

Fig. 17. Changes of human CYP2A6 expression in 3-MC-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP2A6 mRNA (A), protein (B) and the coumarin 7-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 coumarin was 1 μ 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, ND: not detected.

C-2-5. その他のヒト CYP 分子種の発現に及ぼす影響

Fig. 18A にヒト CYP1A1 mRNA 発現量の定量結果を示す。3-MC 投与により mRNA 発現量は、10.0-38.4 倍の顕著な増加が認められた。

Fig. 18B にヒト CYP2C8 mRNA 発現量、Fig. 18C にタンパク発現量の定量結果を示す。3-MC 投与による mRNA 発現量およびタンパク発現量の顕著な変動は認められなかった。(0.5-1.1 倍、0.7-1.9 倍)

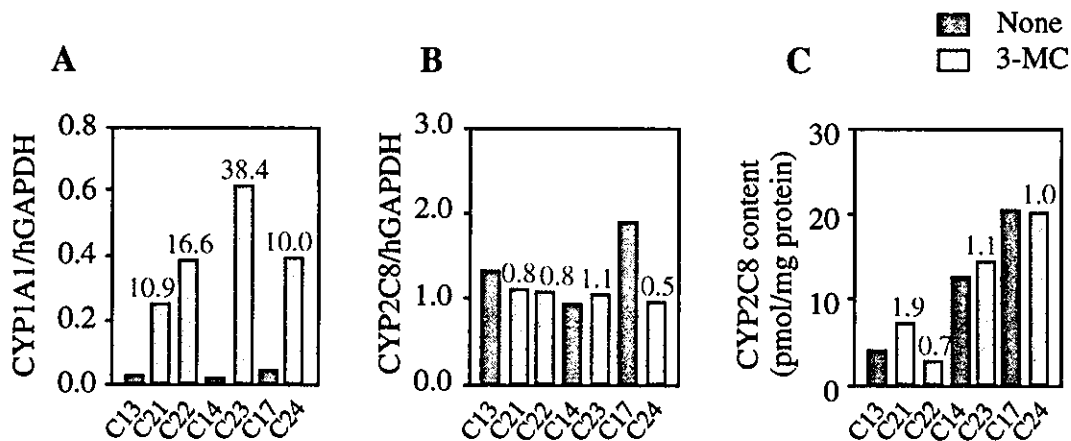


Fig. 18. Changes of human CYP1A1 and CYP2C8 expression in 3-MC-treated chimeric mice.

The expression levels of human CYP1A1 and CYP2C8 mRNA (A, B) and CYP2C8 protein (C) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents.

Fig. 19A にヒト CYP2C18 mRNA 発現量の定量結果を示す。C13 の mRNA 発現量が他のキメラマウスと比較して高かったため、C22 の mRNA 発現量を C13 と比較すると見かけ上、約 0.3 倍に減少した。しかし、hAlb 値の高い C14 の mRNA 発現量は C13 の約 30%程度であるため、C14 と C22 を比較した場合、顕著な差は認められなかった。その他のキメラマウスに関しては 0.7-1.0 倍の変動であった。

Fig. 19B にヒト CYP2C19 mRNA 発現量の定量結果を示す。C13 の mRNA 発現量が他のキメラマウスと比較して高かったため、C22 の mRNA 発現量を C13 と比較すると見かけ上、約 0.4 倍に減少した。しかし、hAlb 値の高い C14 の mRNA

発現量は C13 の約 35%程度であるため、C14 と C22 を比較した場合、顕著な差は認められなかった。その他のキメラマウスに関しては 0.5-1.1 倍の変動であった。

Fig. 20A にヒト CYP2D6 mRNA 発現量、Fig. 20B にタンパク発現量の定量結果を示す。比較的高い hAlb 値を示したキメラマウス C23 および C24 で対照群と比較して約 0.1 倍と mRNA の顕著な減少が認められた。しかしタンパク発現量に関しては、3-MC 投与による顕著な変動は認められなかった (0.7-1.6 倍)。

Fig. 20C にヒト CYP3A5 mRNA 発現量の定量結果を示す。キメラマウス C23 以外の 3-MC 投与群では、対照群と比べて mRNA 発現量が 0.3-0.5 倍と減少した。キメラマウス C23 は対照群と

比べて顕著な変化は認められなかった。

Fig. 20D にヒト CYP3A5 タンパク発現量の定量結果を示す。比較的 hAlb 値の高い C17 と C24 以外では、

本章の実験条件ではタンパクを検出することが出来なかったが、C24 は C17 と比較して約 0.7 倍のタンパク発現量の減少が認められた。

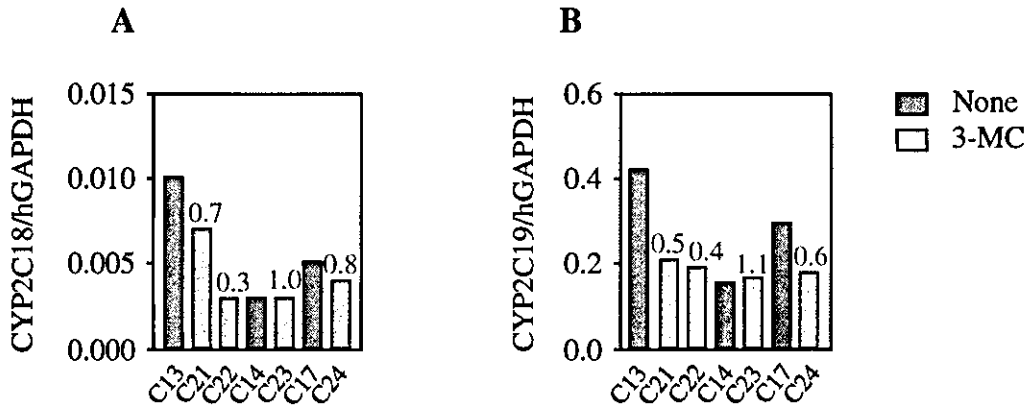


Fig. 19. Changes of human CYP2C18 and CYP2C19 expression in 3-MC-treated chimeric mice.

The expression levels of human CYP2C18 and CYP2C19 mRNA (A, B) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents.

D. 考察

薬物を反復投与すると、その薬物もしくは併用薬の薬効の減弱が認められることがある。これは薬物代謝酵素誘導に基づく相互作用であり、CYPの誘導に関して多くの報告がなされている (Niemi et al., 2003; Zhou et al., 2003)。また、臨床で用いられている酵素誘導を起こす薬物は、肝障害を惹起することがあり、副作用の面からも酵素誘導能の有無を検討することは重要であると言われている (堀江と横井, 2003)。薬物代謝酵素誘導実験はラットやイヌで行うこと

が一般的であるが、投与量がヒトにおける臨床用量と乖離している場合もあり、そのままヒトを予測することが難しい場合もある。また、*in vitro* 実験系において、誘導実験に用いられる細胞株は、細胞培養や遺伝子の導入技術のめざましい発展により改良されてきたが、転写因子や一部の遺伝子のみが発現であることが多い。これより全CYP分子種が発現しているヒトおよび実験動物の肝細胞が誘導実験に頻用されている。また、肝細胞を用いた*in vitro* 実験系で認められたCYPの誘導は、*in vivo* においても同程度の誘導を示すと考えられてい

る (Schuetz et al., 2002)。CYPに関しては、ヒト肝細胞での実験において CYP1A、CYP2A、CYP2B、CYP2C、CYP2EおよびCYP3Aサブファミリー

が誘導されることが明らかになっている (Gerbai-Chaloin et al., 2001; Madan et al., 2003)。

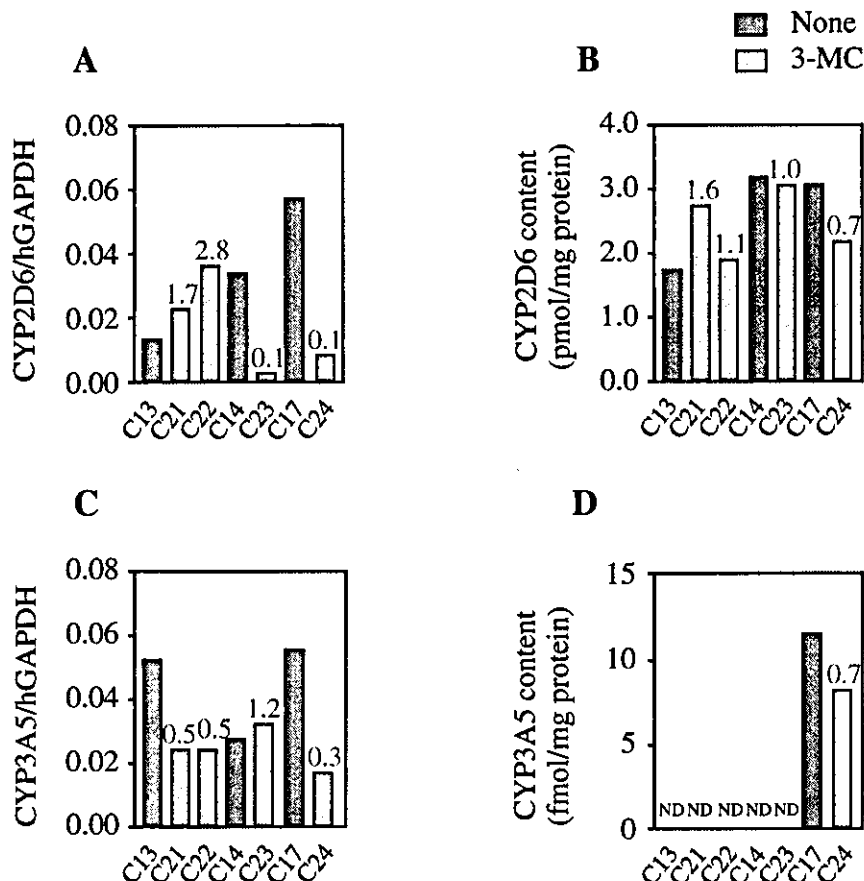


Fig. 20. Changes of human CYP2D6 and CYP3A5 expression in 3-MC-treated chimeric mice. The expression levels of human CYP2D6 and CYP3A5 mRNA (A, C) and protein (B, D) in 3-MC-treated chimeric mice were compared with those in non-treated chimeric mice with similar hAlb contents. ND: not detected.

第I章より、ヒト肝細胞キメラマウスの肝においてヒトCYPが発現していることを明らかにした。そこで、本章ではヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトCYPの誘導能について検

討を行った。CYPの代表的な誘導薬であるリファンピシンと3-MCをキメラマウスに投与し、各CYP分子種の変動をmRNA、タンパク、酵素活性レベルで検討した。

リファンピシンはヒトCYP3A4を誘導することが*in vitro*、*in vivo*実験系で明らかになっている (Runge et al., 2000; Madan et al., 2003; Niemi et al., 2003)。本章の結果より、リファンピシン投与によりキメラマウスのヒトCYP3A4 mRNAおよびタンパク発現量はそれぞれ約6-27倍、2.5-10.4倍増加した。また、デキサメタゾン6-水酸化酵素活性は、5.1-14.5倍の増加が認められた。ヒト肝細胞を使った誘導実験において、曝露条件などは異なるが、リファンピシンはCYP3A4 mRNAを約12倍 (Drocourt et al., 2001)、約13倍 (Desai et al., 2002)、5.0倍 (Nishimura et al., 2002)、2.8-14.8倍 (Raucy et al., 2002) 誘導するとの報告がなされている。また、タンパク発現量に関しては、ヒト肝スライスを用いた実験において3.3倍 (1.0-18.4倍) (Edwards et al., 2003)、ヒト肝細胞を用いた実験で約3倍 (Runge et al., 2000)、4.2倍 (Drocourt et al., 2001)、9.4倍 (Desai et al., 2002)、1.2-8.2倍 (Raucy et al., 2002) の増加が示されている。ヒト肝細胞を用いた実験でリファンピシン投与によりCYP3A4の指標活性であるテストステロン6 β -水酸化酵素活性が10.5倍 (Desai et al., 2002)、2.1-10.1倍 (Reinach et al., 1999)、4-30倍 (Lu and Li, 2001)、平均約10倍 (1.0-145倍)、 (Madan et al., 2003)、

7.1-26倍 (Runge et al., 2000) 増加したと報告されている。本章での結果は*in vivo*実験系であり誘導条件が異なることに加え、対照としたキメラマウスのhAlb値およびRI値が、誘導群のキメラマウスと正確に同じではないことなどを考慮すると、これらの報告と本章での結果には大きな矛盾はないと考えられる。また、uPA (+/-)/SCIDマウスおよびuPA (-/-)/SCIDマウスにおいて、デキサメタゾン6-水酸化酵素活性の上昇が認められなかった。ddYマウスにリファンピシンを100 mg/kg/dayで4日間腹腔内投与すると、Cyp3a11 mRNA発現量が約50倍に増加したとの報告がなされている (Yanagimoto et al., 1997)。従って、uPA (+/-)/SCIDマウスおよびuPA (-/-)/SCIDマウスにおいてもCyp3a11が誘導されていると考えられるが、マウスの主代謝物は6-水酸化デキサメタゾンではないため、リファンピシンによるデキサメタゾン6-水酸化酵素活性の誘導が認められなかったのかもしれない。以上より、キメラマウスはヒトCYP3A4の誘導能を有することを明らかにした。

また、リファンピシンはヒト肝細胞もしくはヒト肝スライスを用いた実験系で、ヒトCYP3A4以外にも、様々なCYPを誘導することが明らかになっている。特にCYP2Cサブファミリー

一に関する検討が多くなされているが、CYP2C8については、mRNA発現量では5.5倍 (Gerbal-Chaloin et al., 2001)、3.4倍 (Nishimura et al., 2002)、タンパク発現量では2.6-15.8倍 (Donato et al., 2000)、約4倍 (Drocourt et al., 2001)、2.8倍 (Gerbal-Chaloin et al., 2001)、2.7-9.9倍 (Madan et al., 2003)の増加が示されている。一方、CYP2C8タンパク発現量は変化しないとの報告もなされている (Edwards et al., 2003)。CYP2C9については、mRNA発現量が3.3倍増加し (Gerbal-Chaloin et al., 2001)、また、タンパク発現量が約4倍 (Drocourt et al., 2001)、2.4倍 (Gerbal-Chaloin et al., 2001)、 2.1 ± 1.8 倍 (Raucy et al., 2002)増加したとの報告がある。CYP2C9の指標活性であるトルブタミド4'-水酸化酵素活性が3.7倍 (Gerbal-chaloin et al., 2001)、ジクロフェナク4'-水酸化酵素活性が1.3-10倍 (Madan et al., 2003)増加したと報告されている。また、ヒトの*in vivo*での実験において、リファンピシンとCYP2C9の基質であるワルファリンとの併用により、ワルファリンのAUCが減少したと報告されている (Niemi et al., 2003)。これに対し、ヒト肝細胞の実験において、mRNAおよびタンパク発現量に変化は認められなかったとの報告もなされている (Runge et al., 2000; Nishimura et al., 2002;

Edwards et al., 2003)。CYP2C18については報告数が少ないが、mRNA発現量に影響を及ぼさないことが示されている (Gerbal-Chaloin et al., 2001; Nishimura et al., 2002)。CYP2C19については、mRNA発現量が1.8倍の上昇であり (Gerbal-Chaloin et al., 2001)、また、タンパク発現量は、2.4倍 (Gerbal-Chaloin et al., 2001)、2.7倍 (Edwards et al., 2003)の増加であった。CYP2C19の指標活性であるS-メフェニトイン4'-水酸化酵素活性は8.3倍 (Gerbal-Chaloin et al., 2001)、4.9-190倍 (Madan et al., 2003)増加した。しかし、mRNAおよびタンパク発現に影響を及ぼさない (Runge et al., 2000; Nishimura et al., 2002)、あるいは、CYP2C19タンパクの誘導は 5.7 ± 5.3 倍であり個体差が大きいとの報告もある (Raucy et al., 2002)。本章の結果と比較すると、CYP2C8およびCYP2C9に関しては、過去の報告ほど誘導は認められなかったが、リファンピシンによる増加傾向は認められた。ジクロフェナク4'-水酸化酵素活性に関しては、ドナーの異なるキメラマウス間での増加傾向に差が認められ、また、誘導率の算出は対照群の活性値に大きく左右されるため、誘導されたと判断するには、例数を増やすなど更なる検討が必要と考えられる。また、CYP2C18とCYP2C19について

はmRNA発現量のみを検討であるため、タンパク、酵素活性レベルで誘導について検討が必要であろう。CYP2A6について、ヒト肝細胞でリファンピシンによるタンパクレベルでの誘導が認められたとの報告がなされているが (Dalet-Beluche et al., 1992)、mRNA発現量が1.7倍程度の増加であったとの報告や (Nishimura et al., 2002)、タンパク発現量は平均2.1倍の増加が認められたがばらつきは大きかった (Edwards et al., 2003) との報告がある。クマリン7-水酸化酵素活性について、増加したが有意差は認められなかったとの報告や (Madan et al., 2003)、0.8-1.1倍の増加であったとの報告がなされている (Donato et al., 2000)。リファンピシンによるCYP2A6の誘導については、過去の報告でも指摘されているが、発現量が低く、さらに個体差が大きく、そのうえ例数が少ないため明確な結論を出すに至っていない。本章の結果では、mRNA、タンパク、酵素活性全てにおいてリファンピシンにより2-3倍程度の増加が認められ、これまでの報告と大きく矛盾することはなかった。CYP1A2については Nishimuraら (2002) によるとリファンピシン投与によりmRNA発現量に変化は認められず、また、Edwardsら (2003) によるとCYP1A2タンパク発

現量に変化は認められなかった。CYP1A2の指標活性であるエトキシレゾルフィンO-脱エチル化酵素活性について、2-3倍の上昇が認められたとの報告 (Lu and Li, 2001) がある一方、2.3倍上昇したが有意差は認められなかったとの報告がある (Madan et al., 2003)。これらの報告は本章の結果とほぼ一致すると考えられる。CYP2D6についてもタンパク発現量や指標活性であるデキストロメトルファンO-脱メチル化酵素活性に影響を及ぼさないことが示されており (Edwards et al., 2003; Madan et al., 2003)、本章の結果と一致した。

リファンピシンはCYP3A4を誘導するが、興味深いことに同じサブファミリーに属するCYP3A5について、タンパクレベルでの誘導が認められなかったことが示されている (Schuetz et al., 1993)。しかし、mRNA発現量は2.8倍に増加したとの報告がある

(Nishimura et al., 2002)。本章での結果については、ウエスタンブロット分析の実施に際し、対照群とリファンピシン投与群で実験日が異なること、CYP3A5のタンパク発現量が低いことを考慮すると、さらに例数を増やした上で考察する必要があると考えられる。以上より、リファンピシンに関して、これまでに報告されているCYP分子種の発現変動は、本章

で得られた結果とほぼ一致したと考えられる。

3-MC に関しては、ヒト肝細胞での実験について報告はあまりないが、3-MC の曝露により CYP1A2 タンパクやエトキシレゾルフィン O-脱エチル化酵素活性が検出可能になったため、ヒト肝細胞での CYP1A2 は誘導されたことが明らかになっている (Runge et al., 2000)。なお、Runge ら (2000) によると、CYP1A1 タンパクは誘導されず、また、CYP2C9 および CYP2C19 タンパクも変動は認められなかったと報告している。本章の結果より、3-MC 投与により CYP1A2 mRNA およびタンパクレベルで誘導が認められたことは、これらの報告と一致する。しかし、CYP1A1 mRNA の増加が認められたため、CYP1A1 については更なる検討が必要と考えられる。また、他の分子種に関して、キメラマウスの例数が少なく大きなばらつきが認められるが、一般的に 3-MC 投与によりタンパク、酵素活性レベルはほぼ同程度、もしくはやや減少傾向を示した。

E. 結論

本章においてヒト肝細胞キメラマウスはヒト CYP 誘導能を示すことを明らかにした。今後、例数を増や

すとともに、さらに様々な誘導薬に関して検討を行う必要があると考えられる。キメラマウスを用いた誘導実験はヒト肝細胞を用いた場合に比べ、活性が低い分子種についても検討が可能であり、さらにより生体に近い *in vivo* の状態で検討を行うことができるなど多くの利点があると考えられる。

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、平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎

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、平成 15 年 10 月 8-10 日、札幌

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、平成 15 年 10 月 8-10 日、札幌

EXPRESSION OF HUMAN CYP IN CHIMERIC MICE WITH HUMANIZED

LIVER ; The 7th International ISSX
(International Society for the Study of
Xenobiotics) Meeting、平成 16 年 8 月 29
日～9 月 2 日、バンクーバー、カナダ

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、平成 16 年 8 月 29
日～9 月 2 日、バンクーバー、カナダ

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）

Bogaards JJ, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn
MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ and Walther B
(2000) Determining the best animal model for
human cytochrome P450 activities: a comparison
of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and
man. *Xenobiotica* **30**: 1131-1152.

Corchero J, Granvil CP, Akiyama TE, Hayhurst
GP, Pimprale S, Feigenbaum L, Idle JR and
Gonzalez FJ (2001) The *CYP2D6* humanized
mouse: effect of the human *CYP2D6* transgene
and HNF 4alpha on the disposition of
debrisoquine in the mouse. *Mol Pharmacol* **60**:
1260-1267.

Dalet-Beluche I, Boulenc X, Fabre G, Maurel P

and Bonfils C (1992) Purification of two
cytochrome P450 isozymes related to CYP2A and
CYP3A gene families from monkey (baboon,
Papio papio) liver microsomes. Cross reactivity
with human forms. *Eur J Biochem* **204**: 641-648.

Dandri M, Burda MR, Torok E, Pollok JM,
Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE,
Gupta S, Will H, Greten H and Petersen J (2001)
Repopulation of mouse liver with human
hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B
virus. *Hepatology* **33**: 981-988.

Desai PB, Nallani SC, Sane RS, Moore LB,
Goodwin BJ, Buckley DJ and Buckley AR (2002)
Induction of cytochrome P450 3A4 in primary
human hepatocytes and activation of the human
pregnane X receptor by tamoxifen and 4-
hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos* **30**: 608-
612.

Donato MT, Viitala P, Rodriguez-Antona C,
Lindfors A, Castell JV, Raunio H, Gomez-Lechon
MJ and Pelkonen O (2000) CYP2A5/CYP2A6
expression in mouse and human hepatocytes
treated with various in vivo inducers. *Drug Metab
Dispos* **28**: 1321-1326.

Drocourt L, Pascussi JM, Assenat E, Fabre JM,
Maurel P and Vilarem MJ (2001) Calcium
channel modulators of the dihydropyridine family
are human pregnane X receptor activators and
inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in
human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **29**:
1325-1331.

Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB,
Tredger JM, Boobis AR and Lake BG (2003)
Induction of cytochrome P450 enzymes in
cultured precision-cut human liver slices. *Drug
Metab Dispos* **31**: 282-288.

Gentile DM, Tomlinson ES, Maggs JL, Park BK

- and Back DJ (1996) Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther* **277**: 105-112.
- Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, Fabre JM, Carrere N and Maurel P (2001) Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* **29**: 242-251.
- Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV and Jover R (2003) Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* **4**: 292-312.
- Guengerich FP (1995) Human cytochrome P450 enzymes, in *CytochromeP450: structure, mechanism and biochemistry* (Ortiz de Montellano PR ed) pp 473-565, Plenum, New York.
- 堀江 透・横井 毅 (2003) 臨床薬物代謝化学 pp307-318. 廣川書店, 東京
- Hwang DY, Chae KR, Shin DH, Hwang JH, Lim CH, Kim YJ, Kim BJ, Goo JS, Shin YY, Jang IS, Cho JS and kim YK (2001) Xenobiotic response in humanized double transgenic mice expressing tetracycline-controlled transactivator and human CYP1B1. *Arch Biochem Biophys* **395**: 32-40
- Imaoka S, Hayashi K, Hiroi T, Yabusaki Y, Kamataki T and Funae Y (2001) A transgenic mouse expressing human CYP4B1 in the liver. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 757-762.
- Ingelman-Sundberg M (2002) Polymorphism of cytochrome p450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* **181-182**: 447-452.
- Ishikawa T, Sekiguchi F, Fukase Y, Sawada N and Ishitsuka H (1998) Positive correlation between the efficacy of capecitabine and doxifluridine and the ratio of thymidine phosphorylase to dihydropyrimidine dehydrogenase activities in tumors in human cancer xenografts. *Cancer Res* **58**: 685-690.
- Klose TS, Blaisdell JA and Goldstein JA (1999) Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol* **13**: 289-295.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Li AP, Kaminski DL and Rasmussen A (1995) Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology* **104**: 1-8.
- Li Y, Yokoi T, Kitamura R, Sasaki M, Gunji M, Katsuki M and Kamataki T (1996) Establishment of transgenic mice carrying human fetus-specific CYP3A7. *Arch Biochem Biophys* **329**: 235-240.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Lu AY (1998) Drug-metabolism research challenges in the new millennium: individual variability in drug therapy and drug safety. *Drug Metab Dispos* **26**: 1217-1222.
- Lu C and Li AP (2001) Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem Biol Interact* **134**: 271-281.
- Madan A, Graham RA, Carroll KM, Mudra DR, Burton LA, Krueger LA, Downey AD, Czerwinski M, Forster J, Ribadeneira MD, Gan LS, LeCluyse EL, Zech K, Robertson P Jr, Koch P, Antonian L, Wagner G, Yu L and Parkinson A

- (2003) Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **31**: 421-431.
- Mankowski DC, Lawton MP and Ekins S (2000) Characterization of transgenic mouse strains using six human hepatic cytochrome P450 probe substrates. *Xenobiotica* **30**: 745-754.
- Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL and Kneteman NM (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**: 927-933.
- Meyer UA and Zanger UM (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 269-296.
- Morgan K, French SW and Morgan TR (2002) Production of a cytochrome P450 2E1 transgenic mouse and initial evaluation of alcoholic liver damage. *Hepatology* **36**: 122-134.
- Nakajima M, Kuroiwa Y and Yokoi T (2002) Interindividual differences in nicotine metabolism and genetic polymorphisms of human CYP2A6. *Drug Metab Rev* **34**: 865-877.
- Nelson DR (2002) Introductory remarks on human CYPs. *Drug Metab Rev* **34**: 1-5.
- Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ and Kivisto KT (2003) Pharmacokinetic interactions with rifampicin: clinical relevance. *Clin Pharmacokinet* **42**: 819-850.
- Nishimura M, Yoshitsugu H, Naito S and Hiraoka I (2002) Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **122**: 339-361.
- Nunoya KI, Yokoi T, Kimura K, Kainuma T, Satoh K, Kinoshita M and Kamataki T (1999) A new CYP2A6 gene deletion responsible for the in vivo polymorphic metabolism of (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one hydrochloride in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **289**: 437-442.
- Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, Yue QY, Lang MA, Bernal ML, Sinues B, Hirvonen A, Raunio H, Pelkonen O and Ingelman-Sundberg M (1999) Characterisation and PCR-based detection of a CYP2A6 gene deletion found at a high frequency in a Chinese population. *FEBS Lett* **448**: 105-110.
- Pelkonen O and Raunio H (1997) Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect* **105**: 767-774.
- Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A and Raunio H (1998) Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* **28**: 1203-1253.
- Raucy JL, Mueller L, Duan K, Allen SW, Strom S and Lasker JM (2002) Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **302**: 475-482.
- Reinach B, de Sousa G, Dostert P, Ings R, Gugenheim J, Rahmani R (1999) Comparative effects of rifabutin and rifampicin on cytochromes P450 and UDP-glucuronosyl-transferases expression in fresh and cryopreserved human hepatocytes. *Chem Biol Interact* **121**: 37-48.

- Robertson GR, Field J, Goodwin B, Bierach S, Tran M, Lehnert A and Liddle C (2003) Transgenic mouse models of human CYP3A4 gene regulation. *Mol Pharmacol* **64**: 42-50.
- Rodrigues AD and Rushmore TH (2002) Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab* **3**: 289-309.
- Runge D, Kohler C, Kostrubsky VE, Jager D, Lehmann T, Runge DM, May U, Stolz DB, Strom SC, Fleig WE and Michalopoulos GK (2000) Induction of cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1) and multidrug resistance associated protein (MRP-1) by prototypical inducers in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **273**: 333-341.
- Schuetz EG, Schuetz JD, Strom SC, Thompson MT, Fisher RA, Molowa DT, Li D and Guzelian PS (1993) Regulation of human liver cytochromes P-450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes. *Hepatology* **18**: 1254-1262.
- Schuetz E, Lan L, Yasuda K, Kim R, Kocarek TA, Schuetz J and Strom S (2002) Development of a real-time in vivo transcription assay: application reveals pregnane X receptor-mediated induction of CYP3A4 by cancer chemotherapeutic agents. *Mol Pharmacol* **62**: 439-445.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 414-423.
- Tomlinson ES, Maggs JL, Park BK and Back DJ (1997) Dexamethasone metabolism in vitro: species differences. *J Steroid Biochem Mol Biol* **62**: 345-352.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.
- Watanabe T, Shibata N, Westerman KA, Okitsu T, Allain JE, Sakaguchi M, Totsugawa T, Maruyama M, Matsumura T, Noguchi H, Yamamoto S, Hikida M, Ohmori A, Reth M, Weber A, Tanaka N, Leboulch P and Kobayashi N (2003) Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers. *Transplantation* **75**: 1873-1880.
- Yamazaki H, Tanaka M and Shimada T (1999) Highly sensitive high-performance liquid chromatographic assay for coumarin 7-hydroxylation and 7-ethoxycoumarin O-deethylation by human liver cytochrome P450 enzymes. *J Chromatogr B Biomed Appl* **721**: 13-19.
- Yanagimoto T, Itoh S, Sawada M and Kamataki T (1997) Mouse cytochrome P450 (Cyp3a11): predominant expression in liver and capacity to activate aflatoxin B1. *Arch Biochem Biophys* **340**: 215-218.
- Zhang W, Purchio AF, Chen K, Wu J, Lu L, Coffee R, Contag PR and West DB (2003) A transgenic mouse model with a luciferase reporter for studying in vivo transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos* **31**: 1054-1064.
- Zhou S, Gao Y, Jiang W, Huang M, Xu A and Paxton JW (2003) Interactions of herbs with

cytochrome P450. *Drug Metab Rev* **35**: 35-98.

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特異的 CYP 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

マウスの肝臓の 80%以上をヒト肝細胞で置換することが可能なキメラマウスが樹立されて以降、我々によって、ヒト薬物代謝酵素 CYP を中心としたキメラマウスにおける薬物代謝能および誘導能についての検討が重ねられてきた。その結果、mRNA 発現量、タンパク発現量、酵素活性レベルの検討を包括的に判断して、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトと同程度の薬物代謝能を持つことが明らかになった。CYP の代表的な誘導薬としてリファンピシンおよび 3-MC を用いた実験により、キメラマウスは誘導能も有していることが明らかとなった。しかし、リファンピシンと 3-MC はマウスの Cyp も誘導するため、キメラマウスに発現しているヒト CYP の誘導能を詳細に検討するためには、ヒト特異的な誘導薬を用いることが望ましいと考えられる。そこで本章では、キメラマウスがヒト CYP 誘導能を有していることを、ヒト CYP3A 特異的な誘導薬であるリファブチンを用いて証明すること、また、リファブチンおよびリファンピシンによる薬物代謝酵素、トランスポーター、核内レセプター発現量への影響を *in vivo* で明らかにすることを目的に検討を行った。

まず、リファブチン投与によりキメラマウスでヒト CYP3A4mRNA、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。また、CYP3A4 以外にもリファブチンにより CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A7 の発現量が、リファンピシンにより CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A7 の発現量を増加させることを mRNA レベルで明らかにした。

次に、リファブチンおよびリファンピシンのヒトトランスポーターと核内レ

セプター発現量への影響を mRNA レベルで検討した。本研究においては、マウスと交差しないヒト PXR のプライマーを設計することができなかつたため、ヒト PXR mRNA 発現量を定量することができなかつた。ヒト PXR mRNA 発現量の定量は今後の研究課題であると考えられる。mRNA 発現量のみでの検討であるものは、タンパク発現レベル、酵素活性レベルでの検討が今後必要となってくると考えられる。

臨床試験は倫理的かつ科学的に行われなければならない、それ故、詳細で適切な非臨床試験の実施が極めて重要になる。ヒト組織由来試料および酵素発現系を用いた *in vitro* 試験での薬物動態を検討し、また必要に応じて行った実験動物を用いた *in vivo* 試験のデータを参考にし、ヒトで有効性および安全性の高い候補化合物を選択することが重要である。*In vitro* から *in vivo*、実験動物からヒトへの外挿には様々な困難が伴う。ヒト肝細胞キメラマウスはヒトの *in vivo* に最も近いモデルとして期待され、様々な検討がなされている。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。本章は、今後の薬物動態研究のみならず医薬品開発において貴重な情報を提供できたと考えられる。

A. 研究目的

薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP) は多くの分子種が存在し、スーパーファミリーを形成している。アミノ酸の相同性からファミリー、サブファミリーに分類され、各々の基質特異性により様々な薬物や生体内化合物の代謝を担っている (Nelson et al., 1996)。これら CYP 遺伝子の中には、特定の薬物によって誘導され、酵素活性が変動するものが存在する。その結果、薬物動態の個人差、薬物相互作用や治療効果の減少といった事象が現れる。

CYP3A の誘導薬であるカルバマセピンやフェニトインを CYP3A の基質であるシクロスポリン A と併用した場合、シクロスポリン A の血中濃度の低下が起こり臓器拒絶反応といった重篤な副作用が起きること (Freeman et al., 1984)、CYP2C の誘導薬であるフェノバルビタールと CYP2C の基質であるワルファリンの併用により抗凝血作用が阻害される (Breckenridge and Orme, 1971) といった例は有名である。従って、候補化合物のヒト CYP 誘導能を医薬品開発段階の早期に理解することは、ヒト CYP 誘導能を示さない

薬物の開発の可能性を高め、候補化合物が臨床試験の段階で開発中断されることを防ぐなど、極めて重要である。

医薬品は実験動物を対象とした非臨床試験により薬効と安全性が確認された後初めてヒトに投与される。非臨床試験では、薬効、安全性試験の他に、代謝物の同定、酵素誘導能の有無、消失クリアランスなど薬物動態、特に代謝に関する基礎的検討が行われる。実験動物には、マウス、ラット、イヌ、サルなどが用いられる。しかし、ヒトと実験動物の間には薬物代謝における種差が存在し、その原因として薬物代謝酵素の質的および量的な差異、体表面積に由来した基礎代謝量の違いなどが指摘されている (Nelson, 1999; Guengerich, 1997)。酵素誘導に関しては、候補化合物を実験動物に反復投与して各 CYP 分子種の発現変動および代表的基質の代謝に及ぼす影響を検討することが多い。しかし、pregnenolone 16 α -carbonitrile およびデキサメタゾン¹はラット CYP3A を誘導するがウサギやヒト CYP3A は誘導せず、逆にリファンピシン²はヒト CYP3A を誘導するが、ラット CYP3A は誘導が認められないこと (Kocarek et al., 1995; Barwick et al., 1996) など哺乳動物間での種差

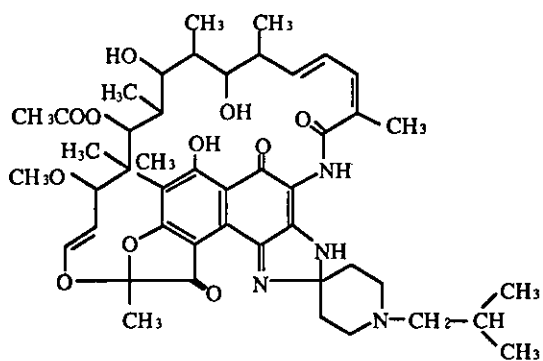
の存在が明らかとなっているため、動物実験の結果をヒトへ外挿することは極めて困難であると考えられる。そのために、薬物代謝研究には近年、肝ミクロソーム、肝スライスなどヒト肝由来試料が用いられるようになって来た。その他に *in vitro* 酵素源としてヒト CYP を発現させた大腸菌、酵母、培養細胞を用いた発現系 CYP が利用されている。現在のところ *in vivo* におけるヒト CYP 誘導能の予測には新鮮ヒト肝細胞が gold standard と考えられている。しかし、新鮮ヒト肝細胞は、単離数日後に CYP 含量が 50%以下になるなど長期培養には技術的な困難が伴う (Rodrigues and Rushmore, 2002)。また、人種差、性差、生存時の薬歴、死因といった個体差や、肝細胞の調製方法や viability の違いなどから、供給された肝細胞により薬物代謝能のばらつきが大きく、再現性に問題があると考えられている。さらに、ヒトの正常組織由来の試料は数が限られており、また倫理的な問題もあり、入手が容易ではなく供給が不安定なのが現状である。従って、酵素活性が減少することなく長期間の安定発現が可能なヒト CYP 誘導能の予測系が望まれている。

そこでこの問題を解決すべく、人工的にヒト肝を作製する研究が行わ

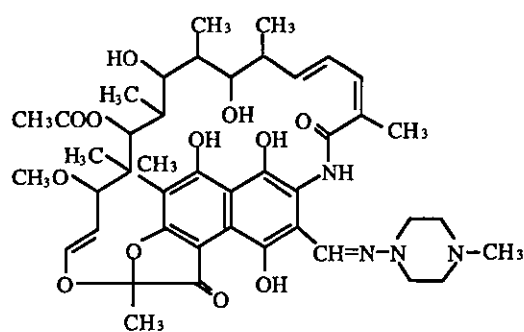
れている。マウスにヒト肝細胞を移植することでキメラマウスを作製する研究が、Dandri ら (2001) および Mercer ら (2001) によって行われた。Dandri ら (2001) はウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター (uPA) トランスジェニックマウスを recombinant activation gene-2 欠損マウス (RAG-2 マウス) と交配後、uPA/RAG-2 マウスに新鮮ヒト肝細胞を移植してキメラマウスを作製した。しかし、キメラマウスにヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) を感染させた後、HBc (hepatitis B core) 抗血清で免疫染色を行った結果、およびマウス血中のヒトアルブミン濃度 (human albumin concn., hAlb) を指標とした場合、マウス肝細胞からヒト肝細胞へは最高で 15% 置換していた。Mercer ら (2001) は uPA(+ / +)SCID マウスに凍結ヒト肝細胞を脾臓より移植しマウス肝の 50%以上がヒト肝細胞で置換されたキメラマウスを作製した。近年我が国において、マウス肝の 80%以上がヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが樹立された (Tateno et al., 2004)。このキメラマウスを用いることで、同一ドナー由来のヒト肝細胞を無限に増殖させることができる、実験動物の使用を減少できる、医薬品開発のコストを

減少させることができるなど数々の利点があり、ヒトにおける薬物動態および安全性を予測できる有用な手段になると期待できる。

昨年度までにヒト肝細胞キメラマウスの肝にヒト CYP が発現しており、ヒトと同程度の薬物代謝能を有することを明らかにした (Katoh et al., 2004)。また、CYP の代表的な誘導薬であるリファンピシンと 3-MC によりキメラマウスの肝に発現するヒト CYP が誘導されることも明らかにした (Katoh et al., 2005)。しかし、リファンピシンと 3-MC はマウスの Cyp も誘導する (Strolin and Dostert, 1994; Kocarek et al., 1995; Nishibe et al., 1998)。そこで、ヒト CYP 誘導能を詳細に検討するには、キメラマウスにヒト CYP 特異的な誘導薬を投与して検討する必要があると考えられる。そこで、本章ではヒト肝細胞キメラマウスにヒト CYP3A を特異的に誘導するリファブチンを投与し、*in vivo* におけるヒト CYP 誘導能を mRNA、タンパク、酵素活性レベルで明らかにすることを目的に検討を行った。また、リファブチン投与による各トランスポーターおよび核内レセプターへの影響についても検討した。本章で用いた誘導薬の構造式を下に示す (Fig. 1)。



Rifabutin



Rifampicin

Fig. 1. Chemical structures of rifabutin and rifampicin.

B. 研究方法

B-1. 実験動物

本章ではキメラマウスのドナーとして In Vitro Technologies (Baltimore, MD) より購入した凍結ヒト肝細胞 (白人、男性、9ヶ月) を用いた。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。キメラマウスは、生後 20 から 30 日齢の uPA(+ / +)SCID マウスの脾臓にヒト肝細胞を移植し

て作製した。必要に応じて補体抑制作用を示すメシル酸ナファモスタットを腹腔内投与した。使用した生後 12-15 週齢の雄性キメラマウスを Table 1 に示す。なお、ELISA 法により測定したキメラマウスの血中 hAlb 濃度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 (Tateno et al., 2004)、Table 1 に併記した。

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

No.	hAlb	RI	Drug treatment
	mg/ml	%	
1	3.1	50	None
2	6.5	70	None
3	9.3	70	None
4	13.7	90	None
5	3.2	50	Rib
6	5.1	60	Rib
7	6.5	70	Rib
8	9.7	70	Rib
9	17.2	90	Rib
10	5.7	60	Rif
11	9.5	70	Rif
12	11.4	80	Rif
13	15.5	90	Rif

Rib: Rifabutin

Rif: Rifampicin

The chimeric mice were intraperitoneally treated daily for 4 days with rifabutin or rifampicin (50 mg/kg/day).

B-2. 試薬

ISOGENは日本ジーン (Tokyo, Japan) より購入した。Taq DNAポリメラーゼはGreiner Japan (Tokyo, Japan) より購入した。MMLV-逆転写酵素 (reverse transcriptase, RT) は東洋紡 (Osaka, Japan) から入手した。ランダムヘキサマー、TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version、SYBR® GREEN IIは宝酒造 (Osaka, Japan) より購入した。オリゴヌクレオチドは北海道システムサイエンス

(Sapporo, Japan) に合成を依頼した。Yeast tRNAはLife Technologies (Rockville, MD) より入手した。

TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents KitおよびTaqMan GAPDH Control ReagentはApplied Biosystems (Foster City, CA) より入手した。プールドヒト肝マイクロソーム、プールドヒト肝サイトゾルおよびヒトCYP3A4を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソーム、ラットCYP3A2を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソームはBD Gentest (Woburn, MA) より購入した。CYP3A5を発現させたバキュロウイルス発現系マイクロソームはPan Vera (Madison, WI) より購入した。ウサギ抗ヒトCYP3A4抗体、ウサギ

抗ヒトCYP3A5抗体はBD Gentestより、ウサギ抗ラットCYP3A2抗体は第一化学薬品 (Tokyo, Japan) より、ビオチン化抗ウサギIgG抗体、ペルオキシダーゼ標識アビジンビオチン複合体はVector (Burlingame, CA) より入手した。発色用3,3'-ジアミノベンチジンは同仁化学 (Kumamoto, Japan) より購入した。G-6-PおよびG-6-P DHはオリエント酵母 (Tokyo, Japan) より購入した。デキサメタゾンおよびリファンピシンは和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。メシル酸ナファモスタットは鳥居薬品 (Tokyo, Japan) よりご供与頂いた。リファブチンはPfizer Japan株式会社 (Aichi, Japan) よりご供与頂いた。そのほかの試薬は特級、生化学用および高速液体クロマトグラフィー用のものを用いた。また、以下に本章で使用した溶液等の組成を示した。表示のないものは1 L当たりの濃度または量で示した。

DEPC処理精製水

DEPCの最終濃度が0.1%になるように精製水に加え、37°Cで2時間加温した。その後、121°C、40分間オートクレーブした。

5 x 逆転写反应用緩衝液

250 mM Tris-HCl (pH 8.3)、375 mM KCl、15 mM MgCl₂、50 mM DTT

5 x SGI緩衝液

Ex Taq R-PCR version 10 x Buffer (Mg²⁺ free) 250 μL、250 mM Mg²⁺ Solution 30 μL、100 x SYBR[®] GREEN Iを8.4 μL、10 mM dNTPs 75 μL、5 U/μL Ex Taq R-PCR version 25 μLに滅菌精製水を加えて全量を500 μLとした。

ホモジナイズ緩衝液

0.1 M Tris-HCl、0.1 M KCl、1 mM EDTA (pH 7.4)

TGE緩衝液

10 mM Tris-HCl、20% Glycerol、1 mM EDTA (pH 7.4)

サンプル処理液

SDS 6.0 g、2 M Tris-HCl緩衝液 (pH 6.8) 20 mL、ピロニンY 6.0 mg、Glycerol 60 mLに超純水を加え、全量を192 mLとした。

NADPH生成系

50 mM G-6-P、50 mM MgCl₂、5 mM NADP⁺、10 U/mL G-6-P DH