

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 であつ た。従って、これらの 5 つの miRNA が免 疫および炎症に関連し、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。

Table 16. Classifications of genes which are reported as target genes of miRNAs whose expression was increased or decreased in liver at 1 hour after HAL administration.

miRNA	Target Gene	Classification									Total	
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)		
<b>Up-regulated</b>												
mmu-miR-375	Adipor2				X		X			X	3	
	Ahr	X	X	X		X	X	X	X	X	8	
	C1qbp	X				X	X			X	4	
	Insm1										0	
	Jak2	X	X	X		X	X		X	X	7	
	Mtpn	X									1	
	Mxi1	X					X				2	
	Olf75-ps1										0	
	Usp1										0	
	<b>Down-regulated</b>											
mmu-let-7c	Lin28a										0	
	Myc	X	X			X	X		X	X	6	
	Mycn	X	X								2	
	Sall4	X	X	X		X	X			X	6	
mmu-let-7d	Bdnf	X	X	X		X	X			X	6	
	Drd3										0	
mmu-miR-101a	Akt1	X	X	X			X		X	X	6	
	Atxn1	X	X							X	3	
	COX2	X									1	
	Dusp1	X	X	X		X	X		X	X	7	
	Icos	X				X	X				3	
mmu-miR-106b	Mapk14	X	X	X		X	X		X	X	7	
	Stat3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9	
mmu-miR-125b-5p	Abtb1										0	
	Apln	X					X			X	3	
	Arid3a										0	
	Arid3b										0	
	B230208H17Rik										0	
	Bmf	X									1	
	Ddx19b										0	
	Dus11										0	
	Entpd4										0	
	Igf2	X	X						X	X	4	
	Jub		X								1	
	Klf13	X									1	
	Lin28a										0	
	Map2k7	X								X	2	
	Ppt2										0	
	Rheb11										0	
	Smo	X	X								2	
	Tnf	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9

	Tor2a									0
	Trim71									0
	Zfp385a	X								1
mmu-miR-126-3p	Hoxa9	X	X			X				3
	Pik3r2	X								1
	Runx1	X	X					X		3
	Sfp1	X	X		X	X			X	5
	Spred1									0
	Tal1	X	X							2
	mmu-miR-126-5p	Runx1	X	X					X	
Sfp1		X	X		X	X			X	5
Tal1		X	X							2
mmu-miR-127	Rtl1								0	
mmu-miR-130a	Atxn1	X	X						X	3
	Zfp2	X								1
mmu-miR-145	Camk2d	X								1
	Hoxa9	X	X			X				3
	Irs1	X	X	X		X	X		X	6
	Klf4	X	X			X	X		X	6
	Prkce	X	X	X		X			X	6
mmu-miR-148a	Camk2a	X	X	X		X			X	5
	Kdm6b									0
mmu-miR-148b	Camk2a	X	X	X		X			X	5
mmu-miR-152	Camk2a	X	X	X		X			X	5
mmu-miR-15a	Bcl2	X	X	X		X	X	X	X	8
	Cadm1	X	X							2
	Ccnd1	X	X	X				X	X	6
	Eln	X	X							2
	Wnt3a	X	X				X	X		4
mmu-miR-15b	Arl2									0
mmu-miR-17	Mapk14	X	X	X		X	X		X	7
	Rbl2	X	X							2
	Stat3	X	X	X	X	X	X	X	X	9
mmu-miR-192	Sip1									0
mmu-miR-19b	Aicda					X	X			2
mmu-miR-200a	Ctnnb1	X	X	X		X	X	X		7
	Dlx5	X	X							2
	Ftl1	X	X			X	X	X	X	7
	Nrp1	X	X							2
	Zeb2	X								1
mmu-miR-200c	Ftl1	X	X			X	X	X	X	7
	Zeb1									0
	Zeb2	X								1
mmu-miR-20b	Hif1a	X	X	X	X	X	X		X	8
	Vegfa	X	X	X		X	X	X	X	7
mmu-miR-21	Fasl	X	X	X	X	X	X	X	X	9
	Pdcd4	X					X			3
	Pel1									0
	Pten	X	X	X	X	X	X	X		8
	Reck	X								1
	Spry1	X	X							2
	Spry2	X	X							2

mmu-miR-214	Pou4f2	X	X							2
	Bnip3	X				X	X		X	4
mmu-miR-221	Ddit4	X							X	2
	Kit	X	X			X	X			4
mmu-miR-222	Kit	X	X			X	X			4
	Smad3	X	X	X		X	X	X	X	7
mmu-miR-24	Smad4	X	X				X			3
	Smad5	X	X				X		X	4
mmu-miR-25	Fbxw7	X								1
mmu-miR-26a	Ezh2	X								1
mmu-miR-26b	Lef1	X	X							2
	Odc1	X	X						X	3
mmu-miR-27a	Pparg	X	X				X	X	X	5
	Runx1	X	X						X	3
	Srm									0
	Mef2c	X					X		X	3
	Runx1	X	X						X	3
mmu-miR-27b	Smad3	X	X	X		X	X	X	X	7
	Smad4	X	X			X				3
	Smad5	X	X				X		X	4
mmu-miR-28	Srsf1									0
mmu-miR-295	Cdkn1a	X	X	X	X	X	X	X	X	9
	Col1a2	X	X	X						3
	Col3a1					X	X			2
	Dnmt3a	X								1
mmu-miR-29a	Dnmt3b	X								1
	Eln	X	X							2
	Fbn1	X						X	X	3
	Zfp36	X		X			X			3
	Acvr2a	X								1
	Bak1	X	X			X	X	X	X	7
	Bbc3	X							X	2
	Bcl2l11	X	X	X			X		X	5
	Bmf	X								1
	Col1a1	X	X				X			3
	Col1a2	X	X	X						3
	Col3a1					X	X			2
	Col4a2	X	X							2
mmu-miR-29b	Col5a3		X							1
	Ctnnbip1	X	X							2
	Dnmt3a	X								1
	Dnmt3b	X								1
	Dusp2	X	X			X	X			4
	Eln	X	X							2
	Fbn1	X						X	X	3
	Hdac4	X								1
	Hrk	X								1
	Tgfb3	X	X				X			3
mmu-miR-29c	Yyl	X								1
mmu-miR-30a	Abcb1b	X					X		X	3
	Ak1	X								1
	Bdnf	X	X	X		X	X		X	6
	Egfr	X	X	X		X	X	X	X	8

	Inhba		X				X				2
	Tnrc6a										0
mmu-miR-30d	Bdnf	X	X	X		X	X			X	6
	Fzd4										0
mmu-miR-31	Hif1a	X	X	X	X	X	X		X	X	8
	Pdgfb	X	X			X	X		X		5
mmu-miR-322	Arl2										0
mmu-miR-339-5p	Kdm6b										0
mmu-miR-494	Hsf2	X		X						X	3
	Bcl2	X	X	X		X	X	X	X	X	8
mmu-miR-497	Bcl2l2	X					X		X		3
	Eln	X	X								2
mmu-miR-676	Arg1					X	X			X	3
mmu-miR-92a	Trp63	X	X				X			X	4
mmu-miR-93	Stat3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9

X marks mean the target gene is included in the MeSH keyword associated gene sets. The following alphabets showed the MeSH keywords. (a): apoptosis, (b): cell adhesion, (c) glutathione, (d) hepatitis, (e) immunity, innate, (f); inflammation, (g): liver diseases, (h): necrosis, (i): oxidative stress.

Table17. Classifications of genes which are reported as target genes of miRNAs whose expression was increased or decreased in liver at 3 hour after HAL administration.

miRNA	Target Gene	Classification									Total
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	
Up-regulated											
mmu-miR-10a	Hdac4	X									1
	Abtb1										0
	Apln	X					X			X	3
	Arid3a										0
	Arid3b										0
	B230208H17Rik										0
	Bmf	X									1
	Ddx19b										0
	Dus11										0
	Entpd4										0
	Igf2	X	X						X	X	4
mmu-miR-125b-5p	Jub		X								1
	Klf13	X									1
	Lin28a										0
	Map2k7	X								X	2
	Ppt2										0
	Rheb1l										0
	Smo	X	X								2
	Tnf	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
	Tor2a										0
	Trim71										0
	Zfp385a	X									1
mmu-miR-142-3p	Adcy9										0
mmu-miR-25	Fbxw7	X									1
mmu-miR-28	Srsf1										0
mmu-miR-375	Adipor2				X		X			X	3
	Ahr	X	X	X		X	X	X	X	X	8

	C1qbp	X			X	X		X	4
	Insm1								0
	Jak2	X	X	X	X	X	X	X	7
	Mtpn	X							1
	Mxi1	X				X			2
	Olf75-ps1								0
	Usp1								0
mmu-miR-494	Hsf2	X		X				X	3
	Bcl2	X	X	X	X	X	X	X	8
mmu-miR-497	Bcl2l2	X				X		X	3
	Eln	X	X						2
mmu-miR-709	Ctcf1								0
Down-regulated									
									0
mmu-miR-137	Ezh2	X							1
	Tbx3	X	X						2

X marks mean the target gene is included in the MeSH keyword associated gene sets. The following alphabets showed the MeSH keywords. (a): apoptosis, (b): cell adhesion, (c) glutathione, (d) hepatitis, (e) immunity, innate, (f): inflammation, (g): liver diseases, (h): necrosis, (i): oxidative stress.

Table 18. Summary of immune-, inflammation- or hepatotoxicity-associated genes which are reported as target genes of miRNAs whose expression was changed with HAL administration.

Hour	miRNA	Target Gene	NT (40-Ct)	Fold change (hour after HAL administration)				
				1	3	6	12	24
Up-regulated								
1	mmu-miR-375	Ahr	6.11	64.87	13.80	0.02	0.17	0.01
		Jak2	6.11	64.87	13.80	0.02	0.17	0.01
Down-regulated								
1	mmu-let-7c	Myc	11.28	0.44	1.14	1.11	0.87	0.96
		Sall4	11.28	0.44	1.14	1.11	0.87	0.96
	mmu-let-7d	Bdnf	12.78	0.36	0.65	1.42	1.10	0.64
		Akt1	11.21	0.50	1.49	1.08	0.68	1.53
	mmu-miR-101a	Dusp1	11.21	0.50	1.49	1.08	0.68	1.53
		Mapk14	10.13	0.17	0.96	0.89	1.07	0.81
	mmu-miR-106b	Stat3	10.13	0.17	0.96	0.89	1.07	0.81
		Tnf	11.07	0.47	2.61	1.08	1.34	0.83
	mmu-miR-125b-5p	Sfp1	18.18	0.44	1.07	1.03	1.10	1.08
	mmu-miR-126-3p	Sfp1	15.26	0.34	0.94	1.09	0.64	1.03
	mmu-miR-126-5p	Irs1	13.29	0.42	1.09	1.10	0.77	0.97
		Klf4	13.29	0.42	1.09	1.10	0.77	0.97
	mmu-miR-145	Prkce	13.29	0.42	1.09	1.10	0.77	0.97
		Camk2a	12.29	0.34	1.01	0.86	0.83	0.94
	mmu-miR-148a	Camk2a	5.39	0.13	0.53	1.53	1.30	0.65
	mmu-miR-148b	Camk2a	11.36	0.36	0.63	0.91	0.81	0.88
	mmu-miR-152	Camk2a	8.55	0.43	0.57	1.29	1.24	0.37
	mmu-miR-15a	Bcl2	8.55	0.43	0.57	1.29	1.24	0.37
		Ccnd1	8.55	0.43	0.57	1.29	1.24	0.37
	mmu-miR-17	Mapk14	15.48	0.35	1.02	1.28	0.85	1.24
		Stat3	15.48	0.35	1.02	1.28	0.85	1.24
	mmu-miR-200a	Ctnnb1	9.13	0.29	0.96	0.48	0.77	1.20
		Flt1	9.13	0.29	0.96	0.48	0.77	1.20
	mmu-miR-200c	Flt1	8.41	0.25	0.60	0.66	0.72	1.13
	mmu-miR-20b	Hif1a	6.13	0.40	1.62	1.28	1.51	0.50
		Vegfa	6.13	0.40	1.62	1.28	1.51	0.50
mmu-miR-21	Fas1	12.79	0.22	1.33	1.07	1.07	1.23	

		Pten	12.79	0.22	1.33	1.07	1.07	1.23
	mmu-miR-24	Smad3	16.38	0.44	0.98	1.00	0.83	0.92
	mmu-miR-27a	Pparg	10.64	0.26	1.08	0.80	1.56	1.01
	mmu-miR-27b	Smad3	10.01	0.26	0.96	1.04	1.04	1.95
	mmu-miR-295	Cdkn1a	7.22	0.45	0.55	1.70	0.50	2.72
	mmu-miR-29b	Bak1	8.21	0.24	0.66	1.57	0.98	0.35
		Bcl2l11	8.21	0.24	0.66	1.57	0.98	0.35
	mmu-miR-30a	Bdnf	13.14	0.34	0.90	0.93	0.60	0.80
		Egfr	13.14	0.34	0.90	0.93	0.60	0.80
	mmu-miR-30d	Bdnf	11.95	0.47	0.89	1.32	0.75	0.76
	mmu-miR-31	Hif1a	14.19	0.49	1.06	0.95	0.68	0.88
		Pdgfr	14.19	0.49	1.06	0.95	0.68	0.88
	mmu-miR-497	Bcl2	6.79	0.32	3.20	0.77	0.91	0.62
	mmu-miR-93	Stat3	11.72	0.29	1.12	1.13	1.16	1.08
	Up-regulated							
	mmu-miR-125b-5p	Tnf	11.07	0.47	2.61	1.08	1.34	0.83
3	mmu-miR-375	Ahr	6.11	64.87	13.80	0.02	0.17	0.01
		Jak2	6.11	64.87	13.80	0.02	0.17	0.01
	mmu-miR-497	Bcl2	6.79	0.32	3.20	0.77	0.91	0.62
	Down-regulated							
3	N/A							

Shading of 40-Ct values indicate that the miRNA is expressed in liver with relatively high expression (40-Ct > 8). Shading of fold change indicate a significant difference (fold change < 0.25 or > 4). N/A: not applicable, NT: non-treated.

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。なお、補正はmiRNA arrayと同様にU6 snRNAを選択して、各々の試料についてそれぞれ補正した(Fig. 7)。miR-21発現量についてはHAL投与0.5、1、12および24時間後において有意な減少が認められた。miR-29bに関し

てはHAL投与3、6および24時間後において有意な増加が認められ、HAL投与1時間後においても顕著な差は認められなかったため、miRNAアレイとの再現性が得られなかった。miR-106bおよび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。

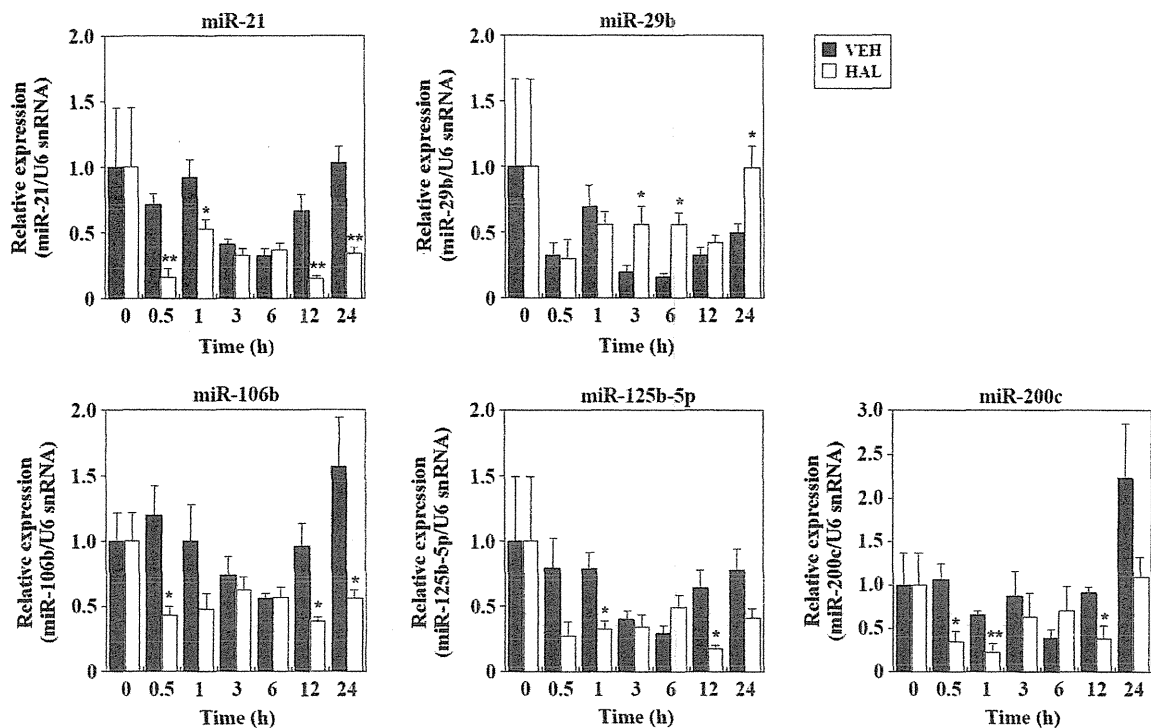


Fig. 7. Time-dependent changes of the hepatic miRNA expression levels in HAL-induced liver injury. Mice were administered intraperitoneally HAL at a dose of 30 mmol/kg. At 0, 0.5, 1, 3, 6, 12 and 24 h after the administration, the livers were collected for assessment of the expression levels of the hepatic miRNA. Expression of hepatic miRNA was normalized to U6 snRNA. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 4). \* $P$  < 0.05 and \*\* $P$  < 0.01, compared with VEH group of each time point. VEH: Vehicle-treated group, HAL: Halothane-treated group.

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。各 miRNAs  
(miR-106b、miR-21、miR-29b、miR-125b-5p、  
miR-200c) の標的として報告されている  
遺伝子の mRNA 発現量を real-time  
RT-PCR にて測定した結果を Fig. 8 に示し

た。miR-29b の標的遺伝子である BAK1  
や BCL2L11 の mRNA 発現量はいずれも  
HAL 投与 24 h 後に増加傾向を示したが、  
それぞれ有意な変動ではなかった。  
miR-21 の標的遺伝子である FasL は、HAL  
投与 0.5 および 1 時間後に有意な増加が認  
められた。miR-200c の標的遺伝子である  
FLT1 の mRNA 発現量については、HAL  
投与による変動は認められなかった。  
miR-106b の標的遺伝子である MAPK14

mRNA 発現量は各時間における溶媒投与群と比較して、HAL 投与 3、6 および 12 時間後において有意な増加が認められた。また、Fig. 4 で示したように、miR-106b の標的遺伝子として知られている STAT3 mRNA 発現量は、HAL 投与 3 時間後において有意な増加が認められた。FasL と同様に miR-21 の標的遺伝子と知られている PTEN mRNA 発現量については、HAL 投与による影響は認められなかった。

miR-125b-5p の標的遺伝子である TNF $\alpha$  は、Fig. 4 で既に示したように、HAL 投与 1 時間後において有意な増加が、3-24 h 後では増加傾向が認められた。さらに、FasL、MAPK14、STAT3 および TNF $\alpha$  mRNA 発現量は肝障害が認められる HAL 投与 12 時間よりも早期の段階において発現の誘導が認められたことから、これらの遺伝子が肝障害に寄与している可能性が考えられた。

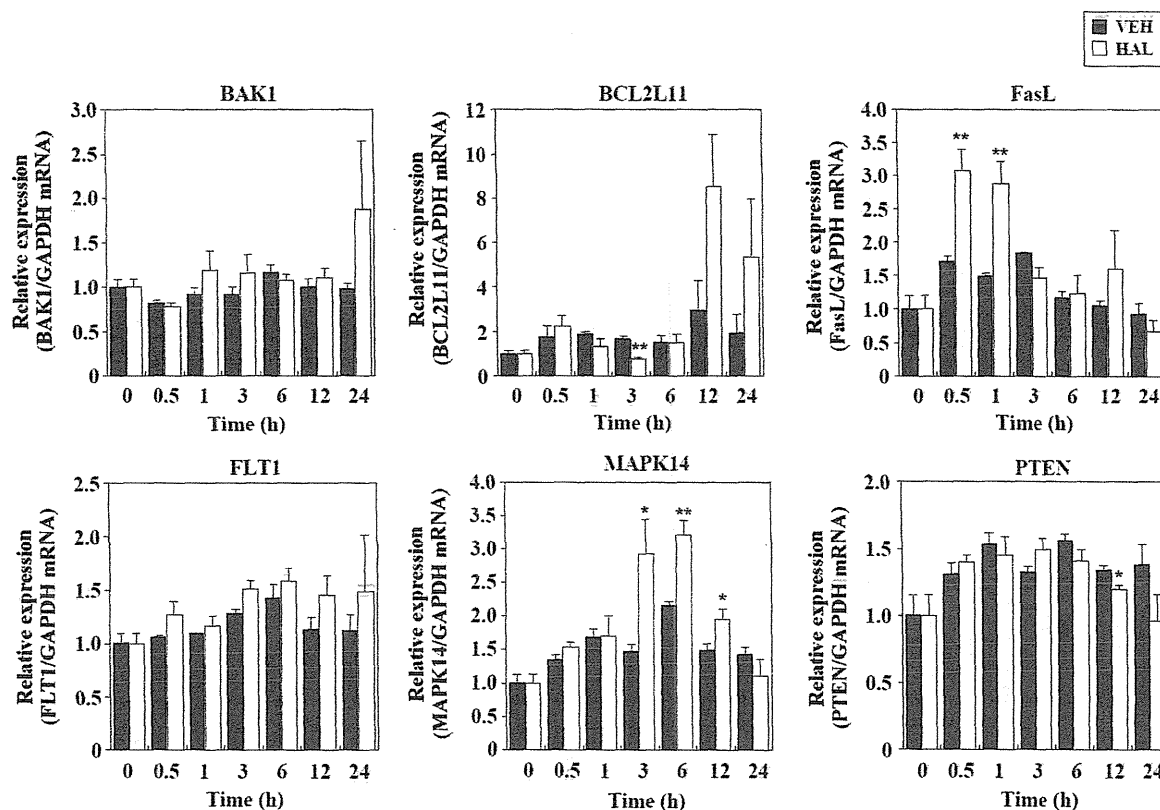


Fig. 8. Time-dependent changes of the hepatic mRNA expression levels in HAL-induced liver injury. Mice were administered intraperitoneally HAL at a dose of 30 mmol/kg. At 0, 0.5, 1, 3, 6, 12 and 24 h after the administration, the livers were collected for assessment of the expression levels of the hepatic mRNA. Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 4). \* $P$  < 0.05 and \*\* $P$  < 0.01, compared with VEH group of each time point. VEH: Vehicle-treated group, HAL: Halothane-treated group.



次に、これらの FasL、MAPK14、TNF $\alpha$  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。

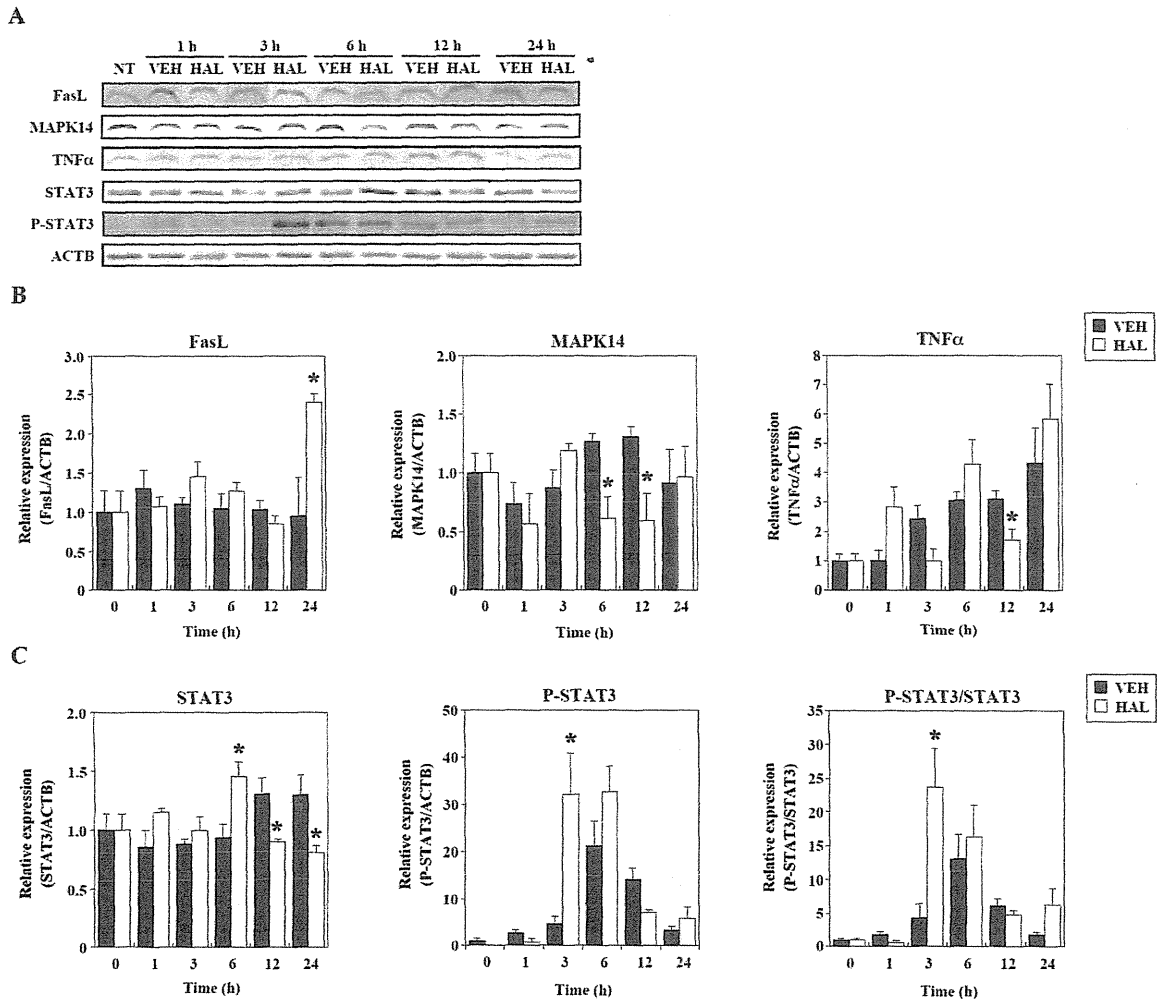


Fig. 9. Time-dependent changes of the hepatic protein expression levels in HAL-induced liver injury. Mice were administered intraperitoneally HAL at a dose of 30 mmol/kg. At 0, 1, 3, 6, 12 and 24 h after the administration, the livers were collected for assessment of the expression levels of the hepatic protein levels. Expression of hepatic protein levels were normalized to ACTB. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 4). \*  $P < 0.05$  compared with VEH group of each time point. VEH: Vehicle-treated group, HAL: Halothane-treated group, ACTB:  $\beta$ -actin.

しかし、FasL mRNA 発現量の誘導が HAL 投与 0.5-1 時間後と非常に早期であった (Fig. 8) のに対し、タンパク質発現量への影響は肝障害時のみでしか認められなかった。さらに、肝臓で発現増加した FasL が血中へ放出されることも考えられたため、血漿中の FasL 濃度を ELISA にて測定したが、HAL 投与 24 時間後においてのみ 3 倍程度の増加が認められ、肝臓中 FasL 発現量と同様の結果であった (data not shown)。従って、FasL タンパク質発現量の増加は、肝障害の結果であり原因ではないと考えられた。MAPK14 に関しては HAL 投与 6 および 12 時間後において溶媒投与群と比較して発現量の有意な低下が認められた。この原因として、各時間における溶媒投与群でのタンパク質発現量の増加に起因するものと考えられる。TNF $\alpha$  タンパク発現量に関しては、HAL 投与 1、6 および 24 時間後において溶媒投与群と比較して発現量の増加傾向が認められたが、それらに顕著な差は認められなかった。HAL 投与 6 時間後において STAT3 タンパク発現量の有意な増加が認められ、HAL 投与 12 および 24 時間後においては発現量の低下が認められた。

今回測定したタンパクの中で、STAT3 は HAL 投与による肝障害の発症前に発現

量の増加が認められた。STAT3 はリン酸化を受けて二量体となり活性化されることで、核内に移行して IL-17 をはじめとした遺伝子の転写を制御する。過去に当研究室の検討により、HAL 誘導性肝障害モデルマウスにおいて IL-17 の関与を明らかにしており、肝障害に対する Th17 の寄与が示唆されている (Kobayashi et al., 2009)。IL-17 の上流には STAT3 や ROR $\gamma$ t などの転写因子があり、Th17 の分化および増殖に重要であることが知られているが、実際に STAT3 がリン酸化を受けているかは検討されていない。そこで、STAT3 が HAL 誘導性肝障害時において活性化されているかについて明らかにするために、リン酸化 STAT3 発現量を測定し、その結果を Fig. 9A および Fig. 9C に付した。HAL 投与 3 時間後における P-STAT3 発現量の顕著な増加が認められ、P-STAT3/STAT3 比も HAL 投与 3 時間後にピークを示した。

以上の結果より、HAL 誘導性肝障害にお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。Stat3 を制御する miRNA として miR-17 ファミリーが報告されている。miR-17 ファミリーは miR-17、miR-18a、miR-18b、miR-20a、miR-20b、miR-93、miR-106a、miR-106b が含まれる。その中でも、Stat3 は miR-17、miR-20a、miR-106a、miR-106b、miR-93 の制御を受けることが報告されている (Carraro et al., 2009)。Table 17 に示した中で、STAT3

を制御する miRNA として miR-106b の他に miR-17 および miR-93 が挙がってきた。miRNA アレイの結果より、miR-106b と同様に、それぞれ HAL 投与 1 時間後にそれぞれ 0.35 および 0.29 倍の発現低下が認められていた。そこで、より大きな変動を示した miR-93 発現量の経時的な変動を測定した。その結果を Fig. 10 に示した。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。

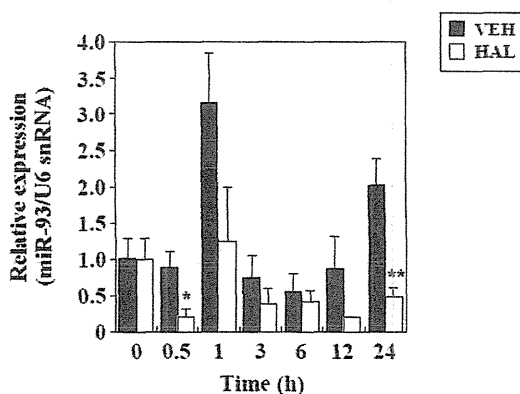


Fig. 10. Time-dependent changes of the miR-93 expression levels in HAL-induced liver injury. Mice were administered intraperitoneally HAL at a dose of 30 mmol/kg. At 0, 0.5, 1, 3, 6, 12 and 24 h after the administration, the livers were collected for assessment of the expression levels of the hepatic miR-93. Expression of hepatic miR-93 was normalized to U6 snRNA. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 4). \* $P$  < 0.05 and \*\* $P$  < 0.01, compared with VEH group of each time point. VEH: Vehicle-treated group, HAL: Halothane-treated group.

#### D. 考察

本研究では、DILIの発症におけるmiRNAの役割について免疫学的な機序について明らかにすることを目的とした。はじめに、HAL誘導性肝障害モデルマウスを用いて、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。HAL投与後いずれの時間においても、検出可能であった全miRNAの約25-50%が2倍以上の発現変動しており、肝障害の発症よりもかなり早期の段階から多くの肝臓中miRNAが発現変動することが明らかとなった。

外来異物投与による肝臓中miRNAの発現変動に関しては、AhRのリガンドである2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)やbenzo(a)pyrene (BaP)についていくつか報告がある。TCDDはラットおよびマウスにおいて肝臓中mRNAは大きな変動を引き起こすが、miRNAはほとんど変動を引き起こさないことが報告されている (Moffat et al., 2007)。さらに、マウスにBaP (150 mg/kg) 投与により、400種類以上の遺伝子の発現変動が認められるのに対し、miRNAはほとんど変動が認められなかった (Yauk et al., 2011)。これらの知見により、げっ歯類においては肝臓中miRNAはTCDDやBaPなどのAhRのリガンドに対して不応答性を示すため、

AhR非依存的なメカニズムで発現制御を受けていると考えられている。また、BaPを25、50および75 mg/kgの濃度でマウスに28日間反復長期投与した後の肝臓中mRNAおよびmiRNA発現量を網羅的に測定した結果、134種類のmRNAが1.5倍以上発現変動したのに対し、miRNAの発現変動は大部分が1.2倍以下の変動であり、BaP高投与群において唯一有意に1.5倍以上変化したmiRNAはmiR-34aのみであった。また、miR-34aの標的として報告されている遺伝子Bcl2、Cdk6、Ccnd1、Ccne2およびE2f3のうち、Bcl2 mRNA発現量はBaP投与により誘導されていたが、タンパク質発現量に増加は認められなかった (Malik et al., 2012)。

こうした報告の一方で、Yoshiokaら (2011) はTCDD誘導性肝障害モデルマウスにおいて、肝障害発症前よりmiR-101aの発現低下が認められること、その標的遺伝子COX-2、EZH2およびcFosタンパク質発現量の増加が認められることを報告した。また、miR-101aの減少はpri-miR-101a、pre-miR-101aのいずれもが低下していたことから、miRNAの生合成経路においてTCDDがpri-miR-101aの転写反応を低下させることを示している。DILIの例として、Wangら (2009) はAPAPをマウスに過剰投与させ、24時間

後の肝臓中 miRNA の発現変動を検討した結果、55 種類の miRNA が 2 倍以上の発現変動を示し、中でも miR-711 が 124 倍に発現が上昇し、miR-29b が 8 倍に発現が低下することを報告した。

このように、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、癌などの病態時や、喫煙や TCDD などの外来異物の暴露により miRNA の発現が低下することが知られている (Hou et al., 2011)。また、肝臓特異的に Dicer をノックアウトし、肝臓内のほとんどの miRNA が約 90%減少しているマウスにおいては、マウスは正常に生まれるが生後 100 日頃から、肝細胞のアポトーシスや胆管の過形成を伴った肝炎を起こすことが明らかにされている (Hand et al., 2009)。これらの報告が示すように、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。また、HAL 投与 1 時間後に発現が上昇する miRNA の中に、薬物代謝酵素である CYP や UGT を制御する可能性のある miRNA が多く存在した (Table 3)。従って、薬物投与により miRNA が発現上昇することで、炎症が生じるよりも早期に、または時期を同じくして標的の薬物代謝酵素の発現が低下する可能性があることを見出したと考えられた。

次に、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 (Table 9)。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 (Dugan et al., 2010)。これらのことから、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。しかし、投与 3 時間後においては、HAL と同様に ISO 特異的に発現変動する

miRNAについても免疫および炎症関連の pathway が多く挙がってきた (Tables 11 and 12)。この原因は不明であるが、投与3時間後の miRNA の発現変動は肝障害発症への寄与は少ない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 (Fig. 9C)。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。

STAT3 をリン酸化するタンパク質として Jak 1 が知られている。Jak ファミリーは 1-3 まで存在し、STAT タンパクをリン酸化することで、下流の遺伝子の発現制御を担っている。Table 17 に示した中に、HAL 投与1および3時間後において発現が増加し、6-24 時間後においては発現が低下した miR-375 は Jak2 を制御することが報告されている (Ding et al., 2010)。Jak2 は INF に応答し、STAT1 を主にリン酸化することで Th1 細胞への分化を担う。そのため、HAL 誘導性肝障害モデルマウスにおいて、HAL 投与により Jak2 を制御する miR-375 の発現が増加することは、Th1 細胞への分化を抑制し、Th17 細胞優位な分化を進めている可能性が考えられた。この考えは、HAL 誘導性肝障害において

は Th1 細胞への分化を担う T-bet や INF の発現が低下することを我々の研究グループが過去に報告している (Kobayashi et al., 2009) ことから支持されている。しかし、miR-375 の肝臓中発現量は低く、TaqMan RT-PCR では定量性の範囲外であったため、詳しい検討を行うことが出来なかった。STAT3 のリン酸化に関する miRNA の報告の例として、ヒト気管支細胞に miR-146a を過剰発現させると、リン酸化 STAT3 (Tyr 705) の発現増加を示すことが報告されている (Liu et al., 2009)。しかし、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。

また、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 (Surdziel et al., 2011)。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<sub>4</sub> 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。

生体異物による miRNA 発現異常は、様々な疾患の発症原因の一つとして考えられる。さらに、miRNA の発現変動を評価することは医薬品の安全性評価において適応できる可能性が考えられる。今後の研究の進展により、免疫系における新たな miRNA の同定や様々な疾患との関連性が明らかとなることで、疾患の発症メカニズムの解明へとつながると考えられる。

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。

#### <参考文献>

Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, and Moldéus P (1985) Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* **28**: 306-311.

Carraro G, El-Hashash A, Guidolin D, Tiozzo C, Turcatel G, Young BM, De Langhe SP, Bellusci S, Shi W, Parnigotto PP, and Warburton D (2009) miR-17 family of microRNAs controls FGF10-mediated embryonic lung epithelial

branching morphogenesis through MAPK14 and STAT3 regulation of E-Cadherin distribution. *Dev. Biol.* **333**: 238-250.

Cheng L, You Q, Yin H, Holt MP, and Ju C (2010) Involvement of natural killer T cells in halothane-induced liver injury in mice. *Biochem. Pharmacol.* **80**: 255-261.

Deng X, Stachlewitz RF, Liguori MJ, Blomme EA, Waring JF, Luyendyk JP, Maddox JF, Ganey PE, and Roth RA (2006) Modest inflammation



- enhances diclofenac hepatotoxicity in rats: role of neutrophils and bacterial translocation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**: 1191-1199.
- Ding L, Xu Y, Zhang W, Deng Y, Si M, Du Y, Yao H, Liu X, Ke Y, Si J, and Zhou T (2010) MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. *Cell Res.* **20**: 784-793.
- Dugan CM, MacDonald AE, Roth RA, and Ganey PE (2010) A mouse model of severe halothane hepatitis based on human risk factors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **333**: 364-372.
- Feng D, Wang Y, Xu Y, Luo Q, Lan B, and Xu L (2009) Interleukin 10 deficiency exacerbates halothane induced liver injury by increasing interleukin 8 expression and neutrophil infiltration. *Biochem. Pharmacol.* **77**: 277-284.
- Fukushima T, Hamada Y, Yamada H, and Horii I (2007) Changes of micro-RNA expression in rat liver treated by acetaminophen or carbon tetrachloride, regulation role of micro-RNA for RNA expression. *J. Toxicol. Sci.* **32**: 401-409.
- Ganey PE, Luyendyk JP, Maddox JF, and Roth RA (2004) Adverse hepatic drug reactions: inflammatory episodes as consequence and contributor. *Chem. Biol. Interact.* **150**: 35-51.
- Guengerich FP and McDonald JS (2007) Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem. Res. Toxicol.* **20**: 344-369.
- Gut J, Christen U, and Huwyler J (1993) Mechanisms of halothane toxicity: Novel insights. *Pharmacol. Ther.* **58**: 133-155.
- Hand NJ, Master ZR, Le Lay J, and Friedman JR (2009) Hepatic function is preserved in the absence of mature microRNAs. *Hepatology* **49**: 618-626.
- Hinson JA, Pumford NR, and Roberts DW (1995) Mechanisms of acetaminophen toxicity: Immunochemical detection of drug-protein adducts. *Drug Metab. Rev.* **27**: 72-92.
- Hoffmann KJ, Streeter AJ, Axworthy DB, and Baillie TA (1985) Identification of the major covalent adduct formed in vitro and in vivo between acetaminophen and mouse liver protein. *Mol. Pharmacol.* **27**: 566-573.
- Hongslo JK, Smith CV, Brunborg G, Søderlund EJ, and Holme JA (1994) Genotoxicity of paracetamol in mice and rats. *Mutagenesis* **9**: 93-100.
- Hou L, Wang D, and Baccarelli A (2011) Environmental chemicals and microRNAs. *Mutat. Res.* **714**: 105-112.
- Izzotti A, Larghero P, Longobardi M, Cartiglia C, Camoirano A, Steele VE, and de Flora S (2011) Dose-responsiveness and persistence of microRNA expression alterations induced by cigarette smoke in mouse lung. *Mutat. Res.* **717**: 9-16.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, and Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**: 635-647.
- Kalscheuer S, Zhang X, Zeng Y, and Upadhyaya P (2008) Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* **29**: 2394-2399.
- Kenna JG, Martin JL, and Pohl LR (1992) The topography of trifluoroacetylated protein antigens in liver microsomal fractions from halothane treated rats. *Biochem. Pharmacol.* **44**: 621-629.
- Kim VN (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 376-385.
- Knowles SR, Uetrecht J, and Shear NH (2000) Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. *Lancet* **356**: 1587-1591.
- Kobayashi E, Kobayashi M, Tsuneyama K, Fukami T, Nakijima M, and Yokoi T (2009) Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. *Toxicol. Sci.* **111**: 302-310.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee WM (2003) Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis.* **23**: 217-226.
- Liu X, Nelson A, Wang X, Kanaji N, Kim M, Sato T,

- Nakanishi M, Li Y, Sun J, Michalski J, Patil A, Basma H, and Rennard SI (2009) MicroRNA-146a modulates human bronchial epithelial cell survival in response to the cytokine-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**: 177-182.
- Malik AI, Williams A, Lemieux CL, White PA, and Yauk CL (2012) Hepatic mRNA, microRNA, and miR-34a-target responses in mice after 28 days exposure to doses of benzo(a)pyrene that elicit DNA damage and mutation. *Environ. Mol. Mutagen.* **53**: 10-21.
- Marquez RT, Wendlandt E, Galle CS, Keck K, and McCaffrey AP (2010) MicroRNA-21 is upregulated during the proliferative phase of liver regeneration, targets Pellino-1, and inhibits NF- $\kappa$ B signaling. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **298**: G535-G541.
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, and Patel T (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* **133**: 647-658.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, and Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 10513-10518.
- Moffat ID, Boutros PC, Celiuss T, Lindén J, Pohjanvirta R, and Okey AB (2007) microRNA in adult rodent liver are refractory to dioxin treatment. *Toxicol. Sci.* **99**: 470-487.
- Moult PJ and Sherlock S (1975) Halothane-related hepatitis. A clinical study of twenty-six cases. *Q. J. Med.* **44**: 99-114.
- Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, Okuhara A, Izumi B, Deie M, Suzuki O, Adachi N, and Ochi M (2010) MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet. Disord.* **11**: 209.
- Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, and Williams DP (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 177-202.
- Park BK, Kitteringham NR, Powell H, and Pirmohamed M (2000) Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology* **153**: 39-60.
- Pogribny IP, Tryndyak VP, Boyko A, Rodriguez-Juarez R, Beland FA, and Kovalchuk O (2007) Induction of microRNAome deregulation in rat liver by long-term tamoxifen exposure. *Mutat. Res.* **619**: 30-37.
- Proctor WR, Chakraborty M, Chea LS, Morrison JC, Berkson JD, Semple K, Bourdi M, and Pohl LR (2012) Eosinophils mediate the pathogenesis of halothane-induced liver injury in mice. *Hepatology*, in press.
- Raucy JL, Lasker JM, Lieber CS, and Black M (1989) Acetaminophen activation by human liver cytochromes P4502E1 and P4501A2. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**: 270-283.
- Riley RJ, Maggs JL, Lambert C, Kitteringham NR, and Park BK (1998) An in vitro study of the microsomal metabolism and cellular toxicity of phenytoin, sorbinil and mianserin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **26**: 577-588.
- Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, and Luedde T (2011) Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* **53**: 209-218.
- Roth RA, Luyendyk JP, Maddox JF, and Ganey PE (2003) Inflammation and drug idiosyncrasy--is there a connection? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**: 1-8.
- Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, Mathe EA, Jen J, Yang P, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Croce CM, and Harris CC (2009) MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **21**: 12085-12090.

- Shaw PJ, Hopfensperger MJ, Ganey PE, and Roth RA (2007) Lipopolysaccharide and trovafloxacin coexposure in mice causes idiosyncrasy-like liver injury dependent on tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Toxicol. Sci.* **100**: 259-266.
- Spracklin DK, Hankins DC, Fisher JM, Thummel KE, and Kharasch ED (1997) Cytochrome P450 2E1 is the principal catalyst of human oxidative halothane metabolism *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**: 400-411.
- Surdziel E, Cabanski M, Dallmann I, Lyszkiewicz M, Krueger A, Ganser A, Scherr M, and Eder M (2011) Enforced expression of miR-125b affects myelopoiesis by targeting multiple signaling pathways. *Blood* **117**: 4338-4348.
- Tafazoli S, Spehar DD, and O'Brien PJ (2005) Oxidative stress mediated idiosyncratic drug toxicity. *Drug Metab. Rev.* **37**: 311-325.
- Thummel KE, Lee CA, Kunze KL, Nelson SD, and Slattery JT (1993) Oxidation of acetaminophen to N-acetyl-p-aminobenzoquinone imine by human CYP3A4. *Biochem. Pharmacol.* **45**: 1563-1569.
- Towbin H, Staehelin T, and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4340-4354.
- Utrecht JP (1999) New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the "danger hypothesis" and innate immune system. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 387-395.
- Walgren JL, Mitchell MD, and Thompson DC (2005) Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**: 325-361.
- Wang B, Koh P, Winbanks C, Coughlan MT, McClelland A, Watson A, Jandeleit-Dahm K, Burns WC, Thomas MC, Cooper ME, and Kantharidis P (2011) miR-200a Prevents renal fibrogenesis through repression of TGF- $\beta$ 2 expression. *Diabetes* **60**: 280-287.
- Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, and Galas DJ (2009) Circulating miRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 4402-4407.
- Yamaura Y, Nakajima M, Takagi S, Fukami T, Tsuneyama K, and Yokoi T (2012) Plasma microRNA profiles in rat models of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis. *PLoS One*. **7**: e30250.
- Yauk CL, Jackson K, Malowany M, and Williams A (2011) Lack of change in microRNA expression in adult mouse liver following treatment with benzo(a)pyrene despite robust mRNA transcriptional response. *Mutat. Res.* **722**: 131-139.
- Yoshioka W, Higashiyama W, and Tohyama C (2011) Involvement of microRNAs in dioxin-induced liver damage in the mouse. *Toxicol. Sci.* **122**: 457-465.
- You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D, and Ju C (2006) Role of neutrophils in mouse model of halothane-induced liver injury. *Hepatology* **44**:1421-1431.
- E. 健康危険情報  
該当なし。
- F. 研究発表  
1. 論文発表  
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).
- G. 知的財産権の出願・登録  
該当なし。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表