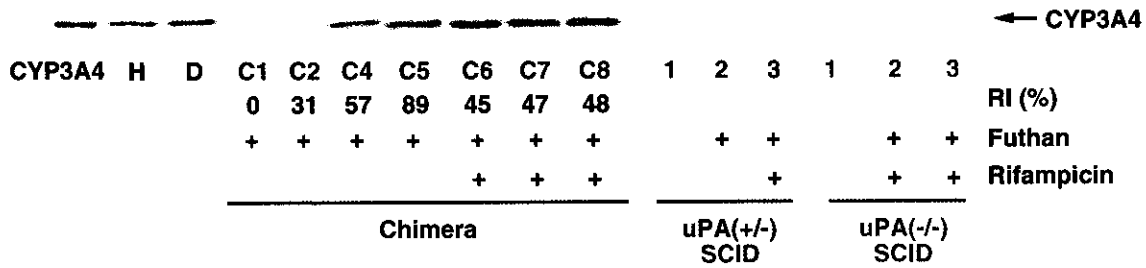


A. Immunoblot analysis



B. CYP3A4 content

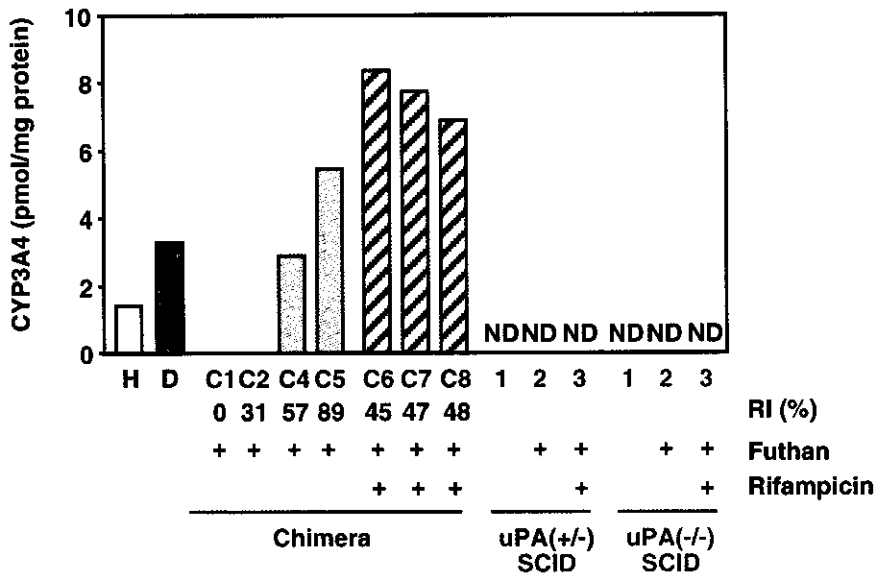


Fig. 7. Immunoblot analysis of liver microsomes from chimeric mouse, uPA(+/-)SCID mouse and uPA(-/-)SCID mouse using anti-human CYP3A4 antibodies. CYP3A4 protein detected by Western blotting (A) and quantification of the CYP3A4 protein (B). H: pooled human liver microsomes from Gentest, D: liver microsomes from donor, RI: repopulation index, ND: not detected.

【ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性】

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、CYP2C9 の指標活性であるジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性を測定した結果を Fig. 8 に示す。

Gentest 社製のプールドヒト肝ミクロソームと比較してドナー肝ミクロソームでは活性値が約 1/3 であった。1. 評価試験時におけるヒト肝ミクロソームの活性値と異なるが、ロット差によるものと考えられる。

・フサンの影響

uPA(+/-)SCID マウスと uPA(-/-)

1-)-SCID マウスを用いて、ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性に及ぼすフサンの影響を検討した。

uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-/-)SCID マウスともに、フサン投与群と未処置群で顕著な差は認められなかった。

・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

ヒト肝細胞キメラマウスでは uPA(+/-)SCID マウスや uPA(-/-)SCID マウスと比べて、ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性は高く、RI 値と相関が認められた。C5 (RI=89%) で

はドナーと比較すると活性が 2.5 倍増加した。また、uPA(+/-)SCID マウスと uPA(-/-)SCID マウスで活性に差は認められなかった。

・リファンピシン投与による酵素活性の変動

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群とフサン投与群で、活性に変化は認められなかった。ヒト肝細胞キメラマウスのリファンピシン投与群 (C6、C7、C8) では RI 値が近似している C3 (RI=52%) と比較すると、約 2 倍の上昇が認められた。

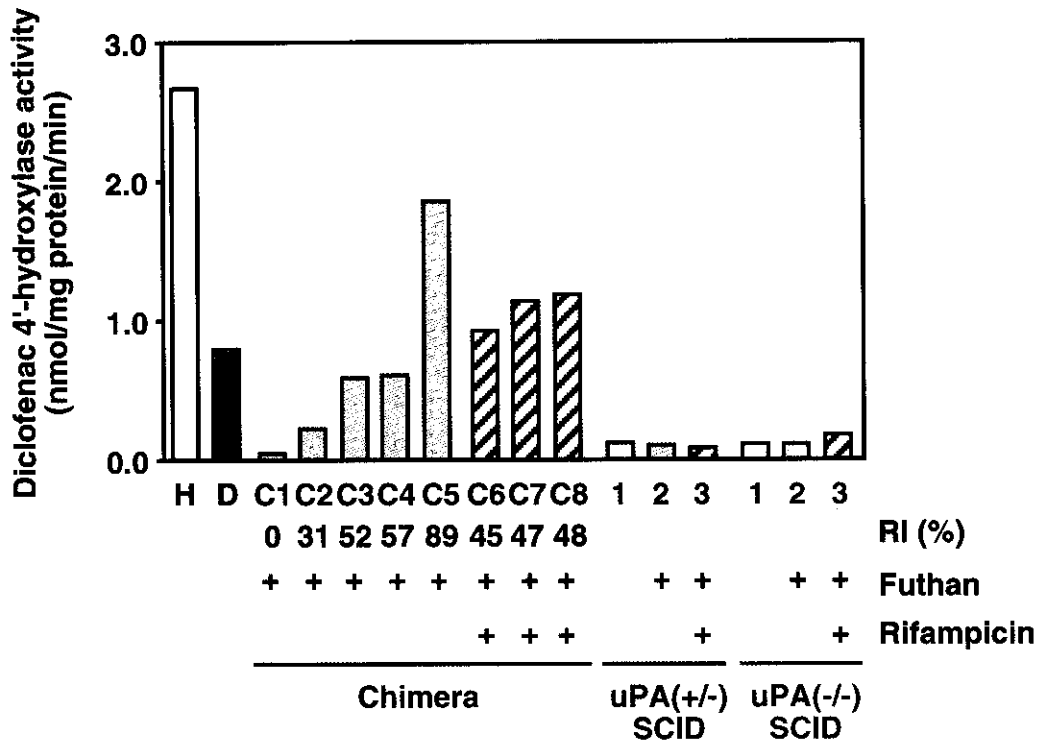


Fig. 8. Diclofenac 4'-hydroxylase activity in liver microsomes from chimeric mouse, uPA(+/-)SCID mouse and uPA(-/-)SCID mouse. Diclofenac 4'-hydroxylase activity was determined at 30 μ M diclofenac. H: pooled human liver microsomes from Gentest, D: liver microsomes from donor, RI: repopulation index

【クマリン7-水酸化酵素活性】

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、CYP2A6 の指標活性であるクマリン7-水酸化酵素活性を測定した結果を Fig. 9 に示す。Gentest 社製のプールドヒト肝ミクロソームでは活性が認められたが、ドナーの肝ミクロソームでは活性が検出できなかった。

・フサンの影響

uPA(+/-)SCID マウスと uPA(-/-)SCID マウスを用いて、クマリン

7-水酸化酵素活性に及ぼすフサンの影響を検討した。uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-/-)SCID マウスとともに、フサン投与群と未処置群で顕著な差は認められなかった。

・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

ヒト肝細胞キメラマウスではクマリン7-水酸化酵素活性は全てのサンプルにおいて認められなかった。また、Gentest 社製のプールドヒト肝ミクロソームと比較した場合、

uPA(+/-)SCID マウスや uPA(-/-)SCID マウスでは活性値は約 1/30 であった。また、uPA(+/-)SCID マウスと uPA(-/-)SCID マウスで活性に差は認められなかった。

・リファンピシン投与による酵素活

性の変動

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群とフサン投与群で、活性に変化は認められなかった。

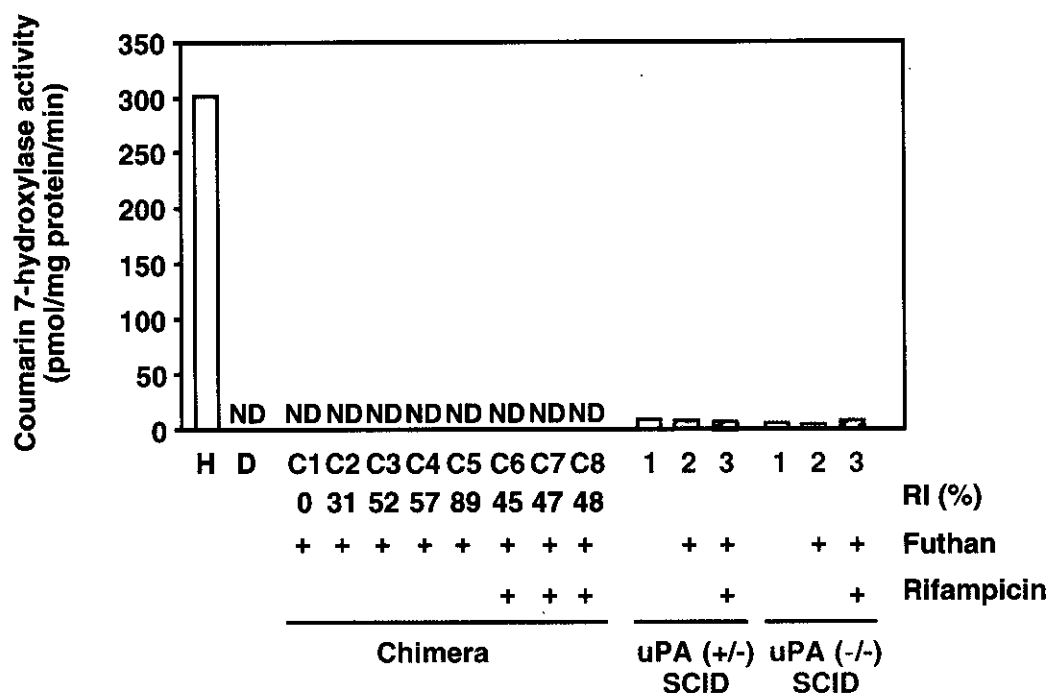


Fig. 9. Coumarin 7-hydroxylase activity in liver microsomes from chimeric mouse, uPA(+/-)SCID mouse and uPA(-/-)SCID mouse. Coumarin 7-hydroxylase activity was determined at 1 μ M coumarin. H: pooled human liver microsomes from Gentest, D: liver microsomes from donor, RI: repopulation index

4-D. 考察

1. 評価試験の検討に関する考察

【タンパクレベルでの考察】

現在のところウエスタンブロット分析でヒトとマウスの種差を検討した報告はなされていない。そこで、市販されている抗体を用いて、マウ

ス Cyp に交差反応することなくヒト CYP を特異的に検出できるか検討した。この結果、使用した抗体のうち CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4 はヒト特異的であることが明らかになった。従って、これらの抗体を用いてウエスタンブ

ロット分析を行うことにより、ヒト CYP のみ検出する評価試験を行うことは可能である。しかし、CYP2A6、CYP2C19、CYP2E1 についてはヒト特異的ではなかった。CY2A6 についてはヒト (CYP2A6) とマウス (Cyp2a5) でタンパクの移動度がわずかに異なったため、分子量が異なることが予測される。データは示さないが、アクリルアミドゲルの濃度を 12%まで上昇させて検討したが、ヒトとマウスのタンパクを分離することはできなかった。CYP2A6 と CYP2E1 に関しては、本研究では Gentest 社製の抗体を使用した。他のメーカーからも市販されているので、検討する必要があるかもしれない。ただし、CYP2C19 については Gentest 社以外で市販されていないので、CYP2C9 はタンパクレベルでの評価を行うことは困難であると考えられる。

本結果より CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6 および CYP3A4 タンパクの定性的な確認は可能であるが、発現系ミクロソームを用いて定量性についてもさらに確認を行う予定である。

【酵素活性レベルでの考察】

ヒト CYP についての代表的な指標活性 9 種類について、ヒト特異性を検討した。ヒトとマウスで 10 倍

以上の顕著な差が認められた反応はクマリン 7-水酸化酵素活性とジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性および S-メフェニトイン 4-水酸化酵素活性の 3 種であった。

クマリン 7-水酸化はマウスでは Cyp2a5 が、ヒトでは CYP2A6 が触媒すると報告されている (Maenpaa et al., 1993)。Bogaards ら (2000) の報告によると、Km 値はヒトで 4.4 μM 、マウスで 6.1 μM であるが、Vmax 値はヒトで 1275 pmol/mg protein/min、マウスで 51 pmol/mg protein/min と 25 倍の差が認められた。従って、クマリン 7-水酸化酵素活性はヒトとマウスの活性の差が大きく、ヒト化の評価に有用であると考えられる。

ヒト肝ミクロソームやヒト CYP2C9 発現系でジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性は認められたが、C57BL/SJL マウス、ACCA マウス、ob/ob マウス、mdr1a/1b(-/-)マウス、FVB/N マウスでは検出できなかったと報告されている (Mankowski et al., 2000)。また、Bogaards ら (2000) の報告では、B6C3F マウス肝ミクロソームではジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性が認められたが、ヒトにおける Vmax 値はマウスの約 10-20 倍であった。本結果ではヒトの活性値はマウスの 7.2-53 倍とマウ

スの系統間で差異が認められたものの、Bogaards らの報告と一致した。従って、肝ミクロソームでのジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性はヒトとマウスを区別する適切な指標であることが示唆された。

また、S-メフェニトイン 4-水酸化反応はヒト肝でもマウス肝でも触媒されるが (Yasumori et al., 1993)、マウスでは系統差が大きいと報告されている (Mankowski et al., 2000)。マウスに関しては二相性を示す系統もあり、Vmax 値も系統間で 8 倍の差 (0.09~0.72 nmol/min/nmolCYP) が認められている。従って、検討に用いた AhR(+/+) マウスと Cyp1a2/1b1 マウスは活性が低い系統だった可能性も考えられるが、uPA(+/+)SCID マウスや uPA(+/-)SCID マウスで活性値を検討する必要がある。なお、Mankowski らの報告ではヒトの Km 値は 40 μ M、Vmax 値は 0.5 nmol/min/nmolCYP であった。

デブリソキン 4-水酸化はマウスで認められなかったとの報告がある (Masubuchi et al., 1997)。しかし、本結果ではヒトと比較すると低い、活性が認められた。系統差がある可能性も示唆されるが、Masubuchi らの報告ではデブリソキンが 2 mM と極めて高いため、実験条件が影響し

ている可能性も否定できない。従ってデブリソキン濃度を上げて活性を測定した場合、ヒトとマウスで差が認められる可能性がある。

テストステロンの 6 β -水酸化はヒト、マウスともに主代謝経路である。Bogaards ら (2000) により、Km 値はヒトでは 72 μ M、マウスでは 99 μ M、Vmax 値はそれぞれ 5.31 nmol/mg protein/min、2.73 nmol/mg protein/min であり、Km 値は類似しているが、Vmax 値は約 2 倍ヒトで高いと報告された。マウスの系統差も認められたため、uPA(+/-)SCID マウスや uPA(-/-)SCID マウスでどの程度活性を有しているのか検討する必要はあるが、活性の差が 2 倍程度であるとすれば、ヒト特異的な酵素活性と判断できないと考えられる。CYP3A4 酵素活性は CYP のなかで最も重要であるため、さらにヒトとマウスで種差を有する基質について更なる検討が必要であろう。

以上より、クマリン 7-水酸化酵素活性とジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性を測定することは、ヒト肝細胞キメラマウスのヒト化が薬物代謝酵素活性の観点から評価できる有用な評価方法であると考えられる。今後さらにヒト特異的な反応について検討予定である。

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 タンパク量の定量に関する考察】

ヒトにおいて CYP3A サブファミリーは CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、CYP3A43 の 4 種が報告されている。CYP3A4 はヒト肝における主要な CYP 分子種であり、総 CYP の約 1/3 を占めている。また、市販されている薬物の約半数が CYP3A4 により代謝されると言われているため、薬物動態学に最も重要な酵素の一つである。従って、薬物動態学的な研究にこのヒト肝細胞キメラマウスの利用が可能か判断するために、CYP3A4 について検討することは非常に重要であると考えられる。従って、CYP3A4 の代表的な誘導剤であるリファンピシンをヒト肝細胞キメラマウスに投与し、誘導剤の影響を検討することにした。本研究で使用したウサギ抗ヒト CYP3A4 抗体はマウス Cyp3a 分子種には交差反応を示さないことを確認したため、この方法は CYP3A4 発現の評価系として有用であると考えられる。また、あらかじめ予備検討を行い、バキュロウイルス発現系 CYP3A4 を用いて本実験条件で 10 fmol から 50 fmol の間で直線性を確認した。従って、

ヒトおよびマウスのマイクロソームは 10-50 fmol アプライできる量を選択した。

CYP3A4 タンパクについて、Gentest 社製のヒト肝マイクロソームよりドナーの CYP3A4 発現量は高かったが、個体差によるものと考えられる。

・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

ヒト肝細胞キメラマウスにおける CYP3A4 タンパク量は RI 値と相関が認められた。マウス C5 についてはドナーのタンパク量よりも高い値を示したため、移植したマウスの肝臓で CYP3A4 タンパクが順調に発現した可能性が示唆される。RI 値が 31%では CYP3A4 タンパクを検出することができなかったため、C2 は CYP3A4 が発現していないのか、あるいは発現しているが検出限界以下なのかは不明である。

uPA(+/-)SCID マウスや uPA(-/-)SCID マウスではウサギ抗ヒト CYP3A4 抗体と交差反応しなかったため、CYP3A4 の発現を確認するためにウエスタンブロット分析は有用であると考えられる。

・リファンピシン投与による酵素活性への影響

リファンピシンはヒトやマウスに

において CYP3A を誘導する薬剤である。リファンピシン投与したヒト肝細胞キメラマウス (C6, C7, C8) について、RI 値が近似している C3 (RI-52%) の約 2.5 倍上昇した。この測定系ではマウスの Cyp3a は検出されないため、ヒト CYP3A4 が誘導されたことが明らかになった。ヒトのヘパトサイトをリファンピシンで誘導すると CYP3A4 のタンパク量が約 2-4 倍上昇したという報告がなされている (Luo et al., 2002)。しかし、これらの報告はヘパトサイトであり、また誘導条件が異なるが、CYP3A4 タンパクの 2.5 倍上昇という結果は妥当な値であると推測される。

【ジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性に関する考察】

ヒトにおいて CYP2C サブファミリーは CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19 の 4 種が報告されている。ジクロフェナク 4'-水酸化反応はヒトにおいて主に CYP2C9 が触媒する。プールドヒト肝ミクロソームのジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性と比較すると、ドナーの活性は 1/3 であった。この活性の差として、肝の採取、保存時の条件が異なることや、もともとドナーの CYP2C9 活性が低いことなどが考えられる。

・フサンの影響

uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-/-)SCID マウスにおいて、薬物未処置群とフサン投与群を比較すると、顕著な差は認められなかったため、フサンの投与は本酵素活性に影響を及ぼさないと考えられる。

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

ヒト肝細胞キメラマウスにおけるジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性は RI 値と相関が認められた。マウス C5 についてはドナーの活性値よりも高い値を示した。採材時にドナーの肝臓の状態が良好ではなかったが、移植したマウスの肝臓で CYP2C9 タンパクが順調に発現した可能性が示唆される。RI 値が 0% であるマウス C1 において、活性値は uPA(+/-)SCID マウスや uPA(-/-)SCID マウスとほぼ同程度であった。uPA(+/+)SCID は肝障害による発育不全を呈し生存できないと考えられるため、マウス C1 はヒト肝細胞ではなく、生存可能なマウス肝細胞が発現したと考えられる。また、uPA(+/-)SCID マウスと uPA(-/-)SCID マウスを比較した場合、活性に差は認められなかった。従って uPA の遺伝子型は本酵素活性に影響を及ぼす可能性が低いことが予想される。

・リファンピシン投与による酵素活性への影響

リファンピシン投与したヒト肝細胞キメラマウス (C6, C7, C8) について、活性値はドナーの 1.4 倍、また、RI 値が近似しているマウス C3 (RI-52%) の 1.9 倍上昇した。ヒトのヘパトサイトにリファンピシンを曝露させると CYP2C9 のタンパク量が約 2-2.4 倍、mRNA は 2-3.7 倍、CYP2C9 の指標活性であるトルブタミド 4'-水酸化酵素活性は 3.7 倍に上昇したという報告がなされている (Rae et al., 2001; Raucy et al., 2002; Gerbal-Chaloin et al., 2001)。しかし、本結果と比較するに際し、これらの報告はヘパトサイトであり、また誘導条件が異なるので、本結果からリファンピシン投与により CYP2C9 が誘導されたと考えるにはさらなる検討が必要であろう。また、マウスにおいて *in vivo* でリファンピシン投与時の CYP2C9 誘導に関する報告がなされていないため、マウスでの誘導程度は不明である。

【クマリン 7-水酸化酵素活性に関する考察】

ヒトにおいて CYP2A サブファミリーは CYP2A6、CYP2A7、CYP2A13、CYP2A18PN および CYP2A18PC が報告されている。ヒト肝試料を用いた研究から CYP2A6 タンパク発現

量や酵素活性に個体差が存在し、それらの中に酵素が完全に欠損している検体の存在が明らかになった (Miles et al., 1990; Yun et al., 1991; Shimada et al., 1996)。クマリン 7-水酸化反応はヒトにおいて CYP2A6 が特異的に触媒する。プールドヒト肝ミクロソームのクマリン 7-水酸化酵素活性は検出されたが、ドナーの活性は検出できなかった。従って、この移植条件では CYP2A6 の発現が困難であるか、あるいはドナーが CYP2A6 を欠損している可能性が示唆された。特に CYP2A6 を欠損している可能性については、ドナーの遺伝子多型を判定して確認する必要があると考えられる。

・フサンの影響

uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-/-)SCID マウスにおいて、薬物未処置群とフサン投与群を比較すると、顕著な差は認められなかったため、フサンの投与は本酵素活性に影響を及ぼさないと考えられる。

・ヒト肝細胞キメラマウスと

uPA(+/-)SCID マウスおよび uPA(-/-)SCID マウスとの比較に関する考察

用いた 8 検体のヒト肝細胞キメラマウスすべてでクマリン 7-水酸化酵素活性は検出されなかったため、RI 値との相関については未解明で

ある。前述のようにドナーが CYP2A6 を欠損しているのであれば、ヒト肝細胞キメラマウスにおいて、全て活性が認められなかったという結果から、これらのマウスはドナーの遺伝子多型を保存できる可能性も示唆されるため、今後ドナーの遺伝子判定についても検討する予定である。

・リファンピシン投与による酵素活性への影響

uPA(+/-)SCID マウスと uPA(-/-)SCID マウスでリファンピシン投与によるクマリン7-水酸化酵素活性への影響は認められなかった。現在のところ、リファンピシン投与により CYP2A が誘導されるという報告はなされていない。

【来年度の検討課題】

ヒト肝細胞キメラマウスの薬物動態学的有用性の検討のために、薬物代謝酵素 CYP の主要な分子種について、mRNA、タンパク、酵素活性の3点から議論する必要があると考えられる。そのため、マウスの Cyp に交差反応を示さず、ヒト CYP のみを測定できる系を各レベルで測定可能な方法をさらに検討する必要がある。現在、mRNA の発現解析を目的として、CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 およびハウスキ

ーピング遺伝子である GAPDH についてヒト特異的なプライマーを設計、確認を行っている。また、ウエスタンブロット分析を行い、主要な分子種である CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6 に関してヒト CYP の定量性について検討している。また、酵素活性についてもさらに調査を進め、マウスと交差反応を示さない測定系の確立について、さらに多くの分子種で検討する予定である。

また、上述したように本研究で用いたヒト肝細胞キメラマウスのドナーは CYP2A6 を欠損している可能性が示唆されたため、キメラマウスの肝臓でドナーの遺伝子多型が正確に保有されているかを検討するために、まず、CYP2A6 の遺伝子多型を判定し、酵素活性と遺伝子多型とが相関しているかを検討する予定である。さらに CYP2A6 だけでなく主要な分子種の遺伝子多型を判定できる測定系を確立し、酵素活性と遺伝子多型とが相関しているかを検討する。

さらに、3-メチルコラントレンやフェノバルビタール、デキサメタゾンなどの薬物代謝酵素の誘導剤をキメラマウスに投与またはヘパトサイトに曝露させ、酵素誘導能について精査する。どの程度ヒト特異的な酵素が誘導を受けるかの定量を行う予

定である。

4-E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスの有用性に関するタンパクレベル、酵素活性レベルでの評価系を一部確立した。今後さらに多くの CYP 分子種についての評価系を確立する必要がある。また、キメラマウスにおいてリファンピシンによるヒト特異的な酵素誘導が認められた。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。

5 : ヒトヘパトサイトを用いた毒性化合物のスクリーニング手法の検討

5-B. 研究方法

5-B-1. ヒトヘパトサイト培養

ヒト非凍結ヘパトサイトは細胞数 2.0×10^5 cells/cm² で、6 well プレートに Lanford medium で満たされた状態で供給され、到着日に培地を交換した。培地量は 2.4 mL/well とし、2 日間 5%CO₂ 存在下 37°C で培養した。ヒト凍結ヘパトサイトは常法に従って解凍し、10%FBS を含む Lanford medium を用いて培地を交換し、5%CO₂ 存在下 37°C で 3 日間培養した。HepG2 細胞は 100 mm シャーレを用い、10%FBS を含む DMEM で 5%CO₂ 存在下 37°C で培養した。

5-B-2. APAP の曝露

5 mM の APAP を含むそれぞれの培地に交換し、6 または 24 時間曝露させた後、total RNA を調製した。

5-B-3. ヒト DNA チップによる遺伝子発現解析

ヒト DNA チップを用いての遺伝子発現解析は日立製作所・ライフサ

イエンス推進事業部に委託した。DNA チップに搭載した遺伝子の種類と数を Table 3 に示した。この DNA チップの特徴として、ヒト薬物動態関連遺伝子を主体に搭載し、さらに他の分類項目においても主要な既知の遺伝子を搭載していることにある。遺伝子発現のスキニングは ScanArray5000 (GSI Lumonics 社製) を用いて行った。画像データから数値データへの変換は専用ソフト QuantArray (GSI Lumonics 社製) を用いて行った。バックグラウンドには negative control の蛍光値を用い、各スポットの蛍光値から差し引いた。サンプル・コントロール間のノーマリゼーションは、グローバルノーマリゼーション法 (全体のスポットを用いて正規化する方法) を用いた。各遺伝子は二重でスポットしてあり、2 スポット間の平均値を算出して各遺伝子の発現量 (蛍光強度) を求めた。

5-C. 研果結果

5-C-1 Scatter-plot

ヒト凍結ヘパトサイトに APAP を曝露し、6 時間と 24 時間での遺伝子の発現変動の解析結果から scatter-plot を作成した。

Table 3. Classification of 1258 genes in human cDNA chip.

Category	Gene name	Number
Metabolism	P450, phase1, phase2 enzyme	171
Growth factor	EGF, PDGF, IGF, FGF, VEGF, HGF etc	58
Cytokine	CSF, IL, TNF, IFN, TGF β , erythropoietin etc	144
Signal	insulin, MAPK, NF κ B, NGF, Wnt etc	330
Cell cycle	cyclin, CDK, CKI etc	53
Apoptosis	caspase, etc	30
Transcription factor	STAT, ATF/CREB etc	35
Oncogene	oncogene, tumour suppression gene	97
Nuclear receptor	RXR, PPAR, AhR, LXR etc	32
DNArepair	topoisomerase, polymerase, DNArepair	85
Stress	heat shock protein etc	127
Membrane protein	receptor, ATPase, Gap-junction, selectin etc	87
Control	β -actin, GAPDH etc	9
Total		1258

相関係数は APAP 曝露 6 時間で 0.9368、24 時間で 0.9091 と相関係数は共に高い値を示した。6 時間と 24 時間では 24 時間の相関係数が低いことからヒト *in vitro* においては APAP を長時間曝露することで遺伝子の発現が 6 時間と比べて大きく変動することが認められた。24 時間でスポットが直線から右下に移る傾向が認められ、これは APAP 曝露によって発現が増加した遺伝子が多いことを示している。

5-C-2 遺伝子の発現変動のクラスター解析

ヒトヘパトサイトへの APAP 曝露

濃度は、以前の検討結果から APAP の毒性発現が 5 mM から認められたことと、ラットにおける結果と比較するために 5 mM とした。曝露時間は APAP の毒性が認められないか、または軽微な毒性が予想される時間として 6 時間、確実な毒性が認められる時間として 24 時間の 2 点で検討した。実験はすべて $n=3$ で行い、カラーパターンによる発現表示は平均値を用いて表した。DNA チップに搭載した 1258 個の遺伝子についてクラスター解析を行った (Fig. 10)。縦軸は各遺伝子名を示していないが、1258 全ての遺伝子を、横軸はサンプルの種類と APAP の曝露

時間を示す。図の赤い部分は APAP 曝露によって遺伝子の発現の増加を、緑の部分は発現の減少を、黒の部分

は発現に変化が認められなかったことを示している。左側は総遺伝子の結果を、右側は左側の一部を拡大し

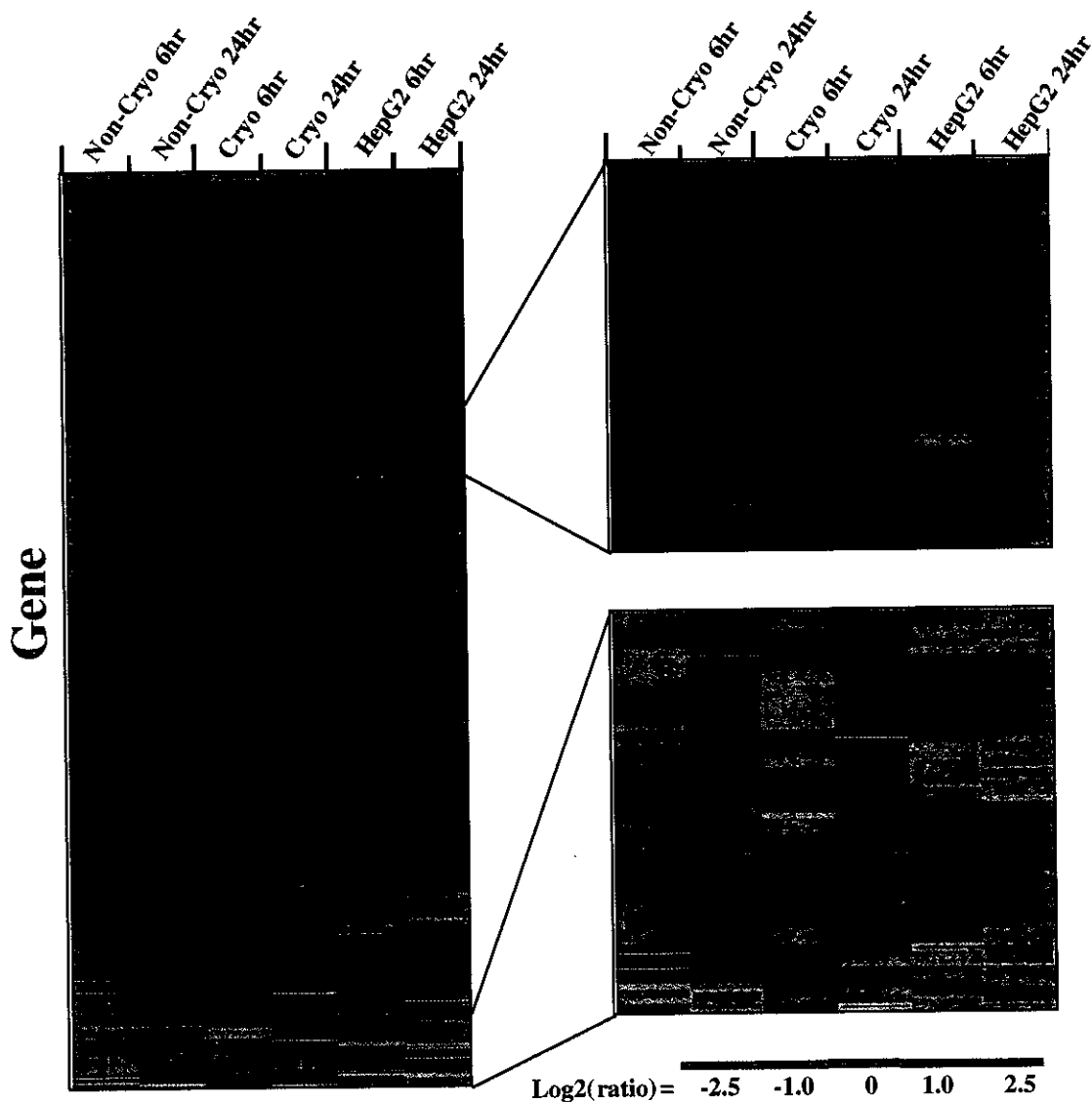


Fig. 10. Clustering of APAP-induced gene expression changes in non-cryopreserved and cryopreserved human hepatocytes and HepG2 cells.

The color figures display expression data for each gene as a horizontal with the intensity of the color indicating the magnitude of up-regulation (red) or down-regulation (green).

て示した。全体的に発現が変化しなかった遺伝子が多く、6 時間および 24 時間で共に変化しなかった遺伝子についてはすべての細胞で類似の発現を示した。非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイト間では 6 時間と 24 時間でそれぞれ遺伝子の発現変動パターンがかなり類似していた。24 時間で発現増加した遺伝子が多く、これらの遺伝子のうち約半分が HepG2 細胞でも発現増加が認められた。6 時間のみまたは 6 時間および 24 時間で発現増加した遺伝子はほぼ同数であった。発現が減少した遺伝子は増加した遺伝子より少なく、6 時間のみ発現減少した遺伝子が非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトで主に認められた。非凍結ヘパトサイトでのみ有意な発現変動を示した遺伝子はほとんど認められなかったが、凍結ヘパトサイトでのみ有意に発現変動した遺伝子は認められた。HepG2 細胞では両ヘパトサイトで有意に発現が変動した遺伝子で有意な発現変動がほとんど認められなかった。HepG2 細胞のみで有意に発現変動した遺伝子はほとんど認められなかった。

5-C-3 遺伝子の発現変動のカテゴリ分類

遺伝子の発現変動を遺伝子のカテ

ゴリー別に分類して観察した。全ての遺伝子について、3 回の実験のうち 2 回以上で APAP 未曝露に対して APAP 曝露サンプルで 2 倍以上 (significant) の発現量が認められた遺伝子を up-regulated、半分以下の発現量を示した遺伝子を down-regulated として集計した (Table 4)。APAP 曝露 6 時間後の significant 遺伝子の総数は非凍結ヘパトサイトで 45 個、凍結ヘパトサイトで 46 個、HepG2 細胞で 16 個であった。また同様に APAP 曝露 24 時間後では、非凍結ヘパトサイトで 42 個、凍結ヘパトサイトで 49 個、HepG2 細胞で 27 個であった。サイトカイン、シグナル関連遺伝子が多く変動していた。

代表的なカテゴリーについて以下に示す。GST 関連遺伝子はすべての細胞で GSTZ1、GSTA4、GSTM3、GSTM4、GSTT2 が 24 時間で大きく発現が増加していた。GSTP1 は HepG2 細胞でのみ発現増加していた。HepG2 細胞では 6 時間での GST の発現変動はほとんど認められなかった。HSP 関連遺伝子は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトにおいて 6 時間と 24 時間共に発現が増加しており、特に HSPA1 類が強い発現増加を示していた。HepG2 細胞での HSP の発現変動は、6 時間では他の

Table 4. Classification of genes those expression were significantly changed by 5 mM APAP exposure in non-cryopreserved and cryopreserved hepatocytes, and HepG2 cells.

6 hr Category	Non-Cryopreserved		Cryopreserved		HepG2	
	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated
ADH	1					1
Ah receptor				1		
ALDH						
Apoptosis		3		4		
ATPase						
Cell Cycle	3		3		1	
Cytokine	3	5	4	9		2
Esterase	1					
GF	2	1	2	1	1	
GST					1	
Hsp	3		1			
Insulin	2	1				1
NR	1	1		1		1
Oncogene	2	3	1			2
P450		1		1		
Polymerase	1		1	1	1	
Signal	4	3	4	5	2	1
Sulfotransferase						1
UGT						
Others	3	1	3	4		1
Total	26	19	19	27	6	10

24 hr Category	Non-Cryopreserved		Cryopreserved		HepG2	
	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated
ADH		1		1		1
Ah receptor						
ALDH	2		1			
Apoptosis				1	1	
ATPase		1	2		1	
Cell Cycle		2		1	3	
Cytokine	2	3	1	7	1	2
Esterase	1					
GF	1	3	4	1	1	
GST	2		1		1	1
Hsp	2		2			
Insulin						
NR						
Oncogene			1			1
P450	1	2	1	1		
Polymerase	1		2		1	
Signal	5	6	4	2	2	1
Sulfotransferase			1			2
UGT				2		
Others	2	5	6	7	5	3
Total	19	23	26	23	16	11

Others: ABC transporter, Angiotensin, ATF/CREB, Corticotropin, DNA-damage-inducible, DNArepair, Gap-junction, GH, Glucagone, Glucocorticoids, HMT, Mitcondria & stress, NQO, Stress, Supressor, TF, Topoisomerase, TPMT

細胞と比べると発現増加が弱く、24時間では類似の発現変動を示した。P450 関連遺伝子については、APAP の代謝に関与する CYP1A2 は非凍結ヘパトサイトの両時間で発現が減少し、凍結ヘパトサイトの6時間で発現減少しており、HepG2 細胞では変動が認められなかった CYP2E1 ほどの細胞のどの時間でも目立った変動は認められなかった。CYP3A4 は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトの6時間でわずかに発現が減少した。CYP2C は細胞間で共通して24時間で発現減少しており、CYP4 family は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトで発現が増加していた。CYP1B1 は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトで6時間では減少するが24時間では増加していた。

Sulfotransferase 関連遺伝子は非凍結ヘパトサイトでは6、24時間ともに大きな発現変動は見られなかった。凍結ヘパトサイトと HepG2 細胞で6時間と24時間で SULT (sulfotransferase) 類が発現の減少を示したが非凍結ヘパトサイトでは SULT1C1 と SULT2A1 は発現が増加していた。CHST1 (carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 1) はすべての細胞で、CHST2 は凍結ヘパトサイトと

HepG2 細胞で発現が増加していた。NR (nuclear receptor) 関連遺伝子については、CAR はどの細胞でもほとんど発現が変動していなかった。FXR と PXR はほぼすべての細胞、時間で発現の減少を示した。凍結ヘパトサイトと HepG2 細胞の24時間で共通して NR1D2、NR2E3、NR3 などの発現が増加していた。

サイトカイン関連遺伝子は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイト間で共通して6時間で SCYA20 (Small inducible cytokine subfamily A) が顕著に発現増加しており、TNFSF10 (tumor necrosis factor subfamily) と TNFSF11 は6時間と24時間で発現減少していた。その他に各細胞間で共通して変動した遺伝子はほとんど認められず、発現変動を示さなかった遺伝子が多かった。アポトーシス関連遺伝子では CASP (caspase) 遺伝子の動きが目立った。CASP1 と CASP10 はどの細胞でも24時間で発現減少を示したが、CASP7 と CASP9 は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトで発現減少を示した。CASP3、CASP6、CASP8 は大きな発現変動を示さなかった。

5-C-4. Real-time PCR による遺伝子発現解析

DNA チップによる解析結果を裏付けるため、非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトについて、DNA チップにより発現に変動が認められた遺伝子のうち薬物動態遺伝子 14 種類 (CYP1B1、CYP26A1、EPHX2、PIG3、CES、ALDH5、ALDH10、HNMT、GSTZ1、CHST2、SULT2A1、PTGS2、

GSTA3、ABCF1) について real-time PCR により発現の変動を確認した (Fig. 11)。このうち、11 種類が DNA チップと再現性のある結果を示した。GSTA3 は検出できなかった。PTGS2 は DNA チップと real-time PCR で正反対の発現変動を示した。

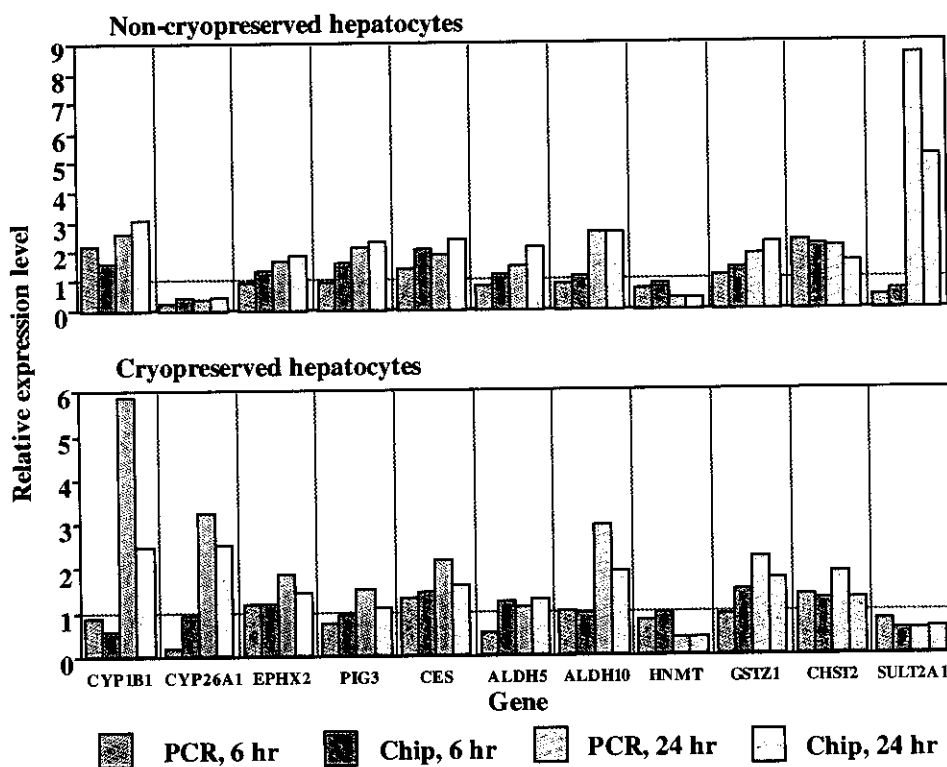


Fig. 11. Comparison of quantitation method for mRNA expression levels by real-time PCR and DNA chip.

Non-cryopreserved hepatocytes and cryopreserved hepatocytes were exposed to 5 mM APAP for 6 and 24 hours. relative quantitation is expressed as the ratio of the each gene/ β -actin to that in control.

ABCF1 は real-time PCR でほとんど発現に変動が認められなかった。

凍結ヘパトサイトの CYP1B1、非凍結ヘパトサイトの SULT2A1 の 24 時間では real-time PCR と DNA チップで共に顕著な発現増加を示したが増加レベルは real-time PCR の方が大きく、CYP1B1 では約 6 倍、SULT2A1 では約 9 倍の発現比を示した。EPHX2、PIG3、CES、ALDH5、CHST2 は各測定方法、時間で発現比が 2 倍以内を示した。

5-C-5. 核内受容体遺伝子の発現変動に与える APAP 曝露の影響

薬物動態関係遺伝子の転写調節に関わる核内受容体遺伝子の発現変動に注目した (Fig. 12)。AHR は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトの APAP 曝露 6 時間で発現減少を示した。CAR はどの細胞、どの時間でも発現にほとんど変動が認められなかった。FXR はすべての細胞で発現の減少を示し、非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトの 6 時間では特に強く減少した。LXR は非凍結ヘパトサイトではほとんど変動せず、凍結ヘパトサイトの 24 時間、HepG2 細胞の 6 時間で発現が減少した。PXR は非凍結ヘパトサイトと凍結ヘパトサイトで強い減少を示した。RXRs はどの細胞でも大きな変動が認められなかった。PPARs は PPAR δ が非凍結ヘパトサイトと凍

結ヘパトサイトのそれぞれ 24 時間でわずかに発現が増加した。PPAR γ s は 6 時間で発現が減少し、HepG2 細胞の 24 時間で強い発現減少を示した。PPAR α は RXRs と同様にほとんど変動を示さなかった。

5-D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスは、薬物動態試験のみならず、医薬品の安全性試験に新たな手法をもたらすと期待されている。本年度の研究では、キメラマウスの供給が充分ではなく、さらに、キメラマウスの基本的な評価研究を行ったために、安全性試験をキメラマウスで行うことが出来なかった。本年度は、キメラマウスのヘパトサイトを使用した場合を想定して、ヒトヘパトサイトを用いて網羅的な遺伝子発現解析の準備実験を行った。なお、ヒト DNA チップは、表 3 に示すように、薬物動態関連遺伝子を主体に搭載した「薬物反応性ヒト DNA チップ」を日立製作所で作成・使用した。

肝毒性を示す薬物として APAP を用いて、非凍結および凍結ヘパトサイトに暴露し、遺伝子の発現変動を検討した。ヒトにおける APAP の肝障害についてはこれまで多数の報告がなされてきたが、毒性発生メカニズムの詳細な検討はなされていない。

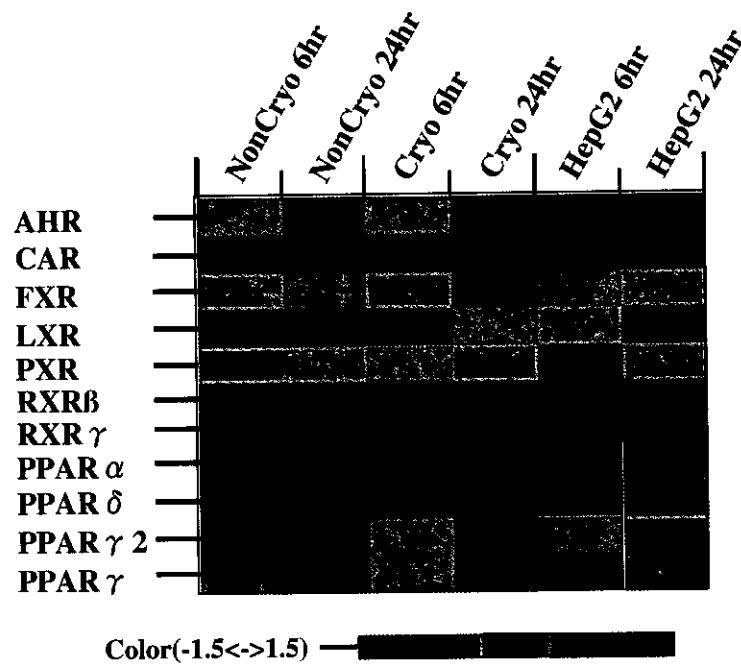


Fig. 12. Changes of expression level of transcription factors by APAP exposure in rat *in vivo* and *in vitro*.

そこで、ヒトヘパトサイトを用いて、ヒト *in vitro* における APAP 毒性の遺伝子発現変化を解析した。DNA チップを用いることにより、遺伝子の顕著な発現変化が認められた。今回の実験では、少ない発現変化は非特異的である可能性を考慮し、他の論文で報告されているように、有意な発現変化を 2 倍以上の増減とした (Coller et al., 2000; Kaminski et al., 2000; Puga et al., 2000)。これまで、マウス *in vivo* で 11,000 個以上の遺伝子を搭載した DNA チップを用いた APAP の研究で、APAP 曝露 6 時

間で 226 個の遺伝子が有意に発現が増加したと 106 個の遺伝子が有意に発現が減少したことが報告されている (Reilly et al., 2001)。多くのストレス性のタンパクや c-fos、c-jun などの早期反応性の因子が変動しており、これらの遺伝子と APAP の毒性との関連について研究がなされている (Liu et al., 1999; Salminen et al., 1997; Blazka et al., 1996; Kitteringham et al., 2000)。本研究で APAP 曝露により有意に発現が変動した遺伝子数の割合は、これまでの報告での割合とほぼ同じであった。発現の変動の