

that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* **102**: 1016–1023.

Levin AA, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M and Lovey A (1992) 9-Cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* **355**: 359–361.

Li AP, Reith MK, Rasmussen A, Gorski JC, Hall SD, Xu L, Kaminski DL and Cheng LK (1997) Primary human hepatocytes as a tool for the evaluation of structure–activity relationship in cytochrome P450 induction potential of xenobiotics: evaluation of rifampin, rifapentine and rifabutin. *Chem Biol Interact* **107**: 17–30.

Madan A, Greham RA, Carroll KM, Mudra DR, Burton LA, Krueger LA, Downey AD, Czerwinski M, Forster J, Ribadeneira MD, Gan LS, Lecluyse EL, Zech K, Robertson P Jr, Koch P, Antonian L, Wagner G, Yu L and Parkinson A (2003) Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **31**: 421–431.

Matheny CJ, Ali RY, Yang X and Pollack GM (2004) Effect of prototypical inducing agents on P-glycoprotein and CYP3A expression in mouse tissues. *Drug Metab Dispos* **32**: 1008–1014.

Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL and Kneteman NM (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**: 927–

933.

Meunier V, Bourrie M, Julian B, Marti E, Guillou F, Berger Y and Fabre G (2000) Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica* **30**: 589–607.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Wazman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and Nevert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**: 1–42.

Nelson DR (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* **369**: 1–10.

Nishibe Y, Wakabayashi M, Harauchi T and Ohno K (1998) Characterization of cytochrome P450 (CYP3A12) induction by rifampicin in dog liver. *Xenobiotica* **28**: 549–557.

Nishimura M, Naito S and Yokoi T (2004) Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokin* **19**: 135–159

Nishimura M, Yoshitsugu H, Naito S and Hiraoka I (2002) Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **122**: 339–361.

Pascussi JM, Drocourt L, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2000) Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid

- X receptor- α expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol* **58**: 361-372.
- Perucca E, Grimaldi R, Frigo GM, Sardi A, Mönig H and Ohnhaus EE (1988) Comparative effects of rifabutin and rifampicin on hepatic microsomal enzyme activity in normal subjects. *Eur J Clin Pharmacol* **34**: 595-599.
- Raucy JL, Mueller L, Duan K, Allen SW, Strom S and Lasker JM (2002) Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **302**: 475-482.
- Reinach B, Sousa GD, Dostert P, Ings R, Gugenheim J and Rahmani R (1999) Comparative effects of rifabutin and rifampicin on cytochromes P450 and UDP-glucuronosyl-transferases expression in fresh and cryopreserved human hepatocytes. *Chem Biol Interact* **121**: 37-48.
- Rodrigues AD and Rushmore TH (2002) Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab* **3**: 289-309.
- Roymans D, Van LC, Leone A, Parker JB, McMillian M, Johnson MD, Koganti A, Gilissen R, Silber P, Mannens G and Meuldermans W (2004) Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **67**: 427-437.
- Rühl R, Sczech R, Landes N, Pfluger P, Kluth D and Schweigert FJ (2004) Carotenoids and their metabolites are naturally occurring activators of gene expression via the pregnane X receptor. *Eur J Nutr* **43**: 336-343.
- Sakuma T, Takai M, Endo Y, Kuroiwa M, Ôhara A, Jarukamjorn K, Honma R and Nemoto N (2000) A novel female-specific member of the CYP3A gene subfamily in the mouse liver. *Arch Biochem Biophys* **377**: 153-162.
- Savas U, Griffin KJ and Johnson EF (1999) Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: An expanded role for nuclear hormone receptors. *Mol Pharmacol* **56**: 851-857.
- Schrenk D, Baus PR, Ermel N, Klein C, Vorderstemann B and Kauffmann HM (2001) Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicology Letters* **120**: 51-57.
- Schuetz JD, Beach DL and Guzelian PS (1994) Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogenetics* **4**: 11-20.
- Strolin BM and Dostert P (1994) Induction and autoinduction properties of rifamycin derivatives: a review of animal and human studies. *Environ Health Perspect* **102**: 101-105.
- Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P and Negishi M (1999) The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human

- CYP2B6 gene. *J Biol Chem* **274**: 6043-6046.
- Tateishi T, Watanabe M, Moriya H, Yamaguchi S, Sato T and Kobayashi S (1999) No ethnic difference between Caucasian and Japanese hepatic sample in the expression frequency of CYP3A5 and CYP3A7 proteins. *Biochem Pharmacol* **57**: 935-939.
- Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T and Yoshizato K (2004) Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* **165**: 901-912.
- 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.
- Tomlinson ES, Maggs JL, Park BK and Back DJ (1997) Dexamethasone metabolism in vitro: species differences. *J Steroid Biochem Mol Biol* **62**: 345-352.
- Usui T, Saitoh Y and Kamada F (2003) Induction of CYP3As in HepG2 cells by several drugs.-Association between induction of CYP3A4 and expression of glucocorticoid receptor-. *Biol Pharm Bull* **26**: 510-517.
- Waxman DJ (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: Central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR. *Arch Biochem Biophys* **369**: 11-23.
- 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 H, LeCulyse E, Liu L, Hu M, Matoney L, Zhu W and Yan B (1999) Rat pregnane X receptor: Molecular cloning, tissue distribution, and xenobiotic regulation.

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リファマイシン系抗生物質の
ヒト CYP 誘導能に関する検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部
協力研究者 岩崎 一秀 ファイザー(株)中央研究所 担当部長

研究要旨

マウス肝細胞をヒト肝細胞で高度に置換したヒト肝細胞キメラマウスは、医薬品開発の初期段階においてヒトにおける薬物動態あるいは CYP 誘導能を予測する有用なシステムになる可能性がある。本研究では、ヒトにおいて CYP 誘導能が報告されているリファマイシン系抗生物質であるリファンピシンおよびリファブチンのヒト肝細胞キメラマウスでの CYP 誘導能を CYP3A で代謝される基質を用いて検討した。

ヒト肝キメラマウスにリファンピシンおよびリファブチンを投与し、肝ミクロソームの CYP3A 代謝活性を測定した。リファンピシン投与により、ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50~90%）ではデキサメサゾン 6 β -水酸化活性、ミダゾラム 1'-および 4-水酸化活性は対照群に比し有意に上昇した。ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）では、リファンピシン投与によりこれらの活性に有意な上昇は認められなかった。リファブチン投与群では、ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50~90%）でミダゾラム 1'-および 4-水酸化活性は対照群に比し有意に上昇したが、デキサメサゾン 6 β -水酸化活性は上昇傾向を示したものの有意な差は認められなかった。ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）ではデキサメサゾン 6 β -水酸化活性、ミダゾラム 1'-および 4-水酸化活性は対照群と有意な差は認められなかった。

以上の結果は、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトにおける CYP3A 誘導能を予測する有用なシステムであることを示唆する。今回の研究ではヒト肝細胞キメラマウスの各処置群での例数が 3~4 例と少なかったため、キメラマウスの例

数を増やして今回の研究結果を確認することは医薬品開発に大きく貢献する情報を提供するものである。

A. 研究目的

CYP3A は全医薬品のうち約 50% の代謝に関与していると報告されている。本酵素の代謝能が活性阻害あるいは酵素誘導により変動することは医薬品の体内動態の変動と連関することとなり、その結果生じる薬物相互作用が臨床で大きな問題となっている。従って、CYP3A 誘導能を創薬の初期段階でチェックして CYP3A 誘導能を有さない医薬品を開発することは、より安全な医薬品の創製に大いに寄与すると考えられる。

リファマイシン系抗生物質は肺結核の治療に使用されている。このうちリファンピシンが汎用されている。本剤はヒト CYP を誘導するが、特にヒト CYP3A に強力な誘導作用を示す。また、高用量ではマウスの CYP も誘導する。リファブチンによりヒト CYP3A は誘導されるが、マウスでは CYP の誘導は認められていない。これらの結果は、ヒト肝キメラマウスにおいてヒト CYP3A の誘導を予測するのに、リファンピシンおよびリファブチンが適切なプローブであることを示している。

本研究では、リファンピシンおよびリファブチンをヒト肝細胞キメラ

マウスに投与して、肝ミクロソームでの CYP3A 酵素活性の変動をデキサメサゾンおよびミダゾラムをモデル基質として検討した。

B. 研究方法

B-1. ヒト肝細胞キメラマウスおよび前処置

今回の報告で使用したヒト肝細胞キメラマウスを Table 1 に示す。ヒト肝臓のドナーは Caucasian (男性、9 ヶ月、Lot. No. 79、In Vitro Technologies 社) であった。

リファンピシンおよびリファブチンは 50mg/kg/day の投与量で 4 日間キメラマウスに腹腔内投与した。対照群には corn oil を投与した。

B-2. 肝ミクロソームの調製

リファンピシンおよびリファブチンを投与したキメラマウスより採取した肝に、肝重量の 3 倍容のホモジナイズ緩衝液を加え、ポリトロンで細切後、テフロンホモジナイザーによりホモジナイズした。ホモジネートを 9,000 g、4℃で 20 分間遠心分離後、上清をさらに 105,000 g、4℃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℃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、使用まで - 80℃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、常法に従って実施した。

Table 1. Chimeric mice used in this induction study

Animal	Animal number	Gender	Age (weeks old)	hAlb ¹⁾ (mg/ml)	Replacement index (%)	Treatment
Chimera	C1	Male	15	3.1	50	None
Chimera	C2	Male	13	9.3	70	None
Chimera	C3	Male	14	13.7	90	None
Chimera	C4	Male	12	3.2	50	Rifabutin
Chimera	C5	Male	12	6.5	70	Rifabutin
Chimera	C6	Male	12	9.7	70	Rifabutin
Chimera	C7	Male	12	17.2	90	Rifabutin
Chimera	C8	Male	13	5.7	60	Rifampicin
Chimera	C9	Male	13	4.2	60	Rifampicin
Chimera	C10	Male	12	11.4	80	Rifampicin
Chimera	C11	Male	12	15.5	80	Rifampicin
Chimera	C12	Male	11	0.0	0	None
Chimera	C13	Male	13	0.0	0	None
Chimera	C14	Male	13	0.0	0	None
Chimera	C15	Male	12	0.0	0	Rifabutin
Chimera	C16	Male	11	0.0	0	Rifabutin
Chimera	C17	Male	11	0.0	0	Rifabutin
Chimera	C18	Male	11	0.0	0	Rifampicin
Chimera	C19	Male	13	0.0	0	Rifampicin
Chimera	C20	Male	12	0.0	0	Rifampicin

¹⁾ hAlb : Human albumin concentration

B-3. デキサメサゾン 6β - 水酸化活性の測定

デキサメサゾン 6β - 水酸化活性として、反応生成物である 6β - 水酸化デキサメサゾンを高速液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) により定量した。

反応液の組成 (最終濃度) はリン酸緩衝液 (67 mM, pH 7.4)、デキサメサゾン (5 μM)、β - NADPH (5 mM)、MgCl₂ (10 mM)、およびミクロソーム (0.5 mg/ml) であり、最終容量は 100 μl に調整した。

NADPH を除いた反応液を 10 分間 37℃ でプレインキュベーションし、NADPH 10 μl 添加して反応を開始した。反応 30 分後に 50% アセトニトリル溶液 (LC/MS に内部標準物質を含む) 200 μl を加えて反応を停止した。混合液を超音波処理後に 2000 rpm、30 分遠心して得られた上清を LC/MS で定量した。LC/MS の測定条件を Table 2 に示す。

B-4. ミダゾラム 1' - および 4 - 水酸化活性の測定

ミダゾラム 1'- および 4 - 水酸化活性として、反応生成物である 1'- 水酸化ミダゾラムおよび 4 - 水酸化ミダゾラムを LC/MS により定量した。

反応液の組成（最終濃度）はリン酸緩衝液（100 mM、pH 7.4）、ミダゾラム（50 μ M）、 β - NADPH（5 mM）、MgCl₂（3.3 mM）、およびミクロソーム（0.03 mg/ml）であり、最終容量は 200 μ l に調製した。

NADPH を除いた反応液を 5 分間 37°C でプレインキュベーションし、NADPH 50 μ l 添加して反応を開始した。反応 5 分後に 75% アセトニトリル溶液（LC/MS に内部標準物質を含む）200 μ l を加えて反応を停止した。混合液を 2000 rpm、15 分遠心して得られた上清を LC/MS で定量した。LC/MS の測定条件を Table 2 に示す。

Table 2. Assay conditions in LC/MS

Analyte	6 β -Hydroxydexamethasone	1'- and 4-Hydroxymidazolam
Mass spectrometer	API-3000	API-4000
LC and injector	Agilent LC1100 + CTC-PAL	Agilent LC1100 + CTC-PAL
Injection volume	10 μ l	10 μ l
Flow rate	300 μ l/min	600 μ l/min
Column oven	40°C	40°C
Column	Luna 3 μ m C18(2), 50 x 2.0 mm	YMC ODS L-80, 35 x 2.0 mm
Mobile phase	A 10% AcCN containing 10mM AcNH ₄ (pH 3.5)	5% AcCN/95% 20mM CH ₃ COOH (adjusted to pH 4.0 with NH ₄ solution)
	B 80% AcCN containing 10mM AcNH ₄ (pH 3.5)	95% AcCN/5% 20mM CH ₃ COOH (adjusted to pH 4.0 with NH ₄ solution)
Gradient condition	Time 0min, A 100%; Time 0.5min, A 100%; Time 1min, A 80%, Time 3min, A 80%; Time 3.5min, A 20%; Time 4min, A 20%; Time 4.2min, A 100%; and Time 9min, A 100%.	Time 0min, A 80%; Time 3min, A 40%; Time 4min, A 40%; Time 4.5min, A 80%; and Time 5.5min, A 80%.
Internal standard	Alprazolam	Tolbutamide

B-5. 病理組織検査

ヒト肝細胞置換率 < 1% ~ 95% までのキメラマウス 36 例、uPA+/- SCID マウス 5 例、および uPA-/- SCID マウス 9 例を用いた。マウスの肝臓および主要臓器について、病理組織学的検査を行った。肝臓については、未固定凍結切片を作製し、

CK8/18 および hAlb の発現を免疫組織化学的に調べた。

C. 研究結果

C-1. デキサメサゾン 6 β - 水酸化活性

今回検討したデキサメサゾン 6 β - 水酸化活性の実験結果を Table 3 に

示す。

プールしたヒト肝マイクロソームによるデキサメサゾン 6β - 水酸化活性はヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50~90%、対照群）あるいは ddY マウスの約 4 倍であった。ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）では本活性はほとんど検出されなかった。

リファンピシンを投与すると、デキサメサゾン 6β - 水酸化活性は、ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50~90%）では対照群に比し約 4 倍に上昇し有意な差が認められたが、ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）で有意な上昇は認められなかった。

リファブチンを投与すると、デキサメサゾン 6β - 水酸化活性は、ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50~90%）では対照群に比し増加する傾向を示したものの有意な差は認められなかった。

Table 3. Metabolism of dexamethasone (6β-hydroxydexamethasone formation)

Group	Treatment	Animal number	hAlb ¹⁾	RI ²⁾		Enzyme activity ³⁾	
				Individual	Mean	Individual	Mean ⁴⁾
Chimera mice	Corn oil	C1	3.1	50	70	0.927	1.84 ± 0.81 ^{a)}
		C2	9.3	70		2.49	
		C3	13.7	90		2.09	
	Rifabutin	C4	3.2	50	70	2.90	3.64 ± 0.67 ^{b)}
		C5	6.5	70		3.71	
		C6	9.7	70		3.46	
		C7	17.2	90		4.50	
	Rifampicin	C8	5.7	60	70	9.10	9.63 ± 2.75 ^{a,b)}
		C9	4.2	60		7.70	
		C10	11.4	80		13.7	
		C11	15.5	80		8.07	
Chimera mice	Corn oil	C12	0.0	0	0	n.d.	—
		C13	0.0	0		0.777	
		C14	0.0	0		n.d.	
	Rifabutin	C15	0.0	0	0	n.d.	—
		C16	0.0	0		n.d.	
		C17	0.0	0		n.d.	
	Rifampicin	C18	0.0	0	0	n.d.	—
		C19	0.0	0		2.50	
		C20	0.0	0		2.09	
	ddY mice	None	—	—	—	—	2.51
Human	None	—	—	—	—	10.6	

- a) Significantly different between Corn oil and Rifampicin treatment group ($p < 0.01$).
b) Significantly different between Rifabutin and Rifampicin treatment group ($p < 0.01$).
1) hAlb : Human albumin concentration (mg/ml)
2) RI : Replacement index (%)
3) Enzyme activity : 6β-Hydroxydexamethasone formation (pmol/mg/min)
4) The values represent mean or mean ± S.D.

C-2. ミダゾラム 1' - および 4 - 水酸化活性

今回検討したミダゾラム 1' - および 4 - 水酸化活性の実験結果を Table 4 に示す。

プールしたヒト肝ミクロソームによるミダゾラム 1' - および 4 - 水酸化活性は ddY マウスとほぼ同等であったが、ヒトでは 1' - 水酸化活性が高く、ddY マウスではその逆で 4 - 水酸化活性が高かった。ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50～90%）およびヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）での本活性はプール肝ミクロソームあるいは ddY マウスに比べて低かったが、1' - 水酸化活性より 4 - 水酸化活性が高く、ddY マウスと同等であった。

リファンピシン投与により、ミダゾラム 1' - および 4 - 水酸化活性はヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50～90%）では対照群に比し有意に増加していたが、ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）で対照群に比し上昇する傾向を示したもののバラツキが大きく有意な差は認められなかった。また、1' - 水酸化活性と 4 - 水酸化活性の比率はリファンピシン処置で変わらなかった。

リファブチンを投与すると、ヒト肝で置換されたキメラマウス（置換率 50～90%）では対照群に比し有意に上昇していたが、増加の度合いはリファンピシンの約半分であった。ヒト肝で置換されていないキメラマウス（置換率 0%）ではミダゾラム 1' - および 4 - 水酸化活性は対照群と有意な差は認められなかった。

Table 4. Metabolism of midazolam (1'- and 4-hydroxymidazolam formation)

Group	Treatment	Animal number	hAlb ¹⁾	RI ²⁾		Enzyme activity ³⁾			
				Indiv.	Mean	1'-OH		4-OH	
						Indiv	Mean ⁴⁾	Indiv.	Mean
Chimera mice	Corn oil	C1	3.1	50	70	126	159 ±	228	261 ±
		C2	9.3	70		185	30.2	287	30.3 ^{a,c)}
		C3	13.7	90		165	^{a,c)}	268	
	Rifabutin	C4	3.2	50	70	259	330 ±	359	428 ±
		C5	6.5	70		357	49.1 ^{b,c)}	451	49.4 ^{b,c)}
		C6	9.7	70		336		429	
		C7	17.2	90		368		473	
	Rifampicin	C8	5.7	60	70	793	794 ±	1010	972 ±
		C9	4.2	60		720	142 ^{a,b,c)}	913	145 ^{a,b,c)}
		C10	11.4	80		993		1150	
		C11	15.5	80		671		813	
Chimera mice	Corn oil	C12	0.0	0	0	59.3	79.4 ±	162	192 ±
		C13	0.0	0		148	60.8	289	86.2
		C14	0.0	0		31.2		124	
	Rifabutin	C15	0.0	0	0	55.6	75.3 ±	155	172 ±
		C16	0.0	0		86.0	17.1	178	14.9
		C17	0.0	0		84.3		183	
	Rifampicin	C18	0.0	0	0	38.5	247 ±	123	394 ±
		C19	0.0	0		473	218	687	283
		C20	0.0	0		230		374	
ddY mice	None	—	—	—	—	707	—	950	
Human	None	—	—	—	—	890	—	753	

- a) Significantly different between Corn oil and Rifampicin treatment group ($p < 0.01$).
b) Significantly different between Rifabutin and Rifampicin treatment group ($p < 0.01$).
c) Significantly different between Corn oil and Rifabutin treatment group ($p < 0.05$).
1) hAlb : Human albumin concentration (mg/ml)
2) RI : Replacement index (%)
3) Enzyme activity : 1'- and 4-hydroxymidazolam formation (pmol/mg/min)
4) The values represent mean or mean \pm S.D.

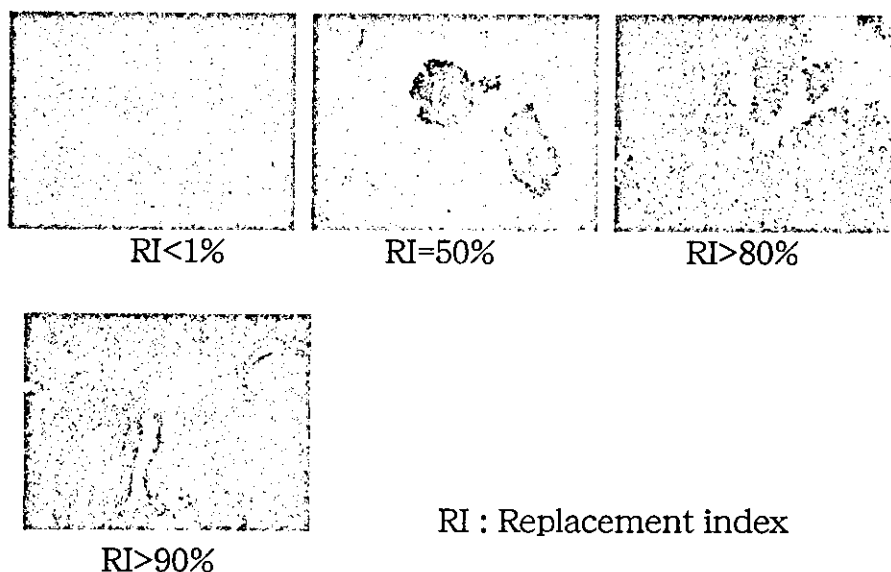
C-3. 病理組織検査

マウス肝臓に生着したヒト肝細胞は、やや大型で淡明な細胞質を有し、結節状ないし敷石状にマウスの肝臓を置換していた。この置換率はヒト血清アルブミン値から予測された置換率とほぼ一致していた。高置換率の肝臓において、ヒト肝細胞領域は正常な肝組織を思わせる血管構築と肝細胞配列を示していた。ヒト肝細胞

は hAlb 陽性、CK8/18 陽性であった。hAb の染色性には個体間、ヒト肝細胞結節間で差が認められ、肝細胞の分化に伴い発現が増強する傾向が認められた。Figure 1 に CK8/18 免疫染色で褐色に陽染されたヒト肝細胞の生着状況を示した。

その他、ヒト肝細胞キメラメウスでは、腎臓糸球体基底膜の肥厚が高率にみられ、胃や十二指腸の潰瘍が

約半数で認められた。これら腎臓や消化管の変化は uPA+/-SCID や uPA-/-SCID では認められなかった。



RI : Replacement index

Figure 1. Immunostaining of human hepatocytes in chimeric mouse liver with CK8/18.

D. 考察

临床上問題となっている医薬品の相互作用に CYP が重要な役割を果たしている。CYP 活性が阻害されると体内からの消失遅延に起因する副作用の発現、CYP が誘導されると消失促進による薬効の消失が相互作用の大きな部分を占めている。このような観点から、CYP 阻害作用や誘導作用を有しない医薬品を開発することは、より安全かつコントロールの容易な医薬品、つまり使いやすい医薬品の創製に重要な項目の一つである。

マウス肝細胞をヒト肝細胞で高度に置換したヒト肝細胞キメラマウス

は、医薬品開発の初期段階においてヒトにおける薬物動態あるいは CYP 誘導能を予測する有用なシステムになるポテンシャルがある。本報告では、ヒトにおいて CYP 誘導能が報告されているリファマイシン系抗生物質であるリファンピシンおよびリファブチンのヒト肝細胞キメラマウスでの CYP 誘導能を CYP3A で代謝される基質を用いて検討した。ヒト肝細胞で置換されたキメラマウスにリファンピシンおよびリファブチンを投与すると、CYP3A で代謝される基質の代謝活性は有意に上昇あるいは有意差はつかないものの増加する傾

向を示した。また、ヒト肝細胞で置換されていないキメラマウスに置いてはこのような現象は観察されなかった。これらの結果はヒト肝細胞で置換されたキメラマウスがヒトにおける CYP3A 誘導能を予測する有用なシステムであることを強く支持する。しかしながら、今回の研究ではヒト肝細胞キメラマウスの各処置群での例数が 3~4 例と少ないこと、あるいは誘導剤を投与されていないキメラマウス肝ミクロソームでの CYP3A 酵素活性がヒト肝ミクロソームと若干異なる性質を示したことより、キメラマウスの例数を増やして今回の結果を確認すること、あるいは未処置キメラマウスの CYP3A 酵素の性質を明らかにすることはヒト肝細胞で置換されたキメラマウスの有用性を実証するのに重要な実験事実を提供する。

ヒト肝細胞キメラマウス研究会では 80% 以上の置換率のマウスを実験に使用することを同意している。このことは、置換率の違いによる実験のバラツキを軽減するとともに、機能的・形態的に、より分化したヒト肝組織を有するマウスを使うことで、健常人の肝臓での薬物代謝や毒作用の予見性を向上させることに繋がると考える。他の研究報告によると、移植されたヒト肝細胞はヒト特有の

薬物代謝機能を発揮していることが示され、キメラマウスは薬物代謝研究では有用なモデルであるとされている。一方、毒性評価モデルとしては動物が脆弱であることから長期投与試験には向かないことや、消化器障害から経口投与試験では注意が必要という点で、課題が残っている。今回、キメラマウスでみられた腎臓糸球体変化は移植したヒト肝細胞由来の異種たん白に起因する免疫原性の変化、胃腸障害は免疫抑制剤の反復投与に伴うストレス性変化と考えられ、引き続き、これらの随伴病変を軽減させるための動物維持方法の改善が望まれる。

E. 結論

本報告において、ヒト肝細胞で置換されたキメラマウスにリファマイシン系抗生物質であるリファンピシンおよびリファブチンを投与すると CYP3A で代謝される基質の代謝活性が誘導された。この現象は、これまでの報告と一致しており、ヒト肝細胞で置換されたキメラマウスがヒトにおける CYP3A 誘導を予測するのに適したシステムを示唆している。

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：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得：なし
- 実案新案登録：なし
- 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を用いた酵素誘導能に関する検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部

協力研究者 柿木 基治、谷口 朋義 エーザイ株式会社

研究要旨

医薬品開発におけるヒトの酵素誘導を予測するツールとしては、ヒト肝細胞の利用がある。しかしながら、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* の評価系では、実際の臨床 (*in vivo*) における薬物相互作用を精度よく予測するためには限界がある。マウス肝の 80%以上をヒト肝細胞に置換することが可能であるヒト肝細胞キメラマウスは、ヒトにおける酵素誘導を予測する有用なシステムになり得るものと想定された。本マウスがヒトにおける酵素誘導を予測する手段として有用であるか見極めるための基礎研究を行い、ヒトを予測する新評価系モデルになり得るのか否かを検証し、医薬品開発に役立てたい。

非ステロイド系の消炎薬を目的にエーザイ株式会社で開発された 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 が低下すると共に肝 CYP3A4 のマーカーである尿中 6 β -hydroxycortisol 量 (6 β -OHF) の投与量依存的な増加が観察されている。

本研究では、ヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスを用いて、尿中 6 β -OHF 量を測定することにより非侵襲的な CYP3A4 酵素誘導の評価モデルになり得るか否かを調べる。実験は、約 60%以上の RI 値を有す高置換率キメラマウス及び 5%未満の RI 値の低置換率キメラマウスについて、E5110 処置群並びに未処置群における尿中 6 β -OHF、mRNA 発現量を測定した。その結果、①高及び低置換率キメラマウスにおける尿中 6 β -OHF は、検出限界未満であった。このことは、マウス内因性の 6 β -OHF は無視できる。②Cortisol 負荷して、尿中 6 β -OHF 量を測定した結果、低及び高置換率キメラマウスいずれも尿中 6 β -OHF の生成は認められ、その生成量

は低置換率キメラマウスの方が高かった。④高置換率マウスにおける E5110 処置した時の CYP3A4mRNA 発現量は、未処置群と比較して増加した。

以上の結果から、E5110におけるヒトCYP3A4の誘導は、ヒトの臨床試験結果と同様にヒト肝細胞に置換したキメラマウスにおいても認められた。一方、尿中6β-OHF量の変動を指標としたヒトにおける非侵襲的なCYP3A4の酵素誘導の評価系モデルとしては、マウス由来の代謝酵素が、ヒトCYP3A4同様にCortisolから6β-OHFへ代謝することが明らかとなったことから、マウスとヒトの分別が、困難であった。今後、非侵襲的なヒトCYP3A4の酵素誘導を予測するモデルとして本キメラマウスを利用するためには、ヒトCYP3A4選択的な基質の発見、あるいはマウス自体の代謝の影響を排除したヒト肝細胞に高置換されたマウスの利用が必須と考えられた。

A. 研究目的

医薬品開発における酵素誘導は、ヒト肝細胞を用いている。ヒト肝細胞を用いた実験では、化合物における mRNA 量の変動並びに酵素活性については評価可能である。しかしながら、肝細胞の評価では、mRNA 量あるいは酵素活性がどれくらい変動すれば実際のヒトの薬物相互作用が問題となるのかという点においては、予測に限界があり、ヒトを精度良く非臨床の段階で予測できるモデルは現時点でない。この命題に対して本研究では、独自に吉里勝利教授（分担研究者）によって開発されたマウス肝の約 80%以上がヒト肝に置換する『ヒト肝細胞キメラマウス』を用いて、ヒトにおける非侵襲的 CYP3A4 の酵素誘導を評価できる

か否かを目的とする。

非侵襲的な CYP3A4 の酵素誘導の評価は、Cortisol の代謝物である尿中の 6β-OHF 量を測定することにより評価する。また、CYP3A4 の誘導については、real-time PCR を用いて mRNA 量を測定することにより評価する。

B. 研究内容及び研究方法

B-1 研究内容

B-1-1. キメラマウスにおける Cortisol代謝の日間変動

低置換率マウス及び高置換率マウスそれぞれ 4 匹用いて、Cortisol を負荷後 24 時間及び 48 時間までの尿中の 6β-OHF/Free-Cortisol を測定する。さらに 48 時間後に Cortisol の再負荷を行い、負荷後 24 時間までの尿中の 6β-OHF/Free-

Cortisol を測定する。実験 1 は、キメラマウスにおける個別の影響及び尿中 6β-OHF 量並びに Cortisol 量の日内変動を確認する目的で、2 回の繰り返しで実施する。

B-1-2. 非侵襲的 CYP3A4 の酵素誘導試験

E5110 を 5 日間反復投与、投与 5 日目に Cortisol を負荷し、負荷後 24 時間までの 24 時間尿中の 6β-OHF/Free-Cortisol を測定する。

B-1-3. CYP3A4 mRNA 量測定

E5110 最終投与後 24 時間にマウスを剖検し、肝 CYP3A4 mRNA 量測定する。本検討は、実験 2 で用いた高置換率キメラマウス 4 匹を用いて検討する。なお、別途、E5110 未処置の高置換率マウス 4 匹を用いて、肝 CYP3A4 mRNA 量測定

E5110 投与群と比較検討する。

B-2 研究方法

B-2-1. 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ズ・リバー (Yokohama, Japan) より入手した。本研究ではキメラマウスのドナーとして、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 10-15 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) から算出した置換率 (replacement index, RI) を Table 1 に併記した。実験スケジュールを Table 2 に示した。

Table 1 実験に用いたヒト肝細胞キメラマウス

Group	No.	RI	Cortisol treatment	E5110 treatment
A	C60-1	64%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C60-2	71%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C60-3	73%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C61-8	68%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
B	C60-5	0%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C61-4	5%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C61-7	0%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C61-9	0%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
C	C69-1	95%	None	None
	C69-2	86%	None	None
	C69-10	80%	None	None
	C70-4	66%	None	None

RI: Replacement index (%)

Table 2 実験スケジュール

実験日	Cortisol treatment	E5110 treatment	尿採取
1	Group A, Group B	None	Group A, Group B
2	None	None	Group A, Group B
3	Group A, Group B	None	Group A, Group B
4	None	None	Group A, Group B
5	None	None	Group A, Group B
6	Group A, Group B	None	Group A, Group B
7	None	None	Group A, Group B
8	Group A, Group B	None	Group A, Group B
9	None	None	Group A, Group B
10	None	None	Group A, Group B
11	Group A, Group B	None	Group A, Group B
12	None	Group A, Group C	Group A, Group B
13	None	Group A, Group C	Group A, Group B
14	None	Group A, Group C	Group A, Group B
15	None	Group A, Group C	Group A, Group B
16	Group A, Group B	Group A, Group C	Group A, Group B
17	None	None	Group A, Group B

B-2-2. 薬物投与

Cortisol は Fig. 1 に示した各個体 5 mg/kg/day を単回腹腔内投与を 48 時間から 120 時間毎、計 6 回投与した。E5110 は、Fig. 2 に示した Group における各個体につき、5 mg/kg/day を 5 日間腹腔内投与し、最終投与 24 時間後に肝臓を摘出した。

B-2-3. 尿中Cortisol及び6β-hydroxy cortisolの測定

尿試料 100 μL に内部標準 (0.5 μg/mL Dexamethasone) 溶液 10 μL、PBS 400 μL、25% 酢酸アンモニウム水溶液 500 μL および酢酸エチル 7 mL を加え、10 分間振とうした。遠心分離後の上清を採取し、窒素気流下

(40℃) 濃縮乾固した。残渣に 20% メタノール水溶液 100 μL を加えて再溶解し、遠心分離後の上清を LC-MS/MS に 5 μL 注入した。

LC-MS/MS による分析は、LC-10ADvp ポンプ (島津製作所, Kyoto, Japan)、DGU-14A degasser (島津製作所), a CTO-10Avp column oven (島津製作所), an SIL-10ADvp auto injector (島津製作所) and an SCL-10Avp system controller (島津製作所)。

カラムは L-column (2.1 x 150 mm, 化学物質評価研究機構, Tokyo, Japan) を使い、移動相は、A: 0.02% ギ酸/水、B: 0.02% ギ酸/アセトニトリルの以下に示したグラジエントにて分析を行った。

時間 (分)	A%	B%	流速 (mL/min)
0.0	100	0	0.3
10.0	70	30	0.3
15.0	0	100	0.3
20.0	0	100	0.3
20.5	100	0	0.3
24.9	100	0	0.3
25.0	100	0	0.3

カラム温度は40°C、測定時間は25分で行った。

MS/MS method (MRM condition)

Compound	Parent (m/z)	Daughter (m/z)
Cortisol	548	351
6 β -OHF	224	224
IS (Dexamethason)	351	351

B-2-4. 肝からのtotal RNAの調製

Trisol 試薬のマニュアルに従い、以下の方法で肝臓から total RNA を調製した。約 50 mg の肝臓に、Trisol 試薬 1 mL を加えてホモジナイズ後、サンプルチューブに分注し、クロロホルム 0.2 mL を加えて攪拌した。室温で 10 分間放置した後、4°C、10,000 g で 10 分間遠心分離した。上清を別のチューブに採取し、0.5 mL のイソプロパノールを加えて室温にて 10 分間放置した後、4°C、10,000 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。

B-2-5. RT-PCR法によるヒト CYP 3A4 mRNA発現量の定量

B-2-4.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、Oligo dT (50 uM) 2.5 μ L、10x 逆転写反応用緩衝液 5 μ L、10 mM dNTPs 10 μ L、MMLV-逆転写酵素 1.25 μ L、DEPC 処理水を加えて全量を 50 μ L とした。この調製液を 48°C で 60 分間反応させた後、94°C 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 2.5 μ L、10 μ M センスプライマー 0.75 μ L、10 μ M アンチセンスプライマー 0.75 μ L、10x SYBR 緩衝液 2.5 μ L、25 mM MgCl₂ 3 μ L、2.5 mM dNTP 2 μ L、Ampli Taq Polymerase (5U/ μ L) 0.125 μ L に滅菌精製水を加え、全量を 25 μ L とした。いずれの遺伝子について ABI PRISM[®] 7900 HT System (Applied Biosystems, Foster 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 60 秒を 1 サイクル (2) 94°C で 15 秒、56°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 40 サイクル。ヒト CYP3A4 及び β -actin のそれぞれのプライマーヒト

CYP3A4 センスプライマー: (5'-TAGCTGAGGATGAAGAATGG-3'), アンチセンスプライマー: (5'-GTGGATTGTTGAGAGAGTCG-3') ヒト β -アクチン センスプライマー: (5'-TCACCCACACTGTGCCCA TCTACGA-3'), アンチセンスプライマー: (5'-CAGCGGAACCGCTCA TTGCCAATGG-3') を用いた。予備検討の結果より、本章で使用したヒト CYP3A4 及び β -actin プライマーは、マウス Cyp 及び β -actin と交差反応を示さないことを確認した。

C. 研究結果

C-1. キメラマウスにおける Cortisol 代謝の日間変動

Table 3 に 24 時間プールした尿中 Cortisol 及び 6β -OHF の測定結果を示す。実験開始 1 日目、Cortisol 投与前 24 時間までに排泄された尿中 Cortisol 及び 6β -OHF を測定した結果、高置換率及び低置換率キメラマウスいずれも検出限界未満であった。このことから、キメラマウスにおける内因性の Cortisol 及び 6β -OHF は無視できるものと考えられた。

Cortisol を負荷後 24 時間、実験開始 2, 4, 7 及び 9 日目の高置換率マウスの尿中へ排泄された総 6β -OHF 量は、664-1113 ng であった。

低置換率マウスの総 6β -OHF 量は、1163-1483 ng であり、低置換率マウスの方が総 6β -OHF 量が高いことから、Cortisol から 6β -OHF への代謝活性は、高置換率マウスのそれと比較して、高いと考えられた。

C-2. 非侵襲的 CYP3A4 の酵素誘導試験

高置換率マウス及び低置換率キメラマウスそれぞれに E5110 5mg/kg を 4 日間皮下投与した結果、酵素誘導の指標であるそれぞれの 6β -OHF/Cortisol の比は、Table 4 に示すように 0.8 及び 1.2 であり、低置換率マウスの方が E5110 による影響が大きかった。実験 1 及び実験 2 の結果から、マウス自体における Cortisol から 6β -OHF への代謝活性が、ヒトにおける活性より高いことから、Cortisol を基質とした場合の非侵襲的ヒト CYP3A4 の酵素誘導を正確に評価することが困難であった。

C-3. CYP3A4 mRNA 量測定

高置換率マウスを用いたヒト CYP3A4 mRNA 発現量の定量結果を Fig.1 に示す。E5110 投与により、mRNA 発現量は、約 3 倍の増加が認められた。

Table 3 高置換率マウス及び低置換率マウスにおける尿中 Cortisol 及び
6β-OHF 量

投与	実験日	高置換		低置換	
		F Mean ± SEM	6β-OHF Mean ± SEM	F Mean ± SEM	6β-OHF Mean ± SEM
F投与	1日目	NC	NC	NC	NC
	2日目	891 ± 123	1051 ± 116	1318 ± 325	1328 ± 142
F投与	3日目	55 ± 8	57 ± 6	114 ± 14	122 ± 23
	4日目	956 ± 223	859 ± 179	1483 ± 176	1486 ± 195
	5日目	307 ± 171	150 ± 55	235 ± 64	195 ± 32
F投与	6日目	NC	NC	NC	NC
	7日目	1113 ± 265	806 ± 136	1279 ± 202	1203 ± 247
F投与	8日目	26	21	115 ± 17	90 ± 17
	9日目	664 ± 259	580 ± 193	1163 ± 371	873 ± 183
	10日目	50 ± 9	45 ± 19	119 ± 34	81 ± 26
F投与	11日目	NC	NC	NC	NC
	12日目	525 ± 165	510 ± 98	623 ± 83	987 ± 164
E 5110投与	13日目	19 ± 8	15 ± 5	18 ± 7	33 ± 8
E 5110投与	14日目	NC	NC	NC	NC
E 5110投与	15日目	NC	NC	NC	NC
F & E 5110投与	16日目	NC	NC	b	NC
	17日目	566 ± 184	397 ± 99	757 ± 276	177 ± 219

F: Cortisol

NC: not calculated to be BQL (<10 ng/mL in sample)

Table 4 高置換率マウス及び低置換率マウスにおける尿中 6β-OHF/Cortisol
比

投与	実験日	高置換	低置換
		Mean ± SEM	Mean ± SEM
F投与	1日目	NC	NC
	2日目	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2
F投与	3日目	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
	4日目	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2
	5日目	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2
F投与	6日目	NC	NC
	7日目	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
F投与	8日目	0.5	0.8 ± 0.1
	9日目	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2
	10日目	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.2
F投与	11日目	NC	NC
	12日目	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.2
E 5110投与	13日目	0.7 ± 0.2	1.3 ± 0.5
E 5110投与	14日目	0.5	NC
E 5110投与	15日目	NC	NC
F & E 5110投与	16日目	NC	NC
	17日目	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.1

F: Cortisol

NC: not calculated to be BQL (<10 ng/mL in sample) in Cortisol and 6β-hydroxycortisol