

acetylator (SA) に分類することができるが、これは NAT2 の遺伝子変異が大きく影響している。イソニアジドやプロカインアミドは NAT2 の代表的基質であるが、SA では、イソニアジドによる多発性神経炎や、プロカインアミドによる全身性エリテマトーデス様症状が起りやすい (北田, 2001)。従って、薬物の代謝に NAT が関与するかどうかを検討することは重要である。本章では、NAT 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、酵素活性レベルでの検討を行った。

まず、NAT2 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 NAT2 mRNA が発現していることを明らかにした。ヒト NAT2 タンパクの発現に関しては、ヒト特異的な抗体を入手することができなかつたため、検討することはできなかつた。ヒト NAT2 の代表的な指標活性であるスルファメタジン *N*-アセチル抱合活性は、マウスのサイトゾル画分を酵素源とした場合、ほとんど認められなかつたと報告されている

(Tannen and Weber, 1979)。これは本章の結果と一致する。これより、スルファメタジン *N*-アセチル抱合活性はヒト特異的であり、キメラマウスのヒト NAT2 抱合活性を評価する

適切な指標であると考えられる。ドナー B 由来のキメラマウスにおいては、ドナーとほぼ同程度のスルファメタジン *N*-アセチル抱合活性を示すことが明らかになった。しかし、ドナー A 由来のキメラマウスでは、活性がほとんど検出されず、マウスの活性と同程度であった。ドナー A は SA である可能性が示唆された。SA の頻度は、日本人や中国人では約 5-20% (Ellard, 1976)、白人、黒人やメキシコ人では約 40-60% と報告されている (Ellard, 1976; Cascorbi et al., 1995; Brocvielle et al., 2003)。NAT2\*5、NAT2\*6、NAT2\*7 は、アミノ酸変異を伴う変異型であり、アセチル抱合能の低下に関与するといわれている。また白人の SA の 90% 以上は NAT2\*5、NAT2\*6 をホモ、もしくは NAT2\*5、NAT2\*6、NAT2\*7 をヘテロで 2 つ有すると報告されている (Cascorbi et al., 1995)。ドナー A は白人であるため、ドナー A 由来キメラマウスについて、白人でアリル頻度の高い NAT2\*5、NAT2\*6、NAT2\*7 の遺伝子判定をおこなった (Gross et al., 1999; Garte et al., 2001)。なお、NAT2\*5 の変異を 2 種の AS-PCR 法で判定した。その結果、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。白人

の SA の 99%以上は NAT2\*5、NAT2\*6、NAT2\*7、NAT2\*13 を有すると報告されている (Meyer and Zanger, 1997)。しかし、NAT2\*13 はアミノ酸変化を伴わず、Fretland ら (2001) の発現系を用いた *in vitro* の実験では、NAT2 タンパク質もスルファメタジン N-アセチル抱合活性も野性型と比べて顕著な減少は認められなかった。NAT2\*13 については *in vivo* 実験と *in vitro* 実験の結果が異なる可能性が示唆されるため、NAT2\*13 を有するかについて判定する必要があると考えられる。また、ドナー A はその他の変異型を有している可能性も否定できないため、さらなる検討が必要と考えられる。

次に、NAT1 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 NAT1 mRNA が発現していることを明らかにした。ヒト NAT1 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。

#### D-4. GST

GST は求核性のグルタチオンと親電子性化合物との抱合反応を触媒する解毒系の酵素の一種である。グルタチオンは含硫アミノ酸であるシステインを含むトリペプチドであり、種々の化合物を酸化型から還元型に

変換する還元剤としての役割を果たし、酸化的傷害から細胞を防御する上で中心的な役割を演じている。薬物は Phase I 酵素により反応性に富む親電子性の代謝中間体を形成する場合があります、これらが核酸やタンパク質などの求核性官能基を有する生体高分子と反応し、遺伝子の変異やタンパク質の修飾などの毒性を発揮する。GST はこれらの代謝中間体や脂溶性ニトロ、ハロゲン化合物、エポキシドや不飽和カルボニル化合物などの多くの外来異物化合物とグルタチオンの求核性イオウ原子との反応を触媒し、生体高分子との反応を防ぐとともに、抱合により化合物の溶解性を高める。その他にも GST は脂質や核酸の過酸化物に対するグルタチオンペルオキシダーゼ活性、およびステロイドホルモンやプロスタグランジンなどに対するイソメラーゼ活性も有する。GST は肝の可溶性タンパクの約 10%を占め、これまでに Alpha、Mu、Pi、Theta、Zeta クラスといった多くの分子種が同定されている。GST はヒトにおいて、肝、腎、肺、脳、骨格筋、皮膚、精巣など多くの組織に分布しているが、臓器により発現している分子種が異なる。ヒト肝においては GSTA1、GSTA2、GSTM1、GSTT1、GSTT2 分子種が発現している。ただし、ヒトでの GST

分子種の臓器分布の結果は必ずしも他の動物種に当てはまるわけではない。また、GSTには遺伝子多型が存在する。GSTM1遺伝子は日本人の約半数で欠損し、GSTM1タンパクが発現していない。GSTM1遺伝子欠損の頻度は人種により異なり、ミクロネシア人やポリネシア人では90-100%に達する。また、GSTT1遺伝子の欠損者は日本人で約60%であるのに対し、欧米人では10-20%である。その他、多くのSNPsが報告されているが、グルタチオン抱合に対する影響は詳細には解明されていない。近年、Watanabeら(2003a)により、2000年3月に重篤な肝障害により市場から回収されたII型糖尿病の治療薬であったトログリタゾンについて、ヒトでのトログリタゾンによるトランスアミナーゼ上昇とGSTM1、GSTT1両遺伝子の欠損(double null mutations)に相関が認められる可能性が示唆された。これらのことをふまえて、薬物がグルタチオン酸抱合されるかどうかを明らかにすることは、特に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GST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およびタンパクレベルでの検討を行った。

まず、GSTA1について述べる。主要なGSTは分子量25,000前後のサブユニットからなるホモあるいはヘテロ二量体であり、同一クラス内のサブユニットで二量体を形成する。例えばGSTA1-1はGSTA1のホモ二量体であり、GSTA1-2はGSTA1とGSTA2のヘテロ二量体である。GSTA1-1を認識するウサギ抗ヒトGSTA1-1抗体が市販されていたため、本章ではGSTA1-1タンパクの発現量を検討した。なおGSTA1はベンズピレン誘導体の抱合を行うほか、ケトステロイドに対するイソメラーゼ活性、プロスタグランジンH<sub>2</sub>からF<sub>2</sub>αの合成などを行う。その他、発癌性を示すアゾ色素、ステロイドホルモンやビリルビンの結合タンパクとして報告されたりガンジン(Yタンパク質)がAlphaクラスのGSTであることが証明されている。ドナーA由来のキメラマウスにおいてヒトGSTA1 mRNAが発現していることを明らかにし、また、GSTA1-1タンパクが両ドナー由来のキメラマウスにおいて認められた。

次にGSTA2について述べる。GSTA2は過酸化脂質の還元(グルタチオンペルオキシダーゼ活性)およびヘム、ビリルビン、グルココルチコイド、胆汁酸などの結合タンパクとして知られている。GSTA2につい

では mRNA レベルの検討であるが、キメラマウスの肝に発現していることが明らかになった。

また、GSTT1 についてであるが、これはエポキシドやハロゲン化アルケンの抱合を行うと言われていた。GSTT1 についても mRNA レベルでの検討であるが、キメラマウスの肝に発現していることが明らかになった。

GST に関しては、ヒト特異的な基質を見つけることが出来なかったため酵素活性レベルでの検討を行うことができなかったが、UGT、SULT および NAT における検討結果より、おそらくキメラマウスの肝で酵素活性を有すると推測される。

## E. 結論

本章ではヒト肝細胞キメラマウスの肝にはヒト UGT、SULT、NAT および GST が発現していることを mRNA、タンパク、酵素活性レベルで明らかにした。また、キメラマウスに発現する Phase II 酵素はドナーと同程度の酵素活性を有することを明らかにした。

## F. 健康危険情報：なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表：なし

### 2. 学会発表：

Expression of human Phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver；第 19 回日本薬物動態学会年会、平成 16 年 11 月 17-19 日、金沢

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

## I. 捕捉（文中で使用した引用文献を示す）

Ando Y, Chida M, Nakayama K, Saka H and Kamataki T (1998) The *UGT1A1\*28* allele is relatively rare in a Japanese population. *Pharmacogenetics* **8**: 357-360.

Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K and Hasegawa Y (2000) Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* **60**: 6921-6926.

Arylamine *N*-acetyltransferase (NAT) Nomenclature.  
[www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html](http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html).

Badawi AF, Hirvonen A, Bell DA, Lang NP and Kadlubar FF (1995) Role of aromatic

- amine acetyltransferase, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Res* **55**: 5230-5237.
- Blanchard RL, Freimuth RR, Buck J, Weinshilboum RM and Coughtrie MW (2004) A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics* **14**: 199-211.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brilliant MH, Gondo Y and Eicher EM (1991) Direct molecular identification of the mouse pink-eyed unstable mutation by genome scanning. *Science* **252**: 566-569.
- Brocvielle H, Muret P, Goydadin AC, Boone P, Broly F, Kantelip JP and Humbert P. (2003) *N*-acetyltransferase 2 acetylation polymorphism: prevalence of slow acetylators does not differ between atopic dermatitis patients and healthy subjects. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **16**: 386-392.
- Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K and Roots I (1995) Arylamine *N*-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet* **57**: 581-592.
- Coughtrie MW and Fisher MB (2003) The role of sulfotransferases (SULTs) and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in human drug clearance and bioactivation, in *Drug Metabolizing Enzyme* (Lee JS, Obach RS and Fisher MB eds) pp 541-575, Marcel Dekker, New York.
- 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.
- De Meio RH (1975) Sulfate Activation and Transfer, in *Metabolic Pathways* vol 7, pp 287-358, Academic Press, New York.
- Ellard QA (1976) Variations between individuals and populations in the acetylation of isoniazid and its significance for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Clin Pharmacol Ther* **19**: 610-625.
- Estrada-Rodgers L, Levy GN and Weber WW (1998) Substrate selectivity of mouse *N*-acetyltransferases 1, 2, and 3 expressed in COS-1 cells. *Drug Metab Dispos* **26**: 502-505
- Evans DA (1989) *N*-acetyltransferase. *Pharmacol Ther* **42**: 157-234.
- Falany CN (1997) Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J* **11**: 206-216.
- Falany CN, Krasnykh V and Falany JL (1995) Bacterial expression and

- characterization of a cDNA for human liver estrogen sulfotransferase. *J Steroid Biochem Mol Biol* **52**: 529–39.
- Fretland AJ, Leff MA, Doll MA and Hein DW (2001) Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenetics* **11**: 207–215.
- Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell’Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC and Taioli E (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Pres* **10**: 1239–48.
- Glatt H (2000) Sulfotransferase, in *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics* (Loannides C ed) pp 353–439, John Wiley & Sons, West Sussex.
- Gross M, Kruisselbrink T, Anderson K, Lang N, McGovern P, Delongchamp R and Kadlubar F (1999) Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**: 683–692.
- Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng Y, Ferguson RJ and Grant DM (1993) Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* **14**: 1633–1638.
- Hobkirk R and Glasler MA (1992) Estrogen sulfotransferase distribution in tissues of mouse and guinea pig: steroidal inhibition of the guinea pig enzyme. *Biochemistry and Cell Biology* **70**: 712–715.
- Hein DW, McQueen CA, Grant DM, Goodfellow DH, Kadlubar FK and Weber WW (2000) Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases *Drug Metab Dispos* **28**: 1425–1432.
- Honma W, Kamiyama Y, Yoshinari K, Sasano H, Shimada M, Nagata K, and Yamazoe Y (2001) Enzymatic characterization and interspecies difference of phenol sulfotransferases, ST1A forms. *Drug Metab Dispos* **29**: 274–281.
- Honma W, Shimada M, Sasano H, Ozawa S, Miyata M, Nagata K, Ikeda T and Yamazoe Y (2002) Phenol sulfotransferase, ST1A3, as the main enzyme catalyzing sulfation of troglitazone in human liver. *Drug Metab Dispos* **30**: 944–949.

- Jakoby WB, Sekura RD, Lyon ES, Marucs CJ and Wang J (1980) Sulfotransferase, in *Enzymatic Basis of Detoxification* (Jakoby WB ed) vol 2, pp 199-228, Academic Press, New York.
- Jinno H, Saeki M, Saito Y, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Sai K, Kaniwa N, Ando M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Ozawa S, Sawada J (2003) Functional characterization of human UDP-glucuronosyltransferase 1A9 variant, D256N, found in Japanese cancer patients. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 688-693.
- Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2004) Expression of human cytochromes p450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* **32**: 1402-1410.
- Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2005) In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* in press.
- Kawai K, Kawasaki-Tokui Y, Odaka T, Tsuruta F, Kazui M, Iwabuchi H, Nakamura T, Kinoshita T, Ikeda T, Yoshioka T, Komai T and Nakamura K (1997) Disposition and metabolism of the new oral antidiabetic drug troglitazone in rats, mice and dogs. *Arzneimittelforschung* **47**: 356-368.
- 北田光一 (2001) 3.5 薬物の抱合と薬効・毒性の変化 薬物代謝学 (加藤隆一・鎌滝哲也編) pp 87-92, 東京化学同人, 東京.
- Kohle C, Mohrle B, Munzel PA, Schwab M, Wernet D, Badary OA and Bock KW (2003) Frequent co-occurrence of the TATA box mutation associated with Gilbert's syndrome (*UGT1A1\*28*) with other polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase-1 locus (*UGT1A6\*2* and *UGT1A7\*3*) in Caucasians and Egyptians. *Biochem Pharmacol* **65**: 1521-1527.
- Kuo CK, Hanioka N, Hoshikawa Y, Oguri K and Yoshimura H (1991) Species difference of site-selective glucuronidation of morphine. *J Pharmacobiodyn* **14**: 187-193.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lampe JW, Bigler J, Horner NK and Potter JD (1999) UDP-glucuronosyltransferase (*UGT1A1\*28* and *UGT1A6\*2*) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations. *Pharmacogenetics* **9**: 341-349.
- Loi CM, Knowlton PW, Stern R, Randinitis EJ, Vassos AB, Koup JR and Sedman AJ (1997) Lack of effect of type II diabetes on the pharmacokinetics of troglitazone in a multiple-dose study. *J Clin Pharmacol* **37**: 1114-1120.
- Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Pritchard

- M and Siest G (1993) Peroxisome proliferators as inducers and substrates of UDP-glucuronosyltransferases. *Biol Cell* **77**: 13-16.
- 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.
- Meyer UA and Zanger UM (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 269-296.
- 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.
- Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Ozawa S and Sawada J (2003) Three Novel Single Nucleotide Polymorphisms in UGT1A9. *Drug Metab Pharmacokinet* **18**: 146-149.
- Shibata H, Nii S, Lobayashi M, Izumi T, Maeda E, Sasahara K, Yamaguchi K, Morita A and Nishiwaki A (1993) Phase I study of a new hypoglycemic agent-CS-045 in healthy volunteers safety and pharmacokinetics in single administration. *Rinsyou Iyaku* **9**: 1503-1518.
- Suiko M, Sakakibara Y and Liu MC (2000) Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 80-84.
- Suzuki T, Miki Y, Nakata T, Shiotsu Y, Akinaga S, Inoue K, Ishida T, Kimura M, Moriya T and Sasano H (2003) Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in normal human tissue and breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Bio* **86**: 449-454.
- Tannen RH and Weber WW (1979) Rodent models of the human isoniazid-acetylase polymorphism. *Drug Metab Dispos* **7**: 274-279.
- 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 drug. *Am J Pathol* **165**: 901-912.
- Tukey RH and Strassburg CP (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 581-616.
- 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.



Watanabe I, Tomita A, Shimizu M, Sugawara M, Yasumo H, Koishi R, Takahashi T, Miyoshi K, Nakamura K, Izumi T, Matsushita Y, Furukawa H, Haruyama H and Koga T (2003a) A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther* **73**: 435-55.

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 (2003b) Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers. *Transplantation* **75**: 1873-1880.

Watanabe Y, Nakajima M and Yokoi T (2002) Troglitazone glucuronidation in human liver and intestine microsomes: high catalytic activity of UGT1A8 and UGT1A10. *Drug Metab Dispos* **30**: 1462-1469.

Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR and Ball SE (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* **32**: 1201-1208.

Yamazoe Y, Nagata K, Ozawa S and Kato R (1994) Structural similarity and diversity of sulfotransferases. *Chem Biol Interact* **92**: 107-117.

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の肝臓における網羅的遺伝子発現解析

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部

協力研究者 池田 眞弓、廣出充洋、関口正博、高見健治、朝日 知  
武田薬品工業株式会社 医薬研究本部

研究要旨

ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓の基本的な特性を知るため、肝臓におけるヒト肝細胞への置換率とヒト遺伝子の発現の関係、ヒト型薬物代謝酵素遺伝子の誘導能および同一ドナー細胞から作製されたヒト肝細胞キメラマウスの個体差について DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により検討した。

DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析からヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では、ヒトおよびマウス遺伝子の発現が確認された。また、肝臓におけるヒト肝細胞への置換率の上昇に応じて発現するヒト遺伝子数は増加し、同時にマウス遺伝子の発現数が減少した。ヒト肝細胞への置換率が高い個体に薬物代謝酵素誘導剤を投与すると肝臓における、ヒト型 cytochrome P450 (CYP)、glutathion S-transferase (GST) および UDP-glucuronosyl-transferase (UGT) の分子種の一部の発現誘導が確認された。

同一ドナー肝細胞で作製されたヒト肝細胞キメラマウスの中からヒト肝細胞への置換率が高い5例を用いて、肝臓における遺伝子発現プロファイルの解析ならびに肝臓左葉の組織学的解析により同一条件で作製された本マウスの個体差について検討した。ヒト肝細胞キメラマウス肝臓では、6239～8789 個のヒト遺伝子 (CV13.6%) が発現しており、これは、同一解析条件で確認されたヒト肝臓における遺伝子発現数の 55～75%であった。また、ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の遺伝子発現プロファイルをクラスター解析したところ、発現するヒト遺伝子数とは関係なく2例と3例の2パターンに分類された。

以上の結果より、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓におけるヒト遺伝子の機能的発現が確認されたものの、同一ドナー肝細胞で作製されたヒト肝細胞キメラマウスであっても遺伝子発現パターンに個体差があるため、その利用においては、その点を考慮する必要があることがわかった。

## 研究目的

ヒト肝細胞キメラマウスは、肝障害マウス (uPA マウス) と免疫不全マウス (SCID マウス) とを交配して生じた免疫不全肝障害マウス (uPA/SCID マウス) に、ヒト肝細胞を移植することにより作出されるもので、ヒト肝細胞に置換された肝臓を保持したまま長期に渡り生存することが知られている。また、ヒト肝細胞への置換率はヒト肝細胞移植 1 月後のキメラマウス血中のヒトアルブミン濃度値から予測しうることが明らかになっている。

医薬品の研究・開発においては、各種動物を用いた薬効・薬理・薬物動態・安全性に関する多くの非臨床試験を実施するが、その結果は必ずしもヒトへの外挿性をもつものではない。特に薬物動態試験ならびに安全性試験においては

ヒト肝組織あるいはヒト肝細胞の利用により多くの有益な情報が得られるにもかかわらず、それらの入手は困難であり、医薬品研究・開発の障害のひとつとなっている。本キメラマウスは、このような問題の解決の一助となることが期待されている。

本研究では、肝臓におけるヒト肝細胞への置換率とヒト遺伝子の発現の関係、ヒト型薬物代謝酵素遺伝子の誘導能についての検討 (第 I 章) および同一ドナー細胞から作成されたヒト肝細胞キメラマウスの個体差について DNA アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析 (第 II 章) を行い、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓の基本的な特性を把握するとともに実利用上の問題点について考察した。

## 第 I 章 ヒト肝細胞への置換率とヒト遺伝子発現数の関連およびヒト型薬物代謝酵素遺伝子の発現および誘導

### A. 研究方法

#### A-1. ヒトおよびマウス GeneChip におけるヒトあるいはマウス肝臓由来 RNA のクロスハイブリダイゼーションの評価

ヒト肝臓 (①人種不明、男性、69 歳、②白人、女性、70 歳) と swiss webstar マウス肝臓から調製された total RNA (Ambion) を購入した。Total RNA の純度は電気泳動により確認し、Affymetrix 社のプロトコールにしたがい、SuperScript Choice system (Invitrogen) による cDNA 合成反応、Enzo BioArray

HighYield RNA Transcript Labeling Kit (Affymetrix) によるビオチン標識により cRNA 合成した後、cRNA を断片化し標識サンプルを調製した。2 個体に由来するヒト標識 RNA は等量(重量)を混合し、ヒト標識 RNA とした。ヒト及びマウス標識 RNA をそれぞれ 100:0、50:50、0:100 の比 (重量比) で混合し、標識サンプルを Humen Expression Array 133A (U133A、Affymetrix) 及び Mouse Expression Array 430A (MOE430A、Affymetrix) にハイブリダイズし、GeneChip system (Affymetrix) によりアレイの染色、洗浄及びスキャンを行い、画像データを取得した。画像データの解析は MicroarraySuite5.0 (MAS5.0、パラ

メーターは default 値を使用、Affymetrix) を用い、各 GeneChip の測定値 (signal) データ及び detection の判定データを取得した。Detection の判定データで present と判定された遺伝子を検出遺伝子として抽出した。

## A-2.キメラマウスでの薬物代謝酵素誘導能

使用したヒト肝細胞キメラマウスの肝臓の total RNA は金沢大学横井教授から供与を受けた。ヒト肝細胞キメラマウスは、ドナー肝細胞として IVT079 (白人、男性、9ヶ月) を利用し、生後 12~13 週齢の雄

性キメラマウスで、無処置、rifampicin、3-methylcholanthrene を 4 日間腹腔内投与したものを用いた (Table 1)。Total RNA の純度は電気泳動により確認し、A-1 で示した方法により、標識サンプルを Human Expression Array 133A (U133A、Affymetrix) 及び Mouse Expression Array 430A (MOE430A、Affymetrix) により解析した。

誘導剤投与による遺伝子の発現変動は、無処置の肝臓 (MTE49-4) に対する誘導剤を投与した肝臓 (CTE8-3 および CTE4-5) の各遺伝子の発現量の比を発現の変化として求めた。

Table 1 使用したヒト肝細胞キメラマウス

	個体No.	処置			置換率 (%)
		投与量	投与日数	投与経路	
無処置	MTE49-7				0
	MTE49-5				71
	MTE49-4				93
Rifampicin (Rif)	CTE2-3	50mg/kg/day	4日間	腹腔内	1
	CTE8-3				80
3-methylcholanthrene (3-MC)	MTE46-4	20mg/kg/day	4日間	腹腔内	6
	CTE4-5				80

置換率: ヒト肝細胞移植 1 月後のキメラマウス血中ヒトアルブミン濃度値から予測

## B. 研究結果

### B-1. ヒトおよびマウス GeneChip におけるヒトあるいはマウス肝臓由来 RNA のクロスハイブリダイゼーションの評価

ヒトあるいはマウスの肝臓由来の RNA をヒトおよびマウス GeneChip で解析し、検出された遺伝子数から種間でクロスハイブリダイゼーションしている遺伝子を評価した。

ヒト及びマウス肝臓由来 RNA を 100:0、50:50、0:100 の比 (重量比) で混合したサンプルを GeneChip で解析したところ、ヒト GeneChip での検出遺伝子数はそれぞれ 9791、7750、2511 遺伝子であり、マウス GeneChip での検出遺伝子数は、それぞれ 2449、10386、12107 であった (Fig. 1)。ヒト肝臓で検出された 9791 遺伝子のうち、マウス肝臓の検出遺伝子と

2511 遺伝子 (25.6%) が共通であった。これらはマウス及びヒトの肝臓で発現量が高い遺伝子であり、主に regulation of transcription (213 遺伝子)、protein

biosynthesis (192 遺伝子)、protein modification (121 遺伝子) に関わる遺伝子が多数含まれていた。

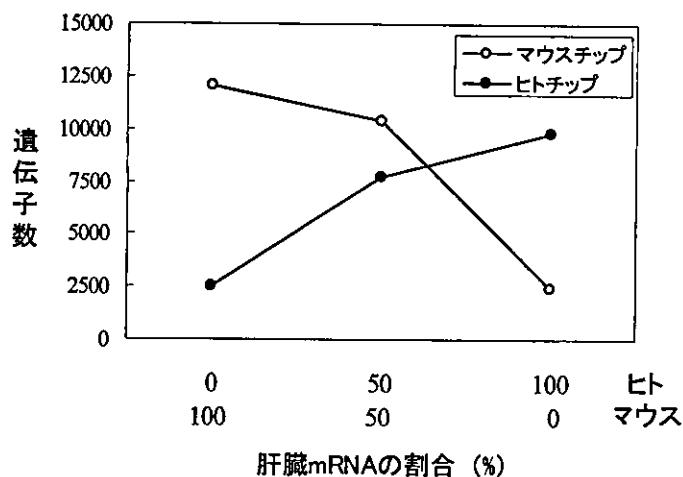


Fig. 1 ヒト及びマウス GeneChip での検出遺伝子数

## B-2. ヒト肝細胞への置換率と遺伝子発現との関連

ヒト肝細胞への置換率とヒトあるいはマウス発現遺伝子数の関係について無処置マウス (MTE49-7, 5, 4) を用いて検討した。ヒト肝細胞への置換率が 0% では、ヒト GeneChip で検出された遺伝子は 2548 個、マウス GeneChip で検出された遺伝子は 12891 個であった。置換率が 71% では発現が確認されたヒト遺伝子は 9065 個、マウス遺伝子は 11927 個、置換率が 93% ではヒト遺伝子は 9475 個、マウス遺伝子は 8893 個であった。このように、置換率の上昇に応じて、発現が検出されたヒト遺伝子の数が増加し同時にマウス遺伝子の数が減少した (Fig.2)。

次に代表的な薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP)、glutathion

S-transferase (GST) および UDP-glucuronosyl-transferase (UGT) の分子種の発現と置換率の関係について検討した。ヒト GeneChip に搭載されている CYP 分子種は 87 個、UGT 分子種は 16 個、GST 分子種は 13 個存在する。これらは置換率 0% では CYP, UGT および GST それぞれ 14, 4 および 5 個の発現が検出された。置換率が 71% ではそれぞれ 62, 13 および 15 個、置換率が 93% ではそれぞれ 62, 13 および 16 個おの検出された。このように、置換率の上昇に応じて、発現が検出されたヒト型薬物代謝酵素遺伝子の数が増加した。(Fig. 3)。

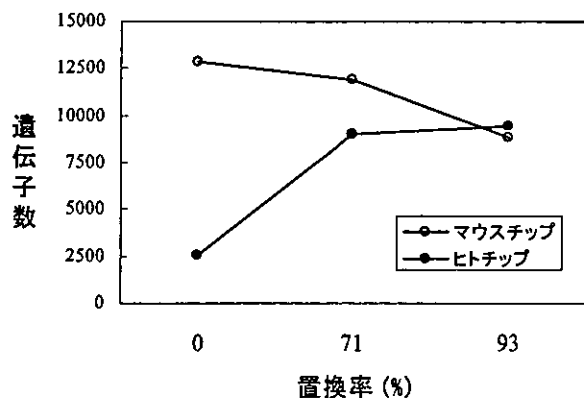


Fig. 2 無処置キメラマウスにおけるヒト肝細胞への置換率と発現が検出されたヒトあるいはマウス遺伝子数の関係

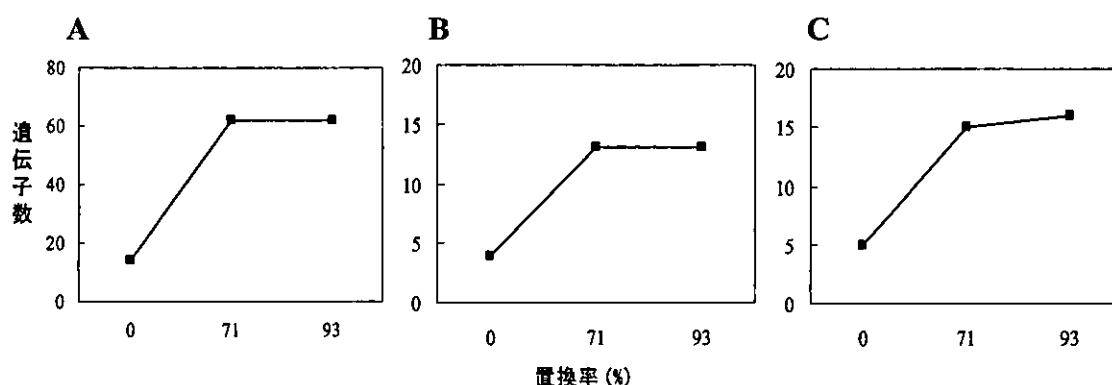


Fig. 3 無処置キメラマウスにおけるヒト肝細胞への置換率と発現が検出されたヒト薬物代謝酵素の数

A: CYP 分子種、B: UGT 分子種、C: GST 分子種、ヒト GeneChip で測定

### B-3. キメラマウスでの薬物代謝酵素誘導能

薬物代謝酵素誘導剤として リファンピシあるいは 3-メチルコランズレンを投与したヒト肝細胞キメラマウスの肝臓での遺伝子発現変動について検討した。高置

換率のキメラマウス (置換率 80%以上) ではリファンピシン、3-メチルコランズレン投与とも、ヒト検出遺伝子数に及ぼす影響はほとんどなかった (Fig. 4)。

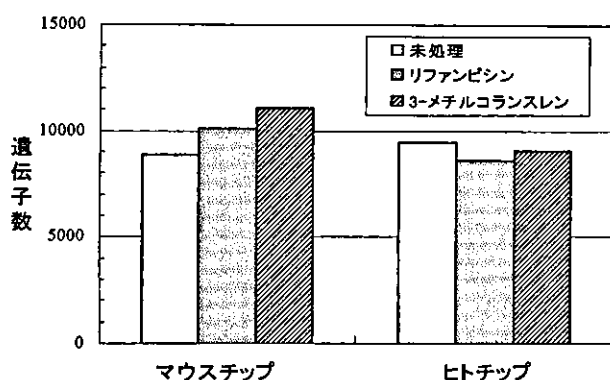


Fig. 4 ヒト薬物代謝酵素誘導剤投与時に検出されるヒトあるいはマウス遺伝子数

置換率が高いキメラマウスに薬物代謝酵素誘導剤として リファンピシンあるいは 3-メチルコランスレンを投与し (CTE8-3、4-5)、無処置マウス (CTE49-4) と比較して肝臓におけるヒト薬物代謝関連遺伝子の発現変動について検討した。リファンピシンを投与した際のキメラマウスの肝臓における CYP 分子種の発現は、無処置マウスと比較して CYP2A6、CYP2A7、CYP2B6、CYP2C18、CYP3A4、CYP3A43、CYP4F11 がそれ

ぞれ 1.8、1.7、2.1、1.9、1.6、2.0、1.8 倍に、GST 分子種では GSTP1 が 1.5 倍に増加した。一方、UGT 分子種の遺伝子発現は変化しなかった。また、3-メチルコランスレン投与した際のキメラマウスの肝臓における CYP 分子種の発現は、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C18 がそれぞれ 9.0、3.8、8.9、1.7 倍に、GST 分子種では GSTM1、GSTP1 の発現が 1.7、1.9 倍に UGT 分子種では、UGT1A9 が 1.5 倍に、増加した。

Table 2 リファンピシンの投与によるヒト CYP 分子種の遺伝子発現変動

CYP分子種	Rif 投与による 発現変化 (比)	CYP分子種	Rif 投与による 発現変化 (比)
1A1	0.4	3A7	1.2
1A2	0.5	3A43	2.0
1B1	0.9	4A11	0.9
2A6	1.8	4F2	1.4
2A7	1.7	4F11	1.8
2B6	2.1	4F12	0.9
2C8	1.1	4F13	0.9
2C9	1.1	7A1	1.2
2C18	1.9	26A1	1.1
2D6	0.9	27A1	0.9
2E1	0.8	39A1	0.9
2J2	0.7	51A1	1.2
3A4	1.6		
3A5	1.0		

Table 3 リファンピシンの投与によるヒト UGT 及び GST 分子種の遺伝子発現変動

UGT分子種	Rif 投与による 発現変化 (比)	GST分子種	Rif 投与による 発現変化 (比)
1A1	0.8	A2	0.9
1A3	0.9	A3	1.1
1A6	0.7	A4	1.3
1A8	1.3	M2	1.4
1A9	1.0	M3	1.1
2B4	1.4	M4	1.3
2B15	1.4	P1	1.5
2B17	1.2	T1	0.9
2B28	1.1	Z1	0.8
		MGST 2	0.9



Table 4 3-メチルコランズレン投与によるヒト CYP 分子種の遺伝子発現変動

CYP分子種	3-MC 投与による 発現変化 (比)	CYP分子種	3-MC 投与による 発現変化 (比)
1A1	9.0	3A7	0.5
1A2	3.8	3A43	0.7
1B1	8.9	4A11	0.9
2A6	0.8	4F2	1.1
2A7	0.6	4F11	1.4
2B6	0.8	4F12	0.9
2C8	0.9	4F13	0.6
2C9	1.0	7A1	0.1
2C18	1.7	26A1	0.7
2D6	0.6	27A1	0.9
2E1	0.8	39A1	0.6
2J2	0.5	51A1	0.8
3A4	0.2		
3A5	0.6		

Table 5 3-メチルコランズレン投与によるヒト UGT 及び GST 分子種の遺伝子発現変動

UGT分子種	3-MC 投与による 発現変化 (比)	GST分子種	3-MC 投与による 発現変化 (比)
1A1	1.3	A2	0.8
1A3	1.4	A3	0.6
1A6	1.1	A4	1.1
1A8	1.3	M1	1.7
1A9	1.5	M2	1.0
2B4	0.9	M3	1.1
2B15	0.8	M4	1.0
2B17	0.3	P1	1.9
2B28	0.9	T1	1.1
		T2	1.0
		Z1	0.8
		MGST 2	1.0
		MGST 3	1.0

### C. 考察

解析に用いた DNA マイクロアレイ (GeneChip) のクロスハイブリダイゼーションを検討した。置換率 0%のキメラマウスの肝臓をヒト GeneChip で解析したところ、約 2500 の遺伝子が検出遺伝子とし

て抽出された。ヒト GeneChip のプローブセットの設計ではマウス遺伝子を区別することは考慮されておらず、クロスハイブリダイゼーションが生じることが考えられた。

DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析からヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では、ヒトおよびマウス遺伝子の発現が確認された。また、肝臓におけるヒト肝細胞への置換率の上昇に応じて発現するヒト遺伝子数は増加し、同時にマウス遺伝子の発現数が減少した。このようにヒト肝細胞キメラマウスの肝臓でヒト遺伝子の発現が確認された。さらに、ヒト肝細胞への置換率が高い個体に薬物代謝酵素誘導剤を投与すると肝臓における、ヒト型 cytochrome P450 (CYP)、glutathion S-transferase (GST) および UDP-glucuronosyl-transferase (UGT) の分子種の一部の発現誘導が確認された。すなわち、リファンピシン投与では CYP2B6、CYP2C18、CYP3A4 等の発現量が、3-メチルコランズレン投与では CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2C18 等の発現量が増加した。このように、ヒト肝細胞キメラマウスでは、ヒト肝細胞がその機能を保持した形で発現しており、ヒト肝組織・細胞にかわり薬物の研究・開発に利用できる可能性が示唆された。

#### D. 結論

DNA アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析からヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では、ヒトおよびマウス遺伝子の発現が確認された。また、肝臓におけるヒト肝細胞への置換率の上昇に応じて発現するヒト遺伝子数は増加し、同時にマウス遺伝子の発現数が減少した。ヒト肝細胞への置換率が高い個体に薬物代謝酵素誘導剤を投与すると肝臓における、ヒト型

cytochrome P450 (CYP)、glutathion S-transferase (GST) および UDP-glucuronosyl-transferase (UGT) の分子種の一部の発現誘導が確認された。

## 第Ⅱ章 ドナー肝細胞 IVT-079 を用いて作製された高置換率のヒト肝細胞キメラマウスの個体差

### A. 研究方法

ドナー肝細胞として共通に IVT-079 を用いて作製された 15~16 週齢のヒト肝細胞キメラマウスの中から 80%以上の高置換率を示す 5 例を選択し、肉眼による剖検所見および遺伝子発現プロファイルの比較により、同じ条件で作製されたキメラマウスにおける個体差を調べた。

剖検 2 日前にマウス血中ヒトアルブミン濃度を測定し、剖検時の肉眼的観察により肝臓の色調や大きさ、ヒト肝細胞への置換の程度などについて形態学的変化を調べた。採材した肝臓は病理評価に用いる部位を除き、個体別に凍結プレス破砕機 (CRYO-PRESS) で粉末状に破砕し、第 I 章 A-1 の方法に準じてサンプルを調製した。ヒト肝細胞キメラマウスは 1 個体につき 2 枚のヒト GeneChip により解析し、解析ソフト MASS.0 で detection の signal が present を 2 枚とも示した遺伝子を検出遺伝子とした。ヒト肝臓は第 I 章 A-1 で用いた試料を個別に解析し、present を示した遺伝子を検出遺伝子とした。さらに、ヒト肝臓で発現する遺伝子を用いてクラスター解析を行い、キメラマウス肝臓の遺伝子発現プロファ

イルを分類した。

## B. 研究結果

肉眼所見からキメラマウスのヒト肝細胞への置換状態は CTE49-6 > CTE51-5 > CTE51-6 > CTE51-4 > CTE49-7 の順に高いと推定された。ヒト肝細胞への置換の割合が高いと推定された個体では、肝臓の肥大傾向と共に、色調は薄いベージュを呈した。置換状態が低いと推定された個体では、マウス肝細胞の再生と考えられる赤褐色のコロニーの散在がみられた (Table 6)。

網羅的遺伝子発現解析により、ヒト遺伝子はそれぞれ 8789 (CTE49-6)、7082 (CTE49-7)、6239 (CTE51-4)、8513 (CTE51-5)、7778 遺伝子 (CTE51-6) (CV 値 13.6%) が検出され、ヒト肝細胞への置換状態に応じてヒト遺伝子が多く検出される傾向がみられた。5 個体に共通した検出遺伝子は 5778 遺伝子であり、

クロスハイブリダイゼーションした遺伝子を除くと、4008 遺伝子がヒト特異的な遺伝子として発現していると考えられた (Table 7)。

また、同一条件で解析したヒト肝臓では 11178 遺伝子が検出遺伝子として抽出され、このうちキメラマウスの肝臓で発現していたヒト肝臓遺伝子は 6100 ~ 8230 遺伝子であり、ヒト肝臓で発現していた遺伝子の 54.6 ~ 75.4% を占めた (Table 6)。

ヒト肝臓で検出された 11178 遺伝子を用いて、キメラマウスの肝臓の遺伝子発現プロファイルをクラスター解析により分類したところ、2 例と 3 例に分類され CTE49-6、CTE51-5 がヒト 1 の発現パターンと類似していた (Fig. 5)。分類パターンは検出遺伝子数と関係があるものではなかった。

Table 6 高置換率のキメラマウスの個体差

キメラマウス	個体 No.	1 (CTE49-6)	2 (CTE49-7)	3 (CTE51-4)	4 (CTE51-5)	5 (CTE51-6)
	性別	♂	♂	♂	♂	♂
	週齢	16週齢			15週齢	
ドナー		IVT-079 (9ヶ月 白人男性)				
置換率		80%以上 (移植後1カ月の血中ヒトアルブミン濃度から算出)				
hAlb濃度 (mg/mL)	移植後1カ月	5.7	1.7	2.6	2.5	2.4
	移植後3カ月 (解剖2日前)	15.3	4.3	3.1	5.1	8.8
体重 (g)		15.7	21.0	20.9	19.2	13.5
肝臓重量 (g)		2.9	2.1	2.2	2.0	1.8
肝臓/体重 (%)		18.5	10.1	10.4	10.3	13.3
肝臓の剖検所見	色調	薄いページュで表面は滑らか	ページュで多くの赤褐色のコロニーが散在	ページュ(CTE49-7と同じ)、一部、赤褐色のコロニーが散在 左葉は赤褐色のコロニー少なく、色も薄いページュ	薄いページュ、CTE49-6と同じ位の色で表面は滑らか	薄いページュ、表面滑らかだが、左葉の端の一部表面が白く網状
	形状	全体的に肥大	——	後部右葉は肥大し、マウスの肝と思われる部分が多い	——	——
	ヒト肝細胞への置換状態(推定)	高	中	中	高	中~高
ヒトGeneChipでの検出遺伝子数		8789	7082	6239	8513	7778
ヒト肝臓で発現している遺伝子との共通性	数	8431	6876	6100	8230	7505
	割合 (%)	75.4	61.5	54.6	73.6	67.1
左葉の一断面でのヒト肝細胞の占める割合 (CK8/18抗体免疫染色)		97.8	44.6	82.8	72.2	85.9
クラスター解析		ヒト1に近い	その他	その他	ヒト1に近い	その他

Table 7 高置換率のキメラマウスで検出されたヒト遺伝子数

No.	個体No.	ヒトGeneChipで検出された遺伝子数	クロスハイブリした遺伝子数	ヒト特異的な遺伝子数
1	CTE49-6	8789	2084	6705
2	CTE49-7	7082	2040	5042
3	CTE51-4	6239	1931	4308
4	CTE51-5	8513	2080	6433
5	CTE51-6	7778	2075	5703
Mean		7680	2042	5638
S.D		1045	64	987
CV (%)		13.6	3.2	17.5