C/G
43	あり	C/T	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	A/A	G/G	A/A	G/G
44	あり	C/T	A/G	G/T	C/G	C/T	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	T/T	A/C	G/G	A/A	C/G
45	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	A/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/C	A/G	A/C	C/C
46	なし	T/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	A/C	G/G	A/A	C/G
47	なし	C/T	G/G	T/T	G/G	C/C	A/G	T/T	G/G	T/T	T/T	G/G	C/C	A/A	A/G	A/C	C/C
48	あり	C/C	G/G	G/T	C/G	C/T	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	G/T	A/A	G/G	A/A	C/G
49	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	T/T	G/G	T/T	T/T	G/G	C/C	A/C	G/G	A/A	C/G
50	あり	C/C	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/G	A/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/C	A/G	A/C	G/G
51	なし	C/T	G/G	T/T	G/G	C/C	A/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/C	A/A	A/G	A/C	C/G
52	あり	C/T	G/G	T/T	G/G	C/T	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	G/G
53	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	C/C
54	なし	T/T	G/G	T/T	G/G	C/C	A/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/A	A/G	A/C	G/G
55	あり	C/T	G/G	T/T	G/G	C/C	A/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	C/C
56	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	A/G	T/T	G/G	T/T	T/T	G/G	C/C	A/C	A/G	A/C	C/C
57	なし	C/C	G/G	G/T	C/G	C/C	A/G	T/T	G/G	T/T	T/T	G/G	C/T	A/C	A/G	A/C	C/G
58	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/C	A/G	A/C	C/G
59	なし	C/T	A/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/T	A/C	G/G	A/A	G/G
60	なし	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	C/G
61	なし	C/C	G/G	T/T	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/T	A/A	G/G	A/A	C/G
62	あり	C/C	A/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	T/T	A/C	G/G	A/A	G/G
63	なし	T/T	G/G	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G	C/C	A/C	A/G	A/C	C/C
64	なし	C/T	G/G	T/T	G/G	C/C	A/G	G/G	NoCall	G/G	A/T	A/G	C/C	A/A	A/G	A/C	G/G
65	なし	C/T	G/G	G/T	C/G	C/C	G/G	G/T	G/G	G/T	A/T	A/G	C/C	A/C	G/G	A/A	C/C
66	なし	T/T	G/G	T/T	G/G	C/C	A/G	G/T	G/G	G/T	T/T	G/G	C/T	A/A	A/G	A/C	C/G

表 1-7 Jonckheere-Terpstra trend 検定の P 値

遺伝子	p-value	遺伝子	p-value
SLC13A1_c.*1214C>T	0.0141	ABCB11_c.-899delCT_alterate	0.138
CHST3_c.*4770G>A	0.0182	DCK_c.*165C>T(3'UTR)	0.138
CHST13_c.180+1473T>G	0.0191	CYP4Z1_c.1170T>C(I390I)	0.14
CHST13_c.180+2676G>C	0.0191	SLCO1B1.*17_c.-11187G>A(Promoter)	0.144
ABCB4_c.696C>T(A232A)	0.0208	GSTA2_c.-10G>C	0.15
GSTA4_c.*429G>A	0.0328	PPARG_c.1431C>T(H477H)	0.154
SLC10A2_c.511G>T(A171S)	0.0361	GSTA2_c.629A>C(E210A)	0.154
POR_c.*372G>A	0.0373	GSTA5_c.-31+1737C>T	0.154
SLC10A2_c.*315G>T	0.0395	SLC28A1_c.709C>A(Q237K)	0.166
CYP2C18_c.204T>A(Y68X)	0.0402	NQO1_c.*1119C>T	0.166
CYP2C19.*3_17948G>A(W212X)	0.0402	FMO1_c.*207C>T	0.177
ABCC2_c.3972C>T(I1324I)	0.0412	POR_c.189-8806C>T	0.182
CHST13_c.98-5237A>C	0.0451	SULT2B1_c.834C>T(C278C)	0.183
GSTA4_c.*487G>A	0.0481	NR3C1_c.2298T>C(N766N)	0.185
GSTA4_c.*137A>C	0.0481	NR3C1_c.2034C>T(D678D)	0.185
PPARG_c.*1411G>C	0.049	NR3C1_c.1764C>T(H588H)	0.185
CYP4A11_c.*3733A>G	0.0605	SLC22A2_c.390G>T(T130T)	0.186
ABCG1_c.1430-293C>G	0.0614	ABCG1_c.589-407A>G	0.188
CHST13_c.950G>A(R317Q)	0.0619	UGT2B15_c.253G>T(D85Y)	0.195
ABCC5_c.*1243G>A	0.0623	SLCO1B3_c.334G>T(A112S)	0.199
CHST13_c.97+3926A>T	0.0665	CYP39A1_c.972T>A(N324K)	0.2
ABCC4_c.3348A>GorDel(K1116KorX)	0.0675	ABCG1_c.973+672G>A	0.207
SLC22A7_c.1275C>T(S425S)	0.0676	ARNT_c.567G>C(V189V)	0.209
ABCC5_c.1782C>T(C594C)	0.0682	GSTT2_c.417C>T(M139I)	0.209
UGT2B17_c.1065T>C(Y355Y)	0.0766	ABCC4_c.2844C>T(F948F)	0.213
ALDH3A1_c.400G>T(A134S)	0.0774	ABCC4_c.2712G>A(L904L)	0.213
SLC25A27_c.298+766C>G	0.0774	CYP2A6.*11_3391T>C(S224P)	0.216
ABCC2_c.-24C>T(5'UTR)	0.0806	NR1I2_c.-1335C>T	0.219
CYP2C18_c.1154C>T(T385M)	0.0837	DCK_c.364C>T(P122S)	0.219
GSTA5_c.-8526G>T	0.0872	ABCC1_c.*1512T>C	0.22
UGT2B4_c.*225T>C	0.0885	FMO1_c.*111C>T	0.221
GSTA2_c.335G>C(S112T)	0.0996	ABCC5_c.1146A>G(Q382Q)	0.223
GSTA5_c.-31+2057C>T	0.0996	SLC13A1_c.99+1812C>G	0.224
CA5P_A>G(rs11859842)	0.108	CYP2B6_18273G>A	0.23
QPRT_T>G(rs13331798)	0.108	SLCO3A1_c.1513-5136A>G	0.231
CYP2B6.*5_25505C>T(R487C)	0.108	ABCC1_c.825T>C(V275V)	0.231
ABCB11_c.896G>A(R299K)	0.108	UGT1A1.*76_c.*211C>T(3'UTR)	0.231
TBXAS1.*7_c.1348G>A(E450K)	0.108	UGT1A1.*78_c.*339C>G(3'UTR)	0.231
ABCC3_c.3942C>T(H1314H)	0.11	UGT1A1.*79_c.*440C>G(3'UTR)	0.231
SLCO1B3_c.699A>G(I233M)	0.118	CYP24A1_3900C>T(A184A)	0.241
SLCO1B3_c.1557G>A(A519A)	0.118	CHST2_2082C>T	0.242
ABP1_c.*69C>T	0.121	ALDH2_c.1510G>A(E504K)	0.247
GSTM5_c.*694T>C	0.122	CYP26A1_c.*5152T>G	0.251
CYP11B1_7293G>T	0.126	SULT1B1_c.-44-95T>C	0.251
CYP11B1_6940T>C	0.126	SLCO1B1_c.597C>T(F199F)	0.252
CYP11B1_6483G>A	0.126	SLCO3A1_c.*1204G>A	0.252
CYP11B1_6135C>T	0.126	EPHX1_c.1071C>T(N357N)	0.252
SLC22A7_c.563A>G(I188T)	0.131	CYP2C9.*13_3276T>C(L90P)	0.259
SULT1A2_c.704A>C(N235T)	0.132	ABCC2_c.1457C>T(T486I)	0.259

遺伝子	p-value	遺伝子	p-value
ABCC1_c.2001C>T(S667S)	0.259	CYP4F3_11466G>A(P348P)	0.312
CYP2A13_2366C>T	0.259	ABCC6_c.3803G>A(R1268Q)	0.313
DPYD_c.496A>G(M166V)	0.259	SLCO3A1_c.882G>C(E294D)	0.315
CHST10_c.444T>C(I148I)	0.259	CHST9_c.-66C>T	0.315
SULT1C2_c.218G>A(R73Q)	0.259	UGT2A1_c.1305-109A>C	0.316
UGT1A10*6_c.605C>T(T202I)	0.259	CYP2F1_5308G>C(V175L)	0.323
PPARG_c.34C>G(P12A)	0.259	ABCB11_c.*236G>A	0.323
NAT2*5_c.341T>C(I114T)	0.259	UGT2A1_c.922G>A(G308R)	0.323
CYP7A1_3285A>G(N233S)	0.259	CHST2_-2693G>A	0.326
ALDH1A1_c.529A>T(I177F)	0.259	CYP2C18_c.*592C>A(3'UTR)	0.327
ALDH1A1_c.225C>T(S75S)	0.259	SLC15A1_c.1348G>A(V450I)	0.331
CYP1A2*1C_-3860G>A(Promoter)	0.261	UGT8_c.741A>G(A247A)	0.331
NAT1_1191G>T(3'UTR)	0.261	CYP2C9*3_42614A>C(I359L)	0.332
SLCO1B1*5_c.521T>C(V174A)	0.265	CYP2C9_55323A>T(G475G)	0.332
CYP4F3_11496A>G(V358V)	0.267	ABCB1_c.3751G>A(V1251I)	0.332
SLC19A1_c.696T>C(P232P)	0.269	SULT1A2_c.888A>G(R296R)	0.334
SLC7A8_c.*665T>C	0.27	SLC25A27_c.299-1425C>T	0.337
ABCC3_c.3039C>T(G1013G)	0.27	SLC10A2_c.*120T>C	0.34
ALDH3A1_c.741T>A(P247P)	0.271	SULT2A1_c.*161C>G	0.345
CYP51A1_c.*251G>C	0.273	EPHX1_c.1350G>C(S450S)	0.346
CYP51A1_c.1359T>C(H453H)	0.273	ABCC1_c.*866T>A	0.35
SLC15A2_c.852G>A(A284A)	0.282	CYP2A13_7233T>G	0.352
SLC15A2_c.1048C>T(L350F)	0.282	CYP2A7_c.931C>T(R311C)	0.359
SLC15A2_c.1161A>G(A387A)	0.282	CYP1A2*1F_-163C>A(Promoter)	0.361
SLC15A2_c.1225C>T(P409S)	0.282	ATP7A_c.2299G>C(V767L)	0.362
SLC15A2_c.1526G>A(R509K)	0.282	SULT1E1_c.-9-682A>G	0.371
SLC28A1_c.565G>A(V189I)	0.283	CHST2_-2387G>A	0.373
ABCB11_c.807T>C(Y269Y)	0.283	SLCO5A1_c.*476G>A	0.373
ABCB11_c.108T>C(D36D)	0.283	GSTA2_c.328C>T(P110S)	0.376
CHST13_c.*671G>C	0.284	GSTA1_c.-5120T>G	0.376
CHST2_-2298T>A	0.286	GSTA5_c.163A>G(I55V)	0.376
GSTZ1_c.245C>T(T82M)	0.288	GSTA5_-8962C>T	0.376
CHST10_c.*758G>A	0.288	SLC28A3_c.1381C>T(L461L)	0.381
CHST10_c.*107C>T	0.288	ABCB7_c.457-1932A>T	0.382
CHST10_c.870C>T(A290A)	0.288	AOX1_T>C(rs7563682)	0.384
ADH1A_c.*2804C>T	0.288	AOX1_A>G(rs11684227)	0.384
ADH1A_c.-5671G>A	0.288	ABCC4_c.*879T>C	0.385
GSTA4_c.487A>G(T163A)	0.288	ABCC4_c.*694G>A	0.385
ABCB4_c.1954A>G(R652G)	0.288	ABCC8_c.4105T>G(S1369A)	0.386
TBXAS1_c.1162G>A(E388K)	0.288	SLCO4A1_c.*497C>T	0.386
ADH5_C>T(rs2602836)	0.295	ABCG1_c.*399G>A	0.386
CYP2B6*2_64C>T(R22C)	0.298	ABCG1_c.*1981G>A	0.386
CYP2B6_12740G>C(P72P)	0.298	GSTP1_c.-18G>A(Promoter)	0.39
FMO2_c.941A>G(E314G)	0.302	SLCO1B1*16_c.452A>G(N151S)	0.39
CYP2B6_14593C>G	0.303	SLCO1B1_c.1007C>G(P336R)	0.39
CYP2B6_15582C>T	0.303	ABCC4_c.*1564A>T	0.39
SLC22A13_c.*3670C>T	0.305	SLC10A1_c.800C>T(S267F)	0.39
CDA_c.435C>T(T145T)	0.307	ABCC6_c.1896C>A(H632Q)	0.39
CYP39A1_c.308G>A(R103H)	0.311	ABCC6_c.1890C>G(T630T)	0.39

遺伝子	p-value	遺伝子	p-value
ABCC3_c.4509A>G(E1503E)	0.39	FMO3_c.472G>A(E158K)	0.449
CYP2A7_c.821A>G(H274R)	0.39	CYP24A1_18948C>T	0.453
CDA*3_c.208G>A(A70T)	0.39	PPARD_c.-186+1796G>A	0.453
ARNT_c.249T>C(S83S)	0.39	PPARD_c.-101-21071C>G	0.453
FMO3_c.627+10C>G	0.39	CHST3_c.*1278C>T	0.457
UGT1A6_c.627G>T(V209V)	0.39	CHST3_c.*1361C>T	0.457
ABCG2_c.376C>T(Q126X)	0.39	CHST3_c.*3477G>A	0.457
ADH1C_c.312T>C(C104C)	0.39	CHST3_c.*3785G>A	0.457
CROT_c.1420G>C(V474L)	0.39	CHST3_c.*4107T>C	0.457
CYP51A1_c.1352-528A>T	0.39	CYP4B1_c.993G>A(M331I)	0.46
CYP3A43_19394C>T(L114L)	0.39	ABCB1_c.2677G>T>A(A893SorT)	0.463
TBXAS1_c.1505G>A(R502Q)	0.39	GSTO1_c.419C>A(A140D)	0.464
CYP17A1_138C>T(H46H)	0.396	ABCB1_c.1725+38A>G	0.465
CYP17A1_-34T>C	0.396	ABCB1_c.1554+24C>T	0.465
AKAP9_c.11546+58T>A	0.396	CYP17A1_195G>T(S65S)	0.467
ABCB4_c.*509A>G	0.397	ABCC1_c.*1293G>A	0.476
SLC22A14_T>C(rs171248)	0.398	PPARD_c.-101-4298A>G	0.482
SLC22A14_A>C(rs183574)	0.398	MAT1A_c.769-195A>T	0.483
SLC22A14_2596A>G	0.398	CYP4F2_11602C>T(H343H)	0.484
ABCC6_c.2835C>T(P945P)	0.399	ABCB11_c.-7449T>C	0.484
ABCB1_c.1236C>T(G412G)	0.399	CYP26A1_c.*2663T>G	0.485
ABCB1_c.IVS9-44A>G	0.399	SLC10A2_c.*755C>T	0.486
SLC22A4_c.917C>T(T306I)	0.4	SLC10A2_c.*373C>G	0.486
ADH7_c.690G>A(R230R)	0.403	SLC22A12_c.426T>C(H142H)	0.488
ADH7_-5360G>A(rs1442477)	0.403	ABCB11_c.*420A>G	0.488
FAAH_c.385C>A(P129T)	0.406	ABCB11_c.*368G>A	0.488
SLC6A6_c.-10918C>T	0.413	ABCB11_c.3084A>G(A1028A)	0.488
UGT2B4_c.*448A>G	0.416	CYP24A1_9028G>A(T248T)	0.489
CYP2S1_1324C>G(P74P)	0.418	ABCG1_c.1809-252G>A	0.489
RALBP1_c.*314T>C	0.421	ARSA_c.1172C>G(T391S)	0.491
SULT2B1_c.637C>T(L213L)	0.422	UGT1A9*1_b.c.-118insT	0.493
SLC16A1_C>A(rs12727968)	0.422	ABCC4_c.*311G>A	0.499
CYP24A1_18858C>T	0.422	ABCC4_c.*38T>G	0.499
UGT2B7_c.735A>G(T245T)	0.422	SULT1E1_c.-64G>A	0.499
CYP7B1_201995C>T	0.422	SLC22A1_c.480C>G(F160L)	0.499
SLC22A1_c.1222G>A(V408M)	0.429	GSTM3_c.670G>A(V224I)	0.501
XDH_c.837C>T(V279V)	0.432	SLC7A7_c.1527G>A(K509K)	0.503
CHST10_c.*381G>A	0.432	SLC05A1_c.*295A>C	0.503
CHST10_c.696G>C(T232T)	0.432	ABCC4_c.951A>G(R317R)	0.504
ABCB11_c.270T>C(F90F)	0.432	AHR_c.1661G>A(R554K)	0.504
ABCB11_c.99-18T>C	0.432	CYP20A1_50767C>T(L346F)	0.505
ABCB11_c.-610C>A	0.432	MAOB_c.1348-36A>G	0.508
ABCB11_c.-899delCT	0.432	COMT_c.36C>T(H12H)	0.512
CYP2B6*4_18053A>G(K262R)	0.433	CHST10_c.*625G>A	0.514
AOX1_83558A>G(H1297R)	0.434	CHST1_c.-226-5041C>T	0.516
ABCC4_c.912G>T(K304N)	0.436	XDH_c.3030C>T(F1010F)	0.516
ABCB11_c.-12519C>T	0.436	MAOB_c.1461C>T(P487P)	0.516
CYP4B1_c.517C>T(R173W)	0.442	CYP19A1_32124C>T(3'UTR)	0.517
CYP1A2*1D_-2467delT(Promoter)	0.444	FMO4_c.843C>T(F281F)	0.517

遺伝子	p-value	遺伝子	p-value
EPHX1_c.1248G>A(K416K)	0.517	SLC7A8_c.508+1988T>C	0.554
ALDH2_c.-360G>A	0.52	ABCC4_c.969G>A(S323S)	0.557
SLC01B3_c.1833A>G(G611G)	0.522	SLC22A2_c.808G>T(A270S)	0.557
NQO1_c.559C>T(P187S)	0.529	CHST1_10046G>C	0.558
CYP4F8_13170C>A(P447P)	0.53	CBR1_c.397+210C>G	0.562
CYP4F8_13793T>C	0.53	CBR1_c.*559C>G	0.562
SLC28A1_c.1017C>T(H339H)	0.533	PON3_c.-498C>G	0.562
SULT1A1*2_c.638G>A(R213H)	0.533	CHST7_c.*58G>A(3'UTR)	0.563
MAOA_c.1559A>G(K520R)	0.535	PPARD_c.-101-9273G>A	0.566
CHST3_c.*1314G>A	0.539	PPARD_c.-101-7011G>A	0.566
CYP7B1_1678T>C	0.542	ABCC2_c.1249G>A(V417I)	0.567
ATP7B_c.1216T>G(S406A)	0.544	CYP2D6_4180G>C(S486T)	0.57
CHST10_c.*39T>C	0.545	CYP2A6*1D_-1013A>G	0.572
ABCC8_c.4714G>A(V1572I)	0.546	CROT_c.*1727A>G	0.58
SLC7A8_c.151+2181T>C	0.546	SLC22A5_c.807A>G(L269L)	0.585
SLC7A8_c.120C>T(I40I)	0.546	CHST10_c.-91C>A	0.587
CHST5_c.-386G>C	0.546	ABCB4_c.711A>T(I237I)	0.589
CYP4F12_22966T>C(P460P)	0.546	COMT_c.447G>A(P149P)	0.591
CYP4F12_23491T>C(L504L)	0.546	SLC22A1_c.156T>C(S52S)	0.591
SULT2B1_c.718G>A(V240I)	0.546	SLC28A3_c.-47A>C	0.591
SULT1C4_c.-1075G>A	0.546	NNMT_c.363-160C>T	0.594
SULT1C4_c.-62G>A	0.546	CHST11_c.*1379A>G	0.594
AOX1_G>A(rs16834027)	0.546	ATP7B_c.3419T>C(V1140A)	0.594
AOX1_T>G(rs16834034)	0.546	ATP7B_c.2855G>A(R952K)	0.594
UGT1A1*27_c.686C>A(P229Q)	0.546	ATP7B_c.2495A>G(K832R)	0.594
SULT1B1_c.612A>C(E204D)	0.546	CYP19A1*2_115T>C(W39R)	0.594
ADH6_c.885G>A(V295V)	0.546	CHST10_c.735C>T(G245G)	0.594
TPMT*3C_c.719A>G(Y240C)	0.546	ABCB4_c.-1484T>C	0.594
PPARD_c.-101-15916T>C	0.546	CHST11_c.*4046A>G	0.596
PPARD_c.-101-13307A>G	0.546	SLC22A14_4739C>T	0.597
PPARD_c.-101-3238C>A	0.546	ABCB1_c.*193A>G(3'UTR)	0.597
PPARD_c.*1722G>A	0.546	CYP2B6*6_15631G>T(Q172H)	0.6
ABCB4_c.-1921T>C	0.546	CYP2B6_21563C>T	0.6
CYP3A4*18_20070T>C(L293P)	0.546	CHST5_c.-1002T>C	0.601
NAT1*11_c.-344C>T	0.546	SULT1B1_c.375+4320T>C	0.601
NAT1*11_c.-40A>T	0.546	CYP2A6*9_-48T>G(Promoter)	0.606
NAT1_c.445G>A(V149I)	0.546	CROT_c.*1327G>A	0.606
NAT1*11_c.459G>A(T153T)	0.546	SLC22A1_c.1022C>T(P341L)	0.607
NAT1*11_c.640T>G(S214A)	0.546	CYP1A2*1K_-739T>G(Promoter)	0.609
SERPINA7_c.631G>A(A211T)	0.546	CYP2A13_6432C>T	0.609
UGT2B7*3_c.211G>T(A71S)	0.549	CDA_c.154+3136T>C	0.609
SLC05A1_c.97C>T(L33F)	0.55	SULT1C2_c.763T>G(S255A)	0.609
ABCB1_c.3435C>T(I1145I)	0.552	SULT1C2_c.*300A>G	0.609
MAOA_c.1410C>T(D470D)	0.552	SLC7A7_c.660T>C(G220G)	0.617
SLC02B1_c.1434-138G>T	0.553	CHST5_c.-5A>G	0.618
CYP19A1_30554C>T(P408P)	0.553	GSTM3_c.-160G>T	0.621
SLC28A1_c.1149A>G(K383K)	0.553	ABCB11_c.-5543C>T	0.623
SLC28A1_c.1368G>A(Q456Q)	0.553	ABCB11_c.-7056C>T	0.623
SLC28A1_c.*141G>T	0.553	ABCB11_c.-10013G>A	0.623

遺伝子	p-value	遺伝子	p-value
PON3_c.63C>T(F21F)	0.626	COMT_c.322G>A(V108M)	0.691
PON3_c.-665T>C	0.626	ABCB4_c.175C>T(L59L)	0.695
UGT8_c.677C>T(P226L)	0.628	UGT2B15_c.*185A>T(3'UTR)	0.697
GSTP1*B_c.313A>G(I105V)	0.629	FMO3_c.441C>T(S147S)	0.698
ABCC4_c.2269G>A(E757K)	0.629	SLC7A8_c.152-5045T>C	0.699
TPSG1_c.74-209A>G	0.629	ABCC4_c.*1282T>C	0.7
ABCC1_c.2168G>A(R723Q)	0.636	UGT2B7*2_c.-327G>A(Promoter)	0.701
UGT1A1*6_c.211G>A(G71R)	0.636	UGT2B7*2_c.-161C>T(Promoter)	0.701
NAT2*6_c.590G>A(R197Q)	0.638	UGT2B7*2_c.802C>T(H268Y)	0.701
SLC22A4_c.1182C>G(T394T)	0.639	CHST11_c.*1416T>C	0.703
CYP2E1*5_-1293G>C(Promoter)	0.64	CHST11_c.*4024C>T	0.703
ATP7B_c.*1172G>A	0.64	SLC15A1_c.350G>A(S117N)	0.703
GSTZ1_c.94G>A(E32K)	0.641	CYP2D6_1661G>C(V136V)	0.704
SULT1B1_c.376-2858G>A	0.643	CYP2C19*17_-806C>T	0.708
ABCG2_c.421C>A(Q141K)	0.643	CYP4F11_20043G>A(D446N)	0.708
CHST7_c.*31+10802G>A	0.647	CYP4F11_4927T>C(I106I)	0.708
SULT4A1_c.*1208G>T	0.648	DPYD*9_c.85T>C(C29R)	0.708
CYP1A1*2C_2454A>G(I462V)	0.649	FMO1_c.747C>T(T249T)	0.708
SLCO3A1_c.1753+4399C>G	0.65	FMO1_c.1188A>G(V396V)	0.708
CYP2A6_51G>A(V17V)	0.65	SLC22A13_c.159T>C(A53A)	0.708
CYP4B1_c.881_882delAT(D294X)	0.651	HMGCR_c.*8G>A	0.708
CYP4B1_c.1018C>T(R340C)	0.651	PPARD_c.-102+2374C>T	0.708
SLCO4A1_c.797-286T>C	0.652	PPARD_c.-102+9814T>C	0.708
UGT1A7*12_c.-57T>G(5'UTR)	0.652	PPARD_c.-102+15103T>C	0.708
UGT2B11_c.1429C>A(R477R)	0.652	PPARD_c.-102+24108C>T	0.708
UGT2B11_c.T>A(G364G)	0.652	PPARD_c.-101-25241A>G	0.708
SLC10A2_c.-457A>G	0.654	CYP3A4*16_15603C>G(T185S)	0.708
FMO3_c.923A>G(E308G)	0.655	NAT2_c.481C>T(L161L)	0.708
FMO6_1415A>G	0.655	NAT2_c.803A>G(K268R)	0.708
FMO6_1510G>A	0.655	ATP7A_c.4201G>C(V1401L)	0.708
UGT2B15_c.*168C>T(3'UTR)	0.655	EPHX1_c.852C>T(P284P)	0.71
PPARD_c.-101-842A>G	0.655	PGAP3_c.*560C>T	0.718
PPARD_c.-101-640A>G	0.655	CDA*2_c.79A>C(K27Q)	0.718
ADH4_c.-711A>G	0.656	SLC28A3_c.338A>G(Y113C)	0.721
PPARD_c.-101-8958T>C	0.656	FMO6_906-3127T>C	0.723
PPARD_c.-101-6240C>G	0.656	UGT2A1_c.1171G>A(V391I)	0.727
UGT2A1_c.715+13414A>G	0.657	ABCB1_c.2481+24G>A	0.727
ABCB4_c.504C>T(N168N)	0.657	ABCB1_c.287-25G>T	0.727
CYP11B1_128G>A(R43Q)	0.661	CYP2D6_-1770G>A	0.727
NNMT_c.363-260T>C	0.665	CHST1_9127C>T	0.729
POR_c.*306G>A	0.669	CYP2D6_-1584C>G	0.73
CHST7_c.*623A>G(3'UTR)	0.673	SPG7_c.1507A>G(T503A)	0.731
FMO2_c.107A>G(D36G)	0.677	ABCB11_c.1331C>T(A444V)	0.733
CYP2E1*7C_-352A>G(Promoter)	0.678	SULT1E1_c.-9-899G>A	0.734
CYP3A4_20230G>A	0.678	PON1_c.163T>A(L55M)	0.735
CYP19A1*4_27142C>T(R264C)	0.681	SLC22A8_c.723T>A(T241T)	0.739
SLC7A7_c.-86C>T	0.682	PON3_c.-746C>T	0.74
SLC7A8_c.152-1008T>C	0.684	TPMT_c.474C>T(I158I)	0.743
CYP8B1_c.-5389A>C	0.69	NR1I2_c.938-17C>T	0.744

遺伝子	p-value	遺伝子	p-value
UGT2B15_c.1568A>C(K523T)	0.748	ABP1_c.1635A>G(P545P)	0.821
UGT2B15_c.1568A>C(K523T)	0.748	ABP1_c.1890G>A(S630S)	0.821
SLC25A27_c.299-346T>C	0.75	ABP1_c.1933C>G(H645D)	0.821
SLC01B1*1B_c.388A>G(N130D)	0.751	CYP4F2*2_34T>G(W12G)	0.829
SLC01B1_c.571T>C(L191L)	0.751	SLC5A6_c.1442T>C(F481S)	0.83
PPARD_c.489T>C(N163N)	0.751	SLC22A2_c.1506A>G(V502V)	0.83
CYP7A1_-267A>C	0.753	NR1I3_C>T(rs2501870)	0.832
SLC22A3_c.1233G>A(A411A)	0.754	SLC28A3_c.267G>A(T89T)	0.832
NAT2*7_c.857G>A(G286E)	0.754	CYP7A1_-1744G>A	0.833
FMO3_c.769G>A(V257M)	0.758	CHST11_c.*810A>G	0.835
CYP19A1_5998A>G(V80V)	0.76	ATP7B_c.1366G>C(V456L)	0.836
CYP19A1_-12829G>C(5'UTR)	0.76	SLC15A1_c.1256G>C(G419A)	0.837
CYP2J2*7_-76G>T(Promoter)	0.761	ABCC1_c.2007C>T(P669P)	0.837
AOX1_C>T(rs11678615)	0.761	ALDH1A1_c.-471del17	0.837
SLC22A5_c.*842C>T	0.761	ORM2_c.421G>C(G141R)	0.837
SLC22A8_c.913A>T(I305F)	0.763	CBR3_c.730G>A(V244M)	0.839
SLC28A2_c.225C>A(S75R)	0.763	XDH_c.2211C>T(I737I)	0.84
CYP2A6*8_6600G>T(R485L)	0.763	CBR3_c.398-12G>A	0.843
PTGIS_c.723A>G(L241L)	0.763	SLC10A2_c.*1496A>G	0.844
PTGIS_c.591C>T(R197R)	0.763	CDA_c.154+1015A>G	0.844
CYP20A1_12905T>C(L97S)	0.763	SLC13A1_c.521A>G(N174S)	0.844
UGT1A3*5_c.17A>G(Q6R)	0.763	CYP1A1_134G>A(G45D)	0.847
CYP7A1_5593G>A(D347N)	0.763	SLC03A1_c.1513-1102G>A	0.849
UGT1A6_c.541A>G(T181A)	0.766	SLC7A8_c.-1065T>G	0.85
SLC7A5_c.*438C>G	0.772	HNMT_c.*60A>G	0.85
UGT1A1*28_c.TATA-box(Promoter)	0.772	HNMT_c.*994C>T	0.85
CHST8_c.-589C>T	0.775	HNMT_c.*1529G>A	0.85
SLC6A6_c.*4206A>G	0.775	SLC01A2_c.61-5605T>A	0.851
CHST3_c.*2422C>T	0.777	UGT1A6_c.19T>G(S7A)	0.852
FMO3_c.855C>T(N285N)	0.781	UGT1A6_c.315A>G(L105L)	0.852
SLC22A14_5030T>G	0.781	CYP3A5*3_6986A>G(SpliceDefect)	0.852
CHST7_c.*675+785T>G(3'UTR)	0.781	ABCG1_c.974-898C>G	0.855
CYP4F2_165A>G(P55P)	0.785	GSTM5_c.-524C>T	0.859
ABCB4_c.-1014A>G	0.786	ABCC5_c.*1366A>C	0.862
ABCB4_c.-1584C>T	0.786	AHR_c.-742C>T	0.864
FMO2_c.585A>G(S195S)	0.788	CYP19A1_32266G>T(3'UTR)	0.865
CHST11_c.*1989C>T	0.79	CBR1_c.397+538C>T	0.866
CYP2F1_96G>A(P32P)	0.792	CYP4B1_c.1123C>T(R375C)	0.867
FMO2_c.*1195C>T	0.795	NR1I2_c.795-93G>A	0.867
FMO2_c.*1385C>T	0.795	GSTA4_c.-1366A>G	0.868
CBR1_c.398-48C>T	0.8	SLC16A1_c.*1414T>C	0.869
PPARD_c.-101-1463A>C	0.8	SPG7_c.2063G>A(R688Q)	0.87
CYP4F2*3_18000G>A(V433M)	0.801	ARSA_c.-1953C>T	0.87
FMO4_c.1251-1720A>G	0.801	CYP2A6_22C>T(L8L)	0.873
SULT1B1_c.376-6044C>T	0.805	FMO2_c.*60A>G	0.877
CYP2E1*5_-1053C>T(Promoter)	0.808	CYP1B1*3_4326C>G(L432V)	0.879
SLC05A1_c.-263G>T	0.809	FMO6_1232G>A	0.885
SULT1C4_c.15C>G(D5E)	0.811	SLC22A13_c.*8336G>A	0.886
CYP1A2_5347T>C(N516N)	0.817	ADH6_c.-1992G>T	0.886

遺伝子	p-value	遺伝子	p-value
PTGIS_c.1117C>A(R373R)	0.888	CA5P_C>T(rs11150564)	0.95
CYP8B1_c.-6468A>C	0.889	UGT2B7*2_c.801T>A(P267P)	0.951
SLC28A2_c.488T>G(L163W)	0.891	SLC05A1_c.1623-10494C>A	0.952
VKORC1_c.*134G>A(3'UTR)	0.891	CYP2D6_100C>T(P34S)	0.953
VKORC1_c.283+837C>T	0.891	GSTA1_c.-5184G>T	0.953
VKORC1_c.283+124G>C	0.891	CYP2D6_-2178G>A	0.953
VKORC1_c.174-136C>T	0.891	CYP2D6_2850C>T(R296C)	0.956
VKORC1_c.-1639G>A(Promoter)	0.891	SPN_G>A(rs4788172)	0.96
UGT1A3_c.31T>C(W11R)	0.891	NAT2_c.282C>T(Y94Y)	0.96
ADH6_c.-930T>C	0.891	MAT1A_c.*67C>T	0.963
ADH6_c.-2874T>C	0.891	MAT1A_c.769-218A>G	0.963
ABCB1_c.-129T>C	0.891	CYP2C18_c.694A>G(K232E)	0.963
ADH1A_c.568-811C>T	0.893	ABCC2_c.2366C>T(S789F)	0.963
UGT1A1*60_c.-3279T>G(Promoter)	0.899	SLC22A8_c.842T>C(V281A)	0.963
UGT1A1*112_c.-1353A>C	0.899	NQO1_c.415C>T(R139W)	0.963
SLC16A1_c.1470A>T(E490D)	0.901	EPHX1_c.128G>C(R43T)	0.963
APOA2_c.185+197G>C	0.901	XDH_c.3717G>A(E1239E)	0.963
NR1I3_G>A(rs11584174)	0.902	UGT2A1_c.*99G>A	0.963
NR1I3_G>A(rs55802895)	0.902	PON2_c.273A>G(K91K)	0.963
CYP3A43_14956C>T	0.902	CYP11B2_4451T>C(I339T)	0.963
ALB_c.-400G>A	0.907	UGT1A5_c.424C>A(H142N)	0.971
ADH1B_c.143G>A(R48H)	0.907	UGT1A3_c.81G>A(E27E)	0.971
TYMS_c.381A>G(E127E)	0.909	EPHX1_c.337T>C(Y113H)	0.976
CBR3_c.11G>A(C4Y)	0.909	GSTA3_c.272+161A>G	0.98
CYP7A1_-5096T>C	0.909	CYP2E1*7_-333T>A(Promoter)	0.985
CES2_c.269-965A>G	0.911	CHST11_c.*2506G>A	0.986
UGT1A3_c.477A>G(A159A)	0.912	UGT1A1*93_c.-3156G>A(Promoter)	0.989
SULT4A1_c.*634T>C	0.914	UGT1A1_c.-2950A>G	0.989
AOX1_T>C(rs6729738)	0.917	UGT1A1*80_c.-364C>T	0.989
RXRA_c.1242-27G>A	0.919	ABCC5_c.3624C>T(L1208L)	0.995
SLC15A1_c.1347T>C(A449A)	0.921	CYP2E1_10463T>C(F421F)	1
CYP4F8_60G>T(L20L)	0.922	SLC7A7_c.498C>T(I166I)	1
PRSS53_c.89A>G(Q30R)	0.924	SLC7A7_c.159A>G(S53S)	1
CYP2F1*4_112T>C(S38P)	0.925		
DPYD_c.1896T>C(F632F)	0.925		
NR1I3_C>A(rs11265572)	0.925		
MAT1A_c.768+572G>A	0.926		
SLC22A11_c.1058+487G>A	0.927		
SLC19A1_c.80A>G(H27R)	0.928		
GSTM4_c.534C>T(F178F)	0.933		
GSTM2_c.36+7G>C	0.933		
CA5P_G>T(rs1364182)	0.936		
SULT1E1_c.-9-469A>G	0.936		
SULT1E1_c.-10+311G>C	0.936		
CYP7A1_9082G>A	0.938		
EPHX1_c.357G>A(K119K)	0.941		
AKAP9_c.11687-648C>G	0.941		
SLC15A1_c.1375C>T(R459C)	0.947		
CHST5_c.-1138C>T	0.947		



#### 第4項 多重共線性の排除

次に、Jonckheere-Terpstra trend 検定で  $P < 0.05$  となった説明変数を対象に、Spearman の順位相関係数を用いて多重共線性を確認した。

Spearman の順位相関係数の絶対値が 0.9 以上となった組み合わせを示す (表 1-8)。

Spearman の順位相関行列を図 1-9 に示す。

表 1-8 Spearman の順位相関係数

Spearman の順位相関係数 > 0.9 の組み合わせ		係数
<i>CHST13_c.180+1473T&gt;G</i>	<i>CHST13_c.180+2676G&gt;C</i>	1.0000
<i>SLC10A2_c.511G&gt;T(A171S)</i>	<i>SLC10A2_c.*315G&gt;T</i>	0.9915
<i>CYP2C18_c.204T&gt;A(Y68X)</i>	<i>CYP2C19*3_17948G&gt;A</i> <i>(W212X)</i>	1.0000
<i>GSTA4_c.*487G&gt;A</i>	<i>GSTA4_c.*137A&gt;C</i>	1.0000

右側の説明変数をこれ以降の解析から除外した。

SLC13A1_c.* 1214C>T	CHST3_c.*47 70G>A	CHST13_c.18 0H1473T>G	CHST13_c.18 042676G>C	ABCB4_c.686 C>T(A232A)	SLC10A2_c.5 11G>T(A171 S)	FOR_c.*372G >A	SLC10A2_c.* 315G>T	CYP2C19.*3 17948G>A(W 212X)	ABCC2_c.397 2C>T(T1324)	CHST13_c.98 -5237A>C	GST4A_c.*46 70>A	GST4A_c.*13 7A>C	PPARG_c.*14 11G>C
SLC13A1_c.*1214C>T	-0.2090	0.1812	0.1812	-0.0616	0.0406	-0.0419	0.0329	0.2392	-0.2784	0.0726	0.1928	0.1928	0.1323
CHST3_c.*4770G>A	1.0000	0.1087	0.1087	0.0091	-0.0501	0.0500	-0.0420	0.0918	0.3392	0.1259	-0.0814	-0.0814	-0.1092
CHST13_c.180H1473T>G	0.1087	1.0000	1.0000	-0.0335	0.0686	0.0168	0.0577	0.2056	-0.0977	0.8798	0.2890	0.2890	0.2668
CHST13_c.180H2676G>C	0.1087	1.0000	1.0000	-0.0335	0.0686	0.0168	0.0577	0.2056	-0.0977	0.8798	0.2890	0.2890	0.2668
ABCB4_c.686C>T(A232A)	-0.0616	0.0091	-0.0335	1.0000	-0.1378	-0.0602	-0.1629	-0.1071	0.1885	-0.1097	-0.1899	-0.1899	-0.0433
GST4A_c.*429G>A	-0.0289	-0.1901	-0.0021	-0.1379	1.0000	0.0293	0.0379	0.1616	-0.0282	0.0818	0.6858	0.6858	0.2248
SLC10A2_c.511G>T(A171S)	0.0406	-0.0501	0.0686	-0.1638	1.0000	-0.1282	0.9915	0.1029	0.1642	0.0446	-0.0131	-0.0131	0.2672
FOR_c.*372G>A	-0.0419	0.0500	0.0168	-0.0602	-0.1282	1.0000	-0.1267	-0.0944	0.0834	-0.0799	0.1842	0.1842	-0.1909
SLC10A2_c.*815G>T	0.0329	-0.0420	0.0577	-0.1629	0.9915	-0.1267	1.0000	0.0682	0.1516	0.0298	-0.0464	-0.0464	0.2686
CYP2C18_c.204T>A(Y68X)	0.2392	0.0918	0.2056	-0.1071	0.1616	0.1029	0.0682	1.0000	-0.0088	0.1128	0.3201	0.3201	0.1185
CYP2C19.*3.17948G>A(W21)	0.2392	0.0918	0.2056	-0.1071	0.1616	0.1029	0.0682	1.0000	-0.0088	0.1128	0.3201	0.3201	0.1185
ABCC2_c.3972C>T(T1324)	-0.2784	0.3392	-0.0977	0.1885	-0.0282	0.1642	0.1516	-0.0088	1.0000	-0.1197	-0.1054	-0.1054	-0.0353
CHST13_c.98-5237A>C	0.0726	0.1259	0.8798	-0.1097	0.0818	0.0446	0.0298	0.1128	-0.1197	1.0000	0.2505	0.2505	0.1544
GST4A_c.*487G>A	0.1928	-0.0814	0.2890	-0.1899	0.6858	-0.0131	-0.0464	0.3201	-0.1054	0.2505	1.0000	1.0000	0.2329
GST4A_c.*137A>C	0.1928	-0.0814	0.2890	-0.1899	0.6858	-0.0131	-0.0464	0.3201	-0.1054	0.2505	1.0000	1.0000	0.2329
PPARG_c.*1411G>C	0.1323	-0.1092	0.2668	-0.0483	0.2248	0.2672	0.2686	0.1185	-0.0353	0.1544	0.2329	0.2329	1.0000

図 1-9 Spearman の順位相関行列

## 第 5 項 ステップワイズ選択法

Spearman の順位相関係数を確認し、残った 12 遺伝子を対象にステップワイズ選択法（変数増加法）を行った。

なお、今回得られている遺伝子は、背景に差のある患者集団から得られている。そのため、患者背景を補正する目的で、背景に有意差のあった年齢および血清クレアチニン値を説明変数に加えて、解析を行うこととした。

ステップワイズ選択法の結果、下記の 6 遺伝子および血清クレアチニン、年齢が選択された（表 1-9）。

表 1-9 ステップワイズで選択された遺伝子

説明変数	rs 番号	P 値
<i>SLC13A1</i>	rs6962039	0.03564
<i>CHST3</i>	rs4148953	0.0092
<i>CHST13</i>	rs6783962	0.0076
<i>ABCB4</i>	rs8187791	0.00629
<i>GSTA4</i>	rs7496	0.00778
<i>SLC10A2</i>	rs188096	0.02578
血清クレアチニン値	-	0.00204
年齢	-	0.00606

## 第 6 項 ROC 解析・候補遺伝子の選択

次に、得られた 6 遺伝子および年齢・クレアチニン値を用いて ROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を行い、肝機能障害予測モデルの作成を行った。感度 100%、特異度 93.0%、AUC (area under the curve) 0.99 という結果であった。

血清クレアチニン値、年齢、選択された 6 遺伝子を用いた ROC 解析の結果を図 1-10 に示す。

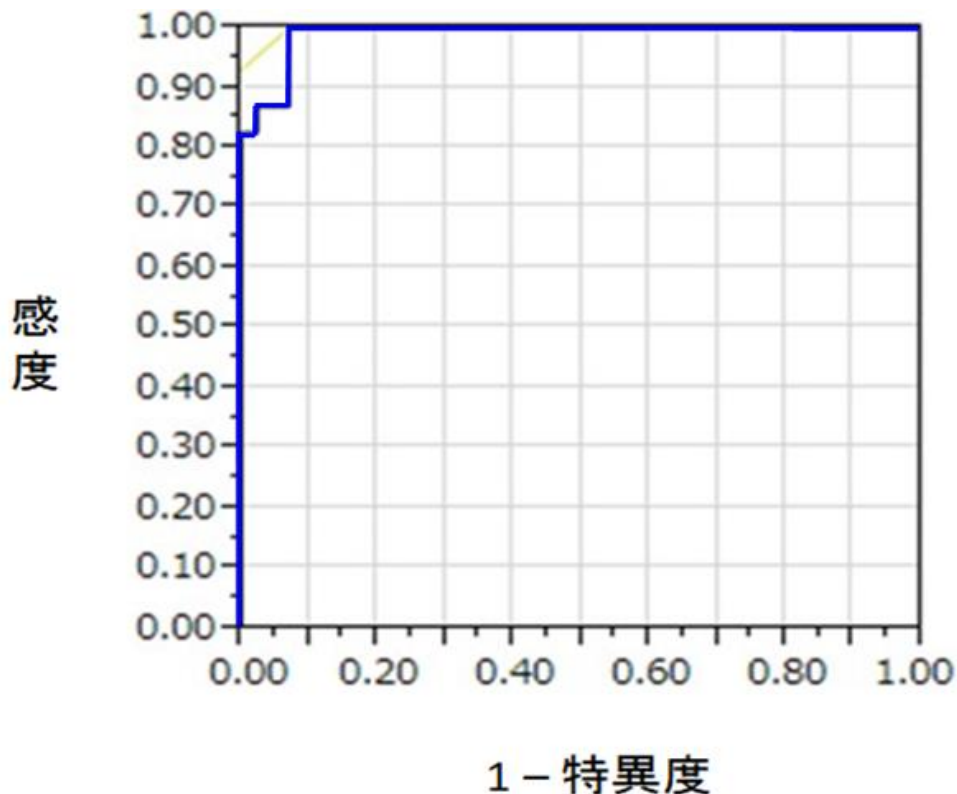


図 1-10 6 遺伝子と年齢・血清クレアチニンの ROC 解析

本解析は、 $AUC > 0.900$  であり、この解析から作成した予測モデルでは、オーバーフィッティング (過学習) が起こると判断した。オーバーフィッティングとは、本解析の限られた集団で適合できるモデルを作成することが可能であるが、新たなデータを予測する事が不可能

なモデルが出来てしまうことを指す。そのため、変数を減少させて予測モデルを作成する必要があると判断した。

まず、一方の群でアレル頻度 0.000 の説明変数を除外することとし、*ABCB4* (*rs8187791*) を解析から除外した。これは、肝機能障害なし群患者は、全員 C/C の遺伝子型であり、変異アレルが存在していなかった。この説明変数は、推定精度が悪くなる原因となるため、解析から除外した。

2 群間における 6 つの遺伝子多型の変異アレル頻度を下記の表 1-10 に示す。

表 1-10 ステップワイズで選択された遺伝子の変異アレル頻度

	<i>SLC13A1</i>	<i>CHST3</i>	<i>CHST13</i>	<i>ABCB4</i>	<i>GSTA4</i>	<i>SLC10A2</i>
肝機能障害 あり群	0.1739	0.2391	0.1522	0.0870	0.0217	0.1957
肝機能障害 なし群	0.4535	0.0698	0.3837	0.0000	0.1628	0.4070

次に、*SLC13A1*、*CHST3*、*CHST13*、*GSTA4*、*SLC10A2* の 5 遺伝子から機能的な検討を行った。

*SLC13A1* (Solute carrier family 13 member 1) は、腎臓で硫酸塩の恒常性に関与する頂端膜で Na-硫酸塩共輸送体のタンパク質をコードする遺伝子として知られている。NAS1、NaSi-1 とも呼ばれる。NaS1 硫酸塩輸送体は、薬物の解毒のためのスルホン化反応が効果的に行われるために、血中硫酸塩レベルを十分に高く保つ機能を担っている。NaS1 機能の低下がアセトアミノフェンによる肝機能障害と関連しているとの報告もあり、遺伝的な機能低下は肝機能障害と関連がある可能性も指摘されている<sup>27</sup>。

*SLC10A2* (Solute carrier family 10 member 2) は、Na-胆汁酸共輸送体をコードする遺伝子である。ASBT (Apical sodium-dependent bile acid transporter) とも呼ばれる。このトランスポーターは、回腸末端部における胆汁酸取り込みの主な機能を担っている。胆汁酸は、コレステロール代謝の生成物であるので、このトランスポーターはコレステロール恒常性に重要である。このトランスポーターの遺伝子多型が原発性胆汁酸吸収不全や家族性高トリグリセリド血症の発症と関連がある可能性も指摘されている<sup>28</sup>。

*GSTA4* (Glutathione S-transferase alpha 4) グルタチオン *S*-transferase の細胞質および膜結合型の形状は、2つの異なったスーパーファミリーによってコード化され、これらの酵素は毒物や薬物解毒に関与し生体防御に関与するタンパク質をコードする遺伝子である。 $\alpha$ クラス遺伝子は6番染色体の上に集団で位置しており、脂質過酸化物の解毒機能のあるグルタチオンペルオキシダーゼ活性と関連がある。酸化反応によって生じる物質は、パーキンソン病、アルツハイマー病、白内障の病態形成とアテローム硬化を含む多くの変性疾患との関連があると指摘されている<sup>29</sup>。

*CHST3* 遺伝子および *CHST13* 遺伝子は、硫酸基の供与体である活性硫酸 (PAPS, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate) からコンドロイチン硫酸 (CS) の *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) のそれぞれ6位および4位に、硫酸基を転移する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子である。それらの酵素は、それぞれ C6ST-1 および C4ST-3 と呼ばれている。CS は、グリコサミノグリカン (GAGs) の1つであり、細胞表面や細胞外マトリックスのプロテオグリカン側鎖として、普遍的に存在している。CS 鎖の硫酸化状態は、細胞接着、細胞増殖、形態形成、脈管形成と軸索突起形成を含む広範囲にわたるプロテオグリカンの生物学的機能にとって重要である<sup>30</sup>。

これら 5 つの候補遺伝子の中から、機能的に関連のある *CHST3* および *CHST13* を選択し、予測モデルを構築することとした。

選択した遺伝子多型の情報を表 1-11 に示す。

表 1-11 予測モデルに選択した遺伝子多型

遺伝子	マーカー	Rs 番号	Chr	Chr position
<i>CHST3</i>	<i>CHST3_c.*4770G&gt;A</i>	rs4148953	10	72013241
<i>CHST13</i>	<i>CHST13_c.180+1473T&gt;G</i>	rs6783962	3	126256669

予測モデルに採用した遺伝子多型を絞り込む過程を図 1-11 にまとめる。

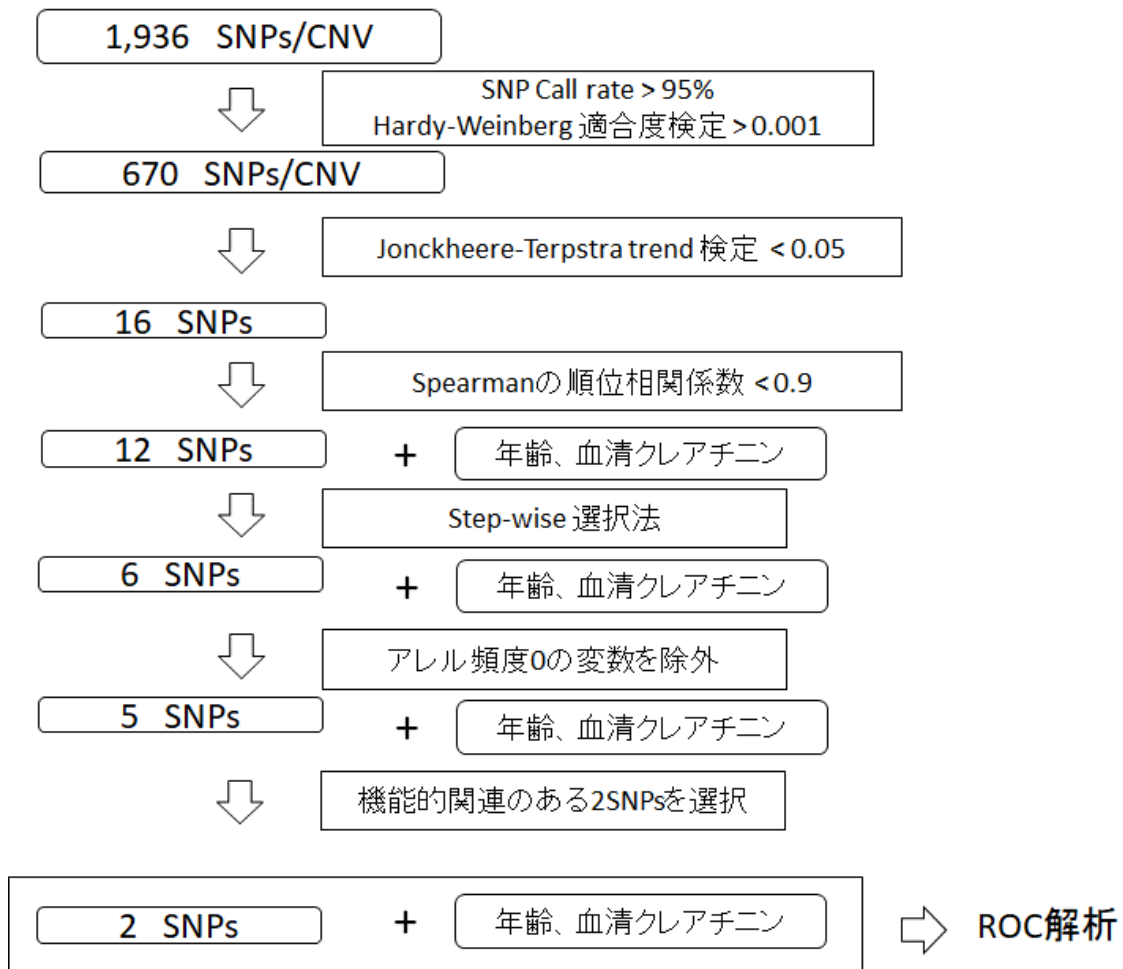


図 1-11 ボセンタン関連肝機能障害リスク遺伝子の絞り込み過程

## 第7項 ボセンタンによる肝機能障害の予測モデル構築

次に、*CHST3* (*rs4148953*), *CHST13* (*rs6783962*), 年齢、血清クレアチニン値を用いて予測モデルの構築を行った。

まず、これら4つの説明変数を用いてROC解析を実施した。

その結果、感度 82.61%、特異度 86.05%、AUC 0.89、カットオフ値 0.4942 となり、良好な予測能を有している組み合わせであった。

ROC解析の結果を示す(図1-12)。

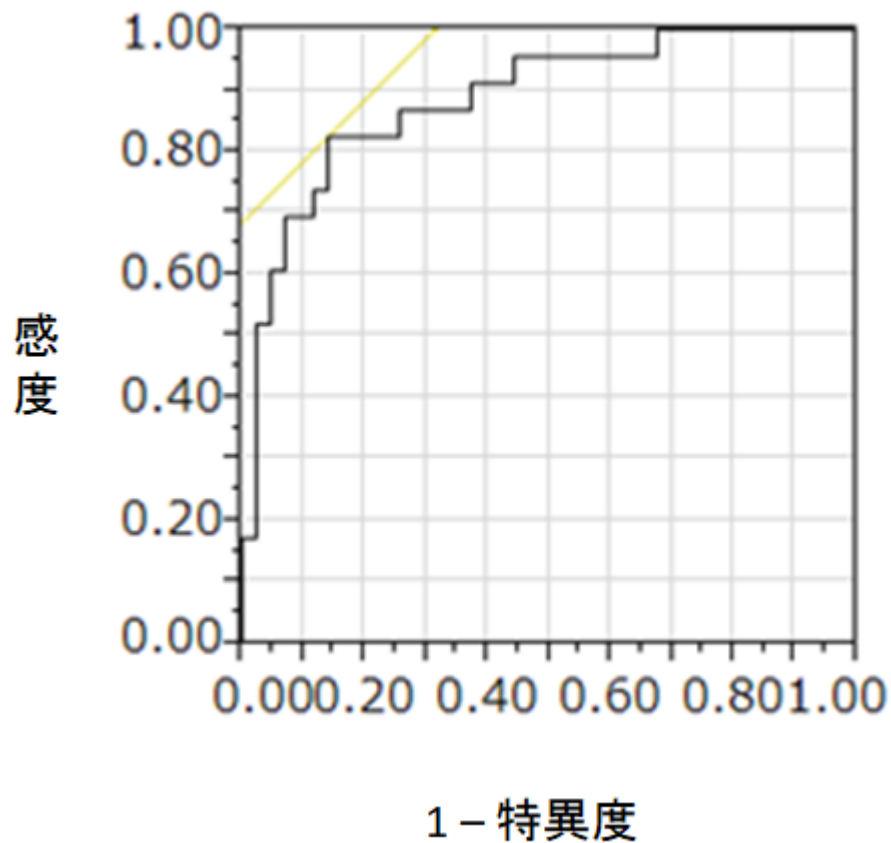


図 1-12 *CHST3* と *CHST13* および年齢・血清クレアチニンによるROC解析



次に、ROC 解析から算出されたパラメータ推定値を用いて予測モデル式を作成した（表 1-12）。

表 1-12 予測モデルのパラメータ推定値

項	スコア	モデルの係数	P 値
切片	3.613	3.613	-
血清クレアチニン (mg/dL)	3.5	3.5302	0.0279
年齢 (年)	-0.1	-0.1020	0.0045
<i>CHST3</i>	-1.7	-1.7244	0.0130
<i>CHST13</i>	2.5	2.4856	0.0008

予測モデル式

$$P = 1 / \{1 + \text{EXP} [3.613 + 3.5 \times \text{血清クレアチニン} - 0.1 \times \text{年齢} - 1.7 \times \text{CHST3} + 2.5 \times \text{CHST13}]\}$$

本予測モデル式は、*CHST3* (*rs4148953*) および *CHST13* (*rs6783962*) の遺伝子多型を評価し、w/w = 0、w/m = 1、m/m = 2 を予測モデルに代入し、トータルスコアを計算する。

トータルスコアが、カットオフ値 0.4942 以上であれば、その患者はボセンタン導入後 1 年以内に、施設基準値の 1.5 倍以上の AST もしくは ALT の上昇を伴う肝機能障害を起こす可能性が高いと予測する。

### 第3節 考 察

ボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子を探索する目的で、DMET™ puls マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子探索を行った。これまでもボセンタンによる肝機能障害を探索する研究の報告があるが、それらは全てボセンタンとの関連が既知の候補遺伝子を標的とした研究であった。これらの検討の中では、ボセンタン関連肝機能障害関連遺伝子として *CYP2C9\*2* 遺伝子多型が報告されている<sup>23</sup>。しかし、ボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子の可能性が示唆されている *CYP2C9\*2* の遺伝子多型は、日本人には発現しない遺伝子多型であることが知られている<sup>25, 26</sup>。そのため、日本人で遺伝子探索を行うことで、日本人特有のボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子を抽出することが可能となると考えた。また、マイクロアレイを用いることでボセンタンとの関連が知られている遺伝子と、関連が知られていない数多くの遺伝子を同時に評価し、網羅的にリスク遺伝子进行评估することが可能となる。そのため、これまでは未知の副作用メカニズムと関連する遺伝子が選択される可能性もあり、ボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子の探索として有用な手法であると考えた。

今回の遺伝子探索で抽出した *CHST3* および *CHST13* は、いずれも CS 鎖の硫酸基を転移する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子であった。グリコサミノグリカン (GAG) 糖鎖の硫酸化と肺高血圧症患者におけるボセンタンによる肝機能障害との関連を指摘した報告は著者が調べ得た範囲では、見られなかった。

CS 鎖は、グルクロン酸 (GlcA) と *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の二糖が繰り返し重合した直鎖を基本骨格にもつ糖鎖構造を有しており、代表的な硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖である。CS 鎖は、細胞表面や細胞外マトリックスにプロテオグリカン側鎖として存在し、様々な細胞増殖因子や細胞外マトリックス成分と相互作用し、細胞接着、移動、増殖、分化、形態形成といった多彩な細胞活動を制

御している。さらに CS 鎖の硫酸化の状態は、広範囲にわたるプロテオグリカン生物学的機能にとって重要である<sup>31</sup>。

CS 鎖の基本骨格は、生合成過程で基質特異性の異なる複数の硫酸基転移酵素の作用により主に GlcA 残基の 2 位や GalNAc 残基の 6 位や 4 位で硫酸化修飾を受ける。その結果、生合成される CS 鎖は、特徴的な二糖類単位 (O、A、C、D、E ユニット) の組み合わせから構成され、多様な構造を示す。(図 1-13) これらの修飾反応は、生体内で無秩序に進行するわけではなく、各硫酸基転移酵素の競合的あるいは協調的作用によって厳密に制御されている<sup>32</sup>。

*CHST3* と *CHST13* は、それぞれコンドロイチン 6-*O*-スルホトランスフェラーゼ (C6ST) -1 とコンドロイチン 4-*O*-スルホトランスフェラーゼ (C4ST) -3 をコードする。C6ST-1 および C4ST-3 は、硫酸基の供与体である活性硫酸 (PAPS, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate) から CS の *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) のそれぞれ、6 位および 4 位に硫酸基を転移する反応を触媒する酵素である<sup>31</sup>。

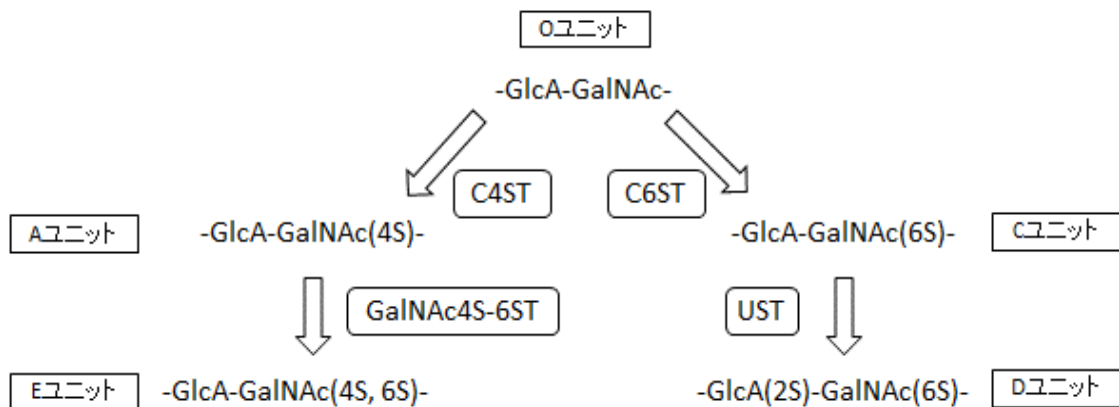


図 1-13 CS 鎖の構成二糖類単位硫酸化経路 文献 41 より著者作成。図中の 4S および 6S は水酸基が硫酸基に置換されていることを示す

*CHST3* 遺伝子変異による C6ST-1 機能異常は、進行性脊髄性病変を伴う重篤な軟骨異形成である脊椎骨端異形成オマーンタイプ (SED:

Spondyloepiphyseal dysplasia omani type) との関連が知られている<sup>31</sup>。臨床的には、著しい骨形成異常による脱臼や骨折、成長障害を来す。疾病関連遺伝子として同定された *CHST3* のミスセンス変異は、PAPS 結合部位でアルギニンがグルタミンに変異 (R304Q) しており、完全に C6ST-1 活性が消失する<sup>33</sup>。その結果、SED 患者では、GalNAc 残基の 6 位に硫酸基を転移する反応が起こらなくなるため、C ユニット、D ユニットの生成が低下している<sup>33</sup>。また、ゲノムワイドの手法を用いた研究では、*CHST3* が腰椎椎間板変性症 (LDD) と関連があることが明らかになった<sup>34</sup>。これらのことが示す通り、C6ST-1 により GalNAc 残基の 6 位に硫酸基を転移された CS は、骨生育や維持において非常に重要な役割を果たしている<sup>30</sup>。このように、生体において C6ST と C4ST の硫酸基転移は競合的に制御されており、その比率の著しい変化は生体に大きな影響を及ぼす。これまでの報告からも C6ST-1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスの脳では、発達に伴う 4-*O*-硫酸化/6-*O*-硫酸化比率の増加が抑制され、通常成熟に伴って失われる神経可塑性が持続することも報告されている<sup>35</sup>。今回著者が作成した予測モデルにおいても、*CHST3* と *CHST13* の変異による影響が、逆の符号を示していることは、興味深い点である。このモデルでは、*CHST3* に遺伝子変異があれば肝機能障害のリスクが低下すると考えられるが、これまでの報告と合わせて考えると 4-*O*-硫酸化/6-*O*-硫酸化比率が関与している可能性もあり、より詳細な解析を行う必要があると考えられる。

また、CS 鎖はデルマタン硫酸 (DS) やヘパラン硫酸 (HS)、ヒアルロン酸 (Hya) とならび肝臓においてみられる GAG の中の 1 つである<sup>36</sup>。ラットを用いた急性肝障害モデルによる検討では、急性肝障害を誘発した直後から HS は減少し、CS および DS は代償的に増加することが知られている<sup>36</sup>。疾病動物モデルによる検討では、CS が肝臓損傷後の肝線維化ならびに肝細胞再生の過程において重要な役割を果たすことが証明されている<sup>37, 38</sup>。また、アルコール性肝炎患者による検討で、

慢性アルコール性肝炎進行期においても GAG の増加が認められ、その硫酸化プロファイルが変化することが報告されている<sup>39</sup>。これらのことから、*CHST3* および *CHST13* による変異によって CS の硫酸化プロファイルに影響を与え、それがボセンタンによる肝機能障害への忍容性に影響している可能性があると考えられる。

今回の検討で抽出された *CHST3* rs4148953 および *CHST13* rs6783962 は、いずれも非転写領域の SNP であり、転写されるアミノ酸に影響するものではなかった。非転写領域の SNP が転写によって生成される酵素にどのような影響を与えているのかは、今回の研究系に含まれていない。今後、機能的な解明も含めたさらなる検討が必要と考える。

また、今回構築した予測モデルは、感度 82.61%、特異度 86.05%と見積もられた。しかし、本予測モデルは限られた集団からの後ろ向きの検証から抽出したモデルなので、真の予測精度は別の集団で検証した方がよいと考えている。そのため、別の患者集団に本予測モデルを適用した時の感度、特異度を評価する必要がある。

#### 第4節 小 括

ボセンタンを用いて治療されている 66 名の肺高血圧症患者から遺伝子を抽出し、DMET™ puls マイクロアレイを用いて網羅的に 231 遺伝子、1,936 変異の中からボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子の探索を行った。その結果、以下の新しい知見を得た。

1. ボセンタンによる肝機能障害関連遺伝子の候補遺伝子として、*SLC13A1*、*CHST3*、*CHST13*、*GSTA4*、*SLC10A2* の 5 つの遺伝子を抽出した。
2. いずれの遺伝子も、ボセンタンの代謝や副作用との関連は知られていない遺伝子であった。
3. 5 つの候補遺伝子の中から、機能的に関連のある *CHST3* および *CHST13* を最終的に予測モデルに採用した。*CHST3* と *CHST13* は、CS の GalNAc 残基のそれぞれ 6 位と 4 位に、硫酸基を転移する反応を触媒する酵素の遺伝子であった。
4. 選択した遺伝子と血清クレアチニンおよび年齢でボセンタン関連肝機能障害に関する予測モデルを構築した。
5. ボセンタンによる肝機能障害の予測モデル式は、下記であった。  
$$P = 1 / \{1 + \text{EXP} [3.613 + 3.5 \times \text{血清クレアチニン} - 0.1 \times \text{年齢} - 1.7 \times \text{CHST3} + 2.5 \times \text{CHST13}]\}$$
6. 予測モデルは、感度 82.61%、特異度 86.05% と高い予測精度であると見積もられた。

## 第 2 章 ボセンタンによる肝機能障害発症の予測モデルの妥当性検証

### 緒 言

第 1 章で 66 名のボセンタン治療中の肺高血圧患者から DMET™ puls マイクロアレイを用いてボセンタンによる肝機能障害に関与する遺伝子を網羅的に探索した。予測モデルは後ろ向きに遺伝子を抽出し、限られた集団の中から遺伝子を同定したために、この予測モデルが他の集団で通用するモデルであるかを検証する必要がある。他の集団で検証する方法としては、下記の 3 つの方法を考慮した。

- ① ボセンタン導入前に、患者の遺伝子から肝機能障害のリスク評価を行う。リスク評価の結果に関わらず、ボセンタンを投与する。その後の肝機能障害発生状況と合わせて、ボセンタンによる肝機能障害をどれくらいの精度で予測していたかを検証する。
- ② ボセンタン導入前に、遺伝子を評価する群としない群の 2 群に分ける。遺伝子を評価する群は、予測モデルのスコアがカットオフ値以上の高リスク群は、他の ERA を選択し、カットオフ値以下の低リスク群は、ボセンタンを選択する。この個別化により、遺伝子を評価しない群よりも、肝機能障害の発生を抑制することができるかの前向き試験を実施する。
- ③ 1 年以上ボセンタンを投与している患者で、遺伝子抽出に参加しておらずボセンタン導入時の状況を確認できる患者の遺伝子を評価し、後ろ向き試験で予測モデルの精度を検証する。

近年、肺高血圧治療領域において新薬開発が活発に進んでいる。ERA の中でボセンタンは最初に開発された薬剤であるが、現在では ERA としてボセンタン、アンブリセンタン、マシテンタンの 3 剤が上市されている。新薬による新しいエビデンスの影響で、肺高血圧患者へのボ

センタンの新規導入は近年減少傾向にあり、前向き試験を行っても患者のエントリーを十分確保できない可能性が高いと判断した。そのため、検討の結果、③の手法で予測モデルの精度を検証することとした。また、今回のボセンタンによる肝機能障害発症の予測モデルの妥当性検証では、検証に必要な症例数を算出し<sup>40</sup>、必要症例数を目標に検証を行うこととした。



## 第 1 節 実験材料および方法

### 第 1 項 対象患者の抽出

ボセンタン関連肝機能障害の予測モデルの推定精度を検証するために、2016年8月に、社会医療法人神鋼記念会神鋼記念病院通院中の肺高血圧症患者で、1年間以上継続してボセンタンを投与されており、ボセンタン導入時から、定期的に血液検査を行っている患者を対象とした。

採血時の残検体を用いて、遺伝子を抽出し、リスク遺伝子の評価を行った。得られた遺伝子評価から予測モデルのトータルスコアと、ボセンタン導入時から1年の肝機能障害の有無を合わせて評価した。

肝機能障害の定義をASTもしくはALTを施設基準値の1.5倍以上とした。ボセンタン投与開始から1年以内に、ASTもしくはALTの上昇を認めた患者を肝機能障害あり群、認めなかった患者を肝機能障害なし群とし、ボセンタン投与以外の要因によるAST・ALTの上昇や、ボセンタン投与開始時にすでに高値の症例は除外することとした。

なお、本研究を遂行するにあたり、プロトコールを神鋼記念病院の倫理審査委員会に提出し、承認を得た。また、すべての患者に口頭と書面による十分な説明を行い、書面による同意を得て行った。

## 第 2 項 リスク遺伝子の評価

患者 1~5 の *CHST3* (*rs4148953*) および *CHST13* (*rs6783962*) の遺伝子多型について評価を行った。

まず、患者の全血から遺伝子の抽出を行った。抽出には、QuickGene DNA whole blood kit S (倉敷紡績株式会社) を用いた。

RNase-free water で溶解済みのキット添付の前処置酵素 30  $\mu\text{L}$  を 1.5 mL マイクロチューブの底に添加した。これに全血 200  $\mu\text{L}$  を添加し、直ちに キット添付の溶解液 250  $\mu\text{L}$  を添加し、すぐにピペットを用いて混和を行った。

2,500 rpm で 15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。数秒間遠心して回収した。

56 度で 2 分間恒温保管した。

特級エタノール (> 99%) を 250  $\mu\text{L}$  添加し、2,500 rpm で 15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。数秒間遠心して回収した。

QuickGene-810 (倉敷紡績株式会社) を用いて遺伝子の抽出を行った。調製した溶解液の全量をカートリッジへ添加した。抽出モードは、「DNA WHOLE BLOOD」モードを選択し、本体を起動させた。

本体停止後に、パネルが正常終了していることを確認して DNA を回収した。Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific 社) で得られた DNA 量を確認し、10 ng/ $\mu\text{L}$  に調製した。

次に、測定用 Master Mix を作製した。1.5 mL マイクロチューブに 1 検体あたり Master Mix 5  $\mu\text{L}$ 、測定するターゲットの Assay Mix (primer) 0.5  $\mu\text{L}$ 、RNase-free water 2.5  $\mu\text{L}$  を加えた。リアルタイム PCR システム StepOnePlus (Applied Biosystems 社) の専用チューブに 1 検体あたり 8  $\mu\text{L}$  ずつ分注した。10 ng/ $\mu\text{L}$  に調製した DNA を 2

μL 分注し、ピペットを用いて混和した。STEP ONE 専用チューブに蓋をして、ボルテックスミキサーで十分に攪拌し、遠心して回収した。

Master Mix および PCR プライマー *CHST3 (rs4148953)* *C\_30633892\_10* および *CHST13 (rs6783962)* *C\_29114539\_20* は Applid Biosystems 社から購入した。

StepOnePlus を用いて PCR を行った。PCR の設定を示す(図 2-1)。

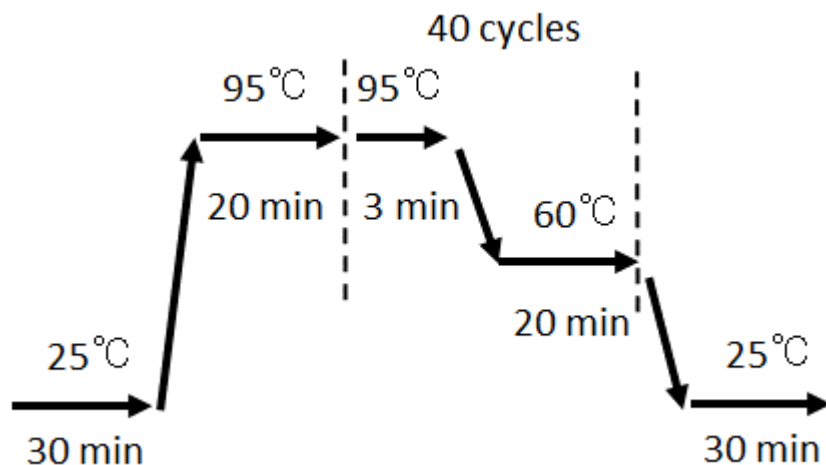


図 2-1 PCR 設定

### 第 3 項 予測モデルの妥当性検証に必要な症例数

今回の検証研究を行うのに必要な症例数を検証した。効果量 0.67、有意水準 0.05、検出力 0.8 と設定した。効果量 0.67 は、第 1 章で予測モデルを作成した 66 例のデータから  $\chi$  二乗検定を行い、クラメールの連関計数を算出し、効果量としてあてはめた。

算出には、ソフトウェア G\*power (G\*Power 3.1.9.2) を用いた。

## 第2節 結果

### 第1項 対象患者

本研究には、5名の患者がエントリーした。対象となった5名の患者の背景を示す（表2-1）。導入時に患者が使用していた併用薬を示す（表2-2）。

表2-1 患者背景

	患者1	患者2	患者3	患者4	患者5
年齢（年）	35.0	76.1	76.4	81.8	65.6
性別	男性	女性	女性	女性	女性
BSA (m <sup>2</sup> )	1.99	1.81	1.30	1.29	1.51
AST (IU/L)	16	15	17	30	17
ALT (IU/L)	17	14	12	22	15
BUN (mg/dL)	11.8	14.6	10	31.4	14.5
血清クレアチニン (mg/dL)	0.56	0.72	0.63	1.0	0.66
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	131.9	59.3	68.6	40.6	68.2
BNP (pg/mL)	46.2	92.9	186	571	81.2
CI (L/min/ m <sup>2</sup> )	5.68	2.27	2.32	2.21	4.33
PVR (dyne*sec/cm <sup>5</sup> )	28.3	176	259	251	325
mPAP (mmHg)	24	22	13	35	33
基礎疾患	SSC	MCTD PAH	SSC 指尖潰瘍	ASD PAH	SSC PAH
ボセンタン導入 1年後の投与量 (mg/day)	250	250	250	250	250

全ての患者で、ボセンタン導入 1 年後時点で保険適用の最高用量である 250 mg まで増量されていた。

患者 1～4 は、ボセンタン導入後 1 年以内に施設基準値の 1.5 倍以上の AST および ALT の上昇を認めなかった。

患者 5 は、ボセンタン導入 3 週間後にボセンタン 125 mg/日で投与中に、AST (2.74×ULN) および ALT (1.94×ULN) の上昇を認めた。ウルソデオキシコール酸を追加し、そのまま投与を継続したところ、14 日後に AST および ALT は正常化した。

表 2-2 ボセンタン導入時の併用薬

患者 1			
薬品名	投与量	薬品名	投与量
シルデナフィルクエン酸塩	60 mg	ラベプラゾールナトリウム	20 mg
トリメブチンマレイン酸塩	300 mg	酸化マグネシウム	1500 mg
レボチロキシシンナトリウム	50 µg	サルポグレラート塩酸塩	300 mg
エルデカルシトール	0.75 µg	モサプリドクエン酸塩	15 mg
ベニジピン塩酸塩	4 mg	メトクロプラミド	15 mg
プレドニゾロン	15 mg	アレンドロン酸ナトリウム	35 mg
		水和物	(週 1 回)

患者 2			
薬品名	投与量	薬品名	投与量
ランソプラゾール	15 mg		

患者 3

薬品名	投与量	薬品名	投与量
ベラプロストナトリウム	120 µg	アセトアミノフェン	1600 mg
フロセミド	20 mg	プレドニゾロン	2.5 mg
スピロノラクトン	25 mg	乾燥硫酸鉄	105 mg
ラベプラゾールナトリウム	10 mg		

患者 4

薬品名	投与量	薬品名	投与量
ベラプロストナトリウム	20 µg	イフェンプロジル酒石酸塩	300 mg
バゼドキシフェン酢酸塩	20 mg	アルファカルシドール	0.5 µg
ラニチジン塩酸塩	150 mg	ニトレンジピン	10 mg
セリプロロール塩酸塩	100 mg	アスピリン、アルミニウム グリシネート配合錠	81 mg

患者 5

薬品名	投与量	薬品名	投与量
ベラプロストナトリウム	60 µg	ランソプラゾール	15 mg
タダラフィル	10 mg	フロセミド	20 mg
ワルファリンカリウム	3 mg	スピロノラクトン	25 mg

ボセンタン導入時に、ボセンタンの添付文書に設定されている併用禁忌薬剤を使用している患者はいなかった。患者 1、3、4、5 と 5 名中 4 名の患者で併用注意薬剤の使用が認められた。

患者 1 は、シルデナフィルクエン酸塩、ベニジピン塩酸塩が併用注意に該当した。患者 3 は、ベラプロストナトリウムが併用注意に該当した。患者 4 は、ベラプロストナトリウム、ニトレンジピンが併用注意に該当した。患者 5 は、ベラプロストナトリウム、ワルファリンカリウムが併用注意に該当した。

併用注意薬剤の理由と影響についてまとめる。

患者 1 が使用していたシルデナフィルは、(1)ボセンタンとの併用により、血圧低下を助長するおそれがある。これは、両剤の薬理的な相加作用の影響と考えられる。(2)ボセンタンとの併用により、シルデナフィルの血中濃度が低下し、ボセンタンの血中濃度が上昇する。これは、ボセンタンの CYP3A4 誘導作用により、シルデナフィルの血中濃度を低下させる。また、機序は不明であるが、シルデナフィルはボセンタンの血中濃度を上昇させる。

患者 1 および 4 が使用していたベニジピン塩酸塩およびニトレンジピンは、いずれも Ca 拮抗薬であり、(1)ボセンタンとの併用により、血圧低下を助長するおそれがある。これは、両剤の薬理的な相加作用の影響と考えられる。(2)ボセンタンとの併用により、ボセンタンの CYP3A4 誘導作用により、Ca 拮抗薬の血中濃度を低下させる可能性がある。

患者 3、4 および 5 が使用していたベラプロストは、プロスタグランジン製剤であり、ボセンタンとの併用により、血圧低下を助長する可能性がある。これは、両剤の薬理的な相加作用の影響と考えられる。

患者 5 が使用していたワルファリンカリウムは、ボセンタンとの併用により、ワルファリンの血中濃度が低下することがある。これは、ボセンタンの CYP2C9 および CYP3A4 誘導作用により、ワルファリンの血中濃度が低下するためである。

いずれの併用注意薬剤も、肝機能障害に直接的に影響している可能性は低いと考えられた。

## 第 2 項 リスク遺伝子の評価と予測モデルへの適用

5名の患者から得られた *CHST3* および *CHST13* の遺伝子型を示す (表 2-3)。

表 2-3 リスク遺伝子の遺伝子型

	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4	患者 5
<i>CHST3</i> ( <i>rs4148953</i> )	G/G	A/G	G/G	G/G	G/G
<i>CHST13</i> ( <i>rs6783962</i> )	G/T	G/T	T/T	G/T	T/T

次に、PCR で得られた患者の遺伝子型から各遺伝子のスコアに  $w/w = 0$ 、 $w/m = 1$ 、 $m/m = 2$  に変換を行った。次に、血清クレアチニン値および年齢の情報と合わせた。各スコアおよび非遺伝子説明変数の値を示す (表 2-4)。

表 2-4 リスク遺伝子のスコアと血清クレアチニンおよび年齢

	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4	患者 5
<i>CHST3</i> ( <i>rs4148953</i> )	0	1	0	0	0
<i>CHST13</i> ( <i>rs6783962</i> )	1	1	0	1	0
血清クレアチニン (mg/dL)	0.56	0.72	0.63	1.0	0.66
年齢 (年)	35.0	76.1	76.4	81.8	65.6



次に、予測モデル式にあてはめ、トータルスコアを算出した。

$$P = 1 / \{1 + \text{EXP} [3.613 + 3.5 \times \text{血清クレアチニン} - 0.1 \times \text{年齢} - 1.7 \times \text{CHST3} + 2.5 \times \text{CHST13}]\}$$

トータルスコアが、カットオフ値 0.4942 以上であれば高リスク群、0.4942 以下であれば低リスク群と判別した。トータルスコアとリスク判定結果を示す（表 2-5）。

表 2-5 トータルスコアとリスク判定

	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4	患者 5
トータルスコア	0.01099	0.7006	0.8768	0.2184	0.6800
リスク判定	低リスク	高リスク	高リスク	低リスク	高リスク

### 第 3 項 予測モデルの予測性能

5 名の患者の予測モデルの予測精度をクロス集計表でまとめる（表 2-6）。

表 2-6 予測モデルと肝機能障害発生のクロス集計

	肝障害あり	肝障害なし
高リスク群	1	2
低リスク群	0	2

今回行った 5 例では予測モデルの推定精度は、下記の様に算出された。

感度：肝機能障害ありの患者中の高リスク患者の割合  $1/(1+0) = 100\%$

特異度：肝機能障害なしの患者中の低リスク患者の割合  $2/(2+2) = 50\%$

### 第 4 項 検証に必要な症例数

G\*power を用いて今回の検証研究を行うのに必要な症例数を算出したところ、効果量 0.67、有意水準 0.05、検出力 0.8 と設定すると 18 症例と算出された。

### 第3節 考察

第1章で66例の患者から、2つの遺伝子多型と2つの臨床指標（血清クレアチニンおよび年齢）を用いることでボセンタン関連肝機能障害の発生を予測する予測モデルを構築した。本モデルは、理論的に感度82.61%、特異度86.05%と見積もられた。第2章の検証では、予測モデルの推定精度を確認するために他の集団で5例の患者にあてはめてみたところ、感度100%、特異度50%という結果であり、理論値とは異なる結果であった。これは、サンプルサイズが不足していたためと考えられ、この結果から予測モデルの妥当性を判断することはできない。今回の検証研究では、統計学的検証に耐え得る必要サンプルサイズには18症例必要と算出されたが、単施設では十分な患者のエントリーを確保することが出来なかった。肺動脈性肺高血圧症が希少疾患であること、ボセンタンの新規導入症例が減少傾向にあることを踏まえると、本検証を完了させるためには今後、他の施設とも協力して症例数を追加し、検証研究を行う必要があると考えている。

今回行った検証では、予測モデルの構築を行う際に併用薬の影響を評価できていない。今回の研究を含め、多くのゲノム薬理学研究では、医薬品相互作用を十分に評価して行っている研究は多くない。ゲノム薬理学研究では非常に多くの遺伝子を説明変数として取り扱うために、医薬品相互作用による影響で集団を細分化することが困難であるというのも原因の1つと考えられる。しかし、薬物間相互作用の影響により研究対象となる薬剤の副作用プロファイルが変化する可能性は大いにある。今回のボセンタンの検証研究では、添付文書に記載されている範囲の併用注意薬情報では、ボセンタンの血中濃度を変動させ、研究結果に影響すると考えられる併用薬の使用は見られなかった。しかし、ボセンタンとの相互作用が未知の組み合わせや、複合的な要因によって、ボセンタンの血中濃度の変動が起こる可能性もある。今後のゲノム薬理学研究では、血中濃度測定や相互作用シミュレーションと組み合わせるなど、薬物動態学的なアプローチも併せて行い、

薬物間相互作用に関する検証も重要になるのではないかと考えている。

今回の検証では、添付文書で規定されているボセンタンの併用禁忌薬剤を使用している患者はいなかった。患者 1、3、4、5 と 5 名中 4 名の患者で併用注意薬剤の使用が認められた。

患者 1 は、シルデナフィルクエン酸塩、ベニジピン塩酸塩が併用注意に該当した。患者 3 は、ベラプロストナトリウムが併用注意に該当した。患者 4 は、ベラプロストナトリウム、ニトレンジピンが併用注意に該当した。患者 5 は、ベラプロストナトリウム、ワルファリンカリウムが併用注意に該当した。いずれの併用注意薬剤も、肝機能障害に直接的に影響している可能性は低いと考えられた。

しかし、添付文書に記載されている併用注意の組み合わせは、必ずしも臨床で使用される組み合わせをカバーしているとは言えない。例えば、最近の研究でバンコマイシン（VCM）投与患者でのピペラシリン/タゾバクタム（TAZ/PIPC）併用が、急性腎障害（AKI）発症を増加させると報告された<sup>41</sup>。この報告では、系統的レビューとメタ解析により、VCM 単独、VCM とセフェピム（CFPM）またはカルバペネム併用、VCM と TAZ/PIPC 併用の AKI リスクを比較した。15 件の論文と 17 件の学会発表が選択され、n = 24,799 の解析結果で、全体の急性腎障害発生率は 16.7%、うち VCM+TAZ/PIPC 併用群が 22.2%、それ以外では 12.9%であった。VCM・TAZ/PIPC 併用による AKI リスクは、VCM 単独（オッズ比 3.40）と他の群よりも高かった。重症患者（n = 968）での VCM・TAZ/PIPC 併用は、VCM 単独と比して AKI リスクを大きく高めたが（オッズ比 9.62）、他の群では有意差がなかった<sup>41</sup>。このように非常に高いレベルのエビデンスにより明らかになっている情報があっても、必ずしも添付文書に反映されるわけではない。事実として、現在ゾシン®静注用（大鵬薬品工業株式会社）の添付文書には、VCM が併用注意として記載されているが、塩酸バンコマイシン点滴静注用®（塩野義製薬）の添付文書には、TAZ/PIPC は記載されていない。

医薬品相互作用を正確に評価する場合に、肝臓でのボセンタンの組織濃度などを定量するためには、肝生検が必要となるなど侵襲の問題などで困難な点が多い。しかし、最近の研究でボセンタンの薬物動態学的パラメータを用いて、併用薬存在下やボセンタンの薬物動態に関与する P450 および肝臓への取り込みに関与するトランスポーターを阻害した時に、全身および肝臓での薬物濃度などの薬物動態変化をシミュレーションする試みが報告されている<sup>42</sup>。この手法を用いた研究によると、ボセンタンは、肝臓よりもむしろ消化管で P450 を多く発現誘導しており、その影響でタダラフィルのバイオアベイラビリティに影響することが示された<sup>43</sup>。また、ボセンタンの肝細胞への取り込みに関与する SLCOs および代謝に関与する CYP3A の影響を定量的にシミュレーションした研究では、これまで SLCO の基質にならないとされていたクラリスロマイシンが SLCO に影響することが示され、クラリスロマイシンの併用によってボセンタンの肝細胞への取り込みに影響する可能性が示された<sup>44</sup>。しかし、現在の日本のトラクリア錠 62.5mg の添付文書にはタダラフィルおよびクラリスロマイシンは併用注意には該当していない。

このように、これまで関連が未知の併用薬の影響で血中濃度や組織濃度の変動し、これにより副作用プロファイルが変化する可能性もある。添付文書への記載がなくとも、併用薬の影響による副作用プロファイルの変動は非常に重要になる可能性もあるため、ゲノム薬理学研究においても医薬品相互作用を検討することは、今後重要になると考えられる。

肺高血圧治療は、治療薬・治療法の開発や一般医療現場の治療水準の向上により、この 20 年で大きく進歩している。それに伴い、優れたエビデンスを有する新薬の開発で、過去の標準治療薬を淘汰する場合もある。それでもなお、ボセンタンはこれからも臨床で必要な薬であると考えられている。その理由は 2 つある。

まず 1 つ目は、ボセンタンは ERA の中で唯一“全身性強皮症におけ

る手指潰瘍の発症抑制” に対し保険適用を有している。そのため、全身性強皮症の患者で、肺動脈圧上昇がなく、レイノー症状のある患者には唯一選択可能な ERA である。全身性強皮症に伴う PAH の予後は非常に悪いことも知られており<sup>45</sup>、早期の ERA 投与の選択肢として臨床でも使用されている。

2 つ目は、ボセンタンは ERA の中で唯一、ジェネリック医薬品が上市されている。本邦での価格であれば先発品のコストと比してジェネリック医薬品では、薬価ベースで 60% 程度までボセンタンにかかる医薬品コストを抑制することができる。肺高血圧症治療には特に高額な医薬品が多く用いられるが、肺高血圧症は、「難病の患者に対する医療等に関する法律」による指定難病であり、特定医療費支給認定の対象となるため、治療にかかる医療費を公的負担でカバーしている。医薬品コストとして 1 年間で一人当たり ERA は 550 万円程度、PDE-5 阻害剤は 140 万円程度、エポプロステノールは 2,000 万円程度かかると概算される。現在は肺高血圧症治療の医薬品を選択する際に制限はないが、高騰する医療費の抑制は国が抱える課題でもあり、ジェネリック医薬品の使用についても考えなければならない。これらの理由から、ボセンタンは今後も臨床で活用される薬剤であると考えている。

本研究を通じて、ボセンタンを使用する際に問題となる肝機能障害を事前に予測し、副作用回避の実現に向けた新しい知見を得ることが出来た。

PAH 治療において個別化医療を推進し、患者に最適な医療を、早期に、安全に提供する手法の 1 つとして、臨床応用可能なエビデンスの集積が求められる。

#### 第4節 小 括

66名の肺高血圧症患者の遺伝子から構築したボセンタンによる肝機能障害予測モデルの推定精度を別の集団で確認した。

その結果、下記の知見を得た。

1. 検証実験では5名の患者のエントリーがあった。4名は肝機能障害なくボセンタンを導入できた患者で、1名は導入後に肝機能障害を認めた患者であった。
2. 5名の患者の *CHST3* および *CHST13* の遺伝子多型を評価し、予測モデルにあてはめてトータルスコアを算出し、肝機能障害発生状況と合わせて感度、特異度の算出を行った。3名が高リスク群、2名が低リスク群であった。
3. ボセンタン導入時の肝機能障害の発生状況と合わせて評価すると、本検証では感度 100%、特異度 50%であった。
4. 本検証において予測モデルの妥当性を判断するために必要な症例数は 18 例と算出された。

## 総括

PAH 治療薬である非選択的エンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンによって引き起こされる肝機能障害について、関連遺伝子を探索する研究を行った。その結果、以下の結論を得た。

1. 66名のPAH患者から遺伝子を抽出し、網羅的遺伝子探索を実施した。その結果、*CHST3* (*rs4148953*) および *CHST13* (*rs6783962*) の2つのSNPsをリスク遺伝子として同定した。これらの遺伝子はボセンタンとの関連は知られていない遺伝子であった。
2. *CHST3* および *CHST13* は、CSのGalNAc残基の、それぞれ6位および4位に硫酸基を転移する反応を触媒する酵素（C6ST-1およびC4ST-3）をコードする遺伝子であった。また、*CHST3* 遺伝子変異によるC6ST-1機能異常は、進行性脊髄性病変を伴う重篤な軟骨異形成である脊椎骨端異形成オマーンタイプとの関連が知られている。
3. *CHST3* および *CHST13* と年齢、血清クレアチニンを用いて予測モデルを構築した。本モデルの推定予測精度は、感度82.61%、特異度86.05%であった。
4. 5例の独立した集団で予測モデル推定精度について検証を行った。その結果、感度100%、特異度50%と見積もられた。本検証は、今後症例数を追加して検証していく必要がある。

本研究を通じて、日本人の肺高血圧患者におけるボセンタンの肝機能障害リスク遺伝子を同定し、予測モデルを構築した。本予測モデルは、速やかにかつ安全に治療導入を行わなければならない肺高血圧診療において、ERAを安全に選択するために有用な手法の1つになると考えられる。



## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました臨床薬学研究室 江本憲昭教授に衷心より感謝申し上げます。

本研究の論文作成、審査にあたり、種々の有益な御助言、御指導を賜りました病態生化学研究室 加藤 郁夫教授、生化学研究室 北川 裕之教授、医療薬学研究室 力武 良行教授に衷心より感謝申し上げます。

本研究に対し、数々の貴重なご助言と幾多の御協力を賜りました社会医療法人神鋼記念会総合医学研究センター 熊谷 俊一センター長、循環器内科 中山 和彦博士、つじ膠原病リウマチ科内科（元神鋼記念会神鋼記念病院膠原病リウマチ内科）辻 剛院長、臨床薬学研究室 宮川 一也特任助教に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、数々のご助力を賜りました臨床薬学研究室 鈴木 陽子氏、元社会医療法人神鋼記念会総合医学研究センター 上村 裕子氏、社会医療法人神鋼記念会総合医学研究センター諸氏に感謝申し上げます。

最後に、長きにわたり様々な面で研究生活を支えてくれた家族ならびに友人たちに深く感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2016; 37: 67-119.
2. Nakamura K, Shimizu J, Kataoka N, et al. Altered nano/micro-order elasticity of pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol*. 2010; 140: 102-107.
3. Miura A, Nakamura K, Kusano KF, et al. Three-dimensional structure of pulmonary capillary vessels in patients with pulmonary hypertension. *Circulation*. 2010; 121: 2151-2153.
4. Lannan KL, Phipps RP, White RJ. Thrombosis, platelets, microparticles and PAH: more than a clot. *Drug Discov Today*. 2014; 19: 1230-1235.
5. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*. 1991; 115: 343-349.
6. Benza RL, Miller DP, Barst RJ, et al. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest*. 2012; 142: 448-456.
7. Tamura Y, Kumamaru H, Satoh T, et al. Effectiveness and Outcome of Pulmonary Arterial Hypertension-Specific Therapy in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ J*. 2017; 82: 275-282.
8. Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004; 61: 227-237.
9. Miyagawa K, Emoto N. Current state of endothelin receptor antagonism in hypertension and pulmonary hypertension. *Ther Adv Cardiovasc Dis*.

- 2014; 8: 202-216.
10. Vignon-Zellweger N, Heiden S, Emoto N. Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life Sci.* 2012; 91: 490-500.
  11. Clozel M, Breu V, Gray GA, et al. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 270: 228-235.
  12. McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch DB, et al. Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2005; 25: 244-249.
  13. Galiè N, Rubin LJ, Hoeper MM, et al. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet North Am Ed.* 2008; 371: 2093-2100.
  14. Binet I, Wallnofer A, Weber C, et al. Renal hemodynamics and pharmacokinetics of bosentan with and without cyclosporine A. *Kidney Int.* 2000; 57: 224-231.
  15. Van Giersbergen PL, Treiber A, Clozel M, et al. In vivo and in vitro studies exploring the pharmacokinetic interaction between bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, and glyburide. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 71: 253-262.
  16. Paul GA, Gibbs JS, Boobis AR, et al. Bosentan decreases the plasma concentration of sildenafil when coprescribed in pulmonary hypertension. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 60: 107-112.
  17. トラクリア錠®62.5mg インタビューフォーム(アクテリオンファーマシューティカルズ ジャパン株式会社) 2018年12月作成(第15版)
  18. Humbert M, Segal ES, Kiely DG, et al. Results of European post-marketing surveillance of bosentan in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2007; 30: 338-344.
  19. Gabbay E, Fraser J, McNeil K. Review of bosentan in the management

- of pulmonary arterial hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2007; 3: 887-900.
20. Fattinger K, Funk C, Pantze M, et al. The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69: 223-231.
  21. Dingemanse J, van Giersbergen PL. Clinical pharmacology of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43: 1089-1115.
  22. Rubin LJ, Badesch DB, Fleming TR, et al. Long-term treatment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: the SUPER-2 study. *Chest.* 2011; 140: 1274-1283.
  23. Markova SM, De Marco T, Bendjilali N, et al. Association of CYP2C9\*2 with bosentan-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther.* 2013; 94: 678-686.
  24. Roustit M, Fonrose X, Montani D, et al. CYP2C9, SLCO1B1, SLCO1B3, and ABCB1 polymorphisms in patients with bosentan-induced liver toxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2014; 95: 583-585.
  25. Nasu K, Kubota T, Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Pharmacogenetics.* 1997; 7: 405-409.
  26. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20: 342-349.
  27. Lee S, Dawson PA, Hewavitharana AK, et al. Disruption of NaS1 sulfate transport function in mice leads to enhanced acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology.* 2006; 43: 1241-1247.
  28. Hagenbuch B, Dawson P. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch.* 2004; 447: 566-570.
  29. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45: 51-88.

30. Kitagawa H. Using sugar remodeling to study chondroitin sulfate function. *Biol Pharm Bull.* 2014; 37: 1705-1712.
31. Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1830: 4719-4733.
32. Miyata S, Kitagawa H. Chondroitin sulfate and neuronal disorders. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2016; 21: 1330-1340.
33. Thiele H, Sakano M, Kitagawa H, et al. Loss of chondroitin 6-*O*-sulfotransferase-1 function results in severe human chondrodysplasia with progressive spinal involvement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 10155-10160.
34. Song YQ, Karasugi T, Cheung KM, et al. Lumbar disc degeneration is linked to a carbohydrate sulfotransferase 3 variant. *J Clin Invest.* 2013; 123: 4909-4917.
35. Miyata S, Kitagawa H. Chondroitin 6-Sulfation Regulates Perineuronal Net Formation by Controlling the Stability of Aggrecan. *Neural Plast.* 2016; 2016: 1305801.
36. Gressner AM. Activation of proteoglycan synthesis in injured liver--a brief review of molecular and cellular aspects. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1994; 32: 225-237.
37. Nadanaka S, Kitagawa H. EXTL2 controls liver regeneration and aortic calcification through xylose kinase-dependent regulation of glycosaminoglycan biosynthesis. *Matrix Biol.* 2014; 35: 18-24.
38. Habuchi H, Ushida T, Habuchi O. Mice deficient in N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-*O*-sulfotransferase exhibit enhanced liver fibrosis and delayed recovery from fibrosis in carbon tetrachloride-treated mice. *Heliyon.* 2016; 2: e00138.
39. Murata K, Ochiai Y, Akashio K. Polydispersity of acidic glycosaminoglycan components in human liver and the changes at different stages in liver cirrhosis. *Gastroenterology.* 1985; 89: 1248-1257.
40. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, et al. G\*Power 3: a flexible statistical

- power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007; 39: 175-191.
41. Luther MK, Timbrook TT, Caffrey AR, et al. Vancomycin Plus Piperacillin-Tazobactam and Acute Kidney Injury in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit Care Med*. 2018; 46: 12-20.
  42. Li R, Maurer TS, Sweeney K, et al. Does the Systemic Plasma Profile Inform the Liver Profile? Analysis Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model and Individual Compounds. *AAPS J*. 2016; 18: 746-756.
  43. Li R, Niosi M, Johnson N, et al. A Study on Pharmacokinetics of Bosentan with Systems Modeling, Part 1: Translating Systemic Plasma Concentration to Liver Exposure in Healthy Subjects. *Drug Metab Dispos*. 2018; 46: 346-356.
  44. Yoshikado T, Maeda K, Kusuhara H, et al. Quantitative Analyses of the Influence of Parameters Governing Rate-Determining Process of Hepatic Elimination of Drugs on the Magnitudes of Drug-Drug Interactions via Hepatic OATPs and CYP3A Using Physiologically Based Pharmacokinetic Models. *J Pharm Sci*. 2017; 106: 2739-2750.
  45. Aithala R, Alex AG, Danda D. Pulmonary hypertension in connective tissue diseases: an update. *Int J Rheum Dis*. 2017; 20: 5-24.