

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた医薬品の動態および
安全性予測システムの構築

平成 14 年度 統括・分担研究報告書

主任研究者名 横 井 毅

平成 15 (2003) 年 4 月

目 次

I. 統括研究報告

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた医薬品の動態および 安全性予測システムの構築	-----	1
横井 毅		

II. 分担研究報告

1. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物動態関連遺伝 子の発現解析	-----	42
横井 毅		
2. ヒト肝細胞キメラマウスにおける薬物動態関連 項目のタンパク質、酵素活性レベルの測定に関する研究	----	70
中島美紀		
3. ヒト肝細胞キメラマウスの作成と安定供給シス テムの構築に関する研究	-----	94
吉里勝利		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	100
---------------------	-------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	100
-----------------	-------	-----

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）

統括研究報告書

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた医薬品の動態および
安全性予測システムの構築

主任研究者 横井 毅 金沢大学薬学部・教授

研究要旨

広島県地域結集型共同研究事業（研究統括：広島大学大学院理学研究科 吉里勝利）で開発されたヒト肝細胞キメラマウスは、ヒトにおける薬物動態および安全性を予測でき、医薬品開発に有用な手段になり得ると予想される。特に薬物動態研究分野では、代謝酵素の誘導現象に起因する相互作用の予測はヒト由来試料を用いないと非常に困難な為に、主にヒトヘパトサイトが多用されている。しかし、我が国では現在ヒトヘパトサイトは全て輸入に頼っており、さらに供給が不安定である。また一方で人種差の観点から、日本人由来の肝細胞の入手が強く期待されている。ヒト肝細胞キメラマウスは、肝障害を発症するアルブミンウロキナーゼプラスミノゲンアクチベータートランスジェニックマウス（uPA マウス、参考文献：Cell, vol.62, 447-456, 1990）と免疫不全の性質を持つ SCID マウスを交配して生じた免疫不全肝障害マウス（uPA/SCID マウス）にヒト肝細胞を移植し作出する。ヒト肝細胞キメラマウスを薬物動態および安全性を予測するシステムとして用いるためには大量のヒト肝細胞キメラマウスが必要となるが、そのためには材料となる肝障害免疫不全マウスを大量にかつ安定に供給するシステムを確立することが必要不可欠である。このために安定供給システムの構築を完了した。さらに効率のよい uPA/SCID マウスの作出のために、マウス肝細胞を移植した uPA/SCID マウスを用いた新しい繁殖方法についても検討した。その結果、現在行っている繁殖方法と比較して、最大で4倍の効率で目的の肝障害免疫不全マウスを繁殖させられる可能性が示された。

創薬研究においてヒトに投与して初めて肝障害が発現し、開発を中断するケースは近年も減少していない。とくに、安全性の予測については大きな種差が

問題となっている。ヒト肝細胞キメラマウスは、マウスの肝の 80%以上がヒト肝細胞と置き換わり、ヒトと同一の肝細胞を多量に得ることができるため、ヒトにおける薬物動態および安全性を予測できる医薬品開発に有用なシステムになり得ると予想される。本研究ではヒト肝細胞キメラマウスの肝 mRNA におけるヒト由来遺伝子の発現量および発現プロファイルをドナー肝 mRNA を比較検討した。また、ヒト肝チトクロム P450(CYP)の主要な分子種である CYP3A4、CYP1A1 および CYP1A2 の誘導について *in vitro* のヘパトサイトレベルで検討した。さらにキメラマウス肝の薬物代謝酵素 CYP について、タンパク発現レベル、酵素活性レベルでの評価を行った。また、マウスにリファンピシンを投与し CYP の誘導能についても評価した。その結果、キメラマウスにおいて得られたヒト型遺伝子の発現プロファイルより、キメラマウス肝がヒト肝としての酵素活性などが十分に機能している可能性が示された。タンパク発現レベルでは、ウエスタンブロット分析を用いて、CYP の主要な分子種である CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4 についてマウスには交差反応を示さず、ヒト特異的に検出する方法を確立し、良好な結果を示した。また、酵素活性レベルでは CYP2C9 が触媒するジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性と CYP2A6 が触媒するクマリン 7-水酸化酵素活性の測定が評価試験として有用であることを明らかにした。現在、さらに多くの分子種についての評価試験を検討している。また、酵素誘導の予備検討として、CYP3A4 の誘導剤であるリファンピシンを投与したヒト肝細胞キメラマウスでヒト CYP3A4 の誘導がタンパク発現レベルで認められた。従って、このヒト肝細胞キメラマウスは、ヒト型の誘導能を有する可能性が示唆された。今後、さらに様々な誘導剤について検討し、キメラマウスの有用性について評価する予定である。さらに、安全性研究へのヒト肝細胞キメラマウスの利用を想定し、ヒトヘパトサイトを用いたアセトアミノフェン(APAP)の毒性について DNA チップを用いた研究の予備検討を終了した。以上、キメラマウスおよびそのヘパトサイトはヒト由来肝として酵素学的な活性および誘導能が十分に機能していることが示された。

分担研究者

中島美紀 金沢大学薬学部・助教授

吉里勝利 広島大学大学院理学

研究科・教授

A. 研究目的

広島県地域結集型共同研究事業（研究統括：広島大学大学院理学研究科 吉里勝利）では、肝障害マウス（uPA マウス：参考文献：Cell, vol.62, 447-456, 1990）と免疫不全マウス（SCID マウス）とを交配させることによって免疫不全肝障害マウス（uPA/SCID マウス）を作出し、この uPA/SCID マウスへヒト肝細胞を移植することにより、マウス肝臓の 80%以上がヒト肝細胞で置換されたヒト肝細胞キメラマウスを作出することに成功した。キメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞はヒト型薬物代謝酵素などのヒト肝細胞機能を保持しているため、このキメラマウスは医薬品開発に重要なヒトにおける薬物動態および安全性を予測するシステムとして利用できると予想される。キメラマウスおよびキメラマウスから分離したヒト肝細胞が、創薬研究に利用可能であるかの基本的な評価研究を行い、さらに、今後多くのキメラマウスを生産し、大学などの研究機関や製薬会社に供給し評価を受ける必要がある。そこで本研究において、ヒト肝細胞キメラマウスの安定供給のための研究とシステム構築を行う。本年度はマウス繁殖システムの構築として（1）

免疫不全肝障害マウスの安定供給システムの構築を行い、また、より効率良くマウスを繁殖させるために（2）免疫不全肝障害マウスの繁殖方法の改良について実験を行った。さらに、ヒト肝細胞キメラマウス由来肝細胞の評価試験として、薬物代謝酵素の誘導剤をキメラマウスに投与し、ヒト型の酵素誘導能について精査する必要がある。ヒト肝細胞キメラマウスは 100%ヒト肝細胞を有する訳ではないため、マウス由来の酵素も誘導される可能性がある。よって、どの程度ヒト特異的な酵素が誘導を受けるか代表的な誘導剤を投与し定量を行う必要がある。そこで本研究では、ヒト肝細胞キメラマウスの評価研究として、（3）ヒト肝細胞キメラマウスのヘパトサイトにおけるヒト薬物動態関連遺伝子の mRNA の発現プロファイルを検討し、さらにヒト肝チトクロム P450（CYP）の主要な分子種である CYP3A4, CYP1A1 および CYP1A2 の誘導について *in vitro* のヘパトサイトレベルで検討した。（4）キメラマウス肝の薬物代謝酵素 CYP についてタンパクレベル、酵素活性レベルでヒト型の酵素活性発現を検討し、評価系の確立を目指して実験を行った。また、キメラマウスに誘導

剤を投与することにより、タンパクレベルおよび酵素活性レベルでの発現変動の定量について実験を行った。さらに、(5) 安全性研究へのヒト肝細胞キメラマウスの利用を想定し、ヒトヘパトサイトを用いたアセトアミノフェン(APAP)の毒性についてDNAチップを用いた研究についての予備検討を実施した。以下、本年度の研究について、(1)～(5)の順に詳述する。

1：免疫不全アルブミンウロキナーゼトランスジェニックマウスの安定供給システムの構築

1-B；研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスは、免疫不全肝障害マウスのホモ個体[uPA(+)+SCID]にヒト肝細胞を移植し作製する。uPA(+)+SCIDは肝障害による発育不全により繁殖に適していないため、現在は免疫不全肝障害マウスのヘテロ個体[uPA(+/-)SCID]同士の交配により行われている。日本チャールスリバーにこの交配および飼育を委託し、uPA(+/-)SCIDを大量にかつ安定に繁殖させるシステム構築することを試みた。

キメラマウス作成に用いたヒト肝細胞

の使用は、広島大学倫理委員会の承諾「課題名；手術等で摘出されたヒト組織から分離したヒト肝細胞を用いた薬物代謝研究（遺伝子解析を含む）」（平成14年6月10日承認）にもとづいて行った。

1-C；研究結果

既に吉里らにより作出されているuPA(+/-)SCIDのオス個体32匹を日本チャールスリバーに搬送し、SCIDマウスのメス個体32匹と交配させた。メスマウス妊娠後、オスマウスはそれぞれ別のメスSCIDマウスと交配させた。日本チャールスリバーにおいてこれまでにこの操作を8回行った。この交配では、uPA(+/-)SCIDの個体が生じる確率はメンデルの法則により2分の1と予想された。生まれたマウスの尾は日本チャールスリバーにて切断され、当施設に送付させた。当施設においてマウスの尾から調整したゲノムDNAを鋳型にしたPCRによりアルブミンウロキナーゼ遺伝子に連結しているヒト成長ホルモン遺伝子の特異的に増幅する解析方法で導入遺伝子の有無について解析を行った。これまでに（平成15年3月12日現在）7回目までの交配で生じた子マウス419個体について解析を行い、197個体のuPA(+/-)SCID（オス：98個体、

メス：110個体)を得た(表1)。予想された通り、uPA(+/-)SCIDが生

じる確率はほぼ2分の1であった。

	♂			♀		
	総数	uPA(+/-)SCID	uPA(+/-)SCID 発生率 (%)	総数	uPA(+/-)SCID	uPA(+/-)SCID 発生率 (%)
1回目	39	17	43.6	46	22	47.8
2回目	37	19	51.4	34	13	38.2
3回目	25	14	56	29	15	51.7
4回目	4	4	100	18	9	50
5回目	25	10	40	17	5	29.4
6回目	34	16	47.1	37	24	64.86
7回目	33	18	54.5	41	22	53.7
合計	197	98	49.74	222	110	49.54

表1 繁殖したマウスの遺伝子型解析の結果

日本チャールスリバーにおけるこれまでのマウスの繁殖は当初の予定通りに進行しており、現在得られたuPA(+/-)SCIDのオスマウスとメスマウスを順次交配に用いている

1-D. 考察

現在、日本チャールスリバーにおいて、得られたuPA(+/-)SCIDどうしを交配させており、3月17日以降妊娠uPA(+/-)SCIDメスマウスとuPA(+/-)SCIDオスマウスが10匹ずつ日本チャールスリバーから搬入される。これまでの経験から妊娠マウス1匹から平均6匹のマウスが生まれることが予想され、毎週60個

体のマウスが得られる予定である。また、得られるマウスの約4分の1がuPA(+/+)SCIDであると予想され、毎週15個体のuPA(+/+)SCIDが得られる計算になる。今後は、生まれたマウスについて、uPA(+/-)SCIDとuPA(-)SCIDをPCRで判別した後、に定量性PCRによりuPA(+/-)SCIDとuPA(+/+)SCIDを判別する予定である。

1-E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウス作製に用いる免疫不全肝障害マウスを安定に供給するシステムを構築した。

2：免疫不全アルブミンウロキナーゼトランスジェニックマウスの繁殖方法の改良

2-B. 研究方法

免疫不全肝障害マウスのホモ個体[uPA(+)+SCID]はヘテロ個体[uPA(+/-)SCID]同士を交配することにより得ているが、ホモ個体は生まれた個体の4分の1しか得られない。そこで、より高効率にuPA(+)+SCIDが得られる繁殖方法について検討した。

uPA(+)+SCIDは肝障害による発育不全を呈し、繁殖に適していない。これまでの報告により正常マウスの肝細胞をuPA(+)+マウスに移植すると、速やかにuPA(+)+マウスの障害肝は、移植した正常マウスの肝細胞で置換される(Science, 263; 1149-1152, 1994)。そこでuPA(+)+SCIDに肝障害の無いuPA(-)SCIDマウスの肝細胞を移植し発育不全を改善させることにより、繁殖可能になるまで性成熟させ、それらのマウスを交配させることを計画した。コラゲナーゼ灌流法によりuPA(-)SCIDマウスの肝細胞を調整し、uPA(+)+SCIDマウスに一匹当たり 5×10^5 個のマウス肝細胞を脾臓経由で移植した。これらのマウスを用いて交配実験を行った。

2-C. 研究結果

マウス肝細胞を移植したuPA(+)+SCIDオス個体の生殖能力を調べたため、uPA(+)+SCIDオス個体とuPA(+/-)SCIDメス個体を8組交配させた。5組で妊娠が確認され4匹が分娩した。生まれた子マウスのうち4匹が食殺され、14匹が生き残った。これらのマウスに関して遺伝子型の解析を行った結果、予想通り2分の1以上の確率でuPA(+)+SCIDの個体が得られた。これらのことからマウス肝細胞を移植したuPA(+/-)SCIDオス個体は移植を受けていない個体より高い生殖能力をもっていることが示された。したがって、この方法で効率良くuPA(+)+SCIDを繁殖出来ることが分かった。

次に、マウス肝細胞を移植したuPA(+)+SCIDどうしで交配実験を行った。5組交配させた結果、これまでに2組で妊娠が確認され分娩にまで至り、11匹の子マウスが誕生し、現在4個体が生存している。このマウスに関してはまだ生まれて間もないため、遺伝子型の解析を行っていない。交配に用いたメス個体の体重は平均(約20グラム)より少なかった(約15グラム)為か、生まれた子マウスはuPA(+/-)SCID同士またはuPA(+/-)SCIDとuPA(+)+SC

ID の交配の交配で生まれた子マウスと比較し小さかった。

2-D. 考察

uPA(+/+)SCID 同士の交配でも繁殖可能であることが示唆された。繁殖に用いるメス個体は体重も十分増加し、体力的にも妊娠および分娩に耐えられる個体を用いることが必要であろうと思われた。uPA(+/+)SCID 同士を交配した場合、生じる全ての個体が uPA(+/+)SCID となる。このことを今後生まれるマウスの遺伝子型を解析し、確認する必要がある。予想通りであれば、これまでの繁殖方法と比較し uPA(+/+)SCID が 4 倍の効率で得られることとなる。

2-E. 結論

uPA(+/+)SCID マウスに正常マウス肝細胞を移植し繁殖に用いることにより、これまでの繁殖方法と比較して高効率で uPA(+/+)SCID を得ることが可能となった。

3：ヒト肝細胞キメラマウスのヘパトサイトにおける薬物動態関連遺伝子の発現と誘導の検討

3-B 研究方法

3-B-1. ヒト肝細胞キメラマウス

由来ヘパトサイトの培養と薬物暴露

ヒト肝細胞キメラマウスのヘパトサイトは、凍結保存されたものを解凍して使用した。解凍後すぐにヘパトサイト培養メEDIUMにて遠心分離洗浄した。トリパンブルーによる色素排出試験で、生細胞を計数し、細胞数 1.0×10^5 cells/0.4 ml/24 well プレート蒔き、5%CO₂ 存在下 37°C で培養した。3 時間、24 時間、48 時間および 72 時間後に培地を交換した。各時間において経時的な mRNA の発現変化の検討試料を作成した。

キメラマウスの研究に関しては、金沢大学の医学部等医の倫理委員会において（課題名；ヒト肝細胞キメラマウスを用いた医薬品の動態及び安全性予測システムの構築）、平成 14 年 9 月 10 日に承認を受けている。ドナーは、12 歳の日本人男性であり、手術時の余剰肝切片からコラゲナーゼ法により採取した。対照とした凍結ヒトヘパトサイトは、In Vitro Technologies, Inc から購入した。74 歳白人の女性由来である。解凍時の viability は、それぞれ 60.1% と 89.0% であった。

ヘパトサイトへの薬物暴露による CYP 誘導実験については、下記の

ように行った。先の培養条件の 48 時間から 72 時間までの 24 時間に、1 μ M または 5 μ M β -ナフトフラボン、10 μ M または 50 μ M のリファンピシンを暴露し、暴露時間終了直後に RNA を調製した。

2. ヒト肝細胞キメラマウスヘパトサイトからの total RNA の調製と Real-time PCR による遺伝子発現解析

ヒト肝細胞キメラマウスの肝より total RNA を常法により調製後、TaqMan 法による Real-time PCR を行った。

3-C. 研果結果

3-C-1. ドナー肝とキメラ肝における薬物動態関連遺伝子の発現量

キメラマウス肝およびドナー肝から mRNA を調製し、薬物動態関連遺伝子の発現比を検討した。表 2 において、1.0 以上は、キメラマウス肝がドナー肝よりも発現量が多かった遺伝子を、1.0 以下は、キメラマウス肝が、ドナー肝よりも発現量が低い遺伝子名を示している。特に CYP8A1 (P450 の 8A1 分子種)、SULT1B1 (硫酸抱合酵素の 1B1 分

子種)、ALDH3 (アルデヒド脱水素酵素 3) は、キメラマウスにおいて高い発現が認められた。一報、FMO5 (フラビン含有モノオキシゲナーゼ 5)、ABCB2 (トランスポーターの分子種) や CYP3A7 (ヒト胎児発現方 CYP3A 分子種) などはドナーよりも 1/5 以下の発現量に留まった。しかし、全体的には殆どの遺伝子の発現量がドナーよりも少し低い程度であり、ヒトの肝の機能を十分に再現しているものと考えられた。

3-C-2. 代表的 CYP の mRNA の変化

図 1 と図 2 に CYP3A4、CYP1A1 と CYP1A2 の発現量の経時的変化を示す。CYP3A4 は最初の 3 時間で発現量が大きく減少したが、その後 72 時間まで緩やかな減少を示した。CYP1A1 は最初の 3 時間で発現量が少し上昇し、その後も 72 時間まで大きな変化は示さなかった。CYP1A2 は最初の 3 時間でキメラのヘパトサイトで減少が大きかったが、その後は、緩やかな減少にとどまった。以上のいずれの分子種の発現も対照群のヒトヘパトサイトよりも活性が高く、良好な結果を示した。

Table 2. Expression ratio of human hepatic mRNA in the chimeric mouse to that from donor.

(Chimeric mouse/Human)	Total number of genes
4.0 CYP8A1, SULT1B1, ALDH3	3
2.0 CYP51, ADH7, UGT1, NAT2, ABCB4, ABCB6	6
1.0 CYP2E1, MGST1, CES1, GSTA2, EPHX1, CST, ABCA2, SLC22A3, TPST2	9
0.8 CYP1B1, CES2, SLC22A5, ADH1, PIG3, ADH2, HADH2, ABCF2, albumin, ALDH2, CYP8B1, NMOR2, SLC22A1, ALDH4, transferrin, OATP2, CYP1A1, MAOB, CYP4F2, CYP27, ABCD1, ALDH1, CYP1A2, ABCB7, ABCB8, ALDH10, EPHX2, GAPDH, ABCB11, AADAC, ADH3, CYP26A1, ABCC9, UGT2B10, ABCB1, ADH4, CYP2D6, SULT2A1, ABCC6, ABCB9, NTE, ABCD3, BAAT, UGT1A9, CYP2J2	45
0.5 AOX1, MGST2, UCHL3, COMT, ALDH5, GSTA4, ALDH9, ABCC3, ADH6, PNMT, GSTT1, NAT1, UGT2B17, MGST3, ABCE1, TPMT, ABCG2, CYP2C18, GSTM4, FMO3, GAMT, GSTM3, ABCB3, ABCA4, ESD, ABCC2, CYP39A1, GSTZ1, CYP4F3, ADH5, PEMT, XDH, ARD1, CYP2C9, ABCF1, MAOA, ASMT, CYP46, DPYD, CYP3A5, CYP2C8, HNMT, CYP4A11, FMO4, ABCA8, CYP3A4, FMO5, ABCB2, LIPA, HEP27, CYP3A7	51
0.2 CYP7B1, β -actin, ABCA1, UCHL1, GSTP1, TPST1, CYP2B6, ABCC5, ALDH6, CYP2C19, ABCG1, CHST4, NNMT, CYP5A1, PTGS2, CHST3, CYP2A6, PTGS1, CHST1, CHST2, UGT2B11, ABCC1	22
0.0	

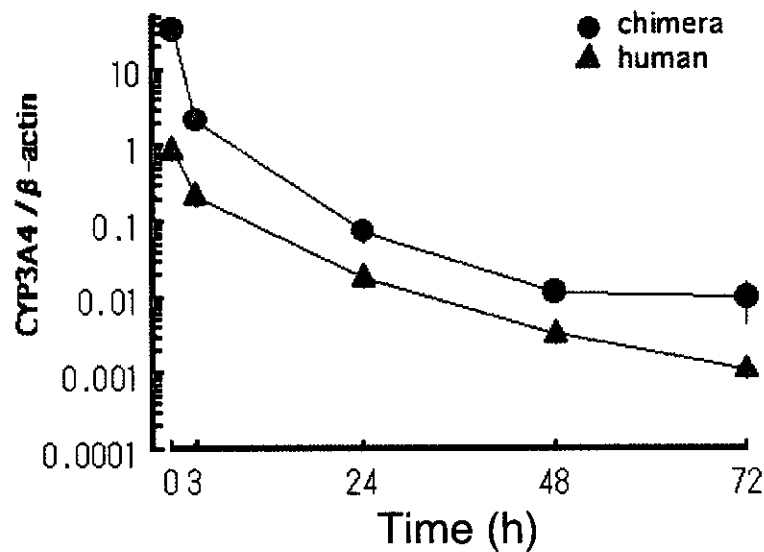


Fig. 1. Time dependent changes of the CYP3A4 expression in chimera mouse and control human hepatocytes.

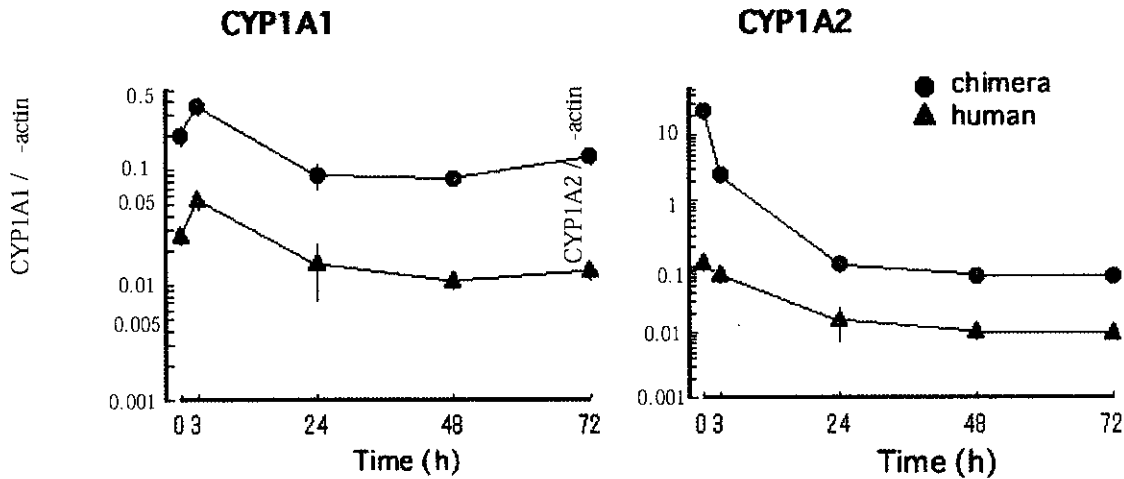


Fig. 2. Time dependent changes of the CYP1A1 and CYP1A2 expression in chimera mouse and control human hepatocytes.

3-C-3. β -ナフトフラボン暴露による CYP1A の誘導

1 μ M または 5 μ M β -ナフトフラボン暴露により、CYP1A1 は、濃度依存的に発現量が増加した (Fig. 3)。同様に CYP1A2 もほぼ同様の誘導を示した。しかし、図 3 の右に示すように、キメラマウスでは、ヒトヘパトサイトよりの誘導能が著しく低下していた。

3-C-4. リファンピシン暴露による CYP3A4 の誘導

10 μ M または 50 μ M のリファンピシン暴露による CYP3A4 の誘導について図 4 に示す。濃度依存的な誘導が認められ、さらに対照群のヒトヘ

パトサイトとほぼ同様の値を示した。

3-D. 考察

今回使用したヒト肝細胞キメラマウスは、マウスの肝細胞全体の約 80% がヒト肝細胞に置き換わったものである。ヘパトサイト調製時の生存率は 83.7% であったが、実験時の解凍後には 60.1% であった。調製時の生存率が少々低いこと、さらに解凍時にもさらに生存率が低いことの直接の理由は不明であるが、今後、生存率の高い調製方法、および凍結手法を導入する必要がある。

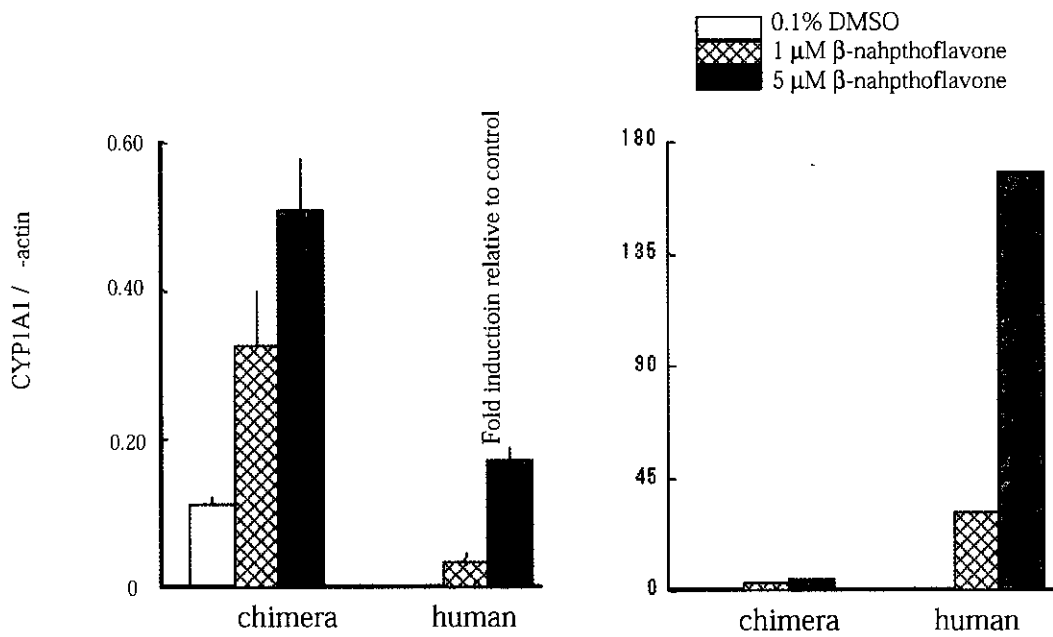


Fig. 3. Induction of CYP1A1mRNA with exposure of β-naphthoflavone in chimera mouse liver.

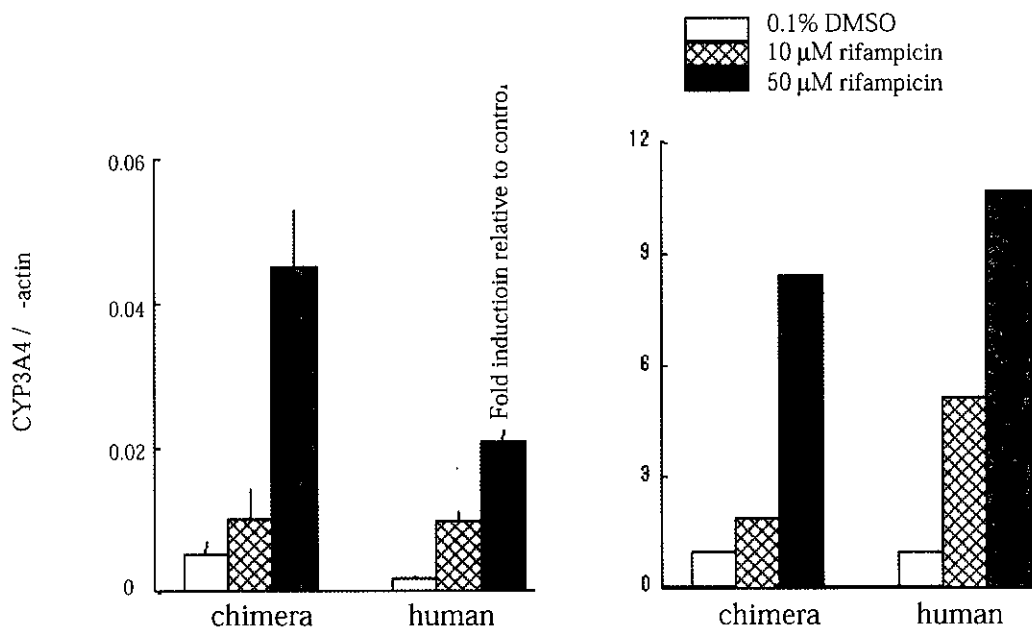


Fig. 4. Induction of CYP3A4mRNA with exposure of rifampicin in chimera mouse liver.

ドナー肝の mRNA の発現量とキメラマウスの比較（表 2）では、特定の酵素群が発現が低いという傾向は認められなかった。全体に 60% から 80% の発現量がキメラマウスに認められたことより、薬物動態や毒性について、ヒト特異的肝としての反応が充分期待できると考えられる。しかし、今後例数を追加し、同一ドナー由来ヘパトサイトを異なるキメラマウスで作成する検討、さらに、異なるドナー由来肝の遺伝子の発現の普遍性の有無を詳細に検討する必要がある。

CYP1A1 と CYP1A2 は 24 時間まで減少を示すが、誘導試験を行う 48 時間から 72 時間ではその発現量が変わりなかった。これにより CYP1A 分子種の誘導については適切な評価が可能であると考えられた。CYP1A1 と CYP1A2 の誘導はいずれも同様の傾向を示したが、対照群のヒトヘパトサイトに比べ、キメラヘパトサイトでは誘導能が著しく低下していた。この原因は不明であるが、凍結時および解凍後の生存率が比較的低いことが影響している可能性がある。今後さらに例数を増やして検討する必要がある。一方、リファンピシンによる CYP3A4 の誘導については、対照群と同様の誘導率を示したことよ

り、CYP3A4 の誘導については、キメラヘパトサイトで十分に代用できる可能性が示されたと考えられる。今後、他の誘導剤を用いて詳細に検討する必要がある。

3-E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスのヘパトサイトについて薬物動態関連遺伝子を中心に肝 mRNA の発現解析を行い、ドナーの肝 mRNA と比較した。その結果キメラマウス肝は、ドナー肝よりも全体的に mRNA の発現が少し低いものの、ヒト肝として充分い機能している可能性が示された。さらに、ヒト肝の代表的な薬物代謝酵素である CYP1A1、CYP1A2 および CYP3A4 の誘導を認めたことより、キメラのヘパトサイトは、ヒトヘパトサイトとして充分に使用できる可能性が示された。今後さらに様々な誘導剤について検討し、キメラマウスにおけるヒト特異的酵素の機能の評価について更なる検討が必要である。

4 ; 薬物代謝酵素 CYP のタンパクレベル、酵素活性レベルでの検討

4-B. 研究方法

4-B-1. 評価試験の検討

【タンパクレベル】

マウスに交差反応することなくヒト CYP を特異的に検出できる評価系について、様々な抗体を用いてウエスタンブロット分析にて検討した。抗体は、CYP1A2 に対するマウスモノクローナル抗体、ウサギ抗ヒト CYP1A2 抗体、ヒト CYP2A6 に対するマウスモノクローナル抗体、ウサギ抗ヒト CYP2C8、ウサギ抗ヒト CYP2C9、ウサギ抗ヒト CYP2C19、ヒト CYP2D6 に対するマウスモノクローナル抗体、ヒト CYP2E1 に対するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗ヒト CYP3A4 を検討した。

【酵素活性レベル】

主要なヒト CYP 分子種が触媒する反応について、マウスに交差反応することなくヒト CYP で特異的に触媒されるかを確認するために HPLC や蛍光光度計を用いて検討を行なった。酵素活性は、各代表的なヒト CYP の指標活性である 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性 (CYP1A2)、フェナセチン *O*-脱エチル化酵素活性 (CYP1A2)、ク

マリン 7-水酸化酵素活性 (CYP2A6)、ベンジルオキシレゾルフィン *O*-脱アルキル化酵素活性 (CYP2B6)、ジクロフェナク 4-水酸化酵素活性 (CYP2C9)、*S*-メフェニトイン 4-水酸化酵素活性 (CYP2C19)、デブリソキン 4-水酸化酵素活性 (CYP2D6)、クロルゾキサゾン 7-水酸化酵素活性 (CYP2E1)、テストステロン 6 β -水酸化酵素活性 (CYP3A4) の9種類について検討した。

4-B-2 誘導剤投与によるタンパクおよび酵素活性の変動

【薬物投与】

ヒト肝細胞キメラマウス、uPA(+/-)SCID マウス、uPA(-/-)SCID マウスにコーン油に溶解したリファンピシンを 50 mg/kg で連続して4日間腹腔内投与した。全て雄性のマウスを用いた。リファンピシン投与マウスにはフサンも投与した。コントロールとしてヒト肝細胞キメラマウス、uPA(+/-)SCID マウス、uPA(-/-)SCID マウスに4日間フサンのみを腹腔内投与した群、また、uPA(+/-)SCID マウスと uPA(-/-)SCID マウスは薬物未処置群も検討した。本研究で用いたヒト肝細胞キメラマウス作製に際し、移植に使用したヒトヘパトサイトは同一ドナー由来の

ものを用いた。uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-/-)SCID マウスは各群 3 例以上とした。

【ウエスタンプロット分析による CYP3A4 タンパク量の定量】

方法は項目 1. 評価試験の検討に準じた。ただし、タンパクは 5 µg アプライとし、1 次抗体のウサギ抗ヒト CYP3A4 は PBS で 1,000 倍希釈した。バキュロウイルス発現系 CYP3A4 を標準品として用いた。代表的なヒト肝ミクロソームにおける CYP3A4 含有量として、Gentest 社製のプールドヒト肝ミクロソーム (lot.21) を用いた。また、ヒト肝細胞キメラマウス作製時に使用したヒト肝ヘパトサイトのドナーの肝ミクロソームについてもあわせて検討した。発色後の膜を流水で十分に洗浄し、Bio-Rad GS-700 デンシトメーターにて定量した。

【倫理】

キメラマウス作成に用いたヒト肝細胞の使用については、広島大学倫理委員会の承諾「課題名；手術等で摘出されたヒト組織から分離したヒト肝細胞を用いた薬物代謝研究（遺伝子解析を含む）」（平成 14 年 6 月 10 日承認）にもとづいている。さらに、金沢大学の医学部等医の倫理委員会において（課題名；ヒト肝細

胞キメラマウスを用いた医薬品の動態及び安全性予測システムの構築）、平成 14 年 9 月 10 日に承認を受けている。ドナーは、12 歳の日本人男性であり、手術時の余剰肝切片からコラゲナーゼ法により採取した。

4-C. 研果結果

1. 評価試験の検討

【タンパクレベル】

市販されている抗体を用いてウエスタンプロット分析した結果を Fig. 5 に示す。

・ CYP1A2

マウスモノクローナル抗体を用いた場合、バキュロウイルス発現系ヒト CYP1A2 のバンドは検出できたが、ヒト、マウスもいずれの肝ミクロソームでも検出できなかった。これに対し、ウサギ抗ヒト CYP1A2 抗体を用いた場合、ヒトのみバンドが認められた。

・ CYP2A6

ヒト、マウスともにバンドが認められた。

・ CYP2C8

ヒトでのみバンドが認められた。また、CYP2C9 および CYP2C19 タンパクにこの抗体が反応しないことを確認した。

・ CYP2C9

ヒトでのみバンドが認められた。

また、CYP2C8 および CYP2C19 タンパクにこの抗体が反応しないことを確認した。

・ CYP2C19

パキユロウイルス発現系ヒト CYP2C19 ではバンドが検出できたが、ヒトおよびマウス肝ミクロソームではバンドが認められなかった。

・ CYP2D6

ヒトでのみバンドが検出できた。

・ CYP2E1

ヒト CYP2E1 に対するマウスモノクローナル抗体を用いたが、パキユロウイルス発現系ヒト CYP2E1 でもバンドは検出されなかった。そのほかに検出されたバンドはヒトにもマウスにも認められたため、非特異的なバンドであると判断した。

・ CYP3A4

ヒトにのみバンドが認められた。

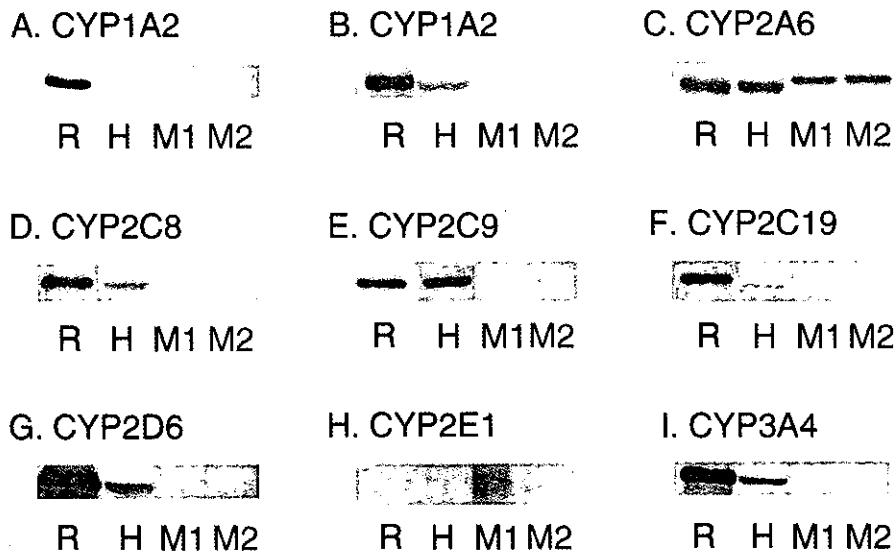


Fig. 5. Immunoblot analysis of liver microsomes from human and mouse using anti-human CYP antibodies.

R: recombinant human CYP, H: human, M1: AhR(+/-) mouse, M2: Cyp1a2/1b1 mouse.

【酵素活性レベル】

各酵素活性の結果を Fig. 6 に示す。

・ 7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化 (CYP1A2)

ヒトよりもむしろマウスで高い活性が認められた。

・ フェナセチン *O*-脱エチル化酵素

活性 (CYP1A2)

ヒトよりもむしろマウスで高い活性が認められた。

・ クマリン 7-水酸化酵素活性 (CYP2A6)

マウスにおいて系統間でわずかに差が認められたが、ヒトと比べるとともに約 1/10 程度であり、ヒトで

の活性が顕著に高かった。

・ベンジルオキシレゾルフィン *O*-
脱アルキル化酵素活性 (CYP2B6)

ヒトとマウスで活性に差は認められなかった。

・ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性 (CYP2C9)

マウスにおいて系統間での差が認められたが、ヒトと比較した場合マウスの活性は低く、ヒトでの活性が顕著に高かった。ヒトと AhR(+/+)マウスの活性を比較すると 53 倍、Cyp1a2/1b1 マウスの活性を比較すると 7.2 倍、ヒトの活性が高かった。

・*S*-メフェニトイン 4-水酸化酵素活性 (CYP2C19)

マウスではともに検出できなかったが、ヒトでは活性が認められた。

・デブリソキン 4-水酸化酵素活性

(CYP2D6)

ヒト、マウスともに活性が認められた。AhR(+/+)マウスと比較すると 2.9 倍、Cyp1a2/1b1 マウスと比較すると 1.5 倍、ヒトでの活性が高かった。マウスでは系統間に差が認められた。

・クロルゾキサゾン 7-水酸化酵素活性 (CYP2E1)

ヒトよりもむしろマウスで高い活性が認められた。

・テストステロン 6β-水酸化酵素活性 (CYP3A4)

ヒト、マウスともに活性が認められた。AhR(+/+)マウスと比較すると 8.6 倍、Cyp1a2/1b1 マウスと比較すると 2.6 倍、ヒトでの活性が高かった。マウスでは系統間に差が認められた。

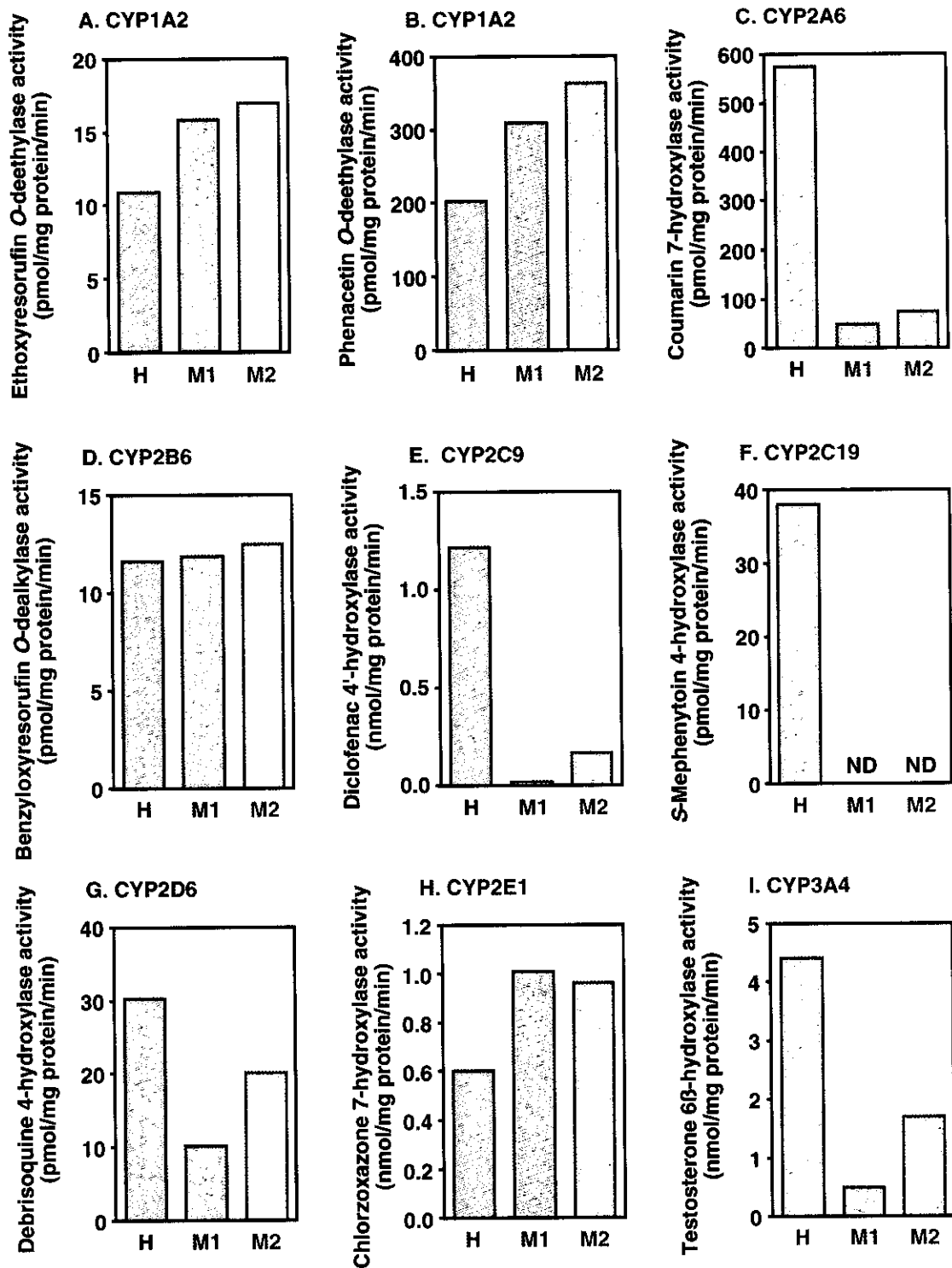


Fig. 6. CYP activities in liver microsomes from human and mouse.
H: human, M1: AhR(+/+) mouse, M2: Cyp1a2/1b1(+/+) mouse, ND: not detected.

2. 誘導剤投与によるタンパクおよび酵素活性の変動 -予備検討-

【ウエスタンブロット分析によるCYP3A4タンパク量の定量】

ヒト肝細胞キメラマウス、
uPA(+/-)SCID マウス、uPA(-/-)SCID
マウスの肝ミクロソームを用いて、
CYP3A4の定量を行った。結果をFig.
7に示す。

・ヒト肝細胞キメラマウスと
uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-
/-)SCID マウスとの比較

ウエスタンブロット分析において、
ウサギ抗ヒト CYP3A4 抗体はマウ
ス Cyp3a タンパクに対して交差反
応しないことを確認しているため、
検出できたタンパクはヒト CYP3A4
である。ドナーの CYP3A4 含量は
プールドヒト肝ミクロソームの 2.3
倍であった。ヒト特異的サイトケラ
チンによる免疫染色より得られたヒ
トへの置換率 (RI 値) が 0%および
31%のヒト肝細胞キメラマウスでは
CYP3A4 タンパクは検出できなかつ

たが、CYP3A4 量は RI 値に比例し
て上昇した。uPA(+/-)SCID および
uPA(-/-)SCID マウスではフサン投与
の有無に関わらず、CYP3A4 タンパ
クは認められなかった。

・リファンピシン投与による
CYP3A4 タンパク量の変動

uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-
/-)SCID マウスにおいて、リファン
ピシン投与の有無に関わらず
CYP3A4 タンパクは検出できなかつ
た。これに対し、リファンピシンを
投与したヒト肝細胞キメラマウスは
RI 値が 45%程度であるが、リファ
ンピシンを投与していない C5

(RI=89%) よりも発現量が高かつ
た。RI 値が近似している C4 と比較
して、C6、C7、C8 では約 2.5 倍の
上昇が認められた。