

ヒト肝細胞キメラマウスは、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 (ロット番号、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 0.75×10^6 個/匹とし、注入する細胞懸濁液量は $15 \mu\text{L}$ /匹とした。移植後3週目から、週1回マウス血液を尾静脈から $2 \mu\text{L}$ 採取し、抗ヒトアルブミン抗体を結合させたラテックスビーズを用いた比濁法により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週間後から経時的に血中ヒトアルブミン濃度を測定し、置換率を求めた。置換率は、これまでと同様に、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の結果から求めた実際の置換

率と、8週目のヒト血中ヒトアルブミン濃度の相関関係より求めた。この方法は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よって開発されたものである。

C. 研究結果

平成16年1月から年12月までの各月においてIVT-079を移植した回数、移植したマウスの月毎の合計数および置換率を表1に示した。移植したマウスの平均数は月あたり31.8匹となり、一回に移植する平均匹数は約8.5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置換率は、1%未満が約3割であった。置換率が80%以上のマウスは約3割で、70%前後を含めると約4割であった。

表1. 平成16年1月から平成16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 合計数	キメラマウス置換率(%)									
		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	
1月	3	31	14	2	1	0	0	0	3	1	10(1)
2月	4	28	5(2)	3	2(1)	1(1)	0	2	0	1	14
3月	4	39	14(1)	5(1)	1	4	0	3	1	2(1)	9(1)
4月	3	29	7	1	0	3	0	5	4(3)	0	9(3)
5月	3	23	7(1)	0	2	3(1)	0	2	1	2(1)	6(1)
6月	4	28	10	1	1	1	3(1)	2(1)	0	2	8(1)
7月	3	28	10	1	0	0	0	5(1)	5	1	6
8月	4	33	9	0	3	4	2	1	2	5	7(1)
9月	5	38	3	0	2	1	2	4	4	2(2)	20(1)
10月	4	34	8	0	0	0	2	2	3	10(2)	9
11月	4	36	6	1	1	2	3	1	4	3	15(2)
12月	4	35	8	2	0	1	4	2	0	7	11
合計	45	382	101(4)	16(1)	13(1)	20(2)	16(1)	29(2)	27(3)	36(6)	124(11)
割合			26.4%	4.2%	3.4%	5.2%	4.2%	7.6%	7.1%	9.4%	32.5%

※ カッコ内は置換率を予測後死亡したマウスの数を示す。

※ 置換率を予測する前に死亡した個体は除いた。

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置換率が 70%以上の比較的高い置換率を示すキメラマウスが約 4 割得られた。これは昨年度の値と同じであった。置換率 1%未満のマウスも約 3 割認められ、この値も前年度とほぼ同じ結果であった。本年度からキメラマウス生産は(株)フェニックスバイオに委託し、これに伴いヒト肝キメラマウスの作製技術の移管を行った。5 月、6 月、7 月はまだ移植技術に熟練していないためか、70%以上の置換率のキメラマウス数は相対的に少なかった。しかしその後は増加していることから、今後は高い割合でヒト肝細胞に置換された肝臓を持つキメラマウスの生産を安定して行うことが出来ると予想された。

E. 結論

キメラマウス生産技術の移管、ヒト肝細胞の移植担当技術者の養成及び施設の整備により、安定したキメラマウス生産を行うことができた。

2: IVT-079 以外のロットのヒト肝細胞の移植

B. 研究方法

IVT 社の凍結ヒト肝細胞である IVT-QKR、IVT-EFA、IVT-GIU、IVT-RQO、IVT-ZCR、及び IVT-GUY の 6 種類のロットをドナー細胞として移植を行った。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-QKR、IVT-EFA、IVT-GIU、IVT-RQO、IVT-ZCR 及び IVT-GUY を移植したマウスにおける置換率の結果を表 2 に示した。IVT-QKR では移植を行った 11 個体中 4 個体が 70%以上の置換率であった。また IVT-RQO では移植を行った 9 個体中 4 個体が 50~60%の置換率を示した。他のロットの凍結ヒト肝細胞を移植したマウスの置換率はすべて 10~20%前後以下であった。

表 2. IVT-079 以外のロットを移植した場合の置換率

ドナー Lot	年齢/性別	移植 回数	移植マウス 合計数	キメラマウス置換率(%)				
				1%未満	10~20%	30~40%	50~60%	70%以上
QKR	35/M	1	11	2	2	1	2	4(1)
EFA	16/M	1	10	8(2)	2	0	0	0
GIU	14/M	1	5	5(2)	0	0	0	0
RQO	0/F	1	9	2	1	2	4	0
ZCR	38/M	1	8	8(2)	2	0	0	0
GUY	39/M	1	9	9(1)	0	0	0	0

※ カッコ内は置換率を予測後死亡したマウスの数を示す。

※ 置換率を測定する前に死亡した個体は除いた。※ M:男性、F:女性。

D. 考察

昨年度までの結果を含めて考えると、ドナーの年齢が生後 9 ヶ月の IVT-079 および 13 歳の IVT-NLR が、他の 30 歳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、20 歳未満のドナーがキメラマウス作製に適している可能性が考えられた。また、昨年度、70% 以上の高置換率のキメラマウスが 1 個体得られた 0 歳児由来の IVT-RQO の移植を本年度再び実施したところ、置換率 50~60% の個体が 4 個体得られた。このことはドナーが 9 ヶ月の IVT-079 および 13 歳の IVT-NLR の結果と同様、小児のドナーの肝細胞がキメラマウス作製に適したものと考えられた。しかしながら、小児のドナーであれば全てマウスに生着し、高置換率のキメラマウスが得られるということではなかった。

一方、昨年度 35 歳の IVT-QKR を移植したところ、置換率 70% 以上のキメラマウスの出現頻度は 20% (5 個体中 1 個体) であったため、本年度再び移植を行った。その結果、置換率 70% 以上の個体が 36.4% の出現率で得られた。これらのことから、ドナー年齢が 30 歳以上であっても、キメラマウス生産に適した肝細胞も存在する可能性もあることが分かった。

キメラマウス生産に適したドナー肝細胞を選択するためには、現在のところ、実際に様々なロットのヒト肝細胞をマウスに移植してその生着と増殖の度合いを調べる方法しかない

のが現状である。これまで述べてきたように、ドナー年齢は比較的若い方が良いと考えているが、小児のドナーであってもキメラマウス生産に適さないロットの方が多い。このことは、脳死ドナー患者の肝臓の状態や、肝臓組織から肝細胞を調整する条件や、肝細胞から凍結肝細胞アンプルを調整する過程の条件が影響している可能性が考えられる。また、昨年、70% の予想置換率の個体が得られた IVT-NLR や IVT-NOG、および今年度 70% の置換率の個体が得られた IVT-QKR は既に在庫がほとんど存在せず、もはやこのロットでのキメラマウス作製は使用不可能となっている。このように、移植に使用可能と思われるドナー細胞が見つかったとしても、その細胞を大量に確保出来なかったり、もし確保できたとしても細胞の量には限りがある。今後、キメラマウスの作製に適したヒト肝細胞のマーカー遺伝子や蛋白の探索や、キメラマウス作製に利用可能な培養肝細胞の開発等が必要と考えられる。

E. 結論

キメラマウス生産に有効と思われる凍結ヒト肝細胞のロットは、今年度試験した結果では IVT-QKR のみであった。しかし、このロットは既に在庫がほとんど存在しなかったため、もはやこのロットでのキメラマウス作製は使用不可能と考えられた。今後はキメラマウス作製に有用なロットを識別する簡便な方法の開発や、

識別することができるマーカー遺伝子や蛋白の同定が重要と考えられた。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

1) Chise Tatenno, Toru Horie, Katsutoshi Yoshizato: Chimeric mice with human hepatocytes—a new tool for preclinical evaluation of new medicines— The Cell, 36:328-332, 2004

2) 立野知世、吉里勝利：ヒト肝細胞キメラマウス 月刊薬事、46：1877-1880、2004

3) 立野知世、吉里勝利：ヒトの肝細胞を持つキメラマウス LABIO21、No. 19、6-10、2005

4) 立野知世、吉里勝利：ヒト肝細胞を導入したスキッドマウス 摘出ヒト組織／細胞を用いた非臨床研究、株)エル・アイ・シー (印刷中)

2. 学会発表：

1) 吉里勝利：マウスを媒体として増殖させたヒト肝細胞の医学・医療分野における応用、連携大学院セミナー、2004.7.30、長崎医療センター

2) 吉里勝利：肝再生医療の展望、第2回COE「細胞社会学の拠点形成」セミナー、2004.9.22、岡山大学

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特異的 CYP 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
協力研究者 加藤 美紀 金沢大学薬学部

研究要旨

マウスの肝臓の 80%以上をヒト肝細胞で置換することが可能なキメラマウスが樹立されて以降、我々によって、ヒト薬物代謝酵素 CYP を中心としたキメラマウスにおける薬物代謝能および誘導能についての検討が重ねられてきた。その結果、mRNA 発現量、タンパク発現量、酵素活性レベルの検討を包括的に判断して、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトと同程度の薬物代謝能を持つことが明らかになった。CYP の代表的な誘導薬としてリファンピシンおよび 3-MC を用いた実験により、キメラマウスは誘導能も有していることが明らかとなった。しかし、リファンピシンと 3-MC はマウスの Cyp も誘導するため、キメラマウスに発現しているヒト CYP の誘導能を詳細に検討するためには、ヒト特異的な誘導薬を用いることが望ましいと考えられる。そこで本章では、キメラマウスがヒト CYP 誘導能を有していることを、ヒト CYP3A 特異的な誘導薬であるリファブチンを用いて証明すること、また、リファブチンおよびリファンピシンによる薬物代謝酵素、トランスポーター、核内レセプター発現量への影響を *in vivo* で明らかにすることを目的に検討を行った。

まず、リファブチン投与によりキメラマウスでヒト CYP3A4mRNA、ヒト CYP3A4 タンパク、TESOH、DEXOH の誘導が認められた。また uPA^{+/+}/SCID マウス、uPA^{-/-}/SCID マウスにおいては、リファブチンでマウス Cyp3a の誘導は認められなかった。これより、ヒト肝細胞キメラマウスに発現するヒト CYP はヒトの誘導能を有していることを明らかにした。また、CYP3A4 以外にもリファブチンにより CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A7 の発現量が、リファンピシンにより CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A7 の発現量を増加させることを mRNA レベルで明らかにした。

次に、リファブチンおよびリファンピシンのヒトトランスポーターと核内レ

セプター発現量への影響を mRNA レベルで検討した。本研究においては、マウスと交差しないヒト PXR のプライマーを設計することができなかつたため、ヒト PXR mRNA 発現量を定量することができなかつた。ヒト PXR mRNA 発現量の定量は今後の研究課題であると考えられる。mRNA 発現量のみでの検討であるものは、タンパク発現レベル、酵素活性レベルでの検討が今後必要となってくると考えられる。

臨床試験は倫理的かつ科学的に行われなければならない、それ故、詳細で適切な非臨床試験の実施が極めて重要になる。ヒト組織由来試料および酵素発現系を用いた *in vitro* 試験での薬物動態を検討し、また必要に応じて行った実験動物を用いた *in vivo* 試験のデータを参考にし、ヒトで有効性および安全性の高い候補化合物を選択することが重要である。*In vitro* から *in vivo*、実験動物からヒトへの外挿には様々な困難が伴う。ヒト肝細胞キメラマウスはヒトの *in vivo* に最も近いモデルとして期待され、様々な検討がなされている。ヒト肝細胞キメラマウスは、予想が困難なヒトでの CYP 誘導能を *in vivo* で評価できる最適な実験動物モデルであることを明らかにした。本章は、今後の薬物動態研究のみならず医薬品開発において貴重な情報を提供できたと考えられる。

A. 研究目的

薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP) は多くの分子種が存在し、スーパーファミリーを形成している。アミノ酸の相同性からファミリー、サブファミリーに分類され、各々の基質特異性により様々な薬物や生体内化合物の代謝を担っている (Nelson et al., 1996)。これら CYP 遺伝子の中には、特定の薬物によって誘導され、酵素活性が変動するものが存在する。その結果、薬物動態の個人差、薬物相互作用や治療効果の減少といった事象が現れる。

CYP3A の誘導薬であるカルバマセピンやフェニトインを CYP3A の基質であるシクロスポリン A と併用した場合、シクロスポリン A の血中濃度の低下が起こり臓器拒絶反応といった重篤な副作用が起きること (Freeman et al., 1984)、CYP2C の誘導薬であるフェノバルビタールと CYP2C の基質であるワルファリンの併用により抗凝血作用が阻害される (Breckenridge and Orme, 1971) といった例は有名である。従って、候補化合物のヒト CYP 誘導能を医薬品開発段階の早期に理解することは、ヒト CYP 誘導能を示さない

薬物の開発の可能性を高め、候補化合物が臨床試験の段階で開発中断されることを防ぐなど、極めて重要である。

医薬品は実験動物を対象とした非臨床試験により薬効と安全性が確認された後初めてヒトに投与される。非臨床試験では、薬効、安全性試験の他に、代謝物の同定、酵素誘導能の有無、消失クリアランスなど薬物動態、特に代謝に関する基礎的検討が行われる。実験動物には、マウス、ラット、イヌ、サルなどが用いられる。しかし、ヒトと実験動物の間には薬物代謝における種差が存在し、その原因として薬物代謝酵素の質的および量的な差異、体表面積に由来した基礎代謝量の違いなどが指摘されている (Nelson, 1999; Guengerich, 1997)。酵素誘導に関しては、候補化合物を実験動物に反復投与して各 CYP 分子種の発現変動および代表的基質の代謝に及ぼす影響を検討することが多い。しかし、pregnenolone 16 α -carbonitrile およびデキサメタゾン¹はラット CYP3A を誘導するがウサギやヒト CYP3A は誘導せず、逆にリファンピシン²はヒト CYP3A を誘導するが、ラット CYP3A は誘導が認められないこと (Kocarek et al., 1995; Barwick et al., 1996) など哺乳動物間での種差

の存在が明らかとなっているため、動物実験の結果をヒトへ外挿することは極めて困難であると考えられる。そのために、薬物代謝研究には近年、肝ミクロソーム、肝スライスなどヒト肝由来試料が用いられるようになって来た。その他に *in vitro* 酵素源としてヒト CYP を発現させた大腸菌、酵母、培養細胞を用いた発現系 CYP が利用されている。現在のところ *in vivo* におけるヒト CYP 誘導能の予測には新鮮ヒト肝細胞が gold standard と考えられている。しかし、新鮮ヒト肝細胞は、単離数日後に CYP 含量が 50%以下になるなど長期培養には技術的な困難が伴う (Rodrigues and Rushmore, 2002)。また、人種差、性差、生存時の薬歴、死因といった個体差や、肝細胞の調製方法や viability の違いなどから、供給された肝細胞により薬物代謝能のばらつきが大きく、再現性に問題があると考えられている。さらに、ヒトの正常組織由来の試料は数が限られており、また倫理的な問題もあり、入手が容易ではなく供給が不安定なのが現状である。従って、酵素活性が減少することなく長期間の安定発現が可能なヒト CYP 誘導能の予測系が望まれている。

そこでこの問題を解決すべく、人工的にヒト肝を作製する研究が行わ

れている。マウスにヒト肝細胞を移植することでキメラマウスを作製する研究が、Dandri ら (2001) および Mercer ら (2001) によって行われた。Dandri ら (2001) はウロキナーゼプラスミノージェンアクチベーター (uPA) トランスジェニックマウスを recombinant activation gene-2 欠損マウス (RAG-2 マウス) と交配後、uPA/RAG-2 マウスに新鮮ヒト肝細胞を移植してキメラマウスを作製した。しかし、キメラマウスにヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) を感染させた後、HBc (hepatitis B core) 抗血清で免疫染色を行った結果、およびマウス血中のヒトアルブミン濃度 (human albumin concn., hAlb) を指標とした場合、マウス肝細胞からヒト肝細胞へは最高で 15% 置換していた。Mercer ら (2001) は uPA(+ / +) SCID マウスに凍結ヒト肝細胞を脾臓より移植しマウス肝の 50%以上がヒト肝細胞で置換されたキメラマウスを作製した。近年我が国において、マウス肝の 80%以上がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが樹立された (Tateno et al., 2004)。このキメラマウスを用いることで、同一ドナー由来のヒト肝細胞を無限に増殖させることができる、実験動物の使用を減少できる、医薬品開発のコストを

減少させることができるなど数々の利点があり、ヒトにおける薬物動態および安全性を予測できる有用な手段になると期待できる。

昨年度までにヒト肝細胞キメラマウスの肝にヒト CYP が発現しており、ヒトと同程度の薬物代謝能を有することを明らかにした (Kato et al., 2004)。また、CYP の代表的な誘導薬であるリファンピシンと 3-MC によりキメラマウスの肝に発現するヒト CYP が誘導されることも明らかにした (Kato et al., 2005)。しかし、リファンピシンと 3-MC はマウスの Cyp も誘導する (Strolin and Dostert, 1994; Kocarek et al., 1995; Nishibe et al., 1998)。そこで、ヒト CYP 誘導能を詳細に検討するには、キメラマウスにヒト CYP 特異的な誘導薬を投与して検討する必要があると考えられる。そこで、本章ではヒト肝細胞キメラマウスにヒト CYP3A を特異的に誘導するリファブチンを投与し、*in vivo* におけるヒト CYP 誘導能を mRNA、タンパク、酵素活性レベルで明らかにすることを目的に検討を行った。また、リファブチン投与による各トランスポーターおよび核内レセプターへの影響についても検討した。本章で用いた誘導薬の構造式を下に示す (Fig. 1)。

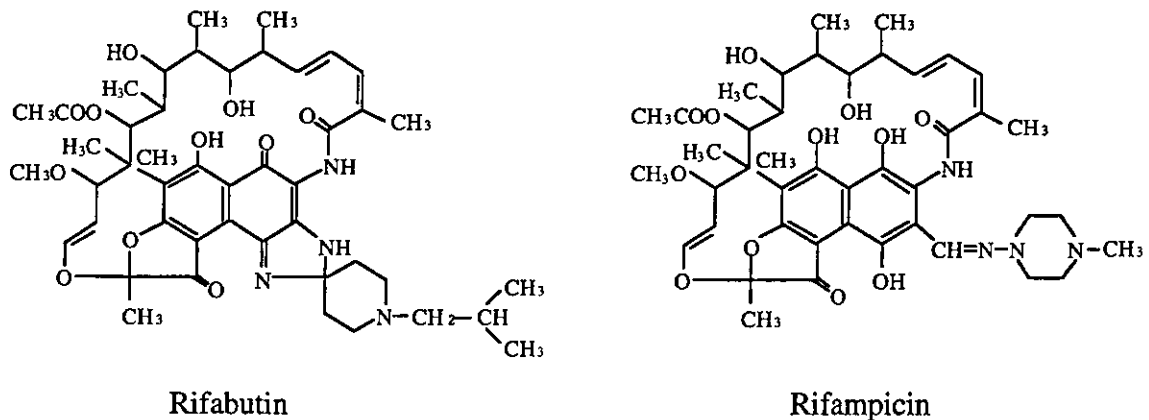


Fig. 1. Chemical structures of rifabutin and rifampicin.

B. 研究方法

B-1. 実験動物

本章ではキメラマウスのドナーとして In Vitro Technologies (Baltimore, MD) より購入した凍結ヒト肝細胞（白人、男性、9ヶ月）を用いた。uPA^{+/-}/SCID マウスおよび uPA^{-/-}/SCID マウスは日本チャールズ・リバー (Yokohama, Japan) より入手した。キメラマウスは、生後 20 から 30 日齢の uPA(+ / +)SCID マウスの脾臓にヒト肝細胞を移植し

て作製した。必要に応じて補体抑制作用を示すメシル酸ナファモスタットを腹腔内投与した。使用した生後 12-15 週齢の雄性キメラマウスを Table 1 に示す。なお、ELISA 法により測定したキメラマウスの血中 hAlb 濃度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 (Tateno et al., 2004)、Table 1 に併記した。

Table 1. The chimeric mice used in the present study.

No.	hAlb	RI	Drug treatment
	mg/ml	%	
1	3.1	50	None
2	6.5	70	None
3	9.3	70	None
4	13.7	90	None
5	3.2	50	Rib
6	5.1	60	Rib
7	6.5	70	Rib
8	9.7	70	Rib
9	17.2	90	Rib
10	5.7	60	Rif
11	9.5	70	Rif
12	11.4	80	Rif
13	15.5	90	Rif

Rib: Rifabutin

Rif: Rifampicin

The chimeric mice were intraperitoneally treated daily for 4 days with rifabutin or rifampicin (50 mg/kg/day).

B-2. 試薬

ISOGENは日本ジーン (Tokyo, Japan) より購入した。Taq DNAポリメラーゼはGreiner Japan (Tokyo, Japan) より購入した。MMLV-逆転写酵素 (reverse transcriptase, RT) は東洋紡 (Osaka, Japan) から入手した。ランダムヘキサマー、TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version、SYBR® GREEN Iは宝酒造 (Osaka, Japan) より購入した。オリゴヌクレオチドは北海道システムサイエンス

(Sapporo, Japan) に合成を依頼した。Yeast tRNAはLife Technologies (Rockville, MD) より入手した。

TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents KitおよびTaqMan GAPDH Control ReagentはApplied Biosystems (Foster City, CA) より入手した。プールドヒト肝マイクロソーム、プールドヒト肝サイトソームおよびヒトCYP3A4を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソーム、ラットCYP3A2を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソームはBD Gentest (Woburn, MA) より購入した。CYP3A5を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソームはPan Vera (Madison, WI) より購入した。ウサギ抗ヒトCYP3A4抗体、ウサギ

抗ヒトCYP3A5抗体はBD Gentestより、ウサギ抗ラットCYP3A2抗体は第一化学薬品 (Tokyo, Japan) より、ビオチン化抗ウサギIgG抗体、ペルオキシダーゼ標識アビジンビオチン複合体はVector (Burlingame, CA) より入手した。発色用3,3'-ジアミノベンチジンは同仁化学 (Kumamoto, Japan) より購入した。G-6-PおよびG-6-P DHはオリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) より購入した。デキサメタゾンおよびリファンピシンは和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。メシル酸ナファモスタットは鳥居薬品 (Tokyo, Japan) よりご供与頂いた。リファブチンはPfizer Japan株式会社 (Aichi, Japan) よりご供与頂いた。そのほかの試薬は特級、生化学用および高速液体クロマトグラフィー用のものを用いた。また、以下に本章で使用した溶液等の組成を示した。表示のないものは1 L当たりの濃度または量で示した。

DEPC処理精製水

DEPCの最終濃度が0.1%になるように精製水に加え、37°Cで2時間加温した。その後、121°C、40分間オートクレーブした。

5 x 逆転写反応用緩衝液

250 mM Tris-HCl (pH 8.3)、375 mM KCl、15 mM MgCl₂、50 mM DTT

5 x SGI緩衝液

Ex Taq R-PCR version 10 x Buffer (Mg²⁺ free) 250 μL、250 mM Mg²⁺ Solution 30 μL、100 x SYBR[®] GREEN Iを8.4 μL、10 mM dNTPs 75 μL、5 U/μL Ex Taq R-PCR version 25 μLに滅菌精製水を加えて全量を500 μLとした。

ホモジナイズ緩衝液

0.1 M Tris-HCl、0.1 M KCl、1 mM EDTA (pH 7.4)

TGE緩衝液

10 mM Tris-HCl、20% Glycerol、1 mM EDTA (pH 7.4)

サンプル処理液

SDS 6.0 g、2 M Tris-HCl緩衝液 (pH 6.8) 20 mL、ピロニンY 6.0 mg、Glycerol 60 mLに超純水を加え、全量を192 mLとした。

NADPH生成系

50 mM G-6-P、50 mM MgCl₂、5 mM NADP⁺、10 U/mL G-6-P DH

クロロホルム溶液

クロロホルムとイソアミルアルコールを24:1 (v/v) の比で混合

10 x PCR緩衝液

670 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.8)、
166 mM 硫酸アンモニウム、4.5%
Triton X-100、2 mg/mL ゼラチン

0.5 x TBE

オートクレーブにより滅菌した5 x
TBE (Tris 54.0 g、ホウ酸 27.5 g、
EDTA 4.7 g) を精製水で10倍希釈

B-3. 薬物投与

リファブチン、リファンピシンを
コーン油に溶解・懸濁させ、ソニケ
ーションを行い再懸濁した後、とも
に 50 mg/kg/day で 4 日間腹腔内投
与した。最終投与の 24 時間後に肝臓
を摘出した。

B-4. 肝からの total RNA の調製

ISOGEN に添付のマニュアルに修
正を加え、以下の方法で肝臓から total
RNA を調製した。肝臓に ISOGEN
を加えてホモジナイズした後、サン
プルチューブに分注し、クロロホル
ムを加えて激しく 15 秒間攪拌した。
室温にて 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、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。

B-5. RT-PCR 法による mRNA 発現 解析

B-5-1. Real-time PCR による mRNA 発現解析

B-4 より得られた total RNA から
cDNA を用いて以下の方法により
real-time PCR を行った。cDNA 溶
液を 1 μ L、5 x SGI 緩衝液を 5 μ L、
10 μ M センスプライマーおよびアン
チセンスプライマーをそれぞれ 1 μ L
を加えて滅菌精製水を用いて全量を
25 μ L とした。Smart cyclor

(TaKaRa)を用いて PCR を行った。
目的の産物が増幅していることを確
認するため、反応終了後にアガロー
スゲルで電気泳動した。本章で使用
したヒト CYP およびマウス Cyp プ
ライマーの配列を Table 2 に示す。
なおヒト CYP3A4、ヒト CYP3A5、
マウス Cyp3a11、マウス Cyp3a13

mRNA 発現解析は本方法により行った。予備検討の結果より、ヒト CYP およびマウス Cyp プライマーは交差反応を示さないことを確認した。

B-5-2. Taq-Man™プローブ法による mRNA 発現解析

CYP3A、Cyp3a 以外の CYP 分子種、トランスポーターおよび核内レセプターの mRNA 発現定量は大塚製薬工場株式会社（東京）に依頼し、Taq-Man™プローブ法にて行った (Nishimura et al., 2002)。予備検討の結果より、使用したプライマーはマウスと交差反応を示さないことを確認した。

B-6. 肝ミクロソームの調製

採取した肝に、肝重量の 3 倍容のホモジナイズ緩衝液を加え、冷却下ポリトロンにより細切後、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズした。ホモジネートを 9,000 g、4°C で 15 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。沈殿物にホモジナイズ緩衝液を加えてホモジナイズ後、105,000 g、4°C で 60 分間遠心分離した。得られた沈殿物を肝重量の 1 倍容の TGE 緩衝液に懸濁し、Bradford 法

(Bradford, 1976) に従い、タンパク定量後、使用時まで-80°C で保存

した。

B-7. SDS-PAGE およびウエスタンブロット分析

Laemmli ら (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した。肝ミクロソームおよび肝サイトゾルにサンプル処理液と 2-メルカプトエタノールを加えた後、100°C で 3 分間煮沸し、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) に電気的に転写した。1 次抗体、2 次抗体、3 次抗体反応後の発色は 0.06% の 3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩を用い、GS-700 デンシトメーター (Bio-Rad) にて定量した。予備検討の結果より、ヒト CYP 抗体は本実験条件においてマウス Cyp と交差反応を示さないことを確認した。

B-8. 酵素活性測定

B-8-1. テストステロン 6β-水酸化酵素活性の測定

テストステロン 6β-水酸化酵素活性 (TESOH) は Arlotto らの方法 (1991) に修正を加え、以下の方法により測定した。反応溶液は 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.2 mg/ml ミクロソームタンパク、50

μM テストステロン、NADPH 生成系とした。37°C での反応終了後、ジクロロメタン 1.5 mL を添加して激しく攪拌した。650 g で 10 分間遠心分離後、ジクロロメタン相を別の試験管に移し、窒素気流下蒸発乾固させた。残渣を 200 μL の移動相に溶解させ、そのうち 100 μL を HPLC に注入して分析した。HPLC による分析には、ポンプ（日立製作所, Tokyo, Japan, L-7100）、オートサンプラー（日立製作所, L-7200）、カラムオープン（島津製作所, Kyoto, Japan, CTO-6A）、UV 検出器（日立製作所, L-7405）インテグレーター（日立製作所, D-2000）を用いて、溶離液を 240 nm でモニターした。カラムは Mightysil RP-18 GP（関東化学, Tokyo, Japan）を用いた。移動相は 50 %メタノール/10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) とした。流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 35°C とした。

B-8-2. デキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の測定

デキサメタゾン 6-水酸化酵素活性 (DEXOH) は Gentile ら (1996) および Tomlinson ら (1997) の方法に修正を加えて以下のように測定した。反応溶液は 100 mM リン酸カ

リウム緩衝液 (pH 7.4)、0.2 mg/ml ミクロソームタンパク、100 μM デキサメタゾン、NADPH 生成系とした。37°C での反応終了後、酢酸エチルを添加することにより反応を停止した。650 g で 10 分間遠心分離後、酢酸エチル相を別の試験管に移し、窒素気流下蒸発乾固させた。残渣を 200 μL の移動相に溶解させ、そのうち 100 μL を HPLC に注入して分析した。6-水酸化デキサメタゾンの標品を入手できなかったため DEXOH 解析時にはデキサメタゾンのモル吸光係数を用いた。HPLC による分析には、L-7100 ポンプ、L-7200 オートサンプラー、Uni-3 ノイズベースクリーン (ユニオン, Gunma, Japan)、CTO-6A カラムオープン、L-7405 UV 検出器、D-2000 インテグレーターを用いて、溶離液を 423 nm でモニターした。カラムは Mightysil RP-8 (関東化学) を用いた。移動相 A はアセトニトリル : 0.018% ギ酸 = 18 : 82 (v/v)、移動相 B はアセトニトリル : 0.018% ギ酸 = 40 : 60 (v/v) とし、移動相 B : 0 (0-15 分)、100 (15-30 分)、0 (30-40 分) のグラジエント条件で分離した。流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 35°C とした。

Table 2. Sequences of the primers used in the present study.

Primer	Sequence
CYP1A2-S ^a	5'-TGTTCAAGCACAGCAAGAAGG-3'
CYP1A2-AS ^a	5'-TGCTCCAAAGACGTCATTGAC-3'
CYP1A2-probe ^a	5'-CTAGAGCCAGCGGCAACCTCATCCCA-3'
CYP2A6-S ^a	5'-TTTTGGTGGCCTTGCTGGT-3'
CYP2A6-AS ^a	5'-GGAGTTGTACATCTGCTCTGTGTTCA-3'
CYP2A6-probe ^a	5'-TGCCTGACTGTGATGGTCTTGATGTCTGTT-3'
CYP2C8-S ^a	5'-GGACTTTATCGATTGCTTCCTG-3'
CYP2C8-AS ^a	5'-CCATATCTCAGAGTGGTGCTTG-3'
CYP2C8-probe ^a	5'-TTGGCACTGTAGCTGATCTATTTGTTGCTGGA-3'
CYP2C9-S ^a	5'-GACATGAACAACCCTCAGGACTTT-3'
CYP2C9-AS ^a	5'-TGCTTGTCGTCTCTGTCCCA-3'
CYP2C9-probe ^a	5'-AAAACACTGCAGTTGACTTGTGTTGGAGC-5'
CYP2C19-S ^a	5'-GAACACCAAGAATCGATGGACA-3'
CYP2C19-AS ^a	5'-TCAGCAGGAGAAGGAGAGCATA-3'
CYP2C19-probe ^a	5'-TAATCACTGCAGCTGACTTACTTGGAGCTGGG-3'
CYP2D6-S ^a	5'-CCTACGCTTCCAAAAGGCTTT-3'
CYP2D6-AS ^a	5'-AGAGAACAGGTCAGCCACCACT-3'
CYP2D6-probe ^a	5'-CAGCTGGATGAGCTGCTAACTGAGCACA-3'
CYP3A4-S ^b	5'-CCAAGCTATGCTCTTCACCG-3'
CYP3A4-AS ^b	5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3'
CYP3A5-S ^b	5'-AGTGTTCCTTCCCTTCACTTTA-3'
CYP3A5-AS ^b	5'-TTCAACATCTTTCTTGCAAGT-3'
CYP3A7-S ^c	5'-CCTTACCCCAATTCTTGAAGCA-3'
CYP3A7-AS ^c	5'-TCCAGATCAGACAGAGCTTTGTG-3'
CYP3A7-probe ^c	5'-AGTCTTTTGAATTCTGAGAGTCAATCATCAGC-3'
Cyp3a11-S	5'-TATATCCCCAAAGGGTCAACA-3'
Cyp3a11-AS	5'-GAAGGAGAAGTTCTGCATAAT-3'
Cyp3a13-S	5'-GGTGAAGGAATGTTACTCTAC-3'
Cyp3a13-AS	5'-GTGGGCTTTCCTTCTCCTAA-3'

ABCB1-S ^d	5'-AGGAAGACATGACCAGGTATGC-3'
ABCB1-AS ^d	5'-CCAACATCGTGCACATCAAAC-3'
ABCB1-probe ^d	5'-CCTGGCAGCTGGAAGACAAATACACAA-3'
ABCC2-S ^d	5'-ACGGACAGCTATCATGGCTTCT-3'
ABCC2-AS ^d	5'-TGGTCACATCCATGAGCTTCT-3'
ABCC2-probe ^d	5'-ACCCTATCCAACCTGGCCAGGAAGGAGT-3'
AHR-S	5'-GGTTGTGATGCCAAAGGAAG-3'
AHR-AS	5'-ATCATTCGGATATGGGACTCG-3'
AHR-probe	5'-AGCTGTGCACGAGAGGCTCAGGTTATCA-3'
CAR-S ^d	5'-CATGGGCACCATGTTTGAAC-3'
CAR-AS ^d	5'-AGGGCTGGTGTGATGGATGAA-3'
CAR-probe ^d	5'-TGTCAGTTTAGGCCCTCCAGCTCATC-3'
LXR α -S ^d	5'-AGACTTTGCCAAAGCAGGG-3'
LXR α -AS ^d	5'-ATGAGCAAGGCAAACCTCGG-3'
LXR α -probe ^d	5'-TTCATCAACCCCATCTTCGAGTTCTCC-3'
HNF4 α -S ^d	5'-AAGACAAGAGGAACCAGTGCC-3'
HNF4 α -AS ^d	5'-GGCTTCCTTCTTCATGCCA-3'
HNF4 α -probe ^d	5'-CTACTGCAGGCTCAAGAAATGCTTCCG-3'
RXR α -S ^d	5'-TCAATGGCGTCCCAAGGTC-3'
RXR α -AS ^d	5'-TTGCCTGAGGAGCGGTCC-3'
RXR α -probe ^d	5'-CCGCCACCCCTCAGGAAACAT-3'
RXR β -S ^d	5'-TCTCCCTTCCAGTTCAGTTC-3'
RXR β -AS ^d	5'-CAGGGAGTGACACTGTTGAGTTAA-3'
RXR β -probe ^d	5'-CCTGGTCTGCCCCCTCCAGCT-3'

S: Sense primer, AS: Anti-sense primer.

^a From Nishimura et al. (2002)

^b From Katoh et al. (2004)

^c From Furukawa et al. (2004)

^d From Nishimura et al. (2004)

C. 研究結果

C-1. リファブチン投与によるマウス Cyp3a 発現に及ぼす影響

まず始めにリファブチンがマウスの Cyp3a を誘導しないことを uPA^{+/-}/SCID マウスおよび uPA^{-/-}/SCID マウスを用いて mRNA、タンパク、酵素活性レベルで検証した。mRNA 発現量はマウス GAPDH (mGAPDH) mRNA 量で補正した。

C-1-1. マウス Cyp3a mRNA への影響

Fig. 2A および 2B にマウス Cyp3a11 および Cyp3a13 mRNA 発現量の定量結果を示す。uPA^{+/-}/SCID マウスにおいて、薬物未処置群と比較してリファブチン投与群でマウス Cyp3a11 mRNA 量、マウス Cyp3a13 mRNA 量ともに顕著な増加は認められなかった。一方、リファンピシン投与群においては、薬物未処置群と比較してマウス Cyp3a11 mRNA 量は 1.7 倍 ($P < 0.05$)、Cyp3a13 mRNA 量は 1.7 倍の増加が認められた。

C-1-2. マウス Cyp3a タンパクへの影響

Fig. 2C にマウス Cyp3a11 タンパ

クの定量結果を示す。マウス Cyp3a11 タンパクはリファブチン投与群では薬物未処置群と比較して、uPA^{+/-}/SCID マウスで 1.4 倍 ($P < 0.05$)、uPA^{-/-}/SCID マウスで 1.7 倍 ($P < 0.01$) の増加が認められた。一方、リファンピシン投与群においては uPA^{+/-}/SCID マウスで 2.9 倍 ($P < 0.001$)、uPA^{-/-}/SCID マウスで 3.5 倍 ($P < 0.001$) の増加が認められた。

C-1-3. マウス Cyp3a 酵素活性への影響

Fig. 2D および 2E に、TESOH および DEXOH の測定結果を示す。TESOH に関しては、両系統においてリファブチン投与群では酵素活性の増加は認められなかった。リファンピシン投与群においては薬物未処置群と比較して、uPA^{+/-}/SCID マウスで 2.0 倍 ($P < 0.01$)、uPA^{-/-}/SCID マウスにおいては 2.3 倍 ($P < 0.05$) の増加が認められた。DEXOH に関しては、両系統においてリファブチン投与群、リファンピシン投与群ともに酵素活性の増加は認められなかった。

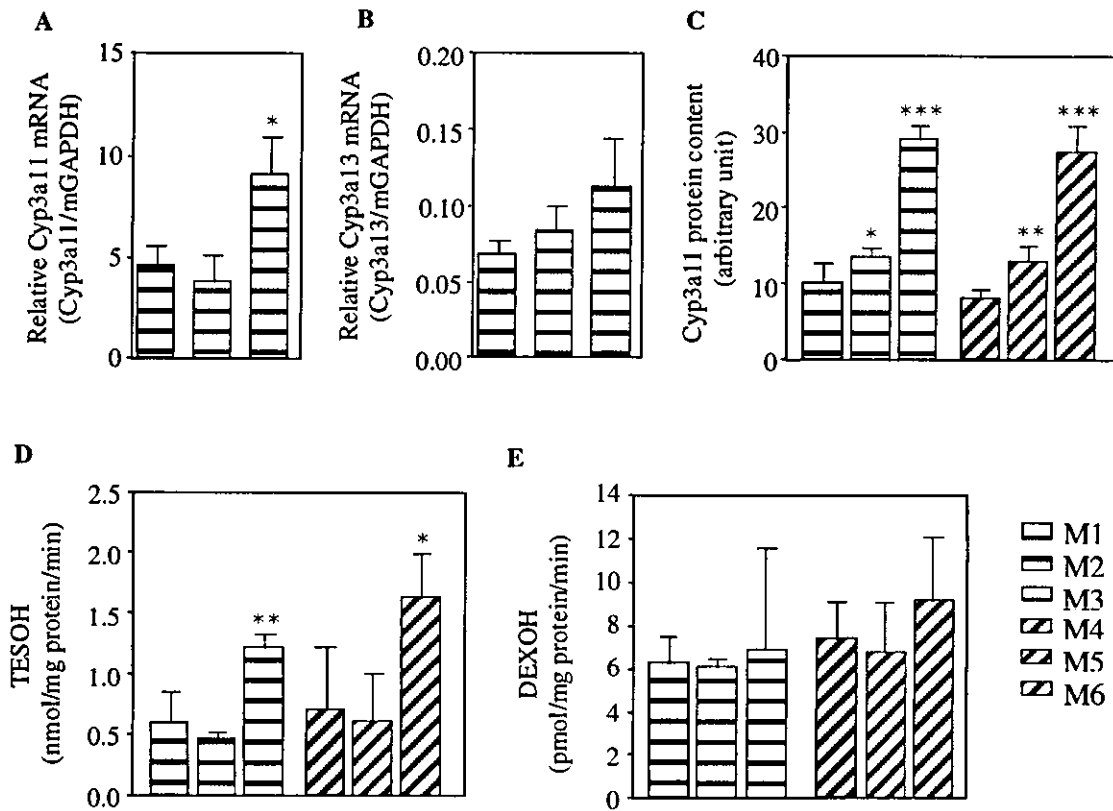


Fig. 2. Changes of murine Cyp3a expression by rifabutin and rifampicin in $uPA^{+/-}/SCID$ mice and $uPA^{-/-}/SCID$ mice.

The expression levels of murine Cyp3a11 mRNA (A), murine Cyp3a13 mRNA (B), murine

Cyp3a11 protein (C), TESOH (D) and DEXOH (E) in a rifabutin- or a rifampicin-treated $uPA^{+/-}/SCID$ mouse and $uPA^{-/-}/SCID$ mouse were compared to those in a non-treated mouse. The concentration of testosterone and dexamethasone were 50 μM and 100 μM , respectively. Each column represents the mean \pm SD (n=4 or 5). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

M1: Non-treated $uPA^{+/-}/SCID$ mouse, M2: Rifabutin-treated $uPA^{+/-}/SCID$ mouse, M3: Rifampicin-treated $uPA^{+/-}/SCID$ mouse, M4: Non-treated $uPA^{-/-}/SCID$ mouse, M5: Rifabutin-treated $uPA^{-/-}/SCID$ mouse, M6: Rifampicin-treated $uPA^{-/-}/SCID$ mouse.

C-2. リファブチン投与ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP3A への影響

本章におけるリファブチンおよびリファンピシンによる各 CYP 分子種の mRNA、タンパク、酵素活性における誘導率は、最も近似した hAlb 濃度を示した薬物未処置のキメラマウスを対照として算出した。mRNA 発現量はヒト GAPDH (hGAPDH) mRNA 量で補正した。

C-2-1. ヒト CYP3A4 の誘導

C-2-1-1. ヒト CYP3A4 mRNA への影響

Fig. 3A にヒト CYP3A4 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP3A4 mRNA 発現量はリファブチン投与群において平均で 8.6 倍 (5.6-13.2 倍)、リファンピシン投与群において平均で 9.2 倍 (5.5-12.2 倍) の増加が認められた。平均の誘導率で比較すると、リファンピシンがリファブチン

の約 1.1 倍、ヒト CYP3A4 mRNA を誘導することが明らかとなった。

C-2-1-2. ヒト CYP3A4 タンパクへの影響

Fig. 3B にヒト CYP3A4 タンパク発現量の定量結果を示す。ヒト CYP3A4 タンパク発現量はリファブチン投与群において平均で 3.5 倍 (2.7-4.3 倍) の誘導が認められた。リファンピシン投与群においては、キメラマウス No.10 では対照としたキメラマウス No.1 におけるヒト CYP3A4 タンパク発現量が低かったため、見かけの誘導率が約 29 倍と高くなったが、その他のキメラマウスでは平均で 11.9 倍 (10.6-14.3 倍) の誘導が認められた。平均の誘導率を用いて比較すると、リファンピシンがリファブチンの約 3.4 倍、ヒト CYP3A4 タンパクを誘導することが明らかになった。

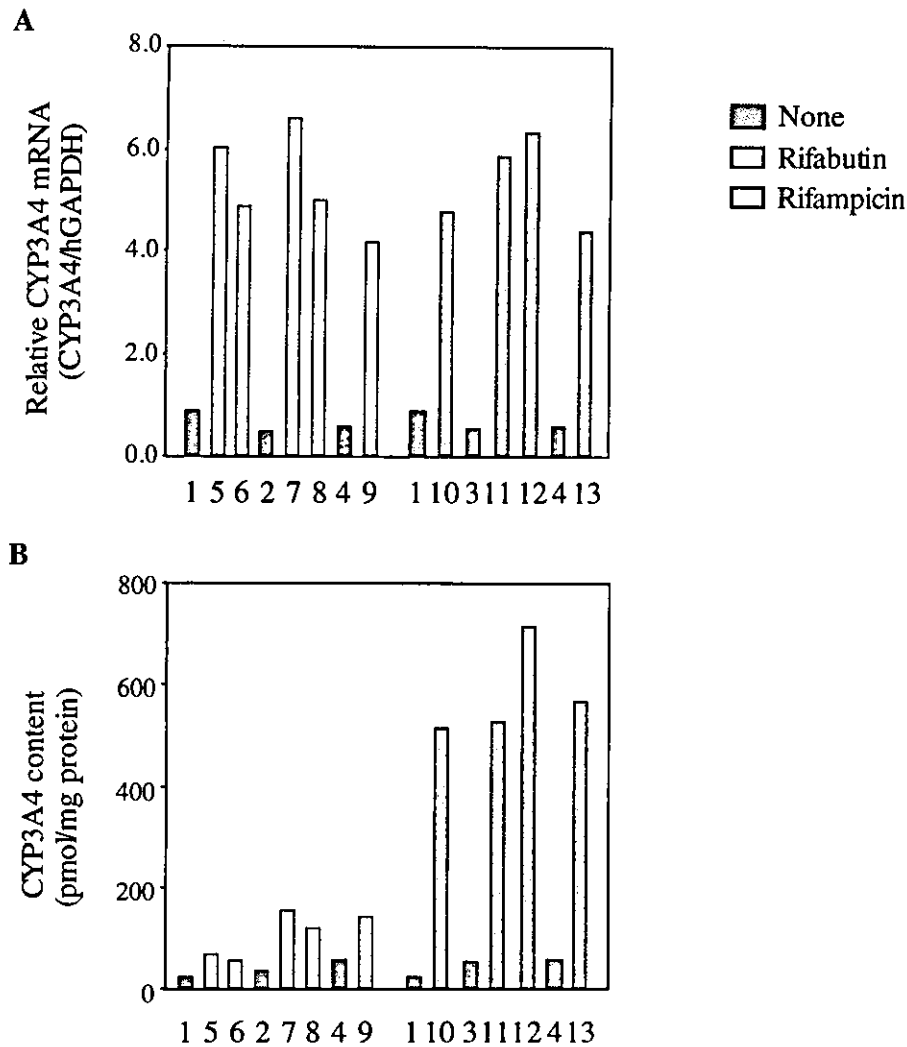


Fig. 3. Changes of human CYP3A4 expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A) and protein (B) in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-2-1-3. テストステロン 6 β -水酸化
酵素活性

Fig. 4A に TESOH の測定結果を示す。キメラマウスにおいて本酵素活性は薬物未処置群と比較してリファブチン投与群において平均で 3.7 倍

(2.0-5.6 倍)、リファンピシン投与群において平均で 3.9 倍 (3.0-5.5 倍) の誘導が認められた。平均の誘導率で比較すると、リファンピシンがリファブチンの約 1.1 倍、TESOH を誘導することが明らかになった。

C-2-1-4. デキサメタゾン 6-水酸化酵素活性

Fig. 4B に DEXOH の測定結果を示す。キメラマウスにおいて本酵素活性は薬物未処置群と比較して、リファブチン投与群において平均で 3.5

倍 (1.8-5.1 倍)、リファンピシン投与群において平均で 4.5 倍 (3.2-6.5 倍) の誘導が認められた。平均の誘導率で比較すると、リファンピシンがリファブチンの約 1.3 倍、DEXOH を誘導することが明らかになった。

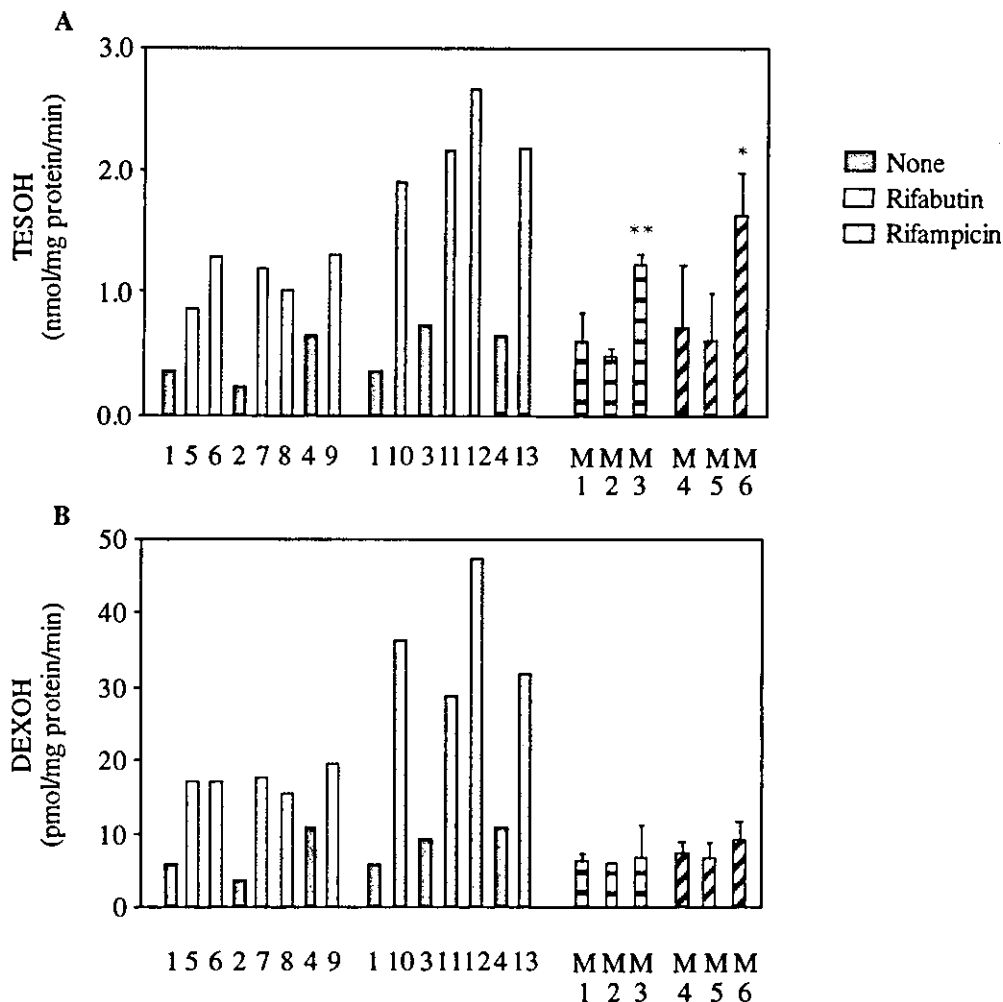


Fig. 4. Changes of human CYP3A4 expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice.

TESOH (A) and DEXOH (B) in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration. The concentration of testosterone and dexamethasone were 50 μ M and 100 μ M, respectively. The columns of M1, M2, M3, M4, M5 and M6 represent the mean \pm SD (n=4 or 5).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

M1: Non-treated uPA^{+/-}/SCID mouse, M2: Rifabutin-treated uPA^{+/-}/SCID mouse, M3: Rifampicin-treated uPA^{+/-}/SCID mouse, M4: Non-treated uPA^{-/-}/SCID mouse, M5: Rifabutin-treated uPA^{-/-}/SCID mouse, M6: Rifampicin-treated uPA^{-/-}/SCID mouse.