

硫酸転移酵素 (SULT)、*N*-アセチル転移酵素 (NAT) およびグルタチオン*S*-転移酵素 (GST) について、RT-PCRを用いてmRNAの発現レベルを、ウエスタンブロット分析によりタンパクの発現レベルを、HPLC分析により各種酵素活性レベルを検討し、ヒト肝細胞キメラマウスの有用性の確立を目指して実験を行った報告を記す。

B. 研究方法

B-1. 実験動物

本章ではヒト肝細胞キメラマウス作製にあたり、ドナーA (白人, 男性, 9ヶ月) とドナーB (日本人, 男性, 12歳) の肝細胞を用いた。雄性 *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。

キメラマウスの作製方法を簡単に以下に示す。生後 20 から 30 日齢の *uPA*^{+/+}/SCID マウスの脾臓からヒト肝細胞を移植した。必要に応じて、補体抑制作用のあるメシル酸ナファモスタットを腹腔内投与した。本章で使用したキメラマウスを 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ヒトアルブミン濃度 (human albumin concn., hAlb) 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. Chimeric mice used in the present study.

Mouse No.	Donor	hAlb	RI
		mg/ml	%
1	A	0.0	0
2	A	0.6	20
3	A	1.2	30
4	A	3.1	50
5	A	6.5	60
6	A	9.3	70
7	A	10.8	80
8	A	13.7	90
9	A	13.7	90

11 ^a	B	0.0	0
12 ^a	B	1.6	30
13 ^a	B	2.1	50
14 ^a	B	3.5	60
15 ^a	B	7.7	90

A: Caucasian, male, 9 months.

B: Japanese, male, 12 years.

^aTotal hepatic RNA in No. 11 - 15 could not be obtained in this study.

B-2. ヒト肝細胞

ドナーA の凍結ヒト肝細胞は、In Vitro Technologies (Catonsville, Japan) より購入した。ドナーB の肝細胞は、両親からのインフォームドコンセントのもと入手した。

B-3. 試薬

ISOGENは日本ジーン (Tokyo, Japan) より購入した。MMLV-逆転写酵素 (reverse transcriptase, RT)、制限酵素*Kpn* Iおよび*Bam* H Iは東洋紡 (Osaka, Japan) から購入した。ランダムヘキサマー、Takara Ex Taq™ R-PCR Version、SYBR® GREEN Iおよび制限酵素*Taq* I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。プールドヒト肝ミクロソーム、プールドヒト肝サイトゾル (HLC)、ヒトUGT1A1およびヒトUGT2B7を発現させたバキュロウイルス発現系ミクロソーム、ウサギ抗ヒトUGT1A1抗体、ウサギ抗ヒトUGT2B7抗体はBD Gentest (Worburn, MA) より購入した。ヒトSULT1Eを発現させたバキュロウイルス発現系サイトゾル、ヒトSULT2A1を発現させたバキュロウイルス発現系サイトゾル、ウサギ抗ヒトSULT1E抗体、ウサギ抗ヒトSULT2A1抗体、ヒトGSTA1-1を発現させた発現系サイトゾルおよびウサギ抗ヒトGSTA1-1抗体はOxford Biomedical Research (Oxford, MI) より購入した。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) より購入した。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。アセチルカルニチン、カルニチンおよびスルファメタジンはSigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。その他の試薬は、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。

5x逆転写反应用緩衝液

250 mM Tris-HCl (pH8.3)、375 mM KCl、15 mM MgCl₂、50 mM DTT

5x SGI緩衝液

Ex Taq R-PCR version 10x Buffer (Mg²⁺ free) 250 μL、250 mM Mg²⁺ Solution 30 μL、100x 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。

TE

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 mM EDTA

0.5x TBE

オートクレーブにより滅菌した 5x TBE (Tris 54.0 g、ホウ酸 27.5 g、EDTA 4.7 g) を精製水で 10 倍希釈

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、グリセロール 60 mLに超純水を加え、全量を192 mLとした。

SE

5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)、50 mM EDTA、0.5% N-ラウロイルサルコシナトリウム

フェノール溶液

フェノールを1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4) で平衡化後、8-ヒドロキシキノリンを0.1%、2-メルカプトエ

タノールを0.2%になるよう加えた。

フェノール/クロロホルム溶液

フェノールにクロロホルムを等量加え、1 M Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4) で平衡化後、8-ヒドロキシキノリンを0.1%、2-メルカプトエタノールを0.2%になるよう加えた。

クロロホルム溶液

クロロホルムとイソアミルアルコールを24:1 (v/v) の比で混合

B-4. 肝からのtotal RNAの調製

ISOGENのマニュアルに修正を加え、以下の方法で肝臓からtotal RNAを調製した。肝切片に、ISOGENを加えてホモジナイズ後、サンプルチューブに分注し、クロロホルムを加えて激しく15秒間攪拌した。室温で3分間放置した後、4°C、14,000 gで15分間遠心分離した。上清を別のチューブに採取し、イソプロパノールを加えて室温にて8分間放置した後、4°C、13,000 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。同時に300 nmの吸収を基準として280 nmと260 nmの吸光度を測定し、その比をタンパク質混入の有無の指

標とした。なお、ドナーAの肝を入手することができなかつたため、total RNAを調製できなかつた。

B-5. RT-PCR法によるヒトmRNA発現量の定量

UGT1A1、UGT1A9、UGT2B7、SULT1A1、SULT1B1、SULT2A1、NAT1、NAT2、GSTA1、GSTA2およびGSTT1 mRNAの定量は大塚製薬工場株式会社（東京）に依頼し、Taq-Man™プローブ法にて行った（Nishimura et al., 2002）。本章で使用したプライマーはマウスと交差反応を示さないことを確認した。

UGT1A1

(GenBank accession number

NM_000463)

Sense primer (187-207):

5'-GACGCCTCGTTGTACATCAGA-3'

Anti-sense primer (269-249):

5'-TCTTTACATCCTCCCTTTGG-3'

TaqMan probe (209-238): 5'-ACGGAG

CATTTTACACCTTGAAGACGTACC-3'

UGT2B7

(GenBank accession number NM_001074)

Sense primer (14-42): 5'-GGACTTC

AGTAATTTTGCTAATACTG-3'

Anti-sense primer (98-80):

5'-TATTCTGCTGCCCACACCA-3'

TaqMan probe (76-47): 5'-CCTTTCC

ACAATTCCCAGAGCTAAAGCAAA-3'

SULT1A1

(GenBank accession number

NM_001055)

Sense primer (391-408):

5'-AACGCAAAGGATGTGGCA-3'

Anti-sense primer (510-491):

5'-TCCGTAGGACACTTCTCCGA-3'

TaqMan probe (431-452):

5'-ACATGGCCAAGGTGCACCCTGA-3'

SULT1B1

(GenBank accession number NM_014465)

Sense primer (386-404):

5'-TGGCTCGTAATGCCAAGGA-3'

Anti-sense primer (518-498):

5'-CAGGAACCATAGGCCACTTTT-3'

TaqMan probe (448-479): 5'-CAGCCTTT

TCCTGGTACCTGGGAAGAATATCT-3'

GSTA1

(GenBank accession number S49975)

Sense primer (151-170):

5'-ATGTTCCAGCAAGTGCCAAT-3'

Anti-sense primer (519-501):

5'-ACTGGAGTCAAGCTCCTCG-3'

TaqMan probe (331-361): 5'-

GTATGTCC

ACCTGAGGAAAAAGATGCCAAGC-3'

また、ヒトSULT1E1 mRNA発現量の定量は、total RNAからcDNAを合成し、得られたcDNA溶液を用いて以下のようにPCRを行った。cDNA溶液 1 μ L、10 μ M センスプライマー 1 μ L、10 μ M アンチセンスプライマー 1 μ L、5x SGI緩衝液 5 μ Lに滅菌精製水を加え、全量を25 μ Lとした。Smart Cycler[®] System (Cepheid, Sunnyvale, CA) を用いて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。本章で使用したヒトSULT1E1プライマーを下記に示す。本章で使用したヒトSULT1E1プライマーはマウスSULTと交差反応を示さないことを確認した。

SULT2E1

(GenBank accession number NM_005420)

Sense primer (277-297):

5'-AAACAATTAGATGAGATGAAT-3'

Anti-sense primer (450-433):

5'-ATTTGGATGACCAGCCAC-3'

B-6. 肝ミクロソームおよび肝サイトゾルの調製

採取したキメラマウス、uPA^{+/+}/SCIDマウスおよびuPA^{-/-}/SCIDマウス肝を用いた。採取したマウス肝に、肝重量の3倍容のホモジナイズ緩衝液を加え、ポリトロンにより細切後、テフロンホモジナイザーにてホ

モジナイズした。ホモジネートを9,000 g、4°Cで20分間遠心分離後、上清をさらに105,000 g、4°Cで90分間遠心分離した。得られた上清をサイトゾルとした。また沈殿物にホモジナイズ緩衝液を加えてホモジナイズ後、105,000 g、4°Cで60分間遠心分離した。得られた沈殿物を肝重量の1倍容のTGE緩衝液に懸濁しミクロソームとした。また、Bradford法 (Bradford, 1976) に従い Protein Assay kit を用いてサイトゾルタンパクの定量を行った。なお、ドナーAについては肝を入手することができなかったため、肝ミクロソームおよび肝サイトゾルを調製できなかった。

B-7. SDS-PAGEとウエスタンブロット分析によるヒトPhase II酵素タンパクの定量

Laemmli (1970) およびTowbinら (1979) の方法に修正を加え、以下の方法により測定を行った。

肝ミクロソームおよび肝サイトゾルにサンプル処理液と2-メルカプトエタノールを加えた後、100°Cで3分間煮沸し、ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後、Immobilon膜 (Millipore, Billerica, MA) に電氣的に転写した。1次抗体、2次抗体、3次抗体反応後の発色は0.06%の3,3'-ジ

アミノベンチジン四塩酸塩を用い、GS-700 デンシトメーター (Bio-Rad) にて定量した。予備検討の結果より、各ヒトUGT、SULT、GST抗体は本章の実験条件ではマウスUGT、SULT、GSTと交差反応を示さないことを確認した。

B-8. Phase II 酵素活性測定

B-8-1. モルフィン 6-グルクロン酸抱合活性測定

モルフィン6-グルクロン酸抱合活性はWatanabeら (2002) の方法に修正を加えて以下のように測定した。反応溶液は1 mM モルヒネ、100 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)、5 mM MgCl₂、25 µg of alamethicin/mg microsomal protein、0.5 mg/mLミクロソームタンパク、30 mM UDP-グルクロン酸とした。反応停止後、13,000 gで10分間遠心分離し、上清80 µLをHPLCに注入した。HPLCによる分析にはL7100ポンプ (日立製作所, Tokyo, Japan)、L7200オートサンプラー (日立製作所)、L7405 UV検出器 (日立製作所)、Uni-3ノイズベースクリーン (ユニオン, Gunma, Japan)、CTO-6Aカラムオープン (島津製作所, Kyoto, Japan) を用いた。カラムはDevelosil C30-UG (野村化学, Aichi, Japan) を用い、移動相は50 mMリン酸二水素ナトリウム溶液

とした。カラム温度は35°C、流速は1.5 mL/minとし、溶離液をUV 285 nmでモニターし、D-2000インテグレーター (日立製作所) に出力した。

B-8-2. トログリタゾン硫酸抱合活性の測定

トログリタゾン硫酸抱合活性はHonmaら (2001) の方法に修正を加えて以下のように測定した。反応溶液は最終濃度が1 µMトログリタゾン、50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)、1 mM DTT、0.5 mg/mLサイトゾルタンパク、100 µM PAPSとした。反応停止後、13,000 gで10分間遠心分離し、上清80 µLをHPLCに注入した。HPLCによる分析にはL7100ポンプ、L7200オートサンプラー、L7405 UV検出器、Uni-3ノイズベースクリーン、CTO-6Aカラムオープンを用いた。カラムはYMC-PACK ODS-A 302 (YMC, Kyoto, Japan) を用い、移動相は42%アセトニトリル/0.05%リン酸 (v/v) とした。カラム温度は35°C、流速は1.5 mL/minとし、溶離液をUV 230 nmでモニターし、D-2000インテグレーターに出力した。

B-8-3. エストロン硫酸抱合活性の測定

エストロン硫酸抱合活性はSuzukiら (2003) の方法に修正を加え以下

のように測定した。反応溶液は50 μ M エストロン、50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)、1 mM DTT、7 mM MgCl₂、0.8 mg/mL サイトゾルタンパク、100 μ M PAPS とした。反応停止後、13,000 gで10分間遠心分離し、上清80 μ LをHPLCに注入した。HPLCによる分析にはL7100ポンプ、L7200オートサンプラー、L7405 UV検出器、Uni-3ノイズベースクリーン、CTO-6Aカラムオープンを用いた。カラムはCapcell Pak UG120 (SHISEIDO, Tokyo, Japan) を使い、移動相は25% アセトニトリル/50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) とした。カラム温度は35°C、流速は1.0 mL/minとし、溶離液をUV 275 nmでモニターし、D-2000インテグレータに出力した。

B-8-4. スルファメタジン N-アセチル抱合活性の測定

スルファメタジンN-アセチル抱合活性はEstrada-Rodgersら (1998) の方法に修正を加え以下のように行った。反応溶液は500 μ Mスルファメタジン、50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4)、1 mM DTT、5 mMアセチルカルニチン、0.02 Unitカルニチンアセチルトランスフェラーゼ、0.5 mg/mL サイトゾルタンパク、アセチルコエンザイムAとした。反応停止後、8,000 gで10分間遠心分離し、上清50

μ LをHPLCに注入した。HPLCによる分析にはLC-6Aポンプ (島津製作所)、SIL-6Bオートサンプラー (島津製作所)、SPD-6AV UV検出器 (島津製作所)、SLC-6Bシステムコントローラー (島津製作所)、WIG-7000Aクーリングシステム (Isido, Tokyo, Japan)、Uni-3ノイズベースクリーン、CO-965カラムオープン (日本分光, Tokyo, Japan) を用いた。カラムはMightysil RP-18 (関東化学, Tokyo, Japan) を使い、移動相は5% アセトニトリル/20 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) とした。カラム温度は35°C、流速は1.0 mL/minとし、溶離液をUV 254 nmでモニターし、C-R7A plusインテグレーター (島津製作所) に出力した。

B-9. 肝ゲノムDNAの調製

Brilliant ら (1991) の方法に従い、ドナーA由来のキメラマウスの肝について以下の操作を行い、ゲノムDNAを調製した。肝切片にTE (pH 7.4) を加えガラスホモジナイザーにてホモジナイズした。その後、別のチューブに移し、SEを加え、さらに1/10量の10 mg/mLアクチナーゼEと10 mg/mL RNaseを10 μ L加え転倒攪拌した後、37°Cで2時間インキュベートした。等量のフェノール溶液を加え、室温で10分間振盪後、20°C、600 g

で10分間遠心分離を行い、上清を回収した。次に等量のフェノール/クロロホルム溶液を加え、室温で10分間振盪後、20°C、600 gで10分間遠心分離を行い、上清を回収し、再度同様の操作を行った。さらに2倍量のクロロホルム溶液を加え、室温で10分間振盪し、20°C、600 gで10分間遠心分離を行い、上清を回収した。0.5% リニア-ポリアクリルアミドを10 µL 加えた後、冷エタノールを2.5倍容加え、穏やかに転倒攪拌した。-80°Cで30分間冷却した後、4°C、9,000 gにて10分間遠心分離を行った。沈殿を冷70%エタノールで洗浄し、得られたゲノムDNAをTEに溶解した。4°Cで一晩放置後、260 nmにおける吸光度を測定することにより定量した。同時に300 nmの吸収を基準として280 nmと260 nmの吸光度を測定し、その比をタンパク質混入の有無の指標とした。

B-10. ヒトNAT2 遺伝子多型の判定

B-10-1. AS-PCRによる遺伝子判定

NAT2*5の遺伝子判定を2種のAS-PCR法 (A) および (B) を用いて行った。遺伝子判定に用いたプライマーはTable 2に示した。

(A) ゲノムDNAに10x PCR緩衝液 2.5 µL、10 µMのセンスプライマー (341-SW1もしくは341-SM1) と10

µMのアンチセンスプライマー (341-AS) をそれぞれ1 µL、2.5 mM dNTPs 2.5 µL、25 mM MgCl₂ 1.5 µL、Taq DNAポリメラーゼ 0.2 µL (1.0 U) を加え、滅菌精製水にて全量を25 µLとし、PCR反応を行った。反応後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行い遺伝子断片の長さを確認した。Fig. 1Aに泳動模式図を示した。なお、使用したプライマーはuPA^{+/+}/SCIDマウス、uPA^{-/-}/SCIDマウスの肝から調製したゲノムDNAには交差反応しないことを確認した。

(B) Cascorbiら (1995) の方法に修正を加え、以下のように行った。ゲノムDNAに10x PCR緩衝液2.5 µL、10 µMのセンスプライマー (NAT2-S2) と10 µMのアンチセンスプライマー (NAT2-AS2) をそれぞれ0.5 µL、2.5 mM dNTPs 2 µL、25 mM MgCl₂ 2.4 µL、Taq DNAポリメラーゼ 0.2 µL (1.0 U) を加え、滅菌精製水にて全量を25 µLとしPCR反応を行った。反応後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、886 base pair (bp) の長さの遺伝子断片をゲルごと切り出した。切り出したゲルをシームレスセルロースチューブ (和光純薬工業, Osaka, Japan) に入れ、0.5x TBEを加えた後、電気泳動し、886 bpのPCR産物を含む溶液を回収した。その後、等量のものフェノール/クロロホルム溶

液を加え、室温で5分間振盪後、20°C、3,000 gで5分間遠心分離を行い、上清を回収した。さらに等量のクロロホルム溶液を加え、室温で5分間振盪し、20°C、3,000 gで5分間遠心分離を行い、上清を回収した。2.5倍量の冷エタノールと1/10量の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.2) 加え、穏やかに転倒攪拌した。-80°Cで30分間冷却した後、4°C、13,000 gにて10分間遠心分離を行った。沈殿を冷70%エタノールで洗浄し、TEに溶解した。切り出した886 bpのPCR産物溶液1 µLに10x PCR緩衝液2.5 µL、10 µMのセンスプライマー (341-SW2もしくはは

341-SM2) と10 µMのアンチセンスプライマー (NAT2-AS2) をそれぞれ0.5 µL、2.5 mM dNTPs 2 µL、25 mM MgCl₂ 1.8 µL、Taq DNAポリメラーゼ 0.2 µL (1.0 U) を加え、滅菌精製水にて全量を25 µLとしPCR反応を行った。反応後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行い遺伝子断片の長さを確認した。Fig. 1Bに泳動模式図を示した。なお、使用したプライマーはuPA^{+/-}/SCIDマウス、uPA^{-/-}/SCIDマウスの肝から調製したゲノムDNAには交差反応しないことを確認した。

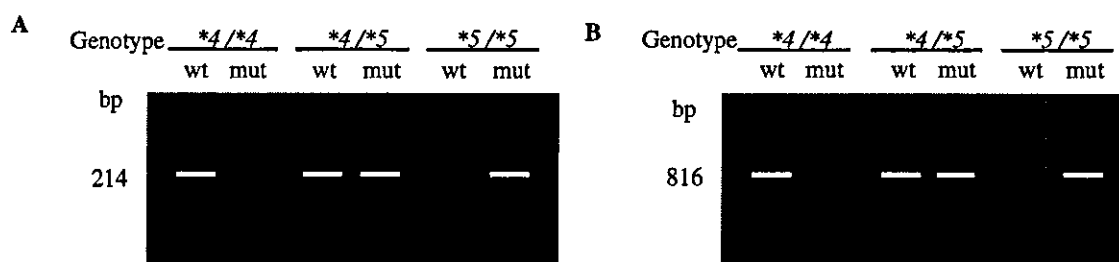


Fig. 1. Genotyping of NAT2*5 allele in genomic DNA by AS-PCR. Schematic AS-PCR patterns for detection of the NAT2*5 allele using different primers. A, The 341-Swt1, 341-Smut1 and 341-AS primers were used. B, NAT2-S2, NAT2-AS2, 341-Swt2 and 341-Smut2 primers from Cascorbi et al. (1995) were used. wt: PCR product obtained by wild-specific primer; mut: PCR product obtained by mutant-specific primer.

B-10-2. PCR-RFLPによる遺伝子判定

NAT2*6、NAT2*7 の遺伝子判定はそれぞれ制限酵素 *Taq* I、*Bam*HI を用いたPCR-RFLP法により判定を行った。遺伝子判定に用いたプライマーはTable 2に示した。ゲノムDNAに10x PCR緩衝液 2.5 μ L、10 μ Mのセンスプライマー (NAT2-S1) と10 μ Mのアンチセンスプライマー (NAT2-AS1) をそれぞれ1 μ L、2.5 mM dNTPs 2.5 μ L、25 mM $MgCl_2$ 1.5 μ L、*Taq* DNAポリメラーゼ 0.2 μ L (1.0 U) を加え、滅菌精製水にて全量を25 μ LとしPCR反応を行った。反応終了後、NAT2*6 の遺伝子判定には、得られたPCR産物に10 x 緩衝

液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、5 mM $MgCl_2$ 、100 mM NaCl) と0.1%BSA、制限酵素 *Taq* Iを加え、65°Cでインキュベートした。NAT2*7 の遺伝子判定には、得られたPCR産物に10 x H緩衝液 (500 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM $MgCl_2$ 、10 mM DTT、1000 mM NaCl)、制限酵素 *Bam*HI を加え、37°Cでインキュベートした。反応後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行い遺伝子断片の長さを確認した。Fig. 2に泳動模式図を示した。なお、予備検討において、遺伝子判定に使用したプライマーはuPA^{+/+}/SCIDマウス、uPA^{-/-}/SCIDマウスの肝から調製したゲノムDNAには交差反応しないことを確認した。

Table 2. Sequence of the primers used for the genotyping of NAT2.

Primer	Sequence
NAT2-S1	5'-GGCTATTGATCACATTGTA-3'
NAT2-AS1	5'-AGCATGAATCACTCTGCTTC-3'
341-Swt1	5'-CTCCTGCAGCTGACCAT-3'
341-Smut1	5'-CTCCTGCAGCTGACCAC-3'
341-AS	5'-TTGGTGTTCCTCTTTGGC-3'
NAT2-S2 ^a	5'-GTCACACGAGGAAATCAAATGC-3'
NAT2-AS2 ^a	5'-GTTTTCTAGCATGAATCACTCTGC-3'
341-Swt2 ^a	5'-CCTGCAGGTGCCAT-3'
341-Smut2 ^a	5'-CCTGCAGGTGCCAC-3'

S: Sense primer, AS: Anti-sense primer.

wt: Wild, mut: Mutant

^a From Cascorbi et al. (1995)

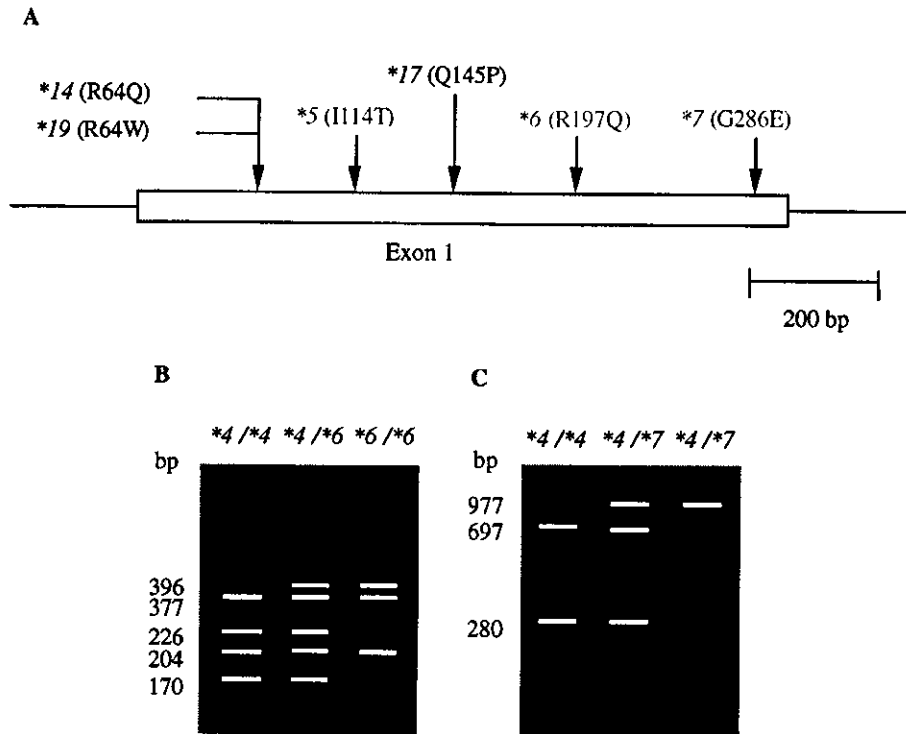


Fig. 2. SNPs in exon 1 on human *NAT2* gene (A) and schematic PCR-RFLP patterns for different *NAT2* alleles of *NAT2**4 (wild type), *NAT2**6 and *NAT2**7 (B). B, The *NAT2**4 yields 377, 226, 204 and 170 bp fragments, *NAT2**6 (*6) yields 396, 377 and 204 bp fragments. C, The *NAT2**4 yields 697 and 280 bp fragments, *NAT2**7 (*7) yields 977 bp fragment.

C. 研究結果

C-1. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトUGT1A1の発現

C-1-1. ヒト UGT1A1 mRNA 発現量

Fig. 3A にヒト UGT1A1 mRNA 発現量の定量結果を示した。ドナーA 由来のキメラマウスは、hAlb 濃度依存的なヒト UGT1A1 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト UGT1A1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.95$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト UGT1A1 mRNA 発

現量が認められた。

C-1-2. ヒト UGT1A1 タンパク発現量

Fig. 3B にヒト UGT1A1 タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス No. 1 から No. 3、No. 11 を除いて、両ドナー由来のキメラマウスともに、ヒト UGT1A1 タンパクの発現が認められた。なお、ヒト UGT1A1 タンパク発現量と hAlb 濃度の相関係数は、ドナーA 由来のキメラマウスで $r = 0.95$ 、ドナーB 由来

のキメラマウスで $r=0.98$ であった。 UGT1A1 タンパク発現量は、ドナー
 また、キメラマウス No. 15 のヒト B の約 1.2 倍であった。

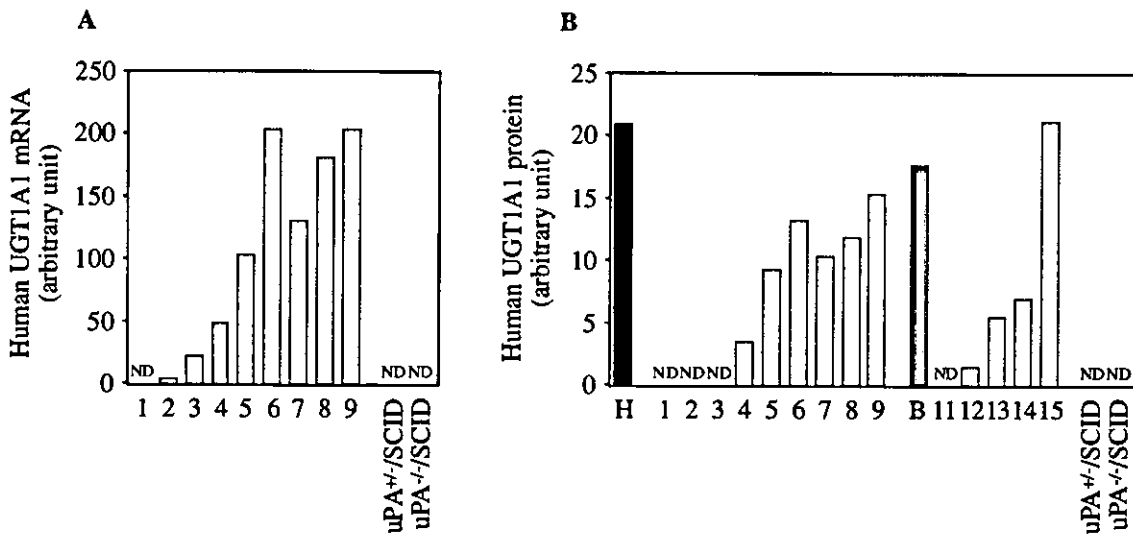


Fig. 3. Human UGT1A1 expression in the chimeric mice. Relative expression levels of human UGT1A1 mRNA (A) and the expression of human UGT1A1 protein (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. H: human liver microsomes; B: donor B; ND: not detected.

I-C-2. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト UGT1A9 の発現

Fig. 4 にヒト UGT1A9 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト UGT1A9 mRNA 発

現量の増加が認められた。ヒト UGT1A9 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.77$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト UGT2B7 mRNA 発現が認められた。

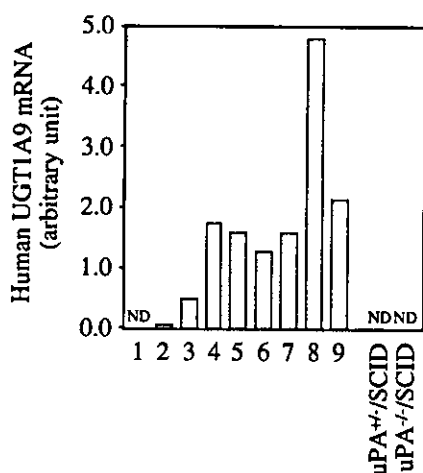


Fig. 4. Human UGT1A9 expression in the chimeric mice. Relative expression level of human UGT1A9 mRNA was determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. ND: not detected.

C-3. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト UGT2B7 の発現

C-3-1. ヒト UGT2B7 mRNA 発現量

Fig. 5A にヒト UGT2B7 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスは、hAlb 濃度依存的なヒト UGT2B7 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト UGT2B7 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.93$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト UGT2B7 mRNA 発現が認められた。

C-3-2. ヒト UGT2B7 タンパク発現量

Fig. 5B にヒト UGT2B7 タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス No. 1、No. 3、No. 11 を除いて、

両ドナー由来のキメラマウスともに、ヒト UGT2B7 タンパクの発現が認められた。なお、ヒト UGT2B7 タンパク発現量と hAlb 濃度の相関係数は、ドナーA 由来のキメラマウスで $r = 0.85$ 、ドナーB 由来のキメラマウスで $r = 0.99$ であった。また、キメラマウス No. 15 のヒト UGT2B7 タンパク発現量は、ドナーB の約 2.6 倍であった。

C-3-3. モルフィン 6-グルクロン酸抱合活性

Fig. 5C にモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性の結果を示す。両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb 濃度依存的なモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性の増加が認められた。モルフィン 6-グルクロン酸抱合活性

と hAlb 濃度の相関係数はドナーA 由来のキメラマウスで $r = 0.93$ 、ドナー B 由来のキメラマウスで $r = 0.93$ であった。また、キメラマウス No. 15 の活性値は、ドナーBの活性値の約3.0

倍であった。なお、HLM の活性値はであり、uPA^{+/-}/SCID マウスや uPA^{-/-}/SCID マウスの 41.3 倍、34.8 倍であった。

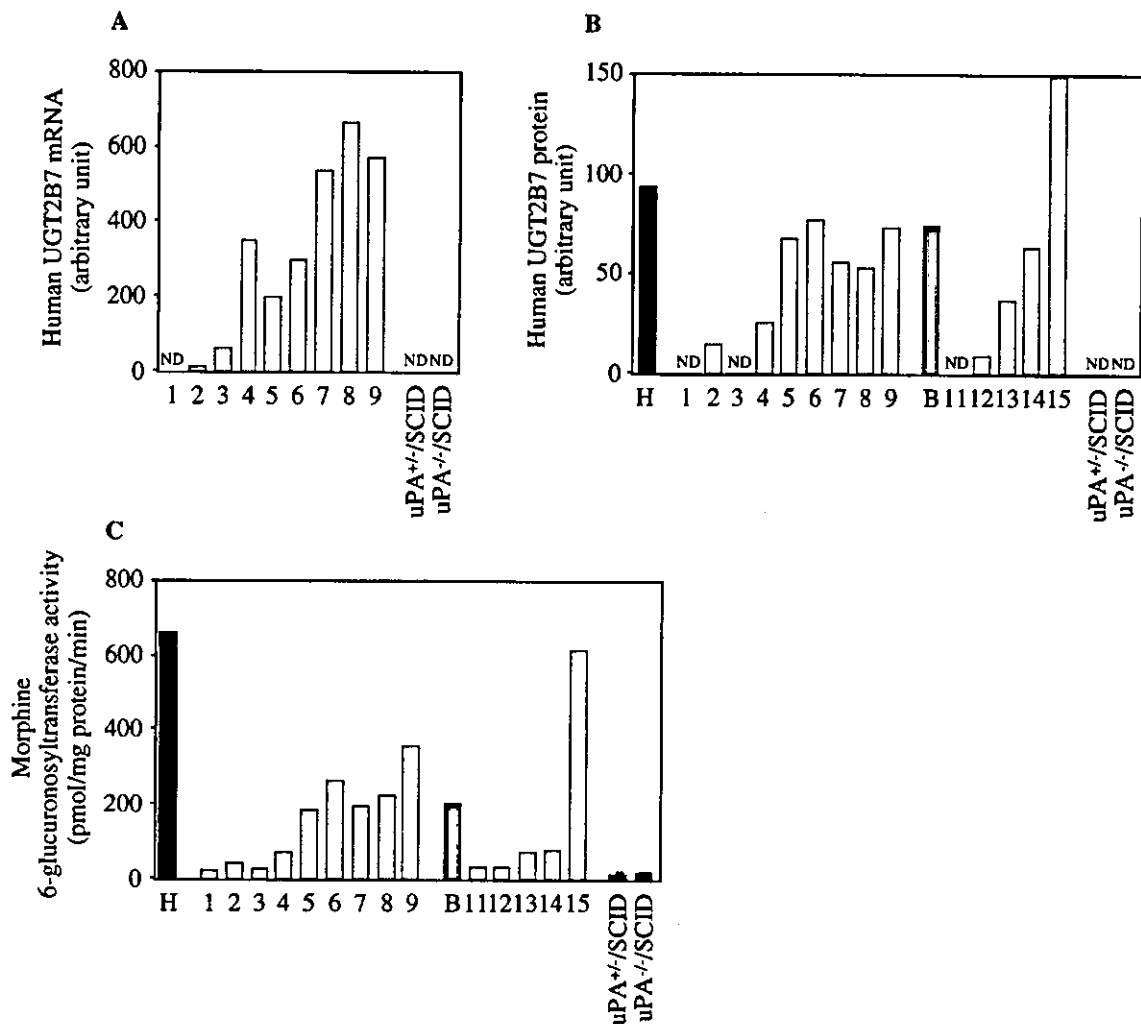


Fig. 5. Human UGT2B7 expression in the chimeric mice. Relative expression levels of human UGT2B7 mRNA (A), the expression of human UGT2B7 protein (B), and morphine 6-glucuronosyltransferase activity (C) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations except in uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice. The columns of uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice represent the mean \pm SD ($n=3$). The sample numbers are described in Table 1. H: human liver microsomes; B: donor B; ND: not detected.

C-4. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトSULT1A1の発現

C-4-1. ヒト SULT1A1 mRNA 発現量

Fig. 6A ヒト SULT1A1 mRNA 発現量の定量結果を示した。ドナーA由来のキメラマウスにおいて、hAlb濃度依存的なヒト SULT1A1 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト SULT1A1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.90$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト SULT1A1 mRNA 発現が認められた。

Fig. 6B にトログリタゾン硫酸抱合活性の結果を示した。両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb 濃度依存的なトログリタゾン硫酸抱合活性の増加が認められた。トログリタゾン硫酸抱合活性と hAlb 濃度の相関係数はドナーA 由来のキメラマウスで $r = 0.69$ 、ドナーB 由来のキメラマウスで $r = 0.82$ であった。また、キメラマウス No. 15 の活性値は、ドナーB の活性値とほぼ同等であった。なお、HLC の活性値は、uPA^{+/-}/SCID マウスと比べて 20 倍、uPA^{-/-}/SCID マウスと比べて 7 倍であった。

C-4-2. トログリタゾン硫酸抱合活性

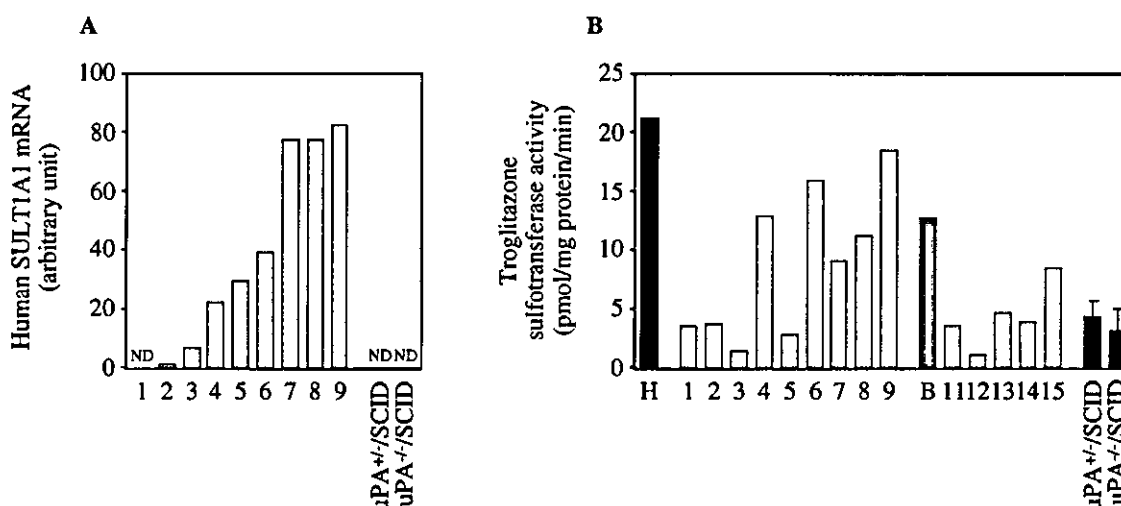


Fig. 6. Human SULT1A1 expression in the chimeric mice.

Relative expression levels of human SULT1A1 mRNA (A) and troglitazone sulfotransferase activity (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations except in uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice. The columns of uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice represent the mean \pm SD ($n=3$). The sample numbers are described in Table 1. H: human live cytosol; B: donor B; ND: not detected.

C-5. ヒト肝細胞キメラマウスにおける SULT1B1 の発現

Fig. 7 にヒト SULT1B1 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト SULT1B1 mRNA 発

現量の増加が認められた。ヒト SULT1B1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.62$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト SULT1B1 mRNA 発現が認められた。

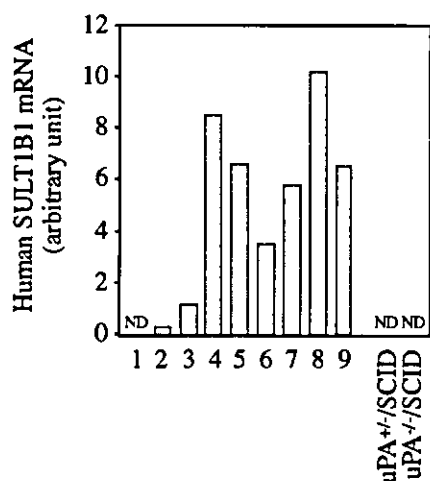


Fig. 7. Human SULT1B1 expression in the chimeric mice.

Relative expression level of human SULT1B1 mRNA was determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. ND: not detected.

C-6. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト SULT1E の発現

C-6-1. ヒト SULT1E1 mRNA 発現量

Fig. 8A にヒト SULT1E1 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト SULT1E1 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト SULT1E1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.92$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くす

べてのキメラマウスでヒト SULT1E1 mRNA 発現が認められた。

C-6-2. ヒト SULT1E タンパク発現量

Fig. 8B にヒト SULT1E タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス No. 1、No. 11 を除いて、両ドナー由来のキメラマウスともに、ヒト SULT1E タンパクの発現が認められた。なお、ヒト SULT1E タンパク発現量と hAlb 濃度の相関係数は、ド

ナーA由来のキメラマウスで $r=0.54$ 、ドナーB由来のキメラマウスで $r=0.90$ であった。また、キメラマウス No. 15 のヒト SULT1E タンパク発現量は、ドナーB の 1.4 倍であった。

C-6-3. エストロン硫酸抱合活性

Fig. 8C にエストロン硫酸抱合活性の結果を示す。両ドナー由来のキメラマウスともに、hAlb 濃度依存的なエストロン硫酸抱合活性の増加が認められた。トログリタゾン硫酸抱合活性と hAlb 濃度の相関係数はドナーA由来のキメラマウスで $r=0.87$ 、ドナーB由来のキメラマウスで $r=0.90$ であった。また、キメラマウス No. 15 の活性値は、ドナーB の活性値の 1.2 倍であった。なお、HLC の活性値はであり、uPA^{+/+}/SCID マウスや uPA^{-/-}/SCID マウスでは活性が認められなかった。

C-7. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトSULT2A1の発現

C-7-1. ヒト SULT2A1 mRNA 発現量

Fig. 9A にヒト SULT2A1 mRNA

発現量の定量結果を示す。ドナーA由来のキメラマウスにおいて、ヒト SULT2A1 mRNA の発現が認められた。ヒト SULT2A1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r=0.90$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト SULT2A1 mRNA 発現が認められた。

C-7-2. ヒト SULT2A1 タンパク発現量

Fig. 9B にヒト SULT2A1 タンパク発現量の定量結果を示す。キメラマウス No. 1、No. 11 を除いて、両ドナー由来のキメラマウスともに、ヒト SULT2A1 タンパクの発現が認められた。なお、ヒト SULT2A1 タンパク発現量と hAlb 濃度の相関係数は、ドナーA由来のキメラマウスで $r=0.70$ 、ドナーB由来のキメラマウスで $r=0.95$ であった。また、キメラマウス No. 15 のヒト SULT2A1 タンパク発現量は、ドナーB の 1.4 倍であった。

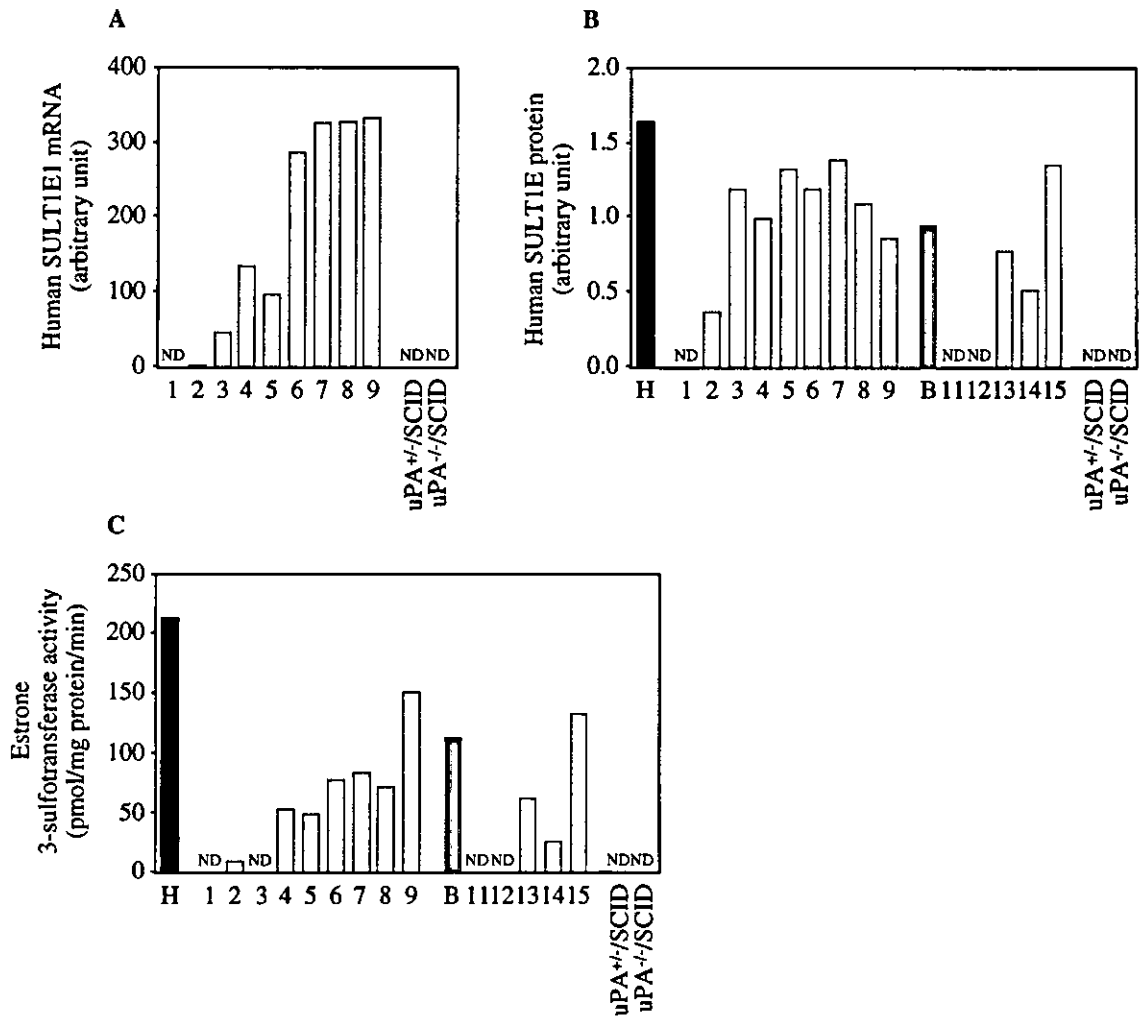


Fig. 8. Human SULT1E1 expression in the chimeric mice. Relative expression levels of human SULT1E1 mRNA (A), the expression of human SULT1E1 protein (B), and estrone 3-sulfotransferase activity (C) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations except in uPA^{+/+}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice. The sample numbers are described in Table 1. H: human live cytosol; B: donor B; ND: not detected.

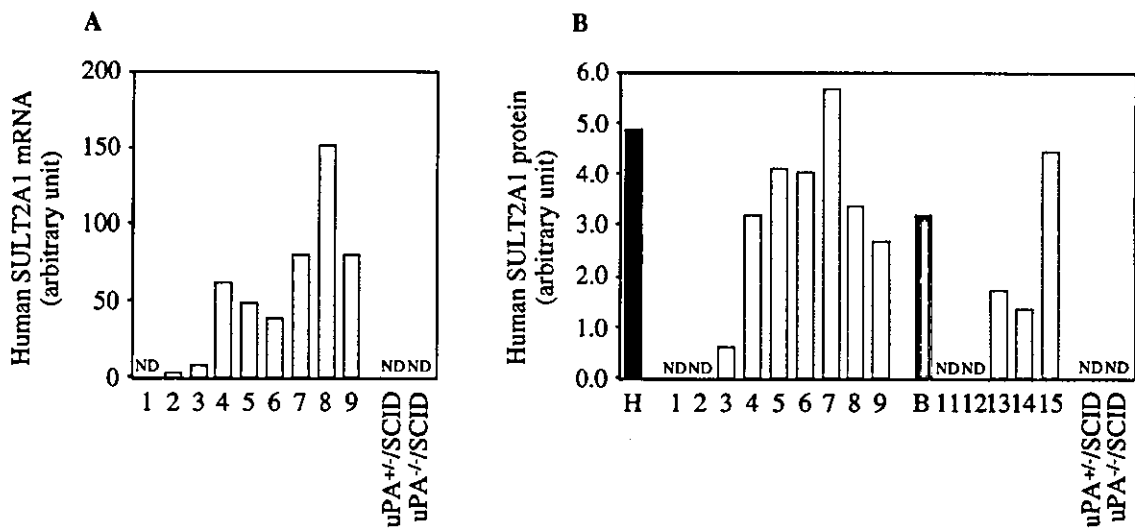


Fig. 9. Human SULT2A1 expressions in the chimeric mice. Relative expression levels of human SULT2A1 mRNA (A) and the expression of human SULT2A1 protein (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. H: human liver cytosol; B: donor B; ND: not detected.

C-8. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト NAT1 の発現

Fig. 10 にヒト NAT1 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA 由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト NAT1 mRNA 発現量の

増加が認められた。ヒト NAT1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.67$ であった。また、キメラマウス No. 1、および No. 2 を除くすべてのキメラマウスでヒト NAT1 mRNA 発現が認められた。

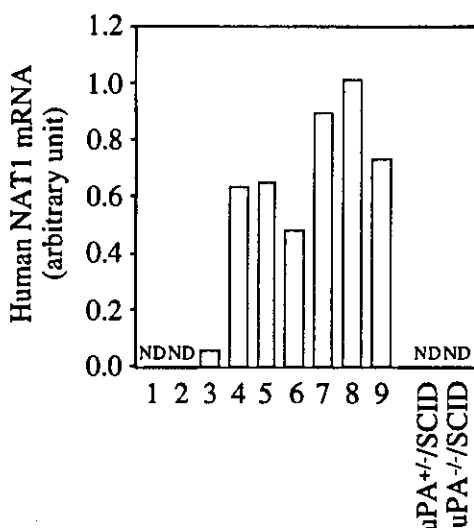


Fig. 10. Human NAT1 expression in the chimeric mice. Relative expression level of human NAT1 mRNA was determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations. The sample numbers are described in Table 1. ND: not detected.

C-9. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト NAT2 の発現

C-9-1. ヒト NAT2 mRNA 発現量

Fig. 11A にヒト NAT2 mRNA 発現量の定量結果を示す。ドナーA由来のキメラマウスにおいて、hAlb 濃度依存的なヒト NAT2 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト NAT2 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r=0.75$ であった。また、キメラマウス No. 1 を除くすべてのキメラマウスでヒト NAT2 mRNA 発現が認められた。

C-9-2. スルファメタジン N-アセチル抱合活性

Fig. 11B にスルファメタジン N-アセチル抱合活性の結果を示す。ドナーA由来のキメラマウスでは活性がほとんど認められなかった。これに対し、ドナーB由来のキメラマウスでは、hAlb 濃度依存的な活性の増加が認められた。ドナーB由来のキメラマウスにおいて、スルファメタジン N-アセチル化抱合活性と hAlb 濃度の相関係数は $r=0.92$ であった。また、キメラマウス No. 15 の活性値は、ドナーBの活性値の 1.3 倍であった。なお、HLC の活性値は、uPA^{+/-}/SCID マウスと比べて 19 倍、uPA^{-/-}/SCID マウスと比べて 26 倍であった。

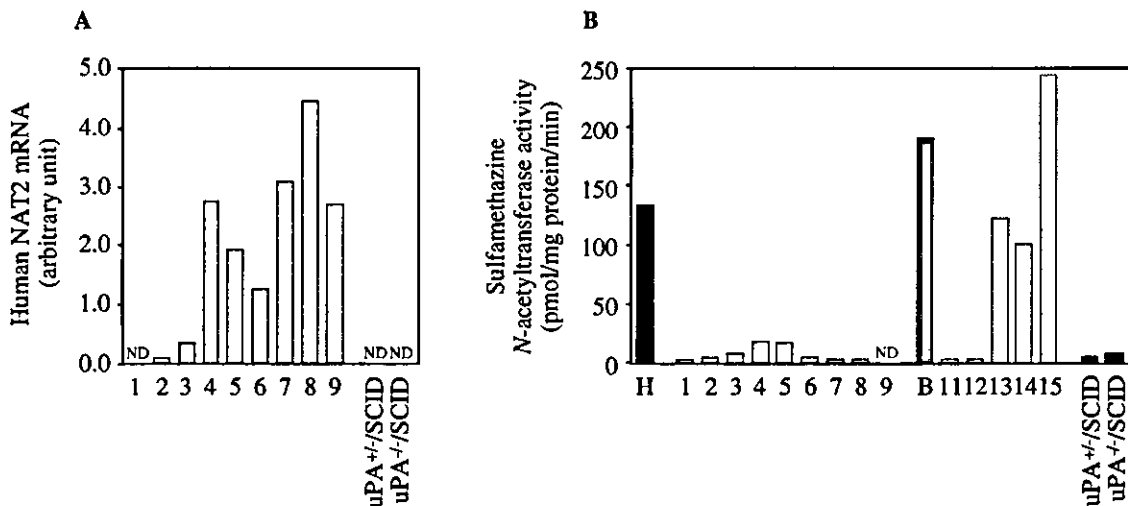


Fig. 11. Human NAT2 expression in the chimeric mice. Relative expression levels of human NAT2 mRNA (A) and sulfamethazine N-acetyltransferase activity (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate determinations except in uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice. The columns of uPA^{+/-}/SCID mice and uPA^{-/-}/SCID mice represent the mean \pm SD ($n = 3$). The sample numbers are described in Table 1. H: human live cytosol; B: donor B; ND: not detected.

C-10. ヒト NAT2 遺伝子型の判定

ドナーA由来のキメラマウスの遺伝