

A. 研究目的

医薬品開発の非臨床試験においてはヒトでの薬物動態を予測するために、動物実験に加えてヒト由来試料を用いた研究が有用であることが広く認識されている。薬物代謝酵素の阻害作用についての検討は、ヒト肝臓マイクロゾームが汎用されるようになり、また、探索試験では化合物の代謝的な安定性についてもヒト肝臓マイクロゾームが用いられている。一方、化合物の誘導作用は酵素タンパクの発現レベルにおける変動の過程を必要とするため、非細胞系であるマイクロゾームでは評価することができない。そこで、雌性ラットを用いて反復投与試験を行い、肝臓の薬物代謝活性の変化から酵素誘導作用を考察していた。しかし、肝薬物代謝酵素にはしばしば種差が存在するためにラットの結果がヒトと必ずしも一致しない。そこで、ヒト肝細胞を用い初代培養系において、酵素誘導を検討して報告されるようになった(Bowen et al., 2000; Garcia et al., 2003; Roymans et al., 2004)。ところが、ヒト肝細胞の使用には、細胞培養系であるために酵素活性の低下による欠点に加えて、倫理性、同一ロットの入手・価格などの問題がある。ヒト肝細胞の代替実験系として、ヒト肝癌細胞由来で継代培養が可能な HepG2 細胞があるが薬物代謝酵素の発現プロファイルと反応性にヒトの *in vivo* と異なる部分も多く(Wilkening et al., 2003)、薬物動態研究への利用には注意が必要である。

立野らにより uPA/SCID マウスにヒト肝細胞を移植し肝臓の 80%以上がヒト肝細胞に置換したキメラマウスが作製された(Tateno et al., 2004)。この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た。既に、

我々はキメラマウス肝臓試料を用いて、20種類のヒトCYP酵素を含む52種類のヒト第1相薬物代謝酵素 mRNA、26種類のヒト第2相薬物代謝酵素 mRNA、21種類のヒト・トランスポーター mRNA が発現していることを確認した。また、キメラマウス肝臓より調製した凍結肝細胞を用いた培養実験から、 β -NF と Rif の暴露による CYP1A2 mRNA あるいは CYP3A4 mRNA の誘導を確認している。いずれも、分担研究報告書を作成しており、そちらを参照されたい。

本研究では、キメラマウスに移植したドナーのヒト肝細胞と、作製されたキメラマウスから得た肝細胞を用いて、mRNA の発現変動を比較し同等性について示した。実験では、3例の由来の異なったヒト肝細胞を uPA/SCID マウスに移植してキメラマウスを作製し、その凍結肝細胞を用いた。また、培養細胞から経時的に total RNA を調製して薬物代謝酵素 (CYPs) mRNA の発現を測定し、さらに、 β -NF と Rif の暴露による CYP1A2 mRNA あるいは CYP3A4 mRNA で評価した酵素誘導を比較した。mRNA 分析は ABI 社製 PRISM 7700 を用い、リアルタイム RT-PCR 法で行った。

B. 研究方法

B-1. 試薬

凍結ヒト肝細胞は In Vitro Technologies, Inc. (Baltimore, MD, USA)より購入した。3例のドナーの特徴は表 1 に示した。 β -naphthoflavone (β -NF)および Rifampicin (Rif)は和光純薬工業より購入した。Total RNA の抽出に用いた Rneasy Mini Kit および QIAshredder は QIAGEN (Hilden, Germany)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。TaqMan One-Step

RT-PCR Master Mix Reagents、TaqMan GAPDH Control Reagents および TaqMan β -actin Control Reagents 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. キメラマウス肝細胞の調製

本研究を開始するのに際し、研究計画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。

キメラマウスは立野らが構築した手法に従い作製した(Tateno et al., 2004)。表 1 に示す凍結で保存されていた3例のヒト肝細胞をドナーとして uPA/SCID マウスに移植して作製した(マウス肝臓からヒト肝臓への置換率は約 60~80%)。キメラマウス肝臓のコラゲナーゼ灌流と遊離肝細胞の調製は、Seglen らの方法で行った(Seglen

et al., 1976)。得られたキメラマウス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。凍結肝細胞の輸送に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

ドナーおよびキメラマウス凍結肝細胞の単層培養は西村らの方法に従って行った(Nishimura et al., 2002)。凍結肝細胞は解凍後、ヒト肝細胞培養液に懸濁し、遠心分離により洗浄した。細胞数はコールターカウンターを用いて測定し、生細胞率(viability)はトリパンプルー色素排除法で確認した。得られた肝細胞の viability は 50.0~86.7%であった(表 1)。細胞を播種した後、3 時間には培養液を新鮮なものと交換し、さらに 21 時間培養した。ついで、ヒト上皮細胞成長因子 (hEGF)、

Table 1. Characteristics of donors, chimera mice and hepatocyte preparations

Donor No.	#1	#2	#3
Human hepatocytes			
Lot No.	RQO	79	NLR
Age in donor	6 days	9 months	13 years
Sex in donor	Female	Male	Male
Race in donor	Caucasian	Caucasian	Caucasian
Viability in donor (%)	94.1	89.2	80.6
Chimeric mouse hepatocytes			
Lot No.	CTE54-9	CTE7-1	CTE31-8
Sex in mouse	Male	Female	Male
Replacement index (%)	about 60	>80	>80
Viability in mouse (%)	50.0	86.7	70.1

Viability after melting the cryopreserved hepatocytes in donor and chimera mouse was determined by trypan blue dye exclusion.

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、引き続き 24 時間毎に培養液を交換して 72 時間まで培養した。酵素誘導実験には播種後 48 時間が経過した細胞を実験に使用した。培養は 5% CO₂-95% O₂、37°C の条件下で行った。

B-4. 培養肝細胞への試験物質の暴露

酵素誘導の評価では、播種 48 時間後からドナーおよびキメラマウス肝細胞にβ-NF または Rif を 24 時間暴露した。実験中、肝細胞は 5% CO₂-95% O₂、37°C の条件下でヒト上皮細胞成長因子 (hEGF)、ゲンタマイシンまたはアンフォテリシン B を含まない培養液で培養した。β-NF の影響は 1 μM, 5 μM および 25 μM で、Rif の影響は 2 μM, 10 μM および 50 μM の濃度で検討した。β-NF と Rif は DMSO に溶解させて使用し、培養液中の DMSO 最終濃度は 0.1% とした。正常対照群は mRNA 発現を評価する試験系と同じく 0.1% DMSO 濃度とした。肝細胞からの total RNA 抽出には QIAshredder Rneasy Mini Kit を使用した。

B-5. オリゴヌクレオチドの設計

ターゲット mRNA を分析するための primer と TaqMan probe は、既に報告した配列を採用した(Nishimura et al., 2002, 2003a)。GenBank accession number と開始コドンの位置は表 2 に示した。primer および probe は QIAGEN (Tokyo, Japan) で合成し、TaqMan probe は 5' 末端として 6-carboxyfluorescein (FAM) を、3' 末端として 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) を含み、これらが PCR primer の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-6. mRNA 分析

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、48°C、30 分間を 1 回、95°C、10 分間を 1 回反応させた後に、95°C、15

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

mRNA	Sequence	Position
CYP1A2 (GenBank accession number AF182274)		
Forward primer	5'-TGTTCAAGCACAGCAAGAAGG-3'	860-880
Reverse primer	5'-TGCTCAAAGACGTCATTGAC-3'	951-931
Probe	5'-CTAGAGCCAGCGGCAACCTCATCCCA-3'	884-909
CYP3A4 (GenBank accession number AF182273)		
Forward primer	5'-GATTGACTCTCAGAAITCAAAGAACTGA-3'	825-854
Reverse primer	5'-GGTGAGTGGCCAGTTCATACATAATG-3'	973-948
Probe	5'-AGGAGAGAACACTGCTCGTGGTTTCACAG-3'	946-918

秒間および 60°C、1 分間を交互に 40 回反応させた。ヒト GAPDH の測定には 200 nM の forward primer、200 nM の reverse primer および 200 nM の TaqMan probe を用い、他の mRNA 測定には 300 nM の forward primer、900 nM の reverse primer および 200 nM の TaqMan probe を用いた。

B-7. 統計解析

データ解析は ABI PRISM sequence detection software で行った。各 mRNA の相対発現量は既に報告している、 ΔCt (目的の mRNA 量から β -actin の mRNA 量を減じて得られた値)により計算した(Nishimura et al., 2003b)。具体的には β -actin に相対する目的の mRNA の総量は $2^{-\Delta Ct}$ として表し、データは目的の mRNA と β -actin の mRNA の比(コントロールに対する相対%)で表される。肝細胞の培養実験は triplicate で行い、データは mean \pm SD として示した。

C. 研究結果

C-1. ドナー肝細胞とキメラマウス肝細胞の初代培養による CYPs mRNA 発現量に関する評価

我々はドナーに用いたヒト肝臓とキメラマウス肝臓の total RNA を用い薬物代謝酵素およびトランスポーター mRNA の発現プロファイルを確認し、キメラマウス肝臓には薬物動態に関連する多くのヒト mRNA が発現していることを示した。

本研究では、凍結で供給されたヒト肝細胞と、そのヒト肝細胞をドナーとして作製したキメラマウスから調製した肝細胞を同条件で同時に培養して、それぞれの培養肝細胞における CYPs mRNA 発現量を比較した。

薬物代謝酵素の経時的な推移は、ヒ

トの主要な CYP 酵素として CYP1A1、CYP1B1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C18、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7 の mRNA 発現を評価項目として選択した。これらの CYP 酵素 mRNA 発現量を β -actin の発現量の比として計算し、キメラマウス肝細胞とドナーに用いたヒト肝細胞の対応するデータから分散図を作成し図 1 に示した。縦軸にキメラマウス肝細胞、横軸にドナーのヒト肝細胞での発現量を対数で表示した。実験は 3 例のドナー肝細胞と対応するキメラマウス肝細胞で、各々 triplicate で行い平均値をプロットしている。

ヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞におけるヒト CYPs mRNA 発現の相関について、凍結肝細胞を解凍し遊離肝細胞とした培養開始前(0 時間時点)、培養開始 3 時間後、24 時間後、48 時間後および 72 時間後に行った。なお、培養 24 時間後までは培養液中に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 を含むが、それ以降は、これらを含まない培養液を用いた。

培養開始前(0 時間時点)で CYPs mRNA の発現量を比較すると、両肝細胞間での発現量に相関性は見られるものの相関係数は低く ($r=0.690$ 、 $p<0.01$)、ヒト肝細胞の発現量よりもキメラマウス肝細胞での発現量が高値であった。培養 3 時間後および 24 時間後では、両肝細胞の CYPs mRNA 発現量の相関係数は、それぞれ $r=0.651$ および $r=0.699$ (いずれも $p<0.01$)であり、培養開始前と同じく有意な正の相関は見られるものの相関係数は低値に推移した。培養 24 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

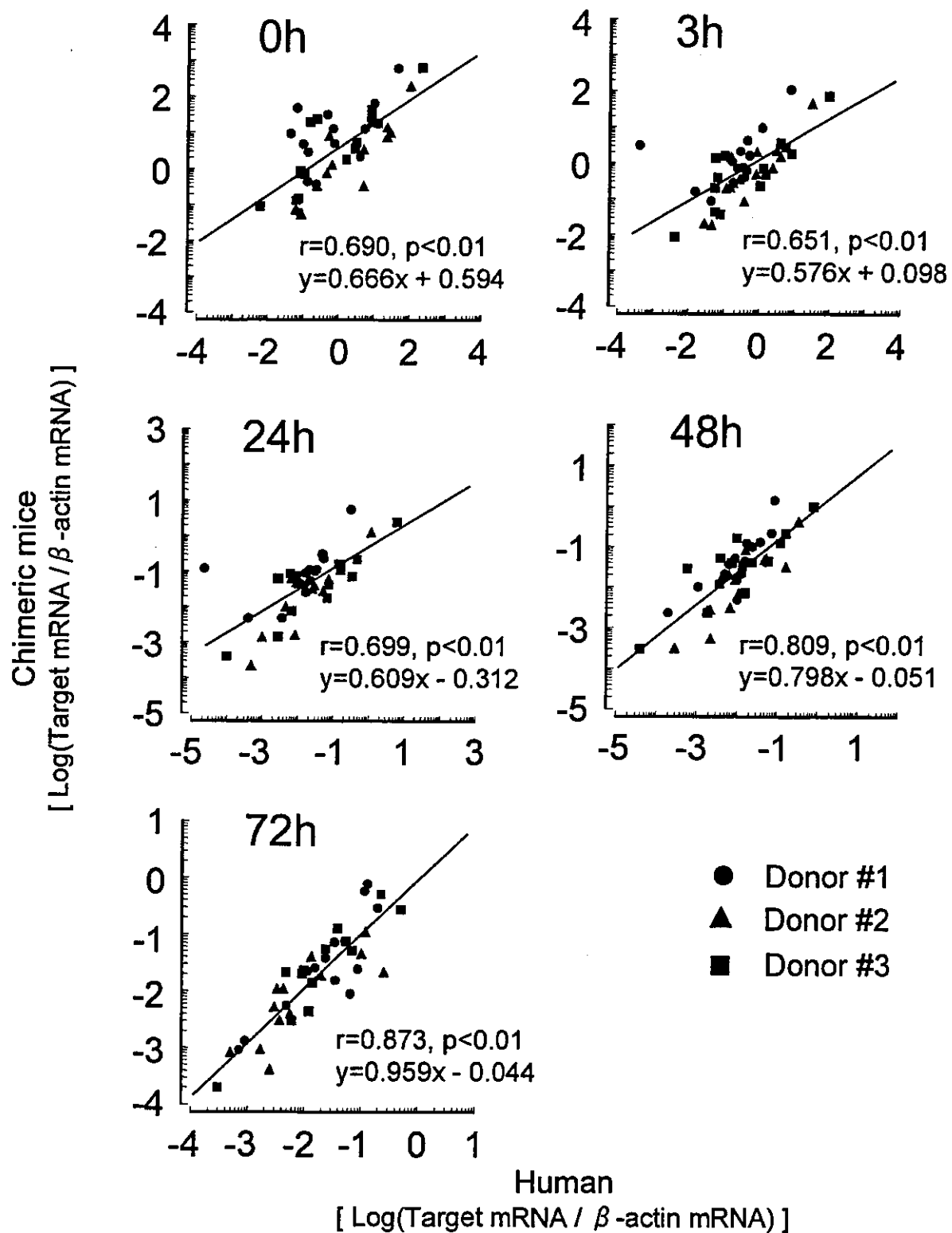


Figure 1. Correlation between mRNA levels of CYPs expressed in chimeric mice and human hepatocytes.

Data are expressed as the ratio of human CYP1A1, 1B1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5 and CYP3A7 mRNA to human β -actin mRNA in chimeric mice and human hepatocytes.

を含まない培養液に交換し、24 時間培養(培養 48 時間後)することで、ドナー肝細胞とキメラマウス肝細胞での CYPs mRNA 発現量は同程度に近づき ($y=0.798x - 0.051$)、相関係数も良好な値を示した($r=0.809$, $p<0.01$)。培養 72 時間後では、さらに良好な相関係数に推移した($y=0.959x - 0.044$, $r=0.873$, $p<0.01$)。

C-2. ドナーのヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞における CYP1A2 および CYP3A4 mRNA の発現量の経時的な推移

凍結ヒト肝細胞を用いた実験から、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に推移することを報告している(Nishimura et al., 2003b)。ま

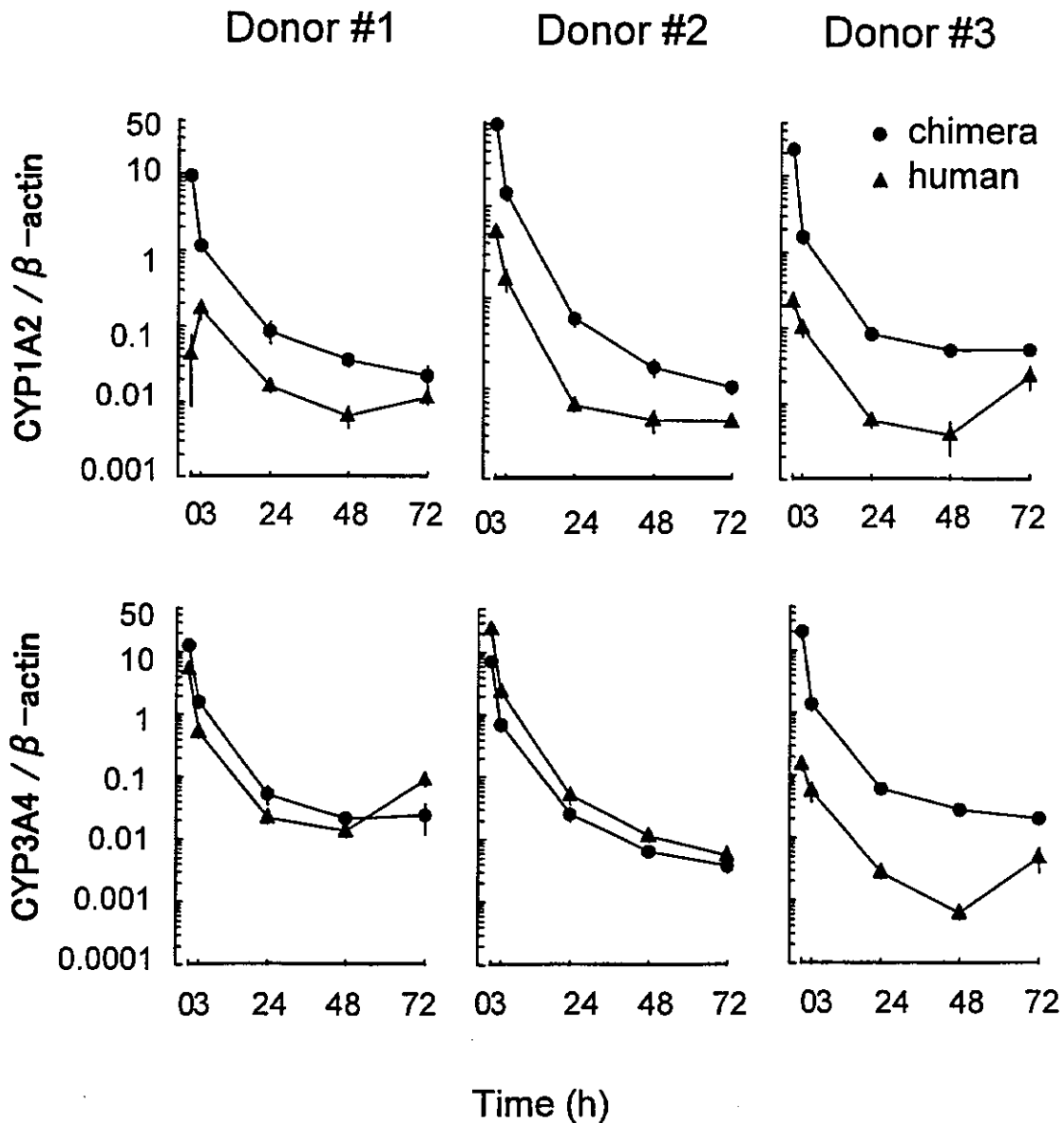


Figure 2. Effects of culture on CYP1A2 and CYP3A4 mRNA expression in primary culture of the hepatocytes isolated from chimeric mice and humans.

Data are expressed as the ratio of human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA to human β -actin mRNA.

た、培養 48 時間以後は細胞の状態が安定しており、酵素誘導実験への適用が可能と報告した。他の CYPs mRNA も培養操作により発現量が大きく変化することが知られている(Bowen et al., 2000; Nishimura et al., 2003b)。

培養による CYP1A2 および CYP3A4 mRNA 発現量の変動について、ヒト肝細胞と、同じヒト肝細胞をドナーに用いたキメラマウス肝細胞で比較検討して図 2 に示した。図は縦軸にキメラマウス肝細胞およびヒト肝細胞における CYP1A2 mRNA あるいは CYP3A4 mRNA 発現量を β -actin の発現量との比で表し、横軸に培養開始からの時間を示した。

CYP1A2 mRNA の発現量は 3 例共にヒト肝細胞に比べキメラマウス肝細胞が高値に推移した。また、キメラマウス肝細胞での CYP1A2 mRNA の発現量は、いずれも培養 24 時間後まで急激な低下を示し、培養開始 48 時間以降はほぼ一定値に推移した。しかし、ヒト肝細胞での CYP1A2 mRNA の発現量を見ると培養 24 時間後まではキメラマウスと同様に低下を示したが、Donor #1 および Donor #3 において培養 72 時間後に発現量の増加が認められた。

Donor #1 における培養 48 時間時点の CYP1A2 mRNA 発現量は、ヒト肝細胞で 0.006 ± 0.002 に対しキメラマウス肝細胞では 0.036 ± 0.007 となり、キメラマウス肝細胞にはヒト肝細胞の 5.6 倍の発現が認められた。同様に、培養 48 時間時点における Donor #2 のキメラマウス肝細胞にはヒト肝細胞の 3.9 倍の CYP1A2 mRNA 発現が認められ、Donor #3 のそれは 13.4 倍であった。

培養による CYP3A4 mRNA 発現量の経時的な推移を見ると、CYP1A2 mRNA と同様に培養 24 時間後にか

て低下し、Donore #1 と Donore #2 ではヒトとキメラマウスが近似しており、Donore #3 はキメラマウス肝細胞での発現量がヒト肝細胞での発現量を上回っていた。

C-3. ヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞を用いた酵素誘導の比較

我々は凍結で供給されたキメラマウス肝細胞を用い、 β -NF 暴露による CYP1A2 mRNA の誘導と Rif 暴露による CYP3A4 mRNA の誘導を評価できることを別の分担研究報告書で報告している。本研究ではヒト肝細胞と、その細胞をドナーに用いたキメラマウス肝細胞に対して β -NF あるいは Rif を暴露した時のヒト CYP1A2 および CYP3A4 mRNA の変化について図 3 に示した。この図では、縦軸に β -actin mRNA の発現量との比で示した CYP1A2 mRNA あるいは CYP3A4 mRNA 発現量を表した。

β -NF 暴露による CYP1A2 mRNA の誘導作用は、検討した 3 例のヒト肝細胞およびキメラマウス肝細胞でいずれも確認できた。Donor #1 はキメラマウス肝細胞で CYP1A2 mRNA の誘導作用が顕著であり、Donor #2 および Donor #3 ではヒト肝細胞で顕著に誘導された。Donor #1 において、何れの肝細胞も最高用量の 25 μ M β -NF 群での誘導作用は減少し、Donor #2 と Donor #3 のキメラマウス肝細胞における CYP1A2 mRNA の誘導作用はヒト肝細胞に比べると弱い傾向であった。

Rif 暴露による CYP3A4 mRNA の誘導作用はヒト肝細胞で 3 例とも顕著に認められたが、キメラマウス肝細胞では Donor #3 のみに顕著な誘導作用が認められた。

以上より、 β -NF 暴露による CYP1A2

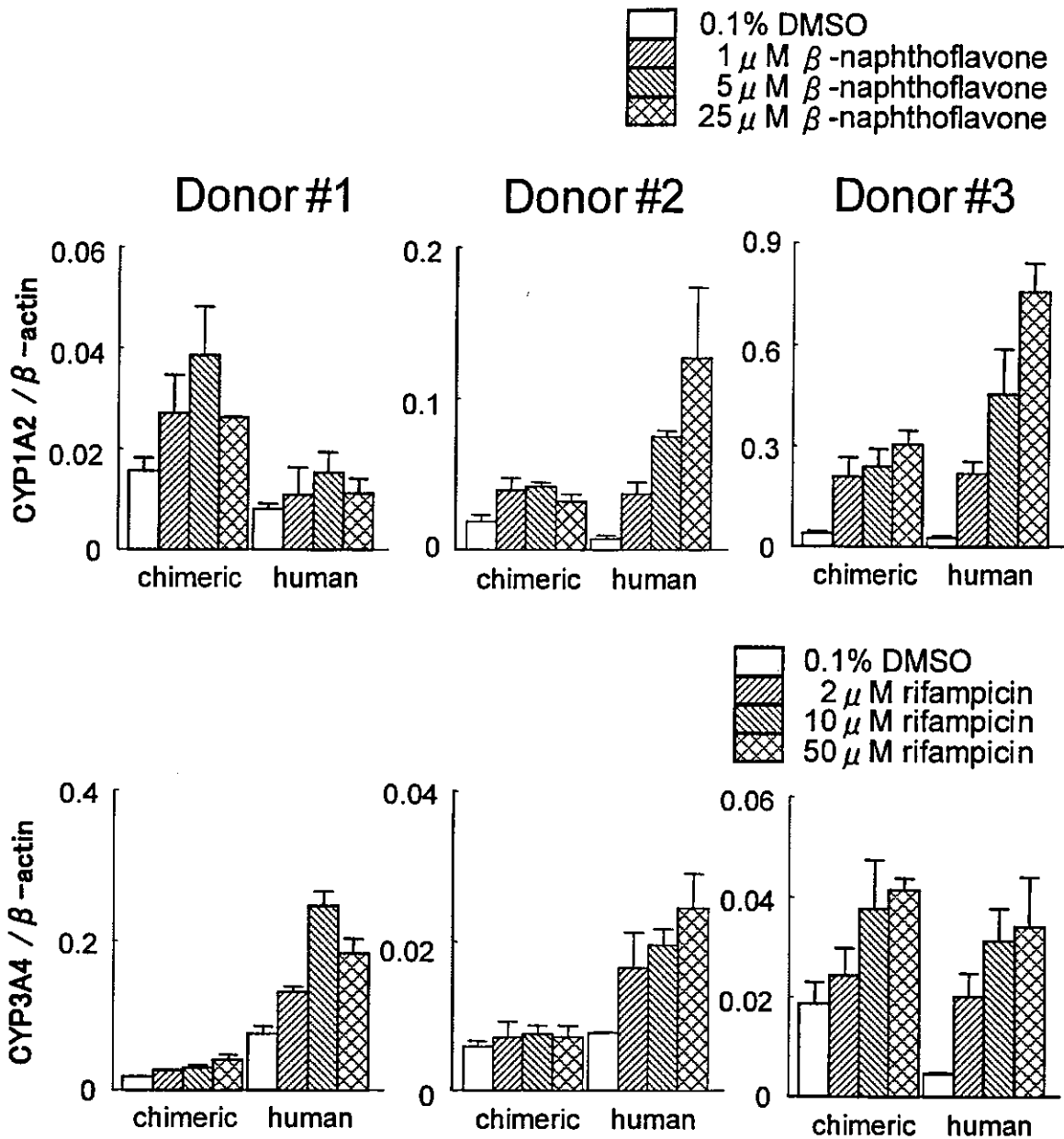


Figure 3. Effect of β -naphthoflavone or rifampicin for exposure on the expression of human CYP1A2 and CYP3A4 mRNA in primary culture of hepatocytes from chimeric mice and human.

β -naphthoflavone (1, 5 and 25 μ M) or rifampicin (2, 10 and 50 μ M) were exposed for 24 hrs. Data are expressed as the ratio of human target mRNA to human β -actin mRNA. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

mRNA 発現量は、3 例共にヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞で同様に誘導作用が見られた。しかし、Rif 暴露による CYP3A4 mRNA 発現量はヒト肝

細胞で3 例共に誘導作用が見られたのに対し、キメラマウスでは3 例中の1 例にのみに誘導作用が確認でき、 β -NF に対する反応性と異なっていた。

D. 考察

創薬科学の進歩により、医薬品開発においてファーマコゲノミクス(PG)データの有用性が認められるようになってきた。そして、探索的な研究でのPG評価法はスクリーニング研究の効率性を上げることが可能であり、ヒトへの外挿性を含めた精度の点で優れていること、新規性の面で将来性が大きいことなどが考えられる。一方、外挿性が不十分であること、データの評価基準が不明確でありバリデートされていないこと、実験技術が確立していないこと、ヒト試料などの試験材料が入手困難であることなどが問題となる。我々はヒト試料を用い薬物代謝酵素の mRNA 発現解析の手法を開発して、医薬品が薬物動態に及ぼす影響を推測している。

医薬品開発における薬物動態研究では多くの場面でヒト試料を用いるようになった。ヒト肝細胞は臨床での代謝・分布反応を予測する研究に利用され、有用性は広く認識されている。欧米において、ヒト肝細胞は遊離肝細胞やプレートに播種された状態で冷蔵供給される。しかし、日本ではドナーの肝臓の提供が無いために冷蔵での供給は難しく、諸外国から供給される凍結肝細胞が用いられている。このような凍結で供給された市販のヒト肝細胞の機能について、Liらは解凍後に薬物代謝酵素活性を測定し、非凍結の新鮮な肝細胞と比較して、平均でCYP1A2は97%、CYP3A4は164%を示し、主要な薬物代謝酵素活性が同等であることを報告している(Li et al., 1999)。

立野らは遺伝的に免疫不全で肝障害のuPA/SCIDマウスを用い、脾臓を経由してヒト肝細胞を移植して肝臓

の80%以上がヒト肝細胞に置換したキメラマウスを完成した(Tateno et al., 2004)。我々は、このキメラマウスから凍結肝細胞を調製して初代培養系による検討を行い、 β -NFあるいはRifの暴露によるCYP1A2 mRNAおよびCYP3A4 mRNAの誘導作用を確認し、ヒト肝細胞の代替実験に利用できることを示した(分担研究報告書参照)。また、キメラマウスの肝臓試料を用いてヒト薬物代謝酵素およびトランスポーターのmRNAが十分に発現していることを確認し、キメラマウスはヒトの薬物動態を予測するための各種の研究に利用できるであろうと報告した(分担研究報告書参照)。

さらに、キメラマウスの有用性を探るために、凍結で市販されているヒト肝細胞試料と、凍結で入手したキメラマウス肝細胞試料を同時に初代培養して、CYP酵素mRNA発現を指標に薬物動態研究における同等性を評価した。この場合、実験に用いたヒト肝細胞をドナーとしてキメラマウスを作製しており、キメラマウスのシステムを利用することにより、ヒト肝細胞を増殖させることができた。実験においては、凍結肝細胞として供給されたヒト肝細胞とキメラマウス肝細胞を用い、薬物代謝酵素のmRNA発現を比較した。細胞培養開始前のキメラマウス肝細胞にはCYPs mRNAの発現は十分に認められており、平均するとドナーのヒト肝細胞での発現量よりも多いようであった。しかし、ヒトとキメラマウス肝細胞での個々のCYP酵素分子種の発現量の比を分散図にプロットして評価すると相関係数は低く偏差が大きいようであった。培養時間が経過し細胞が接着し伸展して酵素誘導実験を開始する培養48時間時点になると、ヒトとキメラマウスの肝

細胞での CYPs mRNA 発現量の相関係数が良好な値に推移し、発現レベルが一致してきたと考えられる。

Bowen らは非凍結で供給されたヒト肝細胞を用い、遊離肝細胞に調製した直後と 5 日間培養した状況で CYP1A1 および CYP3A4 mRNA 発現量を定量した結果、培養により CYP1A1 発現量は増加し、CYP3A4 発現が著しく減少したことを報告している(Bowen et al., 2000)。また、我々の研究においても、凍結で供給されたヒト肝細胞でも培養操作により経時的に薬物代謝酵素の mRNA 発現量が低下することを報告した(Nishimura et al., 2003b)。この変動は、細胞が肝臓内の生理的な活動環境から培養液に浸されて生存のみが主な生理的活動になる単層培養に馴化する平衡反応と考えられる。本研究では、CYP1A2 および CYP3A4 mRNA の発現量は培養 24 時間後まで急速に低下しその後はほぼ一定値に経過していた。このような過程において、CYP1A2 mRNA の発現は常にキメラマウスがヒト肝細胞より高値を示したものの、3 例で良好な相関性が見出されたことは特筆すべき結果であった。一方、CYP3A4 mRNA の発現変動は、3 例の中で 2 例はヒトとキメラマウスで同程度に推移し、1 例は CYP1A2 mRNA と同じくキメラマウスが高値に推移した。いずれにしても、培養開始からの変動は相似した推移であった。mRNA 発現量に個体差が見られたが、Rodriguez-Antona ら(2001)は CYP1A2 mRNA の個体差は 582 倍、CYP3A4 mRNA では 128 倍と報告しており、本研究はこの報告の範囲内であった。

ヒト肝細胞では β -NF による CYP1A2 mRNA の誘導と Rif 暴露による CYP3A4 mRNA の誘導が見られ、薬

物代謝活性と酵素タンパク量の変動で示した Roymans ら(2004)の報告と類似した結果であった。キメラマウスの反応性については、CYP1A2 mRNA に関して、若干の相違はあるものの、3 例共にヒト肝細胞と同じ誘導作用が確認できた。しかし、CYP3A4 mRNA 発現の誘導はヒト肝細胞と比べて 3 例中 2 例は微弱であった。キメラマウス肝細胞を用いた CYP3A4 mRNA の誘導評価は、あらかじめ Rif のような陽性対照薬を用いて反応性を確認する必要がある。パイロット研究でドナーとして用いる肝細胞を取捨選択することが肝要であると思われる。

E. 結論

本研究では、ヒト肝細胞と、それをドナーに用いたキメラマウス肝細胞を用い、薬物動態研究等にヒト肝細胞を用いる研究手法で反応性を比較した。その結果、培養 48 時間以降になるとキメラマウス肝細胞の CYPs mRNA の発現量がヒト肝細胞と同程度になることが確認でき、ヒト肝細胞の代替試料として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はドナーのヒト肝細胞の生理的反応性を定量的に引き継いでいない場合もあることに注意を要する。キメラマウス肝細胞を用いた研究では、ドナー肝細胞の機能がどの程度引き継がれているかを確認することが必要と考えられた。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：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実験

In vitro evaluation of drug induction of human drug-metabolizing enzyme mRNA using hepatocytes isolated from chimeric mice bearing human hepatocytes

第 19 回日本薬物動態学会年会、平成 16 年 11 月 17-19 日、金沢

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).

Garcia, M., Rager, J., Wang, Q., Strab, R., Hidalgo, I. J., Owen, A., 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).

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, 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 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 (2003b).

Nishimura, M., Naito, S. Induction of Human CYP1A2 and CYP3A4 in Primary Culture of Hepatocytes from Chimeric Mice with Humanized Liver ; *Drug Metab. Pharmacokinet.*, (in press).

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., Yoshizato, K.: Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am. J. Pathol.*, **165**: 901-12 (2004).

Seglen, P. O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.*, **13**: 29-83 (1976).

Li, A. P., Lu, C., Brent, J. A., Pham, C., Fackett, A., Ruegg, CE., Silber, PM.: Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential.: *Chem. Biol. Interact.*, **121**: 17-35 (1999).

Lu, C., Li, A. P.: 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 (2001).

Rodriguez-Antona, C., Donato, M. T., Pareja, E., Gomez-Lechon, M. J., Castell, J. V.: Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **393**: 308-315 (2001).

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).

Wilkening, S., Stahl, F., Bader, A.: Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.*, **8**: 1035-1042 (2003).

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ペルオキシソーム増殖剤の影響

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部

協力研究者 池田 敏彦 三共株式会社 薬剤動態研究所 所長

研究要旨

ヒト肝細胞キメラマウスは、広島大学大学院理学研究科の吉里勝利教授が総括する、広島県地域結集型共同研究事業で開発されたマウスであり、ヒトにおける薬物動態や安全性を予測する上で有用な実験動物になり得ると期待されている。本マウスは、肝障害を発症するアルブミンウロキナーゼプラスミノゲンアクチベータートランスジェニックマウス (uPA マウス) と免疫不全の SCID マウスを交配して生じた免疫不全肝障害マウス (uPA (+/+) /SCID (+/+) マウス) にヒト肝細胞を移植して作製された。

一方、フタル酸エステルのようなペルオキシソーム誘導剤を、マウスやラットに投与すると、肝臓のペルオキシソームが顕著に増殖し、さらに長期投与では癌が発生する。このような現象は、ヒトでは起こらないといわれているが、ヒトにおける安全性を評価する適切な評価系の確立が必要とされている。

ヒト肝細胞キメラマウスは、同一個体がヒト肝細胞とマウス肝細胞を有していることから、ペルオキシソーム増殖剤による影響をヒトとマウスで比較するための最適なモデルと思われる。そこで本研究では、ペルオキシソームを増殖させることで有名なプラスチック可塑剤、ジエチルヘキシルフタレート (DEHP) をヒト肝細胞キメラマウスに 10 日間 1%混餌投与し、肝臓中のヒトの細胞領域およびマウスの細胞領域におけるペルオキシソーム増殖の差を観察した。

電子顕微鏡および免疫組織化学的観察の結果、キメラマウス肝臓のマウス肝細胞の領域では、ペルオキシソームの顕著な増殖が確認された。一方、ヒト肝臓の領域では、ペルオキシソームの増殖は認められなかった。

以上の結果から、ヒト肝細胞キメラマウスは、マウスやラットでペルオキシ

ソームの増殖が確認された新薬の、ヒトにおける安全性を予測する最適な実験系になり得ることが示唆された。

A. 研究目的

広島大学大学院理学研究科の吉里勝利教授を統括とする、広島県地域結集型共同研究事業では、肝障害マウス (uPA マウス:参考文献:Cell, vol. 62, 447-456, 1990) と免疫不全マウス (SCID マウス) とを交配させることによって免疫不全肝障害マウス (uPA/SCID マウス) を作製し、さらにヒト肝細胞を移植することにより、マウス肝臓がヒト肝細胞で置換されたヒト肝細胞キメラマウスを作製することに成功した (参考文献: Am J Pathol. 165, 901-912, 2004)。キメラマウス肝臓中のヒト肝細胞は、ヒト型薬物代謝酵素などのヒト肝細胞機能を保持しているため、キメラマウスは医薬品開発において、ヒトにおける薬物動態あるいは安全性を予測するための重要なモデル動物として利用できることが期待される。

本研究では、ヒト肝細胞キメラマウスにペルオキシソーム増殖剤を投与し、投与後の肝臓を観察することにより、ヒトの肝細胞の領域とマウスの肝細胞の領域でペルオキシソーム増殖剤に対する応答性の差異を比較検討した。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスは、フェニックスバイオ株式会社にて、インビトロテクノロジーズ (IVT) 社より

購入したヒト肝細胞、IVT-079 を脾臓より注入することにより作製した。移植約 4 週間後に血中ヒトアルブミン濃度を測定し予想置換率を求めた。移植後 2 ヶ月のヒト肝細胞キメラマウス 9 匹に、プラスチック可塑剤として有名なペルオキシソーム増殖剤 DEHP を 10 日間 1% 混餌 (CE-2: 日本クレア株式会社) 投与した。今回、予想置換率 60% のマウスについて肝臓をホルマリンで固定後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン/エオジン (HE) および各種抗体を用いた免疫組織染色を行った。また、ヒト肝臓の対照群として、エイチ・エー・ビー研究機構から入手したヒト肝臓組織 (32 歳、ヒスパニック系女性) をホルマリン固定し、同様の処理を行った。

C. 研究結果

C-1. HE 染色

キメラマウス肝臓中にヒト肝臓組織と考えられる結節状の構造が認められた。結節を構成する細胞は細胞質が明るいのが特徴的であった (図 1)。

C-2. ヒトアルブミン抗体染色

HAB 協議会より入手したヒト肝臓組織から抗体の反応がヒト特異的であることを確認した (図 2)。本抗体を用いてヒト肝細胞移植キメラマウス

を観察した結果、結節状の細胞集団が陽性に染まりヒト肝細胞であることを確認した（図3）。

C-3. ヒトカタラーゼ抗体染色

同様に、HAB 協議会より入手したヒト肝組織でペルオキシソームが顆粒状に染色され、本抗体がヒト特異的であることを確認した（図4）。DEHP 投与群のヒト肝細胞キメラマウスでは結節状のヒト肝細胞質中にペルオキシソームが顆粒状に観察されたがペルオキシソームの数は、ヒト正常肝並で、増殖は認められなかった（図5）。

C-4. 電子顕微鏡による観察

DEHP 投与ヒト肝細胞移植キメラマウスでは、マウス肝細胞領域でペルオキシソームの顕著な増殖が観察されたが、ヒト肝細胞領域ではペルオキシソームの増殖は認められなかった（図6）。

D. 考察 DEHP 投与により、キメラマウス肝臓中のマウス肝細胞選択的にペルオキシソームの増殖が確認された。

E. 結論

ペルオキシソーム増殖剤のヒトにおける安全性の予測にヒト肝細胞キメラマウスが非常に有用であることが示唆された。

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

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

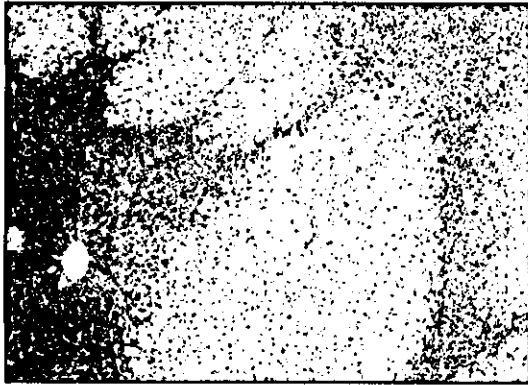


図1 ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の
HE 染色 (x10)

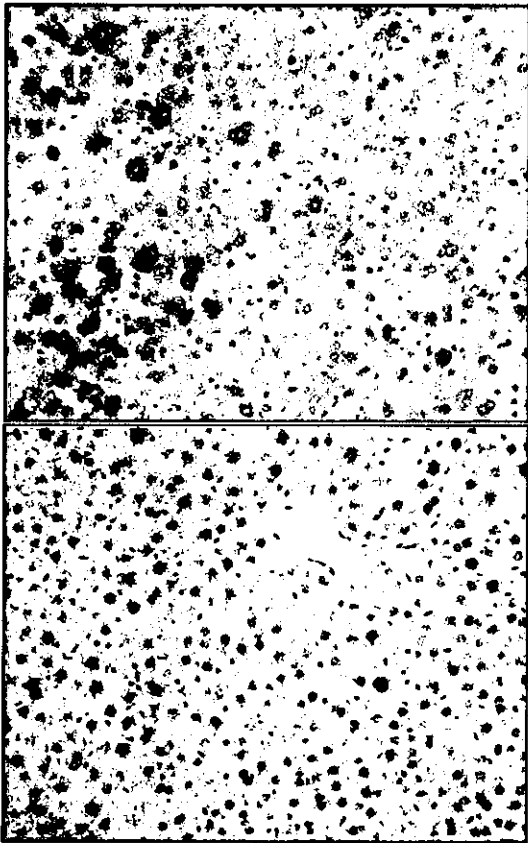


図2 ヒトアルブミン抗体染色 (x20)
上：ヒト肝組織
下：uPA/SCID マウス肝組織

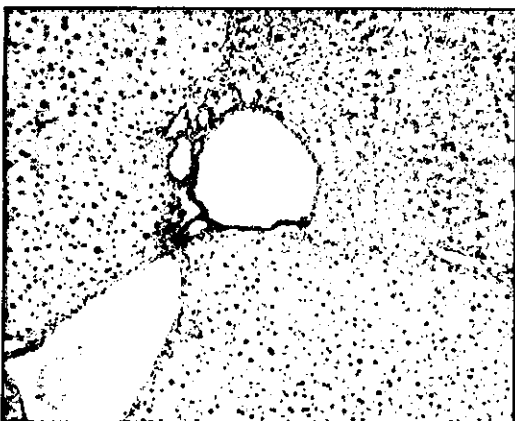


図3：ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の抗
ヒトアルブミン抗体染色 (x10)

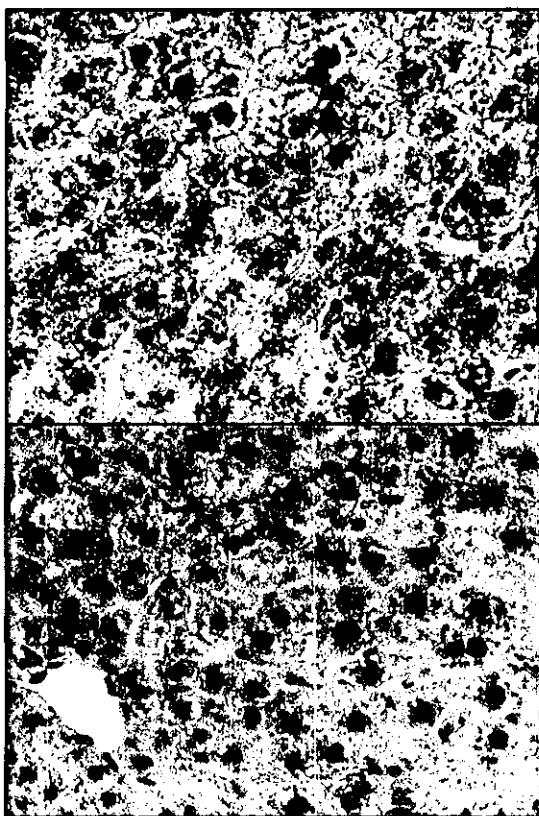


図4 ヒトアルブミンカタラーゼ抗体染色 (x40)

上：ヒト肝組織

下：uPA/SCID マウス肝組織

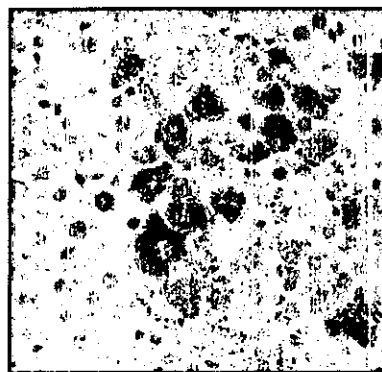
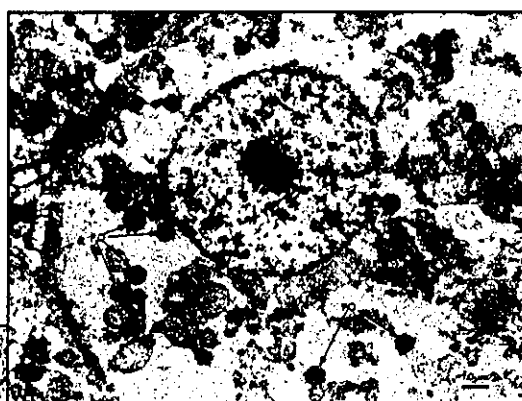
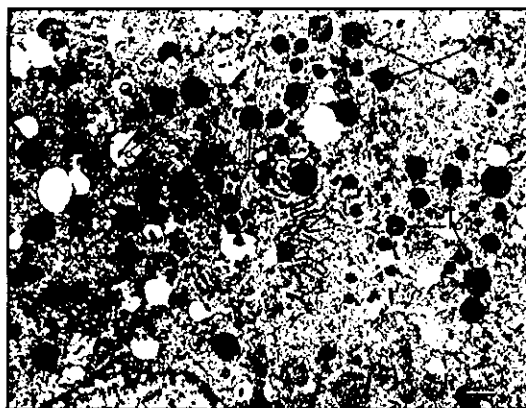


図5：ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の抗ヒトカタラーゼ抗体染色 (x40)

図6：ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の電子顕微鏡観察像

上：ヒト肝細胞領域

下：マウス肝細胞領域



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 Phase II 酵素に関する検討

分担研究者 中島 美紀 金沢大学薬学部 助教授
協力研究者 加藤 美紀 金沢大学薬学部

研究要旨

マウス肝の 80%以上をヒト肝細胞に置換可能なヒト肝細胞キメラマウスは、ヒトにおける薬物動態を予測するのに有用な動物モデルになり得ることが期待される。昨年度までに、キメラマウスの肝にヒト CYP が発現しており、ドナーと同様の酵素活性を持つことを明らかにした。そこで、本年度は Phase II 反応を担う薬物代謝酵素である硫酸転移酵素 (SULT)、N-アセチル転移酵素 (NAT)、グルタチオン S-転移酵素 (GST)、グルクロン酸転移酵素 (UGT) に注目し、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。

キメラマウスの肝におけるヒト UGT、SULT、NAT および GST の発現および薬物抱合能を明らかにするため、様々なヒトアルブミン (hAlb) 濃度を示したキメラマウスを用いて、mRNA 発現量、タンパク発現量、酵素活性を測定した。その結果、mRNA 発現量、タンパク発現量、酵素活性ともに hAlb 濃度依存的な増加が認められた。また、ヒトに特異的なモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性、トログリタゾン硫酸抱合活性、エストロン硫酸抱合活性およびスルファミタジン N-アセチル抱合活性でドナーと同程度の活性を有することが認められた。これより、ヒト肝細胞キメラマウスの肝には、ヒト UGT、SULT、NAT および GST が発現しており、かつヒトの薬物抱合能を有することを明らかにした。

医薬品開発において候補化合物の体内動態を明らかにすることは、有効性および安全性評価において重要である。特に薬物代謝についての詳細な検討は必須項目である。本章における Phase II 酵素に関する基礎的な検討結果を含め、ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト薬物代謝酵素の発現を明らかにすることにより、ヒト肝における薬物の代謝を総括的に実験動物モデルで予測すること

が可能と考えられる。本研究は、ヒト肝細胞キメラマウスの薬物代謝試験への応用を示した研究であり、今後の薬物動態研究をはじめとし医薬品開発に大きく貢献するものと期待できる。

A. 研究目的

近年、医薬品開発において候補化合物の体内動態を明らかにすることは、有効性および安全性評価の要となるため重要であることが広く認識されている。最近 10 年間で、候補化合物が臨床試験開始後に開発中止にいたった理由の約 40%が体内動態に関連するものである。薬効および副作用発現に関連する薬物の体内動態には人種差、個体差が認められており、その原因は薬物の吸収・分布・代謝・排泄過程の差によると考えられる。特に、体内動態に大きな影響を与えるものは代謝過程である。

現在、新規医薬品候補化合物のヒトにおける代謝反応の予測は、ヒト肝ミクロソーム (HLM)、ヒトチトクロム P450 (CYP) 発現系、初代ヒト肝培養細胞 (ヒト肝細胞) あるいはヒト肝スライスなどを用いた *in vitro* 実験系で検討される。頻用されている HLM は、CYP 酵素活性を減少させることなく数年間凍結保存することが可能である。しかし、化合物による CYP の誘導を評価することはできない。ヒト肝細胞は、すべての薬

物代謝酵素が発現しているが、培養を続けるにつれて酵素活性が減少する。加えて、ヒト肝由来の試料は、社会的、倫理的問題を伴い、安定供給に様々な問題がある。これに対し、ラットやマウスなどの実験動物を用いた *in vivo* 実験系は、化合物の全身体内動態を明らかにすることが可能であるという点で有用である。しかし、ヒトとげっ歯類の間には薬物代謝能において大きな種差が存在する。

これらの問題を解決するために様々な研究がなされてきている。Watanabe ら (2003b) は不死化ヒト肝星細胞を用いた人工肝臓を作製した。この細胞モデルでは、CYP3A4 および CYP2C9 のタンパク発現は認められているが、酵素活性については明らかにされていない。また、ヒト肝細胞を増殖させることが可能なヒト肝細胞キメラマウスの開発も行われている。Dandri ら (2001) は免疫不全肝障害マウスにヒト肝細胞を移植し、マウス肝の約 15%をヒト肝細胞に置換することに成功した。同様に、Mercer ら (2001) は 50%以上置換することに成功した。しかし、両者ともヒト肝ウイルス感染に関す

る報告であったため、ヒト薬物代謝酵素の発現に関する情報は無い。

最近、分担研究者である吉里勝利教授により、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)。これは、肝障害を呈するウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター (uPA) (+/+) トランスジェニックマウスと免疫不全マウスである SCID マウスを交配することにより得られる、両形質を有する uPA^{+/+}/SCID マウスにヒト肝細胞を移植して作製する。これまで、マウス肝の80%以上をヒト肝細胞に置換できた例はなく、極めて画期的なキメラマウスと考えられる。このキメラマウスの技術は、少量のヒト肝細胞から同一の肝組織を無限に増殖させることが可能であり、キメラマウスの肝をヒト肝試料として医薬品開発時の薬物動態試験に応用できるか検討することには大きな意義があると考えられる。

CYP は薬物を含む生体異物や内因性化合物などの代謝において重要な役割を担っている。これまで、我々はキメラマウスの肝にはヒト CYP が発現しており、ドナーと同程度の酵素活性を有することを明らかにした (Katoh et al., 2004)。さらに CYP の代表的な誘導薬であるリファンピ

シンおよび 3-MC を用いた実験で、キメラマウスの肝に発現しているヒト CYP は誘導能を有することが明らかになった (Katoh et al., 2005)。

しかし、薬物の代謝には CYP だけではなく、硫酸転移酵素 (SULT)、N-アセチル転移酵素 (NAT)、グルタチオン S-転移酵素 (GST)、グルクロン酸転移酵素 (UGT) などの Phase II 反応に関与する薬物代謝酵素 (Phase II 酵素) も関与している。親化合物が直接抱合を受ける場合もあるが、Phase I 代謝物が抱合され排泄されることも多い。特に近年では、医薬品の非臨床試験において、代謝過程で CYP の関与が小さく、CYP を介した相互作用が少ないと予想される化合物が選択される傾向にある。すなわち、薬物の代謝に関して相対的に Phase II 酵素の寄与が大きくなると考えられる。実際に、多くの薬物が抱合反応を受けることから、キメラマウスの薬物動態学試験への応用に際して、キメラマウスの肝に Phase II 酵素が発現しているかを検討することは極めて重要である。

そこで、本研究では分担者である中島は、昨年度の CYP の発現に関する検討に引き続き、本年度はヒト肝細胞キメラマウス由来の肝ミクロソームを中心に、Phase II 酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)、