

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.	<i>Toxicological Letters</i>	204	17-24	2011
Toru Usui, Takanori Hashizume, Takashi Katsumata, Tsuyoshi Yokoi, and Setsuko Komuro	In vivo investigation of the glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for troglitazone-induced liver injury.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	1303-1310	2011
Hiroko Hosomi, Tatsuki Fukami, Atsushi Iwamura, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Development of a highly sensitive cytotoxicity assay system for CYP3A4-mediated metabolic activation.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	1388-1395	2011
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.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	2057-2065	2011

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙4
研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
横井 毅	第II相代謝の評価と創薬	岩尾洋、奥山茂、飯野正光、斉藤亜紀良、赤池昭紀、山田久陽	実験薬理学「創薬研究のストラテジー」	金芳堂	東京	2011	224-231

総説

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima	microRNAs as mediators of drug toxicity	<i>Annual Review Pharmacology and Toxicology</i>	53	377-400	2013
Tatsuki Fukami and Tsuyoshi Yokoi	The emerging role of human esterases	<i>Drug Metab. Pharmacokinetics</i>	27	466-477	2012
中島 美紀	シトクロムP450と転写因子のmicroRNAによる発現制御	<i>薬学雑誌</i>	132	107-116	2012
Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima	Toxicological implications of modulation of gene expression by microRNAs.	<i>Toxicological Sciences</i>	123	1-14	2011
Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi	MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy: regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors.	<i>Pharmacology & Therapeutics</i>	131	330-337	2011

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	<i>Toxicology Letters</i>		in press	2014

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.	<i>Journal of Applied Toxicology</i>		in press	2014
Shinya Endo, Azusa Yano, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Involvement of miRNAs in the early phase of halothane-induced liver injury.	<i>Toxicology</i>	319	75-84	2014
Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Tshyoshi Yokoi, and Miki Nakajima	Epigenetic regulation of the tissue-specific expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A10.	<i>Biochemical Pharmacology</i>	87	660-667	2014
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.	<i>Toxicology Letters</i>	224	215-224	2014
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.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	42	1-8	2014
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.	<i>Toxicological Sciences</i>	136	250-263	2013
Kei Takahashi, Shin-ichi Yokota, Naoyuki Tatsumi, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima	Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects.	<i>Toxicology and Applied Pharmacology</i>	272	154-160	2013
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.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	41	1220-1230	2013

Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima	Epigenetic regulation is a crucial factor in the repression of UGT1A1 expression in human kidney	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	41	1738-1743	2013
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	<i>Toxicology Letters</i>	214	9-18	2012
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	<i>Toxicological Sciences</i>	130	4-16	2012
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	<i>Journal of Toxicological Sciences</i>	37	931-942	2012
Yukitaka Yoshikawa, Taishi Miyashita, Satonori Higuchi, Koichi Tsuneyama, Shinya Endo, Tohru Tsukui, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Mechanism of the hepatoprotective effects of tamoxifen against drug-induced and chemical-induced acute liver injuries	<i>Toxicology and Applied Pharmacology</i>	264	42-50	2012
Shinya Endo, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Stimulation of human monocytic THP-1 cells by metabolic activation of hepatotoxic drugs	<i>Drug Metabolism and Pharmacokinetics</i>	27	621-630	2012
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	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	40	1620-1627	2012
Azusa Yano, Satonori Higuchi, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.	Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver injury in mice.	<i>Toxicology</i>	293	107-114	2012
Masanori Kobayashi, Satonori Higuchi, Mika Ide, Satomi Nishikawa, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Th2 cytokine-mediated methimazole-induced acute liver injury in mice.	<i>Journal of Applied Toxicology</i>	32	823-833	2012

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	<i>PLoS ONE</i>	7	e30250	2012
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.	<i>Toxicological Sciences</i>	126	16-27	2012
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.	<i>Journal of Applied Toxicology</i>	32	815-822	2012
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.	<i>Archives of Toxicology</i>	85	199-207	2011
Toshihisa Koga, Rhoichi Fujiwara, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.	Toxicological evaluation of acyl glucuronides of NSAIDs using HEK293 cells stably expressing human UGT and human hepatocytes.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	54-60	2011
Satonori Higuchi, Masanori Kobayashi, Yukitaka Yoshikawa, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.	IL-4 mediated dicloxacillin-induced liver injury in mice.	<i>Toxicological Letters</i>	200	139-145	2011
Yuko Abe, Ryoichi Fujiwara, Shingo Oda, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima	Interpretation for the effects of protein kinase C inhibitors on human UDP-glucuronosyl transferase 1A (UGT1A) proteins in cellulo.	<i>Drug Metabolism and Pharmacokinetic</i>	26	256-265	2 2011
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.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	838-846	2011

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.	<i>Toxicological Letters</i>	204	17-24	2011
Toru Usui, Takanori Hashizume, Takashi Katsumata, Tsuyoshi Yokoi, and Setsuko Komuro	In vivo investigation of the glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for troglitazone-induced liver injury.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	1303-1310	2011
Hiroko Hosomi, Tatsuki Fukami, Atsushi Iwamura, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Development of a highly sensitive cytotoxicity assay system for CYP3A4-mediated metabolic activation.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	1388-1395	2011
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.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	2057-2065	2011

III. 研究成果の刊行物・別刷

第II相代謝の評価と創薬

横井 毅 (金沢大学 医薬保健研究域)

はじめに

創薬の初期段階において薬物動態に起因する問題で開発中止になる事例は、近年著しく減少したと言われている。その理由は第I相薬物代謝酵素、特にCYPを中心とした基礎研究が長足の進展をしたことにあり、創薬初期段階のみならず臨床での副作用発現の回避に至るまで、幅広い貢献をしている。近年、創薬初期段階において、CYPに起因する酵素誘導や阻害の問題を起こす可能性がある化合物はスクリーニングで排除されている。その結果、代謝反応を受け難い化合物や、CYP以外の代謝酵素で触媒される化合物が増加傾向にある。

第II相相結合代謝酵素として、グルクロン酸抱合酵素 (UGT)、硫酸抱合酵素 (SULT)、グルタチオン抱合酵素 (GST)、アセチル抱合酵素 (NAT)、アミノ酸抱合やメチル抱合を触媒する酵素等が知られている。図1には、世界のトップ200の医薬品の主要代謝クリアランス等について示す(1)。全クリアランスのうち代謝が約72%を占め(図1A)、そのうち約70%がCYPであり、次にUGT、エステラーゼ、フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO)、NAT、モノアミンオキシダーゼ (MAO)の順である。第II相酵素ではUGTが主要代謝酵素(全体の約15%)であり、次いでNAT(全体の約2%)である(図1B)。その他の第II相代謝酵素の関与は、トップ200の医薬品では報告されていない。また、ヒトでの第II相代謝酵素に起因する相互作用のほとんどにUGTの関与が報告され、抱合代謝全体の約40%をUGTが担っているという報告もある(2)。従って、開発時において最も注意を要する第II相代謝酵素はUGTであり、本稿ではUGTの評価と医薬品開発を中心に述べる。

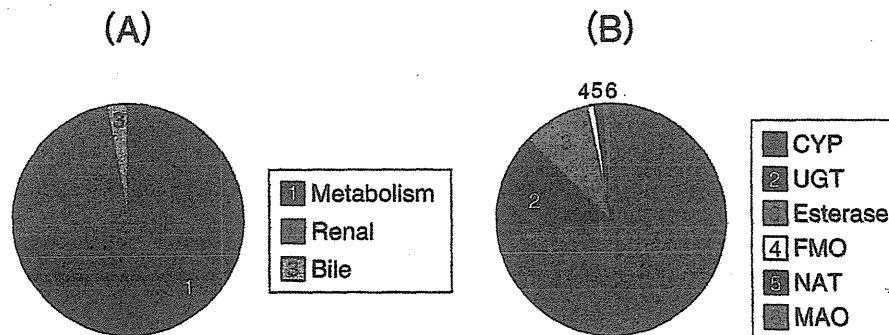


図1 世界のトップ200の医薬品の主要代謝クリアランス (文献1より改変)

■ グルクロン酸抱合酵素 (UGT)

UGTは、フェノール基やアルコール基に対して*O*-グルクロン酸抱合、カルボン酸に対してエステル型グルクロン酸抱合、第1~3級アミンに対して*N*-グルクロン酸抱合を触媒することが知られている。1種類のUGTが複数の代謝経路を触媒する場合や、1つの代謝経路に複数のUGTが関与する場合も多い。

(1) ヒト肝および小腸における分子種の存在比

UGTは肝と小腸に高い活性があり、UGTにはUGT1とUGT2ファミリーがあり、UGT1は5つのエクソンから成り、1つの遺伝子から13種類の異なるエクソン1の選択的スプライスによって多くの分子種が発現し、エクソン2~5は同じ配列である。UGT2は6つのエクソンから成る通常の遺伝子構造である。UGTは一般に基質特異性が低いことが知られている。また、UGT1A8およびUGT1A10は小腸に高く発現し、肝では発現していないという特徴的な分子種がある。分子種間で極めて高いアミノ酸配列の相同性を示すために、個々の分子種を分別できる抗体は無い。このために、mRNAレベルでの発現比から推定される。図2Aと2Bは、それぞれ異なる報告におけるヒト肝の分子種の存在比を示す。図2Aは25検体のヒト肝マイクロゾームを(3)、図2Bは3検体でのデータである(4)。プライマーの設定位置や、試料の由来による差異も考えられるが、いずれもUGT2B分子種の割合がかなり高い。また、図2Cにはヒト小腸のデータを示す(4)が、小腸においてもUGT2Bの割合が高いことが示されている。さらに、代表的な薬に対して、複数のUGT分子種の関与についての詳しい報告もなされている(5)。

(2) UGTの活性測定

UGTは小胞体膜内側に存在しているために、*in vitro*での活性測定には補酵素であるUDP-グルクロン酸(UDP-GA: 3~5 mM 添加)や基質との反応性を上げる為に、小胞体膜に穴を開ける試薬であるアラメチシン(30~50 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein 添加)を加える必要がある。酵素源としては、市販品であるヒト肝マイクロゾーム、各分子種発現系酵素またはヒトヘパトサイトを用いる。ヘパトサイトには補酵素を加える必要はないが、極めて高価であるた

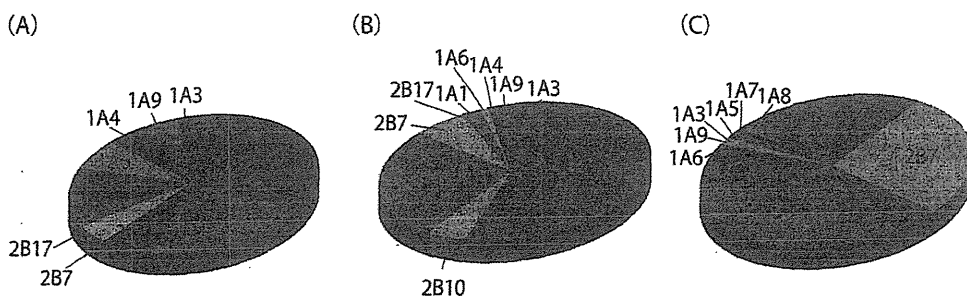


図2 ヒト肝および小腸におけるUGT分子種の存在比

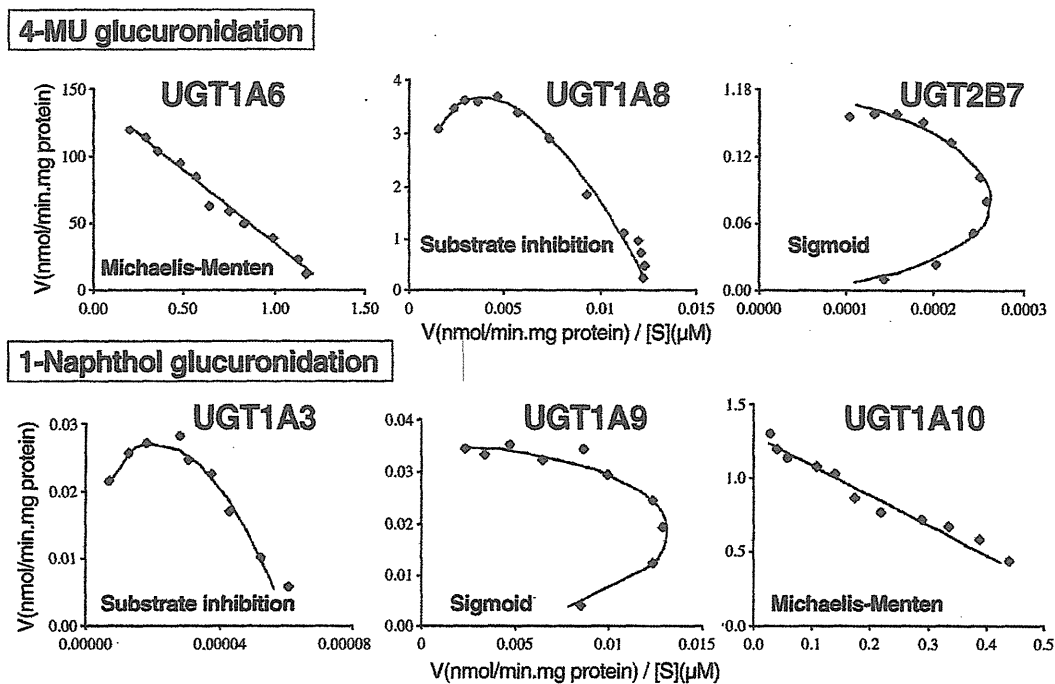


図3 UGT分子種発現系による4-MUと1-ナフトールのグルクロン酸抱合反応のEadie-Hofsteeプロット(文献7より改変)

めに使用が限られる傾向にある。固有クリアランスの算出には、基質の減少で測定する方法もあるが、様々な理由から推奨できない。とりわけ阻害試験には必ず代謝物を指標として検討する必要がある。しかし、多くの場合には代謝物が市販されていないために、グルクロン酸結合を切る酵素である β グルクロニダーゼ処理後、HPLC等を用いて標品を精製して定量に供する必要がある。

In vitroでの試験結果からin vivoクリアランスを予測することは、CYPの場合よりもかなり困難である。In vitroではアラメチシンを必要とするほど基質と酵素の反応性が悪いために、予測値はin vivoの実測値をはるかに下回ることが多い。肝ミクロソームでは、 K_m 値が10倍以上高いこともある。従って、よりin vivoに近い値を得られるヒトヘパトサイトの使用が推奨されるが、大きな個人差の影響を考慮する必要がある。ミクロソームの反応系に2%のウシ血清アルブミンを添加すると改善される場合もあるが、非結合型の濃度の考慮が必要となり(6)、基質によっては反応性の改善が認められない場合もある。さらに、in vitroの反応において、UGT酵素が活性化されて予期しない高い活性が認められる場合がある(7)。この活性化は、一定の範囲内の基質濃度のみで認められる場合が多く、基質濃度を変化させた検討が必要である理由の1つである。さらに、グルクロン酸抱合代謝物が、特定のUGT分子種に対してのみ強い酵素阻害を示すことも珍しくない(8)。補酵素の分解物であるUDPが他の分子種の活性阻害に働くことも知られているが(9)、この現象は反応液中での総活性値が高い場合に認められる。同じ基質に対して、異なる分子種が様々なキネティックを示すことも念頭に置く必要がある(図3)(10)。以上のように、

UGTの活性測定に際しては、多くの因子による影響に十分に注意を払う必要がある。

(3) UGTの酵素活性による分子種同定と阻害試験

開発候補化合物の主代謝分子種の同定方法はCYPの場合と同様である。しかし、UGTは分子種間の基質認識の特異性が低いために、より注意して実施することが肝要である。ヒト肝ミクロソームにおける各分子種特異的な基質として、UGT1A1にはビリルビンまたはエストラジオール、UGT1A3にはトリフルオロペラジン、UGT1A9にはプロポフォル、UGT2B7にはモルフィンまたはジブジンを使用するが、市販のヒト肝ミクロソームには各活性がデータシートとして添付されるようになってきた。これらを用いて、開発候補化合物のグルクロン酸抱合活性と各分子種の活性との相関を検討する。この時にヒト肝ミクロソームの検体において、各分子種の活性値が適度に分散している必要がある。

UGT分子種発現系を用いて開発候補化合物を代謝させ、分子種を同定する。この場合にもUGTの低い基質特異性を考慮する必要がある。in vivo推定 K_m 値だけではなく、高い基質濃度で低親和性 (low affinity) 分子種の関与も必ず検討する必要がある。

阻害試験は特に慎重に実施する必要がある。UGTの分子種特異的な阻害薬はほとんど知られていない。従って、基本的には高親和性 (high affinity) 分子種の基質を阻害薬として用いる検討方法が実施される。さらに、肝ミクロソームとUGT発現系酵素の両者での阻害定数を比較検討する必要がある。こうした検討でも説明が難しい結果が得られることもあり、これには肝ミクロソームとUGT発現系の両者における膜環境の差異が影響していると考えられる。さらに、別の複数の種類の基質兼阻害薬について、 K_m 、 IC_{50} および検出限界値を考慮して検討する必要がある。

(4) UGTと薬物間相互作用

UGTに起因する薬物間相互作用の臨床例はCYPと比較して著しく少なく、その程度も軽いとされている(1)。臨床例のまとめがKiangらによって報告されている(11)。開発候補化合物において、グルクロン酸抱合が主消失経路であり、単一分子種で触媒される場合には、薬物間相互作用を想定した検討が必須である。中でも、内因性基質であるビリルビンを抱合解毒できる分子種はUGT1A1のみであるために、阻害により高ビリルビン血症が惹起される場合がある(12)。また、CYPによる代謝物がUGT1A1を強く阻害することが高ビリルビン血症の原因となる場合もあるので注意が必要である(13)。

UGT2B7は、モルフィンを特異的基質とする分子種であり、さらに、アシルグルクロナイド生成反応を最も効率的に触媒する分子種でもある。UGT1A3もアシルグルクロナイド生成活性を少なからず有していることにも注意が必要である。最近、ナプロキセン、ジクロフェナク、ケトプロフェンなどNSAIDのアシルグルクロナイドの細胞障害性について詳しく検討し、細胞障害性について否定した報告がなされた(14)。また、生体内ではアシルグルクロナイドの生成反応と同時に、アシル体の分解反応を β -グルクロニダーゼが触

媒していると考えられている。しかし、アシル体が生成することが良く知られているミコフェノール酸のアシル体生成の逆反応は、 β -グルクロニダーゼではなく、ABHD10 (α/β hydrolase domain containing 10) という酵素が専ら触媒していることが新たに報告された (15)。また、アシル体代謝物の物理化学的性質を指標として、前臨床試験における選別に役立つ試みにも関心が持たれている (16)。UGT によるアシル体への触媒反応は、多くの候補化合物やその代謝物において、避けられない場合が多いため、今後の定量的な毒性評価の慎重な確立が待たれている (17)。

UGT は PXR (pregnane X receptor) や CAR (constitutive androstane receptor) によって発現調節をされているために、こうした転写因子の発現に影響を及ぼす化合物について、開発段階で考慮する必要がある。転写因子が抱合酵素の活性に及ぼす影響の定量的評価法は確立されていない。さらに、UGT は Nrf2 (NF-E2-related factor 2) によって発現調節を受けており、キノン、カテコール、パーオキシドなどの親電子性化合物類によって誘導を受け、解毒能に影響を及ぼすことが考えられる。

遺伝子多型については、体質性黄疸に関連する多型が、クリグラー・ナジャール症候群 (Crigler-Najjar 症候群) やジルベール症候群 (Gilbert 症候群) について詳しく研究されている (18)。我が国では、塩酸イリノテカンの投与患者について、UGT1A1*28 の遺伝子診断の実施についての保険適用が 2008 年 11 月から認可されている。

(5) UGT の種差と臓器分布

種差については、詳しい研究情報が極めて少ないのが現状であるが、ラット、マウスおよびサルの肝および小腸の分子種の mRNA レベルでの発現比の報告はなされている (19-21)。ラットおよびマウスの肝ミクロソームではイミプラミンやトリフルオロペラジンのグルクロン酸抱合活性は検出できない。肝ミクロソームにおけるエストラジオールのグルクロン酸抱合活性の K_m は、ヒトと同程度であるが、 V_{max} はヒトの 15 倍ほど高い (20)。

In vitro からヒト in vivo への外挿を目指した in silico 系の開発には、正確なクリアランスの予測が必要である。そのためには、肝外組織、特に腸管組織における第 II 相代謝酵素についても詳しい定量的検討が必要であるが、研究が進展していない。エストラジオールのグルクロン酸抱合活性のクリアランスは、ヒトでは肝と小腸では、ほぼ同じであるが、ラットおよびマウスでは、小腸より肝で 7 倍ほど高い。他の基質においても同様の傾向が認められる (22)。

実験動物における、UGT 分子種の種類、発現量、基質特異性、さらには発現臓器差についても、さらに詳しく検討し、前臨床開発に資する必要がある。最終的には CYP と同様に特異的酵素活性比 (RAF: relative activity factor) による定量的予測ができることが望まれている。

2 硫酸抱合酵素 (SULT)

硫酸抱合を触媒する SULT は、主に *p*-ニトロフェノールなどのフェノール性水酸基を有する化合物や、アドレナリン、ドパミンやエストロゲンなどの内因性物質等を基質とする SULT1 ファミリー、アルコール性水酸基や内因性ステロイド類を基質とする SULT2 ファミリーと、アミンを基質とする SULT3 がある。

多くの内因性物質の代謝に主として硫酸抱合が係わることが知られている。しかし、環境化学物質以外の薬物等外来異物の硫酸抱合についてはミノキシジルの他に、タモキシフェン、ラロキシフェンやナプロキセンの代謝の一部に関与しているという報告がある他はほとんど知られていない。SULT は食品中に含まれるフラボノイド化合物やポリフェノール化合物によって強く阻害される場合がある。しかし、薬物によってヒト硫酸抱合活性が阻害された報告は無い。さらに、SULT は PXR によって転写調節されているが、PXR を活性化する薬物による相互作用の報告も無いため、現状では前臨床試験段階で特別の注意を払う必要がないと考えられている。

3 グルタチオン抱合酵素 (GST)

GST は求核性のグルタチオンと親電子性の化合物との抱合反応を触媒する酵素であり、主に肝可溶性画分に存在する。グルタチオン抱合は、化合物の水溶性を著しく上昇させ、胆汁や尿中への排泄を促進する重要な解毒排泄機構の1つである。すなわち、GST は主に CYP による薬物の代謝的活性化反応によって生じた反応性中間体 (反応性代謝物) とグルタチオンとの反応を触媒し、核酸やタンパク質などの生体高分子とアダクトを作ることを防ぐ解毒的な作用を発揮する。ヒト GST には 16 種類以上の分子種があり、そのうち 5 種類がメジャーな分子種である。GSTA や GSTM 分子種は基質特異性が低い。各分子種について遺伝子多型が報告されており、中でも GSTM1 および GSTT1 の完全欠損型のアレル頻度はともに約 50% である。代謝活性は二峰性の分布を示し、遺伝子量効果が強く見られる。GSTM1 と GSTT1 の両因子を欠損しているヒトは、タクリン (23) やトログリタゾン (24) による薬物性肝障害の頻度が有意に高いことが報告され注目されている。近年、開発初期段階において、主に CYP によって生成される反応性代謝物の生成を、*in vitro* で反応性代謝物のグルタチオンアダクトを測定して予測する試験が盛んに行われている。この試験は、反応性代謝物類の構造を決定しないで、アダクトに使用されたグルタチオン量を MS/MS で網羅的に定量測定する。反応性代謝物の解毒能の個人差と副作用発現の関連には、主として本酵素が関与していると考えられている。

4 アセチル抱合酵素 (NAT)

抗不整脈薬プロカインアミド、抗結核薬イソニアジドや炎症性腸疾患治療薬スルファサラゾピリジンは、*N*-アセチル体として尿中に排泄される。これらの薬物のアセチル化体比率には、著しい個人差が認められることは古くから知られている。これらの反応は NAT2

によって触媒され、PM (poor metabolizer) の割合は日本人で約 10% である。結核の薬物治療において、イソニアジドとリファンピシンの併用において、NAT2 の活性が低いヒトでは、ヒドラジンの生成に起因する肝障害発症のリスクが高くなると報告されている(25)。がん原性アリルアミンやヘテロサイクリックアミンの *N*-水酸化体は、NAT が *O*-アシル体にすることによって活性化されるため、専ら発がん性との関連研究が行われているが、基質となる薬の種類は極めて限られている。

■ メチル転移酵素

6-メルカプトプリン、6-チオグアニンやアザチオプリンのメチル化を触媒する酵素であるチオプリン *S*-メチル転移酵素 (TPMT) は、PM における造血障害などの重篤な副作用発現で有名である。TPMT の活性は赤血球と肝で相関する。日本人で報告されている PM 型である *3C の遺伝子頻度が 0.008 であり、患者がこの因子をホモで有する PM である確率は極めて低いが、開発候補化合物の代謝が TPMT でメチル転移を受ける場合には注意が必要である。

生体内物質であるカテコールアミン、レボドパやメチルドパなどのカテコール類をメトキシ体に変換する肝可溶性画分に存在する酵素であるカテコール *O*-メチルトランスフェラーゼ (COMT) にも遺伝子多型による個人差が報告されている。エストラジオールから生成する DNA 障害性のあるカテコール体への代謝を COMT が触媒することから、乳がんの発生リスクとの関連が示唆されているが、薬物等の異物代謝に係わるという報告はない。

■ 第Ⅱ相代謝酵素とトランスポーター

抱合酵素と排出型トランスポーターは機能的に関連していることが、肝臓、小腸や腎臓などで明らかにされて来ている。肝で生成されたグルクロン酸抱合体の多くは、MRP (multidrug resistance-associated protein) 2 によって胆汁中に排泄され、MRP1 や MRP3 によって血漿中に排泄される。グルタチオン抱合体も MRP2 や MRP3 の基質となる。硫酸抱合体は主として BCRP (breast cancer resistant protein/ABCG2) の基質となることが報告されている。排出型トランスポーターが薬物の体内動態におよぼす影響は、開発段階で必要な情報であるが、抱合活性と同時に定量的に評価できる *in vitro* スクリーニング系の確立が今後の課題である。

おわりに

開発候補化合物が第Ⅱ相酵素で直接代謝される場合には、当該酵素活性の個人差等の薬物動態への影響を考慮する必要がある。CYP による代謝物がさらに抱合反応を受けた二次代謝物についても体内動態を考慮しなければならない場合がある。この場合には、最初にヒトおよび実験動物のヘパトサイトを用いて、第Ⅰ相と第Ⅱ相代謝酵素を同時に評価することが推奨される。酵素活性の個人差が、試験結果に影響することをできるだけ避ける

ために、プールドヒトヘパトサイトなどが使われ始めている。今後、各酵素活性のフェノ
タイプング用プローブ薬やカクテルプローブの開発が必要と思われる。近い将来、第Ⅱ相
酵素がCYPと同じ研究レベルに到達し、第Ⅰ相酵素と第Ⅱ相酵素を包括的に考慮できる
予測系の開発が望まれる。

文 献

- 1) Williams JA, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2004;32:1201-1208.
- 2) Evans W, et al. *Science.* 1999;286:487-491.
- 3) Izukawa T, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2009;37:1759-1768.
- 4) Ohno S, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2009;37:32-40.
- 5) Cubitt HE, et al. *Pharm Res.* 2009;26:1073-1083.
- 6) Kilford PA, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2009;37:82-89.
- 7) Yamanaka H, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2005;33:23-30.
- 8) Watanabe Y, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2002;30:1462-1469.
- 9) Fujiwara R, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2008;36:361-367.
- 10) Uchaipichat V, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2004;32:413-423.
- 11) Kiang TK, et al. *Pharmacol Ther.* 2005;106:97-132.
- 12) Zhang D, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2005;1729-1739.
- 13) Katoh M, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2007;35:583-589.
- 14) Koga T, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2011;39:54-60.
- 15) Iwamura A, et al. *Proceeding for 25th JSSX annual meeting.* 2010;215.
- 16) Sawamura R, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2010;38:1857-1864.
- 17) Skonberg C, et al. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4:425-438.
- 18) http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/sgc/ugt_alleles/
- 19) Shelby MK, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2003;31:326-333.
- 20) Buckley DB, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2007;35:121-127.
- 21) Nishimura M, et al. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24:139-144.
- 22) Shiratani H, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2008;36:1745-1752.
- 23) Simon T, et al. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;67:432-437.
- 24) Watanabe I, et al. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73:435-455.
- 25) Ohno M, et al. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4:256-261.

microRNAs as Mediators of Drug Toxicity

Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima

Department of Drug Metabolism and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, Kanazawa 920-1192, Japan; email: tyokoi@p.kanazawa-u.ac.jp, nmiki@p.kanazawa-u.ac.jp

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2013. 53:377–400

First published online as a Review in Advance on November 16, 2012

The *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* is online at pharmtox.annualreviews.org

This article's doi:
10.1146/annurev-pharmtox-011112-140250

Copyright © 2013 by Annual Reviews.
All rights reserved

Keywords

P450, transcriptional factor, toxicology, polymorphism, posttranscriptional regulation

Abstract

microRNAs (miRNAs) represent the most abundant class of gene expression regulators that bind complementarily to transcripts to repress their translation or mRNA degradation. These small (21–23 nucleotides in length) noncoding RNAs are derived through a multistep process by miRNA genes located in genomic DNA. Because miRNAs regulate fundamental cellular functions, their dysregulation affects a large range of physiological processes, such as development, immune responses, metabolism, and diseases as well as toxicological outcomes. Cancer-related miRNAs have been extensively studied; however, the roles of miRNAs in xenobiotic metabolism and in toxicology have only recently been explored. This review focuses on the current knowledge of miRNA-dependent regulation of drug-metabolizing enzymes and nuclear receptors and the associated potential toxicological implications. The potential modulation of toxicology-related changes in miRNA expression, the role of miRNA in immune-mediated drug-induced liver injuries, the use of circulating miRNAs in body fluids as potential toxicological biomarkers, and the link between miRNA-related pharmacogenomics and adverse drug reactions are highlighted.

miRNA: microRNA

UTR: untranslated region

mRNA: messenger RNA

P450s, CYPs: cytochrome P450s

INTRODUCTION

microRNAs (miRNAs) comprise a class of short noncoding single-stranded RNAs that regulate gene expression posttranscriptionally by binding to 3' untranslated regions (UTRs), coding sequences, or 5' UTRs of target messenger RNAs (mRNAs), leading to inhibition of translation or mRNA degradation. Currently, approximately 2,000 human miRNAs have been identified, and more than a half of the known miRNAs are conserved across vertebrate animals (1). Genes that encode for miRNAs are located in intergenic or intragenic (intronic or exonic) regions with both sense and antisense orientations. In humans, miRNAs are distributed as intergenic (52%), intronic (43%), and exonic (5%) (2). In silico prediction estimates that approximately 60% of human mRNAs could be targets of miRNA (3). Like mRNA, miRNAs are expressed in a tissue- or cell-specific manner. miRNAs are now clearly recognized to be involved in posttranscriptional gene regulation and contribute to cellular processes, such as development, differentiation, and cell signaling, as well as pathological and physiological processes, such as disease development, immune response, drug response, and carcinogenesis (4). The biogenesis of miRNA (i.e., how miRNAs are generated and processed, exported to the cytoplasm, and regulated) has been intensively investigated and well reviewed in previous publications (5–7). The development of miRNA-related experimental techniques—such as in silico target site predictions, precursor miRNA transfection or the use of miRNA oligonucleotides for overexpressing or inhibiting miRNA, and immunoprecipitation of RNA-induced silencing complex (RISC) followed by sequence analyses—has enabled us to identify miRNAs that are involved in numerous physiological and toxicological phenotypes.

In the fields of drug metabolism and toxicology, miRNA-related research is progressing. Because most drugs and chemical toxicants are biotransformed to exhibit their functions (i.e., forming detoxified metabolites or toxic metabolites), the expression of drug- or xenobiotic-metabolizing enzymes and their miRNA regulation are important for understanding toxicological phenotypes. The purpose of this review is to summarize the recent findings concerning the roles of miRNA in regulating cytochrome P450s (P450s, CYPs) and nuclear receptors as well as the toxicological significance of miRNAs by considering their potential use as biomarkers and/or in predictive toxicity.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF IDENTIFIED TARGET GENES OF miRNAs

Gene names convey basic information concerning the functional relationships among mature miRNAs (8). For example, the human miRNA hsa-miR-22 and the mouse miRNA mmu-miR-22 are orthologous. Paralogous sequences, in which mature miRNAs differ at only one or two positions, are given lettered suffixes, such as miR-10a and miR-10b. Distinct hairpin loci that result in identical mature miRNAs have numbered suffixes, such as miR-281-1 and miR-281-2. The passenger strand, termed miRNA*, is usually degraded, although it may be functional.

Each miRNA may suppress multiple mRNA targets. Moreover, one mRNA can be targeted by multiple miRNAs, enabling the control of a wide range of cellular processes. Because miRNA binds to the target mRNA with partial complementarity over a short sequence, computational identification of the miRNA target gene is difficult. The 5' end of the miRNA contains six to seven nucleotides known as a seed sequence, which is essential for the function of the miRNA. There are several free, accessible Internet sites that predict the miRNAs for target genes, such as miRanda (9; <http://www.microrna.org/>), TargetScan (10; <http://www.targetscan.org/>), and PicTar (11; <http://pictar.mdc-berlin.de/>). A general algorithm that predicts the precise target gene of each miRNA has not been established; thus, each program generates different results.

Studies to confirm the specific miRNA-mRNA interactions, such as luciferase reporter-gene assays that contain the miRNA recognition element (MRE) of the target, are commonly conducted. The reporter gene is cotransfected into cells with a precursor miRNA or with an expression plasmid that encodes the miRNA or antisense oligonucleotides complementary to the miRNA; this precursor miRNA may also be transfected to overexpress or inhibit miRNA. The miRNA-mRNA interactions are determined on the basis of whether the luciferase activity significantly decreases or increases compared with the activity in the control. When reporter-gene assays are utilized, the methodology should evaluate the effects on the candidate gene of the full length of the 3' UTR or whether other endogenous miRNAs affect the candidate gene. The overexpression of miRNAs is a useful method to elucidate the effects of a miRNA on gene expression targets. However, aberrant cellular functions become apparent when miRNAs exceed physiological levels within cells. Therefore, the use of normal physiological miRNA concentrations *in vivo* is preferred. Furthermore, determining target mRNA or protein expression changes by microarray or proteome analysis after the overexpression and/or inhibition of miRNA is useful (12, 13). However, these assays are likely to show effects that are caused by miRNAs acting on secondary targets. Immunoprecipitation of RISC and sequence analyses are also informative methods (14).

MRE: miRNA recognition element

THE ROLE OF miRNAs IN REGULATING NUCLEAR RECEPTORS AND ENZYMES THAT METABOLIZE XENOBIOTICS

P450s are important enzymes that catalyze the detoxification of xenobiotics, such as drugs, environmental chemicals, and carcinogens. P450s also bioactivate many drugs and procarcinogens to their toxic metabolites in a process termed metabolic activation. The different P450 isozyme expression profiles determine the amount of reactive intermediates formed and the resulting toxic response. The regulation of enzyme expression is important in the individual variability of P450 activities. Whereas mechanisms of P450 transcriptional regulation by nuclear receptors have been well studied, posttranscriptional regulation largely remains unknown. Recently, many P450s and nuclear receptors (Table 1) have been found to be regulated posttranscriptionally by miRNAs, thus establishing an additional means for modulating detoxification mechanisms and drug and chemical metabolic activation.

Human CYP1B1

Human CYP1B1, expressed mainly in ovarian, uterine, and breast tissues (15, 16), catalyzes the metabolic activation of a variety of procarcinogens and promutagens, including polycyclic aromatic hydrocarbons and aryl amines (16), and 17 β -estradiol metabolism (17), which contributes to the growth and development of estrogen-dependent cancers (18). 4-Hydroxyestradiol, a catechol-type metabolite formed by CYP1B1, generates free radicals from reductive-oxidative cycling with the semiquinone and quinone forms, which cause DNA damage (19, 20). There is no apparent difference in the CYP1B1 mRNA levels between tumor and normal tissues (21), whereas the expression of CYP1B1 protein and its enzymatic activity are much higher in various types of malignant cancers than they are in normal tissues (22). Posttranscriptional regulation has been suggested as a mechanism for this difference.

The first study (23) to demonstrate that miRNA can regulate any CYP was conducted on human CYP1B1. Specifically, human CYP1B1 is regulated by miR-27b (24). In Jurkat (miR-27-negative) cells, exogenously expressed miR-27b decreased luciferase activity; in MCF-7 (miR-27-positive) cells, an antisense oligonucleotide to miR-27b restored the luciferase activity and increased the protein level and enzymatic activity of endogenous CYP1B1 (23). These findings strongly suggest

Table 1 Drug-metabolizing enzymes and nuclear receptors that are regulated by microRNAs

Target	miRNA	Reference
CYP1B1	miR-27b	23
CYP2A3 (rat)	miR-126*	34
CYP2E1	miR-378	29
CYP3A4	miR-27b	46
CYP24A1	miR-125b	55
ARNT	miR-24	65
ER α	miR-206	66
	miR-221/222	67
	miR-22	68
GR	miR-18, miR-124a	138
HIF-1 α	miR-17	82
HNF4 α	miR-24a, miR-34	60
PPAR α	miR-21, miR-27b	72
PPAR γ	miR-27a	75
		76
	miR-27b	73
		74
PXR	miR-148a	45
RXR α (rat)	miR-27	77
VDR	miR-125b	56
	miR-27b	46
DHFR	miR-24	126
SULT1A1	miR-631	124
Nrf2	miR-28	139
Keap1	miR-200a	140
MMP1	miR-222	80
Thioredoxin reductase	miR-298, miR-370	86
Mitochondrial antioxidant enzymes	miR-17*	81

that human CYP1B1 is posttranscriptionally regulated by miR-27b. Extending the work to breast cancer patients revealed decreased miR-27b expression and increased CYP1B1 protein levels in 24 cancerous tissues compared with noncancerous tissues ($p < 0.0005$) in each patient. Because miR-27b targets CYP1B1 mRNA, the decreased miR-27b expression is one of the causes of high expression of CYP1B1 protein. Furthermore, although CYP1B1-mediated 4-hydroxylation of estrogen decreases estrogenic activity, the metabolite (4-hydroxyestradiol) is toxicologically active. Accordingly, miR-27b levels may contribute to estrogen-dependent molecular mechanisms of carcinogenesis (Figure 1).

Human CYP2E1

Human CYP2E1 catalyzes the metabolism of numerous low-molecular-weight xenobiotics, including drugs (e.g., acetaminophen, isoniazid, and bromobenzene), organic solvents (e.g., ethanol, acetone, carbon tetrachloride, chloroform, vinyl chloride, glycerol, hexane, and toluene), and procarcinogens (e.g., *N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosomethylethylamine, and