

誘導性肝障害の動物モデルは、ラットへの AZA (25 mg/kg) の 4 週間反復経口投与や、マウスへの AZA (50 mg/kg) の単回腹腔内投与により作製した報告がある。しかし、いずれのモデルにおいても ALT 値の上昇はコントロールの 2.5 倍以下であり、肝組織においてもごく一部でネクローシスが認められる程度の軽微な肝障害であることから、メカニズム解析を行う動物モデルとしては不十分であることが考えられる。そこで、本研究ではより顕著な肝障害が認められる AZA 誘導性肝障害モデルマウスを確立し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

まず、AZA 誘導性肝障害モデルマウスを作製するために投与条件および期間の検討を行った。臨床において AZA は経口投与で使用されていることから、AZA のマウスへの処置は経口投与で行った。AZA の投与量依存的な ALT 値の変動より、以降の実験は ALT 値が最も上昇する条件である 200 mg/kg で行うこととした。また、AZA 投与後の ALT 値の時間推移より、以降の実験における ALT 値の測定は AZA 最終投与の 24 時間後とした。決定した投与条件において AZA をマウスに投与したところ、ALT および AST 値の有意な上昇は投与 3 日後から認められ、5 日および 6 日後においてはさらに顕著な上昇となった。さらに、肝切片の組織評価において AZA 6 日間投与による肝細胞のネクローシスが確認された。以上の結果より、

AZA 反復経口投与により肝障害が引き起こされ、200 mg/kg の 6 日間投与 24 時間後に最も重症化することが示された。そのため、本研究においては AZA 200 mg/kg を反復経口投与し、AZA 誘導性肝障害モデルマウスを作製することとした。また、AZA 200 mg/kg の 7 日間投与により、約 50% のマウスの死亡が認められたことから、反復投与期間は 6 日間までとした。

臨床において、急性および慢性の AZA 誘導性肝障害は、それぞれ AZA 使用開始から数年および 1-5 年後に患者の約 2% に認められる (*Aithal, 2011*)。本研究ではヒトにおける 1 日投与量 (1-5 mg/kg) の約 40-200 倍である 200 mg/kg の AZA をマウスに投与したため、臨床報告よりも短期間かつ高頻度に肝障害が発症したと思われる。

肝臓中 GSH は AZA の 6-MP への変換において消費されるため、AZA 投与による GSH の減少および GSSG の増加は、この反応による影響が大きいと考えられる。XO 阻害剤である allopurinol の併用投与により、AZA 投与による血漿中 ALT 値の上昇が抑制されたことから、6-MP から 6-TU の反応が肝障害の要因となる可能性が示された。また、ROS の一種である H_2O_2 の血漿中濃度も allopurinol の併用により低下したことから、AZA の肝毒性発現に ROS 産生が関与することが示唆された。しかし、allopurinol 併用投与による ALT 値上昇の抑制は、AZA 反復経口投与の 5

日および6日においては認められなかったことから、ROS産生は主に肝障害の発症初期に関与することが考えられる。

炎症反応に関連するサイトカインおよびケモカインであるTNF- α やIL-1 β mRNAにおいては、有意な発現上昇が認められた。また、抗MPO抗体による免疫染色により好中球の浸潤が確認されたことから、AZA誘導性肝障害に炎症反応と好中球の浸潤が関与することが明らかとなった。Th細胞が肝障害に関与していないことが示唆されたため、この炎症反応はDAMPsや自然免疫系の活性化により誘導されたと思われる。

本研究においては、酸化ストレスおよび免疫反応の両側面からAZA誘導性肝障害のメカニズム解析を行ったが、他の因子がさらに複雑に関与している可能性も考えられる。APAP誘導性肝障害においては、シトクロムP450による代謝で生成されるAPAPの代謝物が、ミトコンドリアタンパク質に共有結合することで肝障害

(3) ラットにおける代謝を考慮した

A. 研究目的

薬物性肝障害の原因薬物は多岐にわたるが、その中でも抗てんかん薬であるcarbamazepine (CBZ) は、服用する患者の約20%において副作用が認められ、そのうち10 - 15%が肝臓に関連したものである。CBZによる肝障害および肝機能障害は我が国において2005 - 2011年までの間

が惹起される。臨床において、AZAの代謝物である6-MPのメチル化を担うTPMTが高く発現している患者において、AZA誘導性肝障害が高頻度に発症することが報告されている。そのため、AZA代謝物の一つである6-methyl-MPが反応性代謝物として作用し、肝障害の発症に関わる可能性も考えられる。また、AZA誘導性肝障害を発症した約2/3の患者は、類似したHLAハプロタイプを有することも報告されており、遺伝的な因子も示唆される。これらの因子を考慮することが、DILIメカニズムのより詳細な理解には必要であると思われる。

以上、本研究においてはAZA誘導性肝障害モデルマウスを作製し、発症メカニズムにROS産生に伴う酸化ストレスおよび自然免疫系を介した炎症反応が関与することを明らかとした。本研究で作製した肝障害モデルと肝障害メカニズムの情報は、臨床におけるDILI発症の回避に繋がるものと期待される。

カルバマゼピン誘導性肝障害のメカニズム解析：

で215例報告されている。CBZ誘導性肝障害は「特異体質性」に分類され、肝障害の発症に関して性差は認められず、1日の服用量に依存しない。また、CBZ誘導性肝障害は予後不良（死亡や肝移植例）のものと予後良好なもの2つが存在する。前者は小児に多く治療期間が30週間程度の時期に生じ、後者は青年から高齢者に

多く治療期間が4週間程度で生じる。前者は肝細胞のネクローシスや炎症を伴うが、後者はhypersensitivityの症状や好酸球の増多が認められる。しかし、CBZの構造類似体であり同効薬であるoxcarbazepine (OXC) はCBZと比較して副作用が少なく、hypersensitivityは生じるものの発症率は10%以下と低く、肝障害の報告数も少ない。

ヒトにおいてCBZはCYP3A4により、主に安定で薬理活性を有するCBZ-10, 11-epoxideへ代謝され、その後*trans*-10, 11-dihydroxy CBZへ代謝される (Fig. 1)。CBZはCYP3A4を自己誘導するため、反復投与によりCBZの血漿中濃度が減少することがNovartis社の添付文書に記載されている。ヒトにおけるCBZの投与量は最初、1日200 - 400 mg程度から始まるが、至適効果が得られるまで (通常1日600 mg/kg) 徐々に増量し、症状によっては最大1日1,200 mgまで増量する。また、CBZから細胞障害性を有する反応性代謝物が産生され、GSHやNACにより解毒されることが報告されている以前、当研究室ではマウスを用いてCBZ誘導性肝障害モデルを作製し、炎症と代謝の両面からメカニズムの検討を行った。その結果、炎症および免疫学的因子が肝障害の発症に関与することを明らかにした。また肝障害時では肝臓中GSH量が減少することやCyp3a阻害薬であるtroleandomycin (TAO) やketoconazole

(KTZ) を併用投与すると肝障害が増悪し、CBZの代謝物である3-hydroxy CBZの血漿中濃度が上昇することを報告した。しかし、3-hydroxy CBZがCBZ誘導性肝障害発症に関与しているかは不明である。本研究では、前臨床開発で最も使用頻度が高く、同一個体からの経時的な採血が可能な実験動物であるラットを用いてCBZ誘導性肝障害モデルを作製し、肝障害と代謝物の血漿中濃度推移から肝障害発症に関与する代謝物および代謝酵素を明らかにすることを目的とした。

B-1. CBZ、OXCおよびBSOの投与方法

CBZ単回投与の検討では、F344ラット (雄性、9週齢) を3日間馴化飼育した後、CBZ 400 または 600 mg/kg (10 mL/kg in corn oil) を経口投与し、CBZ投与2時間前にGSH合成阻害剤であるBSO (10 mL/kg in saline) を腹腔内投与した。CBZ投与24時間後に解剖して下行大静脈より採血を行った。CBZ反復投与の検討では、F344ラットを3日間馴化飼育した後、CBZ 400 mg/kgを4日間、1日1回経口投与し、5日目にCBZ 400、600 または 800 mg/kgを経口投与した。また、5日目のCBZ投与2時間前にBSOを腹腔内投与した。OXC反復投与の検討では、F344ラットを3日間馴化飼育した後、OXC 400 mg/kg (10 mL/kg in corn oil) を4日間、1日1回経口投与し、5日目にOXC 600 mg/kgを経口投与した。また、5日目のOXC投与2時間前にBSOを腹腔内投与し

た。CBZ と OXC 投与の検討共に最終投与から、0、1、3、6、12、24、48 および 72 時間後に尾静脈または頸静脈より採血を行い、最終採血時 (CBZ 最終投与から 24 時間または 72 時間後) に解剖して下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-2. CBZ 投与ラットに対する CYP3A 阻害薬の投与

F344 ラットを 3 日間馴化飼育した後、CBZ 400 mg/kg を 4 日間経口投与し、5 日目に BSO 700 mg/kg を腹腔内投与し、30 分後に CYP3A 阻害薬である KTZ (50 mg/kg in corn oil) または TAO (300 mg/kg in corn oil) を腹腔内投与し、その 1 時間 30 分後に CBZ 600 mg/kg を投与した。CBZ 最終投与 24 時間後に解剖して下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-3. CBZ 投与ラットに対する CYP3A 誘導薬の投与

F344 ラットを 3 日間馴化飼育した後、DEX (80 mg/kg, 10 mL/kg in corn oil) を 3 日間腹腔内投与し、4 日目に CBZ 400 mg/kg を経口投与した。CBZ 投与 2 時間前に BSO を腹腔内投与した。CBZ 最終投与 0、3 および 6 時間後に尾静脈または頸静脈から採血し、12 時間後に解剖して下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-4. 統計解析

多群間における統計学的評価は Dunnett 検定により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

C 実験結果

C-1. CBZ 単回投与および最終投与量の検討

単回投与の検討では、BSO 非併用投与群および併用投与群において、CBZ 400 mg/kg および 600 mg/kg のいずれの投与量においても ALT 値の有意な上昇は認められなかった。また、反復投与の検討においても、5 日目の CBZ 投与量が 400 mg/kg の群では ALT 値の上昇は認められなかった。しかし、5 日目の CBZ 投与量が 600 または 800 mg/kg 群では ALT 値の顕著な上昇が認められた (600 mg/kg 投与群: $\overline{\text{ALT}} = 9,986 \pm 5,627 \text{ U/l}$ ($n = 6$), 800 mg/kg 投与群: $\overline{\text{ALT}} = 20,700 \pm 4,798 \text{ U/l}$ ($n = 3$))。以上の結果から、CBZ を 400 mg/kg で 4 日間反復投与後に、CBZ を 600 または 800 mg/kg で投与かつ BSO を併用投与する条件により CBZ 誘導性肝障害モデルラットが作製可能であることが示された。しかし、CBZ 最終投与 24 時間後までに死亡する個体が存在し、CBZ 最終投与量 600 mg/kg 群と 800 mg/kg 群における死亡個体数はそれぞれ 7 匹中 1 匹と 8 匹中 5 匹であった。このように、CBZ 最終投与量 800 mg/kg 群では死亡率が高かったため、以降の検討では CBZ の最終投与量を 600 mg/kg で行うこととした。また、CBZ の最終投与量 600 mg/kg 群においても肝障害の程度に大きな個体差が認められ、CBZ 最終投与 24 時間後に ALT 値が顕著

に上昇する個体 (high responder) (ALT > 2,000 U/l) とほとんど変動しない個体 (low responder) に分類された。

C-2. 肝組織染色

CBZ 投与による肝組織損傷を評価するために、CBZ を 4 日間 400 mg/kg で反復投与し、5 日目に BSO 700 mg/kg と CBZ 600 mg/kg を投与したラットより採取した肝組織を用いて H&E 染色を行った。

C-3. CBZ または OXC 投与ラットにおける ALT および AST 値の時間推移

CBZ 最終投与後の ALT および AST 値の推移を検討するために CBZ と BSO を投与し、CBZ 最終投与 0、6、12、24、48 および 72 時間後の ALT および AST 値を同一個体から採取した血漿を用いて測定した。また、ネガティブコントロールとして構造類似体で同効薬である OXC を

C-4. CBZ およびその代謝物の血漿中濃度推移

CBZ およびその代謝物の血漿中濃度の時間推移と、high responder と low responder 間における血漿中濃度の差異を検討するために、CBZ 最終投与 0、1、3、6、12 および 24 時間後の CBZ とその代謝物の血漿中濃度を測定した。また、CBZ-10, 11-epoxide は CBZ 最終投与 3 時間後に最も高い値を示した。Trans-10, 11-dihydroxy CBZ は CBZ 最終投与 1 - 6 時間後に最も高い値を示した。このように、CBZ およ

BSO 非併用投与 (ALT = 105 U/l) および low responder (ALT = 176 U/l) ではネクロシスは認められなかったが、high responder (ALT = 21,800 U/l) において中心静脈周辺に広範なネクロシスが認められた。以上の結果により、high responder において肝障害が生じていることが病理学的視点から支持された。

CBZ の代わりに投与した。High responder 群において CBZ 最終投与 24 時間後に ALT および AST 値の有意な上昇が認められ、その後、時間依存的に減少した。Low responder 群および BSO 非併用投与群ではいずれの時間においても ALT および AST 値の変化は認められなかった。また、OXC 投与群ではいずれの時間においても ALT および AST 値に変化は認められなかった。

び上記の代謝物は ALT および AST 値が最大を示す CBZ 最終投与 24 時間後よりも早く血漿中濃度が最大を示した。

3-Hydroxy CBZ は low responder 1 において CBZ 最終投与 1 時間後に最も高い値を示したが、high responder および low responder 2 においては血漿中濃度が最も高い値を示す時間を判断することは不可能であった。high responder と low responder 群間で血漿中濃度を比較すると、CBZ、trans-10, 11-dihydroxy CBZ および 2-hydroxy CBZ ではほとんど差は認めら

れなかった。CBZ-10, 11-epoxide は high responder と比較して low responder 群でや

や高い血漿中濃度を示す傾向が認められた。

C-5. CYP3A2 タンパク質量と CYP3A 酵素活性の測定

CYP3A 酵素誘導が起きているか確認するために、CBZ または OXC を 4 日間 400 mg/kg の投与量で反復投与したラットの肝臓から調製したミクロソームを用いて CYP3A2 タンパク質量の測定を行った。また、同一のサンプルを用いて CYP3A の酵素活性を MDZ 1'位および4位水酸化酵素活性を測定することにより評価した。CYP3A2 タンパク質発現量は、CTL 群と比較して CBZ 投与群で 1.82 倍、OXC 投

与群で 1.93 倍の増加が認められた。同様に、CBZ および OXC 投与群で MDZ 1'位水酸化酵素活性の有意な上昇 (CTL: 136 ± 30 pmol/min/mg protein, CBZ: 273 ± 18 pmol/min/mg protein, OXC: 273 ± 42 pmol/min/mg protein) および4位水酸化活性の上昇傾向が認められた (CTL: 778 ± 156 pmol/min/mg protein, CBZ: 1130 ± 77 pmol/min/mg protein, OXC: 1201 ± 182 pmol/min/mg protein)。以上の結果により、CBZ および OXC の反復投与により CYP3A が誘導されることが示された。

C-6. CBZ 誘導性肝障害に対する CYP3A 阻害薬の影響

ラットにおいて CBZ 誘導性肝障害に対する CYP3A の影響を検討するために、TAO または KTZ を CBZ 最終投与 1.5 時間前に併用投与し、CBZ 最終投与 24 時間後に ALT 値を測定した。CYP3A 阻害薬

非併用投与群では4匹中2匹で ALT 値の上昇が認められた。これに対して TAO 併用投与群の5匹、KTZ 併用投与群の3匹全てにおいて ALT 値の上昇は認められなかった。これより、CYP3A が肝障害発症に関与している可能性が示された。

C-7. CBZ 単回投与における DEX 反復投与の影響

CBZ 単回投与では肝障害が発症しないことに着目し、CYP3A 誘導薬である DEX を3日間連投し、4日目に CBZ 400 mg/kg と BSO を投与し、肝障害が発症するか検討を行った (Fig. 8)。DEX の代わりに溶媒として用いた corn oil を反復投与した群で

は ALT 値の上昇は認められなかった。また、DEX 反復投与のみにより ALT 値の上昇が認められたが、時間依存的な ALT 値の上昇は認められなかった。一方、CBZ 投与前に DEX を反復投与した群では CBZ 投与前と比較して、CBZ 投与3時間後から ALT 値の有意な上昇が認められ、12時間後まで上昇し続けた。また、今ま

での検討で用いてきた CBZ 誘導性肝障害を惹起させる投与条件では肝障害発症の程度に大きな個体差が存在したが、今回の検討で用いた投与条件では、CBZ 投与前に DEX を反復投与した群では 4 匹中 4 匹のラットで ALT 値の上昇が認められ、個体差は今までの検討よりも小さかった (CBZ 投与 0 hr 後: ALT = 402 ± 58 U/l, 3 hr 後: ALT = 1737 ± 347 U/l, 6 hr 後: ALT = 2487 ± 429 U/l, 12 hr 後: ALT = 3125 ± 295 U/l)。死亡率に関しては、CBZ 投与前に DEX を反復投与した群では 6 匹中 2 匹が死亡したのに対し、その他の群では死亡する個体は存在しなかった。以上の結果より、CBZ 誘導性肝障害発症は CYP3A の誘導により惹起されることが示唆された。

D. 考察

本検討ではラットでの CBZ 誘導性肝障害モデル作製にあたり、Higuchi ら (2012) がマウスで CBZ 誘導性肝障害を惹起させる際に用いた投与条件を参考にし、CBZ を 4 日間 400 mg/kg で反復投与し、5 日目に投与量を上げ 800 mg/kg で経口投与を行ったが、ALT 値の上昇はほとんど認められなかった。GSH 合成阻害剤である BSO を CBZ 最終投与前に併用投与したところ、ALT 値の顕著な上昇が認められた。また、この条件下で CBZ 最終投与量を 600 mg/kg に下げた際にも ALT 値の上昇が認められた。ラットとマウスで肝障害への

感受性が異なる例として、抗ガン剤として開発されたが肝障害により開発中止となった *N*-methylformamide (NMF) が報告されている。NMF をラットおよびマウスに投与した場合、マウスでは NMF 200 mg/kg 以上の投与量で ALT 値の上昇が認められるが、ラットでは NMF 1,000 mg/kg の投与量でも ALT 値の上昇はほとんど認められておらず、ラットではマウスと比較して NMF 誘導性肝障害に対して感受性が低いことが示されている。また、ラットおよびマウスの肝 GSH 含量はそれぞれ約 7 mmol/g tissue (Wister ラット、雄性、12-16 週齢) (Allameh et al., 1997) と約 8 mmol/g tissue (B6CF3 マウス、雄性、7 週齢) (Watanabe et al., 2003) であり、ラットおよびマウス間でほとんど差は認められない。しかし、glutathione *S*-transferase 活性はマウスと比較してラットでは約 1.7 倍高い (Grover and Sims, 1963)。このため、ラットではマウスと比較して反応性代謝物が GSH 抱合を受けて解毒される効率が高い可能性が考えられ、この違いが CBZ 誘導性肝障害に対する感受性の種差につながっているかもしれない。

肝組織染色の結果より high responder 群において小葉中心性ネクロシスが認められた。CYP は主に肝組織の中心静脈周辺 (zone 3) に発現しているため、CYP により生成される反応性代謝物がネクロシスの原因となる場合は zone 3 に障害が生じる場合が多く、APAP や halothane

により障害が生じる場合もネクローシスは zone 3 において認められる。よって、CBZ による肝障害においても CYP が関与していることが示唆された。ヒトにおいて CBZ による肝障害は hypersensitivity を伴う予後良好なタイプとネクローシスと炎症を伴う予後不良なタイプに分類される。今回作製したラットモデルではネクローシスは認められたが好酸球が認められなかったことから、ヒトにおける予後不良なタイプに類似していることが考えられる。

CBZ 誘導性肝障害に関与する代謝物を推定するために同一個体より経時的に採血し、CBZ 最終投与 24 時間後までの血漿中濃度を測定したところ、3-hydroxy CBZ においてのみ high responder と low responder 群の差が顕著に現れ、high responder と比較して low responder 群ではより高い血漿中濃度を示した。Higuchi ら (2012) のマウスを用いた検討では、TAO または KTZ 併用投与により肝障害の増悪が認められ、この際 CBZ および 3-hydroxy CBZ の血漿中濃度の有意な上昇が認められていた。このように、ラットとマウス間で 3-hydroxy CBZ の血漿中濃度の変動の傾向が異なっていた。

マウスを用いた検討において、Cyp3a 阻害薬である TAO または KTZ を併用投与すると CBZ による肝障害の増悪が認められている。しかし、今回のラットを用いた検討では CBZ による肝障害が TAO

または KTZ の併用投与により認められなくなった。ヒトにおいては CYP3A4 以外に CBZ から CBZ-10, 11-epoxide への代謝には CYP2C8、CBZ から 3-OH CBZ への代謝には CYP2B6 が関与する。マウスおよびラットにおいて各々の代謝物の生成に関与する CYP 分子種は同定されていないが、CYP3A の阻害により相反する結果が得られた原因として CBZ の代謝に関与する酵素の種差が考えられる。CYP3A の阻害により CBZ の代謝に関与する CYP3A 以外の酵素の寄与が大きくなり、マウスでは CBZ から毒性発現経路への代謝反応が亢進され、ラットでは解毒経路への代謝反応が亢進されたことが考えられる。

CBZ の反復投与により CYP3A が誘導されること、CYP3A 阻害薬併用投与により肝障害発症の抑制が認められたことおよび CBZ の単回投与では肝障害が発症しないことから、CBZ の反復投与による CYP3A の誘導が肝障害発症に重要であることが考えられた。今回の検討で用いた DEX は強力な CYP3A 誘導薬として知られており、ラットにおいても CYP3A mRNA 量、CYP3A タンパク質量および testosterone 6b 位水酸化酵素活性を上昇させることが報告されている。CBZ と BSO を単回投与する前に DEX を反復投与した際、CBZ 投与 3 - 12 時間後まで時間依存的に ALT 値の有意な上昇が認められた。よって、CBZ 誘導性肝障害発症に CYP3A

の自己誘導が関与していることが示唆された。しかし、DEX はラットにおいて CYP3A 以外の CYP 分子種も誘導するため、CYP3A 以外の CYP が関与している可能性も否定できない。本検討はラットを用いて CBZ 誘導性肝障害を惹起させることに成功し、肝障害発症には GSH 枯渇下での反応性代謝物の生成が重要であること、および CBZ 反復投与による CYP3A の誘導と CYP3A による代謝が関与していることを明らかにした。本検討では CBZ 誘導性肝障害発症に関与する代謝物および代謝酵素の同定まで至っていないため更なる検討が必要ではあるが、今回明らかとなった結果が薬物誘導性肝障害のメカニズム解明に対して助力となることを期待する。

(4) 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の発症における miRNA の関与:

A. 研究目的

APAP と同様に CYP による代謝的活性化を受け、肝障害を示す薬物として吸入型全身麻酔薬である Halothane (HAL) が挙げられる。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。HAL 誘導性肝障害の発症メカニズムとして、肝臓で主に CYP2E1 により代謝され、生成する活性代謝物のトリフルオロアセチルラジカルが生体内

高分子と共有結合し、トリフルオロアセチル化タンパク質 (TFA-adduct) を生成することが知られている。HAL による肝障害患者の血清からは抗 TFA 抗体および抗 CYP2E1 抗体が検出されることが報告されている。しかし、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。近年の報告において、HAL 誘導性肝障害発症に好中球、NKT 細胞、NK 細胞および好酸球などの免疫細胞に加え、Th17 細胞が主に産生する IL-17 などの様々な炎症性サイトカインの活性化が関与することが明らかにされている。

近年、miRNA と毒性との関連についての研究が盛んに行われている。miRNAs が血中に存在することが Mitchell ら (2008) により初めて報告された後、血中 miRNA が癌や肝障害などの様々な疾患のバイオマーカーとしての可能性を持つ研究が急速に進展してきた。さらに、組織中での miRNA の発現変動は標的遺伝子の発現の変化をもたらし、様々な疾患の発症や進行に関与することが報告されている。このため、疾患における組織中での miRNA の発現変動も注目を集めている。また、環境ストレス、化学物質、毒物および医薬品などの外来異物にตอบสนองして組織中での miRNA の発現プロファイルが変化することが示唆されている。肝

障害の例としては、四塩化炭素 (CCl₄) 誘導性肝線維症モデルマウスの肝臓中 miR-29 の発現が低下することを示し、miR-29 が線維化に重要な TGF-β (transforming growth factor-β) やコラーゲンの発現調節に寄与していることを報告している。また、DILI において肝臓中の miRNA 発現変動に着目した研究も報告されている。ラットに APAP または CCl₄ をそれぞれ単回投与し、24 時間後に共通して肝臓中で発現変動した miRNA の中で、チオレドキシシンレダクターゼを含む酸化ストレス関連遺伝子を制御することが推定されている miR-298 および miR-370 が発現低下することを示している。これらの 2 つの miRNA の発現低下は肝障害発症よりも早い時間において認められたことから、毒性発現前の早期段階において miRNA が発現変動すると考えられている。当研究室においても、急性肝障害である肝細胞障害型および胆汁鬱滞型、慢性肝障害である脂肪肝、脂肪性肝炎および肝線維症の各ラットモデルにおいて、血中 miRNA がそれぞれの病型に応じた特異的な発現プロファイルを示すことを明らかにした。さらに、肝障害の血中マーカーである ALT よりも早期かつ鋭敏に miR-122 が血中で発現上昇することから、

血中 miRNA のバイオマーカーとしての有用性を示している。しかし、組織中での miRNA の発現変動と標的遺伝子の発現の変化の関係は十分には理解されておらず、他の薬物による肝障害における miRNA の役割や、肝障害発症前の早期段階での miRNA の発現変動および免疫や炎症との関連性に焦点を当てた研究はこれまでに行われていない。

そこで、本研究では免疫学的な視点から、DILI の発症前における miRNA の役割について明らかにすることを目的とした。はじめに、DILI の原因薬物の中でも、免疫関連因子の関与が多く認められている HAL をモデル薬物として、薬物投与から経時的に miRNA array による肝臓中 miRNA の網羅的な発現変動解析を行った。また、発現変動した miRNA の推定標的遺伝子の機能を網羅的に解析した。さらに、肝障害発症前に HAL 特異的に発現変動した miRNA のうち、免疫および炎症と関連のある遺伝子を制御する miRNA とその標的遺伝子の発現量との関係を明らかにした。その結果、Th17 分化を担う STAT3 遺伝子を発現制御する miRNAs が HAL 誘導性肝障害の発症に寄与する可能性を初めて明らかにした。

B. 実験方法

B-1 BALB/c マウスへの薬物投与

BALB/c マウス (雌性、8 週齢 16-21 g; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) に溶媒、HAL

(30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) または ISO (30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) を 2 mL 投与した。HAL 投与 0.5、1、3、6、12 および 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。ISO 投与 1 および 3 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。各群 4 匹のマウスを使用した。

B-2 TaqMan miRNA array によるマウス肝臓中 miRNA 発現量の網羅的な測定

TaqMan miRNA array 解析に用いる RNA は RNAiso Plus により抽出した。

B-3 miRNA の標的遺伝子の抽出および KEGG pathway および MeSH 解析

得られたマイクロアレイデータの解析を行った。各時間において溶媒投与群と比較して 2 倍以上に発現変動した miRNA の機能を調べるため、miRNA の標的遺伝子が関与する経路を DIANA miRpath v.2.0 (<http://83.212.96.7/DianaToolsNew/index.php?r=mirpath>) により調べた。DIANA miRpath は miRNA の標的遺伝子の予測サイトである DIANA-microT-CDS に基づいて予測された遺伝子群を、DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) の KEGG pathway を用いて解析可能なウェブツールであり、多数の miRNA の標的遺伝子が関与する生体内経路を網羅的かつハイスループットに解析することが出来る。DIANA-microT-CDS は標的遺伝子の coding region (CDS) および 3'-UTR に結合

する miRNA を予測するサイトである。また、肝臓中で発現変動していた miRNA が発現調節に関与していることが報告されている標的遺伝子は miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) により探索した。なお、それらは、ヒト、マウス、ラットでの実験的な検討により明らかとされたものである。次に、これらの遺伝子が肝障害の発症に関与しているのか Medical Subject Headings (MeSH) 解析 (Gendoo: <http://gendoo.dbcls.jp/>) を用いて調べた。MeSH とは米国国立医学図書館が医学文献の分類に用いている主題見出し用語を用いており、遺伝子に付与 (アノテーション) することにより、データが示す生物学的意義を推測することが出来る解析法である。MeSH に免疫、炎症および肝障害に関連する Apoptosis、Cell Adhesion、Glutathione、Hepatitis、Immunity、Innate、Inflammation、Liver Diseases、Necrosis、Oxidative Stress の 9 つのキーワードを入力し、関連遺伝子を抽出した。なお、MeSH 解析ではマウスにおける遺伝子について調べた。探索した miRNA の標的遺伝子とこれらの抽出遺伝子を比較することで、発現変動した miRNA の肝障害への関与を検討した。

B-4 統計解析

2 群間における統計学的評価は Student's t-test により、多群間における統計学的評価は ANOVA および Tukey 検定により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に

有意であると判断した。

C. 実験結果

C-1 HAL 誘導性肝障害モデルマウスの作製および評価
HAL 投与 12 および 24 時間後において、溶媒投与群と比較して HAL 投与群において血漿中 ALT 値の有意な上昇が認められた。以上より、HAL 投与群において肝障害が惹起され、HAL 誘導性肝障害モデルマウスが作製されたことを確認した。続いて、HAL 投与後 12 時間以前の HAL 投与群において、ALT 値ではモデルマウスが作製出来ているかの評価は出来ないため、mRNA 発現量を測定することによりモデルが作製されたことを確認した。投与 0.5 および 1 時間後は、いずれの mRNA の発現変動が顕著には認められなかったため、miRNA アレイは HAL 投与 0.5 時間後は行わず、投与 1 時間後以降のマウス肝臓を用いて検討することとした。C-2 HAL 誘導性肝障害モデルマウスにおける肝臓中 miRNA の網羅的な発現変動解析

MiRNA array を行った全サンプルの miRNA の発現量を Cluster 3.0 (complete linkage) を用いて階層的クラスタリング解析し、MapleTree を用いて示した。その結果、HAL 投与 6 および 12 時間後の群と投与 3 時間後の群が近くに分類され、HAL 投与 1 時間後と投与 24 時間後の群が近くに分類された。以上の結果より、肝臓中 miRNA の発現プロファイルは ALT を指標とした肝障害の程度とは相関せず、肝

障害の発症前においても多くの miRNA の発現が変動していることが示された。

C-2 HAL 誘導性肝障害モデルマウスにおける肝臓中 miRNA の網羅的な発現変動解析

MiRNA array を行った全サンプルの miRNA の発現量を Cluster 3.0 (complete linkage) を用いて階層的クラスタリング解析し、MapleTree を用いて示した。その結果、HAL 投与 6 および 12 時間後の群と投与 3 時間後の群が近くに分類され、HAL 投与 1 時間後と投与 24 時間後の群が近くに分類された。以上の結果より、肝臓中 miRNA の発現プロファイルは ALT を指標とした肝障害の程度とは相関せず、肝障害の発症前においても多くの miRNA の発現が変動していることが示された。

C-3 発現が変動した miRNA の推定標的遺伝子の網羅的な機能解析

C-2 により、肝障害発症前に多くの miRNA が発現変動することが示されたため、これらの変動した miRNA が生体内でどのような機能を持つかを明らかにすることを目的とした。本検討には、DIANA miRpath というウェブツールを用いて検討した。各時間において溶媒投与群と比較して 2 倍以上に発現上昇または低下した miRNA の機能を調べるため、各 miRNA の標的遺伝子が関与する経路を KEGG pathway によりアノテーションすることで調べた。HAL 投与 1 時間後に発現変動した miRNA の推定標的経路中で、免疫お

よび炎症関連の経路として Jak-STAT signaling pathway、VEGF signaling pathway、Cytokine-cytokine receptor interaction、B cell receptor signaling pathway、Leucocyte transendothelial migration、Cell adhesion molecules (CAM) は投与1時間後において特異的な経路として予測された。HAL 投与1、3、6、12 および24 時間後に発現変動した miRNA に対して KEGG pathway によるアノテーション解析を行うことで、HAL 投与後いずれの時間においても免疫および炎症に関わる pathway が変動している可能性が示された。また、これらの結果は、HAL 誘導性肝障害に関わる炎症性サイトカインやケモカインなどの免疫因子が、miRNA による発現制御を受けている可能性も示した。特に、HAL 投与3 時間後以降と比較して、1 時間後に発現が低下する miRNA の推定標的経路において、免疫および炎症関連の経路が多く予測されたため、mRNA の誘導よりも早期に miRNA がそれらの発現調節を担っている可能性が示された。

C-4 HAL および ISO 投与マウスにおける肝臓中 miRNA の網羅的発現変動解析

C-3 より、HAL 投与後から肝障害発症までの各時間において多くの miRNA が発現変動し、それらの miRNA が免疫および炎症に関連することが明らかとなった。しかし、HAL の薬理作用によって発現変動した miRNA も含めて解析しているた

め、肝障害に寄与する miRNA の絞り込みを行うことは困難である。そこで、HAL と比較して肝障害の報告が少なく、HAL と構造が類似かつ同効薬である ISO 投与後に発現変動した miRNA と比較することで、HAL 特異的に発現変動した miRNA を探索することを目的とした。なお、HAL 投与1 および3 時間後である肝障害発症前の早期において、発現変動した miRNA が免疫および炎症関連経路を変動させている可能性が示唆されたため、これらに関連する因子に注目をした。ISO 投与1 および3 時間後のマウス肝臓中に発現している miRNA を miRNA array により測定した今後の検討においては HAL または ISO 投与によってのみ発現変動した miRNA について解析を行った。

C-5 HAL および ISO 特異的に発現変動した miRNA の推定標的遺伝子の網羅的な機能解析

HAL または ISO 特異的に発現が上昇または低下した miRNA の機能を調べるため、各 miRNA の標的遺伝子が関与する経路を KEGG pathway によりアノテーションすることによって解析した。各時間において HAL または ISO 投与により発現上昇または低下した miRNA の推定標的経路を *P*-value の小さい順にそれぞれ Tables 9-12 に示した。また、各時間において発現上昇または低下した miRNA の推定標的経路が共通して予測された経路を網掛けで示し、免疫、炎症および細胞死に関

わる経路を下線で示した。解析には Fig. 6 で示した HAL または ISO 特異的に発現変動した miRNA を用いた。なお、予測され薬物投与 1 時間後において HAL 投与により発現低下した miRNA の推定標的経路は 42 種類が予測され、ISO 投与により発現低下した miRNA の推定標的経路は 8 種類が予測された。HAL 投与群と ISO 投与群において共通して予測された経路は 7 種類であった (Table 10)。投与 1 時間後に HAL 特異的に発現が低下する miRNA の推定標的経路は 35 種類あり、これらの経路の中で免疫および炎症に関連する経路

C-6 HAL および ISO 特異的に発現変動した miRNA の既知の標的遺伝子の解析
HAL または ISO 特異的に発現変動した miRNA の標的遺伝子に関して、発現調節に関与していることが報告されている遺伝子を miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) により探索した。なお、miRNA*については発現次に、これらの遺伝子が免疫および炎症を介して肝障害の発症に関与しているかについて MeSH を用いて解析した。MeSH を用いてキーワードによる抽出を行った遺伝子との比較により解析した。免疫、炎症および肝障害に関連する apoptosis、cell adhesion、glutathione、hepatitis、immunity、innate、inflammation、liver diseases、necrosis、oxidative stress の 9 つのキーワードから関連遺伝子を抽出し

た経路のうち、肝臓以外でのみ起こる経路を除外した。その結果、

は T cell receptor signaling pathway、VEGF signaling pathway、Leucocyte transendothelial migration、Jak-STAT signaling pathway、Chemokine signaling pathway、Apoptosis、Hepatitis C、B cell receptor signaling pathway の 9 種類の経路が挙がってきた。一方、ISO 投与群においては免疫および炎症に関連する経路は挙がってこなかった。

調節に関する情報が少ないため、検索することが出来なかった。HAL 特異的に発現変動した miRNA の中で、HAL 投与 1 時間後に発現が上昇する miRNA は 1 個、発現が低下する miRNA は 46 個、HAL 投与 3 時間後に発現が上昇する miRNA は 9 個、発現が低下する miRNA は 2 個の miRNA が miRTarBase に登録されていた。5 つ以上のキーワードと共通した遺伝子を網掛けで示した。これらの遺伝子が免疫および炎症との関連性の高い遺伝子であると考えられた。条件のどちらも満たす miRNA として、下線で示した miR-106b、miR-200c、miR-21、miR-29b が選出された。これら 4 つの miRNA は HAL 投与 1 時間後に発現が低下する miRNA であった。また、HAL 投与 3 時間後においては、条件のどちらも満たす

miRNA は認められなかった。miR-125b-5p は HAL 投与 1 時間後においても発現が低下する miRNA であった。従って、これらの 5 つの miRNA が免疫および炎症に関連 C-7 免疫および炎症関連遺伝子を制御する可能性がある 5 つの同定した miRNAs の経時的な発現変動推移

C-6 より、miR-21、miR-29b、miR-106b、miR-125b-5p および miR-200c の 5 個の miRNA が選出された。miRNA array では各群 4 匹の肝臓中 RNA をプールしたものをを用いていたため、個体差および miRNA array の再現性の確認のため、それぞれの miRNA 発現量を TaqMan individual assay により測定した。miR-106b および

C-8 miRNA の標的遺伝子の mRNA およびタンパク質発現量の測定

HAL 誘導性肝障害において、HAL 投与後早期に発現変動した miRNA がその標的遺伝子の発現制御に関与しているかを明らかにすることを目的とした。その結果、FasL、MAPK14、TNF α および STAT3 タンパク発現量を Western blotting 法にて測定した結果を Fig. 9A、9B および 9C に示した。Fig. 9A には Western blotting により検出したバンドを示し、Fig. 9B および 9C には Fig. 9A の結果を定量化し、グラフ化した結果を示した。各時間における溶媒投与群と比較して、HAL 投与 24 時間後において FasL タンパク発現量の有意な増加が認められた HAL 誘導性肝障害にお

し、かつ HAL 特異的に肝障害の早期段階において発現変動する miRNA として同定された。

miR-125b-5p 発現量については、それぞれ HAL 投与 0.5、12 および 24 時間後において有意な減少が認められた。投与 1 時間後においては有意ではなかったが、アレイ結果と同様に半分程度まで発現量の低下が示された。miR-200c に関しては HAL 投与 0.5、1 および 12 時間後において有意な減少が認められた。従って、miRNA の発現変動がかなり早い時間から生じていると考えられた。

ける肝障害発症機序の一つとして、HAL 投与による miR-106b の発現低下に続く、STAT3 mRNA およびタンパク発現量の増加が亢進され、STAT3 の活性化によって IL-17 の産生を担う Th17 細胞への分化が促進されている可能性が示された。

C-9 miR-93 発現変動の経時的推移

STAT3 が miR-106b の標的であることが報告され、HAL 肝障害モデルにおいても、miR-106b の発現量低下による STAT3 の発現増加が示唆された。そこで、STAT3 を制御する他の miRNA について探索した。HAL 投与 0.5 および 24 時間後において溶媒投与群と比較して HAL 投与群において有意な発現量の低下が認められた。

HAL 肝障害モデルにおいて miR-106b だけでなく、miR-93 も Stat3 の制御に関与していることが示唆された。

D. 考察

外来異物による肝臓中 miRNA の発現変動は、疾患の発症やそのメカニズム解明において重要な因子であると考えられている。本検討においても、HAL 誘導性肝障害に多くの miRNA が発現変動し、それらの miRNA が免疫および炎症に関連していることを明らかにした。HAL 投与 1 時間後においては発現上昇する miRNA よりも、発現低下する miRNA が極めて多いことが明らかとなった。一般的に、肝臓の miRNA は発病の機序に大きく寄与している可能性が考えられる。本検討においても、HAL 誘導性肝障害において投与 1 時間という非常に早期の段階において多くの miRNA の発現低下が認められ、肝障害の発症に寄与する重要な因子であると考えられた。

HAL または ISO 投与により発現変動した miRNA を比較解析することで、各 miRNA の生理学的、病理学的意義を明らかにすることを目的とした。各薬物投与 1 時間後に発現低下する miRNA に関して、HAL 特異的に発現変動した miRNA は ISO 特異的に発現変動した miRNA よりも、免疫および炎症に関連する可能性が示された。また、ISO は HAL と比較して肝障害性の極めて低い薬物であることが知られ

ており、マウスにおいても肝障害が惹起されないことが報告されている。これらのことより、薬物の持つ肝障害性が miRNA の発現変動に反映される可能性が考えられた。HAL 投与 1 および 3 時間後に発現変動した miRNA が、HAL 誘導性肝障害においてその標的遺伝子の発現を制御しているか検討した。KEGG pathway により免疫および炎症に関連する多くの経路が予測されたため、MeSH のキーワードとしても免疫、炎症および肝障害に関連するものを選択した。KEGG pathway では疾患との関連が捉えにくい、MeSH 解析によりさらに詳細に検討することが可能となる。さらに、肝障害発症前に HAL 特異的に発現変動した miRNA のうち、免疫および炎症と関連のある遺伝子を制御する miRNA とその標的遺伝子の発現量との関係に注目した。その結果、HAL 誘導性肝障害におけるメカニズムにおいて最も特徴的な免疫因子である IL-17 の産生を担う転写因子である STAT3 の関与を、肝障害発症よりも早期に発現変動した miRNA だけを解析することから見出した。このことは、肝障害のメカニズムにおいて中心的な役割を担う遺伝子の発現調節に関わる miRNA が、肝障害発症前に顕著に発現変動することが、肝障害の発症に寄与している可能性を示した。

HAL 投与による miR-106b の発現低下、それに続く STAT3 発現量の増加を示したため、これまでに報告されている IL-17

の産生を STAT3 が担っているかを、P-STAT3 を測定することで検証した。その結果、HAL 投与 6 時間後において P-STAT3/STAT3 比の増加が認められた。従って、HAL 投与によって肝臓において STAT3 の活性化が認められ、下流遺伝子である IL-17 の産生を担っていることを示した。今回の miRNA アレイのデータにおいては、miR-146a は肝臓中で比較的高い発現量であったものの、HAL 投与 12 時間後において溶媒投与群と比較して、1.31 倍の増加がピークであった。IL-17 が関連する疾患である関節リウマチの患者 PBMC 中で miR-146a と IL-17 発現量との相関が示されている (Niimoto et al., 2010)。従って、miR-146a に関しては肝臓中よりも血漿中の細胞や他の臓器における発現変動が重要かもしれない。

今回用いた miRTarBase には登録されていなかったが、PubMed による検索結果から、miR-125b-5p が STAT3 の発現制御を行うことが新たに報告されていた。このため、STAT3 の発現調節には miR-106b および miR-93 と同時に miR-125b-5p などの miRNAs が協奏的に STAT3 の発現量を制御している可能性が考えられた。miR-106b に加え、miR-125b-5p は HAL 投与 1 時間後において発現が顕著に低下しており、本検討の解析により選出された miRNA である。従って、STAT3 の発現調節に関わるいくつかの miRNA が協奏的に、その標的遺伝子の制御に関わっていることが

考えられた。

今回の検討において同定した 5 個の miRNA のうち、miR-29b や miR-200c はその既知の標的遺伝子への制御に対してほとんど作用していないことが示された。この原因として考えられることとして、miRNA-mRNA の複雑なネットワークに起因する可能性がある。すなわち、1 つの miRNA は多くの遺伝子の発現制御に関わり、1 つの遺伝子は多くの異なる miRNA の制御を受けることが考えられる。そのため、今回測定した以外の mRNA の制御に主に働く可能性や、遺伝子が他の複数の miRNA による遺伝子の発現制御を受けているため、今回の検討では影響が認められなかった可能性が考えられた。miRNA の生理的な意義については不明な点が多く、更なる研究が必要である。

Fig. 7 で示した 5 個の miRNA の発現変動に関して、標的遺伝子の mRNA 発現量に影響を及ぼした miRNA は miR-21、miR-106b および miR-125b-5p であり、miR-29b と miR-200c は標的遺伝子の mRNA 発現量に関与しないことが示された。標的遺伝子の mRNA を誘導させた miR-21、miR-106b および miR-125b-5p の 3 つの miRNA は、いずれも HAL 投与 0.5 や 1 時間後に発現が急激に低下するが、その後の肝障害時の HAL 投与 24 時間後においても発現量は 0.5 倍以下と低下したままであった。肝障害発症前から miRNA の発現量が低下し、肝障害時にお

いても低下し続けていることに関しては、APAP または CCl_4 誘導性肝障害モデルラットにおいて肝障害時に低下する miR-298 および miR-370 が、肝障害よりも早期に発現低下すること (Fukushima et al., 2007)、TCDD 誘導性肝障害モデルマウスにおいても肝障害発症前より miR-101a の発現低下が認められること (Yoshioka et al., 2011) を支持する結果となった。従って、肝障害時において発現低下する miRNA の中で、発症前においても発現が低下する miRNA がより肝障害の発症原因になり得る可能性が考えられた。以上、薬物誘導性肝障害と miRNA の発現変動との関連について肝障害の発症までの時間推移を追うことにより、肝障害発症早期において多数の免疫関連の miRNA が発現変動することを初めて明らかにし、薬物誘導性肝障害の発症メカニズム解明に向けた研究に対して新たな知見を供することが出来たと思われる。

E.健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

F-1. 著書

1) Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.

MicroRNA-Regulation of P450 and Pharmacogenetics in press. 「Handbook Pharmacogenomics and Straified Medicines」 Sandosh Padmanabhan Ed. Elsevier, Watham (2014) in press.

- 2) 横井 毅. 薬物代謝反応・代謝酵素の多様性と薬物相互作用の予測 p198-204. 「*In vitro* 毒性・動態評価の最前線」小島肇監修、シーエムシー出版 (2013).

F-2. 和文総説

- 1) 織田進吾、横井 毅. 薬物性肝障害における免疫・炎症因子の関与。 *日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌* 8: in press (2014).
- 2) 横井 毅. 薬物代謝と免疫・炎症を考慮した薬物性肝障害の理解と展望。 *毒性質問箱* 16: in press (2014).
- 3) 横井 毅. 薬物代謝と免疫・炎症を考慮した薬物性肝障害の理解と展望。 *日本薬理学雑誌* 143: in press (2014).
- 4) 横井 毅. 薬物代謝と肝障害. *月刊薬事* 56: 21-25 (2014).

- 5) 横井 毅. 医薬品開発および臨床に資する薬の副作用の軽減・回避・予測研究. *名古屋大学医学部学友時報* 763: 3-4 (2013).

- 6) 横井 毅. 体内動態と薬物相互作用の基礎と応用-食品成分への展開-. *食品加工技術* 33: 7-13 (2013).

F-3. 英文総説

- 1) Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. MicroRNAs as mediators of drug toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 53: 377-400 (2013).
- 2) Tatsuki Fukami and Tsuyoshi Yokoi. The Emerging role of human esterases. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27: 466-477 (2013).

F-4. 英文原著論文

- 1) Azusa Yano, Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Development of a cell-based assay system considering drug metabolism and immune- and inflammatory-related factors for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, in press (2014).
- 2) Seng Chuan Tang, Rolf W. Sparidans, Ka Lei Cheung, Tatsuki Fukami, Selvi Durmus, Els Wagenaar, Tsuyoshi Yokoi,

- Bart J. M. van Vlijmen, Jos H. Beijnen, and Alfred H. Schinkel. P-glycoprotein, CYP3A and plasma carboxylesterase determine brain and blood disposition of the mTOR inhibitor everolimus (Afinitor) in mice. *Clin. Cancer Res.*, in press (2014)
- 3) Shinya Endo, Azusa Yano, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of miRNAs in the early phase of halothane-induced liver injury. *Toxicology*, **319**: 75-84 (2014).
- 4) Kei Takahashi, Naoyuki Tatsumi, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Integrated analysis of rifampicin-induced microRNA and gene expression changes in human hepatocytes. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press (2014).
- 5) Shohei Takai, Satonori Higuchi, Azusa Yano, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of immune- and inflammatory-related factors in flucloxacillin-induced liver injury in mice. *J. Appl. Toxicol.*, in press (2014).
- 6) Mai Shimizu, Tatsuki Fukami, Yusuke Ito, Takaya Kurokawa, Motoki Kariya, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Indiplon is hydrolyzed by arylacetamide acetylase in human liver. *Drug Metab. Dispos.*, **42**: 751-758 (2014).
- 7) Shuichi Kuno, Fuminori Sakurai, Kahori Shimizu, Naoya Matsumura, Soonih Kim, Hitoshi Watanabe, Katsuhisa Tashiro, Masashi Tachibana, Tsuyoshi Yokoi, and Hiroyuki Mizuguchi. Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of an adenovirus vector expressing human CYP3A4. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press (2014).
- 8) Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Epigenetic regulation of the tissue-specific expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A10. *Biochem. Pharmacol.*, **87**: 660-667 (2014).
- 9) Kentaro Matsuo, Eita Sasaki, Satonori Higuchi, Shohei Takai, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of oxidative stress and immune- and inflammation-related factors in azathioprine-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, **224**: 215-224 (2014).