

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 (Fig. 5A)。その結果、HAL 投与 1 時間後および溶媒投与 6 時間後の群と HAL 投与 24 時間後の群、HAL 投与 3 および 6 時間後の群に大きく分類された。また、原因は不明であるが、溶媒投与 3 および 24 時間後は離れたクラスターに分類された。次に、各時間における溶媒群に対する HAL 投与群の発現比を階層的クラスタリング解析した (Fig. 5B)。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。

初めに、各 miRNA の標的遺伝子を DIANA-microT-CDS に基づいて予測し、予測された遺伝子群を KEGG pathway を用いて解析した。各時間において発現上昇または低下した miRNA の推定標的経路を *P*-value の小さい順にそれぞれ Tables 3-7 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、炎症および細胞障害に関わる経路を下線で示した。解析には Table 1 で各時間において 2 倍以上発現変動した miRNA を用いたが、その中で、ラットの配列の miRNA でマウスの配列と異なる miRNA は、DIANA-microT CDS によって標的遺伝子の予測が出来ないため除外した。なお、予測された経路のうち、肝臓以外でのみ起こる経路を除外した。HAL 投与 1 時間後において発現上昇した miRNA の推定標的経路は 3 個の経路が予測され、発現低下した miRNA の推定標的経路は 42 個の経路が予測された (Table 3)。なお、免疫および炎症関連の経路の中

で MAPK signaling pathway、Chemokine signaling pathway、T cell receptor signaling pathway、TGF- β signaling pathway、Apoptosis は HAL 投与後 1 時間のみならず、いずれの時間においても共通して予測された。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。

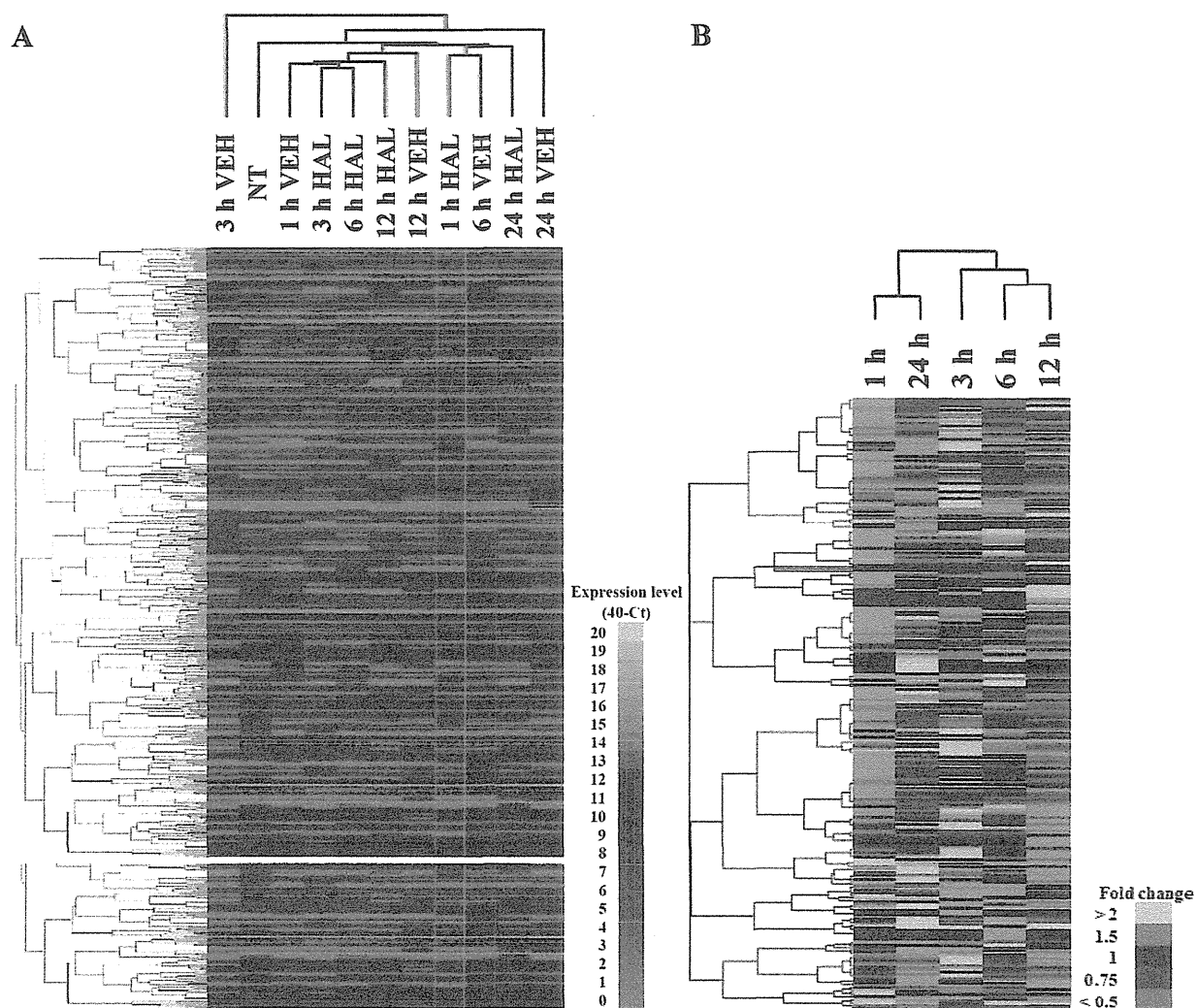


Fig. 5. Hierarchical clustering of hepatic miRNA expression profiles in HAL-induce liver injury (A) and the fold changes (B) between vehicle- or HAL-treated samples at the five different time points after administration . The levels were clustered by using Cluster 3.0 software (complete linkage) and visualized by using MapleTree software. Data are presented as 40-Ct (A). VEH: Vehicle-treated group, HAL: Halothane-treated group.

HAL 投与 1 時間後という肝障害発症前
のかなり早期の段階において、これらの
免疫および炎症に関連する経路が挙がっ
てきた。また、発現が上昇する miRNA の
推定標的経路として Drug metabolism –
cytochrome P450 が挙がってきた。さらに、
この経路に含まれる遺伝子である
Cyp2c55、Ugt2b5、Cyp3a11 がそれぞれ、
miR-151-3p、miR-455、miR-674-5p の標的
遺伝子として予測された。従って、HAL
投与 1 時間後においてこれらの miRNA が
発現上昇することで、Cyp や Ugt などの
薬物代謝酵素に影響を与える可能性が示
された。HAL 投与 3 時間後において発現
上昇した miRNA の推定標的経路は 39 個
の経路が予測され、発現低下した miRNA
の推定標的経路は 27 個の経路が予測され
た (Table 4)。これら経路の中で、Hepatitis
C、B cell receptor signaling pathway、
Jak-STAT signaling pathway、VEGF
signaling pathway は投与 3 時間後において
特異的に予測された。HAL 投与 6 時間後
において発現上昇した miRNA の推定標
的経路は 27 個の経路が予測され、発現低
下した miRNA の推定標的経路は 25 個の
経路が予測された (Table 5)。これらの経
路の中で、B cell receptor signaling pathway、
VEGF signaling pathway は投与 6 時間後に

において特異的に予測された。HAL 投与 12
時間後において発現上昇した miRNA の
推定標的経路は 20 個の経路が予測され、
発現低下した miRNA の推定標的経路は
28 個の経路が予測された (Table 6)。これ
らの経路の中で、Cell adhesion molecules
(CAMs)、Hepatitis C は投与 12 時間後にお
いて特異的に予測された。HAL 投与 24
時間後において発現上昇した miRNA の
推定標的経路は 28 個の経路が予測され、
発現低下した miRNA の推定標的経路は
36 個の経路が予測された (Table 7)。これ
らの経路の中で、B cell receptor signaling
pathway、Cell adhesion molecules (CAMs)、
Cytokine-cytokine receptor interaction、
Hepatitis C は投与 24 時間後において特異
的に予測された。

以上より、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 がこれらの発現調節を担っている可能性が示された。

Table 3. The list of enriched pathways ($P < 0.05$) in the genes predicted to be targeted by up- or down-regulated miRNAs with at least two-fold change in liver at 1 hour after HAL administration.

Up-regulated miRNAs			Down-regulated miRNAs		
KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes	KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes
Drug metabolism - cytochrome P450	0.0089	3	Pathways in cancer	2E-21	188
mTOR signaling pathway	0.0095	8	<u>MAPK signaling pathway</u>	6E-12	141
<u>MAPK signaling pathway</u>	0.037	23	Focal adhesion	9E-12	112
			Regulation of actin cytoskeleton	1E-11	120
			Wnt signaling pathway	8E-10	86
			Endocytosis	2E-09	108
			ErbB signaling pathway	2E-08	55
			Insulin signaling pathway	1E-07	76
			Ubiquitin mediated proteolysis	2E-07	75
			<u>Chemokine signaling pathway</u>	5E-07	93
			Adherens junction	6E-07	47
			<u>T cell receptor signaling pathway</u>	3E-06	64
			<u>TGF-beta signaling pathway</u>	1E-05	49
			Fc gamma R-mediated phagocytosis	6E-05	52
			<u>Jak-STAT signaling pathway</u>	7E-05	74
			<u>Apoptosis</u>	9E-05	47
			<u>VEGF signaling pathway</u>	0.0001	42
			<u>Cytokine-cytokine receptor interaction</u>	0.0002	108
			p53 signaling pathway	0.0003	38
			Phosphatidylinositol signaling system	0.0005	40
			Hedgehog signaling pathway	0.0005	31
			mTOR signaling pathway	0.0012	30
			Gap junction	0.0015	43
			Lysine degradation	0.0018	24
			Cell cycle	0.0037	58
			Fc epsilon RI signaling pathway	0.0039	40
			<u>B cell receptor signaling pathway</u>	0.0045	39
			<u>Leukocyte transendothelial migration</u>	0.0051	54
			Glycerophospholipid metabolism	0.0079	33
			Tight junction	0.0088	59
			SNARE interactions in vesicular transport	0.0093	21
			Heparan sulfate biosynthesis	0.013	16
			Type II diabetes mellitus	0.014	25
			Calcium signaling pathway	0.026	77
			Glycosphingolipid biosynthesis	0.026	14
			Keratan sulfate biosynthesis	0.028	10
			ECM-receptor interaction	0.029	37
			O-Glycan biosynthesis	0.032	15
			Sphingolipid metabolism	0.033	21
			Basal transcription factors	0.045	17
			<u>Cell adhesion molecules (CAMs)</u>	0.046	62
			Adipocytokine signaling pathway	0.048	30

Both pathways predicted by up- or down-regulated miRNAs were shaded. Immune, inflammation or liver injury related pathways were underlined.

Table 4. The list of enriched pathways ($P < 0.05$) in the genes predicted to be targeted by up- or down-regulated miRNAs with at least two-fold change in liver at 3 hour after HAL administration.

Up-regulated miRNAs			Down-regulated miRNAs		
KEGG pathway	P-value	Number of genes	KEGG pathway	P-value	Number of genes
Pathways in cancer	4E-13	152	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	2E-07	8
<u>MAPK signaling pathway</u>	6E-08	124	<u>MAPK signaling pathway</u>	2E-05	76
Lysine degradation	1E-07	22	Phosphatidylinositol signaling system	2E-05	29
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	4E-07	13	ErbB signaling pathway	4E-05	33
ECM-receptor interaction	6E-07	35	Bacterial invasion of epithelial cells	5E-05	25
Regulation of actin cytoskeleton	3E-06	101	Regulation of actin cytoskeleton	8E-05	62
Wnt signaling pathway	3E-06	70	Pathways in cancer	0.0001	82
<u>T cell receptor signaling pathway</u>	3E-06	57	<u>T cell receptor signaling pathway</u>	0.0001	36
Endocytosis	1E-05	94	Inositol phosphate metabolism	0.0002	20
Focal adhesion	2E-05	90	Focal adhesion	0.0003	56
Ubiquitin mediated proteolysis	3E-05	65	Endocytosis	0.0004	60
Gap junction	0.0001	39	Lysine degradation	0.0006	13
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.0001	74	Gap junction	0.0009	24
<u>TGF-beta signaling pathway</u>	0.0004	45	Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.001	30
Insulin signaling pathway	0.0005	62	Adherens junction	0.0017	25
Bacterial invasion of epithelial cells	0.0009	34	Calcium signaling pathway	0.0025	46
ErbB signaling pathway	0.001	44	<u>Chemokine signaling pathway</u>	0.0032	48
Adherens junction	0.0012	39	Folate biosynthesis	0.0053	4
Circadian rhythm - mammal	0.0012	14	Other glycan degradation	0.0059	4
mTOR signaling pathway	0.0012	28	Cell cycle	0.007	34
Primary bile acid biosynthesis	0.0013	5	Insulin signaling pathway	0.0073	37
Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0023	44	Amoebiasis	0.0074	29
Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	0.0029	6	mTOR signaling pathway	0.0106	17
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.0037	41	<u>B cell receptor signaling pathway</u>	0.0172	23
Nucleotide excision repair	0.0055	20	Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0177	27
Toxoplasmosis	0.0087	48	<u>TGF-beta signaling pathway</u>	0.0215	26
Adipocytokine signaling pathway	0.0122	32	Tight junction	0.0424	36
<u>Hepatitis C</u>	0.0138	55			
Hedgehog signaling pathway	0.0139	25			
<u>B cell receptor signaling pathway</u>	0.0154	35			
Type II diabetes mellitus	0.0178	23			
Cell cycle	0.0192	49			
Notch signaling pathway	0.0192	24			
<u>Chemokine signaling pathway</u>	0.0247	71			
<u>Jak-STAT signaling pathway</u>	0.0269	59			
Phosphatidylinositol signaling system	0.0344	35			
Amoebiasis	0.0346	41			
<u>Apoptosis</u>	0.0355	33			
<u>VEGF signaling pathway</u>	0.0355	32			

Both pathways predicted by up- or down-regulated miRNAs were shaded. Immune, inflammation or liver injury related pathways were underlined.

Table 5. The list of enriched pathways ($P < 0.05$) in the genes predicted to be targeted by up- or down-regulated miRNAs with at least two-fold change in liver at 6 hour after HAL administration.

Up-regulated miRNAs			Down-regulated miRNAs		
KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes	KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	2E-31	8	ECM-receptor interaction	2E-12	24
Pathways in cancer	8E-12	104	Focal adhesion	4E-06	66
Lysine degradation	4E-08	17	Pathways in cancer	4E-06	92
Adherens junction	2E-06	29	<u>T cell receptor signaling pathway</u>	5E-05	41
ErbB signaling pathway	2E-05	35	<u>TGF-beta signaling pathway</u>	7E-05	28
<u>T cell receptor signaling pathway</u>	4E-05	40	Lysine degradation	1E-04	15
Regulation of actin cytoskeleton	9E-05	63	Wnt signaling pathway	0.0002	43
<u>TGF-beta signaling pathway</u>	0.0001	29	Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0006	31
Phosphatidylinositol signaling system	0.0003	29	Adherens junction	0.0007	28
Insulin signaling pathway	0.0003	44	Amoebiasis	0.0025	29
Calcium signaling pathway	0.0014	50	Hedgehog signaling pathway	0.0054	19
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.0014	31	ErbB signaling pathway	0.0059	29
Focal adhesion	0.0014	56	<u>MAPK signaling pathway</u>	0.0059	69
Bacterial invasion of epithelial cells	0.0017	24	<u>Chemokine signaling pathway</u>	0.0075	49
mTOR signaling pathway	0.0017	21	Primary bile acid biosynthesis	0.0106	4
Ubiquitin mediated proteolysis	0.0022	44	<u>B cell receptor signaling pathway</u>	0.0114	24
<u>MAPK signaling pathway</u>	0.004	72	Regulation of actin cytoskeleton	0.0121	56
Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0049	30	Protein processing in endoplasmic reticulum	0.0184	43
<u>B cell receptor signaling pathway</u>	0.0054	25	Gap junction	0.0186	21
Type II diabetes mellitus	0.0054	17	Protein digestion and absorption	0.0186	24
Endocytosis	0.0212	53	Ubiquitin mediated proteolysis	0.0307	36
Mucin type O-Glycan biosynthesis	0.0223	6	Glycerophospholipid metabolism	0.0326	23
Amoebiasis	0.023	31	Tight junction	0.0339	36
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.0287	44	Apoptosis	0.0366	23
Fc epsilon RI signaling pathway	0.033	24	<u>VEGF signaling pathway</u>	0.0415	22
<u>Apoptosis</u>	0.0375	24			
Circadian rhythm - mammal	0.0434	8			

Both pathways predicted by up- or down-regulated miRNAs were shaded. Immune, inflammation or liver injury related pathways were underlined.

Table 6. The list of enriched pathways ($P < 0.05$) in the genes predicted to be targeted by up- or down-regulated miRNAs with at least

two-fold change in liver at 12 hour after HAL administration.

Up-regulated miRNAs			Down-regulated miRNAs		
KEGG pathway	P-value	Number of genes	KEGG pathway	P-value	Number of genes
ECM-receptor interaction	1E-23	22	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	7E-42	10
Lysine degradation	1E-07	16	Pathways in cancer	2E-10	105
Bacterial invasion of epithelial cells	7E-05	23	Lysine degradation	4E-09	20
Amoebiasis	0.0002	29	<u>TGF-beta signaling pathway</u>	2E-07	36
Focal adhesion	0.0002	55	Mucin type O-Glycan biosynthesis	1E-05	7
Adherens junction	0.0002	25	<u>MAPK signaling pathway</u>	1E-04	81
Mucin type O-Glycan biosynthesis	0.0002	8	Wnt signaling pathway	0.0002	51
<u>MAPK signaling pathway</u>	0.0003	68	Biotin metabolism	0.0002	1
Pathways in cancer	0.0004	76	<u>T cell receptor signaling pathway</u>	0.0004	40
Regulation of actin cytoskeleton	0.0004	55	SNARE interactions in vesicular transport	0.0007	15
ErbB signaling pathway	0.0008	26	Focal adhesion	0.001	61
Gap junction	0.0008	24	ErbB signaling pathway	0.0017	32
Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	0.0015	6	mTOR signaling pathway	0.0025	22
Protein digestion and absorption	0.0021	25	Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0069	32
Other glycan degradation	0.0108	3	Regulation of actin cytoskeleton	0.0085	63
Endocytosis	0.0132	48	Calcium signaling pathway	0.0095	51
Calcium signaling pathway	0.0331	40	Endocytosis	0.0143	60
<u>Cell adhesion molecules (CAMs)</u>	0.0331	30	Protein processing in endoplasmic reticulum	0.0151	49
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.0366	24	Phosphatidylinositol signaling system	0.0198	25
mTOR signaling pathway	0.0407	15	<u>Apoptosis</u>	0.0258	25
			Notch signaling pathway	0.0292	18
			Hedgehog signaling pathway	0.0292	18
			Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	0.0313	7
			Insulin signaling pathway	0.0316	39
			Adipocytokine signaling pathway	0.0332	23
			<u>Chemokine signaling pathway</u>	0.0377	50
			Cell cycle	0.0394	36
			<u>Hepatitis C</u>	0.0463	37

Both pathways predicted by up- or down-regulated miRNAs were shaded. Immune, inflammation or liver injury related pathways were underlined.

Table 7. The list of enriched pathways ($P < 0.05$) in the genes predicted to be targeted by up- or down-regulated miRNAs with at least two-fold change in liver at 24 hour after HAL administration.

Up-regulated miRNAs			Down-regulated miRNAs		
KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes	KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	2E-27	12	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	5E-33	11
Pathways in cancer	4E-11	130	ECM-receptor interaction	2E-15	32
Lysine degradation	1E-10	27	Pathways in cancer	6E-12	130
ErbB signaling pathway	5E-05	42	Focal adhesion	6E-08	85
<u>MAPK signaling pathway</u>	0.0002	100	<u>T cell receptor signaling pathway</u>	2E-07	54
Bacterial invasion of epithelial cells	0.0003	32	<u>TGF-beta signaling pathway</u>	1E-06	42
Adherens junction	0.0005	33	Endocytosis	1E-06	82
Wnt signaling pathway	0.0005	59	Lysine degradation	1E-06	19
Mucin type O-Glycan biosynthesis	0.0006	9	<u>MAPK signaling pathway</u>	1E-05	98
Regulation of actin cytoskeleton	0.0006	81	Regulation of actin cytoskeleton	2E-05	82
<u>T cell receptor signaling pathway</u>	0.0017	44	ErbB signaling pathway	0.0002	39
mTOR signaling pathway	0.005	24	Insulin signaling pathway	0.0003	54
Focal adhesion	0.0056	70	<u>Chemokine signaling pathway</u>	0.0003	68
<u>TGF-beta signaling pathway</u>	0.0058	33	Amoebiasis	0.0004	39
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.0064	37	Biotin metabolism	0.0005	1
Insulin signaling pathway	0.0064	51	mTOR signaling pathway	0.0007	25
Phosphatidylinositol signaling system	0.0115	33	Mucin type O-Glycan biosynthesis	0.0007	11
Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate	0.0126	6	Wnt signaling pathway	0.0012	56
SNARE interactions in vesicular transport	0.0126	15	Cell cycle	0.0013	47
Sphingolipid metabolism	0.0126	16	Adherens junction	0.0029	31
Type II diabetes mellitus	0.0126	21	<u>B cell receptor signaling pathway</u>	0.0039	31
Gap junction	0.0145	30	Bacterial invasion of epithelial cells	0.0041	28
Adipocytokine signaling pathway	0.016	27	Ubiquitin mediated proteolysis	0.0042	51
Calcium signaling pathway	0.016	60	Gap junction	0.005	29
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.0163	61	<u>Cell adhesion molecules (CAMs)</u>	0.0064	46
Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0185	35	Hedgehog signaling pathway	0.0092	22
Ubiquitin mediated proteolysis	0.0212	51	Protein processing in endoplasmic reticulum	0.0094	55
Notch signaling pathway	0.0293	21	<u>Apoptosis</u>	0.0109	30
			<u>Cytokine-cytokine receptor interaction</u>	0.011	75
			Circadian rhythm - mammal	0.0136	12
			<u>Hepatitis C</u>	0.0236	43
			Tight junction	0.0272	45
			p53 signaling pathway	0.0279	26
			Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0324	33
			Maturity onset diabetes of the young	0.0324	9
			Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.0387	31

Both pathways predicted by up- or down-regulated miRNAs were shaded. Immune, inflammation or liver injury related pathways were underlined.

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。

Table 8には、各時間において溶媒投与群と比較してISO投与群において2倍以上発現変動したmiRNAの数を示した。これらのmiRNAについて、HAL投与1および3時間後に発現変動したmiRNAと比較解析した結果をFig. 6に示した。HAL投与1時間後に発現が上昇した10 miRNAs、ISO投与1時間後に発現が上昇した49

miRNAsのうち、共通しているものは6種類であった。一方、HAL投与1時間後に発現が低下した97 miRNAs、ISO投与1時間後に発現が低下した43 miRNAsのうち、共通しているものは30種類であった(Fig. 6)。また、HAL投与3時間後に発現が上昇した58 miRNAs、ISO投与3時間後に発現が上昇した64 miRNAsのうち、共通しているものは35種類であった。一方、HAL投与3時間後に発現が低下した34 miRNAs、ISO投与3時間後に発現が低下した31 miRNAsのうち、共通しているものは23種類であった(Fig. 6B)。薬物投与1および3時間後に発現上昇または発現低下したmiRNAについて、HAL投与群とISO投与群において共通したmiRNAは薬理作用により変動したmiRNAと考えられる。そのため、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。

Table 8. Number of miRNAs changed at early time points after ISO administration

Time after administration (h)	Up (> 2-fold)	No Change	Down (< 0.5-fold)	Total
1	49	145	43	237
3	64	142	32	238

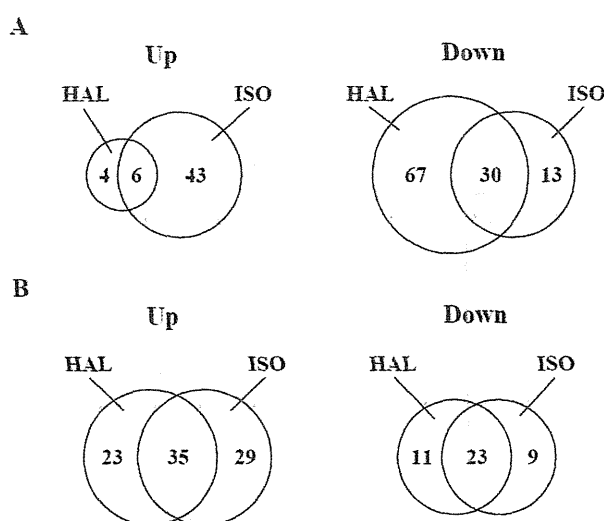


Fig. 6. Venn diagrams showing the overlap of miRNA changed at 1 or 3 hour after HAL or ISO administration. The up- or down-regulated miRNAs at least two-fold change in liver at 1 hour (A) and 3 hour (B) after HAL or ISO administration. VEH: Vehicle-treated group, HAL: Halothane-treated group.

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、薬物投与 1 時間後において HAL 投与により発現上昇した miRNA の推定標的経路は 5 種類が予測され、ISO 投与により発現上昇した miRNA の推定標的経路は 23 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 4 種類であった (Table 9)。投与 1 時間後に HAL 特異的に発現が上昇する miRNA の推定標的経路は Drug metabolism – cytochrome P450 のみであっ

た。一方、ISO 投与群において免疫および炎症関連の経路として TGF- β signaling pathway が挙がってきた。

Table 9. The list of enriched pathways ($P < 0.05$) in the genes predicted to be targeted by up-regulated miRNAs with at least two-fold change in liver at 1 hour after only HAL or ISO administration.

HAL-administered group			ISO-administered group		
KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes	KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes
Drug metabolism - cytochrome P450	0.0047	1	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	5E-26	10
Bacterial invasion of epithelial cells	0.0157	7	Mucin type O-Glycan biosynthesis	1E-11	12
<u>MAPK signaling pathway</u>	0.0276	17	Lysine degradation	3E-11	22
Pathways in cancer	0.0378	18	Pathways in cancer	9E-08	103
mTOR signaling pathway	0.0378	5	ErbB signaling pathway	2E-05	38
			Wnt signaling pathway	4E-05	55
			<u>MAPK signaling pathway</u>	0.0003	83
			Regulation of actin cytoskeleton	0.0003	72
			Insulin signaling pathway	0.0003	50
			Gap junction	0.0004	30
			mTOR signaling pathway	0.0012	23
			Endocytosis	0.0016	67
			Focal adhesion	0.0023	63
			Bacterial invasion of epithelial cells	0.0031	26
			<u>TGF-beta signaling pathway</u>	0.0034	28
			Tight junction	0.0095	43
			Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.0107	32
			mRNA surveillance pathway	0.0107	31
			Adipocytokine signaling pathway	0.0129	23
			Phosphatidylinositol signaling system	0.0226	26
			Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	0.0343	5
			Adherens junction	0.0424	28
			Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate	0.0467	4

Both pathways predicted by HAL- or ISO-specific miRNAs were shaded. Immune, inflammation or liver injury related pathways were underlined.

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。

Table 10. The list of enriched pathways ($P < 0.05$) in the genes predicted to be targeted by down-regulated miRNAs with at least two-fold change in liver at 1 hour after only HAL or ISO administration.

HAL-administered group			ISO-administered group		
KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes	KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes
Focal adhesion	1.87E-09	105	Gap junction	5E-08	11
Pathways in cancer	2.26E-08	145	Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	6E-07	4
Regulation of actin cytoskeleton	2.74E-07	103	Lysine degradation	9E-07	7
<u>MAPK signaling pathway</u>	3.01E-07	122	Pathways in cancer	0.0012	26
ECM-receptor interaction	1.36E-06	36	ErbB signaling pathway	0.0012	11
Mucin type O-Glycan biosynthesis	2.75E-06	12	Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate	0.0044	2
Lysine degradation	3.57E-06	23	Adherens junction	0.0146	5
Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	1.63E-05	12	<u>MAPK signaling pathway</u>	0.033	21
ErbB signaling pathway	2.19E-05	48			
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	0.0001	11			
Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate	0.0001	10			
Insulin signaling pathway	0.00015	65			
Endocytosis	0.00016	89			
Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate	0.00031	8			
Gap junction	0.00047	36			
Glycerophospholipid metabolism	0.00052	41			
T cell receptor signaling pathway	0.00108	53			
Amoebiasis	0.00108	48			
p53 signaling pathway	0.00142	34			
SNARE interactions in vesicular transport	0.0017	18			
mTOR signaling pathway	0.00173	29			
Wnt signaling pathway	0.0019	68			
Biotin metabolism	0.00222	1			
Ubiquitin mediated proteolysis	0.00349	62			
Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	0.00399	7			
<u>VEGF signaling pathway</u>	0.00445	36			
Bacterial invasion of epithelial cells	0.00532	33			
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.00553	41			
Hedgehog signaling pathway	0.00895	26			
<u>Leukocyte transendothelial migration</u>	0.0091	48			
Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.01197	45			
<u>Jak-STAT signaling pathway</u>	0.01274	62			
Sphingolipid metabolism	0.01294	18			
<u>Chemokine signaling pathway</u>	0.013	73			
Phosphatidylinositol signaling system	0.013	38			
<u>Apoptosis</u>	0.02019	36			
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.03116	63			
<u>Hepatitis C</u>	0.03189	55			
Toxoplasmosis	0.03189	46			
<u>B cell receptor signaling pathway</u>	0.03707	33			
Fc epsilon RI signaling pathway	0.03805	35			
Fatty acid metabolism	0.04022	14			

Both pathways predicted by HAL- or ISO-specific miRNAs were shaded. Immune, inflammation or liver injury related pathways were underlined.

Table 11. The list of enriched pathways ($P < 0.05$) in the genes predicted to be targeted by up-regulated miRNAs with at least two-fold change in liver at 3 hour after only HAL or ISO administration.

HAL-administered group			ISO-administered group		
KEGG pathway	P-value	Number of genes	KEGG pathway	P-value	Number of genes
Pathways in cancer	6.39E-10	81	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	2E-21	7
Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	2.42E-08	5	Lysine degradation	6E-14	22
<u>MAPK signaling pathway</u>	1.85E-07	74	Pathways in cancer	9E-13	117
Lysine degradation	4.59E-06	13	ErbB signaling pathway	2E-06	37
<u>TGF-beta signaling pathway</u>	5.33E-06	32	Mucin type O-Glycan biosynthesis	2E-06	9
Adherens junction	1.02E-05	28	<u>TGF-beta signaling pathway</u>	2E-05	36
Wnt signaling pathway	4.12E-05	42	Bacterial invasion of epithelial cells	3E-05	29
<u>Cytokine-cytokine receptor interaction</u>	0.0002	48	Regulation of actin cytoskeleton	0.0002	71
Focal adhesion	0.00038	50	Insulin signaling pathway	0.0002	49
Regulation of actin cytoskeleton	0.00042	54	mTOR signaling pathway	0.0002	25
<u>T cell receptor signaling pathway</u>	0.00042	32	Biotin metabolism	0.0002	1
ErbB signaling pathway	0.00042	28	<u>MAPK signaling pathway</u>	0.0005	81
Prostate cancer	0.00049	28	Focal adhesion	0.0023	61
Endocytosis	0.00115	49	Wnt signaling pathway	0.0023	44
Notch signaling pathway	0.00302	17	Adherens junction	0.0023	30
Insulin signaling pathway	0.00494	34	<u>T cell receptor signaling pathway</u>	0.0026	38
Tight junction	0.005	32	Endocytosis	0.003	63
<u>Leukocyte transendothelial migration</u>	0.00765	28	Ubiquitin mediated proteolysis	0.0031	47
<u>VEGF signaling pathway</u>	0.00982	21	Type II diabetes mellitus	0.0047	19
Maturity onset diabetes of the young	0.01251	7	Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.0051	32
Ubiquitin mediated proteolysis	0.03395	32	Phosphatidylinositol signaling system	0.0064	27
Hedgehog signaling pathway	0.03795	15	<u>B cell receptor signaling pathway</u>	0.0071	27
mTOR signaling pathway	0.03795	15	Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.0191	31
Bladder cancer	0.03795	13	Gap junction	0.0191	30
beta-Alanine metabolism	0.03866	7	Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	0.0209	8
Cell cycle	0.03978	27	<u>Chemokine signaling pathway</u>	0.0332	52
Fc epsilon RI signaling pathway	0.04623	20	<u>Hepatitis C</u>	0.0332	37
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.04851	36	Carbohydrate digestion and absorption	0.0374	13
			<u>VEGF signaling pathway</u>	0.0483	24

Both pathways predicted by HAL- or ISO-specific miRNAs were shaded. Immune, inflammation or liver injury related pathways were underlined.

薬物投与3時間後においてHAL投与により発現上昇したmiRNAの推定標的経路は26種類が予測され、ISO投与により発現上昇したmiRNAの推定標的経路は29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16種類であった。投与3時間後にHAL特異的に発現が上昇するmiRNAの推定標的経路は10種類であった (Table 11)。

これらの経路の中で免疫および炎症に関連する経路としてCytokine-cytokine receptor interaction、Leukocyte transendothelial pathwayが挙げられてきた。一方、ISO特異的に発現が上昇するmiRNAの推定標的経路は13種類であり、その中でB cell receptor signaling pathway、Chemokine signaling pathway、Hepatitis Cは免疫および炎症関連の経路であった。

Table 12. The list of enriched pathways ($P < 0.05$) in the genes predicted to be targeted by down-regulated miRNAs with at least two-fold change in liver at 3 hour after only HAL or ISO administration.

HAL-administered group			ISO-administered group		
KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes	KEGG pathway	<i>P</i> -value	Number of genes
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	8.21E-21	4	ECM-receptor interaction	4E-31	19
Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate	1.34E-05	2	Focal adhesion	3E-09	53
Adherens junction	0.00027	12	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	4E-09	4
Pathways in cancer	0.00027	34	Lysine degradation	3E-06	12
Bacterial invasion of epithelial cells	0.00946	9	ErbB signaling pathway	6E-05	24
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.01064	14	Amoebiasis	9E-05	21
ErbB signaling pathway	0.04079	10	Pathways in cancer	0.0005	54
Focal adhesion	0.04079	21	Protein digestion and absorption	0.0005	21
Lysine degradation	0.0433	5	Mucin type O-Glycan biosynthesis	0.0018	6
<u>T cell receptor signaling pathway</u>	0.0433	13	<u>T cell receptor signaling pathway</u>	0.0054	23
			Fatty acid elongation in mitochondria	0.0058	1
			<u>VEGF signaling pathway</u>	0.0119	17
			Wnt signaling pathway	0.0471	25
			Insulin signaling pathway	0.0471	24
			Gap junction	0.0471	18
			<u>Apoptosis</u>	0.0471	14

Both pathways predicted by HAL- or ISO-specific miRNAs were shaded. Immune, inflammation or liver injury related pathways were underlined.

薬物投与3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10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16種類が予測された (Table 12)。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6種類であった。投与3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4種類であり、これらの経路の中で免疫および炎症に関連する経路は挙がってこなかった。一方、ISO特異的に発現が低下するmiRNAの推定標的経路の中で、VEGF signaling pathwayが免疫および炎症関連の経路として挙がってきた。

Fig. 6で示したように、薬理作用により影響を受けたmiRNAであると考えられるHALおよびISO投与群において共通して発現変動したmiRNAを除外して、KEGGによるpathway解析を行ったが、Tables 9-12において網掛けで示したように、HALおよびISO投与群において共通して認められた経路が多く存在した。そのため、共通した経路以外のHALおよびISO投与群においてのみ認められた経路が、HALおよびISO特異的に影響を受けている経路であると考えられた。

また、HAL投与1時間後において発現低下するmiRNAの推定標的経路において、ISO投与群で認められた経路と比較

して、白血球の内皮細胞への浸潤、Jak-STATシグナル経路およびケモカインシグナル経路などの免疫および炎症に関する経路が多く認められた (Table 10)。

HAL 投与 3 時間後において発現上昇する miRNA の推定標的経路においては、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用や白血球の内皮細胞への浸潤に関する経路も認められたが、同様に ISO 投与 3 時間後に発現上昇する miRNA の推定標的経路においても、ケモカインシグナル経路などの免疫および炎症に関する経路が認められた (Table 11)。

以上より、肝障害発症前の早期段階である薬物投与 1 および 3 時間後に HAL および ISO 特異的に発現変動した miRNA に対して、KEGG pathway によるアノテーション解析を行うことにより、ISO 投与群と比較して HAL 投与 1 時間後において発現低下する miRNA が免疫および炎症に関わる pathway を変動させ、肝障害の発症へ寄与している可能性を示した。また、HAL および ISO 投与 3 時間後においては、いずれの投与群においても免疫および炎症関連の経路が挙がってきたことから、

投与 3 時間後に発現変動する miRNA については肝障害発症における寄与は少ない可能性が示された。

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 2-10 の方法に従い、miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) により探索した。なお、miRNA*については発現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。Fig. 6 に示した 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。HAL 投与 1 時間後について、その miRNA と標的遺伝子を全て Table 13 に示し、HAL 投与 3 時間後についての結果は Table 14 に示した。

Table 13. Reported target genes of miRNAs whose expression was increased or decreased in liver at 1 hour after HAL administration.

miRNA	Target Gene	
Up-regulated		
mmu-miR-375	Adipor2	adiponectin receptor 2
	Ahr	aryl-hydrocarbon receptor
	C1qbp	complement component 1, q subcomponent binding protein
	Insm1	insulinoma-associated 1
	Jak2	Janus kinase 2
	Mtpn	Myotrophin
	Mxi1	Max interacting protein 1
	Olf75-ps1	olfactory receptor 75, pseudogene 1
Usp1	ubiquitin specific peptidase 1	
Down-regulated		
mmu-let-7c	Lin28a	lin-28 homolog A (C. elegans)
	Myc	myelocytomatosis oncogene
	Mycn	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
mmu-let-7d	Sall4	sal-like 4 (Drosophila)
	Bdnf	brain derived neurotrophic factor
mmu-miR-101a	Drd3	dopamine receptor D3
	Akt1	thymoma viral proto-oncogene 1
	Atxn1	ataxin 1
	COX2	cytochrome c oxidase II, mitochondrial
mmu-miR-106b	Dusp1	dual specificity phosphatase 1
	Icos	inducible T cell co-stimulator
mmu-miR-125b-5p	Mapk14	mitogen-activated protein kinase 14
	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3
	Abtb1	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1
	Apln	Apelin
	Arid3a	AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like)
	Arid3b	AT rich interactive domain 3B
	Bmf	BCL2 modifying factor
	Ddx19b	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 19b
	Dus1l	dihydrouridine synthase 1-like (S. cerevisiae)
	Entpd4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4
	Igf2	insulin-like growth factor 2
	Jub	ajuba LIM protein
	Klf13	Kruppel-like factor 13
	Lin28a	lin-28 homolog A (C. elegans)
	Map2k7	mitogen-activated protein kinase kinase 7
	Ppt2	palmitoyl-protein thioesterase 2
	Rheb1l	Ras homolog enriched in brain like 1
	Smo	smoothened homolog (Drosophila)
	Tnf	tumor necrosis factor
	Tor2a	torsin family 2, member A
Trim71	tripartite motif-containing 71	
Zfp385a	zinc finger protein 385A	
mmu-miR-126-3p	Hoxa9	homeobox A9
	Pik3r2	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta)
	Runx1	runt related transcription factor 1
	Sfpi1	SFFV proviral integration 1
mmu-miR-126-5p	Spred1	sprouty protein with EVH-1 domain 1, related sequence
	Tall	T cell acute lymphocytic leukemia 1
	Runx1	runt related transcription factor 1
mmu-miR-127	Sfpi1	SFFV proviral integration 1
	Tall	T cell acute lymphocytic leukemia 1
mmu-miR-130a	Rtl1	retrotransposon-like 1
mmu-miR-145	Atxn1	ataxin 1
	Zfpn2	zinc finger protein, multitype 2
	Camk2d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta
	Hoxa9	homeobox A9

	Irs1	insulin receptor substrate 1
	Klf4	Kruppel-like factor 4 (gut)
	Prkce	protein kinase C, epsilon
mmu-miR-148a	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
	Kdm6b	KDM1 lysine (K)-specific demethylase 6B
mmu-miR-148b	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
mmu-miR-152	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
	Bcl2	B cell leukemia/lymphoma 2
	Cadm1	cell adhesion molecule 1
mmu-miR-15a	Ccnd1	cyclin D1
	Eln	Elastin
	Wnt3a	wingless-related MMTV integration site 3A
mmu-miR-15b	Arl2	ADP-ribosylation factor-like 2
	Mapk14	mitogen-activated protein kinase 14
mmu-miR-17	Rbl2	retinoblastoma-like 2
	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3
mmu-miR-192	Sip1	survival of motor neuron protein interacting protein 1
mmu-miR-19b	Aicda	activation-induced cytidine deaminase
	Ctnnb1	catenin (cadherin associated protein), beta 1
	Dlx5	distal-less homeobox 5
mmu-miR-200a	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1
	Nrp1	neuropilin 1
	Zeb2	zinc finger E-box binding homeobox 2
	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1
mmu-miR-200c	Zeb1	zinc finger E-box binding homeobox 1
	Zeb2	zinc finger E-box binding homeobox 2
mmu-miR-20b	Hif1a	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
	Vegfa	vascular endothelial growth factor A
	Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
	Pdcd4	programmed cell death 4
	Peli1	pellino 1
mmu-miR-21	Pten	phosphatase and tensin homolog
	Reck	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
	Spry1	sprouty homolog 1 (Drosophila)
	Spry2	sprouty homolog 2 (Drosophila)
mmu-miR-214	Pou4f2	POU domain, class 4, transcription factor 2
	Bnip3	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3
mmu-miR-221	Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4
	Kit	kit oncogene
mmu-miR-222	Kit	kit oncogene
	Smad3	SMAD family member 3
mmu-miR-24	Smad4	SMAD family member 4
	Smad5	SMAD family member 5
mmu-miR-25	Fbxw7	F-box and WD-40 domain protein 7
mmu-miR-26a	Ezh2	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
mmu-miR-26b	Lef1	lymphoid enhancer binding factor 1
	Odc1	ornithine decarboxylase, structural 1
mmu-miR-27a	Pparg	peroxisome proliferator activated receptor gamma
	Runx1	runt related transcription factor 1
	Srm	spermidine synthase
	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C
mmu-miR-27b	Runx1	runt related transcription factor 1
	Smad3	SMAD family member 3
	Smad4	SMAD family member 4
	Smad5	SMAD family member 5
mmu-miR-28	Srsf1	serine/arginine-rich splicing factor 1
mmu-miR-295	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)
mmu-miR-29a	Col1a2	collagen, type I, alpha 2
	Col3a1	collagen, type III, alpha 1
	Dnmt3a	DNA methyltransferase 3A
	Dnmt3b	DNA methyltransferase 3B
	Eln	Elastin

	Fbn1	fibrillin 1
	Zfp36	zinc finger protein 36
	Acvr2a	activin receptor IIA
	Bak1	BCL2-antagonist/killer 1
	Bbc3	BCL2 binding component 3
	Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
	Bmf	BCL2 modifying factor
	Col1a1	collagen, type I, alpha 1
	Col1a2	collagen, type I, alpha 2
	Col3a1	collagen, type III, alpha 1
	Col4a2	collagen, type IV, alpha 2
mmu-miR-29b	Col5a3	collagen, type V, alpha 3
	Ctnnbip1	catenin beta interacting protein 1
	Dnmt3a	DNA methyltransferase 3A
	Dnmt3b	DNA methyltransferase 3B
	Dusp2	dual specificity phosphatase 2
	Eln	Elastin
	Fbn1	fibrillin 1
	Hdac4	histone deacetylase 4
	Hrk	harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
	Tgfb3	transforming growth factor, beta 3
mmu-miR-29c	Yy1	YY1 transcription factor
	Abcb1b	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
	Ak1	adenylate kinase 1
mmu-miR-30a	Bdnf	brain derived neurotrophic factor
	Egfr	epidermal growth factor receptor
	Inhba	inhibin beta-A
	Tnrc6a	trinucleotide repeat containing 6a
mmu-miR-30d	Bdnf	brain derived neurotrophic factor
	Fzd4	frizzled homolog 4 (Drosophila)
mmu-miR-31	Hif1a	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
	Pdgfb	platelet derived growth factor, B polypeptide
mmu-miR-322	Arl2	ADP-ribosylation factor-like 2
mmu-miR-339-5p	Kdm6b	KDM1 lysine (K)-specific demethylase 6B
mmu-miR-494	Hsf2	heat shock factor 2
mmu-miR-497	Bcl2	B cell leukemia/lymphoma 2
	Bcl2l2	BCL2-like 2
	Eln	Elastin
mmu-miR-676	Arg1	arginase, liver
mmu-miR-92a	Trp63	transformation related protein 63
mmu-miR-93	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3

Table 14. Reported target genes of miRNAs whose expression was increased or decreased in liver at 3 hour after HAL administration.

miRNA	Target Gene
Up-regulated	
mmu-miR-10a	Hdac4 histone deacetylase 4
mmu-miR-125b-5p	Abtb1 ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1
	Apln Apelin
	Arid3a AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like)
	Arid3b AT rich interactive domain 3B
	Bmf BCL2 modifying factor
	Ddx19b DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 19b
	Dus11 dihydrouridine synthase 1-like (S. cerevisiae)
	Entpd4 ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4
	Igf2 insulin-like growth factor 2
	Jub ajuba LIM protein
	Klf13 Kruppel-like factor 13
	Lin28a lin-28 homolog A (C. elegans)

	Map2k7	mitogen-activated protein kinase kinase 7
	Ppt2	palmitoyl-protein thioesterase 2
	Rheb11	Ras homolog enriched in brain like 1
	Smo	smoothened homolog (Drosophila)
	Tnf	tumor necrosis factor
	Tor2a	torsin family 2, member A
	Trim71	tripartite motif-containing 71
	Zfp385a	zinc finger protein 385A
mmu-miR-142-3p	Adcy9	adenylate cyclase 9
mmu-miR-25	Fbxw7	F-box and WD-40 domain protein 7
mmu-miR-28	Srsf1	serine/arginine-rich splicing factor 1
	Adipor2	adiponectin receptor 2
	Ahr	aryl-hydrocarbon receptor
	Clqbp	complement component 1, q subcomponent binding protein
	Insm1	insulinoma-associated 1
mmu-miR-375	Jak2	Janus kinase 2
	Mtpn	Myotrophin
	Mxi1	Max interacting protein 1
	Olf75-ps1	olfactory receptor 75, pseudogene 1
	Usp1	ubiquitin specific peptidase 1
mmu-miR-494	Hsf2	heat shock factor 2
	Bcl2	B cell leukemia/lymphoma 2
mmu-miR-497	Bcl2l2	BCL2-like 2
	Eln	Elastin
mmu-miR-709	Ctcf1	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)-like
Down-regulated		
mmu-miR-137	Ezh2	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
	Tbx3	T-box 3
mmu-miR-381	Bdnf	brain derived neurotrophic factor

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。2-8 に従い、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。9 つのキーワードから抽出された遺伝子数を Table 15 に示した。なお、これらはすべてマウスの遺伝子である。

Table 13 および 14 に示した miRNA の既知の標的遺伝子の中で、MeSH 解析で各キーワードの関連遺伝子として挙げられたものがあるか調べ、それらをそれぞれ Table 16 および 17 にまとめた。HAL 投与により肝臓中で特異的に発現変動した miRNA の標的遺伝子の多くが、免疫、炎症および肝障害に関連する遺伝子に該当した (Tables 16 and 17)。この中で、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。

Table 15. Number of genes selected by MeSH analysis.

Keywords	Number of genes
Apoptosis	3961
Cell Adhesion	1893
Glutathione	465
Hepatitis	166
Immunity, Innate	1276
Inflammation	1779
Liver Diseases	305
Necrosis	498
Oxidative Stress	1165

さらに、Table 16 および 17 において網掛けで示した遺伝子とその遺伝子の発現調節に関わる miRNA について、HAL 投与 1、3、6、12 および 24 時間後における発現変動の程度を fold change で、および NT 群での発現量を 40-Ct 値として Table 18 に示した。Fold change は各時間において溶媒投与群と比較して、HAL 投与群においてこれらの miRNA が何倍変動したかを相対値で示した。40-Ct 値が大きいほど、NT 群において肝臓中 miRNA の発現量が高いことを示している。これらの miRNA と標的遺伝子の組み合わせの中で、肝臓において標的遺伝子の発現調節への寄与が大きいことが予想される miRNA を選択するために、NT 群での発現量が 40-Ct 値 8 以上である miRNA、HAL 投与 1 または 3 時間後において溶媒投与群と比較して 4 倍以上変動した miRNA の 2 つ

の条件を設定し、絞り込みを行った。これらの理由として、肝臓中で発現量の高い miRNA は、肝臓において遺伝子の発現制御に働く可能性が高いこと、さらに発現量の低い miRNA は miRNA アレイの再現性が得られない可能性が考えられることから条件を設定した。また、miRNA の変動が大きいほど、その標的遺伝子の発現量に影響を及ぼす可能性が高いことから、この条件を設定した。これらの条件を満たす箇所を Table 18 中に網掛けで示した。

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 (Table 18)。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 は認められなかつ