

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293037

研究課題名(和文) グルクロン酸抱合反応による医薬品の副作用発現機構の解明と予測評価系の構築

研究課題名(英文) Risk assessment and mechanistic analysis of adverse reactions of the acyl glucuronides.

研究代表者

横井 毅 (Yokoi, Tsuyoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70135226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体高分子との反応性が比較的高いアシルグルクロン酸抱合体(AG)の毒性評価方法について、創薬研究の実際に適用できる方法を構築した。(1)THP-1細胞およびヒト末梢血単核球細胞を用い、AGの細胞障害性を定量的に評価した。(2)In vitroで3種類の方法(1. AGの物理的半減期、2.ジペプチドアダクト、3.<1>の方法)でAGの毒性を定量的に評価できることを示した。(3)ゾメピラクをモデル化合物としてAGの毒性についてマウスで、酵素阻害剤を用いて示す事ができた。(4)ジクロファナク(DCF)についてもマウスin vivoで、AGに由来する肝障害性を強く示す事ができた。

研究成果の概要(英文)：Acyl glucuronides (AGs) may be related with the toxicity of carboxyl acid drugs, because AGs covalently bind to endogenous proteins owing to potential reactivity. However, the theory remains controversial. In this study, first, the changes in the mRNA and protein expression levels of IL-8 and MCP-1 induced by the treatment of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with several AG of NSAIDs. Second, short half-lives, peptide adducts and immunostimulation were observed in AGs of all withdrawn drugs. Third, responsibility of zomepirac acyl glucuronide (ZP-AG) for renal toxicity by ZP was investigated by in vivo studies. ZP-induced kidney injury mouse model was established by pretreatment with an esterase inhibitor and a glutathione synthesis inhibitor. Fourth, the inhibition of diclofenac (DCF)-AG production by the (-)-borneol (BOR) pretreatment alleviated DIC-induced liver injury in mouse. DIC-AG was involved in the pathogenesis of DIC-induced liver injury.

研究分野：毒性学、医薬品安全性学

キーワード：グルクロン酸転移酵素 アシルグルクロニド ジクロフェナク ゾメピラク 医薬品副作用 加水分解
酵素阻害薬 グルタチオン合成阻害薬 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発において、臨床試験実施化合物や新規承認薬が多くの患者や被験者に投与されて初めて発現する予測困難で、頻度が低いが重篤な副作用が発症することが大きな問題となっている。臨床試験中および上市後の副作用発現は、製薬会社のみならず、患者に対しても多大の不利益をもたらす場合が少なく無い。

一般に薬物のグルクロン酸抱合代謝物は不活性であり、この代謝物の毒性評価の必要は無いと考えられる。しかし、カルボン酸のグルクロン酸抱合代謝物であるアシルグルクロン酸抱合体(AG)は、生体高分子との結合能が比較的高く、生体側に種々の毒性反応をもたらす可能性があると考えられてきている。

生体高分子との反応は、(1)反応性アシルグルクロン酸化合物から、生体分子へのアシル基転移反応と、(2)分子内アシル基異動に続く生体分子の糖化反応、の二つに起因すると考えられる。現在までに、毒性発現リスクを評価するいくつかの方法が提唱されているが、一般に受け入れられている判定方法は未だ無く、非臨床医薬品開発における大きな悩みの一つである。

米国 FDA もヒト特異的薬物性臓器障害の克服を、最重要課題の1つに指定し、2008年2月に出されたガイドライン「Safety Testing of Drug Metabolites」の中で、AG化合物の毒性に留意するべきことを明記しているが、具体的な試験方法については触れていない。さらに、日本製薬工業協会が2011年に行ったアンケートでも、AGに対する定量的でバリデーションされた評価系の必要性が強く求められている。

申請者は、ヒトグルクロン酸抱合酵素(UGT)の分子種(UGT1A3, UGT1A4)発現細胞株や、ヒトヘパトサイトを用いて、NSAIDsのAG代謝物の毒性について詳細に検討し、その結果を報告した(Drug Metab Dispos, 39: 54-60, 2011)。この論文において、NSAIDsのAG代謝物には、細胞障害性および遺伝毒性が無いことを報告した。一方で、申請者は、最近、多くの肝障害モデル動物作成の研究において、薬物誘導性肝障害において、炎症や免疫に関わる因子が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。例えばジクロフェナクの肝障害モデルマウスを作出し、Th2細胞の活性化が肝障害に最も重要な因子であることを初めて報告した。またハロタンによる肝障害のモデルマウスを作成し、その発症機序に Th17 細胞が関与していることなどを報告してきた。こうした背景から、AGの炎症/免疫毒性の機序を *in vitro* の cell-based レベルで明らかにし、その機序に基づいた *in vivo* 実験動物を用いたスクリーニング試験系の構築を行い、AGの毒性評価系を確立し、我が国の創薬の発展に寄与することを考えた。

2. 研究の目的

生体高分子との反応性が比較的高いと考えられているAGの毒性の評価方法について、信頼性が高く、創薬研究の実際に適用できる検討方法の構築を目的とした。本研究の内容は4種類に大別されており、以下(1)~(4)

としてそれぞれの研究について述べる。(1) *In vitro* cell-based assay で AG の免疫・炎症性の細胞障害性を示した。(2) *In vitro* で3種類の手法、1 AGの緩衝液中での半減期、2ジペプチドアダクトの定量、3ヒト末梢血単球細胞(hPBMC)を用いた炎症・免疫因子の発現変動)でAGの毒性を定量的に評価できることを示した。(3) これまでの *in vitro* の検討において、被験化合物中撤退薬ゾメピラク(ZP)が高い毒性ポテンシャルを有することが示唆された。しかしながら、これまでAGに関して *in vivo* レベルで毒性を示した研究はない。そこで、本研究ではZPをモデル化合物としてAGの毒性について *in vivo* レベルで明らかにすることを目的とした。(4) NSAIDの代表であるジクロフェナク(DCF)についてもマウス *in vivo* でのAG代謝物特異的毒性評価系を構築した。

以上の4件の研究報告によって、AG代謝物の毒性評価系が *in vitro* および *in vivo* で確立されと考えられ、これらの評価系が身近のものとなり、今後の非臨床創薬研究に活用されると確信している。

3. 研究の方法

(1) ヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞、ヒト末梢血単核球(PBMC)およびヒト非実質細胞入りヘパトサイト(total liver cells)にDCFおよびDCF-AGを100 μMで処置し、24時間後に細胞を回収し、炎症性因子の mRNA 発現変動を real-time RT-PCR で測定した。PBMCにDCF、プロベネシド(Pro)、トルメチン(Tol)、イブプロフェン(Ibu)、ナプロキセン(Nap)およびそのAG代謝物を100 μMで処置し、24時間後に炎症性サイトカインの mRNA 発現変動を real-time RT-PCR で、CD3 陽性細胞、CD14 陽性細胞および CD19 陽性細胞の細胞生存率をフローサイトメトリーにより測定した。DCF-AGを100 μM 処置後の MAPK 経路(p38, JNK および ERK)の活性化をウエスタンブロッティングにより解析した。P38 阻害剤である SB203580 を 2.5 μM、JNK 阻害剤である SP600125 を 1 μM、ERK 阻害剤である U0126 を 10 μM で DCF-AG と併用処置し、炎症性因子の mRNA 発現変動、および CD3 陽性細胞、CD14 陽性細胞および CD19 陽性細胞の細胞生存率を測定した。

(2) AG代謝物はヒト肝ミクロソームを被験薬をインキュベートして得た。緩衝液中でのAGsの半減期測定には、リン酸カリウム緩衝液を用いて測定した。ペプチドアダクトは、ダンシル化したリジン-フェニルアラニンのジペプチド(dKF)をトラップ剤として用い、蛍光および MSMS による定量を行った。炎症・免疫因子の賦活化作用の検討には、ヒトPBMCを用い、AGは市販の6種類の標品について検討した。すなわち、AGの標品をhPBMCに曝露後、mRNAを抽出して、DNAマイクロアレイで分析を行い、5種類の遺伝子をバイオマーカーの候補として pick up した。その後、5種類の遺伝子について real-time RT-PCR を行い、これらの遺伝子の発現量の総和を integrated score として定量評価した。

(3) マウス *in vivo* において ZP-AG の毒性を検討できるモデル作成について検討した。10週齢の雌性 Balb/c マウスに 150 mg/kg

で単回腹腔内投与し、24h 後に腎毒性マーカーとしてクレアチニンおよび血液尿素窒素 (BUN) ALT 値を測定した。マウス in vivo で ZP による毒性が検出されないのは ZPAG の曝露が低いためと考えられた。また、モルモットにおける検討から何らかのエステラーゼが ZPAG の加水分解に寄与していることが報告されている。加えて、ZPAG はグルタチオン抱合を受けることも知られており、こちらも ZPAG の消失に寄与していると考えられた。そこで、加水分解酵素阻害剤である TOTP およびグルタチオン枯渇剤 BSO を用いることで ZPAG の曝露量を上昇させ、ZP による毒性の検出を試みた。ZP の投与前 12h および 1h 前に TOTP および BSO をそれぞれ投与し、ZP 単独投与時と同様に 24h 後に各血液生化学マーカーを測定した。続いて、ZP 誘導性腎障害について用量依存性、および各障害マーカーの経時的推移を調べた。さらに、ZP 誘導性腎障害について腎臓髄質の組織病理学的評価を行い、さらに、免疫関連因子を中心に ZP 誘導性腎障害時の腎臓中 mRNA 発現量を解析した。

(4) マウス in vivo において DCF-AG の毒性を検討できるモデル作成について検討した。9 週齢雌性 C57BL/6 マウスに DCF を投与する前に、(-)-borneol (BOR) を腹腔内投与した。30 分後に DCF (200 mg/kg) を腹腔内投与した。経時的に血液の採取、肝臓の病理組織学的検査を行った。とくに、MPO, Ly6G, CD-11b など染色を行って判定した。血漿中の DCF およびその代謝物は、血漿 23 microL を用いて 8%の過塩素酸で前処理した試料について測定した。肝臓について、real time RT-PCR によって、CXCL1, CCL2, GAPDH, IL6, MCP-1, S100A8, S100A9 などの発現量を定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) THP-1 細胞において、DCF 処置群と比較し DCF-AG 処置群において炎症性サイトカインである TNF、炎症部位への好中球遊走に關与するケモカインである IL-8 および MCP-1 の有意な増加が認められた。また、PBMC において IL-8 および MCP-1 に加え、GM-CSF および IL-6 の有意な増加が認められた。Total liver cells においては DCF-AG による、各炎症性因子の mRNA 発現変動は認められなかった。THP-1 細胞および PBMC における DCF-AG に対する各炎症性因子の発現誘導は、PBMC においてより顕著に認められた。以降、AG による炎症性因子の発現誘導に関して、PBMC を用いて詳細な検討を行った。

DCF-AG 処置により誘導される炎症性因子の、経時的な発現変動解析を行ったところ、IL-8 および IL-6 mRNA において DCF-AG 処置後 12 時間で最大値を示し、MCP-1 および GM-CSF mRNA は DCF-AG 処置後 24 時間で最大値を示した。各炎症性因子の発現ピーク時間は異なるものの、いずれの因子も 24 時間において DCF 処置と比較し DCF-AG 処置群において有意な増加が認められたことから、以降の検討において薬物処置後 24 時間における炎症性因子の発現変動を解析することとした。

DCF-AG 以外の AG について、PBMC を用いて

炎症性因子の発現変動を測定したところ、Pro-AG 処置により Pro 処置群と比較し MCP-1 mRNA の有意な増加が、Tol-AG 処置により Tol 処置群と比較し IL-8 および IL-6 mRNA の有意な増加が認められたが、Ibu-AG および Nap-AG 処置による各炎症性因子の発現変動は認められなかった。

フローサイトメトリーにより CD3 陽性細胞、CD14 陽性細胞および CD19 陽性細胞の細胞生存率を測定したところ、CD3 陽性細胞および CD19 陽性細胞に対する各 AG の影響は認められなかったが、CD14 陽性細胞の生存率が DCF-AG 処置により約 40%、Pro-AG 処置により約 60% および Tol-AG 処置により約 50% まで低下した。Ibu-AG および Nap-AG 処置による CD14 陽性細胞に対する影響は認められなかった。AG による炎症性因子の発現変動および CD14 陽性細胞に対する細胞傷害性の結果から、各 AG による細胞障害性は DCF-AG、Tol-AG、Pro-AG の順に強いことが示唆された。

PBMC に対する影響が最も強く認められた DCF-AG に着目し、細胞増殖や炎症性サイトカイン産生等多くの細胞内シグナルカスケードに關与する MAPK 経路の活性化を検討したところ、DCF-AG 処置後 30 分で、p38 および JNK リン酸化体の増加が認められた。DCF-AG による細胞毒性に MAPK 経路が關与するから明らかにするために、p38 MAPK 阻害剤である SB203580、JNK 阻害剤である SP600125 および ERK 阻害剤である U0126 を併用処置したところ、SB203580 との併用処置により DCF-AG による炎症性因子の誘導、および CD14 陽性細胞に対する細胞傷害は認められなくなった。以上より、DCF-AG は p38 MAPK 経路の活性化を介して、炎症性因子の発現誘導および CD14 陽性細胞に対する細胞傷害性を示すことを明らかにした。

以上、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 経路が關与することを初めて明らかにし、AG が薬物誘導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。

(2) 本研究で評価したカルボン酸化合物は、市場撤退薬 4 薬物、警告薬 3 薬、安全薬 14 薬であり、撤退薬は日米欧 3 種のいずれかにおいて販売中止となったもの、警告薬は 3 種のいずれかの添付文書中の副作用に肝障害として重篤性が示唆される劇症肝炎の記載があるものを設定した。各薬物について AG の半減期の結果は、全撤退薬において 2h 未満の短い半減期を示したが、イブプロフェンなどの一部の安全薬においても同等の結果を示した。続いて、ペプチドアダクト評価結果であるが、撤退薬においては glycation adduct のみ検出され、acylation adduct と比較して glycation adduct の方が毒性カテゴリーと相関性が高い結果が得られました。しかしながら、半減期と同様に安全薬においても両 adduct が検出された。これは偽陽性すなわち毒性リスクの過大評価に繋がると考えられた。

免疫・炎症因子活性化評価は、ヒト PBMC

に AG 標品を添加し、24 時間培養後 real time RT-PCR 法により細胞中 IL-8 mRNA 発現量を測定し、コントロール群に対する誘導率を評価した。その結果、先の 2 法と同様、全ての撤退薬において IL-8 mRNA の誘導を検出した。さらに、特筆すべきことは、他の 2 法と異なり全ての安全薬において誘導が認められなかったことである。このことは本法が特異性が高い評価法であることを意味している。本検討では過去の報告をもとに IL-8 mRNA を活性化マーカー遺伝子として選択したが、撤退薬/警告薬と安全薬の判定ラインは誘導率として 2 倍程度と評価レンジに課題があることが示された。

次に、IL-8 以外の活性化マーカーを DNA マイクロアレイにより探索した。陽性対象薬物として撤退薬であるゾメピラクおよびトルメチンの AG 体、陰性対象薬物としてイブプロフェンの AG 体を設定し、溶媒対照群に対する遺伝子発現変動プロファイルと比較した。目的のマーカー遺伝子の抽出条件は誘導倍率が陽性対照群のいずれにおいても 1.5 倍以上、かつ陰性対照群より大きいという条件に設定した。本条件で 201 遺伝子が抽出され、免疫関連遺伝子という観点から活性化マーカー候補遺伝子は 10 遺伝子に絞った。これまでマーカーとしていた IL-8 も本条件で抽出されることが確認できた。これらの候補遺伝子についてゾメピラク AG をプローブ薬としてリアルタイム RT-PCR により個別に mRNA 発現誘導を確認したところ、IL-8 に加え 4 遺伝子において 2 倍以上の誘導が認められたが、IL-8 を上回る誘導を示したのは IL-1a のみであった。そこで、これらの 5 遺伝子について総合的に評価することで評価レンジの改善を期待し、各遺伝子の AG による発現誘導倍率の総和をトータルサムスコアと定義し、各 AG について評価を試みた。その結果、カットオフ値をスコア 10 と設定した際に撤退薬/警告薬と安全薬の区別が可能となった。IL-8 による単独評価と比較して顕著な評価レンジの改善はみられなかったものの、複数因子から総合的に評価することで偽陽性リスクの低減が期待できると考えられた。

以上、AG の毒性評価法として半減期およびペプチドアダクト評価法では撤退薬/警告薬のみならず一部の安全薬においても陽性判定がみられたが、ヒト PBMC を用いた免疫活性化評価法では他の 2 法と比較して高い判定精度を示した。よって、ヒト PBMC を用いた免疫活性化評価法は AG の in vitro 毒性評価において有用なツールとなることが期待される。

(3) マウスに ZP を単独投与し、腎障害が認められるか検討した。その結果、10 週齢の雌性 Balb/c マウスに 150 mg/kg で単回腹腔内投与 24h 後に、CRE, BUN, ALT のいずれのマーカーについても有意な上昇は認められなかった。

次に、加水分解酵素阻害剤である TOTP およびグルタチオン枯渇剤 BSO を用いることで ZPAG の曝露量を上昇させ、ZP による毒性の検出を試みた。その結果、阻害剤単独投与では影響はみられなかったのに対し、BSO 併用群において有意ではないものの腎毒性マ

ーカーの CRE, BUN の上昇傾向がみられ、TOTP 併用群においては有意かつ顕著な上昇が認められた。CRE については両阻害剤の併用によりさらに高値を示した。一方で、肝毒性マーカーの ALT の上昇は認められず、臨床における副作用情報と矛盾しない結果であった。ZP 誘導性腎障害については、ZP 100 mg/kg より用量依存的な腎障害マーカーの上昇がみられた、一方、本検討においても肝障害は認められなかった。また、阻害剤併用における血漿中および組織中 ZP/ZPAG 濃度を測定したところ、未変化体は血漿中および組織中のいずれにおいても阻害剤併用により濃度の低下が認められた。一方、AG 体は未変化体とは対照的に濃度の上昇が認められた。また、阻害剤併用時において未変化体濃度は肝腎臓間で顕著な差は無いのに対し、AG 体は最大でおよそ 10 倍程度の濃度差が認められた。この AG 体の組織分布の差は ZP 投与後の障害マーカーの変動と良好に相関した。このことは、ZP による腎障害は未変化体ではなく AG 体によって誘発されている可能性が高いことを意味していた。阻害剤併用群において MPO 陽性細胞の腎組織中への浸潤数の有意な増加が認められた。よって、本腎障害に免疫学的機序が関与することが示唆された。

免疫関連因子を中心に ZP 誘導性腎障害時の腎臓中 mRNA 発現量を解析した。その結果、障害発現以前である投与後 1h よりインターロイキン-1a, -6 といった代表的サイトカインの mRNA 発現量の上昇がみられ、障害進行時である投与後 12h ではこれらに加え自然免疫活性化に関与する因子である DAMP および免疫細胞の浸潤に関わる接着因子の発現上昇がみられた。また、興味深いことにこれらの免疫関連因子に加え、酸化ストレス関連因子であるヘムオキシゲナーゼ (HO-1) の顕著な発現誘導がみられた。

酸化ストレスマーカーである還元型/酸化型グルタチオン比および、脂質過酸化マーカーであり同じく酸化ストレスの指標として用いられているマロンジアルデヒド (MDA) を評価した。こちらについても障害群においてのみ上昇しており、ZP 誘導性腎障害に酸化ストレスが関与していることが示唆された。障害に対する酸化ストレスの関与について、抗酸化剤テンボールを用いて追加評価した。抗酸化剤の併用により腎障害は有意に抑制され、これまでの結果を支持するものであった。

以上、in vivo 検討において、加水分解酵素阻害剤およびグルタチオン枯渇剤の併用投与により ZP 誘導性腎障害マウスモデルの作製に成功した。本マウスモデルにおいて腎組織中への ZPAG の高濃度な蓄積が認められたことから、ZPAG が腎障害を誘発する可能性が強く示唆された。さらに、組織病理評価および各種マーカー評価から本腎障害には免疫因子および酸化ストレスが関与していることが示唆された。これらの結果からこれまで明らかにされていなかった AG の in vivo における AG の毒性を示すことができた。

(4) DCF から UGT によって生成される DCF-AG は生体中でエステラーゼによって加水分解反応を受けると考えられた。そこで前章の ZP と同様に TOTP を用いて、エステラー

ゼ活性を in vivo で阻害する検討を行ったが、TOTP による影響は認められなかった。本研究条件では、DCF-AG の肝臓中の濃度は十分に高いために、TOTP の影響が認められなかったと考えた。次に、DCF-AG を生成する UGT 酵素活性の阻害剤である BOR について検討した。DCF 投与後 3 時間と 6 時間後の ALT は、有意に低下した。病理組織学的検査結果もこの結果と関連していた。

BOR 処理の有無による血漿中の DCF およびその代謝物の濃度への影響を経時的に検討した。その結果、未変化体は BOR 処理によって、いずれの時間も上昇に、代謝が遅延していることが示された。一方、4'-OH、5-OH および AG 代謝物のいずれも BOR 処理によって低下した。さらに、BOR 処理による肝臓中の炎症・免疫関連因子の mRNA レベル発現変動について検討し、MIP-2(CXCL2)、CXCL1 および CD11b が DCF 単独投与と比較して有意にその発現が低下していた。さらに、抗-MPO および Ly6G 染色の結果も、BOR による肝障害の軽減を示唆する結果を示した。以上の結果から、DCF-AG は自然免疫を活性化して、肝障害を増悪させる作用を示していると考えられた。この結果は、<1>の hPBMC を用いた結果を良い相関を示すものである。しかし、BOR 処理によって、いずれの代謝物濃度も低下したことは慎重に判断する必要がある。しかし、DCF-AG の血中濃度は他のいずれの代謝物濃度よりも 10 倍以上高いことから、AG 代謝物の関与が強く示唆された。BOR 前処理による DCF の体内動態を詳しく検討することによって、DCF-AG の肝障害への関与を強く示唆することができた。

以上の 4 件の研究報告によって、AG 代謝物の毒性評価系が in vitro および in vivo で確立されと考えられ、これらの評価系が身近のものとなり、今後の非臨床創薬研究に活用されると確信している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. 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)**. doi: 10.1002/jat.3141. 査読あり.
2. Atsushi Iwamura, Masahito Ito, Hideaki Mitsui, Jun Hasegawa, Keigo Kosaka, Ichiro Kino, Minoru Tsuda, Miki Nakajima, Tsuyoshi Yokoi and Toshiyuki Kume. Toxicological evaluation of acyl glucuronides utilizing half-lives, peptide adducts, and immunostimulation assays. *Toxicol. In Vitro*, **30(1): 241-249 (2015)**. doi: 10.1016/j.tiv.2015.10.013. 査読あり.
3. Azumi Iida, Eita Sasaki, Shingo Oda, Azusa Yano, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Carbamazepine-induced liver injury required CYP3A-mediated metabolism and glutathione depletion in rats. *Drug Metab. Dispos.*, **43(7): 958-968 (2015)**. doi: 10.1124/dmd.115.063370. 査読あり.
4. Shingo Oda, Ryoichi Fujiwara, Yuki Kutsuno, Tatsuki Fukami, Tomoo Itoh, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Targeted screen for human UDP-glucuronosyltransferases inhibitors and the evaluation of potential drug-drug interactions with zafirlukast. *Drug Metab. Dispos.*, **43: 812-818 (2015)**. doi: 10.1124/dmd.114.062141. 査読あり.
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.*, **35(2): 142-151 (2015)**. doi: 10.1002/jat.3002. 査読あり.
6. Eita Sasaki, Atsushi Iwamura, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Toshiyuki Kume and Tsuyoshi Yokoi. Role of P450-mediated metabolism and identification of novel thiol-conjugated metabolites in mice with phenytoin-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, **232(1): 79-88 (2015)**. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.10.012. 査読あり.
7. Mark J. Kurth, Tsuyoshi Yokoi, and M. Eric Gershwin. Halothane-induced hepatitis: Paradigm or paradox for drug-induced liver injury. *Hepatology*, **60: 1473-1475 (2014)**. doi: 10.1002/hep.27253. 査読あり.
8. Azusa Yano, Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Development of a cell-based assay system considering drug metabolism and immune- and inflammatory-related factors for the risk assessment of drug-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, **228(1): 13-24 (2014)**. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.04.005. 査読あり.
9. 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)**. doi: 10.1016/j.tox.2014.02.011. 査読あり.
10. 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(4): 660-667 (2014)**. doi: 10.1016/j.bcp.2013.11.001. 査読あり.
11. 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(2): 215-224 (2014)**. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.10.025. 査読あり.
12. 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). doi:

10.1124/dmd.113.054478. 査読あり.

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). doi: 10.1093/toxsci/kft184. 査読あり.
- [学会発表](計12件)
1. 織田進吾、清木俊雄、横井毅. Investigation of the role of acyl glucuronide in diclofenac-induced liver injury in mice. ポスター発表、2015年11月11-13日、第30回日本薬物動態学会年会、タワーホール船堀、東京都江戸川区
 2. 岩村 篤、伊藤雅仁、三井英晃、長谷川洵、小坂圭吾、木野一郎、津田実、中島美紀、横井毅、久米利行. Toxicological evaluation of acyl glucuronides utilizing half-lives, peptide adducts, and immunostimulation assays. ポスター発表、2015年11月11-13日、第30回日本薬物動態学会年会、タワーホール船堀、東京都江戸川区
 3. 白井勇司、織田進吾、牧野早也香、常山幸一、横井毅. Establishment of a mouse model of enalapril-induced liver injury and investigation of the pathogenesis. ポスター発表、2015年11月11-13日、第30回日本薬物動態学会年会、タワーホール船堀、東京都江戸川区
 4. 赤井 翔、上松泰明、常山幸一、織田進吾、横井毅. 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発症メカニズムの解析. ポスター発表、2015年6月29~7月1日、第42回日本毒性学会学術年会、石川県立音楽堂、石川県金沢市
 5. 清木俊雄、織田進吾、横井毅. ジクロフェナク誘導性肝障害におけるアシルグルクロナイドの関与. ポスター発表、2015年6月29~7月1日、第42回日本毒性学会学術年会、石川県立音楽堂、石川県金沢市
 6. 織田進吾、松尾研太郎、深見達基、中島美紀、横井毅. 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. ポスター発表、2015年6月29~7月1日、第42回日本毒性学会学術年会、石川県立音楽堂、石川県金沢市
 7. 高井翔平、深見達基、中島美紀、横井毅. アミオダロン誘導性肝障害マウスの作出および肝毒性メカニズムの解析. ポスター発表、第41回日本毒性学会学術年会、2014年7月2-4日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市
 8. 佐々木英太、岩村 篤、久米俊行、深見達基、中島美紀、横井毅. A reactive metabolite formed by P450, which is readily subjected to glutathione conjugation, would be causal for

phenytoin-induced liver injury in mice. ポスター発表、2013年10月9-11日、第28回日本薬物動態学会年会、タワーホール船堀、東京都江戸川区

9. 佐々木英太、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. ポスター発表、第40回日本毒性学会学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ国際会議場、千葉県千葉市.
10. 松尾研太郎、樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井毅. チオアザ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. ポスター発表、第40回日本毒性学会学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ国際会議場、千葉県千葉市.
11. 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の解析. ポスター発表、第40回日本毒性学会学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ国際会議場、千葉県千葉市.
12. 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の解析. ポスター発表、第40回日本毒性学会学術年会、2013年6月17-19日、幕張メッセ国際会議場、千葉県千葉市.

[図書](計4件)

1. Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **30**: 30-51 (2015). (doi: 10.1016/j.dmpk.2014.12.001)
2. 横井毅. 薬物代謝と肝障害. *月刊薬事* **56**: 21-25 (2014).
3. 横井毅. 薬物代謝と肝障害: 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* **144**: 22-27 (2014).
4. 織田進吾、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. *YAKUGAKU ZASSHI* **135**: 579-588 (2015).

[その他]

ホームページ等

研究室 HP 研究概要

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/toxicogenomics/Research.html>

研究室 HP 業績リスト

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/toxicogenomics/Publish.html>

6. 研究組織

研究代表者

横井毅 (YOKOI, Tsuyoshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70135226