

protein/min) は uPA (+/-)/SCID マウス (6.2 pmol/mg protein/min) や uPA (-

-)/SCID マウス (7.2 pmol/mg protein/min) と比べて約 5 倍であった。

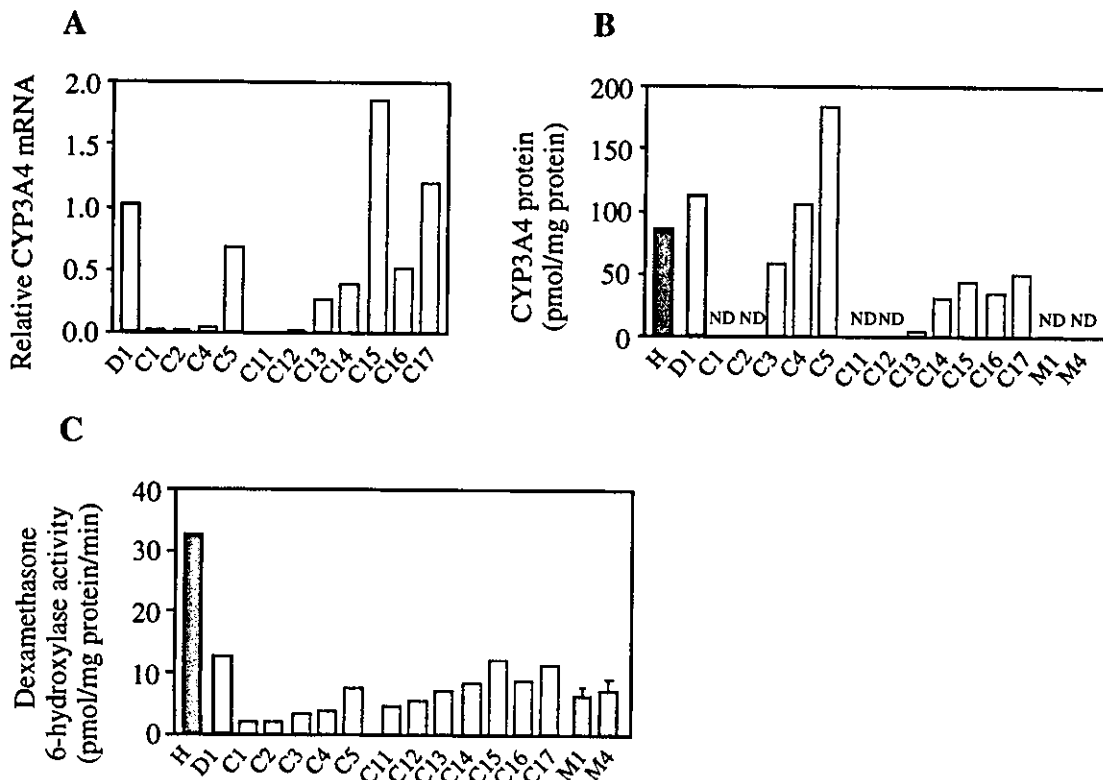


Fig. 2. Human CYP3A4 expression in chimeric mice. The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A), protein (B) and the dexamethasone 6-hydroxylase activity catalyzed by CYP3A4 (C) were determined as described in Materials and Methods. The concentration of dexamethasone was 100  $\mu$ M. The columns of M1 and M4 represent the mean  $\pm$  SD (n=3). H: Pooled human liver microsomes from Gentest, M1: uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M4: uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes, ND: Not detected.

### C-2. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP2C9 の発現

Fig. 3A にヒト CYP2C9 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 値依存性なヒト CYP2C9 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 1.1 倍であった。

Fig. 3B にヒト CYP2C9 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 値依存性なヒト CYP2C9 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 C2 から、ドナーD2 由来のキメラマウスでは C12 からヒト CYP2C9 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 1.1 倍であった。

Fig. 3C にジクロフェナク 4'-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 値依存的なジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の増加が認められた。キメラマウス C5 (1.73 nmol/mg protein/min)

の活性値はドナーD1 (0.74 nmol/mg protein/min) の約 2.3 倍であった。なお、HLM の活性値 (1.80 nmol/mg protein/min) は uPA (+-)/SCID マウス (0.09 nmol/mg protein/min) や uPA (-)/SCID マウス (0.09 nmol/mg protein/min) と比べて約 20 倍であった。

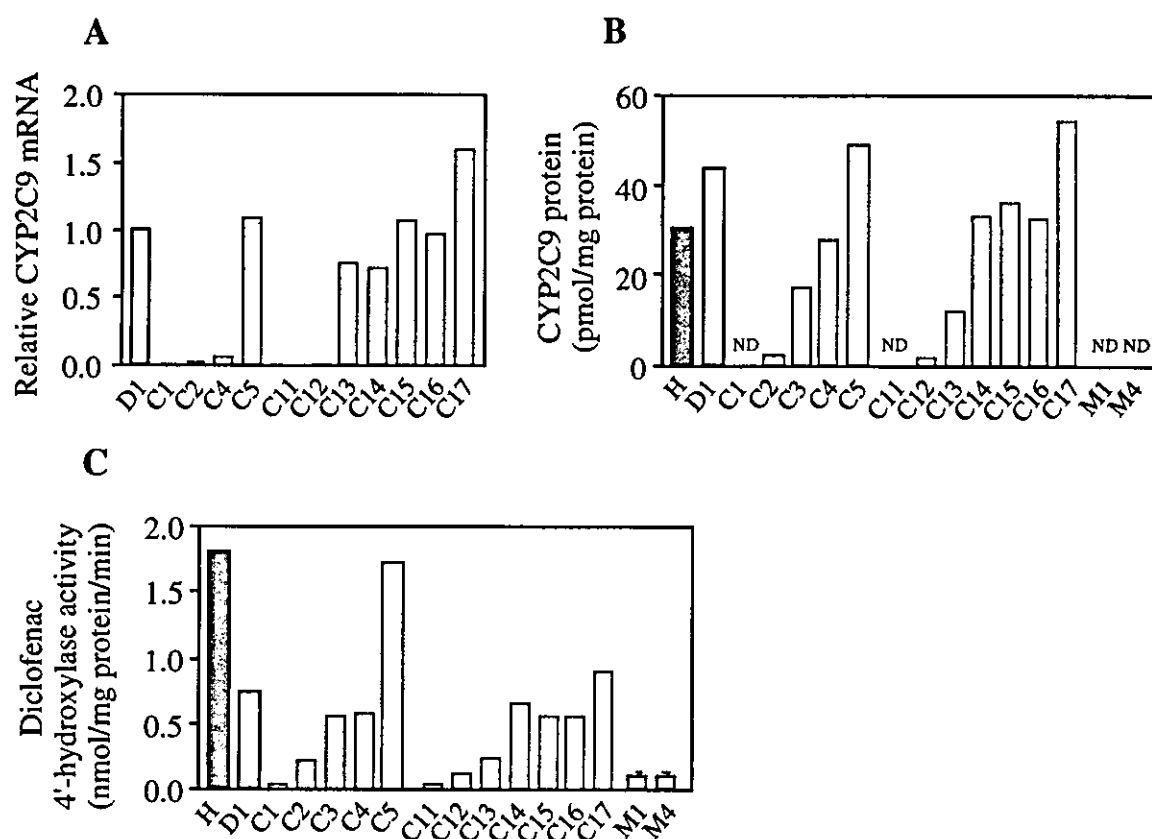


Fig. 3. Human CYP2C9 expression in chimeric mice. The expression levels of human CYP2C9 mRNA (A), protein (B) and the diclofenac 4'-hydroxylase activity catalyzed by CYP2C9 (C) were determined as described in Materials and Methods. The concentration of diclofenac was 30  $\mu$ M. The columns of M1 and M4 represent the mean  $\pm$  SD (n=3). H: Pooled human liver microsomes from Gentest, M1: uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4: uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, ND: Not detected.

C-3. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP2A6 の発現

Fig. 4AにヒトCYP2A6 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CYP2A6 mRNA発現量の増加が認められたが、ドナーD1およびドナーD1由来のキメラマウスのmRNA発現量は、ドナーD2由来のキメラマウスに比べ著しく低かった。

Fig. 4BにヒトCYP2A6タンパク発現量の定量結果を示す。ドナーD2由来のキメラマウスでは、hAlb値依存的なヒトCYP2A6タンパク発現量の増加が認められたが、ドナーD1およびドナーD1由来のキメラマウスではバンドが認められなかった。ドナーD2由来のキメラマウスではC14からヒトCYP2A6タンパクの発現が認められた。

Fig. 4Cにクマリン7-水酸化酵素活性の結果を示す。ドナーD1およびドナーD1由来のキメラマウスでは活性はほとんど認められなかった。これに対し、ドナーD2由来のキメラマウスでは、hAlb値依存的なクマリン7-水酸化酵素活性の増加が認められた。なお、HLMの活性値(305.4 pmol/mg protein/min)はuPA (+/-)SCIDマウス(15.1 pmol/mg protein/min)やuPA (-/-)SCIDマウス(20.2 pmol/mg protein/min)と比べて約15倍であった。

ドナーD1およびドナーD1から作

製したキメラマウスC7とともに、遺伝子型はCYP2A6\*4A/CYP2A6\*4Aであった。

#### C-4. ヒトCYP1A1の発現

Fig. 5AにヒトCYP1A1 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CYP1A1 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2.0倍であった。

#### C-5. ヒトCYP1A2の発現

ヒトCYP1A2について、Fig. 5BにmRNA発現量の、Fig. 5Cに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CYP1A2 mRNA発現量およびタンパク発現量の増加が認められた。また、ヒトCYP1A2タンパクは、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C12から発現が認められ、キメラマウスC5のmRNAおよびタンパク発現量はドナーD1のそれぞれ約1.4倍、約1.3倍であった。

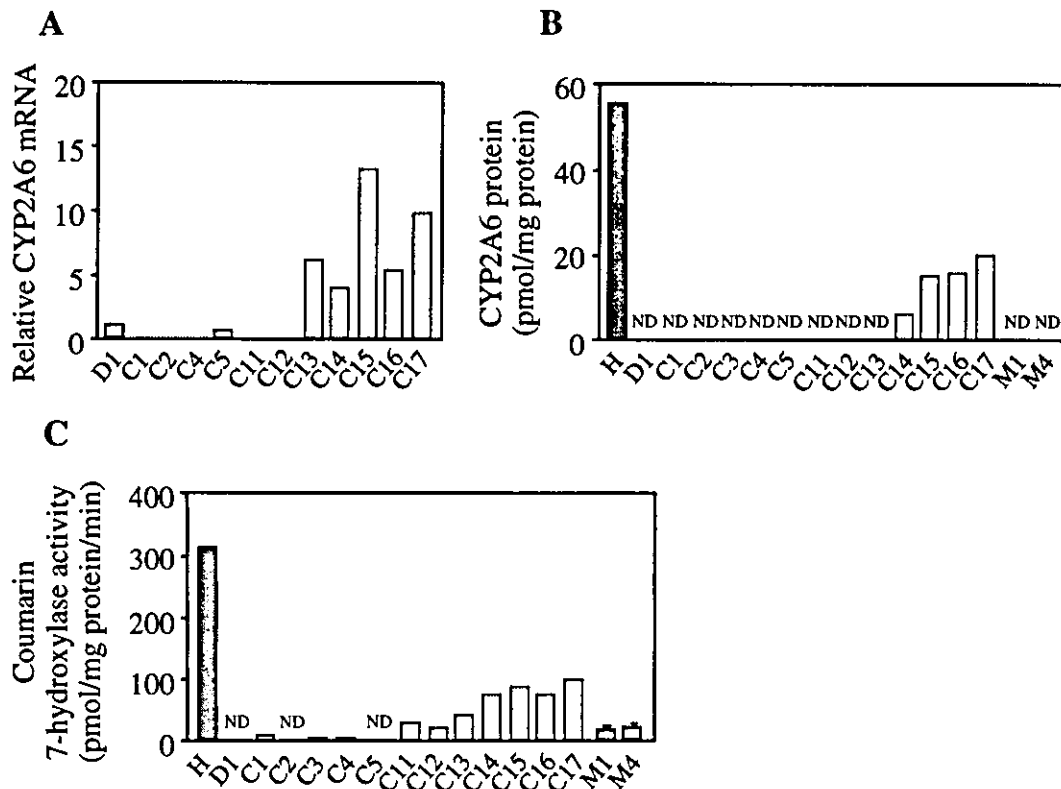


Fig. 4. Human CYP2A6 expression in chimeric mice. The expression levels of human CYP2A6 mRNA (A), protein (B) and the coumarin 7-hydroxylase activity catalyzed by CYP2A6 (C) were determined as described in Materials and Methods. The concentration of coumarin was 1  $\mu$ M. The columns of M1 and M4 represent the mean  $\pm$  SD (n=3). H: Pooled human liver microsomes from Gentest, M1: uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4: uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, ND: Not detected.

#### C-6. ヒト CYP2C8 の発現

ヒト CYP2C8 について、Fig. 6A に mRNA 発現量の、Fig. 6B に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 CYP2C8 mRNA 発現量およびタンパク発現量の増加が認められた。また、ヒト CYP2C8 タンパクは、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 C12 から発現が認められ、キメラマウス C5

の mRNA およびタンパク発現量はドナーD1 のそれぞれ約 0.8 倍、約 1.1 倍であった。

#### C-7. ヒト CYP2C18 の発現

Fig. 6C にヒト CYP2C18 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーD2 由来のキメラマウス C13 の発現量が高いが、両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb 値依存的なヒト CYP2C18 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 1.1 倍であった。

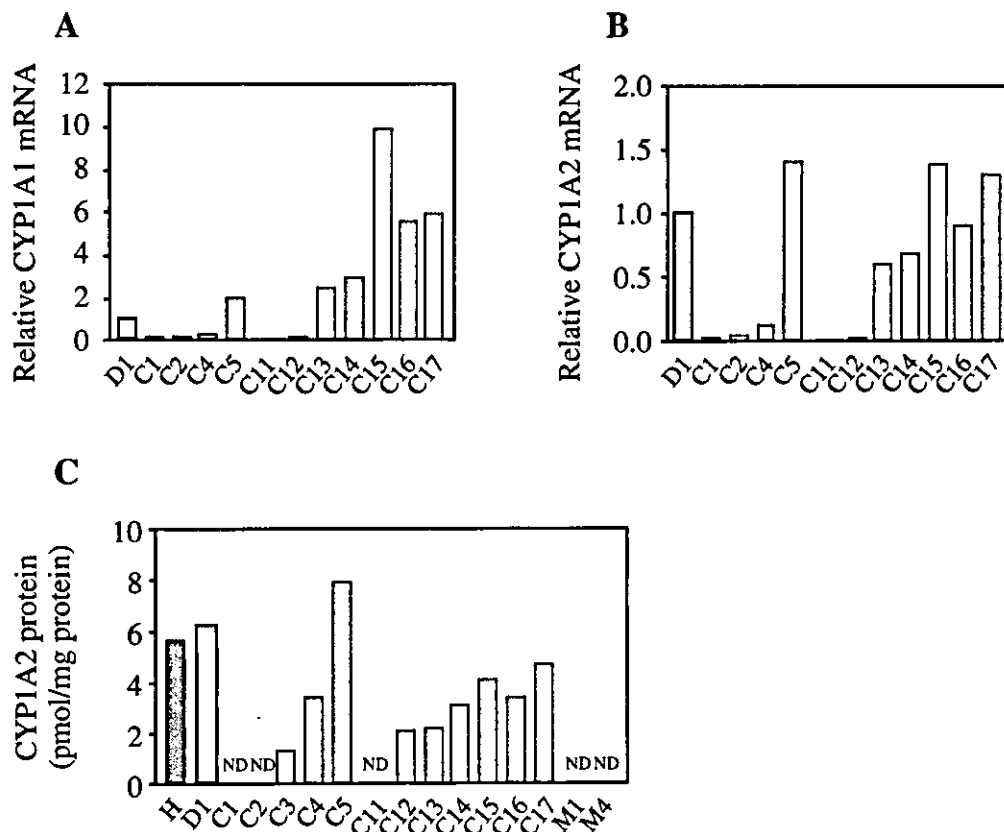


Fig. 5. Human CYP1A1 and CYP1A2 expression in chimeric mice. The expression levels of human CYP1A1 and CYP1A2 mRNA (A, B) and CYP1A2 protein (C) were determined as described in Materials and Methods. H: Pooled human liver microsomes from Gentest, M1: uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4: uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, ND: Not detected.

### C-8. ヒト CYP2C19 の発現

Fig. 6D にヒト CYP2C19 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーD2 由来のキメラマウス C13 の発現量が高いが、両ドナー由来のキメラマ

ウスともに、hAlb 値依存的なヒト CYP2C19 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 0.4 倍であった。

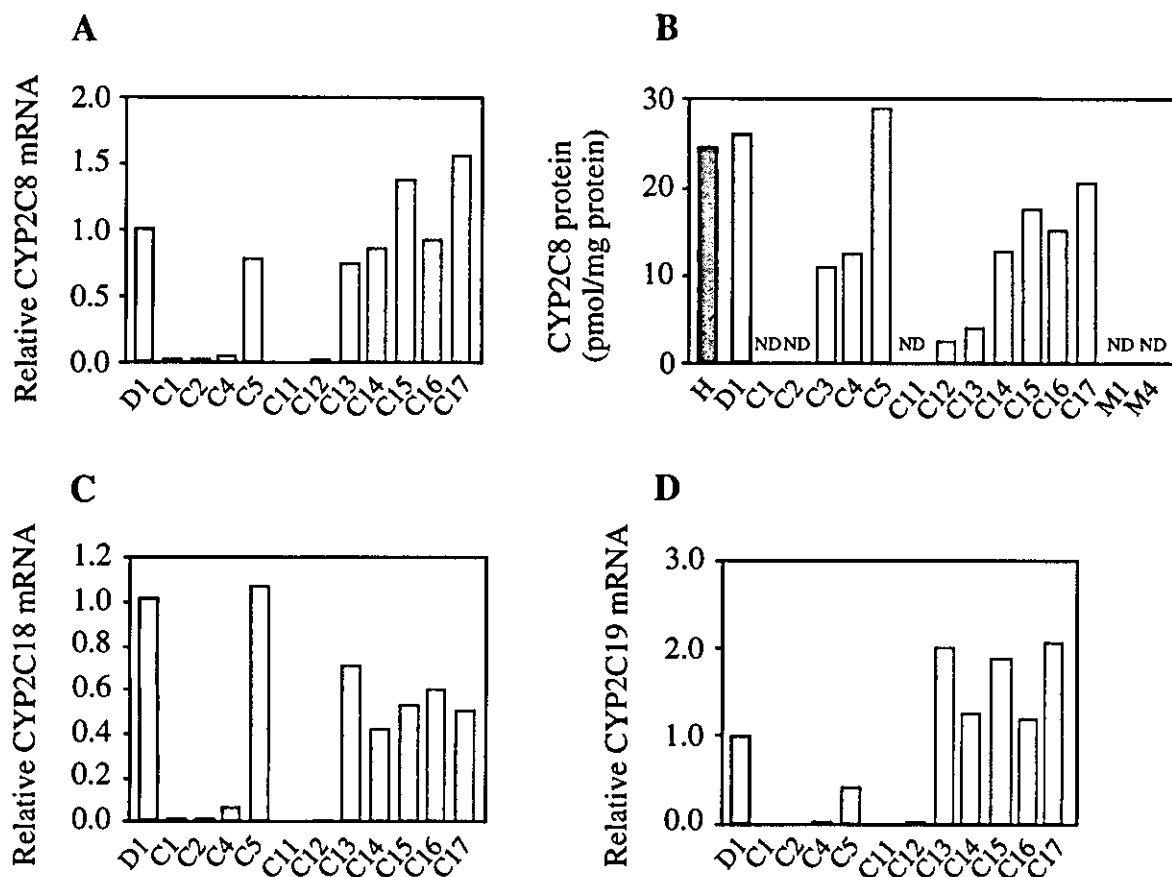


Fig. 6. Human CYP2C8, CYP2C18 and CYP2C19 expression in chimeric mice. The expression levels of human CYP2C8, CYP2C18 and CYP2C19 mRNA (A, C, D) and CYP2C8 protein (B) were determined as described in Materials and Methods. H: Pooled human liver microsomes from Gentest, M1: uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M4: uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes, ND: Not detected.

#### C-9. ヒト CYP2D6 の発現

ヒト CYP2D6 について、Fig. 7A に mRNA 発現量の、Fig. 7B に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 CYP2D6 mRNA 発現量およびタンパク発現量の増加が認められた。また、ヒト CYP2D6 タンパクは、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 C12 から

発現が認められ、キメラマウス C5 の mRNA およびタンパク発現量はドナーD1 のそれぞれ約 0.5 倍、約 1.1 倍であった。

#### C-10. ヒト CYP3A5 の発現

ヒト CYP3A5 について、Fig. 7C に mRNA 発現量の、Fig. 7D に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 CYP3A5 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 1.2 倍であった。

両ドナー由来のキメラマウスともにヒト CYP3A5 タンパク発現量が

低く、ドナーD1 は HLM の約 0.2 倍であった。キメラマウス C5 はドナーD1 の約 1.0 倍であった。

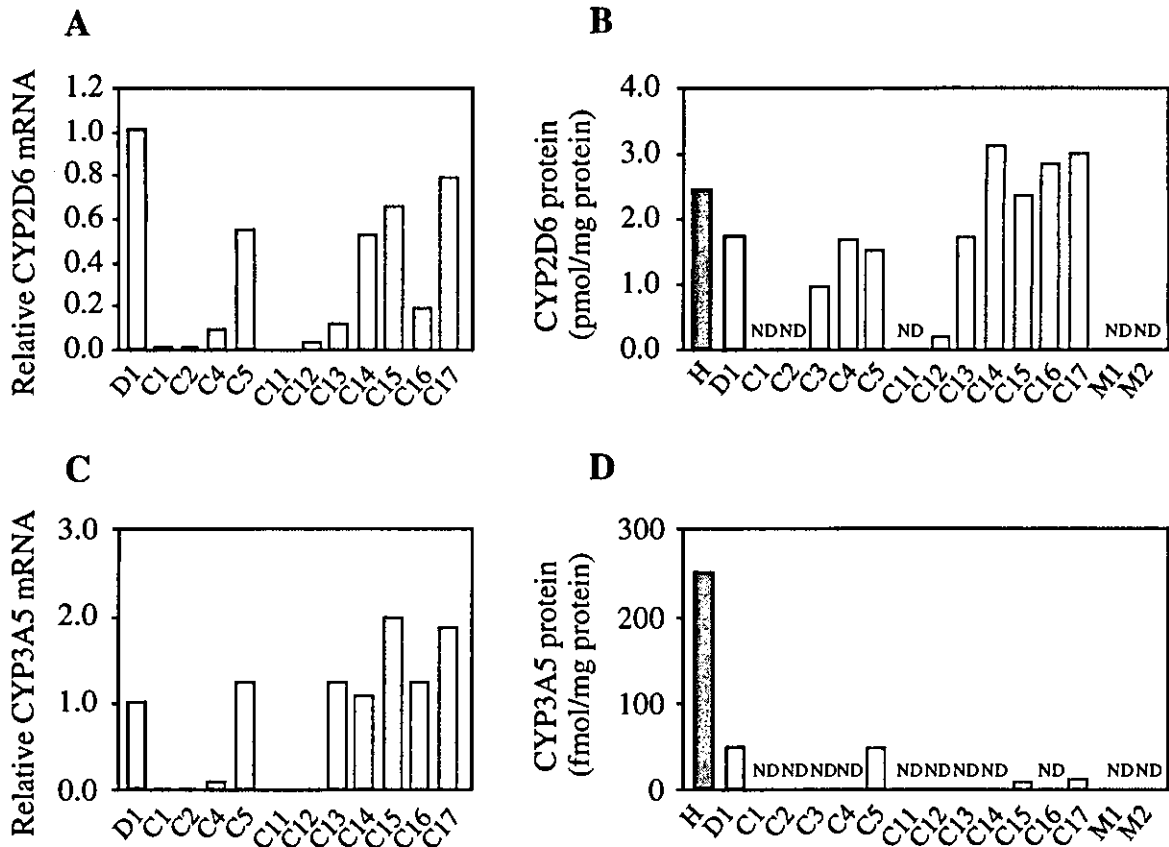


Fig. 7. Human CYP2D6 and CYP3A5 expression in chimeric mice.

The expression levels of human CYP2D6 and CYP3A5 mRNA (A, C) and protein (B, D) were determined as described in Materials and Methods.

H: Pooled human liver microsomes from Gentest, M1: uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4: uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, ND: Not detected.

#### D. 考察

CYPはヒトにおいて生体内基質および生体外異物の代謝に関わるヘムタンパクである (Shimada et al., 1994; Li et al., 1995; Nelson, 2002)。現在までに、*CYP1B1*、*CYP3A4*、*CYP3A7*などのヒトCYP遺伝子を発現させたト

ランスジェニックマウスモデルが作製されている (Li et al., 1996; Corchero et al., 2001; Hwang et al., 2001; Imaoka et al., 2001; Morgan et al., 2002; Robertson et al., 2003; Zhang et al., 2003)。これらのトランスジェニックマウスは通常、ヒトCYP一分子種の

み発現しており、また、宿主であるマウスのCypは活性を有していると考えられる。従って、CYP遺伝子の転写調節や毒性発現メカニズムの検討など、これらのトランスジェニックマウスの薬物代謝実験における使用は限られているのが現状である。しかし、ヒト肝細胞キメラマウスの肝はヒト肝細胞に置換されているため、ヒトCYPが発現しており、かつ、マウスCypの発現は低く抑えられていると予想される。そこで本章では代表的な薬物代謝酵素であるCYPの、ヒト肝細胞キメラマウスにおける発現とその機能を明らかにすることを目的にmRNA、タンパク、酵素活性レベルでの検討を行った。その結果、ドナーD1およびドナーD2由来のキメラマウスの肝において、ヒトCYP mRNAが発現しており、またウエスタンブロット分析の結果からCYP3A4、CYP2C9、CYP1A2、CYP2D6などの主要なヒトCYPタンパクが発現していることを明らかにした。また、全分子種のmRNA発現量、タンパク発現量ともにhAib値およびRI値依存的な増加が認められた。

キメラマウスの肝ミクロソームにおいて、CYP2C9が触媒するジクロフェナク4'-水酸化反応はマウス肝ミクロソームを用いた場合にはヒトの約1/20であったため、ヒトに特異的な反

応であると考えられる。実際に、Mankowskiら（2000）によると、ジクロフェナク4'-水酸化酵素活性はヒトでは検出されたが、マウスでは検出できなかったと報告している。しかし、Bogaardsら（2000）はB6C3Fマウスの肝ミクロソームでは、 $K_m$ 値はヒトとほぼ同じであったが、 $V_{max}$ 値が約1/10から1/20であったと報告している。従って、本章で得られた結果とBogaardsらの報告（2000）は一致した。またヒトにおいてCYP3A4が触媒するデキサメタゾン6-水酸化反応について、ヒトでの主要代謝物は6-水酸化デキサメタゾンであるが、マウスにおいては6-hydroxy-9 $\alpha$ -fluoro-androsta-1,4-diene-11 $\beta$ -hydroxy-16 $\alpha$ -methyl-3,17-dioneであると報告されている（Tomlinson et al., 1997）。デキサメタゾン6-水酸化酵素反応は、マウスと比べヒトでは約5倍高い酵素活性を示したが、本章で使用したドナーおよびキメラマウスの活性値がHLMと比較して低かったため、ヒトとマウスの差が顕著にあらわれなかったと考えられる。また、ヒトにおいてCYP2A6が触媒するクマリン7-水酸化酵素活性は、雄性マウスと比べてヒト男性で $K_m$ 値は近似しているが、 $V_{max}$ 値は約25倍であることが報告されており（Bogaards et al., 1997）、本章の結果と矛盾はないと考えられる。



これより、ジクロフェナク4'-水酸化酵素活性とクマリン7-水酸化酵素活性の測定は、キメラマウスにおけるヒトCYPの発現をより明確に示す指標であると考えられる。ヒト肝細胞キメラマウスの肝ミクロソームを用いてこれらの酵素活性を検討したところ、高いhAlb値を示すキメラマウスでドナーと同程度の酵素活性が認められたことから、キメラマウスの肝に発現しているCYPは、ヒトのCYPと同等の薬物代謝能を有することが明らかになった。CYP2A6、CYP2C9およびCYP3A4以外の分子種については、ヒト特異的な酵素活性を見つけることができなかった。従って、これらのCYP分子種に関しても、ヒト特異的な酵素活性をさらに検討する必要があると考えられる。しかし、CYP2A6、CYP2C9およびCYP3A4と同様、mRNAとタンパクの発現が認められているため、ヒトと同じ機能を有していると考えられる。

本章の実験でウエスタンブロット分析より求めたキメラマウス肝のCYPタンパク発現量は、CYP2A6およびCYP3A5以外はHLMと顕著な差は認められなかった。しかし、キメラマウスの酵素活性はHLMと比較して、全てにおいて低かった。この原因は不明であるが、使用したドナーの年齢が影響しているのかもしれない。

キメラマウスはドナーのCYP機能を反映すると予測される。本章で使用したドナーは12才および9ヶ月の男性である。これに対し、HLMのドナーは成人であるため、キメラマウスのCYPの活性がHLMと比べて低い可能性が示唆される。従って、今後さらに成人のヒト肝細胞を用いて作製したキメラマウスにおける薬物代謝能を検討する必要があると考えられる。

また、hAlb 値が 0 mg/mL であるキメラマウス C1 や C11 について、一部の酵素活性が検出された。しかし、uPA (++)/SCID マウスは肝不全を呈し、長期間生存することは不可能である。本章で用いたキメラマウスは 11-14 週齢であるため、C1 や C11 はキメラマウス肝がヒト肝細胞に置換されたというよりも、マウス肝細胞が再生し、肝としての機能を果たすことができたため、生存できたと推測される。従って、タンパクの発現が認められていないことも併せて、これらのキメラマウスで検出された酵素活性はマウス由来と考えて妥当であろう。

CYP には多くの変異型が報告されており、この変異型がヒトにおける薬物動態の個体差を惹起する要因と考えられている。これまで変異型が及ぼす影響について、ヒト CYP 発現系や遺伝子多型が判定されてい

る単一ドナー由来の肝ミクロソームなどの *in vitro* 実験系を用いて検討されてきた。従って、ヒト肝細胞キメラマウスがドナーと同一の遺伝子型を有するか検討することは重要である。I-3-4 の結果より、ドナーD1 およびドナーD1 由来のキメラマウスの肝ミクロソームでは、CYP2A6 タンパクの発現が認められなかった。しかしドナーD2 由来のキメラマウスからは CYP2A6 タンパクが検出できた。同様に、ヒト CYP2A6 の指標活性であるクマリン 7-水酸化活性についても、ドナーD1 およびドナーD1 由来のキメラマウスでは、クマリン 7-水酸化活性は検出できなかったが、ドナーD2 由来のキメラマウスでは本酵素活性が認められた。現在まで、CYP2A6 に関して多くの変異型が報告されている (Nakajima et al., 2002)。このうち CYP2A6\*4 は CYP2A6 遺伝子を全欠損しているため、CYP2A6\*4 のホモ接合体を有するヒトは CYP2A6 タンパクを検出することができず、Poor Metabolizer としての表現系を示す (Nunoya et al., 1999; Oscarson et al., 1999)。遺伝子判定を行った結果、ドナーD1 およびドナーD1 由来のキメラマウスは CYP2A6\*4A のホモ接合体であった。従ってヒト肝細胞キメラマウスはドナーと同一の遺伝子

多型を有し、遺伝子型および表現型ともにドナーと同一であることが明らかになった

## E. 結論

本章ではヒト肝細胞キメラマウスにはヒト CYP が発現しており、ドナーと同程度の薬物代謝能を有することを明らかにした。また、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も明らかにした。

## 第 II 章 ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト CYP の誘導能に関する検討

### B. 研究方法

#### B-1. 薬物投与

リファンピシンは 50 mg/kg/day、3-MC は 20 mg/kg/day を 4 日間腹腔内投与し、最終投与 24 時間後に肝臓を摘出した。なお、リファンピシン投与はドナーD1 とドナーD2 由来のキメラマウスを用いたが、3-MC 投与にはドナーD2 由来のキメラマウスのみとした。

#### B-2. RT-PCR 法によるヒト CYP mRNA 発現量の定量

本章では Table 2 に示したプライマーに加え、ヒト GAPDH プライマー（センスプライマー：5'-CCAGGGCTGCTTTTAACTC-3'，アンチセンスプライマー：5'-GCTCCCCCCTGCAAATGA-3'）を用いた。予備検討の結果より、マウス GAPDH と交差反応を示さないことを確認した。

### B-3. 酵素活性測定条件等

各酵素活性の測定は前章に準じた。

## C. 研究結果

本章における誘導率は、同一ドナー由来の薬物未処置群で最も近似した hAlb 値を示したキメラマウスを対照として算出した。また、mRNA 発現量についてはヒト GAPDH mRNA で補正した。なお、データは示さないが、キメラマウスにおいてヒト GAPDH mRNA 発現量は hAlb 値依存的に増加しており、誘導薬の影響も認められなかった。

### C-1 リファンピシン投与によるヒト CYP への影響

#### C-1-1. ヒト CYP3A4 の誘導

Fig. 8A にヒト CYP3A4 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与により、mRNA 発現量はドナーD1 由来のキメラマウスで 15-27 倍、ドナーD2 由来のキメラマウスで 6-10 倍の顕著な増加が認められた。

Fig. 8B にヒト CYP3A4 タンパク発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与により、タンパク発現量はドナーD1 由来のキメラマウスで 2.5-3.4 倍、ドナーD2 由来のキメラマウスでは C13 の値が低かったため、C18 の見かけの誘導率が約 33 倍となったが、その他は約 10 倍であった。両ドナー由来のキメラマウスともに顕著な増加が認められた。

Fig. 8C にデキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の結果を示す。リファンピシン投与により、本酵素活性はドナーD1 由来のキメラマウスで 9.9-14.5 倍、ドナーD2 由来のキメラマウスで約 5 倍の顕著な増加が認められた。uPA (+-)/SCID マウス、および uPA (-)/SCID マウスではリファンピシン投与による活性値の上昇は認められなかった。

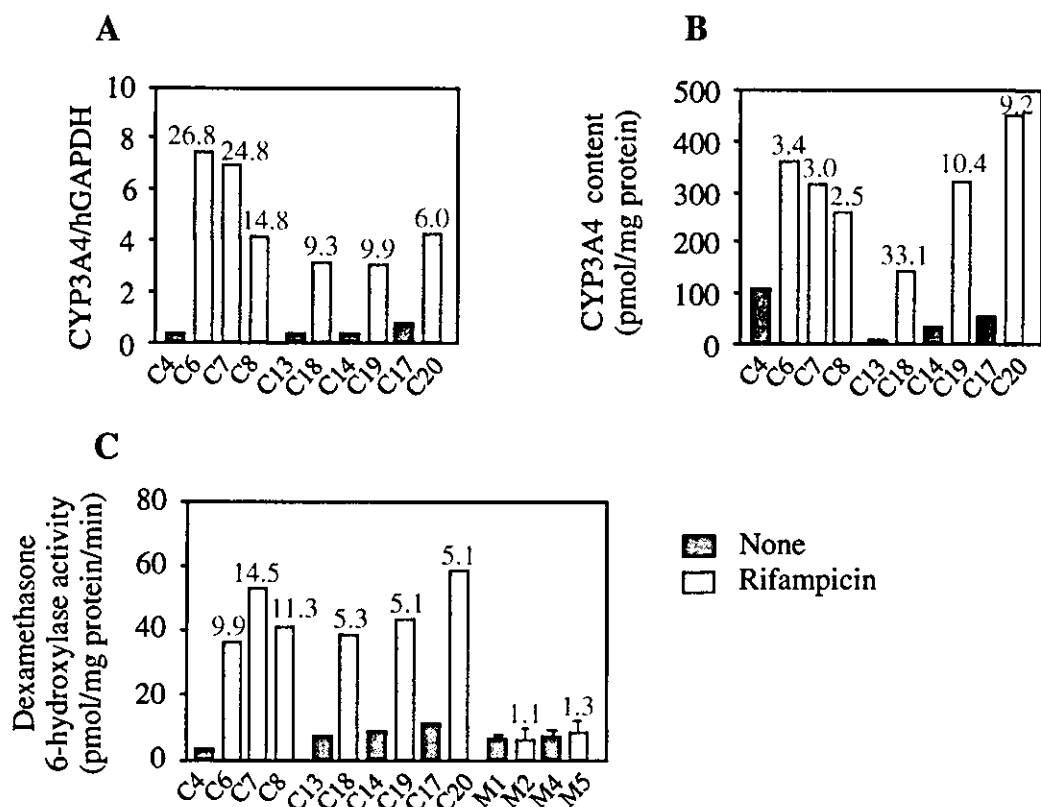


Fig. 8. Changes of human CYP3A4 expression in rifampicin-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A), protein (B) and the dexamethasone 6-hydroxylase activity (C) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of dexamethasone was 100  $\mu$ M. The columns of M1, M2, M4 and M5 represent the mean  $\pm$  SD (n=3).

M1: Non-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M2: Rifampicin-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4: Non-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, M5: Rifampicin-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes.

### C-1-2. ヒト CYP2C9 に及ぼす影響

Fig. 9AにヒトCYP2C9 mRNA発現量の定量結果を示す。ドナーD2由来のキメラマウスC19はC14と比較して4.6倍の増加を示したが、その他のキメラマウスでは1.0-2.1倍の増加であった。

Fig. 9BにヒトCYP2C9タンパク発現量の定量結果を示す。ドナーD2由来

のキメラマウスC18はC13と比較して3.4倍の増加を示したが、その他のキメラマウスでは1.0-1.6倍の増加であった。

Fig. 9Cにジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の結果を示す。リファンピシン投与によりドナーD1由来のキメラマウスで1.5-2.0倍、ドナーD2由来のキメラマウスでは0.6-2.4倍の増加であった。uPA (+-)/SCID

マウス、および uPA (+/-)/SCID マウスではリファンピシン投与による活

性値の上昇は認められなかった。

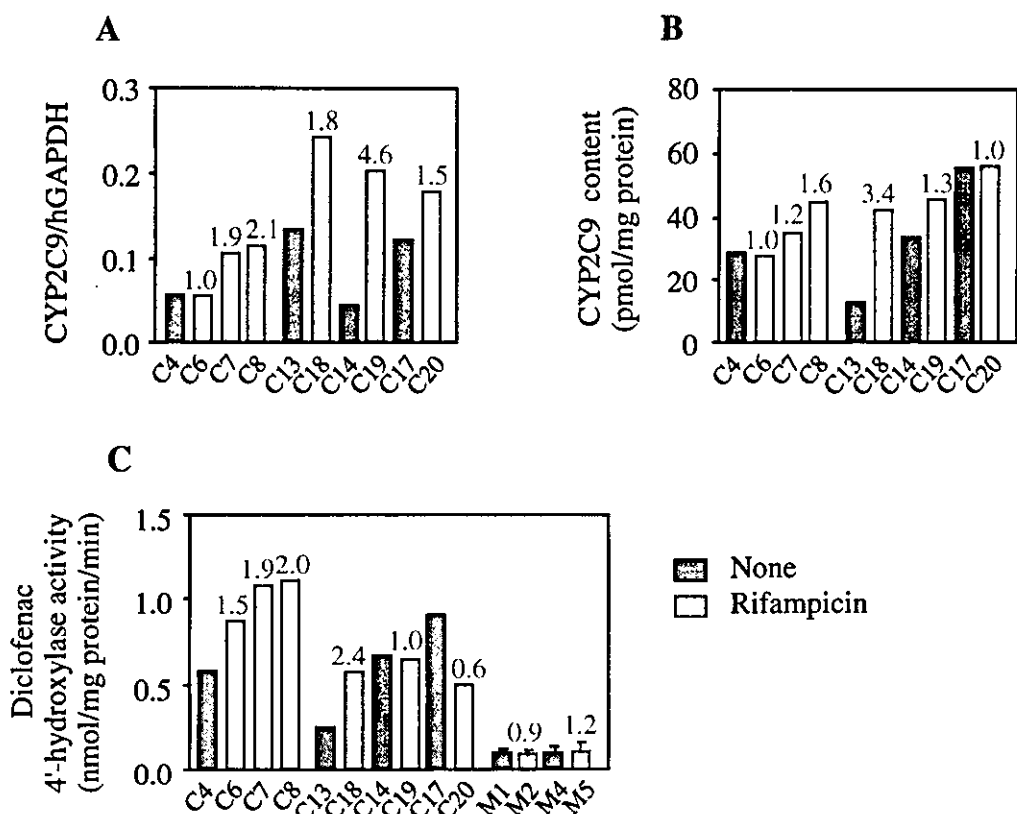


Fig. 9. Changes of human CYP2C9 expression in rifampicin-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP2C9 mRNA (A), protein (B) and the diclofenac 4'-hydroxylase activity (C) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of diclofenac was 30  $\mu$ M. The columns of M1, M2, M4 and M5 represent the mean  $\pm$  SD (n=3). M1: Non-treated uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M2: Rifampicin-treated uPA (+/-)/SCID mouse liver microsomes, M4: Non-treated uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes, M5: Rifampicin-treated uPA (-/-)/SCID mouse liver microsomes.

### C-1-3. ヒトCYP2A6に及ぼす影響

Fig. 10AにヒトCYP2A6 mRNA発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与によりドナーD2由来のキメラマウスで1.4-4.5倍増加した。

Fig. 10BにヒトCYP2A6タンパク発現量の結果を示す。リファンピシン投与によりドナーD2由来のキメラマ

ウスで3.2-3.7倍増加した。

Fig. 10Cにクマリン7-水酸化酵素活性の結果を示す。リファンピシン投与によりドナーD2由来のキメラマウスで1.9-2.9倍増加した。

I-3-3-4の結果より、ドナーD1およびドナーD1由来のキメラマウスは全欠損型であるCYP2A6\*4Aのホモ接合体であり、CYP2A6タンパクおよびク

マリン7-水酸化酵素活性を検出することができなかつたため、誘導率を

評価することはできなかつた。

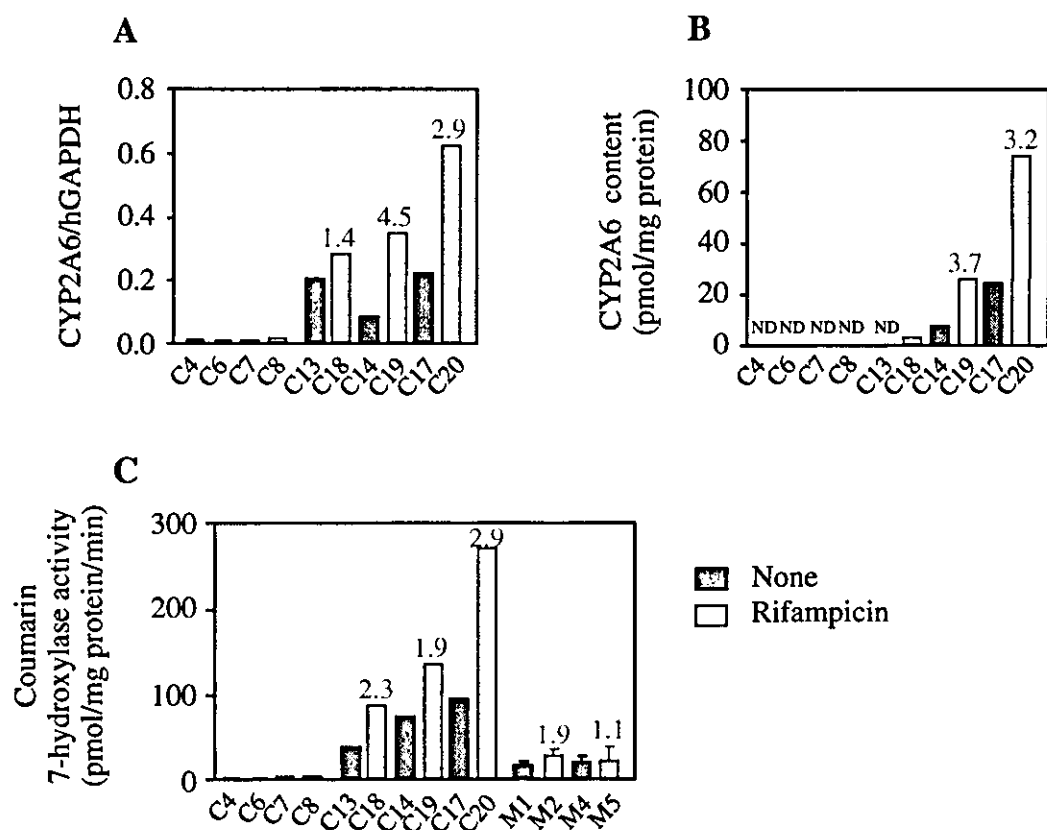


Fig. 10. Changes of human CYP2A6 expression in rifampicin-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP2A6 mRNA (A), protein (B) and the coumarin 7-hydroxylase activity (C) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of coumarin was 1  $\mu$ M. The columns of M1, M2, M4 and M5 represent the mean  $\pm$  SD (n=3). M1: Non-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M2: Rifampicin-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4: Non-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, M5: Rifampicin-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, ND: not detected.

#### C-1-4. その他のヒト CYP 分子種の発現に及ぼす影響

Fig. 11A にヒト CYP1A1 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、発現量に大きなばらつきが認められた。

Fig. 11B にヒト CYP1A2 mRNA 発現量、Fig. 11C にヒト CYP1A2 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、ばらつきは認められるが、リファンピシン投与群と対照群で顕著な差は認められなかつた。

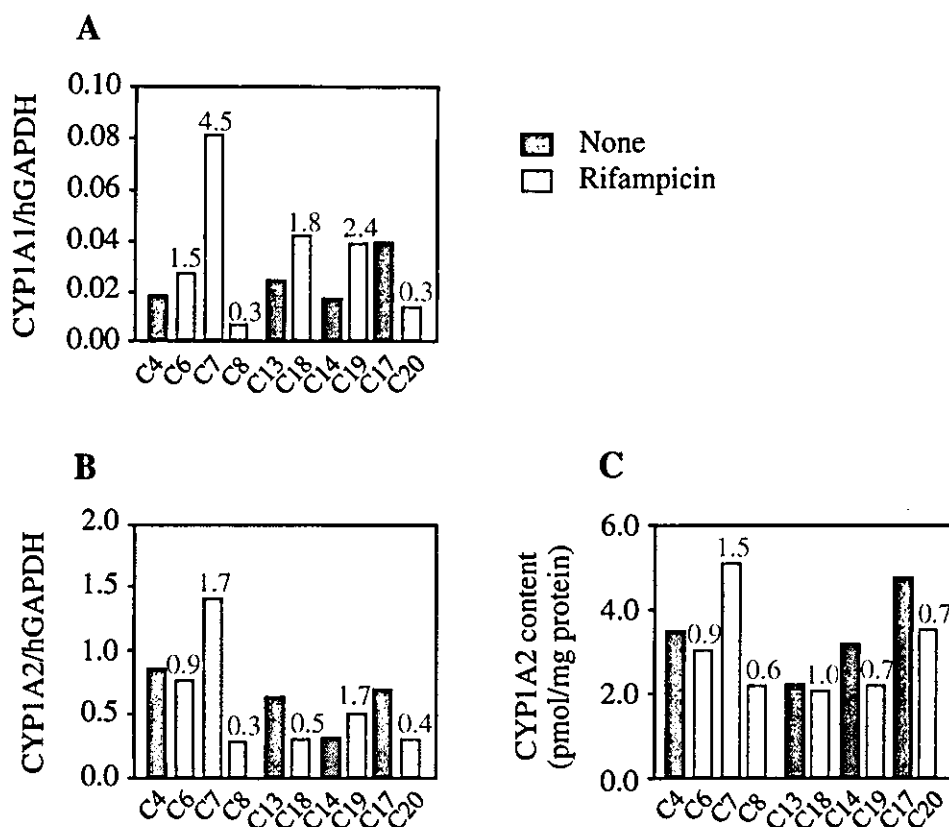


Fig. 11. Changes of human CYP1A1 and CYP1A2 expression in rifampicin-treated chimeric mice.

The expression levels of human CYP1A1 and CYP1A2 mRNA (A, B) and CYP1A2 protein (C) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents.

Fig. 12A にヒト CYP2C8 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与によりドナーD1 由来のキメラマウスで 3.3-3.7 倍、ドナーD2 由来のキメラマウスで 1.4-3.0 倍の増加が認められた。

Fig. 12B にヒト CYP2C8 タンパク発現量の結果を示す。リファンピシン投与によりドナーD1 由来のキメラマウスで 1.6-2.5 倍、ドナーD2 由来のキメラマウスで 1.7-6.0 倍の増加が認められた。

Fig. 12C にヒト CYP2C18 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与によりドナーD1 由来のキメラマウスで 1.8-4.0 倍、ドナーD2 由来のキメラマウスで 1.6-3.3 倍の増加が認められた。

Fig. 12D にヒト CYP2C19 mRNA 発現量の定量結果を示す。リファンピシン投与によりドナーD1 由来のキメラマウスで 1.5-4.3 倍、ドナーD2 由来のキメラマウスで 1.4-4.0 倍の増加が認められた。

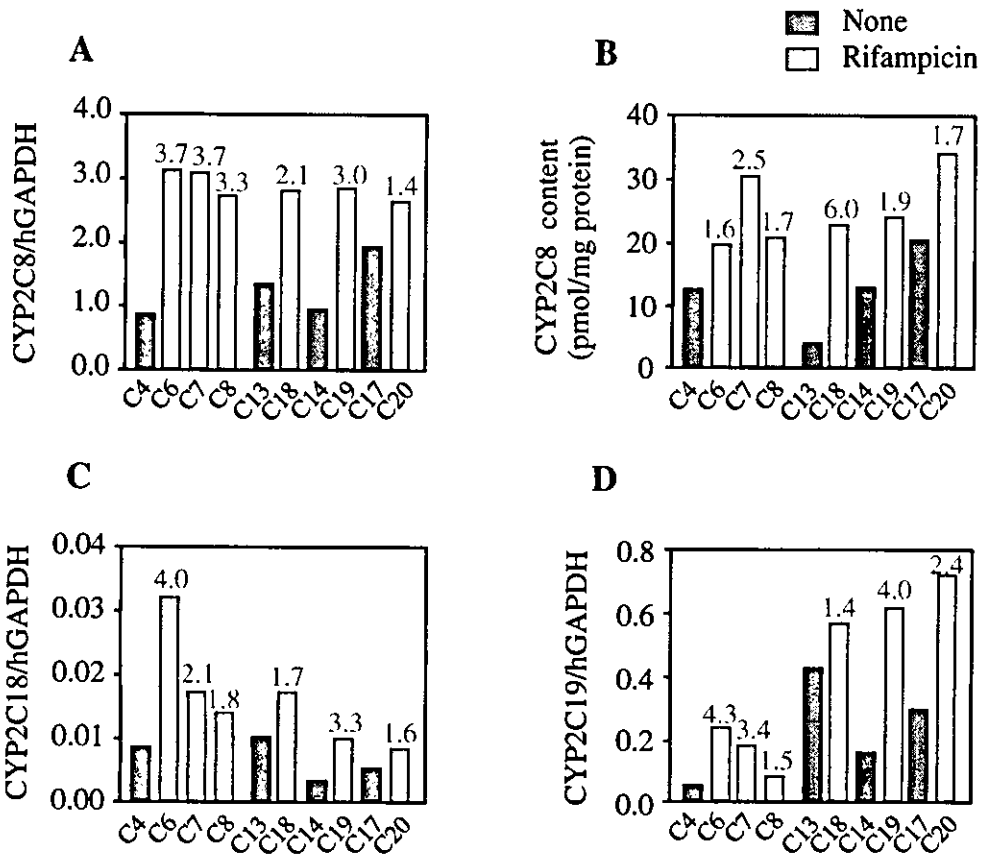


Fig. 12. Changes of human CYP2C8, CYP2C18 and CYP2C19 expression in rifampicin-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP2C8, CYP2C18 and CYP2C19 mRNA (A, C, D) and CYP2C8 protein (B) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents.

Fig. 13A にヒト CYP2D6 mRNA 発現量、Fig. 13B にヒト CYP2D6 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、ばらつきは認められるが、リファンピシン投与群と対照群で顕著な差は認められなかった。

Fig. 13C にヒト CYP3A5 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、リファ

ンピシン投与群と対照群で差は認められなかった。

Fig. 13D にヒト CYP3A5 タンパク発現量の結果を示す。ドナーD1 由来のキメラマウスは、本章での実験条件下では、タンパクを検出することはできなかった。ドナーD2 由来のキメラマウスでは C20 が C17 に比べ約 3.0 倍の増加が認められた。



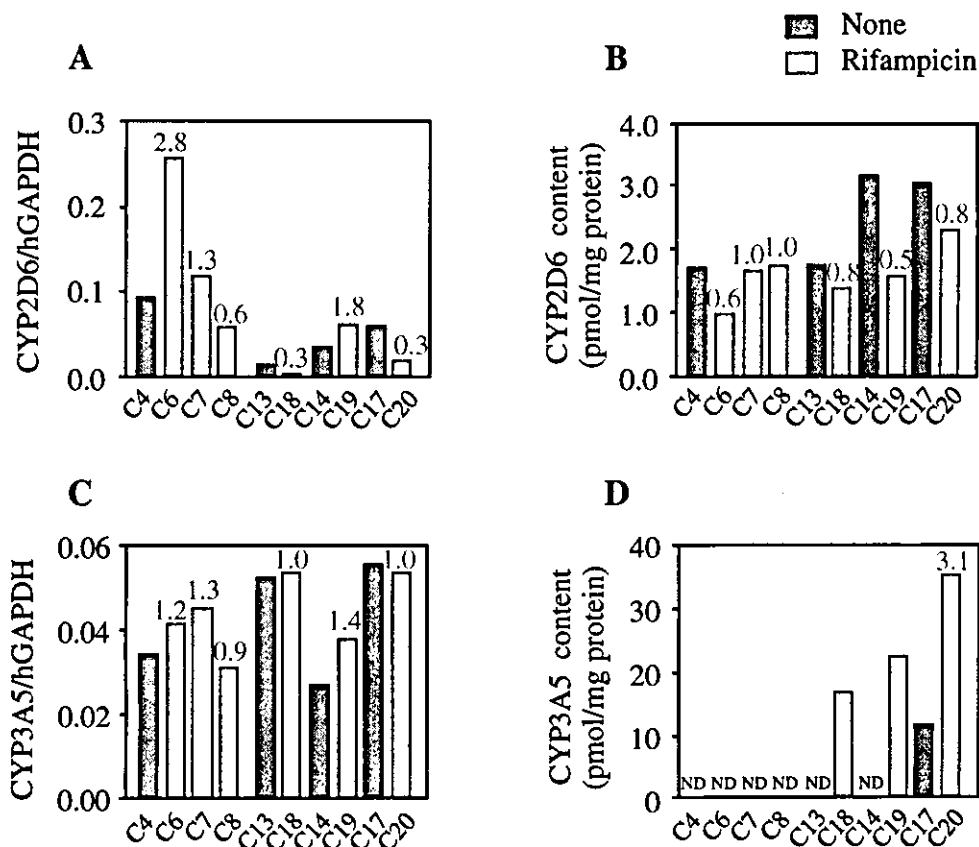


Fig. 13. Changes of human CYP2D6 and CYP3A5 expression in rifampicin-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP2D6 and CYP3A5 mRNA (A, C) and protein (B, D) in rifampicin-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. ND: not detected.

## C-2 3-MC 投与によるヒト CYP への影響

### C-2-1. ヒト CYP1A2 の誘導

Fig. 14A にヒト CYP1A2 mRNA 発現量の定量結果を示す。3-MC 投

与により、mRNA 発現量は 2.1-8.2 倍の増加が認められた。

Fig. 14B にヒト CYP1A2 タンパク 発現量の定量結果を示す。3-MC 投与により、タンパク発現量は 4.0-9.7 倍の増加が認められた。

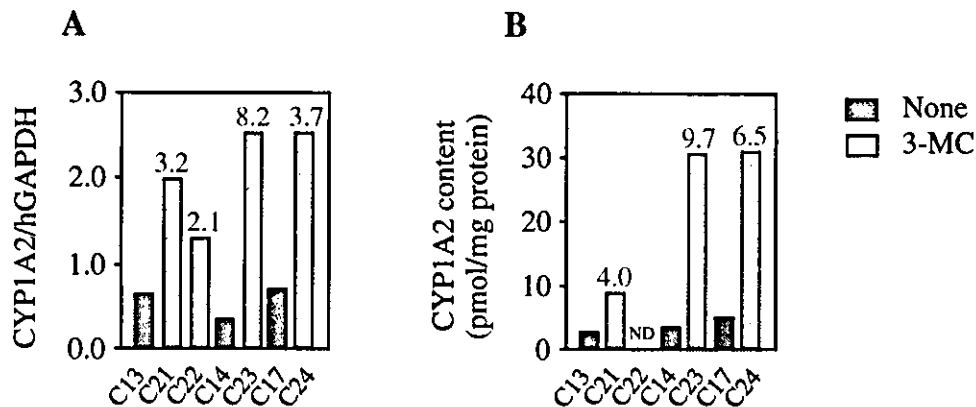


Fig. 14. Changes of human CYP1A2 expression in 3-MC-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP1A2 mRNA (A) and protein (B) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents.

ND: not detected.

#### C-2-2. ヒト CYP3A4 に及ぼす影響

Fig. 15A にヒト CYP3A4 mRNA 発現量の定量結果を示す。キメラマウス C24 が C17 に比べ顕著に低い値を示したが、その他のキメラマウスに関しては 3-MC 投与により、mRNA 発現量に顕著な差は認められなかった (0.9-2.0 倍)。

Fig. 15B にヒト CYP3A4 タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス C13 の発現量が低かったためか、C21 と C22 の値が見かけ上、それぞれ約 7.5 倍、約 12.2 倍の増加となった。その他のキメラマウスに

ついては 3-MC 投与群と対照群を比較すると、1.2 および 3.0 倍の差であり、ヒト CYP3A4 タンパクについては大きなばらつきが認められた。

Fig. 15C にデキサメタゾン 6-水酸化酵素活性の結果を示す。

mRNA 発現量が顕著に低かった C24 は本酵素活性も低かった。その他のキメラマウスについては 3-MC 投与による顕著な変動は認められなかった (0.7-1.1 倍)。uPA (+/-)/SCID マウスおよび uPA (-/-)/SCID マウスでは、3-MC 投与による顕著な変動は認められなかった。

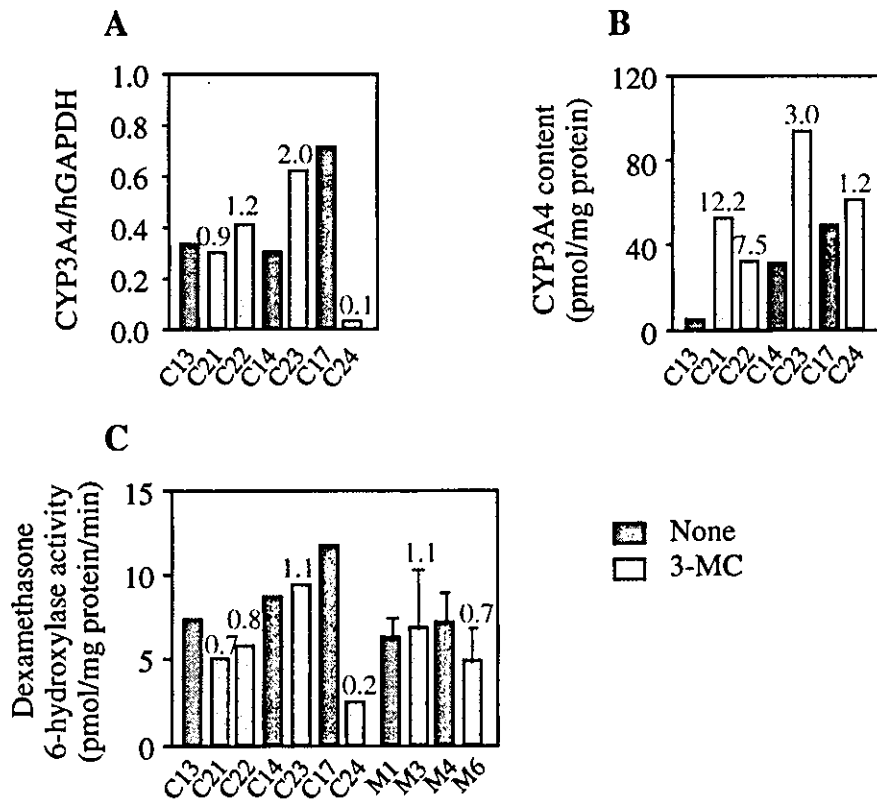


Fig. 15. Changes of human CYP3A4 expression in 3-MC-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP3A4 mRNA (A), protein (B) and the dexamethasone 6-hydroxylase activity (C) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of dexamethasone was 100  $\mu$ M. The columns of M1, M3, M4 and M6 represent the mean  $\pm$  SD (n=3). M1: Non-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M3: 3-MC-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4: Non-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, M6: 3-MC-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes.

### C-2-3. ヒト CYP2C9 に及ぼす影響

Fig. 16A にヒト CYP2C9 mRNA 発現量、Fig. 16B にタンパク発現量、Fig. 16C にジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性の結果を示す。3-MC 投

与群と対照群を比較すると、それぞれ 0.4-2.6 倍、0.7-3.0 倍、0.6-2.3 倍程度の変動であった。なお、uPA (+-)/SCID マウスおよび uPA (-)/SCID マウスでは、本酵素活性に差異は認められなかった。

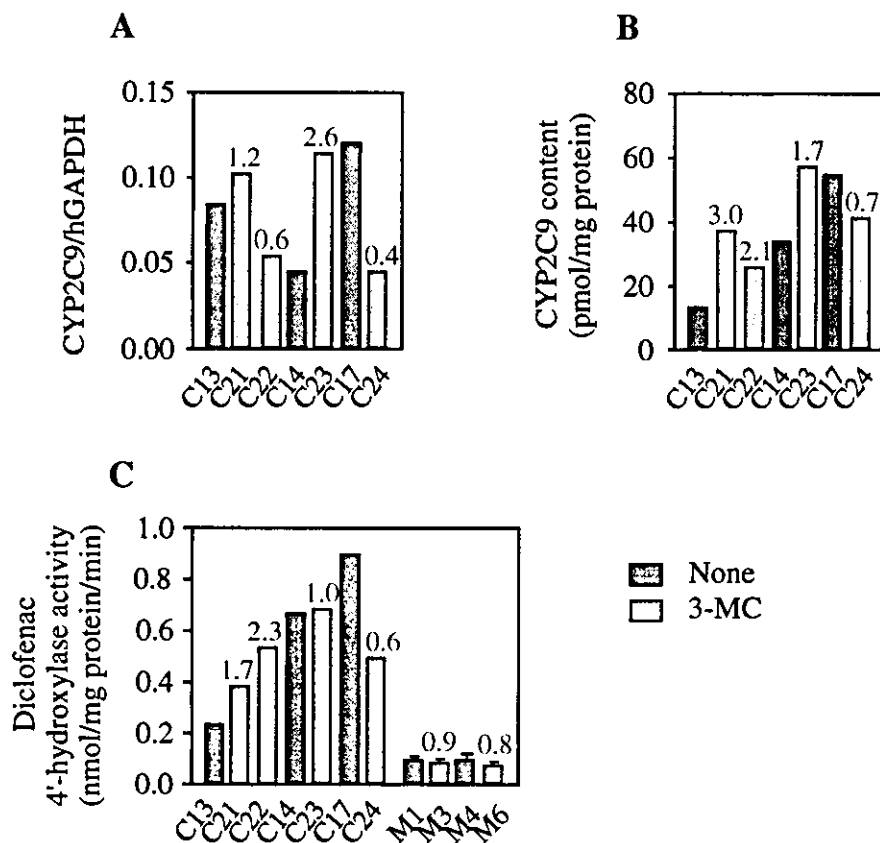


Fig. 16. Changes of human CYP2C9 expression in 3-MC-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP2C9 mRNA (A), protein (B) and the diclofenac 4'-hydroxylase activity (C) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. The concentration of diclofenac was 30  $\mu$ M. The columns of M1, M3, M4 and M6 represent the mean  $\pm$  SD (n=3). M1: Non-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M3: 3-MC-treated uPA (+-)/SCID mouse liver microsomes, M4: Non-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes, M6: 3-MC-treated uPA (-)/SCID mouse liver microsomes.

#### C-2-4. ヒトCYP2A6に及ぼす影響

Fig. 17A にヒト CYP2A6 mRNA 発現量、Fig. 17B にタンパク発現量、Fig. 17C にクマリン7-水酸化酵素活性の結果を示す。3-MC 投与群で mRNA 発現量およびタンパク発現量に減少傾向が認められたが、顕著

な変動は認められなかった (0.3-0.9 倍)。本酵素活性に関しても顕著な差は認められなかった。なお、uPA (+-)/SCID マウスと uPA (-)/SCID マウスでは、本酵素活性における誘導率はそれぞれ 2.7 倍、1.3 倍であった。