

術移転を行い、キメラマウス生産を委託した。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た。以上のことから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。

#### A. 研究目的

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) では、肝障害マウス (uPA トランスジェニックマウス: Cell, Vol.62, 447-456, 1990) と免疫不全マウス (SCID マウス) とを交配させることによって免疫不全肝障害マウス (以下、uPA+ / +SCID マウス) を作出し、このマウスへヒト肝細胞を移植することにより、マウス肝臓の 80%以上がヒト肝細胞で置換されたヒト肝細胞キメラマウス (以下、キメラマウス) を作出することに成功した (Am J Pathol. Vol.165, 901-912, 2004)。キメラマウス肝におけるヒト肝細胞はドナーと同様にヒト型薬物代謝酵素を発現している等、ヒト肝細胞機能を保持していることが推定され、キメラマウスは医薬品開発に重要なヒトにおける薬物動態および薬物の安全性を予測する

モデル動物として利用可能であると予想される。

本研究の目的とするキメラマウスおよびキメラマウスから分離したヒト肝細胞を創薬研究に利用するためには、キメラマウスの大量かつ安定的な供給が必須である。これには凍結ヒト肝細胞を移植する肝障害免疫不全マウス (uPA+ / +SCID マウス) の大量繁殖システムの構築が重要である。そこで平成 14 年度は、肝障害免疫不全マウス繁殖のための施設設置と、効率よく uPA+ / +SCID マウスを得るための繁殖方法の検討、キメラマウス作製技術の移転を平成 15 年は中外テクノス(株) (本社: 広島市西区中広二丁目 14-2) に、平成 16 年は(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) に行った。また、肝障害免疫不全マウスの親である uPA+ / -SCID

マウスの大量繁殖を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）に委託し、キメラマウス安定供給システムの構築を行った。

平成 15 年は中外テクノス(株)に、平成 16 年は(株)フェニックスバイオにヒト肝細胞キメラマウス生産を委託した。中外テクノス(株)及び(株)フェニックスバイオでは、平成 15 年度から日本チャールスリバー株式会社から供給された uPA+/-SCID マウスを交配して uPA+/+SCID マウスを生産し、それらのマウスに凍結ヒト肝細胞を移植しヒト肝細胞キメラマウスの大量生産を行った。

## 1:肝障害免疫不全マウス繁殖方法の検討

### B. 研究方法

広島県地域結集型共同研究事業で既に作出されていた uPA+/-SCID マウスを交配して uPA+/+SCID マウスを繁殖させた。マウスの遺伝子型判定は以下の方法で行った。生後 2 週間のマウス尾を一部切り取り、マウスゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を鋳型として、uPA 導入遺伝子に含まれる human growth hormone (hGH)を特異的に増幅する PCR プライマーを用いて PCR を行

い、ゲノム DNA 中に hGH 遺伝子が検出されるマウスを選別した。次に、hGH と mouse glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (mGAPDH)のプライマーと TaqMan プローブを用いて、マウスのゲノム DNA 中に含まれる hGH と mGAPDH のコピー数を定量性 PCR 法により ABI7700 を用いて解析した。得られた hGH のコピー数を mGAPDH のコピー数で割ると、得られた値が高い群と低い群の 2 群にほぼ別れる。高い群の値は、低い群の値の約 2 倍であり、前者を uPA ホモマウス、後者を uPA (+/-) /SCID マウス (uPA ヘミマウス) と判定した。

繁殖に用いるマウスに関して、uPA+/+SCID マウスは肝障害を呈するため、繁殖に使用できるようになるまで個体を成長・維持することは難しいと考えた。そこで、コラゲナーゼ灌流法により調整したマウス肝細胞を生後 3 週間の uPA+/+SCID マウスに脾臓を通じて移植することで、uPA+/+SCID の肝障害を回復させた。脾臓に注入する細胞数は  $0.5 \times 10^6$  個/匹とし、注入する細胞懸濁液量は 12.5  $\mu$ L/匹とした。移植後のマウスは体重が 20 グラム付近になるまで飼育し、繁殖に用いた。マウス肝細胞を移植したオスの uPA+/+SCID マウスとメスの

uPA+/-SCID マウスを交配し、オスの uPA+/+SCID マウスの繁殖が可能か確認した。次にマウス肝細胞を移植した uPA+/+SCID マウス同士を交配し、メスの uPA+/+SCID マウスの繁殖が可能か確認した。

### C. 研究結果

uPA+/+SCID マウスは肝障害を呈するため、uPA+/+SCID マウスの生産は uPA の遺伝子を有し肝障害が成長と共に回復する uPA+/-SCID マウス同士の交配により行われていた。この場合、生まれる仔マウスでの uPA+/+SCID マウスの出現頻度は約 20%であった。この値が 25%に近いことから、uPA 遺伝子はメンデルの法則に従って遺伝すると予想された。このことから uPA+/+SCID マウスと uPA+/-SCID マウスを交配させた場合は生まれる仔マウスでの uPA+/+SCID マウスの出現頻度は 50%、uPA+/+SCID マウス同士を交配させた場合は 100%と予測され、高効率で uPA+/+SCID マウスが繁殖可能と考えられた。まず、マウス肝細胞を移植したオスの uPA+/+SCID マウスとメスの uPA+/-SCID マウスを 1 匹ずつの 8 ペアで交配させた。その結果、妊娠率は約 50%、1 匹のメスマウス当たりの出産数は 5.5 匹、仔マウスでの

uPA+/+SCID マウスの出現頻度は約 50%であり、予想された出現頻度を得られた。次に uPA+/+SCID マウス同士を 4 ペア交配させた。結果は妊娠率 25%、出産マウス数は 4 匹、仔マウスでの uPA+/+SCID マウスの出現頻度は 100%であった。

### D. 考察

マウス肝細胞を移植したオスの uPA+/+SCID マウスとメスの uPA+/-SCID マウスを交配した場合、妊娠成立率が 50%とやや低い (uPA+/-SCID マウス同士の交配での妊娠率は約 70%) もの、出産仔マウス数、uPA+/+SCID マウス出現頻度は予想通りであった。したがって、マウス肝細胞を移植したオスの uPA+/+SCID マウスは繁殖に使用可能であることが分かった。一方、uPA+/+SCID マウス同士を交配した場合、妊娠が成立する率が 25%と低かった。先の試験でマウス肝細胞を移植したオスの uPA+/+SCID マウスは繁殖に使用可能であることが分かっているため、マウス肝細胞を移植したメスの uPA+/+SCID マウスに問題があると考えられた。マウスを解剖した結果、マウス肝細胞を移植したメスの uPA+/+SCID マウスの生殖腺が未発達であった。このことからマウス肝細胞を移植したメ

スの uPA+/+SCID マウスは繁殖には適さないと考えられた。以上の結果から、効率良く uPA+/+SCID マウスを生産するためにはメスの uPA+/-SCID マウスとマウス肝細胞を移植したオスの uPA+/+SCID マウスの組み合わせでの交配が適していると考えられた。

## E. 結論

メスの uPA+/-SCID マウスとマウス肝細胞を移植したオスの uPA+/+SCID マウスとを交配させることにより、高効率に uPA+/+SCID マウスを生産することができた。

## 2:移植に用いる凍結ヒト肝細胞の決定

## B. 研究方法

キメラマウスは、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 (ドナー：白人、9 ヶ月、男性)、IVT-RQO (ドナー：白人、6 日、女性)、IVT-130 (ドナー：白人、2 歳、女性)、を脾臓より注入することにより作製した。脾臓に注入する細胞数は  $0.5 \times 10^6$  個/匹とし、注入する細胞懸濁液量は 12.5  $\mu$ L/匹とした。移植後 3 週目から、週 1 回マウス血液

を尾静脈から 2  $\mu$ l 採取し、ELISA キット (Human Albumin ELISA Quantitation Kit, Bethyl laboratories Inc.) を用いて血中ヒトアルブミン濃度を測定した。

## C. 研究結果

ロット IVT-079 を移植したマウスでのみ血中ヒトアルブミン濃度が顕著に上昇し、移植後 30 日で 1,000,000 ng/ml を超えた。IVT-RQO, IVT-130 では顕著な血中ヒトアルブミン濃度の上昇は観察されなかった。広島県組織再生プロジェクトと文部科学省知的クラスター創成事業において既に得られていた知見から、ロット IVT-079 を移植することによりマウス肝が高効率にヒト肝細胞に置換されたキメラマウスが作出可能であると考えられた。

## E. 結論

ヒト肝細胞のドナーとして IVT-079 を用いることでマウス肝が高効率でヒト肝細胞に置換されたキメラマウスが作出可能であることが分かった。

## 3:インビトロテクノロジー (IVT) 社のロット 079 を移植したキメラマウスの生産

## B. 研究方法

日本チャールスリバー株式会社に uPA+/+SCID マウスの親となる uPA+/-SCID マウスの繁殖と大量飼育を委託した。繁殖した uPA+/-SCID マウス同士もしくはメスの uPA+/-SCID マウスとマウス肝細胞を移植したオスの uPA+/+SCID マウスとで交配し、uPA+/+SCID マウスを繁殖した。交配はオス 1 匹に対しメス 2 匹で行った。繁殖したマウスの遺伝子型は平成 15 年 8 月までは「1:肝障害免疫不全マウス繁殖方法の検討」と同じ方法で行った。平成 15 年 9 月以降は Meuleman らにより報告された方法 (Biochem Biophys Res Commun, vol. 308, 375-378, 2003) を導入し、繁殖したマウスの遺伝子型を判定した。つまり、uPA 遺伝子を導入することにより uPA/SCID マウスに欠失する配列のプライマーと uPA/SCID マウスに存在する hGH の配列のプライマーを混合し、マウスから採取したゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行い、uPA+/+SCID マウス、uPA+/-SCID マウス、uPA-/-SCID マウスを同時に選別した。

ヒト肝細胞キメラマウスは、uPA+/+SCID にインビトロテクノロジー (IVT) 社より購入したヒト肝細胞 (ロット番号、IVT-079) を

脾臓より注入することにより作製した。脾臓に注入する細胞数は  $0.75 \times 10^6$  個/匹とし、注入する細胞懸濁液量は 15  $\mu$ L/匹とした。移植後 3 週目から、週 1 回マウス血液を尾静脈から 2  $\mu$ l 採取し、「2:移植に用いる凍結ヒト肝細胞の決定」と同様、ELISA キット (Human Albumin ELISA Quantitation Ki, Bethyl laboratories Inc.) を用いて血中ヒトアルブミン濃度を測定した。しかし、この方法は操作が煩雑で時間がかかるため、平成 15 年 12 月より簡易に血中ヒトアルブミン濃度が測定できる抗ヒトアルブミン抗体を結合させたラテックスビーズを用いた比濁法のキット (LX 試薬' 栄研' Alb-II、栄研化学株式会社) による測定を導入した。これにより数時間で血中ヒトアルブミン濃度を定量することが可能となった。尚、文部科学省知的クラスター創成事業において、キメラマウス血中ヒトアルブミン濃度を ELISA 法と比濁法で測定したところ、高い相関関係が認められている。移植約 3 週間後から経時的に血中ヒトアルブミン濃度を測定した。置換率は、これまでと同様に広島県組織再生プロジェクトと文部科学省知的クラスター創成事業において得られている、8 週目のヒト血中ヒトアルブミン濃度と解剖時のマウス肝臓切片に

おけるヒトサイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色の結果から求めた実際の置換率との相関関係より求めた。

以上のキメラマウス作製技術に関して平成 15 年は中外テクノス(株)に、平成 16 年は(株)フェニックスバイオに移管し、キメラマウス作製業務を委託した。

### C. 研究結果

平成 15 年 4 月から 12 月までの中外テクノス(株)に委託したキメラマウス生産における、各月の移植回数、移植したマウスの月毎の合計数および置換率を表 1 に示した。平均して月に 3.1 回移植を行った。移植したマウスの平均は月あたり 31.2 匹となり、一回に移植する平均匹数は 10.0 匹であった。ヒト肝細胞を移植した

マウスのヒト肝細胞による置換率は、1%未満が約 3 割を占めていた。置換率が 80%以上のマウスは約 2 割であったが 70%前後を含めると約 4 割であった。

平成 16 年 1 月から年 12 月までの(株)フェニックスバイオに委託したキメラマウス生産における、各月の移植回数、移植したマウスの合計数および置換率を表 2 に示した。移植したマウスの平均数は月あたり 31.8 匹となり、一回に移植する平均匹数は約 8.5 匹であった。ヒト肝細胞を移植したマウスのヒト肝細胞による置換率は、1%未満が約 3 割であった。置換率が 80%以上のマウスは約 3 割で、70%前後を含めると約 4 割であった。

表 1. 平成 15 年 4 月から平成 15 年 12 月までのキメラマウス生産状況

移植回数	移植マウス		キメラマウス置換率(%)								
	合計数	1%未満	10%前後	20%前後	30%前後	40%前後	50%前後	60%前後	70%前後	80%以上	
4月	2	14	7	1	1	1	1	0	1	1	1
5月	5	47	13	4	5	4	2	2	3(1)	1	13(1)
6月	3	32	10	4(1)	1	1	4	3	0	4	5(1)
7月	4	53	16	3	2	3	6	2	5	8(1)	8(2)
8月	2	13	2	2	0	0	2	3	0	2	2
9月	4	36	17	0	0	0	0	1	1	3	14
10月	2	26	5(2)	0	0	0	1(1)	0	1	6(1)	13(4)
11月	3	24	8	1	0	0	0	1	2	2	10(5)
12月	3	36	16	0	0	0	0	0	4	2	14
合計	28	281	94(2)	15(1)	9	9	16(1)	12	17(1)	29(1)	80(4)
割合			33.5%	5.3%	3.2%	3.2%	5.7%	3.6%	6.0%	10.3%	28.5%

※ カッコ内は置換率を予測後死亡したマウスの数を示す。

※ 置換率を予測する前に死亡した個体は除いた。

表 2. 平成 16 年 1 月から平成 16 年 12 月までのキメラマウス生産状況

移植回数 前後 80%以上	移植マウス		キメラマウス置換率(%)								
	合計数		1%未満	10%前後	20%前後	30%前後	40%前後	50%前後	60%前後	70%前後	80%以上
1月3	31	14	2	1	0	0	0	3	1	10(1)	
2月4	28	5(2)	3	2(1)	1(1)	0	2	0	1	14	
3月4	39	14(1)	5(1)	1	4	0	3	1	2(1)	9(1)	
4月3	29	7	1	0	3	0	5	4(3)	0	9(3)	
5月3	23	7(1)	0	2	3(1)	0	2	1	2(1)	6(1)	
6月4	28	10	1	1	1	3(1)	2(1)	0	2	8(1)	
7月3	28	10	1	0	0	0	5(1)	5	1	6	
8月4	33	9	0	3	4	2	1	2	5	7(1)	
9月5	38	3	0	2	1	2	4	4	2(2)	20(1)	
10月4	34	8	0	0	0	2	2	3	10(2)	9	
11月4	36	6	1	1	2	3	1	4	3	15(2)	
12月4	35	8	2	0	1	4	2	0	7	11	
合計45	382	101(4)	16(1)	13(1)	20(2)	16(1)	29(2)	27(3)	36(6)	124(11)	
割合		26.4%	4.2%	3.4%	5.2%	4.2%	7.6%	7.1%	9.4%	32.5%	

※ カッコ内は置換率を予測後死亡したマウスの数を示す。

※ 置換率を予測する前に死亡した個体は除いた。

#### D. 考察

IVT-079 を uPA+/+SCID マウスへ移植したところ、マウス肝臓におけるヒト肝細胞の置換率が 70%以上の高い置換率を示すキメラマウスが約 4 割得られた。また、置換率 1%未満のマウスも約 3 割認められた。これらの結果は、平成 15 年の中外テクノス(株)に委託した場合と平成 16 年の(株)フェニックスバイオに委託した場合とでほぼ同じであった。このことから、高い割合でヒト肝細胞に置換された肝臓を持つキメラマウスを安定して生産するシステムが確立することができたものと考えている。

#### E. 結論

キメラマウス生産技術の移管、ヒト肝細胞の移植担当技術者の養成、施設の整備により、安定したキメラマウス生産システムが構築された。

#### 4: IVT-079 以外のロットのヒト肝細胞の移植

#### B. 研究方法

IVT-079 以外の接着性のヒト凍結肝細胞 11 ロットをドナー細胞として uPA+/+SCID マウスに移植し、キメラマウスの作製に有効な凍結ヒト肝細胞の探索を試みた。なお、移植方法、移植した細胞数、注入量および置換率の判定は「3:インビトロテクノロジー (IVT) 社のロット 079

を移植したキメラマウスの生産」と同様の方法で行った。

### C. 研究結果

今回移植に用いた 11 種類のロットを移植したマウスにおける置換率の結果を表 3 に示した。移植後の置換率が 70%以上の高置換率のマウスが

作出された細胞は IVT-QKR、IVT-NOG、IVT-NLR の 3 種類で、置換率 70%以上のキメラマウスの出現率はそれぞれ、31.3%、16.7%、55.6%であった。その他のロットでは高置換率のキメラマウスを作出することは出来なかった。

表 3. IVT-079 以外のロットを移植した場合の置換率

Lot	ドナー 年齢/性別	移植 回数	移植マウス 合計数	キメラマウス置換率(%)				
				1%未満	10~20%	30~40%	50~60%	70%以上
100	74/F	1	3	3	0	0	0	0
59	33/M	1	6	2	4	0	0	0
QKR	35/M	2	16	6(3)	2	1	2	5(1)
XPK	39/M	1	7	5	2	0	0	0
NOG	46/M	1	6	3	0	1	1	1
NLR	13/M	1	9	4(1)	0	0	0	5
EFA	16/M	1	10	8(2)	2	0	0	0
GIU	14/M	1	5	5(2)	0	0	0	0
RQO	0/F	1	9	2	1	2	4	0
ZCR	38/M	1	8	8(2)	0	0	0	0
GUY	39/M	1	9	9(1)	0	0	0	0

※ カッコ内は置換率を予測後死亡したマウスの数を示す。

※ 置換率を予測する前に死亡した個体は除いた。

※ M:男性、F:女性。

### D. 考察

本研究でキメラマウス作製に用いたヒト凍結肝細胞ロット IVT-079 における置換率 70%以上の高置換率キメラマウスの出現率が約 40%であることを考慮すると、今回試験したロットの中でキメラマウスの大量安定供給に使用可能な凍結ヒト肝細胞ロットは置換率 70%以上の高置換率キメラマウスの出現率が 30%以上の

IVT-QKR と NLR のみと思われた。

IVT-079 を含めた 13 種のロット {キメラマウス作製用のドナーを選択する際に用いた IVT-130 (ドナー:白人、2 歳、女性) を含む} 中 3 種が使用可能ということで、移植試験を行いキメラマウス作製に使用可能な凍結ヒト肝細胞を見出せる確立は 23.1%と低かった。ヒト凍結肝細胞を移植するまでに要する経費や労力、

高置換マウスが得られると判断できるまでの時間（移植後8週間）を考慮すると、使用可能と思われるヒト凍結肝細胞をある程予想する必要がある。

IVT-O79 および IVT-NLR は生後9ヶ月と13歳のドナー由来と比較的若いことから、20歳未満のドナーがキメラマウス作製に適している可能性が高いと考えられた。また、置換率50~60%の個体が4個体得られたIVT-RQOはドナーが0歳児由来であり、このことは若いドナーの肝細胞がキメラマウス作製に適している可能性が高いことを支持していると考えられた。今回試験したドナーを20歳未満に絞れば、高置換率キメラマウス作製に使用可能なヒト凍結肝細胞を見出される可能性は33.3%であった。35歳のドナー由来であるIVT-QKRを移植したところ、置換率70%以上のキメラマウスが見出されたが、20歳以上のドナーで使用可能な確率は14.3%であった。

キメラマウス生産に適したドナー肝細胞を選択するためには、現在のところ、実際に様々なロットのヒト肝細胞をマウスに移植してその生着、増殖の度合いを調べる方法しかないのが現状である。これまで述べてきたように、ドナー年齢は比較的若い方が良いと考えているが、小児のド

ナーであってもキメラマウス生産に適さないロットの方が多い。このことは、脳死ドナー患者の肝臓の状態や、肝臓組織から肝細胞を調整する条件や、肝細胞から凍結肝細胞アンプレを調整する過程の条件が影響している可能性が考えられた。また、昨年、70%の置換率の個体が得られたIVT-QKRやIVT-NLRは既に在庫がほとんど存在せず、もはやこのロットでのキメラマウス作製は使用不可能となっている。このように、移植に使用可能と思われるドナー細胞が見つかってその細胞を大量に確保出来なくなる場合もあり、もし確保できたとしても細胞の量には限りがある。今後、キメラマウスの作製に適したヒト肝細胞のマーカ遺伝子や蛋白の探索や、キメラマウス作製に利用可能な培養肝細胞の開発等が必要と考えられる。

## E. 結論

キメラマウス生産に有効と思われる凍結ヒト肝細胞のロットは、これまでに試験した結果では、IVT-079、IVT-NLRおよびIVT-QKRであった。肝細胞のドナーを選択する際のドナー年齢は20歳未満に絞る方が良いと考えられた。今後はキメラマウス作製に有用なロットを識別する簡便な方法の開発や、識別することができ

るマーカー遺伝子や蛋白の同定が重要と考えられた。

#### F. 健康危険情報：なし

#### G. 研究発表

##### 1. 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) 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

4) 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)

##### 2. 学会発表：

1) 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、2003.4.18、昭和大学上條講堂

2) 吉里勝利：Growth and Differentiation Potential of Human Hepatocytes, Biocomplexity IV

Workshops: Regenerative Biology and Medicine, 2003, 5.15, Willkie Conference Center/Indiana

University Bloomington

3) 吉里勝利：ヒト肝細胞キメラマウス、医療薬学フォーラム 2003.7.5、広島国際会議場

4) 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、2003.7.16、日本薬学会会長井記念ホール

5) 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、2003.9.13、泉南市総合福祉センター

6) 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、2003.9.20、西鉄グランドホテル

7) 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、2004.7.30、長崎医療センター

8) 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、2004.9.22、岡山大学

#### 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ヒト CYP 代謝能および誘導能に 関する検討

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

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予想される。しかし、これまで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I章では、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と同一の遺伝子多型を有することを明らかにした。

第II章では、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、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CYPは

誘導能を有していることを明らかにした。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、CYP以外の薬物代謝酵素や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CYP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。また、本研究はヒト肝細胞キメラマウスの薬物代謝試験への応用を初めて示した画期的な研究であり、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。

#### A. 研究目的

医薬品開発における薬物動態および安全性の予測試験には、ヒト由来組織とりわけヒト肝試料が必要である。我が国では現在、多量のヒト肝を欧米からの輸入に頼っている。本研究では、独自に吉里勝利教授（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』を用いて、ヒトにおける薬物動態および安全性を予測するシステムを樹立することを目的とする。ヒト肝細胞キメラマウスは、特殊な免疫不全マウスにヒト肝細胞を注入し、ヒト肝細胞を特異的に増殖させる画期的なシステムであり、マウス肝の約80%以上がヒト肝に置き替わり、ドナーの肝細胞と全く同じ肝細胞を多量に作製することが可能である。

このヒト肝細胞キメラマウスの適用により、(1) 同一のドナー由来のヒト

肝細胞を無制限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検討が容易になる。(3) パネル化された肝細胞により、遺伝子多型と表現多型（特に誘導能）の対応付けが可能になる。(4) 実験動物の使用を減らすことができる。(5) 医薬品開発のコストを削減できる。(6) 入手が困難な日本人由来の肝細胞を多量に得ることが可能になる。(7) 人種差の検討が極めて容易になる。(8) 我が国発信の技術である。(9) 毒性発現の予測研究が飛躍的に進展するなど、この画期的なキメラマウスの使用により、我が国の医薬品開発に大きな利益をもたらすものと期待される。

主要な薬物代謝酵素であるCYPは、*in vitro* の培養系では活性を十分

に維持することが困難であることが知られている。薬物輸送トランスポーターは、その活性は *in vitro* の培養系においても、その機能が比較的維持されることが知られている。そこで本研究において、分担者である中島は、昨年度の予備的な検討に続き、本年度はヒト肝細胞キメラマウス由来肝ミクロソームを中心に、ヒト特異的な薬物代謝酵素活性を維持しているか否かについて、薬物代謝酵素 CYP について real-time PCR を用いて mRNA の発現レベルを、ウエスタンブロット分析によりタンパクの発現レベルを、HPLC 分析により各種酵素活性レベルを検討し、ヒト肝細胞キメラマウスの有用性の確立を目指して実験を行った報告を第 I 章として記す。さらに誘導能に関する研究について第 II 章として記す。

## 第 I 章 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP の薬物代謝能に関する検討

### B. 研究方法

#### B-1. ヒト肝細胞キメラマウス

uPA (+/-)/SCID マウスおよび uPA (-/-)/SCID マウスは日本チャールズ・リバー (Yokohama, Japan) より入手した。本研究ではキメラマウスのドナーとして、D1 (日本人、男性、12 才)

と In Vitro Technologies (Catonsville, MD) より購入した凍結ヒト肝細胞 D2 (白人、男性、9 ヶ月) を用いた。本研究で使用したキメラマウスを Table 1 に示す。生後 11-14 週齢の雄性キメラマウスを使用した。なお、ELISA 法により測定したキメラマウスの血中ヒトアルブミン濃度 (human albumin concn., hAlb) と、ヒト特異的サイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色から算出した置換率 (replacement index, RI) は相関が認められているため、Table 1 に併記した。

#### B-2. 肝からの total RNA の調製

ISOGEN のマニュアルに修正を加え、以下の方法で肝臓から total RNA を調製した。約 30 mg の肝臓に、ISOGEN 0.5 mL を加えてホモジナイズ後、サンプルチューブに分注し、クロロホルム 0.1 mL を加えて激しく 15 秒間攪拌した。室温で 3 分間放置した後、4°C、14,000 g で 15 分間遠心分離した。上清を別のチューブに採取し、0.25 mL のイソプロパノールを加えて室温にて 8 分間放置した後、4°C、14,000 g で 10 分間遠心分離した。沈殿を 75% エタノールで洗浄した。この沈殿を乾燥させた後、DEPC 処理精製水に溶解させ、260 nm における吸光度を測定することにより定量した。同時に 300 nm の吸収を基準とし

て 280 nm と 260 nm の吸光度を測定し、その比をタンパク質混入の有無の指標とした。なお、キメラマウス

C3 およびドナーD2 の肝を入手することができなかったため、total RNA を調製できなかった。

Table 1. The chimeric mice used in the present study.

No.	Donor	hAb	RI	Drug treatment			
C1	D1	0.0	0	None			
C2	D1	1.6	31	None			
C3	D1	2.1	52	None			
C4	D1	3.5	57	None			
C5	D1	7.7	89	None			
C6	D1	2.3	45	Rif	50 mg/kg/day	i.p.	4 days
C7	D1	4.2	47	Rif	50 mg/kg/day	i.p.	4 days
C8	D1	5.2	48	Rif	50 mg/kg/day	i.p.	4 days
C11	D2	0.0	0	None			
C12	D2	0.6	19	None			
C13	D2	2.1	60	None			
C14	D2	9.3	71	None			
C15	D2	10.8	88	None			
C16	D2	13.7	71	None			
C17	D2	13.7	93	None			
C18	D2	4.2	60	Rif	50 mg/kg/day	i.p.	4 days
C19	D2	5.7	70	Rif	50 mg/kg/day	i.p.	4 days
C20	D2	11.4	80	Rif	50 mg/kg/day	i.p.	4 days
C21	D2	2.2	70	3-MC	20 mg/kg/day	i.p.	4 days
C22	D2	2.8	57	3-MC	20 mg/kg/day	i.p.	4 days
C23	D2	4.6	76	3-MC	20 mg/kg/day	i.p.	4 days
C24	D2	13.0	80	3-MC	20 mg/kg/day	i.p.	4 days

hAb: Human albumin concn. (mg/mL)

RI: Replacement index (%)

D1: Japanese, 12 years, male

D2: Caucasian, 9 months, male

Rif: Rifampicin

3-MC: 3-Methylcholanthrene

### B-3. RT-PCR法によるヒトCYP mRNA発現量の定量

I-2-2 より得られた total RNA から以下の方法により cDNA を合成し

た。Total RNA 4  $\mu$ g、ランダムヘキサマー (150 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L に DEPC 処理水を加えて 23  $\mu$ L とした。70°C 水浴中で 10 分間反応後、氷冷した。さらに 5x 逆転写反作用緩衝液 8  $\mu$ L、

2.5 mM dNTPs 8  $\mu$ L、MMLV-逆転写酵素 1  $\mu$ Lを加えて全量を 40  $\mu$ Lとした。37°Cで60分間反応させた後、沸騰水浴中で逆転写酵素を失活させた。得られた cDNA 溶液を用いて以下の方法により PCR を行った。cDNA 溶液 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M センスプライマー 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M アンチセンスプライマー 1  $\mu$ L、5x SGI 緩衝液 5  $\mu$ L に滅菌精製水を加え、全量を 25  $\mu$ L とした。全ての遺伝子について Smart Cycler<sup>®</sup> System ( Cepheid,

Sunnyvale, CA) を用いて以下の条件で PCR 反応を行い、蛍光を real time で検出することにより定量を行った。(1) 95°Cで30秒を1サイクル(2) 94°Cで4秒、64°Cで20秒を45サイクル。本章で使用したヒトCYPプライマーをTable 2示す。予備検討の結果より、本章で使用したヒトCYPプライマーはマウスCypと交差反応を示さないことを確認した。

Table 2. Sequence of the primers used in the present study.

Primer	Sequence
CYP1A1 RT-S	5'-ATGACCAGAAGCTATGGGTC-3'
CYP1A1 RT-AS	5'-GCACGCTGAATTCCACCC-3'
CYP1A2 RT-S	5'-GCTTCTACATCCCCAAGAAAT-3'
CYP1A2 RT-AS	5'-TCCCCTTGGCCAGGACT-3'
CYP2A6 RT-S	5'-AGCAACAGGCCTTTCAGTT-3'
CYP2A6 RT-AS	5'-CCCAATGAAGAGGTTCAAC-3'
CYP2C8 RT-S <sup>a</sup>	5'-AGATCAGAATTTTCTCACCC-3'
CYP2C8 RT-AS <sup>a</sup>	5'-AACTTCGTGTAAGAGCAACA-3'
CYP2C9 RT-S	5'-CAGATCTGCAATAATTTTCTC-3'
CYP2C9 RT-AS	5'-CTTTCAATAGTAAATTCAGATG-3'
CYP2C18 RT-S <sup>a</sup>	5'-ACCTCAGGATTCTGAGCTCT-3'
CYP2C18 RT-AS <sup>a</sup>	5'-TTGAAGAAGTCCTTGCGTGTC-3'
CYP2C19 RT-S <sup>a</sup>	5'-ATTGAATGAAAACATCAGGATTG-3'
CYP2C19 RT-AS <sup>a</sup>	5'-GAGGGTTGTTGATGTCCATC-3'
CYP2D6 RT-S	5'-GGTGTGACCCATATGACATC-3'
CYP2D6 RT-AS	5'-CTCCCCGAGGCATGCACG-3'
CYP3A4 RT-S	5'-CCAAGCTATGCTCTTCACCG-3'
CYP3A4 RT-AS	5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3'
CYP3A5 RT-S	5'-AGTGTCTTTTCTTCACTTTA-3'
CYP3A5 RT-AS	5'-TTCAACATCTTTCTTGCAAGT-3'

S: Sense primer, AS: Anti-sense primer.

<sup>a</sup>From Klose et al. (1999)

#### B-4. 肝ミクロソームの調製

採取した肝に、肝重量の3倍容のホモジナイズ緩衝液を加え、ポリトロンにより細切後、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズした。ホモジネートを9,000 g、4°Cで20分間遠心分離後、上清をさらに105,000 g、4°Cで90分間遠心分離した。沈澱物にホモジナイズ緩衝液を加えてホモジナイズ後、105,000 g、4°Cで60分間遠心分離した。得られた沈澱物をTGE緩衝液に懸濁し、使用時まで-80°Cで保存した。タンパク定量はウシ血清アルブミンを標準タンパクとして、常法に従い行った (Lowry et al., 1951)。なお、ドナーD2について肝を入手することができなかつたため、ミクロソームを調製できなかつた。

#### B-5. SDS-PAGEとウエスタンブロット分析によるヒトCYPタンパクの定量

Laemmli (1970) および Towbin ら (1979) の方法に修正を加え、以下の方法により測定を行った。肝ミクロソームは滅菌精製水で、CYPを発現したバキュロウイルス発現系ミクロソームは1 mg/mLの透析ヒト肝サイトゾルでそれぞれ希釈した。ヒト肝サイトゾルはIshikawaら (1998) の方法に従い、以下のように透析した。ダイヤライシスメンブラン8 (和光純

薬工業) を用い、約330倍量の1 mM 2-メルカプトエタノールを含む20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に4°Cで約20時間透析した。

サンプル10  $\mu$ Lに対して、サンプル処理液と2-メルカプトエタノールを32:5の割合で混合した溶液を10  $\mu$ L加えた後、100°Cで3分間煮沸し、厚さ1 mm、7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後、Immobilon膜 (Millipore, Billerica, MA) に電氣的に (10 V, 30分) 転写した。この際、濾紙、アクリルアミドゲル、Immobilon膜は転写用緩衝液に浸して使用した。転写後、Immobilon膜を3%スキムミルク、0.1% Tween 20を含むPBS溶液に浸してブロッキングを一晩行った。1次抗体としてウサギ抗ヒトCYP1A2抗体 (PBSで1,000倍希釈)、ウサギ抗ヒトCYP2A6抗体 (PBSで5,000倍希釈)、ウサギ抗ヒトCYP2C8抗体 (PBSで5,000倍希釈)、ウサギ抗ヒトCYP2C9抗体 (PBSで2,000倍希釈)、マウス抗ヒトCYP2D6抗体 (PBSで2,000倍希釈)、ウサギ抗ヒトCYP3A4抗体 (PBSで1,000倍希釈)、ウサギ抗ヒトCYP3A5抗体 (PBSで500倍希釈) を用いた。2次抗体としてCYP2D6はビオチン化抗マウスIgG抗体 (PBSで2,000倍希釈) を、その他の分子種にはビオチン化抗ウサギIgG抗体 (PBSで2,000倍希釈) を用い、3次抗体としてペルオキシ

ダーゼ標識アビジンビオチン複合体 (PBSで2,000倍希釈) を用いた。抗体はCYP2A6のみ1次抗体と30分、その他の分子種では1次、2次、3次抗体ともにそれぞれ室温で60分間反応させた。ブロッキング後、1次、2次抗体反応後はPBSで5分、3回洗浄し、3次抗体反応後はPBSで10分、3回洗浄し、非特異的に結合した抗体を除いた。発色は0.06%の3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩で行ない、GS-700デンシトメーター(Bio-Rad, Hercules, CA) にて定量した。

予備検討の結果より、各ヒト CYP 抗体は本章の実験条件ではマウス Cyp と交差反応を示さないことを確認した。各 CYP における肝ミクロソームのアプライ量は以下の通りである。CYP1A2 (20 µg)、CYP2A6 (20 µg)、CYP2C8 (20 µg)、CYP2C9 (5-10 µg)、CYP2D6 (10 µg)、CYP3A4 (5-10 µg)、CYP3A5 (20 µg)。

#### B-6. デキサメタゾン6-水酸化酵素活性の測定

デキサメタゾン6-水酸化酵素活性は、Gentileら (1996) およびTomlinsonら (1997) の方法に修正を加え以下のように測定した。最終濃度が100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、100 µM デキサメタゾン、0.2 mg/mL ミクロソームタンパクとなるように精製水を加えて全量を180 µLとした。

37°Cで2分間ブレインキュベートした後、NADPH生成系を20 µL添加することにより反応を開始した。37°Cで30分間インキュベートした後、酢酸エチルを1.5 mL加え激しく攪拌することにより反応を停止した。3 M NaCl および内部標準物質として5 ng/µL 6-水酸化クロルゾキサゾン10 µL加えた。650 gで10分間遠心分離し、有機溶媒層を採取し、窒素気流下蒸発乾固させた。残渣を移動層 200 µLに溶解し、100 µLをHPLCに注入した。

HPLC による分析には L7100 ポンプ(日立製作所, Tokyo, Japan)、L7200 オートサンプラー (日立製作所)、L7405 UV 検出器 (日立製作所)、Uni-3 ノイズベースクリーン (ユニオン, Gunma, Japan)、CTO-6A カラムオープン (島津製作所, Kyoto, Japan) を用いた。カラムは Mightysil RP8 (4.6 mm x 150 mm, 関東化学, Tokyo, Japan) を用い、移動相はアセトニトリル : 0.018%ギ酸 = 18 : 82 (v/v) とした。カラム温度は 35°C、流速は 1.0 mL/min とし、溶離液を UV 423 nm でモニターし、D-2000 インテグレータ (日立製作所) に出力した。

#### B-7. ジクロフェナク4'-水酸化酵素活性の測定

最終濃度が100 mM リン酸カリウ

ム緩衝液 (pH 7.4)、30  $\mu$ M ジクロフェナク、0.2 mg/mL ミクロソームタンパクとなるように精製水を加えて全量を180  $\mu$ Lとした。37°Cで2分間プレインキュベートした後、NADPH生成系を20  $\mu$ L添加することにより反応を開始した。37°Cで30分間インキュベートした後、氷冷したアセトニトリルを200  $\mu$ L添加することにより反応を停止した。内部標準物質として50  $\mu$ M クロルゾキサゾン5  $\mu$ Lを加えた後、6,500 gで5分間遠心分離を行い、上清100  $\mu$ LをHPLCに注入した。

HPLCによる分析にはL7100ポンプ、L7200オートサンプラー、L7405 UV検出器、CTO-6Aカラムオープンを用いた。カラムはMightysil RP18 (4.6 mm x 150 mm, 関東化学)を用い、移動相は22%アセトニトリル、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4)とした。カラム温度は35°C、流速は1.0 mL/minとし、溶離液をUV 282 nmでモニターし、D-2000インテグレータに出力した。

#### B-8. クマリン7-水酸化酵素活性の測定

クマリン7-水酸化酵素活性はYamazakiら (1999) の方法に修正を加え、以下の方法により測定した。最終濃度が100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、1  $\mu$ M クマリン、0.1

mg/mL ミクロソームタンパクとなるように精製水を加えて全量を180  $\mu$ Lとした。37°Cで1分間プレインキュベートした後、NADPH生成系を20  $\mu$ L添加することにより反応を開始した。37°Cで3分間インキュベートした後、氷冷した60% 過塩素酸を20  $\mu$ L添加することにより反応を停止した。6,500 gで5分間遠心分離を行い、上清20  $\mu$ LをHPLCに注入した。

HPLCによる分析にはLC-6Aポンプ (日立製作所)、AS-950オートサンプラー (日本分光, Tokyo, Japan)、FP-920II蛍光検出器 (日本分光)、CTO-6Aカラムオープンを用いた。カラムはCapcell Pak C18 (4.6 mm x 150 mm, 資生堂, Tokyo, Japan)を用い、移動相は20%アセトニトリル、20 mM 過塩素酸ナトリウムとした。カラム温度は35°C、流速は1.0 mL/minとし、溶離液をEx: 338 nm、Em: 485 nmでモニターし、D-2000インテグレータに出力した。

#### B-9. 肝ゲノムDNAの調製

ドナーD1、ドナーD1由来のキメラマウス C7、uPA (+/-)/SCID マウス、uPA (-/-)/SCID マウス、リファンピシンを投与した uPA (+/-)/SCID マウスの肝について以下の操作を行い、ゲノムDNAを調製した。肝切片約40 mgにTE (pH7.4)を加えガラスホモジナイ

ザーにてホモジナイズした。その後、別のチューブに移し、SE を 500  $\mu$ L 加え、さらに 1/10 量の 10 mg/mL アクチナーゼ E と 10 mg/mL RNase を 10  $\mu$ L 加え転倒攪拌した後、37°C で 2 時間インキュベートした。等量のフェノール溶液を加え、室温で 10 分間振盪後、20°C、600 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。次に等量のフェノール/クロロホルム溶液を加え、室温で 10 分間振盪後、20°C、600 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収し、再度同様の操作を行った。さらに 2 倍量のクロロホルム溶液を加え、室温で 10 分間振盪し、20°C、600 g で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。0.5% リニアールアクリルアミドを 10  $\mu$ L 加えた後、冷エタノールを 2.5 倍容加え、穏やかに転倒攪拌した。-80°C で 30 分間冷却した後、4°C、9,000 g にて 10 分間遠心分離を行った。沈殿を冷 70% エタノールで洗浄し、得られたゲノム DNA を TE に溶解した。4°C で一晩放置後、260 nm における吸光度を測定することにより定量した。

#### B -10. PCR-RFLP 法によるヒト *CYP2A6* 遺伝子多型の判定

*CYP2A6*\*4 の遺伝子判定は制限酵素 *Acc II* と *Eco81 I* を用いた PCR-RFLP 法により判定を行った。I-2-7 で調製

したゲノム DNA 約 2  $\mu$ g に 10x PCR 緩衝液 2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ M のセンスプライマー ( 2Aex7F: 5'-GGCCAAGATGCCCTACATG-3') と 10  $\mu$ M のアンチセンスプライマー ( 2A6UTR-AS1: 5'-TGTA AAAATGGGCATGAACGCCC-3') をそれぞれ 1  $\mu$ L、2.5 mM dNTPs 2.5  $\mu$ L、25 mM  $MgCl_2$  1.5  $\mu$ L、Taq DNA ポリメラーゼ 0.2  $\mu$ L (1.0 U) を加え、滅菌精製水にて全量を 25  $\mu$ L とし、以下の条件で PCR 反応を行った。

(1) 95°C で 1 分 (2) 95°C で 15 秒、60°C で 20 秒、72°C で 3 分を 35 サイクル (3) 72°C で 7 分。反応終了後、得られた PCR 産物 17.6  $\mu$ L に 10x M 緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM  $MgCl_2$ 、10 mM DTT、50 mM NaCl) 2  $\mu$ L と制限酵素 *Acc II* 0.2  $\mu$ L (1.0 U) と *Eco81 I* 0.2  $\mu$ L (1.0 U) を加え、全量を 20  $\mu$ L とし 37°C で一晩インキュベートした。反応後、2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い遺伝子断片の長さを確認した。Fig. 1 に泳動模式図を示した。2% アガロースゲルはアガロース 3.0 g、エチジウムブロマイド、0.5x TBE 150 mL を固化させたものとした。電気泳動用溶液には 0.5x TBE を用いた。なお、使用したプライマーは uPA (+/-)/SCID マウス、uPA (-/-)/SCID マウスのゲノム DNA には交差反応しないことを確

認した。

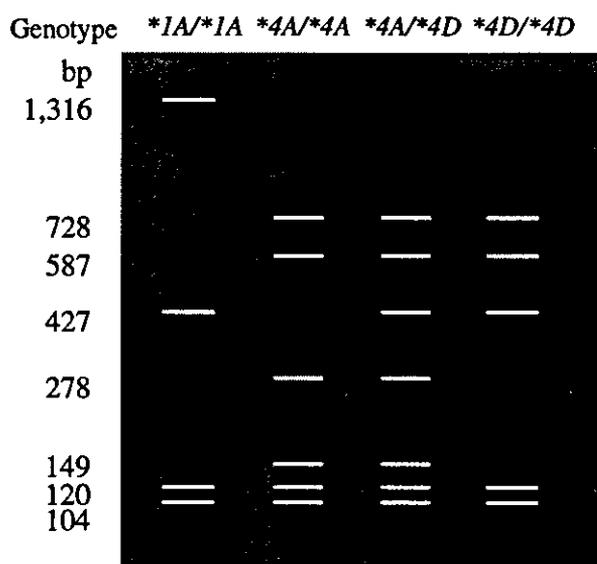


Fig. 1. Genotyping of *CYP2A6\*4A* and *CYP2A6\*4D* in genomic DNA by PCR-RFLP. Schematic PCR-RFLP patterns for different *CYP2A6* alleles of *CYP2A6\*1A* (wild type), *CYP2A6\*4A* and *CYP2A6\*4D*. The *CYP2A6\*1A* yields 1,316, 427, 120 and 104 bp fragments, *CYP2A6\*4A* yields 728, 587, 278, 149, 120 and 104 bp fragments and *CYP2A6\*4D* yields 728, 587, 427, 120 and 104 bp.

## C. 研究結果

### C-1. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト *CYP3A4* の発現

Fig. 2Aにヒト*CYP3A4* mRNA発現量の定量結果を示す。両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb値依存的なヒト*CYP3A4* mRNA発現量の増加が認められた。また、キメラマウスC5のmRNA発現量は、ドナーD1の約0.7倍であった。

Fig. 2Bにヒト*CYP3A4*タンパク発現量の定量結果を示す。両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb値依存的なヒト*CYP3A4*タンパク発現量の増加が

認められた。ドナーD1由来のキメラマウスではC3から、ドナーD2由来のキメラマウスではC13からヒト*CYP3A4*タンパクの発現が認められた。キメラマウスC5のタンパク発現量は、ドナーD1の約1.5倍であった。

Fig. 2Cにデキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の結果を示す。両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb値依存的なデキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の増加が認められた。キメラマウスC5 (7.5 pmol/mg protein/min) の活性値は、ドナーD1 (12.5 pmol/mg protein/min) の約0.6倍であった。なお、HLMの活性値 (32.6 pmol/mg