

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 15 年度 統括・分担研究報告書

主任研究者名 横 井 毅

平成 16 (2004) 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の生産状況とキメラマウスの簡易 低コスト生産技術の開発	-----	30
古里 勝利		
2 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP 代謝能および 誘導能に関する検討	-----	38
中島 美紀		
3 ヒト肝細胞キメラマウスの薬物動態・安全性試験における 有用性の検討	-----	80
横井 毅		

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。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ケンアクチヘ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、以下 uPA (+/+) /SCID マウス）にヒト肝細胞を移植して作出する。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標準動物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。そのためには肝障害免疫不全マウス（uPA/SCID マウス）を大量にかつ安定に供給する方法を確立することが必要不可欠である。昨年度は日本チャールスリハー株式会社（本社 横浜市港北区新横浜 2-3-8 東新 24 新横浜ヒル）にマウス飼育を委託し、uPA/SCID マウスの大量繁殖法を構築したことを報告した。本年度はその大量繁殖法により増やした uPA/SCID マウスを用いて、中外テクノス株式会社（本社 広島市西区横川新町 9 番 12 号）に委託しヒト肝細胞キメラマウスを作出したので、その生産状況を報告する。また、遺伝子解析手法を real-time 定量性 PCR 法から最近報告された簡便な PCR 法に変更した。その結果、uPA 遺伝子のホモとヘミの識別の精度が 100%となったことから、ヒト肝細胞に高い割合で置換されたキメラマウスの割合の向上につなげなかった。また、キメラマウスの血中ヒトアルブミン濃度測定を ELISA から比濁法に変更したことにより、短時間で簡易に測定することが可能となった。キメラマウスのトナーとなる生着可能な肝細胞ロッ

ト数を増やすために、インヒトロテクノロジー（IVT）社のロット 079 以外の 6 種類のロットの肝細胞をマウスに移植したところ、IVT-NLR か IVT-079 と同等にキメラマウス生産に用いることができることか分かった。

これまでに、キメラマウスのヒト薬物代謝酵素に関する詳細な検討は行われていない。そこで本研究では、代表的な薬物代謝酵素であるCYPの薬物代謝能および誘導能を評価することを目的に、mRNA、タンパク、酵素活性レベルでの検討を行なった。第一にヒトCYPの発現および薬物代謝能を明らかにするため、様々なhAlb値およびRI値を有するキメラマウスについて、mRNA発現量、タンパク発現量、酵素活性を測定した。その結果、mRNA発現量、タンパク発現量、酵素活性ともにhAlb値およびRI値依存的な増加が認められた。また、ヒトに特異的なシクロフェナク4'-水酸化酵素活性やデキサメタゾン6-水酸化酵素活性などトナーと同程度の活性を有することか認められた。これより、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトCYPが発現しており、かつヒトの薬物代謝能を有することを明らかにした。またCYP2A6の遺伝子判定より、キメラマウスはトナーと同一の遺伝子多型を有することを明らかにした。

次に、キメラマウスに発現しているヒトCYPの誘導能を明らかにするために、CYPの代表的な誘導薬であるリファンピシンと3-MCを投与し、mRNA発現量、タンパク発現量、酵素活性の変動を検討した。この結果、リファンピシン投与によりヒトCYP3A4のmRNA、タンパク、酵素活性レベルでの顕著な増加が認められた。また、3-MC投与により、ヒトCYP1A2 mRNAおよびタンパクレベルでの顕著な増加が認められた。これより、キメラマウスのヒトCYPは誘導能を有していることを明らかにした。今後、キメラマウスの例数を増やして更なる検討を行うとともに、CYP以外の薬物代謝酵素やトランスポーターに関しても様々な検討する必要があると考えられる。

ヒト肝細胞キメラマウスを活用することにより、我が国の医薬品開発に大きな利益をもたらすことか期待される。当初の研究計画に従い、多くの製薬メーカーの研究所との共同研究を幅広く行い、各研究所でのデータを学会発表などとして開示することにより、ヒト肝細胞キメラマウスの薬物動態研究の分野における評価を確かなものにし一般化を諮ることに着手した。

製薬メーカー7社の薬物動態研究所および1大学の研究室と共に、「ヒト肝細胞キメラマウス研究会」を平成15年度に立ち上げた。参加企業は、山之内製薬(株)、三共(株)、武田薬品工業(株)、第一製薬(株)、エーザイ(株)、ファ

イザー(株)、(株)大塚製薬工場の7社と東京大学大学院薬学研究科製剤設計学研究室である。主任研究者の横井毅がヒト肝細胞キメラマウスの使用および研究内容の調整を一手に行っている。平成15年度末現在、第一製薬を除く全ての参加会員との共同研究課題がスタートしている。終了まで至った共同研究課題はまた無いものの、順調に進行中である。本推進事業の最終年度である平成16年度中には、全ての共同研究について、結果・結論を得るようとする予定である。本報告書では、現在進行中の各共同研究課題の目的と経過および今後の予定について記す。

ヒトにおける薬物動態を予測することは薬物の適正使用ならびに副作用の回避につながるため、医薬品開発時および臨床における重要課題である。本研究でのCYPに関する基礎的な検討結果より、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトにおける薬物動態研究の有用な手段として期待できる。また、本研究はヒト肝細胞キメラマウスの薬物代謝試験への応用を初めて示した画期的な研究であり、今後の薬物動態研究の発展、医薬品開発ならびに医療に大きく貢献するものである。

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**

1-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)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、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%以上を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、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モデル動物として利用できると予想される。

本事業の目的とす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できるためには、キメラマウスの安定供給が必須である。そこで、昨年度、日本チャールスリハー株式会社(本社 横浜市港北区新横浜 2-3-8 東新 24 新横浜ビル)に委託し、キメラマウス安

定供給法の構築を行った。

本年度は日本チャールスリハー株式会社から供給された uPA/SCID マウスをホストとして用いて、ヒト肝細胞キメラマウスの安定供給方法の確立のための調査研究を行った。尚、本年度よりヒト肝細胞キメラマウス生産は中外テクノス株式会社（本社 広島市西区横川新町 9 番 12 号）に委託した。また、簡易、低コストでキメラマウス生産を行うために、遺伝子解析手法およびマウス血中ヒトアルブミン濃度測定法の変更を行った。さらに、本事業では、複数のドナーからなるキメラマウスを作製し、薬物代謝能の個体差の検討を行うことも予定しているため、これまで移植に用いてきたロット以外のヒト肝細胞がマウスに生着するかどうかについて検討を行った。

1 インビトロテクノロジー (IVT) 社のロット 079 を移植したキメラマウスの生産

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} にインビトロテクノロジー (IVT) 社より購入したヒト肝細胞、IVT-079 を脾臓より注入することにより作製した。脾臓に注入する細胞数は 0.5×10^6 個/匹～ 1.0×10^6 個/匹とし、注入量は 15～20 μ L/匹とした。移植後 3 週目から、週 1 回マウス血液を尾から 2 μ l 採取し、ELISA

を用いてマウス血中におけるヒトアルブミン濃度を測定した。移植約 4 週間後に血中ヒトアルブミン濃度を測定し予想置換率を求めた。予想置換率は、これまで広島県組織再生プロジェクトと文部科学省知的クラスター創成事業において得られている、解剖時のマウス肝臓切片におけるヒトサイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色結果から求めた実際の置換率と、4 週目のヒト血中ヒトアルブミン濃度の相関関係のグラフより求めた。

1-C 研究結果

平成 15 年 4 月から 12 月までの各月において IVT-079 を移植した回数、移植したマウスの合計数および予想置換率を表 1 に示した。ヒト肝細胞の移植は毎週行う予定を立てたが、移植に用いる uPA (+/+) /SCID マウスの匹数が少ない場合は移植を翌週に行うため、平均して月に約 3 回移植を行った。移植したマウスの平均は月あたり約 31 匹となり、一回に移植する平均匹数は約 10 匹であった。ヒト肝細胞を移植したマウスのヒト肝細胞による予想置換率は、1%未満が約 3 割で最も高い割合を占めていた。予想置換率が 80%以上のマウスは約 2 割であったが 70%前後を含めると約 4 割であった。

表1 平成15年4月から平成15年12月までのキメラマウス生産状況

移植回数	移植マウス数 ¹⁾		キメラマウス予想置換率(%)									
	合計数	1%未満	10%前後	20%前後	30%前後	40%前後	50%前後	60%前後	70%前後	80%以上		
4月	2	14	7	1	1	1	1	0	1	1	1	
5月	5	47	13	4	5	4	2	2	3(1) ²⁾	1	13(1)	
6月	3	32	10	4(1)	1	1	4	3	0	4	5(1)	
7月	4	53	16	3	2	3	6	2	5	8(1)	8(2)	
8月	2	13	2	2	0	0	2	3	0	2	2	
9月	4	36	17	0	0	0	0	1	1	3	14	
10月	2	26	5(2)	0	0	0	1(1)	0	1	6(1)	13(4)	
11月	3	24	8	1	0	0	0	1	2	2	10(5)	
12月	3	36	16	0	0	0	0	0	4	2	14	
合計	28	281	94(2)	15(1)	9	9	16(1)	12	17(1)	29(1)	80(4)	
割合			33.5%	5.3%	3.2%	3.2%	5.7%	3.6%	6.0%	10.3%	28.5%	

¹⁾置換率を予測する前に死亡した個体は除いた。

²⁾カッコ内は置換率を予測後死亡したマウスの数を示す。

1-D 考察

IVT-079 を uPA (+/+) /SCID マウスへ移植したところ、マウス肝臓におけるヒト肝細胞の予想置換率が70%以上のキメラマウスが約4割得られた。しかし、置換率1%未満のマウスも約3割認められ、安定して高い割合でヒト肝細胞に置換されたマウス生産を行うためのさらなる技術改良が必要である。

1-E 結論

IVT-079 をトナー細胞として、安定したキメラマウス生産が可能となった。

2 遺伝子解析手法の変更

2-B 研究方法

平成15年8月までは、以下の方法で移植に用いる uPA (+/+) /SCID マウス (uPA ホモマウス) の遺伝子判定を行っていた。uPA 導入遺伝子に含まれる human growth hormone (hGH) のプライマーと TaqMan プローブを用いて PCR 法によりマウスゲノム DNA 中に hGH 遺伝子か検出されたマウスを選択した。次に、hGH と mouse glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (mGAPDH) のプライマーと TaqMan プローブを用いて、マウスのゲノム DNA 中に含まれる hGH

と mGAPDH のコピー数をリアルタイム定量性 PCR 法により ABI7700 を用いて解析した。得られた hGH のコピー数を mGAPDH のコピー数で割ると、得られた値が高い群と低い群の 2 群にほぼ別れる。高い群の値は、低い群の値の約 2 倍であり、前者を uPA ホモマウス、後者を uPA (+/-) / SCID マウス (uPA ヘミマウス) と判定した。

最近、Meuleman らにより、uPA 遺伝子を導入することにより uPA / SCID マウスに欠失する配列のプライマーと uPA / SCID マウスに存在する hGH の配列のプライマーを混合し、マウスから採取したゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行うことにより、uPA ヘミマウス、uPA ホモマウス、uPA (-/-) / SCID マウス (uPA ネガティブマウス) を同時に検出する方法が報告された (Biochem Biophys Res Commun, vol 308, 375-378, 2003)。この方法を導入し、平成 15 年 9 月以降はその遺伝子判定の結果を基に uPA ホモマウスを選択しヒト肝細胞の移植を行った。

2-C 研究結果

リアルタイム定量性 PCR は非常にコストと手間がかかる。また、この方法は、マウスゲノム DNA 中に含まれる導入遺伝子の量の 2 倍の差を検出できることから、原理的には uPA ヘミマウスと uPA ホモマウスを識別できる。しかし、現実的には、毎回得られた値を 2 倍の差で uPA ヘミマ

ウスと uPA ホモマウスに分類することは難しく、どちらとも判定できない 1.5 倍程度の値が得られることかしばしばあった。その様な場合には解析を繰り返し、その平均値から判断していたが、それでも判定が困難なマウスは移植動物からはずしていた。また、uPA ホモマウスと判定してヒト肝細胞を移植したマウスを解剖したところ、肝臓の肉眼所見から uPA ヘミマウスであることも 1 - 2 割の割合で生じていた。uPA ヘミマウスにヒト肝細胞を移植した場合は、ヒト肝細胞はホモと同様に生着しマウス血中ヒトアルブミン濃度は増加するが、移植後 30 日ごろから低下する。このことは、uPA 導入遺伝子を欠失したヘミマウスの宿主肝細胞が活発に増殖し、その結果ヒト肝細胞は萎縮していくためと考えられる。したかつて、ヘミマウスを確実に識別し、これを除去することは重要である。新たに導入した方法では、PCR 産物をアガロースゲルを用いて電気泳動することにより分離したバンドの本数と分子量を調べるため、確実に uPA ヘミマウス、uPA ホモマウス、uPA ネガティブマウスを判定することかてきる。

表 2 に 4 月から 8 月までと 9 月から 12 月までの予想置換率の値を示した。4 月から 8 月までは、全体的に予想置換率の値が低いマウスが多く、予想置換率 80% 以上のマウスは約 20% であった。一方、9 月以降は予想置換率 10% から 50% のマウス

はほぼ0%で、予想置換率80%以上のマウスは約40%に向上した。

また、新たな解析方法に変更したことにより、解析費用は1834円/匹か

ら614円/匹に低減したとともに、解析にかかる日数も3日程度から1日程度に短縮することかてきた。

表2 平成15年4月から8月までの予想置換率の割合と9月以降の予想置換率の割合

		キメラマウス予想置換率(%)								
4月～8月		1%未満	10%前後	20%前後	30%前後	40%前後	50%前後	60%前後	70%前後	80%以上
マウス数 ¹⁾	48	14(1) ²⁾	9	9	15	10	9(1)	16(1)	29(4)	
割合	30.2%	9.4%	5.7%	5.7%	9.4%	6.3%	5.7%	10.1%	18.2%	
9月～12月										
マウス数	46(2)	1	0	0	1(1)	2	8	13	51(9)	
割合	37.7%	0.8%	0%	0%	0.8%	1.6%	6.6%	10.7%	41.8%	

¹⁾置換率を予測する前に死亡した個体は除いた。

²⁾カッコ内は置換率を予測後死亡したマウスの数を示す。

2-D 考察

新たな遺伝子解析法に変更することにより、簡易かつ低コストで確実に遺伝子解析を行うことが可能となった。新たな遺伝子解析法を導入以降、予想置換率80%以上のマウスの割合が導入以前に比べて約2倍に向上した。この結果は、以前の方法でuPAホモマウスと判定してヒト肝細胞を移植したマウスの中に、uPAヘミマウスが混在していたことかひとつの原因と考えられた。しかし、新たな解析によりホモを確実に識別できたと考えられる平成15年9月以降においても、予想置換率が1%未満であるマウスが4割弱存在しており、低置換と高置換の二極化現象が認められている。今後、予想置換率が1%

未満であるマウスの割合を低減させる方法の開発が必要である。

2-E 結論

新たな遺伝子解析法を導入したことにより、簡易・低コストでしかも正確にuPAホモマウスを選択することができるようになり、高置換マウスの割合を増やすことかてきた。

3 IVT-079 以外のロットのヒト肝細胞の移植

3-B 研究方法

IVT社のロットIVT-100、IVT-59、IVT-QKR、IVT-XPK、IVT-NOGおよびIVT-NLRをトナー細胞として用いて移植を行った。なお、移植方法、

移植した細胞数、注入量および予想置換率の判定は IVT-079 と同様の方法で行った。

3-C 研究結果

IVT-079 以外の IVT 社のロットを移植した結果を表 3 に示した。NLR は 8 匹中 4 匹のマウスが予想置換率

70%以上を示した。IVT-QKR、IVT-NOG においては予想置換率が 70%程度の個体か 5 匹中 1 匹、6 匹中 1 匹みられた。他のロットに関しては予想置換率がすべて 10%程度以下であった。

表 3 IVT-079 以外のロットを移植した場合の予想置換率

Lot No	年齢/性別 ¹⁾	トナー	移植回数	移植日	移植マウス 合計数 ²⁾	キメラマウス予想置換率 (%)				
						1%未満	10%前後	30%前後	50%前後	70%前後 80%以上
100	74/F	1	6/19	3	3	0	0	0	0	0
59	33/M	1	7/17	6	2	4	0	0	0	0
QKR	35/M	1	7/17	5	4(1) ³⁾	0	0	0	1	0
XPK	39/M	1	8/7	7	5	2	0	0	0	0
NOG	46/M	1	10/1	6	3	0	1	1	1	0
NLR	13/M	1	11/27	8	4(1)	0	0	0	1	3

¹⁾M 男性、F 女性

²⁾置換率を予測する前に死亡した個体は除いた。

³⁾カッコ内は置換率を予測後死亡したマウスの数を示す。

3-D 考察

これまで、トナーの年齢が生後 9 ヶ月の IVT-079 および 13 歳の IVT-NLR か、他の 30 代以上のドナーに比べて高置換率のキメラマウスを多く得られたことから、トナーの年齢が若い程、キメラマウス作製に適している可能性が考えられる。しかし、今回、トナー年齢 35 才の IVT-QKR と 45 才の IVT-NOG から、割合は低いものの 70%以上置換率のキメラマ

ウスが得られたことから、30 才以上のトナーの中にも、キメラマウスに適したヒト肝細胞も存在する可能性も示唆された。これらのことから、キメラマウス生産のトナー細胞として IVT-NLR が利用できると考えられた。

しかしながら、今回の結果は、IVT-NOG および IVT-NLR 以外は、新たに導入した PCR 法ではなく、旧来の定量性 PCR 法による遺伝子解析

により uPA (+/+) /SCID マウスを判定しヒト肝細胞を移植した。このことから、予想置換率が低めに見積もられている可能性があるため、今後再検討する予定である。

3-E 結論

IVT-NLR はキメラマウス生産に用いることか可能であることが確認された。

4-A 研究目的

ヒト肝細胞キメラマウスの使用により、我が国の医薬品開発に大きな利益をもたらすものと期待される。主要な薬物代謝酵素である CYP は、in vitro の培養系では活性を十分に維持することが困難であることが知られている。薬物輸送トランスポーターは、その活性は in vitro の培養系においても、その機能が比較的維持されることか知られている。そこで本研究において、昨年度の予備的な検討に続き、本年度はヒト肝細胞キメラマウス由来肝ミクロソームを中心に、ヒト特異的な薬物代謝酵素活性を維持しているか否かについて、薬物代謝酵素 CYP について real-time PCR を用いて mRNA の発現レベルを、ウエスタンブロット分析によりタンパクの発現レベルを、HPLC 分析により各種酵素活性レベルを検討し、ヒト肝細胞キメラマウスの有用性の確立を目

指して実験を行った報告を第 4 章として記す。さらに誘導能に関する研究について第 5 章として記す。

第 4 章 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP の薬物代謝能に関する検討

4-B 研究方法

4-B-1 ヒト肝細胞キメラマウス

本研究ではキメラマウスのヒト肝細胞トナーとして、D1（日本人、男性、12 才）と In Vitro Technologies（Catonsville, MD）より購入した凍結ヒト肝細胞 D2（白人、男性、9 ヶ月）を用いた。本研究で使用したキメラマウスを Table 4 に示す。生後 11-14 週齢の雄性キメラマウスを使用した。なお、ELISA 法により測定したキメラマウスの血中ヒトアルブミン濃度（human albumin concn, hAlb）と、ヒト特異的サイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色から算出した置換率（replacement index, RI）は相関が認められているため、Table 4 に併記した。

4-B-2 研究手法

肝臓から total RNA の調製、RT-PCR 法によるヒト CYP mRNA 発現量の定量、肝ミクロソームの調製、SDS-PAGE とウエスタンブロット分析によるヒト CYP タンパクの定量、肝ゲノム DNA の調製、テキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の側定、シクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の測定、クマリン 7-水酸化酵

素活性の測定、およびその他の薬物代謝酵素活性の測定については常法に従った。詳しい説明は研究分担者の中島美紀の報告に記載した。

Table 4 The chimeric mice used in the present study

No.	Donor	hAb	RI	Drug treatment			
C1	D1	0.0	0	None			
C2	D1	1.6	31	None			
C3	D1	2.1	52	None			
C4	D1	3.5	57	None			
C5	D1	7.7	89	None			
C6	D1	2.3	45	Rif	50 mg/kg/day	1 p	4 days
C7	D1	4.2	47	Rif	50 mg/kg/day	1 p	4 days
C8	D1	5.2	48	Rif	50 mg/kg/day	1 p	4 days
C11	D2	0.0	0	None			
C12	D2	0.6	19	None			
C13	D2	2.1	60	None			
C14	D2	9.3	71	None			
C15	D2	10.8	88	None			
C16	D2	13.7	71	None			
C17	D2	13.7	93	None			
C18	D2	4.2	60	Rif	50 mg/kg/day	1 p	4 days
C19	D2	5.7	70	Rif	50 mg/kg/day	1 p	4 days
C20	D2	11.4	80	Rif	50 mg/kg/day	1 p	4 days
C21	D2	2.2	70	3-MC	20 mg/kg/day	1 p	4 days
C22	D2	2.8	57	3-MC	20 mg/kg/day	1 p	4 days
C23	D2	4.6	76	3-MC	20 mg/kg/day	1 p	4 days
C24	D2	13.0	80	3-MC	20 mg/kg/day	1 p	4 days

hAb Human albumin concn (mg/mL)

RI Replacement index (%)

D1 Japanese, 12 years, male

D2 Caucasian, 9 months, male

Rif Rifampicin

3-MC 3-Methylcholanthrene

4-C. 研究結果

4-C-1 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP3A4 の発現

Fig 1AにヒトCYP3A4 mRNA発現量の定量結果を示す。両トナー由来のキメラマウスともに、hAb値依存的なヒトCYP3A4 mRNA発現量の増加が認め

られた。また、キメラマウスC5のmRNA発現量は、トナーD1の約0.7倍であった。

Fig 1BにヒトCYP3A4タンパク発現量の定量結果を示す。両トナー由来のキメラマウスともに、hAb値依存的なヒトCYP3A4タンパク発現量の増加が認められた。トナーD1由来のキメラマウスではC3から、トナーD2由来のキメラマウスではC13からヒトCYP3A4タン

パクの発現が認められた。キメラマウスC5のタンパク発現量は、トナーD1の約1.5倍であった。

Fig 1C にデキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の結果を示す。両トナー由来のキメラマウスともに、hAlb 値依存的なデキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の増加が認められた。キメラマウスC5 (7.5 pmol/mg protein/min) の活

性値は、トナー D1 (12.5 pmol/mg protein/min) の約 0.6 倍であった。なお、HLM の活性値 (32.6 pmol/mg protein/min) は uPA (+-)/SCID マウス (6.2 pmol/mg protein/min) や uPA (-)/SCID マウス (7.2 pmol/mg protein/min) と比べて約 5 倍であった。

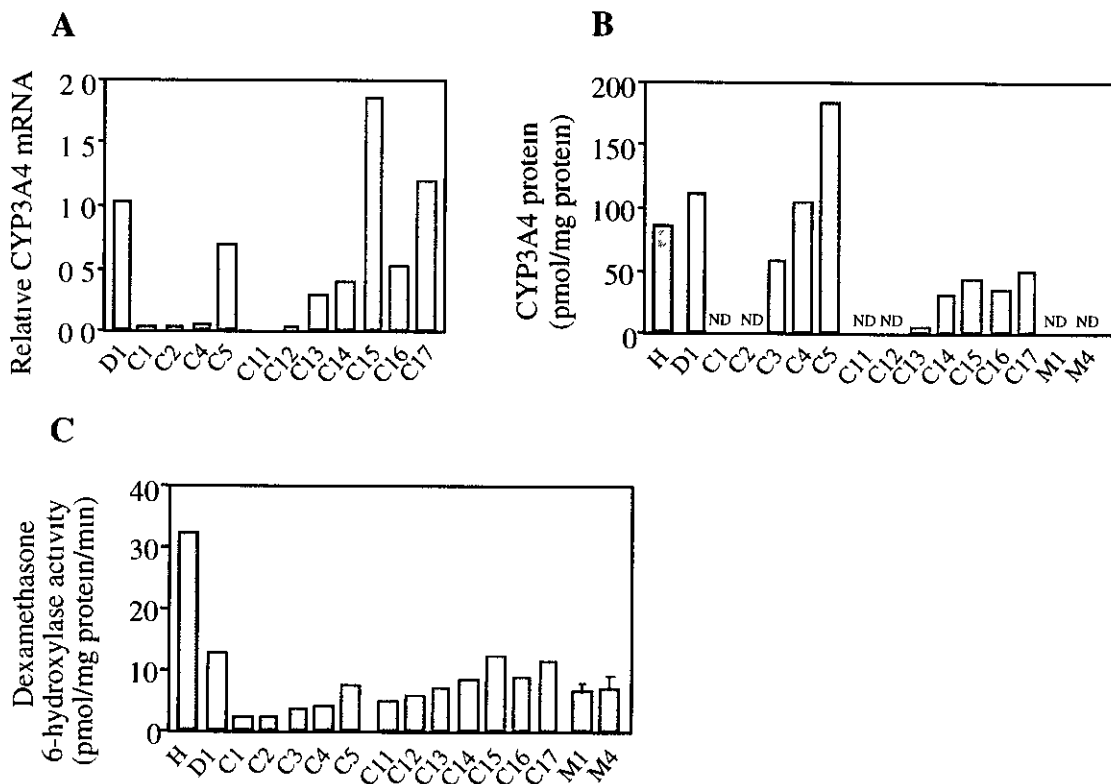


Fig 1 Human CYP3A4 expression in chimeric mice
The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A), protein (B) and the dexamethasone 6-hydroxylase activity catalyzed by CYP3A4 (C) were determined as described in Materials and Methods. The concentration of dexamethasone was 100 μ M. The columns of M1 and M4 represent the mean \pm SD (n=3).
H: Pooled human liver microsomes from Gentest, M1: uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4: uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, ND: Not detected

4-C-2 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP2C9 の発現

Fig 4A にヒト CYP2C9 mRNA 発現量の定量結果を示す。両トナー由来のキメラマウスともに、hAlb 値依存的な

ヒト CYP2C9 mRNA 発現量の増加が認められた。まめラマウスでは C2 から、トナー D2 由来のキメラマウスでは C12 からヒト CYP2C9 タンパクの発現が認められた。キメラマウス C5 のタンパク発現量はトナー D1 の約 1.1 倍であった。

Fig 4C にシクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の結果を示す。両トナー由来のキメラマウスともに、hAlb 値依存的なシクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の

増加が認められた。キメラマウス C5 (1.73 nmol/mg protein/min) の活性値はトナー D1 (0.74 nmol/mg protein/min) の約 2.3 倍であった。なお、HLM の活性値 (1.80 nmol/mg protein/min) は uPA (+-)/SCID マウス (0.09 nmol/mg protein/min) や uPA (-)/SCID マウス (0.09 nmol/mg protein/min) と比べて約 20 倍であった。

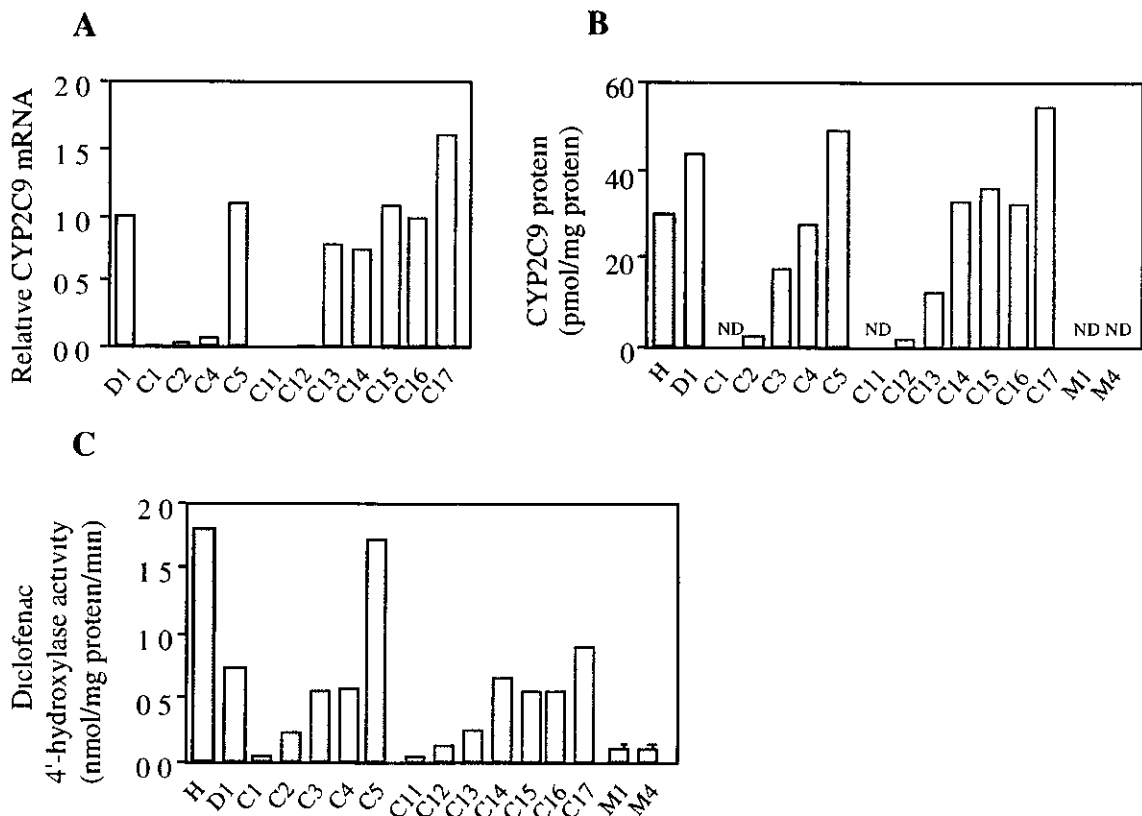


Fig 2 Human CYP2C9 expression in chimeric mice

The expression levels of human CYP2C9 mRNA (A), protein (B) and the diclofenac 4'-hydroxylase activity catalyzed by CYP2C9 (C) were determined as described in Materials and Methods. The concentration of diclofenac was 30 μ M. The columns of M1 and M4 represent the mean \pm SD (n=3).

H: Pooled human liver microsomes from Gentest, M1: uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4: uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, ND: Not detected.

4-C-3 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP2A6 の発現

Fig 3AにヒトCYP2A6 mRNA発現量の定量結果を示す。両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb値依存的なヒトCYP2A6 mRNA発現量の増加が認められたが、トナーD1およびトナーD1由来のキメラマウスのmRNA発現量は、トナーD2由来のキメラマウスに比へ著しく低かった。

Fig 3BにヒトCYP2A6タンパク発現量の定量結果を示す。ドナーD2由来のキメラマウスでは、hAlb値依存的なヒトCYP2A6タンパク発現量の増加が認められたか、トナーD1およびトナーD1由来のキメラマウスではハントか認められなかった。ドナーD2由来のキメラマウスではC14からヒトCYP2A6タンパクの発現が認められた。

Fig 3C にクマリン 7-水酸化酵素活性の結果を示す。トナー D1 およびトナー D1 由来のキメラマウスでは活性はほとんど認められなかった。これに対し、トナー D2 由来のキメラマウスでは、hAlb 値依存的なクマリン 7-水酸化酵素活性の増加が認められた。なお、HLM の活性値 (305.4 pmol/mg protein/min) は uPA (+/-)SCID マウス (15.1 pmol/mg protein/min) や uPA (-/-)SCID マウス (20.2 pmol/mg protein/min) と比べて約 15 倍であった。

トナー D1 およびトナー D1 から作製したキメラマウス C7 とともに、遺伝子型は CYP2A6*4A/CYP2A6*4A であ

った。

4-D 考察

CYP はヒトにおいて生体内基質および生体外異物の代謝に関わるヘムタンパクである。現在までに、CYP1B1、CYP3A4、CYP3A7 などのヒト CYP 遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスモデルが作製されている。これらのトランスジェニックマウスは通常、ヒト CYP 一分子種のみ発現しており、また、宿主であるマウスの Cyp は活性を有していると考えられる。従って、CYP 遺伝子の転写調節や毒性発現メカニズムの検討など、これらのトランスジェニックマウスの薬物代謝実験における使用は限られているのか現状である。しかし、ヒト肝細胞キメラマウスの肝はヒト肝細胞に置換されているため、ヒト CYP が発現しており、かつ、マウス Cyp の発現は低く抑えられていると予想される。そこで本章では代表的な薬物代謝酵素である CYP の、ヒト肝細胞キメラマウスにおける発現とその機能を明らかにすることを目的に mRNA、タンパク、酵素活性レベルでの検討を行った。その結果、トナー D1 およびトナー D2 由来のキメラマウスの肝において、ヒト CYP mRNA が発現しており、またウエスタンブロット分析の結果から CYP3A4、CYP2C9、CYP1A2、CYP2D6 などの主要なヒト CYP タンパクが発現していることを明らかにした。また、全分子種の mRNA 発現量、タンパク発現量ともに hAlb 値およびRI値依存的な増加が認められた。

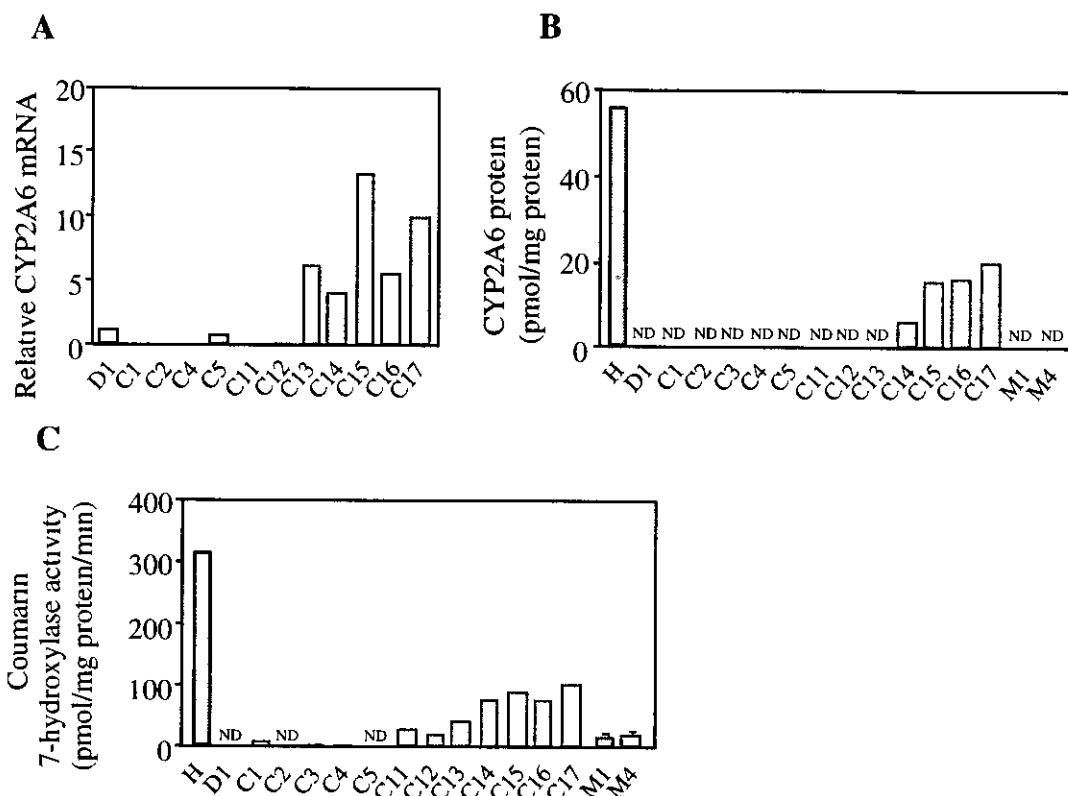


Fig 3 Human CYP2A6 expression in chimeric mice
 The expression levels of human CYP2A6 mRNA (A), protein (B) and the coumarin 7-hydroxylase activity catalyzed by CYP2A6 (C) were determined as described in Materials and Methods. The concentration of coumarin was 1 μ M. The columns of M1 and M4 represent the mean \pm SD (n=3). H: Pooled human liver microsomes from Gentest, M1: uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M4: uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes, ND: Not detected.

キメラマウスの肝ミクロソームにおいて、CYP2C9が触媒するシクロフェナク4'-水酸化反応はマウス肝ミクロソームを用いた場合にはヒトの約1/20であったため、ヒトに特異的な反応であると考えられる。実際に、Mankowskiら (2000) によると、シクロフェナク4'-水酸化酵素活性はヒトでは検出されたが、マウスでは検出できなかったと報告している。しかし、Bogaardsら (2000) はB6C3Fマウスの肝ミクロソームでは、 K_m 値はヒ

トとほぼ同であったが、 V_{max} 値が約1/10から1/20であったと報告している。従って、本章で得られた結果とBogaardsらの報告 (2000) は一致した。またヒトにおいてCYP3A4が触媒するテキサメタソン6-水酸化反応について、ヒトでの主要代謝物は6-水酸化テキサメタソンであるが、マウスにおいては6-hydroxy-9 α -fluoro-androsta-1,4-diene-11 β -hydroxy-16 α -methyl-3,17-dioneであると報告されている。テキサメタソン6-水酸化酵素反応は、

マウスと比へヒトでは約5倍高い酵素活性を示したか、本章で使用したトナーおよびキメラマウスの活性値がHLMと比較して低かったため、ヒトとマウスの差が顕著にあらわれなかったと考えられる。また、ヒトにおいてCYP2A6が触媒するクマリン7-水酸化酵素活性は、雄性マウスと比へてヒト男性で K_m 値は近似しているか、 V_{max} 値は約25倍であることが報告されており、本章の結果と矛盾はないと考えられる。これより、シクロフェナク4-水酸化酵素活性とクマリン7-水酸化酵素活性の測定は、キメラマウスにおけるヒトCYPの発現をより明確に示す指標であると考えられる。ヒト肝細胞キメラマウスの肝ミクロソームを用いてこれらの酵素活性を検討したところ、高いhAlb値を示すキメラマウスでトナーと同程度の酵素活性が認められたことから、キメラマウスの肝に発現しているCYPは、ヒトのCYPと同等の薬物代謝能を有することか明らかになった。CYP2A6、CYP2C9およびCYP3A4以外の分子種については、ヒト特異的な酵素活性を見つけることができなかった。従って、これらのCYP分子種に関しても、ヒト特異的な酵素活性をさらに検討する必要があると考えられる。しかし、CYP2A6、CYP2C9およびCYP3A4と同様、mRNAとタンパクの発現が認められているため、ヒトと同じ機能を有していると考えられる。

本章の実験でウエスタンブロット

分析より求めたキメラマウス肝のCYPタンパク発現量は、CYP2A6およびCYP3A5以外はHLMと顕著な差は認められなかった。しかし、キメラマウスの酵素活性はHLMと比較して、全てにおいて低かった。この原因は不明であるか、使用したトナーの年齢が影響しているのかもしれない。キメラマウスはトナーのCYP機能を反映すると予測される。本章で使用したトナーは12才および9ヶ月の男性である。これに対し、HLMのトナーは成人であるため、キメラマウスのCYPの活性がHLMと比へて低い可能性が示唆される。従って、今後さらに成人のヒト肝細胞を用いて作製したキメラマウスにおける薬物代謝能を検討する必要があると考えられる。

また、hAlb値が0 mg/mLであるキメラマウス C1 や C11 について、一部の酵素活性が検出された。しかし、uPA (++)/SCID マウスは肝不全を呈し、長期間生存することは不可能である。本章で用いたキメラマウスは11-14 週齢であるため、C1 や C11 はキメラマウス肝かヒト肝細胞に置換されたというよりも、マウス肝細胞が再生し、肝としての機能を果たすことかできたため、生存してきたと推測される。従って、タンパクの発現が認められていないことも併せて、これらのキメラマウスで検出された酵素活性はマウス由来と考えて妥当であろう。

CYP には多くの変異型が報告されており、この変異型がヒトにおける

薬物動態の個体差を惹起する要因と考えられている。これまで変異型が及ぼす影響について、ヒト CYP 発現系や遺伝子多型が判定されている単一トナー由来の肝ミクロソームなどの *in vitro* 実験系を用いて検討されてきた。従って、ヒト肝細胞キメラマウスかトナーと同一の遺伝子型を有するか検討することは重要である。I-3-4 の結果より、トナー D1 およびトナー D1 由来のキメラマウスの肝ミクロソームでは、CYP2A6 タンパクの発現が認められなかった。しかしトナー D2 由来のキメラマウスからは CYP2A6 タンパクが検出された。同様に、ヒト CYP2A6 の指標活性であるクマリン 7-水酸化活性についても、トナー D1 およびトナー D1 由来のキメラマウスでは、クマリン 7-水酸化活性は検出できなかったか、トナー D2 由来のキメラマウスでは本酵素活性が認められた。現在まで、CYP2A6 に関して多くの変異型が報告されている。このうち CYP2A6*4 は CYP2A6 遺伝子を全欠損しているため、CYP2A6*4 のホモ接合体を有するヒトは CYP2A6 タンパクを検出することかできず、Poor Metabolizer としての表現系を示す。遺伝子判定を行った結果、トナー D1 およびトナー D1 由来のキメラマウスは CYP2A6*4A のホモ接合体であった。従ってヒト肝細胞キメラマウスはトナーと同一の遺伝子多型を有し、遺伝子型および表現型ともにトナーと同一であることが明らかになった

4-E 結論

本章ではヒト肝細胞キメラマウスにはヒト CYP が発現しており、トナーと同程度の薬物代謝能を有することを明らかにした。また、キメラマウスはトナーと同一の遺伝子多型を有することも明らかにした。

第 5 章 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP の誘導能に関する検討

5-B 研究方法

5-B-1 薬物投与

リファンピシンは 50 mg/kg/day、3-MC は 20 mg/kg/day を 4 日間腹腔内投与し、最終投与 24 時間後に肝臓を摘出した。なお、リファンピシン投与はトナー D1 とトナー D2 由来のキメラマウスを用いたか、3-MC 投与にはトナー D2 由来のキメラマウスのみとした。

5-B-2 その他の実験条件

酵素活性測定条件等は前章に準じた。

5-C 研究結果

本章における誘導率は、同一トナー由来の薬物未処置群で最も近似した hAlb 値を示したキメラマウスを対照として算出した。また、mRNA 発現量についてはヒト GAPDH mRNA

て補正した。なお、データは示さないか、キメラマウスにおいてヒト GAPDH mRNA 発現量は hAlb 値依存的に増加しており、誘導薬の影響も認められなかった。

5-C-1 リファンピシン投与によるヒト CYP への影響

5-C-1-1 ヒト CYP3A4 の誘導

Fig 4A にヒト CYP3A4 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与により、mRNA 発現量はトナー D1 由来のキメラマウスで 15-27 倍、トナー D2 由来のキメラマウスで 6-10 倍の顕著な増加が認められた。

Fig 4B にヒト CYP3A4 タンパク発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与により、タンパク発現量はトナー D1 由来のキメラマウスで 2.5-3.4 倍、トナー D2 由来のキメラマウスでは C13 の値が低かったため、C18 の見かけの誘導率が約 33 倍となったか、その他は約 10 倍であった。両トナー由来のキメラマウスともに顕著な増加が認められた。

Fig 4C にデキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の結果を示す。リファンピシン投与により、本酵素活性はトナー D1 由来のキメラマウスで 9.9-14.5 倍、トナー D2 由来のキメラマウスで約 5 倍の顕著な増加が認められた。

uPA (+/-)/SCID マウス、および uPA (-/-)/SCID マウスではリファンピシン投与による活性値の上昇は認められなかった。

5-C-1-2 ヒト CYP2C9 に及ぼす影響

Fig 5A にヒト CYP2C9 mRNA 発現量の定量結果を示す。トナー D2 由来のキメラマウス C19 は C14 と比較して 4.6 倍の増加を示したか、その他のキメラマウスでは 1.0-2.1 倍の増加であった。

Fig 5B にヒト CYP2C9 タンパク発現量の定量結果を示す。トナー D2 由来のキメラマウス C18 は C13 と比較して 3.4 倍の増加を示したか、その他のキメラマウスでは 1.0-1.6 倍の増加であった。

Fig 5C にジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の結果を示す。リファンピシン投与によりトナー D1 由来のキメラマウスで 1.5-2.0 倍、トナー D2 由来のキメラマウスでは 0.6-2.4 倍の増加であった。uPA (+/-)/SCID マウス、および uPA (-/-)/SCID マウスではリファンピシン投与による活性値の上昇は認められなかった。

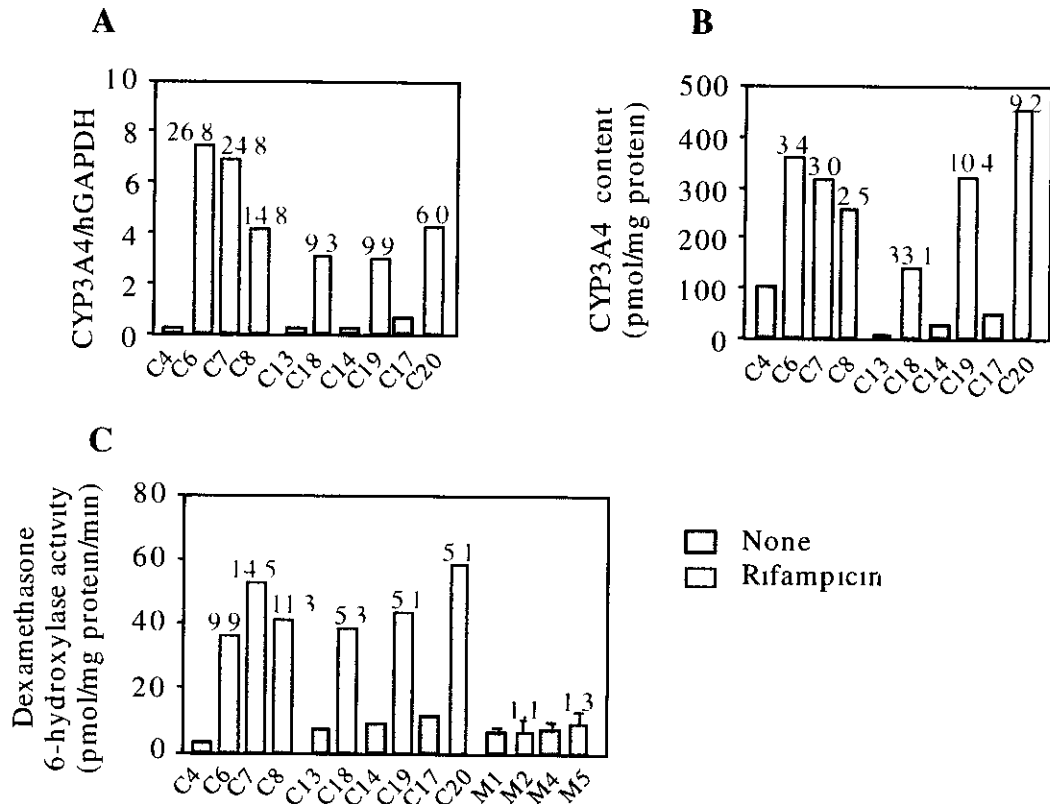


Fig 4 Changes of human CYP3A4 expression in rifampicin-treated chimeric mice The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A), protein (B) and the dexamethasone 6-hydroxylase activity (C) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with the in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents The concentration of dexamethasone was 100 μ M The columns of M1, M2, M4 and M5 represent the mean SD (n=3)

M1 Non-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M2 Rifampicin-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4 Non-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, M5 Rifampicin-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes

5-C-2 3-MC 投与によるヒト CYP への影響

増加が認められた。

5-C-2-1 ヒト CYP1A2 の誘導

Fig 6A にヒト CYP1A2 mRNA 発現量の定量結果を示す。3-MC 投与により、mRNA 発現量は 2.1-8.2 倍の増加が認められた。

Fig 6B にヒト CYP1A2 タンパク発現量の定量結果を示す。3-MC 投与により、タンパク発現量は 4.0-9.7 倍の

5-C-2-2 ヒト CYP3A4 に及ぼす影響

Fig 7A にヒト CYP3A4 mRNA 発現量の定量結果を示す。キメラマウス C24 か C17 に比へ顕著に低い値を示したか、その他のキメラマウスに関しては 3-MC 投与により、mRNA 発現量に顕著な差は認められなかった (0.9-2.0 倍)。