

子多型は、*NAT2**4/*NAT2**6 であった (Fig. 12)。

C-11. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒトGSTA1の発現

C-11-1. ヒト GSTA1 mRNA 発現量
 Fig. 13A にヒト GSTA1 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 GSTA1 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト GSTA1 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.84$ 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 GSTA1 mRNA 発現が認められた。

C-11-2. ヒト GSTA1-1 タンパク発現量

Fig. 13B にヒト GSTA1-1 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 および No. 12 を除いて、両ドナー由来のキメラマウスともに、ヒト GSTA1-1 タンパクの発現が認められた。なお、ヒト GSTA1-1 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 $r = 0.88$ 、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 GSTA1-1 タンパク発現量は、ドナーBの約0.79倍であった。

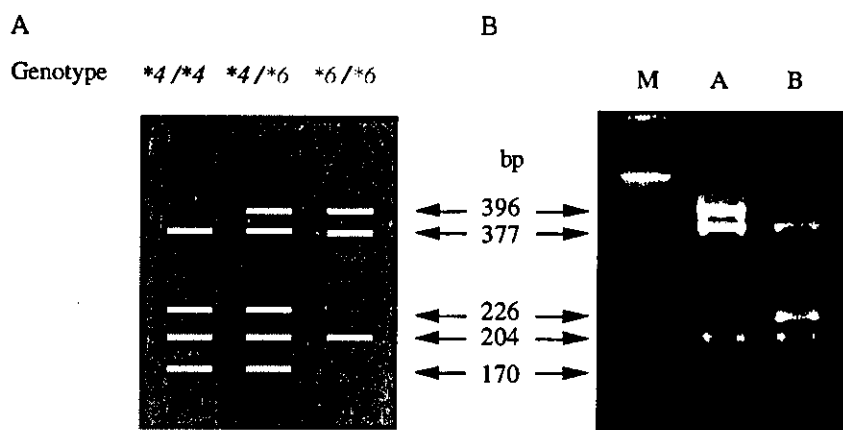


Fig. 12. Genotyping of *NAT2**4 or *NAT2**6 alleles by PCR-RFLP. A, Schematic PCR-RFLP patterns for different *NAT2* alleles. B, Photograph of PCR-RFLP patterns. M: ladder marker, A: a donor A chimeric mouse, B: a donor B chimeric mouse.

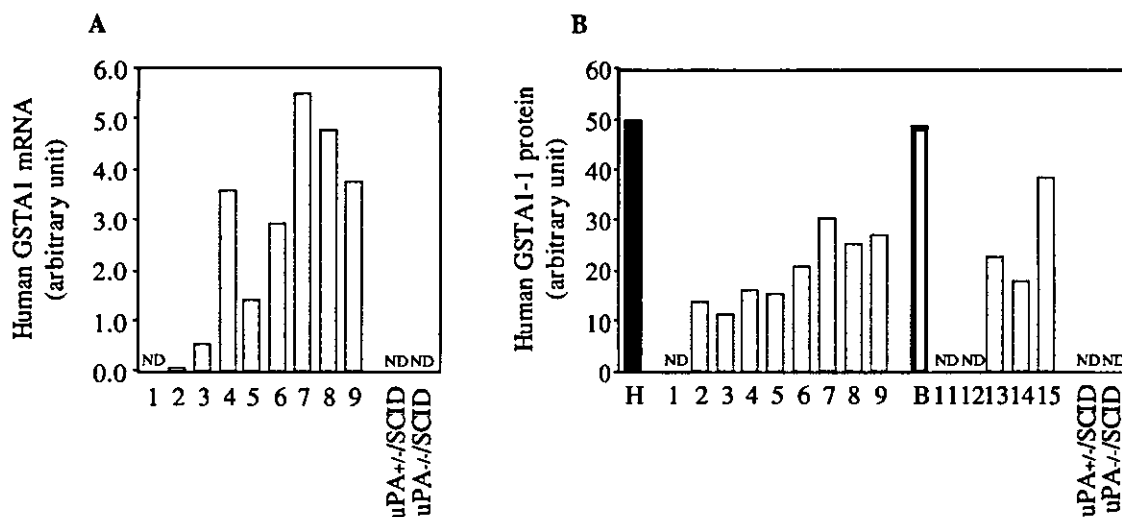


Fig. 13. Human GSTA1-1 expression in the chimeric mice. Relative expression levels of human GSTA1-1 mRNA (A) and the expression of human GSTA1-1 protein (B) were determined as described in *Materials and Methods*. Each column represents the mean of duplicate. The sample numbers are described in Table 1. H: human liver cytosol; B: donor B; ND: not detected.

C-12. ヒト肝細胞キメラマウスにおける

ヒト GSTA2 の発現

Fig. 14A にヒト GSTA2 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 GSTA2 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト GSTA2 mRNA 発現量と hAlb 濃度の相関係数は $r = 0.73$ 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 GSTA2 mRNA 発現が認められた。

C-13. ヒト肝細胞キメラマウスにおけるヒト GSTT1 の発現

Fig. 14B にヒト GSTT1 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 GSTT1 mRNA 発現量の増加が認められた。ヒト GSTT1 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 GSTT1 mRNA 発現が認められた。

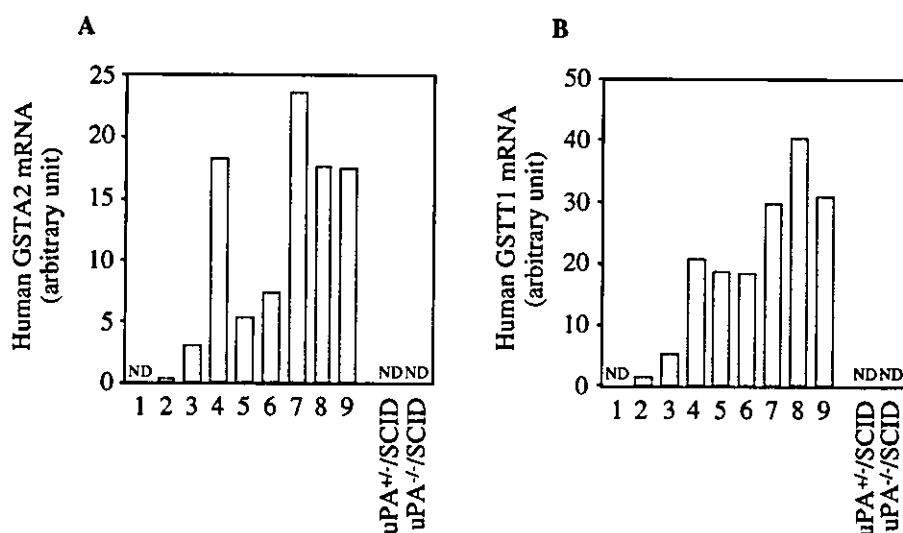


Fig. 14. Human GSTA2 and GSTT1 expressions in the chimeric mice.

Relative expression levels of human GSTA2 mRNA (A) and GSTT1 mRNA (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. ND: not detected.

D. 考察

D-1. UGT

UGT はステロイド、胆汁酸、ビリルビン、ホルモンといった内因性化合物、および薬物、環境化学物質、発癌性物質などの外因性化合物の抱合を行う。UGT は UDP-グルクロン酸を補酵素とし、基質の水酸基、カルボキシル基、アミノ基にグルクロン酸を転移して、 β -グルクロン酸抱合体を生成する。基質は水溶性化合物となり、一般に速やかに排泄される。薬物代謝に関与する UGT は腎臓、肺、小腸にも存在するが、肝臓で多く発現しており、肝臓がグルクロン酸抱合の主要な臓器である。近年、UGT に関する研究はめざましい発展

を遂げたが、以前より UGT の遺伝子変異による遺伝的疾患の存在が明らかにされていた (Tukey and Strassburg, 2000)。ビリルビンの抱合を触媒する UGT1A1 の欠損症が知られており、Crigler-Najjar 症候群タイプ I と呼ばれている。これは、常染色体劣性遺伝であり、ビリルビンをグルクロン酸抱合することができないため非抱合型の高ビリルビン血症を示す。非抱合型のビリルビンが体内に蓄積するため黄疸を呈し、また、ビリルビン脳症を引き起こし、死に至る。また、Crigler-Najjar 症候群タイプ II は野性型の UGT1A1 を有するヒトと比べて約 10% 程度の抱合能を有するため、タイプ I ほどではないが、

非抱合型ビリルビンが高値を示す。しかし、これらの疾患の頻度は極めて低い。このほかに、UGT1A1 の変異が原因であると考えられている疾患には Gilbert 症候群がある。野性型の UGT1A1 は(TA)₆TAA であるが、一般的に Gilbert 症候群の患者は (TA)₇TAA のアレル (UGT1A1*28) を有することが知られている。このほかにも UGT1A1*6 (G221A)、UGT1A1*27 (C686A)、UGT1A1*29 (C1099G) を有する場合もある。UGT1A1*28 のアリル頻度は白人で約 30% (Lampe et al., 1999; Kohle et al., 2003)、日本人では約 14% と報告されている (Ando et al., 1998)。Gilbert 症候群は約 3-10% のヒトで認められるが、肝の UGT1A1 抱合活性は野性型を有するヒトの約 30% 程度であり、血中のビリルビン濃度は正常値を示すため高ビリルビン血症は認められない。しかし、UGT1A1*28 をホモ、もしくはヘテロで有するヒトにおいて、イリノテカンの副作用が強く現れたことが報告されている (Ando et al., 2000)。イリノテカンはカルボキシエステラーゼにより活性代謝物である SN-38 に変換され、その後 UGT1A1 にてグルクロン酸抱合される。従って、グルクロン酸抱合能が低いヒトにおいて、SN-38 の毒性が強く発現したと考えられる。

従って、薬物がグルクロン酸抱合されるかどうかを明らかにすることは、薬効および副作用発現を予測するに際し、極めて重要であると考えられる。本章では、Phase II 酵素の一つである UGT のヒト肝細胞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。

まず、UGT1A1 について述べる。ドナー A 由来のキメラマウスの肝において、ヒト UGT1A1 mRNA が発現していることを明らかにした。また、ドナー A およびドナー B 由来のキメラマウスにヒト UGT1A1 タンパクが発現していることを明らかにした。キメラマウスの肝臓を用いて、ヒト UGT1A1 酵素活性の検討を行うことができなかったが、これは、ヒトのみで酵素活性が認められる交差反応を示さない基質を見つけられなかったためである。ヒトにおいて UGT1A1 は肝臓や小腸などの初回通過効果に重要な役割を果たす臓器に発現しており、上述したように、遺伝子多型の存在から薬物の体内動態に大きな影響を及ぼす。また、UGT1A1 はクロフィブラートやデキサメタゾンなどにより誘導されることが報告されている (Magdalou et al., 1993)。2002 年にアメリカで処方された上位 200

の薬物の中で、グルクロン酸抱合される薬物の約 1/4 が UGT1A1 で触媒される (Williams et al., 2004)。従って、UGT1A1 は経口投与された薬物のバイオアベイラビリティの変動を左右する重要な因子であるため、薬物がヒト UGT1A1 の基質であるかを検討することは医薬品開発においては必要である。酵素活性の検討を行う必要があるが、キメラマウスにおいてヒト UGT1A1 が発現していることが明らかになった。

次に UGT1A9 について述べる。ヒトにおいて UGT1A9 は肝臓、生殖器、小腸、結腸、腎臓に発現しており、エストロゲンや甲状腺ホルモンなど内因性化合物の抱合や、多くのフェノール性化合物の抱合に関与する。最近、ヒト UGT1A9 の遺伝子変異に関する報告がなされたが (Jinno et al., 2003; Saeki et al., 2003)、これらの変異が酵素活性にどの程度影響を及ぼすかについては詳細な検討がなされていない。しかし、UGT1A9 は内因性化合物だけでなく、実際に臨床で使用されている薬物であるプロポフォール、アセトアミノフェン、SN-38 の抱合に関与することが示唆されているため、UGT1A9 について検討することは重要である。本章ではマウスとの交差反応性や基質特異性の問題よりタンパク、酵素活性に

関する検討を行うことができなかったが、ヒト UGT1A9 mRNA の発現は認められた。UGT1A9 についてはさらに詳細に検討する必要があると考えられる。

次に UGT2B7 について述べる。ヒト UGT2B ファミリーの中で、最も主要な分子種が UGT2B7 であり、肝臓、小腸、結腸、食道、脳、腎臓、膵臓など多岐にわたる臓器に発現している。また、2002 年にアメリカで処方された上位 200 の薬物の中で、グルクロン酸抱合される薬物の 35% が UGT2B7 で触媒される (Williams et al., 2004)。Williams ら (2004) の報告によると、UGT2B7 がグルクロン酸抱合に関与する UGT のうち最も薬物を抱合する割合が多い。従って、UGT2B7 に関して特に詳細に検討をする必要があると考えられる。ヒトにおいて UGT2B7 は非ステロイド性消炎鎮痛薬、ジドブジンといった薬物をはじめ、エストロゲンやアンドロステロン、レチノイド、脂肪酸といった内因性化合物の抱合を触媒する。また、モルフィンも UGT2B7 によりグルクロン酸抱合を受けるが、代謝物としては 3-グルクロン酸と 6-グルクロン酸の 2 種が認められている。この代謝物の比が動物種により異なることが報告されている (Kuo et al., 1991)。予備検討の結果、モルフ

イン 3-グルクロン酸抱合活性はヒトとマウスで大きな違いは認められなかった。しかし、本章の結果から、BD Gentest 社製プールド HLM を用いた場合、ヒトにおいてモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性はマウスの 35 から 41 倍高値を示した。従って、モルフィン 6-グルクロン酸抱合活性は、キメラマウスの肝におけるヒト化の指標として適切であると考えられる。ヒト UGT2B7 mRNA、ヒト UGT2B7 タンパクおよびモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性は hAlb 濃度依存的な増加が認められたため、キメラマウスの肝にヒト UGT2B7 が発現していることが明らかになった。キメラマウス No. 15 はドナー B よりも、タンパクおよび酵素活性で約 2 倍高値を示したが、この理由は不明である。キメラマウス No. 15 のみ高い値を示しているため、UGT2B7 がキメラマウスで発現しやすいということよりも、キメラマウスの個体差が影響していると考えられる。

D-2. SULT

SULT はホルモン、神経伝達物質、薬物、変異原性物質など様々な内因性、外因性化合物の解毒や活性化に重要な役割を果たしている (De Meio, 1975; Jakoby et al., 1980; Yamazoe et al., 1994)。薬物代謝に関与する

SULT は主にサイトゾル画分に存在する。SULT は PAPS を補酵素とし、硫酸基を基質中の水酸基、アミノ基およびチオール基に転移させる (Glatt, 2000)。この反応によって脂溶性基質の極性が増加し、薬物は比較的容易に尿や糞に排泄される。しかし、癌原性物質の一部は、硫酸抱合を受けると容易に DNA やタンパク質に結合する活性体へと変化することが知られている。SULT の代表的な基質として、ドパミン、エストロゲンおよび甲状腺ホルモンなどがある。SULT はこれらの生体内物質のホメオスタシスに大きく関与している。また、鎮痛薬のアセトアミノフェンやアドレナリン β 作動薬のイソプロテレノールを代謝し、一方で癌原性物質である *N*-ヒドロキシ-2-アセチルアミノフルオレンなどを活性化する作用がある。このような多様な働きを有する SULT について検討することは重要である。本章では、Phase II 酵素の一種である SULT のヒト肝細胞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。

ヒトにおいてサイトゾル画分に存在する SULT は SULT1、SULT2、SULT4 の 3 つのファミリーから成り、11 分子種に分類される (Blanchard et

al., 2004)。中でも、SULT1 と SULT2 ファミリーが内因性、外因性化合物の抱合に重要な役割を果たす。ヒトにおいて、SULT1 ファミリーに属するのは SULT1A1、SULT1A2、SULT1A3、SULT1B1、SULT1C1、SULT1C2 および SULT1E1 である。また、SULT2 ファミリーには SULT2A1、SULT2B1 v1 および SULT2B1 v2 が属する。現在までに、SULT1A2、SULT1B1、SULT1C1、SULT1C2、SULT2B1 v1 および SULT2B1 v2 については特異的な基質は発見されておらず、あまり研究されていない。

まず、SULT1A1 について述べる。SULT1A1 はヒト肝サイトゾルにおいて主要な SULT 分子種である (Coughtrie and Fisher, 2003)。フェノールやアシル基を有する化合物を基質とし、様々なヒト臓器で発現が認められている (Glatt, 2000)。ドナーA 由来のキメラマウスの肝において、ヒト SULT 1A1 mRNA が発現していることを明らかにした。ヒト SULT1A1 タンパク発現量に関しては、ヒト特異的抗体を入手することができなかったため、検討することができなかった。

ヒトにおいてトログリタゾン硫酸抱合反応には、SULT1A1 と SULT1E1 が関与しているが、

SULT1A1 の肝における発現量は SULT1E1 の 13 倍であるため、肝においては SULT1A1 が主要な酵素であると報告されている (Honma et al., 2002)。また、トログリタゾンは、ヒトでは硫酸抱合体が、マウスではグルクロン酸抱合体が主要代謝物であり (Shibata et al., 1993; Kawai et al., 1997; Loi et al., 1997)、本章の結果からも、マウスにおいては硫酸抱合活性がヒトと比べて顕著に低かったため、トログリタゾンの硫酸抱合活性は SULT1A1 の指標活性として適切であると考えられる。本章で、トログリタゾン硫酸抱合活性は、hAlb 濃度の高いキメラマウス No. 15 でドナーと同程度の活性が認められた。これより、キメラマウスの肝におけるトログリタゾン硫酸抱合能はドナーと同程度であると示唆された。

hAlb 濃度が 0 mg/mL であるキメラマウス No. 1、No. 11 のトログリタゾン硫酸抱合活性は低いが検出された。しかし、uPA^{+/+}/SCID マウスは肝不全を呈し、長期間生存することは不可能である。本章で用いたキメラマウスは 11~14 週齢であるため、キメラマウス No. 1 や No. 11 はマウスの肝にヒト肝細胞に生着しなかったが、マウス肝細胞が再生し、肝としての機能を果たすことができたため、生存できたと推測される。これ

より、これらのキメラマウスで検出された抱合活性は、uPA^{+/-}/SCID マウスおよび uPA^{-/-}/SCID マウスの本抱合活性と同程度であったため、マウス由来と考えられる。また、キメラマウス No. 3、No. 12 では、マウスの活性よりも低い値であった。これは、ともに hAlb 濃度が 0 mg/mL ではないが、1~2 mg/mL と低い個体であるため、キメラマウス No. 1 や No. 11 ほどマウスの肝細胞は再生していないが、ヒトの肝細胞も十分に生着していないため、抱合活性がマウスよりも低くなったと考えられる。あるいはキメラマウスの個体差とも考えられるが、詳細は不明である。

SULT1A3 はドパミンやノルエピネフリンなどのカテコールアミン類の硫酸抱合に関与する (Glatt, 2000)。他の動物種において SULT1A3 に類似した基質特異性を示す ortholog と考えられる分子種はこれまで発見されていない (Blanchard et al., 2004)。しかし、SULT1A3 はヒトにおいて主に小腸や脳で高く発現しているが、肝ではほとんど発現していないため (Glatt, 2000)、本章では検討しなかった。

次に、SULT1B1 について述べる。ドナーA 由来のキメラマウスの肝においてヒト SULT1B1 mRNA が発現

していることを明らかにした。ヒト SULT1B1 のタンパク発現および酵素活性に関しては、今後の検討課題と考えられる。

次に、SULT1E1 について述べる。SULT1E1 はエストロンやエストラジオールなどエストロゲンの硫酸抱合に関与し、エストロゲン作用の調節に重要な役割を果たすと考えられている (Coughtrie and Fisher, 2003)。SULT1E1 はヒトにおいて肝だけでなく子宮内膜や空腸などにも発現している (Glatt, 2000)。キメラマウスの肝において、ヒト SULT1E1 mRNA およびヒト SULT1E タンパクが発現していることを明らかにした。ヒト SULT1E1 mRNA とヒト SULT1E タンパク発現量の相関係数は $r = 0.57$ と、高くはなかった。これは、肝サイトゾルはほぼすべての葉を用いて調製するのに対し、total RNA は採取した肝の一部を使用して調製したことが原因として考えられる。また、翻訳過程に関する因子の発現に関して、個体差が存在している可能性もあるが、この点に関しては、さらなる検討を行う必要があると考えられる。

エストロンは SULT1E1 の代表的基質であり、マウスのエストロン硫酸抱合活性は睾丸、胎盤や子宮で高く、肝や副腎で低いといわれている (Hobkirk and Glasier, 1992)。本

章で測定したキメラマウスのエストロン硫酸抱合活性は、マウス肝サイトゾルで検出されなかったため、ヒト由来の活性値と考えられる。hAlb濃度の高いキメラマウス No. 15 でドナーと同程度の活性が確認された。これより、キメラマウスの肝におけるエストロン硫酸抱合能はドナーと同程度であると示唆された。しかし、SULT 発現系を用いた実験で、エストロン硫酸抱合活性の最大活性を示すエストロン濃度は、ヒト SULT1E1 で 20 nM、ヒト SULT1A1 で 6 μ M、ヒト SULT2A1 で 25 μ M であったとの報告がなされている (Falany et al., 1995; Falany, 1997)。また、発現系を用い、エストロン濃度 50 μ M の条件で行った実験でエストロン硫酸抱合活性は、ヒト SULT1A1 でヒト SULT1E1 の 3 倍、ヒト SULT2A1 でヒト SULT1E1 の 1/3 と報告されている (Suiko et al., 2000)。これより、エストロン濃度が本章で用いた 50 μ M の場合、エストロン硫酸抱合活性は SULT1E1 特異的ではなく、SULT1A1 などの他の SULT 分子種の寄与が考えられる。

次に、SULT2A1について述べる。SULT2A1はデヒドロエピアンドロステロンやプレグネノロンなどステロイドの硫酸抱合を触媒し、ヒトにおいて肝、副腎、空腸などで発現が認

められている (Glatt, 2000)。キメラマウスの肝において、ヒトSULT 2A1 mRNAおよびヒトSULT2A1タンパクが発現していることを明らかにした。ヒト SULT2A1 mRNA と ヒト SULT2A1タンパク発現量の相関係数は $r = 0.64$ と、それほど高くはなかった。これは、上述した理由のためと考えられる。また、SULT2A1においてはヒト特異的な酵素活性を見つけることができなかったため、更なる検討が必要と考えられる。

D-3. NAT

NATは薬物や環境中の癌原性物質を含む様々なアミン類の生体内変化に関与している (Badawi et al., 1995; Hein et al., 2000)。NATはサイトゾル画分に存在し、通常アセチルコエンザイム A を補酵素とし、アリルアミンの N-アセチル化やヒドロキシ体の O-アセチル化反応を触媒する。NATには遺伝子多型が多く存在する。特に、NAT2には30を越える遺伝子変異が報告されており (Arylamine N-acetyltransferase (NAT) Nomenclature)、これらの変異は、様々な薬物、癌原性物質や生体異物などの生体内変化に大きな個人差を引き起こす (Evans, 1989; Hein et al., 1993)。アセチル抱合能が高い Rapid acetylator (RA) と低い Slow

acetylator (SA) に分類することができるが、これは NAT2 の遺伝子変異が大きく影響している。イソニアジドやプロカインアミドは NAT2 の代表的基質であるが、SA では、イソニアジドによる多発性神経炎や、プロカインアミドによる全身性エリテマトーデス様症状が起こりやすい (北田, 2001)。従って、薬物の代謝に NAT が関与するかどうかを検討することは重要である。本章では、NAT のヒト肝細胞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、酵素活性レベルでの検討を行った。

まず、NAT2 について述べる。ドナー A 由来のキメラマウスの肝において NAT2 mRNA が発現していることを明らかにした。ヒト NAT2 タンパクの発現に関しては、ヒト特異的な抗体を入手することができなかつたため、検討することはできなかつた。ヒト NAT2 の代表的な指標活性であるスルファメタジン *N*-アセチル抱合活性は、マウスのサイトゾル画分を酵素源とした場合、ほとんど認められなかつたと報告されている

(Tannen and Weber, 1979)。これは本章の結果と一致する。これより、スルファメタジン *N*-アセチル抱合活性はヒト特異的であり、キメラマウスのヒト NAT2 抱合活性を評価する

適切な指標であると考えられる。ドナー B 由来のキメラマウスにおいては、ドナーとほぼ同程度のスルファメタジン *N*-アセチル抱合活性を示すことが明らかになった。しかし、ドナー A 由来のキメラマウスでは、活性がほとんど検出されず、マウスの活性と同程度であった。ドナー A は SA である可能性が示唆された。SA の頻度は、日本人や中国人では約 5-20% (Ellard, 1976)、白人、黒人やメキシコ人では約 40-60% と報告されている (Ellard, 1976; Cascorbi et al., 1995; Brocvielle et al., 2003)。NAT2*5、NAT2*6、NAT2*7 は、アミノ酸変異を伴う変異型であり、アセチル抱合能の低下に関与するといわれている。また白人の SA の 90% 以上は NAT2*5、NAT2*6 をホモ、もしくは NAT2*5、NAT2*6、NAT2*7 をヘテロで 2 つ有すると報告されている (Cascorbi et al., 1995)。ドナー A は白人であるため、ドナー A 由来キメラマウスについて、白人でアリル頻度の高い NAT2*5、NAT2*6、NAT2*7 の遺伝子判定をおこなった (Gross et al., 1999; Garte et al., 2001)。なお、NAT2*5 の変異を 2 種の AS-PCR 法で判定した。その結果、ドナー A 由来のキメラマウスの遺伝子多型は NAT2*4/NAT2*6 であった。白人

の SA の 99%以上は NAT2*5、NAT2*6、NAT2*7、NAT2*13 を有すると報告されている (Meyer and Zanger, 1997)。しかし、NAT2*13 はアミノ酸変化を伴わず、Fretland ら (2001) の発現系を用いた *in vitro* の実験では、NAT2 タンパク質もスルファメタジン *N*-アセチル抱合活性も野性型と比べて顕著な減少は認められなかった。NAT2*13 については *in vivo* 実験と *in vitro* 実験の結果が異なる可能性が示唆されるため、NAT2*13 を有するかについて判定する必要があると考えられる。また、ドナー A はその他の変異型を有している可能性も否定できないため、さらなる検討が必要と考えられる。

次に、NAT1 について述べる。ドナー A 由来のキメラマウスの肝においてヒト NAT1 mRNA が発現していることを明らかにした。ヒト NAT1 のタンパク発現および酵素活性に関しては、今後の検討課題と考えられる。

D-4. GST

GST は求核性のグルタチオンと親電子性化合物との抱合反応を触媒する解毒系の酵素の一種である。グルタチオンは含硫アミノ酸であるシステインを含むトリペプチドであり、種々の化合物を酸化型から還元型に

変換する還元剤としての役割を果たし、酸化的傷害から細胞を防御する上で中心的な役割を演じている。薬物は Phase I 酵素により反応性に富む親電子性の代謝中間体を形成する場合があります、これらが核酸やタンパク質などの求核性官能基を有する生体高分子と反応し、遺伝子の変異やタンパク質の修飾などの毒性を発揮する。GST はこれらの代謝中間体や脂溶性ニトロ、ハロゲン化合物、エポキシドや不飽和カルボニル化合物などの多くの外来異物化合物とグルタチオンの求核性イオウ原子との反応を触媒し、生体高分子との反応を防ぐとともに、抱合により化合物の溶解性を高める。その他にも GST は脂質や核酸の過酸化物に対するグルタチオンペルオキシダーゼ活性、およびステロイドホルモンやプロスタグランジンなどに対するイソメラーゼ活性も有する。GST は肝の可溶性タンパクの約 10%を占め、これまでに Alpha、Mu、Pi、Theta、Zeta クラスといった多くの分子種が同定されている。GST はヒトにおいて、肝、腎、肺、脳、骨格筋、皮膚、精巣など多くの組織に分布しているが、臓器により発現している分子種が異なる。ヒト肝においては GSTA1、GSTA2、GSTM1、GSTT1、GSTT2 分子種が発現している。ただし、ヒトでの GST

分子種の臓器分布の結果は必ずしも他の動物種に当てはまるわけではない。また、GSTには遺伝子多型が存在する。GSTM1遺伝子は日本人の約半数で欠損し、GSTM1タンパクが発現していない。GSTM1遺伝子欠損の頻度は人種により異なり、ミクロネシア人やポリネシア人では90-100%に達する。また、GSTT1遺伝子の欠損者は日本人で約60%であるのに対し、欧米人では10-20%である。その他、多くのSNPsが報告されているが、グルタチオン抱合に対する影響は詳細には解明されていない。近年、Watanabeら(2003a)により、2000年3月に重篤な肝障害により市場から回収されたII型糖尿病の治療薬であったトログリタゾンについて、ヒトでのトログリタゾンによるトランスアミナーゼ上昇とGSTM1、GSTT1両遺伝子の欠損(double null mutations)に相関が認められる可能性が示唆された。これらのことをふまえて、薬物がグルタチオン酸抱合されるかどうかを明らかにすることは、特に副作用発現を予測するに際し、極めて重要であると考えられる。本章では、Phase II酵素の一つであるGSTのヒト肝細胞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およびタンパクレベルでの検討を行った。

まず、GSTA1について述べる。主要なGSTは分子量25,000前後のサブユニットからなるホモあるいはヘテロ二量体であり、同一クラス内のサブユニットで二量体を形成する。例えばGSTA1-1はGSTA1のホモ二量体であり、GSTA1-2はGSTA1とGSTA2のヘテロ二量体である。GSTA1-1を認識するウサギ抗ヒトGSTA1-1抗体が市販されていたため、本章ではGSTA1-1タンパクの発現量を検討した。なおGSTA1はベンズピレン誘導体の抱合を行うほか、ケトステロイドに対するイソメラーゼ活性、プロスタグランジンH₂からF₂αの合成などを行う。その他、発癌性を示すアゾ色素、ステロイドホルモンやビリルビンの結合タンパクとして報告されたりガンジン(Yタンパク質)がAlphaクラスのGSTであることが証明されている。ドナーA由来のキメラマウスにおいてヒトGSTA1 mRNAが発現していることを明らかにし、また、GSTA1-1タンパクが両ドナー由来のキメラマウスにおいて認められた。

次にGSTA2について述べる。GSTA2は過酸化脂質の還元(グルタチオンペルオキシダーゼ活性)およびヘム、ビリルビン、グルココルチコイド、胆汁酸などの結合タンパクとして知られている。GSTA2につい

ては mRNA レベルの検討であるが、キメラマウスの肝に発現していることが明らかになった。

また、GSTT1 についてであるが、これはエポキシドやハロゲン化アルケンの抱合を行うと言われている。GSTT1 についても mRNA レベルでの検討であるが、キメラマウスの肝に発現していることが明らかになった。

GST に関しては、ヒト特異的な基質を見つけることが出来なかったため酵素活性レベルでの検討を行うことができなかったが、UGT、SULT および NAT における検討結果より、おそらくキメラマウスの肝で酵素活性を有すると推測される。

E. 結論

本章ではヒト肝細胞キメラマウスの肝にはヒト UGT、SULT、NAT および GST が発現していることを mRNA、タンパク、酵素活性レベルで明らかにした。また、キメラマウスに発現する Phase II 酵素は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。

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：

Expression of human Phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver ; 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. 捕捉（文中で使用した引用文献を示す）

Ando Y, Chida M, Nakayama K, Saka H and Kamataki T (1998) The *UGT1A1*28* allele is relatively rare in a Japanese population. *Pharmacogenetics* **8**: 357-360.

Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K and Hasegawa Y (2000) Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* **60**: 6921-6926.

Arylamine *N*-acetyltransferase (NAT) Nomenclature.
www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html.

Badawi AF, Hirvonen A, Bell DA, Lang NP and Kadlubar FF (1995) Role of aromatic

amine acetyltransferase, NAT1 and NAT2, in carcinogen-DNA adduct formation in the human urinary bladder. *Cancer Res* **55**: 5230-5237.

Blanchard RL, Freimuth RR, Buck J, Weinshilboum RM and Coughtrie MW (2004) A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics* **14**: 199-211.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brilliant MH, Gondo Y and Eicher EM (1991) Direct molecular identification of the mouse pink-eyed unstable mutation by genome scanning. *Science* **252**: 566-569.

Brocvielle H, Muret P, Goydadin AC, Boone P, Broly F, Kantelip JP and Humbert P. (2003) *N*-acetyltransferase 2 acetylation polymorphism: prevalence of slow acetylators does not differ between atopic dermatitis patients and healthy subjects. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **16**: 386-392.

Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K and Roots I (1995) Arylamine *N*-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet* **57**: 581-592.

Coughtrie MW and Fisher MB (2003) The role of sulfotransferases (SULTs) and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in human drug clearance and bioactivation, in *Drug Metabolizing Enzyme* (Lee JS, Obach RS and Fisher MB eds) pp 541-575, Marcel Dekker, New York.

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.

De Meio RH (1975) Sulfate Activation and Transfer, in *Metabolic Pathways* vol 7, pp 287-358, Academic Press, New York.

Ellard QA (1976) Variations between individuals and populations in the acetylation of isoniazid and its significance for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Clin Pharmacol Ther* **19**: 610-625.

Estrada-Rodgers L, Levy GN and Weber WW (1998) Substrate selectivity of mouse *N*-acetyltransferases 1, 2, and 3 expressed in COS-1 cells. *Drug Metab Dispos* **26**: 502-505

Evans DA (1989) *N*-acetyltransferase. *Pharmacol Ther* **42**: 157-234.

Falany CN (1997) Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J* **11**: 206-216.

Falany CN, Krasnykh V and Falany JL (1995) Bacterial expression and

- characterization of a cDNA for human liver estrogen sulfotransferase. *J Steroid Biochem Mol Biol* **52**: 529-39.
- Fretland AJ, Leff MA, Doll MA and Hein DW (2001) Functional characterization of human N-acetyltransferase 2 (NAT2) single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenetics* **11**: 207-215.
- Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC and Taioli E (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Pres* **10**: 1239-48.
- Glatt H (2000) Sulfotransferase, in *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics* (Loannides C ed) pp 353-439, John Wiley & Sons, West Sussex.
- Gross M, Kruisselbrink T, Anderson K, Lang N, McGovern P, Delongchamp R and Kadlubar F (1999) Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**: 683-692.
- Hein DW, Doll MA, Rustan TD, Gray K, Feng Y, Ferguson RJ and Grant DM (1993) Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis* **14**: 1633-1638.
- Hobkirk R and Glasier MA (1992) Estrogen sulfotransferase distribution in tissues of mouse and guinea pig: steroidal inhibition of the guinea pig enzyme. *Biochemistry and Cell Biology* **70**: 712-715.
- Hein DW, McQueen CA, Grant DM, Goodfellow DH, Kadlubar FK and Weber WW (2000) Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases *Drug Metab Dispos* **28**: 1425-1432.
- Honma W, Kamiyama Y, Yoshinari K, Sasano H, Shimada M, Nagata K, and Yamazoe Y (2001) Enzymatic characterization and interspecies difference of phenol sulfotransferases, ST1A forms. *Drug Metab Dispos* **29**: 274-281.
- Honma W, Shimada M, Sasano H, Ozawa S, Miyata M, Nagata K, Ikeda T and Yamazoe Y (2002) Phenol sulfotransferase, ST1A3, as the main enzyme catalyzing sulfation of troglitazone in human liver. *Drug Metab Dispos* **30**: 944-949.

- Jakoby WB, Sekura RD, Lyon ES, Marucs CJ and Wang J (1980) Sulfotransferase, in *Enzymatic Basis of Detoxification* (Jakoby WB ed) vol 2, pp 199–228, Academic Press, New York.
- Jinno H, Saeki M, Saito Y, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Sai K, Kaniwa N, Ando M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Ozawa S, Sawada J (2003) Functional characterization of human UDP-glucuronosyltransferase 1A9 variant, D256N, found in Japanese cancer patients. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 688–693.
- Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2004) Expression of human cytochromes p450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* **32**: 1402–1410.
- Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2005) In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* in press.
- Kawai K, Kawasaki-Tokui Y, Odaka T, Tsuruta F, Kazui M, Iwabuchi H, Nakamura T, Kinoshita T, Ikeda T, Yoshioka T, Komai T and Nakamura K (1997) Disposition and metabolism of the new oral antidiabetic drug troglitazone in rats, mice and dogs. *Arzneimittelforschung* **47**: 356–368.
- 北田光一 (2001) 3.5 薬物の抱合と薬効・毒性の変化 薬物代謝学 (加藤隆一・鎌滝哲也編) pp 87–92, 東京化学同人, 東京.
- Kohle C, Mohrle B, Munzel PA, Schwab M, Wernet D, Badary OA and Bock KW (2003) Frequent co-occurrence of the TATA box mutation associated with Gilbert's syndrome (*UGT1A1*28*) with other polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase-1 locus (*UGT1A6*2* and *UGT1A7*3*) in Caucasians and Egyptians. *Biochem Pharmacol* **65**: 1521–1527.
- Kuo CK, Hanloka N, Hoshikawa Y, Oguri K and Yoshimura H (1991) Species difference of site-selective glucuronidation of morphine. *J Pharmacobiodyn* **14**: 187–193.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lampe JW, Bigler J, Horner NK and Potter JD (1999) UDP-glucuronosyltransferase (*UGT1A1*28* and *UGT1A6*2*) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations. *Pharmacogenetics* **9**: 341–349.
- Loi CM, Knowlton PW, Stern R, Randinitis EJ, Vassos AB, Koup JR and Sedman AJ (1997) Lack of effect of type II diabetes on the pharmacokinetics of troglitazone in a multiple-dose study. *J Clin Pharmacol* **37**: 1114–1120.
- Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Pritchard

- M and Siest G (1993) Peroxisome proliferators as inducers and substrates of UDP-glucuronosyltransferases. *Biol Cell* **77**: 13-16.
- Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL and Kneteman NM (2001) Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* **7**: 927-933.
- Meyer UA and Zanger UM (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 269-296.
- 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.
- Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Ozawa S and Sawada J (2003) Three Novel Single Nucleotide Polymorphisms in UGT1A9. *Drug Metab Pharmacokinet* **18**: 146-149.
- Shibata H, Nii S, Lobayashi M, Izumi T, Maeda E, Sasahara K, Yamaguchi K, Morita A and Nishiwaki A (1993) Phase I study of a new hypoglycemic agent-CS-045 in healthy volunteers safety and pharmacokinetics in single administration. *Rinsyou Iyaku* **9**: 1503-1518.
- Suiko M, Sakakibara Y and Liu MC (2000) Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 80-84.
- Suzuki T, Miki Y, Nakata T, Shiotsu Y, Akinaga S, Inoue K, Ishida T, Kimura M, Moriya T and Sasano H (2003) Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in normal human tissue and breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Bio* **86**: 449-454.
- Tannen RH and Weber WW (1979) Rodent models of the human isoniazid-acetylase polymorphism. *Drug Metab Dispos* **7**: 274-279.
- 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 drug. *Am J Pathol* **165**: 901-912.
- Tukey RH and Strassburg CP (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 581-616.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.

Watanabe I, Tomita A, Shimizu M, Sugawara M, Yasumo H, Koishi R, Takahashi T, Miyoshi K, Nakamura K, Izumi T, Matsushita Y, Furukawa H, Haruyama H and Koga T (2003a) A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther* **73**: 435-55.

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 (2003b) Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers. *Transplantation* **75**: 1873-1880.

Watanabe Y, Nakajima M and Yokoi T (2002) Troglitazone glucuronidation in human liver and intestine microsomes: high catalytic activity of UGT1A8 and UGT1A10. *Drug Metab Dispos* **30**: 1462-1469.

Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR and Ball SE (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* **32**: 1201-1208.

Yamazoe Y, Nagata K, Ozawa S and Kato R (1994) Structural similarity and diversity of sulfotransferases. *Chem Biol Interact* **92**: 107-117.

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の肝臓における網羅的遺伝子発現解析

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部

協力研究者 池田 眞弓、廣出充洋、関口正博、高見健治、朝日 知
武田薬品工業株式会社 医薬研究本部

研究要旨

ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓の基本的な特性を知るため、肝臓におけるヒト肝細胞への置換率とヒト遺伝子の発現の関係、ヒト型薬物代謝酵素遺伝子の誘導能および同一ドナー細胞から作製されたヒト肝細胞キメラマウスの個体差について DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により検討した。

DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析からヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では、ヒトおよびマウス遺伝子の発現が確認された。また、肝臓におけるヒト肝細胞への置換率の上昇に応じて発現するヒト遺伝子数は増加し、同時にマウス遺伝子の発現数が減少した。ヒト肝細胞への置換率が高い個体に薬物代謝酵素誘導剤を投与すると肝臓における、ヒト型 cytochrome P450 (CYP)、glutathion S-transferase (GST) および UDP-glucuronosyl-transferase (UGT) の分子種の一部の発現誘導が確認された。

同一ドナー肝細胞で作製されたヒト肝細胞キメラマウスの中からヒト肝細胞への置換率が高い5例を用いて、肝臓における遺伝子発現プロファイルの解析ならびに肝臓左葉の組織学的解析により同一条件で作製された本マウスの個体差について検討した。ヒト肝細胞キメラマウス肝臓では、6239～8789 個のヒト遺伝子 (CV13.6%) が発現しており、これは、同一解析条件で確認されたヒト肝臓における遺伝子発現数の 55～75%であった。また、ヒト肝細胞キメラマウス肝臓の遺伝子発現プロファイルをクラスター解析したところ、発現するヒト遺伝子数とは関係なく2例と3例の2パターンに分類された。

以上の結果より、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓におけるヒト遺伝子の機能的発現が確認されたものの、同一ドナー肝細胞で作製されたヒト肝細胞キメラマウスであっても遺伝子発現パターンに個体差があるため、その利用においては、その点を考慮する必要があることがわかった。

研究目的

ヒト肝細胞キメラマウスは、肝障害マウス (uPA マウス) と免疫不全マウス (SCID マウス) とを交配して生じた免疫不全肝障害マウス (uPA/SCID マウス) に、ヒト肝細胞を移植することにより作出されるもので、ヒト肝細胞に置換された肝臓を保持したまま長期に渡り生存することが知られている。また、ヒト肝細胞への置換率はヒト肝細胞移植 1 月後のキメラマウス血中のヒトアルブミン濃度値から予測しうることが明らかになっている。

医薬品の研究・開発においては、各種動物を用いた薬効・薬理・薬物動態・安全性に関する多くの非臨床試験を実施するが、その結果は必ずしもヒトへの外挿性をもつものではない。特に薬物動態試験ならびに安全性試験においては

ヒト肝組織あるいはヒト肝細胞の利用により多くの有益な情報が得られるにもかかわらず、それらの入手は困難であり、医薬品研究・開発の障害のひとつとなっている。本キメラマウスは、このような問題の解決の一助となることが期待されている。

本研究では、肝臓におけるヒト肝細胞への置換率とヒト遺伝子の発現の関係、ヒト型薬物代謝酵素遺伝子の誘導能についての検討 (第 I 章) および同ドナー細胞から作成されたヒト肝細胞キメラマウスの個体差について DNA アレイを用いた網羅的遺伝子発現解析 (第 II 章) を行い、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓の基本的な特性を把握するとともに実用上の問題点について考察した。

第 I 章 ヒト肝細胞への置換率とヒト遺伝子発現数の関連およびヒト型薬物代謝酵素遺伝子の発現および誘導

A. 研究方法

A-1. ヒトおよびマウス GeneChip におけるヒトあるいはマウス肝臓由来 RNA のクロスハイブリダイゼーションの評価

ヒト肝臓 (①人種不明、男性、69 歳、②白人、女性、70 歳) と swiss webstar マウス肝臓から調製された total RNA (Ambion) を購入した。Total RNA の純度は電気泳動により確認し、Affymetrix 社のプロトコールにしたがい、SuperScript Choice system (Invitrogen) による cDNA 合成反応、Enzo BioArray

HighYield RNA Transcript Labeling Kit (Affymetrix) によるビオチン標識により cRNA 合成した後、cRNA を断片化し標識サンプルを調製した。2 個体に由来するヒト標識 RNA は等量(重量)を混合し、ヒト標識 RNA とした。ヒト及びマウス標識 RNA をそれぞれ 100:0、50:50、0:100 の比 (重量比) で混合し、標識サンプルを Human Expression Array 133A (U133A、Affymetrix) 及び Mouse Expression Array 430A (MOE430A、Affymetrix) にハイブリダイズし、GeneChip system (Affymetrix) によりアレイの染色、洗浄及びスキャンを行い、画像データを取得した。画像データの解析は MicroarraySuite5.0 (MAS5.0、パラ