

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かあると考えられる。

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。

A. 研究目的

医薬品開発における薬物動態および安全性の予測試験には、ヒト由来組織とりわけヒト肝試料が必要である。我が国では現在、多量のヒト肝を欧米からの輸入に頼っている。本研究では、独自に吉里勝利教授（分担研究者）によって開発された『ヒト肝細胞キメラマウス』を用いて、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を樹立することを目的とする。ヒト肝細胞キメラマウスは、特殊な免疫不全マウスにヒト肝細胞を注入し、ヒト肝細胞を特異的に増殖させる画期的なシステムであり、マウス肝の約80%以上をヒト肝に置き替わり、トナーの肝細胞と全く同じ肝細胞を多量に作製することが可能である。

このヒト肝細胞キメラマウスの適用により、(1) 同一のトナー由来のヒト

肝細胞を無制限に増やして得ることが出来るため、肝細胞の極めて有効な利用が可能になる。(2) 多種類の肝細胞のパネル化が容易になり、複数の研究機関におけるデータの比較検討が容易になる。(3) パネル化された肝細胞により、遺伝子多型と表現多型（特に誘導能）の対応付けが可能になる。(4) 実験動物の使用を減らすことができる。(5) 医薬品開発のコストを削減できる。(6) 入手が困難な日本人由来の肝細胞を多量に得ることが可能になる。(7) 人種差の検討が極めて容易になる。(8) 我が国発信の技術である。(9) 毒性発現の予測研究が飛躍的に進展するなど、この画期的な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

に維持することか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が知られている。そこで本研究において、分担者である中島は、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 I 章として記す。さらに誘導能に関する研究について第 II 章として記す。

第 I 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

B. 研究方法

B-1 ヒト肝細胞キメラマウス

uPA (+/-)/SCID マウスおよび uPA (-/-)/SCID マウスは日本チャールス・リハー (Yokohama, Japan) より入手した。本研究ではキメラマウスのトナーとして、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 1 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 1 に併記した。

B-2 肝からの total RNA の調製

ISOGEN のマニュアルに修正を加え、以下の方法で肝臓から total RNA を調製した。約 30 mg の肝臓に、ISOGEN 0.5 mL を加えてホモシナイズ後、サンプルチューブに分注し、クロロホルム 0.1 mL を加えて激しく 15 秒間攪拌した。室温で 3 分間放置した後、4°C、14,000 g で 15 分間遠心分離した。上清を別のチューブに採取し、0.25 mL のイソプロパノールを加えて室温にて 8 分間放置した後、4°C、14,000 g で 10 分間遠心分離した。沈殿を 75% エタノールで洗浄した。この沈殿を乾燥させた後、DEPC 処理精製水に溶解させ、260 nm における吸光度を測定することにより定量した。同時に 300 nm の吸収を基準とし

て 280 nm と 260 nm の吸光度を測定し、その比をタンパク質混入の有無の指標とした。なお、キメラマウス

C3 およびトナー D2 の肝を入手することかてきなかったため、total RNA を調製てきなかった。

Table 1 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

B-3 RT-PCR法によるヒトCYP mRNA発現量の定量

I-2-2 より得られた total RNA から以下の方法により cDNA を合成し

た。Total RNA 4 μ g、ランダムヘキサマー (150 ng/ μ L) 1 μ L に DEPC 処理水を加えて 23 μ L とした。70°C 水浴中で 10 分間反応後、氷冷した。さらに 5x 逆転写反应用緩衝液 8 μ L、

2.5 mM dNTPs 8 μ L、MMLV-逆転写酵素 1 μ L を加えて全量を 40 μ L とした。37°C で 60 分間反応させた後、沸騰水浴中で逆転写酵素を失活させた。得られた cDNA 溶液を用いて以下の方法により PCR を行った。cDNA 溶液 1 μ L、10 μ M センスプライマー 1 μ L、10 μ M アンチセンスプライマー 1 μ L、5x SGI 緩衝液 5 μ L に滅菌精製水を加え、全量を 25 μ L とした。全ての遺伝子について Smart Cycler[®] System (Cepheid,

Sunnyvale, CA) を用いて以下の条件で PCR 反応を行い、蛍光を real time で検出することにより定量を行った。(1) 95°C で 30 秒を 1 サイクル (2) 94°C で 4 秒、64°C で 20 秒を 45 サイクル。本章で使用したヒト CYP プライマーを Table 2 示す。予備検討の結果より、本章で使用したヒト CYP プライマーはマウス Cyp と交差反応を示さないことを確認した。

Table 2 Sequence of the primers used in the present study

Primer	Sequence
CYP1A1 RT-S	5'-ATGACCAGAAGCTATGGGTC-3'
CYP1A1 RT-AS	5'-GCACGCTGAATTCCACCC-3'
CYP1A2 RT-S	5'-GCTTCTACATCCCCAAGAAAT-3'
CYP1A2 RT-AS	5'-TCCCACTTGGCCAGGACT-3'
CYP2A6 RT-S	5'-AGCAACAGGCCTTTCAGTT-3'
CYP2A6 RT-AS	5'-CCCAATGAAGAGGTTCAAC-3'
CYP2C8 RT-S ^a	5'-AGATCAGAATTTTCTCACCC-3'
CYP2C8 RT-AS ^a	5'-AACTTCGTGTAAGAGCAACA-3'
CYP2C9 RT-S	5'-CAGATCTGCAATAATTTTCTC-3'
CYP2C9 RT-AS	5'-CTTTCAATAGTAAATTCAGATG-3'
CYP2C18 RT-S ^a	5'-ACCTCAGGATTCTGAGCTCT-3'
CYP2C18 RT-AS ^a	5'-TTGAAGAAGTCCTTGCGTGTC-3'
CYP2C19 RT-S ^a	5'-ATTGAATGAAAACATCAGGATTG-3'
CYP2C19 RT-AS ^a	5'-GAGGGTTGTTGATGTCCATC-3'
CYP2D6 RT-S	5'-GGTGTGACCCATATGACATC-3'
CYP2D6 RT-AS	5'-CTCCCCGAGGCATGCACG-3'
CYP3A4 RT-S	5'-CCAAGCTATGCTCTTCACCG-3'
CYP3A4 RT-AS	5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3'
CYP3A5 RT-S	5'-AGTGTCTTTCTTCACTTTA-3'
CYP3A5 RT-AS	5'-TTCAACATCTTTCTTGCAAGT-3'

S Sense primer, AS Anti-sense primer

^a From Klose et al (1999)

B-4 肝ミクロソームの調製

採取した肝に、肝重量の 3 倍容のホモシナイス緩衝液を加え、ポリトロンにより細切後、テフロンホモジナイサーにてホモシナイスした。ホモシネートを 9,000 g、4°C で 20 分間遠心分離後、上清をさらに 105,000 g、4°C で 90 分間遠心分離した。沈殿物にホモシナイス緩衝液を加えてホモシナイス後、105,000 g、4°C で 60 分間遠心分離した。得られた沈殿物を TGE 緩衝液に懸濁し、使用時まで 80°C で保存した。タンパク定量はウシ血清アルブミンを標準タンパクとして、常法に従い行った (Lowry et al, 1951)。なお、ドナー D2 について肝を入手することができなかつたため、ミクロソームを調製できなかつた。

B-5 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

Laemmli (1970) および Towbin ら (1979) の方法に修正を加え、以下の方法により測定を行った。肝ミクロソームは滅菌精製水で、CYPを発現したハキュロウイルス発現系ミクロソームは 1 mg/mL の透析ヒト肝サイトソルでそれぞれ希釈した。ヒト肝サイトソルは Ishikawa ら (1998) の方法に従い、以下のように透析した。ダイヤライシスマンブラン 8 (和光純

薬工業) を用い、約 330 倍量の 1 mM 2-メルカプトエタノールを含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に 4°C で約 20 時間透析した。

サンプル 10 μ L に対して、サンプル処理液と 2-メルカプトエタノールを 32 : 5 の割合で混合した溶液を 10 μ L 加えた後、100°C で 3 分間煮沸し、厚さ 1 mm、7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE 後、Immobilon 膜 (Millipore, Billerica, MA) に電氣的に (10 V, 30 分) 転写した。この際、濾紙、アクリルアミドケル、Immobilon 膜は転写用緩衝液に浸して使用した。転写後、Immobilon 膜を 3% スキムミルク、0.1% Tween 20 を含む PBS 溶液に浸してブロッキングを一晩行った。1 次抗体としてウサギ抗ヒト CYP1A2 抗体 (PBS で 1,000 倍希釈)、ウサキ抗ヒト CYP2A6 抗体 (PBS で 5,000 倍希釈)、ウサキ抗ヒト CYP2C8 抗体 (PBS で 5,000 倍希釈)、ウサギ抗ヒト CYP2C9 抗体 (PBS で 2,000 倍希釈)、マウス抗ヒト CYP2D6 抗体 (PBS で 2,000 倍希釈)、ウサキ抗ヒト CYP3A4 抗体 (PBS で 1,000 倍希釈)、ウサギ抗ヒト CYP3A5 抗体 (PBS で 500 倍希釈) を用いた。2 次抗体として CYP2D6 はヒオチン化抗マウス IgG 抗体 (PBS で 2,000 倍希釈) を、その他の分子種にはヒオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (PBS で 2,000 倍希釈) を用い、3 次抗体としてペルオキシ

ターゼ標識アヒジンヒオチン複合体

(PBSで2,000倍希釈)を用いた。抗体はCYP2A6のみ1次抗体と30分、その他の分子種では1次、2次、3次抗体ともにそれぞれ室温で60分間反応させた。フロッキング後、1次、2次抗体反応後はPBSで5分、3回洗浄し、3次抗体反応後はPBSで10分、3回洗浄し、非特異的に結合した抗体を除いた。発色は0.06%の3,3'-シアミノヘンチシン四塩酸塩で行ない、GS-700デンストメーター(Bio-Rad, Hercules, CA)にて定量した。

予備検討の結果より、各ヒト CYP 抗体は本章の実験条件ではマウス Cyp と交差反応を示さないことを確認した。各 CYP における肝ミクロソームのアプライ量は以下の通りである。CYP1A2 (20 µg)、CYP2A6 (20 µg)、CYP2C8 (20 µg)、CYP2C9 (5-10 µg)、CYP2D6 (10 µg)、CYP3A4 (5-10 µg)、CYP3A5 (20 µg)。

B-6 デキサメタソン6-水酸化酵素活性の測定

デキサメタソン6-水酸化酵素活性は、Gentileら(1996)およびTomlinsonら(1997)の方法に修正を加え以下のように測定した。最終濃度が100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、100 µM デキサメタソン、0.2 mg/mL ミクロソームタンパクとなるように精製水を加えて全量を180 µLとした。

37°Cで2分間プレインキュベートした後、NADPH生成系を20 µL添加することにより反応を開始した。37°Cで30分間インキュベートした後、酢酸エチルを1.5 mL加え激しく攪拌することにより反応を停止した。3 M NaCl および内部標準物質として5 ng/µL 6-水酸化クロルゾキサゾン(Chlorzoxipron)を10 µL加えた。650 gで10分間遠心分離し、有機溶媒層を採取し、窒素気流下蒸発乾固させた。残渣を移動相 200 µLに溶解し、100 µLをHPLCに注入した。

HPLCによる分析にはL7100ポンプ(日立製作所, Tokyo, Japan)、L7200オートサンプラー(日立製作所)、L7405 UV 検出器(日立製作所)、Uni-3 ノイズヘースクリーン(ユニオン, Gunma, Japan)、CTO-6A カラムオープン(島津製作所, Kyoto, Japan)を用いた。カラムはMightysil RP8 (4.6 mm x 150 mm, 関東化学, Tokyo, Japan)を用い、移動相はアセトニトリル 0.018%キ酸= 18 : 82 (v/v)とした。カラム温度は35°C、流速は1.0 mL/minとし、溶離液をUV 423 nmでモニターし、D-2000インテグレーター(日立製作所)に出力した。

B-7 シクロフェナク4'-水酸化酵素活性の測定

最終濃度が100 mM リン酸カリウ

ム緩衝液 (pH 7.4)、30 μ M シクロフェナク、0.2 mg/mL ミクロソームタンパクとなるように精製水を加えて全量を180 μ Lとした。37°Cで2分間プレインキュベートした後、NADPH生成系を20 μ L添加することにより反応を開始した。37°Cで30分間インキュベートした後、氷冷したアセトニトリルを200 μ L添加することにより反応を停止した。内部標準物質として50 μ M クロルソキサゾン5 μ Lを加えた後、6,500 gで5分間遠心分離を行い、上清100 μ LをHPLCに注入した。

HPLCによる分析にはL7100ポンプ、L7200オートサンプラー、L7405 UV検出器、CTO-6Aカラムオープンを用いた。カラムはMightysil RP18 (4.6 mm x 150 mm, 関東化学)を用い、移動相は22%アセトニトリル、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)とした。カラム温度は35°C、流速は1.0 mL/minとし、溶離液をUV 282 nmでモニターし、D-2000インテグレーターに出力した。

B-8 クマリン7-水酸化酵素活性の測定

クマリン7-水酸化酵素活性はYamazakiら (1999)の方法に修正を加え、以下の方法により測定した。最終濃度か100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、1 μ M クマリン、0.1

mg/mL ミクロソームタンパクとなるように精製水を加えて全量を180 μ Lとした。37°Cで1分間プレインキュベートした後、NADPH生成系を20 μ L添加することにより反応を開始した。37°Cで3分間インキュベートした後、氷冷した60% 過塩素酸を20 μ L添加することにより反応を停止した。6,500 gで5分間遠心分離を行い、上清20 μ LをHPLCに注入した。

HPLCによる分析にはLC-6Aポンプ (日立製作所)、AS-950オートサンプラー (日本分光, Tokyo, Japan)、FP-920II蛍光検出器 (日本分光)、CTO-6Aカラムオープンを用いた。カラムはCapcell Pak C18 (4.6 mm x 150 mm, 資生堂, Tokyo, Japan)を用い、移動相は20%アセトニトリル、20 mM 過塩素酸ナトリウムとした。カラム温度は35°C、流速は1.0 mL/minとし、溶離液をEx 338 nm、Em 485 nmでモニターし、D-2000インテグレーターに出力した。

B-9 肝ケノムDNAの調製

トナー D1、ドナー D1 由来のキメラマウス C7、uPA (+/-)/SCID マウス、uPA (-/-)/SCID マウス、リファンピシンを投与した uPA (+/-)/SCID マウスの肝について以下の操作を行い、ケノムDNAを調製した。肝切片約40 mgにTE (pH 7.4)を加えガラスホモジ

ナイサーにてホモジナイスした。その後、別のチューブに移し、SE を 500 μ L 加え、さらに 1/10 量の 10 mg/mL アクチナーゼ E と 10 mg/mL RNase を 10 μ L 加え転倒攪拌した後、37°C で 2 時間インキュベートした。等量のフェノール溶液を加え、室温で 10 分間振盪後、20°C、600 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。次に等量のフェノール/クロロホルム溶液を加え、室温で 10 分間振盪後、20°C、600 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収し、再度同様の操作を行った。さらに 2 倍量のクロロホルム溶液を加え、室温で 10 分間振盪し、20°C、600 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。0.5% リニアーポリアクリルアミトを 10 μ L 加えた後、冷エタノールを 2.5 倍容加え、穏やかに転倒攪拌した。-80°C で 30 分間冷却した後、4°C、9,000 g にて 10 分間遠心分離を行った。沈殿を冷 70% エタノールで洗浄し、得られたゲノム DNA を TE に溶解した。4°C で一晩放置後、260 nm における吸光度を測定することにより定量した。

B-10 PCR-RFLP 法によるヒト CYP2A6 遺伝子多型の判定

CYP2A6*4 の遺伝子判定は制限酵素 *Acc II* と *Eco8I* I を用いた PCR-RFLP 法により判定を行った。I-2-7 で調製

したゲノム DNA 約 2 μ g に 10x PCR 緩衝液 25 μ L、10 μ M のセンスプライマー (2Aex7F 5'-GGCCAAGATGCCCTACATG-3') と 10 μ M のアンチセンスプライマー (2A6UTR-AS1 5'-TGTAATAATGGGCATGAACGCCC-3') をそれぞれ 1 μ L、2.5 mM dNTPs 2.5 μ L、25 mM MgCl₂ 1.5 μ L、Taq DNA ポリメラーゼ 0.2 μ L (1.0 U) を加え、滅菌精製水にて全量を 25 μ L とし、以下の条件で PCR 反応を行った。

(1) 95°C で 1 分 (2) 95°C で 15 秒、60°C で 20 秒、72°C で 3 分を 35 サイクル (3) 72°C で 7 分。反応終了後、得られた PCR 産物 17.6 μ L に 10x M 緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM MgCl₂、10 mM DTT、50 mM NaCl) 2 μ L と制限酵素 *Acc II* 0.2 μ L (1.0 U) と *Eco8I* 1.0 2 μ L (1.0 U) を加え、全量を 20 μ L とし 37°C で一晩インキュベートした。反応後、2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い遺伝子断片の長さを確認した。Fig 1 に泳動模式図を示した。2% アガロースゲルはアガロース 3.0 g、エチシウムフロマイト、0.5x TBE 150 mL を固化させたものとした。電気泳動用溶液には 0.5x TBE を用いた。なお、使用したプライマーは uPA (+/-)/SCID マウス、uPA (-/-)/SCID マウスのゲノム DNA には交差反応しないことを確

認した。

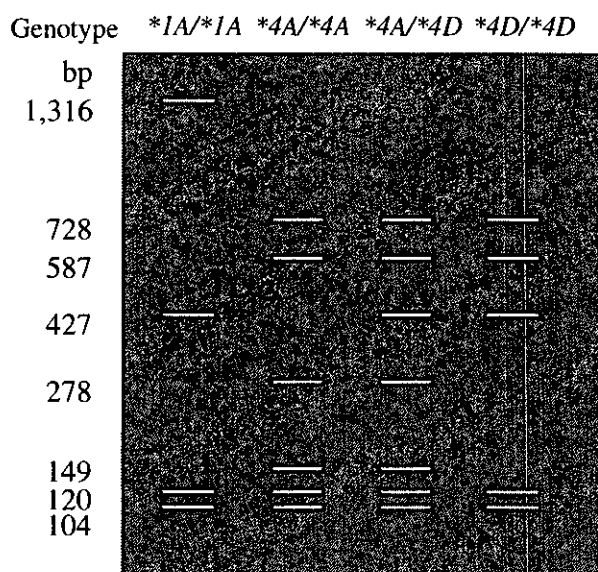


Fig 1 Genotyping of *CYP2A6*4A* and *CYP2A6*4D* in genomic DNA by PCR-RFLP. Schematic PCR-RFLP patterns for different *CYP2A6* alleles of *CYP2A6*1A* (wild type), *CYP2A6*4A* and *CYP2A6*4D*. The *CYP2A6*1A* yields 1,316, 427, 120 and 104 bp fragments, *CYP2A6*4A* yields 728, 587, 278, 149, 120 and 104 bp fragments and *CYP2A6*4D* yields 728, 587, 427, 120 and 104 bp

C. 研究結果

C-1 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト *CYP3A4* の発現

Fig 2A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、hAlb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 2B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、hAlb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 2C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。

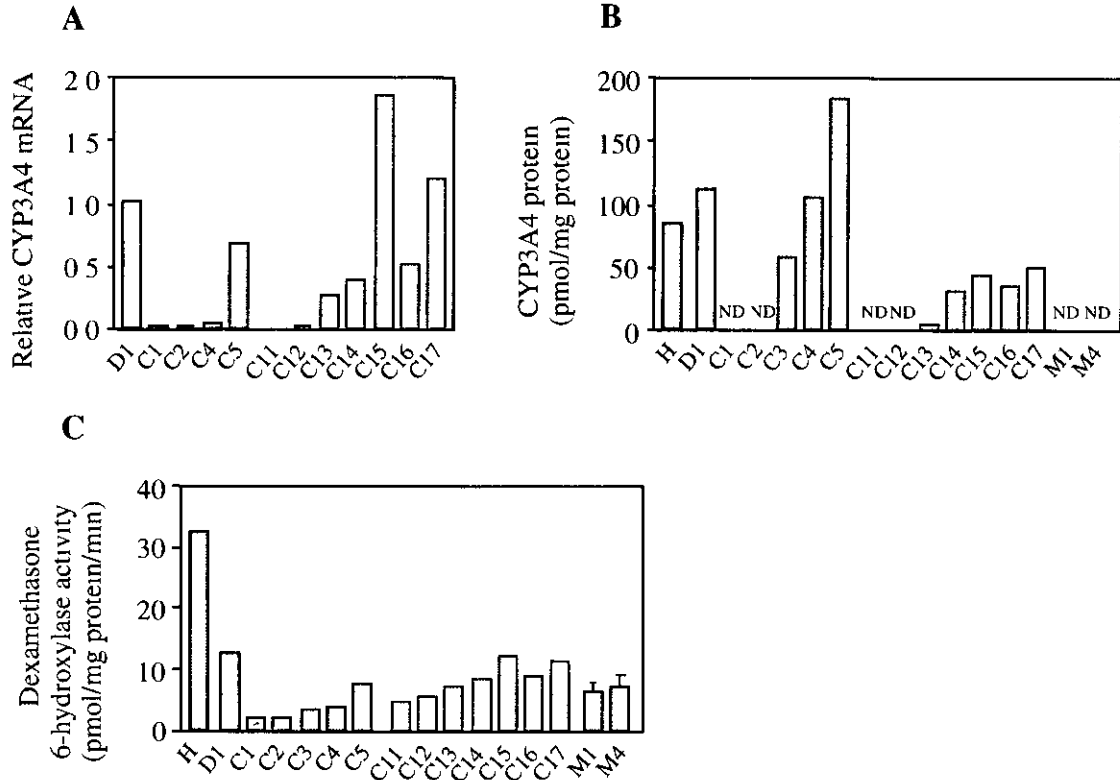


Fig 2 Human CYP3A4 expression in chimeric mice
The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A), protein (B) and the dexamethasone 6-hydroxylase activity catalyzed by CYP3A4 (C) were determined as described in Materials and Methods. The concentration of dexamethasone was 100 μ M. The columns of M1 and 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

C-2 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP2C9 の発現

Fig 3A 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 値依存性的なヒト CYP2C9 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 1.1 倍であった。

Fig 3B にヒト CYP2C9 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、hAlb 値依存性的なヒト CYP2C9 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 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 3C にジクロフェナク 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 値依存的なジクロフェナク 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。

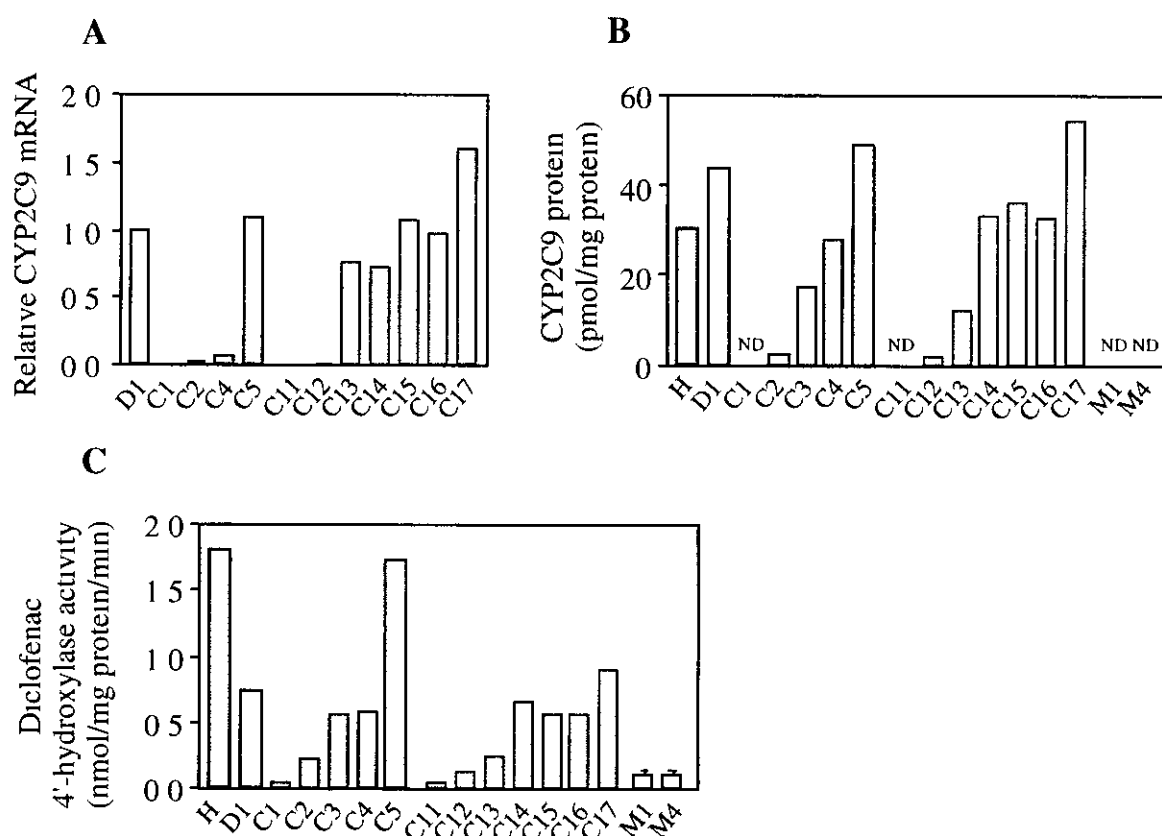


Fig 3 Human CYP2C9 expression in chimeric mice
The expression levels of human CYP2C9 mRNA (A), protein (B) and the diclofenac 4'-hydroxylase activity catalyzed by CYP2C9 (C) were determined as described in Materials and Methods. The concentration of diclofenac was 30 μ M. The columns of M1 and M4 represent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

C-3 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP2A6 の発現

Fig 4AにヒトCYP2A6 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CYP2A6 mRNA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 4BにヒトCYP2A6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が、ドナーD1およびトナーD1由来のキメラマウスではハントが認められなかった。トナー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 4C 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、ドナー 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 ともに、遺伝子型は *CYP2A6*4A/CYP2A6*4A* であった。

C-4 ヒト CYP1A1 の発現

Fig 5A にヒト CYP1A1 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 CYP1A1 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 20 倍であった。

C-5 ヒト CYP1A2 の発現

ヒト CYP1A2 について、Fig 5B に mRNA 発現量の、Fig 5C に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、hAlb 値依存的なヒト CYP1A2 mRNA 発現量およびタンパク発現量の増加が認められた。また、ヒト CYP1A2 タンパクは、ドナー 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 C12 から発現が認められ、キメラマウス C5 の mRNA およびタンパク発現量はトナー D1 のそれぞれ約 14 倍、約 13 倍であった。

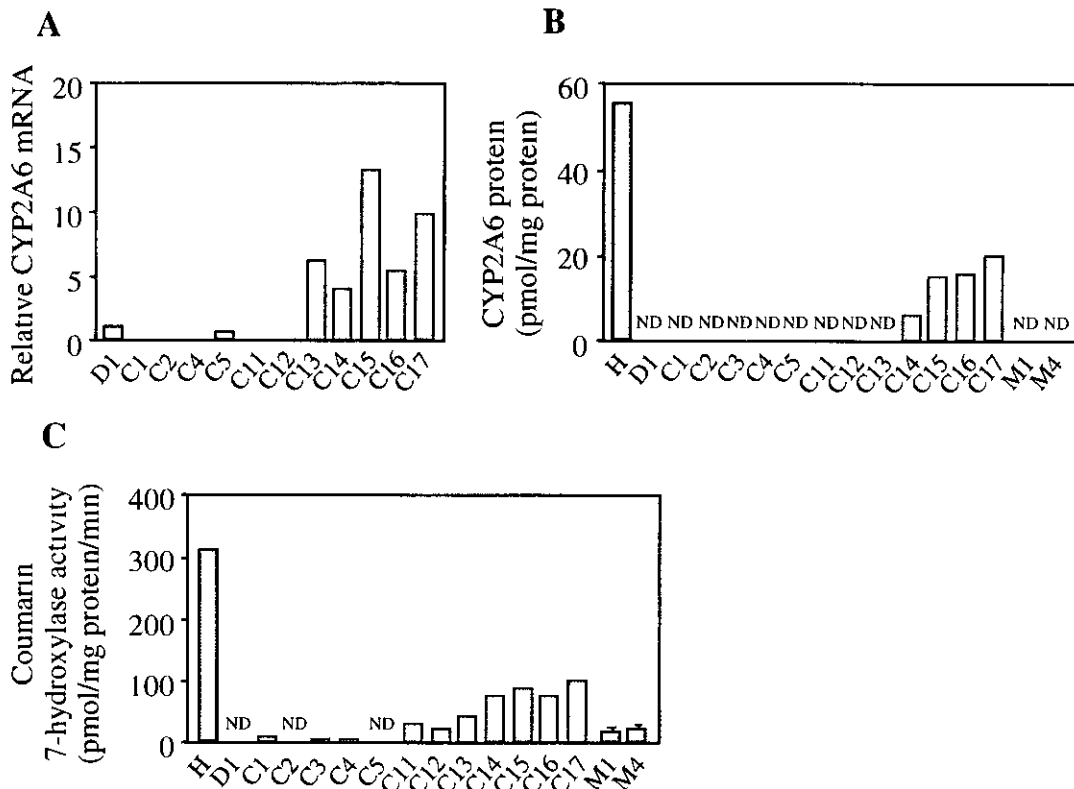


Fig 4 Human CYP2A6 expression in chimeric mice
 The expression levels of human CYP2A6 mRNA (A), protein (B) and the coumarin 7-hydroxylase activity catalyzed by CYP2A6 (C) were determined as described in Materials and Methods. The concentration of coumarin was 1 μ M. The columns of M1 and M4 represent 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

C-6 ヒト CYP2C8 の発現

ヒト CYP2C8 について、Fig 6A に mRNA 発現量の、Fig 6B に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、hAlb 値依存的なヒト CYP2C8 mRNA 発現量およびタンパク発現量の増加が認められた。また、ヒト CYP2C8 タンパクは、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 C12 から発現が認められ、キメラマウス C5

の mRNA およびタンパク発現量はトナー D1 のそれぞれ約 0.8 倍、約 1.1 倍であった。

C-7 ヒト CYP2C18 の発現

Fig 6C にヒト CYP2C18 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 C13 の発現量が高いか、両トナー由来のキメラマウスともに、hAlb 値依存的なヒト CYP2C18 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 11 倍であった。

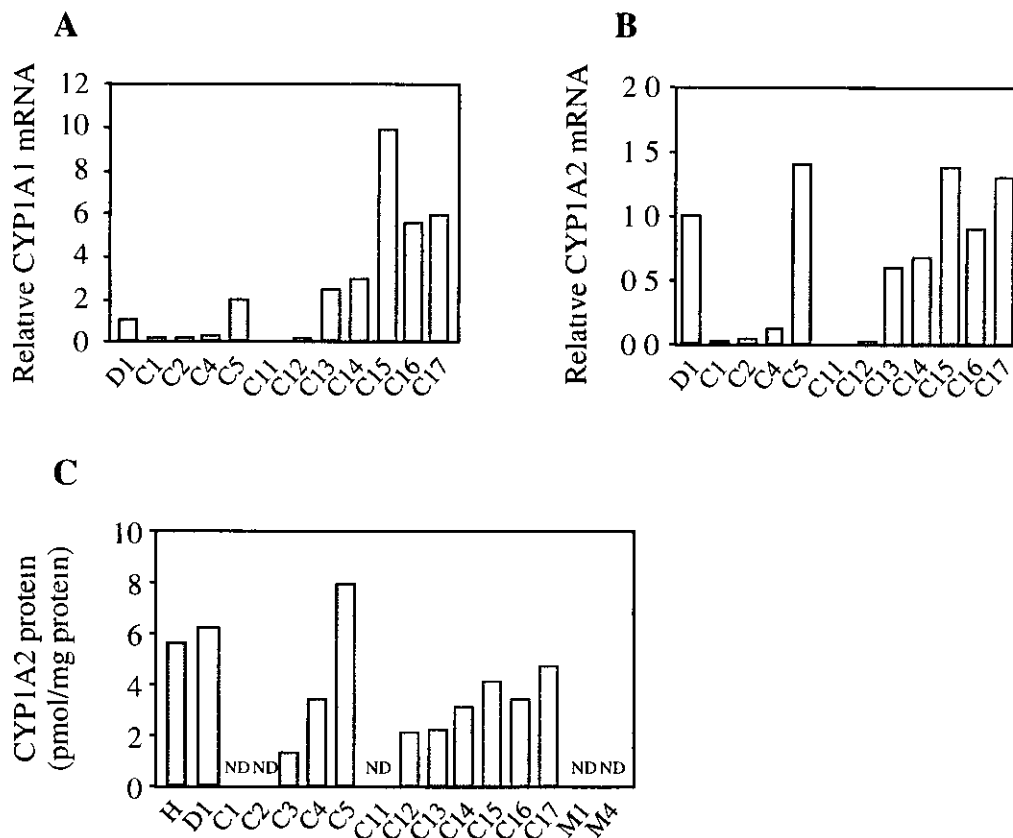


Fig 5 Human CYP1A1 and CYP1A2 expression in chimeric mice
 The expression levels of human CYP1A1 and CYP1A2 mRNA (A, B) and CYP1A2 protein (C) were determined as described in Materials and Methods
 H Pooled human liver microsomes from Gentest, M1 uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4 uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, ND Not detected

C-8 ヒト CYP2C19 の発現

Fig 6D にヒト CYP2C19 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 C13 の発現量が高いか、両トナー由来のキメラマ

ウスともに、hAlb 値依存的なヒト CYP2C19 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 0.4 倍であった。

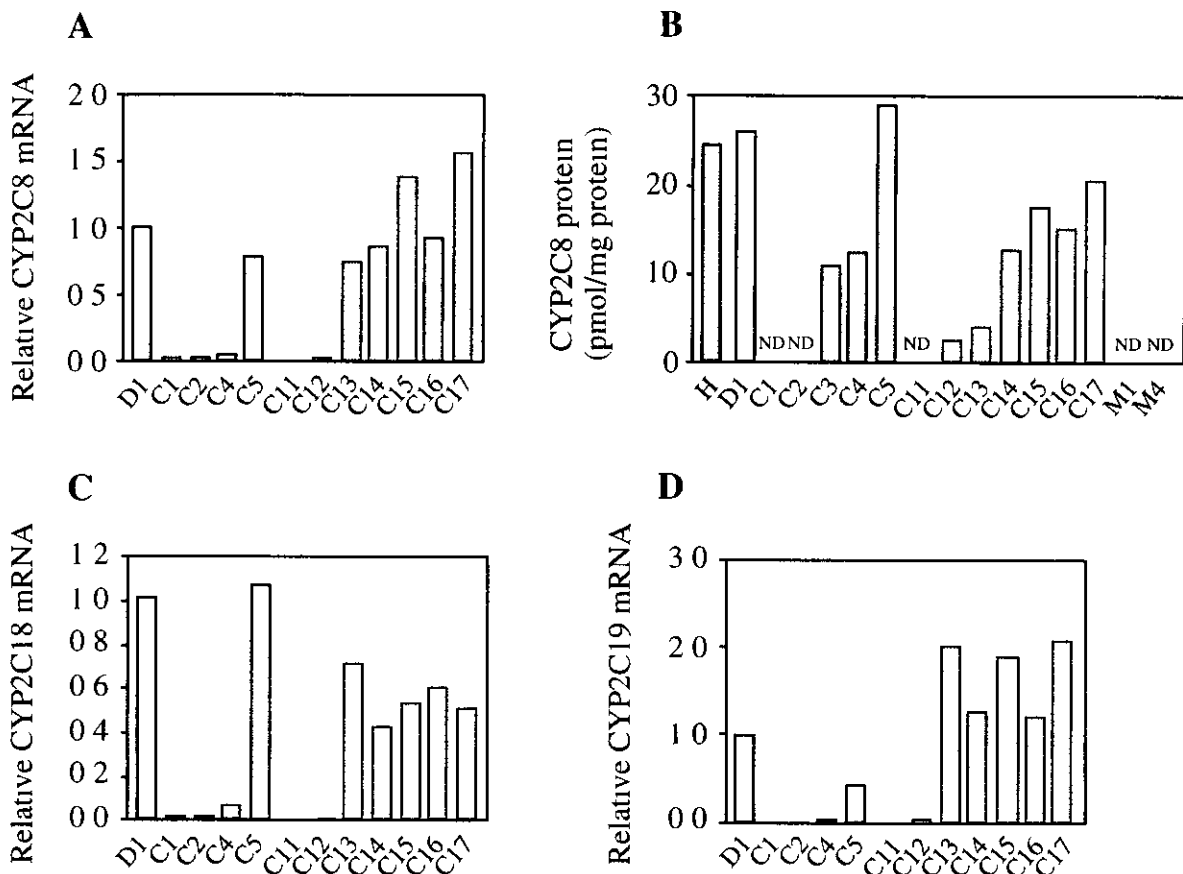


Fig 6 Human CYP2C8, CYP2C18 and CYP2C19 expression in chimeric mice
 The expression levels of human CYP2C8, CYP2C18 and CYP2C19 mRNA (A, C, D) and CYP2C8 protein (B) were determined as described in Materials and Methods
 H Pooled human liver microsomes from Gentest, M1 uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4 uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, ND Not detected

C-9 ヒト CYP2D6 の発現

ヒト CYP2D6 について、Fig 7A に mRNA 発現量の、Fig 7B に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、hAlb 値依存的なヒト CYP2D6 mRNA 発現量およびタンパク発現量の増加が認められた。また、ヒト CYP2D6 タンパクは、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 C12 から

発現が認められ、キメラマウス C5 の mRNA およびタンパク発現量はトナー D1 のそれぞれ約 0.5 倍、約 1.1 倍であった。

C-10 ヒト CYP3A5 の発現

ヒト CYP3A5 について、Fig 7C に mRNA 発現量の、Fig 7D に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、hAlb 値依存的なヒト CYP3A5 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 12 倍であった。

両トナー由来のキメラマウスともにヒト CYP3A5 タンパク発現量か

低く、トナー D1 は HLM の約 0.2 倍であった。キメラマウス C5 はトナー D1 の約 10 倍であった。

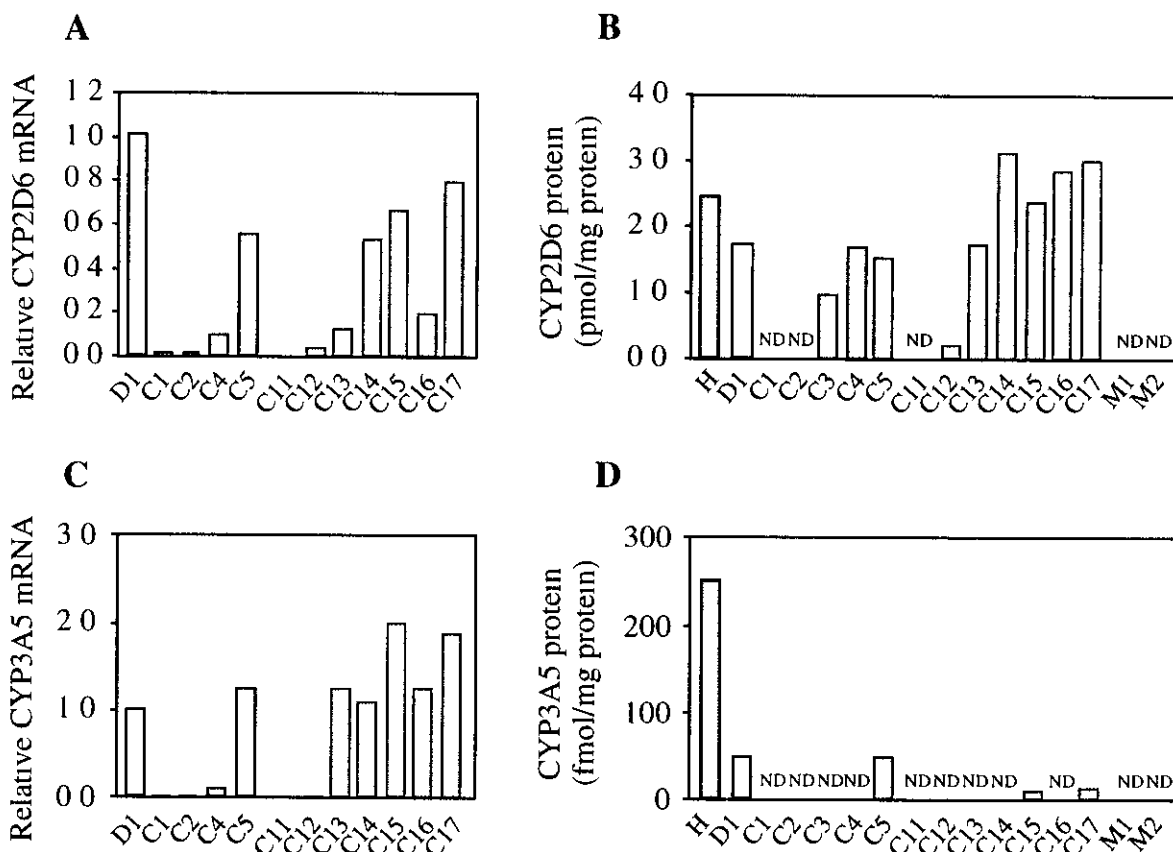


Fig 7 Human CYP2D6 and CYP3A5 expression in chimeric mice

The expression levels of human CYP2D6 and CYP3A5 mRNA (A, C) and protein (B, D) were determined as described in Materials and Methods

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

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 (Shimada et al, 1994, Li et al, 1995, Nelson, 2002)。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 (Li et al, 1996, Corchero et al, 2001, Hwang et al, 2001, Imaoka et al, 2001, Morgan et al, 2002, Robertson et al, 2003, Zhang et al, 2003)。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が現状である。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。

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 値はヒトとほぼ同じであったが、 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が触媒するデキサメタソン6-水酸化反応について、ヒトでの主要代謝物は6-水酸化デ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（Tomlinson et al, 1997）。デキサメタソン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 値は近似しているが、 V_{max} 値は約25倍であることが報告されており（Bogaards et al, 1997）、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が明らかになった。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、使用したド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と比べ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はキメラマウス肝が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てきたため、生存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が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てきた。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、ドナー 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、ドナー 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 (Nakajima et al, 2002)。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 (Nunoya et al, 1999, Oscarson et al, 1999)。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

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 II 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

B. 研究方法

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が、3-MC 投与にはドナー D2 由来のキメラマウスのみとした。

B-2 RT-PCR 法によるヒト CYP mRNA 発現量の定量

本章では Table 2 に示したプライマーに加え、ヒト GAPDH プライマー（センスプライマー 5'-CCAGGGCTGCTTTTAACTC-3'、アンチセンスプライマー 5'-GCTCCCCCCTGCAAATGA-3'）を用いた。予備検討の結果より、マウス GAPDH と交差反応を示さないことを確認した。

B-3 酵素活性測定条件等

各酵素活性の測定は前章に準じた。

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 で補正した。なお、データは示さないが、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。

C-1 リファンピシン投与によるヒト CYP への影響

C-1-1 ヒト CYP3A4 の誘導

Fig 8A 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 8B 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 倍となったが、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 8C 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。