

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を用いたヒト肝有機アニオン
トランスポーターに関する検討

ヒト肝細胞キメラマウスを用いたヒト肝トランスポーター
機能評価～DBSP (dibromosulfophthalein) に関して～

主任研究者 横井 毅 金沢大学薬学部 教授

協力研究者 鈴木 洋史 東京大学医学部 教授

研究要旨

トランスポーターは代謝酵素と並び異物解毒に重要な役割を果たすが、*in vitro* 機能評価が困難であることや供給上の問題により、ヒトの肝臓における輸送機能には未解明な点が多いのが現状である。本研究においては、免疫不全肝障害マウスのホモ個体 {uPA(+/+)/SCID} にヒト肝細胞を移植したヒト肝臓移植マウスを用い、*in vivo* 実験を行うことにより、ヒト肝細胞におけるトランスポーター機能の解析を試みた。肝有機アニオン輸送系の良好な基質であり、胆汁中への排出が主な消失経路である DBSP (dibromosulfophthalein) の肝移行に関する種々の検討を行った結果、ヒト肝臓への置換率が低い移植マウスは高い移植マウスに比べ高い胆汁排泄クリアランス値を示した。肝取り込みクリアランス・胆管側膜クリアランスを算出した結果、血液中→肝細胞、および、肝細胞→胆汁の両過程にヒト・マウス間の種差が存在し、ヒトではマウスよりも輸送能力が低いことが示唆された。特に、胆汁排泄過程における種差に関しては、マウス由来の肝細胞が残存している本検討の実験条件においても3倍程度の違いが見出されており、完全なヒト肝細胞とマウス肝細胞の比較を行った場合、さらに大きな種間の違いが見出されると考えられる。以上の結果から、肝細胞における DBSP の輸送能（特に排出能力）が変動した場合、胆汁排泄クリアランスおよび全身クリアランスに大きな影響を及ぼすことが示唆された。

A. 研究目的

薬物投与後の反応性を規定する因子の一つである薬物体内動態を明らかにすることは、ヒトにおける薬物反応性を予測する上で重要な課題である。現在までに、薬物代謝酵素に関しては、保存可能なヒトミクロソーム分画を研究に用いることができること、各種代謝酵素の肝臓含量が知られていることから、*in vitro* 実験からヒト *in vivo* 代謝動態を予測することが可能であった。しかしながら、代謝酵素と並び異物解毒に重要な役割を果たすトランスポーターに関しては、肝細胞を調製後の経過時間とともに機能が激減すること、バイアビリティの高いヒト肝細胞の供給が限られていること、トランスポーターの担う極性輸送を培養肝細胞で再現することが難しいことなどが、ヒト肝細胞における研究を進める上での大きな障壁となっていた。

本研究においては、免疫不全肝障害マウスのホモ個体 {uPA(+)/SCID} にヒト肝細胞を移植したヒト肝臓移植マウスを用い、*in vivo* 実験を行うことにより、ヒト肝細胞におけるトラン

スポーター機能の解析を試みた。ヒト肝細胞への予想置換率の高いマウス群（高置換群）および低いマウス群（低置換群）を用い、積分プロットおよび定常状態試験により、血液から肝臓への血管側膜を介した薬物取り込み・胆管側膜を介した肝臓から胆汁への薬物の排出の評価を行った。

B. 研究方法

B-1. ヒト肝細胞キメラマウス

ヒト肝細胞キメラマウスは、日本チャールズ・リバー株式会社から供給された免疫不全肝障害マウスのホモ個体 {uPA(+)/SCID} にインビトロテクノロジーズ (IVT) 社より購入したヒト肝細胞、IVT-079 を脾臓より注入することにより作製した。移植約4週間後に ELISA 法により血中ヒトアルブミン濃度を測定し、予想置換率を算出した。

B-2. dibromosulfophthalein (DBSP)

積分プロットを行う際の瞬時投与は、10mg/kgbw の投与量で行った。定常状態試験の際は、25mg/kgbw のDBSPを初期投与

し、その後は 0.2mg/min/kgbw の速度で定速静注を行った。

B-3. 積分プロットによる肝取り込み過程の解析

血液から肝臓への取り込み過程のみを分離して評価することを目的として、積分プロット法を用いた解析を行った。DBSP を静脈内に瞬時投与した後、経時的に血液と肝臓とをサンプリング（投与後 20 秒、40 秒、60 秒）し、両サンプル中の薬物濃度を測定した。この実験条件は、薬物の肝臓からの排出が無視できる短い時間内であると仮定され、肝臓へ取り込まれた薬物量 (X) の時間推移は、

$$dX/dt = CL_{\text{uptake}} * C_B$$

という式で表される。ここで CL_{uptake} は、循環血中濃度 (C_B) に対して定義された臓器クリアランスである。この式を時間 0 から t まで積分すると、

$$X_{(t)} = CL_{\text{uptake}} * AUC_{(0-t)} + X_{(0)}$$

となる。よって、縦軸に $X_{(t)} / C_{B(t)}$ を、横軸に $AUC_{(0-t)} / C_{B(t)}$ をプロットし、傾きとしての CL_{uptake} を算出した。

B-4. 定常状態試験による排泄過程の解析

DBSP を静脈内定速投与し、定

常状態に達したところでの胆汁流速 (bile flow rate) ・胆汁中濃度 (C_{bile}) ・血液中濃度 (C_B) ・肝臓中濃度 (C_h) を基に、

$$V_{\text{bile}} = (\text{bile flow rate}) * C_{\text{bile}}$$

$$CL_{\text{canalicular}} = V_{\text{bile}} / C_h$$

$$CL_{\text{bile}} = V_{\text{bile}} / C_B$$

の算出を行った。

C. 研究結果および考察

C-1. DBSP の肝臓への取り込み

静脈内瞬時投与後の経時的な血液および肝臓中薬物濃度を測定し、各時間における濃度および時間の値を用い、一次消失を仮定した計算により $AUC_{(0-t)} / C_{B(t)}$ を算出した。 $X_{(t)}$ は、各時間における肝臓中濃度に肝重量を乗じることにより求めた。算出結果を、縦軸に $X_{(t)} / C_{B(t)}$ を、横軸に $AUC_{(0-t)} / C_{B(t)}$ をプロットし (Figure 1-1)、傾きより CL_{uptake} を算出した結果、高置換群においては 0.904 mL/min/g-liver、低置換群においては 1.47 mL/min/g-liver であった (Table 1-1)。有機アニオンの肝臓への取り込み能力に関しては、遊離肝細胞を用いた検討により、単位重量あたりの取り込み活性として数倍程度の種差が存在し、ヒトでは肝臓への取り込み活性が低いことが

推測される (Nakai D, et al., Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther. 2001 Jun;297(3):861-7., Yamazaki M, et al., Na(+)-independent multispecific anion transporter mediates active transport of pravastatin into rat liver. Am J Physiol. 1993 Jan;264(1 Pt 1):G36-44.). 本研究の結果においても、ヒト肝細胞への置換率の高いマウス群における取り込み能力が、マウス由来の肝細胞が多い置換率の低いマウス群に比べて低いことが示されており、ヒトにおけるDBSPの低い肝取り込み能力を反映した結果であると推測された。

C-2. 定常状態におけるプラバスタチンの胆汁排泄

DBSPの静脈内定速投与を行った際の、経時的な胆汁流量 (Figure 1-2) および胆汁中DBSP濃度 (Figure 1-3) を図に示した。この二つの値を乗じることにより算出される V_{bile} は、今回の実験条件において定常状態に達していると判断されたため (Figure 1-4)、 $CL_{\text{canalicular}} (= V_{\text{bile}}$

$/ C_h)$ および $CL_{\text{bile}} (= V_{\text{bile}} / C_B)$ の算出に用いた。 $C_{h,ss}$ は高置換マウス群で 0.18 ± 0.04 mg/mL、低置換マウス群で 0.19 ± 0.04 mg/mL であり、 $C_{B,ss}$ は高置換マウス群で 0.051 ± 0.039 mg/mL、低置換群で 0.044 ± 0.036 mg/mL であった (Table 1-1)。

(薬物投与速度) $/ C_B$ により計算される CL_{tot} は高置換マウス群で 0.07 ± 0.06 mL/min/g-liver、低置換マウス群で 0.20 ± 0.20 mL/min/g-liver であり、 CL_{bile} は高置換群で 0.07 ± 0.08 mL/min/g-liver、低置換群で 0.24 ± 0.24 mL/min/g-liver と算出された (Table 1-1)。DBSPの消失において、全身クリアランスに占める胆汁排泄クリアランスの割合は非常に大きく、高置換群において全身クリアランス値が低い傾向を示しているのは、ヒト肝細胞の血液中から胆汁中へのクリアランス能力の低さを反映したものであると考えられる。一方、胆汁排泄速度を肝臓中薬物濃度で除することにより算出される $CL_{\text{canalicular}}$ は、高置換群で 0.009 ± 0.006 mL/min/g-liver、低置換群で 0.028 ± 0.003 mL/min/g-liver となっており、ヒト肝細胞への予想置換率の異なる両群間にお

いて約3倍程度の輸送能力の違いが見出された (Table 1-1)。このことは、ヒト肝臓より調製した canalicular membrane vesicle (CMV) を用いてATP依存的な輸送を調べた実験結果において、プラバスタチンや β -estradiol 17 β -glucuronide などのように比較的種間での輸送能の違いが小さな化合物があるのに対し、Leukotriene C₄ や DNP-SG などのようにヒトCMVとラットCMV間で数十倍以上の輸送能の違い (ラットCMVにおける輸送活性が高い) を示す化合物が存在するという事実を考慮すると、DBSPは後者の、比較的輸送活性に種差のあるタイプの基質であることを示唆していると考えられる (Niinuma K, et al., Primary active transport of organic anions on bile canalicular membrane in humans. Am J Physiol. 1999 May;276(5 Pt 1):G1153-64.)。

C-3. ヒト肝キメラマウスにおける DBSP 肝取り込み・排出

本研究においては、ヒト肝細胞移植マウスを用い、肝有機アニオン輸送系の良好な基質であり、胆汁中への排出が主な消失経路である DBSP の肝移行に関する種々

の検討を行った。その結果、全身からの薬物除去能力を表す CL_{tot} 、血液中から胆汁中への排出を反映した CL_{bile} に関して、ヒト肝臓に類似した環境であると思われる高置換群と比べ、ヒト肝細胞への置換の少ない低置換群において高い値を示した。血液中から肝細胞中への薬物取り込み能力である CL_{uptake} ・肝細胞中から胆汁中への消失能力を示すパラメーターである $CL_{canalicular}$ の値を算出し、各ステップに関する考察を行うと、血液中→肝細胞、および、肝細胞→胆汁の両過程にヒト・マウス間の種差が存在していることが示唆された。特に、胆汁排泄過程における種差は本検討の実験条件においても3倍程度の違いが見出されており、生理的条件のヒト (置換率で言えば100%と表される) とマウスの比較を行った場合、さらに大きな種間の違いが見出されることが考えられる。

本検討の結果から、肝細胞における DBSP の輸送能 (特に排出能力) が変動した場合、胆汁排泄クリアランスおよび全身クリアランスに大きな影響を及ぼすことが示唆された。ヒトにおける有機アニオンの肝胆系移行を予測する際には、取り込み能力・排出能力の

病態時における変動や遺伝的多型等に起因する個人差を考慮する必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

Table 1-1. Pharmacokinetic parameters of DBSP

mL/min/g-liver	CL _{tot}	CL _{hep}	CL _{renal/clear}	CL _{uptake}	C _{0.5h} (mg/mL)	C _{1.5h} (mg/mL)
High	0.07±0.06	0.07±0.08	0.009±0.006	0.904	0.051±0.039	0.18±0.04
Low	0.20±0.20	0.24±0.24	0.028±0.003	1.47	0.044±0.036	0.19±0.04

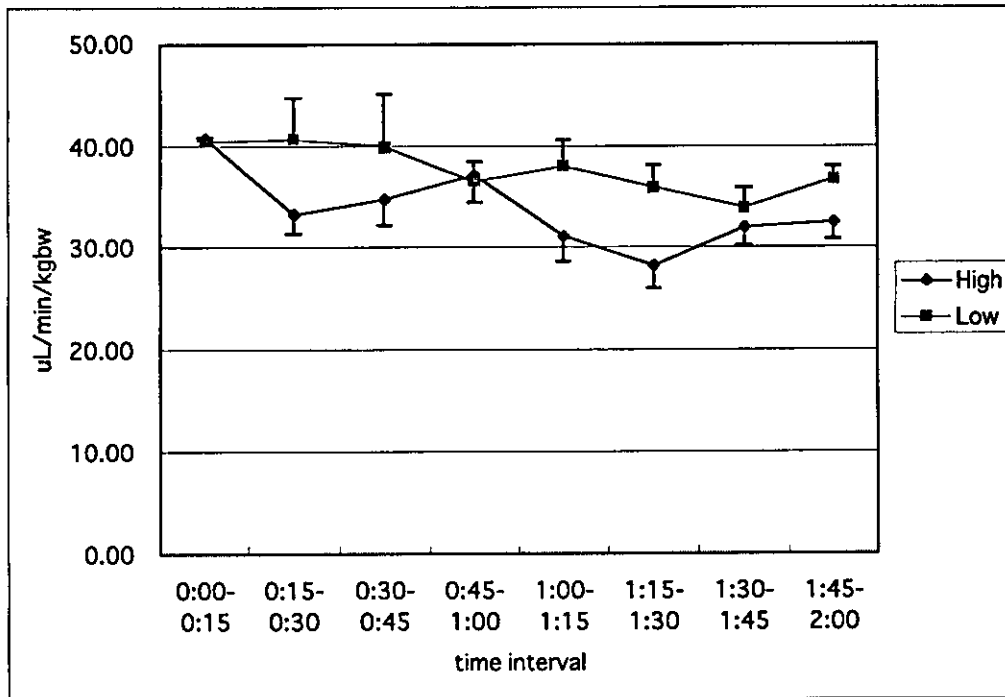


Figure 1-2. Bile flow rate (ul/min/kgbw) of mice transplanted with humanized liver with low (<1%) or high (>60%) replacement index

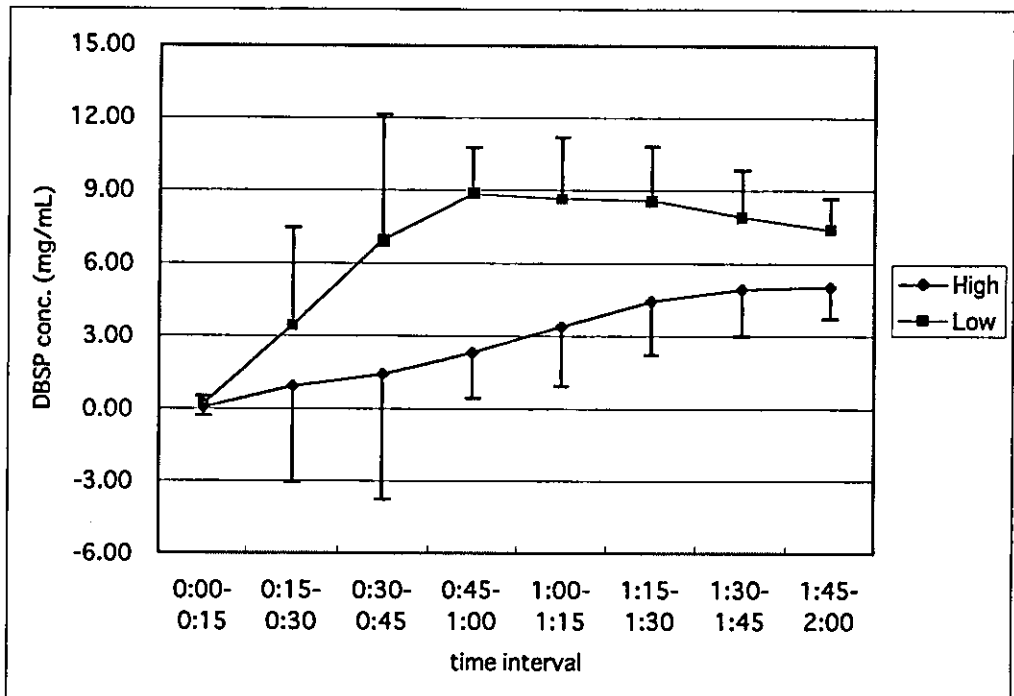


Figure 1-3. DBSP concentration in bile (mg/ml) of mice transplanted with humanized liver with low (<1%) or high (>60%) replacement index

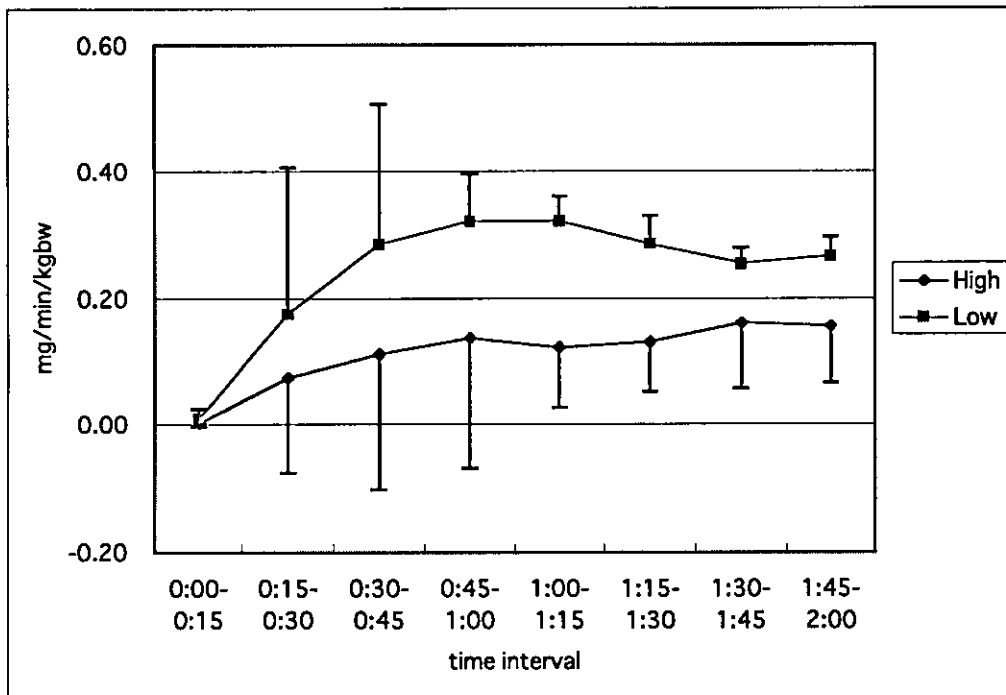


Figure 1-4. Biliary excretion of DBSP (mg/min/kgbw) of mice transplanted with humanized liver with low (<1%) or high (>60%) replacement index

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漢方薬由来活性成分ジェニピンの
有機陰イオン・トランスポータ Mrp2 への作用に関する研究

主任研究者 横井 毅 金沢大学薬学部 教授
協力研究者 正田 純一 筑波大学臨床医学系 講師

研究要旨

茵陳蒿湯は黄疸、肝硬変症の治療薬として薬価基準にも収載されている漢方薬である。しかし、現代の医療現場ではその有用性がいまだ十分認知されているとはいいがたい。茵陳蒿湯の胆汁分泌亢進作用の活性成分は20年以上前から知られていたが、その作用機序の解明は最近になって初めて明らかにされた (Shoda et al, 2004)。茵陳蒿湯の主要成分であるジェニポサイドは経口投与の後腸内細菌によって活性本体ジェニピンに変換される。ラットを用いた基礎研究で、ジェニピンはラット肝細胞の有機陰イオン輸送蛋白である multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2)の胆管膜へのトランスロケーションを促進してグルタチオン (GSH) やビリルビンの排泄を促進して胆汁酸非依存性胆汁分泌を亢進すること、また1週間連投によって Mrp2 の発現量自体も増加させ同時に肝臓グルタチオン量を増加させることがこれまでの研究で明らかになっている。これらの作用は、茵陳蒿湯の黄疸や胆汁うっ滞に対する有用性を強く示唆するものである。しかしながらこれらの作用の有無はヒト肝臓ないしはヒト肝細胞ではまだ検討されていない。

そこで、本研究では、ヒト肝細胞キメラマウスにジェニピン、ジェニポサイド及び茵陳蒿湯を経口投与し、キメラマウス中のヒト肝細胞においてもこれらの薬物の作用が認められるかどうかを、mRNA 発現量、蛋白発現量、免疫組織化学的検討を指標として解析した。まずジェニピン、ジェニポシドを単回経口投与し、ヒト肝細胞における Mrp2 の胆管膜上への局在及び肝臓中グルタチオン量の変化を検討したところ、ジェニピンが投

与後 2 時間でヒト胆管膜上への Mrp2 のトランスロケーションを誘導すること、ジェニポサイドが投与後 24 時間で肝臓中グルタチオン(GSH)量を顕著に増加させることが認められた。これより、キメラマウスにおいてもジェニポサイドからジェニピンへの変換が起こること、ジェニピンがヒト肝細胞の Mrp2 の胆管膜上へのトランスロケーションを促進することが示唆された。臨床現場で現在実際に使用が可能な薬剤は茵陳蒿湯であるので、今後は、茵陳蒿湯が同様の作用をヒト肝細胞において有するか、またラットにおいてジェニピン及び茵陳蒿湯の 1 週間連続投与で観察されている Mrp2 やその他の薬物輸送蛋白の発現誘導などが認められるかどうかを検討する必要がある。肝臓の輸送蛋白の動態に関する詳細な研究を実際に臨床で行うことは至難であり、動物実験からヒトでの作用を外挿するのは不確実性がつきまとう。ヒト肝細胞の *in vitro* 初代培養系には一定の有用性が認められるが、培養細胞の physiology は *in vivo* の状態とは種々の点で乖離していることも周知の事実である。ヒト肝細胞を有するキメラマウスは、肝疾患の発症機序の解明や医薬品開発および医療に大きく貢献するものであり、本研究は現在治療手段の限られている胆汁うっ滞や黄疸などの肝胆道疾患に対する新しい治療法の可能性を拓くものである。

A. 研究目的

既に臨床で使用されている漢方薬である茵陳蒿湯の研究にはヒトあるいはヒト由来組織から得られたデータが最も意義あるものである。しかし、莫大な費用と時間の問題を差し置いても、臨床において薬剤の薬理作用を詳細に検討・証明することは現実には不可能なことが多い。したがって、このような研究は実験動物を用いて行われるのが常である。茵陳蒿湯の胆汁酸分泌機能亢進作用については、その活性本体のひとつであるジェニ

ピンについて、ラットを用いてその作用機序 (Mrp2 のトランスロケーションの促進作用) が詳細に明らかにされている。しかし、ラットとヒトの肝細胞では、Mrp2 のアミノ酸配列は同一ではなく、また胆汁生成・輸送やトランスポート類にも種々の異同があり、その特性が異なる可能性が十分に考えられるため、ヒトでも同じ作用が発現している保証はない。この点を解決するために、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた研究を実施することは非常に価値があると考えられる。

本研究は、ラットで確認されているジェニピンの Mrp2 の胆管膜上へのトランスロケーション作用ならびに肝組織中 GSH レベルの上昇作用が、ヒト肝細胞でも観察されるか否かについて検討した。

B. 研究方法

B-1. ヒト肝細胞キメラマウス

ヒト肝細胞キメラマウスは、日本チャールズ・リバー株式会社から

供給された免疫不全肝障害マウスのホモ個体 {uPA(+)/SCID} にインビトロテクノロジーズ (IVT) 社より購入したヒト肝細胞、IVT-079 を脾臓より注入することにより作製した。移植約4週間後に ELISA 法により血中ヒトアルブミン濃度を測定し、予想置換率を算出した。本マウスの内訳は、Table 2-1 に併記したように、高置換マウスが6匹、中置換マウスが3匹であった。

Table 2-1 The chimeric mice used in the present study, and drug-treatment.

Substitution grade	Identification number	Body weight (g)	Drug treatment
Higher	CTE68-2	22.86	vehicle (water)
	CTE68-3	10.91	vehicle (water)
	CTE65-2	14.35	vehicle (water)
	CTE66-11	20.23	genipin
	CTE73-2	18.54	genipin
	CTE74-3	16.37	genipin
Median	CTE72-3	16.37	geniposide
	CTE72-9	9.09	geniposide
	CTE66-11	18.56	geniposide

B-2.薬物投与および肝組織摘出

genipin および geniposide は、投与直前に各々20 mg/ml, 35 mg/ml になるように温精製水にて溶解し、薬物溶液は0.1 ml/10 g bodyweight の割合で強制経口投与した。また、比較対照として担体としての精製水のみを同率で投与した。各薬物処理群および対照群の例数は各々3例とした。

肝臓摘出は、genipin および担体投与では2時間後、geniposide 投与は24時間後に行った。摘出肝臓は写真撮影された後、直ちに検査目的に最適な方法にて処理された。

B-3.ヒト肝の Mrp2 の免疫組織化学的解析

光学顕微鏡によって Mrp2 の局在を調べるために、ジェニピン、ジェニポシド、ないしは担体を投与したヒト肝細胞キメラマウスから採取された肝組織(50 mg)は、OTC コンパウンド(Miles, Elkhart, ID)に包埋して液体窒素にて凍結し、6 μ m 厚の切片を作製しスライドにマウントした。既報に従って、cytokeratin-8 と Mrp2 に対するポリクロナル抗体を用いて免疫染色を行った。

B-4.肝組織中の GSH 量の測定

肝組織中の GSH レベルを測定す

るため、ジェニピン、ジェニポシド、ないしは担体を投与したヒト肝細胞キメラマウスから採取された肝組織(70-80 mg)は、1 ml の氷冷 metaphosphoric acid (MPA)溶液でホモジネートし、超遠心(45000rpm, 4°C, 10min)して得られた上清は0.2mm フィルターで濾過後測定に供した。調製液中の GSH 量は GSH アッセイキット(GSH-400, Oxis, Portland, OR)で測定した。

C. 研究結果

C-1.ヒト肝組織における Mrp2 の免疫組織化学的局在に対するジェニピンの影響

肝病理切片における Mrp2 の免疫組織化学的解析を行った。結果は Fig. 2-1 に示した。光学顕微鏡による観察で、keratin-8 に特異的に染色されるヒト肝組織細胞切片部の概ね毛細胆管に Mrp2 は発現していた。ジェニピン投与マウスの肝の Mrp2 の免疫染色は毛細胆管においてより広範に観察された。

C-2.肝組織における GSH レベルに対するジェニピン、ジェニポシドの影響

結果は Fig. 2-2 に示した。ジェニポシド投与24時間後に採取した肝組織

の GSH レベルは顕著に増加したが、ジェニピン投与 2 時間後に採取した肝組織の GSH レベルは対照群(Cont)に比較して若干低下していた。

既に、100 mg/kg のジェニピン投与後の肝組織中の GSH レベルの経時的変化を Balb/c マウスで検討しており、GSH レベルは、GSH 排泄の急激な亢進により投与後 1 時間後に一過性に低下すること、その後は、おそらくは急な GSH レベルの低下によって代償的に誘導される GSH 合成系の賦活によって上昇に転じること、ジェニピンないしはジェニポサイド投与の 24 時間後には GSH レベルは投与前のレベルより高くなること、などを確認している。本研究において、ジェニピン投与 2 時間後で GSH レベルが低下し、ジェニポシド投与 24 時間後で上昇していたのは、Balb/c マウスで見られた上述の変化とよく一致しており、同様の GSH 排泄促進作用が起こったことを間接的にではあるが示唆している。

D. 考察

単回経口投与されたジェニピンが、ヒト肝細胞キメラマウスのヒト肝細胞の胆管膜上へのヒト Mrp2 の局在を促進することが明らかになった。ジェニポサイドについては現在解析中であるが、肝組織中の GSH レベル

の動態から同様の作用があったと推察される。今まで実験動物でしか確認されていなかったジェニピンの Mrp2 に対する作用がヒト肝細胞でも観察できたことは、ジェニピンのヒトでの作用を示唆するデータとして極めて重要である。ジェニピンは毒性と安定性の問題から医薬品として開発されていないが、ジェニピンの母構造であるジェニポサイドを高含量で含み、臨床で医療用製剤として使用されている茵陳蒿湯の作用機序を、ヒト肝臓でも推察させる貴重なデータである。現在、胆管閉鎖症や肝移植後の肝機能不全の改善薬が臨床で求められているが、満足できる治療法が確立されているとはいえない。ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、ジェニピンだけではなく、茵陳蒿湯のヒト肝細胞の Mrp2 に対する作用を解明することは、当該疾患における新しい治療法の可能性を拓くものであると考えている。

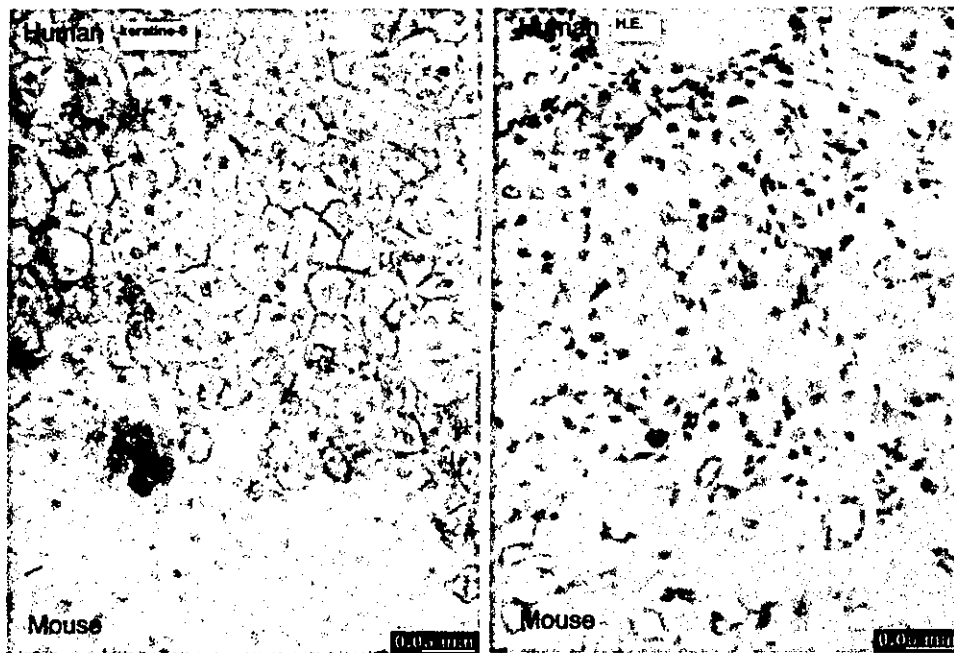
F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

A



B

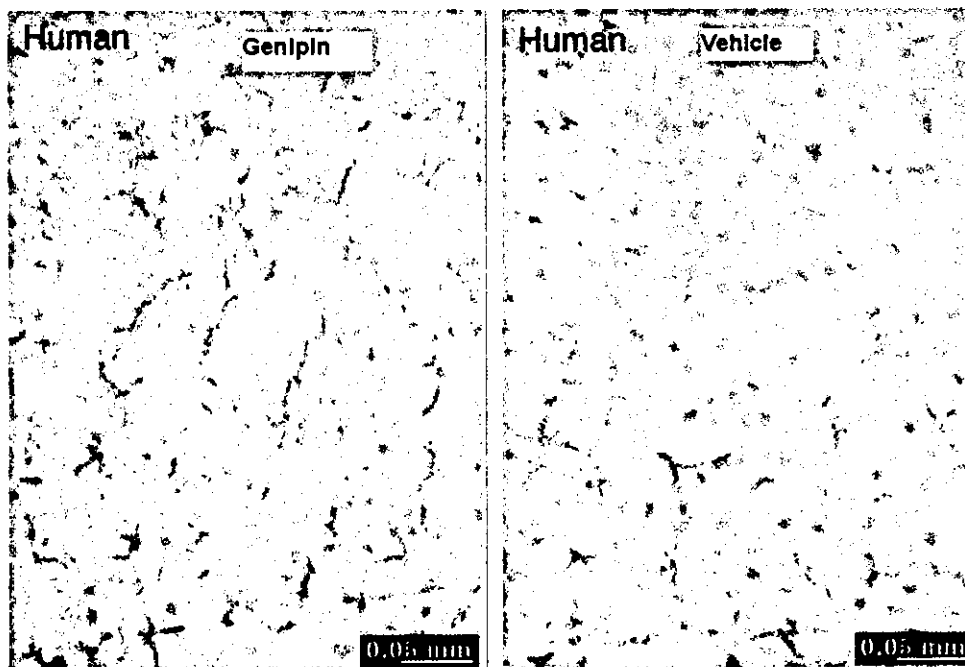


Fig. 2-1 Immunohistochemical localizations of keratino-8 and Mrp2 in the livers of chimeric mice (light microscopic view). Liver tissue sections were prepared from livers 2 hours after oral administration of vehicle or genipin. (A) Anti-human Keratino-8 polyclonal antibody immunostaining shows human hepatic cells, and (B) Mrp2 polyclonal antibody immunostaining shows a diffuse and linear pattern outlining the canalicular membrane (CM) domain of each keratino-8 stained liver section from vehicle and genipin-treated chimeric mice. (Bars = 50 μ m)

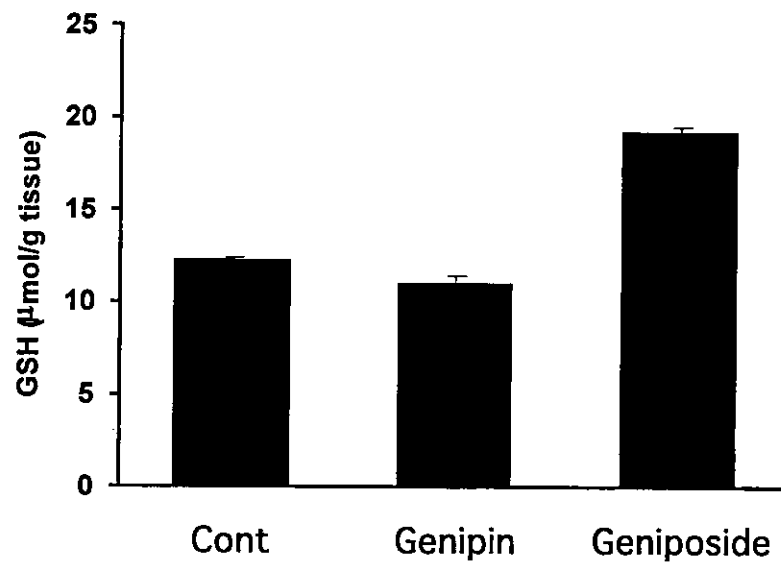


Fig. 2-2 Hepatic GSH levels in the chimeric mice. GSH concentrations were measured as according to GSH assay kit's method. The GSH levels were expressed as mean \pm SEM of three determinations.

研究成果の刊行物・別刷り

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
立野 知世 吉里 勝利	ヒト肝細胞キメラ マウス	薬 事	46	1877- 1881	2004
Chise Tateno Toru Horie Katsutoshi Yoshizato	Chimeric mice with human hepatocytes	The Cell	36	328-332	2004
Miki Katoh Tomohito Matsui Miki Nakajima Chise Tateno Miho Kataoka Yoshinori Soeno Toru Horie Kazuhide Iwasaki Katsutoshi Yoshizato Tsuyoshi Yokoi	Expression of human cy tochromes P450 in chim eric mice with humaniz ed liver	Drug Metabolism and Disposition	32	1402- 1410	2004
立野 知世 吉里 勝利	ヒトの肝細胞を持つマ ウス	LABIO 21	19	6-10	2005
立野 知世 吉里 勝利	ヒト肝細胞を導入した スキッドマウス	摘出ヒト組 織/細胞を 用いた非臨 床研究		印刷中	2005
Masuhiko Nishimura Tsuyoshi Yokoi Chise Tateno Miho Kataoka Eiji Takahashi Toru Horie Katsutoshi Yoshizato Shinsaku Naito	Induction of human CYP1A2 and CYP3A4 in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver	Drug Metabolism And Pharmacokin etics	20	印刷中	2005
Miki Katoh Tomohito Matsui Miki Nakajima Chise Tateno Yoshinori Soeno Toru Horie Kazuhide Iwasaki Katsutoshi Yoshizato Tsuyoshi Yokoi	In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver	Drug Metabolism and Disposition	33	印刷中	2005



ヒト肝細胞キメラマウス

立野 知世, 吉里 勝利

TATENO Chise, YOSHIZATO Katsutoshi

広島県産業科学技術研究所 知的クラスター創成事業 吉里プロジェクト
広島大学大学院理学研究科

はじめに

医薬品開発研究においては、候補化合物が医薬品として認可されるまで15年もの年月と200億円の研究費を要する。臨床試験に入るまでの薬効試験、安全性試験、薬物代謝試験などの多くの試験はマウスやラットなどの齧歯類やイヌ、サルを用いて行われている。化学物質の多くは肝臓で代謝・解毒されるが、齧歯類とヒトの肝臓では、代謝活性に大きな違いがあることが知られている。臨床試験の段階で開発中止となる医薬候補品は60%に達するが、その原因の約8割が、種差に起因するものである。また、肝がんという深刻な疾患をもたらすB型およびC型肝炎ウイルスは、ヒトの体内の肝細胞にしか感染しないことが知られており、このことが、ウイルス感染のメカニズム解明や治療法の開発に大きな遅れをもたらしている。もし、ヒト肝細胞で置換された肝臓をもつキメラマウスを薬効試験や安全性試験に、あるいは肝炎ウイルス感染モデルとして利用することができれば、医薬品開発における経費削減と時間の短縮に大いに寄与すると考えられる。

肝障害モデルマウスへの異種肝細胞移植

Sandgrenらは、albumin enhancer/promoterに urokinase plasminogen activator (uPA) の遺伝子を接続した遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した¹⁾。彼らは当初、uPAの性質を調べるために、大量に蛋白質を合成して分泌することができる肝臓でuPAが発現されるように導入遺伝子をデザインした。このuPAが大量に発現しているマウスの肝細胞は小さな脂肪滴を大量にもっており肝臓は白い。RhimらはこのuPAマウスに、マウス正常肝細胞を移植すると、障害肝に生着・増殖し、移植した肝細胞で置換されることを示した²⁾。彼らはさらに、uPAマウスとT細胞をもたないnudeマウスを掛け合わせ、uPA/nudeマウスにラット正常肝細胞を移植した。ラット肝細胞はuPA/nudeマウス肝臓の中で増殖して完全に置換し、ラット肝細胞キメラマウスが作出された³⁾。

その後、ヒト肝細胞キメラマウスの作製の検討がいくつかのグループにより行われた。Dandriらは、uPAマウスとT細胞、B細胞をもたないRag2ノックアウトマウスを掛け合わせ、新鮮ヒト肝細胞を移植した。ヒト肝細胞による置換率は最高で15%であった。彼らはこのマウスへのB

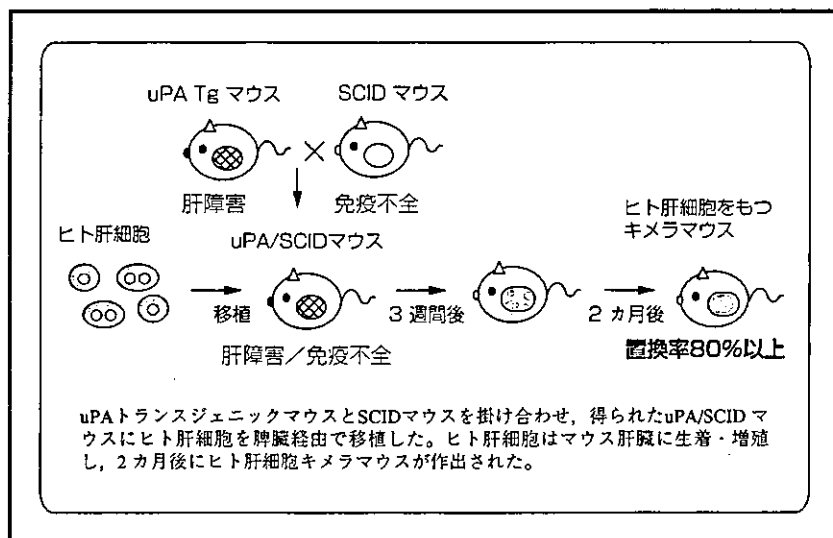


図1 ヒト肝細胞キメラマウスの作製

型肝炎ウイルスの感染成立を証明した⁴⁾。

Mercerらは、uPAマウスとT細胞、B細胞、NK細胞をもたないSCID (severe combined immunodeficiency disease) -bgマウスを掛け合わせuPA/SCIDマウスを作製した⁵⁾。このマウスに凍結融解ヒト肝細胞を移植したところ、マウス血清中のヒトアルブミン濃度は最高で2mg/mLに上昇した(血中に換算すると約1mg/mL)。彼らはこのマウスにC型肝炎ウイルスを感染させ、キメラマウス血清から別のキメラマウスへの感染の成立も証明した⁵⁾。

これらの研究により、ヒト肝細胞キメラマウスはヒト肝炎感染モデルマウスとして有用なことが示された。われわれは、uPAマウスとSCIDマウスを掛け合わせ、uPA/SCIDマウスを作製しヒト肝細胞キメラマウスの作製を試みた。ヒト肝細胞キメラマウスもラット肝細胞キメラマウスと同様にヒト肝細胞で完全に置換させることが可能かどうか、また、ヒト肝細胞で置換されたマウス肝臓はヒト型の薬物代謝活性をもつかどうかについて調べた。

高置換ヒト肝細胞キメラマウスの作製

まず、ヒト肝細胞キメラマウスドナーに、12歳男児の凍結融解肝細胞を用いた。生後3~4週のuPA/SCIDマウスの肝臓へ $5\sim 10 \times 10^5$ 個の細胞を脾臓経由で移植した(図1)。ヒト肝細胞のマウスへの生着および増殖は、マウス血中のヒトアルブミン濃度でモニタリングした。マウスのヒトアルブミン濃度は移植後対数的に増加し、30~40日頃から増加のスピードが遅くなった。60日頃からヒトアルブミン濃度の増加は止まり一定濃度を維持した(図2)。この間、ヒトアルブミン濃度が3mg/mL以上になったマウスで体重が減少し死亡するケースがみられた⁶⁾。死亡した個体では、主に腎臓障害が観察され、尿細管と糸球体にヒト補体(hC3)および、ヒト膜侵襲複合体(hMAC)の沈着がみられた⁶⁾。このことは、キメラマウス肝臓のヒト肝細胞が産生したヒト補体が活性化されマウス細胞を攻撃したことを意味する。そこで、われわれは、キメラマウスに補体抑制剤(フサン、メシル酸ナファモスタット)を投