

I. 補足（文中で使用した引用論文を示す）

薬学雑誌 122(12) 1037-1058 (2002) 生体膜輸送の分子機構に関する生物薬剤学的研究 辻 彰（トランスポーターのFig. 3の由来）

Ando K, Noda H, Ogata E and Fujita T (1992) Hemodynamic and endocrine changes associated with hypotensive action of amosulalol in essential hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **20**:7-10.

Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH and Schellens JH (2003) An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology & Applied Pharmacology* **189**:233-246.

Ekins S, Ring BJ, Grace J, McRobie-Belle DJ and Wrighton SA (2000) Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *Journal of Pharmacological & Toxicological Methods* **44**:313-324.

Gonzalez FJ and Kimura S (2003) Study of P450 function using gene knockout and transgenic mice. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **409**:153-158.

Guillouzo A, Begue JM, Maurer G and Koch P (1988) Identification of metabolic pathways of pindolol and fluperlapine in adult human hepatocyte cultures. *Xenobiotica* **18**:131-139.

Kamimura H, Sasaki H and Kawamura S (1984) Pharmacokinetics of

amosulalol, an alpha, beta-adrenoceptor blocker, in rats, dogs and monkeys. *Xenobiotica* **14**:613-620.

Kamimura H, Sasaki H and Kawamura S (1985) Metabolism of amosulalol hydrochloride in man: quantitative comparison with laboratory animals. *Xenobiotica* **15**:413-420.

Nakashima M, Asano M, Ohguchi S, Hashimoto H, Seki T, Miyazaki M and Takenaka T (1984) Amosulalol, a combined alpha and beta adrenoceptor antagonist: kinetics after intravenous and oral doses. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **36**:436-443.

Sasaki H, Kamimura H, Kaniwa H, Kawamura S, Takaichi M and Yokoshima T (1984) Disposition and metabolism of amosulalol hydrochloride, a new combined alpha- and beta-adrenoceptor blocking agent, in rats, dogs and monkeys. *Xenobiotica* **14**:621-631.

Tateno C, Yoshizane Y, Salto N, Soeno Y, Kataoka M, 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. *American Journal of Pathology :in press*

Wrighton SA, Ring BJ and VandenBranden M (1995) The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies. *Toxicologic Pathology* **23**:199-208.

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薬物トランスポーターの発現および誘導能に関する検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部
協力研究者 玉井 郁巳 東京理科大学薬学部 教授

研究要旨

マウス肝の80%以上をヒト肝細胞に置換することが可能であるヒト肝細胞キメラマウスは、ヒトにおける薬物動態を予測する有用なシステムになり得ると期待される。しかし、これまでキメラマウスのヒト薬物輸送トランスポーターに関する詳細な検討は行われていない。そこで本研究では、代表的な薬物トランスポーターであるOrganic Anion Transporting Peptide (OATP)の発現および誘導能を評価することを目的に、mRNAレベルでの発現量の変動について検討を行なった。さらに、キメラマウスの評価としてラット肝臓初代培養を用いてoatpの発現および誘導能を調べ比較したのち、本キメラマウスの有用性の検討を行った。

キメラマウスに発現しているヒト薬物トランスポーターの誘導能を明らかにするために、コレステロール、胆汁酸などの生体内物質センサーとして機能している核内レセプターに着目し誘導能の検討を行った。ラット肝初代培養の結果を基に、ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞に、5種類の化合物 [cholic acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), dexamethasone (DEX), retinoic acid (RA), 22R-hydroxycholesterol (HC)]で前処理し、各OATPの発現変動パターンを比較した。この結果、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞においてもヒト凍結肝細胞同様OATPsの発現誘導能は比較的保持している結果が得られた。今後、キメラマウスの例数を増やして更なる検討を行うとともに、OATP以外の薬物トランスポーターに関しても様々な検討する必要があると考えられる。

ヒトにおける薬物動態を予測することは薬物の適正使用ならびに副作用の回避につながるため、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

での薬物トランスポーター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期待できる。

A. 研究目的

肝臓への薬物の移行性や代謝能に関する情報は、薬物の有効性のヒトでの評価として薬物代謝酵素活性の動態変動への影響やバイオアベイラビリティの推測に有用であるとともに、肝毒性の予測など、医薬品開発に必須である。しかし、国内においては欧米で行われているような移植不適臓器の使用が容易ではなく、ヒト肝細胞を用いた医薬品評価は困難であり、ヒト試験は海外での試験あるいは海外で得られた限られた臓器試料に依存しているのが現状である。また、ヒト試験が困難なことから前臨床試験としてマウスやラットを用いて安全性や薬理効果評価を行う必要が増える。しかし、薬物代謝酵素については種差が明確になっており、得られた結果のヒトへの外挿の有用性は論争になっている。これらを解決するためにはヒト試料をいかにして国内で医薬品評価に効率的に使用できる体制にするかがポイントであり、日本薬物動態学会を中心に国内におけるヒト試験の必要性が高まっている。一方、ヒト試料を利用する体制も早急に高める必要があるが、その代替手法として人工の肝

臓を作成する様々な試みがなされてきた。過去に Dandri 等や Mercer 等によって免疫不全肝障害マウス (urokinase-type plasminogen activator/severe combined immunodeficient; uPA/SCID) を用いて正常成人の肝臓を一部置換することに成功したが、それらの報告は置換率が 15%程度であった (Dandri et al., 2001; Mercer et al., 2001)。最近、吉里らによって、uPA/SCID マウスにヒトの肝細胞を移植し、マウス肝臓の 80%をヒト由来細胞に置き換えたキメラマウスの生産技術を開発した (Tateno et al., 2004)。この技術によって、ディッシュ上の培養と比較して少量の肝細胞を効率よく増殖させることが可能になり、機能面でも、ヒト型の P450 を発現していること (Kato et al., 2004) や、ヒト肝細胞で置換されたマウスが生存していることから、マウス肝臓内でのヒト肝細胞は各種肝機能を保持していることが予測される。しかし、実際にヒト肝細胞キメラマウスが、in vivo や in vitro での薬物代謝試験、毒性試験にどこまで有用であるかについては必ずしも樹立された状態では

なく、現在その評価が共同体制で進められている。

肝臓においてアニオン系の化合物の肝移行に働いていると考えられるトランスポーターとして OATP ファミリーが発現している (Tamai et al., 2000)。OATP ファミリーはヒトとげっ歯類の間に種差があり、アミノ酸相同性、基質選択性、発現組織とどの面からも完全に一致するものはほとんどない (Hagenbuch et al., 2003)。例えばヒトの OATP-C や OATP8 とラットやマウスにおける *oatp4* は、共に肝臓特異的に発現しているが、アミノ酸相同性において約 65%程度しか一致していない。つまり、OATP によって肝臓に移行する薬物に関して、マウスやラットでの試験結果をヒトに分子レベルで外挿することはできない。ここで、ヒト肝キメラマウスが期待される。ヒト肝キメラマウスにおいて発現している OATP がヒトと同様の働きを保持しているならば、アニオン性の薬物の肝移行を試験する際に有用なツールとなりうる。

ヒト肝キメラマウスの有用性評価を目的とし、肝臓に発現するトランスポーターの観点から解析することを目的とした。中でも上述の OATP トランスポーターを中心に、ヒト凍結肝細胞とヒト凍結肝細胞の移植に

よってマウスから得られたヒト肝キメラマウス凍結肝細胞の比較をおこなった。さらに、ラットにおける各 *oatp* の発現誘導能のヒトとラットの対応付けを目的に同様の検討を行った。本検討では、特に各種核内レセプターのリガンド処置により、ヒト凍結肝細胞における OATP の発現変動がヒト肝細胞キメラマウスでも再現されるかという発現調節に関わる観点からヒト肝キメラマウスの評価を行うことにした。

B. 研究方法

B-1. 細胞

ヒト凍結肝細胞 (cryopreserved human hepatocytes; Lot. 59, NOG, XPK; Table 1) はチャールズリバーより購入した。ヒト肝キメラマウス試料については、吉里研究室にて共同研究として金沢大学の横井毅教授等が得た凍結肝細胞を提供いただいた。なお、マウスに移植されたヒト肝細胞のロットは Lot. 79 であり、マウスのロット番号は CTE22-4, 22-11 である。

B-2. 凍結肝細胞培養

ヒト凍結肝細胞; Type I コラーゲンでコートされた 24 well のプレート (旭テクノグラス) に培地 250

Table 1 Human donor demographics and medical histories for plateable cryopreserved hepatocytes.

Lot No.	Age (yrs)	Sex	Race	Cause of Death	Tabaco Use	Alcohol Use	Substance Use
59	33	Male	C	ICB	Yes	Yes	No
79	0.75	Male	C	HT	No	No	No
NOG	49	Male	C	Head trauma	No	Yes	No
XPK	39	Male	H	Head trauma	Yes	Yes	Yes

Abbreviations: [races]: C, Caucasian; H, Hispanic; [causes of death]: ICH, intracranialhemorrhage; HT, head trauma.

マウス番号	予想置換率	得られた細胞数 ($\times 10^6$ 個生細胞数)	調整日
CTE22-4	> 80%	56.13	2003, 11, 12
CTE22-11	> 80%	2.1	2003, 11, 12

μL を添加し、 CO_2 インキュベーター内で一時間以上平衡化した。

Hepatocyte Thawing Medium (DMEM with 10% FBS + 4 g/L BSA) を 48 mL、 37°C に暖めた。氷上にて細胞保存容器の蓋を緩めて、圧を抜いた。蓋を締め、 37°C の恒温槽でかるく攪拌しながら溶かした。暖めておいた Hepatocyte Thawing Medium にバイアルの中身を移し、ゆっくり攪拌した。室温で、 $50\times\text{g}$ で 5 分間細胞懸濁液を遠心した。上清を吸引し、Hepatocyte Plating Medium (DMEM with 10% FBS + 2 g/L BSA) を 2 mL 加え、チューブを転倒しやさしく懸濁した。トリパンブルーにより生存率を算出後、12mL にメスアップし、平衡化した培地を捨ててから 2.5×10^5 viable cells/mL でプレートに蒔いた。

ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞；

Type I コラーゲンでコートされた 24 well のプレート (旭テクノグラス) に培地 250 μL を添加し、 CO_2 インキュベーター内で一時間以上平衡化した。氷上にて細胞保存容器の蓋を緩めて、圧を抜いた。蓋を締め、 37°C の恒温槽でかるく攪拌しながら溶かした。50 mL のファルコンチューブにバイアルの中身を移し、氷冷した培地をゆっくり滴下した。 4°C で、 $50\times\text{g}$ で 3 分間細胞懸濁液を遠心した。上清を吸引し、氷冷培地を 6 mL 加え、チューブを転倒しやさしく懸濁した。トリパンブルーにより生存率を算出後、12mL にメスアップし平衡化した培地を捨ててから 2.5×10^5 viable cells/mL でプレートに蒔いた。

ヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウスの肝細胞共に培地は DMEM に 10% FBS、70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin、139 $\mu\text{g}/\text{mL}$

penicillin, 2 g/L BSA, 1 μ M dexamethasone, 1 μ M insulin を加えたものを用いた。この肝実質細胞をコラーゲンコートした 24well のプレートに 1.0×10^5 cells / cm^2 で播種し 37°C で培養した。3 時間後、DMEM から FBS, dexamethasone, insulin を除いた培地に交換した。以後、24 時間毎に培地を交換した。

B-3. 初代培養ラット肝実質細胞の調製

Wistar 系ラット(♂)7 週令を埼玉実験動物供給所 (Saitama, Japan) より購入した。ラットの肝細胞は、コラゲナーゼ肝灌流法 (Moldeus et al., 1978)により単離、精製した。

EGTA 液 (8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.121 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.265 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.35 g/L NaHCO_3 , 1.0 g/L Glucose, 0.0006 g/L phenol red, 2.383 g/L HEPES, 0.190 g/L EGTA) とコラゲナーゼ液 (8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.121 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.735 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.35 g/L NaHCO_3 , 1.0 g/L glucose, 0.0006 g/L phenol red, 2.383 g/L

HEPES, 0.5 g/L collagenase) に O_2 を約 10 分通気した。ラットはジエチルエーテルにより麻酔した。ラットの腹部を切開し、門脈を露出させた。門脈にカニューレ (24G) を通し、まず EGTA 液を 40 mL/min, 37°C で約 3 分灌流した。次に、コラゲナーゼ液を 40 mL/min, 37°C で約 2 分灌流した。肝臓を単離し、氷冷した HBSS 液 (8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.121 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.265 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.35 g/L NaHCO_3 , 1.0 g/L glucose, 0.0006 g/L phenol red) に浸した。肝臓をはさみで細分化し、氷冷した HBSS 液にて懸濁し、ステンレスメッシュ (150 mesh) でろ過した。ろ過した細胞懸濁液を 500 rpm で 3 分遠心した。上清を除去後、氷冷した HBSS 液にて再度懸濁した。遠心後、細胞を HBSS 液にて懸濁する操作を 3 回繰り返した。3 回目の遠心後、上清を取り除き、培地を加えた。培地は DMEM に 10% FBS, 70 μ g/mL streptomycin, 139 μ g/mL penicillin, 2 g/L BSA, 1 μ M dexamethasone, 1 μ M insulin を加えたものを用いた。この肝実質細胞をコラーゲンコートしたシャーレに 1.0×10^5 cells/ cm^2 で播種し

37°Cで培養した。3時間後、DMEMからFBS, dexamethasone, insulinを除いた培地に交換した。以後、24時間毎に培地を交換した。

B-4. リガンド処置

細胞を播種した24時間後に核内受容体のリガンド、アンタゴニストを加えた培地を交換した。Cholic acid (CA)は滅菌水を溶媒とした。dexamethasone (DEX)、all-trans retinoic acid (RA)、rifampin (RIFA)、TCPOBOP (TCPO)、pregnenorone-16 α -carbonitrile (PCN)、estradiol (E₂)、RU486、ciprofibrate (CIPRO)はDMSOを溶媒とした。22(R)-hydroxy cholesterol (HC)、

ethanol (EtOH)を溶媒とした。培地中のDMSO、EtOH濃度は0.1%に調製した(Table 2)。

B-5. Real-time PCRによる定量

mRNAレベルの変化をreal-time PCR (ABI PRISM 7700)によって定量した。Oligo(dt)プライマー (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA)を用い逆転写を行った。作成したcDNAをテンプレートとしqPCR™ Mastermix Plus SYBR Green I (ニッポンジーン)と特異的なプライマー (Table 3)によってRT-PCRを行った。サンプルのcDNA量を算出するためにプラスミドをテンプレートとして検量線を作成した。検量線は10²~10⁶コピーのプラスミ

Table 2 Nuclear receptors and these ligands.

Nuclear Receptor	Typical Ligands
Liver X Receptor (LXR)	22(R)-Hydroxycholesterol (HC)
Farnesoid X Receptor (FXR) acid (CDCA)	Cholic acid (CA), Chenodeoxycholic acid (CDCA)
Estrogen Receptor (ER)	Estradiol (E ₂)
Glucocorticoid Receptor (GR)	Dexamethason (DEX; >0.1 μ M)
Retinoic Acid Receptor (RAR)	Retinoic Acids (RA)
Human; Pregnane X Receptor (PXR)	Rifampin (Rifa)
Rat; Pregnane X Receptor (PXR)	Pregnenorone-16 α -carbonitrile (PCN)
Constitutive Androstane Receptor (CAR)	TCPOBOP (TCPO)
Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR α)	Ciprofibrate (CIPRO)
Retinoid X Receptor (RXR)	9-cis Retinoic Acid (RA)
Nuclear Receptor	Antagonist
Glucocorticoid Receptor (GR)	RU486

From reference (Wilson et al., 2002; Honer et al., 2003)

chenodeoxycholic acid (CDCA)は

ドを用いた。半定量 PCR 法は定法

にしたがった。

C. 研究結果

Table 3-1 Primer sequences for the human genes of G3PDH and transporters.

Transporter	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')
OATP-A	AAGACCAACGCAGGATCCAT	GAGTTTCACCCATTCCACGTACA
OATP-B	CTTAGCAGTCACAGACTCACC	GGACTAGGCCATCCTGCTT
OATP-C	GAATGCCCAAGAGATGATGCTT	AACCCAGTGCAAGTGATTTCAAT
OATP-D	GGCACTGCCACGTGGTGG	CTACGACAATGTGGTCTACC
OATP-E	GCACCAGTTGAAGGACAGC	GAGCCAGATGGAGAGAGG
OATP8	GTCCAGTCATTGGCTTTGCA	CAACCCAACGAGAGTCCTTAGG
G3PDH	GGCTGCTTTTAACTCTGG	CGGTGCCATGGAATTTGCC

Table 3-2 Primer sequences for the rat genes of G3PDH, transporters and nuclear receptors.

Nuclear Receptor	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')
LXR	CGTGACCCACTATGTCTTCCC	GGTCGGAGAAAGATCGCTTGT
PXR	ACCTACATGTTCAAGGGCGTCATC	GCAGGATATGGCCGACTACACTC
RXR_	CTAAGATGCGTGACATGCAG	GTAAAGATGGCGAGAGTGGT
GR	GACAAAGCTTCTGGACTCCAT	CGACCCATTTTCACACGGAA
RAR	ATTGCCGACCAGATTACCCTT	CAGCATGTCCACCTTGCTG
CAR	CCTGGGGTTACCCAAAGAGAA	CAGCTGCAAATCTCCCAAG
PPAR	CCTTACCTGTGAACACGATCT	AGCAGTGAAGAATCGGAC
FXR	CGGACATGCAGACCTGTTGGAAG	CCAGTGGGTTTCTCTGAAGCC
HNF4	AATGACTACATCGTCCCTCGG	CCAGGTAATGCTCTGCAGAGT
ER	AAGCCTCAATGATGGGCTTAT	CTGTCCAAGAGCAAGTTAGGAG
Transporter	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')
Oatp1	GTTGACCTGTGACAATGCAGC	AGCTTGATCCTCTTAGTGCTATAGG
Oatp2	GGCTGCACTAAGAGGAGCA	AACTTTGACGGCCTTATGGATAAC
Oatp3	GCCATTCATGAAGAGCCTCTC	CATATACCCAGGTATGGCTGTG
Oatp4	ACGACATTGGCTCTCTAGGC	CTTGGCGATTCCAACCGATG
Oatp9	CTTTGGGAAGAGCAGGTGAG	GTCCAGTGACCTATTGTCCG
Oatp11	AGTCTTACGCGCTGGGAGTT	GCGATGCTGACGTACAGGTATC
Oatp12	CTGGTTCTCGTGTTCGTTGT	CTGGGATACTGCCTAGCGT
G3PDH	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC

C-1. ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞における OATP ファミリーの発現量

ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞における各 OATP の発現量を調べた。調べたトランスポーター分子は OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E および OATP8 である。ヒト凍結肝細胞において OATP-D の発現量が最も高く、以下 OATP-E>OATP-C>OATP8>OATP-B の順であった。また、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞においては OATP-E の発現量が最も高く、以下 OATP-B>OATP-D>OATP8>OATP-C の順であった (Table 3)。OATP-A に関しては、発現は見られたが、ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞両細胞において定量限界以下と判断され、定量化することはできなかった。また、各 OATP の中で OATP-B の発現量がヒト凍結肝細胞と比較してヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞の方が 100 倍以上の発現量を示した。

C-2. OATP ファミリーの発現変動

ラット肝初代培養の結果を基に、ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞に 5 種類の化合物

[cholic acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), dexamethasone (DEX), retinoic acid (RA), 22R-hydroxycholesterol (HC)]を処置し、各 OATP の発現変動パターンを比較した。これらの結果は個体差が大きく、3 種類の異なるロットのヒト凍結肝細胞から mRNA を調製し、それぞれ独立した 3 回の実験によりデータを解析した (Figure 1)。

C-2-1. OATP-B

CA を処置することによってヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞共に発現の変化は見られなかった。RA 処置により、ヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞において共に 2 ロットで発現が低下した。CDCA 処置によりヒト凍結肝細胞において、2 ロットでは有意な発現の上昇が、1 ロットでは発現の低下が見られた。また、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞においては、CDCA 処置により発現が上がる傾向が見られた。一方、ヒト凍結肝細胞において DEX 処置により発現が上昇したが、キメラマウスでは変化しなかった。また、HC 処置により発現が上昇したが、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞では発現が減少するなど、ヒトとキメラマウスで

Table 3 Expression of OATPs in human cryopreserved and chimeric mouse hepatocytes.

		OATPs/G3PDH	Chimera / Cryopreserved
OATP-A	Chimara	$< 6.8 \times 10^{-3}$	-
	Cryopreserved	$< 1.4 \times 10^{-3}$	
OATP-B	Chimara	220×10^{-3}	130
	Cruopreserved	1.5×10^{-3}	
OATP-C	Chimara	19×10^{-3}	3.6
	Cruopreserved	5.2×10^{-3}	
OATP-D	Chimara	160×10^{-3}	0.8
	Cruopreserved	190×10^{-3}	
OATP-E	Chimara	600×10^{-3}	7.5
	Cruopreserved	80×10^{-3}	
OATP8	Chimara	6.2×10^{-3}	1.3
	Cruopreserved	4.6×10^{-3}	

一致しない発現変動が観察された。

C-2-2. OATP-C

RA を処置することでヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞共に1ロットで発現が低下した。また、CDCA 処置によりヒト凍結肝細胞で1ロット発現が上昇したのに対し、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞でも発現が上昇する傾向が見られた。HC 処置によりヒト凍結肝細胞で発現が上昇する傾向を示したのに対し、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞で1ロット発現が上昇した。また、DEX を処置することでヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞において1ロット発現の約 20%の低下を示したが、3ロットの傾向とし

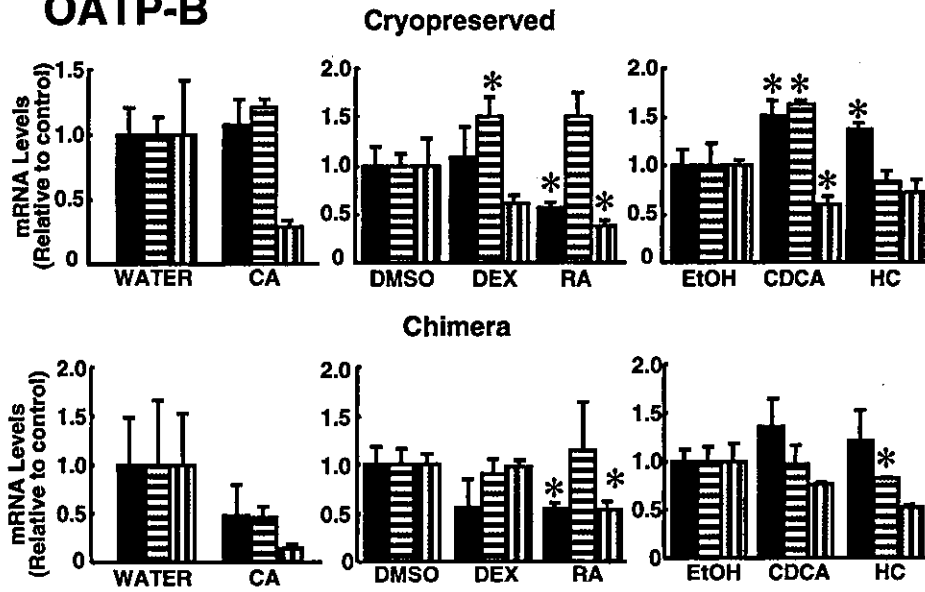
て DEX 処置の影響で発現は変化しないと判断した。また、ヒト凍結肝細胞も発現の変動は見られなかった。

C-2-3. OATP-D

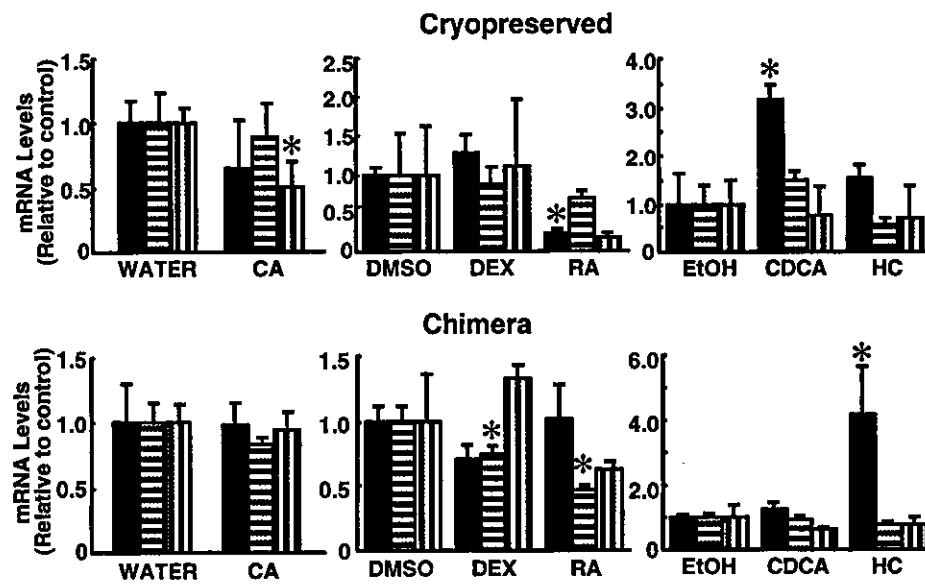
DEX、RA を処置することで、ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞共に発現量は変化しなかった。CA を処置することで、ヒト凍結肝細胞で発現が低下する傾向を示したのに対し、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞では1ロットで発現が低下した。CDCA を処置した結果、ヒト凍結肝細胞で1ロット発現が上昇したのに対し、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞で発現が上昇する傾向を示した。一方、ヒト凍結

Figure 1

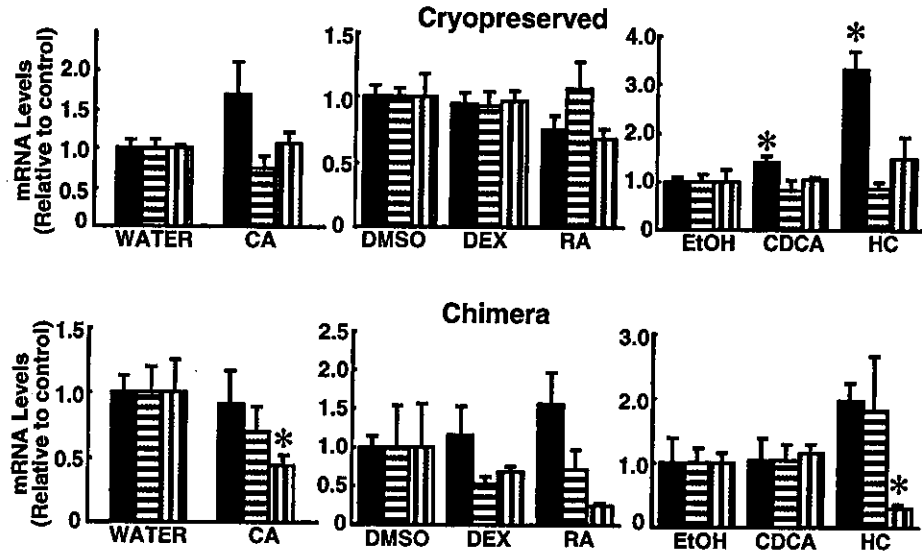
OATP-B



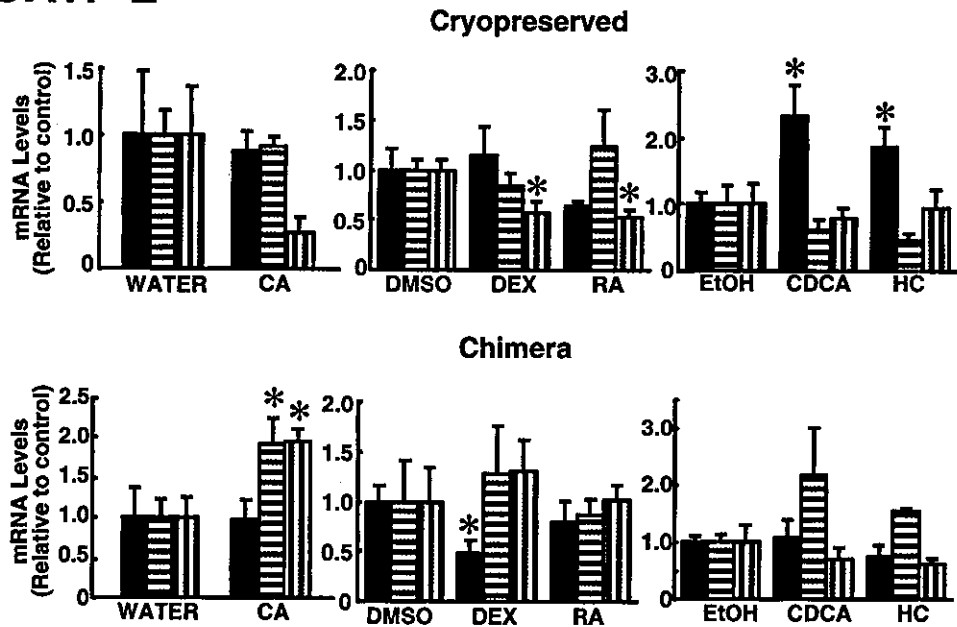
OATP-C



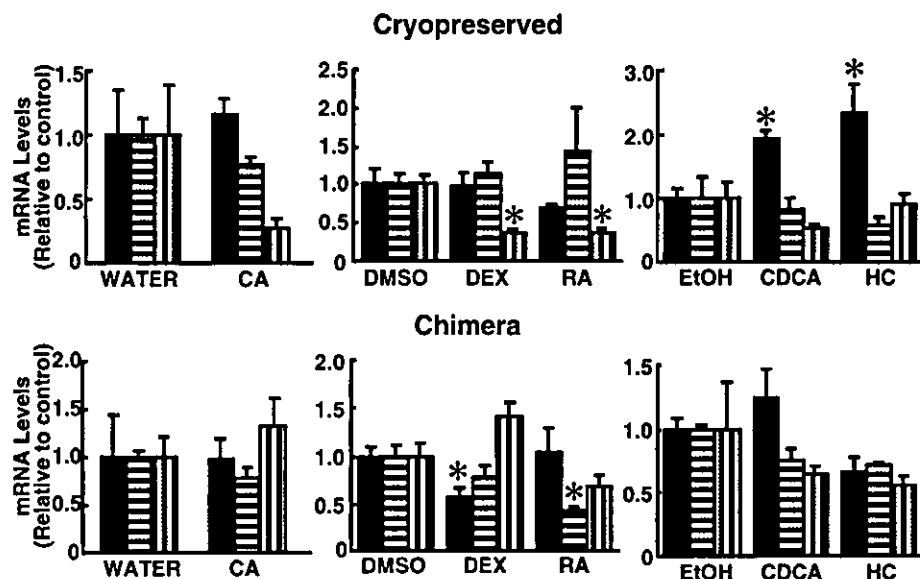
OATP-D



OATP-E



OATP8



Effect of nuclear receptor ligands on expression of OATP family in human cryopreserved and chimeric mouse hepatocytes.

The mRNA levels of transporter genes were measured by RT-PCR. mRNAs were prepared from human cryopreserved and chimeric mouse hepatocytes. Specific primers as described in the experimental section were used to determine the levels of expression of each transporter mRNA. Each chemicals were solved in water, 0.1% DMSO or 0.1% EtOH, and each control were treated counter solvent. Lot 59 was represented closed column. Lot NOG was represented horizontal stripe column. Lot XPK was represented vertical stripe column. Each points represent the mean \pm S. E. M. from three to seven experiments. *Significantly different from the control by t-test ($p < 0.05$).

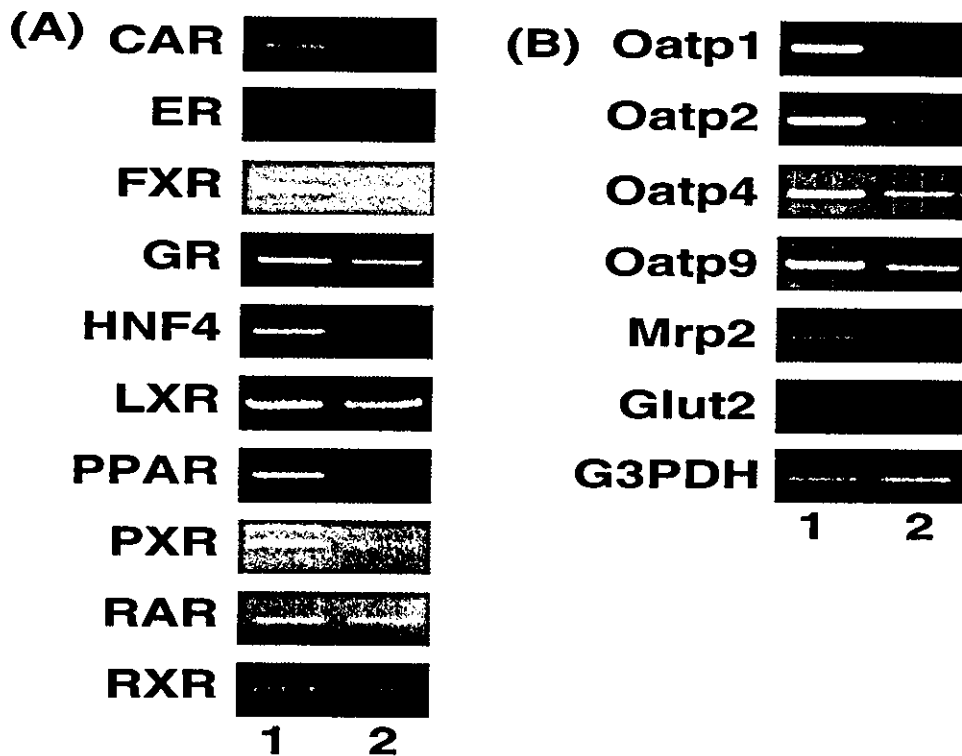


Figure 2 Expression of nuclear receptors (A) and drug transporters (B) in rat hepatocytes.

RT-PCR was performed with total RNA isolated from freshly isolated hepatocytes (lane 1) and primary cultured rat hepatocytes for 36 h (lane 2). PCR products were separated in 2.0% agarose gel.

肝細胞において HC 処置で発現が上昇したのに対し、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞においては発現が低下し、ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞間で一致しない誘導パターンを示した。

C-2-4. OATP-E

DEX 処置によりヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞において共に 1 ロットずつ有意に発現が低下した。さらに、CDCA、HC を

処置することでヒト凍結肝細胞において有意に発現が上昇したのに対し、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞においても同様に発現が上昇する傾向を示した。CA を処置することでヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞で 2 ロット発現の上昇を示したが、ヒト凍結肝細胞において変化は見られなかった。

C-2-5. OATP8

OATP8 に関しては、DEX あるいは RA 処置によりそれぞれ 1 ロッ

トでヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞において有意な発現の低下が観察された。また、CA処置により、ヒト凍結肝細胞とヒトキメラマウス肝共に変化がなかった。その他、CDCA処置によってもヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞両方において発現が上昇する傾向が見られた。

C-3. ラット肝臓初代培養細胞における核内受容体のリガンド処置が与える薬物トランスポーターの発現変動に対する影響

ラット肝臓初代培養細胞において、本検討で対象とした核内受容体とトランスポーターの発現の有無をRT-PCRによって調べた (Figure 2)。また、ラット肝実質細胞の初代培養前後での発現の変動を調べた (Figure 2)。核内受容体として LXR、RXR、GR、RAR、PXR、CAR、PPAR、FXR、HNF4、ER を、トランスポーターとして oatp1、oatp2、oatp3、oatp4、oatp9、oatp11、Mrp2、Gult2 の発現の有無を調べた。その結果、核内受容体はすべてが発現していた。また、トランスポーターに関しては oatp1、oatp2、oatp3、oatp4、oatp9、oatp11 が発現していた。さらに、

培養前後で発現が減少する遺伝子が多く検出された。Oatp3 の発現量は低く、定量限界以下であった。

ラット肝初代培養細胞に核内受容体のリガンドを 12 時間処置し、発現変動を測定した (Figure 3)。Oatp ファミリーに関しては oatp2 の発現が DEX 処置により 2.5 倍に増加したのに対し、oatp4 や oatp11 はそれぞれ 0.4 倍に減少した。また、oatp4 は CA、RA、CDCA 処置により、oatp11 は RA、HC 処置により有意に発現が変動したのに対し、oatp9 は CA 処置でのみ発現が減少した。Ntcp の発現が CDCA 処置により発現が減少することや oatp2 の発現が DEX 処置により上昇したことは他の報告と一致する結果である (Turncriff et al., 2004)。

D. 考察

本研究は、ヒト肝キメラマウスの有用性評価を目的とし、肝臓に発現するトランスポーターの観点から解析した。中でも OATP トランスポーターを中心に、ヒト凍結肝細胞とヒト凍結肝細胞の移植によってマウスから得られたヒト肝キメラマウス

Figure 3

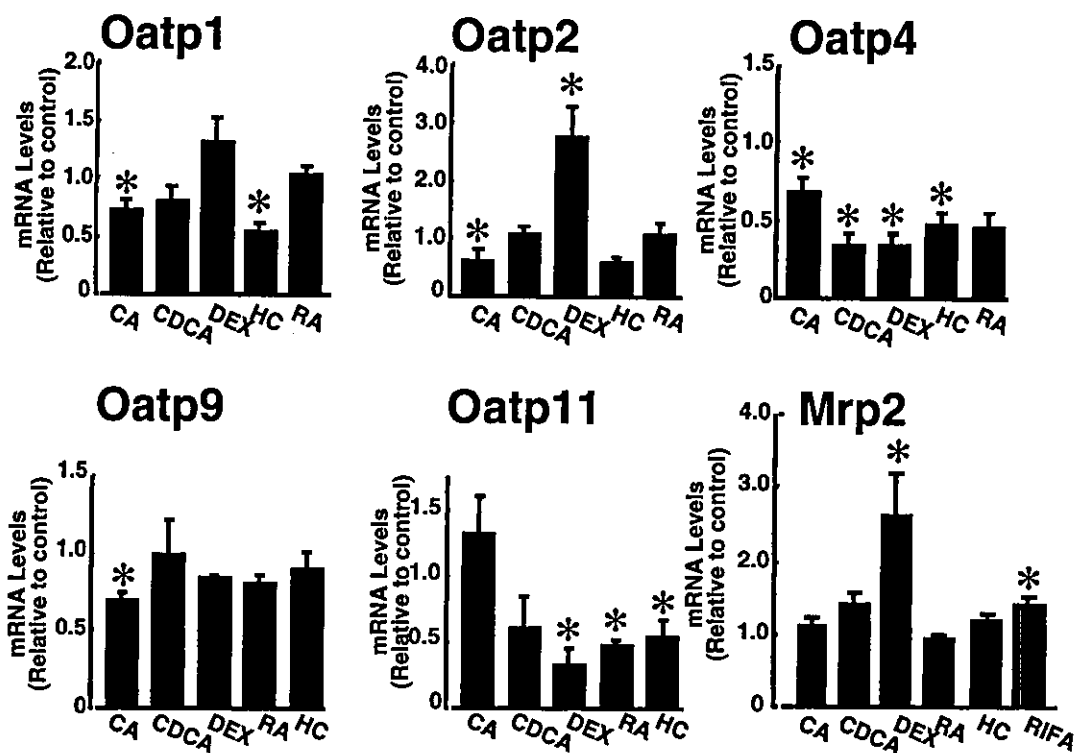


Figure 3 Expression induction of drug transporters mRNAs in primary cultured rat hepatocytes exposed to several ligands of nuclear receptor.

Primary cultured rat hepatocytes were treated with several ligands of nuclear receptors, including: CA (100 μ M), CDCA (200 μ M), DEX (100 μ M), RA (100 μ M), HC (30 μ M), RIFA (100 μ M), ESTRA (100 μ M), CIPRO (100 μ M), TCPO (5 μ M) for 24 h before harvest. Each Chemicals were solved in water (dot column), 0.1% DMSO (closed column) or 0.1% EtOH (open column). RT-PCR was performed with total RNA isolated from primary cultured rat hepatocytes for 36 h. Drug transporters mRNA levels, including: Oatp1, Oatp2, Oatp4, Oatp9, Oatp11 and Mrp2 were analyzed by RT-PCR. PCR products were separated in 2.0% agarose gel. Each points represent the mean \pm S. E. M. from three to seven experiments. *Significantly different from the control by t-test ($p < 0.05$).

凍結肝細胞の比較をおこなった。我々は以前にマウスやラットにおける各 *oatp* の発現制御は異なるメカニズムによって制御されていることを示している (Maeda et al., 2004)。したがって、ヒトにおいても OATP の発現はそれぞれ異なるメカニズムで制御されていると予想される。そこでラットの *oatp* ファミリーの発現を変動させた核内レセプターのリガンドである CA、CDCA、DEX、RA、HC の 5 化合物の処置によって、ヒト凍結肝細胞における OATP の発現変動がヒト肝細胞キメラマウスでも再現されるかという発現調節に関わる観点からヒト肝キメラマウスの評価を行った (Table 5)。

各 OATP の発現量をヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞間で比較したところ、キメラマウスにおいて OATP-B の発現量が 100 倍以上に増加したが、他の OATP は凍結肝細胞とキメラ肝細胞では同程度のコピー数であった。OATP-B は肝臓、小腸、腎臓、肺、胎盤、膵臓、心臓と様々な組織に発現しており、当研究室により小腸において薬物の吸収に重要な役割を果たしていることが示唆されている (Nozawa et al., 2004; Kobayashi et al., 2003)。しかし、肝臓に発現

しているにもかかわらず胆汁酸や BSP を輸送せず (Kullak-Ublick et al., 2000)、肝臓での役割は不明である。キメラマウスで OATP-B の発現量が約 100 倍に増加したことは、肝臓が異常状態に陥ったときに高発現し、何らかの物質の輸送に働いていることが考えられる。

化合物処置による誘導実験において、HC 処置により OATP-B と OATP-D の発現はヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞間で異なる調節を受けていた。しかし、他の化合物による誘導結果からヒトとキメラマウス間で 3 もしくは 4 種類の化合物でヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞間で同じ調節を受けていた。一方、ラットの *oatp* ファミリーに対して同じ化合物を処置した結果とヒト凍結肝細胞を比較した場合、例えばアミノ酸相同性が 79% 一致している OATP-B と *Oatp9* では 5 種類の化合物すべてで異なる調節を受けているなど、ヒトとの種差が大きいことがいえる。Table 5 に誘導方向の一致した化合物の数をスコアとしてまとめた。

このようにキメラマウスではヒトの OATP ファミリーが発現しており、また化合物に対する発現変動も保持していると考えられる。特に現

時点で、肝臓において優位に発現しておりアニオン系化合物の輸送に重要と考えられている OATP-C と OATP8 に関しては 5 種類中 4 種類の化合物の誘導によってヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞間で同様の調節を受けており、アニオン系化合物の評価をする際にキメラマウスはヒトの肝臓の代替として有用であると考えられる。しかし、OATP-B の発現量がキメラ化することで大幅に変化していることや、化合物による誘導も完全に一致してはいないことから、マウス特異的な発現制御が存在し、一部でその制御を受けていると考えられる。今後、トランスポーターを活性等の面からキメラマウスの評価を行い、ヒトの機能を保持している部分と保持していない部分をはっきりさせることにより、ヒトの肝細胞の代替として有用なツールとなることを期待する。

E. 結論

ヒト肝キメラマウスの有用性を OATP の誘導実験によって評価した。キメラマウスではヒトの OATP ファミリーが発現しており、また化

合物に対する反応も比較的保持しているといえる。しかし、OATP-B の発現量がキメラ化することで大幅に変化していることや、化合物による誘導も完全に一致してはいない。今回の検討から、ラット等と比較してアニオン系化合物の評価をする際にキメラマウスはヒトの肝臓の代わりとして有用であることはいえるが、一部でヒトとは異なることも考慮しなければならない。今後、様々な面からキメラマウスの評価を行い、ヒトの機能を保持している部分と保持していない部分をはっきりさせることにより、ヒトの肝細胞の代替として有用なツールとなりうることを期待される。

Table 5-1 Identity of expression pattern between OATPs in human cryopreserved hepatocytes and OATPs in chimeric mouse hepatocytes.

	CA	CDCA	DEX	RA	HC	score
OATP-B	○	△		○	×	3
OATP-C		△	○	○	△	4
OATP-D	△	△	○	○	×	4
OATP-E		△	○		△	3
OATP8	○	△	○	○		4

The score were exhibitive identity of expression pattern of between OATPs in human cryopreserved liver and OATPs in chimera liver. The circle, delta and cross were shown same patter, same tendency and opposite pattern, respectively.

Table 5-2 Identity of expression pattern between OATPs in human liver and oatps in rat liver.

	OATP-B	OATP-C	OATP-D	OATP-E	OATP8
Oatp1	0	2	2	0	0
Oatp2	1	2	1	0	0
Oatp4	1	3	0	2	2
Oatp9	0	3	2	0	0
Oatp11	2	1	1	3	3

Arabic numerals were shown the score that were exhibitive identity of expression pattern of OATPs/oatps.

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
OATP トランスポーターの誘導能
に関する検討；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. 補足（文中で使用した引用論文
を示す）

Dandri M., Burda MR., Torok E., Pollok
JM., Iwanska A., Sommer G., Rogiers X.,
Rogler CE., Gupta S., Will H., Greten H.,
Petersen J.: Repopulation of mouse liver

- with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus: *Hepatology*, **33** 981-988 (2001).
- Hagenbuch B., Meier PJ.: The superfamily of organic anion transporting polypeptides: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1609**, 1-18 (2003).
- Honer C., Nam K., Fink C., Marshall P., Ksander G., Chatelain RE., Cornell W., Steele R., Schweitzer R., Schumacher C.: Glucocorticoid receptor antagonism by cyproterone acetate and RU486: *Mol. Pharmacol.*, **63**, 1012-1020 (2003).
- Katoh M., Matsui T., Nakajima M., Tateno C., Kataoka M., Soeno Y., Horie T., Iwasaki K., Yoshizato K., Yokoi T.: Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with humanized liver: *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1402-1410 (2004).
- Kobayashi D., Nozawa T., Imai K., Nezu J., Tsuji A., Tamai I.: Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 703-708 (2003).
- Kullak-Ublick GA., Ismail MG., Stieger B., Landmann L., Huber R., Pizzagalli F., Fattinger K., Meier PJ., Hagenbuch B.: Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver: *Gastroenterology*, **120**, 525-533 (2001).
- Maeda T., Miyata M., Yotsumoto T., Kobayashi D., Nozawa D., Toyama K., Gonzalez FG., Yamazoe Y., and Tamai I. *Molecular Pharmaceutics* **1**, 281-289 (2004)
- Mercer DF., Schiller DE., Elliott JF., Douglas DN., Hao C., Rinfret A., Addison WR., Fischer KP., Churchill TA., Lakey JR., Tyrrell DL., Kneteman NM.: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers: *Nat. Med.*, **8**, 927-933 (2001).
- Moldeus P., Hogberg J., Orrenius S.: Isolation and use of liver cells: *Methods Enzymol.*, **52**, 60-71 (1978).
- Nozawa T., Imai K., Nezu J., Tsuji A., Tamai I.: Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**, 438-445 (2004).
- Tamai I., Nezu J., Uchino H., Sai Y., Oku A., Shimane M., Tsuji A.: Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 251-260 (2000).
- 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., Yoshizato K.: Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs: *Am. J. Pathol.*, **165**, 901-912 (2004).
- Turncliff RZ., Meier PJ., Brouwer KL.: Effect of dexamethasone treatment on the expression and function of transport proteins in sandwich-cultured rat hepatocytes: *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 834-839 (2004).
- Willson TM., Moore JT.: Genomics versus orphan nuclear receptors—a half-time report: *Mol. Endocrinol.*, **16**, 1135-1144 (2002).