

201307007B

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物性肝障害における免疫学的因子の
作用機序解明と予測試験系の開発研究

平成23年度～25年度 総合研究報告書

主任研究者 横井 毅

平成26(2014)年5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物性肝障害における免疫学的因子の

作用機序解明と予測試験系の開発研究

平成 23 年度～25 年度 総合研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 平成 23～25 年度 総括研究報告書

特異体質性薬物誘導性肝障害における免疫学的因子の作用機序解明と予測試験系の開発研究

横井 毅

----- I - XXVIII

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- XXVIII - XXXVI

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 1 - 405

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

特異体質性薬物誘導性肝障害における免疫学的因子の
作用機序解明と予測試験系の開発研究

主任研究者 横井 毅 名古屋大学大学院医学系研究科

医薬品の開発において、安全な薬の開発と使用を妨げる最大の課題は、ヒト特異的に発現する予測困難な毒性・副作用にある。医薬品による重篤な副作用の中で薬物性肝障害の報告数は多く、薬効が秀でた薬や開発候補化合物が、開発途中で断念することや、臨床試験の中止や上市後の販売停止は、製薬会社のみならず患者や社会にとっても大きな損失である。特に最近FDAが、解決すべき最重要課題としている「ヒト特異的薬物性肝障害の発現の早期解決」が切望されている。また、2013年12月に武田薬品工業株式会社が、第III相臨床試験の後期で、肝障害発症により開発を中止した糖尿病治療薬 fasiglifam (TAK-875)も記憶に新しい。近年、反応性代謝物の生成量を *in vitro* で精査する手法が急速に一般化したものの、薬物誘導性の肝障害の予測性は向上していないこと認識されるようになってきた。その主な原因は、*denger signal*と言われる肝障害発症における様々な因子の中で、免疫学的因子の関与が全く考慮・評価されていないことに起因していると我々は考えている。こうした研究は殆ど行われていない。我々はこの問題を解決し、我が国の創薬に資することを目的として研究を進めている。本研究成果により、臨床試験段階または市販後に肝障害で薬が潰れることを防ぐことが高い確立で期待でき、我が国の医薬品開発に資すること大であると考えられるとともに、患者の利益を向上させるなど、極めて社会性が高い研究であると考えられる。

過去3年間の研究をとおして、下図に示すように、急性肝障害モデルを7種類、連投による肝障害モデルを3種類確立し、論文として報告することができた。これまでに、薬物誘導性肝障害モデルとしては、アセトアミノフェンのみが研究対象であったが、我々の研究によって、以下の10種類の薬も新たな研究対象として将来多くの研究者に使用されるモデルであると確信する。我々が、こうしたモデルと正常のマウスを用いて作成できた理由は、薬の体内動態を考えた投与方法を行ったからである。グルタチオンを低下させるBSOの併用投与を採用した場合や、フェニトインのように、最初に血中濃度を急速に上げる必要があり、i.p.とp.o.の両方を使い分ける方法を考案した。また、カルバマゼピンのように、酵素誘導を想定して、後半

薬物性肝障害モデル動物と発症関連因子

	Drug	Important factor	Reference
単回投与	ANIT	Th17	<i>Toxicology</i> , 275: 50-57 (2010)
	Diclofenac	IL-1 β /Th17	<i>Toxicology</i> , 293: 107-114 (2012)
	Dicloxacillin	Th2	<i>Toxicol. Lett.</i> , 200: 139-145 (2011)
	Flucloxacillin	Th17/TLR4	<i>J. Appl. Toxicol.</i> , in press
	Flutamide	Th2	<i>J. Appl. Toxicol.</i> , 32: 815-822 (2012)
	Halothane	Th17	<i>Toxicol. Sci.</i> , 111: 302-310 (2009)
	Methimazole	Th2	<i>J. Appl. Toxicol.</i> , 32: 823-833 (2012)
連続投与	Carbamazepine	Th17	<i>Toxicol. Sci.</i> , 130: 4-16 (2012)
	Phenytoin	DAMPs/Th17	<i>Toxicol. Sci.</i> , 136: 250-263 (2013)
	Azathiopurine	ROS/XO	<i>Toxicol. Lett.</i> , 224: 215-224 (2014)

ANIT: α -naphthylisothiocyanate, TLR:toll-like receptor

に投与量を増量するなどの様々な工夫をした。こうした動物モデルにおいて、それぞれの薬によって関連する免疫/炎症関連因子が異なることが明らかになった。すなわち、アザチオプリンのような免疫/炎症因子が関わらない場合には、ROS やミトコンドリア毒性の関与が明確となった。その他の薬においては、Th2 または Th17 が dominant に関与する場合には、Balb/c 系統のメスが最適な動物である。また、これまで検討した薬で、Th1 が主に関わる場合は無かった。Th1 または自然免疫系が関わる場合には、C57BL/6 系統が適することが示唆されているが、Th1 の関与による細胞障害性は、従来の創薬の早い段階のスクリーニングでオミットされているのではないかと考えている。しかし、フェニトインの場合の様に、DAMPs が主に関わり、Th17 の関与が低く、C57BL/6 系統が適するという結果となった。いずれにしても、マウスの系統の使い分けについて、Balb/c と C57BL/6 の使用方法について有益な情報を提供した。個々の内容の概略は、以下に要約するが、薬物性肝障害の発症機序を体系的に整理できれば、in vivo でマウスを使用した創薬初期のスクリーニングへの適用が可能になると思われる。

さらに、様々な薬の肝障害モデルを用いて、in vitro で使用できるバイオマーカーの選択についても、報告を行った。すなわち、薬効類似薬と比較検討することによって、肝障害に関わるバイオマーカーを特異的に pick up を行い、これを in vitro に応用する検討を行った。この研究内容は、今後さらに深化させ、汎用性と予測性が高い系とする必要が有る。

以上、これまでの研究で、特異体質性といわれる薬による肝障害であっても、そのモデルを作成でき、機序が明らかにされれば、特異体質性という曖昧に表現を使用する必要がなくなると思われる。そうした、時代が少し見えてきたと考えている。

研究期間中に著書（分担）3件、和文総説6件、海外英文総説5件、国内和文

原著論文 0 件、海外英語原著論文 5 2 件、招聘講演（国外、国際） 1 3 件、招聘講演（国内） 4 5 件、一般学会発表（国外、国際） 1 2 件、一般学会発表（国内） 5 4 件を行った。

分担研究者：金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授 中島美紀

分担研究者：金沢大学医薬保健研究域薬学系・助教 深見達基

以下に特筆すべき研究成果について、個々に概略を紹介する。

1. 薬物性肝障害の *in vivo* マウスモデルの確立と機序解析と *cell-based* のスクリーニング試験系の開発研究(研究成果に関する一覽表 英文原著論文#1)

薬物性肝障害の発症機序を包括的に捉えるためには、肝障害性を有する種々の薬物を用いて多くのモデルにおいて比較検討することが肝要である。また、薬物性肝障害の発症メカニズムを把握して、そのメカニズムに基づいた毒性試験系を構築することができれば、高感度に毒性予測を行うことが可能であると考えられる。本研究では、薬物性肝障害の発症機序について新たな知見を与え、毒性を予測できる試験系を開発することを目的とした。第一に、ジクロフェナク誘導性肝障害のモデルマウスを作製し、発症メカニズム解析を行った。その結果、

ジクロフェナク誘導性肝障害において様々な炎症性因子が肝臓において発現変動することを示した。中でも肝障害の非常に早い段階において発現上昇が認められた IL-1b が肝障害の発症に寄与することを示した。これらの結果から、これまで当研究室で着目してきた Th 細胞関連因子に加えて、肝障害の発症初期に着目することが重要であると考えられた。第二に、これまでに薬物性肝障害において関与することが報告されてきた因子が、一般的なメカニズムとして提唱できるかについて検討するために、複数の薬物性肝障害をマウスに惹起させ、肝臓中の mRNA 発現変動解析により肝障害発症に重要なメディエーターの探索を行った。薬物性肝障害における炎症性因子の発現変動パターンは薬物によって多様であることが明らかとなった。S100A8、S100A9、RAGE および NALP3 は複数の薬物性肝障害に共通して発現量の増加が認められ、これらの因子が免疫を介した肝障害を予測する毒性マーカーとして有用である可能性が示唆された。また、薬物投与によって TLR4 および RAGE のリガンドが

誘導されることが、薬物性肝障害の発症の一因である可能性を示した。

2. フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスの作製および発症メカニズムの検討（研究成果に関する一覧表 英文原著論文 #2）

薬物性肝障害の原因薬物は多岐にわたるが、特に抗菌薬は薬物性肝障害の注意喚起が多いことで知られている。抗菌薬の中でもイソキサゾリル系の合成ペニシリンであるフルクロキサシリンはペニシリナーゼ耐性をもつ優れた抗生物質であり、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) が関与する感染症に適用される。しかし、フルクロキサシリンを服用した患者においてまれに重篤な肝障害を発症することがあり、重篤化した患者の中には死亡例や肝移植例も報告されている。発症頻度は10万人に8.5人であり、比較的高い割合である。フルクロキサシリンにより肝障害を発症した患者の中には発熱、好酸球増多、免疫細胞の浸潤といったアレルギー様の症状を伴うことより、免疫反応の関与が示唆されている。現在までの報告では、フルクロキサシリン誘導性肝障害を実験動物で再現した例はなく、また免疫学的因子に着目してメカニズムを研究した報告もない。そこで、本研究はフルクロキサシリン誘導性

肝障害をマウスで再現し、その発症メカニズムを解明することを目的とした。その結果、本研究においてフルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスにおいて免疫学的因子が発症および増悪に関与していることを明らかにした。その中でも high mobility group box 1 (HMGB1) と Toll like receptor (TLR)4 が関係するシグナル伝達が発症に関与している可能性、さらにインターイキン (IL-17) が増悪因子である可能性を示すことができた。よって、得られた結果はフルクロキサシリン誘導性肝障害および他の薬物性肝障害の発症メカニズム解明に有用な情報を提供しうると考えられる。

3. 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（研究成果に関する一覧表 英文原著論文） #3）

Halothane (HAL) 誘導性肝障害モデルマウスは好中球および Interleukin (IL)-17 などの炎症性サイトカイン等の様々な免疫因子が関与することが知られ、免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の代表的なモデルである。近年 miRNA が免疫細胞の分化や増殖、サイトカイン産生などを制御していることが報告され、免疫因子との関連が示されている。本研究では、肝臓中の miRNA が肝障害の発症前に変

動することで、その発症に関与している可能性を明らかにすることを目的とした。HAL 誘導性肝障害モデルマウスを用いて、経時的に肝 miRNA の発現を網羅的に解析したところ、HAL 投与後いずれの時間においても、検出された 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 miRNA が発現変動することを明らかにした。これらの変動した miRNA の生体内での機能を明らかとするため、各 miRNA の標的遺伝子が関与する経路を KEGG pathway 解析によりアノテーションすることで調べた。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経路に加え、多くの経路が変動している可能性が示された。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。また、ISO 投与群で認められた経路と比較して、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、免疫および炎症に関する経路が多く認められた。よって、HAL 投与 1 時間後において顕著に発現低下する miRNA の中で、報告されている標的遺伝子が免疫、炎症および肝障害に関連する遺伝子である miRNA に注目した。その結果、miR-21、

miR-29b、miR-106b、miR-125b-5p および miR-200c の 5 種類の miRNA が該当した。それぞれの miRNA の発現量およびその標的遺伝子の発現量を測定した。その中で、HAL 投与による miR-106b の発現低下およびその標的遺伝子である STAT3 タンパク質発現量の有意な増加が認められた。従って、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。さらに、これまでに HAL 誘導性肝障害モデルマウスにおいて報告されている IL-17 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 STAT3 の有意な活性化が認められた。以上、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 およびタンパク質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。本研究は、薬物誘導性肝障害において、肝 miRNA の早期の発現変動を指標にした機構解析が可能であることを示した。なお、本研究内容は、分担研究者 中島美紀の報告書に詳しく記載している (p. 83 から)。

4. アザチオプリン誘導性肝障害における酸化ストレスと免疫および炎症関連因子の関与（研究成果に関する一覧表 英文原著論文#5）

アザチオプリン (Azathioprine, AZA) は免疫抑制剤の一つであり、治療患者の約 2%に肝障害が認められている。これまでの報告から、AZA 誘導性肝障害には酸化ストレスが関与することが示唆されている。しかし、酸化ストレスの要因は明らかにされておらず、発症メカニズムには不明な点が多く残されている。また、AZA 投与患者において発熱や発疹といった症状が稀に認められていることから、免疫および炎症反応の寄与が疑われるが、免疫系および炎症関連因子の関与を検討した報告は未だにない。本研究では AZA 誘導性肝障害モデルを作製し、発症メカニズムにおける酸化ストレス、免疫および炎症関連因子の関与について検討を行った。

マウスへのAZA反復経口投与を行ったところ、6日間AZA 200 mg/kg投与において、肝障害マーカーである血漿中ALT値は最高値を示した。この結果から、以降の検討ではAZA 200 mg/kgを反復経口投与することによりAZA誘導性肝障害モデルを作製し、詳細なメカニズムを解析することとした。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。AZA誘導

性肝障害における酸化ストレスの関与を検討するため、抗酸化物質であるグルタチオンの肝臓中含量を測定したところ、AZA投与により有意な低下が認められた。また、酸化ストレスマーカーである肝臓中プロテインカルボニル含量およびSOD活性は、AZA投与によりそれぞれ経日的な上昇および減少が認められた。さらに、抗酸化剤tempolを併用投与したところ、血漿中ALT値の有意な低下が認められ、肝臓中SOD活性の低下が抑制された。これらの結果から、AZA誘導性肝障害に酸化ストレスが関与していることが示された。キサンチンオキシダーゼによる活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) 産生がAZA誘導性肝障害に関与するか検討する目的で、キサンチンオキシダーゼ阻害剤allopurinolを併用投与した。その結果、血漿中ALT値とROSの一種であるH₂O₂の血漿中濃度に有意な低下が認められた。このことから、キサンチンオキシダーゼにより触媒される反応によって産生されるROSが、酸化ストレスの要因となりAZAの肝毒性を惹起する可能性が示された。AZA投与後の自然免疫の活性化に関与する因子の肝臓中 mRNA発現変動を解析したところ、TLR-2、TLR4、receptor for advanced glycation end products、S100A8およびS100A9において有意な発現上昇が認められた。また、TLR4のリガンドであるhigh-mobility group box 1の血漿中

タンパク質濃度は、AZA投与により経日的な上昇が認められた。さらに、TLR4アンタゴニストeritoranを併用投与したところ、血漿中ALT値の有意な低下が認められた。これらの結果から、AZA誘導性肝障害にTLR4シグナル経路を介した自然免疫系の活性化が関与することが示された。AZA投与後の炎症関連因子の肝臓中mRNA発現変動を解析したところ、炎症性サイトカインであるinterleukin-1 β およびtumor necrosis factor- α や、好中球の遊走に関わるケモカインであるmacrophage inflammatory protein-2の有意な発現上昇が認められた。また、AZA投与後の肝臓において、抗ミエロペルオキシダーゼ抗体陽性細胞が認められた。これらの結果から、AZA誘導性肝障害に好中球の肝臓への浸潤を伴った炎症反応が関与することが示唆された。以上、本研究ではAZA誘導性肝障害モデルマウスを作製し、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。本研究において作製した肝障害モデルと肝障害メカニズムの情報は、臨床における薬物誘導性肝障害発症の回避に繋がるものと期待される。なお、本研究内容は、主任研究者 横井毅の報告書に詳しく記載している (p. 33から)。

5. アシルグルクロニドによる細胞毒性の評価およびメカニズム解析

(研究成果に関する一覧表 英文原著論文#6)

近年、薬物または反応性代謝物による直接のストレスの他に、免疫細胞活性化に伴う炎症反応を介した肝障害が注目されている。アシルグルクロニド (AG) は比較的反応性が高いことから細胞毒性に対する関与が示唆されているが、その毒性を直接証明した報告はない。本研究では AG による細胞毒性について炎症性因子を指標として評価検討した。最初に、AG による炎症性因子の発現誘導についてヒト末梢血単球細胞 (PBMC) を用いて評価し、ジクロフェナクアシルグルクロニド (DCF-AG)、プロベネシドアシルグルクロニド (Pro-AG) およびトルメチンアシルグルクロニド (Tol-AG) において炎症性因子の発現が誘導されることを見出した。また、DCF-AG が炎症性因子の発現を強く誘導することから、そのメカニズム解明のために MAPK 経路を解析した結果、DCF-AG による炎症性因子の発現誘導には p38 および c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路が関与することが示された。次に、PBMC 中の各細胞に与える影響についてフローサイトメトリーにより検討した。PBMC 中の CD3 および CD19 陽性細胞に対する AG の影響は認められなかったが、CD14 陽性細胞においてのみ DCF-AG、Pro-AG および Tol-AG により細胞生存率の低下が認められた。ま

た第 I 章と同様に、MAPK 経路の解析の結果、DCF-AG 処置による CD14 陽性細胞に対する細胞傷害には p38 経路が関与することを明らかにした。本研究では、AG が炎症性因子の発現を誘導すること、PBMC 中の CD14 陽性細胞特異的に細胞傷害性を示すこと、それらに p38 経路が関与することを初めて明らかにし、AG が薬物誘導性肝障害の原因の一因になる可能性を示した。本研究で明らかにした AG の細胞毒性およびメカニズムの情報は、臨床における薬物誘導性肝障害の予測に役立ち、医薬品開発に資することが期待される。

6. フェニトイン誘導性肝障害マウスの作出と発症メカニズムの解明 (研究成果に関する一覽表 英文原著論文#7)

抗てんかん薬フェニトイン (DPH) は、肝障害や薬物過敏性症候群を引き起こす事が報告されている。ヒトにおける DPH 誘導性肝障害では、肝組織に免疫細胞の浸潤が認められる事から免疫因子の関与が示唆されている。しかし、これまでに DPH 誘導性肝障害モデル動物の報告はなく、その発症メカニズムは不明な点が多い。本研究では、DPH 誘導性肝障害モデルマウスを作出し、免疫や炎症反応及び薬物代謝酵素による代謝的活性化の視点から、肝障害発症メカニズムを解析した。雌性 C57BL/6 マウスに DPH と L-buthionine

sulfoximine (BSO) を 5 日間併用投与する事で肝障害モデルを作製し、肝臓中の抗酸化物質、免疫及び炎症に関する因子を測定した。P450 阻害剤である l-aminobenzotriazole (ABT) を併用投与し、代謝的活性化の影響を検討した。DPH と BSO の 5 日間の併用投与により、DPH 最終投与後 24-48 時間後に ALT 値が有意に上昇した。自然免疫因子においては、NACHT, LRR and PYD domains-containing protein (NALP) 3, interleukin (IL)-1 β mRNA の有意な発現上昇が見られ、血漿中 high-mobility group box (HMGB) 1 タンパク質の上昇が認められた。獲得免疫系では Retinoic acid-related orphan receptor (ROR)- γ t, IL-6, IL-23 mRNA の有意な発現上昇及び、血漿中 IL-17 タンパク質の上昇が認められた事から、T helper (Th) 17 細胞の関与が示唆された。ABT の投与により ALT 値の有意な低下が認められた。以上、DPH 誘導性肝障害モデルマウスを作出し、肝障害発症における代謝的活性化及び免疫因子の関与を明らかにした。

7. カルバマゼピン誘導性肝障害のモデルマウスの作製およびメカニズム解析 (研究成果に関する一覽表 英文原著論文#12)

鎮痙薬である carbamazepine (CBZ) は稀に肝障害を惹起することが報告さ

れている。CBZ 連投により種々の CYP が誘導され、毒性を有する反応性代謝物を生成すると考えられている。これまでの *in vitro* における報告などから、反応性代謝物が肝臓のタンパク質と結合し、免疫反応およびネクロシスなどの細胞傷害が起きることで肝障害が惹起されると考えられているが、実験動物でその肝障害の再現に成功した例はない。そこで CBZ 誘導性肝障害マウスモデルを確立し、そのメカニズムを免疫・代謝の両面から検討した。10 週齢の BALB/c マウスに CBZ を 4 日間 400 mg/kg を、5 日目に 800 mg/kg を投与した群において血中 ALT と AST 値の有意な上昇が認められ、肝組織染色において、著しいネクロシスが認められた。一方で、構想類似薬であるオクスカルバゼピン(OXC) 投与群では肝障害は惹起されなかった。以降、肝障害の惹起された条件におけるメカニズムの詳細な検討を行った。血中濃度の検討から、CBZ 誘導性肝障害の発症に 3-OH CBZ が関与する可能性が示された。炎症を惹起する S100A8、S100A9 およびそれらのレセプターである TLR4 と RAGE の肝臓 mRNA の上昇が認められた。炎症性サイトカインやケモカインの mRNA を網羅的に解析したところ、IL-17 が免疫系細胞の浸潤を介して、CBZ 誘導性肝障害の発症に関与することが示された。本研究では CBZ 誘導性肝障害

モデルマウスを作出に成功し、肝障害のメカニズムを代謝・免疫の両面から明らかにした。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、臨床における薬物誘導性肝障害発症の回避に繋がる研究に役立つものと期待される。

8. NASH および Steatosis モデルマウスに対するタモキシフェンの影響 (研究成果に関する一覽表 英文原著論文#13)

近年、非アルコール性脂肪肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) の罹患率が増加している。NAFLD とは 飲酒歴を有さないものの肝への脂肪沈着を認める疾患群 (Steatosis) であり、欧米では人口の約 30%が NAFLD を有していると推測されている。NAFLD の多くは肥満、耐糖能異常、脂質異常症を始めとしたメタボリック症候群に起因しており、肥満や糖尿病とともに今後も世界的な増加が予想される疾患である。Steatosis は今まで悪性ではないと考えられていたが、肝硬変や肝癌へと進行する病型が潜んでいることが明らかになってきたが、適切な治療薬は存在しない。本検討ではこれらの肝障害モデルマウスを作製し、作製したモデルマウスに対するタモキシフェン (TAM) の影響を検討した。その結果、Steatosis モデルマウスにおいて、TAM

が肝障害の程度を減弱させることを示した。また、その作用の一因として TAM による ERK1/2 活性化が関与することが示唆された。Steatosis に対して TAM を投与して改善を示した報告は本研究が初めてである。Steatosis は肥満により肝臓における中性脂肪の過剰な蓄積が生じ、細胞が変性することで発症するといわれている。TAM 投与により steatosis モデルマウスの ALT 値および AST 値の低下が認められ、組織染色においては、細胞の肥大化および炎症の減弱が認められた。また遺伝子レベルにおいても炎症性因子の低下が認められた。本研究は、steatosis および NASH モデルマウスに対して、TAM の post 投与が肝障害改善作用を示すことを初めて明らかにした報告であり、また肝障害に対する薬物治療を考える上で役立つ有用な情報が提供できると考えられる。

9. 免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価 (研究成果に関する一覧表 英文原著論文#15)

本研究においては、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いて代謝的活性化を考慮した *in vitro* 試験系を構築し、反応性代謝物による免疫学的因子の活性化について評価した。その結果、肝障害を惹起する報告のある 10 種の薬物について検討した

結果、アルベンダゾール、アミオダロン (AMD) および代謝物であるデスエチルアミオダロン (DEA) 処置において、CYP3A4 による CD 発現量の有意な増加が認められた。AMD 処置 24 時間後の DEA およびその代謝物であるジデスエチルアミオダロン (DiDEA) 生成量を HPLC により定量した結果、AMD の約 40% が DEA に、約 1.3% が DiDEA に代謝されていることを明らかとした。また、AMD および DEA 処置により、TNF α および IL-8 の mRNA 発現量およびタンパク質産生量を測定した結果、CYP3A4 存在下において処置濃度依存的な増加が認められた。以上、AMD などの肝障害性薬物について、CYP3A4 による代謝的活性化を介した免疫反応の活性化が示唆されたことより、本試験系は *in vitro* において代謝的活性化による免疫反応の関与を評価し得る手段となると考えられた。

10. ジクロフェナク (DIF) 誘導性肝障害における免疫学的因子の影響 (研究成果に関する一覧表 英文原著論文#17)

本研究では、臨床で高い頻度で使用され、稀に重篤な肝障害を惹起することが知られている DIF 誘導性肝障害における免疫学的因子の関与について明らかにすることを目的として検討した。その結果、DIC 投与マウスにおいて血漿中 ALT 値および AST

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

1 1. ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響 (研究成果に関する一覧表 英文原著論文#20)

本研究は、女性において重篤な肝障害発症が多く認められる原因を解明することを目的としたものである。全身麻酔薬であるハロタン (HAL) は約 20%以上の患者に軽度な肝障害

を引き起こし、さらに稀に重篤な肝障害を引き起こすことが知られている。また、HAL 誘導性肝障害発症のリスクファクターの一つに女性が挙げられており、実際に臨床における肝障害報告は女性が多い。近年 HAL 誘導性肝障害モデルを再現できるマウスモデルが開発され、ヒトと同様に雄性マウスと比較して雌性マウスで重篤な肝障害発症が認められることが報告されている。女性で重篤な肝障害発症が多いメカニズムを解明するために、女性ホルモンであるエストロゲン (E2) とプロゲステロン (Prog) が HAL 誘導性肝障害に与える影響について主としてマウスを用いて検討した。その結果、HAL 誘導性肝障害に対して E2 投与による肝障害減弱作用および Prog 投与による肝障害悪化作用が認められた。これらの作用は HAL の活性代謝物である TFA と肝臓中タンパク質とのアダクト形成には変化を示さず、HAL 投与後の炎症反応を介して肝障害の程度に影響を及ぼすことを示した。さらに、E2 および Prog は E2 レセプターおよび Prog レセプターを介して免疫反応を調節し、肝障害の程度を変化させることが示された。

1 2. プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明 (研究成果に関する一覧表 英文原著論文#27)

HAL だけでなく他の肝障害性化合物においても Prog 投与による肝障害悪化作用が認められ、これらは CXCL1 を初めとする免疫因子の活性化を介していることを見出した。さらに、これらの免疫因子の活性化には ERK 経路の活性化や、クッパー細胞が関与し、Prog による肝障害悪化に寄与していることが示された。また、Prog レセプターのアンタゴニストを肝障害惹起後に投与した際にも、HAL 誘導性肝障害を減弱させることを示した。本研究では、女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の程度に影響を与えることを示した。また、Prog が ERK

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表など

著書（分担）3件、和文総説 6件、

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 (2013) 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).
- 3) 横井 毅. 第 II 相代謝の評価と創薬 p224-231. 「医薬品開発に必要なストラ

経路やクッパー細胞を介して薬物誘導性肝障害の悪化に寄与することを初めて明らかにし、これらの女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の性差メカニズムの一因になりうる可能性を示した。さらに、肝障害惹起後の RU 投与により肝障害減弱が認められたことから、薬物誘導性肝障害に対する新たな治療手段になりうることが期待された。

以上、研究期間中に論文発表できた代表的な研究の内容について概略を述べた。論文の別刷写しは、本報告書の後半に添付されている。

海外英文総説 5件、国内和文原著 0件、

海外英文原著 52件、招聘講演(海外、国際) 13件、招聘講演(国内) 45件、一般学会発表(海外、国際) 12件、一般学会発表(国内) 54件。
「テジーと各種試験法」日本薬理学会編 (2011).

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).

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).

3) Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Toxicological implications of modulation of gene expression by microRNAs. *Toxicol. Sci.*, 123: 1-14 (2011).

4) Tsuyoshi Yokoi. Current topics in drug metabolism and drug toxicity. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 26: 1-2 (2011).

5) Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy: regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors. *Pharmacol. Ther.*, 131: 330-337 (2011).

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).
 - 10) Kyotaka Muta, Tatsuki Muta, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. N-glycosylation during translation is essential for human arylacetamide deacetylase enzyme activity. *Biochem. Pharmacol.*, **87**: 352-359 (2014).
 - 11) Taishi Miyashita, Kento Kimura, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Evaluation and mechanistic analysis of the cytotoxicity of the acyl glucuronide of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Metab. Dispos.*, **42**: 1-8 (2014).
 - 12) Kei Takahashi, Yuki Oda, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Regulation of cytochrome b5 expression by miR-223 in human liver; effects on cytochrome P450 activities. *Pharm. Res.*, **31**: 780-794 (2014).
 - 13) Eita Sasaki, Kentaro Matsuo, Azumi Iida, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. A novel mouse model for phenytoin-induced liver injury: involvement of immune-related factors and P450-mediated metabolism. *Toxicol. Sci.*, **136**: 250-263 (2013).
 - 14) Kei Takahashi, Shin-ichi Yokota, Naoyuki Tatsumi, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **272**: 154-160 (2013).
 - 15) Yukiko Kato, Takeshi Izukawa, Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Moshe Finel, Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Human UGT2B10 in drug N-glucuronidations: substrate screening and comparison with UGT1A3 and UGT1A4. *Drug Metab. Dispos.*, **41**: 1389-1397 (2013).
 - 16) Ryota Higuchi, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Prilocaine- and lidocaine-induced methemoglobinemia is caused by human carbosylesterase-, CYP2E1- and CYP3A4-mediated metabolic activation. *Drug Metab. Dispos.*, **41**: 1220-1230 (2013).
 - 17) Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Epigenetic regulation is a crucial factor in the repression of UGT1A1 expression in the human kidney. *Drug Metab. Dispos.*, **41**: 1738-1743 (2013).
 - 18) Ching Ho Poon, Tsz Yan Wong, Yanfei Wang, Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Tsuyoshi Yokoi, and Lai K. Leung. The citrus flavanone naringenin suppresses CYP1B1 transactivation through antagonizing xenobiotic-responsive element binding. *Br. J. Nutr.*, **109**: 1598-1605 (2013).
 - 19) Makoto Kataoka, Yuki Terashima, Katsuhiko Miuno, Yoshie Masaoka, Shinji Saluma, Tsuyoshi Yokoi and Shinji Yamashita. Establishment of

- MDCKII cell monolayer with metabolic activity by CYP3A4 transduced with recombinant adenovirus. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 28: 125-131 (2013).
- 20) Yuki Kobayashi, Tatsuki Fukami, Ryota Higuchi, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation by human arylacetamide deacetylase, CYP2E1, and CYP1A2 causes phenacetin-induced methemoglobinemia. *Biochem. Pharmacol.*, 84: 1196-1206 (2012).
- 21) Masakazu Kakuni, Mayu Morita, Kentaro Matsuo, Yumiko Katoh, Miki Nakajima, Chise Tateno, and Tsuyoshi Yokoi. Chimeric mice with a humanized liver as an animal model of troglitazone-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, 214: 9-18 (2012).
- 22) Satonori Higuchi, Azusa Yano, Shohei Takai, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol. Sci.*, 130: 4-16 (2012).
- 23) Taishi Miyashita, Yasuyuki Toyoda, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Hepatoprotective effect of tamoxifen on steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in mouse models. *J. Toxicol. Sci.*, 37: 931-942 (2012).
- 24) Yukitaka Yoshikawa, Taishi Miyashita, Satonori Higuchi, Koichi Tsuneyama, Shinya Endo, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Mechanisms of the hepatoprotective effects of tamoxifen against drug-induced and chemical-induced acute liver injuries. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 264: 42-50 (2012).
- 25) Shingo Oda, Miki Nakajima, Masahiko Hatakeyama, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Preparation of a specific monoclonal antibody against human UGT1A9 and evaluation of UGT1A9 protein levels in human tissues. *Drug Metab. Dispos.*, 40: 1620-1627 (2012).
- 26) Shinya Endo, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Activation of human monocytic THP-1 cells by metabolic activation of hepatotoxic drugs. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27: 621-630 (2012).
- 27) Yuki Kobayashi, Tatsuki Fukami, Mai Shimizu, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Contributions of arylacetamide deacetylase and carboxylesterase 2 to flutamide hydrolysis in human liver. *Drug Metab. Dispos.*, 40: 1080-1084 (2012).
- 28) Mai Shimizu, Tatsuki Fukami, Yuki Kobayashi, Masataka Takamiya, Yoshihiro Aoki, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. A novel polymorphic allele of human arylacetamide deacetylase leads to diminished enzyme activity. *Drug Metab. Dispos.*, 40: 1183-1190 (2012).
- 29) Kornphimol Kulthong, Rawiwan Maniratanachote, Yuki Kobayashi, Tatsuki Fukami and Tsuyoshi Yokoi. Effects of silver nanoparticles on hepatic cytochrome P450 enzyme activity. *Xenobiotica*, 42: 854-862 (2012).
- 30) Yuki Oda, Miki Nakajima, Takuya Mohri, Masataka Takamiya, Yasuhiro Aoki, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in human liver is regulated by miR-24. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 260: 222-231 (2012).
- 31) Atsushi Iwamura, Tatsuki Fukami, Ryota Higuchi, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Human α/β hydrolase domain containing 10 (ABHD10) is a responsible enzyme for deglucuronidation of mycophenolic acid

- acyl-glucuronide in liver. *J. Biol. Chem.*, **287**: 9240-9249 (2012).
- 32) Azusa Yano, Satonori Higuchi, Koichi Tsuneyama, Tasuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver in mice. *Toxicology*, **293**: 107-114 (2012).
- 33) Theerada Taesotikul, Miki Nakajima, Wichitra Tassaneeyakul, and Tsuyoshi Yokoi. Effects of *Phyllanthus amarus* extract on the pharmacokinetics of midazolam and cytochrome P450 activities in rats. *Xenobiotica.*, **42**: 641-648 (2012).
- 34) Masanori Kobayashi, Satonori Higuchi, Mika Ide, Satomi Nishikawa, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Th2 cytokines-mediated methimazole-induced liver injury in mice. *J. Appl. Toxicol.*, **32**: 823-833 (2012).
- 35) Yuki Kobayashi, Tatsuki Fukami, Akinori Nakajima, Akinobu Watanabe, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Species differences in tissue distribution and enzyme activities of arylacetamide deacetylase in human, rat, and mouse. *Drug Metab. Dispos.*, **40**: 671-679 (2012).
- 36) Yu Yamaura, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Tatsuki Fukami, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. Plasma microRNA profiles in rat models of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis. *PLoS One*, **7**: e30250 (2012).
- 37) Yasuyuki Toyoda, Shinya Endo, Koichi Tsuneyama, Taishi Miyashita, Azusa Yano, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Mechanism of exacerbative effect of progesterone on drug-induced liver injury. *Toxicol. Sci.*, **126**: 16-27 (2012).
- 38) Yukiko Kato, Miki Nakajima, Shingo Oda, Tasuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Human UGT-glucuronosyltransferase isoforms involved in haloperidol glucuronidation and quantitative estimation of their contributions. *Drug Metab. Dispos.*, **40**: 240-248 (2012).
- 39) Satonori Higuchi, Masanori Kobayashi, Azusa Yano, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury. *J. Appl. Toxicol.*, **32**: 815-822 (2012).
- 40) Shingo Oda, Miki Nakajima, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Progesterone receptor membrane component 1 modulates human cytochrome P450 activities in an isoform-dependent manner. *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 2057-2065 (2011).
- 41) Akinori Nakajima, Tatsuki Fukami, Yuki Kobayashi, Akinobu Watanabe, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Human arylacetamide deacetylase is responsible for deacetylation of rifamycins: rifampicin, rifabutin, and rifapentine. *Biochem. Pharmacol.*, **82**: 1747-1756 (2011).
- 42) Katsuhiko Kida, Miki Nakajima, Takuya Mohri, Yuki Oda, Shingo Takagi, Tasuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Peroxisome proliferator-activator receptor α is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharm. Res.*, **28**: 2467-2476 (2011).
- 43) Hiroko Hosomi, Tatsuki Fukami, Atsushi Iwamura, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Development of a highly sensitive cytotoxicity assay system for CYP3A4-mediated metabolic activation. *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 1388-1395 (2011).

- 44) Tomomi Hioki, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Human paraoxonase 1 is the enzyme responsible for pilocarpine hydrolysis. *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 1345-1352 (2011).
- 45) Tosu Usui, Takanori Hashizume, Takashi Katsumata, Tsuyoshi Yokoi, and Setsuko Komuro. *In vitro* investigation of the glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for troglitazone-induced liver injury. *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 1303-1310 (2011).
- 46) Yasuyuki Toyoda, Taishi Miyashita, Shinya Endo, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Estradiol and progesterone modulate halothane-induced liver injury in mice. *Toxicol. Lett.*, **204**: 17-24 (2011).
- 47) Atsushi Iwamura, Tatsuki Fukami, Hiroko Hosomi, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. CYP2C9-mediated metabolic activation of losartan detected by a high sensitive cell-based screening assay. *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 838-846 (2011).
- 48) Yuko Abe, Rhoichi Fujiwara, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Interpretation for the effects of protein kinase C inhibitors on human UGT-glucuronosyltransferase 1A (UGT1A) proteins in cellulose. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **26**: 256-265 (2011).
- 49) Satonori Higuchi, Masanori Kobayashi, Yukitaka Yoshikawa, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. IL-4 mediated dicloxacillin-induced liver injury in mice. *Toxicol. Lett.*, **200**: 139-145 (2011).
- 50) Toshihisa Koga, Ryoichi Fujiwara, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Toxicological evaluation of acyl glucuronides of NSAIDs using HEK293 cells stably expressing human UGT and human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.*, **39**: 54-60 (2011).
- 51) Shin-ichi Yokota, Eriko Higashi, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Human CYP2A6 is regulated by nuclear factor-erythroid 2 related factor 2. *Biochem. Pharmacol.*, **81**: 289-294 (2011).
- 52) Katsuhiko Mizuno, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Arch. Toxicol.*, **85**: 199-207 (2011).

4. 招待講演 (国際・国外学会)

- 1) Tsuyoshi Yokoi. Regulation of human nuclear receptors and cytochrome P450s by microRNAs. Keynote Presentation in International Conference of Genomic Research Asia 2012, November 13-14, 2012, Deajeon, South Korea
- 2) Tsuyoshi Yokoi. Regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors by microRNAs and its toxicological implications. Lecture in The Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Louisville, October 19, 2012, Louisville, USA
- 3) Tsuyoshi Yokoi. MicroRNA Regulation of Foreign Compound Metabolism. Short Course in RNAi Therapeutics: A Primer on microRNAs and Their Regulatory Role in Regulation of Expression. 18th North American Regional ISSX Meeting, October 14-18, 2012, Dallas, USA
- 4) Tsuyoshi Yokoi. Approaches to predict drug-induced liver injury. Seminar in Faculty of Medicine, Khon Kaen University, September 14, 2012. Khon Kaen, Thailand.