

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 25 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

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

横井 毅 ----- I - XLIII

II. 分担研究報告

1. アミオダロン誘導性肝障害における代謝反応を考慮した毒性メカニズ
ムに関する研究

横井 毅 ----- 1 - 32

2. 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よび炎症関
連因子の関与

横井 毅 ----- 33 - 60

3. ラットにおける代謝を考慮したカルバマゼピン誘導性肝障害のメカニズ
ム解析

深見 達基 ----- 61 - 82

4. 免疫学的機序による薬物誘導性肝障害の発症における miRNA の関与

中島美紀 ----- 83 - 136

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 137 - 142

VI. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 143 - 295

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

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

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

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、danger 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。

本年は3年計画の最終年度であるが、全体として当初の予定を上回る成果を発表することができた。本年度は関連論文10報と総説1報を発表することができた。3年目に業績（原著論文）として発表することができた特筆できるものとしては、以下の6つの研究成果を挙げるができる。

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覧表 (P.138) #1) である。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。その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 (P.138) #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 (P.138) #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(P.138)#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 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 (P.138) #6)

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 (P.138) #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覧表 (P.138) #7)

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覧表 (P.138) #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 1-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 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 , 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。

以上、今年度に論文発表できた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。

総括・分担研究報告書には、今年度まだ論文発表にはなっていないものの研究結果について得られた内容を以下の 2 項目 (**アミオダロン誘導性肝障害における代謝反応を考慮した毒性メカニズムに関する研究** および、 **ラットにおける代謝を考慮したカルバマゼピン誘導性肝障害のメカニズム解析**) について詳しく報告する。さらに、2014 年に論文発表を行った 2 項目 (**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** および、 **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**) を加えて、4 項目についての詳しい分担報告を以下に行った。

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

金沢大学医薬保健研究域薬学系 助教 深見達基

A. 研究目的

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。最近、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、予測性は向上しないことが次第に明らかになってきている。その主な原因は、免疫学的因子の関与がほとんど考慮・評価されていないことに起因していると考えられているが、その研究はほとんど進展していない。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。

以下には、各項目において、A. 研究目的、B. 研究方法、C. 研究結果、D. 考察を記載する。

(1) アミオダロン誘導性肝障害における代謝反応を考慮した毒性メカニズムに関する研究：

A. 研究目的：アミオダロン (AMD) は Vaughan-Williams 分類で III 群に分類される抗不整脈薬であり、生命に危険のある再発性不整脈で他の抗不整脈薬が無効又は使用できない場合に経口剤が、生命に危険のある不整脈で難治性かつ緊急を要する場合および電氣的除細動抵抗性の心室細動あるいは無脈性心室頻拍による心停止に注射剤が用いられる。AMD の主代謝物はデスエチルアミオダロン (DEA) であり、主に CYP3A4 により *N*-脱アルキル化反応を受けることで生成される。DEA はさらに *N*-脱アルキル化を受けてジ-*N*-デスエチルアミオダロン (DiDEA) に変換される。AMD および DEA はそれぞれ水酸化を受けてヒドロキシアミオダロン (OH-AMD) および 3'-ヒドロキシデスエチルアミオダロン

(3'-OH DEA) が生成する。OH-AMD の構造について詳細は不明である。また AMD、DEA および DiDEA から *O*-脱アルキル化や酸化的脱アミノ化を受けて *O*-デスアルキルアミオダロン (ODAA) やデアミノアミオダロン (DAA) も生成される。さらに脱ヨード化体の生成も報告されている。AMD は薬物性肝障害の発現頻度が高いことが知られており、服用患者の約 4 分の 1 に血清中 ALT 値の上昇、1-3% に肝炎の症状が認められている。AMD の肝毒性発現には代謝物の関与が示唆されており、これまで *in vitro* において DEA、DiDEA、ODAA および DAA がミトコンドリア毒性や細胞毒性を示すことが報告されている。AMD の代謝物の中でも DEA はヒトにおいて最も高い血漿中濃度を示し、AMD 同様高い臓器蓄積性を示すことから毒性発現に大きく寄与していることが考えられる。これまで *in vitro* における検討により、HepG2 細胞に CYP3A4 発現系ミクロソーム存在下で AMD を処置することにより細胞毒性の増悪が認められたこと、ヒト急性単球性白血病由来細胞株である THP-1 細胞に CYP3A4 発現系ミクロソーム存在下で AMD を処置することにより THP-1 細胞の活性化が認められたこと、ラット肝細胞に AMD の誘導体を処置した結果より DEA、DiDEA、3'-OH DEA が毒性を示したこと (Waldhauser et al., 2006) が報告されており、いずれも CYP3A による代謝物が AMD の肝毒性に関与することを示唆している。AMD 誘導

性肝障害に代謝物が関与するか実験動物を用いて検討した例はない。本研究では AMD 誘導性肝障害に代謝物が関与するか検討するため、DEA 生成を触媒する Cyp3a を誘導するデキサメタゾンをマウスに投与することにより、代謝反応を考慮した肝毒性の発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。

B. 実験方法

B-1 アミオダロンおよびデキサメタゾンの投与

本検討における動物実験については、すべて金沢大学動物実験指針に従って行った。Balb/cCrSlc マウス (雄性、8 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育後、デキサメタゾン (60 mg/kg in corn oil) を 10 mL/kg で 3 日間腹腔内投与した。デキサメタゾン最終投与から 24 時間後に AMD (1,000 mg/kg in corn oil) を 10 mL/kg で経口投与した。AMD 投与 0、1、3、6、12 および 24 時間後に下行大静脈より採血し、肝臓を採取した。

B-2 ケトコナゾールの投与

デキサメタゾンおよび AMD を投与し、ケトコナゾール (50 mg/kg in corn oil) を AMD 投与 1 時間前に腹腔内投与した。AMD 投与 24 時間後に下行大静脈より採血し、肝臓を採取した。

B-3 1-アミノベンゾトリアゾールの投与

デキサメタゾンおよび AMD を投与し、1-アミノベンゾトリアゾール (100 mg/kg in saline) を AMD 投与 1 時間前に腹腔内投与した。AMD 投与 24 時間後に下行大

静脈より採血し、肝臓を採取した。

B-4 塩化ガドリニウムの投与

デキサメタゾンおよび AMD を投与し、塩化ガドリニウム (10 mg/kg in saline) を AMD 投与 48 および 24 時間前に静脈内投与した。AMD 投与 24 時間後に下行大静脈より採血し、肝臓を採取した。

B-5 統計解析

2 群間における統計学的評価は Student's *t*-test により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

C. 実験結果

C-1 アミオダロン投与マウスの血漿中 ALT 値に対するデキサメタゾンの影響

Balb/c マウスに AMD を単回投与したところ、血漿中 ALT 値は 6 時間後に軽微な上昇を示し、24 時間後には正常値まで低下した。そこで、デキサメタゾン前処理することで AMD による肝障害を惹起されるか検討を行った。デキサメタゾンを 3 日間反復投与することで ALT 値が上昇したものの、6 および 24 時間後においても同じ値で推移した。デキサメタゾン前処理したマウスに AMD を投与したところ、6 および 24 時間後における血漿中 ALT 値が有意に高値を示し、時間依存的な ALT 値の上昇が認められた。

C-2 血漿および肝臓中アミオダロンおよびデスエチルアミオダロンの濃度

AMD 投与 24 時間後の血漿および肝臓中の AMD および DEA 濃度の測定を行った。AMD のみを投与したマウスと比較し

て、デキサメタゾン前処理したマウスにおいて血漿中 AMD 濃度が有意に低い値を示し、血漿中 DEA 濃度は高値を示す傾向が認められた。また、肝臓中 AMD の濃度はデキサメタゾン前処理の有無による差が認められず、肝臓中デスエチルアミオダロン濃度は高値を示す傾向が認められた

C-3 1-アミノベンゾトリアゾール併用投与がデキサメタゾンを前処理したアミオダロン投与マウスの肝障害に与える影響

Cyp 分子種を非特異的に阻害する 1-アミノベンゾトリアゾールをデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスに併用投与し、血漿中 ALT 値に違いが認められるか検討し、その結果 1-アミノベンゾトリアゾール併用投与を行っていないマウスと比較して併用投与を行ったマウスにおいて血漿中 ALT 値が有意に高値を示した。血漿中 ALT 値と血漿中および肝臓中 AMD および DEA 濃度の関係を評価したところ、血漿中 DEA 以外の濃度と血漿中 ALT 値との間に有意な相関関係が認められた。以上より、血漿中 AMD 濃度、肝臓中 AMD 濃度と DEA 濃度の上昇が肝毒性発現に関与している可能性が示された。

C-4 デキサメタゾンを前処理したアミオダロン投与マウスの肝障害に対するクッパー細胞の関与

ヒト急性単球性白血病由来細胞株である THP-1 細胞に CYP3A4 発現系ミクロソームと AMD を処置しインキュベートすると単球の活性化マーカーである

CD54 および CD86 の発現上昇と、炎症性サイトカインである IL-8 および tumor necrosis factor a (TNFa) の産生上昇が認められている。そこで、肝類洞内に存在する組織マクロファージであるクッパー細胞の枯渇剤である塩化ガドリニウムをデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスに併用投与し、ALT 値に差が認められるか検討した。その結果、塩化ガドリニウム併用投与することにより血漿中 ALT 値が有意に低値を示した。

C-5 肝臓中 GSH および GSSG 量の測定

AMD 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、肝臓中の GSH および GSSG 量を測定し、GSH/GSSG 比を算出した。AMD 投与マウスと比較してデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスにおいて AMD 投与 0 時間における GSH が有意に低値を示した。また、投与 24 時間後における GSH/GSSG 比が有意に低値を示した。この結果より、AMD 誘導性肝障害の発症に酸化ストレスが関与する可能性が示された。C-6 ミトコンドリア毒性に関する検討

血漿中の triglyceride 量を測定することによりβ酸化が阻害されているか検討を行った。AMD 投与マウスおよびデキサメタゾン投与マウスと比較して、デキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスにおいて血漿中 triglyceride 量が高値を示した。したがって、デキサメタゾン前処理によりβ酸化が阻害された結果として血漿中 triglyceride 量が増加した可能性が示され

た。以上の結果より、デキサメタゾンによりアポトーシス経路が活性化され、肝細胞死が生じやすい条件となっており、AMDによる肝障害を増悪させている可能性が示された。

D. 考察

ヒトにおいてDEA生成を触媒する主代謝酵素はCYP3A4である。マウスにおけるDEA生成反応の責任酵素は不明であるが、マウスCyp3a分子種の中で最も発現量の高いCyp3a11はヒトCYP3A4と76%の高いアミノ酸相同性を有する。よって、ヒトと同様にマウスにおいてもCyp3a分子種がDEA生成反応を担うと考え、Cyp3aを誘導することで肝毒性を発現させることを考えた。Cyp3aの誘導剤としてはデキサメタゾンの他にpregnan X receptor (PXR) のリガンドであるpregnenolone-16-carbonitrile (PCN) や constitutive androstane receptor (CAR) の活性化剤であるフェノバルビタールが考えられた。AMDとDEAはCypに対してmechanism-based inhibition (MBI) を起こすことが知られており、AMDとDEAがそれぞれ有する三級または二級アミンがニトロソアルカン (R-N=O) を形成し、P450のヘム鉄に結合して不可逆的に障害すると考えられている。また、AMDとDEAが有するフラン環もMBIの原因として知られている。したがって、本実験ではAMDの反応性代謝物の生成を亢進させると考えられるデキサメタゾンを前処

理することで肝障害を発症させることにした。

デキサメタゾン前処理した後にAMDを投与することで血漿中AMD濃度は有意に低値を示した。これはCyp誘導により代謝能が亢進された結果であると考えられる。一方、血漿中DEA濃度、肝臓中AMD濃度およびDEA濃度にはデキサメタゾン前処理による影響は認められなかった。また、血漿中ALT値と肝臓中AMD濃度または肝臓中DEA濃度との間に有意な正の相関が認められた。したがって、AMDとDEAのいずれが毒性発現に関与するか本検討では明らかにできなかった。

DEAはヒトにおいてCYP3A4よりも寄与は小さいがCYP1A2, CYP2C8, CYP2C19, CYP2D6などのCYP分子種によっても生成される。マウスにおいても同様に複数のCyp分子種によりDEAが生成される可能性が考えられる。1-アミノベンゾトリアゾールはMBIによりCYP分子種非選択的に結合することで代謝活性を阻害することが知られている。ことから、血漿中ALT値およびDEAの濃度に影響するか検討を行った。その結果、予想に反してALT値が低値を示すことが考えられたが、ALT値が有意に高値を示した。また、血漿中AMD濃度、肝臓中AMDおよびDEA濃度が有意に高値を示し、これらと血漿中ALT値の間に有意な相関関係が認められた。血漿中および肝臓中AMD濃度は肝毒性に反映しないことが考えられる一方で、肝臓中DEA濃度が高いこと

が肝毒性発現に対して最も寄与が大きいことが考えられた。DEA は $\text{LogP} = 6.4$ という非常に高い脂溶性を示すため、肝臓内に高濃度で貯留し続けることが肝毒性発現につながると考えられる。

クッパー細胞の枯渴剤である塩化ガドリニウムを投与することで ALT 値が低値を示したことから、*in vivo* においても単球/マクロファージ、特にクッパー細胞が毒性発現に関与することを示した。クッパー細胞は肝臓内に存在する組織マクロファージであり、アセトアミノフェンおよびハロタン誘導性肝障害の発症に関与することが知られている。クッパー細胞は組織マクロファージの 80-90% を占めることから肝臓のみならず全身の防御に重要な役割を果たしている。クッパー細胞が肝毒性を発現させるメカニズムとして IL-1 β や TNF α といった炎症性サイトカインの放出並びに酸化ストレスの増悪による肝細胞への攻撃が考えられている。炎症性サイトカインは炎症が起こることで初めて誘導されるタンパク質であり、mRNA 発現量測定により組織固有の免疫細胞等から放出されたサイトカイン・ケモカインの発現量の増減を評価できる。そこで、炎症性因子が肝臓において発現増加しているか mRNA 量を測定することにより検討したが、デキサメタゾン投与マウスと比較してデキサメタゾンを前処理した AMD 投与マウスにおいてサイトカイン・ケモカイン等の発現量は高値を示さなかった。これはデキサメタゾンの

免疫抑制作用が原因であると考えられる。AMD 投与により IL-1 β 、IL-18、MIP-2 の発現量が低値を示した原因は転写活性等の阻害が考えられるが詳細は不明である。よって、炎症性因子の放出はデキサメタゾンを前処理した AMD 投与マウスにおける肝毒性には関与していない可能性が示された。一方、酸化ストレスマーカーとなる GSH/GSSG 比が AMD 投与マウスと比較してデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスにおいて有意に低値を示したことから酸化ストレスの関与が示された。

以上よりクッパー細胞はサイトカイン・ケモカインの放出ではなく、酸化ストレスの増悪により肝毒性を発現させていることが示された。

本検討ではマウスにおいてデキサメタゾンを前処理することにより AMD 誘導性肝障害を発症させることに成功した。また、AMD 誘導性肝障害において代謝物である DEA が肝臓に貯留することにより肝毒性が発現すること、マクロファージが酸化ストレスを増悪することで肝細胞を損傷していること、デキサメタゾン前処理によりミトコンドリア毒性が起こることでアポトーシスが生じ、肝細胞死が引き起こされていることを明らかにした。本研究結果により AMD 誘導性肝障害の発症メカニズムを *in vivo* において初めて明らかにし、薬物性肝障害の発症メカニズムに新たな知見を得ることができた。

(2) 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:

A. 研究目的

Azathioprine (AZA) は免疫抑制剤の 1 つであり、慢性関節リウマチや潰瘍性大腸炎の治療および臓器移植後の拒絶反応を抑制する目的で使用されている。しかし、治療患者の 15-28%に骨髄抑制、肝毒性および胃腸障害等の副作用が発生し、このうち肝障害の発症は、約 2%の患者で認められている。ラットを用いた *in vivo* の検討により、AZA の肝障害性が再現されており、AZA 投与によりプロテインカルボニルやマロンジアルデヒドといった酸化ストレスマーカーの上昇が認められていることから、酸化ストレスの関与が示唆されている。

AZA は肝臓中で glutathione S-transferase (GSH-ST) により、6-mercaptoprine (6-MP) へと速やかに変換された後、3 つの経路により代謝を受ける。1 つは thiopurine methyltransferase (TPMT) により 6-MP がメチル化され、薬理活性をもたない 6-methyl mercaptopurine (6-methyl-MP) に代謝される経路である。2 つ目は hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HGPRT) により thioinosine monophosphate (TIMP) へと代謝される経路であり、TIMP がさらに代謝を受け、methyl-thioinosine monophosphate (Methyl-TIMP) や 6-thioguanine nucleotide

(6-TGN) に変換されることで薬理作用を発揮する。そして、3 つ目は xanthine oxidase (XO) により不活性な代謝物である 6-thiouric acid (6-TU) に代謝される経路であり、6-TU は尿中へと排泄されることから、これは解毒経路であると考えられる。しかし、この XO に触媒される反応では ROS の産生が伴い、この経路によって産生される ROS が酸化ストレスの原因となることが示唆されている。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が AZA 誘導性肝障害に寄与することが示唆されるが、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 誘導性肝障害の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。

B. 実験方法

B-1 マウスへのアザチオプリン投与

Balb/cCrSlc (Balb/c) マウス (雌性、8 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育後、AZA を 100、200 および 300 mg/kg (in corn oil) で単回経口投与または 2-7 日間反復経口投与した。投与 6、24、48 および 72 時間後に採血または肝臓を採取した。

B-2 GSH および GSH disulfide (GSSG) 含量測定

Tietze (1969) の方法を一部修正して、

以下の方法により肝臓中総 GSH 含量を測定した。マウス肝臓 100 mg に対して 5% スルホサリチル酸 1 mL を加え、ガラスホモジナイザーでホモジェナイズし、1.5 mL チューブに分注後、6,500 g、4°C で 10 分間遠心後、上清を新しいチューブに移した。96 well プレートの各ウェルに 0.3 mM β -NADPH 溶液 140 μ L と 4.8 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid 溶液を 25 μ L 加え、5 分間室温で反応させ、上記操作で得られた肝ホモジェナイズ溶液の上清を 20 μ L ずつ加えた。GSH reductase 溶液 (4 Unit/mL) 25 μ L を加え、5 分後 405 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定した。GSSG を測定するには、肝ホモジェナイズ溶液の上清 100 μ L にピニルピリジンを 2 μ L を加え、室温で 1 時間放置後に同様の操作を行った。

B-3 プロテインカルボニル含量測定

肝臓中プロテインカルボニル含量は Protein Carbonyl ELISA kit のマニュアルに従い、以下の方法で測定した。2-4 で調整した肝ホモジェネートを 4 mg/mL となるように精製水で希釈し、サンプル 50 μ L に対して、dinitrophenylhydrazine (DNP) 溶液を 200 μ L 加え 45 分間室温で放置した。その後、5 μ L を 1 mL の緩衝液中に移すことで反応を停止し、このうち 200 μ L を ELISA 用 96 well プレートに移し、4°C で over night 静置した。Buffer で 5 回洗浄後水分を除き、blocking solution を 1 well あ

たり 250 μ L 加え 30 分間室温で静置した。Buffer で 5 回洗浄後水分を除き、anti-DNP biotin antibody を 1 well あたり 200 μ L 加え 1 時間 37°C で静置した。Buffer で 5 回洗浄後水分を除き、streptavidin HRP を 1 well あたり 200 μ L 加え 1 時間室温で静置した。Buffer で 5 回洗浄後水分を除き、Chromatin reagent を 1 well あたり 200 μ L 加え 20 分間室温で静置した。Stopping reagent を 100 μ L 加え反応を停止させた後、450 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定した。

B-4 SOD 活性測定

肝臓中 SOD 活性は Superoxide Dismutase Assay kit のマニュアルに従い、以下の方法で測定した。2-4 で調整した肝ホモジェネートを 100 μ g/mL となるように精製水で希釈後、96 well プレートに希釈サンプル 10 μ L および tetrazolium salt 溶液 200 μ L を添加した。Xanthine oxidase 溶液 20 μ L を加えることで反応を開始させ、20 分後に 450 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定した。

B-5 抗酸化剤投与

Balb/cCrSlc マウスに 3、4 および 5 日間 AZA (200 mg/kg, *p.o.*) と tempol (200 mg/kg in sterilize PBS, *i.p.*) の同時投与を行った。AZA および tempol 最終投与 24 時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した

B-6 XO 阻害剤投与

Balb/cCrSlc マウスに、3 日間 AZA (200

mg/kg, *p.o.*) と allopurinol (30 mg/kg in sterilize PBS, *i.p.*) の同時投与を行った。AZA および allopurinol 最終投与 0、1、3 および 6 時間後に尾静脈より、24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-7 TLR4 アンタゴニスト投与

Balb/cCrSlc マウスに、5 日間 AZA (200 mg/kg, *p.o.*) を投与し、5 日目に AZA (200 mg/kg, *p.o.*) と eritoran (50 µg/mouse in 0.2 mL sterile saline, *i.v.*) の同時投与を行った。AZA および eritoran 投与 24 時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-8 統計解析

2 群間における統計学的解析は Student's t-test により、多群間における統計学的解析は ANOVA および Tukey 検定により解析し、 $P < 0.05$ のとき、統計学的に有意であると判断した。本検討における動物実験については、全て金沢大学動物実験指針に従って行った。

C. 実験結果

C-1 AZA 投与による肝障害モデルマウス作製

AZA 投与による血漿中生化学パラメータ値の変動を検討した。血漿中 ALT および AST 値は、AZA 200 mg/kg 投与 3 日間で溶媒 (corn oil) 投与および non-treated (NT) と比較し有意な上昇が認められ、5 日間および 6 日間ではさらに顕著な上昇が認められた (Fig. 2A)。Corn oil 投与にお

いて ALT および AST 値の上昇は認められなかった。AZA 投与時の投与量依存性を検討したところ、AZA 投与量 100、200 および 300 mg/kg において ALT 値の最高値はそれぞれ約 1900、2500 および 2000 (U/l) であった。AZA 200 mg/kg の 6 日間投与後の ALT 値の時間推移を検討したところ、最終投与 24 時間後において最も高い値を示した。さらに、肝切片の H&E 染色による組織評価を行ったところ、AZA 投与マウスの肝臓において、肝小葉構造の変形、肝細胞の肥大および凝固性壊死が認められた。

C-2 グルタチオンの検討

GSH は反応性代謝物や ROS の解毒に重要な役割をもつことが知られている。また、GSH は酸化ストレスに反応して酸化型である GSSG に変換されるため、それぞれの比をとった GSH/GSSG の値は酸化ストレスの指標として用いられる。AZA 投与における肝臓中 GSH は、corn oil 投与や NT と比較し、1、3、5 および 6 日間投与後において有意な減少が認められた。一方、肝臓中 GSSG は AZA 投与において、corn oil 投与や NT と比較し 3、5 および 6 日間投与後において有意な上昇が認められた。さらに、GSH/GSSG は GSH と同様に、AZA 投与において corn oil 投与や NT と比較し 1、3、5 および 6 日間投与後において有意な減少が認められた。

C-3 酸化ストレスマーカーの測定

酸化ストレスの関与をさらに検討するため、酸化ストレスマーカーとして用いられるプロテインカルボニルとSOD活性の値を測定した。肝臓中プロテインカルボニルはAZA投与により経日的な上昇傾向が見られ、6日間投与後においてcorn oil投与と比較し有意な上昇が認められた。一方、肝臓中のSOD活性はAZA投与により経日的な減少傾向が見られ、5日間および6日間投与後において、corn oil投与やNTと比較し有意な減少が認められた。

C-4 抗酸化剤併用投与によるAZA誘導性肝障害への影響

抗酸化剤であるtempolをAZAと同時に投与し、ALT値および肝臓中SOD活性を測定した。血漿中ALT値はAZA単独投与と比較しtempol併用投与において、4および5日間投与後に有意な減少が認められた。また、5日間AZA投与後におけるSOD活性の減少は、tempolの併用投与により有意に抑制された。

C-5 XO阻害剤併用投与によるAZA誘導性肝障害への影響

AZA誘導性肝障害におけるXOの関与を検討するため、AZAとXO阻害剤であるallopurinolの併用投与を行い、血漿中ALT値を測定した。AZA単独投与と比較しallopurinol併用投与において、血漿中ALT値に有意な減少が認められた。

C-6 AZA誘導性肝障害におけるROSの関与

AZA誘導性肝障害におけるROSの関与を検討するため、AZAとXO阻害剤であるallopurinolの併用投与を行い、血漿中ALT値およびROSの一種である H_2O_2 濃度を測定した。3日間AZA単独またはallopurinol併用投与後の血漿中 H_2O_2 濃度を経時的に測定したところ、allopurinol併用投与において血漿中 H_2O_2 濃度の低下傾向が見られ、最終投与1時間後において有意な低下が認められた。

C-7 自然免疫系およびDAMPs関連遺伝子のmRNA変動解析

TLR2、TLR4、RAGE、S100A8およびS100A9の肝臓中mRNA発現を測定したところ、AZA投与においてcorn oil投与やNTと比較し、TLR2は3、5および6日間投与後に、TLR4は5および6日間投与後に、RAGE、S100A8およびS100A9は5日間投与後に有意な上昇が認められた。

C-8 血漿中HMGB1タンパク質量の測定

HMGB1は活性化された免疫細胞から能動的に放出されるものと、ネクロシスを起こした細胞から受動的に放出されるものがあるため、肝臓中mRNA発現と血漿中タンパク質濃度に相関が得られな

い場合がある。そのため、ELISA により血漿中 HMGB1 タンパク質濃度を測定した。その結果、AZA 投与において corn oil 投与や NT と比較し、6 日間投与後に有意な上昇が認められた。

C-9 TLR4 アンタゴニスト併用投与による AZA 誘導性肝障害への影響

TLR4 シグナル経路が AZA 誘導性肝障害に関与するか検討するために、TLR4 のアンタゴニストである eritoran の併用投与を行い、血漿中 ALT 値の測定を行った。その結果、AZA 単独投与と比較し eritoran 併用投与において、血漿中 ALT 値に有意な減少が認められた。

C-10 炎症関連遺伝子、サイトカインおよびケモカインの mRNA 変動解析

AZA 誘導性肝障害に獲得免疫系や炎症反応に関与するか検討するため、T 細胞の転写関連因子として T-bet、GATA3 および ROR- γ t を、炎症性サイトカインおよびケモカインとして IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、NALP3 および MIP-2 の肝臓中 mRNA 発現を測定した。T 細胞の転写関連因子の肝臓中 mRNA 発現は AZA 投与において corn oil 投与や NT と比較し、T-bet は 5 日間投与後において有意な上昇が認められた。一方、GATA3、ROR- γ t の肝臓中 mRNA 発現変動は認められなかった。

炎症性サイトカインおよびケモカインの肝臓中 mRNA 発現は AZA 投与におい

て corn oil 投与や NT と比較し、NALP3 は 5 日間投与後に、TNF- α 、IL-1 β および MIP-2 は、5 および 6 日間投与後において有意な上昇が認められた。一方、IFN- γ の肝臓中 mRNA 発現変動は認められなかった。

C-11 AZA 誘導性肝障害における免疫細胞浸潤

AZA 誘導性肝障害に肝臓への好中球の浸潤に関与するか検討するため、抗 MPO 抗体による肝切片の免疫染色を行った。その結果、6 日間 AZA 投与において、MPO 陽性細胞が肝実質細胞に認められたが、corn oil 投与においては認められた。

D. 考察

免疫抑制剤として臨床で使用されている AZA も頻度は低いが、肝障害の発症が報告されている。肝障害発症の原因として酸化ストレスが関与することが示唆されているが、臨床報告においては発熱や発疹等の症状も認められていることから、免疫系および炎症反応の関与も疑われている。しかし、AZA の肝毒性と免疫系の関連を示す報告は未だされていない。AZA 誘導性肝障害の動物モデルは、ラットへの AZA (25 mg/kg) の 4 週間反復経口投与や、マウスへの AZA (50 mg/kg) の単回腹腔内投与により作製した報告がある。しかし、いずれのモデルにおいても ALT 値の上昇はコントロールの 2.5 倍以下で

あり、肝組織においてもごく一部でネクローシスが認められる程度の軽微な肝障害であることから、メカニズム解析を行う動物モデルとしては不十分であることが考えられる。そこで、本研究ではより顕著な肝障害が認められる AZA 誘導性肝障害モデルマウスを確立し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

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

AZA 200 mg/kg の 7 日間投与により、約 50% のマウスの死亡が認められたことから、反復投与期間は 6 日間までとした。

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

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

炎症反応に関連するサイトカインおよびケモカインである TNF- α や IL-1 β mRNA においては、有意な発現上昇が認

められた。また、抗 MPO 抗体による免疫染色により好中球の浸潤が確認されたことから、AZA 誘導性肝障害に炎症反応と好中球の浸潤が関与することが明らかとなった。Th 細胞が肝障害に関与していないことが示唆されたため、この炎症反応は DAMPs や自然免疫系の活性化により誘導されたと思われる。

本研究においては、酸化ストレスおよび免疫反応の両側面から AZA 誘導性肝障害のメカニズム解析を行ったが、他の因子がさらに複雑に関与している可能性も考えられる。APAP 誘導性肝障害においては、シトクロム P450 による代謝で生成される APAP の代謝物が、ミトコンドリアタンパク質に共有結合することで肝障害が惹起される。臨床において、AZA の代謝物である 6-MP のメチル化を担う TPMT が高く発現している患者において、AZA

(3) ラットにおける代謝を考慮したカルバマゼピン誘導性肝障害のメカニズム解析

A. 研究目的

薬物性肝障害の原因薬物は多岐にわたるが、その中でも抗てんかん薬である carbamazepine (CBZ) は、服用する患者の約 20%において副作用が認められ、そのうち 10 - 15%が肝臓に関連したものである。CBZ による肝障害および肝機能障害は我が国において 2005 - 2011 年までの間で 215 例報告されている。CBZ 誘導性肝障

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

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

害は「特異体質性」に分類され、肝障害の発症に関して性差は認められず、1 日の服用量に依存しない。また、CBZ 誘導性肝障害は予後不良（死亡や肝移植例）のものと予後良好なもの 2 つが存在する。前者は小児に多く治療期間が 30 週間程度の時期に生じ、後者は青年から高齢者に多く治療期間が 4 週間程度で生じる。前者は肝細胞のネクロシスや炎症を伴うが、後者は hypersensitivity の症状や好酸球の増多が認められる。しかし、CBZ の構造類似体であり同効薬である oxcarbazepine (OXC) は CBZ と比較して

副作用が少なく、hypersensitivityは生じるものの発症率は10%以下と低く、肝障害の報告数も少ない。

ヒトにおいてCBZはCYP3A4により、主に安定で薬理活性を有するCBZ-10, 11-epoxideへ代謝され、その後 *trans*-10,11-dihydroxy CBZへ代謝される (Fig. 1)。CBZはCYP3A4を自己誘導するため、反復投与によりCBZの血漿中濃度が減少することがNovartis社の添付文書に記載されている。ヒトにおけるCBZの投与量は最初、1日200 - 400 mg程度から始まるが、至適効果が得られるまで (通常1日600 mg/kg) 徐々に増量し、症状によっては最大1日1,200 mgまで増量する。また、CBZから細胞障害性を有する反応性代謝物が産生され、GSHやNACにより解毒されることが報告されている以前、当研究室ではマウスを用いてCBZ誘導性肝障害モデルを作製し、炎症と代謝の両面からメカニズムの検討を行った。その結果、炎症および免疫学的因子が肝障害の発症に関与することを明らかにした。また肝障害時では肝臓中GSH量が減少することやCyp3a阻害薬である troleandomycin (TAO) や ketoconazole (KTZ) を併用投与すると肝障害が増悪し、CBZの代謝物である3-hydroxy CBZの血漿中濃度が上昇することを報告した。しかし、3-hydroxy CBZがCBZ誘導性肝障害発症に関与しているかは不明である。本研究では、前臨床開発で最も使用頻度

が高く、同一個体からの経時的な採血が可能な実験動物であるラットを用いてCBZ誘導性肝障害モデルを作製し、肝障害と代謝物の血漿中濃度推移から肝障害発症に関与する代謝物および代謝酵素を明らかにすることを目的とした。

B. 実験方法

B-1. CBZ、OXCおよびBSOの投与方法

CBZ単回投与の検討では、F344ラット (雄性、9週齢) を3日間馴化飼育した後、CBZ 400 または 600 mg/kg (10 mL/kg in corn oil) を経口投与し、CBZ投与2時間前にGSH合成阻害剤であるBSO (10 mL/kg in saline) を腹腔内投与した。CBZ投与24時間後に解剖して下行大静脈より採血を行った。CBZ反復投与の検討では、F344ラットを3日間馴化飼育した後、CBZ 400 mg/kg を4日間、1日1回経口投与し、5日目にCBZ 400、600 または 800 mg/kg を経口投与した。また、5日目のCBZ投与2時間前にBSOを腹腔内投与した。OXC反復投与の検討では、F344ラットを3日間馴化飼育した後、OXC 400 mg/kg (10 mL/kg in corn oil) を4日間、1日1回経口投与し、5日目にOXC 600 mg/kg を経口投与した。また、5日目のOXC投与2時間前にBSOを腹腔内投与した。CBZとOXC投与の検討共に最終投与から、0、1、3、6、12、24、48および72時間後に尾静脈または頸静脈より採血を行い、最終採血時 (CBZ最終投与から24または72時間後) に解剖して下行大静脈

より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-2. CBZ 投与ラットに対する CYP3A 阻害薬の投与

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

B-3. CBZ 投与ラットに対する CYP3A 誘導薬の投与

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

B-4. 統計解析

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

C 実験結果

C-1. CBZ 単回投与および最終投与量の検討

単回投与の検討では、BSO 非併用投与群および併用投与群において、CBZ 400 mg/kg および 600 mg/kg のいずれの投与量においても ALT 値の有意な上昇は認められなかった。また、反復投与の検討においても、5 日目の CBZ 投与量が 400 mg/kg の群では ALT 値の上昇は認められなかった。しかし、5 日目の CBZ 投与量が 600 または 800 mg/kg 群では ALT 値の顕著な上昇が認められた (600 mg/kg 投与群: $ALT = 9,986 \pm 5,627$ U/l ($n = 6$), 800 mg/kg 投与群: $ALT = 20,700 \pm 4,798$ U/l ($n = 3$))。以上の結果から、CBZ を 400 mg/kg で 4 日間反復投与後に、CBZ を 600 または 800 mg/kg で投与かつ BSO を併用投与する条件により CBZ 誘導性肝障害モデルラットが作製可能であることが示された。しかし、CBZ 最終投与 24 時間後までに死亡する個体が存在し、CBZ 最終投与量 600 mg/kg 群と 800 mg/kg 群における死亡個体数はそれぞれ 7 匹中 1 匹と 8 匹中 5 匹であった。このように、CBZ 最終投与量 800 mg/kg 群では死亡率が高かったため、以降の検討では CBZ の最終投与量を 600 mg/kg で行うこととした。また、CBZ の最終投与量 600 mg/kg 群においても肝障害の程度に大きな個体差が認められ、CBZ 最終投与 24 時間後に ALT 値が顕著に上昇する個体 (high responder) ($ALT > 2,000$ U/l) とほとんど変動しない個体

(low responder) に分類された。

C-2. 肝組織染色

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

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

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

C-4. CBZ およびその代謝物の血漿中濃度推移

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

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

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

大を示す CBZ 最終投与 24 時間後よりも早く血漿中濃度が最大を示した。

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

や高い血漿中濃度を示す傾向が認められ

C-5. CYP3A2 タンパク質量と CYP3A 酵素活性の測定

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

C-6. CBZ 誘導性肝障害に対する CYP3A 阻害薬の影響

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

C-7. CBZ 単回投与における DEX 反復投与の影響

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

た。

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

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

た、DEX 反復投与のみにより ALT 値の上昇が認められたが、時間依存的な ALT 値の上昇は認められなかった。一方、CBZ 投与前に DEX を反復投与した群では CBZ 投与前と比較して、CBZ 投与 3 時間後から ALT 値の有意な上昇が認められ、12 時間後まで上昇し続けた。また、今までの検討で用いてきた CBZ 誘導性肝障害を惹起させる投与条件では肝障害発症の

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

D. 考察

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

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

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

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

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

マウスを用いた検討において、Cyp3a阻害薬であるTAOまたはKTZを併用投与するとCBZによる肝障害の増悪が認められている。しかし、今回のラットを用いた検討ではCBZによる肝障害がTAOまたはKTZの併用投与により認められなくなった。ヒトにおいてはCYP3A4以外

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

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

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

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

A. 研究目的

APAP と同様に CYP による代謝的活性化を受け、肝障害を示す薬物として吸入型全身麻酔薬である Halothane (HAL) が挙げられる。HAL は軽度なもの、または無症候性の症例を含めると 20% 以上の患者において血清中トランスアミナーゼの上昇が起こること、さらに約 10,000 人に 1 人の割合で劇症化が生じることが報告されている。HAL 誘導性肝障害の発症メカニズムとして、肝臓で主に CYP2E1 により代謝され、生成する活性代謝物のトリフルオロアセチルラジカルが生体内高分子と共有結合し、トリフルオロアセチル化タンパク質 (TFA-adduct) を生成す

ることが知られている。HAL による肝障害患者の血清からは抗 TFA 抗体および抗 CYP2E1 抗体が検出されることが報告されている。しかし、TFA-adduct 生成は肝障害を引き起こさない実験動物においても認められており、adduct 生成以降に存在するメカニズムが肝障害の原因として重要であることが示唆されている。近年の報告において、HAL 誘導性肝障害発症に好中球、NKT 細胞、NK 細胞および好酸球などの免疫細胞に加え、Th17 細胞が主に産生する IL-17 などの様々な炎症性サイトカインの活性化が関与することが明らかにされている。

近年、miRNA と毒性との関連についての研究が盛んに行われている。miRNAs が血中に存在することが Mitchell ら (2008) により初めて報告された後、血中 miRNA が癌や肝障害などの様々な疾患のバイオマーカーとしての可能性を持つ研究が急速に進展してきた。さらに、組織中での miRNA の発現変動は標的遺伝子の発現の変化をもたらし、様々な疾患の発症や進行に関与することが報告されている。このため、疾患における組織中での miRNA の発現変動も注目を集めている。また、環境ストレス、化学物質、毒物および医薬品などの外来異物に反応して組織中での miRNA の発現プロファイルが変化することが示唆されている。肝障害の例としては、四塩化炭素 (CCl₄) 誘導性肝線維症モデルマウスの肝臓中

miR-29 の発現が低下することを示し、miR-29 が線維化に重要な TGF- β (transforming growth factor- β) やコラーゲンの発現調節に寄与していることを報告している。また、DILI において肝臓中の miRNA 発現変動に着目した研究も報告されている。ラットに APAP または CCl₄ をそれぞれ単回投与し、24 時間後に共通して肝臓中で発現変動した miRNA の中で、チオレドキシシンレダクターゼを含む酸化ストレス関連遺伝子を制御することが推定されている miR-298 および miR-370 が発現低下することを示している。これらの 2 つの miRNA の発現低下は肝障害発症よりも早い時間において認められたことから、毒性発現前の早期段階において miRNA が発現変動すると考えられている。当研究室においても、急性肝障害である肝細胞障害型および胆汁鬱滞型、慢性肝障害である脂肪肝、脂肪性肝炎および肝線維症の各ラットモデルにおいて、血中 miRNA がそれぞれの病型に応じた特異的な発現プロファイルを示すことを明らかにした。さらに、肝障害の血中マーカーである ALT よりも早期かつ鋭敏に miR-122 が血中で発現上昇することから、血中 miRNA のバイオマーカーとしての有用性を示している。しかし、組織中の miRNA の発現変動と標的遺伝子の発現の変化の関係は十分には理解されておらず、他の薬物による肝障害における miRNA の役割や、肝障害発症前の早期段

階での miRNA の発現変動および免疫や炎症との関連性に焦点を当てた研究はこれまでに行われていない。

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

B 実験方法

B-1 BALB/c マウスへの薬物投与

BALB/c マウス (雌性、8 週齢 16-21 g; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) に溶媒、HAL (30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) または ISO (30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) を 2 mL 投与した。HAL 投与 0.5、1、3、6、12 および 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。ISO 投与 1 および 3 時間後に下行大静脈より採血を行った後、

肝臓を採取した。各群 4 匹のマウスを使用した。

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

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

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

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

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

B-4 統計解析

2 群間における統計学的評価は Student's t-test により、多群間における統計学的評価は ANOVA および Tukey 検定により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

C. 実験結果

C-1 HAL 誘導性肝障害モデルマウス

の作製および評価

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

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

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

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

C-3 発現が変動した miRNA の推定標的遺伝子の網羅的な機能解析

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

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

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

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

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

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

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

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

C-6 HAL および ISO 特異的に発現変動した miRNA の既知の標的遺伝子の解析

HAL または ISO 特異的に発現変動した miRNA の標的遺伝子に関して、発現調節に関与していることが報告されている遺伝子を miRTarBase

(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) により探索した。なお、miRNA*については発現

次に、これらの遺伝子が免疫および炎症を介して肝障害の発症に関与しているかについて MeSH を用いて解析した。MeSH を用いてキーワードによる抽出を行った遺伝子との比較により解析した。免疫、炎症および肝障害に関連する apoptosis、cell adhesion、glutathione、hepatitis、immunity、innate、inflammation、liver diseases、necrosis、oxidative stress の 9

動した miRNA を用いた。なお、予測された経路のうち、肝臓以外でのみ起こる経路を除外した。その結果、

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

調節に関する情報が少ないため、検索することが出来なかった。HAL 特異的に発現変動した miRNA の中で、HAL 投与 1 時間後に発現が上昇する miRNA は 1 個、発現が低下する miRNA は 46 個、HAL 投与 3 時間後に発現が上昇する miRNA は 9 個、発現が低下する miRNA は 2 個の miRNA が miRTarBase に登録されていた

つのキーワードから関連遺伝子を抽出した。5 つ以上のキーワードと共通した遺伝子を網掛けで示した。これらの遺伝子が免疫および炎症との関連性の高い遺伝子であると考えられた。条件のどちらも満たす miRNA として、下線で示した miR-106b、miR-200c、miR-21、miR-29b が選出された。これら 4 つの miRNA は HAL 投与 1 時間後に発現が低下する

miRNA であった。また、HAL 投与 3 時間後においては、条件のどちらも満たす miRNA は認められなかった。miR-125b-5p は HAL 投与 1 時間後においても発現が低下する miRNA であった。従って、これら

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 が選出出来た。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

C-8 miRNA の標的遺伝子の mRNA およびタンパク質発現量の測定

HAL 誘導性肝障害において、HAL 投与後早期に発現変動した miRNA がその標的遺伝子の発現制御に関与しているかを明らかにすることを目的とした。その結果、FasL、MAPK14、TNF α および STAT3 タンパク発現量を Western blotting 法にて測定した。各時間における溶媒投与群と比較して、HAL 投与 24 時間後において FasL タンパク発現量の有意な増加が認められた HAL 誘導性肝障害にお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

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。

により測定した。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。

進され、STAT3 の活性化によって IL-17 の産生を担う Th17 細胞への分化が促進されている可能性が示された。

C-9 miR-93 発現変動の経時的推移

STAT3 が miR-106b の標的であることが報告され、HAL 肝障害モデルにおいても、miR-106b の発現量低下による STAT3 の発現増加が示唆された。そこで、STAT3 を制御する他の miRNA について探索した。HAL 投与 0.5 および 24 時間後において溶媒投与群と比較して HAL 投与群において有意な発現量の低下が認められた。HAL 肝障害モデルにおいて miR-106b だけでなく、miR-93 も Stat3 の制御に関与していることが

示唆された。

D. 考察

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

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

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

HAL 投与による miR-106b の発現低下、それに続く STAT3 発現量の増加を示したため、これまでに報告されている IL-17 の産生を STAT3 が担っているかを、P-STAT3 を測定することで検証した。そ

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

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

今回の検討において同定した 5 個の miRNA のうち、miR-29b や miR-200c はそ

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

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 CCl₄ 誘導性肝障害モデルラットにおいて肝障害時に低下する miR-298 および miR-370 が、肝障害

よりも早期に発現低下すること

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

E.健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

F-1. 著書

- 1) Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.
MicroRNA-Regulation of P450 and
Pharmacogenetics in press. 「Handbook
Pharmacogenomics and Straified
Medicines」 Sandosh Padmanabhan Ed.
Elsevier, Watham (2014) in press.
- 2) 横井 毅. 薬物代謝反応・代謝酵素の
多様性と薬物相互作用の予測
p198-204. 「*In vitro* 毒性・動態評価の
最前線」小島肇監修、シーエムシー出
版 (2013).

F- 2 .和文総説

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

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

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

F- 3 .英文総説

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

F- 4 .英文原著論文

- 1) Azusa Yano, Shingo Oda, Tatsuki
Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi
Yokoi. Development of a cell-based
assay system considering drug
metabolism and immune- and
inflammatory-related factors for the risk
assessment of drug-induced liver injury.
Txicol. 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 adovirus. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **28**: 125-131 (2013).

F-5.招待講演（国内学会）

- 1) 横井 毅 . 薬物性肝障害の動物モデルの作出と発症メカニズムの解析 . シンポジウム「特異体質性薬物毒性の研究最前線」日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 30 日 熊本市青年会館ホール、熊本
- 2) 中島美紀 : 薬による microRNA の発現変動と薬効・副作用予測 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28-30 シンポジウム 熊本
- 3) 横井 毅 . 薬の副作用発現の個人差と創薬 . 名古屋大学 予防早期医療創成センター第 4 回ワークショップ 2014 年 1 月 29 日 名古屋大学野依記念学術交流館、名古屋
- 4) 横井 毅 . 転写因子のマイクロ RNA による発現制御機構 . 近畿大学薬学部大

学院特別講演、2013 年 12 月 7 日 近畿大学 39 号館講義室、大阪

- 5) 横井 毅 . 薬物性肝障害における免疫学的因子の関与 シンポジウム「薬疹の理解に必要な免疫学」第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2013 年 11 月 29-31 日 ホテル日航金沢、金沢
- 6) 横井 毅 . 薬物動態・毒性研究の創薬における重要性 2013 年 11 月 21 日 岐阜薬科大学特別講義 大学院講義室、岐阜薬科大学、岐阜
- 7) 横井 毅 . 薬が効くヒトと効かないヒト-遺伝子多型と薬物相互作用- 第 9 回名古屋大学ホームカミングデイ公開講演会 2013 年 10 月 19 日 ES ホール、名古屋大、名古屋
- 8) 横井 毅 . Biomarkers for Drug-induced Liver Injury. Symposium at 28th Japanese Society for the study of Xenobiotics (JSSX) 2013 年 10 月 9-11 日、船堀タワーホール、Tokyo
- 9) 中島美紀 . New knowledge of the microRNA-mediated regulation of drug metabolism. Symposium at 28th Japanese Society for the study of Xenobiotics (JSSX) 2013 年 10 月 9-11 日、船堀タワーホール、Tokyo
- 10) 横井 毅 . ミクロゾームの生化学 . 金

沢大学医学部 (特別講義) 2013 年 10 月 4 日、金沢大学医学部第 1 講義室、金沢.

11) 横井 毅. 薬効と毒性のバイオマーカーとしてのマイクロ RNA 第 50 回薬剤学懇談会研究討論会 (シンポジウム) 2013 年 6 月 26-28 日、ホテル シャトレーゼガトーキングダムサッポロ、札幌

12) 横井 毅. 生体と薬物「薬物代謝酵素」福井大学医学部 (特別講義) 2013 年 6 月 6 日、福井大学医学部第 3 講義室、福井

13) 横井 毅、マイクロ RNA による薬物代謝酵素の活性変動と毒性バイオマーカーとしての可能性、(シンポジウム) 第 30 回日本 TDM 学会学術大会、2013 年 5 月 25-26 日、市民会館崇城大学ホール、熊本

14) 横井 毅、転写因子のマイクロ RNA による発現制御機構、昭和薬科大学大学院特別講演、2013 年 5 月 16 日、昭和薬科大学講堂、町田

15) 横井 毅、安全性・有効性のバイオマーカーとしてのマイクロ RNA、第 27 回日本薬物動態学会ワークショップ、基調講演、2013 年 5 月 9-10 日、学術総合センター橋講堂、東京

F-6 . 一般講演【国際・国外学会】

1. Tsuyoshi Yokoi, Eita Sasaki, Atsushi

Iwamura, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Toshiyuki Kume.

Identification of a P450-mediated hepatotoxicity-associated glutathione-conjugate of phenytoin in phenytoin-induced liver injury in mice. 53rd Annual Meeting and ToxExpo. March 23-27, 2014 Phoenix, USA

2. Eita Sasaki, 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. 53rd Annual Meeting and ToxExpo. March 23-27, 2014 Phoenix, USA

3. Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Epigenetic regulation is a crucial factor for the tissue-specific expression of human UGT1A10. 53rd Annual Meeting and ToxExpo. March 23-27, 2014 Phoenix, USA

F-7 . 一般講演【国内学会】

1. 黒川尚也、深見達基、中島美紀：ジルチアゼム加水分解酵素活性の種差の原因となる酵素の同定 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28-30 ポスター 熊本

2. 古川陽一、織田進吾、加藤有紀子、深見達基、中島美紀：ヒトおよびラッ

- トにおけるテルミサルタングルクロン酸抱合酵素活性の評価 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28-30
ポスター 熊本
3. 加藤有紀子、織田進吾、畠山雅彦、岡崎道貴子、深見達基、横井 毅、中島美紀：ヒト UGT1A10 モノクローナル抗体の作製とその評価 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28-30
ポスター 熊本
4. 深見達基、清水麻衣、渡邊旭延、中島彰紀、中島美紀、横井 毅：ヒト新規薬物加水分解酵素アリルアセタミドデアセチラーゼの基質特異性について 日本薬学会北陸支部第 125 回例会 口頭 2013.11.17 金沢
5. 伊藤祐介、深見達基、中島美紀、横井毅：ヒトにおけるプロベネシドアシルグルクロニド生成と分解を担う酵素の同定 日本薬学会北陸支部第 125 回例会 口頭 2013.11.17 金沢
6. 岡崎道貴子、畠山雅彦、織田進吾、中島美紀：薬物代謝酵素ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)アイソザイムに対する特異的マウスモノクローナル抗体の作製 第 41 回静岡実験動物研究会 口頭 2013.10.18 静岡
7. Yukiko Kato, Takeshi Izukawa, Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Moshe Finel, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Human UGT2B10 in drug N-glucuronidation: substrate screening and comparison with UGT1A3 and UGT1A4. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013.10.9-11, ポスター 東京
8. Eita Sasaki, Atsushi Iwamura, Toshiyuki Kume, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. A reactive metabolite formed by P450, which is readily subjected to glutathione conjugation, would be causal for phenytoin-induced liver injury. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013.10.9-11, ポスター 東京
9. Masataka Nakano, Takuya Mohri, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Allele specific regulation of human CYP2E1 by a microRNA. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013.10.9-11, 口頭 東京
10. Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Screening of specific inhibitors for human intestinal UGT1A8 and UGT1A10. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013.10.9-11, ポスター 東京
11. 中野正隆、茂利拓也、深見達基、横井

- 毅、中島美紀：ヒト CYP2E1 3'-UTR 上の SNP が miR-570 結合性およびヒト肝における CYP2E1 発現量に与える影響 第 5 回日本 RNAi 研究会 ポスター 2013.8.29-8.31 広島
12. 小田祐輝、中島美紀、深見達基、横井毅：miR-34a によるヒト retinoid X receptor a の発現制御は肝線維化の進行の一因となる 第 5 回日本 RNAi 研究会 ポスター 2013.8.29-8.31 広島
13. 中島美紀、山浦優、辰巳直之、高木信伍、深見達基、常山幸一、田尻和人、峯村正実、横井毅：肝疾患患者の血中 microRNA プロファイルを用いた病型診断法の検討 第 40 回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
14. 辰巳直之、中島美紀、山浦優、深見達基、常山幸一、横井毅：NAFLD の進行に關与する肝臓中 microRNAs の解析：モデルラットを用いた検討 第 40 回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
15. 宮下泰志、深見達基、中島美紀、横井毅：アシルグルクロニドによる細胞毒性のメカニズム解析 第 40 回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19
- ポスター 千葉
16. 松尾研太郎、樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井毅：アザチオプリン誘導性肝障害マウスにおける発症メカニズムの解析 第 40 回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
17. 伊藤祐介、深見達基、中島美紀、横井毅：プロベネシドからのアシルグルクロニド生成とその逆反応を担うヒト薬物代謝酵素の同定 第 40 回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
18. 佐々木永太、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井毅：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 第 40 回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
19. 飯田あずみ、矢野 梓、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井毅：ラットにおける代謝を考慮したカルバマゼピン誘導性肝障害のメカニズム解析 第 40 回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

III. 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

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, Tsuyoshi 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

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	Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol	53	377- 400	2013

個別の分担報告書などは、図表が pdf で貼付けてあり、up できません。
ご了承ください。

横井 毅