

- Kuribayashi, S., Moustafa, M. A., Uchida, T., Sawada, H., Kamataki, T., Funae, Y. and Fukumoto, M.: Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci.*, **95**: 520–529 (2004).
- Garcia, M., Rager, J., Wang, Q., Strab, R., Hidalgo, I. J., Owen, A. and Li, J.: Cryopreserved human hepatocytes as alternative in vitro model for cytochrome P450 induction studies. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **39**: 283–287 (2003).
- Kostrubsky, V. E., Lewis, L. D., Strom, S. C., Wood, S. G., Schuetz, E. G., Schuetz, J. D., Sinclair, P. R., Wrighton, S. A. and Sinclair, J. F.: Induction of CYP3A by Taxol in primary cultures of human hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **355**: 131–136 (1998).
- Meunier, V., Bourrie, M., Julian, B., Marti, E., Guillou, F., Berger, Y. and Fabre, G.: Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica*, **30**: 589–607 (2000)
- Nishimura, M., Imai, T., Morioka, Y., Kuribayashi, S., Kamataki, T. and Naito, S.: Effects of NO-1886 (Ibrolipim), a lipoprotein lipase-promoting agent, on gene induction of cytochrome P450s, carboxylesterases, and sulfotransferases in primary cultures of human hepatocytes. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**: 422–429 (2004).
- Nishimura, M., Yoshitsugu, H., Naito, S. and Hiraoka, I.: 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 (2002).
- Nishimura, M., Ueda, N. and Naito, S.: Effects of dimethyl sulfoxide on the gene induction of cytochrome P450 isoforms UGT-dependent glucuronosyl transferase isoforms, and ABCB1 in primary culture of human hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**: 1052–1056 (2003a).
- Nishimura, M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito, S. and Satoh, T.: Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, **123**: 369–375 (2003b).
- Pichard-Garcia, L., Hyland, R., Baulieu, J., Fabre, J., Milton, A. and Maurel, P.: Human hepatocytes in primary culture predict lack of cytochrome P-450 3A4 induction by eletriptin in vivo. *Drug Metab. Dispos.*, **28**: 51–57 (2000).
- Roymans, D., Van Looveren, C., Leone, A., Parker, J. B., McMillian, M., Johnson, M. D., Koganti, A., Gilissen, R., Silber, P., Mannens, G. and Meuldermans, W.: Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **67**: 427–437 (2004).
- Sahi, J., Black, C. B., Hamilton, G. A., Zheng, X., Jolley, S., Rose, K. A., Gilbert, D., LeCluyse, E. L. and Sinz, M. W.: Comparative effects of thiazolidinediones on in vitro P450 enzyme induction and inhibition. *Drug Metab. Dispos.*, **31**: 439–446 (2003).
- Seglen, P.O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**: 29–83 (1976).

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

ヒト肝細胞を移植したキメラマウスにおける  
薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現解析

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

ゲノム情報を基盤とした創薬科学は、新薬開発のいろいろな場面で有効利用されるようになってきた。ファーマコゲノミクス(PG)から得られる情報群は大きく分けて2つのカテゴリーがあり、DNAの解析によるSNPs情報とmRNA発現量の情報になる。具体的には代謝酵素やトランスポーターの遺伝子多型の研究、SNPsで層別した臨床試験などがある。一方、mRNA発現と関連した開発研究も盛んで、DNAチップ(薬効・毒性マーカーなど)、トランスジェニック動物やヒト遺伝子発現細胞の利用、mRNA発現でみた酵素誘導の研究などがある。また、DNAからmRNAの発現には各種の制御機構が知られており、タンパク質の発現と活性にも影響を与える。薬理活性や毒性発現においても関連する酵素タンパクの発現を制御するmRNA発現量は注目されている。

我々は、ヒト肝細胞を移植して肝臓の大部分がヒト化したキメラマウスを用い、ヒト薬物代謝酵素およびトランスポーターのmRNA発現について検討した。mRNA発現量はリアルタイムRT-PCR法で測定した。その結果、キメラマウス肝臓試料より20種類のヒトP450分子種mRNAを含む52種類のヒト第1相薬物代謝酵素mRNAの発現を確認した。また、ヒト第2相薬物代謝酵素mRNAは26種類の発現を確認し、ヒト・トランスポーターmRNAは21種類の発現が確認できた。薬物代謝酵素に加えて、アルブミンのような内因性物質の合成と分泌などの肝臓機能を維持するためには、mRNAの発現を含む細胞内の生理的な活動は極めて重要と考えられる。キメラマウス肝臓の薬物動態機能を測る指標として、薬物代謝酵素やトランスポーターのmRNAに関し、ドナーの肝臓に対してキメラマウス肝臓での発現比率の頻度を見ると、中心値が0.46であった。一方、キメラマウス肝臓におけるマウスのCyp酵素mRNAの発現比率は、正常対照群のマウス肝臓での結果に対して、Cyp2b10の結果を除くと平均で0.19であった。ヒトmRNAあるいはマウスmRNAの発現率の結果は、ヒトアルブミン遺伝子の発現率、あるいはキメラマウスにおける血中ヒトアルブミン濃度から推定したマウス肝臓からヒト肝臓への置換率と良く相関していた。

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

## A. 研究目的

臨床現場で見られる薬物相互作用は、ある薬物が他の薬物の代謝を変化させることによって生じる場合が多い。この薬物動態的な相互作用は、一般的に薬物の消失で律速となる過程に関与する代謝酵素の阻害あるいは誘導に起因していると考えられる。薬物代謝酵素の誘導は薬物の代謝と動態に大きな影響を与え、臨床症状としての薬物相互作用を生じさせることが報告されている(Waxman, 1999)。

新薬候補化合物はヒトにおける代謝について前臨床試験の中でさまざまな手法により検討されている。ヒト肝ミクロソームやヒト CYP 発現系から調製されたミクロソーム、ヒト肝細胞、cDNA を発現させた培養細胞系などを用いた *in vitro* 研究が報告されている。しかし、これらの *in vitro* 試験系には幾つかの利点と限界がある(Gomez-Lechon et al., 2003; Rodrigues and Rushmore, 2002)。ヒト肝ミクロソームは市販品を入手でき、CYP 酵素の代謝活性を損なうことなく凍結保存して代謝実験に利用できるが、誘導実験に用いることはできない。一方、ヒト肝細胞は全ての薬物代謝酵素を保持しているものの培養により酵素活性は減少する。また、ヒト由来試料はいずれも供給が限られている。一方、実験動物を用いた *in vivo* 研究は生体での薬物動態を明らかにできるが、ヒトと動物の CYP 酵素にはしばしば種差が存在していることも確かである。

人工肝臓の開発も試みられており、不死化したヒト肝細胞を用いた報告がある(Watanabe et al., 2003)。このモデルでは、CYP3A4 と CYP2C9 タンパクの発現が確認されているものの酵素活性は明確ではない。近年において、ヒト肝細胞を用いた初代培養系で酵

素誘導に関する報告が多くみられるようになった(Bowen et al., 2000; Lindley et al., 2002; Hesse et al., 2003; Roymans et al., 2004; Garcia et al., 2003)。Baliharováらは継代培養が可能なヒト肝細胞である HepG2 を用いて CYP1A の誘導を評価している(Baliharová et al., 2003)。Walleらは HepG2 を用いて UDP-グルクロニルトランスフェラーゼの誘導を評価している(Walle et al., 2000)。HepG2 は比較的扱いやすい培養細胞系でありヒトの機能を再現することが可能である。しかし、HepG2 における薬物代謝酵素の発現はヒトの *in vivo* と異なる部分も多く(Wilkening et al., 2003)、臨床で見られる代謝や誘導を予測するためにはあまり適切な試験系ではない。従って、臨床での薬物の代謝や誘導作用を予測するには、やはりヒト肝細胞を用いた研究が有用である。さらに、Liらは短期間の薬物代謝とか薬物による細胞毒性の評価に凍結で供給されたヒト肝細胞を用いた検討が有用と報告している(Li et al., 1999)。

さて、マウスにウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)と組替え型の activation gene-2 を導入し、成人の肝細胞を移植し 15%がヒト型に置換されたモデルに、ヒト B 型肝炎ウイルスを播種できたことが報告されている(Dandri et al., 2001)。Mercerらは、uPA<sup>+/+</sup>/SCID マウスを用いてヒト肝細胞が生着した肝臓組織像を示し、さらにヒト C 型肝炎ウイルスに感染することを報告している(Mercer et al., 2001)。これらの研究は、肝炎ウイルスに対する新薬の開発や再生医療の進歩に役立つものと思われる。しかしながら、マウス肝臓に対するヒト肝臓の置換率は低く不十分な結果である(Dandri et al., 2001; Mercer et al., 2001)。

そこで、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、uPA/SCID マウスにヒト肝細胞を移植することにより肝臓の 80%以上がヒト肝細胞に置換されたキメラマウスが作られた(Tateno et al., 2004)。ほぼ完全にヒト肝細胞で置換されたキメラマウスの肝臓を用いた研究はヒトの薬物代謝の予測に利用できると考えられる。

医薬品の開発研究において、mRNA 発現量の解析から薬物による代謝酵素の阻害や誘導作用の評価を考えた場合、組織あるいは細胞試料等から調製した total RNA を出発として、mRNA 発現量を分析するハイスループットで網羅的な分析法には DNA チップがある。一方、個々の mRNA 発現量の検討にはノーザンブロット法がある。まず、RNA 試料から cDNA を調製した後に、目的の mRNA 配列に特異的なプライマーを使用して PCR 反応により増幅し、増幅産物を電気泳動後に検出して測定する。この方法により半定量的に mRNA の増減を観察できる。mRNA 発現解析は、情報の有用性が注目されるのに従って、さらに高感度でハイスループットな種々の mRNA 分析法が考案されてきた。比較的実用化が進んでいる手法には、シグナル増幅の bDNA 法、ターゲット増幅の TaqMan 法と、増幅系を必要としない Invader 法の 3 種類がある。その中で、我々は Applied Biosystems 社により開発された TaqMan Assay を利用した mRNA 分析法を利用した。本法は PCR 法により RNA を増幅する反応を利用している。ただし、PCR 反応産物の定量は難しいため、TaqMan Probe が分解されて生じる蛍光を検出するのが特徴である。TaqMan Probe をはさんでプライマーを設計し、プライマーの伸

張反応で TaqMan Probe が分解されて蛍光を発し、この蛍光が検出されたときの PCR サイクル数から mRNA 量が定量する。細胞などから得た少量の total RNA で分析でき特異性が高いのが特徴である。

本研究ではキメラマウスの肝臓から得た試料を用い、リアルタイム RT-PCR 法でヒト CYP 酵素等の mRNA 発現を検討し、新薬開発の研究における新しい実験法としての可能性を評価した。

## B. 研究方法

### B-1. 試薬

研究の中で total RNA の抽出に用いた Isogen は Nippon Gene (Tokyo, Japan) より購入した。そして、total RNA の希釈に用いた酵母 tRNA は Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA) より購入した。mRNA の分析には TaqMan One-Step RT-PCR Master mix reagents、TaqMan GAPDH control reagents、TaqMan  $\beta$ -actin Control Reagents、Micro Amp Optical 96-Well reaction Plates、Optical Adhesive Covers および Optical Cover Compression Pads を用い、これらは Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) より購入した。その他の試薬は全て分析用グレードを使用した。

### B-2. ヒト化した肝臓を有するキメラマウスの作製

本研究を開始するのに際し、研究計画は広島県地域結集型共同研究事業および株式会社大塚製薬工場の倫理委員会で審査を受け承認されている。キメラマウス作成のためのドナーとなったヒト肝臓(性別：男性、年齢：12 歳、人種：日本人)はインフォームドコンセント得て入手した。

ヒト化した肝臓を有するキメラマウスの作製法は既に立野らが報告している(Tateno et al., 2004)。生後 20~30 日齢の  $uPA^{+/+}/SCID$  マウスの腹部左手に小さな側腹切開を行い、脾臓下部にヒト肝細胞を注入する。そして、必要に応じて消炎剤のタンパク分解酵素阻害剤メシル酸ナファモスタットを腹腔内に投与した。キメラマウス血中のヒトアルブミン濃度は酵素免疫測定法(ELISA)で求め、また、解剖時のマウス肝臓切片をヒトサイトケラチン 8/18 抗体で免疫染色した結果より、マウス肝臓からヒト肝臓への置換率を求めた(Tateno et al., 2004)。実験には 11-14 週齢の雄性キメラマウスを用いた(表 1)。なお、本研究に使用した  $uPA^{+/+}/SCID$  マウス、 $uPA^{-/-}/SCID$  マウスおよび  $uPA^{+/-}/SCID$  マウスに関しては、既に立野らが報告している(Tateno et al., 2004)。

### B-3. オリゴヌクレオチドの設計

SULT1B1、TPST1、アルブミンおよびトランスフェリン用のプライマーと TaqMan Probe は Primer Express software (Applied Biosystems)を用いて設計した。オリゴヌクレオチドのヌクレオチドの位置を表 2 に示した。プライマーおよびプローブの一方または両方がターゲット mRNA 転写に特異的であることを確認するために NCBI BLAST でホモロジー検索した。その他のヒト mRNA 測定用のフォワード、リバープライマーおよび TaqMan Probe は、既に報告した配列を用いた(Nishimura et al., 2002, 2003a)。RT-PCR に使用したマウスのターゲット mRNA は Pan らが報告した配列を用いた(Pan et al., 2000)。プライマーおよび TaqMan Probe は QIAGEN Japan (Tokyo, Japan)で合成した。TaqMan Probe は 5' 末端に 6-carboxyfluorescein (FAM)、3' 末端に 6-carboxytetramethylrhodamine

Table 1. Chimeric mice used in the present study.

Mouse No.	hAlb <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>
	mg/ml	%
1	10.7	71
2	7.1	84
3	5.1	89
Mean	7.6	81
(SD)	(2.8)	(9)

Data represent individual values and mean  $\pm$  SD of three mice.

Donor: Japanese, male, 12 years old.

<sup>a</sup>Human albumin concentration in chimeric mouse.

<sup>b</sup>Replacement index.

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

mRNA	Sequence	Position
SULT1B1 (GenBank accession number NM_014465)		
Forward primer	TGGCTCGTAATGCCAAGGA	860–880
Reverse primer	CAGGAACCATAGGCCACTTTT	951–931
Probe	CAGCCTTTTCCTGGTACCTGGGAAGAATATCT	884–909
TPST1 (GenBank accession number NM_003596)		
Forward primer	TTGCTCCTATGCTTGCCAA	950–968
Reverse primer	TTGGGATCAGGTTTTCCGTAG	1022–1002
Probe	TGGATATGACCCATATGCCAACCCACCT	972–999
albumin (GenBank accession number XM_031322)		
Forward primer	CCAGAATGCGCTATTAGTTCGT	1281–1302
Reverse primer	ACATTTGCTGCCCACTTTTCC	1383–1363
Probe	CACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCC	1305–1334
transferrin (GenBank accession number XM_002793)		
Forward primer	AGTGTGTATCAGCAGAGACCACC	1157–1179
Reverse primer	TGCCCGCTATGTAGACAAACC	1258–1238
Probe	TGCATCGCCAAGATCATGAATGGA	1186–1209

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

(TAMRA)を持ち、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。

#### B-4. Total RNA の調製と TaqMan RT-PCR の条件

ドナーの肝臓組織、キメラマウスおよび uPA<sup>-/-</sup>/SCID マウス(正常対照群)からの total RNA の抽出は Isogen を用いて実施した。肝の 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 300 nM の forward primer、900 nM の reverse primer および 200 nM の TaqMan Probe と 20

ng の total RNA を含む TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix 試薬を 50 µL 用いた。増幅と検出は ABI PRISM 7700 Sequence Detector system (Applied Biosystems)を用い、48°C 30 分間で 1 cycle、95°C 10 分間で 1 cycle、そして 95°C 15 秒間と 60°C 1 分間を 40 cycle とした。ヒト GAPDH の分析では 200 nM forward primer、200 nM reverse primer および 100 nM TaqMan probe を用いた。ヒト β-actin の分析では 300 nM forward primer、300 nM reverse primer と 200 nM TaqMan probe を用いた。

Table 3. Cross-reactivity in RT-PCR of primer sets and probes for mRNA of human target genes between human and mouse.

Target mRNA	Ratio of uPA <sup>-/-</sup> /SCID mouse to human	
	ND	0.000002 to 0.0005
	Number of target gene	
Phase I enzyme		
CYP	18	5
Other enzyme	27	8
Phase II enzyme	22	4
Transporter	21	2
<b>Total</b>	<b>88</b>	<b>19</b>

ND: No cross-reactivity was detected (<0.000002).

#### B-5. 統計解析

データ解析は ABI PRISM sequence detection software により行った。mRNA の相対的な発現程度は、4 µg/mL キメラマウス肝臓 total RNA を用いて測定したターゲット mRNA の Ct 値から、4 µg/mL のヒトまたはマウス肝臓 total RNA を用いて測定したターゲット mRNA の Ct 値を減じて得られた  $\Delta Ct$  により計算した。すなわち、4 µg/mL のヒトまたはマウス肝臓 total RNA 中のターゲット mRNA に対する 4 µg/mL のキメラマウス肝臓 total RNA 中の標的 mRNA の発現比率は  $2^{-(\Delta Ct)}$  として表すことができる。データは 3 例の結果から mean  $\pm$  SD を求めて示した。

#### C. 研究結果

##### C-1. キメラマウスのヒト型置換率

本研究では日本人ドナーの肝細胞を用いて作製された 3 例のキメラマウスを使用した。用いたキメラマウスのヒトアルブミン濃度と、ヒト型への置換率は表 1 に示した。ヒトアルブミン

濃度  $7.6 \pm 2.8$  mg/mL で、置換率は  $81 \pm 9\%$  であった。

##### C-2. mRNA 分析系の特異性

ヒトとマウス肝臓の total RNA を用いて、ヒトとマウスの mRNA 分析に使用したプライマーセットとプローブの RT-PCR の特異性を調べた。ヒトの mRNA 分析に使用したプライマーセットとプローブのデータは、4 µg/mL のヒト肝臓 total RNA 中のターゲット mRNA 量に対する 4 µg/mL マウス肝臓 total RNA におけるターゲット mRNA 量の比として表した。ヒトのターゲット mRNA に関して本研究で使用した 107 組のプライマーセットとプローブのマウスとの交差性は 0.0005 未満であった(表 3)。ヒトの GAPDH、 $\beta$ -actin、アルブミンあるいはトランスフェリン mRNA の測定に用いたプライマーセットとプローブのマウスとの交差性も 0.0005 未満であった。マウスの mRNA に使用したプライマーセットとプローブは、4 µg/mL のマウス肝臓 total RNA 中のタ

Table 4. Cross-reactivity in RT-PCR of primer sets and probes for mRNA in mouse Cyps between mouse and human.

Target mRNA	Cross-reactivity
Ratio of human to uPA <sup>-/-</sup> /SCID mouse	
Cyp1a2	0.0011
Cyp2b10	0.019
Cyp2d9	0.00040
Cyp2e1	0.00031
Cyp3a11	0.0017

ターゲット mRNA 量に対する 4 µg/mL ヒト肝臓 total RNA におけるターゲット mRNA 量の比として表した。各々のマウス Cyp mRNA を測定するためのプライマーセットとプローブのヒトとの交差性は 0.02 未満であった(表 4)。従って、ヒトおよびマウスの RT-PCR における本研究に用いたプライマーセットとプローブの特異性が検証できた。

### C-3. キメラマウスにおけるヒト型 mRNA の発現

ヒトハウスキーピング遺伝子について、ヒトのドナー肝臓での mRNA 発現に対するキメラマウス肝臓での mRNA 発現の比を図 1 に示す。GAPDH の比は  $0.57 \pm 0.08$ 、 $\beta$ -actin の比は  $0.15 \pm 0.05$  であった。

図 2 にキメラマウス肝臓におけるヒト第 1 相および第 2 相薬物代謝酵素とトランスポーターの発現プロファイルを示した。ヒトの肝臓を有するキメラマウス肝臓試料を用いて、23 種類の CYP 酵素、35 種類の CYP 以外の第 1 相薬物代謝酵素、26 種類の第 2 相薬物代謝酵素および 23 種類のトランスポーターに関してヒト mRNA 発現を分

析した。本研究において、ヒトの肝臓を有するキメラマウスにヒト型ターゲット mRNA が発現していると判断する限界を発現比率が 0.1 以上と仮定した。この判断基準を適用した結果、キメラマウス肝臓においては 20 種類の CYP 酵素、32 種類の CYP 以外の第 1 相薬物代謝酵素、26 種類の第 2 相薬物代謝酵素および 21 種類のトランスポーターのヒト型 mRNA の発現を確認した。

### C-4. キメラマウスにおけるヒト第 1 相薬物代謝酵素の中で CYP 酵素に関する mRNA の発現

CYP1A1、CYP1A2 および CYP1B1 mRNA の発現比率は、それぞれ  $0.62 \pm 0.35$ 、 $0.58 \pm 0.19$  および  $0.78 \pm 0.05$  であり、これらの結果はキメラマウスにおけるヒト肝臓への置換率の結果と近似していた。CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7 mRNA の発現比率は、それぞれ  $0.23 \pm 0.09$ 、 $0.31 \pm 0.14$  および  $0.20 \pm 0.11$  であった。CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2D6、CYP2E1 および CYP2J2 mRNA の発現比率は 0.25 以上であった。CYP2B6 と YP2C19 mRNA の発現比率は、それぞれ  $0.090 \pm$

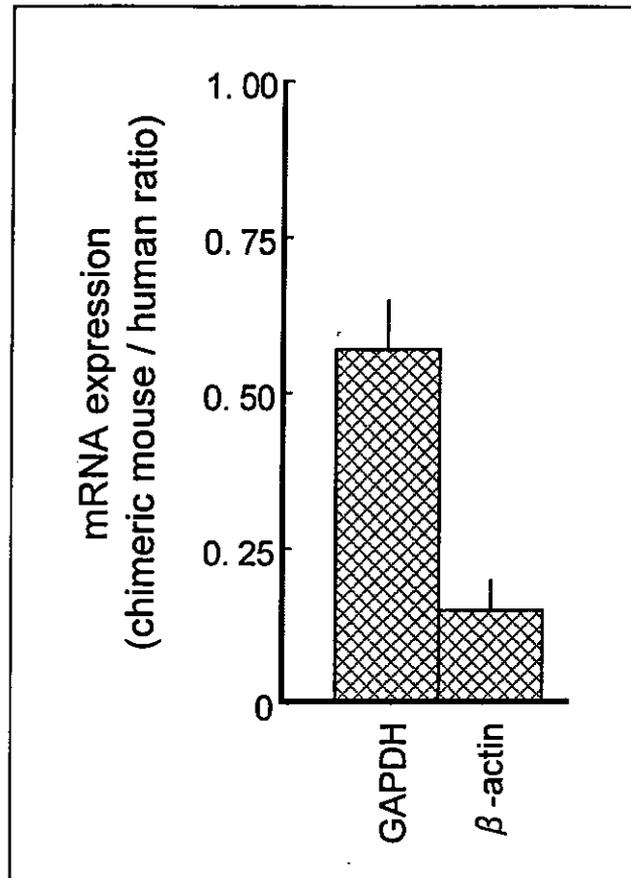


Figure 1 mRNA expression of human housekeeping genes in chimeric mouse liver. Data are expressed as the ratio of target mRNA in the chimera mouse liver to target mRNA in the human liver of the donor. Data represent mean  $\pm$  SD of three mice.

0.018 および  $0.064 \pm 0.055$  と低値であった。また、CYP5A1 mRNA 発現比率は  $0.0047 \pm 0.0007$  となり、ヒト肝臓に比べてキメラマウスでの発現はかなり低値であった。この他にキメラマウス肝臓では、CYP4A11、CYP4F2、CYP4F3、CYP7B1、CYP8B1、CYP26A1、CYP27 および CYP46 などの CYP mRNA の発現が確認された。

#### C-5. キメラマウスにおける CYP 酵素以外のヒト第1相薬物代謝酵素 mRNA の発現

CYP 酵素以外の第1相薬物代謝酵素について、EPHX1 および EPHX2

mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.85 \pm 0.05$  および  $0.58 \pm 0.07$  であった。PIG3 および NMOR2 mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.72 \pm 0.24$  および  $0.66 \pm 0.05$  であった。MAOA および MAOB mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.31 \pm 0.11$  および  $0.61 \pm 0.12$  であった。DPYD、AOX1 および XDH mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.31 \pm 0.07$ 、 $0.49 \pm 0.04$  および  $0.34 \pm 0.16$  であった。さらに、エステラーゼ (CES1、CES2、AADAC、LIPA、UCHL1、UCHL2 および ESD) の mRNA の発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.13 から 0.89 の割合であった。FMO3 および

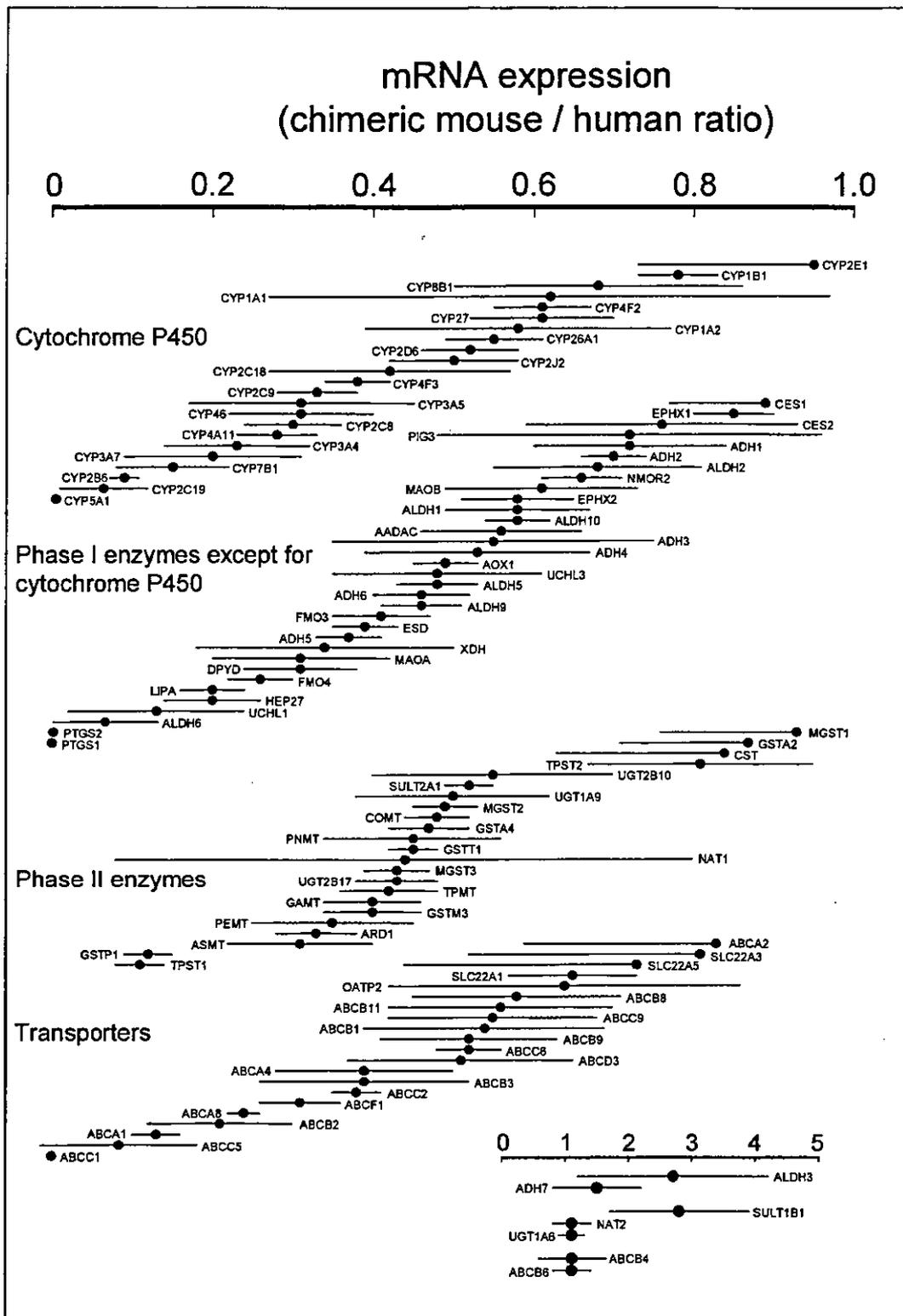


Figure 2 mRNA expression profile of human phase I enzymes, phase II enzymes and transporters in chimeric mouse liver. Data are expressed as the ratio of target mRNA in the chimera mouse liver to target mRNA in the human liver of the donor. Data represent mean  $\pm$  SD of three mice. Closed circles are mean value of each data.

FMO4 mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.41 \pm 0.06$  および  $0.26 \pm 0.04$  であった。アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH1、ADH2、ADH3、ADH4、ADH5、ADH6、ADH7 および HEP27) の mRNA の発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.20 から 1.5 の割合であった。アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH1、ALDH2、ALDH3、ALDH5、ALDH9 および ALDH10) の mRNA の発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.46 から 2.7 の割合であった。しかし、キメラマウス肝臓中の ALDH6 の mRNA 発現比率はヒト肝臓での発現量の  $0.067 \pm 0.065$  と低値であった。Prostaglandin endoperoxide synthase (PTGA1 および PTGS2) mRNA の発現比率はヒトの肝臓と比較すると 0.0025 またはそれ以下であった。キメラマウス肝臓中におけるメチルトランスフェラーゼ (TPMT、COMT、ASMT、GAMT、PEMT および PNMT) の mRNA の発現はドナーのヒト肝臓と比較して 0.31 から 0.48 の割合であった。NAT1、NAT2 および ARD1 mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.44 \pm 0.36$ 、 $1.1 \pm 0.3$  および  $0.33 \pm 0.05$  であった。

#### C-6. キメラマウスにおけるヒト第 2 相薬物代謝酵素 mRNA の発現

第 2 相薬物代謝酵素について、キメラマウス肝臓におけるグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GSTP1、GSTT1、GSTM3、GSTA2、GSTA4、MGST1、MGST2 および MGST3) の mRNA の発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.12 から 0.93 の割合であった。キメラマウス肝臓におけるスルフトランスフェラーゼ (CST、SULT1B1、SULT2A1、TPST1 および TPST2) の mRNA 発現比率はドナーの

ヒト肝臓と比較して 0.11 から 2.8 の割合であった。キメラマウス肝臓の SULT1B1 mRNA の発現量はヒト肝臓よりも  $2.8 \pm 1.1$  と特異的に高値であった。キメラマウス肝臓における UDP-グルクロン酸抱合酵素 (UGT1A6、UGT1A9、UGT2B10 および UGT2B17) の mRNA 発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.43 から 1.1 の割合であった。

#### C-7. キメラマウスにおけるヒト・トランスporter mRNA の発現

キメラマウス肝臓における ABC トランスporter (ABCA1、ABCA2、ABCA4、ABCA8、ABCB1、ABCB2、ABCB3、ABCB4、ABCB6、ABCB8、ABCB9、ABCB11、ABCC2、ABCC6、ABCC9、ABCD3 および ABCF1) の mRNA 発現比率はドナーのヒト肝臓と比較して 0.13 から 1.1 の割合であった。しかし、キメラマウス肝臓中の ABCC5 の mRNA 発現量はヒト肝臓における発現量の  $0.084 \pm 0.097$  と低値であった。ABCC1 mRNA の発現は確認されなかった。SLC22A1、SLC22A3、SLC22A5 および OATP2 mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.65 \pm 0.08$ 、 $0.81 \pm 0.29$ 、 $0.73 \pm 0.29$  および  $0.64 \pm 0.22$  であり、これらの発現比率はキメラマウスにおけるヒト肝臓への置換率と近似していた。

#### C-8. キメラマウスにおけるヒト mRNA の発現比率のプロファイル

図 3 はキメラマウスに発現しているヒト薬物代謝酵素とトランスporter の発現プロファイルの頻度をヒストグラムで表している。パネル A には全てのターゲット mRNA の発現比率をまとめ、パネル B は CYP 酵素、パネル C は CYP 酵素以外の第 1 相薬物

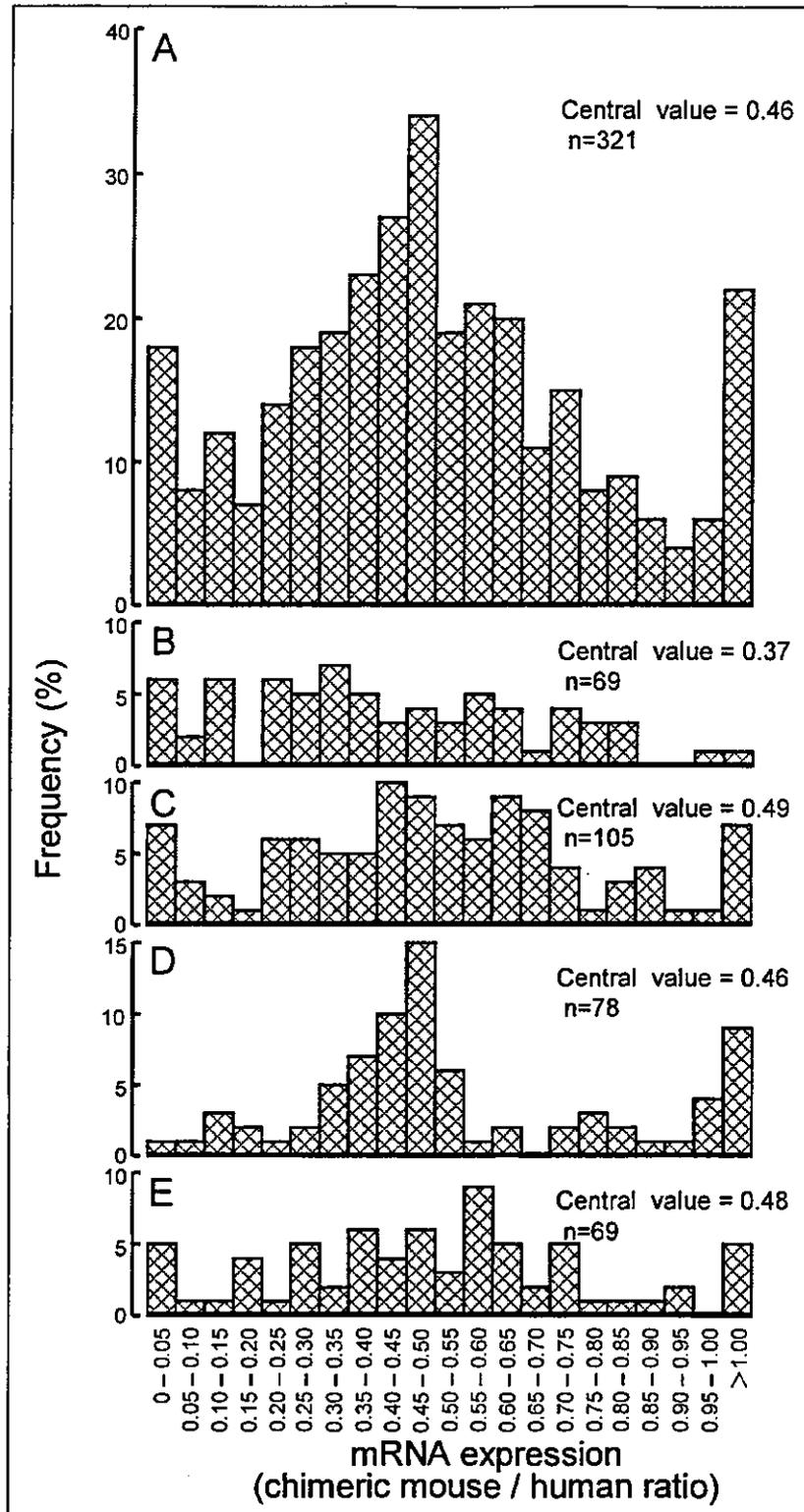


Figure 3 Histogram of the frequency of the mRNA expression ratios of human phase I enzymes, phase II enzymes and transporters in chimeric mouse liver. Data are shown as frequency of ratio of all target mRNA in Figure 2, and as individual values of each target mRNA in the three mice. A: all targets (107 targets); B:CYPs (23 targets); C: phase I enzymes except for CYPs (35 targets); D: phase II enzymes (26 targets); E: transporters (23 targets).

代謝酵素、パネルDは第2相薬物代謝酵素、そしてパネルEはトランスポーターの結果をまとめた。パネルAにおいて、発現比率の頻度の中央値は0.46で、キメラマウスにおけるマウス肝臓からヒト肝臓への置換率 $81 \pm 9\%$ (表1)よりも低かった。第2相薬物代謝酵素(パネルD)の分散は第1相薬物代謝酵素(パネルB、C)やトランスポーター(パネルE)と比較して小さかった。

C-9. キメラマウスにおけるヒトアルブミン等の肝機能評価項目に関する mRNA の発現比率のプロファイル

図4はキメラマウス肝臓中のヒトアルブミンおよびトランスフェリン mRNA プロファイルを示している。アルブミンおよびトランスフェリン mRNA の発現比率はそれぞれ  $0.68 \pm 0.06$  および  $0.64 \pm 0.15$  であり、これらの結果はキメラマウスにおけるマウ

ス肝臓からヒト肝臓への置換率  $81 \pm 9\%$ (表1)と近似していた。

C-10. キメラマウスにおけるマウス mRNA の発現比率のプロファイル

図5はキメラマウス肝臓中のマウス Cyp 酵素 mRNA の発現プロファイルを示した。Cyp1a2、Cyp2d9、Cyp2e1 および Cyp3a11 mRNA の発現比率は0.19またはそれ以下であった。キメラマウスにおけるヒト肝臓への置換率は  $81 \pm 9\%$ (表1)であるが、Cyp2b10の比は  $1.2 \pm 0.7$  と高値を示した。

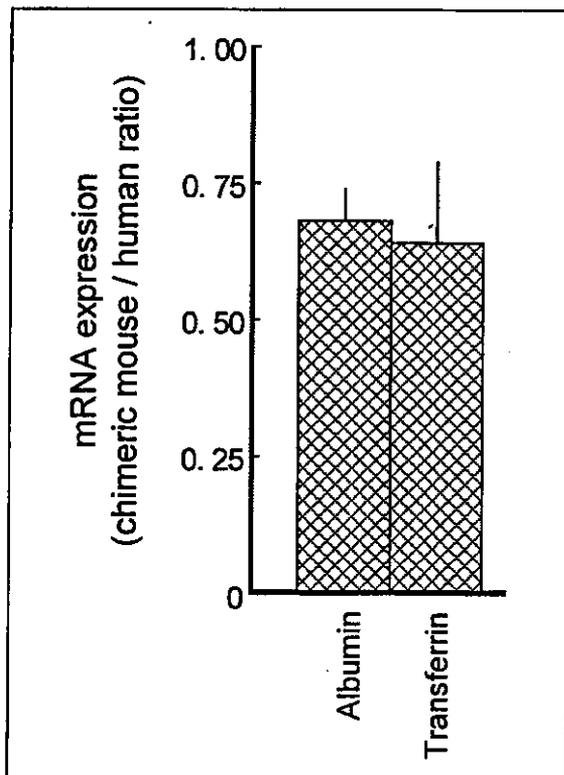


Figure 4 mRNA expression of human albumin and transferrin in chimeric mouse liver. Data are expressed as the ratio of target mRNA in the chimera mouse liver to target mRNA in the human liver. Data represent mean  $\pm$  SD of three mice.

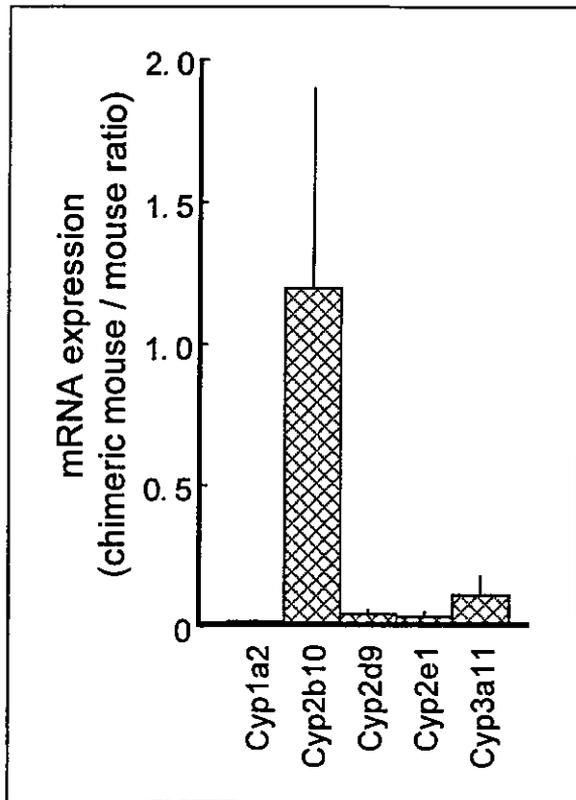


Figure 5 mRNA expression of mouse Cyps in chimeric mouse liver. Data are expressed as the ratio of target mRNA in the chimera mouse liver to target mRNA in the uPA<sup>+</sup>/SCID mouse control liver. Data represent mean  $\pm$  SD of three mice.

#### D. 考察

GAPDH と  $\beta$ -actin などハウスキーピング遺伝子の mRNA 発現レベルは病態下で変化することが報告されており (Chang et al., 1998; Glare et al., 2002)、我々の研究でもヒト肝細胞の初代培養系において GAPDH と  $\beta$ -actin の mRNA 発現比率が変化することを報告している (Nishimura et al., 2003b)。本研究においても、GAPDH と  $\beta$ -actin の mRNA 発現レベルの比がキメラマウスの肝臓で顕著な違いを示すことが確認された (図 1)。我々の研究においては、mRNA 発現量の面で最も適切な内在性のコントロール遺伝子を選ぶ目的で、ヒトの肝臓試料を用いて多くのハウスキーピング遺伝子の mRNA 発現レベルを測定して報告した (Nishimura et al., 2004)。これらの結果より考えると、キメラマウスを用いた

定量的な遺伝子発現の研究を考案する場合は、幾つかのハウスキーピング遺伝子の mRNA 発現レベルを確認し、適切な遺伝子を選択する必要がある。

CYP2A6 mRNA はヒト肝臓に発現する一般的な CYP 分子種であるが、本研究において、ドナーの肝臓における CYP2A6 mRNA の GAPDH に対する比率は 0.0016 であった。この結果は、我々の以前の研究において、GAPDH の mRNA に対する CYP2A6 mRNA の比率が 27.5 であった報告 (Nishimura et al., 2003a) と比較して極めて小さい値を示した。関連した研究として、加藤らは肝臓から抽出されたゲノム DNA から、今回の試験に用いたドナーとそのドナーから作成されたキメラマウスの両方ともが CYP2A6\*4/CYP2A6\*4 の遺伝子型であること、さらに、このドナー由来のキメラマウスのタンパ

ク発現型がドナーと同じであることを報告している(Katoh et al., 2004)。キメラマウスの肝臓はドナーと同じ遺伝子型とタンパク発現型を示すので、遺伝子多型による個体間の薬物動態の違いについても適切なドナー試料を用いたキメラマウスの研究から評価できると考えられる。

ドナーのヒト肝臓での mRNA 発現と比較してキメラマウスの肝臓での mRNA 発現の比率が 1.0 以上を示したターゲット遺伝子が 7 種類あった(図 2、挿入パネル)。一方、8 種類の CYP ターゲット遺伝子 (CYP2B6, CYP2C19, CYP5A1, ALDH6, PTGS1, PTGS2, ABCC1 および ABCC5) の mRNA 発現がドナーのヒト肝臓と比較してキメラマウスの肝臓において 0.01 より低値を示した。この他のターゲット遺伝子の mRNA 発現比率はドナーのヒト肝臓での mRNA 発現と比較してキメラマウスの肝臓では 0.1 から 1.0 の範囲であった。キメラマウスにおけるヒト第 2 相薬物代謝酵素の mRNA 発現比率の分散は第 1 相薬物代謝酵素やトランスporterと比較して小さかった(図 2、図 3)。特に、ヒトメチルトランスフェラーゼ (COMT, PNMT, TPMT, GAMT, PEMT および ASMT) の mRNA 発現比率の分散は他のヒト第 2 相薬物代謝酵素と比較しても小さかった(図 2)。ABCB4、ABCB11 および ABCC2 のような ABC トランスporter の mRNA 発現はキメラマウスの肝臓において維持されており(図 2)、これらのトランスporterは胆汁酸やビリルビンのグルクロン酸抱合のような生理的な物質を胆汁へ分泌する過程で重要な役割を担っている(Dean et al., 2001; Borst et al., 2000)。内因性物質の能動輸送に重要な役割を担っている有機トランスporterで

ある SLC22As と OATP2 の mRNA 発現レベルもキメラマウスの肝臓において維持されていた(図 2)。このように、多くのヒト薬物代謝酵素とトランスporterの mRNA 発現がキメラマウスの肝臓において確認され、特に、生理的な活動に重要な意味を持つ分子種の mRNA 発現はドナーのヒト肝臓と同様にキメラマウス肝臓においても維持されていた。

図 3 ではキメラマウスの肝臓において多くのヒト薬物代謝酵素とトランスporterの mRNA 発現がドナーのヒト肝臓での発現レベルの約 50% であることを示している。しかし、CYP2C19、ALDH6 および ABCC5 mRNA などは、ドナーのヒト肝臓と比較したキメラマウス肝臓での発現が数%程度であり(図 2)、一方において、ALDH3 や SULT1B1 のように発現比率が数倍以上の高値を示すターゲットもあった(図 2、挿入パネル)。Iyer と Sinz(1999)は第 1 相および第 2 相薬物代謝酵素の含量には 2.5~175 倍の幅が見られることを報告している。従って、我々はキメラマウス肝臓中の発現量の比率が、ドナー肝臓の数%~500%の間であれば、薬物代謝酵素やトランスporterの阻害や誘導による薬物相互作用の評価に用いることができると考えている。しかし、ドナーのヒト肝臓と比較してキメラマウス肝臓にほとんどあるいは全く発現していない CYP5A1、PTGS1、PTGS2 および ABCC1 のようなターゲット mRNA の場合は、誘導や阻害による薬物相互作用の評価に用いることに適さないであろう。

立野らはキメラマウスにおけるヒト肝臓への置換率の値とキメラマウスの血中のヒトアルブミン濃度が良く相関することを報告している

(Tateno et al., 2004)。表2に示したヒトアルブミン濃度と置換率の相関は、立野らおよび加藤らによる報告と類似している(Tateno et al., 2004; Katoh et al., 2004)。今回の研究ではキメラマウスの肝臓におけるヒトアルブミン遺伝子の mRNA 発現レベルと置換率あるいは血中のヒトアルブミン濃度の関係についても示した(表2、図4)。ドナーの肝臓に対するキメラマウスの肝臓でのアルブミン遺伝子の mRNA 発現レベルの比率は、置換率の結果(71~89%)と類似していた。肝機能のバイオマーカーとして臨床で用いられるトランスフェリンに関して、mRNA 発現レベルはキメラマウスでのアルブミン遺伝子の発現レベルと類似していた。これらの結果より、ヒトの肝組織で置換されたキメラマウスの肝機能指標はヒトの肝臓の一般状態を反映していることが示唆された。

Pan らは IL-1 $\beta$  と IL-6 が Cyp2b10 mRNA の発現を抑制することを報告している(Pan et al., 2000)。また、これらのサイトカインはフェノバルビタールに反応する CYP2B の誘導を抑えることが知られている(Clark et al., 1995)。さらに、マウスにおいてリポポリサッカライドはフェノバルビタールで誘導される CYP2B の発現を抑制することが知られている(Li-Masters and Morgan, 2001)。しかし、免疫不全を伴っているキメラマウスの肝臓における Cyp2b10 mRNA の発現は、同じく免疫不全を伴っている uPA<sup>-/-</sup>/SCID マウスでの発現と同様に高値であった(図5)。キメラマウスの肝臓において Cyp2b10 mRNA の高発現は免疫不全に加えて未知の因子の関係も否定できないと考えられた。

## E. 結論

化学物質の毒性や CYP 遺伝子の転写制御の研究に使うため、CYP2D6 や CYP3A4 のようなヒト薬物代謝酵素を有する遺伝子発現マウスが報告されている(Corcherо et al., 2001; Robertson et al., 2003; Zhang et al., 2003)。また、ABCA1 のようなヒトのトランスポーターを有する遺伝子発現マウスも報告されている(Vaisman et al., 2001)。しかし、遺伝子発現マウスは正常なマウスの活性を保持している環境に1種類のヒト型のターゲット mRNA を発現しているため、ヒトの *in vivo* における薬物代謝や排泄を予測するためには限界がある。

今回の研究では、キメラマウスの肝臓に多くのヒト型の薬物代謝酵素やトランスポーターが発現していることを示した。さらに、多くの薬物代謝酵素およびトランスポーター mRNA の高感度で網羅的な定量データは、これらの阻害や誘導による薬物相互作用の評価に有用である。そして、肝臓の大部分がヒト化したキメラマウスはヒト肝臓試料を用いた研究と同様に医薬品開発において有用な評価手段と考えられる。さらに、キメラマウスは、特定の日本人ドナーからの肝細胞を移植して作成できるため、遺伝子多型や投薬などの履歴を持った日本人ドナーの肝臓を有するキメラマウスを作製することもできる。このような研究環境が整備されれば、同じドナーのキメラマウスを用いた比較研究が研究施設間で可能になり、遺伝子多型による個人差なども評価出来るようになるであろう。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表:

Evaluation of mRNA expression of Human Drug-metabolizing Enzymes and Transporters in Chimeric Mouse with Humanized Liver

Drug Metabolism and Disposition に投稿中

MS ID#: DMD/2005/004671

2. 学会発表

ヒト肝臓を有するキメラマウスにおける薬物代謝酵素及びトランスポーターの発現解析; 第17回日本薬物動態学会年会、平成14年11月20-22日、東京

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)

Baliharová V, Skálová L, Maas RF, De Vrieze G, Bull S and Fink-Gremmels J. (2003) The effects of mebendazole on P4501A activity in rat hepatocytes and HepG2 cells. Comparison with tiabendazole and omeprazole. *J Pharm Pharmacol* **55**:773-781.

Bowen WP, Carey JE, Miah A, McMurray HF, Munday PW, James RS, Coleman RA and Brown AM (2000) Measurement of cytochrome P450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos* **28**:781-788.

Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*,

**92**:1295-1302.

Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW and Tsay HJ (1998) Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in NIS1 rat hepatoma. *Oncol Rep* **5**:469-471.

Clark MA, Bing BA, Gottschall PE and Williams JF (1995) Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholanthrene induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **49**:97-104.

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 HNF4alpha on the disposition of debrisoquine in the mouse. *Mol Pharmacol* **60**:1260-1267.

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.

Dean M, Rzhetsky A and Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*, **11**:1156-1166.

Garcia, M., Rager, J., Wang, Q., Strab, R., Hidalgo, I. J., Owen, A. and Li, J.: Cryopreserved human hepatocytes as alternative in vitro model for cytochrome P450 induction studies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **39**:283-287 (2003).

Glare EM, Divjak M, Bailey MJ and

- Walters EH (2002)  $\beta$ -Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* **57**:765–770.
- 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.
- Hesse LM, Sakai Y, Vishnuvardhan D, Li AP, von Moltke LL and Greenblatt DJ (2003) Effect of bupropion on CYP2B6 and CYP3A4 catalytic activity, immunoreactive protein and mRNA levels in primary human hepatocytes: comparison with rifampicin. *J Pharm Pharmacol* **55**:1229–1239.
- Iyer KR and Sinz MW (1999) Characterization of phase I and phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparations. *Chem Biol Interact* **118**:151–169.
- Kato M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2004) Expression of human CYPs in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* **32**:1402–1410.
- Li AP, Gorycki PD, Hengstler JG, Kedderis GL, Koebe HG, Rahmani R, de Sousa G, Silva JM and Skett P (1999) Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem Biol Interact* **121**:117–123.
- Li-Masters T and Morgan ET (2001) Effects of bacterial lipopolysaccharide on phenobarbital-induced CYP2B expression in mice. *Drug Metab Dispos* **29**:252–257.
- Lindley C, Hamilton G, McCune JS, Faucette S, Shord SS, Hawke RL, Wang H, Gilbert D, Jolley S, Yan B and LeCluyse EL (2002) The effect of cyclophosphamide with and without dexamethasone on cytochrome P450 3A4 and 2B6 in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **30**:814–822.
- 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.
- 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.
- Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S and Satoh T (2003a) Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **123**:369–375.
- Nishimura M, Ueda N and Naito S (2003b) Effects of dimethyl sulfoxide on the gene induction of cytochrome P450 isoforms UGT-dependent glucuronosyltransferase isoforms, and ABCB1 in primary culture of human hepatocytes. *Biol Pharm Bull* **26**:1052–1056.
- Nishimura M, Naito S and Yokoi T (2004)

Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet*, **19**:135–149.

Pan J, Xiang Q and Ball S (2000) Use of a novel real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the effects of cytokines on cytochrome P450 mRNA expression in mouse liver. *Drug Metab Dispos* **28**:709–713.

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.

Roymans, D., Van Looveren, C., Leone, A., Parker, J. B., McMillian, M., Johnson, M. D., Koganti, A., Gilissen, R., Silber, P., Mannens, G. and Meuldermans, W.: Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **67**: 427–437 (2004).

Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T and Yoshizato K (2004) Near-completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* **165**:901–912.

Vaisman BL, Lambert G, Amar M, Joyce C, Ito T, Shamburek RD, Cain WJ,

Fruchart-Najib J, Neufeld ED, Remaley AT, Brewer HB Jr and Santamarina-Fojo S (2001) ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest* **108**:303–309.

Walle T, Otake Y, Galijatovic A, Ritter JK and Walle U K (2000) Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in the human hepatoma cell line Hep G2. *Drug Metab Dispos* **28**:1077–1082.

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.

Waxman DJ (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* **369**:11–23.

Wilkening S, Stahl F and Bader A. (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* **31**:1035–42.

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.

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

ヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞の培養実験における  
CYPs mRNA 発現で見た同等性の評価

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をヒト肝細胞に置換することが可能なキメラマウスが開発された。CYP 酵素を始めとする薬物代謝酵素には種差があり、代謝酵素の変動が薬物動態に影響する場合は動物実験の結果から臨床を予測できないことがある。そこで、薬物代謝酵素の誘導に対する作用はヒト肝細胞を用いた研究から臨床での酵素誘導作用を予測する手法が有用と考えられている。キメラマウスは、このようなヒト肝細胞を用いた医薬品開発における研究において有用な試験系と考えられる。

我々はヒト肝細胞に置換されたキメラマウス肝臓から凍結肝細胞を調製し、培養実験によりヒト肝細胞と同様に $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF)暴露でヒト CYP1A2 mRNA が誘導され、Rifampicin (Rif)暴露でヒト CYP3A4 mRNA が誘導されることを示した。さらに、キメラマウス肝臓にヒトの薬物代謝酵素やトランスポーターなどの mRNA が多数発現していることを見出した。

本研究では、ヒト肝細胞と、その細胞をドナーとしたキメラマウスの肝細胞を凍結で準備し、同時に培養実験を行って mRNA 発現量を比較した。mRNA 分析はリアルタイム RT-PCR 法を用いた。12 種類の CYP 酵素 mRNA の発現レベルを見ると、培養開始直前はキメラマウス肝細胞がヒト肝細胞よりも多く、また両細胞系で相関性は低かった(相関係数； $r=0.690$ )。培養 24 時間後も相関性は低かった( $r=0.699$ )。その後、ヒト上皮細胞成長因子(hEGF)等を含まない培地に交換し、培養 48 時間後ではキメラマウス肝細胞の CYPs mRNA 発現量がドナー肝細胞と同程度になり、発現量の相関性は良好になった( $r=0.809$ )。さらに、培養 72 時間後も良好な相関性が維持された( $r=0.873$ )。CYP1A2 と CYP3A4 mRNA の発現を $\beta$ -actin mRNA との比で評価すると、ヒトとキメラマウスの肝細胞ではいずれも培養 24 時間後に大きく低下した後にはほぼ一定値に推移した。 $\beta$ -NF 暴露により CYP1A2 mRNA は 3 例のヒトとキメラマウス肝細胞で同様に誘導が見られたが、Rif 暴露による CYP3A4 mRNA の誘導は 3 例のヒト肝細胞で共に誘導が見られたのに対しキメラマウス肝細胞では 3 例中 1 例に誘導が明確であった。

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