

Fig.3 高置換率マウスに E5110 (5mg/kg/day) 処置及び未処置における CYP3A4 発現量の比較 (E5110 処置 (左)、未処置 (右) それぞれ 4 例)

E. 考察

ヒト尿中 6β -OHF の尿中排泄量濃度が、肝 CYP3A 活性と相関することを見出し、CYP3A4 酵素誘導のマーカーになることが報告されている (Ged et al, 1989, Yamamoto et al, 2000)。臨床第 1 相試験でヒトに E5110 投与 (40 mg/man/day, 2 週間反復経口投与) した時の 6β -OHF/Cortisol 比は、プラセボと比較して約 2 倍増加した (Horie et al, 1996)。本研究では、臨床用量の約 10 倍の E5110 5mg/kg 処置において、ヒト肝細胞キメラマウスにおいて尿中 6β -OHF を指標とした非侵襲的な CYP3A4 が観察さ

れば、ヒトの酵素誘導を精度良く予測できるモデルとなるものと考えられた。

キメラマウスに E5110 処置した結果、CYP3A4 の mRNA 発現量は、未処置と比較して約 3 倍増加したことから、臨床で見られた CYP3A4 誘導の裏づけを得た。

一方、非侵襲的な CYP3A4 酵素誘導については、低置換及び高置換キメラマウスそれぞれに 6β -OHF 量は検出されなかったが、負荷した Cortisol に対しては、置換及び高置換キメラマウスいずれも代謝物 6β -OHF の生成が認められ、その生成量は、低置換率マウスの方が高置

換率マウスより多かった。このことは、マウスにおける Cortisol から 6β -OHF への代謝活性がヒトと比較して、高いことが示唆された。その結果、ヒト由来の活性とマウス由来の活性とを分別できず、尿中 6β -OHF の変動では、ヒト CYP3A4 の酵素誘導を正確に見積もることが不可能であった。非侵襲的な CYP3A4 酵素誘導について、キメラマウスを利用して評価するためには、本実験で用いた Cortisol ではなく CYP3A4 選択的に代謝される化合物を用いた検討が不可欠と思われた。また、マウス由来の影響をなるべく排除するためにヒト肝細胞に高置換されたマウスを実験に供すことも重要であると考えられた。

F. 結論

ヒト CYP3A4 の酵素誘導については、ヒト肝細胞キメラマウスにおいても観察された。また、CYP3A4 選択的な基質を利用すればヒト肝細胞をもつキメラマウスにおいても非侵襲的な CYP3A4 酵素誘導の評価が可能であり、医薬品開発に大きく寄与できるものと期待される。

G. 健康危険情報：なし

H. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

I. 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

J. 補足（文中で使用した引用論文を示す）

Horie T, Nakata and Kusube K (1996) Basic strategy for avoiding drug interaction during stage of drug development. The proposal relative to planning of non-clinical and clinical studies how should it be the planning of clinical trials. *Journal of Toxicol Sci* 21: 331-339.

Ged C, Rouillon J.M., Pichrd L, Combalbert J., Bressot N., Bories P., Michel H., Braune P and Maurel P. (1989) The increase in urinary excretion of 6β -hydroxy cortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450 IIIA induction. *Br.J. Clin. Pharmacol.* 28: 373-387.

Yamamoto N, Tamura T, Kamiya Y, Sekine I, Kunitoh H and Saijo N (2000) Correlation between docetaxel clearance and estimated cytochrome P450 activity by urinary metabolite of exogeneous cortisol. *Journal of Clinical Oncology* 18: 2301-2308.

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

ヒト肝細胞を有するキメラマウス由来の初代肝細胞培養系を用いたヒト
CYP1A2 および CYP3A4 の誘導評価

分担研究者 内藤 真策 株式会社大塚製薬工場 栄養研究所 所長補佐

研究要旨

ヒト肝細胞をマウスに移植し、肝臓の大部分がヒト肝細胞で置換されたキメラマウスが開発され、ヒトにおける薬物相互作用を予測するため薬物代謝酵素の誘導作用を評価する試験系に利用できると考えられた。そこで、日本人あるいは白人由来の肝細胞を移植した3例のキメラマウスより得た凍結肝細胞を用い、初代培養系でのヒトCYP1A2およびCYP3A4の誘導作用を評価した。培養実験にはチトクロームP450の典型的な誘導薬として知られている基質を利用し、CYP1A2の誘導には β -naphthoflavone (β -NF)を用い、CYP3A4の誘導にはRifampicin (Rif)を用いた。実験ではDMSOを基質の溶媒とし、対照群を含めて全て0.1% DMSO存在下で検討した。分析はreal-time RT-PCR法で行った。5 μ M β -NFの暴露により、ヒト型のCYP1A2 mRNAは3例のキメラマウス肝細胞において、0.1% DMSOを含む無処置群と比較して3.8倍、6.3倍および3.3倍となり顕著な誘導が確認された($p < 0.01$)。また、50 μ M Rifの暴露により、ヒト型のCYP3A4 mRNAは3例のキメラマウス肝細胞において、0.1% DMSOを含む無処置群と比較して8.4倍($p < 0.001$)、2.2倍($p < 0.01$)および2.3倍($p < 0.05$)となり、こちらも顕著な誘導が確認された($p < 0.01$)。

今回の試験結果より、ヒトの肝細胞を用いた研究と同様に、肝臓の大部分がヒト化したキメラマウスより調製した凍結肝細胞を用いた初代培養系においても、ヒトにおける薬物代謝酵素の誘導能を評価するための手段として利用できることを示した。このin vitro試験法は新薬開発におけるヒト薬物代謝酵素誘導作用の評価において非常に有用な手段になると考えている。

A. 研究目的

臨床における薬物の代謝反応や薬理・毒性反応を考えると、動物実験に加えてヒト試料を用いた研究から重要な臨床予測指標を得ることができると考えられる。特に創薬における安全性研究において薬物相互作用の評価は重要な課題と考えられる。ヒトでの薬物動態における相互作用を予測するためには、代謝酵素の誘導と阻害に対する作用

を把握することが大切である。しかし、一般的な肝薬物代謝酵素であるP450酵素は種差が大きいため実験動物での結果が必ずしもヒトに反映するとはいえない。そこで、ヒト由来試料を用いたin vitro研究が重要となる。薬物代謝酵素に対する薬物の作用に酵素誘導があり、実験動物や培養肝細胞を用いて評価ができる。酵素誘導には種差がみられるが、ヒト培養肝細胞

を使用して、適切な陽性対照を用いた評価は、少なくとも種差が問題とならない。培養肝細胞を用いた酵素誘導の評価は、典型基質の代謝活性に加えて mRNA 発現量の変動を見ることによっても確認できる。薬物代謝酵素タンパクの発現調節は、遺伝子から mRNA への転写活性化も重要であり、介在する受容体が明らかにされつつある。そこで、mRNA レベルの変動は酵素誘導の初発因子として意義があるものと考えている。

薬物の暴露による薬物代謝酵素の誘導作用を検出するために、ヒト肝細胞が利用されるようになった (Bowen et al., 2000, Kostrubsky et al., 1998, Pichard-Garcia et al., 2000, Meunier et al., 2000)。ヒト肝細胞初代培養系において、 β -naphthoflavone (β -NF)は CYP1A1 および CYP1A2 の強力な誘導薬であることが報告されている (Meunier et al., 2000)。一方、ヒト肝細胞初代培養系において、Rifampicin (Rif)は CYP3A4 の強力な誘導薬である (Kostrubsky et al., 1998, Pichard-Garcia et al., 2000)。我々の研究においても、ヒト肝細胞初代培養系に Rif などの典型基質を暴露することにより薬物代謝酵素やトランスポート遺伝子が誘導されることを既に示した (Nishimura et al., 2002)。

ところで、薬物相互作用の研究において薬物代謝酵素の誘導作用の評価に利用できるヒト肝細胞はわずかであり、さらに日本人由来の試料は皆無である。今回、広島県地域結集型共同研究事業(研究統括：広島大学大学院理学研究科 吉里勝利)により、uPA/SCID マウスにヒト肝細胞を移植する方法で、肝臓の大部分がヒトの肝細胞に置換したキメラマウス(ヒト肝臓への置換率は約 80%)が開発された

(Tateno et al., 2004)。多くの研究者がこのキメラマウスから調製したヒト肝細胞を利用し薬物代謝酵素の評価が可能になればヒト肝細胞の需要と供給のバランスは改善されると考えられる。

本報告では、日本人あるいは白人由来の肝細胞を移植したキメラマウスの肝臓から遊離肝細胞を調製しプログラムフリーズの手法で、長期保存ができ輸送可能な凍結肝細胞を得た。これを用いた肝細胞初代培養系における CYP1A2 および CYP3A4 の誘導についての研究を行った。分析は TaqMan プローブ存在下、ABI 社製 PRISM 7700 を用い、real-time RT-PCR 法で行った。

B. 研究方法

B-1. 試薬

β -NF および Rif は和光純薬工業 (Osaka, Japan)より購入した。Rneasy[®] Mini Kit および QIAshredder[™] は QIAGEN (Hilden, Germany)より購入した。酵母 tRNA は Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)より購入した。TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents、TaqMan GAPDH Control Reagents、TaqMan β -Actin Control Reagents は Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)より購入した。

全ての試薬は分析用グレードを使用した。

B-2. ヒト肝細胞キメラマウス

本試験は株式会社大塚製薬工場の倫理委員会の承認を得て実施した。

凍結で保存されていたヒト肝細胞(性別：男性、年齢：12 歳、人種：日本人、あるいは、性別：男性、年齢：13 歳、人種：白人)を用い、uPA/SCID マウスに移植し、肝臓の大部分がヒト

Table 1. Characteristics of chimeric mice and hepatocyte preparations

Mouse No.	1	2	3
Donor	A	B	B
Replacement index (%)	about 80	>80	>80
Sex (mouse)	male	male	female
Viability (%)	60.1±3.8	70.1±1.1	57.8±3.6

A, Japanese, male, 12 years old; B, Caucasian, male 13 years old. Viability was determined by trypan blue dye exclusion. Viability data represent mean±SD of three independent experiments.

肝細胞に置換したキメラマウス(マウス肝臓からヒト肝臓への置換率は約80%)を得た。この手法は Tateno ら(2004)により構築された。キメラマウス肝臓の灌流と遊離肝細胞の調製は、Seglen らの方法(1976)で行った。得られたキメラマウス遊離肝細胞はプログラムフリーザーで凍結し超低温で保存した。輸送においては、液体窒素で平衡化した専用コンテナを用いた。

B-3. 肝細胞の単層培養

凍結肝細胞の単層培養は Nishimura ら(2002)の方法で行った。解凍後の肝細胞に培養液を加えて懸濁し、遠心分離により洗浄して調製したキメラマウス肝細胞の生細胞率(viability)は、トリパンブルー色素排除法によって評価した。その結果、57.8~70.1%の viability を示す肝細胞浮遊液を得て培養実験に使用した(表1)。

常法に従って、肝細胞はヒト上皮細胞成長因子(hEGF)、ゲンタマイシンおよびアンフォテリシン B を含む培養液を用いて、5% CO₂-95% O₂、37°Cの条件下で培養した。

B-4. 培養肝細胞に試験物質の暴露

細胞播種 48 時間後からは、ヒト上皮細胞成長因子(hEGF)、ゲンタマイシンおよびアンフォテリシン B を含まない培養液に交換し、典型的な誘導薬を含む培養液に交換してさらに 24 時間暴露した。β-NF の影響は 1 μM および 5 μM の濃度で、Rif は 10 μM および 50 μM の濃度で検討した。β-NF および Rif は、いずれも DMSO に溶解させ、DMSO の最終濃度は 0.1% とした。mRNA 発現に及ぼす DMSO の影響を評価するため、0.1% DMSO を加えた正常対照群を培養実験に加えた。mRNA 分析に用いるために、所定の処置を行ったキメラマウス培養肝細胞からは Rneasy[®] Mini Kit and QIAshredder[™] を用いて total RNA を抽出した。

B-5. mRNA 分析

オリゴヌクレオチドについて、RT-PCR に用いる CYP1A2 と CYP3A4 用の forward primer および reverse primer と TaqMan probe は、既に報告した配列を採用した(表2) (Nishimura et al., 2002)。プライマーとプローブは QIAGEN(Tokyo, Japan)で合成した。TaqMan probe は 5' 端末に

Table 2. Primers and probes used for RT-PCR analysis.

mRNA	Sequence	Position
CYP1A2 (GenBank accession number AF182274)		
Forward primer	TGTTCAAGCACAGCAAGAAGG	860–880
Reverse primer	TGCTCCAAAGACGTCATTGAC	951–931
Probe	CTAGAGCCAGCGGCAACCTCATCCCA	884–909
CYP3A4 (GenBank accession number AF182273)		
Forward primer	GATTGACTCTCAGAATTCAAAAGAAACTGA	825–854
Reverse primer	GGTGAGTGGCCAGTTCATACATAATG	973–948
Probe	AGGAGAGAACTGCTCGTGGTTTCACAG	946–918

All sequences are shown from the 5' to 3' end.

6-carboxyfluorescein (FAM)、3' 末端に 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) を含み、これらは PCR プライマー間に位置する配列にハイブリダイズするように設計した。

キメラマウス肝細胞から調製した total RNA は 50 µg/mL 酵母 tRNA を用い 4 µg/mL に希釈した。RT-PCR アッセイは forward primer、reverse primer および TaqMan probe と約 20 ng の total RNA を含む、50 µL の TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix 試薬を用いた。増幅および検出は ABI PRISM 7700 Sequence Detector system (Applied Biosystems) を用いた。分析では、48°C 30 分、95°C 10 分の後に、95°C 15 秒と 60°C 1 分を 40 回繰り返した。GAPDH には、200 nM forward primer、200 nM reverse primer と 100 nM TaqMan probe を、β-actin には、200 nM forward primer、200 nM reverse primer と 100 nM TaqMan probe を用い、CYP1A2 および CYP3A4 には、300 nM forward primer、900 nM reverse primer と 200 nM TaqMan probe を用いた。

B-6. 統計解析

データ解析は ABI PRISM sequence detection software により行った。各 mRNA の相対発現量の解析は、既に報告している ΔCt (ターゲットの mRNA 量から GAPDH の mRNA 量を減じて得た値) を用いる方法で計算した。すなわち、β-actin mRNA に相対する目的の mRNA の総量は $2^{-\Delta Ct}$ として表される。データはターゲットの mRNA と β-actin の mRNA の比率として表わされる。さらに、数値は正常対照群に対する % を表している。ヒト肝細胞の培養を含む実験は duplicate で行い、平均値を算出した。さらに、データは 3 例のドナーマウスの mean ± SD として示した。統計解析は有意水準を 5% とした Student's *t*-test で行った。

C. 研究結果

C-1. ヒト肝細胞キメラマウスから凍結肝細胞の調製と実験への適用

凍結で供給された日本人 (donor A) あるいは白人 (donor B) の肝細胞 (表 1)

を移植することにより、肝臓の大部分がヒト化したキメラマウスを作成した。両ドナーを移植し、ヒト肝細胞が生着して置換が確認されたキメラマウスの肝臓を用いて凍結肝細胞を調製し、これを解凍することによりヒト凍結肝細胞初代培養系におけるCYP1A2およびCYP3A4の誘導作用を評価した。測定はTaqManプローブ存在下、ABI製PRISM 7700を用いたりアルタイム RT-PCR法で行った。

C-2. ヒト型 mRNA 分析法の特異性の確認

ヒト型の β -actin、GAPDH、CYP1A2あるいはCYP3A4 mRNA に対するプライマーセットとプローブを用いたRT-PCRで、ヒトとマウスの肝臓のtotal RNA に対する特異性を調べたところ、ヒトの肝臓のtotal RNA に対するマウスの肝臓のtotal RNA での交差

性は human β -actin、GAPDH、CYP1A2 および CYP3A4 とともに 0.000002 未満であった。

C-3. ハウスキーピング遺伝子発現の経時変化に関する評価

マウス No.1 におけるハウスキーピング遺伝子である GAPDH と β -actin の比は、培養開始時(0h)および培養開始3時間後にそれぞれ、 12.0 ± 0.5 および 2.46 ± 0.49 であり、24時間後に初期値の約10%に低下し、その後は一定値を示した(図1)。マウス No.2 と3においても同様の傾向がみられた。

C-4. CYP1A2 および CYP3A4 遺伝子発現の経時変化に関する評価

マウス No.1、2 および 3 において、CYP1A2 mRNA と β -actin mRNA の比は培養24時間でそれぞれ培養開始時の $0.474 \pm 0.041\%$ 、 0.362% および

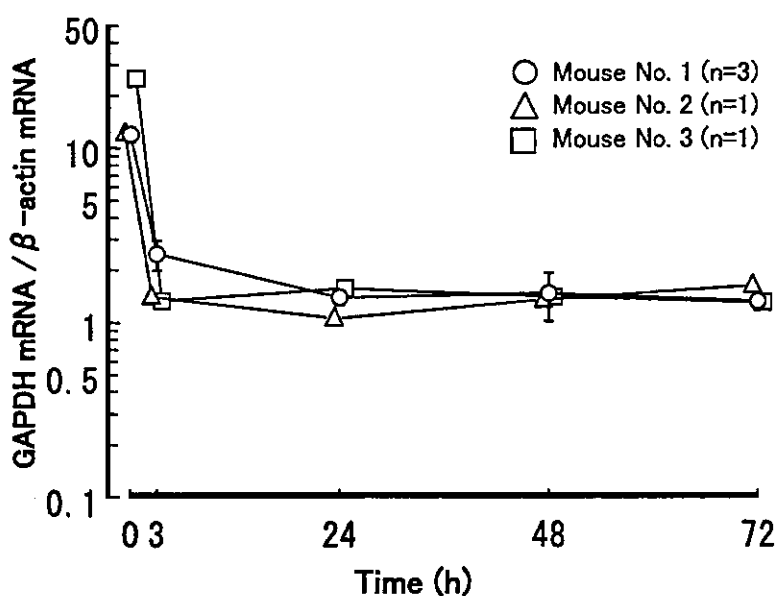


Figure 1. Changes of human GAPDH mRNA expression in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver.

Data are expressed as the ratio of human GAPDH mRNA to human β -actin mRNA. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments in mouse No. 1 and individual values in mice No. 2 and 3.

0.910%に低下し、その後は一定であった(図 2A)。培養 72 時間後の No.1、2 および 3 のキメラマウスの CYP1A2 mRNA レベル (それぞれ CYP1A2 mRNA / β -actin mRNA 比: 0.0736 ± 0.0082 , 0.0515 および 0.104) (図 2A)は凍結ヒト肝細胞の結果の 2 から 5 倍の高値(0.0204 ± 0.0166) (Nishimura et al., 2003a)であった。マウス No.1、2 およ

び 3 において、CYP3A4 mRNA と β -actin mRNA の比は培養 48 時間でそれぞれ培養開始時の $0.0346 \pm 0.0073\%$ 、 0.113% および 0.0402% に低下し、その後培養開始 72 時間後まで一定で推移した(図 2B)。培養 72 時間後の No.1、2 および 3 のキメラマウスの CYP3A4 mRNA レベル(それぞれ CYP3A4 mRNA / β -actin mRNA 比: $0.0101 \pm$

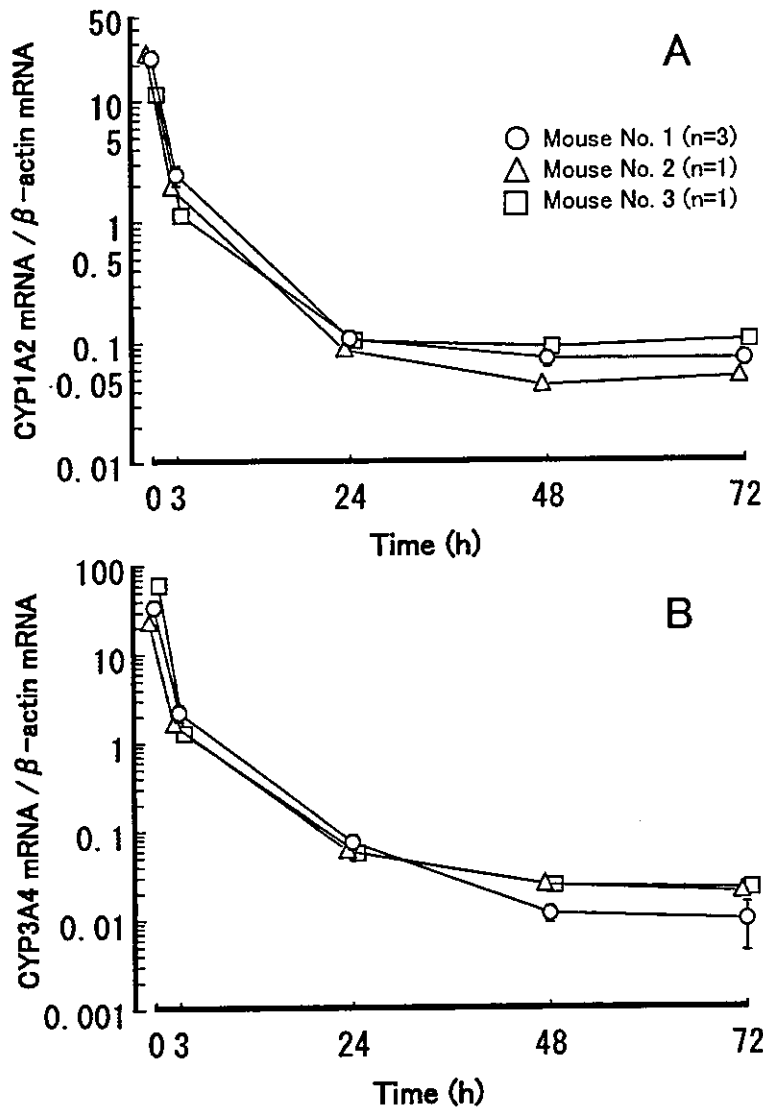


Figure 2. Changes of human (A) CYP1A2 and (B) CYP3A4 mRNA expression in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver.

Data are expressed as the ratio of human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA to human β -actin mRNA. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments in mouse No. 1 and individual values in mice No. 2 and 3.

0.0056、0.0205 および 0.0226) (図 2A) は凍結ヒト肝細胞の結果の3から6倍高値(0.00373 ± 0.0026) (Nishimura et al., 2003a)であった。

C-5. 典型基質を用いた CYP1A2 と CYP3A4 の誘導作用についての評価

ヒト型の CYP1A2 mRNA は $5 \mu\text{M}$ の $\beta\text{-NF}$ 暴露により、マウス No.1、2 および 3 のキメラマウス肝細胞においてそれぞれ 0.1% DMSO を含む正常対照群と比較して 3.8 倍、6.3 倍および 3.3 倍と顕著な誘導が確認された ($p < 0.01$) (図 3)。ヒト型の CYP3A4 mRNA は $10 \mu\text{M}$ の Rif 暴露により、マウス No.1、2 および 3 のキメラマウス肝細胞においてそれぞれ 0.1% DMSO を含む正常対照群と比較して 1.9 倍、2.0 倍 ($p < 0.05$) および 2.8 倍 ($p < 0.05$) と誘導が確認された。さらに、ヒト型の CYP3A4 mRNA は $50 \mu\text{M}$ の Rif 暴露により、マウス No.1、2 および 3 のキメラマウス

肝細胞においてそれぞれ 0.1% DMSO を含む正常対照群と比較して 8.4 倍 ($p < 0.001$)、2.2 倍 ($p < 0.01$) および 2.3 倍 ($p < 0.05$) と顕著な誘導が確認された ($p < 0.01$) (図 4)。

D. 考察

ヒトとマウスの mRNA 配列におけるホモロジーは高く、mRNA 分析では交差性が問題となる。ヒトの mRNA をターゲットとして確立した分析系でもマウスの同種 mRNA との交差性が否定できない。本研究では試料にヒトとマウス由来の細胞が混在しているため、ヒト mRNA 分析法がヒト特異的であることを確認し、得られた結果がヒト肝細胞に特有の反応であることを明らかとした。我々の分析法は、ヒト型 $\beta\text{-actin}$ 、GAPDH、CYP1A2 あるいは CYP3A4 mRNA について、マウス肝臓の total RNA で調べた交差性は非常に小さく、ヒト mRNA をターゲッ

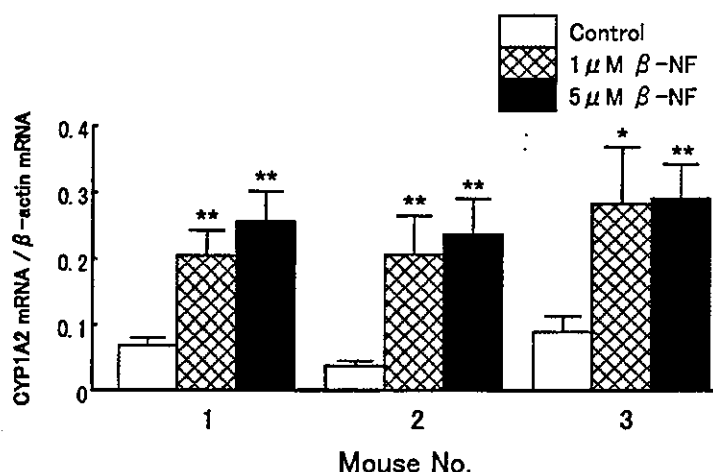


Figure 3. Effect of $\beta\text{-NF}$ exposure on the expression of human CYP1A2 mRNA in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver.

$\beta\text{-NF}$ (1 and $5 \mu\text{M}$) were exposed for 24 hrs. Data are expressed as the ratio of human CYP1A2 mRNA to human $\beta\text{-actin}$ mRNA. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. the 0.1% DMSO control sample.

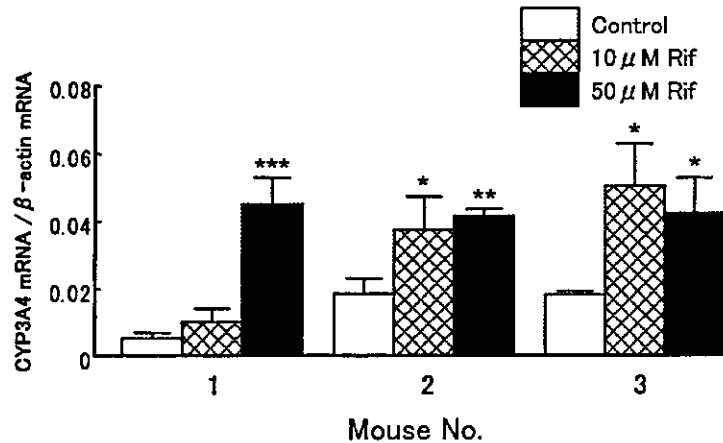


Figure 4. Effect of Rif exposure on the expression of human CYP3A4 mRNA in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver.

Rif (10 and 50 μM) were exposed for 24 hrs. Data are expressed as the ratio of human CYP3A4 mRNA to human β-actin mRNA. Data represent the mean±SD of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. the 0.1% DMSO control sample.

トとしている特異性の面で満足すべき結果であった。すなわち、本研究で示した結果は、ヒト肝細胞固有の反応のみを捕らえていると言える。さらに、ヒトの total RNA 中での CYP1A1 と CYP1A2 mRNA 間での交差性が無いことについては Furukawa ら(2004)によって、また CYP3A4 と CYP3A5 の交差性がないことについては、我々の研究(Nishimura et al., 2004)によって既に報告している。これらの結果から、本研究に用いたプライマーセットとプローブの特異性は十分であることが確認できた。

培養開始後にハウスキーピング遺伝子である GAPDH と β-actin の比が低下した後に一定値を示す変動は、既に我々が報告している凍結ヒト肝細胞の培養結果と近似している(Nishimura et al., 2003a)。この結果から、GAPDH と β-actin の比が一定となった培養 48 時間後からは、細胞の状態が安定して酵素誘導能評価に適用可能と考えら

れた。なお、GAPDH と β-actin の比は、培養細胞への暴露実験に用いた全ての試験物質の結果においても一定であった。

さらに、CYP3A4 mRNA 発現も経時的に変化し、β-actin mRNA の比で見ると、培養 48 時間には大きく低下し、その後は同程度に推移していた。我々の研究では、既に CYP3A4 mRNA と β-actin mRNA の比は培養 72 時間後で 0.13%に低下することを報告している(Nishimura et al., 2003a)。また、Bowen ら(2000)はヒト肝細胞を用いて、CYP3A4 mRNA の初期発現量と培養 5 日後の発現量を比較し、CYP3A4 mRNA は培養 5 日後では初期値に対して 1%に低下することを報告している。また、CYP1A2 や CYP3A4 の発現レベルについて、ドナー間で違いがみられるが、Bowen ら(2000)と Royman ら(2004)も数倍かそれ以上の違いがあることを報告している。従って、我々は培養系におけるキメラマウス由来の

凍結肝細胞とヒト肝細胞の mRNA 発現レベルは同程度と考えている。

培養細胞を暴露させる薬物の溶媒として用いた DMSO の影響に関して、我々は、既に DMSO 存在下でのヒト凍結肝細胞初代培養系における CYP1A2 および CYP3A4 mRNA の発現に及ぼす影響について検討しており、薬物暴露による誘導試験には DMSO 濃度が 0.1% もしくはそれ以下であれば適切であることを示唆した (Nishimura et al., 2003a)。そのため、今回のキメラマウスの肝臓を用いた肝細胞初代培養系での誘導作用を評価する実験では 0.1% DMSO 存在下で実施した。

初代培養肝細胞を用いた酵素誘導の評価にキメラマウスから得たヒト肝細胞が利用できる可能性については、典型基質を用いた CYP1A2 と CYP3A4 の誘導作用を指標として評価した。β-NF の暴露により観察されたヒト型の CYP1A2 mRNA の誘導は、Garcia ら(2003)の凍結ヒト肝細胞を用いた報告と類似している。また、Rif による CYP3A4 mRNA の発現の上昇は Bowen ら(2000)および Sahi ら(2003)の新鮮なヒト肝細胞での報告や、Roymans ら(2004)や Garcia ら(2003)の凍結ヒト肝細胞での報告と類似している。また、我々の凍結ヒト肝細胞を用いた報告とも類似していた (Nishimura et al., 2002)。

E. 結論

本研究結果より、市販されているヒト肝細胞と同様に、肝臓の大部分がヒト化したキメラマウスの凍結肝細胞初代培養系は、ヒトの薬物代謝酵素の誘導作用を評価するのに有用であることを示している。

キメラマウスの手法を用いること

により、少量のヒト肝臓試料を機能を損なうことなく増殖することが可能になり、本研究のようにキメラマウスで日本人の肝細胞を増殖させることにより日本人試料由来の凍結肝細胞の供給も可能であると考えられる。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

Induction of Human CYP1A2 and CYP3A4 in Primary Culture of Hepatocytes from Chimeric Mice with Humanized Liver ; Drug Metab. Pharmacokinet. Vol.20 No.2 掲載予定

2. 学会発表

ヒト肝細胞を移植したキメラマウスの肝細胞培養系での mRNA でみた酵素誘導；日本薬学会 123 年会、平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎

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. 補足 (文中で使用した引用論文を示す)

Bowen, W. P., Carey, J. E., Miah, A., McMurray, H. F., Munday, P. W., James, R. S., Coleman, R. A. and Brown, A. M.: Measurement of cytochrome P450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Drug Metab. Dispos. 28: 781-788 (2000).

Furukawa, M., Nishimura, M., Ogino, D., Chiba, R., Ikai, I., Ueda, N., Naito, S.,

- Kuribayashi, S., Moustafa, M. A., Uchida, T., Sawada, H., Kamataki, T., Funae, Y. and Fukumoto, M.: Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci.*, **95**: 520–529 (2004).
- Garcia, M., Rager, J., Wang, Q., Strab, R., Hidalgo, I. J., Owen, A. and Li, J.: Cryopreserved human hepatocytes as alternative in vitro model for cytochrome P450 induction studies. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **39**: 283–287 (2003).
- Kostrubsky, V. E., Lewis, L. D., Strom, S. C., Wood, S. G., Schuetz, E. G., Schuetz, J. D., Sinclair, P. R., Wrighton, S. A. and Sinclair, J. F.: Induction of CYP3A by Taxol in primary cultures of human hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **355**: 131–136 (1998).
- Meunier, V., Bourrie, M., Julian, B., Marti, E., Guillou, F., Berger, Y. and Fabre, G.: Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica*, **30**: 589–607 (2000).
- Nishimura, M., Imai, T., Morioka, Y., Kuribayashi, S., Kamataki, T. and Naito, S.: Effects of NO-1886 (Ibrolipim), a lipoprotein lipase-promoting agent, on gene induction of cytochrome P450s, carboxylesterases, and sulfotransferases in primary cultures of human hepatocytes. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**: 422–429 (2004).
- Nishimura, M., Yoshitsugu, H., Naito, S. and Hiraoka, I.: 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 (2002).
- Nishimura, M., Ueda, N. and Naito, S.: Effects of dimethyl sulfoxide on the gene induction of cytochrome P450 isoforms UGT-dependent glucuronosyl transferase isoforms, and ABCB1 in primary culture of human hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**: 1052–1056 (2003a).
- Nishimura, M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito, S. and Satoh, T.: Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, **123**: 369–375 (2003b).
- Pichard-Garcia, L., Hyland, R., Baulieu, J., Fabre, J., Milton, A. and Maurel, P.: Human hepatocytes in primary culture predict lack of cytochrome P-450 3A4 induction by eletriptin in vivo. *Drug Metab. Dispos.*, **28**: 51–57 (2000).
- Roymans, D., Van Looveren, C., Leone, A., Parker, J. B., McMillian, M., Johnson, M. D., Koganti, A., Gilissen, R., Silber, P., Mannens, G. and Meuldermans, W.: Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **67**: 427–437 (2004).
- Sahi, J., Black, C. B., Hamilton, G. A., Zheng, X., Jolley, S., Rose, K. A., Gilbert, D., LeCluyse, E. L. and Sinz, M. W.: Comparative effects of thiazolidinediones on in vitro P450 enzyme induction and inhibition. *Drug Metab. Dispos.*, **31**: 439–446 (2003).
- Seglen, P.O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**: 29–83 (1976).

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

ヒト肝細胞を移植したキメラマウスにおける
薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現解析

分担研究者 内藤 真策 株式会社大塚製薬工場 栄養研究所 所長補佐

研究要旨

ゲノム情報を基盤とした創薬科学は、新薬開発のいろいろな場面で有効利用されるようになってきた。ファーマコゲノミクス(PG)から得られる情報群は大きく分けて2つのカテゴリーがあり、DNAの解析によるSNPs情報とmRNA発現量の情報になる。具体的には代謝酵素やトランスポーターの遺伝子多型の研究、SNPsで層別した臨床試験などがある。一方、mRNA発現と関連した開発研究も盛んで、DNAチップ(薬効・毒性マーカーなど)、トランスジェニック動物やヒト遺伝子発現細胞の利用、mRNA発現でみた酵素誘導の研究などがある。また、DNAからmRNAの発現には各種の制御機構が知られており、タンパク質の発現と活性にも影響を与える。薬理活性や毒性発現においても関連する酵素タンパクの発現を制御するmRNA発現量は注目されている。

我々は、ヒト肝細胞を移植して肝臓の大部分がヒト化したキメラマウスを用い、ヒト薬物代謝酵素およびトランスポーターのmRNA発現について検討した。mRNA発現量はリアルタイムRT-PCR法で測定した。その結果、キメラマウス肝臓試料より20種類のヒトP450分子種mRNAを含む52種類のヒト第1相薬物代謝酵素mRNAの発現を確認した。また、ヒト第2相薬物代謝酵素mRNAは26種類の発現を確認し、ヒト・トランスポーターmRNAは21種類の発現が確認できた。薬物代謝酵素に加えて、アルブミンのような内因性物質の合成と分泌などの肝臓機能を維持するためには、mRNAの発現を含む細胞内の生理的な活動は極めて重要と考えられる。キメラマウス肝臓の薬物動態機能を測る指標として、薬物代謝酵素やトランスポーターのmRNAに関し、ドナーの肝臓に対してキメラマウス肝臓での発現比率の頻度を見ると、中心値が0.46であった。一方、キメラマウス肝臓におけるマウスのCyp酵素mRNAの発現比率は、正常対照群のマウス肝臓での結果に対して、Cyp2b10の結果を除くと平均で0.19であった。ヒトmRNAあるいはマウスmRNAの発現率の結果は、ヒトアルブミン遺伝子の発現率、あるいはキメラマウスにおける血中ヒトアルブミン濃度から推定したマウス肝臓からヒト肝臓への置換率と良く相関していた。

このようにヒト化した肝臓を有するキメラマウスは、薬物代謝酵素やトランスポーターの阻害と誘導に起因するような薬物相互作用の評価について非常に有用な研究方法になると考えられた。

A. 研究目的

臨床現場で見られる薬物相互作用は、ある薬物が他の薬物の代謝を変化させることによって生じる場合が多い。この薬物動態的な相互作用は、一般的に薬物の消失で律速となる過程に関与する代謝酵素の阻害あるいは誘導に起因していると考えられる。薬物代謝酵素の誘導は薬物の代謝と動態に大きな影響を与え、臨床症状としての薬物相互作用を生じさせることが報告されている(Waxman, 1999)。

新薬候補化合物はヒトにおける代謝について前臨床試験の中でさまざまな手法により検討されている。ヒト肝ミクロソームやヒト CYP 発現系から調製されたミクロソーム、ヒト肝細胞、cDNA を発現させた培養細胞系などを用いた *in vitro* 研究が報告されている。しかし、これらの *in vitro* 試験系には幾つかの利点と限界がある(Gomez-Lechon et al., 2003; Rodrigues and Rushmore, 2002)。ヒト肝ミクロソームは市販品を入手でき、CYP 酵素の代謝活性を損なうことなく凍結保存して代謝実験に利用できるが、誘導実験に用いることはできない。一方、ヒト肝細胞は全ての薬物代謝酵素を保持しているものの培養により酵素活性は減少する。また、ヒト由来試料はいずれも供給が限られている。一方、実験動物を用いた *in vivo* 研究は生体での薬物動態を明らかにできるが、ヒトと動物の CYP 酵素にはしばしば種差が存在していることも確かである。

人工肝臓の開発も試みられており、不死化したヒト肝細胞を用いた報告がある(Watanabe et al., 2003)。このモデルでは、CYP3A4 と CYP2C9 タンパクの発現が確認されているものの酵素活性は明確ではない。近年において、ヒト肝細胞を用いた初代培養系で酵

素誘導に関する報告が多くみられるようになった(Bowen et al., 2000; Lindley et al., 2002; Hesse et al., 2003; Roymans et al., 2004; Garcia et al., 2003)。Baliharováらは継代培養が可能なヒト肝細胞である HepG2 を用いて CYP1A の誘導を評価している(Baliharová et al., 2003)。Walleらは HepG2 を用いて UDP-グルクロニルトランスフェラーゼの誘導を評価している(Walle et al., 2000)。HepG2 は比較的扱いやすい培養細胞系でありヒトの機能を再現することが可能である。しかし、HepG2 における薬物代謝酵素の発現はヒトの *in vivo* と異なる部分も多く(Wilkening et al., 2003)、臨床で見られる代謝や誘導を予測するためにはあまり適切な試験系ではない。従って、臨床での薬物の代謝や誘導作用を予測するには、やはりヒト肝細胞を用いた研究が有用である。さらに、Liらは短期間の薬物代謝とか薬物による細胞毒性の評価に凍結で供給されたヒト肝細胞を用いた検討が有用と報告している(Li et al., 1999)。

さて、マウスにウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)と組替え型の activation gene-2 を導入し、成人の肝細胞を移植し 15%がヒト型に置換されたモデルに、ヒト B 型肝炎ウイルスを播種できたことが報告されている(Dandri et al., 2001)。Mercerらは、uPA^{+/+}/SCID マウスを用いてヒト肝細胞が生着した肝臓組織像を示し、さらにヒト C 型肝炎ウイルスに感染することを報告している(Mercer et al., 2001)。これらの研究は、肝炎ウイルスに対する新薬の開発や再生医療の進歩に役立つものと思われる。しかしながら、マウス肝臓に対するヒト肝臓の置換率は低く不十分な結果である(Dandri et al., 2001; Mercer et al., 2001)。

そこで、広島県地域結集型共同研究事業(研究統括：広島大学大学院理学研究科 吉里勝利)では、uPA/SCID マウスにヒト肝細胞を移植することにより肝臓の 80%以上がヒト肝細胞に置換されたキメラマウスが作られた(Tateno et al., 2004)。ほぼ完全にヒト肝細胞で置換されたキメラマウスの肝臓を用いた研究はヒトの薬物代謝の予測に利用できると考えられる。

医薬品の開発研究において、mRNA 発現量の解析から薬物による代謝酵素の阻害や誘導作用の評価を考えた場合、組織あるいは細胞試料等から調製した total RNA を出発として、mRNA 発現量を分析するハイスループットで網羅的な分析法には DNA チップがある。一方、個々の mRNA 発現量の検討にはノーザンブロット法がある。まず、RNA 試料から cDNA を調製した後に、目的の mRNA 配列に特異的なプライマーを使用して PCR 反応により増幅し、増幅産物を電気泳動後に検出して測定する。この方法により半定量的に mRNA の増減を観察できる。mRNA 発現解析は、情報の有用性が注目されるのに従って、さらに高感度でハイスループットな種々の mRNA 分析法が考案されてきた。比較的実用化が進んでいる手法には、シグナル増幅の bDNA 法、ターゲット増幅の TaqMan 法と、増幅系を必要としない Invader 法の 3 種類がある。その中で、我々は Applied Biosystems 社により開発された TaqMan Assay を利用した mRNA 分析法を利用した。本法は PCR 法により RNA を増幅する反応を利用している。ただし、PCR 反応産物の定量は難しいため、TaqMan Probe が分解されて生じる蛍光を検出するのが特徴である。TaqMan Probe をはさんでプライマーを設計し、プライマーの伸

張反応で TaqMan Probe が分解されて蛍光を発し、この蛍光が検出されたときの PCR サイクル数から mRNA 量が定量する。細胞などから得た少量の total RNA で分析でき特異性が高いのが特徴である。

本研究ではキメラマウスの肝臓から得た試料を用い、リアルタイム RT-PCR 法でヒト CYP 酵素等の mRNA 発現を検討し、新薬開発の研究における新しい実験法としての可能性を評価した。

B. 研究方法

B-1. 試薬

研究の中で total RNA の抽出に用いた Isogen は Nippon Gene (Tokyo, Japan) より購入した。そして、total RNA の希釈に用いた酵母 tRNA は Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA) より購入した。mRNA の分析には TaqMan One-Step RT-PCR Master mix reagents、TaqMan GAPDH control reagents、TaqMan β -actin Control Reagents、Micro Amp Optical 96-Well reaction Plates、Optical Adhesive Covers および Optical Cover Compression Pads を用い、これらは Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) より購入した。その他の試薬は全て分析用グレードを使用した。

B-2. ヒト化した肝臓を有するキメラマウスの作製

本研究を開始するのに際し、研究計画は広島県地域結集型共同研究事業および株式会社大塚製薬工場の倫理委員会で審査を受け承認されている。キメラマウス作成のためのドナーとなったヒト肝臓(性別：男性、年齢：12 歳、人種：日本人)はインフォームドコンセント得て入手した。

ヒト化した肝臓を有するキメラマウスの作製法は既に立野らが報告している(Tateno et al., 2004)。生後 20~30 日齢の uPA^{+/+}/SCID マウスの腹部左手に小さな側腹切開を行い、脾臓下部にヒト肝細胞を注入する。そして、必要に応じて消炎剤のタンパク分解酵素阻害剤メシル酸ナファモスタットを腹腔内に投与した。キメラマウス血中のヒトアルブミン濃度は酵素免疫測定法(ELISA)で求め、また、解剖時のマウス肝臓切片をヒトサイトケラチン 8/18 抗体で免疫染色した結果より、マウス肝臓からヒト肝臓への置換率を求めた(Tateno et al., 2004)。実験には 11-14 週齢の雄性キメラマウスを用いた(表 1)。なお、本研究に使用した uPA^{+/+}/SCID マウス、uPA^{+/+}/SCID マウスおよび uPA^{-/-}/SCID マウスに関しては、既に立野らが報告している(Tateno et al., 2004)。

B-3. オリゴヌクレオチドの設計

SULT1B1、TPST1、アルブミンおよびトランスフェリン用のプライマーと TaqMan Probe は Primer Express software (Applied Biosystems)を用いて設計した。オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの位置を表 2 に示した。プライマーおよびプローブの一方または両方がターゲット mRNA 転写に特異的であることを確認するために NCBI BLAST でホモロジー検索した。その他のヒト mRNA 測定用のフォワード、リバープライマーおよび TaqMan Probe は、既に報告した配列を用いた(Nishimura et al., 2002, 2003a)。RT-PCR に使用したマウスのターゲット mRNA は Panらが報告した配列を用いた(Pan et al., 2000)。プライマーおよび TaqMan Probe は QIAGEN Japan (Tokyo, Japan)で合成した。TaqMan Probe は 5' 末端に 6-carboxyfluorescein (FAM)、3' 末端に 6-carboxytetramethylrhodamine

Table 1. Chimeric mice used in the present study.

Mouse No.	hAlb ^a	RI ^b
	mg/ml	%
1	10.7	71
2	7.1	84
3	5.1	89
Mean	7.6	81
(SD)	(2.8)	(9)

Data represent individual values and mean ± SD of three mice.

Donor: Japanese, male, 12 years old.

^aHuman albumin concentration in chimeric mouse.

^bReplacement index.

Table 2. Primers and probes used for RT-PCR analysis.

mRNA	Sequence	Position
SULT1B1 (GenBank accession number NM_014465)		
Forward primer	TGGCTCGTAATGCCAAGGA	860–880
Reverse primer	CAGGAACCATAGGCCACTTTT	951–931
Probe	CAGCCTTTTCCTGGTACCTGGGAAGAATATCT	884–909
TPST1 (GenBank accession number NM_003596)		
Forward primer	TTGCTCCTATGCTTGCCAA	950–968
Reverse primer	TTGGGATCAGGTTTTCCGTAG	1022–1002
Probe	TGGATATGACCCATATGCCAACCCACCT	972–999
albumin (GenBank accession number XM_031322)		
Forward primer	CCAGAATGCGCTATTAGTTCGT	1281–1302
Reverse primer	ACATTTGCTGCCACTTTTCC	1383–1363
Probe	CACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCC	1305–1334
transferrin (GenBank accession number XM_002793)		
Forward primer	AGTGTGTATCAGCAGAGACCACC	1157–1179
Reverse primer	TGCCCGCTATGTAGACAAACC	1258–1238
Probe	TGCATCGCCAAGATCATGAATGGA	1186–1209

All sequences are shown from the 5' to 3' end.

(TAMRA)を持ち、PCRプライマー間に位置する配列にハイブリダイズするように設計した。

B-4. Total RNA の調製と TaqMan RT-PCR の条件

ドナーの肝臓組織、キメラマウスおよび uPA⁺/SCID マウス(正常対照群)からの total RNA の抽出は Isogen を用いて実施した。肝の total RNA は 50 µg/mL 酵母 tRNA を用い 4 µg/mL に希釈した。RT-PCR アッセイは 300 nM の forward primer、900 nM の reverse primer および 200 nM の TaqMan Probe と 20

ng の total RNA を含む TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix 試薬を 50 µL 用いた。増幅と検出は ABI PRISM 7700 Sequence Detector system (Applied Biosystems)を用い、48°C 30 分間で 1 cycle、95°C 10 分間で 1 cycle、そして 95°C 15 秒間と 60°C 1 分間を 40 cycle とした。ヒト GAPDH の分析では 200 nM forward primer、200 nM reverse primer および 100 nM TaqMan probe を用いた。ヒト β-actin の分析では 300 nM forward primer、300 nM reverse primer と 200 nM TaqMan probe を用いた。

Table 3. Cross-reactivity in RT-PCR of primer sets and probes for mRNA of human target genes between human and mouse.

Target mRNA	Ratio of uPA ^{-/-} /SCID mouse to human	
	ND	0.000002 to 0.0005
	Number of target gene	
Phase I enzyme		
CYP	18	5
Other enzyme	27	8
Phase II enzyme	22	4
Transporter	21	2
Total	88	19

ND: No cross-reactivity was detected (<0.000002).

B-5. 統計解析

データ解析は ABI PRISM sequence detection software により行った。mRNA の相対的な発現程度は、4 µg/mL キメラマウス肝臓 total RNA を用いて測定したターゲット mRNA の Ct 値から、4 µg/mL のヒトまたはマウス肝臓 total RNA を用いて測定したターゲット mRNA の Ct 値を減じて得られた ΔCt により計算した。すなわち、4 µg/mL のヒトまたはマウス肝臓 total RNA 中のターゲット mRNA に対する 4 µg/mL のキメラマウス肝臓 total RNA 中の標的 mRNA の発現比率は $2^{(\Delta Ct)}$ として表すことができる。データは 3 例の結果から mean \pm SD を求めて示した。

C. 研究結果

C-1. キメラマウスのヒト型置換率

本研究では日本人ドナーの肝細胞を用いて作製された 3 例のキメラマウスを使用した。用いたキメラマウスのヒトアルブミン濃度と、ヒト型への置換率は表 1 に示した。ヒトアルブミン

濃度 7.6 ± 2.8 mg/mL で、置換率は $81 \pm 9\%$ であった。

C-2. mRNA 分析系の特異性

ヒトとマウス肝臓の total RNA を用いて、ヒトとマウスの mRNA 分析に使用したプライマーセットとプローブの RT-PCR の特異性を調べた。ヒトの mRNA 分析に使用したプライマーセットとプローブのデータは、4 µg/mL のヒト肝臓 total RNA 中のターゲット mRNA 量に対する 4 µg/mL マウス肝臓 total RNA におけるターゲット mRNA 量の比として表した。ヒトのターゲット mRNA に関して本研究で使用した 107 組のプライマーセットとプローブのマウスとの交差性は 0.0005 未満であった(表 3)。ヒトの GAPDH、 β -actin、アルブミンあるいはトランスフェリン mRNA の測定に用いたプライマーセットとプローブのマウスとの交差性も 0.0005 未満であった。マウスの mRNA に使用したプライマーセットとプローブは、4 µg/mL のマウス肝臓 total RNA 中のタ

Table 4. Cross-reactivity in RT-PCR of primer sets and probes for mRNA in mouse Cyps between mouse and human.

Target mRNA	Cross-reactivity
Ratio of human to uPA ^{-/-} /SCID mouse	
Cyp1a2	0.0011
Cyp2b10	0.019
Cyp2d9	0.00040
Cyp2e1	0.00031
Cyp3a11	0.0017

ターゲット mRNA 量に対する 4 µg/mL ヒト肝臓 total RNA におけるターゲット mRNA 量の比として表した。各々のマウス Cyp mRNA を測定するためのプライマーセットとプローブのヒトとの交差性は 0.02 未満であった(表 4)。従って、ヒトおよびマウスの RT-PCR における本研究に用いたプライマーセットとプローブの特異性が検証できた。

C-3. キメラマウスにおけるヒト型 mRNA の発現

ヒトハウスキーピング遺伝子について、ヒトのドナー肝臓での mRNA 発現に対するキメラマウス肝臓での mRNA 発現の比を図 1 に示す。GAPDH の比は 0.57 ± 0.08 、 β -actin の比は 0.15 ± 0.05 であった。

図 2 にキメラマウス肝臓におけるヒト第 1 相および第 2 相薬物代謝酵素とトランスポーターの発現プロファイルを示した。ヒトの肝臓を有するキメラマウス肝臓試料を用いて、23 種類の CYP 酵素、35 種類の CYP 以外の第 1 相薬物代謝酵素、26 種類の第 2 相薬物代謝酵素および 23 種類のトランスポーターに関してヒト mRNA 発現を分

析した。本研究において、ヒトの肝臓を有するキメラマウスにヒト型ターゲット mRNA が発現していると判断する限界を発現比率が 0.1 以上と仮定した。この判断基準を適用した結果、キメラマウス肝臓においては 20 種類の CYP 酵素、32 種類の CYP 以外の第 1 相薬物代謝酵素、26 種類の第 2 相薬物代謝酵素および 21 種類のトランスポーターのヒト型 mRNA の発現を確認した。

C-4. キメラマウスにおけるヒト第 1 相薬物代謝酵素の中で CYP 酵素に関する mRNA の発現

CYP1A1、CYP1A2 および CYP1B1 mRNA の発現比率は、それぞれ 0.62 ± 0.35 、 0.58 ± 0.19 および 0.78 ± 0.05 であり、これらの結果はキメラマウスにおけるヒト肝臓への置換率の結果と近似していた。CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7 mRNA の発現比率は、それぞれ 0.23 ± 0.09 、 0.31 ± 0.14 および 0.20 ± 0.11 であった。CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2D6、CYP2E1 および CYP2J2 mRNA の発現比率は 0.25 以上であった。CYP2B6 と YP2C19 mRNA の発現比率は、それぞれ $0.090 \pm$

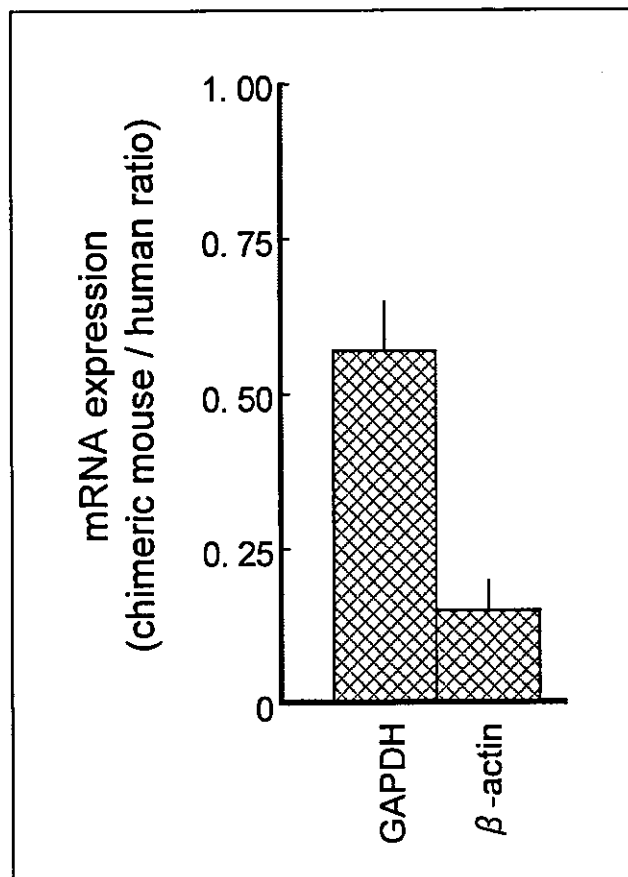


Figure 1 mRNA expression of human housekeeping genes in chimeric mouse liver. Data are expressed as the ratio of target mRNA in the chimera mouse liver to target mRNA in the human liver of the donor. Data represent mean \pm SD of three mice.

0.018 および 0.064 ± 0.055 と低値であった。また、CYP5A1 mRNA 発現比率は 0.0047 ± 0.0007 となり、ヒト肝臓に比べてキメラマウスでの発現はかなり低値であった。この他にキメラマウス肝臓では、CYP4A11、CYP4F2、CYP4F3、CYP7B1、CYP8B1、CYP26A1、CYP27 および CYP46 などの CYP mRNA の発現が確認された。

C-5. キメラマウスにおける CYP 酵素以外のヒト第1相薬物代謝酵素 mRNA の発現

CYP 酵素以外の第1相薬物代謝酵素について、EPHX1 および EPHX2

mRNA の発現比率はそれぞれ 0.85 ± 0.05 および 0.58 ± 0.07 であった。PIG3 および NMOR2 mRNA の発現比率はそれぞれ 0.72 ± 0.24 および 0.66 ± 0.05 であった。MAOA および MAOB mRNA の発現比率はそれぞれ 0.31 ± 0.11 および 0.61 ± 0.12 であった。DPYD、AOX1 および XDH mRNA の発現比率はそれぞれ 0.31 ± 0.07 、 0.49 ± 0.04 および 0.34 ± 0.16 であった。さらに、エステラーゼ (CES1、CES2、AADAC、LIPA、UCHL1、UCHL2 および ESD) の mRNA の発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.13 から 0.89 の割合であった。FMO3 および