

氏名(本籍)	依藤 健之介(兵庫県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博第44号
学位授与年月日	平成31年3月7日
学位授与の条件	学位規程第4条第1項該当者
学位論文の題名	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
論文審査委員	主査 教授 加藤 郁夫 副査 教授 北川 裕之 副査 教授 江本 憲昭 副査 教授 力武 良行

## 論文内容の要旨

### 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。背景疾患により(1)肺動脈性肺高血圧症(Pulmonary arterial hypertension: PAH)、(2)左心性疾患に伴う肺高血圧症、(3)肺疾患・低酸素血症に伴う肺高血圧症、(4)慢性血栓塞栓性肺高血圧症、(5)詳細不明な多因子のメカニズムに伴う肺高血圧症の5つに大別される<sup>1</sup>。PAHは、肺動脈に主要な病変が存在する肺高血圧症の総称であり、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。また、PAHの発症機序は十分に解明されておらず、国が指定する難治性疾患克服研究事業、臨床調査研究分野の対象疾患である。

#### 2. 肺動脈性肺高血圧症の疫学

本邦の特発性/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。

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、3年生存率は34%であった。また、その死因は突然死、右心不全、喀血が多いことが知られている<sup>2</sup>。2006年から2009年に米国で行われたREVEAL登録研究では、I/H-PAHの5年生存率は65%であった<sup>3</sup>。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。さらに、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年生存率は92%と極めて良好な結果であった<sup>4</sup>。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補助されることにより、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。

### 3. 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きた。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 (エンドセリン受容体拮抗薬: ERA) に介入する3系統の薬剤に分類され、それぞれ複数の製剤が上市されている (図1、表1)。

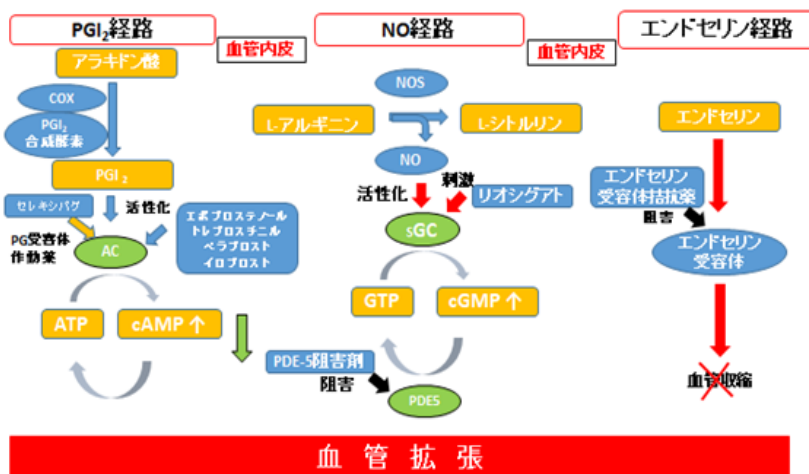


図1 肺血管拡張薬の作用機序

表1 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)

### 4. エンドセリン受容体拮抗薬ボセンタンの特徴

ボセンタンは、ERAの中で最初に上市されたET<sub>A</sub>・ET<sub>B</sub>非選択的エンドセリン受容体拮抗薬であり<sup>5</sup>、本邦では2005年に保険収載された。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。臨床的に患者が自覚する副作用は頭痛、ほてりや嘔気など軽微な場合が多いが、肝機能障害が治療上問題となる。

### 5. ボセンタンによる肝機能障害

ボセンタンによる肝機能障害は、ボセンタンがSLC01B1、SLC01B3によって肝細胞に取り込まれ、肝胆側膜で胆汁酸排泄に関与するトランスポーターであるABCB11やABCC2を阻害し、胆汁うっ滞を引き起こすことが原因の一部と考えられている<sup>6</sup>。ボセンタンは、肝機能障害の発現が約10%と高く<sup>7</sup>、し

ばしば治療の妨げとなるため重要な副作用である。そのため、これまでに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きた。ボセンタンの薬物動態との関連が既知の遺伝子を対象とした試験では、*CYP2C9\*2* 遺伝子が AST、ALT 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マーカーとして使用できる可能性が示唆された<sup>6</sup>。しかし一方で、その結果を否定する報告もあり<sup>8</sup>、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。また、先行研究でボセンタンによる肝機能障害と関連が指摘されている *CYP2C9\*2* 遺伝子は、日本人には発現しない遺伝子であることが知られている<sup>9</sup>。

## 6. 臨床的な課題

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>10, 11</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の使用を回避し、早期に有効な治療を提供できる可能性がある。そのため、次に解決すべき臨床的な課題は、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

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目的とした研究を計画し、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。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に、網羅的に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、PAH の臨床的課題の 1 つである個別化医療の実現に貢献できる可能性がある。

### 第 1 節 実験材料および方法

#### 第 1 項 対象患者の抽出

神戸大学医学部附属病院もしくは社会医療法人神鋼記念会神鋼記念病院にて、2006 年 8 月から 2013 年 7 月までにボセンタンを投与された患者のうち、2013 年 3 月から 2013 年 7 月までの期間に本研究への参加同意が得られた患者を対象とした。ボセンタン導入から 1 年間に、施設基準値上限 1.5 倍以上の AST もしくは ALT の上昇を認めた患者を肝機能障害あり群とし、AST、ALT いずれも異常を認めなかった患者を肝機能障害なし群とした。なお、観察期間はボセンタン導入から 1 年と設定した。

#### 第 2 項 解析プロトコール

遺伝子探索には、DMET™ Plus Solution (アフィメトリクス ジャパン株式会社) を用いて、231 種類の薬物動態関連遺伝子上の 1,936 変異を網羅的に探索した。解析プロトコールは、1,936 変異から一塩基多型 (SNP) の Call rate > 0.95 およびハーディ・ワインベルク平衡検定で  $P > 0.001$  となる遺伝子を解析対象とし、ヨンクヒール・タプストラ検定で  $P < 0.05$  となった遺伝子を抽出し、多重共線性を

排除した。患者背景で有意差のあった変数を加えて、ステップワイズ法を行い、変数の絞り込みを行った。一方の群でアレル頻度ゼロの変数を除外し、ROC解析(Receiver operating characteristic analysis)を行った。

## 第2節 結果

### 2-1) 患者エントリー

本研究のエントリー期間に同意を得られた者のうち、ボセンタン導入から1年間でASTもしくはALTの上昇を認め、解析対象となった肝障害あり群は23名であった。また、ASTとALTのいずれも上昇を認めなかった肝障害なし群は43名であった。患者背景で、年齢と血清クレアチニンに両群間に差を認めた。

### 2-2) 肝機能障害関連遺伝子の抽出

1,936変異からSNPのCall rate > 0.95およびハーディ・ワインベルグ平衡検定で $P > 0.001$ となった遺伝子は670変異であった。Jonckheere-Terpstra trend検定を行い16遺伝子に絞り込んだ。多重共線性を排除した12遺伝子に患者背景で有意差のあった年齢、血清クレアチニンを変数として加えステップワイズ法を行い、6遺伝子抽出した。一方の群でアレル頻度ゼロの変数を除外し、5遺伝子の中から機能的に関連のある2遺伝子(*CHST3*, *CHST13*)を抽出した。遺伝子抽出の過程を図2に示す。

### 2-3) 肝機能障害予測モデルの構築

抽出した2つの遺伝子と両群間で差のあった2項目の臨床指標でROC解析を行った。その結果、感度82.61%、特異度86.05%、AUC 0.89、カットオフ値0.4942と良好な結果を得た。ROC曲線を図3に示す。

次に、ROC解析から算出されたパラメーター推定値を用いて予測モデル式を作成した。予測モデル式を示す。

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

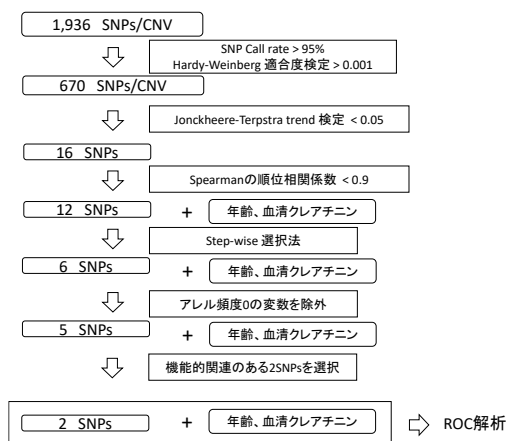


図2 ボセンタン関連肝機能障害リスク遺伝子の絞り込み過程

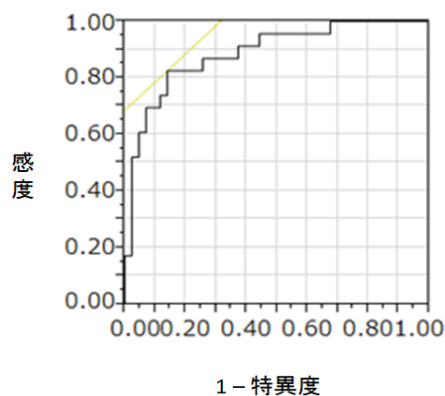


図3 2SNPsと年齢、血清クレアチニンによるROC曲線

## 第3節 考察

ボセンタン関連肝機能障害のリスク遺伝子の抽出を行い、遺伝子マーカーとして*CHST3*および*CHST13*を同定した。*CHST3*および*CHST13*は、いずれもコンドロイチン硫酸(CS)鎖の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。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 (GAG) 糖鎖である。また、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>12</sup>。肝臓においては、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) とならび代表的な GAG の 1 つである<sup>13</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>13</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示されている<sup>14, 15</sup>。また、アルコール性肝炎患者による検討で、慢性肝炎の進行期においても 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>16</sup>。これらのことから、*CHST3* および *CHST13* における変異が 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が、その分子機序の解明にはさらなる検討が必要と考えられた。

#### 第 4 節 小 括

本研究は、66 名の患者からボセンタン関連肝機能障害のリスク遺伝子の探索を行った。その結果、CS の GalNAc 残基の 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る *CHST3* および *CHST13* を用いて、ボセンタンによる肝機能障害発症の予測モデルを構築した。本モデルの予測精度は、感度 82.61%、特異度 86.05%であった。

## 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 章ではマイクロアレイを用いて遺伝子を抽出し、臨床指標を加え、予測モデルを構築した。この予測モデルは、限られた集団から作成したモデルであるために、他の集団に適用した時の感度、特異度を検証することとした。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、必要な症例数を算出し、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

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。肝機能障害の定義は第 1 章の研究と同様とした。

#### 第 2 項 リスク遺伝子の評価

患者の全血から遺伝子の抽出を行い、RT-PCR を用いて患者 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。投与開始時の年齢および血清クレアチニンと併せて予測モデルに適用した。

### 第3項 予測モデルの妥当性検証に必要な症例数

必要症例数の検証は、効果量 0.67、有意水準 0.05、検出力 0.8 と設定し、算出には、G\*power (G\*Power 3.1.9.2) を用いた<sup>17</sup>。

## 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。患者1~4は、ボセンタン導入後1年以内に肝機能障害を起こしていなかったが、患者5は、ボセンタン導入3週間後に肝機能障害を認めた。

### 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*、*CHST13* の遺伝子型、年齢および血清クレアチニンから得られた予測モデルスコアとリスク判定を示す (表2)。

表2 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

5名の患者での予測モデルの推定精度は、感度 100%、特異度 50%であった。

### 第3項 検証に必要な症例数

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を行うための必要症例数は、18症例と算出された。

## 第3節 考察

第2章の検証研究では、予測モデルの推定精度を確認するために、前回とは異なる集団の5名の患者に適用したところ、感度 100%、特異度 50%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。本検証を完了させるためには今後、他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。

また、今回の研究では、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。本研究を含め、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ことも原因の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と考えている。

## 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、別の患者集団で確認した。5名の *CHST3* および *CHST13* の遺伝子多型を評価し、予測モデルに適用したと

ころ、3名が高リスク群、2名が低リスク群であった。ボセンタン導入時の肝機能障害の発生状況と併せて評価すると、感度100%、特異度50%であった。本検証に必要なサンプルサイズは18症例と算出された。

## 総括

本研究は、PAH治療薬である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、関連バイオマーカーの探索を行った。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、*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。同定された*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。*CHST3*および*CHST13*と年齢、血清クレアチニンを用いてボセンタンによる肝機能障害の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。5名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ところ、感度100%、特異度50%であった。予測モデルの妥当性を検証するためには、今後例数を追加して検証する必要がある。

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、エンドセリン受容体拮抗薬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。

## 参考文献

1. Galie N., et al., *Eur Heart J*, 2016. 37: 67-119.
2. D'Alonzo GE., et al., *Ann Intern Med*, 1991. 115: 343-349.
3. Benza RL., et al., *Chest*, 2012. 142: 448-456.
4. Tamura Y., et al., *Circ J*, 2017. 82: 275-282.
5. Clozel M., et al., *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. 270: 228-235.
6. Markova SM., et al., *Clin Pharmacol Ther*, 2013. 94: 678-686.
7. Humbert M., et al., *Eur Respir J*, 2007. 30: 338-344.
8. Roustit M., et al., *Clin Pharmacol Ther*, 2014. 95: 583-585.
9. Nasu K., et al., *Pharmacogenetics*, 1997. 7: 405-409.
10. Galiè N., et al., *The Lancet*, 2008. 371: 2093-2100.
11. Rubin LJ., et al., *Chest*, 2011. 140: 1274-1283.
12. Mikami T., et al., *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1830: 4719-4733.
13. Gressner AM. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1994. 32: 225-237.
14. Nadanaka S., et al., *Matrix Biol*, 2014. 35: 18-24.
15. Habuchi H., et al., *Heliyon*, 2016. 2: e00138.
16. Murata K., et al., *Gastroenterology*, 1985. 89: 1248-1257.
17. Faul F., et al., *Behav Res Methods*, 2007. 39: 175-191.

## 論文審査の結果の要旨

肺動脈性肺高血圧症は肺動脈圧の上昇から心不全をきたす極めて予後不良の難治性疾患であるが、近年、有効な薬物の開発が進み、治療成績が向上してきた。エンドセリン受容体拮抗薬のボセンタンは、肺動脈性肺高血圧症治療薬の1つとして汎用されているが、約10～15%の患者に肝機能障害をきたし、これが治療の妨げとなることがある。肝機能障害発症を予測する遺伝子マーカーの研究はいくつかあるが意見の一致を見ていない。

著者は、ボセンタンで治療された日本人の肺高血圧患者の検体を用いて、マイクロアレイを用いた網羅的な検討により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。また、異なる集団から得られた検体を用い、その妥当性を検討した。

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、エンドセリン受容体拮抗薬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、将来の肺高血圧症に対する個別化医療の確立という観点から臨床的な意義が大きい。

また、本研究は、ボセンタンによる肝機能障害にコンドロイチン硫酸のN-アセチルガラクトサミン残基に、硫酸基を転移する反応を触媒する酵素であるコンドロイチン 6-O-硫酸転移酵素-1 とコンドロイチン-4-O-硫酸転移酵素-3 が関与する可能性を示し、ボセンタンによる肝機能障害の全く新たな発症機序の解明につながり得る重要な研究である。

以上より本論文は博士（薬学）として適当と判定する。