

タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化に向けて

斎藤嘉朗[#], 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌

Toward acceleration of drug development with proteomic and metabolomic biomarkers

Yoshiro Saito[#], Keiko Maekawa, Kosuke Saito, Yoji Sato, Takayoshi Suzuki

Biomarkers, reflecting disease states or predicting/assessing drug efficacy or adverse reactions, are expected to play pivotal roles in effective drug development and promoting proper usage of drugs. To accelerate biomarker identification and usage, administrative guidance can direct to design appropriate exploration, validation and utilization studies and show examination procedures. However, very limited number of guidance or its draft were released from Japanese, US and European regulatory authorities so far. From 2012, we have been conducting proteomic and metabolomic studies using blood and urine samples from human and rat, in order to establish draft guidance for sampling/storage of these biofluid and for extrapolation of biomarker candidates from animals in the non-clinical to humans in the clinical studies. The results are still partial and the rest of the analysis is ongoing. However, we developed sensitive proteomic system for urine and found large inter-sex differences in the proteomic profiles of rat. In addition, matrix-, sex- and generation-differences were also observed in the metabolite levels in human blood, some of which showed over 2-fold differences. We continue this regulatory science studies for contribution to accelerated novel biomarker findings and its usage by generation of the draft guidance.

Keywords: Biomarker, Biofluid, Drug development, Metabolomics, Proteomics

はじめに

バイオマーカーは、「客観的に測定され、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療の処置に対する薬理学的反応の指標」と米国のバイオマーカー定義ワーキンググループにて定義されている¹⁾。臨床的な最終評価指標を、早期に、簡便に、かつ頑健に反映するサロゲート（代替え）マーカーとしての利用が医薬品開発において始まっている。疾患の状態や医薬品の有効性確保および安全性向上のための指標となり、医薬品開発が効率化されるため、バイオマーカーを利用した世界の臨床試験年間登録数は急増している²⁾。さらに医薬品の市販後においても、各患者における有効性を最大限に確保し、副作用を最小限に抑え

るために、その利用が期待されている。重篤な副作用は死亡や重い後遺症につながることもあり、バイオマーカーの診断費用を含めても医療経済学的に有用との研究結果もある³⁾。

バイオマーカー自体は、新しい概念ではなく、例えば肝障害におけるアラニンアミノトランフェラーゼ (ALT) や腎障害におけるクレアチニンなど、古くから用いられているものも多い。しかし臓器障害がある程度重篤になってからしか上昇が見られない、または臓器特異性が低いなど、問題が多いマーカーも使われており、臨床現場では問題となっている。そのため、より早期に軽症の段階で検出しようとする新規バイオマーカーの探索が活発に行われている。

バイオマーカーとしては、遺伝子多型やmRNAレベル等のゲノムバイオマーカーに関する検討が多くなされており、近年ではマイクロRNAも注目されている。しかし、遺伝子多型に関しては、ヒトに固有であり、一部の代謝酵素等を除いて非臨床試験段階で検討することは難しく、臨床試験段階で初めて十分なデータが得られる

[#] To whom correspondence should be addressed:

Yoshiro Saito; Division of Medicinal Safety Science, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9528; Fax: +81-3-3700-9788; E-mail: yoshiro@nihs.go.jp

ため、医薬品開発の初期から利用することは難しい。一方で、血液や尿などの体液に含まれるタンパク質⁴⁾や内在性代謝物⁵⁾は、種差が報告されている分子が一部存在するものの、非臨床で用いられる動物から、臨床におけるヒトへの外挿は、多くの場合、理論的に可能と考えられる。

1. バイオマーカーとしての要件

医薬品開発において有用なバイオマーカーは、

- 1) 種差なく共通して変化し、非臨床から臨床への外挿が可能、
- 2) 疾病や医薬品の有効性および安全性と、その早期段階から感度・特異度高く相関、
- 3) 食事や運動等の環境要因を含め、目的とする要因以外による影響を受けにくい、

ものと考えられる。さらにバイオマーカーを適切に評価するためには、正確度および精度高く測定することが必要であり、これには

- 4) 生体試料を測定する機器や方法（バイオアナリシス）の要件
- 5) 測定する試料の品質に関する要件

も重要となる。しかしバイオマーカーの利用はまだ緒に就いたばかりであり、各製薬会社はその利用方法を模索している状態である。

2. 行政的な動向

各国の規制当局である日本の厚生労働省/医薬品医療機器総合機構、米国・食品医薬品庁（FDA）、欧州・医薬品庁（EMA）もバイオマーカーについては注目しており、その積極的な利用を促進するため、いくつかのガイダンス等が公開されている。しかし、そのほとんどはゲノムバイオマーカーを対象にしており、タンパク質や内在性代謝物は対象外となっているものが多い。また、手続きに関する記載が多く、評価要件など技術的なものは少ない。

ゲノムバイオマーカーに関しては、その定義を「正常な生物学的過程、発病過程、及び／または治療の介入等への反応を示す指標となる、DNAもしくはRNAの測定可能な特性」としたゲノム薬理学における用語集について（ICH E15）⁶⁾を始め、ゲノムデータの申請方法（FDA）⁷⁾、バイオマーカーと診断法の同時開発（EMA）⁸⁾、臨床試験の研究デザインやデータ解析方法（EMA, FDA）^{9, 10)}、薬物動態解析におけるゲノムバイオマーカー利用のスキーム（EMA）¹¹⁾、医薬品の製造販売後監視におけるゲノムバイオマーカー利用の課題（EMA）¹²⁾、試料採取や保管・測定法・データ処理（EMA, FDA）^{13, 14)}、に関するガイダンス（または案、コンセプトペーパーやリフレク

ションペーパーを含む）が公開されている。

一方、タンパク質や内在性代謝物に関するガイダンスは、ほとんど無い。適格性確認のための資料における用法の記載要領、構成及び様式を定めた「医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー（ICH E16）」¹⁵⁾はゲノム以外のバイオマーカーを明示的には適用範囲としていないが、この文書に記載される原則は、タンパク質等の他のバイオマーカーについても適用可能としている。これ以外には、組織学的知見を陽性対照としたFDAの概要的ガイダンス案¹⁶⁾しかなく、実データを反映した明確な評価要件がないため、その探索・検証・利用は個別に模索している状態である。

このようにバイオマーカーの有用性を担保するための評価要件が確立していない状況では、不適切な試料の利用や不的確なバイオマーカーの利用により、かえって医薬品開発の遅延や混乱を招く可能性がある。今後は、ゲノム同様、タンパク質や内在性代謝物に関する、測定試料の品質要件を始めとする多くのガイダンスを策定する必要がある。しかし、その策定の基礎となるデータは非常に乏しいのが現状である。

3. 体液中のタンパク質および内在性代謝物をバイオマーカーとする場合の、ガイダンス案策定に向けて

3-1. 研究班の目的、構成と期待される成果

平成24年度より厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究（研究代表者：斎藤嘉朗，研究分担者：熊谷雄治（北里大学），鈴木孝昌，前川京子）」が開始された。本研究は、血液・尿中のタンパク質および内在性代謝物バイオマーカーの医薬品開発における利用を促進するための評価要件案作成の一環として、特に問題となる測定用試料の採取条件、および非臨床動物で見出されたバイオマーカーのヒトへの外挿性に関する評価要件案の作成を最終目標として、1) バイオマーカーの開発動向調査、2) 測定用血液・尿の採取等に関する要件の明確化、3) 動物モデルおよびヒト試料を用いた外挿性に関する実践的検討と、注意すべき評価要件の明確化、等を行うものである（図）。本研究の遂行により、血液・尿中のタンパク質および内在性代謝物バイオマーカーの測定用試料採取、および非臨床試験から臨床試験への外挿に関する評価要件案が作成され、ガイダンス等として発出されると、本邦におけるバイオマーカーの開発および利用推進につながり、医薬品開発を効率化して新薬創出の増加に結びつくと期待される。またこれら試料採取に関する要件案および非臨床から臨床への外挿に関する評価要件案は、世界的にも例がなく、国際的にも



図 研究の背景、目的と計画

貢献できる研究である。

3-2. 研究の進捗状況

現在、三年計画の一年目が終了した段階であるが、下記の成果を挙げている。

3-2-1. バイオマーカーの開発動向調査

開発動向としては、腎障害マーカーとして尿中Kim-1等の新規バイオマーカーが有用であることが報告されている¹⁷⁾。さらにタンパク質マーカーとしては、抗がん剤ゲムシタビンによる重篤な血液毒性(好中球減少および血小板減少)の発症と血中のハプトグロビンのレベルが有意に相関すること¹⁸⁾、血清中のアポリポ蛋白タンパク質Eのレベルが89%の正確性で薬物性肝障害患者と健常人を区別すること¹⁹⁾等が報告されている。代謝物マーカーとしては、薬物性肝障害に関して、血中ALT+γ-グルタミルシトルリンのレベルがマーカーとなりうること²⁰⁾、急性腎障害患者の血清を対象とした研究でアシカルニチンや数種のアミノ酸レベルの増加、リゾホスファチジルコリンの減少²¹⁾が報告されている。

3-2-2. プロテオミクス解析による尿中タンパク質に関する検討

ショットガンプロテオミクス法では、トリプシン消化後にタンパク質およびペプチド混合試料を、液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)で分析するが、尿中に

は高発現量のタンパク質があり、そのため微量のタンパク質は検出できない²²⁾。そこで、雄ラット尿を用いて、有機溶媒による簡便な高発現タンパク質の除去に関する前処理条件の検討を行った。収率は低くなるものの高発現のタンパク質を効率的に除去し、低濃度のタンパク質を中心に一回の分析で700種以上を同定しうる系を構築した。これを用いて、ラット尿中のプロテオーム解析を行った。雌雄間の比較では、予想されたように差が認められ、特に雌雄のいずれかのみで発現が認められるタンパク質が、同定タンパク質数の約1/3程度を占めた。食事影響については、比較的小さいものであった。従って、非臨床試験に用いるラットの尿を対象としたタンパク質バイオマーカーの探索と候補の選択に当たっては、性差を十分考慮に入れる必要があると示唆された。一方、食事影響については、重要でないと考えられた。

さらに平成25年度の解析としては、高齢群の一部の個体において、ばらつきの原因となる高発現量のタンパク質の存在が明らかとなり、注意が必要であることが示唆されている。

3-3. メタボロミクス解析による血中内在性代謝物に関する検討

内在性代謝物は親水性の高いもの(糖リン酸や核酸等)から低いもの(リン脂質やトリアシルグリセロール等)まで、その分子論的な性質は多様である。このため、現在の技術では一つの方法で全ての種類の内在性代謝物を

測定することは不可能であり、複数の方法を組み合わせる必要がある。本研究では、大きく親水性代謝物と疎水性代謝物に分類し、前者はLC/MSとガスクロマトグラフ質量分析計にて、後者はLC/MSにて、カラム等の条件を変えて測定を行った。

まず絶食後のヒト血液試料に関し、内在性代謝物濃度への採取・背景条件（性別、年齢、血漿・血清）および保管条件（凍結融解）の影響を、網羅的に明らかにした。測定可能であった代謝物数は、約550種である。血漿と血清間の比較では、親水性および疎水性代謝物共に、血液凝固に関係する代謝物群などの一部分子種で、そのレベルが血漿・血清間で大きく異なることが明らかになった。2倍以上のレベル差を示した代謝物数は、若年男性、老年男性、若年女性、老年女性のいずれの群でも30種程度で、親水性代謝物が多かった。

男女差に関しては、有意なレベル差のある代謝物が、老年よりも若年で多く認められた。若年ではアミノ酸類が男性において、脂肪酸類が女性において有意に高いレベルを示した。また年齢にかかわらず、女性でスフィンゴミエリンレベルが有意に高い傾向を示した。男女間で2倍以上の差があった代謝物は、若年血漿、老年血漿、若年血清、老年血清で、それぞれ数種であった。

年齢（30歳程度と60歳程度）に関しては、レベルに有意な差のある代謝物は、男性よりも女性で多く認められた。女性では、黄体ホルモン代謝物等が若年において、胆汁酸代謝物やトリアシルグリセロール等が老年において有意に高いレベルを示した。若年・老年間で2倍以上の差があった代謝物は、男性血漿、男性血清、女性血漿、女性血清で、それぞれ10種程度であった。

さらに若年男性の血漿と血清に関し、凍結融解回数（2回と10回）による相違について検討を行った。凍結融解を繰り返した場合、親水性代謝物では、血清と比べ血漿で大きなレベルの変化が認められる分子種が多かった。一方、疎水性代謝物では、血漿・血清ともに、ほぼすべてのリン脂質分子種等で、20-30%程度のレベル減少が認められた。

以上の結果、健常人というバックグラウンドレベルで、各条件につき2倍以上の差が認められた代謝物は、バイオマーカーの探索・診断の際に十分注意すべきであると考えられた。また、臨床におけるバイオマーカー診断に際しては、検体を選択することは不可能であり、検体間において普遍的なバイオマーカーが求められる。したがって、内在性代謝物をバイオマーカーとして測定する際には、1) 血液試料として、血漿・血清のいずれでも利用可能だが、親水性代謝物の場合は凍結融解の影響を考慮すると血清が望ましく、疎水性代謝物の場合は、血液凝固過程の影響を受けにくい血漿が望ましいこと、

2) 検出率が高く、試料背景間および各試料背景内における差異の小さい代謝物をバイオマーカーとして選択すること、3) 以上を満たせない場合には、これら背景の差異に対して、病気や薬剤反応性などによる差異が相対的に大きい代謝物（程度については、今後、検討予定）を選択すべきであること、が示唆された。

4. 研究の将来展望

今後は、健常ラットと健常人におけるタンパク質および内在性代謝物レベルの相違（外挿性）について検討を行う予定である。さらに、特定の副作用に関し、ラットのモデル系と副作用患者の試料を比較して、副作用マーカーの外挿性を検討する。

これらの知見を基に、バイオマーカーの測定用試料採取、および非臨床試験から臨床試験へのバイオマーカーの外挿に関する血液・尿中バイオマーカーの評価要件案を作成する予定である。

5. おわりに

総合科学技術会議は平成25年4月17日の会議で、「個別化医療の世界的研究開発競争における日本の出遅れ、および創薬力の低下」を指摘している。本邦におけるバイオマーカー探索・同定とその医薬品開発への応用の早期実現は、まさに待ったなしの状況である。本研究の遂行によるガイダンス案の作成は、バイオマーカー評価の一部ではあるが、国としての基準を示すものとなり、本邦におけるバイオマーカー開発とその利用を通じた医薬品開発の活性化につながると期待される。今後とも医薬品の品質、有効性および安全性を確保するための研究機関として、医薬品の開発と適正使用の推進に向けた適切な規制のための研究という社会的な役割を十分に果たしていきたい。

謝辞：本研究の成果は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究」（H24-医薬-指定-028）によるものである。

引用文献

- 1) Biomarkers Definitions Working Group.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89-95 (2001).
- 2) Phillips, K.A., Van Bebbber, S. and Issa, A.M.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 463-9 (2006).
- 3) Dong, D., Sung, C., Finkelstein, E.A.: *Neurology.* 79, 1259-67 (2012).
- 4) Feng, Z., Prentice, R. and Srivastava, S.: *Pharma-*

- cogenomics*. 5, 709-19 (2004).
- 5) Kell, D.B.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7, 329-33 (2007).
 - 6) ゲノム薬理学における用語集. 薬食審査発第0109013号, 薬食安発第0109002号, 平成20年1月9日
 - 7) Pharmacogenomic Data Submission. FDA, March 2005.
 - 8) Reflection paper on co-development of pharmacogenomic biomarkers and Assays in the context of drug development (Draft). EMA/CHMP/641298/2008, 24 June 2010.
 - 9) Reflection paper on methodological issues associated with pharmacogenomic biomarkers in relation to clinical development and patient selection (Draft). EMA/446337/2011, 9 June 2011.
 - 10) Clinical Pharmacogenomics: Premarket Evaluation in Early-Phase Clinical Studies and Recommendations for Labeling. FDA, January 2013.
 - 11) Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/37646/2009, 12 December 2011.
 - 12) Concept paper on key aspects for the use of pharmacogenomic methodologies in the pharmacovigilance evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/917570/2011, 15 December 2011.
 - 13) Reflection paper on pharmacogenomic samples, testing and data handling. EMEA/CHMP/PGx-WP/201914/2006, 15 November 2007.
 - 14) Pharmacogenomic Data Submission-Companion Guidance (Draft). FDA, August 2007.
 - 15) 医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発における バイオマーカー: 適格性確認のための資料における用法の記載 要領, 資料の構成及び様式. 薬食審査発0120第1号, 薬食安発0120第1号, 平成23年1月20日.
 - 16) Use of histology in biomarker qualification studies (Draft). FDA, December 2011.
 - 17) Fuchs, T.C. and Hewitt, P.: *AAPS J.* 13, 615-31 (2011).
 - 18) Matsubara, J., Ono, M., Negishi, A., Ueno, H., Okusaka, T., Furuse, J., Furuta, K., Sugiyama, E., Saito, Y., Kaniwa, N., Sawada, J., Honda, K., Sakuma, T., Chiba, T., Saijo, N., Hirohashi, S. and Yamada, T.: *J. Clin. Oncol.* 27, 2261-8 (2009).
 - 19) Bell, L.N., Vuppalanchi, R., Watkins, P.B., Bonkovsky, H.L., Serrano, J., Fontana, R.J., Wang, M., Rochon, J., Chalasani, N.; US Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) Research Group.: *Aliment Pharmacol. Ther.* 35, 600-12 (2012).
 - 20) Soga, T., Sugimoto, M., Honma, M., Mori, M., Igarashi, K., Kashikura, K., Ikeda, S., Hirayama, A., Yamamoto, T., Yoshida, H., Otsuka, M., Tsuji, S., Yatomi, Y., Sakuragawa, T., Watanabe, H., Nihei, K., Saito, T., Kawata, S., Suzuki, H., Tomita, M. and Suematsu, M.: *J Hepatol.* 55, 896-905 (2011).
 - 21) Sun, J., Shannon, M., Ando, Y., Schnackenberg, L.K., Khan, N.A., Portilla, D., Beger, R.D.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 893-4, 107-113 (2012).
 - 22) Decramer, S., Gonzalez de Peredo, A., Breuil, B., Mischak, H., Monsarrat, B., Bascands, J.L. and Schanstra, J.P.: *Mol. Cell. Proteomics.* 7, 1850-62 (2008).