

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。

## 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ブロット分析した結果を Fig. 1 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

バキュ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、バキュ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。

#### 【酵素活性レベル】

各酵素活性の結果を Fig. 2 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)

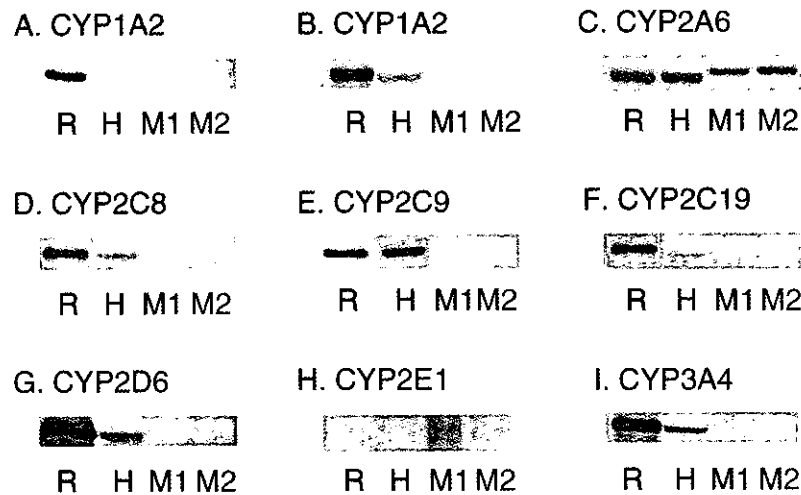


Fig. 1. Immunoblot analysis of liver microsomes from human and mouse using anti-human CYP antibodies.  
R: recombinant human CYP, H: human, M1: AhR(+/+) mouse, M2: Cyp1a2/1b1 mouse.

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

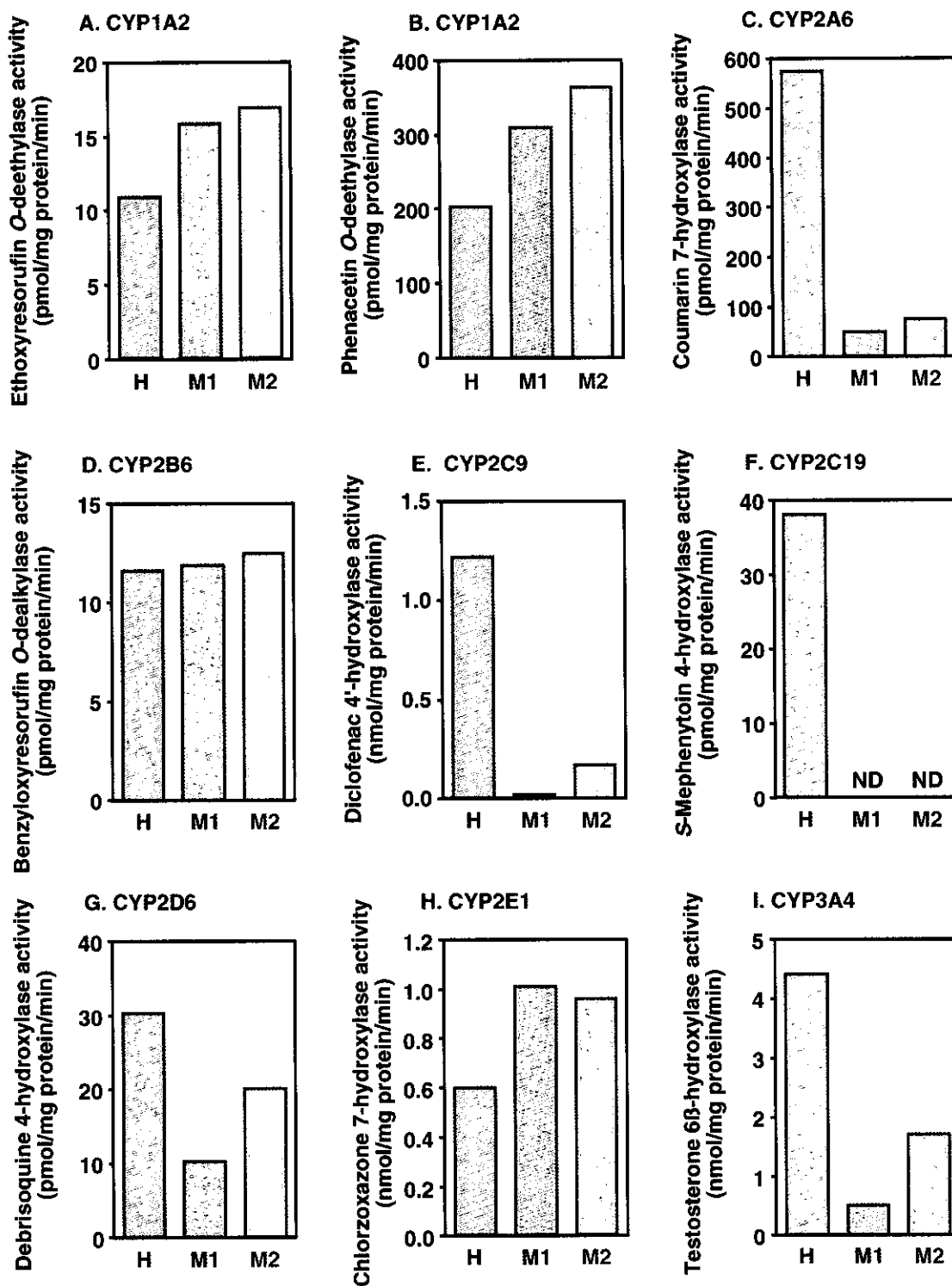


Fig. 2. CYP activities in liver microsomes from human and mouse. H: human, M1: AhR(+)(+) mouse, M2: Cyp1a2/1b1(+)(+) mouse, ND: not detected.

活性が認められた。

- ・ テストステロン 6 $\beta$ -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。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 マウスの肝マイクロソームを用いて、CYP3A4の定量を行った。結果を Fig. 3 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

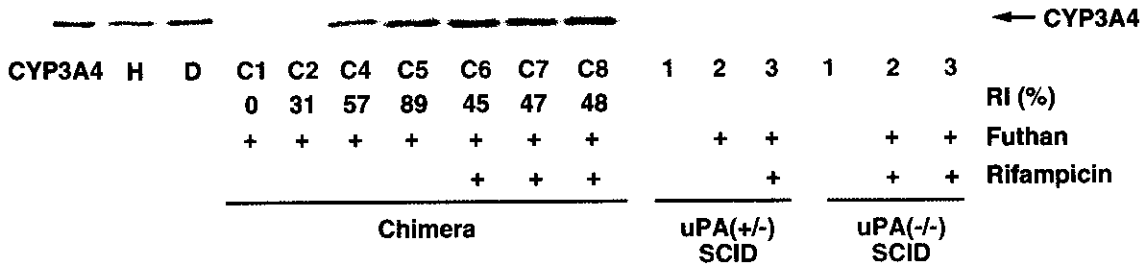
ウエスタンブロット分析において、ウサギ抗ヒト CYP3A4 抗体はマウス Cyp3a タンパクに対して交差反応しないことを確認しているため、検出できたタンパクはヒト CYP3A4

である。ドナーの CYP3A4 含量はプールドヒト肝マイクロソームの 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ったが、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った。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った。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。

**A. Immunoblot analysis**



**B. CYP3A4 content**

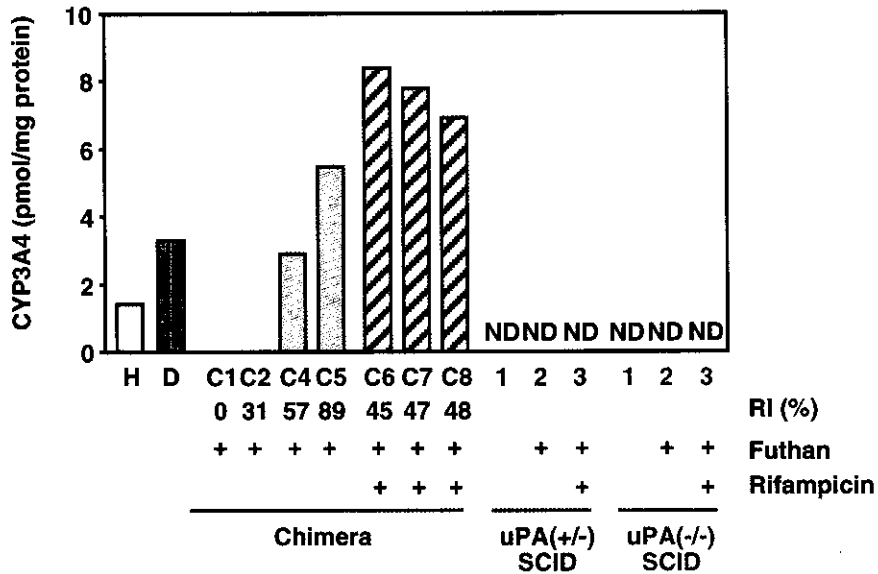


Fig. 3. Immunoblot analysis of liver microsomes from chimeric mouse, uPA(+/-)SCID mouse and uPA(-/-)SCID mouse using anti-human CYP3A4 antibodies. CYP3A4 protein detected by Western blotting (A) and quantification of the CYP3A4 protein (B). H: pooled human liver microsomes from Gentest, D: liver microsomes 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. 4 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(-/-)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。

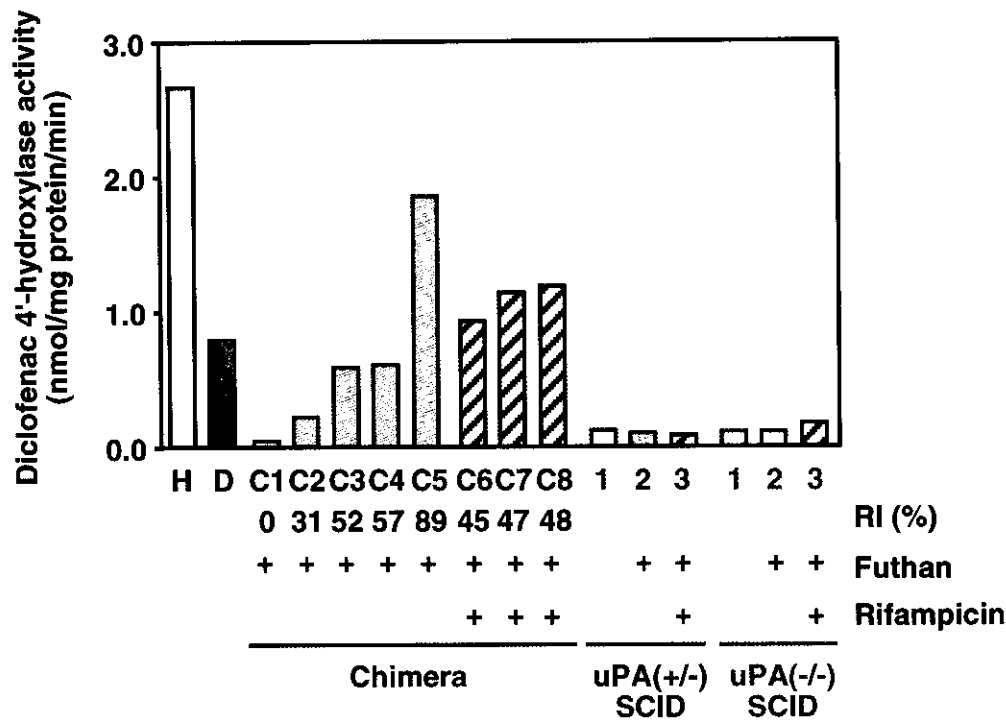


Fig. 4. Diclofenac 4'-hydroxylase activity in liver microsomes from chimeric mouse, uPA(+/-)SCID mouse and uPA(-/-)SCID mouse. Diclofenac 4'-hydroxylase activity was determined at 30  $\mu$ M diclofenac. H: pooled human liver microsomes from Gentest, D: liver microsomes from donor, RI: repopulation index

【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. 5 に示す。Gentest 社製のプー  
 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  
 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。

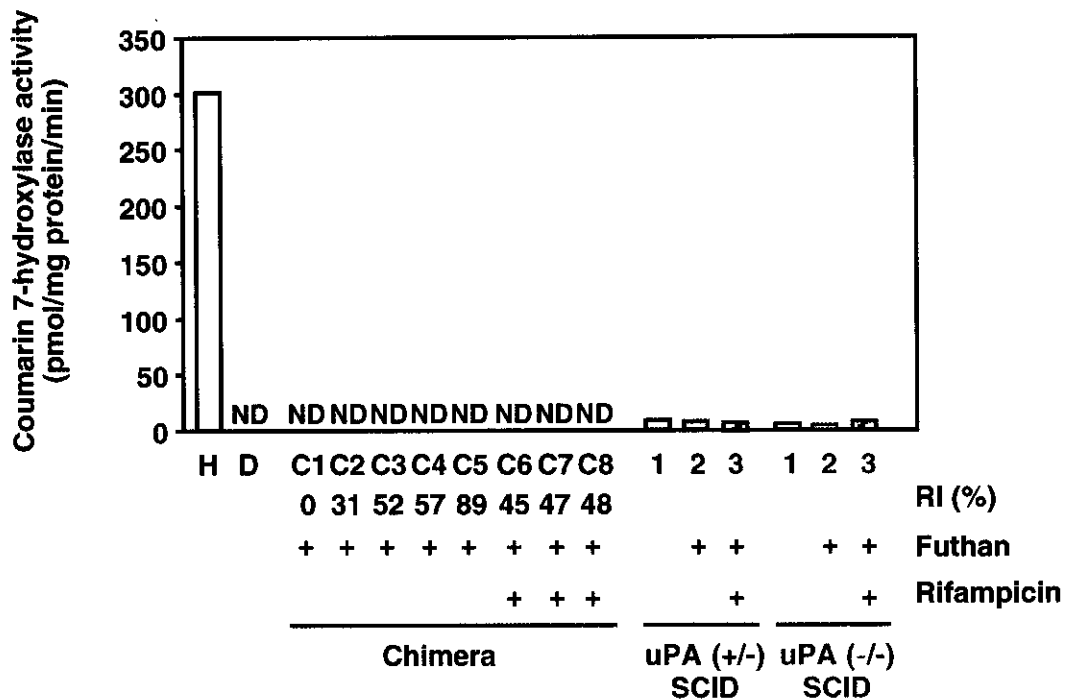


Fig. 5. Coumarin 7-hydroxylase activity in liver microsomes from chimeric mouse, uPA(+/-)SCID mouse and uPA(-/-)SCID mouse. Coumarin 7-hydroxylase activity was determined at 1  $\mu$ M coumarin. H: pooled human liver microsomes from Gentest, D: liver microsomes from donor, RI: repopulation index

#### 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  $\mu$ M、マウスで 6.1  $\mu$ M 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、 $V_{max}$  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  $K_m$  値は 40  $\mu$ M、 $V_{max}$  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 $\beta$ -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、 $K_m$  値はヒトでは 72  $\mu$ M、マウスでは 99  $\mu$ M、 $V_{max}$  値はそれぞれ 5.31 nmol/mg protein/min、2.73 nmol/mg protein/min であり、 $K_m$  値は類似しているが、 $V_{max}$  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。

#### **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。

**F. 健康危険情報**：なし

#### **G. 研究発表**

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

- ・特許取得：なし
- ・実用新案登録：なし
- ・その他：なし

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）  
分担研究報告書

ヒト肝細胞キメラマウスの作製と安定供給システムの構築に関する研究

分担研究者 吉里 勝利 広島大学大学院理学研究科生物科学専攻 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。この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ー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。そこで、肝障害免疫不全マウスの大量繁殖を目的として、日本チャールスリバー株式会社（本社：横浜市港北区新横浜2-3-8 東伸2 4新横浜ビル）へマウス飼育業務を委託し、肝障害免疫不全マウスの大量繁殖系を確立した。また現在の肝障害免疫不全マウスの繁殖方法では、ヒト肝細胞キメラマウス作出に用いる遺伝子型のマウスが4分の1の確率でしか生じないため、大量繁殖には効率的とは言えない。そこで、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。



## 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かと予想される。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見極めるために、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

テムの構築」を、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」の2項目について実験を行った。

### 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

## 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。



	♂			♀		
	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2 繁殖したマウスの遺伝子型解析の結果

#### 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。

#### 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

#### 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, Vol.263, 1149-1152, 1994)。そこで uPA(+/+)SCID に肝障害の無い uPA(-)SCID マウスの

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  $5 \times 10^5$  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。

uPA(+/+)SCID♂×uPA(+/-)SCID♀

ペアリング数	妊娠マウス数	分娩マウス数	生まれた子マウス数	生存子マウス数	遺伝子型	
					uPA(+/+)SCID	uPA(+/-)SCID
8	5	4	4	0	データなし	
			7	4	2 (注1)	
			7	6	4	2
			4	4	未解析	

注1：残り2個体に関しては現時点で不明

uPA(+/+)SCID♂×uPA(+/+)SCID♀

ペアリング数	妊娠マウス数	分娩マウス数	生まれた子マウス数	生存子マウス数	遺伝子型	
					uPA(+/+)SCID	uPA(+/-)SCID
5	2	2	7	0	データなし	
			4	4	未解析	

表3 uPA(+/+)SCIDマウスを用いた交配の結果

肝細胞を移植し発育不全を改善させ

### 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るため、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 の固体が得られた。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