

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02616

研究課題名(和文) 特異体質性薬物性肝障害の予測試験系の構築と発症バイオマーカーの探索評価研究

研究課題名(英文) Establishment of a predictive test system for idiosyncratic drug-induced liver injury and study for evaluation of onset biomarkers

研究代表者

横井 毅 (Yokoi, Tsuyoshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70135226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬物性肝障害の予測研究は、発症に用量依存性が無く、個体差が極めて大きな特異体質性(idiosyncratic)に分類されるDILIの発症予測系を構築することが最終目的である。3年間の研究期間において、メチマゾール、カルバマゼピン、エナラプリル、ファシグリファムの肝障害モデル動物を作成し、その発症メカニズムを論文報告した。早期血漿中のバイオマーカーとしてのmicroRNA(miRNA)をラット肝障害モデルを用いて、NGSで検討した結果、肝細胞障害性、胆汁うっ滞性と脂肪肝の病態を分別できる血漿miRNAを提案できた。さらにこれらの情報をin vitro細胞試験系に適用した報告を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新薬が市場から撤退する理由の約30%は薬物性肝障害の発症であり、患者や製薬会社のみならず社会にとっても大きな損失である。本研究では、研究代表者らが最近個々の臨床での肝障害発症被疑薬で報告している反応性代謝物の生成反応と免疫や炎症因子の関与を考慮した非臨床肝障害予測試験系を更に発展させ、新規化合物の細胞レベルおよび実験動物レベルでの実践的で統括的な肝障害予測試験系を提案・評価することを目的とした。その結果、多くの代表的な臨床肝障害被疑薬の動物モデルと発症機序を明らかにできたことより、創薬における非臨床研究に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The final purpose of drug-induced liver injury (DILI) prediction study is to establish a DILI prediction test system that is classified as idiosyncratic DILI, which has no significant dose-dependent onset and very large individual differences. During the three-year research period, we established a model animal for liver injury with methimazole, carbamazepine, enalapril, and faciglifam, and reported the mechanism of its onset. MicroRNA (miRNA) as a biomarker in early plasma was investigated by NGS using a rat liver injury model, and as a result, a plasma miRNA capable of discriminating pathogenesis of hepatocytotoxicity, cholestasis and fatty liver was suggested. In addition, we reported that the information from in vivo animal model was applied to an in vitro cell-based test system.

研究分野：医薬品安全性学

キーワード：薬物性肝障害 肝障害予測 医薬品開発 マイクロRNA 特異体質性肝障害 バイオマーカー 動物モデル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 新薬が市販後に稀な頻度ではあるが重篤な肝障害を発症することがあり、場合によっては市場から撤退することは、製薬企業のみならず患者や社会にとって大きな損失である。2014年12月にPhase III後期で肝障害発症により撤退した糖尿病治療薬 TAK-875 は記憶に新しい。臨床使用薬全体の約40%に肝障害発症の注意が添付文書に記載されている。我々は薬物性肝障害(drug-induced liver injury, DILI)の予測試験系の構築を目指して、研究に取り組んできた。我々の研究以前には、臨床DILI被疑薬について、げっ歯類DILI動物モデルの作出は困難であると考えられており、研究報告は非常に限られており、専ら培養細胞を用いた *in vitro* の報告がなされていた。また、臨床DILI症例から統計的な予測手法の研究も行われてきたが、目立った成果は得られていない。
- (2) 我々は従来の *in vitro* 培養細胞や肝細胞を用いた検討のみでは、DILI 予測試験系は確立できないという考えに基づき、野生型マウスやラットを用いて、被験薬の体内動態を考慮した投与方法等を工夫した研究を行ってきた。その結果多くの DILI モデル動物の作出に成功し、新たな発症メカニズムを解析・報告してきた。特に、炎症・免疫因子が肝障害増悪段階に関わることを明らかにしてきた。しかし、特異体質性と称される発症頻度が低いが、重篤な肝障害の予測までには至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、創薬の非臨床研究段階で DILI 発症の可能性を高い確率で予測する手技手法を確立することを目的としている。(1) In vivo 試験系においては、これまでに DILI モデル動物が報告されていない臨床 DILI 起因薬に対して、*in vivo* 試験系の作出を検討する。様々な投与条件、バイオマーカーの適用検討を行い、適切な手法を提案する。さらに、血漿 miRNA を極めて早期の予測バイオマーカーとして、その組み合わせ等を選択する。多くの DILI 被疑薬について miRNA の適用の評価研究を行う。(2) In vitro 試験系においては、バイオマーカー指標細胞であるヒト PBMC(末梢血由来単球細胞)や HepaRG などの細胞種において網羅的な遺伝子発現変動解析を行い、最適なバイオマーカーの組み合わせを選択・評価検討する。また、我々の試験提案のストラテジーに従って、反応条件を精査し DILI リスク予測性が高い試験系を提案する。

3. 研究の方法

【*In vivo*: *in vivo* DILI スクリーニング方法の提案と評価】*In vivo* DILI スクリーニング方法を提案するために、被験薬の種類を増やして評価検討を行う。すなわち、マウスやラットの系統、性別、投与経路、投与溶媒、投与量、投与スケジュール、バイオマーカーの選択などの全てについて、一定の標準プロトコールとする。この検討には多くの動物が必要とされるが、できるだけ使用数を減らす努力をする。多くの被験薬について標準プロトコールが適用できるかを精査・評価する。

【*In vivo*: miRNA の DILI 早期バイオマーカーとしての検討】早い時期の経時的な血漿材料について、バイオマーカーとしての miRNA の変動とその適用について詳細に検討する。予め機序が明らかな *in vivo* モデルを活用し、バイオマーカーの選択・決定を効率的に進める。

【*In vivo* & *In vitro*: 血漿 miRNA の DILI 発症予測バイオマーカーとしての評価】我々が報告した全ての特異体質性 DILI 動物モデルで、血漿中 miRNA の発現変動を網羅的に評価・検討を行い、DILI およびその病型を推定できる miRNA をバイオマーカーとして詳細に明らかにする。

【*In vitro*: HepaRG 細胞の高感度化】薬物代謝酵素の活性を有する HepaRG 細胞に対するミトコンドリア毒性や酸化ストレス等による細胞障害性の指標を、DC-like 細胞から得られるバイオマーカーと組み合わせ、より高い予測性の試験系確立を目指す。

【*In vitro*: ヒト末梢血単核細胞(PBMC)の適用】ヒト PBMC は凍結製品として均一なロットが市販されるようになった。我々は凍結製品のヒト PBMC を細胞障害性試験に適用経験がある。本研究では、ヒト PBMC または精製単球を DC-like 細胞として用い、特異体質性 DILI 薬の分別検出力の評価を行う。最初にマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、ヒト PBMC に適したバイオマーカーの組み合わせの候補を選択する。被験薬の最適な暴露濃度と時間を決定する。ヒト PBMC の個体差を検討する。

4. 研究成果

引用文献として我々が研究期間中に発表した英文原著論文 16 件を主な成果として記載した。研究成果には誌面の都合上、7 件の内容を記載する。

- (1)【カルバマゼピン誘導性肝障害モデルラットにおける免疫因子を介した肝障害発症機序の解析】抗てんかん薬カルバマゼピン (CBZ) は、肝障害を引き起こすことが報告されている。非臨床試験で頻用されるラットを用いて、CBZ 誘導性肝障害発症機序を解析し、肝毒性発現解析モデルとしての有用性を検討した。雄性 F344 ラットに CBZ 400 mg/kg を 4 日間経口投与し、5 日目に CBZ 600 mg/kg を経口投与した。グルタチオン合成阻害剤である L-buthionine-(S,R)- sulfoximine (BSO) は CBZ 最終処置より 2 時間前に腹腔内投与した。また、肝臓中の Kupffer 細胞 (KC) を枯渇させる為、CBZ 最終投与 24 時間前に、gadolinium

chloride (GdCl₃) 10 mg/kg を静脈内投与した。CBZ 最終投与 3, 6 および 24 時間後に血漿および肝臓を採取し、血漿中 ALT 値測定、肝病理組織学検査、肝臓中カスパーゼ活性測定および免疫因子の mRNA 発現量を解析した。その結果、CBZ 最終投与 24 時間後に顕著な ALT 値上昇が認められ、小葉中心性の顕著な細胞壊死が認められた。肝臓中においては、炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 、および IL-6 および抗炎症性サイトカイン (IL-10) mRNA 発現量の上昇が認められた。これらの mRNA 発現量の上昇は GdCl₃ を投与することで抑えられ、同時に肝障害発症も強く抑制された。T 細胞分化マーカーの mRNA 発現上昇は認められなかった。肝障害発症に伴い肝臓中カスパーゼ 8 活性の上昇が認められたが、カスパーゼ 3 活性は低下したことから、アポトーシスは誘発されていないことが示唆された。以上より、F344 ラットにおける CBZ 誘導性肝障害発症には主に KC を介した炎症性サイトカイン分泌が関与していることが示唆され、肝障害ラットモデルは薬物による免疫学的機序を介した肝毒性発現機序の検討にも有用と考えられた。

(2) 【HepaRG 細胞および免疫・炎症関連遺伝子マーカーを用いた薬剤性肝障害リスク評価系の構築】DILI を非臨床で予測するために、肝実質細胞におけるパラメーター (細胞死、共有結合量、ミトコンドリア障害) を指標とした試験系が発案されてきたが、十分な予測性を得られておらず、新たな角度からの DILI 評価系の構築が求められている。反応性代謝物と免疫反応の活性化は DILI の発症に重要であることが示唆されている。本研究では、*in vitro* DILI 予測評価系として、薬物代謝反応を考慮し、免疫および炎症関連遺伝子発現量をマーカーとすることの有用性について検証した。96 種類の臨床使用薬 (100 μ M を上限とし、HL-60 の生存率が 70% を下回らない濃度) を HepG2 または分化 HepaRG 細胞に 24 時間処置し、その培養上清を HL-60 細胞に暴露させた。24 時間後、HL-60 細胞より total RNA を抽出し、qPCR により MCP-1, S100A9, IL-1 β , IL-8 及び TNF mRNA 発現量を測定した。各 mRNA 発現量の DILI 予測マーカーとしての有用性は ROC 曲線に基づき評価した。さらに、S100A9, IL-1 β 及び IL-8 発現量において、各々 cut-off 値以上を示す薬剤には score (+1 点) を与え、3 遺伝子における score の総和値 (immune inducible score, IIS) を算出し、その値の DILI 予測性も同様に評価した。その結果、HepaRG 培養上清を暴露させた HL-60 (HepaRG/HL-60) における IL-8 発現量の ROC-AUC は最も高値 (0.758) であり、次いで HepaRG/HL-60 における IL-1 β (AUC-ROC = 0.726) による予測性が良好であった。いずれの遺伝子においても HepaRG 培養上清を暴露させた方が HepG2 よりも AUC-ROC が高値傾向にあることから、薬物代謝を考慮することで予測性が向上することが示唆された。HepG2 と HepaRG の IIS の総和値による AUC-ROC は高値 (0.819) であり、複数のパラメーターを考慮することで DILI の予測性が向上することが明らかとなった。DILI の *in vitro* 予測試験系として、免疫および炎症関連遺伝子発現量をマーカーとした試験系の可能性を示した。

(3) 【メチマゾール誘導性肝障害ラットモデルの作成及び肝障害増悪メカニズムの解析】【背景・目的】メチマゾール (MTZ) は抗甲状腺薬として広く使用されているが、まれにヒトで肝障害を起こすと報告されている。我々は、Balb/c マウスにグルタチオン合成阻害剤 BSO を投与することで MTZ 誘導性肝障害マウスモデルを作成し、その肝障害発症には interleukin-4 や eotaxin 等 T helper 2 細胞関連の免疫因子が関与していることを以前報告した。本研究ではマウスと同様に非臨床安全性試験で使用されるラットを用いて MTZ 誘導性肝障害モデルを作成し、その肝障害増悪メカニズムの種差について検討した。雄性 F344 ラットに絶食条件下で BSO 700 mg/kg を単回腹腔内投与した後に、MTZ 20 mg/kg を単回経口投与した。また、肝臓中の Kupffer 細胞を不活化する目的で塩化ガドリニウム (GdCl₃) 10 mg/kg を MTZ 投与前 48 及び 24 時間に静脈内投与した。MTZ 投与後 6 時間に血漿及び肝臓を採材し、血漿中 ALT 及び HMGB1 測定、肝病理組織学的検査及び免疫関連因子の mRNA 発現解析を行った。その結果、MTZ 投与後 6 時間に小葉中心性の肝細胞壊死を伴った ALT 上昇がみられ、その程度はマウスでみられた肝障害と同程度であった。肝臓中では自然免疫に関連した MCP-1、や MIP-2 等の mRNA 発現量上昇がみられたが、GATA binding protein 3 や eotaxin mRNA 等の T helper 2 細胞関連免疫因子の発現変動は確認できなかった。また、この肝障害は GdCl₃ 投与で抑制されたことから、ラットの MTZ 誘導性肝障害の増悪には T helper 2 細胞関連性の免疫因子は関与しておらず、Kupffer 細胞が関与している可能性が高いと考えられた。MTZ 誘導性肝障害はマウスとラットで同程度の肝障害を引き起こすが、その増悪メカニズムは種間で異なることが示された。

(4) 【メチマゾール誘導性マウス肝障害において T helper 2 型免疫応答に關与する miRNA】メチマゾール (MTZ) は抗甲状腺薬として広く用いられ、ヒトで稀に肝障害を起こすことが知られている。我々は L-buthinin-(S,R)-sulfoximine (BSO) 投与によりグルタチオンを枯渇させた野生型マウスに MTZ を投与すると肝障害が惹起され、肝障害の発症に T helper (Th) 2 型免疫応答が關与することを明らかにした。本研究では、当該動物モデルを用いて Th2 型免疫応答に關与する miRNA について検討した。

雌性 Balb/c マウスに絶食下で BSO 700 mg/kg を腹腔内投与した 1 時間後に MTZ 25 mg/kg を経口投与し、MTZ 投与後 0、0.5、1、3 及び 6 時間で血漿及び肝臓を採材した。血漿を用い

て ALT 及び IL-4 を定量し、肝臓を用いて、miRNA 網羅的発現解析、miRNA/mRNA 発現定量及び蛋白質発現定量を実施した。

MTZ 投与後 3 時間以降で顕著な血漿中 ALT 及び IL-4 の上昇並びに肝臓における Th2 亢進型免疫因子の mRNA 発現上昇が認められ、重篤な肝障害及び Th2 型免疫応答が確認された。また、MTZ 投与後 1 時間までに肝臓で Th2 抑制型転写因子の mRNA 発現減少がみられた。Taqman array miRNA card を用いた miRNA 網羅的発現解析で障害群特異的に変動が認められた miRNA から、Th2 関連遺伝子を標的とし得る miRNA を探索した結果、miR-29b-1-5p 及び miR-449a-5p が見出された。miR-29b-1-5p は MTZ 投与 0.5 及び 1 時間で有意に発現が上昇し、miR-449a-5p は MTZ 投与後 0.5 及び 3 時間で有意に発現が上昇していた。miR-29b-1-5p 及び miR-449a-5p はそれぞれ Th2 抑制因子である SRY-related HMG-box 4 (SOX4) 及び Lymphoid enhancer factor-1 (LEF1) を標的とすることが予測され、これら転写因子の蛋白質発現は MTZ 投与後 1 時間以降で抑制されていた。これらの結果から、miR-29b-1-5p 及び miR-449a-5p は SOX4 及び LEF1 の発現を負に制御し、MTZ 誘導性肝障害における Th2 型免疫応答に重要な役割を果たしていることが示唆された。

- (5) 【Fasiglifam (TAK-875) 誘導性肝障害への炎症関連因子の関与の検討】 Fasiglifam (TAK-875) は新規 2 型糖尿病治療薬として開発が進められていたが、臨床第 3 相試験で肝臓における安全性の懸念から開発が中止された。TAK-875 は、*in vitro* において胆汁酸トランスポーター阻害及びミトコンドリア障害、ラット及びイヌ *in vivo* において血中胆汁酸濃度増加を惹起することが示されており、これらが肝障害発現に寄与することが示唆されている。他方で、同一クラス化合物との毒性の比較はなされていない。本研究では、TAK-875 誘導性肝障害マウスモデルを作成し、同一クラス化合物との比較により、肝障害発現機序を解明することを目的とした。6 週齢雌性 ICR マウスに、一晚絶食条件下において TAK-875、及び GPR40 アゴニストである AMG-837、TUG-770 を 200 mg/kg それぞれ単回腹腔内投与した。投与後 1、3、6、12 時間に採血し、24 時間に血液及び肝臓を採材した。血漿中 ALT、TB、ALP の測定、HE 染色及び MPO 免疫染色による肝臓組織学的評価、肝臓での免疫関連因子の mRNA 発現変動解析を実施した。その結果、TAK-875 により投与後 1 時間より ALT 値が 500 IU/L 程度まで有意に上昇した。一方、AMG-837、TUG-770 投与では影響が認められなかった。TB 及び ALP 値は全群において変化が認められなかった。組織学的検査により、TAK-875 投与マウスにおいてのみ、肝臓被膜下表面の壊死像を認め、壊死部位に MPO 陽性細胞の浸潤が認められた。また、Gro- と MIP-2 のケモカイン mRNA の有意な発現上昇が認められた。以上、TAK-875 による肝障害には炎症関連因子の発現上昇が関与していることが示唆された。また、その肝障害は GPR40 アゴニスト作用によるものではなく、TAK-875 に特異的であることが示された。マイクロアレイによる mRNA の網羅的解析結果も報告予定である。
- (6) 【エナラプリル誘発性肝障害マウスモデルの作出と病態の解明】エナラプリル (ELP) は ACE 阻害薬であり高血圧の治療に用いられているが、ヒトにおいて稀に肝障害を引き起こすことが知られている。ELP による肝障害の報告件数は ACE 阻害薬の中で最も多いが、肝毒性発現のメカニズムは明らかになっていない。雄性 Balb/c マウスにデキサメタゾン (DEX) の 3 日間反復投与及び ELP 投与 1 時間前に BSO の腹腔内投与を行った。DEX 最終投与 24 時間後に ELP の経口投与を行い、投与 0、3、6、24 時間後の肝臓及び血漿を採取した。結果、DEX/BSO/ELP 投与群のみで ALT の上昇が認められ、肝臓中 H₂O₂、malondialdehyde 及び血漿中 hydrogen peroxide の上昇から酸化ストレスの関与が示唆された。また、DEX/BSO/ELP 投与群で MIP-2 の発現上昇及び肝臓への myeloperoxidase 陽性細胞の浸潤が認められ、好中球の関与が示唆された。この肝障害は、抗酸化剤併用もしくは好中球枯渇によって減弱したことから、酸化ストレス及び肝臓への好中球の浸潤が ELP 誘発性肝障害の増悪に関与していることが明らかになった。ELP 誘発性肝障害モデルの作出に成功し、毒性発現のメカニズムとして酸化ストレス及び好中球の関与を明らかにした。
- (7) 【肝細胞障害、胆汁うっ滞および脂肪肝を病型別に早期予測が可能な血漿 miRNA バイオマーカー探索研究】肝細胞障害、胆汁うっ滞および脂肪肝について、早期に病型判断可能な miRNA の探索と評価を目的とした。肝障害モデル作成には 6 週齢の雄性 SD ラットを用いた。肝細胞障害モデル作成にはアセトアミノフェン (1500 mg/kg) とチオアセトアミド (100 mg/kg)、胆汁うっ滞モデルには *N*-ナフチルイソチオシアネート (150 mg/kg) と 4,4'-メチレンジアニリン (250 mg/kg)、脂肪肝モデルには四塩化炭素 (300 mg/kg) とデキサメタゾン (15 mg/kg) をそれぞれラットに経口投与した。経時的に血液を採取し、血漿から RNA を抽出後、次世代シーケンサーを用いて血漿中 miRNA を網羅的に解析した。ピーク時点や障害の程度が異なる病型間での miRNA 発現を比較するために、時系列的 miRNA プロファイルのクラスターパターンから肝障害の初期、中期、後期を定義し、各時点において増加または減少した miRNA を、ベン図を用いて病型別、または網羅的に解析した。病型別肝障害モデルにおいて、ALT や AST などの生化学値や、組織学的に変化の認められない障害初期の段階から変動する miRNA を複数同定することができた。その中から全病型に共通して上昇する miR-122 および、病型特異的 miRNA に着目し、RT-PCR による検証実験を行なった。その結果、肝細胞障害か

らは miR-1-3p と let-7b-5p、胆汁うっ滞からは miR-218a-5p、脂肪肝からは miR-320-3p が病型初期に上昇し、全病型における miR-122 の経時的増加も確認された。本研究結果から肝障害の病型別、早期予測における miRNA の有用性が示された。

<引用文献>

- 1) Yasuaki Uematsu, Sho Akai, Tomoaki Tochtani, Yumi Tateishi, Shingo Oda, Izumi Tsumoto, Toru Yamada, and Tsuyoshi Yokoi. Micro RNA-mediated Th2 bias in the pathogenesis of methimazole-induced acute liver injury in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **307**: 1-9 (2016).
- 2) Sho Akai, Yasuaki Uematsu, Koichi Tsuneyama, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi. Kupffer cell-mediated exacerbation of methimazole-induced acute liver injury in rats. *J. Appl. Toxicol.*, **36(5)**: 702-715 (2016).
- 3) Eita Sasaki, Azumi Iida, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakaima, and Tsuyoshi Yokoi. Pathogenetic analyses of carbamazepine-induced liver injury in F344 rats focused on morphology and immune- and inflammation-related factors. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **68(1)**: 27-38 (2016).
- 4) Shingo Oda, Kentaro Matsuo, Akira Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. A novel cell-based assay for evaluation of immune- and inflammatory-related gene expression as biomarkers for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, **241**: 60-70 (2016).
- 5) Shohei Takai, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Establishment of a mouse model for amiodarone-induced liver injury and analyses of its hepatotoxic mechanism. *J. Appl. Toxicol.*, **36(1)**: 35-37 (2016).
- 6) Yu Yamaura, Naoyuki Tatsumi, Shingo Takagi, Shinsaku Tokumitsu, Tatsuki Fukami, Kazuto Tajiri, Masami Minemura, Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Serum microRNA profiles in patients with chronic hepatitis B, chronic hepatitis C, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, nonalcoholic steatohepatitis, or drug-induced liver injury. *Clinical Biochem.*, **50**:1034-1039 (2017).
- 7) Sho Akai, Shingo Oda and Tsuyoshi Yokoi. Establishment of a novel mouse model for pioglitazone-mediated skeletal muscle injury. *Toxicology*, **382**: 1-9 (2017).
- 8) Yuji Shirai, Shingo Oda, Sayaka Makino, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. Establishment of a mouse model of enalapril-induced liver injury and investigation of a pathogenesis. *Lab. Invest.*, **97**: 833-842 (2017).
- 9) Shingo Oda, Yuji Shirai, Sho Akai, Akira Nakajima, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. Toxicological role of an acyl glucuronide metabolite in diclofenac-induced acute liver injury in mice. *J. Appl. Toxicol.*, **37**: 545-553 (2017).
- 10) Takafumi Tomida, Hayao Okamura, Tsuyoshi Yokoi, Yoshihiro Konno. A modified multiparametric assay using HepaRG cells for predicting the degree of drug-induced liver injury risk. *J. Appl. Toxicol.*, **37**: 382-390 (2017).
- 11) Eita Sasaki, and Tsuyoshi Yokoi. Role of cytochrome P450-mediated metabolism and involvement of reactive metabolite formations on antiepileptic drug-induced liver injuries. *J. Toxicol. Sci.*, **43**: 75-87 (2018).
- 12) Yuya Urano, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. Comprehensive hepatic transcriptome analyses revealed possible pathogenic mechanisms of fasiglifam (TAK-875)-induced acute liver injury in mice. *Chem. Biol. Interact.*, **296**: 185-197 (2018).
- 13) Takumi Kagawa, Yuji Shirai, Shingo Oda and Tsuyoshi Yokoi. Identification of specific microRNA biomarkers in early stage of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis in rat. *Toxicol. Sci.*, **166**: 228-239 (2018).
- 14) Masaki Takeuchi, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. Comprehensive analysis of serum microRNAs in hepatic sinusoidal obstruction syndrome (SOS) in rats: implication as early-phase biomarkers for SOS. *Arch. Toxicol.*, **92**: 2947-2962 (2018).
- 15) Jieyu Xu, Shingo Oda and Tsuyoshi Yokoi. Cell-based assay using glutathione-depleted HepaRG human liver cells for predicting drug-induced liver injury. *Toxicol. In Vitro*, **48**: 286-301 (2018).
- 16) Shingo Oda, Masaki Takeuchi, Sho Akai, Yuji Shirai, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. MicroRNA in rat liver sinusoidal endothelial cells and hepatocytes and application to circulating biomarkers that discern pathogenesis of liver injuries. *Am. J. Pathol.*, **188**:916-928 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takafumi Tomida, Hayao Okamura, Tsuyoshi Yokoi, Yoshihiro Konno	4. 巻 37
2. 論文標題 A modified multiparametric assay using HepaRG cells for predicting the degree of drug-induced liver injury risk.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 382-390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jat.3371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shingo Oda, Yuji Shirai, Sho Akai, Akira Nakajima, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi.	4. 巻 37
2. 論文標題 Toxicological role of an acyl glucuronide metabolite in diclofenac-induced acute liver injury in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 545-553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jat.3388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuji Shirai, Shingo Oda, Sayaka Makino, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi.	4. 巻 97
2. 論文標題 Establishment of a mouse model of enalapril-induced liver injury and investigation of a pathogenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 833-842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/labinvest.2017.22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yu Yamaura, Naoyuki Tatsumi, Shingo Takagi, Shinsaku Tokumitsu, Tatsuki Fukami, Kazuto Tajiri, Masami Minemura, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima.	4. 巻 50
2. 論文標題 Serum microRNA profiles in patients with chronic hepatitis B, chronic hepatitis C, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, nonalcoholic steatohepatitis, or drug-induced liver injury.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1034-1039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clinbiochem.2017.08.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jieyu Xu, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi.	4. 巻 48
2. 論文標題 Cell-based assay using glutathione-depleted HepaRG human liver cells for predicting drug-induced liver injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicology In Vitro	6. 最初と最後の頁 286-301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tiv.2018.01.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sho Akai, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi	4. 巻 382
2. 論文標題 Establishment of a novel mouse model for pioglitazone-mediated skeletal muscle injury.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tox.2017.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eita Sasaki, and Tsuyoshi Yokoi	4. 巻 43
2. 論文標題 Role of cytochrome P450-mediated metabolism and involvement of reactive metabolite formations on antiepileptic drug-induced liver injuries.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J.Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 75-87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.43.75	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shohei Takai, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	4. 巻 36
2. 論文標題 Establishment of a mouse model for amiodarone-induced liver injury and analyses of its hepatotoxic mechanism.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J. Appl. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 35-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.3141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shingo Oda, Kentaro Matsuo, Akira Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.	4. 巻 241
2. 論文標題 A novel cell-based assay for evaluation of immune- and inflammatory-related gene expression as biomarkers for the risk assessment of drug-induced liver injury.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Toxicol. Lett.	6. 最初と最後の頁 60-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2015.10.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eita Sasaki, Azumi Iida, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakaima, and Tsuyoshi Yokoi	4. 巻 68
2. 論文標題 Pathogenetic analyses of carbamazepine-induced liver injury in F344 rats focused on morphology and immune- and inflammation-related factors.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Exp. Toxicol. Pathol.	6. 最初と最後の頁 27-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.etp.2015.09.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sho Akai, Yasuaki Uematsu, Koichi Tsuneyama, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi	4. 巻 36
2. 論文標題 Kupffer cell-mediated exacerbation of methimazole-induced acute liver injury in rats.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J. Appl. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 702-715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.3202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuaki Uematsu, Sho Akai, Tomoaki Tochtani, Yumi Tateishi, Shingo Oda, Izumi Tsumoto, Toru Yamada, and Tsuyoshi Yokoi.	4. 巻 307
2. 論文標題 Micro RNA-mediated Th2 bias in the pathogenesis of methimazole-induced acute liver injury in mice.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Toxicol. Appl. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2016.07.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shingo Oda, Masaki Takeuchi, Sho Akai, Yuji Shirai, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi	4. 巻 188
2. 論文標題 MicroRNA in rat liver sinusoidal endothelial cells and hepatocytes and application to circulating biomarkers that discern pathogenesis of liver injuries.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am. J. Pathol.	6. 最初と最後の頁 916-928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2017.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Takeuchi, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi.	4. 巻 92
2. 論文標題 Comprehensive analysis of serum microRNAs in hepatic sinusoidal obstruction syndrome (SOS) in rats: implication as early-phase biomarkers for SOS.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arch. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 2947-2962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-018-2269-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takumi Kagawa, Yuji Shirai, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi.	4. 巻 166
2. 論文標題 Identification of specific microRNA biomarkers in early stage of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis in rat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 228-239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/toxsci/kfy200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuya Urano, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi.	4. 巻 296
2. 論文標題 Comprehensive hepatic transcriptome analyses revealed possible pathogenic mechanisms of fasilglifam (TAK-875)-induced acute liver injury in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem. Biol. Interact.	6. 最初と最後の頁 185-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbi.2018.09.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 15件）

1. 発表者名 Shingo Oda, Masaki Takeuchi, Sho Akai, Yuji Shirai, and Tsuyoshi Yokoi.
2. 発表標題 Application of microRNAs derived from liver sinusoidal endothelial cells to circulating biomarkers that discern pathogenesis of liver injuries.
3. 学会等名 International Meeting of 22nd Microsomes and Drug Oxidations and 33rd Japanese Society of the Study of Xenobiotics, October 1-5, 2018, Ishikawa Ongakudo Hall, Kanazawa, Ishikawa, Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shingo Oda, Nanaka Miyazaki, Ru Jia, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi.
2. 発表標題 Establishment of gefitinib-induced liver injury and its pathogenic mechanisms in mice.
3. 学会等名 The 8th International Congress of Asian Society of Toxicology, June 17-20, 2018, The Royal Cliff Grand Hotel, Pattaya, Thailand. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shingo Oda, Yuka Uchida, M.D. Aleo, M. Hizue, L.D. Marroquin, P. H. Koza-Taylor, J. Whritenour, and Tsuyoshi Yokoi.
2. 発表標題 Exploration of biomarkers for predicting drug-induced liver injury in co-culture systems of human peripheral blood mononuclear cells with hepatocellular carcinoma-derived cells.
3. 学会等名 57th Annual Meeting of Society of Toxicology, March 11-15, 2018, San Antonio Convention Center, San Antonio, Texas, USA. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fung Yang, Shingo Oda, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi.
2. 発表標題 Bile salt supplementation for detecting drug-induced, cholestatic liver injury in rats.
3. 学会等名 57th Annual Meeting of Society of Toxicology, March 11-15, 2018, San Antonio Convention Center, San Antonio, Texas, USA. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takumi Kagawa, Yuji Shiarai, Thomas Zarybnicky, Shingo Oda, and Tsuyoshi Yokoi.
2. 発表標題 Identification of specific microRNA biomarkers in early stage of hepatocellular injury.
3. 学会等名 57th Annual Meeting of Society of Toxicology, March 11-15, 2018, San Antonio Convention Center, San Antonio, Texas, USA. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuyoshi Yokoi
2. 発表標題 Cellular and animal models for human drug-induced liver injury.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, July 1-6, 2018, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横井 毅、香川 匠、織田進吾
2. 発表標題 病型および臓器特異的な毒性予測バイオマーカーとしてのmiRNA
3. 学会等名 2018年7月18日～7月20日、第45回日本毒性学会学術年会、大阪国際会議場グランキューブ大阪、大阪府大阪市 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuaki Uematsu, Sho Akai, Shingo Oda, Toru Yamada, Tsuyoshi Yokoi
2. 発表標題 Individual variability of carbamazepine-induced liver injury in mice.
3. 学会等名 56th Annual Meeting of Society of Toxicology, March 12-16, 2017, Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Jieyu Xu, Shingo Oda, Tsuyoshi Yokoi.
2. 発表標題 Comparison of in vitro cytotoxicity assays using glutathione-depleted HepaRG and HepG2 cells for predicting drug-induced liver injury.
3. 学会等名 56th Annual Meeting of Society of Toxicology, March 12-16, 2017, Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shingo Oda, Masataka Takeuchi, Yuji Shirai, Sho Akai, Koichi Tsuneyama, Tsuyoshi Yokoi.
2. 発表標題 Characterization of microRNAome in rat liver sinusoidal endothelial cells and hepatocytes and their potential application to plasma biomarkers that discern pathogenesis of liver injuries
3. 学会等名 56th Annual Meeting of Society of Toxicology, March 12-16, 2017, Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shingo Oda, Masaki Takeuchi, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi.
2. 発表標題 Serum microRNAs as biomarkers for hepatic sinusoidal obstruction syndrome in rats.
3. 学会等名 52nd European Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2016), September 4-7, 2016, Fibes, Conference and Exhibition Centre, Seville, Spain. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsuyoshi Yokoi and Shingo Oda.
2. 発表標題 Establishment of a novel cell-based assay for drug-induced liver injury (DILI) potential considering immune- and inflammation-related factors.
3. 学会等名 56th Annual Meeting of Society of Toxicology, March 12-16, 2017, Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横井 毅
2. 発表標題 特異体質性薬物性肝障害の免疫学的機序
3. 学会等名 2017年9月4日～5日、第24回日本免疫毒性学会学術年会、北里大学獣医学部講堂、青森県十和田市（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横井 毅
2. 発表標題 Involvement of microRNAs and immune- and inflammation-related factors in drug-induced liver injury.
3. 学会等名 2017年7月10日～7月12日、第44回日本毒性学会学術年会、パシフィコ横浜、横浜市（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shingo Oda, Yuji Shirai, Sho Akai, Akira Nakajima, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi.
2. 発表標題 Toxicological role of acylglucuronide metabolite in diclofenac-induced acute liver injury in mice.
3. 学会等名 The 11th International ISSX Meeting. June 12-16, 2016. BEXCO Convention Center, Busan, Republic of Korea. (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tsuyoshi Yokoi
2. 発表標題 MicroRNAs as potential toxicological biomarkers in drug-induced liver injury.
3. 学会等名 14th International Congress of Toxicology (ICT). October 2-6, 2016. Tulum room in Merida Convention Center, Merida, Mexico. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tsuyoshi Yokoi
2. 発表標題 Animal models to predict human risk factors in drug-induced adverse drug reactions.
3. 学会等名 The 11th International ISSX Meeting. June 12-16, 2016. BEXCO Convention Center, Busan, Republic of Korea. (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tsuyoshi Yokoi and Shigo Oda.
2. 発表標題 Approaches to predict drug-induced liver injury.
3. 学会等名 The 13th Asian Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting. February 1-3, 2016. The Berkeley Hotel Pratunum, Bangkok, Thailand. (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 横井 毅
2. 発表標題 物性肝障害-薬物代謝、免疫、炎症との関係-
3. 学会等名 2016年5月26-27日、第23回HAB研究機構学術大会、つくば産業総合技術研究所共用講堂、茨城県つくば市(招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学医学系研究科 トキシコゲノミクス研究室
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/toxicogenomics/Publish.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	織田 進吾 (Oda Shingo) (10725534)	名古屋大学・医学系研究科・特任助教 (13901)	