

向を示した。また、ヒト肝細胞で置換されていないキメラマウスに置いてはこのような現象は観察されなかった。これらの結果はヒト肝細胞で置換されたキメラマウスがヒトにおける CYP3A 誘導能を予測する有用なシステムであることを強く支持する。しかしながら、今回の研究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 例と少ないこと、あるいは誘導剤を投与されていないキメラマウス肝ミクロソームでの CYP3A 酵素活性がヒト肝ミクロソームと若干異なる性質を示したことより、キメラマウスの例数を増やして今回の結果を確認すること、あるいは未処置キメラマウスの CYP3A 酵素の性質を明らかにすることはヒト肝細胞で置換されたキメラマウスの有用性を実証するのに重要な実験事実を提供する。

ヒト肝細胞キメラマウス研究会では 80% 以上の置換率のマウスを実験に使用することを同意している。このことは、置換率の違いによる実験のバラツキを軽減するとともに、機能的・形態的に、より分化したヒト肝組織を有するマウスを使うことで、健常人の肝臓での薬物代謝や毒作用の予見性を向上させることに繋がると考える。他の研究報告によると、移植されたヒト肝細胞はヒト特有の

薬物代謝機能を発揮していることが示され、キメラマウスは薬物代謝研究では有用なモデルであるとされている。一方、毒性評価モデルとしては動物が脆弱であることから長期投与試験には向かないことや、消化器障害から経口投与試験では注意が必要という点で、課題が残っている。今回、キメラマウスでみられた腎臓系球体変化は移植したヒト肝細胞由来の異種たん白に起因する免疫原性の変化、胃腸障害は免疫抑制剤の反復投与に伴うストレス性変化と考えられ、引き続き、これらの随伴病変を軽減させるための動物維持方法の改善が望まれる。

E. 結論

本報告において、ヒト肝細胞で置換されたキメラマウスにリファマイシン系抗生物質であるリファンピシンおよびリファブチンを投与すると CYP3A で代謝される基質の代謝活性が誘導された。この現象は、これまでの報告と一致しており、ヒト肝細胞で置換されたキメラマウスがヒトにおける CYP3A 誘導を予測するのに適したシステムを示唆している。

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：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実案新案登録：なし

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を用いた酵素誘導能に関する検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部

協力研究者 柿木 基治、谷口 朋義 エーザイ株式会社

研究要旨

医薬品開発におけるヒトの酵素誘導を予測するツールとしては、ヒト肝細胞の利用がある。しかしながら、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* の評価系では、実際の臨床 (*in vivo*) における薬物相互作用を精度よく予測するためには限界がある。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、ヒトにおける酵素誘導を予測する有用なシステムになり得るものと想定された。本マウスがヒトにおける酵素誘導を予測する手段として有用であるか見極めるための基礎研究を行い、ヒトを予測する新評価系モデルになり得るのか否かを検証し、医薬品開発に役立てたい。

非ステロイド系の消炎薬を目的にエーザイ株式会社で開発された E5110 は、ヒト臨床第 1 相試験において、反復投与により未変化体の AUC が低下すると共に肝 CYP3A4 のマーカーである尿中 6 β -hydroxycortisol 量 (6 β -OHF) の投与量依存的な増加が観察されている。

本研究では、ヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスを用いて、尿中 6 β -OHF 量を測定することにより非侵襲的な CYP3A4 酵素誘導の評価モデルになり得るか否かを調べる。実験は、約 60%以上の RI 値を有す高置換率キメラマウス及び 5%未満の RI 値の低置換率キメラマウスについて、E5110 処置群並びに未処置群における尿中 6 β -OHF、mRNA 発現量を測定した。その結果、①高及び低置換率キメラマウスにおける尿中 6 β -OHF は、検出限界未満であった。このことは、マウス内因性の 6 β -OHF は無視できる。②Cortisol 負荷して、尿中 6 β -OHF 量を測定した結果、低及び高置換率キメラマウスいずれも尿中 6 β -OHF の生成は認められ、その生成量

は低置換率キメラマウスの方が高かった。④高置換率マウスにおける E5110 処置した時の CYP3A4mRNA 発現量は、未処置群と比較して増加した。

以上の結果から、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6β-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6β-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。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。

A. 研究目的

医薬品開発における酵素誘導は、ヒト肝細胞を用いている。ヒト肝細胞を用いた実験では、化合物における mRNA 量の変動並びに酵素活性については評価可能である。しかしながら、肝細胞の評価では、mRNA 量あるいは酵素活性がどれくらい変動すれば実際のヒトの薬物相互作用が問題となるのかという点においては、予測に限界があり、ヒトを精度良く非臨床の段階で予測できるモデルは現時点でない。この命題に対して本研究では、独自に吉里勝利教授（分担研究者）によって開発されたマウス肝の約 80%以上がヒト肝に置換する『ヒト肝細胞キメラマウス』を用いて、ヒトにおける非侵襲的 CYP3A4 の酵素誘導を評価できる

か否かを目的とする。

非侵襲的な CYP3A4 の酵素誘導の評価は、Cortisol の代謝物である尿中の 6β-OHF 量を測定することにより評価する。また、CYP3A4 の誘導については、real-time PCR を用いて mRNA 量を測定することにより評価する。

B. 研究内容及び研究方法

B-1 研究内容

B-1-1. キメラマウスにおける Cortisol代謝の日間変動

低置換率マウス及び高置換率マウスそれぞれ 4 匹用いて、Cortisol を負荷後 24 時間及び 48 時間までの尿中の 6β-OHF/Free-Cortisol を測定する。さらに 48 時間後に Cortisol の再負荷を行い、負荷後 24 時間までの尿中の 6β-OHF/Free-

Cortisol を測定する。実験 1 は、キメラマウスにおける個別の影響及び尿中 6 β -OHF 量並びに Cortisol 量の日内変動を確認する目的で、2 回の繰り返して実施する。

B-1-2. 非侵襲的 CYP3A4 の酵素誘導試験

E5110 を 5 日間反復投与、投与 5 日目に Cortisol を負荷し、負荷後 24 時間までの 24 時間尿中の 6 β -OHF/Free-Cortisol を測定する。

B-1-3. CYP3A4 mRNA 量測定

E5110 最終投与後 24 時間にマウスを剖検し、肝 CYP3A4 mRNA 量測定する。本検討は、実験 2 で用いた高置換率キメラマウス 4 匹を用いて検討する。なお、別途、E5110 未処置の高置換率マウス 4 匹を用いて、肝 CYP3A4 mRNA 量測定

E5110 投与群と比較検討する。

B-2 研究方法

B-2-1. 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、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 10-15 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) から算出した置換率 (replacement index, RI) を Table 1 に併記した。実験スケジュールを Table 2 に示した。

Table 1 実験に用いたヒト肝細胞キメラマウス

Group	No.	RI	Cortisol treatment	E5110 treatment
A	C60-1	64%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C60-2	71%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C60-3	73%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C61-8	68%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
B	C60-5	0%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C61-4	5%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C61-7	0%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
	C61-9	0%	5 mg/kg ip	5 mg/kg ip 4days
C	C69-1	95%	None	None
	C69-2	86%	None	None
	C69-10	80%	None	None
	C70-4	66%	None	None

RI: : Replacement index (%)

Table 2 実験スケジュール

実験日	Cortisol treatment	E5110 treatment	尿採取
1	Group A, Group B	None	Group A, Group B
2	None	None	Group A, Group B
3	Group A, Group B	None	Group A, Group B
4	None	None	Group A, Group B
5	None	None	Group A, Group B
6	Group A, Group B	None	Group A, Group B
7	None	None	Group A, Group B
8	Group A, Group B	None	Group A, Group B
9	None	None	Group A, Group B
10	None	None	Group A, Group B
11	Group A, Group B	None	Group A, Group B
12	None	Group A, Group C	Group A, Group B
13	None	Group A, Group C	Group A, Group B
14	None	Group A, Group C	Group A, Group B
15	None	Group A, Group C	Group A, Group B
16	Group A, Group B	Group A, Group C	Group A, Group B
17	None	None	Group A, Group B

B-2-2. 薬物投与

Cortisol は Fig. 1 に示した各個体 5 mg/kg/day を単回腹腔内投与を 48 時間から 120 時間毎、計 6 回投与した。E5110 は、Fig. 2 に示した Group における各個体につき、5 mg/kg/day を 5 日間腹腔内投与し、最終投与 24 時間後に肝臓を摘出した。

B-2-3. 尿中Cortisol及び6β-hydroxy cortisolの測定

尿試料 100 μL に内部標準 (0.5 μg/mL Dexamethasone) 溶液 10 μL、PBS 400 μL、25% 酢酸アンモニウム水溶液 500 μL および酢酸エチル 7 mL を加え、10 分間振とうした。遠心分離後の上清を採取し、窒素気流下

(40°C) 濃縮乾固した。残査に 20% メタノール水溶液 100 μL を加えて再溶解し、遠心分離後の上清を LC-MS/MS に 5 μL 注入した。

LC-MS/MS による分析は、LC-10ADvp ポンプ (島津製作所, Kyoto, Japan)、DGU-14A degasser (島津製作所), a CTO-10Avp column oven (島津製作所), an SIL-10ADvp auto injector (島津製作所) and an SCL-10Avp system controller (島津製作所)。

カラムは L-column (2.1 x 150 mm, 化学物質評価研究機構, Tokyo, Japan) を用い、移動相は、A: 0.02% ギ酸/水、B: 0.02% ギ酸/アセトニトリルの以下に示したグラジエントにて分析を行った。

時間 (分)	A%	B%	流速 (mL/min)
0.0	100	0	0.3
10.0	70	30	0.3
15.0	0	100	0.3
20.0	0	100	0.3
20.5	100	0	0.3
24.9	100	0	0.3
25.0	100	0	0.3

カラム温度は40°C、測定時間は25分で行った。

MS/MS method (MRM condition)

Compound	Parent (m/z)	Daughter (m/z)
Cortisol	548	351
6 β -OHF	224	224
IS (Dexamethason)	351	351

B-2-4. 肝からのtotal RNAの調製

Trisol 試薬のマニュアルに従い、以下の方法で肝臓から total RNA を調製した。約 50 mg の肝臓に、Trisol 試薬 1 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 0.2 mL を加えて攪拌した。室温で 10 分間放置した後、4°C、10,000 g で 10 分間遠心分離した。上清を別のチューブに採取し、0.5 mL のイソプロパノールを加えて室温にて 10 分間放置した後、4°C、10,000 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。

B-2-5. RT-PCR法によるヒト CYP 3A4 mRNA発現量の定量

B-2-4.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 μ g、Oligo dT (50 uM) 2.5 μ L、10x 逆転写反応用緩衝液 5 μ L、10 mM dNTPs 10 μ L、MMLV-逆転写酵素 1.25 μ L、DEPC 処理水を加えて全量を 50 μ L とした。この調製液を 48°C で 60 分間反応させた後、94°C 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 2.5 μ L、10 μ M センスプライマー 0.75 μ L、10 μ M アンチセンスプライマー 0.75 μ L、10x SYBR 緩衝液 2.5 μ L、25 mM MgCl₂ 3 μ L、2.5 mM dNTP 2 μ L、Ampli Taq Polymerase (5U/ μ L) 0.125 μ L に滅菌精製水を加え、全量を 25 μ L とした。いずれの遺伝子について ABI PRISM® 7900 HT System (Applied Biosystems, Foster 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 60 秒を 1 サイクル (2) 94°C で 15 秒、56°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 40 サイクル。ヒト CYP3A4 及び β -actin のそれぞれのプライマーヒト

CYP3A4 センスプライマー: (5'-TAGCTGAGGATGAAGAATGG-3'), アンチセンスプライマー: (5'-GTGGATTGTTGAGAGAGTCG-3') ヒト β -アクチン センスプライマー: (5'-TCACCCACACTGTGCCCA TCTACGA-3'), アンチセンスプライマー: (5'-CAGCGGAACCGCTCA TTGCCAATGG-3') を用いた。予備検討の結果より、本章で使用したヒト CYP3A4 及び β -actin プライマーは、マウス Cyp 及び β -actin と交差反応を示さないことを確認した。

C. 研究結果

C-1. キメラマウスにおける Cortisol 代謝の日間変動

Table 3 に 24 時間プールした尿中 Cortisol 及び 6β -OHF の測定結果を示す。実験開始 1 日目、Cortisol 投与前 24 時間までに排泄された尿中 Cortisol 及び 6β -OHF を測定した結果、高置換率及び低置換率キメラマウスいずれも検出限界未満であった。このことから、キメラマウスにおける内因性の Cortisol 及び 6β -OHF は無視できるものと考えられた。

Cortisol を負荷後 24 時間、実験開始 2, 4, 7 及び 9 日目の高置換率マウスの尿中へ排泄された総 6β -OHF 量は、664-1113 ng であった。

低置換率マウスの総 6β -OHF 量は、1163-1483 ng であり、低置換率マウスの方が総 6β -OHF 量が高いことから、Cortisol から 6β -OHF への代謝活性は、高置換率マウスのそれと比較して、高いと考えられた。

C-2. 非侵襲的 CYP3A4 の酵素誘導試験

高置換率マウス及び低置換率キメラマウスそれぞれに E5110 5mg/kg を 4 日間皮下投与した結果、酵素誘導の指標であるそれぞれの 6β -OHF/Cortisol の比は、Table 4 に示すように 0.8 及び 1.2 であり、低置換率マウスの方が E5110 による影響が大きかった。実験 1 及び実験 2 の結果から、マウス自体における Cortisol から 6β -OHF への代謝活性が、ヒトにおける活性より高いことから、Cortisol を基質とした場合の非侵襲的ヒト CYP3A4 の酵素誘導を正確に評価することが困難であった。

C-3. CYP3A4 mRNA 量測定

高置換率マウスを用いたヒト CYP3A4 mRNA 発現量の定量結果を Fig.1 に示す。E5110 投与により、mRNA 発現量は、約 3 倍の増加が認められた。

Table 3 高置換率マウス及び低置換率マウスにおける尿中 Cortisol 及び 6β-OHF 量

投与	実験日	高置換		低置換	
		F Mean ± SEM	6β-OHF Mean ± SEM	F Mean ± SEM	6β-OHF Mean ± SEM
F投与	1日目	NC	NC	NC	NC
	2日目	891 ± 123	1051 ± 116	1318 ± 325	1328 ± 142
F投与	3日目	55 ± 8	57 ± 6	114 ± 14	122 ± 23
	4日目	956 ± 223	859 ± 179	1483 ± 176	1486 ± 195
	5日目	307 ± 171	150 ± 55	235 ± 64	195 ± 32
F投与	6日目	NC	NC	NC	NC
	7日目	1113 ± 265	806 ± 136	1279 ± 202	1203 ± 247
F投与	8日目	26	21	115 ± 17	90 ± 17
	9日目	664 ± 259	580 ± 193	1163 ± 371	873 ± 183
	10日目	50 ± 9	45 ± 19	119 ± 34	81 ± 26
	11日目	NC	NC	NC	NC
E 5110投与	12日目	525 ± 165	510 ± 98	623 ± 83	987 ± 164
E 5110投与	13日目	19 ± 8	15 ± 5	18 ± 7	33 ± 8
E 5110投与	14日目	NC	NC	NC	NC
E 5110投与	15日目	NC	NC	NC	NC
F & E 5110投与	16日目	NC	NC	b	NC
	17日目				

F: Cortisol
NC: not calculated to be BQL (<10 ng/mL in sample)

Table 4 高置換率マウス及び低置換率マウスにおける尿中 6β-OHF/Cortisol 比

投与	実験日	高置換	低置換
		Mean ± SEM	Mean ± SEM
F投与	1日目	NC	NC
	2日目	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2
F投与	3日目	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
	4日目	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2
	5日目	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2
F投与	6日目	NC	NC
	7日目	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
F投与	8日目	0.5	0.8 ± 0.1
	9日目	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2
	10日目	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.2
	11日目	NC	NC
E 5110投与	12日目	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.2
E 5110投与	13日目	0.7 ± 0.2	1.3 ± 0.5
E 5110投与	14日目	0.5	NC
E 5110投与	15日目	NC	NC
F & E 5110投与	16日目	NC	NC
	17日目		

F: Cortisol
NC: not calculated to be BQL (<10 ng/mL in sample) in Cortisol and 6β-hydroxycortisol

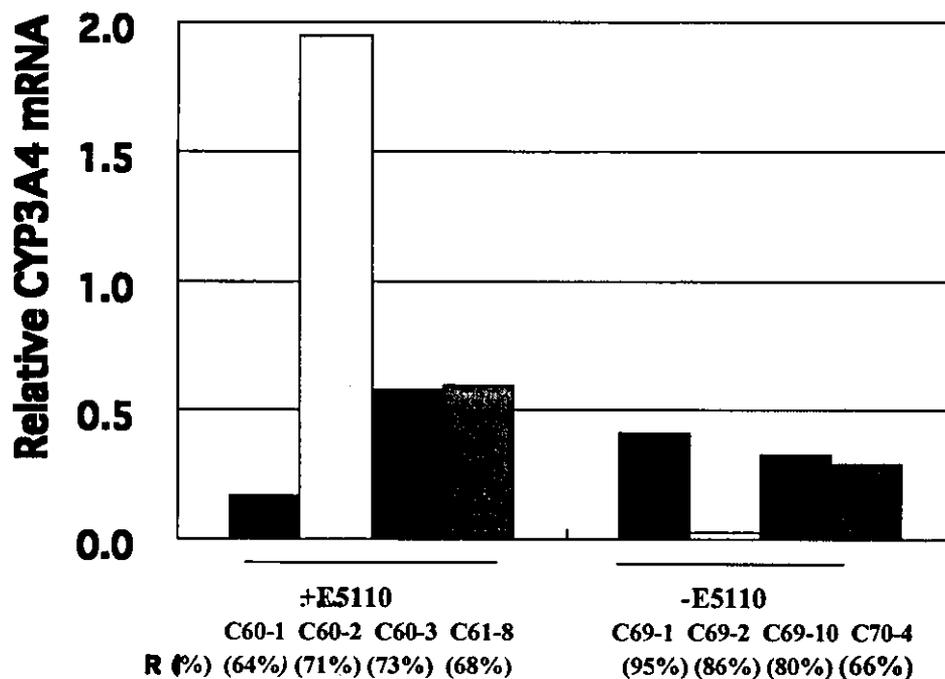


Fig.3 高置換率マウスに E5110 (5mg/kg/day) 処置及び未処置における CYP3A4 発現量の比較 (E5110 処置 (左)、未処置 (右) それぞれ 4 例)

E. 考察

ヒト尿中 6β -OHF の尿中排泄量濃度が、肝 CYP3A 活性と相関することを見出し、CYP3A4 酵素誘導のマーカーになることが報告されている (Ged et al, 1989, Yamamoto et al, 2000)。臨床第 1 相試験でヒトに E5110 投与 (40 mg/man/day, 2 週間反復経口投与) した時の 6β -OHF/Cortisol 比は、プラセボと比較して約 2 倍増加した (Horie et al, 1996)。本研究では、臨床用量の約 10 倍の E5110 5mg/kg 処置において、ヒト肝細胞キメラマウスにおいて尿中 6β -OHF を指標とした非侵襲的な CYP3A4 が観察さ

れば、ヒトの酵素誘導を精度良く予測できるモデルとなるものと考えられた。

キメラマウスに E5110 処置した結果、CYP3A4 の mRNA 発現量は、未処置と比較して約 3 倍増加したことから、臨床で見られた CYP3A4 誘導の裏づけを得た。

一方、非侵襲的な CYP3A4 酵素誘導については、低置換及び高置換キメラマウスそれぞれに 6β -OHF 量は検出されなかったが、負荷した Cortisol に対しては、置換及び高置換キメラマウスいずれも代謝物 6β -OHF の生成が認められ、その生成量は、低置換率マウスの方が高置

換率マウスより多かった。このことは、マウスにおける Cortisol から 6β -OHF への代謝活性がヒトと比較して、高いことが示唆された。その結果、ヒト由来の活性とマウス由来の活性とを分別できず、尿中 6β -OHF の変動では、ヒト CYP3A4 の酵素誘導を正確に見積もることが不可能であった。非侵襲的な CYP3A4 酵素誘導について、キメラマウスを利用して評価するためには、本実験で用いた Cortisol ではなく CYP3A4 選択的に代謝される化合物を用いた検討が不可欠と思われた。また、マウス由来の影響をなるべく排除するためにヒト肝細胞に高置換されたマウスを実験に供すことも重要であると考えられた。

F. 結論

ヒト CYP3A4 の酵素誘導については、ヒト肝細胞キメラマウスにおいても観察された。また、CYP3A4 選択的な基質を利用すればヒト肝細胞をもつキメラマウスにおいても非侵襲的な CYP3A4 酵素誘導の評価が可能であり、医薬品開発に大きく寄与できるものと期待される。

G. 健康危険情報：なし

H. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

I. 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

J. 補足（文中で使用した引用論文を示す）

Horie T, Nakata and Kusube K (1996) Basic strategy for avoiding drug interaction during stage of drug development. The proposal relative to planning of non-clinical and clinical studies how should it be the planning of clinical trials. *Journal of Toxicol Sci* 21: 331-339.

Ged C, Rouillon J.M., Pichrd L, Combalbert J., Bressot N., Bories P., Michel H., Braune P and Maurel P. (1989) The increase in urinary excretion of 6β -hydroxy cortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450 IIIA induction. *Br.J. Clin. Pharmacol.* 28: 373-387.

Yamamoto N, Tamura T, Kamiya Y, Sekine I, Kunitoh H and Saijo N (2000) Correlation between docetaxel clearance and estimated cytochrome P450 activity by urinary metabolite of exogenous cortisol. *Journal of Clinical Oncology* 18: 2301-2308.

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

分担研究者 内藤 真策 株式会社大塚製薬工場 栄養研究所 所長補佐

研究要旨

ヒト肝細胞をマウスに移植し、肝臓の大部分がヒト肝細胞で置換されたキメラマウスが開発され、ヒトにおける薬物相互作用を予測するため薬物代謝酵素の誘導作用を評価する試験系に利用できると考えられた。そこで、日本人あるいは白人由来の肝細胞を移植した3例のキメラマウスより得た凍結肝細胞を用い、初代培養系でのヒトCYP1A2およびCYP3A4の誘導作用を評価した。培養実験にはチトクロームP450の典型的な誘導薬として知られている基質を利用し、CYP1A2の誘導には β -naphthoflavone (β -NF)を用い、CYP3A4の誘導にはRifampicin (Rif)を用いた。実験ではDMSOを基質の溶媒とし、対照群を含めて全て0.1% DMSO存在下で検討した。分析はreal-time RT-PCR法で行った。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($p < 0.01$)。

今回の試験結果より、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ている。

A. 研究目的

臨床における薬物の代謝反応や薬理・毒性反応を考えると、動物実験に加えてヒト試料を用いた研究から重要な臨床予測指標を得ることができると考えられる。特に創薬における安全性研究において薬物相互作用の評価は重要な課題とされる。ヒトでの薬物動態における相互作用を予測するためには、代謝酵素の誘導と阻害に対する作用

を把握することが大切である。しかし、一般的な肝薬物代謝酵素であるP450酵素は種差が大きいため実験動物での結果が必ずしもヒトに反映するとはいえない。そこで、ヒト由来試料を用いたin vitro研究が重要となる。薬物代謝酵素に対する薬物の作用に酵素誘導があり、実験動物や培養肝細胞を用いて評価ができる。酵素誘導には種差がみられるが、ヒト培養肝細胞

を使用して、適切な陽性対照を用いた評価は、少なくとも種差が問題とならない。培養肝細胞を用いた酵素誘導の評価は、典型基質の代謝活性に加えて mRNA 発現量の変動を見ることによっても確認できる。薬物代謝酵素タンパクの発現調節は、遺伝子から mRNA への転写活性化も重要であり、介在する受容体が明らかにされつつある。そこで、mRNA レベルの変動は酵素誘導の初発因子として意義があるものと考えている。

薬物の暴露による薬物代謝酵素の誘導作用を検出するために、ヒト肝細胞が利用されるようになった (Bowen et al., 2000, Kostrubsky et al., 1998, Pichard-Garcia et al., 2000, Meunier et al., 2000)。ヒト肝細胞初代培養系において、 β -naphthoflavone (β -NF)は CYP1A1 および CYP1A2 の強力な誘導薬であることが報告されている (Meunier et al., 2000)。一方、ヒト肝細胞初代培養系において、Rifampicin (Rif)は CYP3A4 の強力な誘導薬である (Kostrubsky et al., 1998, Pichard-Garcia et al., 2000)。我々の研究においても、ヒト肝細胞初代培養系に Rif などの典型基質を暴露することにより薬物代謝酵素やトランスポーター遺伝子が誘導されることを既に示した (Nishimura et al., 2002)。

ところで、薬物相互作用の研究において薬物代謝酵素の誘導作用の評価に利用できるヒト肝細胞はわずかであり、さらに日本人由来の試料は皆無である。今回、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)により、uPA/SCID マウスにヒト肝細胞を移植する方法で、肝臓の大部分がヒトの肝細胞に置換したキメラマウス(ヒト肝臓への置換率は約 80%)が開発された

(Tateno et al., 2004)。多くの研究者がこのキメラマウスから調製したヒト肝細胞を利用し薬物代謝酵素の評価が可能になればヒト肝細胞の需要と供給のバランスは改善されると考えられる。

本報告では、日本人あるいは白人由来の肝細胞を移植したキメラマウスの肝臓から遊離肝細胞を調製しプログラムフリーズの手法で、長期保存ができ輸送可能な凍結肝細胞を得た。これを用いた肝細胞初代培養系における CYP1A2 および CYP3A4 の誘導についての研究を行った。分析は TaqMan プローブ存在下、ABI 社製 PRISM 7700 を用い、real-time RT-PCR 法で行った。

B. 研究方法

B-1. 試薬

β -NF および Rif は和光純薬工業 (Osaka, Japan)より購入した。Rneasy[®] Mini Kit および QIAshredder[™] は QIAGEN (Hilden, Germany)より購入した。酵母 tRNA は Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)より購入した。TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents、TaqMan GAPDH Control Reagents、TaqMan β -Actin Control Reagents は Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)より購入した。

全ての試薬は分析用グレードを使用した。

B-2. ヒト肝細胞キメラマウス

本試験は株式会社大塚製薬工場の倫理委員会の承認を得て実施した。

凍結で保存されていたヒト肝細胞(性別：男性、年齢：12 歳、人種：日本人、あるいは、性別：男性、年齢：13 歳、人種：白人)を用い、uPA/SCID マウスに移植し、肝臓の大部分がヒト

Table 1. Characteristics of chimeric mice and hepatocyte preparations

Mouse No.	1	2	3
Donor	A	B	B
Replacement index (%)	about 80	>80	>80
Sex (mouse)	male	male	female
Viability (%)	60.1±3.8	70.1±1.1	57.8±3.6

A, Japanese, male, 12 years old; B, Caucasian, male 13 years old. Viability was determined by trypan blue dye exclusion. Viability data represent mean±SD of three independent experiments.

肝細胞に置換したキメラマウス(マウス肝臓からヒト肝臓への置換率は約80%)を得た。この手法は Tateno ら(2004)により構築された。キメラマウス肝臓の灌流と遊離肝細胞の調製は、Seglen らの方法(1976)で行った。得られたキメラマウス遊離肝細胞はプログラムフリーザーで凍結し超低温で保存した。輸送においては、液体窒素で平衡化した専用コンテナを用いた。

B-3. 肝細胞の単層培養

凍結肝細胞の単層培養は Nishimura ら(2002)の方法で行った。解凍後の肝細胞に培養液を加えて懸濁し、遠心分離により洗浄して調製したキメラマウス肝細胞の生細胞率(viability)は、トリパンブルー色素排除法によって評価した。その結果、57.8~70.1%の viability を示す肝細胞浮遊液を得て培養実験に使用した(表1)。

常法に従って、肝細胞はヒト上皮細胞成長因子(hEGF)、ゲンタマイシンおよびアンフォテリシン B を含む培養液を用いて、5% CO₂-95% O₂、37°Cの条件下で培養した。

B-4. 培養肝細胞に試験物質の暴露

細胞播種 48 時間後からは、ヒト上皮細胞成長因子(hEGF)、ゲンタマイシンおよびアンフォテリシン B を含まない培養液に交換し、典型的な誘導薬を含む培養液に交換してさらに 24 時間暴露した。β-NF の影響は 1 μM および 5 μM の濃度で、Rif は 10 μM および 50 μM の濃度で検討した。β-NF および Rif は、いずれも DMSO に溶解させ、DMSO の最終濃度は 0.1% とした。mRNA 発現に及ぼす DMSO の影響を評価するため、0.1% DMSO を加えた正常対照群を培養実験に加えた。mRNA 分析に用いるために、所定の処置を行ったキメラマウス培養肝細胞からは Rneasy[®] Mini Kit and QIAshredder[™] を用いて total RNA を抽出した。

B-5. mRNA 分析

オリゴヌクレオチドについて、RT-PCR に用いる CYP1A2 と CYP3A4 用の forward primer および reverse primer と TaqMan probe は、既に報告した配列を採用した(表2) (Nishimura et al., 2002)。プライマーとプローブは QIAGEN(Tokyo, Japan)で合成した。TaqMan probe は 5' 端末に

Table 2. Primers and probes used for RT-PCR analysis.

mRNA	Sequence	Position
CYP1A2 (GenBank accession number AF182274)		
Forward primer	TGTTCAAGCACAGCAAGAAGG	860-880
Reverse primer	TGCTCCAAAGACGTCATTGAC	951-931
Probe	CTAGAGCCAGCGGCAACCTCATCCCA	884-909
CYP3A4 (GenBank accession number AF182273)		
Forward primer	GATTGACTCTCAGAATTCAAAGAAACTGA	825-854
Reverse primer	GGTGAGTGGCCAGTTCATACATAATG	973-948
Probe	AGGAGAGAACACTGCTCGTGGTTTCACAG	946-918

All sequences are shown from the 5' to 3' end.

6-carboxyfluorescein (FAM)、3'末端に6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)を含み、これらは PCR プライマー間に位置する配列にハイブリダイズするように設計した。

キメラマウス肝細胞から調製した total RNA は 50 µg/mL 酵母 tRNA を用い 4 µg/mL に希釈した。RT-PCR アッセイは forward primer、reverse primer および TaqMan probe と約 20 ng の total RNA を含む、50 µL の TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix 試薬を用いた。増幅および検出は ABI PRISM 7700 Sequence Detector system (Applied Biosystems)を用いた。分析では、48°C 30分、95°C 10分の後に、95°C 15秒と 60°C 1分を 40回繰り返した。GAPDHには、200 nM forward primer、200 nM reverse primer と 100 nM TaqMan probe を、β-actinには、200 nM forward primer、200 nM reverse primer と 100 nM TaqMan probe を用い、CYP1A2 および CYP3A4には、300 nM forward primer、900 nM reverse primer と 200 nM TaqMan probe を用いた。

B-6. 統計解析

データ解析は ABI PRISM sequence detection software により行った。各 mRNA の相対発現量の解析は、既に報告している ΔCt (ターゲットの mRNA 量から GAPDH の mRNA 量を減じて得た値)を用いる方法で計算した。すなわち、β-actin mRNA に相対する目的の mRNA の総量は $2^{-(\Delta Ct)}$ として表される。データはターゲットの mRNA と β-actin の mRNA の比率として表わされる。さらに、数値は正常対照群に対する%を表している。ヒト肝細胞の培養を含む実験は duplicate で行い、平均値を算出した。さらに、データは3例のドナーマウスの mean ± SD として示した。統計解析は有意水準を 5%とした Student's *t*-test で行った。

C. 研究結果

C-1. ヒト肝細胞キメラマウスから凍結肝細胞の調製と実験への適用

凍結で供給された日本人(donor A)あるいは白人(donor B)の肝細胞(表 1)

を移植することにより、肝臓の大部分がヒト化したキメラマウスを作成した。両ドナーを移植し、ヒト肝細胞が生着して置換が確認されたキメラマウスの肝臓を用いて凍結肝細胞を調製し、これを解凍することによりヒト凍結肝細胞初代培養系における CYP1A2 および CYP3A4 の誘導作用を評価した。測定は TaqMan プローブ存在下、ABI 製 PRISM 7700 を用いたリアルタイム RT-PCR 法で行った。

C-2. ヒト型 mRNA 分析法の特異性の確認

ヒト型の β -actin、GAPDH、CYP1A2 あるいは CYP3A4 mRNA に対するプライマーセットとプローブを用いた RT-PCR で、ヒトとマウスの肝臓の total RNA に対する特異性を調べたところ、ヒトの肝臓の total RNA に対するマウスの肝臓の total RNA での交差

性は human β -actin、GAPDH、CYP1A2 および CYP3A4 とともに 0.000002 未満であった。

C-3. ハウスキーピング遺伝子発現の経時変化に関する評価

マウス No.1 におけるハウスキーピング遺伝子である GAPDH と β -actin の比は、培養開始時(0h)および培養開始 3 時間後にそれぞれ、 12.0 ± 0.5 および 2.46 ± 0.49 であり、24 時間後に初期値の約 10%に低下し、その後は一定値を示した(図 1)。マウス No.2 と 3 においても同様の傾向がみられた。

C-4. CYP1A2 および CYP3A4 遺伝子発現の経時変化に関する評価

マウス No.1、2 および 3 において、CYP1A2 mRNA と β -actin mRNA の比は培養 24 時間でそれぞれ培養開始時の $0.474 \pm 0.041\%$ 、 0.362% および

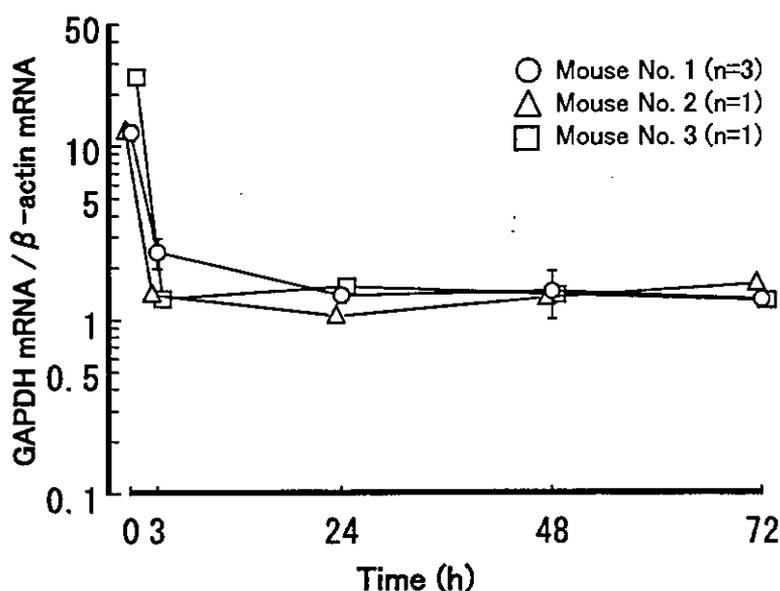


Figure 1. Changes of human GAPDH mRNA expression in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver.

Data are expressed as the ratio of human GAPDH mRNA to human β -actin mRNA. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments in mouse No. 1 and individual values in mice No. 2 and 3.

0.910%に低下し、その後は一定であった(図 2A)。培養 72 時間後の No.1、2 および 3 のキメラマウスの CYP1A2 mRNA レベル (それぞれ CYP1A2 mRNA / β -actin mRNA 比: 0.0736 ± 0.0082 , 0.0515 および 0.104) (図 2A)は凍結ヒト肝細胞の結果の 2 から 5 倍の高値(0.0204 ± 0.0166) (Nishimura et al., 2003a)であった。マウス No.1、2 およ

び 3 において、CYP3A4 mRNA と β -actin mRNA の比は培養 48 時間でそれぞれ培養開始時の $0.0346 \pm 0.0073\%$ 、 0.113% および 0.0402% に低下し、その後培養開始 72 時間後まで一定で推移した(図 2B)。培養 72 時間後の No.1、2 および 3 のキメラマウスの CYP3A4 mRNA レベル(それぞれ CYP3A4 mRNA / β -actin mRNA 比: $0.0101 \pm$

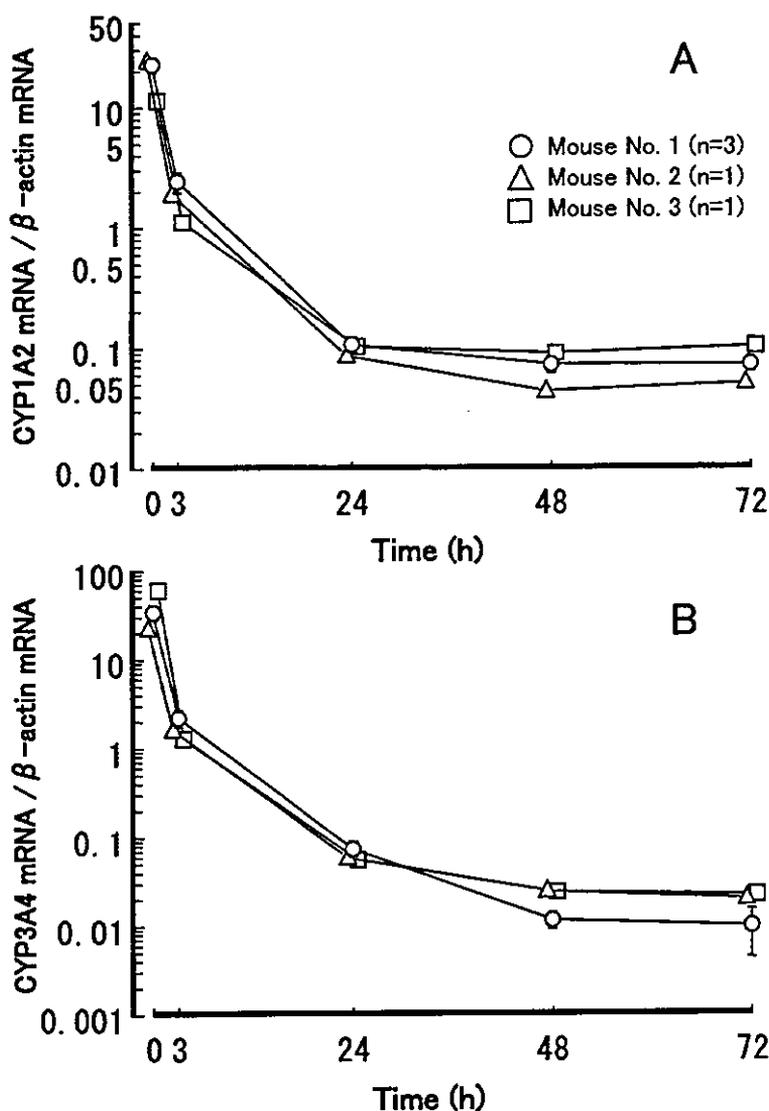


Figure 2. Changes of human (A) CYP1A2 and (B) CYP3A4 mRNA expression in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver.

Data are expressed as the ratio of human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA to human β -actin mRNA. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments in mouse No. 1 and individual values in mice No. 2 and 3.

0.0056、0.0205 および 0.0226) (図 2A) は凍結ヒト肝細胞の結果の3から6倍高値(0.00373 ± 0.0026) (Nishimura et al., 2003a)であった。

C-5. 典型基質を用いた CYP1A2 と CYP3A4 の誘導作用についての評価

ヒト型の CYP1A2 mRNA は $5 \mu\text{M}$ の $\beta\text{-NF}$ 暴露により、マウス No.1、2 および3のキメラマウス肝細胞においてそれぞれ 0.1% DMSO を含む正常対照群と比較して 3.8 倍、6.3 倍および 3.3 倍と顕著な誘導が確認された($p < 0.01$) (図 3)。ヒト型の CYP3A4 mRNA は $10 \mu\text{M}$ の Rif 暴露により、マウス No.1、2 および3のキメラマウス肝細胞においてそれぞれ 0.1% DMSO を含む正常対照群と比較して 1.9 倍、2.0 倍($p < 0.05$) および 2.8 倍($p < 0.05$)と誘導が確認された。さらに、ヒト型の CYP3A4 mRNA は $50 \mu\text{M}$ の Rif 暴露により、マウス No.1、2 および3のキメラマウス

肝細胞においてそれぞれ 0.1% DMSO を含む正常対照群と比較して 8.4 倍($p < 0.001$)、2.2 倍($p < 0.01$)および 2.3 倍($p < 0.05$)と顕著な誘導が確認された($p < 0.01$) (図 4)。

D. 考察

ヒトとマウスの mRNA 配列におけるホモロジーは高く、mRNA 分析では交差性が問題となる。ヒトの mRNA をターゲットとして確立した分析系でもマウスの同種 mRNA との交差性が否定できない。本研究では試料にヒトとマウス由来の細胞が混在しているため、ヒト mRNA 分析法がヒト特異的であることを確認し、得られた結果がヒト肝細胞に特有の反応であることを明らかとした。我々の分析法は、ヒト型 $\beta\text{-actin}$ 、GAPDH、CYP1A2 あるいは CYP3A4 mRNA について、マウス肝臓の total RNA で調べた交差性は非常に小さく、ヒト mRNA をターゲッ

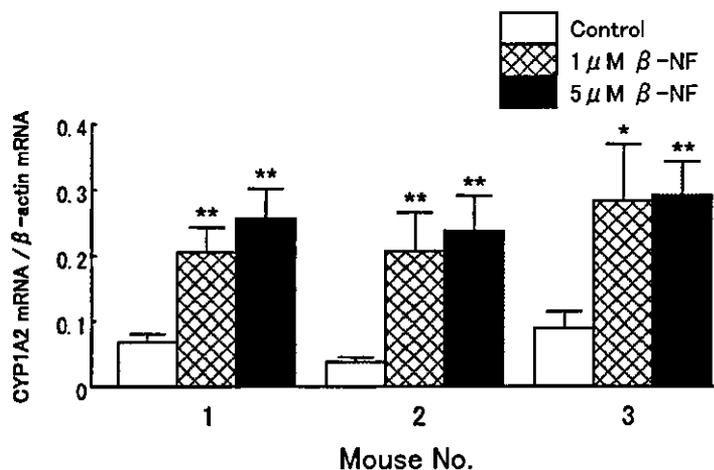


Figure 3. Effect of $\beta\text{-NF}$ exposure on the expression of human CYP1A2 mRNA in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver.

$\beta\text{-NF}$ (1 and $5 \mu\text{M}$) were exposed for 24 hrs. Data are expressed as the ratio of human CYP1A2 mRNA to human $\beta\text{-actin}$ mRNA. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. the 0.1% DMSO control sample.

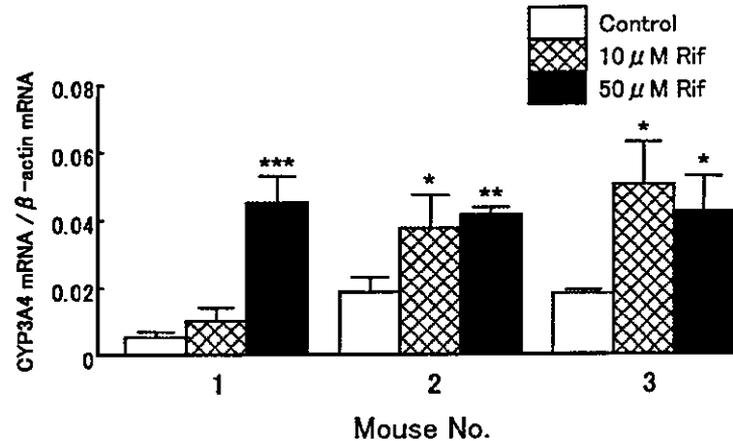


Figure 4. Effect of Rif exposure on the expression of human CYP3A4 mRNA in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver.

Rif (10 and 50 μM) were exposed for 24 hrs. Data are expressed as the ratio of human CYP3A4 mRNA to human β-actin mRNA. Data represent the mean±SD of three independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. the 0.1% DMSO control sample.

トとしている特異性の面で満足すべき結果であった。すなわち、本研究で示した結果は、ヒト肝細胞固有の反応のみを捕らえていると言える。さらに、ヒトの total RNA 中での CYP1A1 と CYP1A2 mRNA 間での交差性が無いことについては Furukawa ら(2004)によって、また CYP3A4 と CYP3A5 の交差性がないことについては、我々の研究(Nishimura et al., 2004)によって既に報告している。これらの結果から、本研究に用いたプライマーセットとプローブの特異性は十分であることが確認できた。

培養開始後にハウスキーピング遺伝子である GAPDH と β-actin の比が低下した後一定値を示す変動は、既に我々が報告している凍結ヒト肝細胞の培養結果と近似している(Nishimura et al., 2003a)。この結果から、GAPDH と β-actin の比が一定となった培養 48 時間後からは、細胞の状態が安定して酵素誘導能評価に適用可能と考えら

れた。なお、GAPDH と β-actin の比は、培養細胞への暴露実験に用いた全ての試験物質の結果においても一定であった。

さらに、CYP3A4 mRNA 発現も経時的に変化し、β-actin mRNA の比でみると、培養 48 時間には大きく低下し、その後は同程度に推移していた。我々の研究では、既に CYP3A4 mRNA と β-actin mRNA の比は培養 72 時間後で 0.13%に低下することを報告している(Nishimura et al., 2003a)。また、Bowen ら(2000)はヒト肝細胞を用いて、CYP3A4 mRNA の初期発現量と培養 5 日後の発現量を比較し、CYP3A4 mRNA は培養 5 日後では初期値に対して 1%に低下することを報告している。また、CYP1A2 や CYP3A4 の発現レベルについて、ドナー間で違いがみられるが、Bowen ら(2000)と Royman ら(2004)も数倍かそれ以上の違いがあることを報告している。従って、我々は培養系におけるキメラマウス由来の

凍結肝細胞とヒト肝細胞の mRNA 発現レベルは同程度と考えている。

培養細胞を暴露させる薬物の溶媒として用いた DMSO の影響に関して、我々は、既に DMSO 存在下でのヒト凍結肝細胞初代培養系における CYP1A2 および CYP3A4 mRNA の発現に及ぼす影響について検討しており、薬物暴露による誘導試験には DMSO 濃度が 0.1% もしくはそれ以下であれば適切であることを示唆した (Nishimura et al., 2003a)。そのため、今回のキメラマウスの肝臓を用いた肝細胞初代培養系での誘導作用を評価する実験では 0.1% DMSO 存在下で実施した。

初代培養肝細胞を用いた酵素誘導の評価にキメラマウスから得たヒト肝細胞が利用できる可能性については、典型基質を用いた CYP1A2 と CYP3A4 の誘導作用を指標として評価した。β-NF の暴露により観察されたヒト型の CYP1A2 mRNA の誘導は、Garcia ら(2003)の凍結ヒト肝細胞を用いた報告と類似している。また、Rif による CYP3A4 mRNA の発現の上昇は Bowen ら(2000)および Sahi ら(2003)の新鮮なヒト肝細胞での報告や、Roymans ら(2004)や Garcia ら(2003)の凍結ヒト肝細胞での報告と類似している。また、我々の凍結ヒト肝細胞を用いた報告とも類似していた (Nishimura et al., 2002)。

E. 結論

本研究結果より、市販されているヒト肝細胞と同様に、肝臓の大部分がヒト化したキメラマウスの凍結肝細胞初代培養系は、ヒトの薬物代謝酵素の誘導作用を評価するのに有用であることを示している。

キメラマウスの手法を用いること

により、少量のヒト肝臓試料を機能を損なうことなく増殖することが可能になり、本研究のようにキメラマウスで日本人の肝細胞を増殖させることにより日本人試料由来の凍結肝細胞の供給も可能であると考えられる。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

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

2. 学会発表

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、平成 15 年 3 月 27-29 日、長崎

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)

Bowen, W. P., Carey, J. E., Miah, A., McMurray, H. F., Munday, P. W., James, R. S., Coleman, R. A. and Brown, A. M.: Measurement of cytochrome P450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Drug Metab. Dispos. 28: 781-788 (2000).

Furukawa, M., Nishimura, M., Ogino, D., Chiba, R., Ikai, I., Ueda, N., Naito, S.,