

Fig. 7 Mass chromatograms of ICR mice (100 mg/kg, **A**) and (10 mg/kg, **B**), and chimeric mice (RI=70%, **C**), (RI=70%, **D**), (RI=60%, **E**), (RI=10%, **F**) and (RI<1%, **G**) bile samples collected for 0 to 24 h after single oral administration to bile duct-cannulated animals.

Amosulalol hydrochloride was administrated at a dose of 10 mg/kg to all chimeric mice.

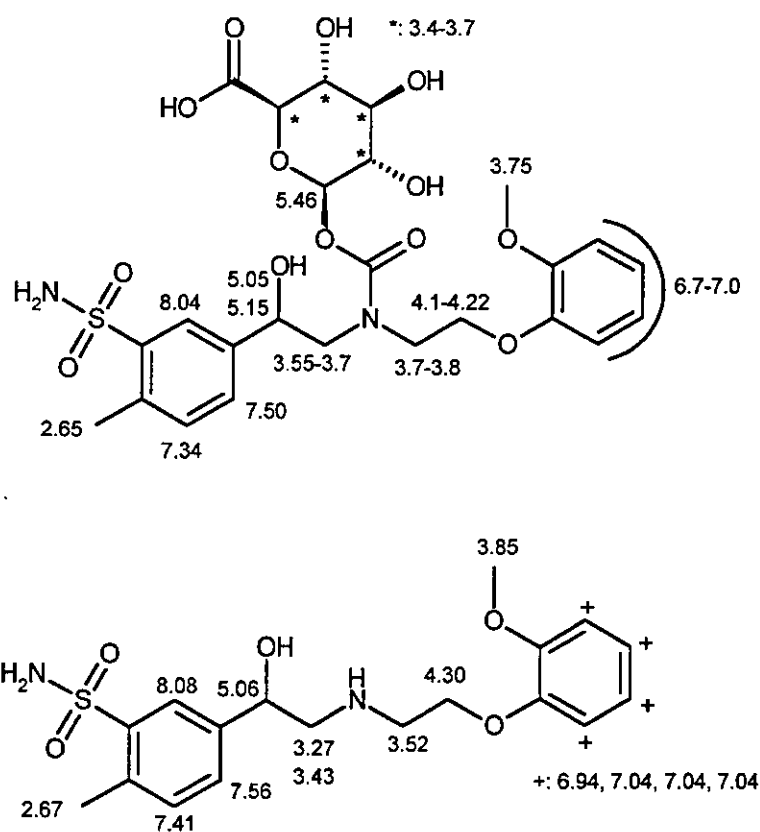


Fig. 8 Structures and $^1\text{H-NMR}$ assignment of amosulalol carbamoyl glucuronide (above) and amosulalol (below) in methanol- d_4

- 1) Chemical shift values were noted in ppm.
- 2) Marked signals were not isolated between signals and not assigned to individual hydrogen atom.

C-4. 凍結肝実質細胞を用いた *in vitro* 代謝実験

塩酸アモスラロールを凍結肝実質細胞で代謝させたときの LC/MS 分析の結果を Fig. 9 にまとめて示した。分析した結果、未変化体がほとんどで代謝物の生成はわずかであったことから、クロマトでは未変化体の分子量を加算せずに表示した。ICR マウスにおいては M2G が尿と

同じく主代謝物であることが判明し、尿代謝をよく反映していた。ヒト肝細胞 (IVT079, IVT CYE) においては主代謝物は M3S でヒトの尿中代謝物と一致していた。しかし数種のその他の代謝物 (M4S, M6S, M3, M1) も検出された。IVT079 を移植したキメラマウスから調製した凍結肝実質細胞では、ヒトと同じ代謝プロファイルを示した。

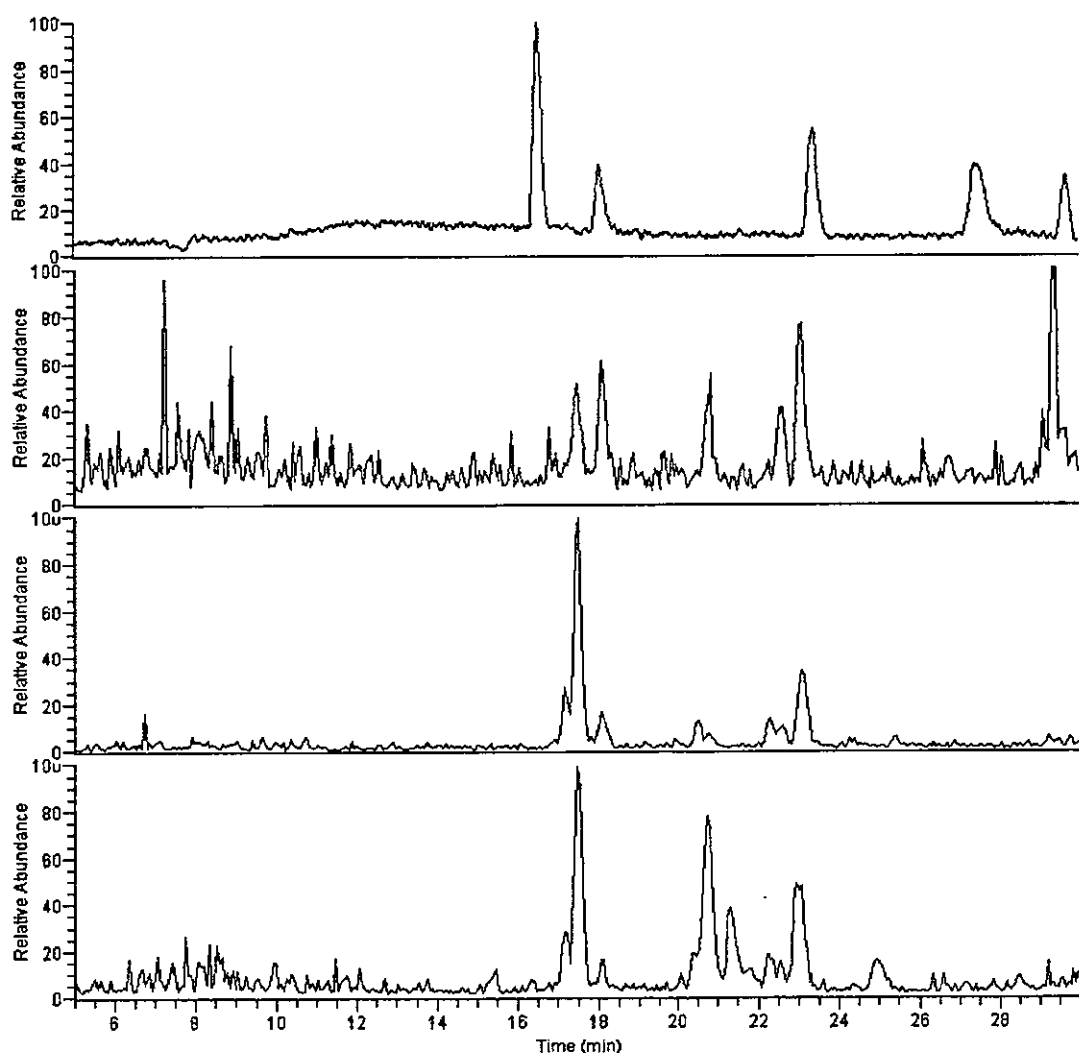


Fig. 9 Mass chromatograms of amosulalol hydrochloride incubations with cryopreserved hepatocytes prepared from ICR mice (A), chimeric mouse (Lot No. IVT079, B), humans (Lot No. IVT079, C) and (Lot No. CYE, D) Substrate was subtracted when drawing mass chromatograms.

第Ⅱ章 ヒト肝細胞キメラマウスにおける肝細胞の組織学的考察

B-1. 組織学的検査

安楽死直後のキメラマウスの新鮮

な肝臓を4%パラホルムアルデヒド (PFA)で室温24時間で固定した後、脱水してパラフィン包埋した。パラフィン切片(3-5 μm)は、常法に従ってHematoxylin/Eosin (H&E)染色および過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色を

実施し、光学顕微鏡下で鏡検した。

B-2. 免疫組織化学的検査

安楽死直後のキメラマウスの新鮮な肝臓の一部を液体窒素で凍結させた後、使用時まで -80°C で保存し、その凍結切片($5-8\ \mu\text{m}$)を免疫染色に用いた。肝組織内の類洞内皮と毛細胆管を検出するため、抗ヒトCD31マウスモノクローナル抗体(Biomedica, CA, USA)、抗ヒトZO-1ウサギ抗血清(Zymed Laboratories Inc; CA, USA)を用いて免疫染色を実施した。ヒト肝細胞に発現しているヒトトランスポーターを検出するため、抗ヒトMRP2マウスモノクローナル抗体(Alexis, Nottingham, UK)、抗ヒトMRP3マウスモノクローナル抗体(Kamiya Biomedical Co; WA, USA)、抗ヒトMDR1マウスモノクローナル抗体(P-gp, Kamiya Biomedical, WA, USA)、抗ヒトOAT2ウサギ抗血清(Transgenic, Kumamoto, Japan)、抗ヒトLST-1ウサギ抗血清(Alpha Diagnostic International Inc; TX, USA)を用いて免疫染色を実施した。上記のCD31, LST-1, MRP3, OAT2, MRP2, MDR1を用いた免疫染色は酵素標識ポリマー法(間接法)を用いて実施した。凍結切片は風乾後、アセトンで10分間固定した。内因性ペ

ルオキシダーゼ活性を阻害するため、0.3%過酸化水素水で30分間処理し、その後、1%ウシ血清アルブミン(BSA)で15分間室温で処理し、非特異的結合をブロックした。1次抗体処理は 4°C overnightで行った。内因性ピオチンの影響を避けるため、西洋わさびペルオキシダーゼを抱合させたデキストランポリマー法を採用したDAKO Envision+ システム(Dakocytomation, Denmark)により可視化した。Envisionポリマー試薬と切片を室温で30分間反応させた後、DABを10-15分間反応させた。ヘマトキシリンで対比染色を行い、光学顕微鏡下で鏡検した。

ZO-1を用いた免疫組織化学染色は、蛍光抗体を用いた間接法で実施した。凍結切片は風乾後、アセトンで5分間固定した後、1% BSAで30分間室温で処理し、非特異的結合をブロックした。ZO-1に対する1次抗体処理は30分間室温で実施し、その後、抗ウサギ Alexa 488 抗体(Molecular Probes Inc; OR, USA)で30分間室温で反応させた。切片はヨウ化プロピジウムで1分間室温で対比染色させた。蛍光切片は共焦点型レーザー走査型顕微鏡 TCS SP2 (Leica Microsystems, Tokyo, Japan)を用いて鏡検した。

B-3. ヒトLST-1およびヒトMRP2の二重染色

LST-1 および MRP2 に対する二重染色は、最初に MRP2 に対しての染色を前述のペルオキシダーゼを用いた酵素標識ポリマー法（間接法）にて実施し、続いて LST-1 に対しての染色をアルカリフォスファターゼを用いて酵素標識ポリマー法（間接法）にて実施した。LST-1 の染色方法は、切片を 1% BSA で 30 分間室温で処理した後、1 次抗体を 3 時間室温で反応させた。アルカリフォスファターゼと抱合させたデキストランポリマー(DAKO Envision/AP system, Dakocytomation, Tokyo, Japan)を 30 分間室温で反応させた。この切片をファストブルーを用いて 8°C、overnight で反応させた。最後にヘマトキシリンで対比染色し、光学顕微鏡下で鏡検した。

C. 研究結果

ヒト肝細胞は既存のマウス肝組織内で結節状に生着していた。ヒト肝細胞は肝小葉および肝細胞索を構築せず、敷石状に配列していた(Fig. 10 A)。ほとんどのヒト肝細胞は軽度の腫大を示し、細胞質は均一で淡明であった。また、びまん性に細胞内グリコーゲン顆粒の蓄積が認められた (PAS 染色陽性)。ときにヒト

肝細胞の細胞質内に大小の空胞が認められた。一方、既存のマウス肝細胞は uPA 遺伝子の発現により傷害を受け、びまん性萎縮、空胞化および壊死が認められた。さらに、マウス肝細胞では、大小の再生性結節が認められ、しばしば肝葉全域が置換されていた。

内皮のマーカーである CD31 と毛細胆管に局在するタイトジャンクションである ZO-1 の組織化学的検査により、ヒト肝細胞がキメラ肝組織内へ組み込まれていることが確認された。ヒト CD31 免疫染色により、一層の内皮に裏打ちされた既存の類洞がヒト肝細胞間に僅かながら検出された(Fig. 10 B)。また、ヒト肝細胞領域で ZO-1 陽性の毛細胆管がネットワークを形成しており、個々のヒト肝細胞から出た毛細胆管はヒト肝細胞の集塊の中で広範囲に分岐していた。さらに、ヒト毛細胆管が近傍のマウス小葉間胆管に結合していると考えられる部位が認められた(Fig. 10 C)。キメラマウス肝組織内のヒトトランスポーターの発現を確認するため、基底膜（血管、basolateral）側に発現しているトランスポーターとして LST-1, OAT2, MRP3, 毛細胆管(apical)側に発現しているトランスポーターとして MRP2, MDR1 に対する抗体を用いて、

免疫染色を行った。その結果、LST-1 と MRP3 は主にヒト肝細胞の基底膜側に発現していた(Fig. 10 D)。OAT2 はヒト肝細胞の細胞質膜全体に発現していたが、基底膜側でより顕著であった。MRP2 と MDR1 を含む毛細胆管のトランスポーターは、免疫染色でヒト肝細胞の apical 側の細胞質膜に強く発現しており、その染色パターンは ZO-1 の染色性と同

様であった。LST-1 および MRP2 の二重染色の結果、両方のトランスポーター共にヒト肝細胞で予想された側、すなわち LST-1 は血管側、MRP2 は胆管側に発現していることが証明され、キメラマウスの肝臓中のヒト肝細胞でも apical-basolateral の極性が保持されていることが今回の研究ではじめて明らかとなった。

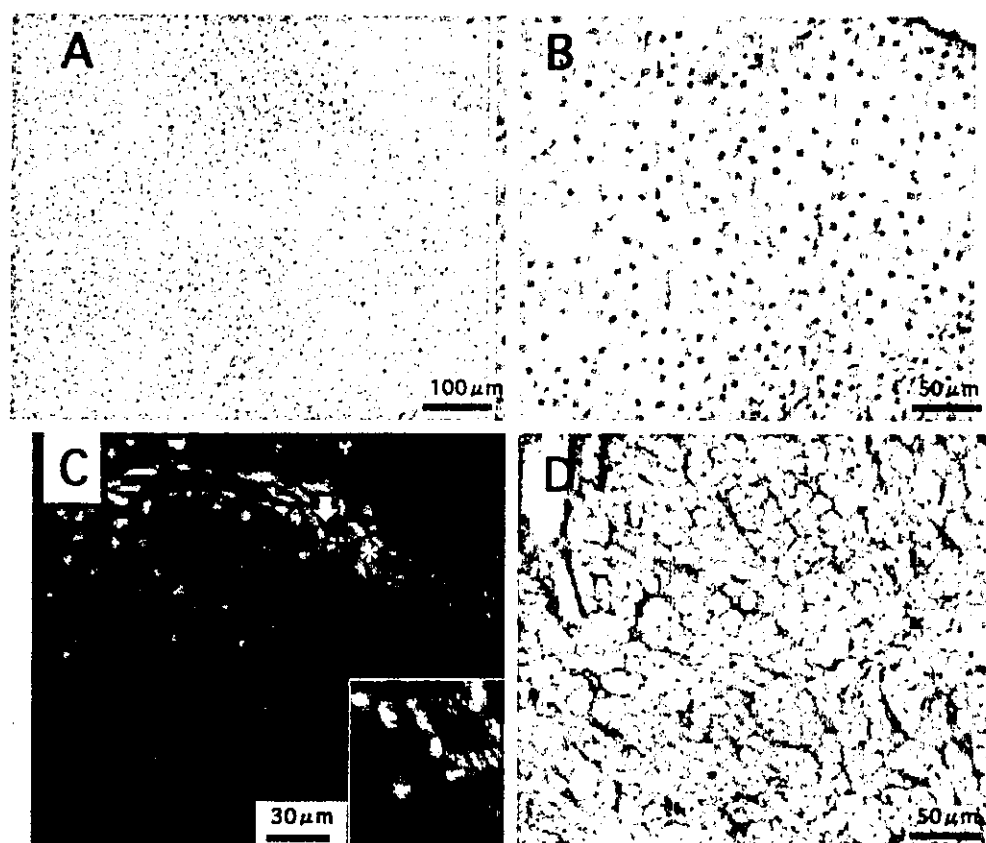


FIG 10. Histology of chimeric mouse liver transplanted with human hepatocytes. (A) Human hepatocytes stained by hematoxylin/eosin staining (100X). (B) Immunohistochemical detection of CD31 (200X). (C) Immunohistochemical detection of ZO-1 using fluorescent antibody (300X). A region that considered as connecting human bile canaliculi to mouse interlobular bile duct (*) was observed (arrow). Inset of figure shows the higher magnification (600X). (D) Immunohistochemical detection of LST-1 (violet) and MRP2 (brown) in human hepatocytes by a double stain method (200X).

D. 考察

肝臓は内臓で最大の臓器であり、薬物や生体成分の解毒・代謝において重要な役割を担っている器官である。臓器内においては第一相および第二相反応が統合し薬物を代謝している。肝臓へ取り込まれた薬物が代謝物あるいは未変化体のまま肝細胞から血液や胆汁中へ受動拡散あるいはトランスポーターによって能動輸送され全身を循環している。ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓はドナーのヒト肝臓の種々の cytochrome P450 (CYPs) をエンコードしている mRNA を発現していることが確かめられている (Tateno *et al.*, 2004)。ヒト UDP-glucuronosyltransferase と sulfotransferase の mRNA がキメラマウスで発現していることが確認されている (Dr. Naito of Otsuka Pharmaceutical Factory Co., Ltd., personal communication)。以上のことからヒト肝臓キメラマウスのヒト肝細胞においても第一相反応および第二相代謝能をほとんど維持していると推察された。今回の研究の中で我々は、キメラマウス中のヒト肝細胞の病理学的な検査によりその構造と主要なトランスポーターの局在化を検証した。組織検査の結果、ヒトの肝細胞組織像では肝小葉と肝細胞索の構造が完全に欠除しているこ

とが明らかとなった。しかし、ヒト肝細胞間で類洞の存在し、これはヒト肝細胞に新鮮な血液が供給されることを示している。ZO-1 タンパクの免疫組織化学的検査によりヒト肝細胞から分泌された胆汁がマウスの胆管網に接続し、総胆管への排泄されることが強く示唆された。また、入手可能なヒト肝細胞トランスポーターの免疫染色によりその存在が確認され、さらにトランスポーターの apical-basolatera の極性が存在が明らかになったことは、本来の構造体を欠いてはいるが、移植された肝細胞がマウス肝細胞の間で、定着し分裂する過程で細胞の極性を認識し分化・誘導されることを示唆した。

キメラマウスの代謝実験に先立ち、塩酸アモスラロールのマウス尿中代謝物は神村らにより HPLC-UV 法により定量された (Kamimura *et al.* 1985)。その結果をもとに、今回 LC/MS を用いて分析したところ、定性試験ではあったが、第一相反応代謝物と第二相代謝物ともにこれらの代謝物ピークは半定量的に分析することが判明し、定量値と定性分析の相対的ピーク面積強度のパターンでよく一致した。

キメラマウスの胆汁中代謝物を検索するに当たり、これまで ICR マウスの胆汁中代謝物が検索実施されていな

かったので、今回初めて実施した。尿中代謝物検索と同様に100 mg/kgの投与のほかにキメラマウスで投与の10 mg/kg投与を実施した。100 mg/kgにおいてはこれまでに見出されていなかった代謝物を検出し、マウス胆汁中より単離した。各種機器分析によりその構造を未変化体の carbamoyl glucuronide と構造決定した。その一方で、10 mg/kg投与群では100 mg/kgの投与群よ代謝パターンは大きく異なり尿中の代謝パターンに酷似していた。100 mg/kg投与群で代謝パターンが変わったのは、代謝経路が飽和したため代謝能が比較的大きいグルクロン酸抱合へ代謝経路が変わったためと推察された。

被検薬の投与量はキメラマウスでは10 mg/kgとした。これはICRマウスで 100 mg/kg、ヒトで約0.85 mg/kgの薬効用量で2桁の差があることから決定した。RIが1%未満の低置換率マウスの尿および胆汁の代謝物パターンはおおよそICRマウスのものと一致した。Alb-uPAにより障害を受けたマウス肝細胞は著しい代謝活性を有し、代謝物を尿および胆汁へ排泄することが分かった。ICRマウスと低置換マウスを比較して異なる点はM2Gがキメラマウスでは減少し、M2Sが増加している点であった。キ

メラマウスの尿の代謝物プロファイルと比較するとヒト肝臓置換RIの割合に関係なくM3Sを除く各代謝物ピークに量的な差異は観察されなかった。その一方、ヒト肝臓置換RIの割合が増加するにつれて、M3Sの増加が認められた。塩酸アモスラロールのキメラマウスにおける肝クリアランスは残存のマウス肝細胞あるいは Alb-uPA 遺伝子により障害を受けたマウス肝細胞に予想以上に代謝されることが明らかとなった。胆汁中代謝物プロファイルにおいては、10 mg/kg投与でありながら低置換マウスの代謝物パターンは100 mg/kgのパターンに類似していた。これは肝障害により代謝が飽和していることを示唆していると思われた。置換率が上昇するにつれ、ヒト代謝物であるM3Sが増加している傾向が認められた。しかしながら他の代謝物のパターンは置換率に関係が見られず個体差があると考えられた。キメラマウスの尿においては胆汁のように飽和による代謝パターンの変化が観察されなかったのは腎排泄が飽和しているためと考えられた。

山之内製薬(株)代謝研究所で実施された16人の異なったドナーから調製された肝ミクロソームを用いた *in vitro* 相関試験の結果、塩酸アモスラロールは主にCYP3A4により代謝さ

れることが明らかになった。これよりキメラマウスの肝臓中のヒト肝細胞中のCYP3A4により被検薬がM3に代謝されたと推察された。しかし、残念なことにM3Sがヒト胆汁中に排泄されたという臨床実験がされていない。そして、M3Sのトランスポーターは同定されていないが、今回の試験結果によりヒトにおいても尿同様M3Sは胆汁中へも排泄されていることが強く示唆された。

塩酸アモスラロールのPK解析の結果、総クリアランスがICRマウスでは $10.7 \text{ lh}^{-1}\text{kg}^{-1}$ ヒトでは $0.1 \text{ lh}^{-1}\text{kg}^{-1}$ であった(Nakashima *et al.*, 1986)。これはこの薬物がマウスにおいてヒトよりもより代謝され易いことを示している。今回のヒト肝細胞キメラマウスを使った実験から、ヒトよりもマウスの代謝速度の速い薬物ではヒトの代謝を予測するには不向きであると思われた。寄主であるマウス肝細胞の干渉対策として、例えば90%以上の高置換率キメラマウスを作成するか、ホスト動物の代謝能のみを選択的に抑制する方法が挙げられる。一例として、1つか2つの生体異物代謝CYPの遺伝子のノックアウトマウスが開発されつつある(Gonzalez and Kimura, 2003)。ヒト化マウスへのこれらの遺伝子の導入は今回のアモスラロール代謝で見出された問題の

解決の一つの手段となり得ると推察される。

E. 結論

ヒト肝臓キメラマウスの組織化学的検査により移植されたヒト肝細胞が寄主のマウス肝細胞の中で類洞と肝小管基底膜に複合構造を形成し、さらにヒトトランスポーターが極性を持ちそれぞれの細胞に発現し、分裂・増殖していることが明らかとなった。キメラマウスが塩酸アモスラロールを代謝し、ヒト特異的代謝物M3の硫酸抱合体を尿および胆汁中に排泄していた。

寄主肝細胞の競合的代謝活性の抑制の測定は必要ではあるが、キメラマウスはヒトの薬物代謝と消失を予測することが可能なツールになり得ると思われた。

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

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）

薬学雑誌 122(12) 1037-1058 (2002) 生体膜輸送の分子機構に関する生物薬剤学的研究 辻 彰 (トランスポーターのFig. 3の由来)

Ando K, Noda H, Ogata E and Fujita T (1992) Hemodynamic and endocrine changes associated with hypotensive action of amosulalol in essential hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **20**:7-10.

Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH and Schellens JH (2003) An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology & Applied Pharmacology* **189**:233-246.

Ekins S, Ring BJ, Grace J, McRobie-Belle DJ and Wrighton SA (2000) Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *Journal of Pharmacological & Toxicological Methods* **44**:313-324.

Gonzalez FJ and Kimura S (2003) Study of P450 function using gene knockout and transgenic mice. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **409**:153-158.

Guillouzo A, Begue JM, Maurer G and Koch P (1988) Identification of metabolic pathways of pindolol and fluperlapine in adult human hepatocyte cultures. *Xenobiotica* **18**:131-139.

Kamimura H, Sasaki H and Kawamura S (1984) Pharmacokinetics of

amosulalol, an alpha, beta-adrenoceptor blocker, in rats, dogs and monkeys. *Xenobiotica* **14**:613-620.

Kamimura H, Sasaki H and Kawamura S (1985) Metabolism of amosulalol hydrochloride in man: quantitative comparison with laboratory animals. *Xenobiotica* **15**:413-420.

Nakashima M, Asano M, Ohguchi S, Hashimoto H, Seki T, Miyazaki M and Takenaka T (1984) Amosulalol, a combined alpha and beta adrenoceptor antagonist: kinetics after intravenous and oral doses. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **36**:436-443.

Sasaki H, Kamimura H, Kaniwa H, Kawamura S, Takaichi M and Yokoshima T (1984) Disposition and metabolism of amosulalol hydrochloride, a new combined alpha- and beta-adrenoceptor blocking agent, in rats, dogs and monkeys. *Xenobiotica* **14**:621-631.

Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Soeno Y, Kataoka M, 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. *American Journal of Pathology* :in press

Wrighton SA, Ring BJ and VandenBranden M (1995) The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies. *Toxicologic Pathology* **23**:199-208.

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薬物トランスポーターの発現および誘導能に関する検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学 薬学部
協力研究者 玉井 郁巳 東京理科大学薬学部 教授

研究要旨

マウス肝の80%以上をヒト肝細胞に置換することが可能であるヒト肝細胞キメラマウスは、ヒトにおける薬物動態を予測する有用なシステムになり得ると期待される。しかし、これまでキメラマウスのヒト薬物輸送トランスポーターに関する詳細な検討は行われていない。そこで本研究では、代表的な薬物トランスポーターであるOrganic Anion Transporting Peptide (OATP)の発現および誘導能を評価することを目的に、mRNAレベルでの発現量の変動について検討を行なった。さらに、キメラマウスの評価としてラット肝臓初代培養を用いてoatpの発現および誘導能を調べ比較したのち、本キメラマウスの有用性の検討を行った。

キメラマウスに発現しているヒト薬物トランスポーターの誘導能を明らかにするために、コレステロール、胆汁酸などの生体内物質センサーとして機能している核内レセプターに着目し誘導能の検討を行った。ラット肝初代培養の結果を基に、ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞に、5種類の化合物 [cholic acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), dexamethasone (DEX), retinoic acid (RA), 22R-hydroxycholesterol (HC)]で前処理し、各OATPの発現変動パターンを比較した。この結果、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞においてもヒト凍結肝細胞同様OATPsの発現誘導能は比較的保持している結果が得られた。今後、キメラマウスの例数を増やして更なる検討を行うとともに、OATP以外の薬物トランスポーターに関しても様々な検討する必要があると考えられる。

ヒトにおける薬物動態を予測することは薬物の適正使用ならびに副作用の回避につながるため、医薬品開発時および臨床における重要課題である。本研究

での薬物トランスポーターに関する基礎的な検討結果より、ヒト肝細胞キメラマウスはヒトにおける薬物動態研究の有用な手段として期待できる。

A. 研究目的

肝臓への薬物の移行性や代謝能に関する情報は、薬物の有効性のヒトでの評価として薬物代謝酵素活性の動態変動への影響やバイオアベイラビリティの推測に有用であるとともに、肝毒性の予測など、医薬品開発に必須である。しかし、国内においては欧米で行われているような移植不適臓器の使用が容易ではなく、ヒト肝細胞を用いた医薬品評価は困難であり、ヒト試験は海外での試験あるいは海外で得られた限られた臓器試料に依存しているのが現状である。また、ヒト試験が困難なことから前臨床試験としてマウスやラットを用いて安全性や薬理効果評価を行う必要が増える。しかし、薬物代謝酵素については種差が明確になっており、得られた結果のヒトへの外挿の有用性は論争になっている。これらを解決するためにはヒト試料をいかにして国内で医薬品評価に効率的に使用できる体制にするかがポイントであり、日本薬物動態学会を中心に国内におけるヒト試験の必要性が高まっている。一方、ヒト試料を利用する体制も早急に高める必要があるが、その代替手法として人工の肝

臓を作成する様々な試みがなされてきた。過去に Dandri 等や Mercer 等によって免疫不全肝障害マウス (urokinase-type plasminogen activator/severe combined immunodeficient; uPA/SCID) を用いて正常成人の肝臓を一部置換することに成功したが、それらの報告は置換率が 15%程度であった (Dandri et al., 2001; Mercer et al., 2001)。最近、吉里らによって、uPA/SCID マウスにヒトの肝細胞を移植し、マウス肝臓の 80%をヒト由来細胞に置き換えたキメラマウスの生産技術を開発した (Tateno et al., 2004)。この技術によって、ディッシュ上の培養と比較して少量の肝細胞を効率よく増殖させることが可能になり、機能面でも、ヒト型の P450 を発現していること (Kato et al., 2004) や、ヒト肝細胞で置換されたマウスが生存していることから、マウス肝臓内でのヒト肝細胞は各種肝機能を保持していることが予測される。しかし、実際にヒト肝細胞キメラマウスが、*in vivo* や *in vitro* での薬物代謝試験、毒性試験にどこまで有用であるかについては必ずしも樹立された状態では

なく、現在その評価が共同体制で進められている。

肝臓においてアニオン系の化合物の肝移行に働いていると考えられるトランスポーターとして OATP ファミリーが発現している (Tamai et al., 2000)。OATP ファミリーはヒトとげっ歯類の間に種差があり、アミノ酸相同性、基質選択性、発現組織とどの面からも完全に一致するものはほとんどない (Hagenbuch et al., 2003)。例えばヒトの OATP-C や OATP8 とラットやマウスにおける *oatp4* は、共に肝臓特異的に発現しているが、アミノ酸相同性において約 65%程度しか一致していない。つまり、OATP によって肝臓に移行する薬物に関して、マウスやラットでの試験結果をヒトに分子レベルで外挿することはできない。ここで、ヒト肝キメラマウスが期待される。ヒト肝キメラマウスにおいて発現している OATP がヒトと同様の働きを保持しているならば、アニオン性の薬物の肝移行を試験する際に有用なツールとなりうる。

ヒト肝キメラマウスの有用性評価を目的とし、肝臓に発現するトランスポーターの観点から解析することを目的とした。中でも上述の OATP トランスポーターを中心に、ヒト凍結肝細胞とヒト凍結肝細胞の移植に

よってマウスから得られたヒト肝キメラマウス凍結肝細胞の比較をおこなった。さらに、ラットにおける各 *oatp* の発現誘導能のヒトとラットの対応付けを目的に同様の検討を行った。本検討では、特に各種核内レセプターのリガンド処置により、ヒト凍結肝細胞における OATP の発現変動がヒト肝細胞キメラマウスでも再現されるかという発現調節に関わる観点からヒト肝キメラマウスの評価を行うことにした。

B. 研究方法

B-1. 細胞

ヒト凍結肝細胞 (cryopreserved human hepatocytes; Lot. 59, NOG, XPK; Table 1) はチャールズリバーより購入した。ヒト肝キメラマウス試料については、吉里研究室にて共同研究として金沢大学の横井毅教授等が得た凍結肝細胞を提供いただいた。なお、マウスに移植されたヒト肝細胞のロットは Lot. 79 であり、マウスのロット番号は CTE22-4, 22-11 である。

B-2. 凍結肝細胞培養

ヒト凍結肝細胞; Type I コラーゲンでコートされた 24 well のプレート (旭テクノグラス) に培地 250

Table 1 Human donor demographics and medical histories for plateable cryopreserved hepatocytes.

Lot No.	Age		Sex	Race	Cause of Death	Tabaco	Alcohol	Substance
	(yrs)					Use	Use	Use
59	33		Male	C	ICB	Yes	Yes	No
79	0.75		Male	C	HT	No	No	No
NOG	49		Male	C	Head trauma	No	Yes	No
XPK	39		Male	H	Head trauma	Yes	Yes	Yes

Abbreviations: [races]: C, Caucasian; H, Hispanic; [causes of death]: ICH, intracranialhemorrhage; HT, head trauma.

マウス番号	予想置換率	得られた細胞数 ($\times 10^6$ 個生細胞数)	調整日
CTE22-4	> 80%	56.13	2003, 11, 12
CTE22-11	> 80%	2.1	2003, 11, 12

μL を添加し、 CO_2 インキュベーター内で一時間以上平衡化した。

Hepatocyte Thawing Medium (DMEM with 10% FBS + 4 g/L BSA) を 48 mL、 37°C に暖めた。氷上にて細胞保存容器の蓋を緩めて、圧を抜いた。蓋を締め、 37°C の恒温槽でかるく攪拌しながら溶かした。暖めておいた Hepatocyte Thawing Medium にバイアルの中身を移し、ゆっくり攪拌した。室温で、 $50\times g$ で 5 分間細胞懸濁液を遠心した。上清を吸引し、Hepatocyte Plating Medium (DMEM with 10% FBS + 2 g/L BSA) を 2 mL 加え、チューブを転倒しやさしく懸濁した。トリパンブルーにより生存率を算出後、12mL にメスアップし、平衡化した培地を捨ててから 2.5×10^5 viable cells/mL でプレートに蒔いた。

ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞；

Type I コラーゲンでコートされた 24 well のプレート（旭テクノグラス）に培地 250 μL を添加し、 CO_2 インキュベーター内で一時間以上平衡化した。氷上にて細胞保存容器の蓋を緩めて、圧を抜いた。蓋を締め、 37°C の恒温槽でかるく攪拌しながら溶かした。50 mL のファルコンチューブにバイアルの中身を移し、氷冷した培地をゆっくり滴下した。 4°C で、 $50\times g$ で 3 分間細胞懸濁液を遠心した。上清を吸引し、氷冷培地を 6 mL 加え、チューブを転倒しやさしく懸濁した。トリパンブルーにより生存率を算出後、12mL にメスアップし平衡化した培地を捨ててから 2.5×10^5 viable cells/mL でプレートに蒔いた。

ヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウスの肝細胞共に培地は DMEM に 10% FBS、 $70 \mu\text{g/mL}$ streptomycin、 $139 \mu\text{g/mL}$

penicillin, 2 g/L BSA, 1 μ M dexamethasone, 1 μ M insulin を加えたものを用いた。この肝実質細胞をコラーゲンコートした 24well のプレートに 1.0×10^5 cells / cm^2 で播種し 37°C で培養した。3 時間後、DMEM から FBS, dexamethasone, insulin を除いた培地に交換した。以後、24 時間毎に培地を交換した。

B-3. 初代培養ラット肝実質細胞の調製

Wistar 系ラット(♂)7 週令を埼玉実験動物供給所 (Saitama, Japan) より購入した。ラットの肝細胞は、コラゲナーゼ肝灌流法 (Moldeus et al., 1978) により単離、精製した。

EGTA 液 (8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.121 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.265 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.35 g/L NaHCO_3 , 1.0 g/L Glucose, 0.0006 g/L phenol red, 2.383 g/L HEPES, 0.190 g/L EGTA) とコラゲナーゼ液 (8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.121 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.735 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.35 g/L NaHCO_3 , 1.0 g/L glucose, 0.0006 g/L phenol red, 2.383 g/L

HEPES, 0.5 g/L collagenase) に O_2 を約 10 分通気した。ラットはジエチルエーテルにより麻酔した。ラットの腹部を切開し、門脈を露出させた。門脈にカニューレ (24G) を通し、まず EGTA 液を 40 mL/min, 37°C で約 3 分灌流した。次に、コラゲナーゼ液を 40 mL/min, 37°C で約 2 分灌流した。肝臓を単離し、氷冷した HBSS 液 (8.0 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.121 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.265 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.35 g/L NaHCO_3 , 1.0 g/L glucose, 0.0006 g/L phenol red) に浸した。肝臓をはさみで細分化し、氷冷した HBSS 液にて懸濁し、ステンレスメッシュ (150 mesh) でろ過した。ろ過した細胞懸濁液を 500 rpm で 3 分遠心した。上清を除去後、氷冷した HBSS 液にて再度懸濁した。遠心後、細胞を HBSS 液にて懸濁する操作を 3 回繰り返した。3 回目の遠心後、上清を取り除き、培地を加えた。培地は DMEM に 10% FBS, 70 μ g/mL streptomycin, 139 μ g/mL penicillin, 2 g/L BSA, 1 μ M dexamethasone, 1 μ M insulin を加えたものを用いた。この肝実質細胞をコラーゲンコートしたシャーレに 1.0×10^5 cells/ cm^2 で播種し

37°Cで培養した。3時間後、DMEMからFBS, dexamethasone, insulinを除いた培地に交換した。以後、24時間毎に培地を交換した。

B-4. リガンド処置

細胞を播種した24時間後に核内受容体のリガンド、アンタゴニストを加えた培地を交換した。Cholic acid (CA)は滅菌水を溶媒とした。dexamethasone (DEX)、all-trans retinoic acid (RA)、rifampin (RIFA)、TCPOBOP (TCPO)、pregnenorone-16 α -carbonitrile (PCN)、estradiol (E₂)、RU486、ciprofibrate (CIPRO)はDMSOを溶媒とした。22(R)-hydroxy cholesterol (HC)、

ethanol (EtOH)を溶媒とした。培地中のDMSO、EtOH濃度は0.1%に調製した(Table 2)。

B-5. Real-time PCRによる定量

mRNAレベルの変化をreal-time PCR (ABI PRISM 7700)によって定量した。Oligo(dt)プライマー (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA)を用い逆転写を行った。作成したcDNAをテンプレートとしqPCR™ Mastermix Plus SYBR Green I (ニッポンジーン)と特異的なプライマー (Table 3)によってRT-PCRを行った。サンプルのcDNA量を算出するためにプラスミドをテンプレートとして検量線を作成した。検量線は10²~10⁶コピーのプラスミ

Table 2 Nuclear receptors and these ligands.

Nuclear Receptor	Typical Ligands
Liver X Receptor (LXR)	22(R)-Hydroxycholesterol (HC)
Farnesoid X Receptor (FXR)	Cholic acid (CA), Chenodeoxycholic acid (CDCA)
Estrogen Receptor (ER)	Estradiol (E ₂)
Glucocorticoid Receptor (GR)	Dexamethason (DEX; >0.1 μ M)
Retinoic Acid Receptor (RAR)	Retinoic Acids (RA)
Human; Pregnane X Receptor (PXR)	Rifampin (Rifa)
Rat; Pregnane X Receptor (PXR)	Pregnenorone-16 α -carbonitrile (PCN)
Constitutive Androstane Receptor (CAR)	TCPOBOP (TCPO)
Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR α)	Ciprofibrate (CIPRO)
Retinoid X Receptor (RXR)	9-cis Retinoic Acid (RA)
Nuclear Receptor	Antagonist
Glucocorticoid Receptor (GR)	RU486

From reference (Willson et al., 2002; Honer et al., 2003)

chenodeoxycholic acid (CDCA)は

ドを用いた。半定量 PCR 法は定法

にしたがった。

C. 研究結果

Table 3-1 Primer sequences for the human genes of G3PDH and transporters.

Transporter	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')
OATP-A	AAGACCAACGCAGGATCCAT	GAGTTTCACCCATTCCACGTACA
OATP-B	CTTAGCAGTCACAGACTCACC	GGACTAGGCCATCCTGCTT
OATP-C	GAATGCCCAAGAGATGATGCTT	AACCCAGTGCAAGTGATTTCAAT
OATP-D	GGCACTGCCACGTGGTGG	CTACGACAATGTGGTCTACC
OATP-E	GCACCAGTTGAAGGACAGC	GAGCCAGATGGAGAGAGG
OATP8	GTCCAGTCATTGGCTTTGCA	CAACCCAACGAGAGTCTTAGG
G3PDH	GGCTGCTTTTAACTCTGG	CGGTGCCATGGAATTTGCC

Table 3-2 Primer sequences for the rat genes of G3PDH, transporters and nuclear receptors.

Nuclear Receptor	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')
LXR	CGTGACCCACTATGTCTTCCC	GGTCGGAGAAAGATCGCTTGT
PXR	ACCTACATGTTCAAGGGCGTCATC	GCAGGATATGGCCGACTACACTC
RXR_	CTAAGATGCGTGACATGCAG	GTAAAGATGGCGAGAGTGGT
GR	GACAAAGCTTCTGGACTCCAT	CGACCCATTTTCACACGGAA
RAR	ATTGCCGACCAGATTACCCTT	CAGCATGTCCACCTTGTCTG
CAR	CCTGGGGTTACCCAAAGAGAA	CAGCTGCAAATCTCCCCAAG
PPAR	CCTTACCTGTGAACACGATCT	AGCAGTGGAAGAATCGGAC
FXR	CGGACATGCAGACCTGTGGAAG	CCAGTGGGTTTCTGAAGCC
HNF4	AATGACTACATCGTCCCTCGG	CCAGGTAATGCTCTGCAGAGT
ER	AAGCCTCAATGATGGGCTTAT	CTGTCCAAGAGCAAGTTAGGAG
Transporter	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')
Oatp1	GTTGACCTGTGACAATGCAGC	AGCTTGATCCTCTTAGTGCTATAGG
Oatp2	GGCTGCACTAAGAGGAGCA	AACTTTGACGGCCTTATGGATAAC
Oatp3	GCCATTCATGAAGAGCCTCTC	CATATACCCAGGTATGGCTGTG
Oatp4	ACGACATTGGCTCTCTAGGC	CTTGGCGATTCCAACCGATG
Oatp9	CTTTGGGAAGAGCAGGTGAG	GTCCAGTGACCTATTGTCCG
Oatp11	AGTCTTACGCGCTGGGAGTT	GCGATGCTGACGTACAGGTATC
Oatp12	CTGGTTCTCGTGTTCGTTGT	CTGGGATACTGCCTAGCGT
G3PDH	TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC	CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC

C-1. ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞における OATP ファミリーの発現量

ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞における各 OATP の発現量を調べた。調べたトランスポーター分子は OATP-A, OATP-B, OATP-C, OATP-D, OATP-E および OATP8 である。ヒト凍結肝細胞において OATP-D の発現量が最も高く、以下 OATP-E>OATP-C>OATP8>OATP-B の順であった。また、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞においては OATP-E の発現量が最も高く、以下 OATP-B>OATP-D>OATP8>OATP-C の順であった (Table 3)。OATP-A に関しては、発現は見られたが、ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞両細胞において定量限界以下と判断され、定量化することはできなかった。また、各 OATP の中で OATP-B の発現量がヒト凍結肝細胞と比較してヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞の方が 100 倍以上の発現量を示した。

C-2. OATP ファミリーの発現変動

ラット肝初代培養の結果を基に、ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞に 5 種類の化合物

[cholic acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), dexamethasone (DEX), retinoic acid (RA), 22R-hydroxycholesterol (HC)]を処置し、各 OATP の発現変動パターンを比較した。これらの結果は個体差が大きく、3 種類の異なるロットのヒト凍結肝細胞から mRNA を調製し、それぞれ独立した 3 回の実験によりデータを解析した (Figure 1)。

C-2-1. OATP-B

CA を処置することによってヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞共に発現の変化は見られなかった。RA 処置により、ヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞において共に 2 ロットで発現が低下した。CDCA 処置によりヒト凍結肝細胞において、2 ロットでは有意な発現の上昇が、1 ロットでは発現の低下が見られた。また、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞においては、CDCA 処置により発現が上がる傾向が見られた。一方、ヒト凍結肝細胞において DEX 処置により発現が上昇したが、キメラマウスでは変化しなかった。また、HC 処置により発現が上昇したが、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞では発現が減少するなど、ヒトとキメラマウスで

Table 3 Expression of OATPs in human cryopreserved and chimeric mouse hepatocytes.

		OATPs/G3PDH	Chimera / Cryopreserved
OATP-A	Chimara	$< 6.8 \times 10^{-3}$	-
	Cryopreserved	$< 1.4 \times 10^{-3}$	
OATP-B	Chimara	220×10^{-3}	130
	Cruopreserved	1.5×10^{-3}	
OATP-C	Chimara	19×10^{-3}	3.6
	Cruopreserved	5.2×10^{-3}	
OATP-D	Chimara	160×10^{-3}	0.8
	Cruopreserved	190×10^{-3}	
OATP-E	Chimara	600×10^{-3}	7.5
	Cruopreserved	80×10^{-3}	
OATP8	Chimara	6.2×10^{-3}	1.3
	Cruopreserved	4.6×10^{-3}	

一致しない発現変動が観察された。

C-2-2. OATP-C

RA を処置することでヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞共に1ロットで発現が低下した。また、CDCA 処置によりヒト凍結肝細胞で1ロット発現が上昇したのに対し、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞でも発現が上昇する傾向が見られた。HC 処置によりヒト凍結肝細胞で発現が上昇する傾向を示したのに対し、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞で1ロット発現が上昇した。また、DEX を処置することでヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞において1ロット発現の約 20%の低下を示したが、3ロットの傾向とし

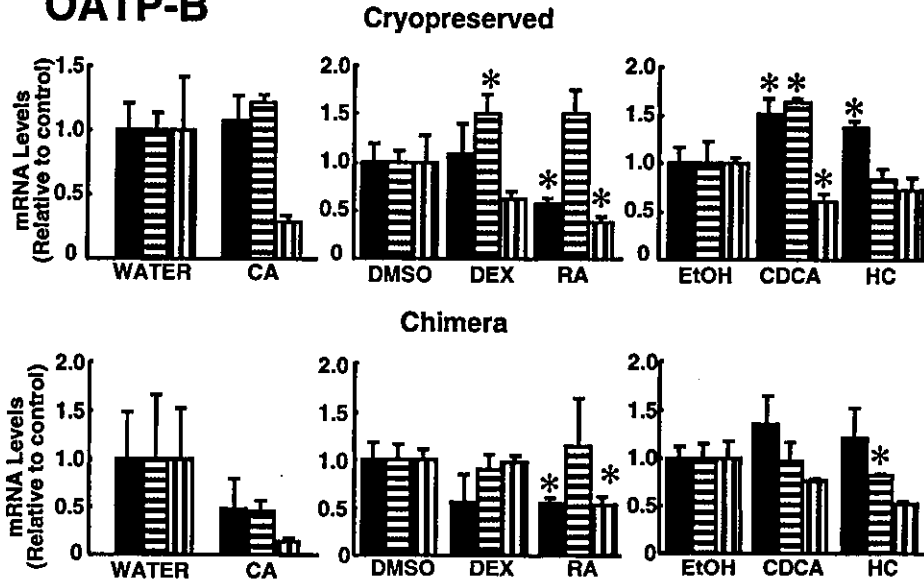
て DEX 処置の影響で発現は変化しないと判断した。また、ヒト凍結肝細胞も発現の変動は見られなかった。

C-2-3. OATP-D

DEX、RA を処置することで、ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞共に発現量は変化しなかった。CA を処置することで、ヒト凍結肝細胞で発現が低下する傾向を示したのに対し、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞では1ロットで発現が低下した。CDCA を処置した結果、ヒト凍結肝細胞で1ロット発現が上昇したのに対し、ヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞で発現が上昇する傾向を示した。一方、ヒト凍結

Figure 1

OATP-B



OATP-C

