

C-2-2. ヒト CYP3A5 に及ぼす影響

Fig. 5A にヒト CYP3A5 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファブチン、リファンピシン投与群ともに、薬物未処置群との顕著な差が認められなかった。

Fig. 5B にヒト CYP3A7 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP3A7 mRNA 発現量はリファブチン投与群において平均で 2.3 倍 (1.6-3.0 倍)、リファンピシン投与群において平均で 2.1 倍 (0.9-4.0 倍) の増加が認められた。

C-2-3. ヒト CYP3A7 に及ぼす影響

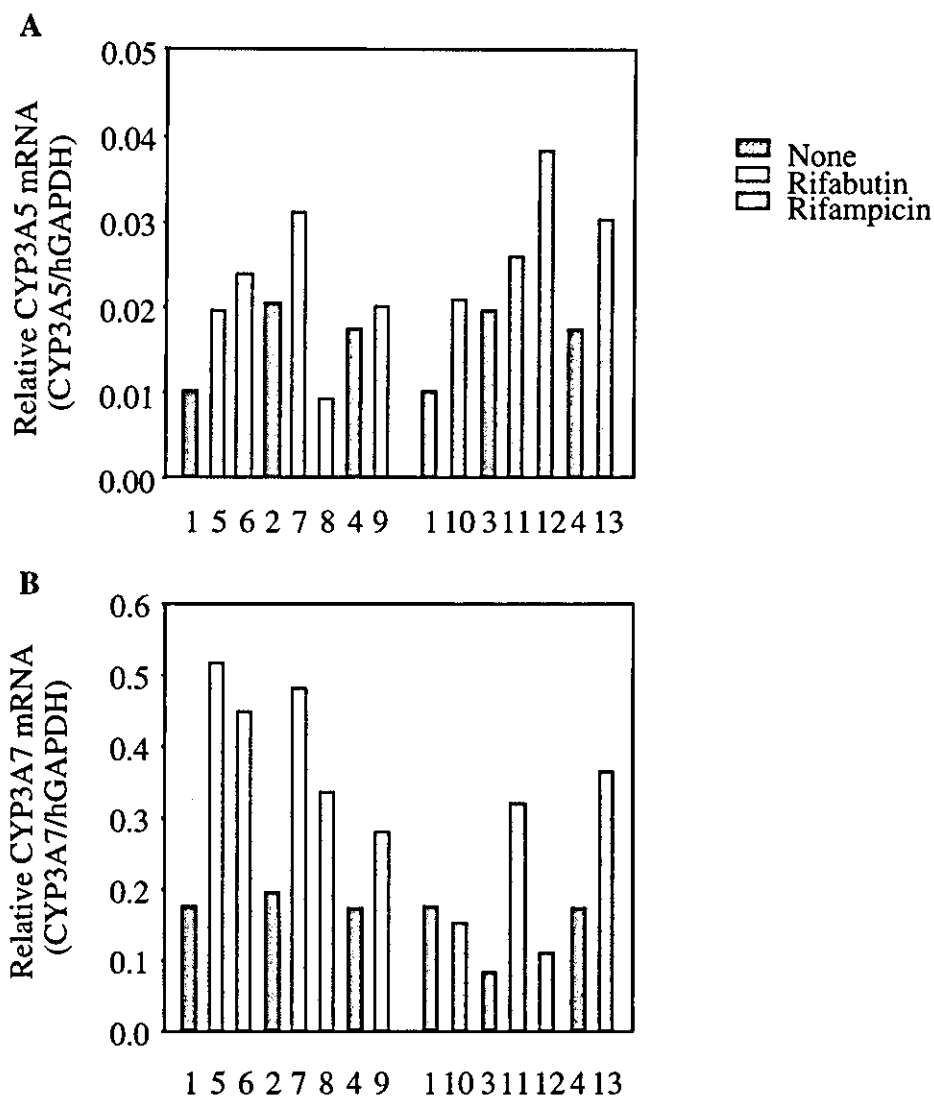


Fig. 5. Changes of human CYP3A5 and CYP3A7 mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human CYP3A5 (A) and CYP3A7 (B) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-3. リファブチン投与ヒト肝細胞キメラマウスにおけるその他のヒト CYP への影響

C-3-1. ヒト CYP2C8 に及ぼす影響

Fig. 6A にヒト CYP2C8 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP2C8 mRNA 発現量はリファブチン投与群において平均で 2.5 倍 (1.6-3.4 倍)、リファンピシン投与群において平均で 2.7 倍 (0.8-5.9 倍) の増加が認められた。

C-3-2. ヒト CYP2C9 に及ぼす影響

Fig. 6B にヒト CYP2C9 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP2C9 mRNA 発現量はリファブチン投与群において平均で 1.4 倍 (1.1-1.7 倍)、リファンピシン投与群においては平均で 2.6 倍 (0.5-6.5 倍) の増加が認められた。

C-3-3. ヒト CYP2C19 に及ぼす影響

Fig. 6C にヒト CYP2C19 mRNA 発現量の定量結果を示す。CYP2C19 mRNA 発現量はリファブチン投与群において平均で 2.7 倍 (1.7-3.5 倍) の増加が認められた。リファンピシン投与群においては大きなばらつき

が認められた。

C-3-4. ヒト CYP1A2 に及ぼす影響

Fig. 7A にヒト CYP1A2 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP1A2 mRNA 発現量はリファブチン、リファンピシン投与群ともに、薬物未処置群との顕著な差が認められなかった。

C-3-5. ヒト CYP2A6 に及ぼす影響

Fig. 7B にヒト CYP2A6 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファブチン投与群においては mRNA 発現量に増加は認められなかった。リファンピシン群においては平均で 3.2 倍 (1.3-4.2 倍) の増加が認められた。

C-3-6. ヒト CYP2D6 に及ぼす影響

Fig. 7C にヒト CYP2D6 mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CYP2D6 mRNA 発現量はリファブチン、リファンピシン投与群ともに、薬物未処置群との顕著な差が認められなかった。

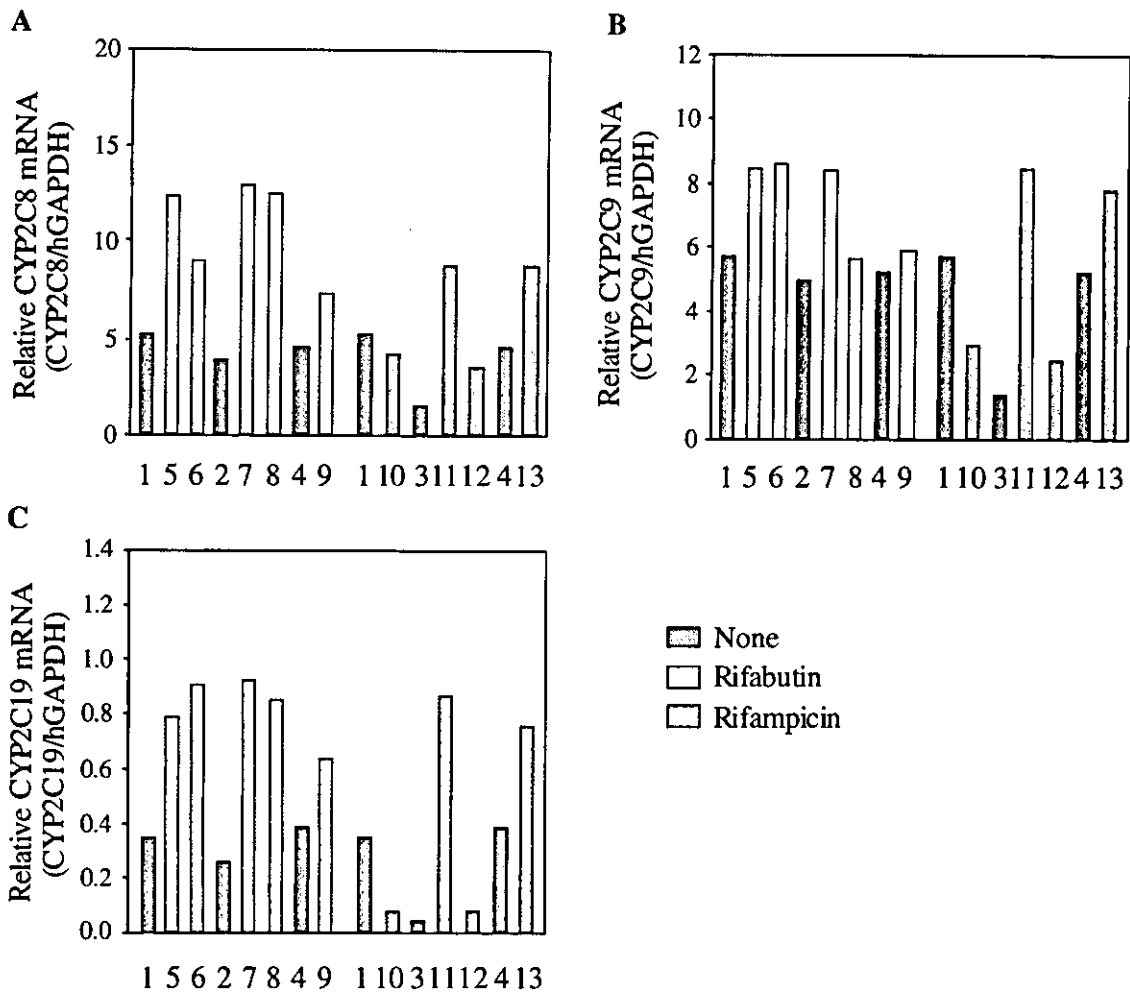


Fig. 6. Changes of human CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice.

The expression levels of human CYP2C8 (A), CYP2C9 (B) and CYP2C19 (C) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

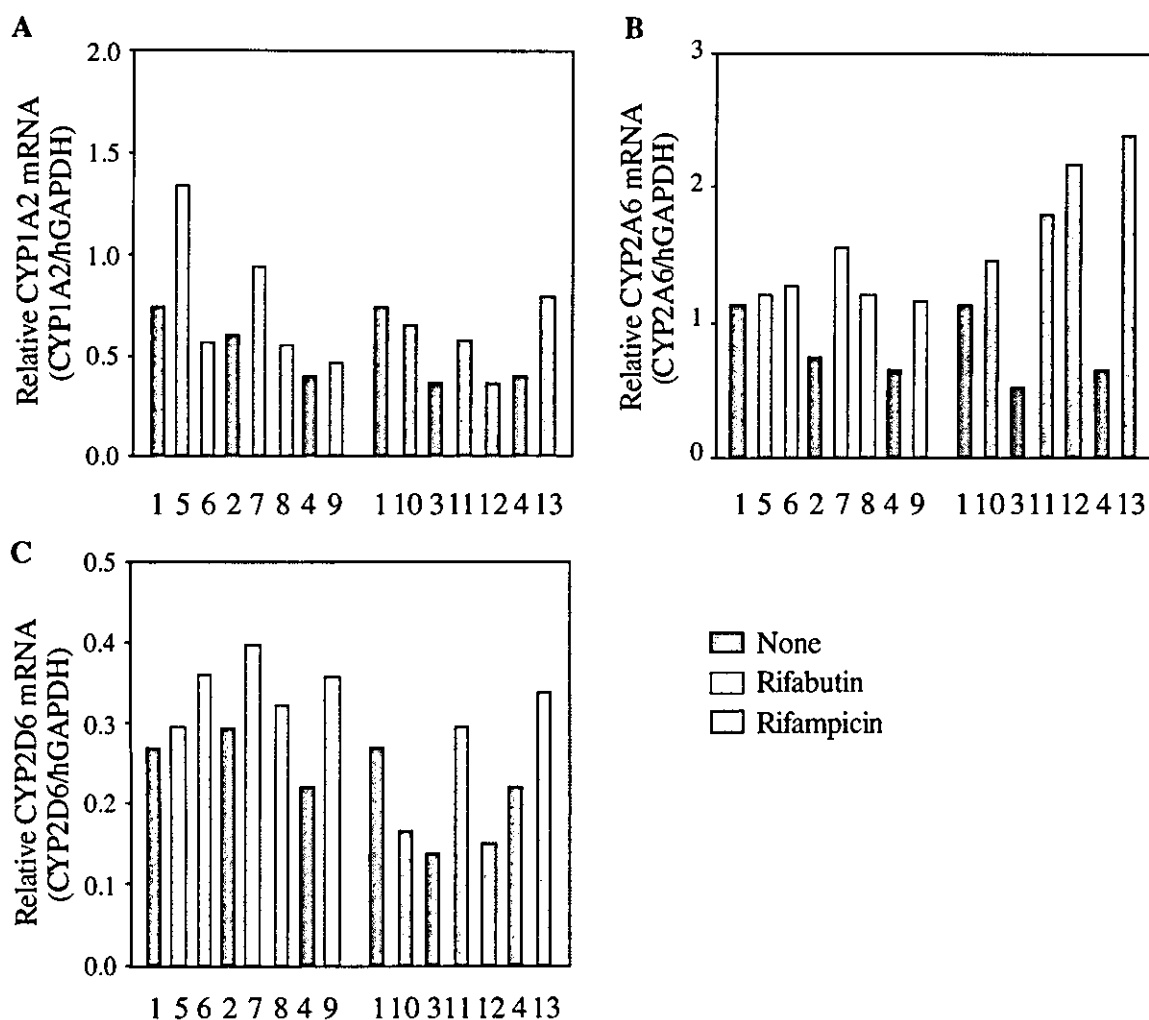


Fig. 7. Changes of human CYP1A2, CYP2A6 and CYP2D6 mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human CYP1A2 (A), CYP2A6 (B) and CYP2D6 (C) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-4. リファブチン投与によるトランスポーターへの影響

C-4-1. ヒト ABCB1 mRNA に及ぼす影響

Fig. 8A にヒト Adenosine triphosphate-binding cassette transporter B1 (ABCB1, P-gp)

mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト ABCB1 mRNA 発現量はリファブチン投与群において 0.9-2.0 倍の変動が認められた。リファンピシン投与群においては 0.3-4.5 倍の変動であった。

C-4-2. ヒト ABCC2 mRNA に及ぼす影響

Fig. 8B にヒト Adenosine triphosphate-binding cassette transporter C2 (ABCC2, MRP2) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト ABCC2 mRNA 発現量はリファブチン投与群において 1.0-2.1 倍の変

動が認められた。リファンピシンの投与群においては、キメラマウス No. 11 では対照としたキメラマウス No. 3 におけるヒト ABCC2 mRNA 発現量が低かったため、見かけの誘導率が 6.3 倍となったが、その他のキメラマウスにおいては顕著な変動が認められなかった。

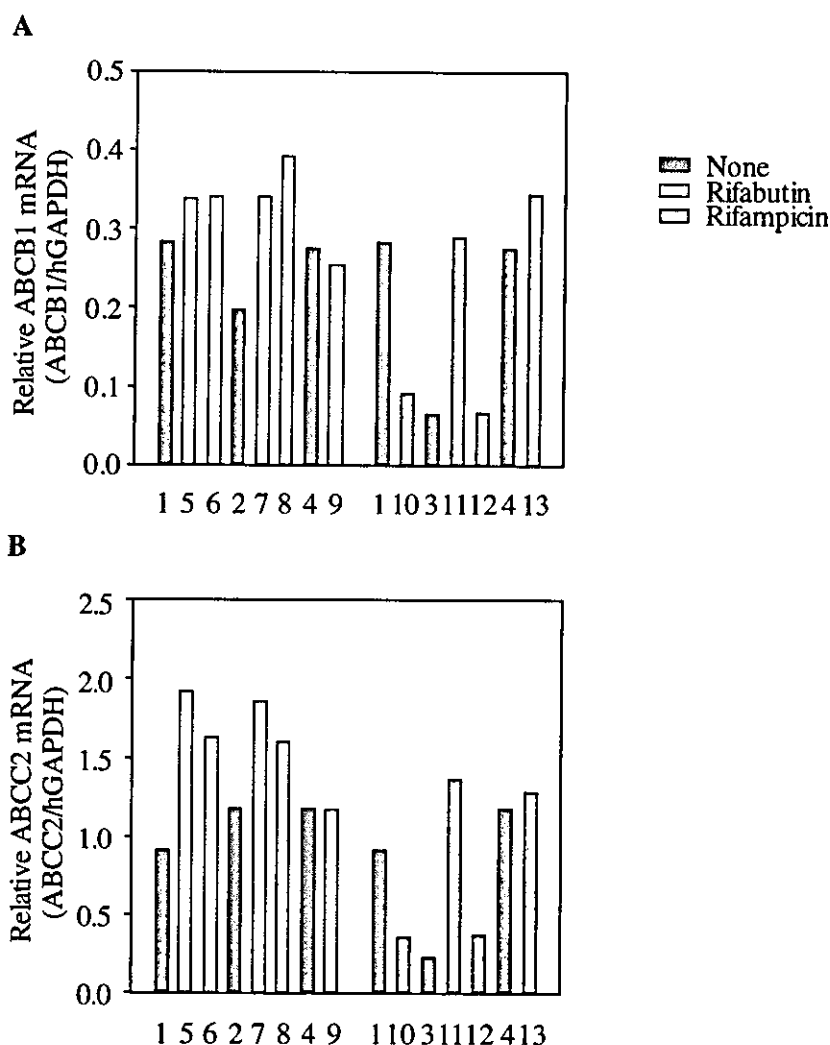


Fig. 8. Changes of human ABCB1 and ABCC2 mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human ABCB1 (A) and ABCC2 (B) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-5. リファブチン投与による核内レセプターへの影響

C-5-1. ヒト CAR mRNA に及ぼす影響

Fig. 9A にヒト Constitutively activated receptor (CAR) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト CAR mRNA 発現量はリファブチン投与群においては、1.1-1.8 倍、リファンピシン投与群においては 0.5-5.5 倍の変動が認められた。

C-5-2. ヒト AHR mRNA に及ぼす影響

Fig. 9B にヒト Aryl hydrocarbon receptor (AHR) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト AHR mRNA 発現量は、リファブチン投与群において 0.8-1.5 倍の変動が認められた。リファンピシン投与群に関してはキメラマウス No. 11 で 3.9 倍と高くなったが、その他のキメラマウスでは減少傾向が認められた。

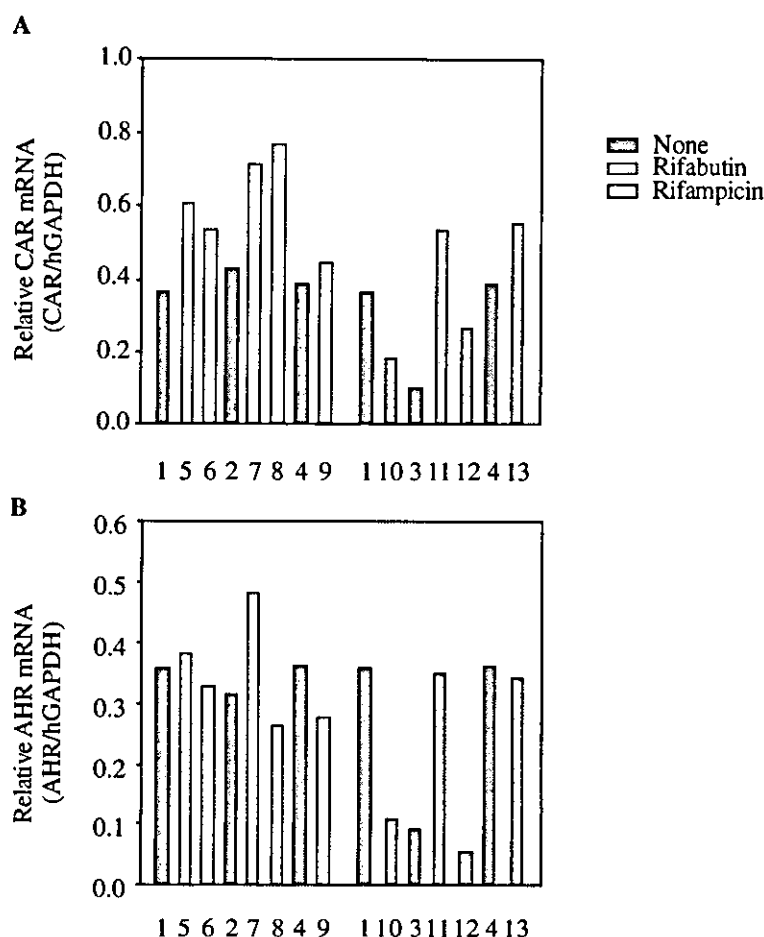


Fig. 9. Changes of human CAR and AHR mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human CAR (A) and AHR (B) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

C-5-3. ヒト HNF4 α mRNA に及ぼす影響

Fig. 10A にヒト Hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト HNF4 α mRNA 発現量はリファブチン投与群においては、1.2-1.7 倍の変動が認められた。リファンピシン投与群においては、0.3-6.1 倍の変動が認められた。

C-5-4. ヒト LXR α mRNA に及ぼす影響

Fig. 10B にヒト Liver X receptor α (LXR α) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト LXR α mRNA 発現量は、リファブチン、リファンピシン投与群ともに、薬物未処置群との顕著な差は認められなかった。

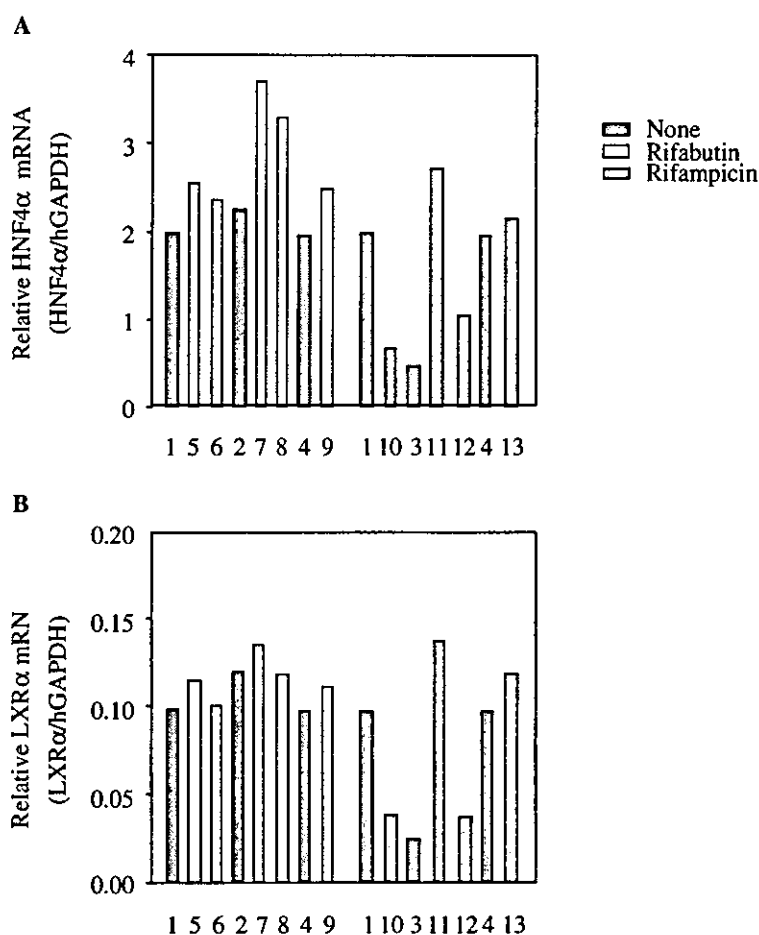


Fig. 10. Changes of human HNF4 α and LXR α mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice.

The expression levels of human HNF4 α (A) and LXR α (B) mRNA 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-5-5. ヒト RXR α mRNA に及ぼす影響

Fig. 11A にヒト Retinoid X receptor α (RXR α) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト RXR α mRNA 発現量は、対照としたキメラマウス No. 3 のヒト RXR α mRNA 発現量が顕著に低かったため、キメラマウス No. 11 で見かけ上増加傾向が見られるが、その他のキメラマウスにおいては両誘導薬による顕著な影響は認められなかった。

C-5-6. ヒト RXR β mRNA に及ぼす影響

Fig. 11B にヒト Retinoid X receptor β (RXR β) mRNA 発現量の定量結果を示す。ヒト RXR β mRNA 発現量は、対照としたキメラマウス No. 3 のヒト RXR β mRNA 発現量が顕著に低かったため、キメラマウス No. 11 で見かけ上増加傾向が見られるが、その他のキメラマウスにおいては両誘導薬による影響は認められなかった。

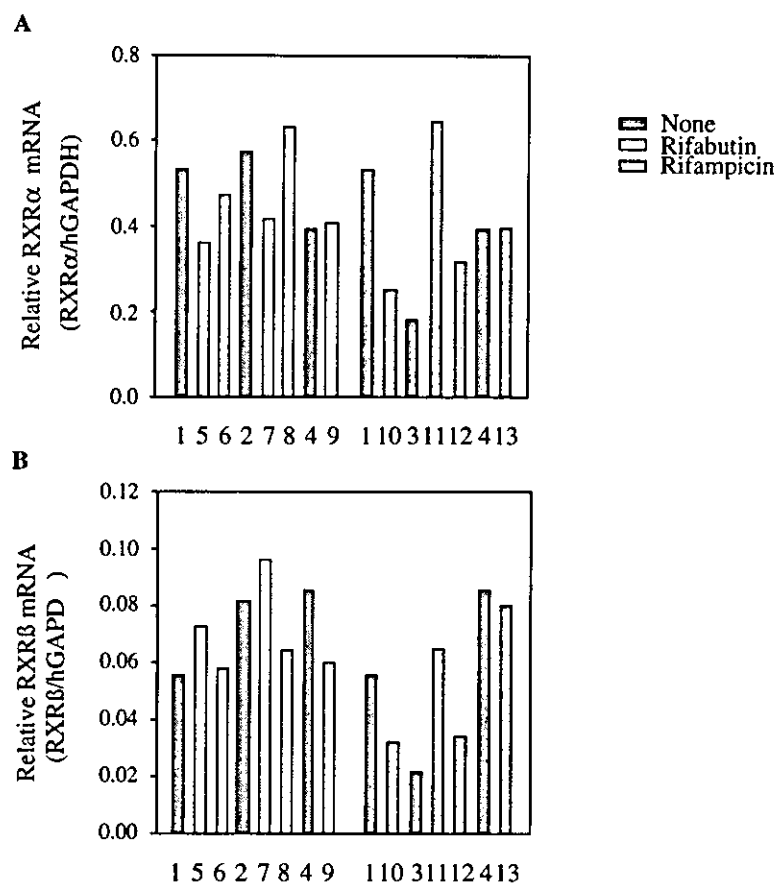


Fig. 11. Changes of human RXR α and RXR β mRNA expression by rifabutin and rifampicin in chimeric mice. The expression levels of human RXR α (A) and RXR β (B) mRNA in a rifabutin- or a rifampicin-treated chimeric mouse were compared to those in a non-treated chimeric mouse with a similar hAlb concentration.

D. 考察

昨年度までの検討により、CYPの代表的な誘導薬であるリファンピシンと3-MCで、キメラマウスの肝に発現しているヒトCYPが誘導されることをmRNA、タンパク、酵素活性レベルで明らかにした。しかし、リファンピシンと3-MCはマウスのCypも誘導することが現在までに多く報告されている (Strolin and Dostert, 1994; Kocarek et al., 1995; Nishibe et al., 1998)。キメラマウス作製に用いるuPA(+/+)*SCID*マウスは重度の肝不全・免疫不全を呈することから、キメラマウスにおけるマウスCypの寄与は非常に小さいと考えられる。しかし、キメラマウスは100%ヒト肝細胞を有する訳ではないため、ヒトCYP誘導能を詳細に検討するにはヒト特異的誘導薬をキメラマウスに投与する必要があると考えられる。

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。

リファブチンに関して、64 mg/kg/dayで5-10日間連続経口投与した場合、マウス肝ミクロソーム

のアミノピリン*N*-脱メチル化酵素活性の誘導が認められなかったという報告がなされている (Strolin and Dostert, 1994)。まず、マウスにおいてリファブチンでマウスCyp3aが誘導されないことを検証した。キメラマウス作製に用いるuPA(+/+)*SCID*マウスは本研究で使用したキメラマウスと同じ週齢まで生存することは不可能であるため、本章ではuPA^{+/-}/*SCID*マウスおよびuPA^{-/-}/*SCID*マウスを使用した。この結果、リファブチン投与によりマウスCyp3a11 mRNA量、マウスCyp3a13 mRNA量、TESOHおよびDEXOHに変化が認められなかった。なお、マウスCyp3aタンパクについてはマウスCyp3aに特異的な抗体は市販されていないため、ウサギ抗ラットCYP3A2抗体を使用した。本実験条件では、ウサギ抗ラットCYP3A2抗体と交差する2本のバンドが検出された。雄性マウス肝においては、主にCyp3a11およびCyp3a13が存在し、Cyp3a11がCyp3a13よりも数倍高く発現していることが報告されている (Yanagimoto et al., 1997)。ラットCYP3A2とマウスCyp3a11のアミノ酸相同性が84.9%であること、Cyp3a11はCyp3a13よりも分子量が大きい (Sakuma et al., 2000) ことからリファンピシンで主に誘導

されたのは Cyp3a11 と判断した。Cyp3a13 タンパクもわずかに検出したが、定量限界以下であった。これよりマウスにおいてリファブチンは Cyp3a を誘導しないと考えられる。従って、Fig. 3 で認められたリファブチンを投与したキメラマウスにおける酵素活性増加は、キメラマウスに発現しているヒト CYP によるものであると示唆される。

また、リファンピシンがマウス Cyp を誘導することも検証した。これまでに、雄性 ddY マウスにリファンピシン 100 mg/kg/day、4 日間腹腔内投与すると、Cyp3a11 mRNA が約 50 倍、Cyp3a13 mRNA が約 3 倍増加したと報告されている

(Yanagimoto et al., 1997)。本章での結果はリファンピシンによる Cyp3a11 mRNA 誘導率が Yanagimoto らの報告 (1997) より低かった。また雄性 FVB マウスにリファンピシン 250 mg/kg/day、5 日間経口投与すると Cyp3a11 タンパクが 3.5 ± 1.1 倍増加したと報告されている (Matheny et al., 2004)。本章での結果はリファンピシンにより Cyp3a11 タンパクは uPA^{+/+}/SCID マウスで 2.9 倍、uPA^{-/-}/SCID マウスで 3.5 倍の増加が認められた。マウスの系統や投与量、投与日数が異なるがリファンピシンによりマウス

Cyp3a が誘導されたと考えられる。

マウスにリファブチン 64 mg/kg/day までの用量を 5-10 日連続経口投与した場合、マウス肝における Cyp3a の誘導が認められなかったと報告されている (Strolin and Dostert, 1994)。また、当研究室の以前の検討において、ヒト肝細胞キメラマウスはリファンピシン 50 mg/kg/day を 4 日間連続投与した場合、ヒト CYP3A が誘導されることを確認している。従って、本研究ではリファブチンとリファンピシンのヒト CYP 誘導能を直接比較するために、リファンピシンの誘導条件と同用量に設定した。マウスに対する毒性については、180 mg/kg/day を長期投与した場合に、リファブチンによる癌原性が認められなかったと報告されている (Physicians' desk reference, 2002)。また、リファブチン 30 mg/kg/day を投与するとビリルビン上昇および肝重量増加といった肝障害が認められたが、リファブチンは分布容積が非常に大きく、血漿中からの消失は代謝よりも分布により制限されているため、肝機能の変化がリファブチンの薬物動態に及ぼす影響はないと考えられている。従って、本章で用いた投与量はヒト CYP 誘導能を評価するのに支障を来すものではないと考える。

マウス Cyp3a をリファブチンが誘導しないことを確認後、キメラマウスにおいてリファブチン投与による各 CYP 分子種の変動を検討した。Fig. 3 の結果より、リファブチン投与によりキメラマウスのヒト CYP3A4 mRNA は平均で 8.6 倍、タンパク発現量は平均で 3.5 倍の増加が認められた。また、TESOH および DEXOH はそれぞれ平均で 3.7 倍、平均で 3.5 倍の増加が認められた。TESOH に関しては、誘導条件が異なるが、ヒト培養肝細胞を用いた *in vitro* 実験系において、2.4 倍 (Li et al., 1997)、4 倍 (Reinach et al., 1999) 増加したとの報告がある。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、薬物未処置のキメラマウスとリファブチン投与キメラマウスで hAlb 濃度が正確に同じでないことを考慮しても、CYP3A の誘導においては以前の報告と大きな矛盾はないと思われる。リファブチンの対照薬として用いたリファンピシンのヒト CYP3A4 誘導については、*in vivo*、*in vitro* 実験系において現在まで多数の報告がなされている。Fig. 3 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 は平均で 9.2 倍、タンパク発現量は平均で 11.9 倍の増加が認められた。また、TESOH および DEXOH はそ

れぞれ平均で 3.9 倍、平均で 4.5 倍の増加が認められた。CYP3A4 mRNA の誘導に関しては、ヒト培養肝細胞を用いた *in vitro* 実験系において 3.4-10 倍 (Li et al., 1997)、8-16 倍 (Nishimura et al., 2002)、2.8-14.8 倍 (Raucy et al., 2002)、4-8 倍 (Garcia et al., 2003) と報告されている。タンパク発現量に関しては、ヒト肝スライスを用いた *in vitro* 実験系において、平均で 3.3 倍 (1.0-18.4 倍) (Edwards et al., 2003)、ヒト肝細胞を用いた実験系で 4.2 倍 (Drocourt et al., 2001)、9.4 倍 (Desai et al., 2002)、1.2-8.2 倍 (Raucy et al., 2002) 増加したとの報告がある。TESOH に関しては、ヒト培養肝細胞を用いた *in vitro* 実験系において、10 倍 (Reinach et al., 1999)、10.5 倍 (Desai et al., 2002)、5-8 倍 (Garcia et al., 2003)、平均で 6.2 倍 (Roymans et al., 2004) 増加したとの報告がある。また *in vivo* においては、Gharaibeh ら (1998) によって Erythromycin Breath Test の測定値がリファンピシンにより 46-123%上昇したと報告されている。リファンピシンにおいても以前の報告と本章における結果に大きな矛盾はないと考えられる。

リファブチンとリファンピシンの CYP3A4 誘導能の強弱に関しては *in*

vivo, *in vitro* において報告がなされている。健常者にリファブチン 300 mg/day およびリファンピシン 600 mg/day を 7 日間連続投与すると、尿中 6 β -hydroxycortisol 排泄量がリファンピシンで 274%、リファブチンで 26%増加したという報告がある (Perucca et al., 1988)。また、ヒト培養肝細胞を用いた実験系で TESOH がリファブチン処置により 4 倍、リファンピシン処置により 10 倍増加したと報告されている (Reinach et al., 1999)。誘導条件が異なるが Liら (1997) によるとそれぞれ 2.4 倍、3.4-10 倍と報告されている。本章の結果は、キメラマウスの CYP3A 誘導能は mRNA、タンパク、活性レベルと全てにおいてリファブチンはリファンピシンよりも弱いことが示唆され、ヒトにおける報告と一致した。キメラマウスは、誘導薬に対する反応性はヒトと同じ傾向を示すと考えられる。

ヒト CYP3A subfamily には CYP3A4 以外にも CYP3A5、CYP3A7 が存在する。Fig. 5 より、ヒト CYP3A5 mRNA 発現量はリファブチン、リファンピシン投与群ともに、薬物未処置群との顕著な差は認められなかった。キメラマウスおよびドナーについて CYP3A5 遺伝子の genotyping を行った結果、

CYP3A5*3 のホモ接合体であったと報告されている (Kato et al., 2004)。これはイントロン 3 の A6986G の変異であり、splicing defect により分子量が小さく機能を有しないタンパクを産生する。リファブチンに関しては CYP3A5 に関する報告が現在までになされていないが、CYP3A5 の誘導の有無に関しては更なる検討が必要であろう。

CYP3A7 は胎児ヒト肝から単離された分子種であり胎児に特異的な CYP3A 分子種であると考えられていた。しかし、白人成人健常者の 54% (Schuetz et al., 1994)、88% (Greuet et al., 1996)、日本人成人肝癌患者 (Tateishi et al., 1999) の肝において CYP3A7 mRNA の発現が見られたという報告から、成人肝においても発現量は非常に低いものの存在することが明らかにされた。さらに成人肝に発現する CYP3A7 は CYP3A4 と同様、リファンピシンにより mRNA レベルで誘導されることを、Greuet ら (1996) および Schuetz ら (1994) がヒト培養肝細胞を用いた実験系で報告し、Usui ら (2003) はヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いた実験系で約 2.4 倍の誘導が認められたことを報告している。本章の結果よりヒト肝細胞キメラマウスの肝においてもヒト CYP3A7 の発現が認め

られ、リファンピシン投与により平均で2.1倍(0.9-4.0倍)のmRNAの増加が認められた。これはUsuiら(2003)の報告と大きな矛盾はない。リファブチンのCYP3A7の誘導に関して現在まで報告されていないがmRNAレベルで平均で2.3倍(1.6-3.0倍)の誘導が認められた。

CYP3A以外の分子種に関してはCYP1A2において、リファブチン投与により健常者において、テオフィリンのクリアランスやAUCに有意な差が見られなかったと報告されており(Gillum et al., 1996)、CYP1A2を誘導しないと考えられる。本章の結果はmRNAレベルであるがリファブチンはCYP1A2を誘導しないことが示唆された。リファンピシンについては、CYP1A2を誘導しないことがmRNAレベル(Nishimura et al., 2002)、タンパク発現レベル、CYP1A2指標活性であるエトキシレゾルフィンO-脱エチル化酵素活性(Meunier et al., 2000)において報告されている。本章の結果は以前の結果と矛盾しないものであった。

本章において、リファブチンとリファンピシンは誘導の強さに差があるものの同じCYP分子種を誘導することがmRNAレベルで認められたが、興味深いことにCYP2A6の誘導に関しては、リファンピシンは誘導する

がリファブチンは誘導しないという結果が認められた。CYP2A6はリファンピシンの他にフェノバルビタールでも誘導されることからPXR、CAR、RXRが転写活性化に関与する可能性が考えられるが、CYP2A6の誘導メカニズムに関しては詳細に解明されてはいない。リファンピシンとリファブチンの構造の違い、例えばpiperazinyl iminomethyl基の有無が核内レセプターへの親和性の差の原因となり、リファンピシンでは誘導が認められるが、リファブチンでは認められなかったという可能性は考えられる。

CYP2D6に関しては、ヒト培養肝細胞を用いた実験系によりリファンピシンでデキストロメトルファンO-脱メチル化酵素活性に有意な増加が認められなかったと報告されている(Madan et al., 2003)。またヒト肝スライスを用いた実験系においてタンパク発現量に有意な増加が認められなかったと報告されている

(Edwards et al., 2003)。本章の結果ではmRNAレベルでリファンピシンによりCYP2D6の誘導が認められず、以前の報告と一致した。リファブチンに関してはヒト培養肝細胞を用いた実験系によりデキストロメトルファンO-脱メチル化酵素活性に影響が認められなかったと報告されて

いる (Li et al., 1997)。リファブチンはリファンピシンと同様 CYP2D6 を誘導しないことが mRNA レベルで明らかとなった。

以上、本章においてリファブチンを用いることでヒト肝細胞キメラマウスに発現するヒト CYP3A4 が誘導能をもつことが明らかになった。また、リファブチンおよびリファンピシンに関して、ヒトで報告されている CYP3A 以外の各 CYP 分子種の変化はキメラマウスにおいてもヒトと同一であったことを mRNA レベルにおいて明らかにした。mRNA レベルにおける検討のみの CYP 分子種に関しては、タンパク、酵素活性レベルの検討も行い、包括的に評価する必要があるだろう。また、本研究は単一ドナーの肝細胞を移植して作製したキメラマウスについてのみの検討であるため、様々なドナーを移植したキメラマウスを用い、誘導の個体差についても更に検討を行う必要があると考えられる。

また、生体外異物や内因性物質の肝外排泄は、循環血中から肝への取り込み、肝における代謝、そして胆汁排泄という一連の流れを経て行われる。従って、肝細胞膜を介した輸送は肝外排泄における重要な因子であり、胆汁排泄には ABCB1、ABCC2 などいくつかのトランスポーターが

働くことが知られている。そこで、キメラマウスの肝に発現するトランスポーターのうち、胆汁排泄に重要な役割を果たす ABCB1、ABCC2 の 2 つのトランスポーターに注目して、リファブチンおよびリファンピシン投与による影響を検討した。

ABCB1 は肝、腎臓、小腸、血液脳関門など全身に発現しており、多くの生体外異物の吸収、排泄、分布に重要な役割を果たしている。リファンピシンによる ABCB1 の誘導に関しては、HepG2 細胞を用いた実験系で mRNA が 1.3 倍 (Rühl et al., 2004)、ヒト培養肝細胞を用いた実験系で約 1.6 倍 (Nishimura et al., 2002) 増加したという報告がある。本章の結果からリファブチン投与により 0.9-2.0 倍、リファンピシン投与により 0.3-4.5 倍の増加が認められた。本研究は *in vivo* 実験系であり、キメラマウスにおける個体差、薬物処置群と未処置群で hAlb 濃度が正確に同じでないことを考慮しても、以前の報告と矛盾はないと考えられる。

ABCC2 は肝細胞の胆管膜上に局在し、胆汁酸の硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体、グルタチオンといった有機アニオンの輸送に関わっているトランスポーターである。ABCC2 の発現は胆管膜において最も高いが、腎臓、回腸、空腸においても発現し

ており、体外への毒性化合物の排泄に関わっていると考えられている。現在までに、リファンピシンにより ABCC2 mRNA の誘導がヒト肝細胞、ヒト小腸において認められている

(Fromm et al., 2000; Kast et al., 2002)。本章の結果において、ヒト ABCC2 mRNA 発現量は 6.3 倍と大きな誘導率を示す個体も存在したが、他のキメラマウスで 0.4-1.7 倍の変動であった。ABCC2 のリファンピシンによる誘導率に関しては、現在までにヒト培養肝細胞を用いた実験系において ABCC2 mRNA 発現量は 1.3-2 倍 (Kast et al., 2002; Nishimura et al., 2002) の増加が認められており、また Hep G2 細胞を用いた実験系において mRNA 発現量は 1.5-2 倍 (Kauffmann et al., 2002; Rühl et al., 2004)、タンパク発現量は 2-2.5 倍 (Schrenk et al., 2001; Kauffmann et al., 2002) の増加が認められたと報告されている。本章で得られた誘導率は以前の報告と大きな矛盾はないと考えられる。また、リファブチンに関しては報告がないが、リファブチン投与によりヒト ABCC2 mRNA 発現量は 1.0-2.1 倍増加するという結果を得た。

以上より、ヒト肝細胞キメラマウスにおいて、ヒトトランスポーターの発現が mRNA レベルで確認できた。

また、リファンピシンが各トランスポーターの mRNA 発現レベルに及ぼす影響を検討し、ヒトにおける今までの報告と同様なことがキメラマウスにおいても再現されていることを確認できた。胆汁酸に関しては、ヒトトランスポーターに対する親和性が taurocholate > glycochenodeoxycholate > glycocholate > taurochenodeoxycholate の順であり、マウスにおいては taurochenodeoxycholate に最も親和性が高いというように、ヒトとマウスで胆汁酸排泄に種差が見られることが知られている (Byrne et al., 2002)。各トランスポーターについてのタンパクレベルでの検討は今後の課題であるが、ヒト肝細胞キメラマウスは薬物代謝能のヒト化と同様、トランスポーターにおいても機能的にヒト化しており、高い hAlb 濃度を示すマウスにおいては、ヒトと同様の排泄経路をとるのではないかと推察される。

薬物代謝酵素の活性に変動をもたらす要因の一つとして、酵素発現の誘導が挙げられる。様々な CYP 分子種が薬物や生体外異物によって誘導されることが報告されており、その誘導メカニズムも明らかになってきた。例えば、CYP3A4 はリファンピ

シンなどのリガンドが核内レセプター-Pregnane X receptor (PXR) に結合し、これが核内レセプター-RXR α とヘテロダイマーを形成して CYP3A4 遺伝子の 5'-上流の ER6

(evereted repeat separated by 6 nucleotides) に結合することにより転写を活性化する (Bertilsson et al., 1998; Lehmann et al., 1998)。

CYP2B6 はフェノバルビタールなどの薬物により核内レセプター-CAR が活性化されて RXR α とヘテロダイマーを形成し、CYP2B6 遺伝子 5'-上流に存在する PBREM

(phenobarbital responsive enhancer module) に結合することにより、転写を活性化する (Sueyoshi et al., 1999)。CYP 遺伝子発現調節や誘導に関する核内レセプターの研究の大多数は *in vitro* において行われている。*In vitro* での知見は重要であるが、肝に発現する多くの遺伝子は多数の制御因子によって制御されているため、必ずしも *in vivo* での環境を反映していないかもしれない。例として、ウサギ CYP2C 遺伝子の promoter 領域への HNF4 α の結合が肝での CYP2C mRNA 発現レベルと相関しなかったことが挙げられる

(Chen et al., 1994)。従って *in vivo* における核内レセプターの変動を検討することは誘導メカニズムを解明

する一助となると考えられる。

PXR は多くの CYP や ABCB1 や ABCC2 といったトランスポーターをコードする遺伝子の重要な制御因子であると言われている。PXR は応答エレメントに結合し転写活性化に寄与する。PXR mRNA 発現量と PXR の標的遺伝子の mRNA 発現量に関しては、parallel に増加しないという報告が今までになされている。Pascussi ら (2000) によると、ヒト培養肝細胞を用いた実験系において、リファンピシンで CYP3A4 mRNA の誘導が認められたが、同じ PXR のリガンドであるデキサメタゾンとは異なり PXR mRNA 発現量に変化がなかったことが報告されている。また、リファンピシン以外にも CYP3A4 やヒト PXR の activator として知られている RU486、クロトリマゾール、フェノバルビタールでは PXR mRNA の誘導が認められなかったことが報告されている。更に興味深いことに、CYP3A の誘導薬でないイソニアジドや perfluorodecanoic acid などで PXR mRNA の強い誘導作用を持つことがラットにおいて報告されている (Zhang et al., 1999)。このことから PXR activator が必ずしも PXR 遺伝子の発現を正に制御しているわけではないと考えられる。その他の核内レセプターにおいても同様である

可能性も否定できない。加えて、PXRのリガンドに対する応答性に種差が存在している。リファンピシンに対してマウス PXR の応答性は弱い、ヒト PXR は応答して転写を活性化することが報告されている (Lehmann et al., 1998; Savas et al., 1999; Waxmann, 1999)。この薬物に対するレセプター応答性の種差が CYP3A 誘導能の種差を引き起こしていると考えられている。本研究では、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ず、ヒト PXR mRNA 発現量を測定することができなかつたため、今後の研究課題であると考えられる。

RXRs は steroid/thyroid hormone receptor superfamily に属し、3 つの分子種 (RXR α , RXR β , RXR γ) が存在し (Levin et al., 1992)、そのうち、RXR α が肝における主要な分子種であると報告されている (Berrodin et al., 1992)。RXR α は他の核内レセプターとヘテロダイマーを形成する補助的なタンパクとして機能する。RXR α と他の核内レセプターとのヘテロダイマーはリガンド依存的に標的遺伝子を活性化する。従って、RXR α のレベルが標的遺伝子発現量を決定する重要な因子であると考えられる。Pascussi ら (2000) によるとリファンピシンは CYP3A4

タンパク発現量を増加させたが、RXR α タンパク発現量を変化させなかったと報告されている。本結果において、リファンピシンにより 0.3-6.1 倍の mRNA 増加が認められた。以前の結果と比較するためにもタンパクレベルの検討を行う必要があると考える。Pascussi ら (2000) の検討は mRNA レベルで行われていないため不明であるが、リファンピシンによる RXR α レベルへの影響は転写段階においてのみで転写後には影響しないのかもしれない。

以上、本章においてはヒト肝細胞キメラマウスに発現するトランスポーターおよび核内レセプターの誘導薬による変動を見た。本章のように、誘導薬による *in vivo* における複数の核内レセプターの発現変動を検討した研究は少ない。今後、キメラマウスの例数を増して検討すること、ヒト PXR mRNA 発現量の定量を行うことなど更なる検討が必要であろう。本章の結果は今後の各 CYP 分子種の誘導メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。

キメラマウスを用いたヒト CYP 誘導実験は、新鮮ヒト肝細胞を用いた場合に比べより生体に近い条件での検討が可能と考えられ、医薬品開発において有用な手段になり得ると予想される。

E. 結論

ヒト CYP 特異的な誘導薬であるリファブチンを用いて、ヒト肝細胞キメラマウスに発現するヒト CYP3A4 が誘導能をもつことを明らかにした。また、リファブチンおよびリファンピシンに関して、ヒトで報告されている CYP3A 以外の各 CYP 分子種の変化はキメラマウスにおいてもヒトと同一であったことを mRNA レベルにおいて明らかにした。

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：

In vivo induction potency on CYP3A4 by rifabutin in chimeric mice with humanized liver；第 19 回日本薬物動態学会年会、平成 16 年 11 月 17-19 日、金沢

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

I. 捕捉（文中で使用した引用文献を示す）

Arlotto MP, Trant JM and Estanrool RW (1991) Measurement of steroid hydroxylation reactions by high-performance liquid chromatography as indicator of P450 identity and function. *Methods Enzymol* **206**: 454-462.

Barwick JL, Quattrochi LC, Mills AS, Potenza C, Tukey RH and Guzelian PS (1996) Trans-species gene transfer for analysis of glucocorticoid-inducible transcriptional activation of transiently expressed human CYP3A4 and rabbit CYP3A6 in primary cultures of adult rat and rabbit hepatocytes. *Mol Pharmacol* **50**: 10-16.

Berrodin TJ, Marks MS, Ozato K, Linney E and Lazar MA (1992) Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein. *Mol Endocrinol* **6**: 1468-1478.

Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Åsman M, Jendeberg L, Sydow-Bäckman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P and Berkenstam A (1998) Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12208-12213.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Breckenridge A and Orme M (1971) Clinical implications of enzyme induction. *Ann NY Acad Sci* **179**: 421–431.
- Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ and Thompson RJ (2002) The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* **123**: 1649–1658.
- Chen D, Park Y and Kemper B (1994) Differential protein binding and transcriptional activities of HNF-4 elements in three closely related CYP2C genes. *DNA Cell Biol* **13**: 771–779.
- Dandri M, Burda MR, Torok E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H and Petersen J (2001) Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* **33**: 981–988.
- Desai PB, Nallani SC, Sane RS, Moore LB, Goodwin BJ, Buckley DJ and Buckley AR (2002) Induction of cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes and activation of the human pregnane X receptor by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos* **30**: 608–612.
- Drocourt L, Pascussi JM, Assenat E, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2001) Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **29**: 1325–1331.
- Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB, Tredger JM, Boobis AR and Lake BG (2003) Induction of cytochrome P450 enzymes in culture precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos* **31**: 282–288.
- Freeman DJ, Laupacis A, Keown PA, Stiller CR and Carruthers SG (1984) Evaluation of cyclosporine-phenytoin interaction with observations on cyclosporine metabolites. *Br J Clin Pharmacol* **18**: 887–893.
- Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W and Schrenk D (2000) The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *Am J Pathol* **157**: 1575–1580.
- Furukawa M, Nishimura M, Ogino D, Chiba R, Ikai I, Ueda N, Naito S, Kuribayashi S, Moustafa MA, Uchida T, Sawada H, Kamataki T, Funae Y and Fukumoto M (2004) Cytochrome p450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci* **95**: 520–529.
- Garcia M, Rager J, Wang Q, Strab R, Hidalgo IJ, Owen A and Li J (2003) Cryopreserved human hepatocytes as alternative in vitro model for cytochrome P450 induction studies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **39**: 283–287.
- Gentile DM, Tomlinson ES, Maggs JL, Park BK and Back DJ (1996) Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and

- inhibition of 6-hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther* **277**: 105–112.
- Gharaibeh MN, Gillen LP, Osborne B, Schwartz JI and Waldman SA (1998) Effect of multiple doses of rifampicin on the [¹⁴C N-methyl] erythromycin breath test in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* **38**: 492–495.
- Gillum JG, Sesler JM, Bruzzese VL, Israel DS and Polk RE (1996) Induction of theophylline clearance by rifampicin and rifabutin in healthy male volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1866–1969
- Greuet J, Pichard L, Bonfils C, Domergue J and Maurel P (1996) The fetal specific gene CYP3A7 is inducible by rifampicin in adult human hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **225**: 689–694.
- Guengerich FP (1997) Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact* **106**: 161–182.
- Ishikawa T, Sekiguchi F, Fukase Y, Sawada N and Ishitsuka H (1998) Positive correlation between the efficacy of capecitabine and doxifluridine and the ratio of thymidine phosphorylase to dihydropyrimidine dehydrogenase activities in tumors in human cancer xenografts. *Cancer Res* **58**: 685–690.
- Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM and Edwards PA (2002) Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* **277**: 2908–2915.
- Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2004) Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* **32**: 1402–1410.
- Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2005) In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* in press.
- Kauffmann HM, Pfannschmidt S, Zöller H, Benz A, Vorderstemann B, Webster JI and Schrenk D (2002) Influence of redox-active compounds and PXR-activators on human MRP1 and MRP2 gene expression. *Toxicology* **171**: 137–146.
- Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA and Guzelian PS (1995) Comparative analysis of cytochrome P450 3A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **23**: 415–421.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT and Kliewer SA (1998) The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds