

Fig 5 Changes of human CYP2C9 expression in rifampicin-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP2C9 mRNA (A), protein (B) and the diclofenac 4'-hydroxylase activity (C) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of diclofenac was 30 μ M. The columns of M1, M2, M4 and M5 represent the mean \pm 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.

Fig 7B にヒト CYP3A4 タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス C13 の発現量が低かったためか、C21 と C22 の値が見かけ上、それぞれ約 75 倍、約 122 倍の増加となった。その他のキメラマウスについては 3-MC 投与群と対照群を比較すると、1.2 および 3.0 倍の差であり、ヒト CYP3A4 タンパクについては大きなはらつきが認められた。

Fig 7C にテキサメタソン 6-水酸化酵素活性の結果を示す。

mRNA 発現量が顕著に低かった C24 は本酵素活性も低かった。その他のキメラマウスについては 3-MC 投与による顕著な変動は認められなかった (0.7-1.1 倍)。uPA (+-)/SCID マウスおよび uPA (-)/SCID マウスでは、3-MC 投与による顕著な変動は認められなかった。

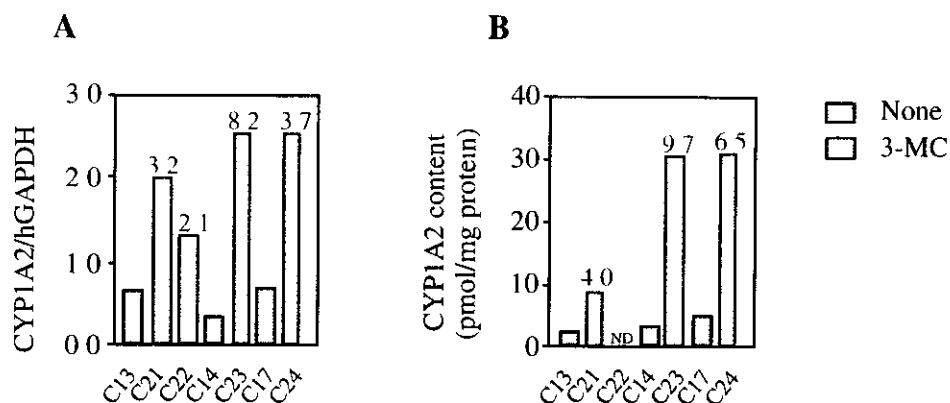


Fig 6 Changes of human CYP1A2 expression in 3-MC-treated chimeric mice
 The expression levels of human CYP1A2 mRNA (A) and protein (B) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents
 ND not detected

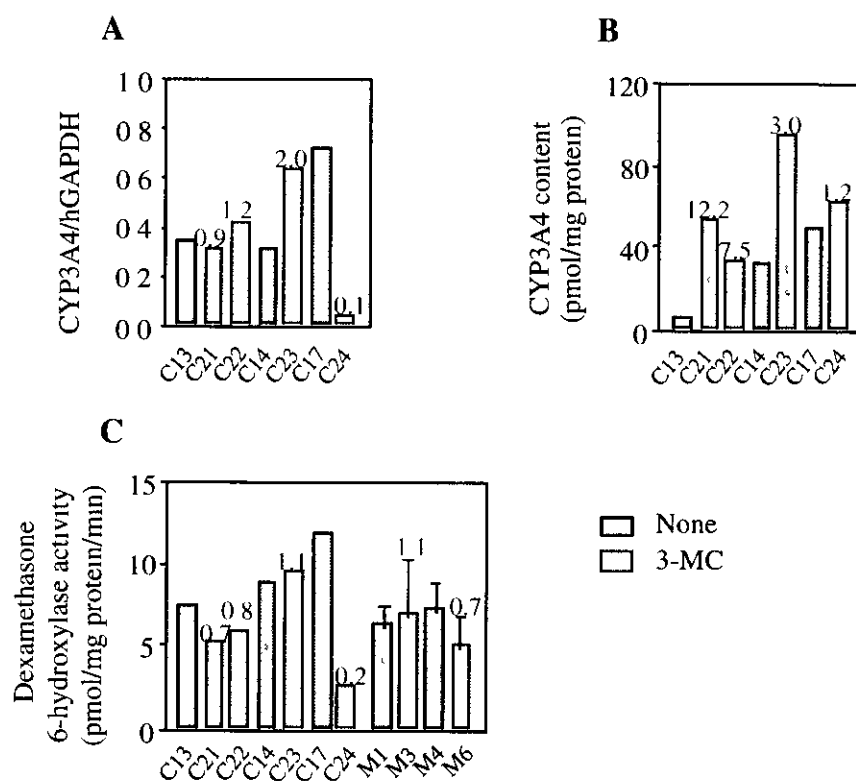


Fig 7 Changes of human CYP3A4 expression in 3-MC-treated chimeric mice
 The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A), protein (B) and the dexamethasone 6-hydroxylase activity (C) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of dexamethasone was 100 μ M. The columns of M1, M3, M4 and M6 represent the mean \pm SD (n=3)
 M1 Non-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M3 3-MC-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4 Non-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, M6 3-MC-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes

5-D 考察

薬物を反復投与すると、その薬物もしくは併用薬の薬効の減弱が認められることがある。これは薬物代謝酵素誘導に基づく相互作用であり、CYPの誘導に関して多くの報告がなされている。また、臨床で用いられている酵素誘導を起こす薬物は、肝障害を惹起することもあり、副作用の面からも酵素誘導能の有無を検査することは重要であると言われている。薬物代謝酵素誘導実験はラットやイヌで行うことが一般的であるか、投与量かヒトにおける臨床用量と乖離している場合もあり、そのままヒトを予測することが難しい場合もある。また、*in vitro* 実験系において、誘導実験に用いられる細胞株は、細胞培養や遺伝子の導入技術のめざましい発展により改良されてきたが、転写因子や一部の遺伝子のみの発現であることが多い。これより全CYP分子種が発現しているヒトおよび実験動物の肝細胞が誘導実験に頻用されている。また、肝細胞を用いた*in vitro* 実験系で認められたCYPの誘導は、*in vivo* においても同程度の誘導を示すと考えられている。CYPに関しては、ヒト肝細胞での実験においてCYP1A、CYP2A、CYP2B、CYP2C、CYP2E および CYP3A サブファミリーが誘導されることか明らかになっている。第4章より、ヒト肝細胞キメラマウスの肝においてヒトCYPが発現していることを明らかにした。そこで、本

章ではヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトCYPの誘導能について検討を行った。CYPの代表的な誘導薬であるリファンピシンと3-MCをキメラマウスに投与し、各CYP分子種の変動をmRNA、タンパク、酵素活性レベルで検討した。

リファンピシンはヒトCYP3A4を誘導することが*in vitro*、*in vivo*実験系で明らかになっている。本章の結果より、リファンピシン投与によりキメラマウスのヒトCYP3A4 mRNAおよびタンパク発現量はそれぞれ約6-27倍、2.5-10.4倍増加した。また、デキサメタゾン6-水酸化酵素活性は、5.1-14.5倍の増加が認められた。ヒト肝細胞を使った誘導実験において、曝露条件などは異なるが、リファンピシンはCYP3A4 mRNAを約12倍、約13倍、5.0倍、2.8-14.8倍誘導するとの報告がなされている。また、タンパク発現量に関しては、ヒト肝スライスを用いた実験において3.3倍(1.0-18.4倍)、ヒト肝細胞を用いた実験で約3倍、4.2倍、9.4倍、1.2-8.2倍の増加が示されている。ヒト肝細胞を用いた実験でリファンピシン投与によりCYP3A4の指標活性であるテストステロン6 β -水酸化酵素活性が10.5倍、2.1-10.1倍、4-30倍、平均約10倍、7.1-26倍増加したと報告されている。本章での結果は*in vivo*実験系であり誘導条件が異なることに加え、対照としたキメラマウスのhAlb値およびRI値が、誘導群のキメラマウスと正確に同してはなないことなどを考慮すると、これらの

報告と本章での結果には大きな矛盾はないと考えられる。また、uPA (+-)/SCIDマウスおよびuPA (-)/SCIDマウスにおいて、デキサメタゾン6-水酸化酵素活性の上昇が認められなかった。ddYマウスにリファンピシンを100 mg/kg/dayで4日間腹腔内投与すると、Cyp3a11 mRNA発現量が約50倍に増加したとの報告がなされている。従って、uPA (+-)/SCIDマウスおよびuPA (-)/SCIDマウスにおいてもCyp3a11が誘導されていると考えられるか、マウスの主代謝物は6-水酸化デキサメタゾンではないため、リファンピシンによるデキサメタゾン6-水酸化酵素活性の誘導が認められなかったのかもしれない。以上より、キメラマウスはヒトCYP3A4の誘導能を有することを明らかにした。

また、リファンピシンはヒト肝細胞もしくはヒト肝スライスを用いた実験系で、ヒトCYP3A4以外にも、様々なCYPを誘導することか明らかになっている。特にCYP2Cサブファミリーに関する検討が多くなされているか、CYP2C8については、mRNA発現量では5.5倍、3.4倍、タンパク発現量では2.6-15.8倍、約4倍、2.8倍、2.7-9.9倍の増加が示されている。一方、CYP2C8タンパク発現量は変化しないとの報告もなされている。CYP2C9については、mRNA発現量が3.3倍増加し、また、タンパク発現量が約4倍、2.4倍、 2.1 ± 1.8 倍増加したとの報告がある。CYP2C9の指標活性であるトルブタミト4'-水酸化酵素活性が3.7倍、

ジクロフェナク4'-水酸化酵素活性が1.3-10倍増加したと報告されている。また、ヒトの*in vivo*での実験において、リファンピシンとCYP2C9の基質であるワルファリンとの併用により、ワルファリンのAUCが減少したと報告されている。これに対し、ヒト肝細胞の実験において、mRNAおよびタンパク発現量に変化は認められなかったとの報告もなされている。

CYP2C18については報告数が少ないか、mRNA発現量に影響を及ぼさないことが示されている。CYP2C19については、mRNA発現量が1.8倍の上昇であり、また、タンパク発現量は、2.4倍、2.7倍の増加であった。CYP2C19の指標活性であるS-メフェニトイン4'-水酸化酵素活性は8.3倍、4.9-190倍増加した。しかし、mRNAおよびタンパク発現に影響を及ぼさない、あるいは、CYP2C19タンパクの誘導は 5.7 ± 5.3 倍であり個体差が大きいとの報告もある。本章の結果と比較すると、CYP2C8およびCYP2C9に関しては、過去の報告ほど誘導は認められなかったか、リファンピシンによる増加傾向は認められた。ジクロフェナク4'-水酸化酵素活性に関しては、トナーの異なるキメラマウス間での増加傾向に差が認められ、また、誘導率の算出は対照群の活性値に大きく左右されるため、誘導されたと判断するには、例数を増やすなど更なる検討が必要と考えられる。また、CYP2C18とCYP2C19についてはmRNA発現量のみでの検討であるため、

タンパク、酵素活性レベルで誘導について検討が必要であろう。CYP2A6について、ヒト肝細胞でリファンピシンによるタンパクレベルでの誘導が認められたとの報告がなされているか、mRNA発現量が1.7倍程度の増加であったとの報告や、タンパク発現量は平均2.1倍の増加が認められたがはらつきは大きかったとの報告がある。クマリン7-水酸化酵素活性について、増加したか有意差は認められなかったとの報告や、0.8-1.1倍の増加であったとの報告がなされている。リファンピシンによるCYP2A6の誘導については、過去の報告でも指摘されているか、発現量が低く、さらに個体差が大きく、そのうえ例数が少ないため明確な結論を出すに至っていない。本章の結果では、mRNA、タンパク、酵素活性全てにおいてリファンピシンにより2-3倍程度の増加が認められ、これまでの報告と大きく矛盾することはなかった。CYP1A2についてはNishimuraら（2002）によるとリファンピシン投与によりmRNA発現量に変化は認められず、また、Edwardsら（2003）によるとCYP1A2タンパク発現量に変化は認められなかった。CYP1A2の指標活性であるエトキシレソルフィンO-脱エチル化酵素活性について、2-3倍の上昇が認められたとの報告がある一方、2.3倍上昇したか有意差は認められなかったとの報告がある。これらの報告は本章の結果とほぼ一致すると考えられる。CYP2D6についてもタンパク

発現量や指標活性であるデキストロメトルファンO-脱メチル化酵素活性に影響を及ぼさないことが示されており、本章の結果と一致した。

リファンピシンはCYP3A4を誘導するが、興味深いことに同系ファミリーに属するCYP3A5について、タンパクレベルでの誘導が認められなかったことが示されている。しかし、mRNA発現量は2.8倍に増加したとの報告がある。本章での結果については、ウエスタンブロット分析の実施に際し、対照群とリファンピシン投与群で実験日が異なること、CYP3A5のタンパク発現量が低いことを考慮すると、さらに例数を増やした上で考察する必要があると考えられる。以上より、リファンピシンに関して、これまでに報告されているCYP分子種の発現変動は、本章で得られた結果とほぼ一致したと考えられる。

3-MC に関しては、ヒト肝細胞での実験について報告はあまりないが、3-MC の曝露により CYP1A2 タンパクやエトキシレソルフィン O-脱エチル化酵素活性が検出可能になったため、ヒト肝細胞での CYP1A2 は誘導されたことが明らかになっている。なお、Runge ら（2000）によると、CYP1A1 タンパクは誘導されず、また、CYP2C9 および CYP2C19 タンパクも変動は認められなかったと報告している。本章の結果より、3-MC 投与により CYP1A2 mRNA およびタンパクレベルで誘導が認められたことは、これらの報告と一致する。しかし、CYP1A1

mRNA の増加が認められたため、CYP1A1 については更なる検討が必要と考えられる。また、他の分子種に関して、キメラマウスの例数が少なく大きなはらつきが認められるか、一般的に 3-MC 投与によりタンパク、酵素活性レベルはほぼ同程度、もしくはやや減少傾向を示した。

E 結論

本章においてヒト肝細胞キメラマウスはヒト CYP 誘導能を示すことを明らかにした。今後、例数を増やすとともに、さらに様々な誘導薬に関して検討を行う必要があると考えられる。キメラマウスを用いた誘導実験はヒト肝細胞を用いた場合に比べ、活性が低い分子種についても検討が可能であり、さらにより生体に近い *in vivo* の状態で検討を行うことかてきると多くの利点があると考えられる。

第6章 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

6-A 研究目的

当初の研究計画に従い、平成 15 年度は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で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、同時に一般化を諮ることに着手した。

製薬メーカー 7 社の薬物動態の研究所および 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キメラマウスの使用および研究内容の調整を全て行っている。本研究会は、公に開示できない研究内容は行わず、必ず速やかに学会発表等を行うことを前提としている。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・結論を得て終了する予定である。

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。

6-1 アモスラロール塩酸塩の代謝の検討（山之内製薬との共同研究課題）

6-1-A 研究目的

アモスラロール塩酸塩の *in vivo* 代謝には明確な種差があり、マウスでは M-2 クルクロン酸抱合体が主代謝物であり、他に M-5、M-3 グルクロン酸抱合体、M-4 グルクロン酸抱合体に代謝されるか、ひとは、未変化体に次いで、M-3 硫酸抱合体が主た

る代謝物であり、他にはほとんど知られていない。従って、代謝に明確な種差が存在するアモスラロール塩酸塩をモデル化合物として、ヒト肝細胞キメラマウスにおいてヒト特異的な代謝を観察することができるか、マウスとしての代謝能かどの程度残っているかについて検討を進行中である。

6-1-B 研究方法

キメラマウスにアモスラロール 10 mg/kg を経口投与する。24 時間尿 0.5mL について酢酸アンモニウムなどで抽出し、HPLC-MS にて分析 (ESI-positive/negative) を行った。

6-1-C 研究結果と考察

ヒト肝細胞キメラマウスの尿中代謝物について検討した結果、キメラマウスのヒト肝置換率の増加に伴って代謝物 3 の硫酸抱合体 (M3-S) および M1 が増加した。低置換率と高置換率のマウスの比較により、ヒト特異的な代謝物の予測が明確に可能と考えられた。ヒトとマウスでクリアランスの差が少ない化合物ほど予測が可能である。同時に胆汁中の代謝物についても検討したか、キメラマウスの個体差が大きいため、解析が難しい。さらに、キメラマウスは一般のマウスに比べて小さいために、胆管カニューレの装着が難しい。また、この研究において、ICR マウスを対照群として用いた。未同定はあるか、キメラマウスの尿中に ICR

にはない代謝物と考えられるピークも認められたため、注意が必要である。

6-2 化合物 A の反復経口投与による肝毒性の検討 (山之内製薬との共同研究課題)

6-2-A 研究目的

化合物 A は齧歯類、イヌおよびサルにおける毒性試験にて、臨床試験を上回る暴露量においても肝酵素に変化はなかったが、ヒトにおいてのみ、GOT/GPT の上昇が被験者の 60/70% に観察された。そこで、このヒト特異的肝障害性がヒト肝細胞キメラマウスで再現できるかについて検討することとした。この研究課題も現在進行中である。化合物 A は、現在は構造式が公開できないが、トキシコゲノミクスの計画班において、山之内製薬から提供される予定の化合物であり、将来構造式が公開される予定である。

6-2-B 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスの低置換率と高置換率それぞれに化合物 A を 30 mg/kg、1 日 1 回 7 日間反復経口投与した。投与前日、4 日目、7 日目の投与後 2 時間の血液を採取し、GOT、GPT、化合物 A の血中濃度、ヘマトクリット値を測定した。

6-2-C 研究結果と考察

高置換率のキメラマウス 3 匹中

1匹において、投与前日の2倍を超えるGPTの上昇変化が認められたか、その3匹の平均の上昇は、対照群と比較して有意差はなかった。低置換率のマウスにおいて、ICRよりも高いGOT/GPTが観察された。

UPA(+/-)SCIDやuPA(-/-)SCIDマウスのGOT/GPTの変化について、今後詳しいデータを採取する必要がある。今回の実験では、マウス由来のGOT/GPTをヒト由来を分離して測定していない。種別に測定できれば、差が明確になると考えられる。また、置換率の高いキメラマウスを、一群6匹以上でまとめた実験をする必要があると思われるため、今後の検討課題と考える。また、投与量および投与期間を変化させて例数を増やして今後検討する予定である。

6-3 ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓の組織学的検討（山之内製薬およびファイザーとの共同研究課題）

6-3-A 研究目的

広島大学の吉里研において、キメラマウスの肝臓の組織化学的検討はなされているか、薬物動態関連の蛋白質の発現について、組織学的な検討は行われていない。よって、トランスポーターの発現を中心に検討を行った。

6-3-B 研究方法

対照群としてのSCIDマウスおよび、低置換率、中程度の置換率および高

置換率のマウス肝の切片を作製して検討を行った。

6-3-C 研究結果と考察

組織構築については、CD31抗体を用いて、類洞用血管があることを確認し、ZO-1によって、毛細胆管の形成も十分にされており、タイトジャンクションが形成されていることを確認した。また、細胞質が淡明であるために、グリコーケンの蓄積が豊富であり、増殖活性が強いことがPCNA陽性であることから推定された。

トランスポーターについては、類洞側にOAT2, LST-1, MRP3か、毛細胆管側にMRP2, P-GPが陽性に染色されたことから、薬物の取り込み排泄に関する機能を有していることが推定された。さらに、類洞側と毛細胆管側のトランスポーターは別々の部位に発現していることから、極性を有していることも認められた。以上より、ヒト肝細胞キメラマウスの肝は薬物輸送の評価をできる系として有用であると考えられた。

6-4 ヒト肝細胞キメラマウス由来初代肝細胞培養系（ヘパトサイト）を用いた酵素誘導試験 置換率の違いによる誘導能の評価について（本課題は大塚製薬工場(株)との共同研究課題である）

6-4-A 研究目的

昨年度の報告において、置換率の

高いマウスを用いて、薬物動態関連遺伝子の発現について網羅的に検討した結果および、ヒト CYP に焦点を絞った検討結果について横井毅が報告した。

ヒト肝細胞キメラマウスは、常に 80%以上の置換率が得られるわけではなく、様々な置換率のマウスが作製されてくる。そこでここでは、置換率の違いによる誘導の差異について検討した。

6-4-B 研究方法

置換率が約 20、40、50、60%のキメラマウス由来のヘパトサイトを 10 万細胞/0.4mL/well の条件で播種し、3 時間後に培地を交換し、さらに 24 時間後に再度培地を交換し、その 24 時間後に薬物暴露を開始し、24 時間暴露させた。その試料について RNA を回収して CYP1A1、CYP1A2 について real-time PCR にて検討した。

6-4-C 研究結果と考察

β -アクチンおよび GAPDH による補正は、いずれを対照として使用しても誘導率に変化は認められなかった。CYP1A1 は、60%置換率のヘパトサイトにおいて、 β -ナフトフラボンが 25mM の高濃度において 7.5 倍程度の誘導が認められた。これに対して、80%以上の置換率のキメラマウスにおいては、低濃度の β -ナフトフラボンの暴露においても十分な誘導が認められた。CYP1A2 については、ヒトおよびマウスのヘパトサイトにお

いて、通常の培養条件では CYP1A2 の発現および誘導の検討は難しいことか報告されており、本検討においても、十分な誘導を認められなかった。CYP1A2 の誘導に関しては、3 次元的な培養手法を行う必要がある。今後は、異なるトナー由来のヒト肝を有するマウス由来のヘパトサイトについて検討し、個体差についての情報を充実させる予定である。

6-5 ヒト肝細胞キメラマウスを用いた E5110 による酵素誘導試験

6-5-A 研究目的

E5110 はヒト臨床第 1 相試験において、反復投与により未変化体の AUC が低下するとともに肝 CYP3A のマーカーである 6β -ヒドロキシコルチゾール量の投与量依存的な増加が観察されている。ラットでのこうした現象は観察されていない。本研究では、キメラマウスを用いて、CYP3A4 の誘導が認められるか、さらに非侵襲的な CYP3A4 の誘導を認めることができるかについて検討することを目的とした。

6-5-B 研究方法

E5110 を 5 mg/kg 経口投与し、投与後 0-24、24-48、48-72 時間の尿を採取。72 時間の時点で、コルチゾールを投与し、その 16 時間後の尿を採取した。

6-5-C 研究結果と考察

E5110 における CYP3A4 遺伝子の発現量は、同じ C 葉で比較した結果、未処理の発現量と比較して、予想置換率 50% では、2.8 倍、予想置換率 80% では、32 倍であった。E5110 における UGT1A1 遺伝子の発現量は、未処理の発現量と比較して、予想置換率 80% で 10 倍であった(図 8)。CYP3A5 の発現は確認できなかった。以上、ヒト肝細胞キメラマウスを用いることにより、臨床で観察された E5110 投与による CYP3A4 および UGT1A1 遺伝子の発現誘導が再現してきた。

今後は、このキメラマウスか、非侵襲的な酵素誘導のモデル動物になりうるかの検討を行う予定である。

6-E 結論

ヒト肝細胞キメラマウス研究会として、製薬メーカー 7 社と 1 大学研究室との共同研究の主な 5 課題について説明した。これらの課題は全て進行中であり、遠からず学会発表、論文発表を行う予定である。さらに、ファイサーと、CYP3A の誘導の種差を利用して、ヒト特異的な CYP3A を見積もる研究を開始している。誘導剤として、リファンピシンとリファブチンを投与して、比較検討を行っている。また、第一製薬とは、抗菌薬レボフロキサシンの代謝の種差と毒性の差異について検討を開始する予定である。また、金沢大学の研究グループとして、抱合系の Phase II の薬物代謝酵素について検討を行っている。また、金沢大と三共の共同課

題として、ヒト特異的な肝毒性で知られているトログリタゾンについて、キメラマウスで、ヒト特異的な肝障害が再現できるかについて検討を開始したところである。さらに、ファイメトリクス社の DNA マイクロアレイを用いて、ヒトとマウスの遺伝子の動きの差異から、ヒト特異的な遺伝子の動きを網羅的に検討することを考え、現在武田薬品工業との共同研究課題として進行中である。また、東京大学大学院製剤設計学研究室との共同課題として、プラハスタチンの取り込みの種差に注目をして検討中である。

以上、平成 15 年度には、多くの製薬メーカーの研究者と 13 の共同研究課題を開始することができ、データが開始している。平成 16 年度には全ての課題を終了し、ヒト肝細胞キメラマウスの有用性について、確実な評価をだすことができると考えている。

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,

1 吉里勝利 ヒト肝細胞キメラマウスの医薬品開発応用への展望、日本薬物動態学会第 17 回ワークショップ、2003 4 18、昭和大学上條講堂

2 吉里勝利 Growth and Differentiation

Potential of Human Hepatocytes,
Biocomplexity IV Workshops
Regenerative Biology and Medicine,
2003, 5 15, Willkie Conference
Center/Indiana University Bloomington

3 吉里勝利 ヒト肝細胞キメラマウス、医療薬学フォーラム 2003 7 5、広島国際会議場

4 吉里勝利 ヒト型キメラマウスの作製と医学研究への展望、ゲノム創薬フォーラム、2003 7 16、日本薬学会会長井記念ホール

5 吉里勝利 先端医療のこれからの発展～肝臓再生について、市民公開講座、2003 9 13、泉南市総合福祉センター

6 吉里勝利 ヒト肝細胞のインヒトロ及びインビホでの増殖能、第 7 回九州肝不全研究会、2003 9 20、西鉄グラントホテル

7 横井毅 他 ヒト肝細胞を有するキメラマウス由来の初代肝細胞培養系を用いた酵素誘導試験、日本薬学会 123 年会、平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎

8 横井毅 他 ヒト肝細胞キメラマウスにおける *in vitro* 薬物代謝能の検討、第 18 回日本薬物動態学会年会、平成 15 年 10 月 8-10 日、札幌

9 横井毅 他 ヒト肝細胞キメラマウスにおける薬物代謝酵素の誘導能に関する検討、第 18 回日本薬物動態学会年会、平成 15 年 10 月 8-10 日、札幌

10 横井毅 他 EXPRESSION OF HUMAN CYP IN CHIMERIC MICE WITH HUMANIZED LIVER, The 7th International ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) Meeting、平成 16 年 8 月 29 日～9 月 2 日、ハンクーハー、カナダ

11 横井毅 他 IN VIVO INDUCTION POTENCY OF HUMAN CYP IN CHIMERIC MICE WITH HUMANIZED LIVER, The 7th International ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) Meeting、平成 16 年 8 月 29 日～9 月 2 日、ハンクーハー、カナダ

H 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得 なし
- 2 実用新案登録 なし
- 3 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

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。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ランスシェニクマウス（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か必要不可欠である。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がった。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か可能となった。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かできることか分かった。

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、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%以上か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ようにするには、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、複数のト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

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 μL /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 μl 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。

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か、

移植に用いる uPA (+/+) /SCID マウスの匹数か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%未満か約 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 割であったか 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。

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。

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

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 遺伝子が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 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。

C. 研究結果

リアルタイム定量 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か、それでも判定が困難なマウスは移植動物からはすしていた。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か、移植後30日ころから低下する。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。したがって、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 産物をアカロースケ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。

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。

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かてきるようになり、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

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。

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% 程度の個体が 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	トナー 年齢/性別 ¹⁾	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。

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 代以上のトナーに比べて

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。

E. 結論

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

4 その他

置換率を予測するために血中ヒトアルブミン濃度はこれまで ELISA キット (Human Albumin ELISA Quantitation Kit, Bethyl laboratories Inc) を用いて測定してきたが、操作が煩雑で時間がかかるため、12 月より簡易に血中ヒトアルブミン濃度が測定できるラテックスヒース比濁法のキット (LX 試薬' 栄研' Alb-II、栄研化学株式会社) による測定を導入した。尚、文部科学省知的クラス

ター創成事業において、キメラマウス血中ヒトアルブミン濃度を ELISA 法と比濁法で測定したところ、高い相関関係が認められている。これまでに ELISA では一日を要する煩雑な作業を行っていたが、比濁法に変更することにより、数時間で血中ヒトアルブミン濃度を定量することが可能となった。

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

1 吉里勝利 ヒト肝細胞キメラマウスの医薬品開発応用への展望、日本薬物動態学会第 17 回ワークショップ、2003 4 18、昭和大学上條講堂

2 吉里勝利 Growth and Differentiation Potential of Human Hepatocytes, Biocomplexity IV Workshops Regenerative Biology and Medicine, 2003, 5 15, Willkie Conference Center/Indiana University Bloomington

3 吉里勝利 ヒト肝細胞キメラマウス、医療薬学フォーラム 2003 7 5、広島国際会議場

4 吉里勝利 ヒト型キメラマウスの作製と医学研究への展望、ケノム創

薬フォーラム、2003 7 16、日本薬学
会長井記念ホール

5 吉里勝利 先端医療のこれからの
発展～肝臓再生について、市民公開
講座、2003 9 13、泉南市総合福祉セ
ンター

6 吉里勝利 ヒト肝細胞のインヒト
ロ及びインヒホでの増殖能、第 7 回
九州肝不全研究会、2003 9 20、西鉄
クラントホテル

H 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得 なし
- 2 実用新案登録 なし
- 3 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におけるヒト CYP 代謝能および誘導能に 関する検討

分担研究者 中島 美紀 金沢大学薬学部 助教授

研究要旨

マウス肝の80%以上をヒト肝細胞に置換することか可能であるヒト肝細胞キメラマウスは、ヒトにおける薬物動態を予測する有用なシステムになり得ると予想される。しかし、これまで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I章では、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'-水酸化酵素活性やテキサメタソン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。

第II章では、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