

201010001A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討
および予測評価試験系の開発研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横井 毅

平成23(2011)年5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討

および予測評価試験系の開発研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討および予測評価試験系の
開発研究

横井 毅 ----- I

II. 分担研究報告

1. ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の影響

横井 毅 ----- 1

2. 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価

横井 毅 ----- 17

3. ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響

横井 毅 ----- 43

4. プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明

横井 毅 ----- 57

5. ヒト肝臓における PPAR α の microRNA による発現制御

中島美紀 ----- 87

6. ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御

中島 美紀 ----- 111

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 133

VI. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 137

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討

および予測評価試験系の開発研究

平成 22 年度 総括研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 23 (2011) 年 5 月

特異体質性薬物誘導性肝障害のバイオマーカーの検討および
予測評価試験系の開発研究

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

医薬品の開発や安全な使用を妨げる最大の課題は、予測が困難な毒性・副作用の発現にあると言っても過言ではない。創薬は定めた薬効標的に対する効果の評価により進められ、同時に細胞系や実験動物を用いた副作用回避の研究が行われる。しかし、薬物動態関連因子の大きな種差と個人差に起因する毒性・副作用発現により、優れた医薬品であってもその開発途中で断念や、臨床試験中の副作用発現など患者への不利益がもたらされる。これは適切な副作用発現予測系が欠如しているために生じる。肝臓は薬を解毒する最も主要な臓器であるが、薬物代謝酵素等は、薬を解毒する共に、代謝的活性化と称する反応により、毒性代謝物に変換される反応をも触媒する 경우가少なく無いために、最も薬の毒性を受けやすい臓器でもある。また、重篤な副作用を引き起こす反応性代謝物の生成や副作用に直結する薬物動態の変動など、その予測法は確立されていないことは特筆に値する。特にこれら因子は個人差が大きく、小規模臨床試験では検出するのが困難なため、大規模臨床試験によって初めて見られることが患者保護と企業経営上の問題を大きくする。本研究では、医薬品の毒性発現機構の解明に基づいて、薬物誘導性の肝障害のバイオマーカーの検討および予測試験系の開発研究を遂行し 3 年目に至った。最終年である本年は、海外学会誌英文原著論文 13 編を発表することができ、当初の予定以上の成果を得ることができた。

本報告書の後半には、原著論文を印刷したものを添付してある為に、詳しい分担報告書としての掲載は割愛した。分担研究報告書には、まだ論文発表にはなっていないものの、一定の研究結果を得られた内容について、以下の 6 項目について報告するものである。

(1) ジクロフェナク (DIF) 誘導性肝障害における免疫学的因子の影響；本研究では、臨床で高い頻度で使用され、稀に重篤な肝障害を惹起するこ

とが知られている DIF 誘導性肝障害における免疫学的因子の関与について明らかにすることを目的として検討した。その結果、DIC 投与マウスにおいて血漿中 ALT 値および AST 値の上昇が認められ、薬物投与 24 時間に最も高値を示した。また、肝細胞壊死および肝組織への好中球の浸潤が認められた。肝臓中における免疫学的因子の mRNA 発現変動を解析した結果、IL-1b、IL-6、macrophage inflammatory protein (MIP) -2 および monocyte chemoattractant protein (MCP) -1 などの様々な炎症性サイトカインおよびケモカインの発現上昇が認められた。また、Th17 への分化に関与する転写因子である retinoid-related orphan receptor (ROR) - γ t の発現上昇および、Th1 分化に関与する転写因子である T box expressed in T cells (T-bet) の発現低下が認められた。さらに、ハロタンなどの薬物誘導性肝障害への関与が明らかにされている IL-17 のタンパク質量の増加が認められた。以上より、DIC 誘導性肝障害において様々な免疫学的因子が発現変動すること、その中でも IL-17 を初めとする Th17 因子の関与が示唆された。

(2) 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価；本研究においては、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いて代謝的活性化を考慮した *in vitro* 試験系を構築し、反応性代謝物による免疫学的因子の活性化について評価した。その結果、肝障害を惹起する報告のある 10 種の薬物について検討した結果、アルベンダゾール、アミオダロン (AMD) および代謝物であるデスエチルアミオダロン (DEA) 処置において、CYP3A4 による CD 発現量の有意な増加が認められた。AMD 処置 24 時間後の DEA およびその代謝物であるジデスエチルアミオダロン (DiDEA) 生成量を HPLC により定量した結果、AMD の約 40% が DEA に、約 1.3% が DiDEA に代謝されていることを明らかとした。また、AMD および DEA 処置により、TNF α および IL-8 の mRNA 発現量およびタンパク質産生量を測定した結果、CYP3A4 存在下において処置濃度依存的な増加が認められた。以上、AMD などの肝障害性薬物について、CYP3A4 による代謝的活性化を介した免疫反応の活性化が示唆されたことより、本試験系は *in vitro* において代謝的活性化による免疫反応の関与を評価し得る手段となると考えられた。

(3) ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響；本研究は、女性において重篤な肝障害発症が多く認められる原因を解明することを目的としたものである。全身麻酔薬であるハロタン (HAL) は約 20%以上の患者に軽度な肝障害を引き起こし、さらに稀に重篤な肝障害を引き起こすことが知られている。また、HAL 誘導性肝障害発症のリスクファクターの一つに女性が挙げられ

ており、実際に臨床における肝障害報告は女性が多い。近年 HAL 誘導性肝障害モデルを再現できるマウスモデルが開発され、ヒトと同様に雄性マウスと比較して雌性マウスで重篤な肝障害発症が認められることが報告されている。女性で重篤な肝障害発症が多いメカニズムを解明するために、女性ホルモンであるエストロゲン (E2) とプロゲステロン (Prog) が HAL 誘導性肝障害に与える影響について主としてマウスを用いて検討した。その結果、HAL 誘導性肝障害に対して E2 投与による肝障害減弱作用および Prog 投与による肝障害悪化作用が認められた。これらの作用は HAL の活性代謝物である TFA と肝臓中タンパク質とのアダクト形成には変化を示さず、HAL 投与後の炎症反応を介して肝障害の程度に影響を及ぼすことを示した。さらに、E2 および Prog は E2 レセプターおよび Prog レセプターを介して免疫反応を調節し、肝障害の程度を変化させることが示された。続いて、このメカニズムの解明を目的として次の

(4) プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明について検討した。その結果 HAL だけでなく他の肝障害性化合物においても Prog 投与による肝障害悪化作用が認められ、これらは CXCL1 を初めとする免疫因子の活性化を介していることを見出した。さらに、これらの免疫因子の活性化には ERK 経路の活性化や、クッパー細胞が関与し、Prog による肝障害悪化に寄与していることが示された。また、Prog レセプターのアンタゴニストを肝障害惹起後に投与した際にも、HAL 誘導性肝障害を減弱させることを示した。本研究では、女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の程度に影響を与えることを示した。また、Prog が ERK 経路やクッパー細胞を介して薬物誘導性肝障害の悪化に寄与することを初めて明らかにし、これらの女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の性差メカニズムの一因になりうる可能性を示した。さらに、肝障害惹起後の RU 投与により肝障害減弱が認められたことから、薬物誘導性肝障害に対する新たな治療手段になりうることを期待された。

(5) ヒト肝臓における Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の microRNA による発現制御: 本研究は、ヒト肝臓における PPAR α の発現調節に microRNA が関与する可能性を検討したものである。PPAR α mRNA の 3'-非翻訳領域に結合し得る microRNA を探索し、肝臓に高く発現する 6 つの microRNA について検討した。その中で miR-21 および miR-27b の過剰発現とノックダウンにより PPAR α タンパク質発現量が有意に減少および増加することを明らかにした。PPAR α mRNA 発現量は変化しなかったことから、miR-21 と miR-27b は翻訳抑制により PPAR α の発現を制御していることが示唆された。また、PPAR α の下流遺伝子である acyl CoA synthetase の発現にも影響を及ぼすことを示した。さら

に、ヒト個人肝試料を用いた相関解析において、PPAR α タンパク質と mRNA の間に正の相関が認められず、転写後調節の関与が支持された。また、PPAR α タンパク質発現量および翻訳効率 は miR-21 発現量と逆相関を示したが、miR-27b とは示さなかった。従って、ヒト肝臓における PPAR α の発現制御に対して miR-21 が大きく寄与している可能性が示された。

(6) ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御：本研究では、ヒト CYP2E1 の発現調節に miRNA が関与するか検討した。CYP2E1 mRNA の 3'-UTR に miR-378 が結合する領域 (MRE378) を見出し、MRE378 に対して miR-378 が機能的に作用するかをルシフェラーゼアッセイにより検討し、その結果 MRE378 が miR-378 により認識され、発現制御に機能的に働いていることが示された。また、3'-UTR を含むまたは含まない CYP2E1 安定発現 HEK293 細胞を構築することで、CYP2E1 タンパク質発現量への miR-378 の影響を検討した。3'-UTR を含む CYP2E1 安定発現細胞株においてのみ、pre-miR-378 導入による CYP2E1 タンパク質発現量の低下が認められた。このことから、MRE378 を含む 3'-UTR の存在が miR-378 による CYP2E1 の発現抑制に重要な役割を果たしていることが示された。次に、miR-378 による CYP2E1 発現調節が実際にヒト肝臓中에서도起きている事象であるか、25 検体のヒト個人肝における CYP2E1 mRNA とタンパク質発現量および酵素活性、mature miR-378 発現量の相関関係を調べることで評価した。CYP2E1 mRNA 発現量とタンパク質発現量との間には正の相関関係が認められず、また、miR-378 発現量と CYP2E1 タンパク質発現量および CYP2E1 翻訳効率との間に有意な逆相関が認められたことから、miR-378 による翻訳抑制がヒト肝における CYP2E1 の常在的な発現に寄与していることが示された。未解明であった CYP2E1 の転写後調節機構に対して、miRNA による翻訳抑制機構を新たに提唱することが出来た。miR-378 による CYP2E1 の発現制御は、ヒト肝における CYP2E1 発現量の個人差を引き起こす要因の 1 つとして考えられた。以上の 6 項目の検討は、いずれも研究内容を論文にまとめる段階にあり、一部については、論文投稿中であり、今後報告内容の全ての項目について速やかに英文論文とする予定である。以上、すでに論文として本冊子に報告してある内容については割愛し、上記の 6 項目について本報告書にて報告する。

分担研究者：金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授 中島美紀

A. 研究目的

ヒトに初めて投与される開発候補薬や、市販後に多くの患者に投与されて初めて重篤な薬物誘導性臓器障害、特に肝障害が発現する場合は現在でも多く報告されており、創薬の大きな障害となっている。本研究では、薬物誘導性肝障害のメカニズムの解明と予測試験系の構築とその評価を目的として研究を継続してきた。分担研究書に記載の6項目の各研究目的を以下に述べる。

(A-1) ジクロフェナク (DIF) 誘導性肝障害における免疫学的因子の影響；ジクロフェナクは非ステロイド性消炎鎮痛剤の一種であり、解熱鎮痛薬として臨床で広く用いられている。その作用機序は主としてアラキドン酸代謝におけるシクロオキシゲナーゼの活性を阻害することにより、炎症や疼痛などに関与するプロスタグランジンの合成を阻害すると考えられている。ジクロフェナクは副作用として消化管潰瘍やうっ血性心不全などが挙げられ、長期服用した場合には多くの患者にこれらの症状が認められる。また、ジクロフェナクは肝障害を引き起こすことが知られており、軽度または無症候性な症例を含めると約15%の患者において血清中のトランスアミナーゼの上昇が認められること、さらに稀に重篤な肝障害を惹起することが報告されている。これまでにジクロフェナクによる肝障害の発症機序に関しては、様々なメカニズムが提唱されている。例えば、ジクロフ

ェナクはCYP2C9により主代謝物である4-hydroxy diclofenacを生成するが、他にもCYP3A4により5-hydroxy diclofenacも生成する。これらの代謝物はそれぞれキノニンミン体を生成することにより、タンパク質との共有結合の形成および酸化ストレスを引き起こすと考えられている。また、*in vivo*動物モデルを用いた検討については、acyl glucuronideを肝臓から胆汁中へ排出するトランスポーターであるMrp2/Mrp3/Bcrp1をノックアウトしたマウスや、アデノウイルスを用いてγ-Glutamylcysteine synthetase (γ-GCS) をノックダウンしたラットでは、ジクロフェナクによる肝毒性の影響を受けやすくなることが報告されており、Diclofenac acyl glucuronideの肝臓内での蓄積やGSHによる解毒反応も肝障害に関与すると考えられている。一方で、ラットに対しLipopolysaccharide (LPS) とジクロフェナクを併用投与すると肝障害の増悪が認められること、およびジクロフェナクの服用により肝障害を発症した患者において、肝細胞壊死、血中における自己抗体の検出、肝組織へのリンパ球の浸潤および炎症を伴う場合が多く認められることから、ジクロフェナク誘導性肝障害に免疫学的因子を介した反応が関与することが疑われているが、その機序については未だに明らかにされていない。本研究はジクロフェナク誘導性肝障害の発症に対する免疫学的因子の関与について明らかにすることを目的として検討を行った。

(A-2) 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価；

Vignati ら (2005) は、CYP3A4による代謝

的活性化を評価する系として、HepG2細胞の細胞障害性を指標とした*in vitro*評価系を構築した。当研究室においても、パキウウイルス発現系またはアデノウイルスを用いたCYP3A4による代謝的活性化を評価する試験系を構築してきた。しかし、いずれも代謝的活性化を介した直接的な細胞障害性は評価可能であるが、免疫反応に関しては検討することは困難である。Cosgrove ら (2009) は、肝障害性薬物と炎症性因子 (外毒素であるLPS、炎症性サイトカインであるTNF α など) の同時暴露により、ヒトまたはラット初代培養肝細胞とヒト肝癌由来HepG2細胞を用いて細胞毒性を評価している。この評価系では、肝障害性薬物と炎症性因子の相乗効果について検討することが可能であるが、肝障害性薬物が直接的に免疫担当細胞を活性化しているか否かを判別することはできない。

薬物や化合物による免疫反応を評価するヒト*in vitro*試験系としては、ヒトの末梢血から単離した単核球やT細胞、B細胞などを用いることが多い。しかし、ヒト末梢血から調製する試料の使用では、ロット間の個体差や、コストの問題が生じるため、*in vitro*の大規模スクリーニングには適さない。近年、このような問題を回避した*in vitro*評価系として、ヒト単球系細胞株の有用性が注目されている。ヒト単球系細胞株は、単球やマクロファージ、骨髄球などの免疫担当細胞における分化や活性化のメカニズム解明に頻用されている細胞株である。これまでに市場から撤退した薬物である抗凝固薬キシメラガトランまたは糖尿病治療薬トログ

リタゾンの暴露により、ヒト急性単球性白血病細胞株であるTHP-1細胞の炎症性サイトカインやケモカインの産生が増加することが報告され、炎症反応活性化が肝障害の副作用に関与することが示された。また、当研究室においても、駆虫薬メベンダゾールおよび抗真菌薬テルビナフィンの暴露によりTHP-1細胞の炎症性サイトカインおよびケモカイン産生量が増加したことを報告した。しかし、これらの検討において代謝物の評価は検討しておらず、これまでに免疫学的な肝障害に関与する代謝的活性化を評価した報告はない。本研究では、代謝的活性化を介した反応性代謝物による免疫活性化を評価することを目的とした。初めに、THP-1細胞の免疫因子の変動を指標とし、活性代謝物による代謝的活性化を評価可能な試験系を構築し、様々な肝障害性薬物におけるCYP3A4による代謝的活性化の評価を行った。

(A-3) ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響：今日、DILIのリスクファクターの一つとして女性が挙げられている。女性は男性に比べ肝細胞障害型のDILI発症が有意に多いこと、米国において劇症化DILIが認められた患者の90%が女性であったこと、およびDILIが原因で肝移植を受けた患者の76%が女性であったことが報告されており、女性では肝移植や死亡を伴う劇症化の頻度が高いことが報告されている。また、米国ではDILIに限らず、急性肝障害患者の74%が女性であることや、アルコール性肝障害も女性において劇症化しやすいことが報告されている。これらの多くの報告

から、女性は重篤な肝障害を引き起こすリスクファクターであることが示唆されるが、その原因およびメカニズムについては不明である。

性周期においてエストラジオール (E2) やプロゲステロン (Prog) といった女性ホルモン濃度の周期的な変化を伴い、血中女性ホルモン濃度が免疫反応に影響を与えることが報告されている。これまでに *in vitro* でマウス腹腔マクロファージや慢性 C 型肝炎患者の末梢血単核球を用いた検討において、E2 処置による炎症性サイトカインやケモカイン産生の減弱および Prog 処置による産生増加が報告されている。また、E2 に関しては広く研究され、肝虚血再灌流障害や出血性ショックによる肝障害に対して E2 が肝保護的に働くことが報告されているが、Prog と肝障害の関連性についてはほとんど研究されていない。以上のように、女性ホルモンが肝障害に影響することが示唆されているが、現在までに女性ホルモンと DILI との関連性について検討した報告はない。

吸入型全身麻酔薬である Halothane (HAL) は軽度なもの、または無症候性の症例を含めると 20 %以上の患者において血清中トランスアミナーゼの上昇が起こること、さらに約 10,000 人に 1 人の割合で劇症化が生じることが報告されている。また、HAL 誘導性肝障害は男性に比べ女性での肝障害発症例 (男性: 女性 = 1: 2) が多いことも報告されている。TFA-adduct 生成は肝障害を引き起こさない実験動物においても認められており、adduct 生成以降に存在するメカニズムが肝障害の原因として重要であることが示唆されてい

る (Feng et al., 2009)。近年の報告において、HAL 誘導性肝障害発症に好中球や、NKT 細胞および Th17 などの様々な免疫因子の活性化が関与することが明らかにされている (You et al., 2006; Kobayashi et al., 2009; Cheng et al., 2010)。女性で重篤な肝障害発症が多いメカニズムを解明するために、女性ホルモンである E2 と Prog が HAL 誘導性肝障害に与える影響について主としてマウスを用いて検討した。

(A-4) プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明について; 一般に DILI のリスクファクターの一つに女性が挙げられており、臨床において男性に比べ、女性で DILI 発症率や重篤な DILI 患者が多いことが報告されている。前章での検討より、女性ホルモンである E2 および Prog が HAL 誘導性肝障害の程度に影響を及ぼすことが示された。E2 の肝保護作用については広く研究されているが、Prog と肝障害との関連性についてはほとんど報告されておらず、臨床で重篤な DILI 発症が女性に多いことのメカニズムについては不明のままである。本章では肝障害悪化作用の認められた Prog に着目し、HAL に加え Thioacetamide (TA)、Dicloxacillin (DCX) および ANIT を用いて、Prog による DILI 悪化のメカニズムを解明することを目的とした

(A-5) ヒト肝臓における Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の microRNA による発現制御:

Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属しているリガンド依存的な転写因子である。PPAR α は主に

肝臓に発現しており、その他にも腎臓、心臓、筋肉などにも発現が認められる。内因性リガンドとして脂肪酸やエイコサノイド、また外因性リガンドとしてフェノフィブラートやベザフィブラートといったフィブラート系薬剤が結合すると retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成する。このヘテロダイマーが fatty acid transport protein のような脂肪酸輸送に関わるタンパク質や、acyl CoA synthetase (ACS) のような脂肪酸の分解に関わるタンパク質などの標的遺伝子のプロモーター領域内に存在する PPAR α response element と呼ばれる特異的な DNA 配列に結合することで遺伝子の発現を上昇させる。加えて

UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A9 や UGT2B4 といった第 II 相薬物代謝酵素の発現も上昇させることが知られている。このように PPAR α は脂質代謝や異物代謝において中心的に働く遺伝子を制御する役割を担っている。

miRNA は薬物代謝酵素およびその発現を制御する転写因子の発現調節にも関与しており、薬物動態においても重要な因子であると考えられる。これまでに miRNA とヒト PPAR α の関係に関して、骨関節軟骨細胞において PPAR α の発現制御に miR-22 が関与すること (Iliopoulos et al., 2008) が報告されている。しかし肝臓における常在的な PPAR α の発現と miRNA の関係については不明である。本研究では、肝臓での PPAR α の発現調節メカニズムとして miRNA の関与の可能性を検討した。コンピューター解析により PPAR α の 3'-UTR に相補的な miRNA を探

索したところ、Targetscan

(<http://www.targetscan.org>) においては、miR-18a, miR-21, miR-22, miR-24, miR-27b など計 28 種の miRNAs が候補として挙げられた。Pictar

(http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_ve rtebrate.cgi) では 9 種の miRNAs が挙げられた。これらの中で肝臓において発現が比較的高い miR-21, miR-22, miR-24, miR-27b, miR-181a, let-7a (miRanda: <http://www.microrna.org/microrna/getMirnaForm.do>) について、ヒト肝臓での PPAR α の発現調節に関わる可能性を検討した。

(A-6) ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御

：CYP2E1 は主に肝臓に発現しており、肺や胎盤においても発現が認められる。CYP2E1 は比較的小さい化合物を基質とし、アセトアミノフェンやイソニアジドなどの薬物、エタノールやアセトン、四塩化炭素などの有機溶媒や、ニトロソアミン類などの癌原性物質など、数多くの化合物の代謝に関与し、薬理的だけでなく毒性学的にも極めて重要な P450 分子種の 1 つである。基質となるイソニアジドやエタノールにより CYP2E1 自身が誘導され、その代謝が促進することが知られている。ヒト P450 分子種のほとんどは、生体外異物や内因性物質により誘導されるが、それは化合物がリガンドとなり核内レセプターを活性化し転写を促進する、という転写レベルでの調節機構によるものである。しかし、CYP2E1 の誘導にはそのような核内レセプターは作用しない。CYP2E1 タンパク質の増加には、CYP2E1 mRNA の増加が伴わないと報告されており、

CYP2E1 誘導メカニズムとして、mRNA やタンパク質の安定化などの転写後調節が関与していることが示されている。ヒト肝臓中に発現する P450 タンパク質のうち、最も主要なものは CYP3A4 であり、全 P450 発現量の約 30% を占めることが広く周知されている。次いで、CYP2C (20%) と CYP1A2 (13%) が高く発現し、CYP2E1 は 4 番目に高い発現を示している (約 7%)。一方、mRNA 発現レベルで評価した場合では、CYP2E1 が最も高く、全 P450 発現量の 56% を占めていることが近年報告された。また Sumida ら (1999) は、ヒト肝臓サンプル 15 検体を用いた検討により CYP2E1 mRNA 発現量が、CYP2E1 のプロモーター領域であるクロルゾキサゾンの 6-水酸化酵素活性と正の相関を示さないことを報告している ($y = 0.000x + 1.744, r = 0.036$)。これらの報告から、CYP2E1 の常在的発現にも転写後発現調節メカニズムが関わっていることが考えられる。本研究では、CYP2E1 の転写後調節メカニズムとして miRNA の関与の可能性を検討した。最初に、コンピュータ解析により CYP2E1 の 3'-UTR に相補的な miRNA を探索した。miRBase Target database (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) を用いた解析においては、miR-378, -607, -223, -105 など計 24 miRNAs が候補として挙げられた。Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) を用いた解析では 6 miRNAs が挙げられ、両アルゴリズムに共通して予測された miRNA は miR-378 と miR-607 の 2 つであった。miR-607 は肝臓での発現が非常に低く、一方、miR-378 は肝臓で発現が認められ、CYP2E1 mRNA と最も高い相同性

(score 18.31 and energy -16.95) を示したことから、本研究では miR-378 に注目した。本研究では、ヒト CYP2E1 の発現調節における miRNA の役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(B-1) ジクロフェナク (DIF) 誘導性肝障害における免疫学的因子の影響 ;

ジクロフェナク誘導性肝障害モデルマウス作製は、Balb/cCrSlc マウス (雌性、8 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育後、ジクロフェナクを 50、80 および 120 mg/kg で単回腹腔内投与した。投与 6、12 および 24 時間後に、下行大静脈より採血を行い、同時に肝臓を採取した。マウスへのイブプロフェン投与は、Balb/cCrSlc マウス (雌性、8 週齢) を馴化飼育後、イブプロフェンを 120 mg/kg で単回腹腔内投与した。投与 24 時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った。血清中の生化学値や肝臓中の mRNA の発現量およびタンパク質発現量の測定は常法によって行った。以下の項目についても同様である。

(B-2) 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価 ;

CYP3A4 による代謝的活性化の検討は、 1×10^6 cells/mL の THP-1 細胞、CYP3A4 発現系マイクロソーム (CYP3A4 として 15 nM) および 1 mM NADPH となるように調製した溶液に被験薬を加え、24 well plate に 1 mL ずつ播種し培養した。FACS による CD86 および CD54 発現量の定量および細胞生存率の測定については細胞を 0.1% BSA を含む $1 \times$ PBS で 2 回洗浄した後、新しく用意した 1.5 mL チューブに FITC 標

識モノクローナル抗体 (抗ヒト CD86 抗体 (clone: Fun-1)、抗ヒト CD54 抗体 (clone, 6.5B5) および FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識マウス IgG1 κ アイソタイプコントロール (clone, MOPC-21)) を加え、そこに洗浄した細胞を分注し、4°C、暗所において 30 分間インキュベーションを行い、細胞染色を行った。その後、0.1% BSA を含む 1 × PBS で 1 回洗浄した後、FACS flow に PI (propidium iodide) を 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした溶液に懸濁し、フローサイトメトリーを用いて分析を行った。なお、CD 発現量の解析の際には死細胞はゲートにより取り除き、計 10,000 個の生細胞を解析した。CD86 および CD54 発現の指標として用いた相対発現量は算出式により計算した。

(B-3) ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響 : E2 および Prog 前投与 BALB/c マウスに対する薬物投与は、BALB/c マウス (雌性, 8 週齢 16~21 g; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) に E2 (0.3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ in olive oil, *s.c.*)、Prog (0.3 mg/mouse in olive oil, *s.c.*) を 7 日間連続投与し、最終投与 1.5 時間後に薬物を投与した。また、レセプターアンタゴニストを用いた検討では、E2 および Prog 投与 30 分前に ER アンタゴニストである ICI (50 $\mu\text{g}/\text{head}$ in olive oil, *s.c.*) および PR アンタゴニストである RU (50 $\mu\text{g}/\text{head}$ in olive oil, *s.c.*) を投与した。薬物は HAL (15 or 30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) または ISO (15 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) を投与し、投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

(B-4) プロゲステロンによる薬物誘

導性肝障害悪化メカニズムの解明に

ついて ; Prog 前投与 BALB/c マウスに対する薬物投与については、BALB/c マウス (雄性および雌性, 8 週齢 16~21 g; 日本 SLC) を用いた。薬物は HAL (15 or 30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*)、Iso (15 mmol/kg in olive oil, *i.p.*)、DCX (600 mg/kg in saline, *i.p.*)、ANIT (80 mg/kg in olive oil, *p.o.*) または TA (50 mg/kg in saline, *i.p.*) を投与した。各群 3~5 匹のマウスを使用した。HAL、Iso、ANIT および TA 投与群は投与 24 時間後に、DCX 投与群は投与 6 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。また、ANIT 投与群は投与前 18 時間絶食を行い、投与 2 時間後に給餌を再開した。

薬物および阻害剤処置については、RAW264.7 細胞を 1×10^5 cells/well になるように 12 well plate に 1 mL/well ずつ播種し、24 時間後に Prog (0.01、0.1 および 1.0 μM) を含む DMEM に交換した。また、同時に PR アンタゴニストである RU (1 μM) および ER アンタゴニストである ICI (1 μM) を、MAPK 阻害剤として ERK 活性化阻害剤である U0126、P38 活性化阻害剤である SB203580 および JNK 活性化阻害剤である SP600125 を各 1 μM 処置した。Prog 処置 24 時間と 48 時間後に細胞を回収した。HAL 投与マウスに対する RU 投与については、BALB/c マウス (雌性, 8 週齢 16~21 g) を用いた。RU 前投与の検討では、RU (50 $\mu\text{g}/\text{head}$ in olive oil, *s.c.*) を 7 日間連続投与し、最終投与 1.5 時間後に HAL (30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) を投与した。RU 後投与の検討では、HAL (30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) 投与 1 時間後に

RU (1 mg/kg in saline, *i.v.*) を投与した。いずれも HAL 投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

(B-5) ヒト肝臓における Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の microRNA による発現制御: Lipofectamine RNAiMAX を用いた reverse transfection により、HuH7 および HepG2 細胞に pre-miRNA または AsO を導入した。125 pmol の pre-miRNA または AsO を加えた FBS 非含有 DMEM 500 μ L に 5 μ L の Lipofectamine RNAiMAX を加え、室温で 20 分間インキュベートした。転倒攪拌した後、6 well 細胞培養用プレートに 1 well あたり 500 μ L ずつ添加し、HuH7 および HepG2 細胞を 2×10^5 および 5×10^5 cells/well となるように播種して 5% CO₂ 存在下 37°C で 72 時間培養した。acyl CoA synthetase (ACS) mRNA を測定する場合には、pre-miRNA および AsO を導入した 48 時間後に、メディウムを 100 μ M ベザフィプレートを含むメディウムに交換し、5% CO₂ 存在下 37°C でさらに 24 時間培養した。

(B-6) ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御: 本研究では、ヒト CYP2E1 の翻訳領域 (coding region) を含む発現プラスミド pTARGET/2E1 を作製した (Fig. 5B)。CYP2E1 の翻訳領域と 3' -UTR を含む発現プラスミド pTARGET/2E1+UTR (Fig. 5A) は以下の方法で作製した。I-2-3-2 で増幅させた PCR 産物 (+762 から +1667) を pTARGET ベクターに T4 ligase を用いて組み込み、DH5a コンピテントセルに形質転換した。このプラスミドと pTARGET/2E1 プラスミドを組み換えるために、*Xho* I と *Eco*R V で同

時に消化し、目的の DNA 断片を精製後、T4 ligase を用いて組み込み、DH5a コンピテントセルに形質転換した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、金沢大学動物実験指針に従って、承認を受けた後に行った。本研究で用いたヒト肝ミクロゾーム、ヒト肝 RNA などのヒト由来試料は、全て市販品として入手できるものを用いており、倫理委員会の申請対象とされないことを確認済である。

C. 実験結果

(C-1) DIF 誘導性肝障害における免疫学的因子の影響: ジクロフェナクを 80 および 120 mg/kg で投与した群の 24 時間後の血漿中 ALT 値および AST 値は対照群と比較して有意な上昇が認められた。また、イブプロフェン投与群では、120 mg/kg 投与においても血漿中 ALT 値および AST 値に変化は認められなかった。この結果から、以降の検討ではジクロフェナクの投与量を 80 mg/kg とした。ジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても、対照群と比較して血漿中 ALT 値および AST 値の有意な増加が認められた。投与 24 時間で最も高値を示した。ジクロフェナクを投与したマウスでは、肝組織におけるアポトーシスおよびネクローシス細胞が認められた。また、肝実質細胞に多数の MPO 陽性細胞の浸潤が認められた。対照群と比較してジクロフェナク投与マウスにおいて血漿中 IL-17 の有意な増加が認められた。T-bet はジクロフェナク投与後 6、12 および 24

時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な低下が認められ、投与時間依存的な低下を示した。ROR- γ t は対照群と比較して、ジクロフェナク投与 12 時間において増加傾向を示し、24 時間では有意な増加が認められた。IL-1 β はジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な増加が認められ、6 時間で最も高値を示し、その後は減少傾向を示した。IL-6 はジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な増加が認められ、時間依存的な増加を示した。MIP-2 はジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な増加が認められ、投与時間依存的な増加を示した。MCP-1 はジクロフェナク投与後 6 および 12 時間において有意な増加が認められ、24 時間においては有意ではないが増加が認められた。MCP-1 の発現量は投与時間依存的な増加を示した。CXCL1 はジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な増加が認められ、投与時間依存的な増加を示した。ジクロフェナク誘導性肝障害における IL-17 の関与を検討するために、rIL-17 を用いて、薬物投与 24 時間後の血漿中 ALT 値の平均値の結果を以下に示した。ジクロフェナク単独投与群と比較して rIL-17 併用投与により血漿中 ALT 値の増加が認められた。

(C-2) 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価；アミオダロン (AMD) およびデスエチルアミオダロン (DEA) 処置において、コント

ロールマイクロソーム処置群に比べて CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で CD54 発現量の有意な増加が認められた。アルベンダゾール処置において、コントロールマイクロソーム処置群に比べて CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で CD86 発現量の有意な増加が認められた。一方、その他の薬物ではコントロールマイクロソーム処置群と CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群の間に CD 発現量の顕著な変動は認められなかった。12 および 24 時間後において、溶媒処置と比較して AMD および DEA 処置による有意な CD54 発現量の増加が認められた。12 時間後において、AMD および DEA 処置による CD54 発現量は CYP3A4 発現系処置群により有意な変化は認められなかった。AMD および DEA 処置 IL-8 および TNF α の mRNA 発現量は AMD 処置によりコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において 6 時間後から 24 時間後まで有意に増加し、12 時間後において最も高値を示した。また、IL-8 タンパク質産生量は、AMD 処置によりコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において時間依存的に増加が認められ、24 時間後において最も高値を示した。TNF α タンパク質産生量は、AMD 処置によりコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において 6 時間から 12 時間後まで認められ、12 時間後において最も高値を示した。AMD 処置による炎症性サイトカインの増加は代謝物である DEA 処置による代謝的活性化の寄与が大きいと考えられた。AMD 処置により IL-8 および

TNF α 産生はコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において、濃度依存的な増加が認められた。20 μ M の AMD 処置により IL-8 mRNA 発現量およびタンパク質産生量の有意な増加が認められた。また、20 μ M の AMD 処置により TNF α mRNA 発現量はコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において有意に増加したが (Fig. 6B)、TNF α タンパク質産生量の有意な増加には 30 μ M ではじめて認められた (Fig. 6D)。CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群での AMD 処置 12 時間後、DEA は 7.4 μ M 生成し、DiDEA は検出されなかった。また、AMD 濃度は処置時間依存的に減少した (Table 3)。また、CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群での AMD 処置 24 時間後、DEA は 11.7 μ M、DiDEA は 0.4 μ M 生成した。CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群での DEA 処置 12 時間後、DiDEA は 0.3 μ M 生成した。CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群での DEA 処置 24 時間後、DiDEA は 0.5 μ M 生成した。一方、コントロールマイクロソーム処置群においては、いずれの条件においても代謝物は検出されなかった。

(C-3) ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響：E2 および Prog 前投与による HAL 誘導性肝障害への影響を 8 週齢雌性 BALB/c マウスを用いて検討した。その結果、CTL と比較して HAL 30 mmol/kg 投与により有意な ALT 値の上昇が認められた (Fig. 2A)。E2 前投与により HAL (30 mmol/kg) 単独投与群と比較して有意な ALT 値と AST 値の減少が認められ、その肝障害減弱作用は ER アンタゴ

ニストである ICI の併用により認められなくなった。また、HAL 15 mmol/kg 投与では CTL と比較して、ALT 値および AST 値に増加傾向が認められた。Prog 前投与により HAL (15 mmol/kg) 単独投与群と比較して有意な ALT 値と AST 値の増加が認められ、その肝障害悪化作用は PR アンタゴニストである RU の投与により認められなくなった。また、E2、Prog、ICI および RU 単独投与のみでは血漿トランスアミナーゼ値の上昇は認められなかった。また、血漿トランスアミナーゼ値と同様に肝組織学的評価においても、E2 による肝障害減弱および Prog による肝障害悪化が認められた。HAL の代謝的活性化に関与する Cyp2e1 と GSH 含量の変化、直接的な細胞障害および炎症反応を惹起すると報告されている TFA-adduct および酸化ストレスに対する影響について検討した。その結果、肝臓中 TFA-protein adducts 生成量および生成パターンに対して、HAL 投与により顕著な TFA-protein adducts 生成量および生成パターンの増加が認められたが、E2 または Prog 前投与時において顕著な変化は認められなかった。HAL (30 mmol/kg) 投与時には炎症性サイトカイン、CXC ケモカインおよび ICAM-1 の mRNA の有意な増加が認められた。さらに、E2 前投与時の HAL 投与においては、HAL 投与群と比較して炎症関連因子の有意な減弱が認められ、これらの E2 の作用は ER アンタゴニストである ICI の投与により認められなくなった。以上の結果から、E2 投与単独では炎症関連因子に有意な変化は認められなかったが、E2 前投与は HAL 投与後の炎症反応の有意な減弱を

示すことが認められた。Prog 単独投与において CXCL1 の有意な mRNA 発現増加が認められ、さらに Prog 前投与により HAL 投与後の炎症反応に顕著な変化を示すことが認められた

(C-4) プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明について ; Prog 前投与による HAL 誘導性肝障害の悪化が、その他の毒性発現機序の異なる肝障害性化合物の投与においても認められるか検討するために、TA、ANIT および DCX 誘導性肝障害に対する Prog の影響について検討した。投与法は II-2-2 に記載した方法によった。TA、ANIT および DCX 投与において、化合物単独投与群と比較して Prog 前投与群で血漿 ALT 値および AST 値の有意な上昇が認められた。また、肝組織学的評価において、TA および ANIT 投与群と比較して、Prog 前投与群で肝細胞障害の悪化と好中球や好酸球の浸潤の増加が認められた。今回検討した全ての肝障害性を示す化合物投与において Prog 前投与による肝障害悪化が認められた。以上の結果から、Prog による肝障害悪化は HAL 特異的ではなく、TA や ANIT などその他の肝障害性を示す化合物においても認められることが示された。雄性マウスではいずれの肝障害性化合物においても Prog 前投与による肝障害悪化は認められず、今回の Prog による肝障害悪化は雌性マウスでのみ顕著に認められることが示された。DNA マイクロアレイ解析の結果より、Prog 単独投与群において全ての候補遺伝子で発現増加が認められると考えられたが、CXCL1 以外の遺伝子では増加が認められず、再現性が得られなかった。

CXCL1 は好中球遊走に関わる CXC ケモカインの一つであることと、第 I 章において、Prog+HAL 群で好中球浸潤が強く認められていることから、Prog による肝障害悪化には CXCL1 が大きく寄与していることが示唆された。これより、CXCL1 を第一候補として詳細な検討を行うこととした。これまでの結果同様に、雌性マウスでは各時間において HAL 15 mg/kg 投与による顕著な ALT 値の増加は認められなかった。

Prog+HAL 群では HAL 投与 24 時間と 36 時間後に、HAL 単独投与群と比較して有意な ALT 値の増加および AST 値の増加傾向が認められた。また、Prog 前投与時において HAL 投与により早い時間での CXCL1 および ICAM-1 の増加、さらに CXCL2 や TNF α の増加が認められることを示した。また、血漿中タンパク質量と肝臓中 mRNA 発現量に相関関係が得られた。雄性マウスでは Prog による肝障害悪化が認められず、CXCL1 の増加も認められなかった。また、TNF α 以外の mRNA では雌性マウスで認められたような Prog 前投与による顕著な変化は認められなかった。Prog 前投与は MAPK のなかでも ERK pathway を活性化すること、および Prog 前投与による ERK 活性化は肝障害悪化の認められた雌性マウスでのみ認められることを示した。

U0126 併用は HAL 単独の肝障害性に対して有意な変化は認められなかったが、Prog による肝障害悪化作用および、HAL 投与後の TNF α 以外の炎症関連因子の減弱が認められた。以上の結果より、Prog による HAL 誘導性肝障害の悪化の一因に Prog による ERK 活性化が関与していることが示された。GdCl₃ 投与により HAL 単独の肝障

害性に対して有意な変化は認められなかったが、Prog による肝障害悪化作用および、HAL 投与後の炎症関連因子の有意な減弱が認められた。以上の結果より、Prog による HAL 誘導性肝障害悪化にはクッパー細胞を介した炎症反応が寄与していることが示された。HAL 群と比較して、RU を 7 日間連投した RU+HAL 群では有意な ALT 値の減少および AST 値の減少傾向が認められた。同様に、CTL と比較して HAL 投与により増加が認められた CXCL1、CXCL2、ICAM-1 および TNF α mRNA 発現は RU+HAL 群において有意な発現の減弱が認められた。これらのことから、RU 前投与は HAL 投与後における炎症反応を抑制し、肝障害悪化の程度を減弱させることが示された。

(C-5) ヒト肝臓における Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の microRNA による発現制御:

PPAR α は脂質代謝や異物代謝を担う代謝酵素の発現調節を行う重要な転写因子である。本研究では、ヒト肝臓における PPAR α の発現調節に miRNA が関与するか検討した。PPAR α に結合する可能性が in silico で予測された複数の miRNA のうち、肝臓で高く発現している miR-21、miR-22、miR-24、miR-27b、miR-181a、let-7a について、PPAR α の発現量およびその機能に与える miRNA の影響について検討した。

pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により、ヒト肝癌由来 HuH7 および HepG2 細胞において PPAR α タンパク質発現量が低下することを見出した。その際、PPAR α mRNA 発現量は変化しなかったことから、miR-21 および miR-27b は PPAR α

を翻訳抑制により制御することが示された。さらに pre-miR-21 および pre-miR-27b の導入により、PPAR α の下流遺伝子である ACS mRNA の常在的発現量の減少およびリガンドによる ACS mRNA の誘導の消失が認められ、一方 AsO-miR-21 および AsO-miR-27b の導入により誘導された ACS mRNA のさらなる上昇が認められた。このことから miR-21 および miR-27b が PPAR α の下流遺伝子にも影響することが示された。

PPAR α mRNA に見出された MRE のうち、どの MRE が機能的に作用するかをルシフェラーゼアッセイにより検討した。この検討より、2つの MRE21 のうち相同性が高く(energy -21.8)、seed sequence と完全に相補的な配列をもつ MRE21_1 が miR-21 により認識され、発現調節に機能的に働いていることが示唆された。一方で、seed sequence との相補性が高い8つの MRE27b はいずれも機能的ではなかった。従って、直接的に働いているか間接的に働いているかは明らかでないが、細胞株を用いた検討から miR-27b は PPAR α の発現制御に関与すると考えられる。

miR-21 および miR-27b による PPAR α 発現調節が実際にヒト肝臓中でも起きている事象であるか、24検体のヒト個人肝における PPAR α mRNA とタンパク質発現量、miR-21 および miR-27b 発現量の相関関係を調べることで評価した。PPAR α mRNA とタンパク質発現量との間には正の相関関係が認められず、転写後調節の関与が示唆された。また miR-21 発現量と PPAR α タンパク質発現量および PPAR α 翻訳効率との間に有意な逆相関が

認められた。一方で、miR-27b 発現量と PPAR α タンパク質発現量および PPAR α 翻訳効率との間には有意な逆相関が認められなかった。従って、ヒト肝臓における PPAR α の発現制御に対し、miR-27b の寄与は相関解析からは検知できず miR-21 の寄与が大きい可能性が示唆された。しかし、miR-27b 過剰発現により PPAR α タンパク質発現量が減少しただけでなく、内因性の miR-27b のノックダウンによって PPAR α タンパク質発現量が増加したことから、miR-27b もヒト肝臓中における PPAR α の常在的な発現に寄与していると考えられる。これまでに PPAR α の発現制御に関して miRNA の関与が示唆されつつあるが、ヒト肝臓における常在的な PPAR α の発現と miRNA の関係については不明であった。

(6) ヒト肝臓における CYP2E1 の microRNA による発現制御： HEK293 細胞に Pre-miR-378 の導入により pGL3/c-378 ではコントロールの 35%まで活性が低下し、導入した pre-miRNA が細胞内で働いていることが確認された。pGL3-p および pGL3/3xMRE-Rev では活性の上昇が認められたが、pGL3/3xMRE においてコントロールの 27%まで活性の低下が認められた。さらに、pGL3/UTR1 および pGL3/2xUTR1 でも、pre-miR-378 の導入により活性の低下が認められたが、MRE を含まない pGL3/UTR2 では活性の上昇が認められた。以上の結果より MRE378 が機能的であることが示唆された。

HEK293/2E1+UTR 細胞および HEK293/2E1 細胞に pre-miRNA を導入し、

CYP2E1 のタンパク質発現量に及ぼす miR-378 過剰発現の影響を検討した。HEK293/2E1+UTR 細胞において、pre-miR-378 導入により、CYP2E1 タンパク質発現量はコントロールに比べ有意に低下した (60%)。しかし、HEK293/2E1 細胞においては、CYP2E1 タンパク質発現量の変動は認められなかった。従って、MRE378 を含む 3'-UTR の存在が miR-378 による CYP2E1 の発現抑制に役割を果たしていることが示された。酵素活性を評価することによっても、pre-miR-378 による CYP2E1 タンパク質発現量の低下が示された。miR-378 による CYP2E1 mRNA 発現量の低下が、mRNA 分解の亢進によるものかどうか調べるため、CYP2E1 mRNA の安定性に及ぼす pre-miR-378 の影響を検討した。HEK293/2E1+UTR 細胞では、CYP2E1 mRNA の半減期は 5.6 hr であり、pre-miR-378 導入による変化は認められなかった。また、HEK293/2E1 細胞では CYP2E1 mRNA の半減期は、HEK293/2E1+UTR 細胞の半減期よりも長く 7.1 hr であったが、pre-miR-378 導入による変化は認められなかった。従って、miR-378 は CYP2E1 mRNA の分解には影響しないことが示された。25 検体のヒト個人肝における mature miR-378 の発現量には、約 18 倍の個人差が認められた。CYP2E1 タンパク質発現量を mRNA 発現量で除した値を翻訳効率として算出した。mature miR-378 発現量は、CYP2E1 タンパク質発現量 ($r = -0.47, p < 0.05$) と、さらに CYP2E1 翻訳効率 ($r = -0.53, p < 0.01$) と有意な逆相関を示した。従って、miR-378 による翻訳抑制がヒト肝におけ