

Figure 2 mRNA expression profile of human phase I enzymes, phase II enzymes and transporters 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. Closed circles are mean value of each data.

FMO4 mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.41 \pm 0.06$  および  $0.26 \pm 0.04$  であった。アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH1、ADH2、ADH3、ADH4、ADH5、ADH6、ADH7 および HEP27) の mRNA の発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.20 から 1.5 の割合であった。アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH1、ALDH2、ALDH3、ALDH5、ALDH9 および ALDH10) の mRNA の発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.46 から 2.7 の割合であった。しかし、キメラマウス肝臓中の ALDH6 の mRNA 発現比率はヒト肝臓での発現量の  $0.067 \pm 0.065$  と低値であった。Prostaglandin endoperoxide synthase (PTGA1 および PTGS2) mRNA の発現比率はヒトの肝臓と比較すると 0.0025 またはそれ以下であった。キメラマウス肝臓中におけるメチルトランスフェラーゼ (TPMT、COMT、ASMT、GAMT、PEMT および PNMT) の mRNA の発現はドナーのヒト肝臓と比較して 0.31 から 0.48 の割合であった。NAT1、NAT2 および ARD1 mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.44 \pm 0.36$ 、 $1.1 \pm 0.3$  および  $0.33 \pm 0.05$  であった。

#### C-6. キメラマウスにおけるヒト第 2 相薬物代謝酵素 mRNA の発現

第 2 相薬物代謝酵素について、キメラマウス肝臓におけるグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GSTP1、GSTT1、GSTM3、GSTA2、GSTA4、MGST1、MGST2 および MGST3) の mRNA の発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.12 から 0.93 の割合であった。キメラマウス肝臓におけるスルフトランスフェラーゼ (CST、SULT1B1、SULT2A1、TPST1 および TPST2) の mRNA 発現比率はドナーの

ヒト肝臓と比較して 0.11 から 2.8 の割合であった。キメラマウス肝臓の SULT1B1 mRNA の発現量はヒト肝臓よりも  $2.8 \pm 1.1$  と特異的に高値であった。キメラマウス肝臓における UDP-グルクロン酸抱合酵素 (UGT1A6、UGT1A9、UGT2B10 および UGT2B17) の mRNA 発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.43 から 1.1 の割合であった。

#### C-7. キメラマウスにおけるヒト・トランスporter mRNA の発現

キメラマウス肝臓における ABC トランスporter (ABCA1、ABCA2、ABCA4、ABCA8、ABCB1、ABCB2、ABCB3、ABCB4、ABCB6、ABCB8、ABCB9、ABCB11、ABCC2、ABCC6、ABCC9、ABCD3 および ABCF1) の mRNA 発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.13 から 1.1 の割合であった。しかし、キメラマウス肝臓中の ABCC5 の mRNA 発現量はヒト肝臓における発現量の  $0.084 \pm 0.097$  と低値であった。ABCC1 mRNA の発現は確認されなかった。SLC22A1、SLC22A3、SLC22A5 および OATP2 mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.65 \pm 0.08$ 、 $0.81 \pm 0.29$ 、 $0.73 \pm 0.29$  および  $0.64 \pm 0.22$  であり、これらの発現比率はキメラマウスにおけるヒト肝臓への置換率と近似していた。

#### C-8. キメラマウスにおけるヒト mRNA の発現比率のプロファイル

図 3 はキメラマウスに発現しているヒト薬物代謝酵素とトランスporter の発現プロファイルの頻度をヒストグラムで表している。パネル A には全てのターゲット mRNA の発現比率をまとめ、パネル B は CYP 酵素、パネル C は CYP 酵素以外の第 1 相薬物

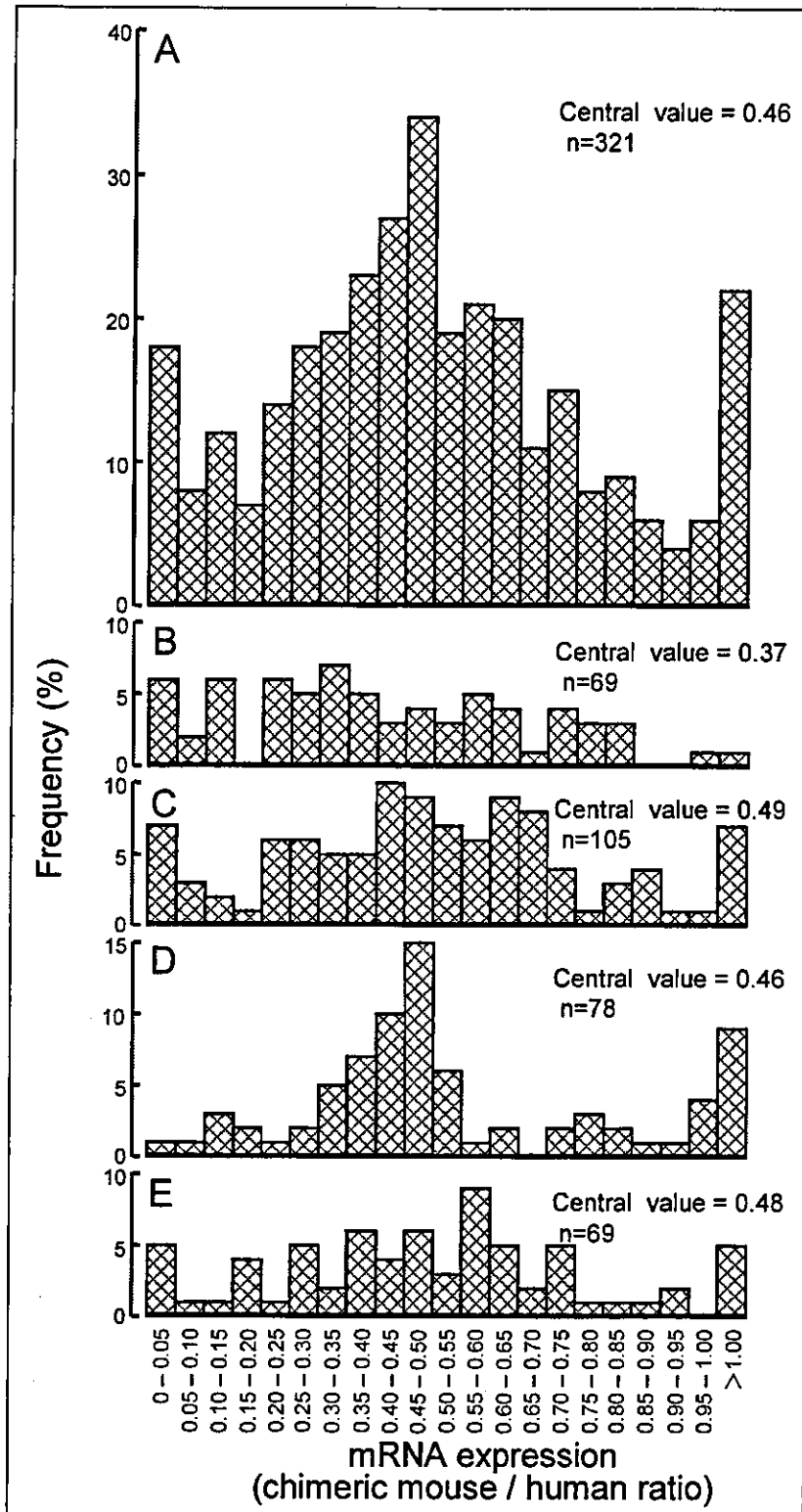


Figure 3 Histogram of the frequency of the mRNA expression ratios of human phase I enzymes, phase II enzymes and transporters in chimeric mouse liver. Data are shown as frequency of ratio of all target mRNA in Figure 2, and as individual values of each target mRNA in the three mice. A: all targets (107 targets); B:CYPs (23 targets); C: phase I enzymes except for CYPs (35 targets); D: phase II enzymes (26 targets); E: transporters (23 targets).

代謝酵素、パネル D は第 2 相薬物代謝酵素、そしてパネル E はトランスポーターの結果をまとめた。パネル A において、発現比率の頻度の中央値は 0.46 で、キメラマウスにおけるマウス肝臓からヒト肝臓への置換率  $81 \pm 9\%$ (表 1) よりも低かった。第 2 相薬物代謝酵素(パネル D)の分散は第 1 相薬物代謝酵素(パネル B、C)やトランスポーター(パネル E)と比較して小さかった。

C-9. キメラマウスにおけるヒトアルブミン等の肝機能評価項目に関する mRNA の発現比率のプロファイル

図 4 はキメラマウス肝臓中のヒトアルブミンおよびトランスフェリン mRNA プロファイルを示している。アルブミンおよびトランスフェリン mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.68 \pm 0.06$  および  $0.64 \pm 0.15$  であり、これらの結果はキメラマウスにおけるマウ

ス肝臓からヒト肝臓への置換率  $81 \pm 9\%$ (表 1)と近似していた。

C-10. キメラマウスにおけるマウス mRNA の発現比率のプロファイル

図 5 はキメラマウス肝臓中のマウス Cyp 酵素 mRNA の発現プロファイルを示した。Cyp1a2、Cyp2d9、Cyp2e1 および Cyp3a11 mRNA の発現比率は 0.19 またはそれ以下であった。キメラマウスにおけるヒト肝臓への置換率は  $81 \pm 9\%$ (表 1)であるが、Cyp2b10 の比は  $1.2 \pm 0.7$  と高値を示した。

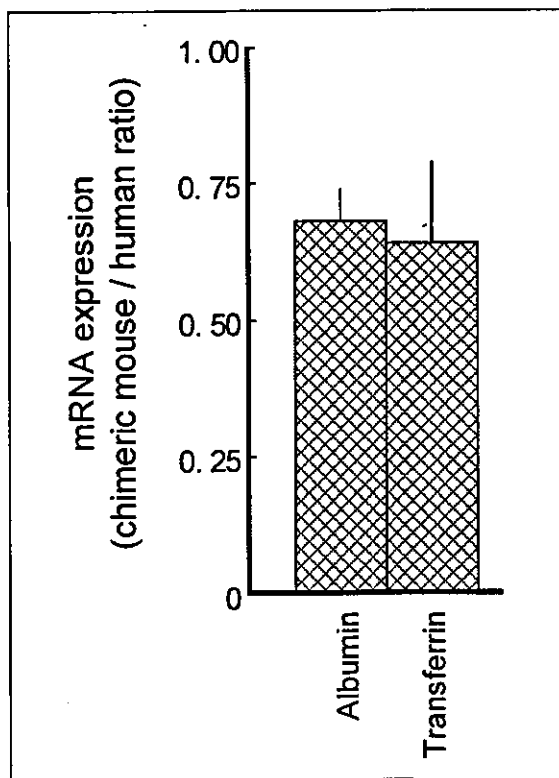


Figure 4 mRNA expression of human albumin and transferrin in chimeric mouse liver. Data are expressed as the ratio of target mRNA in the chimera mouse liver to target mRNA in the human liver. Data represent mean  $\pm$  SD of three mice.

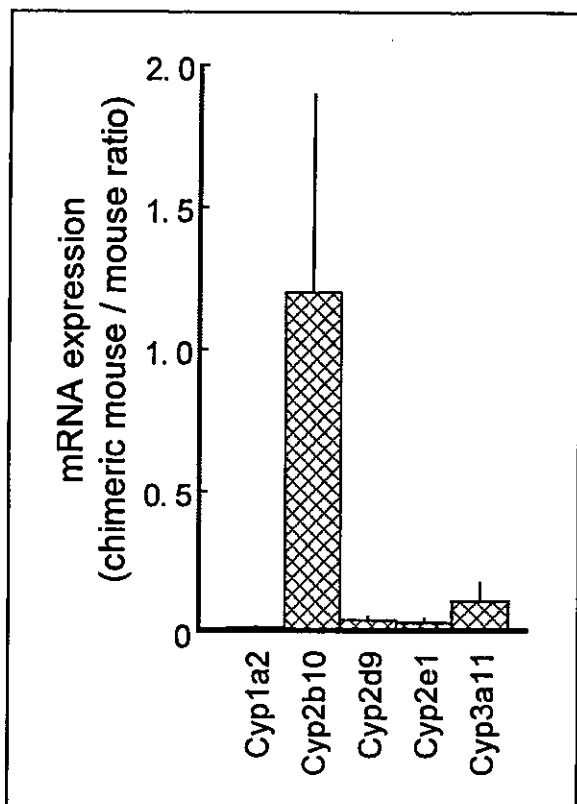


Figure 5 mRNA expression of mouse CyPs in chimeric mouse liver. Data are expressed as the ratio of target mRNA in the chimera mouse liver to target mRNA in the uPA<sup>+</sup>/SCID mouse control liver. Data represent mean  $\pm$  SD of three mice.

#### D. 考察

GAPDH と  $\beta$ -actin などハウスキーピング遺伝子の mRNA 発現レベルは病態下で変化することが報告されており (Chang et al., 1998; Glare et al., 2002)、我々の研究でもヒト肝細胞の初代培養系において GAPDH と  $\beta$ -actin の mRNA 発現比率が変化することを報告している (Nishimura et al., 2003b)。本研究においても、GAPDH と  $\beta$ -actin の mRNA 発現レベルの比がキメラマウスの肝臓で顕著な違いを示すことが確認された (図 1)。我々の研究においては、mRNA 発現量の面で最も適切な内在性のコントロール遺伝子を選ぶ目的で、ヒトの肝臓試料を用いて多くのハウスキーピング遺伝子の mRNA 発現レベルを測定して報告した (Nishimura et al., 2004)。これらの結果より考えると、キメラマウスを用いた

定量的な遺伝子発現の研究を考案する場合は、幾つかのハウスキーピング遺伝子の mRNA 発現レベルを確認し、適切な遺伝子を選択する必要がある。

CYP2A6 mRNA はヒト肝臓に発現する一般的な CYP 分子種であるが、本研究において、ドナーの肝臓における CYP2A6 mRNA の GAPDH に対する比率は 0.0016 であった。この結果は、我々の以前の研究において、GAPDH の mRNA に対する CYP2A6 mRNA の比率が 27.5 であった報告 (Nishimura et al., 2003a) と比較して極めて小さい値を示した。関連した研究として、加藤らは肝臓から抽出されたゲノム DNA から、今回の試験に用いたドナーとそのドナーから作成されたキメラマウスの両方ともが CYP2A6\*4/CYP2A6\*4 の遺伝子型であること、さらに、このドナー由来のキメラマウスのタンパ

ク発現型がドナーと同じであることを報告している(Katoh et al., 2004)。キメラマウスの肝臓はドナーと同じ遺伝子型とタンパク発現型を示すので、遺伝子多型による個体間の薬物動態の違いについても適切なドナー試料を用いたキメラマウスの研究から評価できると考えられる。

ドナーのヒト肝臓での mRNA 発現と比較してキメラマウスの肝臓での mRNA 発現の比率が 1.0 以上を示したターゲット遺伝子が 7 種類あった(図 2、挿入パネル)。一方、8 種類の CYP ターゲット遺伝子 (CYP2B6, CYP2C19, CYP5A1, ALDH6, PTGS1, PTGS2, ABCC1 および ABCC5) の mRNA 発現がドナーのヒト肝臓と比較してキメラマウスの肝臓において 0.01 より低値を示した。この他のターゲット遺伝子の mRNA 発現比率はドナーのヒト肝臓での mRNA 発現と比較してキメラマウスの肝臓では 0.1 から 1.0 の範囲であった。キメラマウスにおけるヒト第 2 相薬物代謝酵素の mRNA 発現比率の分散は第 1 相薬物代謝酵素やトランスポーターと比較して小さかった(図 2、図 3)。特に、ヒトメチルトランスフェラーゼ (COMT, PNMT, TPMT, GAMT, PEMT および ASMT) の mRNA 発現比率の分散は他のヒト第 2 相薬物代謝酵素と比較しても小さかった(図 2)。ABCB4、ABCB11 および ABCC2 のような ABC トランスポーターの mRNA 発現はキメラマウスの肝臓において維持されており(図 2)、これらのトランスポーターは胆汁酸やビリルビンのグルクロン酸抱合のような生理的な物質を胆汁へ分泌する過程で重要な役割を担っている(Dean et al., 2001; Borst et al., 2000)。内因性物質の能動輸送に重要な役割を担っている有機トランスポーターで

ある SLC22As と OATP2 の mRNA 発現レベルもキメラマウスの肝臓において維持されていた(図 2)。このように、多くのヒト薬物代謝酵素とトランスポーターの mRNA 発現がキメラマウスの肝臓において確認され、特に、生理的な活動に重要な意味を持つ分子種の mRNA 発現はドナーのヒト肝臓と同様にキメラマウス肝臓においても維持されていた。

図 3 ではキメラマウスの肝臓において多くのヒト薬物代謝酵素とトランスポーターの mRNA 発現がドナーのヒト肝臓での発現レベルの約 50% であることを示している。しかし、CYP2C19、ALDH6 および ABCC5 mRNA などは、ドナーのヒト肝臓と比較したキメラマウス肝臓での発現が数%程度であり(図 2)、一方において、ALDH3 や SULT1B1 のように発現比率が数倍以上の高値を示すターゲットもあった(図 2、挿入パネル)。Iyer と Sinz(1999)は第 1 相および第 2 相薬物代謝酵素の含量には 2.5~175 倍の幅が見られることを報告している。従って、我々はキメラマウス肝臓中の発現量の比率が、ドナー肝臓の数%~500%の間であれば、薬物代謝酵素やトランスポーターの阻害や誘導による薬物相互作用の評価に用いることができると考えている。しかし、ドナーのヒト肝臓と比較してキメラマウス肝臓にほとんどあるいは全く発現していない CYP5A1、PTGS1、PTGS2 および ABCC1 のようなターゲット mRNA の場合は、誘導や阻害による薬物相互作用の評価に用いることに適さないであろう。

立野らはキメラマウスにおけるヒト肝臓への置換率の値とキメラマウスの血中のヒトアルブミン濃度が良く相関することを報告している

(Tateno et al., 2004)。表 2 に示したヒトアルブミン濃度と置換率の相関は、立野らおよび加藤らによる報告と類似している(Tateno et al., 2004; Katoh et al., 2004)。今回の研究ではキメラマウスの肝臓におけるヒトアルブミン遺伝子の mRNA 発現レベルと置換率あるいは血中のヒトアルブミン濃度の関係についても示した(表 2、図 4)。ドナーの肝臓に対するキメラマウスの肝臓でのアルブミン遺伝子の mRNA 発現レベルの比率は、置換率の結果(71~89%)と類似していた。肝機能のバイオマーカーとして臨床で用いられるトランスフェリンに関して、mRNA 発現レベルはキメラマウスでのアルブミン遺伝子の発現レベルと類似していた。これらの結果より、ヒトの肝組織で置換されたキメラマウスの肝機能指標はヒトの肝臓の一般状態を反映していることが示唆された。

Pan らは IL-1 $\beta$  と IL-6 が Cyp2b10 mRNA の発現を抑制することを報告している(Pan et al., 2000)。また、これらのサイトカインはフェノバルビタールに反応する CYP2B の誘導を抑えることが知られている(Clark et al., 1995)。さらに、マウスにおいてリポポリサッカライドはフェノバルビタールで誘導される CYP2B の発現を抑制することが知られている(Li-Masters and Morgan, 2001)。しかし、免疫不全を伴っているキメラマウスの肝臓における Cyp2b10 mRNA の発現は、同じく免疫不全を伴っている uPA<sup>-/-</sup>/SCID マウスでの発現と同様に高値であった(図 5)。キメラマウスの肝臓において Cyp2b10 mRNA の高発現は免疫不全に加えて未知の因子の関係も否定できないと考えられた。

## E. 結論

化学物質の毒性や CYP 遺伝子の転写制御の研究に使うため、CYP2D6 や CYP3A4 のようなヒト薬物代謝酵素を有する遺伝子発現マウスが報告されている(Corchero et al., 2001; Robertson et al., 2003; Zhang et al., 2003)。また、ABCA1 のようなヒトのトランスポーターを有する遺伝子発現マウスも報告されている(Vaisman et al., 2001)。しかし、遺伝子発現マウスは正常なマウスの活性を保持している環境に 1 種類のヒト型のターゲット mRNA を発現しているため、ヒトの *in vivo* における薬物代謝や排泄を予測するためには限界がある。

今回の研究では、キメラマウスの肝臓に多くのヒト型の薬物代謝酵素やトランスポーターが発現していることを示した。さらに、多くの薬物代謝酵素およびトランスポーター mRNA の高感度で網羅的な定量データは、これらの阻害や誘導による薬物相互作用の評価に有用である。そして、肝臓の大部分がヒト化したキメラマウスはヒト肝臓試料を用いた研究と同様に医薬品開発において有用な評価手段と考えられる。さらに、キメラマウスは、特定の日本人ドナーからの肝細胞を移植して作成できるため、遺伝子多型や投薬などの履歴を持った日本人ドナーの肝臓を有するキメラマウスを作製することもできる。このような研究環境が整備されれば、同じドナーのキメラマウスを用いた比較研究が研究施設間で可能になり、遺伝子多型による個人差なども評価出来るようになるであろう。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表:

Evaluation of mRNA expression of Human Drug-metabolizing Enzymes and Transporters in Chimeric Mouse with Humanized Liver

Drug Metabolism and Disposition に投稿中

MS ID#: DMD/2005/004671

2. 学会発表

ヒト肝臓を有するキメラマウスにおける薬物代謝酵素及びトランスポーターの発現解析; 第17回日本薬物動態学会年会、平成14年11月20-22日、東京

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)

Baliharová V, Skálová L, Maas RF, De Vrieze G, Bull S and Fink-Gremmels J. (2003) The effects of mebendazole on P4501A activity in rat hepatocytes and HepG2 cells. Comparison with tiabendazole and omeprazole. *J Pharm Pharmacol* **55**:773-781.

Bowen WP, Carey JE, Miah A, McMurray HF, Munday PW, James RS, Coleman RA and Brown AM (2000) Measurement of cytochrome P450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos* **28**:781-788.

Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*,

**92**:1295-1302.

Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW and Tsay HJ (1998) Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep* **5**:469-471.

Clark MA, Bing BA, Gottschall PE and Williams JF (1995) Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholanthrene induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **49**:97-104.

Corchero J, Granvil CP, Akiyama TE, Hayhurst GP, Pimprale S, Feigenbaum L, Idle JR and Gonzalez FJ (2001) The CYP2D6 humanized mouse: effect of the human CYP2D6 transgene and HNF4alpha on the disposition of debrisoquine in the mouse. *Mol Pharmacol* **60**:1260-1267.

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.

Dean M, Rzhetsky A and Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*, **11**:1156-1166.

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).

Glare EM, Divjak M, Bailey MJ and



- Walters EH (2002)  $\beta$ -Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* **57**:765–770.
- Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV and Jover R (2003) Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* **4**:292–312.
- Hesse LM, Sakai Y, Vishnuvardhan D, Li AP, von Moltke LL and Greenblatt DJ (2003) Effect of bupropion on CYP2B6 and CYP3A4 catalytic activity, immunoreactive protein and mRNA levels in primary human hepatocytes: comparison with rifampicin. *J Pharm Pharmacol* **55**:1229–1239.
- Iyer KR and Sinz MW (1999) Characterization of phase I and phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparations. *Chem Biol Interact* **118**:151–169.
- Kato M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2004) Expression of human CYPs in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* **32**:1402–1410.
- Li AP, Gorycki PD, Hengstler JG, Kedderis GL, Koebe HG, Rahmani R, de Sousa G, Silva JM and Skett P (1999) Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem Biol Interact* **121**:117–123.
- Li-Masters T and Morgan ET (2001) Effects of bacterial lipopolysaccharide on phenobarbital-induced CYP2B expression in mice. *Drug Metab Dispos* **29**:252–257.
- Lindley C, Hamilton G, McCune JS, Faucette S, Shord SS, Hawke RL, Wang H, Gilbert D, Jolley S, Yan B and LeCluyse EL (2002) The effect of cyclophosphamide with and without dexamethasone on cytochrome P450 3A4 and 2B6 in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **30**:814–822.
- 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.
- 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.
- Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S and Satoh T (2003a) Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **123**:369–375.
- Nishimura M, Ueda N and Naito S (2003b) Effects of dimethyl sulfoxide on the gene induction of cytochrome P450 isoforms UGT-dependent glucuronosyltransferase isoforms, and ABCB1 in primary culture of human hepatocytes. *Biol Pharm Bull* **26**:1052–1056.
- Nishimura M, Naito S and Yokoi T (2004)

Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet*, **19**:135–149.

Pan J, Xiang Q and Ball S (2000) Use of a novel real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the effects of cytokines on cytochrome P450 mRNA expression in mouse liver. *Drug Metab Dispos* **28**:709–713.

Robertson GR, Field J, Goodwin B, Bierach S, Tran M, Lehnert A and Liddle C (2003) Transgenic mouse models of human *CYP3A4* gene regulation. *Mol Pharmacol* **64**:42–50.

Rodrigues AD and Rushmore TH (2002) Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab* **3**:289–309.

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).

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.

Vaisman BL, Lambert G, Amar M, Joyce C, Ito T, Shamburek RD, Cain WJ,

Fruchart-Najib J, Neufeld ED, Remaley AT, Brewer HB Jr and Santamarina-Fojo S (2001) ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest* **108**:303–309.

Walle T, Otake Y, Galijatovic A, Ritter JK and Walle U K (2000) Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in the human hepatoma cell line Hep G2. *Drug Metab Dispos* **28**:1077–1082.

Watanabe T, Shibata N, Westerman KA, Okitsu T, Allain JE, Sakaguchi M, Totsugawa T, Maruyama M, Matsumura T, Noguchi H, Yamamoto S, Hikida M, Ohmori A, Reth M, Weber A, Tanaka N, Leboulch P and Kobayashi N (2003) Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers. *Transplantation* **75**:1873–1880.

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.

Wilkening S, Stahl F and Bader A. (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* **31**:1035–42.

Zhang W, Purchio AF, Chen K, Wu J, Lu L, Coffee R, Contag PR and West DB (2003) A transgenic mouse model with a luciferase reporter for studying in vivo transcriptional regulation of the human *CYP3A4* gene. *Drug Metab Dispos* **31**:1054–1064.

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

ヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞の培養実験における  
CYPs mRNA 発現で見た同等性の評価

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をヒト肝細胞に置換することが可能なキメラマウスが開発された。CYP 酵素を始めとする薬物代謝酵素には種差があり、代謝酵素の変動が薬物動態に影響する場合は動物実験の結果から臨床を予測できないことがある。そこで、薬物代謝酵素の誘導に対する作用はヒト肝細胞を用いた研究から臨床での酵素誘導作用を予測する手法が有用と考えられている。キメラマウスは、このようなヒト肝細胞を用いた医薬品開発における研究において有用な試験系と考えられる。

我々はヒト肝細胞に置換されたキメラマウス肝臓から凍結肝細胞を調製し、培養実験によりヒト肝細胞と同様に $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF)暴露でヒト CYP1A2 mRNA が誘導され、Rifampicin (Rif)暴露でヒト CYP3A4 mRNA が誘導されることを示した。さらに、キメラマウス肝臓にヒトの薬物代謝酵素やトランスポーターなどの mRNA が多数発現していることを見出した。

本研究では、ヒト肝細胞と、その細胞をドナーとしたキメラマウスの肝細胞を凍結で準備し、同時に培養実験を行って mRNA 発現量を比較した。mRNA 分析はリアルタイム RT-PCR 法を用いた。12 種類の CYP 酵素 mRNA の発現レベルを見ると、培養開始直前はキメラマウス肝細胞がヒト肝細胞よりも多く、また両細胞系で相関性は低かった(相関係数 ;  $r=0.690$ )。培養 24 時間後も相関性は低かった( $r=0.699$ )。その後、ヒト上皮細胞成長因子(hEGF)等を含まない培地に交換し、培養 48 時間後ではキメラマウス肝細胞の CYPs mRNA 発現量がドナー肝細胞と同程度になり、発現量の相関性は良好になった( $r=0.809$ )。さらに、培養 72 時間後も良好な相関性が維持された( $r=0.873$ )。CYP1A2 と CYP3A4 mRNA の発現を $\beta$ -actin mRNA との比で評価すると、ヒトとキメラマウスの肝細胞ではいずれも培養 24 時間後に大きく低下した後にほぼ一定値に推移した。 $\beta$ -NF 暴露により CYP1A2 mRNA は 3 例のヒトとキメラマウス肝細胞で同様に誘導が見られたが、Rif 暴露による CYP3A4 mRNA の誘導は 3 例のヒト肝細胞で共に誘導が見られたのに対しキメラマウス肝細胞では 3 例中 1 例に誘導が明確であった。

以上のように、ドナーのヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞の mRNA 発現を比較した結果、培養 48 時間以後は CYPs mRNA の発現量が同程度に推移し、この時点になるとヒト肝細胞の代替試料としてキメラマウス肝細胞を用いることが可能と考えられた。しかし、Rif 暴露による CYP3A4 mRNA 反応性の個体差のように、キメラマウス肝細胞がドナーであるヒト肝細胞の機能の全てを定量的に引き継いでいないことに注意を要する。

## A. 研究目的

医薬品開発の非臨床試験においては、ヒトでの薬物動態を予測するために、動物実験に加えてヒト由来試料を用いた研究が有用であることが広く認識されている。薬物代謝酵素の阻害作用についての検討は、ヒト肝臓マイクロゾームが汎用されるようになり、また、探索試験では化合物の代謝的な安定性についてもヒト肝臓マイクロゾームが用いられている。一方、化合物の誘導作用は酵素タンパクの発現レベルにおける変動の過程を必要とするため、非細胞系であるマイクロゾームでは評価することができない。そこで、雌性ラットを用いて反復投与試験を行い、肝臓の薬物代謝活性の変化から酵素誘導作用を考察していた。しかし、肝臓薬物代謝酵素にはしばしば種差が存在するためラットの結果がヒトと必ずしも一致しない。そこで、ヒト肝細胞を用い初代培養系において、酵素誘導を検討して報告されるようになった(Bowen et al., 2000; Garcia et al., 2003; Roymans et al., 2004)。ところが、ヒト肝細胞の使用には、細胞培養系であるために酵素活性の低下による欠点に加えて、倫理性、同一ロットの入手・価格などの問題がある。ヒト肝細胞の代替実験系として、ヒト肝臓細胞由来で継代培養が可能な HepG2 細胞があるが薬物代謝酵素の発現プロファイルと反応性にヒトの *in vivo* と異なる部分も多く(Wilkening et al., 2003)、薬物動態研究への利用には注意が必要である。

立野らにより uPA/SCID マウスにヒト肝細胞を移植し肝臓の 80%以上がヒト肝細胞に置換したキメラマウスが作製された(Tateno et al., 2004)。この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た。既に、

我々はキメラマウス肝臓試料を用いて、20種類のヒトCYP酵素を含む52種類のヒト第1相薬物代謝酵素 mRNA、26種類のヒト第2相薬物代謝酵素 mRNA、21種類のヒト・トランスポーター mRNA が発現していることを確認した。また、キメラマウス肝臓より調製した凍結肝細胞を用いた培養実験から、 $\beta$ -NF と Rif の暴露による CYP1A2 mRNA あるいは CYP3A4 mRNA の誘導を確認している。いずれも、分担研究報告書を作成しており、そちらを参照されたい。

本研究では、キメラマウスに移植したドナーのヒト肝細胞と、作製されたキメラマウスから得た肝細胞を用いて、mRNA の発現変動を比較し同等性について示した。実験では、3例の由来の異なったヒト肝細胞を uPA/SCID マウスに移植してキメラマウスを作製し、その凍結肝細胞を用いた。また、培養細胞から経時的に total RNA を調製して薬物代謝酵素 (CYPs) mRNA の発現を測定し、さらに、 $\beta$ -NF と Rif の暴露による CYP1A2 mRNA あるいは CYP3A4 mRNA で評価した酵素誘導を比較した。mRNA 分析は ABI 社製 PRISM 7700 を用い、リアルタイム RT-PCR 法で行った。

## B. 研究方法

### B-1. 試薬

凍結ヒト肝細胞は In Vitro Technologies, Inc. (Baltimore, MD, USA)より購入した。3例のドナーの特徴は表 1 に示した。 $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF)および Rifampicin (Rif)は和光純薬工業より購入した。Total RNA の抽出に用いた Rneasy Mini Kit および QIAshredder は QIAGEN (Hilden, Germany)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。TaqMan One-Step

RT-PCR Master Mix Reagents、TaqMan GAPDH Control Reagents および TaqMan  $\beta$ -actin Control Reagents 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. キメラマウス肝細胞の調製

本研究を開始するのに際し、研究計画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。

キメラマウスは立野らが構築した手法に従い作製した(Tateno et al., 2004)。表 1 に示す凍結で保存されていた3例のヒト肝細胞をドナーとして uPA/SCID マウスに移植して作製した(マウス肝臓からヒト肝臓への置換率は約 60~80%)。キメラマウス肝臓のコラゲナーゼ灌流と遊離肝細胞の調製は、Seglen らの方法で行った(Seglen

et al., 1976)。得られたキメラマウス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。凍結肝細胞の輸送に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

ドナーおよびキメラマウス凍結肝細胞の単層培養は西村らの方法に従って行った(Nishimura et al., 2002)。凍結肝細胞は解凍後、ヒト肝細胞培養液に懸濁し、遠心分離により洗浄した。細胞数はコールターカウンターを用いて測定し、生細胞率(viability)はトリパンブルー色素排除法で確認した。得られた肝細胞の viability は 50.0~86.7%であった(表 1)。細胞を播種した後、3 時間には培養液を新鮮なものと交換し、さらに 21 時間培養した。ついで、ヒト上皮細胞成長因子 (hEGF)、

Table 1. Characteristics of donors, chimera mice and hepatocyte preparations

Donor No.	#1	#2	#3
<b>Human hepatocytes</b>			
Lot No.	RQO	: 79	NLR
Age in donor	6 days	9 months	13 years
Sex in donor	Female	Male	Male
Race in donor	Caucasian	Caucasian	Caucasian
Viability in donor (%)	94.1	89.2	80.6
<b>Chimeric mouse hepatocytes</b>			
Lot No.	CTE54-9	CTE7-1	CTE31-8
Sex in mouse	Male	Female	Male
Replacement index (%)	about 60	>80	>80
Viability in mouse (%)	50.0	86.7	70.1

Viability after melting the cryopreserved hepatocytes in donor and chimera mouse was determined by trypan blue dye exclusion.

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、引き続き 24 時間毎に培養液を交換して 72 時間まで培養した。酵素誘導実験には播種後 48 時間が経過した細胞を実験に使用した。培養は 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>、37°C の条件下で行った。

#### B-4. 培養肝細胞への試験物質の暴露

酵素誘導の評価では、播種 48 時間後からドナーおよびキメラマウス肝細胞にβ-NF または Rif を 24 時間暴露した。実験中、肝細胞は 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>、37°C の条件下でヒト上皮細胞成長因子 (hEGF)、ゲンタマイシンまたはアンフォテリシン B を含まない培養液で培養した。β-NF の影響は 1 μM, 5 μM および 25 μM で、Rif の影響は 2 μM, 10 μM および 50 μM の濃度で検討した。β-NF と Rif は DMSO に溶解させて使用し、培養液中の DMSO 最終濃度は 0.1% とした。正常対照群は mRNA 発現を評価する試験系と同じく 0.1% DMSO 濃度とした。肝細胞からの total RNA 抽出には QIAshredder Rneasy Mini Kit を使用した。

#### B-5. オリゴヌクレオチドの設計

ターゲット mRNA を分析するための primer と TaqMan probe は、既に報告した配列を採用した(Nishimura et al., 2002, 2003a)。GenBank accession number と開始コドンの位置は表 2 に示した。primer および probe は QIAGEN (Tokyo, Japan) で合成し、TaqMan probe は 5' 末端として 6-carboxyfluorescein (FAM) を、3' 末端として 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA) を含み、これらが PCR primer の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-6. mRNA 分析

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、48°C、30 分間を 1 回、95°C、10 分間を 1 回反応させた後に、95°C、15

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

mRNA	Sequence	Position
CYP1A2 (GenBank accession number AF182274)		
Forward primer	5'-TGTTCAAGCACAGCAAGAAGG-3'	860-880
Reverse primer	5'-TGCTCCAAAGACGTCATTGAC-3'	951-931
Probe	5'-CTAGAGCCAGCGGCAACCTCATCCCA-3'	884-909
CYP3A4 (GenBank accession number AF182273)		
Forward primer	5'-GATTGACTCTCAGAATTCAAAGAAACTGA-3'	825-854
Reverse primer	5'-GGTGAGTGGCCAGTTCATACATAATG-3'	973-948
Probe	5'-AGGAGAGAACACTGCTCGTGGTTTCACAG-3'	946-918

秒間および 60°C、1 分間を交互に 40 回反応させた。ヒト GAPDH の測定には 200 nM の forward primer、200 nM の reverse primer および 200 nM の TaqMan probe を用い、他の mRNA 測定には 300 nM の forward primer、900 nM の reverse primer および 200 nM の TaqMan probe を用いた。

#### B-7. 統計解析

データ解析は ABI PRISM sequence detection software で行った。各 mRNA の相対発現量は既に報告している、 $\Delta Ct$  (目的の mRNA 量から  $\beta$ -actin の mRNA 量を減じて得られた値)により計算した(Nishimura et al., 2003b)。具体的には  $\beta$ -actin に相対する目的の mRNA の総量は  $2^{-(\Delta Ct)}$  として表し、データは目的の mRNA と  $\beta$ -actin の mRNA の比(コントロールに対する相対%)で表される。肝細胞の培養実験は triplicate で行い、データは mean  $\pm$  SD として示した。

### C. 研究結果

#### C-1. ドナー肝細胞とキメラマウス肝細胞の初代培養による CYPs mRNA 発現量に関する評価

我々はドナーに用いたヒト肝臓とキメラマウス肝臓の total RNA を用い薬物代謝酵素およびトランスポーター mRNA の発現プロファイルを確認し、キメラマウス肝臓には薬物動態に関連する多くのヒト mRNA が発現していることを示した。

本研究では、凍結で供給されたヒト肝細胞と、そのヒト肝細胞をドナーとして作製したキメラマウスから調製した肝細胞を同条件で同時に培養して、それぞれの培養肝細胞における CYPs mRNA 発現量を比較した。

薬物代謝酵素の経時的な推移は、ヒ

トの主要な CYP 酵素として CYP1A1、CYP1B1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7 の mRNA 発現を評価項目として選択した。これらの CYP 酵素 mRNA 発現量を  $\beta$ -actin の発現量の比として計算し、キメラマウス肝細胞とドナーに用いたヒト肝細胞の対応するデータから分散図を作成し図 1 に示した。縦軸にキメラマウス肝細胞、横軸にドナーのヒト肝細胞での発現量を対数で表示した。実験は 3 例のドナー肝細胞と対応するキメラマウス肝細胞で、各々 triplicate で行い平均値をプロットしている。

ヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞におけるヒト CYPs mRNA 発現の相関について、凍結肝細胞を解凍し遊離肝細胞とした培養開始前(0 時間時点)、培養開始 3 時間後、24 時間後、48 時間後および 72 時間後に行った。なお、培養 24 時間後までは培養液中に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 を含むが、それ以降は、これらを含まない培養液を用いた。

培養開始前(0 時間時点)で CYPs mRNA の発現量を比較すると、両肝細胞間での発現量に相関性は見られるものの相関係数は低く ( $r=0.690$ 、 $p<0.01$ )、ヒト肝細胞の発現量よりもキメラマウス肝細胞での発現量が高値であった。培養 3 時間後および 24 時間後では、両肝細胞の CYPs mRNA 発現量の相関係数は、それぞれ  $r=0.651$  および  $r=0.699$ (いずれも  $p<0.01$ )であり、培養開始前と同じく有意な正の相関は見られるものの相関係数は低値に推移した。培養 24 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

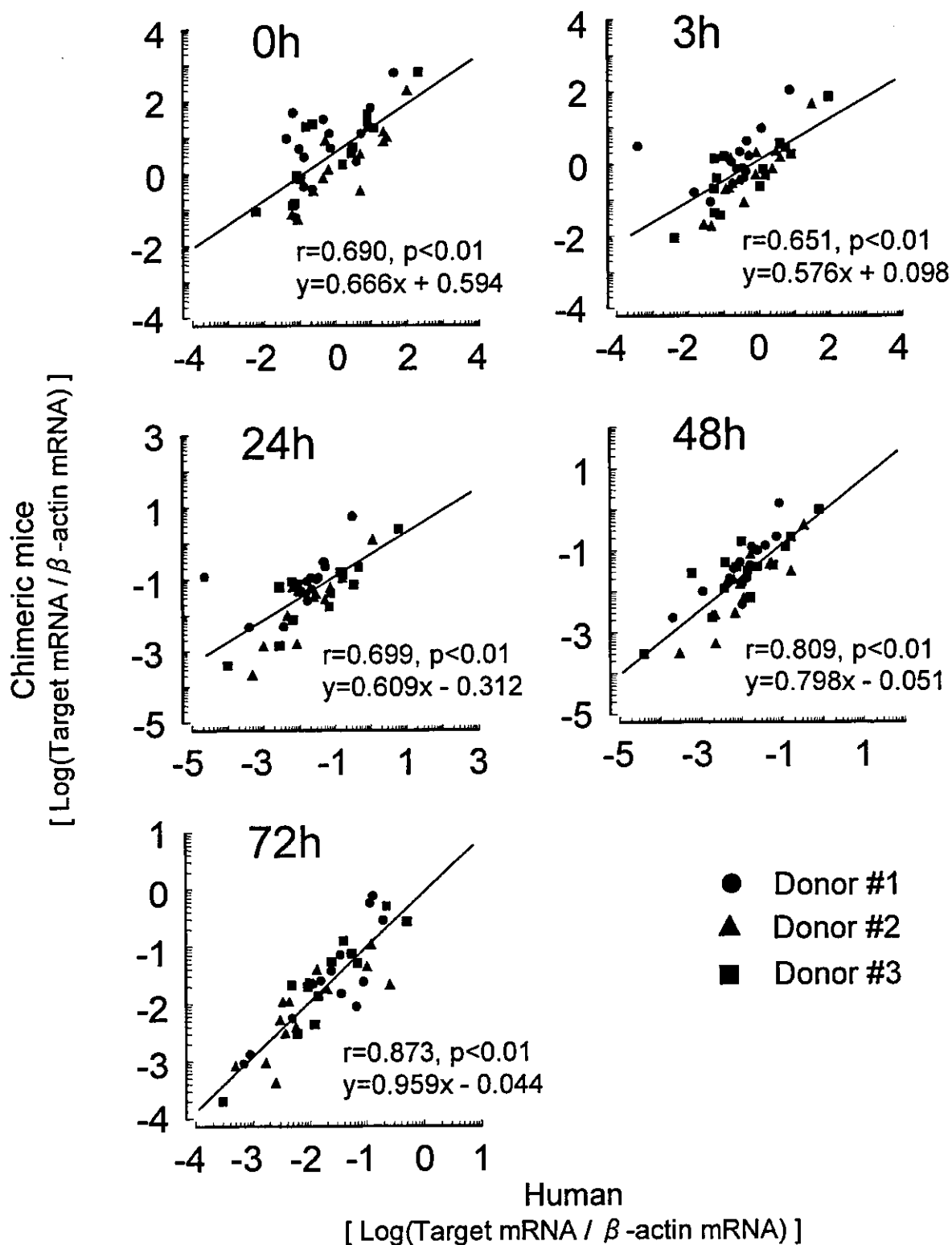


Figure 1. Correlation between mRNA levels of CYPs expressed in chimeric mice and human hepatocytes.

Data are expressed as the ratio of human CYP1A1, 1B1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5 and CYP3A7 mRNA to human  $\beta$ -actin mRNA in chimeric mice and human hepatocytes.



を含まない培養液に交換し、24 時間培養(培養 48 時間後)することで、ドナー肝細胞とキメラマウス肝細胞での CYPs mRNA 発現量は同程度に近づき ( $y=0.798x - 0.051$ )、相関係数も良好な値を示した( $r=0.809$ 、 $p<0.01$ )。培養 72 時間後では、さらに良好な相関係数に推移した( $y=0.959x - 0.044$ 、 $r=0.873$ 、 $p<0.01$ )。

C-2. ドナーのヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞における CYP1A2 および CYP3A4 mRNA の発現量の経時的な推移

凍結ヒト肝細胞を用いた実験から、培養開始後にハウスキーピング遺伝子である GAPDH と  $\beta$ -actin の比が低下した後一定値に推移することを報告している(Nishimura et al., 2003b)。ま

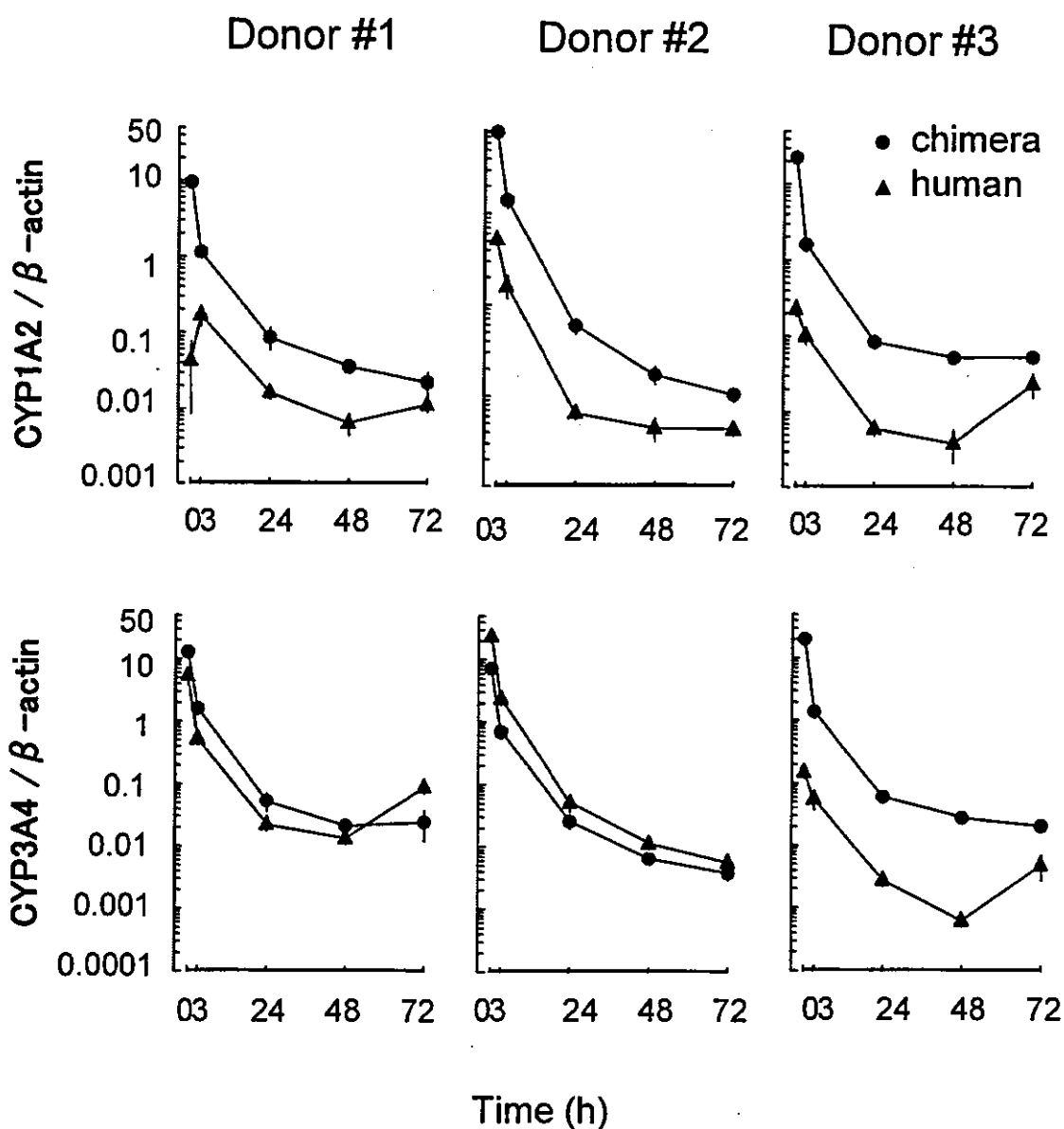


Figure 2. Effects of culture on CYP1A2 and CYP3A4 mRNA expression in primary culture of the hepatocytes isolated from chimeric mice and humans.

Data are expressed as the ratio of human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA to human  $\beta$ -actin mRNA.

た、培養 48 時間以後は細胞の状態が安定しており、酵素誘導実験への適用が可能と報告した。他の CYPs mRNA も培養操作により発現量が大きく変化することが知られている(Bowen et al., 2000; Nishimura et al., 2003b)。

培養による CYP1A2 および CYP3A4 mRNA 発現量の変動について、ヒト肝細胞と、同じヒト肝細胞をドナーに用いたキメラマウス肝細胞で比較検討して図 2 に示した。図は縦軸にキメラマウス肝細胞およびヒト肝細胞における CYP1A2 mRNA あるいは CYP3A4 mRNA 発現量を  $\beta$ -actin の発現量との比で表し、横軸に培養開始からの時間を示した。

CYP1A2 mRNA の発現量は 3 例共にヒト肝細胞に比べキメラマウス肝細胞が高値に推移した。また、キメラマウス肝細胞での CYP1A2 mRNA の発現量は、いずれも培養 24 時間後まで急激な低下を示し、培養開始 48 時間以降はほぼ一定値に推移した。しかし、ヒト肝細胞での CYP1A2 mRNA の発現量を見ると培養 24 時間後まではキメラマウスと同様に低下を示したが、Donor #1 および Donor #3 において培養 72 時間後に発現量の増加が認められた。

Donor #1 における培養 48 時間時点の CYP1A2 mRNA 発現量は、ヒト肝細胞で  $0.006 \pm 0.002$  に対しキメラマウス肝細胞では  $0.036 \pm 0.007$  となり、キメラマウス肝細胞にはヒト肝細胞の 5.6 倍の発現が認められた。同様に、培養 48 時間時点における Donor #2 のキメラマウス肝細胞にはヒト肝細胞の 3.9 倍の CYP1A2 mRNA 発現が認められ、Donor #3 のそれは 13.4 倍であった。

培養による CYP3A4 mRNA 発現量の経時的な推移を見ると、CYP1A2 mRNA と同様に培養 24 時間後にか

て低下し、Donore #1 と Donore #2 ではヒトとキメラマウスが近似しており、Donore #3 はキメラマウス肝細胞での発現量がヒト肝細胞での発現量を上回っていた。

### C-3. ヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞を用いた酵素誘導の比較

我々は凍結で供給されたキメラマウス肝細胞を用い、 $\beta$ -NF 暴露による CYP1A2 mRNA の誘導と Rif 暴露による CYP3A4 mRNA の誘導を評価できることを別の分担研究報告書で報告している。本研究ではヒト肝細胞と、その細胞をドナーに用いたキメラマウス肝細胞に対して  $\beta$ -NF あるいは Rif を暴露した時のヒト CYP1A2 および CYP3A4 mRNA の変化について図 3 に示した。この図では、縦軸に  $\beta$ -actin mRNA の発現量との比で示した CYP1A2 mRNA あるいは CYP3A4 mRNA 発現量を表した。

$\beta$ -NF 暴露による CYP1A2 mRNA の誘導作用は、検討した 3 例のヒト肝細胞およびキメラマウス肝細胞でいずれも確認できた。Donor #1 はキメラマウス肝細胞で CYP1A2 mRNA の誘導作用が顕著であり、Donor #2 および Donor #3 ではヒト肝細胞で顕著に誘導された。Donor #1 において、何れの肝細胞も最高用量の  $25 \mu\text{M}$   $\beta$ -NF 群での誘導作用は減少し、Donor #2 と Donor #3 のキメラマウス肝細胞における CYP1A2 mRNA の誘導作用はヒト肝細胞に比べると弱い傾向であった。

Rif 暴露による CYP3A4 mRNA の誘導作用はヒト肝細胞で 3 例とも顕著に認められたが、キメラマウス肝細胞では Donor #3 のみに顕著な誘導作用が認められた。

以上より、 $\beta$ -NF 暴露による CYP1A2

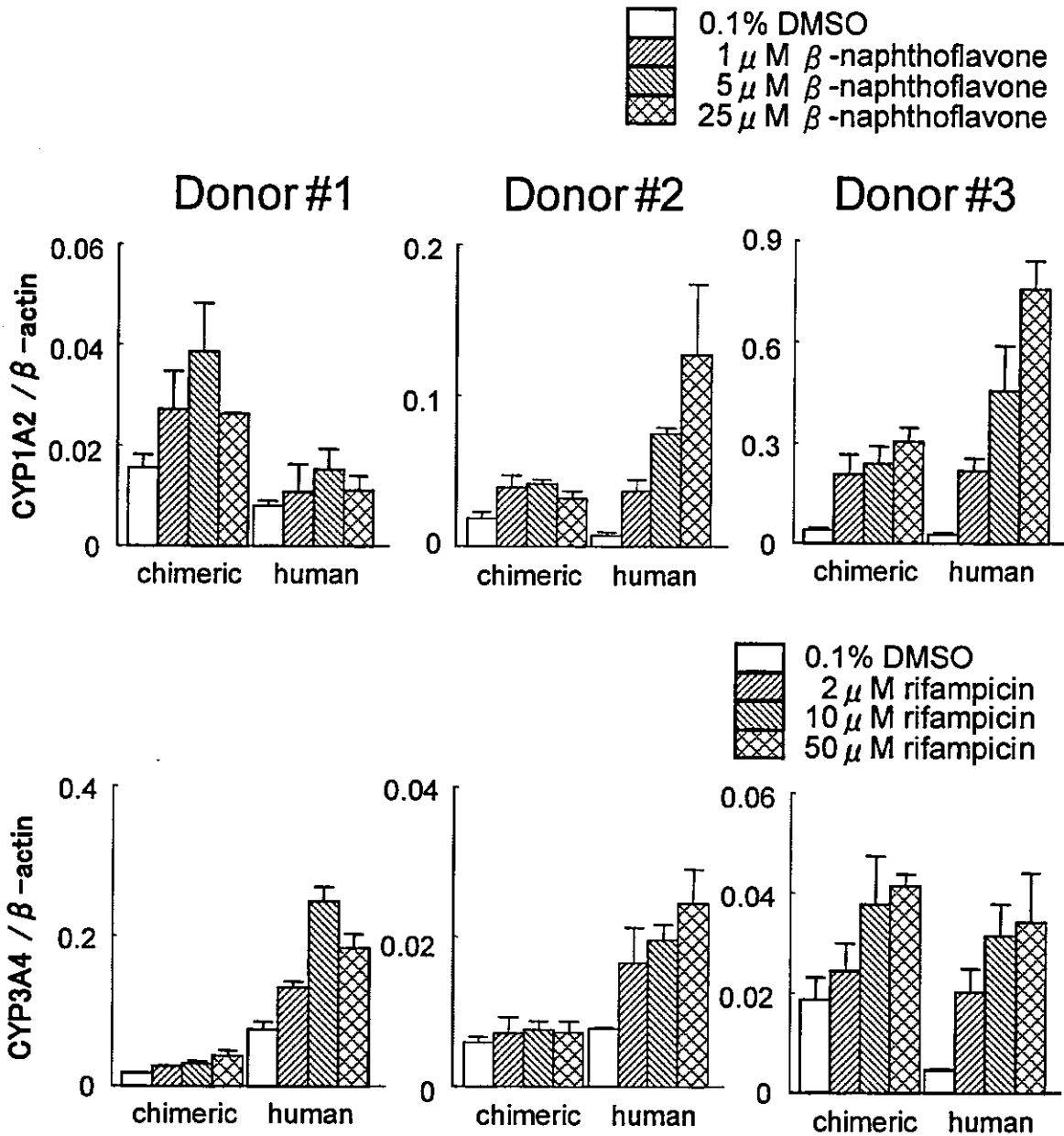


Figure 3. Effect of  $\beta$ -naphthoflavone or rifampicin for exposure on the expression of human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA in primary culture of hepatocytes from chimeric mice and human.

$\beta$ -naphthoflavone (1, 5 and 25  $\mu$ M) or rifampicin (2, 10 and 50  $\mu$ M) were exposed for 24 hrs. Data are expressed as the ratio of human target mRNA to human  $\beta$ -actin mRNA. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

mRNA 発現量は、3 例共にヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞で同様に誘導作用が見られた。しかし、Rif 暴露による CYP3A4 mRNA 発現量はヒト肝

細胞で3 例共に誘導作用が見られたのに対し、キメラマウスでは3 例中の1 例にのみ誘導作用が確認でき、 $\beta$ -NF に対する反応性と異なっていた。

#### D. 考察

創薬科学の進歩により、医薬品開発においてファーマコゲノミクス(PG)データの有用性が認められるようになってきた。そして、探索的な研究でのPG評価法はスクリーニング研究の効率性を上げることが可能であり、ヒトへの外挿性を含めた精度の点で優れていること、新規性の面で将来性が大きいことなどが考えられる。一方、外挿性が不十分であること、データの評価基準が不明確でありバリデーションされていないこと、実験技術が確立していないこと、ヒト試料などの試験材料が入手困難であることなどが問題となる。我々はヒト試料を用い薬物代謝酵素の mRNA 発現解析の手法を開発して、医薬品が薬物動態に及ぼす影響を推測している。

医薬品開発における薬物動態研究では多くの場面でヒト試料を用いるようになった。ヒト肝細胞は臨床での代謝・分布反応を予測する研究に利用され、有用性は広く認識されている。欧米において、ヒト肝細胞は遊離肝細胞やプレートに播種された状態で冷蔵供給される。しかし、日本ではドナーの肝臓の提供が無いために冷蔵での供給は難しく、諸外国から供給される凍結肝細胞が用いられている。このような凍結で供給された市販のヒト肝細胞の機能について、Liらは解凍後に薬物代謝酵素活性を測定し、非凍結の新鮮な肝細胞と比較して、平均でCYP1A2は97%、CYP3A4は164%を示し、主要な薬物代謝酵素活性が同等であることを報告している(Li et al., 1999)。

立野らは遺伝的に免疫不全で肝障害のuPA/SCIDマウスを用い、脾臓を経由してヒト肝細胞を移植して肝臓

の80%以上がヒト肝細胞に置換したキメラマウスを完成した(Tateno et al., 2004)。我々は、このキメラマウスから凍結肝細胞を調製して初代培養系による検討を行い、 $\beta$ -NFあるいはRifの暴露によるCYP1A2 mRNAおよびCYP3A4 mRNAの誘導作用を確認し、ヒト肝細胞の代替実験に利用できることを示した(分担研究報告書参照)。また、キメラマウスの肝臓試料を用いてヒト薬物代謝酵素およびトランスポーターの mRNA が十分に発現していることを確認し、キメラマウスはヒトの薬物動態を予測するための各種の研究に利用できるであろうと報告した(分担研究報告書参照)。

さらに、キメラマウスの有用性を探るために、凍結で市販されているヒト肝細胞試料と、凍結で入手したキメラマウス肝細胞試料を同時に初代培養して、CYP酵素 mRNA 発現を指標に薬物動態研究における同等性を評価した。この場合、実験に用いたヒト肝細胞をドナーとしてキメラマウスを作製しており、キメラマウスのシステムを利用することにより、ヒト肝細胞を増殖させることができた。実験においては、凍結肝細胞として供給されたヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞を用い、薬物代謝酵素の mRNA 発現を比較した。細胞培養開始前のキメラマウス肝細胞にはCYPs mRNAの発現は十分に認められており、平均するとドナーのヒト肝細胞での発現量よりも多いようであった。しかし、ヒトとキメラマウス肝細胞での個々のCYP酵素分子種の発現量の比を分散図にプロットして評価すると相関係数は低く偏差が大きいようであった。培養時間が経過し細胞が接着し伸展して酵素誘導実験を開始する培養48時間時点になると、ヒトとキメラマウスの肝