

B-10-2. PCR-RFLPによる遺伝子判定

NAT2*6、NAT2*7 の遺伝子判定はそれぞれ制限酵素 *Taq* I、*Bam*H I を用いたPCR-RFLP法により判定を行った。遺伝子判定に用いたプライマーはTable 2に示した。ゲノムDNAに10x PCR緩衝液 2.5 μ L、10 μ Mのセンスプライマー (NAT2-S1) と10 μ Mのアンチセンスプライマー (NAT2-AS1) をそれぞれ1 μ L、2.5 mM dNTPs 2.5 μ L、25 mM $MgCl_2$ 1.5 μ L、*Taq* DNAポリメラーゼ 0.2 μ L (1.0 U) を加え、滅菌精製水にて全量を25 μ LとしPCR反応を行った。反応終了後、NAT2*6 の遺伝子判定には、得られたPCR産物に10 x 緩衝

液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、5 mM $MgCl_2$ 、100 mM NaCl) と0.1%BSA、制限酵素 *Taq* Iを加え、65°Cでインキュベートした。NAT2*7 の遺伝子判定には、得られたPCR産物に10 x H緩衝液 (500 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM $MgCl_2$ 、10 mM DTT、1000 mM NaCl)、制限酵素 *Bam* H I を加え、37°Cでインキュベートした。反応後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行い遺伝子断片の長さを確認した。Fig. 2に泳動模式図を示した。なお、予備検討において、遺伝子判定に使用したプライマーはuPA^{+/+}/SCIDマウス、uPA^{-/-}/SCIDマウスの肝から調製したゲノムDNAには交差反応しないことを確認した。

Table 2. Sequence of the primers used for the genotyping of NAT2.

Primer	Sequence
NAT2-S1	5'-GGCTATTGATCACATTGTA-3'
NAT2-AS1	5'-AGCATGAATCACTCTGCTTC-3'
341-Swt1	5'-CTCCTGCAGCTGACCAT-3'
341-Smut1	5'-CTCCTGCAGCTGACCAC-3'
341-AS	5'-TTGGTGTTTCTTCTTTGGC-3'
NAT2-S2 ^a	5'-GTCACACGAGGAAATCAAATGC-3'
NAT2-AS2 ^a	5'-GTTTTCTAGCATGAATCACTCTGC-3'
341-Swt2 ^a	5'-CCTGCAGGTGCCAT-3'
341-Smut2 ^a	5'-CCTGCAGGTGCCAC-3'

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

wt: Wild, mut: Mutant

^a From Cascorbi et al. (1995)

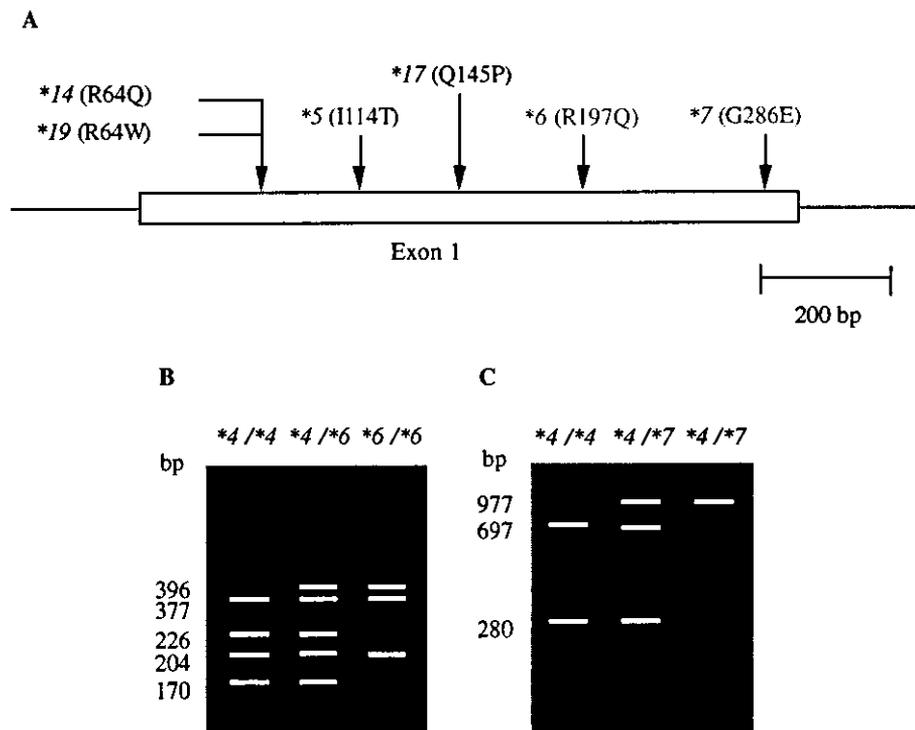


Fig. 2. SNPs in exon 1 on human NAT2 gene (A) and schematic PCR-RFLP patterns for different NAT2 alleles of NAT2*4 (wild type), NAT2*6 and NAT2*7 (B). B, The NAT2*4 yields 377, 226, 204 and 170 bp fragments, NAT2*6 (*6) yields 396, 377 and 204 bp fragments. C, The NAT2*4 yields 697 and 280 bp fragments, NAT2*7 (*7) yields 977 bp fragment.

C. 研究結果

C-1. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトUGT1A1の発現

C-1-1. ヒト UGT1A1 mRNA 発現量

Fig. 3A にヒト UGT1A1 mRNA 発現量の定量結果を示した。ドナーA由来のキメラマウスは、hAlb 濃度依存的なヒト UGT1A1 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト UGT1A1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.95$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト UGT1A1 mRNA 発

現が認められた。

C-1-2. ヒト UGT1A1 タンパク発現量

Fig. 3B にヒト UGT1A1 タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス No. 1 から No. 3、No. 11 を除いて、両ドナー由来のキメラマウスともに、ヒト UGT1A1 タンパクの発現が認められた。なお、ヒト UGT1A1 タンパク発現量と hAlb 濃度の相関係数は、ドナーA由来のキメラマウスで $r = 0.95$ 、ドナーB由来

のキメラマウスで $r=0.98$ であった。 UGT1A1 タンパク発現量は、ドナー
 また、キメラマウス No. 15 のヒト B の約 1.2 倍であった。

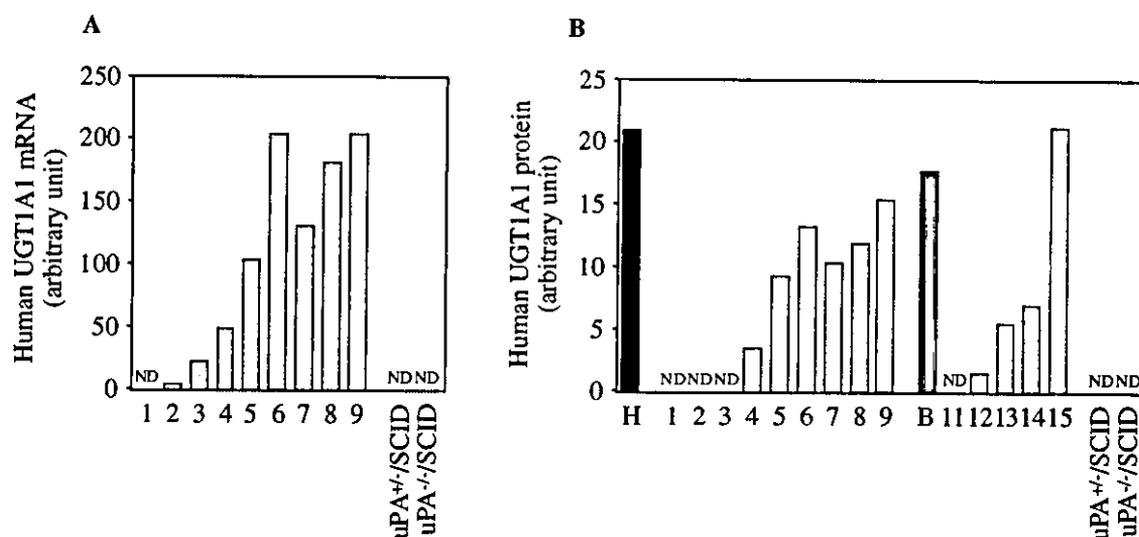


Fig. 3. Human UGT1A1 expression in the chimeric mice. Relative expression levels of human UGT1A1 mRNA (A) and the expression of human UGT1A1 protein (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. H: human liver microsomes; B: donor B; ND: not detected.

I-C-2. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト UGT1A9 の発現

Fig. 4 にヒト UGT1A9 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト UGT1A9 mRNA 発

現量の増加が認められた。ヒト UGT1A9 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.77$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト UGT2B7 mRNA 発現が認められた。

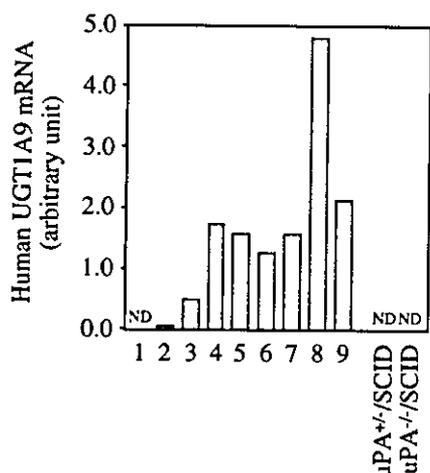


Fig. 4. Human UGT1A9 expression in the chimeric mice.

Relative expression level of human UGT1A9 mRNA was determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. ND: not detected.

C-3. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト UGT2B7 の発現

C-3-1. ヒト UGT2B7 mRNA 発現量

Fig. 5A にヒト UGT2B7 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスは、hAlb 濃度依存的なヒト UGT2B7 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト UGT2B7 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.93$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト UGT2B7 mRNA 発現が認められた。

C-3-2. ヒト UGT2B7 タンパク発現量

Fig. 5B にヒト UGT2B7 タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス No. 1、No. 3、No. 11 を除いて、

両ドナー由来のキメラマウスともに、ヒト UGT2B7 タンパクの発現が認められた。なお、ヒト UGT2B7 タンパク発現量と hAlb 濃度の相関係数は、ドナーA 由来のキメラマウスで $r = 0.85$ 、ドナーB 由来のキメラマウスで $r = 0.99$ であった。また、キメラマウス No. 15 のヒト UGT2B7 タンパク発現量は、ドナーB の約 2.6 倍であった。

C-3-3. モルフィン 6-グルクロン酸抱合活性

Fig. 5C にモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性の結果を示す。両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb 濃度依存的なモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性の増加が認められた。モルフィン 6-グルクロン酸抱合活性

と hAlb 濃度の相関係数はドナーA 由来のキメラマウスで $r = 0.93$ 、ドナー B 由来のキメラマウスで $r = 0.93$ であった。また、キメラマウス No. 15 の活性値は、ドナーBの活性値の約3.0

倍であった。なお、HLM の活性値はであり、uPA^{+/-}/SCID マウスや uPA^{-/-}/SCID マウスの 41.3 倍、34.8 倍であった。

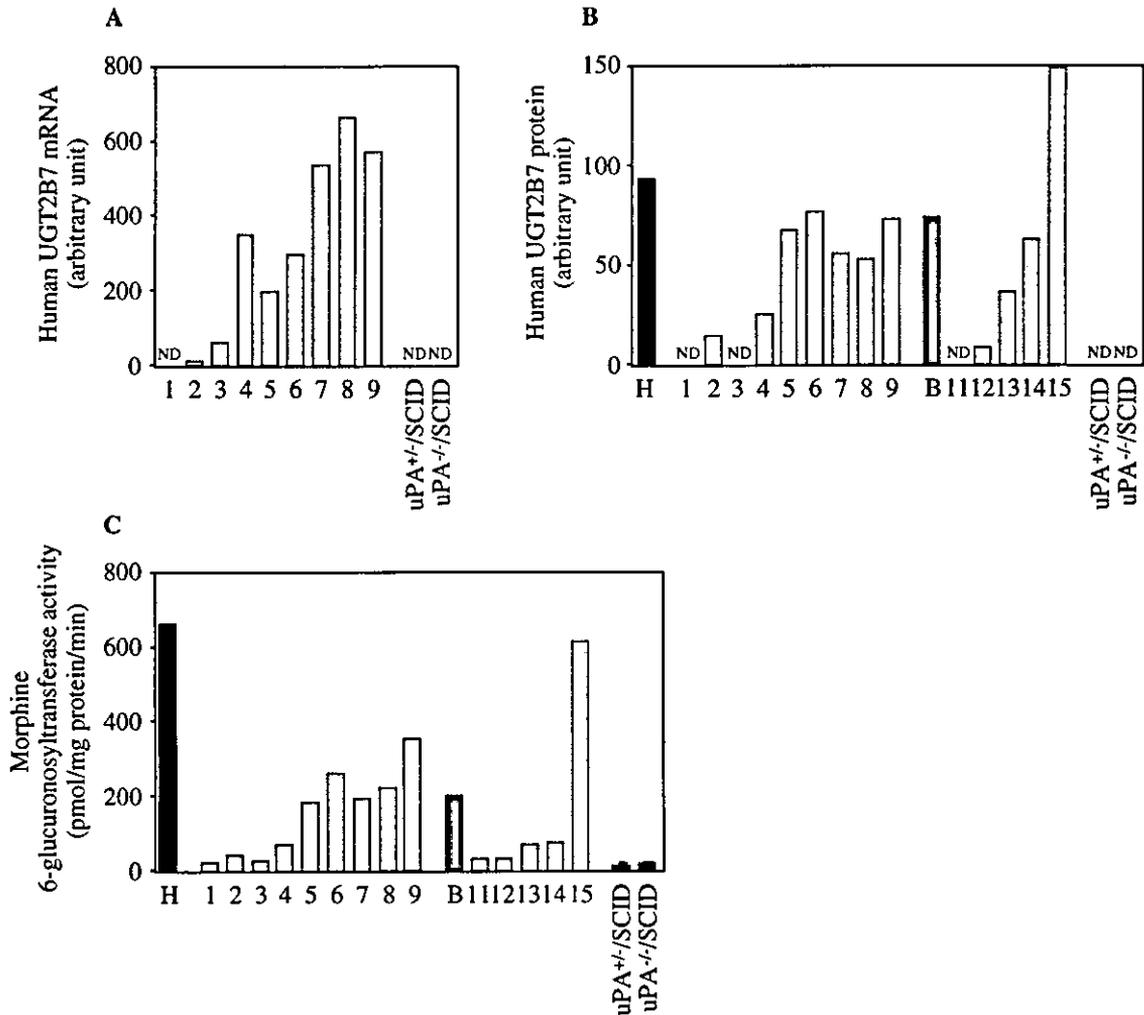


Fig. 5. Human UGT2B7 expression in the chimeric mice. Relative expression levels of human UGT2B7 mRNA (A), the expression of human UGT2B7 protein (B), and morphine 6-glucuronosyltransferase activity (C) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations except in uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice. The columns of uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice represent the mean \pm SD (n=3). The sample numbers are described in Table 1. H: human liver microsomes; B: donor B; ND: not detected.

C-4. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトSULT1A1の発現

C-4-1. ヒト SULT1A1 mRNA 発現量

Fig. 6A ヒト SULT1A1 mRNA 発現量の定量結果を示した。ドナーA由来のキメラマウスにおいて、hAlb濃度依存的なヒト SULT1A1 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト SULT1A1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.90$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト SULT1A1 mRNA 発現が認められた。

Fig. 6B にトログリタゾン硫酸抱合活性の結果を示した。両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb 濃度依存的なトログリタゾン硫酸抱合活性の増加が認められた。トログリタゾン硫酸抱合活性と hAlb 濃度の相関係数はドナーA由来のキメラマウスで $r = 0.69$ 、ドナーB由来のキメラマウスで $r = 0.82$ であった。また、キメラマウス No. 15 の活性値は、ドナーBの活性値とほぼ同等であった。なお、HLCの活性値は、uPA^{+/-}/SCIDマウスと比べて20倍、uPA^{-/-}/SCIDマウスと比べて7倍であった。

C-4-2. トログリタゾン硫酸抱合活性

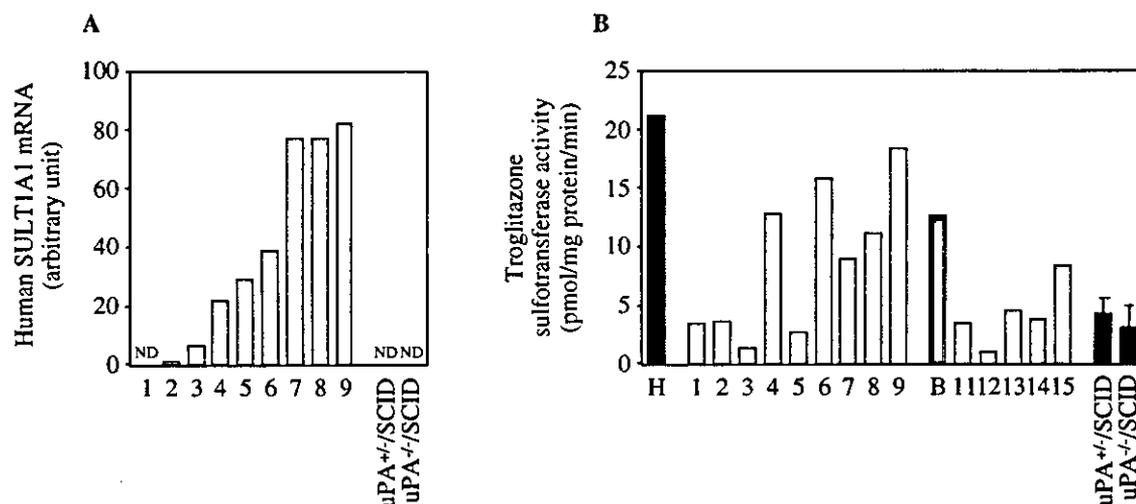


Fig. 6. Human SULT1A1 expression in the chimeric mice.

Relative expression levels of human SULT1A1 mRNA (A) and troglitazone sulfotransferase activity (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations except in uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice. The columns of uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice represent the mean \pm SD ($n=3$). The sample numbers are described in Table 1. H: human live cytosol; B: donor B; ND: not detected.

C-5. ヒト肝細胞キメラマウスにおける SULT1B1 の発現

Fig. 7 にヒト SULT1B1 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト SULT1B1 mRNA 発

現量の増加が認められた。ヒト SULT1B1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.62$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト SULT1B1 mRNA 発現が認められた。

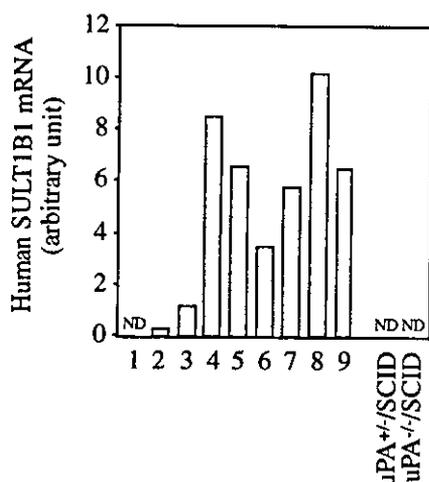


Fig. 7. Human SULT1B1 expression in the chimeric mice.

Relative expression level of human SULT1B1 mRNA was determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. ND: not detected.

C-6. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト SULT1E の発現

C-6-1. ヒト SULT1E1 mRNA 発現量

Fig. 8A にヒト SULT1E1 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト SULT1E1 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト SULT1E1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.92$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くす

べてのキメラマウスでヒト SULT1E1 mRNA 発現が認められた。

C-6-2. ヒト SULT1E タンパク発現量

Fig. 8B にヒト SULT1E タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス No. 1、No. 11 を除いて、両ドナー由来のキメラマウスともに、ヒト SULT1E タンパクの発現が認められた。なお、ヒト SULT1E タンパク発現量と hAlb 濃度の相関係数は、ド

ナーA由来のキメラマウスで $r=0.54$ 、ドナーB由来のキメラマウスで $r=0.90$ であった。また、キメラマウス No. 15 のヒト SULT1E タンパク発現量は、ドナーBの1.4倍であった。

C-6-3. エストロン硫酸抱合活性

Fig. 8C にエストロン硫酸抱合活性の結果を示す。両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb 濃度依存的なエストロン硫酸抱合活性の増加が認められた。トログリタゾン硫酸抱合活性と hAlb 濃度の相関係数はドナーA由来のキメラマウスで $r=0.87$ 、ドナーB由来のキメラマウスで $r=0.90$ であった。また、キメラマウス No. 15 の活性値は、ドナーBの活性値の1.2倍であった。なお、HLC の活性値はであり、uPA^{+/+}/SCID マウスや uPA^{-/-}/SCID マウスでは活性が認められなかった。

C-7. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトSULT2A1の発現

C-7-1. ヒト SULT2A1 mRNA 発現量

Fig. 9A にヒト SULT2A1 mRNA

発現量の定量結果を示す。ドナーA由来のキメラマウスにおいて、ヒト SULT2A1 mRNA の発現が認められた。ヒト SULT2A1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r=0.90$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト SULT2A1 mRNA 発現が認められた。

C-7-2. ヒト SULT2A1 タンパク発現量

Fig. 9B にヒト SULT2A1 タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス No. 1、No. 11 を除いて、両ドナー由来のキメラマウスともに、ヒト SULT2A1 タンパクの発現が認められた。なお、ヒト SULT2A1 タンパク発現量と hAlb 濃度の相関係数は、ドナーA由来のキメラマウスで $r=0.70$ 、ドナーB由来のキメラマウスで $r=0.95$ であった。また、キメラマウス No. 15 のヒト SULT2A1 タンパク発現量は、ドナーBの1.4倍であった。

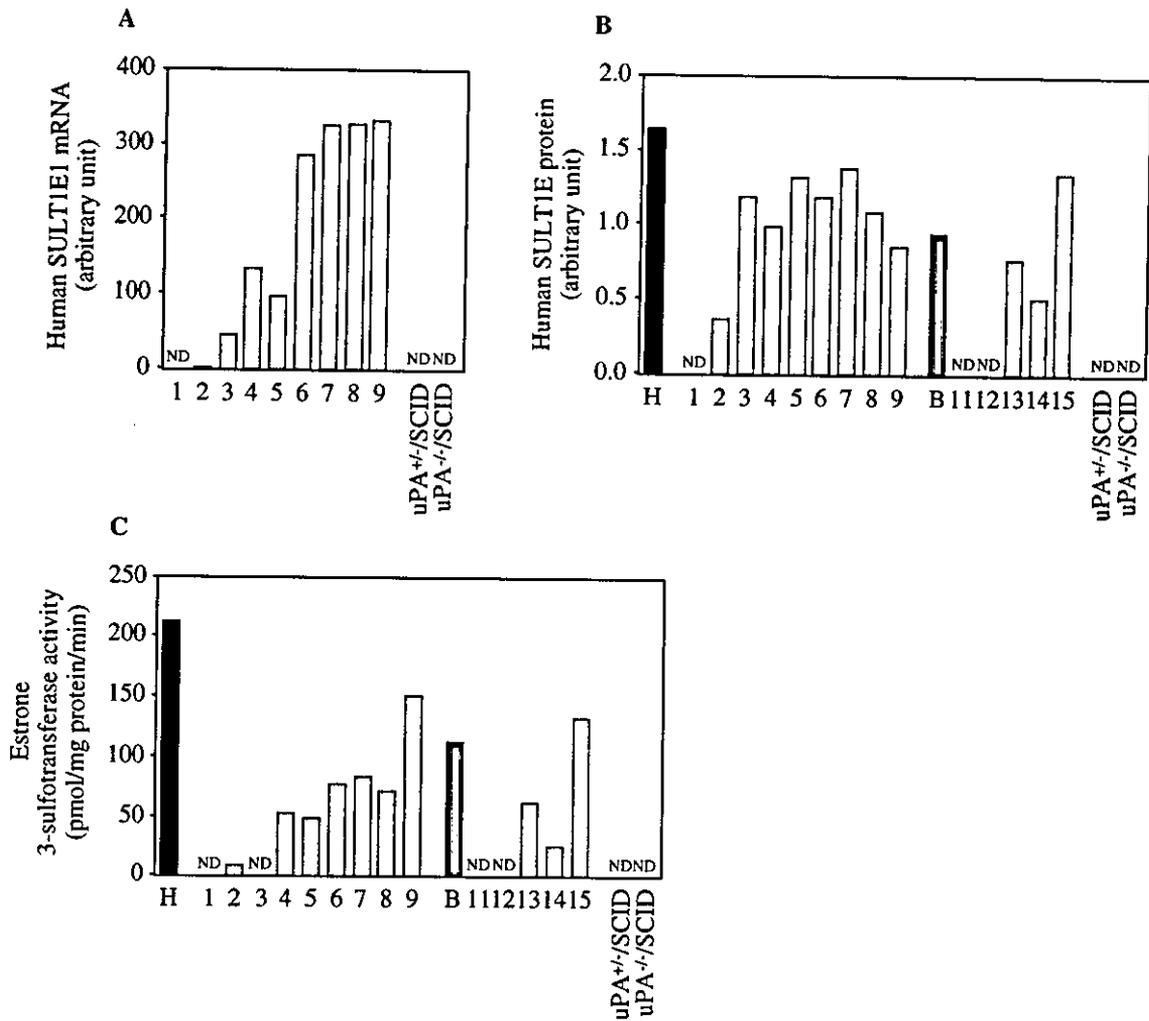


Fig. 8. Human SULT1E1 expression in the chimeric mice. Relative expression levels of human SULT1E1 mRNA (A), the expression of human SULT1E1 protein (B), and estrone 3-sulfotransferase activity (C) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations except in uPA^{+/+}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice. The sample numbers are described in Table 1. H: human live cytosol; B: donor B; ND: not detected.

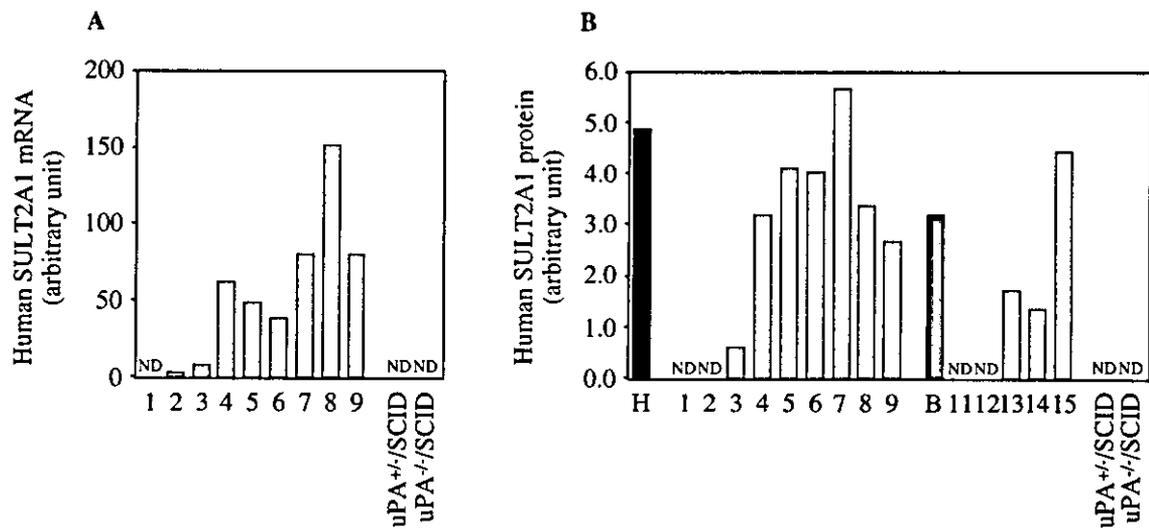


Fig. 9. Human SULT2A1 expressions in the chimeric mice. Relative expression levels of human SULT2A1 mRNA (A) and the expression of human SULT2A1 protein (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. H: human liver cytosol; B: donor B; ND: not detected.

C-8. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト NAT1 の発現

Fig. 10 にヒト NAT1 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト NAT1 mRNA 発現量の

増加が認められた。ヒト NAT1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.67$ であった。また、キメラマウス No. 1、および No. 2 を除くすべてのキメラマウスでヒト NAT1 mRNA 発現が認められた。

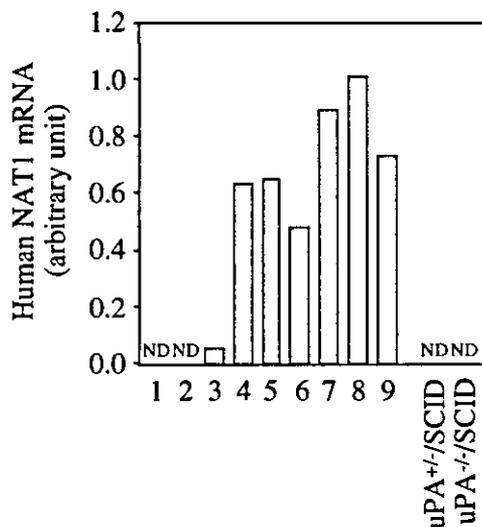


Fig. 10. Human NAT1 expression in the chimeric mice. Relative expression level of human NAT1 mRNA was determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. ND: not detected.

C-9. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト NAT2 の発現

C-9-1. ヒト NAT2 mRNA 発現量

Fig. 11A にヒト NAT2 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA由来のキメラマウスにおいて、hAlb濃度依存的なヒト NAT2 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト NAT2 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r=0.75$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト NAT2 mRNA 発現が認められた。

C-9-2. スルファメタジン N-アセチル抱合活性

Fig. 11B にスルファメタジン N-アセチル抱合活性の結果を示す。ドナーA由来のキメラマウスでは活性がほとんど認められなかった。これに対し、ドナーB由来のキメラマウスでは、hAlb濃度依存的な活性の増加が認められた。ドナーB由来のキメラマウスにおいて、スルファメタジン N-アセチル化抱合活性と hAlb 濃度の相関係数は $r=0.92$ であった。また、キメラマウス No. 15 の活性値は、ドナーBの活性値の 1.3 倍であった。なお、HLCの活性値は、uPA^{+/-}/SCID マウスと比べて 19 倍、uPA^{-/-}/SCID マウスと比べて 26 倍であった。

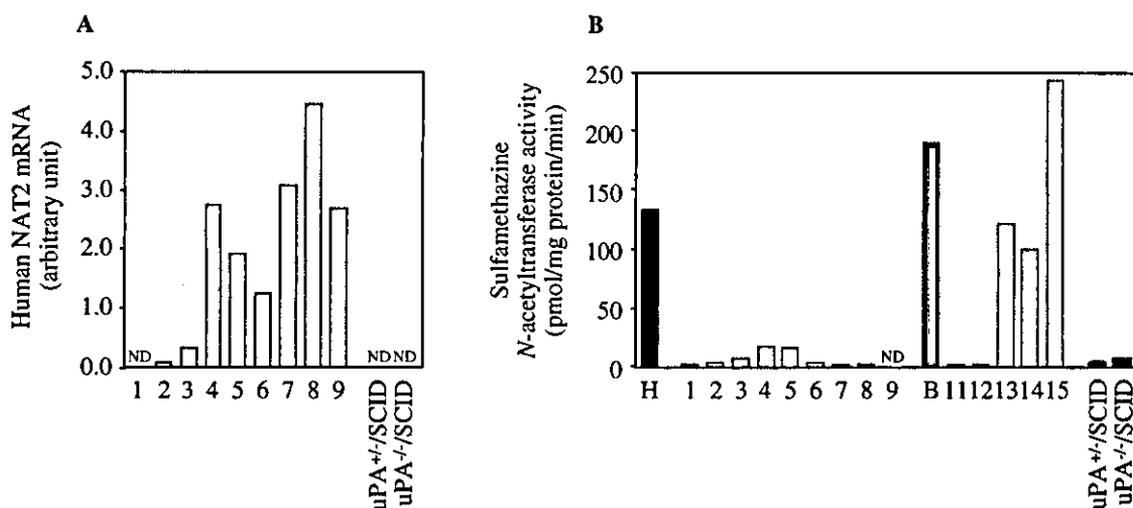


Fig. 11. Human NAT2 expression in the chimeric mice. Relative expression levels of human NAT2 mRNA (A) and sulfamethazine N-acetyltransferase activity (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations except in uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice. The columns of uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice represent the mean \pm SD (n = 3). The sample numbers are described in Table 1. H: human live cytosol; B: donor B; ND: not detected.

C-10. ヒト NAT2 遺伝子型の判定

ドナーA由来のキメラマウスの遺伝

子多型は、NAT2*4/NAT2*6 であった (Fig. 12)。

C-11. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトGSTA1の発現

C-11-1. ヒト GSTA1 mRNA 発現量

Fig. 13A にヒト GSTA1 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト GSTA1 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト GSTA1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.84$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト GSTA1 mRNA 発現が認められた。

C-11-2. ヒト GSTA1-1 タンパク発現量

Fig. 13B にヒト GSTA1-1 タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス No. 1、No. 11 および No. 12 を除いて、両ドナー由来のキメラマウスともに、ヒト GSTA1-1 タンパクの発現が認められた。なお、ヒト GSTA1-1 タンパク発現量と hAlb 濃度の相関係数は、ドナーA由来のキメラマウスで $r = 0.88$ 、ドナーB由来のキメラマウスで $r = 0.90$ であった。また、キメラマウス No. 15 のヒト GSTA1-1 タンパク発現量は、ドナーBの約0.79倍であった。

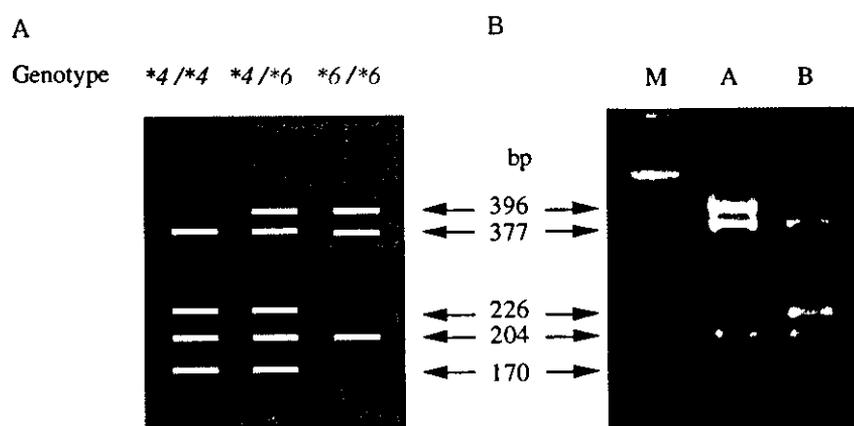


Fig. 12. Genotyping of NAT2*4 or NAT2*6 alleles by PCR-RFLP. A, Schematic PCR-RFLP patterns for different NAT2 alleles. B, Photograph of PCR-RFLP patterns. M: ladder marker, A: a donor A chimeric mouse, B: a donor B chimeric mouse.

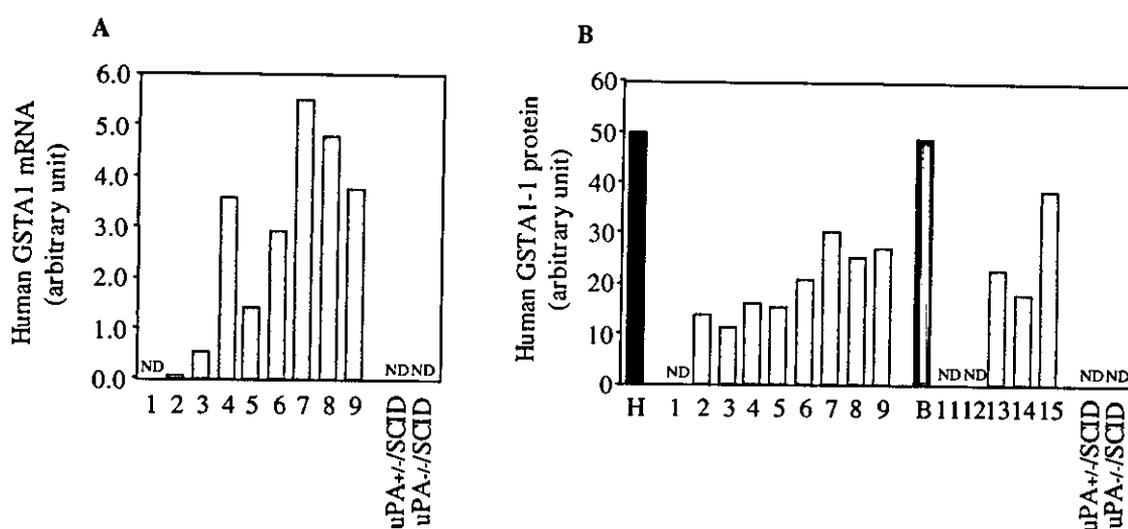


Fig. 13. Human GSTA1-1 expression in the chimeric mice. Relative expression levels of human GSTA1-1 mRNA (A) and the expression of human GSTA1-1 protein (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate. The sample numbers are described in Table 1. H: human liver cytosol; B: donor B; ND: not detected.

C-12. ヒト肝細胞キメラマウスにおける

ヒト GSTA2 の発現

Fig. 14A にヒト GSTA2 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト GSTA2 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト GSTA2 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.73$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト GSTA2 mRNA 発現が認められた。

C-13. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト GSTT1 の発現

Fig. 14B にヒト GSTT1 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト GSTT1 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト GSTT1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.93$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト GSTT1 mRNA 発現が認められた。

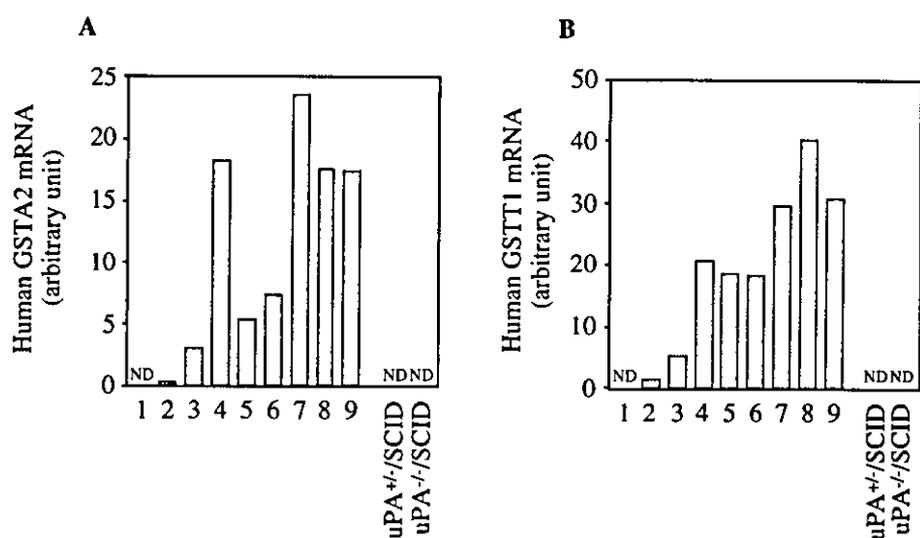


Fig. 14. Human GSTA2 and GSTT1 expressions in the chimeric mice.

Relative expression levels of human GSTA2 mRNA (A) and GSTT1 mRNA (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. ND: not detected.

D. 考察

D-1. UGT

UGT はステロイド、胆汁酸、ビリルビン、ホルモンといった内因性化合物、および薬物、環境化学物質、発癌性物質などの外因性化合物の抱合を行う。UGT は UDP-グルクロン酸を補酵素とし、基質の水酸基、カルボキシル基、アミノ基にグルクロン酸を転移して、 β -グルクロン酸抱合体を生成する。基質は水溶性化合物となり、一般に速やかに排泄される。薬物代謝に関与する UGT は腎臓、肺、小腸にも存在するが、肝臓で多く発現しており、肝臓がグルクロン酸抱合の主要な臓器である。近年、UGT に関する研究はめざましい発展

を遂げたが、以前より UGT の遺伝子変異による遺伝的疾患の存在が明らかにされていた (Tukey and Strassburg, 2000)。ビリルビンの抱合を触媒する UGT1A1 の欠損症が知られており、Crigler-Najjar 症候群タイプ I と呼ばれている。これは、常染色体劣性遺伝であり、ビリルビンをグルクロン酸抱合することができないため非抱合型の高ビリルビン血症を示す。非抱合型のビリルビンが体内に蓄積するため黄疸を呈し、また、ビリルビン脳症を引き起こし、死に至る。また、Crigler-Najjar 症候群タイプ II は野性型の UGT1A1 を有するヒトと比べて約 10% 程度の抱合能を有するため、タイプ I ほどではないが、

非抱合型ビリルビンが高値を示す。しかし、これらの疾患の頻度は極めて低い。このほかに、UGT1A1 の変異が原因であると考えられている疾患には Gilbert 症候群がある。野性型の UGT1A1 は(TA)₆TAA であるが、一般的に Gilbert 症候群の患者は (TA)₇TAA のアレル (UGT1A1*28) を有することが知られている。このほかにも UGT1A1*6 (G221A)、UGT1A1*27 (C686A)、UGT1A1*29 (C1099G) を有する場合もある。UGT1A1*28 のアリル頻度は白人で約 30%(Lampe et al., 1999; Kohle et al., 2003)、日本人では約 14%と報告されている (Ando et al., 1998)。Gilbert 症候群は約 3-10%のヒトで認められるが、肝の UGT1A1 抱合活性は野性型を有するヒトの約 30%程度であり、血中のビリルビン濃度は正常値を示すため高ビリルビン血症は認められない。しかし、UGT1A1*28 をホモ、もしくはヘテロで有するヒトにおいて、イリノテカンの副作用が強く現れたことが報告されている (Ando et al., 2000)。イリノテカンはカルボキシエステラーゼにより活性代謝物である SN-38 に変換され、その後 UGT1A1 にてグルクロン酸抱合される。従って、グルクロン酸抱合能が低いヒトにおいて、SN-38 の毒性が強く発現したと考えられる。

従って、薬物がグルクロン酸抱合されるかどうかを明らかにすることは、薬効および副作用発現を予測するに際し、極めて重要であると考えられる。本章では、Phase II 酵素の一つである UGT のヒト肝細胞キメラマウスにおける発現とその機能を明らかにすることを目的に mRNA、タンパク、酵素活性レベルでの検討を行った。

まず、UGT1A1 について述べる。ドナーA 由来のキメラマウスの肝において、ヒト UGT1A1 mRNA が発現していることを明らかにした。また、ドナーA およびドナーB 由来のキメラマウスにヒト UGT1A1 タンパクが発現していることを明らかにした。キメラマウスの肝臓を用いて、ヒト UGT1A1 酵素活性の検討を行うことができなかったが、これは、ヒトのみで酵素活性が認められる交差反応を示さない基質を見つけられなかったためである。ヒトにおいて UGT1A1 は肝臓や小腸などの初回通過効果に重要な役割を果たす臓器に発現しており、上述したように、遺伝子多型の存在から薬物の体内動態に大きな影響を及ぼす。また、UGT1A1 はクロフィブラートやデキサメタゾンなどにより誘導されることが報告されている (Magdalou et al., 1993)。2002 年にアメリカで処方された上位 200

の薬物の中で、グルクロン酸抱合される薬物の約 1/4 が UGT1A1 で触媒される (Williams et al., 2004)。従って、UGT1A1 は経口投与された薬物のバイオアベイラビリティの変動を左右する重要な因子であるため、薬物がヒト UGT1A1 の基質であるかを検討することは医薬品開発においては必要である。酵素活性の検討を行う必要があるが、キメラマウスにおいてヒト UGT1A1 が発現していることが明らかになった。

次に UGT1A9 について述べる。ヒトにおいて UGT1A9 は肝臓、生殖器、小腸、結腸、腎臓に発現しており、エストロゲンや甲状腺ホルモンなど内因性化合物の抱合や、多くのフェノール性化合物の抱合に関与する。最近、ヒト UGT1A9 の遺伝子変異に関する報告がなされたが (Jinno et al., 2003; Saeki et al., 2003)、これらの変異が酵素活性にどの程度影響を及ぼすかについては詳細な検討がなされていない。しかし、UGT1A9 は内因性化合物だけでなく、実際に臨床で使用されている薬物であるプロポフォール、アセトアミノフェン、SN-38 の抱合に関与することが示唆されているため、UGT1A9 について検討することは重要である。本章ではマウスとの交差反応性や基質特異性の問題よりタンパク、酵素活性に

関する検討を行うことができなかったが、ヒト UGT1A9 mRNA の発現は認められた。UGT1A9 についてはさらに詳細に検討する必要があると考えられる。

次に UGT2B7 について述べる。ヒト UGT2B ファミリーの中で、最も主要な分子種が UGT2B7 であり、肝臓、小腸、結腸、食道、脳、腎臓、膵臓など多岐にわたる臓器に発現している。また、2002 年にアメリカで処方された上位 200 の薬物の中で、グルクロン酸抱合される薬物の 35% が UGT2B7 で触媒される (Williams et al., 2004)。Williams ら (2004) の報告によると、UGT2B7 がグルクロン酸抱合に関与する UGT のうち最も薬物を抱合する割合が多い。従って、UGT2B7 に関して特に詳細に検討をする必要があると考えられる。ヒトにおいて UGT2B7 は非ステロイド性消炎鎮痛薬、ジドブジンといった薬物をはじめ、エストロゲンやアンドロステロン、レチノイド、脂肪酸といった内因性化合物の抱合を触媒する。また、モルフィンも UGT2B7 によりグルクロン酸抱合を受けるが、代謝物としては 3-グルクロン酸と 6-グルクロン酸の 2 種が認められている。この代謝物の比が動物種により異なることが報告されている (Kuo et al., 1991)。予備検討の結果、モルフ

イン 3-グルクロン酸抱合活性はヒトとマウスで大きな違いは認められなかった。しかし、本章の結果から、BD Gentest 社製プールド HLM を用いた場合、ヒトにおいてモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性はマウスの 35 から 41 倍高値を示した。従って、モルフィン 6-グルクロン酸抱合活性は、キメラマウスの肝におけるヒト化の指標として適切であると考えられる。ヒト UGT2B7 mRNA、ヒト UGT2B7 タンパクおよびモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性は hAlb 濃度依存的な増加が認められたため、キメラマウスの肝にヒト UGT2B7 が発現していることが明らかになった。キメラマウス No. 15 はドナー B よりも、タンパクおよび酵素活性で約 2 倍高値を示したが、この理由は不明である。キメラマウス No. 15 のみ高い値を示しているため、UGT2B7 がキメラマウスで発現しやすいということよりも、キメラマウスの個体差が影響していると考えられる。

D-2. SULT

SULT はホルモン、神経伝達物質、薬物、変異原性物質など様々な内因性、外因性化合物の解毒や活性化に重要な役割を果たしている (De Meio, 1975; Jakoby et al., 1980; Yamazoe et al., 1994)。薬物代謝に関与する

SULT は主にサイトゾル画分に存在する。SULT は PAPS を補酵素とし、硫酸基を基質中の水酸基、アミノ基およびチオール基に転移させる (Glatt, 2000)。この反応によって脂溶性基質の極性が増加し、薬物は比較的容易に尿や糞に排泄される。しかし、癌原性物質の一部は、硫酸抱合を受けると容易に DNA やタンパク質に結合する活性体へと変化することが知られている。SULT の代表的な基質として、ドパミン、エストロゲンおよび甲状腺ホルモンなどがある。SULT はこれらの生体内物質のホメオスタシスに大きく関与している。また、鎮痛薬のアセトアミノフェンやアドレナリン β 作動薬のイソプロテレノールを代謝し、一方で癌原性物質である *N*-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレンなどを活性化する作用がある。このような多様な働きを有する SULT について検討することは重要である。本章では、Phase II 酵素の一種である SULT のヒト肝細胞キメラマウスにおける発現とその機能を明らかにすることを目的に mRNA、タンパク、酵素活性レベルでの検討を行った。

ヒトにおいてサイトゾル画分に存在する SULT は SULT1、SULT2、SULT4 の 3 つのファミリーから成り、11 分子種に分類される (Blanchard et

al., 2004)。中でも、SULT1 と SULT2 ファミリーが内因性、外因性化合物の抱合に重要な役割を果たす。ヒトにおいて、SULT1 ファミリーに属するのは SULT1A1、SULT1A2、SULT1A3、SULT1B1、SULT1C1、SULT1C2 および SULT1E1 である。また、SULT2 ファミリーには SULT2A1、SULT2B1 v1 および SULT2B1 v2 が属する。現在までに、SULT1A2、SULT1B1、SULT1C1、SULT1C2、SULT2B1 v1 および SULT2B1 v2 については特異的な基質は発見されておらず、あまり研究されていない。

まず、SULT1A1 について述べる。SULT1A1 はヒト肝サイトゾルにおいて主要な SULT 分子種である (Coughtrie and Fisher, 2003)。フェノールやアシル基を有する化合物を基質とし、様々なヒト臓器で発現が認められている (Glatt, 2000)。ドナーA 由来のキメラマウスの肝において、ヒト SULT 1A1 mRNA が発現していることを明らかにした。ヒト SULT1A1 タンパク発現量に関しては、ヒト特異的抗体を入手することができなかったため、検討することができなかった。

ヒトにおいてトログリタゾン硫酸抱合反応には、SULT1A1 と SULT1E1 が関与しているが、

SULT1A1 の肝における発現量は SULT1E1 の 13 倍であるため、肝においては SULT1A1 が主要な酵素であると報告されている (Honma et al., 2002)。また、トログリタゾンは、ヒトでは硫酸抱合体が、マウスではグルクロン酸抱合体が主要代謝物であり (Shibata et al., 1993; Kawai et al., 1997; Loi et al., 1997)、本章の結果からも、マウスにおいては硫酸抱合活性がヒトと比べて顕著に低かったため、トログリタゾンの硫酸抱合活性は SULT1A1 の指標活性として適切であると考えられる。本章で、トログリタゾン硫酸抱合活性は、hAlb 濃度の高いキメラマウス No. 15 でドナーと同程度の活性が認められた。これより、キメラマウスの肝におけるトログリタゾン硫酸抱合能はドナーと同程度であると示唆された。

hAlb 濃度が 0 mg/mL であるキメラマウス No. 1、No. 11 のトログリタゾン硫酸抱合活性は低いが出された。しかし、uPA^{+/+}/SCID マウスは肝不全を呈し、長期間生存することは不可能である。本章で用いたキメラマウスは 11~14 週齢であるため、キメラマウス No. 1 や No. 11 はマウスの肝にヒト肝細胞に生着しなかったが、マウス肝細胞が再生し、肝としての機能を果たすことができたため、生存できたと推測される。これ

より、これらのキメラマウスで検出された抱合活性は、uPA^{+/-}/SCID マウスおよび uPA^{-/-}/SCID マウスの本抱合活性と同程度であったため、マウス由来と考えられる。また、キメラマウス No. 3、No. 12 では、マウスの活性よりも低い値であった。これは、ともに hAlb 濃度が 0 mg/mL ではないが、1~2 mg/mL と低い個体であるため、キメラマウス No. 1 や No. 11 ほどマウスの肝細胞は再生していないが、ヒトの肝細胞も十分に生着していないため、抱合活性がマウスよりも低くなったと考えられる。あるいはキメラマウスの個体差とも考えられるが、詳細は不明である。

SULT1A3 はドパミンやノルエピネフリンなどのカテコールアミン類の硫酸抱合に関与する (Glatt, 2000)。他の動物種において SULT1A3 に類似した基質特異性を示す ortholog と考えられる分子種はこれまで発見されていない (Blanchard et al., 2004)。しかし、SULT1A3 はヒトにおいて主に小腸や脳で高く発現しているが、肝ではほとんど発現していないため (Glatt, 2000)、本章では検討しなかった。

次に、SULT1B1 について述べる。ドナーA 由来のキメラマウスの肝においてヒト SULT1B1 mRNA が発現

していることを明らかにした。ヒト SULT1B1 のタンパク発現および酵素活性に関しては、今後の検討課題と考えられる。

次に、SULT1E1 について述べる。SULT1E1 はエストロンやエストラジオールなどエストロゲンの硫酸抱合に関与し、エストロゲン作用の調節に重要な役割を果たすと考えられている (Coughtrie and Fisher, 2003)。SULT1E1 はヒトにおいて肝だけでなく子宮内膜や空腸などにも発現している (Glatt, 2000)。キメラマウスの肝において、ヒト SULT1E1 mRNA およびヒト SULT1E タンパクが発現していることを明らかにした。ヒト SULT1E1 mRNA とヒト SULT1E タンパク発現量の相関係数は $r = 0.57$ と、高くはなかった。これは、肝サイトゾルはほぼすべての葉を用いて調製するのに対し、total RNA は採取した肝の一部を使用して調製したことが原因として考えられる。また、翻訳過程に関する因子の発現に関して、個体差が存在している可能性もあるが、この点に関しては、さらなる検討を行う必要があると考えられる。

エストロンは SULT1E1 の代表的基質であり、マウスのエストロン硫酸抱合活性は睾丸、胎盤や子宮で高く、肝や副腎で低いといわれている (Hobkirk and Glasier, 1992)。本

章で測定したキメラマウスのエストロン硫酸抱合活性は、マウス肝サイトゾルで検出されなかったため、ヒト由来の活性値と考えられる。hAlb濃度の高いキメラマウス No. 15 でドナーと同程度の活性が確認された。これより、キメラマウスの肝におけるエストロン硫酸抱合能はドナーと同程度であると示唆された。しかし、SULT 発現系を用いた実験で、エストロン硫酸抱合活性の最大活性を示すエストロン濃度は、ヒト SULT1E1 で 20 nM、ヒト SULT1A1 で 6 μ M、ヒト SULT2A1 で 25 μ M であったとの報告がなされている (Falany et al., 1995; Falany, 1997)。また、発現系を用い、エストロン濃度 50 μ M の条件で行った実験でエストロン硫酸抱合活性は、ヒト SULT1A1 でヒト SULT1E1 の 3 倍、ヒト SULT2A1 でヒト SULT1E1 の 1/3 と報告されている (Suiko et al., 2000)。これより、エストロン濃度が本章で用いた 50 μ M の場合、エストロン硫酸抱合活性は SULT1E1 特異的ではなく、SULT1A1 などの他の SULT 分子種の寄与が考えられる。

次に、SULT2A1について述べる。SULT2A1はデヒドロエピアンドロステロンやプレグネロンなどステロイドの硫酸抱合を触媒し、ヒトにおいて肝、副腎、空腸などで発現が認

められている (Glatt, 2000)。キメラマウスの肝において、ヒトSULT 2A1 mRNAおよびヒトSULT2A1タンパクが発現していることを明らかにした。ヒト SULT2A1 mRNA と ヒト SULT2A1タンパク発現量の相関係数は $r = 0.64$ と、それほど高くはなかった。これは、上述した理由のためと考えられる。また、SULT2A1においてはヒト特異的な酵素活性を見つけることができなかつたため、更なる検討が必要と考えられる。

D-3. NAT

NATは薬物や環境中の癌原性物質を含む様々なアミン類の生体内変化に関与している (Badawi et al., 1995; Hein et al., 2000)。NATはサイトゾル画分に存在し、通常アセチルコエンザイム A を補酵素とし、アリルアミンの N-アセチル化やヒドロキシ体の O-アセチル化反応を触媒する。NATには遺伝子多型が多く存在する。特に、NAT2には30を越える遺伝子変異が報告されており (Arylamine N-acetyltransferase (NAT) Nomenclature)、これらの変異は、様々な薬物、癌原性物質や生体異物などの生体内変化に大きな個人差を引き起こす (Evans, 1989; Hein et al., 1993)。アセチル抱合能が高い Rapid acetylator (RA) と低い Slow