

厚生労働科学研究研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた医薬品の動態および
安全性予測システムの構築

平成14年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 横井 毅

平成17(2005)年4月

厚生労働科学研究研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた医薬品の動態および
安全性予測システムの構築

平成 14 年度～平成 16 年度 総合研究報告書

主任研究者 横 井 毅

平成 17 (2005) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた医薬品の動態および 安全性予測システムの構築	-----	1
横井 毅		
資料1. ヒト肝細胞キメラマウスの安定生産技術の開発に関する研究		
吉里 勝利	-----	15
資料2. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP 代謝能および誘導能 に関する検討	-----	26
中島美紀		
資料3. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト特異的 CYP 誘導能 に関する検討	-----	69
中島 美紀		
資料4. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるリファマイシン系抗生 物質のヒト CYP 誘導能に関する検討	-----	108
横井 毅		
資料5. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた酵素誘導能に関する検討		
横井 毅	-----	118
資料6. ヒト肝細胞を有するキメラマウス由来の初代肝細胞培養系を 用いたヒト CYP1A2 および CYP3A4 の誘導評価	-----	127
横井 毅		

資料7. ヒト肝細胞を移植したキメラマウスにおける薬物代謝酵素 およびトランスポーターの発現解析	-----	137
横井 毅		
資料8. ヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞の培養実験における CYPs mRNA 発現で見た同等性の評価	-----	155
横井 毅		
資料9. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるペルオキシゾーム増殖剤の 影響	-----	168
横井 毅		
資料10. ヒト肝細胞キメラマウスにおける Phase II 酵素に関する検討 中島美紀	-----	173
資料11. 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 横井 毅	-----	214
資料12. ヒト肝細胞キメラマウスにおける <i>in vivo</i> 薬物代謝能の検討 中島美紀	-----	229
資料13. 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トランスポーターに関する組織学的 検討	-----	243
横井 毅		
資料14. 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	-----	267
横井 毅		
資料15. 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～ 横井 毅	-----	286
資料16. 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ーMrp2 への作用に関する 研究 横井 毅	-----	295
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	303
VI. 研究成果の刊行物・別刷	-----	304

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）

総合研究報告書

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた医薬品の動態および 安全性予測システムの構築

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部 教授

研究要旨

広島県地域結集型共同研究事業（研究統括：広島大学大学院理学研究科吉里 勝利）で開発されたヒト肝細胞キメラマウスは、ヒトにおける薬物動態および安全性を予測できる医薬品開発に有用なシステムになり得ると予想される。ヒト肝細胞キメラマウスは、肝障害を発症するアルブミンウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベータートランスジェニックマウス（uPA マウス）と免疫不全の性質を持つ SCID マウスを交配して生じた免疫不全肝障害マウス（uPA^(+/+)/SCID^(+/+) マウス、以下 uPA^(+/+)/SCID マウス）にヒト肝細胞を移植して作出する。ヒト肝細胞キメラマウスを薬物動態および安全性を予測する標準動物として用いるためには多くのヒト肝細胞キメラマウスが必要となる。そのためには肝障害免疫不全マウス（uPA^(+/+)/SCID マウス）を大量にかつ安定に供給する方法を確立することが必要不可欠である。本研究では初年度に uPA^(+/+)/SCID マウスの大量繁殖法を構築した。大量繁殖法により増やした uPA^(+/+)/SCID マウスを用いて、ヒト肝細胞キメラマウスをルーチンに作出する方法を確立した。また、遺伝子解析手法を real-time 定量性 PCR 法から最近報告された簡便な PCR 法に変更した。その結果、uPA 遺伝子のホモとヘミの識別の精度が 100%となったことから、ヒト肝細胞に高い割合で置換されたキメラマウスの割合の向上につながった。また、キメラマウスの血中ヒトアルブミン濃度測定を ELISA から比濁法に変更したことにより、短時間で簡易に測定することが可能となった。キメラマウスのドナーとなる生着可能な肝細胞ロット数を増やすために、インビトロテクノロジーズ（IVT）社の凍結ヒト肝細胞の幾つかのロットを uPA^(+/+)/SCID マウスに移植し、キメラマウス生産に使用可能な凍結ヒト肝細胞の探索を行い候補を見出した。今後はキメラマウ

ス作製に使用可能なロットの簡便な識別方法やそれらの大量確保、有効な培養肝細胞などの開発が重要であると考えられた。

これまでにヒト肝細胞キメラマウスのヒト薬物代謝酵素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、代表的な薬物代謝酵素であるCYPの薬物代謝能および誘導能を評価することを目的に、mRNA、タンパク、酵素活性レベルでの検討を行なった。第一にヒトCYPの発現および薬物代謝能を明らかにするため、様々なhAlb値およびRI値を有するキメラマウスについて、mRNA発現量、タンパク発現量、酵素活性を測定した。その結果、mRNA発現量、タンパク発現量、酵素活性ともにhAlb値およびRI値依存的な増加が認められた。また、ヒトに特異的なジクロフェナク4-水酸化酵素活性やデキサメタゾン6-水酸化酵素活性などでドナーと同程度の活性を有することなどが認められた。これより、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトCYPが発現しており、かつヒトの薬物代謝能を有することを明らかにした。またCYP2A6の遺伝子判定より、キメラマウスはドナーは、共にCYP2A6の全遺伝子欠損型であったころからも、同一の遺伝子多型を有することを明らかにした。

さらに、キメラマウスに発現しているヒトCYPの誘導能を明らかにするために、CYPの代表的な誘導薬であるリファンピシンと3-MCを投与し、mRNA発現量、タンパク発現量および酵素活性の変動を検討した。この結果、リファンピシン投与によりヒトCYP3A4のmRNA、タンパク、酵素活性レベルでの顕著な増加が認められた。また、3-MC投与により、ヒトCYP1A2 mRNAおよびタンパクレベルでの顕著な増加が認められた。これより、キメラマウスのヒト特異的なCYPの誘導能を有していることを明らかにした。さらに、主任研究者らは、Phase IIの薬物酵素のヒト特異的活性、ヒト特異的な酵素誘導現象の定量的解析、薬物相互作用のモデル動物としての利用研究などを実施した。それぞれは、本報告書の資料2, 3, 10, 12にそれぞれ詳細に述べた。

ヒト肝細胞キメラマウスを活用することにより、我が国の医薬品開発の様々な研究において、大きな利益をもたらすことが期待される。当初の研究計画に従い、多くの製薬メーカーの研究所等との共同研究を幅広く行い、データを学会発表などで開示することにより、ヒト肝細胞キメラマウスの薬物動態研究の分野における評価を確かなものにし一般化を諮ることを目的に、研究会を発足し、多くの研究成果を得ることができた。

製薬メーカー7社の薬物動態研究所および2大学の研究室と共に、「ヒト

肝細胞キメラマウス研究会」を平成 15 年度に立ち上げた。参加企業は、山之内製薬(株)、三共(株)、武田薬品工業(株)、第一製薬(株)、エーザイ(株)、ファイザー(株)、(株)大塚製薬工場の 7 社と東京大学大学院薬学研究科製剤設計学研究室と、東京理科大学薬学部生物薬剤学研究室である。主任研究者の横井 毅が中心となり、分担研究者とも意見交換を行って、ヒト肝細胞キメラマウスの使用および研究内容の調整を行った。これまでに、第一製薬を除く全ての参加会員との共同研究課題の成果をまとめることができ、本報告書に資料 1～資料 16 (資料 1, 2, 3, 10, 12 は、主任および分担研究者の研究報告) としてその詳細を掲載する。薬物代謝型酵素の代謝能や酵素誘導を中心とした研究のみならず、薬物トランスポーターに関する研究、薬物相互作用のモデル動物としての研究、毒性学的視点の研究、さらに網羅的遺伝子発現解析に至るまで、肝 mRNA、肝ミクロソーム、肝ヘパトサイトやマウス *in vivo* を材料として、極めて幅広い研究を実施することができた。

ヒトにおける薬物動態および毒性を予測することは、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および毒性研究の有用な手段として期待できることが明らかになった。今後の薬物動態研究の発展、医薬品開発ならびに医療に大きく貢献するものである。

分担研究者

吉里勝利

広島大学大学院理学研究科教授

中島美紀

金沢大学薬学部 助教授

A. 研究目的

近年の薬物動態分野の研究の急速な進展に伴い、薬物代謝酵素を始めとする動態関連酵素の機能には大きな種差が存在することが明らかにされてきた。ヒトに特異的に発現する薬の副作用、特に肝障害が原因で新

規医薬候補品の開発を断念する場合が現在でも多い。すなわち、実験動物を用いた研究データを用いてヒトを予測することは、本来非常に困難であるとの認識が広まってきた。そのため近年、医薬品開発の早いステージにおいて、ヒト薬物代謝酵素発現

系ミクロソーム等をヒトにおける動態および安全性の予測に用いられている。しかしながら、これらを用いても予測が出来ない重要な問題として、(1) 薬物動態関連酵素には、薬物や外来異物による酵素の誘導現象が頻繁に認められること。さらに、誘導現象に明確な種差が存在すること、(2) 実験動物で認められなかった毒性がヒトでのみ発現することがなど挙げられる。

これらの問題を解決するために、現在、ヒト初代培養肝細胞を用いている。これによりヒトにおける解毒代謝、酵素誘導と相互作用の予測試験が、医薬品開発の早い段階で行われるようになってきた。しかしながら、現在我が国では、日本人由来のヒト初代肝細胞は倫理上の問題等により使用が極めて困難な状況にあり、殆どを欧米からの輸入に頼っており、社会問題化する懸念が指摘されている。

本研究で用いる広島大学の吉里勝利教授（分担研究者）が開発に成功した『ヒト肝細胞キメラマウス』は、前述の問題を全て解決する画期的なマウスであり、マウス肝の80%以上がヒト肝細胞と置き換わり、ヒトと全く同一の肝細胞を多量に得ることができる。

ヒト肝細胞キメラマウスが、動態・

安全性の予測システムに適用できれば、(1) 同一のドナー由来のヒト肝細胞を、大量に増やして得ることが出来るため、肝細胞の極めて有効な利用が可能になる。(2) 多種類の肝細胞のパネル化が容易になり、複数の研究機関におけるデータの比較評価が可能になる。(3) 実験動物の使用を減らすことができる。(4) 入手が困難な日本人由来の肝細胞を多量に増やして得ることが可能になる。(5) 人種差の検討が極めて容易になる。(6) 医薬品開発のコストを削減できる。(7) 我が国発信の技術であること。(8) パネル化された肝細胞により、遺伝子多型と表現多型（特に酵素誘導能）の対応付けができる、など数々の成果を期待して、様々な視点からの幅広い動態研究への応用および評価研究を目指した。さらに、製薬メーカーの研究所等と幅広い共同研究を実施することにより、このキメラマウスの普及の促進を諮ることも目指した。

B. 研究方法

分担研究者の広島大の吉里研究室で、キメラマウスの作出と供給を行うと同時に、キメラマウスの安定生産技術の開発研究を行った。詳細は資料1に記載した。作出されたキメラマウスを用いて、主任研究者 横井毅および分担研究者 中島美紀の研究

室では、資料 2, 3, 10, 12 に記載した研究を主に行った。さらに、製薬会社等の動態研究部門および他大学にキメラマウスを供給し、7 社 2 大学と共同研究を行った。詳細は資料 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 として添付した。共同研究は広島大または金沢大で実施し、プロジェクト内容の検討、調整およびマウスの使用調整は主任研究者および分担研究者が行った。

(倫理面への配慮)

欧米人由来の肝試料 (米国チャールズリバー社による市販品) および日本人由来肝試料 (手術時の余剰肝) を用いる研究について、倫理委員会の承認を広島大学および金沢大学それぞれで取得した。平成 15 年度からのヒト肝細胞キメラマウスの量産には、市販のヒト肝細胞試料のみを使用した。さらに実験動物マウスの使用については、広島大学および金沢大学で動物実験の倫理指針に従った研究として承認を取得後実施した。なお、共同研究については、研究実施場所を広島大学または金沢大学のみとした為に、他期間での倫理委員会の対応は原則として必要なかったものの、各研究参加者の所属機関の倫理規定に添った対応を行った。

C. 研究結果

ヒト肝細胞キメラマウスの安定生産技術の開発に関する研究 (資料 1) においては、平成 15 年度と平成 16 年度ではほぼ同様に、置換率 70% 以上の高置換キメラマウスを約 4 割の出現率で作出することが出来、大量にキメラマウスを安定に生産するシステムを構築することに成功したと考えられた。また、キメラマウスのドナーとなる生着可能な肝細胞ロット数を増やすために、インビトロテクノロジー (IVT) 社の凍結ヒト肝細胞の幾つかのロットを uPA+/+SCID マウスに移植し、キメラマウス生産に使用可能な凍結ヒト肝細胞の探索を行い候補を見出した。

ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP 代謝能および誘導能に関する検討 (資料 2) では、ヒト肝細胞キメラマウスはヒト CYP が発現しており、かつヒトの薬物代謝能を有することを明らかにした。また CYP2A6 の遺伝子判定より、キメラマウスはドナーと同一の遺伝子多型を有することを明らかにした。また、リファンピシン投与によりヒト CYP3A4 の mRNA、タンパク、酵素活性レベルでの顕著な増加が認められた。また、3-MC 投与により、ヒト CYP1A2

mRNA およびタンパクレベルでの顕著な増加が認められた。これより、キメラマウスのヒト CYP は誘導能を有していることを明らかにした。

ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト特異的 CYP 誘導能に関する検討（資料 3）では、リファブチン投与によりキメラマウスでヒト CYP3A4 mRNA、ヒト CYP3A4 タンパク、TESOH、DEXOH の誘導が認められた。また uPA^{+/+}/SCID マウス、uPA^{-/-}/SCID マウスにおいては、リファブチンでマウス Cyp3a の誘導は認められなかった。これより、ヒト肝細胞キメラマウスに発現するヒト CYP はヒトの誘導能を有していることを明らかにした。

ヒト肝細胞キメラマウスにおけるリファマイシン系抗生物質のヒト CYP 誘導能に関する検討（資料 4）では、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトにおける CYP 3A 誘導能を予測する有用なシステムであることを示唆する結果を得た。

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた酵素誘導能に関する検討（資料 5）では、E5110 におけるヒト CYP3A4 の誘導は、ヒトの臨床試験結果と同様にヒト肝細胞に置換したキメラマウスにおいても認められた。一方、尿中 6 β -OHF 量の変動を指標としたヒトにおける非侵襲的な CYP3A4

の酵素誘導の評価系モデルとしては、マウス由来の代謝酵素が、ヒト CYP3A4 同様に Cortisol から 6 β -OHF へ代謝することが明らかとなったことから、マウスとヒトの分別が、困難であった

ヒト肝細胞を有するキメラマウス由来の初代肝細胞培養系を用いたヒト CYP1A2 および CYP3A4 の誘導評価研究（資料 6）から、5 μ M β -NF の暴露により、ヒト型の CYP1A2 mRNA は 3 例のキメラマウス肝細胞において、0.1% DMSO を含む無処置群と比較して 3.8 倍、6.3 倍および 3.3 倍となり顕著な誘導が確認された ($p < 0.01$)。また、50 μ M Rif の暴露により、ヒト型の CYP3A4 mRNA は 3 例のキメラマウス肝細胞において、0.1% DMSO を含む無処置群と比較して 8.4 倍 ($p < 0.001$)、2.2 倍 ($p < 0.01$) および 2.3 倍 ($p < 0.05$) となり、こちらも顕著な誘導が確認された ($p < 0.01$)。

ヒト肝細胞を移植したキメラマウスにおける薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現解析研究（資料 7）結果においては、キメラマウス肝臓の薬物動態機能を測る指標として、薬物代謝酵素やトランスポーターの mRNA に関し、ドナーの肝臓に対してキメラマウス肝臓での発現比率の頻度を見ると、中心値が 0.46 で

あった。一方、キメラマウス肝臓におけるマウスの Cyp 酵素 mRNA の発現比率は、正常対照群のマウス肝臓での結果に対して、Cyp2b10 の結果を除くと平均で 0.19 であった。ヒト mRNA あるいはマウス mRNA の発現率の結果は、ヒトアルブミン遺伝子の発現率、あるいはキメラマウスにおける血中ヒトアルブミン濃度から推定したマウス肝臓からヒト肝臓への置換率と良く相関していた。

ヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞の培養実験における CYPs mRNA 発現で見た同等性の評価研究（資料 8）では、ヒト肝細胞と、その細胞をドナーとしたキメラマウスの肝細胞を凍結で準備し、同時に培養実験を行って mRNA 発現量を比較した。mRNA 分析はリアルタイム RT-PCR 法を用いた。12 種類の CYP 酵素 mRNA の発現レベルを見ると、培養開始直前はキメラマウス肝細胞がヒト肝細胞よりも多く、また両細胞系で相関性は低かった（相関係数； $r = 0.690$ ）。培養 24 時間後も相関性は低かった（ $r = 0.699$ ）。その後、ヒト上皮細胞成長因子(hEGF)等を含まない培地に交換し、培養 48 時間後ではキメラマウス肝細胞の CYPs mRNA 発現量がドナー肝細胞と同程度になり、発現量の相関性は良好になった（ $r = 0.809$ ）。さらに、培養 72 時間後も良

好な相関性が維持された（ $r = 0.873$ ）。

資料 9 のヒト肝細胞キメラマウスにおけるペルオキシソーム増殖剤の影響の研究では、ペルオキシソームを増殖させることで有名なプラスチック可塑剤、ジエチルヘキシルフタレート（DEHP）をヒト肝細胞キメラマウスに 10 日間 1%混餌投与し、肝臓中のヒトの細胞領域およびマウスの細胞領域におけるペルオキシソーム増殖の差を観察した。

電子顕微鏡および免疫組織化学的観察の結果、キメラマウス肝臓のマウス肝細胞の領域では、ペルオキシソームの顕著な増殖が確認された。一方、ヒト肝臓の領域では、ペルオキシソームの増殖は認められなかった。

資料 10 にある、ヒト肝細胞キメラマウスにおける Phase II 酵素に関する検討では、キメラマウスの肝におけるヒト UGT、SULT、NAT および GST の発現および薬物抱合能を明らかにするため、様々なヒトアルブミン（hAlb）濃度を示したキメラマウスを用いて、mRNA 発現量、タンパク発現量、酵素活性を測定した。その結果、mRNA 発現量、タンパク発現量、酵素活性ともに hAlb 濃度依存的な増加が認められた。また、ヒトに特異的なモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性、トログリタゾン硫酸抱合活性、エストロン硫酸抱合活性お

よびスルファメタジン N-アセチル抱合活性でドナーと同程度の活性を有することが認められた。これより、ヒト肝細胞キメラマウスの肝には、ヒト UGT、SULT、NAT および GST が発現しており、かつヒトの薬物抱合能を有することを明らかにした。

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研究（資料 11）では、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。

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（資料 12）では、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。

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（資料 13）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。さらに、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。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。

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 (資料 14) では、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。

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～ (資料 15) では、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。

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ーMrp2への作用に関する研究(資料16)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、ジェニポサイ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。

D. 考察

資料1にあるヒト肝細胞キメラマウスの生産において、今後はキメラマウス作製に使用可能なロットの簡便な識別方法やそれらの大量確保、有効な培養肝細胞などの開発が重要であると考えられた。

資料3の実験から、ヒト肝細胞キメラマウスは、予想が困難なヒトでのCYP誘導能を*in vivo*で評価できる最適な実験動物モデルであることを明らかにした。

資料4の課題では、ヒト肝細胞キメラマウスの各処置群での例数が3~4例と少なかったため、キメラマウスの例数を増やして今回の研究結果を確認することは医薬品開発に大きく貢献する情報を提供するものであると考えられた。

資料5の課題においては、今後、非侵襲的なヒトCYP3A4の酵素誘導を予測するモデルとして本キメラマウスを利用するためには、ヒトCYP3A4選択的な基質の発見、あるいはマウス自体の代謝の影響を排除したヒト肝細胞に高置換されたマウスの利用が必須と考えられた。

資料6の研究から、ヒトの肝細胞を用いた研究と同様に、肝臓の大部分がヒト化したキメラマウスより調製した凍結肝細胞を用いた初代培養系においても、ヒトにおける薬物代謝酵素の誘導能を評価するための手段として利用できることを示した。この*in vitro*試験法は新薬開発におけるヒト薬物代謝酵素誘導作用の評価において非常に有用な手段になると考えられた。

資料7における研究から、ヒト肝

細胞キメラマウスは、薬物代謝酵素やトランスポーターの阻害と誘導に起因するような薬物相互作用の評価について非常に有用な研究方法になると考えられた。

資料 8 の研究では、ドナーのヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞の mRNA 発現を比較した。その結果、培養 48 時間以後は CYPs mRNA の発現量が同程度に推移し、この時点になるとヒト肝細胞の代替試料としてキメラマウス肝細胞を用いることが可能と考えられた。しかし、Rif 暴露による CYP3A4 mRNA 反応性の個体差のように、キメラマウス肝細胞がドナーであるヒト肝細胞の機能の全てを定量的に引き継いでいないことに注意を要すると考えられた。

資料 9 の研究から、ヒト肝細胞キメラマウスは、マウスやラットでペルオキシソームの増殖が確認された新薬の、ヒトにおける安全性を予測する最適な実験系になり得ることが示唆された。

資料 10 における Phase II 酵素に関する基礎的な検討結果を含め、ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト薬物代謝酵素の発現を明らかにすることにより、ヒト肝における薬物の代謝を総括的に実験動物モデルで予測することが可能と考えられた。

資料 11 に示す、網羅的な遺伝子発

現解析から、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。

資料 12 に示す薬物相互作用のモデル動物としての結果より、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。

資料 13 に示す研究において、今回用いた塩酸アモスラロール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。

資料 14 に示す研究から、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。

資料 15 の研究からは、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。

資料 16 の研究から、キメラマウスにおいてもジェニボ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。

E. 結論

本研究により、ヒト肝細胞キメラマウスは、肝臓のみヒト型であるという特徴について、動態学的な様々な重要なデータ等を得ることができた。このヒト肝細胞キメラマウスを創薬研究の様々な場面で使用するための、十分な基礎的なデータを得ることができた。さらに、薬物相互作用のモデル動物としての利用等についても、明確なデータを得ることができた。

ヒト肝細胞キメラマウス研究会として、製薬メーカー 7 社と 2 大学研究室との共同研究を行い、資料にあるように、様々な研究課題を遂行することができた。一部の課題については、すでに学会発表および論文発表を行ったが、多くの課題について、現在データのまとめの段階にあり、遠からず学会発表、論文発表を行う予定である。以上、我が国発のヒト肝細胞キメラマウスを用いて、我が国の主要な製薬メーカーの研究所と共同研究を行い、このキメラマウスの利用を促進することが出来たと考える。

F. 研究発表

論文発表：

- 1) Chise Tateno, Toru Horie, Katsutoshi Yoshizato: Chimeric mice with human hepatocytes—a new tool for preclinical evaluation of new medicines. *The Cell*, 36:328-332, 2004
- 2) 立野知世、吉里勝利：ヒト肝細胞キメラマウス 月刊薬事、46：1877-1880、2004
- 3) Expression of human cytochrome P450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabol. Dispos.*, 32:1402-1410,

2004

4) 立野知世、吉里勝利：ヒトの肝細胞を持つキメラマウス LABIO21、No. 19、6-10、2005

5) 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、株) エル・アイ・シー (印刷中)

6) Induction of Human CYP1A2 and CYP3A4 in Primary Culture of Hepatocytes from Chimeric Mice with Humanized Liver. Drug Metab. Pharmacokinet.

Vol.20 No.2 掲載予定

7) In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. Drug Metabol. Dispos., Vol.33, No.6 に掲載予定

学会発表：

1) ヒト肝臓を有するキメラマウスにおける薬物代謝酵素及びトランスポーターの発現解析；第 17 回日本薬物動態学会年会、2002 年 11 月 20-22 日、東京

2) ヒト肝細胞を有するキメラマウス由来の初代肝細胞培養系を用いた酵素誘導試験；日本薬学会 123 年会、2003 年 3 月 27-29 日、長崎

3) ヒト肝細胞を移植したキメラマウスの肝細胞培養系での mRNA でみた

酵素誘導；日本薬学会 123 年会、2003 年 3 月 27-29 日、長崎

4) 吉里勝利：ヒト肝細胞キメラマウスの医薬品開発応用への展望、日本薬物動態学会第 17 回ワークショップ、2003 年 4 月 18 日、昭和大学上條講堂

5) 吉里勝利：Growth and Differentiation Potential of Human Hepatocytes, Biocomplexity IV Workshops: Regenerative Biology and Medicine, 2003 年 5 月 15 日、Willkie Conference Center/Indiana University Bloomington

6) 吉里勝利：ヒト肝細胞キメラマウス、医療薬学フォーラム 2003 年 7 月 5 日、広島国際会議場

7) 吉里勝利：ヒト型キメラマウスの作製と医学研究への展望、ゲノム創薬フォーラム、2003 年 7 月 16 日、日本薬学会会長井記念ホール

8) 吉里勝利：先端医療のこれからの発展～肝臓再生について、市民公開講座、2003 年 9 月 13 日、泉南市総合福祉センター

9) 吉里勝利：ヒト肝細胞のインビトロ及びインビボでの増殖能、第 7 回九州肝不全研究会、2003 年 9 月 20 日、西鉄グランドホテル

10) ヒト肝細胞キメラマウスにおける in vitro 薬物代謝能の検討；第 18 回日本薬物動態学会年会、2003 年 10

月 8-10 日、札幌

11) ヒト肝細胞キメラマウスにおける薬物代謝酵素の誘導能に関する検討；第 18 回日本薬物動態学会年会、2003 年 10 月 8-10 日、札幌

12) 吉里勝利：マウスを媒体として増殖させたヒト肝細胞の医学・医療分野における応用、連携大学院セミナー、2004 年 7 月 30 日、長崎医療センター

13) Expression of human CYP in chimeric mice with humanized liver. The 7th International ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) Meeting、2004 年 8 月 29 日～9 月 2 日、バンクーバー、カナダ

14) In vivo induction potency of human CYP in chimeric mice with humanized liver. The 7th International ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) Meeting、2004 年 8 月 29 日～9 月 2 日、バンクーバー、カナダ

15) 吉里勝利：肝再生医療の展望、第 2 回 COE「細胞社会学の拠点形成」セミナー、2004 年 9 月 22 日、岡山

16) In vitro evaluation of drug induction of human drug-metabolizing enzyme mRNA using

hepatocytes isolated from chimeric mice bearing human hepatocytes

第 19 回日本薬物動態学会年会、2004 年 11 月 17-19 日、金沢

17) 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

18) In vivo induction potency on CYP3A4 by rifabutin in chimeric mice with humanized liver；第 19 回日本薬物動態学会年会、2004 年 11 月 17-19 日、金沢

19) 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

20) 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、2005 年 3 月 29-31 日、東京

G. 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の安定生産技術の開発に関する研究

分担研究者 吉里 勝利 広島大学大学院理学研究科生物科学専攻 教授

研究要旨

広島県地域結集型共同研究事業（研究統括：広島大学大学院理学研究科 吉里勝利）で開発されたヒト肝細胞キメラマウス（以下、キメラマウス：Am J Pathol. Vol.165, 901-912, 2004）は、ヒトにおける薬物の体内動態および安全性を予測する医薬品開発に有用な試験系になり得ると予想される。キメラマウスは、肝障害を発症するアルブミンウロキナーゼプラスミノージェンアクトペータートランスジェニックマウス（uPA トランスジェニックマウス：Cell, Vol.62, 447-456, 1990）と免疫不全を呈する SCID マウスを交配して生じた免疫不全肝障害マウス（以下、uPA+/+SCID マウス）にヒト肝細胞を移植し作出する。キメラマウスを薬物の動態および安全性を予測するモデル動物として用いるためには大量のキメラマウスを安定に供給することが必要となる。そのためには uPA+/+SCID マウスの大量安定供給システムの構築と移植用の凍結ヒト肝細胞を確保することが必要不可欠である。そこでまず、uPA+/+SCID マウスおよび uPA+/-SCID マウスを用いて交配を行い、効率よく uPA+/+SCID マウスを作出する交配方法を検討した。次に日本チャールスリバー株式会社（本社：横浜市港北区新横浜 2-3-8 東新 24 新横浜ビル）に uPA+/+SCID マウスの親となる uPA+/-SCID マウスの大量飼育を委託し、uPA+/+SCID マウスの大量繁殖システムを構築した。uPA 遺伝子に関する遺伝子型判定は当初定量性 PCR により行った。遺伝子型判定の操作は後に簡便な PCR 法に変更した。キメラマウスの血中ヒトアルブミン濃度測定は ELISA 法による行った。この操作も後に測定に要する時間が短い比濁法に変更し、迅速化を図った。平成 15 年には中外テクノス(株)（本社：広島市西区横川新町 9-12）に、平成 16 年には(株)フェニックスバイオ（本社：東広島市鏡山 3 丁目 10-31 広島大学インキュベーションセンター7号室）にキメラマウス作製の技