

- Robertson GR, Field J, Goodwin B, Bierach S, Tran M, Lehnert A and Liddle C (2003) Transgenic mouse models of human CYP3A4 gene regulation *Mol Pharmacol* **64** 42-50
- Rodrigues AD and Rushmore TH (2002) Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development in vitro studies and clinical consequences *Curr Drug Metab* **3** 289-309
- Runge D, Kohler C, Kostrubsky VE, Jager D, Lehmann T, Runge DM, May U, Stolz DB, Strom SC, Fleig WE and Michalopoulos GK (2000) Induction of cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1) and multidrug resistance associated protein (MRP-1) by prototypical inducers in human hepatocytes *Biochem Biophys Res Commun* **273** 333-341
- Schuetz EG, Schuetz JD, Strom SC, Thompson MT, Fisher RA, Molowa DT, Li D and Guzelian PS (1993) Regulation of human liver cytochromes P-450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes *Hepatology* **18** 1254-1262
- Schuetz E, Lan L, Yasuda K, Kim R, Kocarek TA, Schuetz J and Strom S (2002) Development of a real-time in vivo transcription assay application reveals pregnane X receptor-mediated induction of CYP3A4 by cancer chemotherapeutic agents *Mol Pharmacol* **62** 439-445
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians *J Pharmacol Exp Ther* **270** 414-423
- Tomlinson ES, Maggs JL, Park BK and Back DJ (1997) Dexamethasone metabolism in vitro species differences *J Steroid Biochem Mol Biol* **62** 345-352
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications *Proc Natl Acad Sci USA* **76** 4350-4354
- Watanabe T, Shibata N, Westerman KA, Okitsu T, Allain JE, Sakaguchi M, Totsugawa T, Maruyama M, Matsumura T, Noguchi H, Yamamoto S, Hikida M, Ohmori A, Reth M, Weber A, Tanaka N, Leboulch P and Kobayashi N (2003) Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers *Transplantation* **75** 1873-1880
- Yamazaki H, Tanaka M and Shimada T (1999) Highly sensitive high-performance liquid chromatographic assay for coumarin 7-hydroxylation and 7-ethoxycoumarin O-deethylation by human liver cytochrome P450 enzymes *J Chromatogr B Biomed Appl* **721** 13-19
- Yanagimoto T, Itoh S, Sawada M and Kamataki T (1997) Mouse cytochrome P450 (Cyp3a11) predominant expression in liver and capacity to activate aflatoxin B1 *Arch Biochem Biophys* **340** 215-218
- Zhang W, Purchio AF, Chen K, Wu J, Lu L, Coffee R, Contag PR and West DB (2003) A transgenic mouse model with a luciferase reporter for studying in vivo transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene *Drug Metab Dispos* **31** 1054-1064
- Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A and Paxton JW (2003) Interactions of herbs with

cytochrome P450 *Drug Metab Rev* **35** 35-98

## 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薬物動態・安全性試験における有用性の検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学薬学部 教授

#### 研究要旨

医薬品開発における薬物動態試験および安全性予測試験には、ヒト由来組織とりわけヒト肝試料が頻用されている。我が国では現在、多量のヒト肝試料（凍結品および非凍結品）を米国からの輸入に頼っている。本研究では、独自に吉里教授（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%以上がヒト肝に置き替わり、トナーの肝細胞と同じ肝細胞を多量に作製することか可能である。

この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が期待される。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)、エーサイ(株)、ファイサー(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。

## 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、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)、エーサイ(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だ無いものの、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。

### 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）

#### 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 グ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（図 1）。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かてきるか、マウスとしての代謝能がどの程度残っているかに

ついて検討を進行中である。

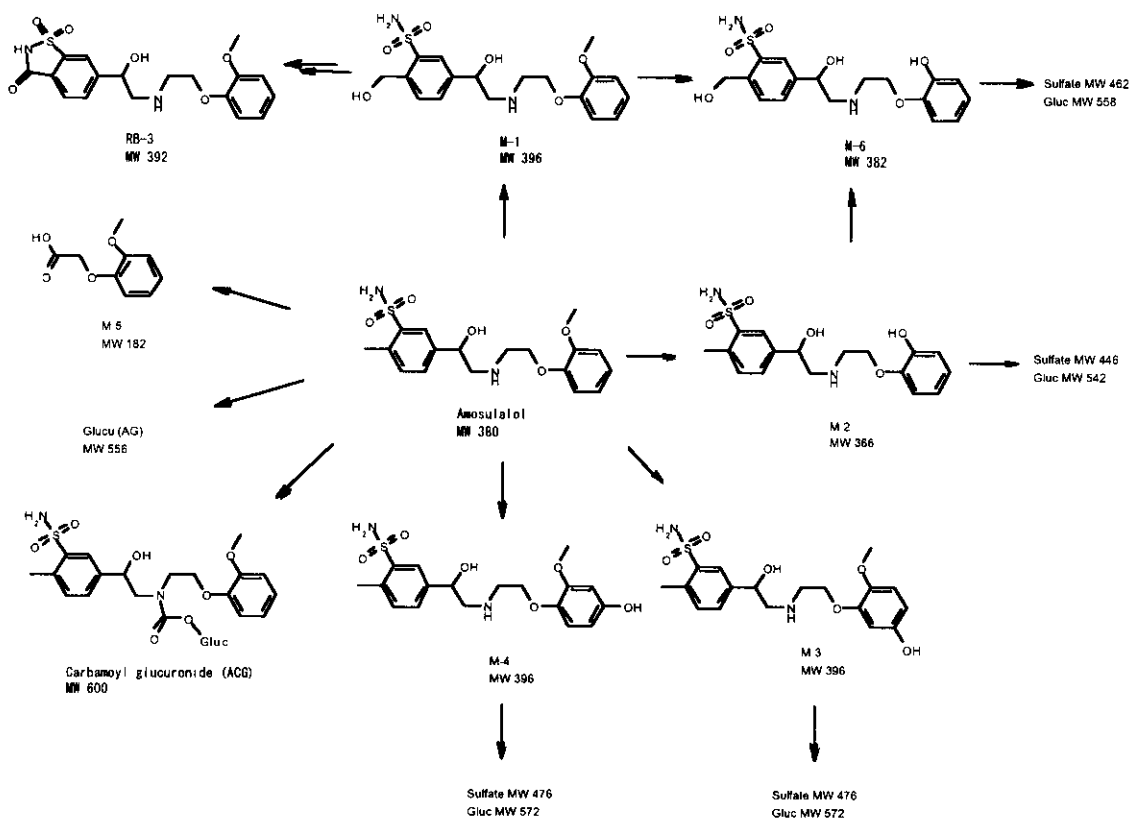


図1 塩酸アモスラロールの推定代謝経路

### 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。

### 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と予測が可能である。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。未同定ではあるか、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。

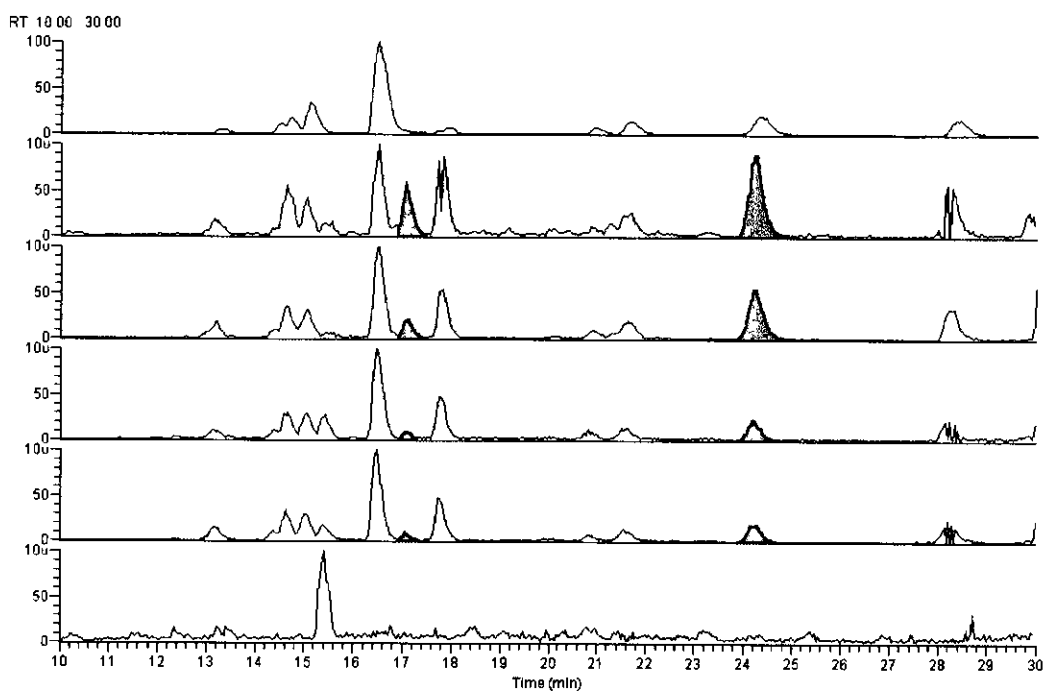


図2 キメラマウスにエストロール塩酸塩を投与したときの尿の分析

## 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）

### 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か、ト

キシコケ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。

### 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。

### 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が、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。

### 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）

#### 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。

#### 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。

#### 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（図3）。また、細胞質が淡明であるために、グリコーゲンの蓄積が豊富であり、増殖活性が強いことか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（図3）、P-GPか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。

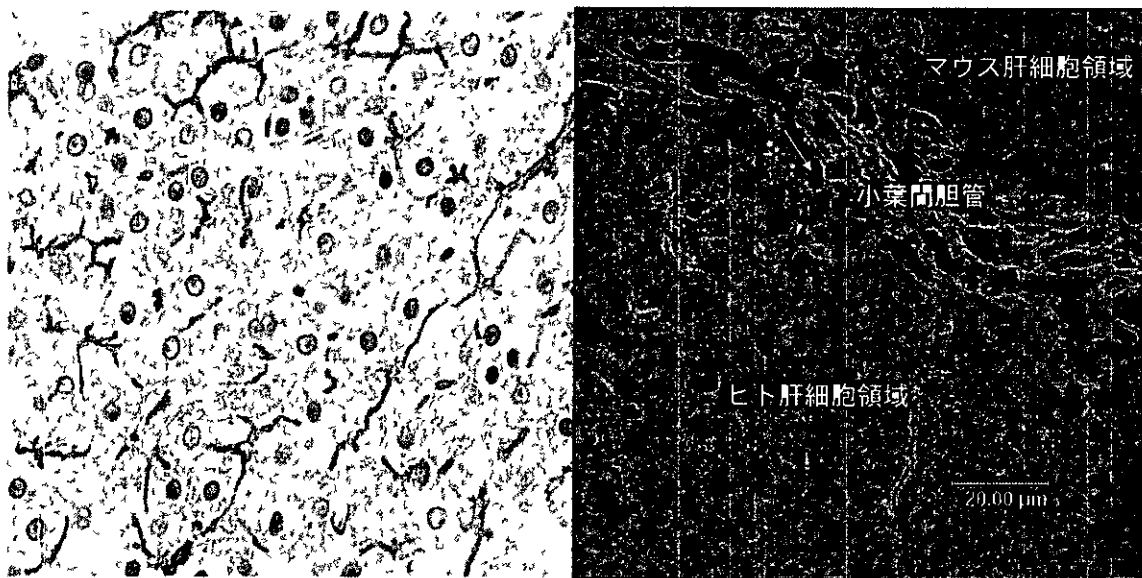


図3 毛細胆管側におけるMRP2の局在（右）とZO-1抗体によるタイトジャンクション

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）

#### 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。

#### 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。

#### 4-C 研究結果と考察

$\beta$ -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、 $\beta$ -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 $\beta$ -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 (図 4)。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

検討は難しいことが報告されており、本検討においても、図 5 に示すように、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。

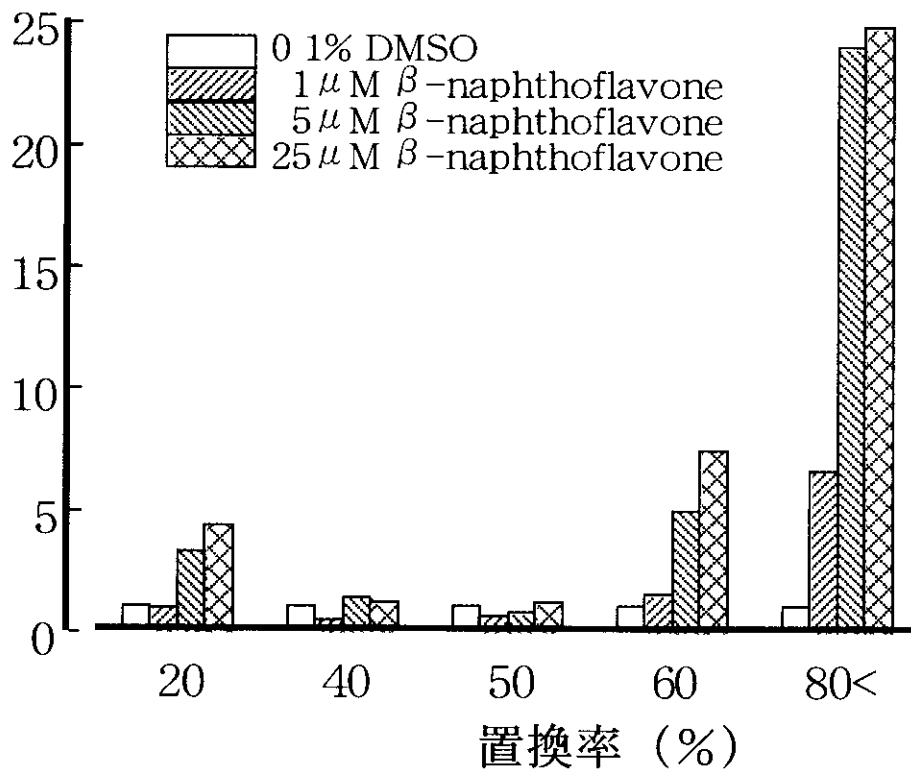


図 4  $\beta$ -ナフトフラボン暴露による CYP1A1 の誘導

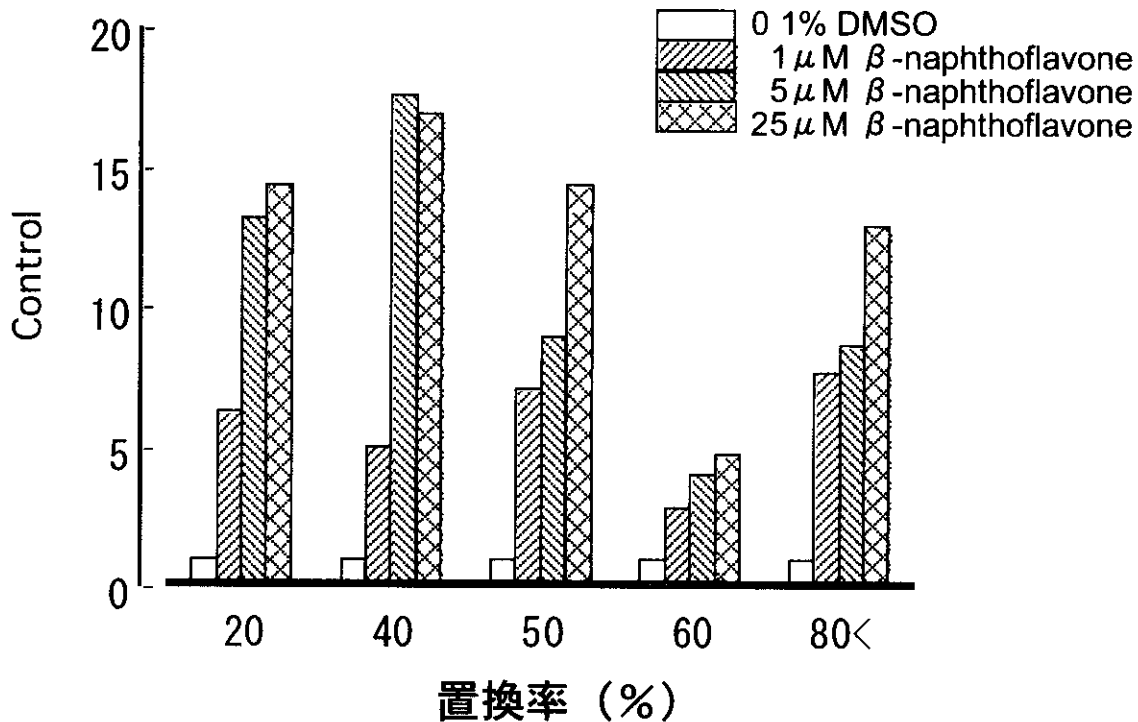


図5 β-ナフトフラボン暴露によるCyp1a2の誘導

ることを目的とした。

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

#### 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のマーカである6β-ヒドロキシコルチソ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かてきるかについて検討す

#### 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、コルチソールを投与し、その16時間後の尿を採取した。

#### 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、3.2倍であった(図7)。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できた。

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。

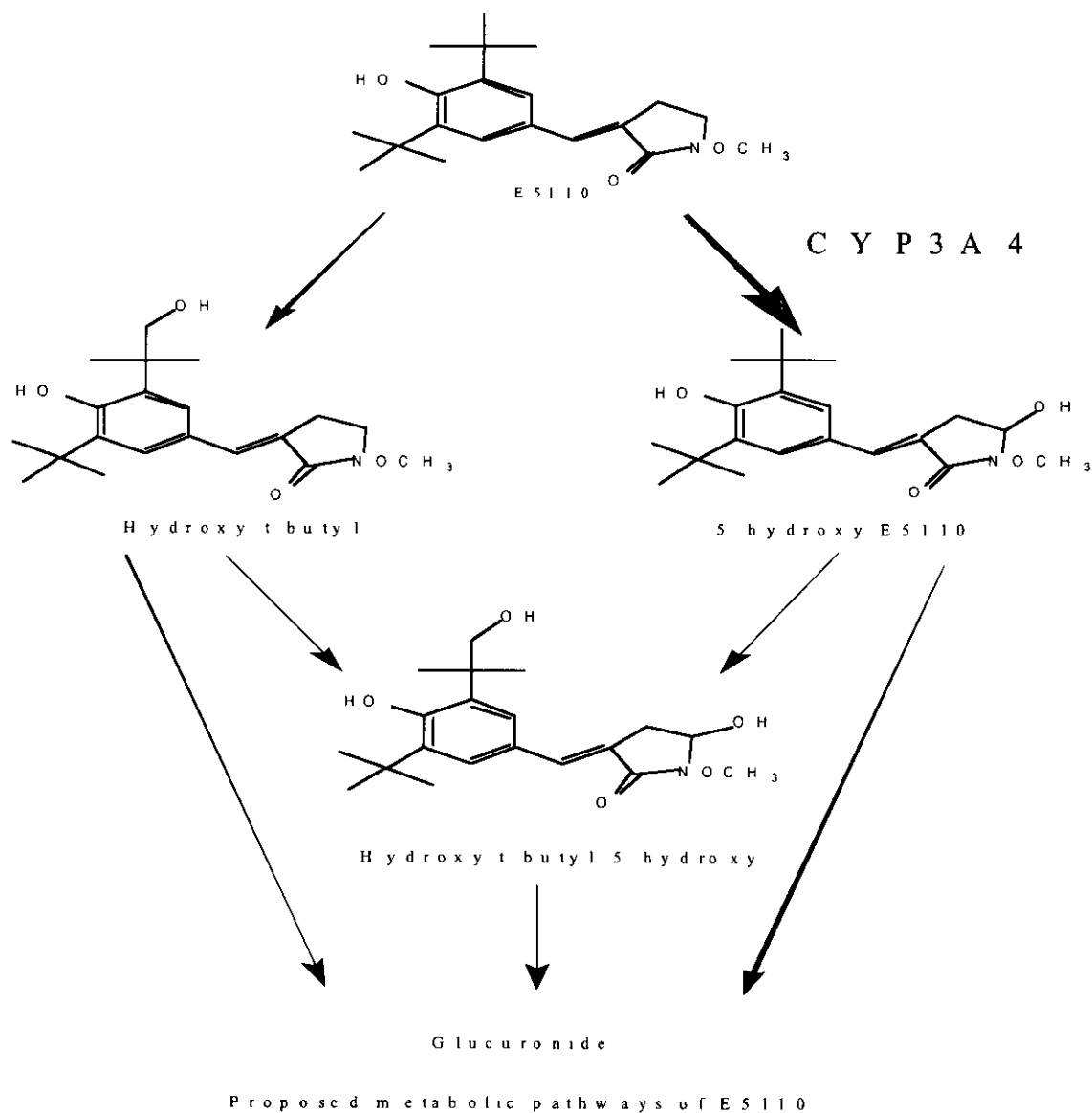


図 6. E5110の代謝経路

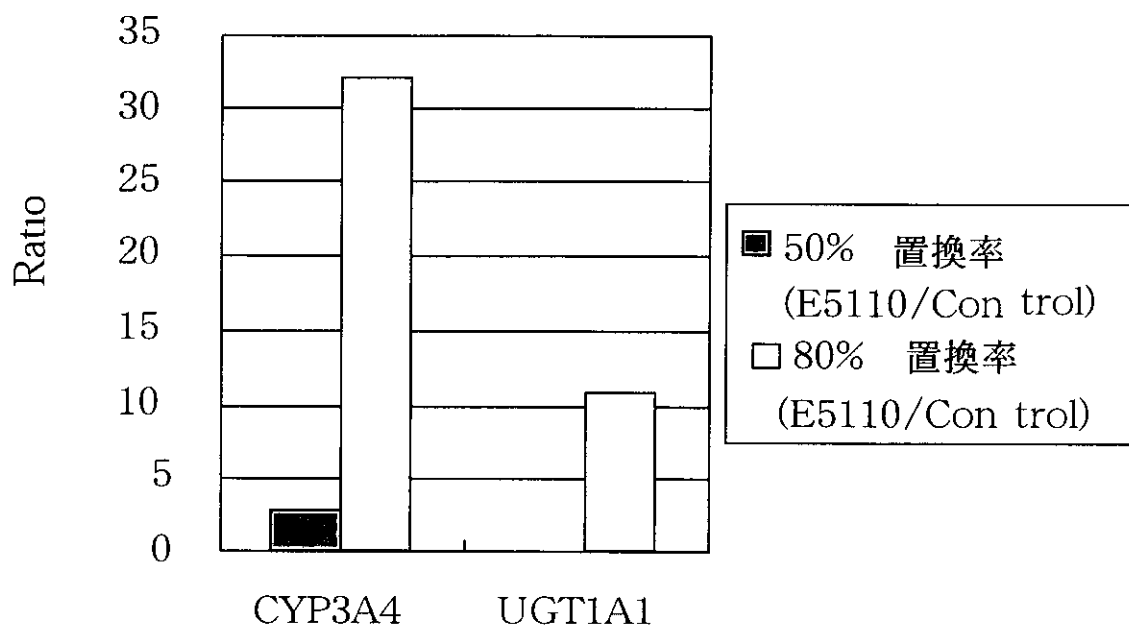


図7. 置換率の違いによるE5110のCYP3A4およびUGT1A1の遺伝子発現の比較

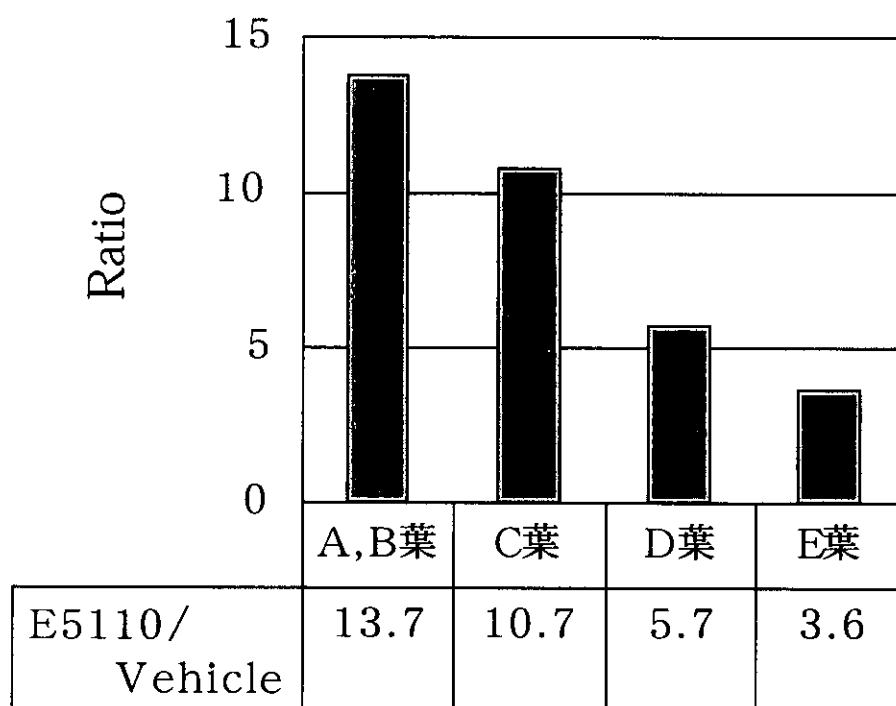


図8. E5110におけるUGT1A1の誘導

## 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、ファイザーと、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、抗菌薬レホ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、アフィメトリクス社の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、データが出始めている。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かできると考えている。

F 健康危険情報 なし

G 研究発表 なし

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