

Fig. 5 キメラマウス及びヒト肝臓の遺伝子発現クラスターリング

キメラマウス No.1: CTE49-6、No.2: CTE49-7、No.3: CTE51-4、No.4: CTE51-5、No.5: CTE51-6、ヒト肝臓の検出遺伝子 (11178 遺伝子) を用いて解析した。

総合的な評価では、CTE49-6 は剖検所見でヒト肝細胞への置換状態も高く、ヒト GeneChip で検出された遺伝子数、ヒト肝臓と共通している遺伝子数、肝臓遺伝子発現プロファイル、ヒト肝細胞の占める割合などの点で、5 個体のなかでヒトに近い性質を有していた。この個体は置換率算出時及び剖検 2 日前のマウス血中ヒトアルブミン濃度も高かった。一方、CTE51-4 は剖検 2 日前のマウス血中ヒトアルブミン濃度は 5 個体中最低値を示しており、ヒト検出遺伝子数やヒト肝臓と共通している遺伝子数も少なかった (Table 6)。

(参考:病理組織学的評価)

剖検時に肝臓左葉を切り出し、10%

中性緩衝ホルマリン液にて固定後、パラフィン包埋し、HE 染色、ヒトサイトケラチン 8/18 (CK8/18) 免疫染色により行なった。一次抗体は抗 CK8/18 マウスモノクローナル抗体 Clone NCL5D3 (Cappel)、二次抗体はビオチン化マウス IgG 抗体 (Vector) を用いた。ヒト肝臓の占める割合は、光学顕微鏡に接続したビデオカメラで肝臓の一断面の切片を撮影後、キメラマウスの肝臓断面積及びヒト CK8/18 抗体の陰性断面積を測定し、面積比から算出した。計算式は〔(肝臓断面積—CK8/18 陰性領域)X100 / 肝臓断面積〕を用いた。

HE 染色においては薄染されている領域が、ヒト CK8/18 免疫染色においては陽性領域がヒト肝細胞領域と考えられた

(Fig. 6)。ヒト肝細胞領域をマウス肝細胞領域と比較したところ、ヒト肝細胞領域では肝細胞のサイズが大きく、空胞化も認

められた。5 個体のキメラマウス肝臓左葉の一断面におけるヒト肝細胞領域の占める割合は 44.6~97.8%であった。

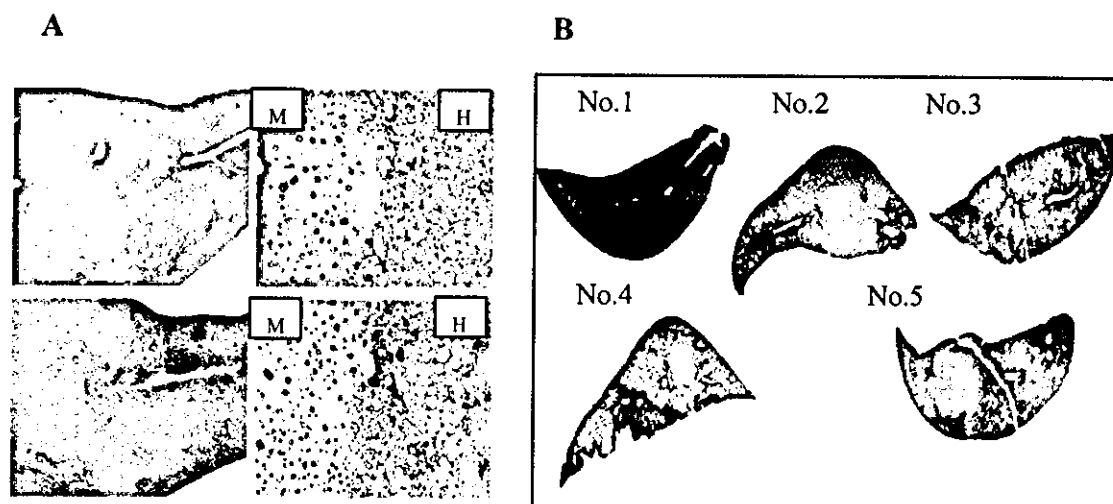


Fig. 6 キメラマウス肝臓左葉の組織学的評価

(A) 上段: HE 染色、下段: ヒト CK8/18 免疫染色、M: マウス領域、H: ヒト領域

(B) ヒト CK8/18 免疫染色におけるヒト肝臓の占める割合

キメラマウス No.1: CTE49-6、No.2: CTE49-7、No.3: CTE51-4、No.4: CTE51-5、No.5: CTE51-6

C. 考察

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高置換率を示す 5 例を選択し、肝臓での遺伝子発現解析を行なったところ、6239~8789 個のヒト遺伝子 (CV13.6%) が発現し、同一解析条件で確認されたヒト肝臓での発現遺伝子の 55~75%を占めていた。また、キメラマウス肝臓の遺伝子発現プロファイルは 2 例と 3 例に分類され、その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。このように、同一ドナーで作製し、同程度の置換率を示すキメラマウスでもヒト遺伝子の発現数やヒト肝臓との発現プロファイルの類似性に個体差が認められた。

キメラマウスの肝臓で発現していたヒト

遺伝子はヒト肝臓遺伝子の 54.6~75.4%を占めていたが、24.6~45.4%のヒト遺伝子は検出遺伝子として捉えられなかった。キメラマウスの肝臓にはマウスの肝臓が再生した領域が認められる。本研究ではそれらの領域を区別せず評価したため、非検出遺伝子にはヒト遺伝子の発現が GeneChip の検出限界以下になったものも含まれていると考えられ、ヒト肝細胞と思われる領域の解析により、検出されるヒト遺伝子は増加するものと考えられる。

本キメラマウスは薬物代謝や安全性の予測ツールとしての利用が期待されている。本研究で示されたように同一の条件で作製され、同程度のヒト肝細胞への置換率を示すマウスであっても個体差がか

なりみられることから、均質なヒト型モデルとして個体を利用することは難しいと考えられる。第 I 章で示したように本マウスではヒト薬物代謝酵素遺伝子の多くが発現しており、2 種の誘導剤を用いた実験ではヒトと同様の誘導能を有することが確認され、薬物の研究・開発に利用できる可能性はあるものの、その利用においては個体差を十分に考慮する必要があると思われる。

D. 結論

同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 例について、肝臓における遺伝子発現プロファイルならびに肝臓左葉の組織学的解析からの同一条件で作製されたヒト肝細胞キメラマウスの個

体差について検討した。同ドナー肝細胞で作製され同等の置換率を示す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、個体差を考慮する必要があることがわかった。

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：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
分担研究報告書

ヒト肝細胞キメラマウスにおける *in vivo* 薬物代謝能の検討

分担研究者 中島 美紀 金沢大学薬学部 助教授
協力研究者 加藤 美紀 金沢大学薬学部

研究要旨

ヒト肝細胞キメラマウスについて、昨年度までに *in vitro* においてヒトの薬物代謝能を有していることを明らかにしたが、*in vivo* における薬物代謝能に関しては不明である。そこで本年度は *in vivo* の薬物代謝能を検討することを目的として、ヒトと実験動物で大きな種差が認められている分子種の一つである CYP2D6 に着目し、代表的な基質であるデブリソキンの 4'-水酸化酵素活性を指標として検討を行った。また、薬物相互作用の予測をめざし、CYP2D6 の阻害薬を併用することによるデブリソキンの代謝能の変化を検討した。

ヒトにおいて、デブリソキンは CYP2D6 により 4'-水酸化デブリソキンに代謝される。しかし、マウスではほとんど代謝されないことが報告されている。そこで、キメラマウスにデブリソキンを単回経口投与後、血漿中のデブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキンを経時的に測定した。その結果、キメラマウスでは uPA(-/-)SCID マウスと比べ、4'-水酸化デブリソキンの AUC および Cmax は顕著に高い値を示し、また、デブリソキンの AUC および Cmax は低い傾向が認められた。すなわち、キメラマウスは *in vivo* においてヒト型の代謝プロファイルを示すことが明らかになった。また、CYP2D6 の代表的な阻害薬であるキニジンおよびパロキセチンを 3 日間連続腹腔内投与後、同様にデブリソキンを投与し、血漿中デブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキンの変動を検討した。キニジンやパロキセチンの前投与により、キメラマウスの血漿中 4'-水酸化デブリソキンの AUC と Cmax が著しく低下したため、キメラマウスの肝に発現するヒト CYP2D6 が阻害されることが明らかとなった。なお、uPA(-/-)SCID マウスではキニジンの前投与により 4'-水酸化デブリソキンのキネティックパラメーターに大きな変化は認められなかったため、キメラマウスにおいてヒト特異的な相互作用が再現できたと考えられる。

ヒトにおける薬物動態および薬物相互作用を早期に予測することは医薬品開発の効率化、医薬品の適正使用ならびに安全性評価において重要課題である。キメラマウスを用いて、ヒトの薬物相互作用を予測するためには更なる検討が必要であるが、本章の結果より、キメラマウスは *in vivo* においてヒトの薬物代謝能を有し、ヒト特異的な薬物相互作用の再現モデルとして極めて有用であることが示された。

A. 研究目的

現代の医療における薬物療法の役割は極めて大きい。今日、日常化している多剤併用において、薬物相互作用の回避は、重篤な副作用回避のために不可欠である。薬物相互作用はそのメカニズムから、薬力学的もしくは薬物動態学的な相互作用の2種に大別できるが、約3分の1以上は薬物動態学的な代謝過程によるものであると言われている。さらに、代謝が関与する薬物相互作用の中で、チトクロム P450 (CYP) が関与するものは95%にも及ぶ(千葉, 1995)。CYP を介した薬物相互作用は阻害によるものが約70%、誘導によるものが23%と言われている。従って、臨床における薬物の適正使用だけでなく医薬品の開発段階においても、CYPの阻害による薬物相互作用を予測することは極めて重要である。

CYP 阻害試験は1997年にFDAよりガイダンスが発表され、また、我が国においても、厚生労働省より

2001年に薬物相互作用の検討方法について通知がなされ、医薬品開発におけるCYP阻害の重要性が広く認識されるようになった。現在のところ、薬物の代謝を司る主要な臓器である肝由来の試料を用いた *in vitro* でのCYP阻害実験の結果からヒトにおける薬物相互作用を予測する試みがなされているが、肝細胞中で酵素と反応する薬物濃度が不明であることやタンパク結合などの問題から、現状では *in vitro* から *in vivo* への外挿は極めて難しい。また、医薬品開発時にはラット、イヌ、サルなどの実験動物を用いて *in vivo* における薬物動態試験が実施されるが、薬物の代謝には大きな種差が存在する。その原因は、ヒトと実験動物ではCYPの基質特異性が異なり、かつ、肝における発現の程度が異なるためと考えられている。従って、実験動物からヒトへの正確な外挿もかなり困難である。

昨年度までに我々はヒト肝細胞キメラマウスの肝にヒトCYPが発現し

ていることを明らかにした (Kato et al., 2004)。これより、相互作用を予測する際に *in vitro* で問題となる肝で酵素と反応する薬物濃度や、*in vivo* で問題となる CYP の種差などを、キメラマウスを用いることによりクリアできる可能性が示唆された。そこで、本章ではキメラマウスの *in vivo* における薬物代謝能を測定し、また、併用薬存在下での薬物代謝能を検討することにより、ヒトでの薬物相互作用を予測する有用なモデル動物になりうるか検討を行った。なお、本章では CYP2D6 に着目し検討を行った。CYP2D6 はヒトにおいて、全肝 CYP の約 2%程度の発現量であるにも関わらず (Shimada et al., 1994)、約 30%の医薬品の代謝反応に関与する (Guengerich, 1996)。実際に、これまで CYP2D6 を介した薬物相互作用が多く報告されており、加えて、遺伝子多型が存在することからも、CYP2D6 の基質を臨床で使用する場合には、細心の注意を払わねばならない。CYP2D6 を介した薬物相互作用を検討することは、臨床での薬物の適正使用ならびに医薬品開発における相互作用の予測から重要であると判断した。なお、本章では CYP2D6 の代表的な基質であるデブリソキンの 4'-水酸化酵素活性を指標とし、相互作用の検討には CYP2D6 の代表的

な阻害薬であるキニジンとパロキセチンを用いて検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 実験動物

ヒト肝細胞キメラマウスは株式会社フェニックスバイオ (Hiroshima, Japan) に依頼生産した。uPA(-/-)SCID マウスは日本チャールズ・リバー (Yokohama, Japan) より入手した。本章で使用したマウスは全て雌性とした。

本章では In Vitro Technologies (Baltimore, MD) より購入した凍結ヒト肝細胞 (白人、男性、9ヶ月) を用いてキメラマウスを作製した。キメラマウスは血中ヒトアルブミン (hAlb) 濃度が 5.0 mg/ml 以上を高 hAlb 群、0.6 mg/ml 以下を低 hAlb 群と定義した。なおコントロールマウスとして uPA(-/-)SCID マウスを使用した。

B-2. 試薬

デブリソキン硫酸塩は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より、4'-水酸化デブリソキンは Ultrafine chemicals (Manchester, England) より購入した。キニジン硫酸塩二水和物、イミプラミン塩酸塩は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より、パロ

キセチンは Toronto Research Chemicals (Brisbane, Canada) より購入した。そのほかの試薬は特級、生化学用および高速液体クロマトグラフィー用のものを用いた。

B-3. 薬物投与および採血

試験スケジュールは下記の通り行った。

Day 1: デブリソキン代謝試験 I (Test I)

デブリソキン硫酸塩をミリ Q 水に溶解し、デブリソキンとして 2.0 mg/kg/day で単回経口投与した。投与後 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 時間後に眼底より採血し、遠心分離後約 20 μ l の血漿を得た。

Day 2, Day 3, Day 4: 休薬

Day 5, Day 6, Day 7: 阻害薬投与

CYP2D6 の阻害薬であるキニジンもしくはパロキセチンを 3 日間連続腹腔内投与した。キニジン硫酸塩二水和物はミリ Q 水に溶解し、キニジンとして 50 mg/kg で 1 日 2 回 (100 mg/kg/day)、パロキセチンはミリ Q 水に溶解し、30 mg/kg/day とした。

Day 8: デブリソキン代謝試験 II (Test II)

Test I と同様、デブリソキンを 2.0 mg/kg/day で単回経口投与後、所定の時間に眼底より採血した。なお、

デブリソキン投与 12 時間前には薬物の投与を終了した。

B-4. LC-MS/MS による血漿中デブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキン濃度の測定

Corchero ら (2001) および Pereira ら (2000) の方法に修正を加えて以下のように行った。血漿 10 μ l にミリ Q 水 400 μ l を添加した後、内標準物質として 20 nM イミプラミンを 40 μ l 添加し、ジクロロメタン: イソプロパノール (6:4, v/v) 1.3 ml で抽出した。1,000 g で 10 分間遠心分離を行い、有機溶媒層を採取した。採取した有機溶媒層を窒素気流下留去し、残渣に移動相 30 μ l を加えて溶解した。そのうちの 10 μ l をインジェクトし LC-MS/MS により分析した。

LC 装置は HP1100 システム (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いた。カラムは Symmetry C18 (Waters, Tokyo, Japan, 4.6 mm ID \times 150 mm, 5 μ m) を使用し、カラム温度は 35 $^{\circ}$ C とした。移動相は 40% アセトニトリル、0.1% ギ酸とし、流速は 0.3 ml/min とした。質量分析装置は API2000 (Applied Biosystems, Langen, Germany) を用いた。ターボガスは

550°C とし、ネブライジングガス、ターボガスおよびカーテンガスには窒素を用い、それぞれ 65、85、30 psi とした。コリジョンエネルギーは 25-27 V とした。イオンは positive-ESI mode を用い、MRM (multiple reaction monitoring) mode で検出した。デブリソキンは m/z 176 および 134 のイオンを、4'-水酸化デブリソキンは m/z 192 および 132 のイオンを、イミプラミンは m/z 281 および 86 のイオンを検出した。

B-5. ファーマコキネティックパラメータの解析

デブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキンの血中濃度時間曲線下面積 (AUC) は最小二乗法 (MULTI) により投与後 8 時間までの血中濃度より台形法にて求めた。最高血漿中濃度 (Cmax) および最高血漿中濃度到達時間 (Tmax) をデータから得た。

B-6. 統計解析

各群におけるファーマコキネティックパラメータは Mann-Whitney U-

test および Student t-test により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

C. 研究結果

C-1. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるデブリソキンの代謝

Fig.1 に Test I における各群のデブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキン血漿中濃度の時間推移を、Table 1 にファーマコキネティックパラメータを示した。デブリソキンの Cmax、Tmax および AUC について、高 hAlb 群では uPA(-/-)SCID マウスと比べ有意な差は認められなかったが、減少傾向が認められた。低 hAlb 群は uPA(-/-)SCID マウスと同程度の値を示した。これに対し、4'-水酸化デブリソキンの Cmax および AUC に関しては、高 hAlb 群において uPA(-/-)SCID マウスと比べて有意に高い値を示し、Cmax においては約 4 倍、AUC では約 2.5 倍であった。Tmax に関しては顕著な差は認められなかった。また、低 hAlb 群は uPA(-/-)SCID マウスと同程度の値を示した。

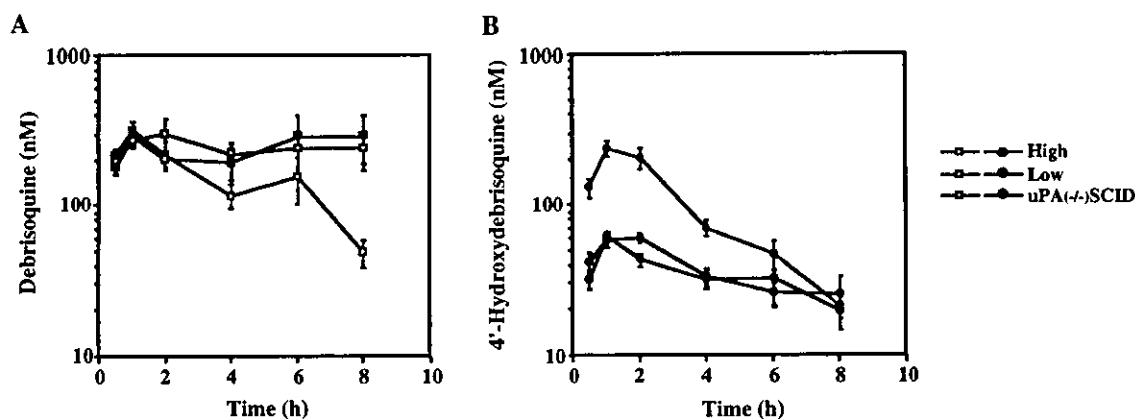


Fig. 1. Plasma concentration of debrisoquine and 4'-hydroxydebrisoquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice in Test I.

Time dependent changes of the plasma concentration of debrisoquine (A) and 4'-hydroxydebrisoquine (B) in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice after single oral administration of debrisoquine (2.0 mg/kg). Data represent the mean \pm SE (n = 10). High: chimeric mouse with a high hAlb concentration, Low: chimeric mouse with a low hAlb concentration.

Table 1 Pharmacokinetic parameters of debrisoquine and 4'-hydroxydebrisoquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice after single oral administration of debrisoquine (2.0 mg/kg).

	Debrisoquine			4'-Hydroxydebrisoquine		
	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₈ (nM·h)	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₈ (nM·h)
High	387.1 \pm 53.3	2.0 \pm 0.6	1286 \pm 165	273.3 \pm 34.6***	1.1 \pm 0.1	813 \pm 87***
Low	418.0 \pm 67.8	4.3 \pm 1.0	1814 \pm 320	65.5 \pm 6.1	1.4 \pm 0.2	253 \pm 31
uPA(-/-)SCID	475.1 \pm 92.3	4.9 \pm 1.0	1961 \pm 340	67.6 \pm 8.6	1.5 \pm 0.5	302 \pm 31

Data represent the mean \pm SE (n = 10). ***P < 0.001, compared with uPA(-/-)SCID mice.

High: chimeric mouse with a high hAlb concentration, Low: chimeric mouse with a low hAlb concentration.

C-2. デブリソキンの代謝に対するキニジンの影響

Test II において、キニジン前投与後のデブリソキンおよび4'-水酸化デブリソキン血漿中濃度推移を Fig. 2 に、また、ファーマコキネティックパラメータを Table 2 に示す。各群

ともにキニジンの前投与によりデブリソキンの C_{max} および AUC は増加傾向を示したが、有意差は認められなかった。T_{max} については高 hAlb 群と uPA(-/-)SCID マウスで増加傾向が認められたが、低 hAlb 群では減少した。4'-水酸化デブリソキンの

Cmax および AUC に関しては、高 hAlb 群においてキニジンの前投与より有意な減少が認められた。しかし、低 hAlb 群および uPA(-/-)SCID マ

ウスにおいてはキニジンの前投与による影響は認められなかった。Tmax に関しては高 hAlb 群で増加傾向が認められた。

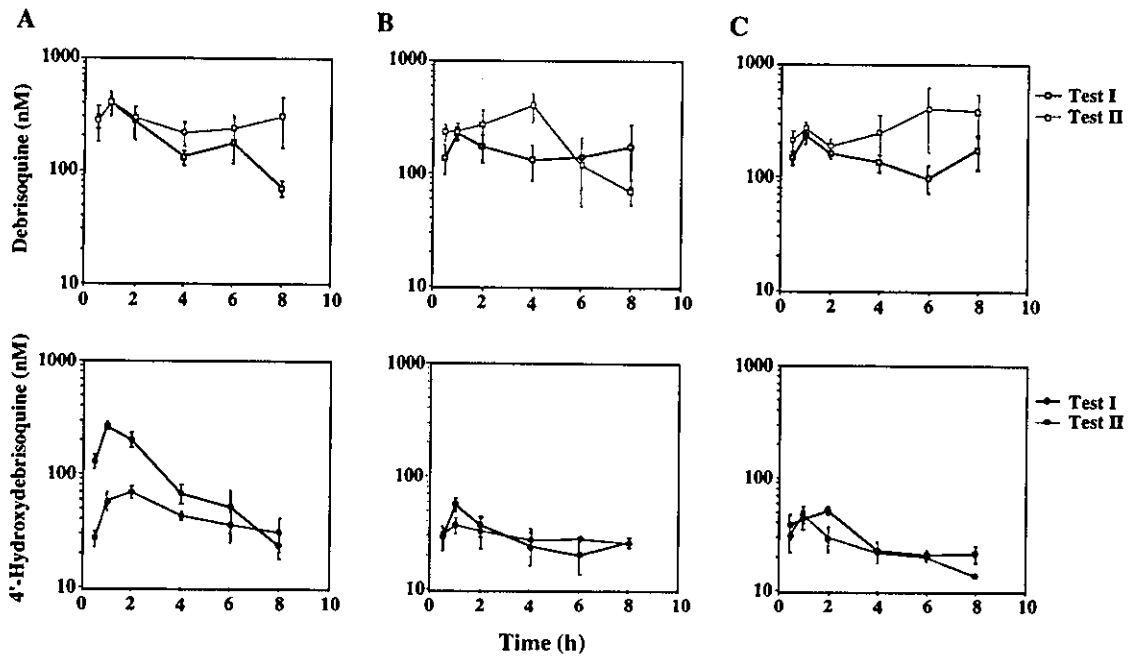


Fig. 2. Effects of quinidine treatment on plasma concentrations of debrisoquine and 4'-hydroxydebrisoquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice.

Plasma concentrations of debrisoquine (upper panel) and 4'-hydroxydebrisoquine (lower panel) in the chimeric mice with high hAlb concentrations (A), the chimeric mice with low hAlb concentrations (B) and uPA(-/-)SCID mice (C) were measured. Data represent the mean \pm SE (n = 4). Test I: 3-day pre-treatment of quinidine, Test II: 3-day post-treatment of quinidine.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of debrisoquine and 4'-hydroxydebrisoquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice 3-day post-treatment of quinidine.

	Debrisoquine			4'-Hydroxydebrisoquine		
	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₈ (nM·h)	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₈ (nM·h)
High						
Test I	464.3 ± 91.8	2.5 ± 1.2	1552 ± 226	274.0 ± 19.5	1.3 ± 0.3	815 ± 91
Test II	481.4 ± 102.0	3.0 ± 1.7	2122 ± 417	67.9 ± 9.1 ***	2.5 ± 0.5	345 ± 41**
Low						
Test I	321.6 ± 81.8	4.2 ± 1.7	1366 ± 439	56.0 ± 7.7	1.0 ± 0	203 ± 51
Test II	533.8 ± 96.8	2.8 ± 0.8	1914 ± 283	41.4 ± 6.3	1.0 ± 0.4	181 ± 48
uPA(-/-)SCID						
Test I	261.7 ± 43.0	4.5 ± 2.0	1115 ± 127	51.3 ± 4.6	2.0 ± 0	219 ± 28
Test II	562.5 ± 211.9	5.7 ± 1.7	2230 ± 801	54.4 ± 6.7	2.3 ± 1.3	196 ± 46

Data represent the mean ± SE (n = 4). ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, compared with Test I. High: chimeric mouse with a high hAlb concentration, Low: chimeric mouse with a low hAlb concentration, Test I: 3-day pre-treatment of quinidine, Test II: 3-day post-treatment of quinidine.

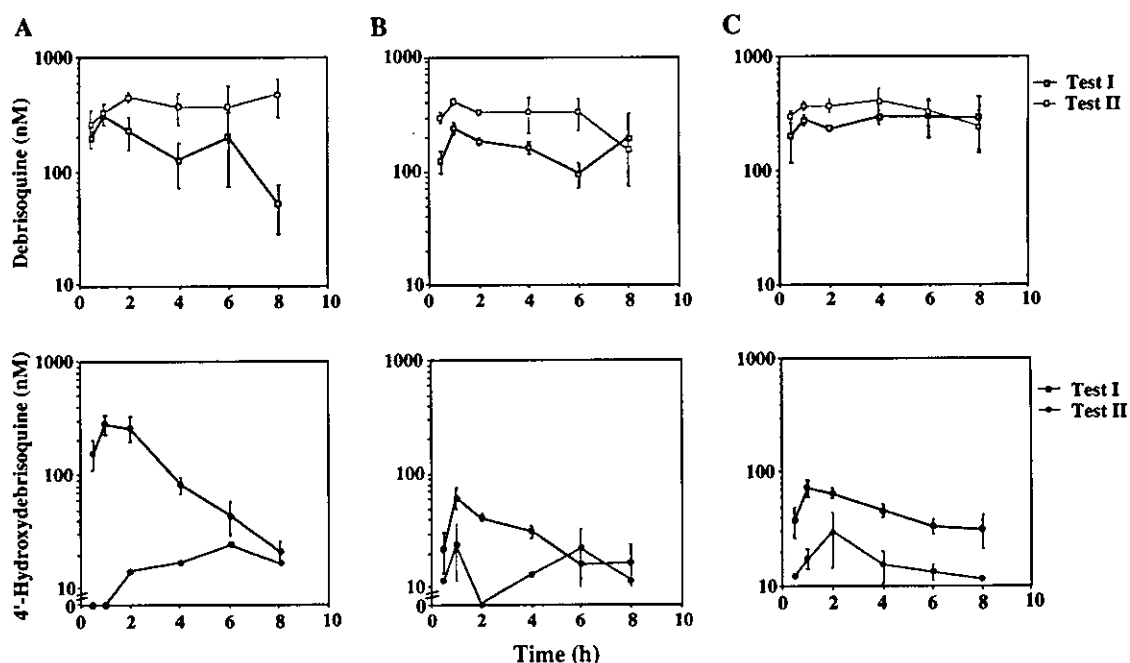


Fig. 3. Effects of paroxetine treatment on plasma concentrations of debrisoquine and 4'-hydroxydebrisoquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice.

Plasma concentrations of debrisoquine (upper panel) and 4'-hydroxydebrisoquine (lower panel) in the chimeric mice with high hAlb concentrations (A), the chimeric mice with low hAlb concentrations (B) and uPA(-/-)SCID mice (C) were measured. Data represent the mean ± SE (n = 4). Test I: 3-day pre-treatment of quinidine, Test II: 3-days post-treatment of quinidine.

C-3. デブリソキンの代謝に対する
パロキセチンの影響

Test II において、パロキセチン前投与後のデブリソキンおよび 4'-水酸化デブリソキン血漿中濃度推移を Fig. 3 に、また、ファーマコキネティックパラメータを Table 3 に示す。各群ともにパロキセチンの前投与によりデブリソキンの C_{max} および AUC は増加傾向を示し、AUC については高 hAlb 群でのみ有意差が認められた。

T_{max} については高 hAlb 群と低 hAlb 群で増加傾向が認められたが、uPA(-/-)SCID マウスでは減少した。4'-水酸化デブリソキンの C_{max} および AUC に関しては、全ての群においてパロキセチンの前投与より有意な減少が認められた。

Table 3. Pharmacokinetic parameters of debrisoquine and 4'-hydroxydebrisoquine in chimeric mice and uPA(-/-)SCID mice 3-day post-treatment of paroxetine.

	Debrisoquine			4'-Hydroxydebrisoquine		
	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₈ (nM·h)	C _{max} (nM)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₈ (nM·h)
High						
Test I	401.4 ± 63.7	2.5 ± 1.2	1350 ± 225	341.9 ± 54.2	1.3 ± 0.3	960 ± 161
Test II	606.4 ± 116.0	5.0 ± 1.3	2971 ± 595 *	13.0 ± 8.0 **	5.3 ± 1.3	55 ± 32 **
Low						
Test I	324.8 ± 82.9	1.3 ± 0.3	1546 ± 363	64.6 ± 10.8	5.3 ± 1.7	233 ± 19
Test II	478.7 ± 55.6	3.3 ± 1.1	2387 ± 328	24.3 ± 7.2 *	4.1 ± 1.5	107 ± 46 *
uPA (-/-)SCID						
Test I	411.3 ± 79.1	2.8 ± 1.8	2489 ± 330	76.7 ± 9.9	1.0 ± 0	338 ± 41
Test II	508.3 ± 50.4	1.8 ± 0.8	2888 ± 277	33.3 ± 14.0 *	1.0 ± 0	95 ± 17 *

Data represent the mean ± SE (n = 4). **P < 0.01, ***P < 0.001, compared with Test I. High: chimeric mouse with a high hAlb concentration, Low: chimeric mouse with a low hAlb concentration, Test I: 3-day pre-treatment of paroxetine, Test II: 3-day post-

treatment of paroxetine.

D. 考察

CYP2D6 はヒトにおいてデブリソキンやスパルテインの代謝を触媒することは古くから知られているが、その他にも様々なβ遮断薬や抗うつ薬の酸化的代謝に関与する。ヒトにおいて、CYP2D サブファミリーに属する分子種は CYP2D6、CYP2D7 および CYP2D8 が知られているが、CYP2D7 と CYP2D8 は偽遺伝子であるため、CYP2D サブファミリーにおいては CYP2D6 が酵素活性を有する唯一の分子種である。薬物動態試験で頻用されるラットでは、CYP2D1、CYP2D2、CYP2D3、CYP2D4 などが、また、マウスにおいても Cyp2d9 や Cyp2d10 をはじめとして複数の分子種が CYP2D サブファミリーに属している。特に CYP2D の薬物代謝能に関してヒトとげっ歯類の間で大きな種差が存在する理由は、発現する分子種、発現量、基質特異性の違いと考えられている。昨年度までの検討により、キメラマウスの肝にヒト CYP が発現していることを明らかにしたため、本章では特に CYP2D6 に注目し、キメラマウスを用いて *in vivo* での薬物代謝能および薬物相互作用の予測に関する検討を行った。

本章で使用したデブリソキンは、

ヒトの CYP2D6 に関する研究において古くから頻用されてきた代表的な基質である。デブリソキンはヒトや SD ラットでは 4'-水酸化体へと代謝されるが、Dark Agouti ラットではデブリソキン 4'-水酸化酵素活性が低いことが報告されている (Al-Dabbagh et al., 1981)。また、マウスの肝ミクロソームを用いた実験では、C57BL/6 マウス、DBA/2 マウス、ddY マウスにおいて、本酵素活性は極めて低いことが示されている (Masubuchi et al., 1997)。すなわち、種差のみならず系統差も認められており、動物実験からヒトへの外挿の難しさが改めて認識できる。本酵素活性はマウスにおいて極めて低いことから、キメラマウスにデブリソキンを投与し、血漿中 4'-水酸化デブリソキンを測定することにより、ヒトにおける薬物代謝能を評価・検討することが可能と考えた。そこで本章では、デブリソキン代謝試験 I (Test I) として、デブリソキンの代謝能を血漿中 4'-水酸化デブリソキン濃度を測定することにより評価した。次に、デブリソキン代謝試験 II (Test II) として、CYP2D6 の阻害薬であるキニジンとパロキセチンを 3 日間連続投与後、再度デブリソキンの代謝能を測定することにより、阻害薬

がデブリソキンの代謝に及ぼす影響を検討した。

デブリソキン代謝試験 I (Test I) において、4'-水酸化デブリソキンの AUC が高 hAlb 群のキメラマウスで低 hAlb 群や uPA(-/-)SCID マウスより顕著に高く、また、Cmax も高値を示した。また、デブリソキンの AUC、Cmax については 3 群で顕著な差は認められなかったが、高 hAlb 群でこれらのパラメーターはともに低 hAlb 群や uPA(-/-)SCID マウスよりも低値を示した。これより、*in vivo* においてキメラマウスはヒト型の薬物代謝プロファイルを示すことが明らかになった。

これまでに CYP2D6 が触媒する薬物代謝を予測する実験動物モデルとして、Corchero ら (2001) がヒト CYP2D6 のトランスジェニックマウスを樹立した。彼らはこのトランスジェニックマウスの *in vivo* における CYP2D6 の薬物代謝能を、デブリソキン経口投与後の血漿中 4'-水酸化デブリソキンを測定することにより評価している。それによると、野性型のマウスに比べ、CYP2D6 のホモ接合体であるトランスジェニックマウスは 4'-水酸化デブリソキンの AUC が高く、デブリソキンの AUC は低いという結果が得られている。このトランスジェニックマウスは受精した

マウスの卵にヒト CYP2D6 DNA をマイクロインジェクトして樹立した系であるため、CYP2D6 酵素活性が極めて高い可能性も否定できず、実際のヒトの CYP2D6 酵素活性を反映しているかどうかは不明である。これに対し、本章で使用したキメラマウスは *in vitro* において、ドナーと同程度の薬物代謝能を有することを昨年度明らかにしたため、おそらく、*in vivo* においても、ヒトの代謝能を反映していると推測される。しかし、この点に関しては更なる検討が必要であろう。

次に、CYP2D6 阻害薬の前投与がデブリソキンの代謝に及ぼす影響について検討した。キニジンは古くから臨床で使用されてきた抗不整脈薬であり、ヒト CYP2D6 の代表的な阻害薬として知られている。肝ミクロソームを用いた阻害実験で、デブリソキンの 4'-水酸化酵素活性に対するキニジンの Ki 値はヒトにおいて 0.6 μM であるが、ラットにおいては 50 μM であった (Kobayashi et al., 1989)。しかし、マウスについて、キニジンの阻害作用に関する報告はなされていない。キニジンの前投与により、高 hAlb 群で 4'-水酸化デブリソキンの AUC および Cmax が有意に減少した。キメラマウスにおいて、キニジンによる CYP2D6 の阻害作用

が認められたことから、*in vivo*における薬物相互作用を再現できることが示唆された。これに対し、低 hAlb 群や uPA(-/-)SCID マウスでは顕著な変化は認められなかった。従って、ラットと同様、マウスにおいてもデブリソキンの 4'-水酸化酵素活性に対するキニジンの阻害作用は弱いと考えられる。これより、本章で用いたキニジンの投与量では、高 hAlb 群におけるキニジンの阻害作用はヒト特異的と考えられる。*In vivo*における CYP2D6 酵素活性のヒト特異的な阻害が高 hAlb 群のキメラマウスで認められたことから、ヒトで起こりうる薬物相互作用を予測することが可能と考えられる。

CYP の阻害様式には可逆的な阻害と不可逆的な阻害がある。可逆的な阻害様式としては競合阻害、非競合阻害、不競合阻害がある。上述したキニジンのデブリソキン 4'-水酸化酵素活性に対する阻害作用は *in vitro*において競合阻害であると報告されている (Kobayashi et al., 1989)。不可逆的な阻害様式として、mechanism-based inhibition と呼ばれる阻害があり、これは、阻害薬が代謝されて生成した中間体が酵素の活性中心に共有結合することにより酵素を不活性化するものである。そこで、不可逆的な阻害が認められ

るか検討を行うため、ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 実験で CYP2D6 の mechanism-based inhibition が報告されているパロキセチンを用いて (Bertelsen et al., 2003)、同様に検討を行った。その結果、パロキセチンの前投与により、いずれの群においても 4'-水酸化デブリソキンの AUC および Cmax の有意な低下が認められた。デブリソキンについても全ての群において、AUC および Cmax の上昇傾向が認められた。mechanism-based inhibition に関して、種差の報告がこれまでになされていないため、ヒト特異的な阻害を検討することはできなかったが、高 hAlb 群において 4'-水酸化デブリソキンの AUC が顕著に減少したことから、異なる阻害様式であるパロキセチンについても阻害が認められることが明らかになった。

以上より、キメラマウスのヒト CYP2D6 酵素活性をキニジンやパロキセチンが阻害することを明らかにした。本章で認められた CYP2D6 阻害薬によるデブリソキンおよび代謝物である 4'-水酸化デブリソキンのキネティックパラメーターの変動を基に、ヒトでの相互作用を予測するためにはさらなる検討が必要と考えられる。しかし、キメラマウスは *in vitro* 実験系や実験動物を用いた *in vivo* 実

験よりもさらにヒトに近い状態で、薬物相互作用の検討を行うことが出来る動物モデルであると考えられる。ヒトへの外挿について様々な検討が行われており、予測方法も改良が重ねられているが、キメラマウスを用いて同様の検討を行うことにより、ヒトにおける薬物相互作用をより詳細に予測することができると期待される。

E. 結論

本章では、*in vivo*においてヒト肝細胞キメラマウスはヒトの薬物代謝能を有することを明らかにした。また、ヒト特異的な薬物相互作用が発現することを明らかにした。これより、キメラマウスはヒトにおける薬物相互作用を *in vivo* で検討することが可能な実験動物モデルとして活用できると考えられる。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：

ヒト肝細胞キメラマウスにおける *in vivo* 薬物代謝能の検討；日本薬学会第125年会、平成17年3月29-31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）

Al-Dabbagh SG, Idle Jr and Smith RL (1981) Animal modelling of human polymorphic drug oxidation—the metabolism of debrisoquine and phenacetin in rat inbred strains. *J Pharm Pharmacol* **33**: 161-164.

Bertelsen KM, Venkatakrisnan K, Von Moltke LL, Obach RS and Greenblatt DJ (2003) Apparent mechanism-based inhibition of human CYP2D6 *in vitro* by paroxetine: comparison with fluoxetine and quinidine. *Drug Metab Dispos* **31**: 289-293.

千葉寛 (1995) チトクローム P450 を介した薬物相互作用. *ファルマシア* **9**: 992-996.

Corchero J, Granvil CP, Akiyama TE, Hayhurst GP, Pimprale S, Felgenbaum L, Idle JR and Gonzalez FJ (2001) The CYP2D6 Humanized Mouse: Effect of the Human CYP2D6 transgene and HNF4 α on the disposition of debrisoquine in the mouse. *Mol Pharmacol* **60**: 1260-1267.

Guengerich FP (1996) *In vitro* techniques for studying drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* **24**: 521-533.

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.

Kobayashi S, Murray S, Watson D, Sesardic D, Davies DS and Boobis AR (1989) The specificity of inhibition of debrisoquine 4-hydroxylase activity by quinidine and quinine in the rat is the inverse of that in man. *Biochem Pharmacol* **38**: 2795-2799.

Masubuchi Y, Iwasa T, Hosokawa S, Suzuki T, Horie T, Imaoka S, Funae Y and

Narimatsu S (1997) Selective deficiency of debrisoquine 4-hydroxylase activity in mouse liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **282**: 1435-1441.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 414-423.

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
分担研究報告書

ヒト肝細胞キメラマウスにおける塩酸アモスラロールの代謝に関する
検討および薬物輸送トランスポーターに関する組織学的検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部

協力研究者 鈴木 勝広 山之内製薬(株)代謝研究所 主任研究員

研究要旨

肝組織をヒト肝細胞で置換したマウスの医薬品開発への応用について検討した。本研究の第I章では、ヒトとそれ以外の動物種で代謝が大きく異なっていることが判明している β ブロッカーの1種である塩酸アモスラロールをキメラマウスに単回経口投与した。この尿および胆汁中代謝プロファイルはヒト肝細胞低置換マウスにおいては、通常のICRマウスの代謝プロファイルに類似していた。高置換マウスの尿においての主代謝パターンは低置換マウスのそれと類似していたが、それらに加え、ヒトの主要代謝物であるM3硫酸抱合体(M3S)が置換率と共に増加していることが判明した。胆汁においては置換率よりも個体差の影響が大きいことが明らかとなったが、ヒト肝細胞置換率に応じてM3Sが増加していることが判明した。凍結肝実質細胞を用いて*in vitro*代謝試験においては、ICRマウスとヒトとヒト肝臓キメラマウスから調製した凍結肝実質細胞の反応液を比較したところ、ヒトとヒト肝臓キメラマウスの代謝パターンが類似した。第II章では、マウス肝臓内に着生し増殖した肝細胞の組織学的考察をヒト抗体を用いた各種染色のほか、ヒトトランスポーターの抗体も用いて代謝や毒性学の観点から実施した。ヒト肝細胞は本来の肝小葉、肝細胞索の構造を欠くがヒト肝細胞間で類洞および毛細胆管の形成が観察された。また、ヒトトランスポーターの免疫化学的染色では、apical-basolateralに存在するトランスポーターがそれぞれ局在化し発現していることが確認された。今回用いた薬剤はマウスでヒトよりも大きなクリアランスを示し、これがキメラマウスの残存マウス肝細胞により代謝されることが判明した。今後の検討課題として残存マウス細胞による代謝の影響の回避が上げられた。

ヒトにおける薬物の代謝物を早期に予測することはヒト代謝物の動物における暴露の検証、ヒト特異的代謝物の有無の確認と毒性の確認等が見込まれるため、医薬品開発時および臨床における重要課題である。本研究での*in vivo*代謝に関する基礎的な検討結果より、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトにおける薬物動態研究の有用な手段として可能性を有していると考えられた。

A. 研究目的

新規医薬品開発における早期のヒトの代謝の予測は薬理的、毒性学的研究においてヒトの代謝能と相同性の高い動物種を選択するのに貢献すると思われる(Wrighton et al., 1995)。これまでヒトの代謝の予測にはヒトと動物種間での種差が存在し、各種実験動物を用いた薬物のヒトでの有効性、安全性を予測するには必ずしも十分とはいえない状況であった。このような状況を打開すべく、さまざまな試みが世界中でなされてきた。例えばヒトの肝ミクロソーム、肝スライス、凍結肝実質細胞などである(Ekins et al., 2000; Brandon et al., 2003)。これらを用いた方法は調製方法、種差、系統差、ロット間差、酵素活性の発現の有無、第 II 相抱合反応への補酵素の添加の有無等、条件が詳しく検討され方法が確立されている。しかし、これらの*in vitro*代謝がヒトの代謝を反映しているかの確認はヒトの尿および血漿との比較が必要になっている。

また、これら*in vitro*代謝試験においては*in vivo*における吸収、分布および排泄過程が欠除しているが、生体においてはこれらの過程が薬理、薬物動態や毒性発現において重要な要因であり、薬物によってはこの過程で代謝を受けたり毒性を発現に関与する場合も多く*in vitro*代謝でヒトにおける薬物動態等を全て網羅しているとは言えないのが現状である(Guillouzo et al., 1985)。ヒトの代謝予測をする上でこのような問題点を克服する試験方法および材料は常に関心が高く、より*in vivo*に近い系が模索され検討されている。

このような状況の下、本研究では吉里勝利教授（分担研究者）によって開発された「ヒト肝細胞キメラマウス」(Tateno et al., 2004)を用いることにより、従来の*in vitro*試験や動物を用いた各種試験の欠点を補ったヒトにおける薬物動態および安全性を予測するツールとしての有用性を確認することを目的とした。

今回被験試薬として選択した塩酸

アモスラロール（販売名ローガン®、Fig. 1）は当社において創製された本態性高血圧を適応症とする β -受容体遮断作用を有する医薬品である（Ando et al., 1992）。その薬物動態および代謝物および代謝経路については詳細に調べられ（Sasaki et al., 1984, Kamimura et al., 1985）、そのPKパラメーター（Kamimura et al., 1984）をTable 1に、代謝物の構造をFig. 2に、マウスとヒトにおける代謝物の尿における投与した未変化体に対する排泄率をTable 2にそれぞれ示した。本物質はマウスとヒトでクリアランスに差があるものの、ヒトとマウスでは代謝物プロファイルが大きく異なり、ヒト肝臓由来による代謝物と残存マウス肝臓による代謝物の差を検証するには最適の薬物と思われた。そこで本研究において、本薬物をキメラマウスに経口投与し、尿中代謝物の未変化体および各種代謝物の濃度を測定した。さらに凍結肝実質細胞（cryopreserved hepatocytes）を用いた *in vitro* 代謝試験を実施し *in vitro* 系での検証も併せて行った。これらの結果を第I章に記す。

他方、ヒト肝細胞の増殖したキメラマウスの肝臓の構造を評価することも代謝上重要と思われた。哺乳類の肝は肝小葉の集まりから成立して

いる。それぞれの肝小葉はグリソン鞘という結合組織で隔てられている。グリソン鞘の中には固有肝動脈、門脈、肝管の枝が一組になって走っている。肝細胞はブロック状に並びこのブロックとブロックの間に類洞と呼ばれる毛細血管が走っている。1つの肝細胞のブロックを肝細胞索という。肝細胞索の内側に毛細胆管の集合したこれが小葉間胆管に繋がり総胆管へ胆汁を分泌する。以上のように肝細胞は血液から薬物などを取り込み胆汁へ排泄するという機能的な構造を有している。マウスに移植されたヒト肝細胞がマウスの肝臓内で定着した後、薬物の取り込みから胆汁へ分泌できる機能的な構造を有しているか知ることは、代謝を考察する上でも重要である。標準的な染色方法のほかに、ヒト特異的タンパクの染色により構造の知見を得ることとした。

また、近年薬物動態分野では吸収・排泄過程においてトランスポーターが重要な役割を果たしていること明らかにされ、主要臓器、例えば小腸、肝臓、腎臓、脳血管、胎盤のトランスポーターの種類や遺伝子の同定や機能・構造等が詳細に調べられ、さらに輸送する基質となる医療用薬剤と相互作用も調べられ、知見が集積されつつある（Fig. 3）。また、これら