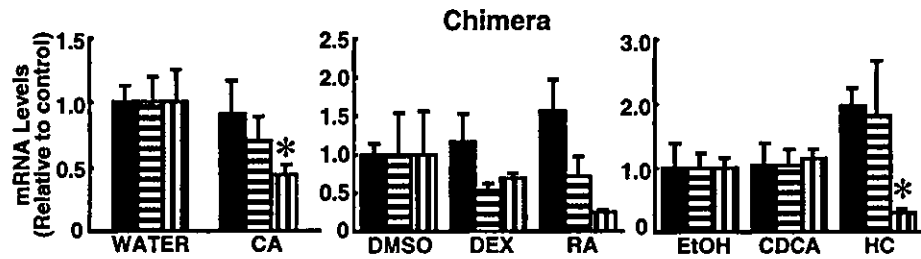
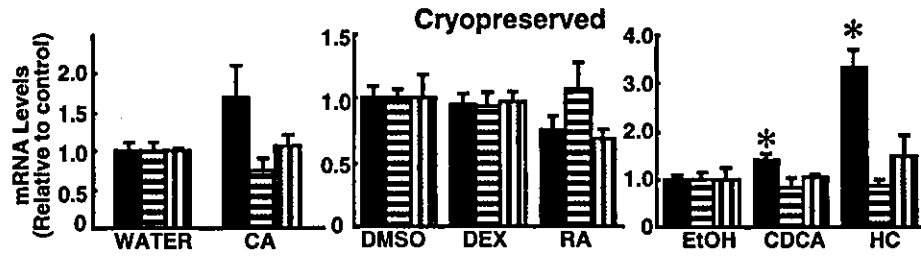
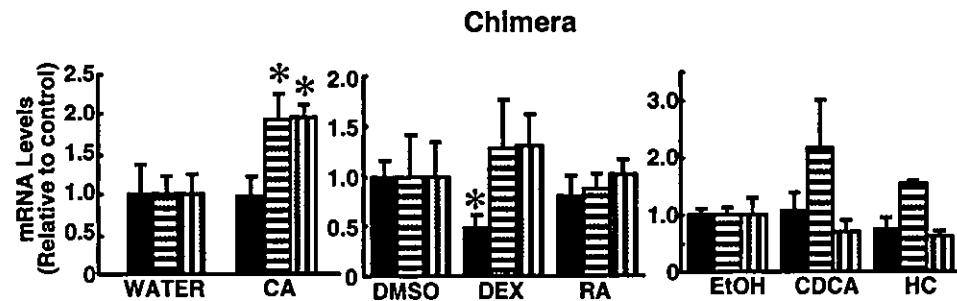
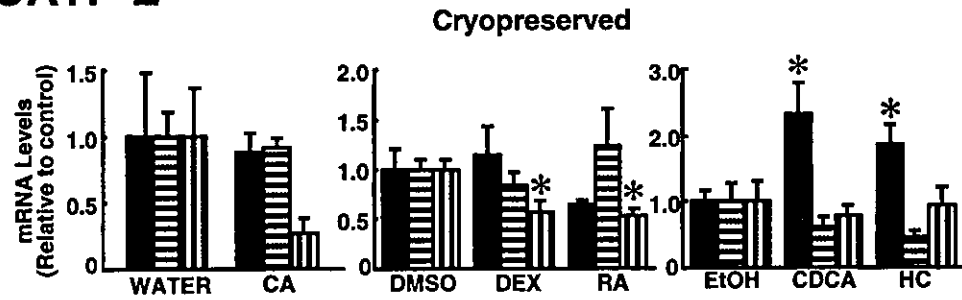


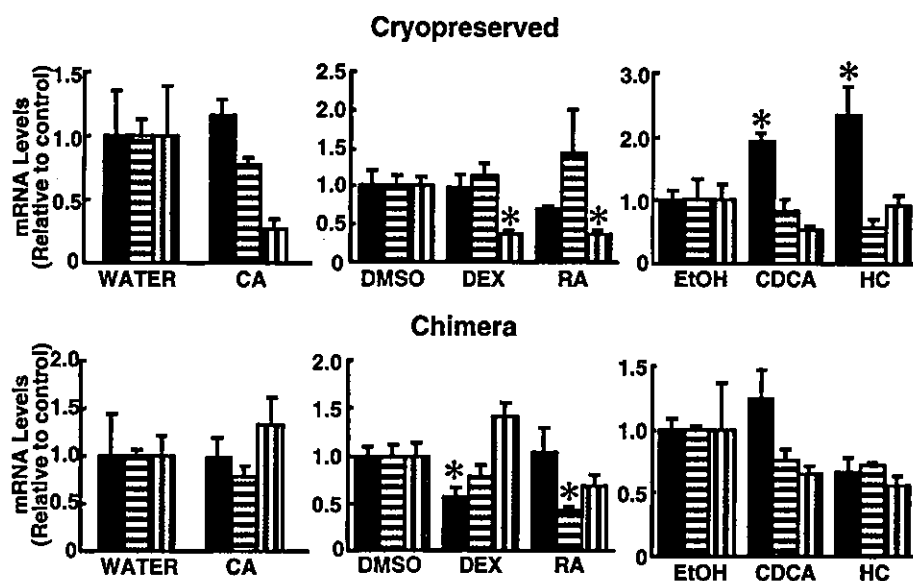
OATP-D



OATP-E



OATP8



Effect of nuclear receptor ligands on expression of OATP family in human cryopreserved and chimeric mouse hepatocytes.

The mRNA levels of transporter genes were measured by RT-PCR. mRNAs were prepared from human cryopreserved and chimeric mouse hepatocytes. Specific primers as described in the experimental section were used to determine the levels of expression of each transporter mRNA. Each chemicals were solved in water, 0.1% DMSO or 0.1% EtOH, and each control were treated counter solvent. Lot 59 was represented closed column. Lot NOG was represented horizontal stripe column. Lot XPK was represented vertical stripe column. Each points represent the mean \pm S. E. M. from three to seven experiments. *Significantly different from the control by t-test ($p < 0.05$).

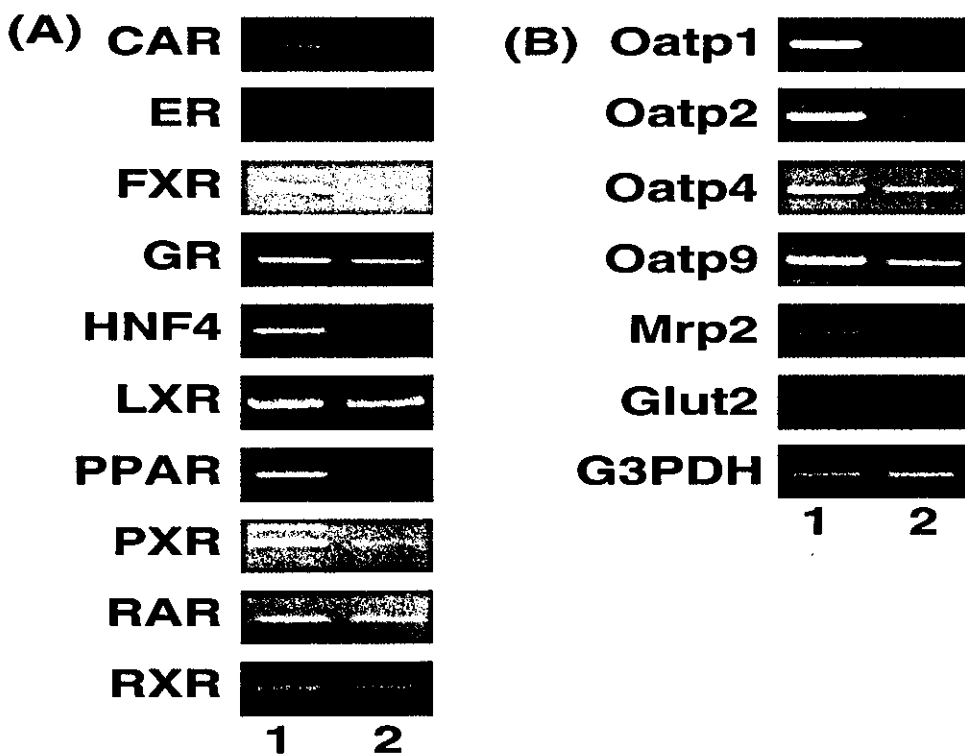


Figure 2 Expression of nuclear receptors (A) and drug transporters (B) in rat hepatocytes.

RT-PCR was performed with total RNA isolated from freshly isolated hepatocytes (lane 1) and primary cultured rat hepatocytes for 36 h (lane 2). PCR products were separated in 2.0% agarose gel.

肝細胞において HC 処置で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においては発現が低下し、ヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞間で一致しない誘導パターンを示した。

C-2-4. OATP-E

DEX 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1ロットずつ有意に発現が低下した。さらに、CDCA、HC を

処置することでヒト凍結肝細胞において有意に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においても同様に発現が上昇する傾向を示した。CA を処置することでヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞で2ロット発現の上昇を示したが、ヒト凍結肝細胞において変化は見られなかった。

C-2-5. OATP8

OATP8 に関しては、DEX あるいは RA 処置によりそれぞれ1ロッ

トでヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞において有意な発現の低下が観察された。また、CA処置により、ヒト凍結肝細胞とヒトキメラマウス肝共に変化がなかった。その他、CDCA 処置によってもヒト凍結肝細胞、ヒト肝キメラマウス凍結肝細胞両方において発現が上昇する傾向が見られた。

C-3. ラット肝臓初代培養細胞における核内受容体のリガンド処置が与える薬物トランスポーターの発現変動に対する影響

ラット肝臓初代培養細胞において、本検討で対象とした核内受容体とトランスポーターの発現の有無をRT-PCRによって調べた (Figure 2)。また、ラット肝実質細胞の初代培養前後での発現の変動を調べた (Figure 2)。核内受容体として LXR, RXR, GR, RAR, PXR, CAR, PPAR, FXR, HNF4, ER を、トランスポーターとして oatp1, oatp2, oatp3, oatp4, oatp9, oatp11, Mrp2, Gult2 の発現の有無を調べた。その結果、核内受容体はすべてが発現していた。また、トランスポーターに関しては oatp1, oatp2, oatp3, oatp4, oatp9, oatp11 が発現していた。さらに、

培養前後で発現が減少する遺伝子が多く検出された。Oatp3 の発現量は低く、定量限界以下であった。

ラット肝初代培養細胞に核内受容体のリガンドを 12 時間処置し、発現変動を測定した (Figure 3)。Oatp ファミリーに関しては oatp2 の発現が DEX 処置により 2.5 倍に増加したのに対し、oatp4 や oatp11 はそれぞれ 0.4 倍に減少した。また、oatp4 は CA, RA, CDCA 処置により、oatp11 は RA, HC 処置により有意に発現が変動したのに対し、oatp9 は CA 処置でのみ発現が減少した。Ntcp の発現が CDCA 処置により発現が減少することや oatp2 の発現が DEX 処置により上昇したことは他の報告と一致する結果である (Turncriff et al., 2004)。

D. 考察

本研究は、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した。中でも 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

Figure 3

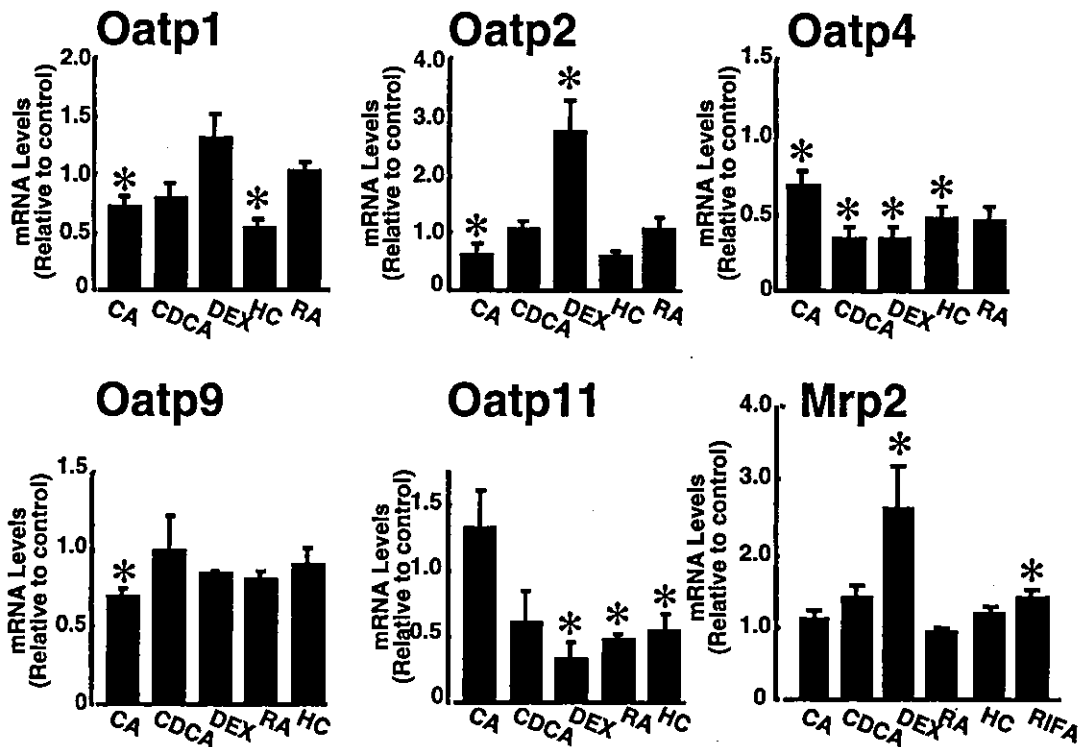


Figure 3 Expression induction of drug transporters mRNAs in primary cultured rat hepatocytes exposed to several ligands of nuclear receptor.

Primary cultured rat hepatocytes were treated with several ligands of nuclear receptors, including: CA (100 μ M), CDCA (200 μ M), DEX (100 μ M), RA (100 μ M), HC (30 μ M), RIFA (100 μ M), ESTRA (100 μ M), CIPRO (100 μ M), TCPO (5 μ M) for 24 h before harvest. Each Chemicals were solved in water (dot column), 0.1% DMSO (closed column) or 0.1% EtOH (open column). RT-PCR was performed with total RNA isolated from primary cultured rat hepatocytes for 36 h. Drug transporters mRNA levels, including: Oatp1, Oatp2, Oatp4, Oatp9, Oatp11 and Mrp2 were analyzed by RT-PCR. PCR products were separated in 2.0% agarose gel. Each points represent the mean \pm S. E. M. from three to seven experiments. *Significantly different from the control by t-test ($p < 0.05$).

凍結肝細胞の比較をおこなった。我々は以前にマウスやラットにおける各 *oatp* の発現制御は異なるメカニズムによって制御されていることを示している (Maeda et al., 2004)。したがって、ヒトにおいても OATP の発現はそれぞれ異なるメカニズムで制御されていると予想される。そこでラットの *oatp* ファミリーの発現を変動させた核内レセプターのリガンドである CA、CDCA、DEX、RA、HC の 5 化合物の処置によって、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った (Table 5)。

各 OATP の発現量をヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞間で比較したところ、キメラマウスにおいて OATP-B の発現量が 100 倍以上に増加したが、他の OATP は凍結肝細胞とキメラ肝細胞では同程度のコピー数であった。OATP-B は肝臓、小腸、腎臓、肺、胎盤、膵臓、心臓と様々な組織に発現しており、当研究室により小腸において薬物の吸収に重要な役割を果たしていることが示唆されている (Nozawa et al., 2004; Kobayashi et al., 2003)。しかし、肝臓に発現

しているにもかかわらず胆汁酸や BSP を輸送せず (Kullak-Ublick et al., 2000)、肝臓での役割は不明である。キメラマウスで OATP-B の発現量が約 100 倍に増加したことは、肝臓が異常状態に陥ったときに高発現し、何らかの物質の輸送に働いていることが考えられる。

化合物処置による誘導実験において、HC 処置により OATP-B と OATP-D の発現はヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞間で異なる調節を受けていた。しかし、他の化合物による誘導結果からヒトとキメラマウス間で 3 もしくは 4 種類の化合物でヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞間で同じ調節を受けていた。一方、ラットの *oatp* ファミリーに対して同じ化合物を処置した結果とヒト凍結肝細胞を比較した場合、例えばアミノ酸相同性が 79% 一致している OATP-B と *Oatp9* では 5 種類の化合物すべてで異なる調節を受けているなど、ヒトとの種差が大きいことがいえる。Table 5 に誘導方向の一致した化合物の数をスコアとしてまとめた。

このようにキメラマウスではヒトの OATP ファミリーが発現しており、また化合物に対する発現変動も保持していると考えられる。特に現

時点で、肝臓において優位に発現しておりアニオン系化合物の輸送に重要と考えられている OATP-C と OATP8 に関しては 5 種類中 4 種類の化合物の誘導によってヒト凍結肝細胞とヒト肝キメラマウスの凍結肝細胞間で同様の調節を受けており、アニオン系化合物の評価をする際にキメラマウスはヒトの肝臓の代替として有用であると考えられる。しかし、OATP-B の発現量がキメラ化することで大幅に変化していることや、化合物による誘導も完全に一致してはいないことから、マウス特異的な発現制御が存在し、一部でその制御を受けていると考えられる。今後、トランスポーターを活性等の面からキメラマウスの評価を行い、ヒトの機能を保持している部分と保持していない部分をはっきりさせることにより、ヒトの肝細胞の代替として有用なツールとなることを期待する。

E. 結論

ヒト肝キメラマウスの有用性を OATP の誘導実験によって評価した。キメラマウスではヒトの OATP ファミリーが発現しており、また化

合物に対する反応も比較的保持しているといえる。しかし、OATP-B の発現量がキメラ化することで大幅に変化していることや、化合物による誘導も完全に一致してはいない。今回の検討から、ラット等と比較してアニオン系化合物の評価をする際にキメラマウスはヒトの肝臓の代わりとして有用であることはいえるが、一部でヒトとは異なることも考慮しなければならない。今後、様々な面からキメラマウスの評価を行い、ヒトの機能を保持している部分と保持していない部分をはっきりさせることにより、ヒトの肝細胞の代替として有用なツールとなりうることが期待される。

Table 5-1 Identity of expression pattern between OATPs in human cryopreserved hepatocytes and OATPs in chimeric mouse hepatocytes.

	CA	CDCA	DEX	RA	HC	score
OATP-B	○	△		○	×	3
OATP-C		△	○	○	△	4
OATP-D	△	△	○	○	×	4
OATP-E		△	○		△	3
OATP8	○	△	○	○		4

The score were exhibitive identity of expression pattern of between OATPs in human cryopreserved liver and OATPs in chimera liver. The circle, delta and cross were shown same patter, same tendency and opposite pattern, respectively.

Table 5-2 Identity of expression pattern between OATPs in human liver and oatps in rat liver.

	OATP-B	OATP-C	OATP-D	OATP-E	OATP8
Oatp1	0	2	2	0	0
Oatp2	1	2	1	0	0
Oatp4	1	3	0	2	2
Oatp9	0	3	2	0	0
Oatp11	2	1	1	3	3

Arabic numerals were shown the score that were exhibitive identity of expression pattern of OATPs/oatps.

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：

ヒト肝細胞キメラマウスにおける
OATP トランスポーターの誘導能
に関する検討；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）

Dandri M., Burda MR., Torok E., Pollok
JM., Iwanska A., Sommer G., Rogiers X.,
Rogler CE., Gupta S., Will H., Greten H.,
Petersen J.: Repopulation of mouse liver

- with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus: *Hepatology*, **33** 981–988 (2001).
- Hagenbuch B., Meier PJ.: The superfamily of organic anion transporting polypeptides: *Biochim. Biophys. Acta*, **1609**, 1–18 (2003).
- Honer C., Nam K., Fink C., Marshall P., Ksander G., Chatelain RE., Cornell W., Steele R., Schweitzer R., Schumacher C.: Glucocorticoid receptor antagonism by cyproterone acetate and RU486: *Mol. Pharmacol.*, **63**, 1012–1020 (2003).
- Katoh M., Matsui T., Nakajima M., Tateno C., Kataoka M., Soeno Y., Horie T., Iwasaki K., Yoshizato K., Yokoi T.: Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with humanized liver: *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1402–1410 (2004).
- Kobayashi D., Nozawa T., Imai K., Nezu J., Tsuji A., Tamai I.: Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 703–708 (2003).
- Kullak-Ublick GA., Ismail MG., Stieger B., Landmann L., Huber R., Pizzagalli F., Fattinger K., Meier PJ., Hagenbuch B.: Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver: *Gastroenterology*, **120**, 525–533 (2001).
- Maeda T., Miyata M., Yotsumoto T., Kobayashi D., Nozawa D., Toyama K., Gonzalez FG., Yamazoe Y., and Tamai I. *Molecular Pharmaceutics* **1**, 281–289 (2004).
- Mercer DF., Schiller DE., Elliott JF., Douglas DN., Hao C., Rinfret A., Addison WR., Fischer KP., Churchill TA., Lakey JR., Tyrrell DL., Kneteman NM.: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers: *Nat. Med.*, **8**, 927–933 (2001).
- Moldeus P., Hogberg J., Orrenius S.: Isolation and use of liver cells: *Methods Enzymol.*, **52**, 60–71 (1978).
- Nozawa T., Imai K., Nezu J., Tsuji A., Tamai I.: Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**, 438–445 (2004).
- Tamai I., Nezu J., Uchino H., Sai Y., Oku A., Shimane M., Tsuji A.: Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 251–260 (2000).
- 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**, 901–912 (2004).
- Turncliff RZ., Meier PJ., Brouwer KL.: Effect of dexamethasone treatment on the expression and function of transport proteins in sandwich-cultured rat hepatocytes: *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 834–839 (2004).
- Willson TM., Moore JT.: Genomics versus orphan nuclear receptors—a half-time report: *Mol. Endocrinol.*, **16**, 1135–1144 (2002).

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を用いたヒト肝有機アニオン
トランスポーターに関する検討

ヒト肝細胞キメラマウスを用いたヒト肝トランスポーター
機能評価～DBSP (dibromosulfophthalein) に関して～

主任研究者 横井 毅 金沢大学薬学部 教授
協力研究者 鈴木 洋史 東京大学医学部 教授

研究要旨

トランスポーターは代謝酵素と並び異物解毒に重要な役割を果たすが、*in vitro* 機能評価が困難であることや供給上の問題により、ヒトの肝臓における輸送機能には未解明な点が多いのが現状である。本研究においては、免疫不全肝障害マウスのホモ個体 {uPA(+ / +) / SCID} にヒト肝細胞を移植したヒト肝臓移植マウスを用い、*in vivo* 実験を行うことにより、ヒト肝細胞におけるトランスポーター機能の解析を試みた。肝有機アニオン輸送系の良好な基質であり、胆汁中への排出が主な消失経路である DBSP (dibromosulfophthalein) の肝移行に関する種々の検討を行った結果、ヒト肝臓への置換率が低い移植マウスは高い移植マウスに比べ高い胆汁排泄クリアランス値を示した。肝取り込みクリアランス・胆管側膜クリアランスを算出した結果、血液中→肝細胞、および、肝細胞→胆汁の両過程にヒト・マウス間の種差が存在し、ヒトではマウスよりも輸送能力が低いことが示唆された。特に、胆汁排泄過程における種差に関しては、マウス由来の肝細胞が残存している本検討の実験条件においても3倍程度の違いが見出されており、完全なヒト肝細胞とマウス肝細胞の比較を行った場合、さらに大きな種間の違いが見出されると考えられる。以上の結果から、肝細胞における DBSP の輸送能（特に排出能力）が変動した場合、胆汁排泄クリアランスおよび全身クリアランスに大きな影響を及ぼすことが示唆された。

A. 研究目的

薬物投与後の反応性を規定する因子の一つである薬物体内動態を明らかにすることは、ヒトにおける薬物反応性を予測する上で重要な課題である。現在までに、薬物代謝酵素に関しては、保存可能なヒトミクロソーム分画を研究に用いることができること、各種代謝酵素の肝臓内含量が知られていることから、*in vitro* 実験からヒト *in vivo* 代謝動態を予測することが可能であった。しかしながら、代謝酵素と並び異物解毒に重要な役割を果たすトランスポーターに関しては、肝細胞を調製後の経過時間とともに機能が激減すること、バイアピリティの高いヒト肝細胞の供給が限られていること、トランスポーターの担う極性輸送を培養肝細胞で再現することが難しいことなどが、ヒト肝細胞における研究を進める上での大きな障壁となっていた。

本研究においては、免疫不全肝障害マウスのホモ個体 {uPA(+)/SCID} にヒト肝細胞を移植したヒト肝臓移植マウスを用い、*in vivo* 実験を行うことにより、ヒト肝細胞におけるトラン

スポーター機能の解析を試みた。ヒト肝細胞への予想置換率の高いマウス群（高置換群）および低いマウス群（低置換群）を用い、積分プロットおよび定常状態試験により、血液から肝臓への血管側膜を介した薬物取り込み・胆管側膜を介した肝臓から胆汁への薬物の排出の評価を行った。

B. 研究方法

B-1. ヒト肝細胞キメラマウス

ヒト肝細胞キメラマウスは、日本チャールズ・リバー株式会社から供給された免疫不全肝障害マウスのホモ個体 {uPA(+)/SCID} にインビトロテクノロジー（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 ELISA 法により血中ヒトアルブミン濃度を測定し、予想置換率を算出した。

B-2. dibromosulfophthalein (DBSP)

積分プロットを行う際の瞬時投与は、10mg/kgbw の投与量で行った。定常状態試験の際は、25mg/kgbw のDBSPを初期投与

し、その後は 0.2mg/min/kgbw の速度で定速静注を行った。

B-3. 積分プロットによる肝取り込み過程の解析

血液から肝臓への取り込み過程のみを分離して評価することを目的として、積分プロット法を用いた解析を行った。DBSP を静脈内に瞬時投与した後、経時的に血液と肝臓とをサンプリング（投与後 20 秒、40 秒、60 秒）し、両サンプル中の薬物濃度を測定した。この実験条件は、薬物の肝臓からの排出が無視できる短い時間内であると仮定され、肝臓へ取り込まれた薬物量 (X) の時間推移は、

$$dX/dt = CL_{\text{uptake}} * C_B$$

という式で表される。ここで CL_{uptake} は、循環血中濃度 (C_B) に対して定義された臓器クリアランスである。この式を時間 0 から t まで積分すると、

$$X_{(t)} = CL_{\text{uptake}} * AUC_{(0-t)} + X_{(0)}$$

となる。よって、縦軸に $X_{(t)} / C_{B(t)}$ を、横軸に $AUC_{(0-t)} / C_{B(t)}$ をプロットし、傾きとしての CL_{uptake} を算出した。

B-4. 定常状態試験による排泄過程の解析

DBSP を静脈内定速投与し、定

常状態に達したところでの胆汁流速 (bile flow rate) ・胆汁中濃度 (C_{bile}) ・血液中濃度 (C_B) ・肝臓中濃度 (C_h) を基に、

$$V_{\text{bile}} = (\text{bile flow rate}) * C_{\text{bile}}$$

$$CL_{\text{canalicular}} = V_{\text{bile}} / C_h$$

$$CL_{\text{bile}} = V_{\text{bile}} / C_B$$

の算出を行った。

C. 研究結果および考察

C-1. DBSP の肝臓への取り込み

静脈内瞬時投与後の経時的な血液および肝臓中薬物濃度を測定し、各時間における濃度および時間の値を用い、一次消失を仮定した計算により $AUC_{(0-t)} / C_{B(t)}$ を算出した。 $X_{(t)}$ は、各時間における肝臓中濃度に肝重量を乗じることにより求めた。算出結果を、縦軸に $X_{(t)} / C_{B(t)}$ を、横軸に $AUC_{(0-t)} / C_{B(t)}$ をプロットし (Figure 1-1)、傾きより CL_{uptake} を算出した結果、高置換群においては 0.904 mL/min/g-liver、低置換群においては 1.47 mL/min/g-liver であった (Table 1-1)。有機アニオンの肝臓への取り込み能力に関しては、遊離肝細胞を用いた検討により、単位重量あたりの取り込み活性として数倍程度の種差が存在し、ヒトでは肝臓への取り込み活性が低いことが

推測される (Nakai D, et al., Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther. 2001 Jun;297(3):861-7., Yamazaki M, et al., Na(+)-independent multispecific anion transporter mediates active transport of pravastatin into rat liver. Am J Physiol. 1993 Jan;264(1 Pt 1):G36-44.)。本研究の結果においても、ヒト肝細胞への置換率の高いマウス群における取り込み能力が、マウス由来の肝細胞が多い置換率の低いマウス群に比べて低いことが示されており、ヒトにおけるDBSPの低い肝取り込み能力を反映した結果であると推測された。

C-2. 定常状態におけるプラバスタチンの胆汁排泄

DBSPの静脈内定速投与を行った際の、経時的な胆汁流量 (Figure 1-2) および胆汁中DBSP濃度 (Figure 1-3) を図に示した。この二つの値を乗じることにより算出される V_{bile} は、今回の実験条件において定常状態に達していると判断されたため (Figure 1-4)、 $CL_{canalicular} (= V_{bile}$

$/ C_h)$ および $CL_{bile} (= V_{bile} / C_B)$ の算出に用いた。 $C_{h,ss}$ は高置換マウス群で 0.18 ± 0.04 mg/mL、低置換マウス群で 0.19 ± 0.04 mg/mLであり、 $C_{B,ss}$ は高置換マウス群で 0.051 ± 0.039 mg/mL、低置換群で 0.044 ± 0.036 mg/mLであった (Table 1-1)。

(薬物投与速度) $/ C_B$ により計算される CL_{tot} は高置換マウス群で 0.07 ± 0.06 mL/min/g-liver、低置換マウス群で 0.20 ± 0.20 mL/min/g-liverであり、 CL_{bile} は高置換群で 0.07 ± 0.08 mL/min/g-liver、低置換群で 0.24 ± 0.24 mL/min/g-liverと算出された (Table 1-1)。DBSPの消失において、全身クリアランスに占める胆汁排泄クリアランスの割合は非常に大きく、高置換群において全身クリアランス値が低い傾向を示しているのは、ヒト肝細胞の血液中から胆汁中へのクリアランス能力の低さを反映したものであると考えられる。一方、胆汁排泄速度を肝臓中薬物濃度で除することにより算出される $CL_{canalicular}$ は、高置換群で 0.009 ± 0.006 mL/min/g-liver、低置換群で 0.028 ± 0.003 mL/min/g-liverとなっており、ヒト肝細胞への予想置換率の異なる両群間にお

いて約3倍程度の輸送能力の違いが見出された (Table 1-1)。このことは、ヒト肝臓より調製した canalicular membrane vesicle (CMV) を用いてATP依存的な輸送を調べた実験結果において、プラスタチンや β -estradiol 17 β -glucuronide などのように比較的種間での輸送能の違いが小さな化合物があるのに対し、Leukotriene C4 や DNP-SG などのようにヒトCMVとラットCMV間で数十倍以上の輸送能の違い (ラットCMVにおける輸送活性が高い) を示す化合物が存在するという事実を考慮すると、DBSPは後者の、比較的輸送活性に種差のあるタイプの基質であることを示唆していると考えられる (Niinuma K, et al., Primary active transport of organic anions on bile canalicular membrane in humans. Am J Physiol. 1999 May;276(5 Pt 1):G1153-64.)。

C-3. ヒト肝キメラマウスにおけるDBSP肝取り込み・排出

本研究においては、ヒト肝細胞移植マウスを用い、肝有機アニオン輸送系の良好な基質であり、胆汁中への排出が主な消失経路であるDBSPの肝移行に関する種々

の検討を行った。その結果、全身からの薬物除去能力を表す CL_{tot} 、血液中から胆汁中への排出を反映した CL_{bile} に関して、ヒト肝臓に類似した環境であると思われる高置換群と比べ、ヒト肝細胞への置換の少ない低置換群において高い値を示した。血液中から肝細胞中への薬物取り込み能力である CL_{uptake} ・肝細胞中から胆汁中への消失能力を示すパラメーターである $CL_{canalicular}$ の値を算出し、各ステップに関する考察を行うと、血液中→肝細胞、および、肝細胞→胆汁の両過程にヒト・マウス間の種差が存在していることが示唆された。特に、胆汁排泄過程における種差は本検討の実験条件においても3倍程度の違いが見出されており、生理的条件のヒト (置換率で言えば100%と表される) とマウスの比較を行った場合、さらに大きな種間の違いが見出されると考えられる。

本検討の結果から、肝細胞におけるDBSPの輸送能 (特に排出能力) が変動した場合、胆汁排泄クリアランスおよび全身クリアランスに大きな影響を及ぼすことが示唆された。ヒトにおける有機アニオンの肝胆系移行を予測する際には、取り込み能力・排出能力の

病態時における変動や遺伝的多型等に起因する個人差を考慮する必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

Table 1-1. Pharmacokinetic parameters of DBSP

mL/min/g-liver	CL _{tot}	CL _{hep}	CL _{canalicular}	CL _{uptake}	C _{B,ss} (mg/mL)	C _{T,ss} (mg/mL)
High	0.07±0.06	0.07±0.08	0.009±0.006	0.904	0.051±0.039	0.18±0.04
Low	0.20±0.20	0.24±0.24	0.028±0.003	1.47	0.044±0.036	0.19±0.04

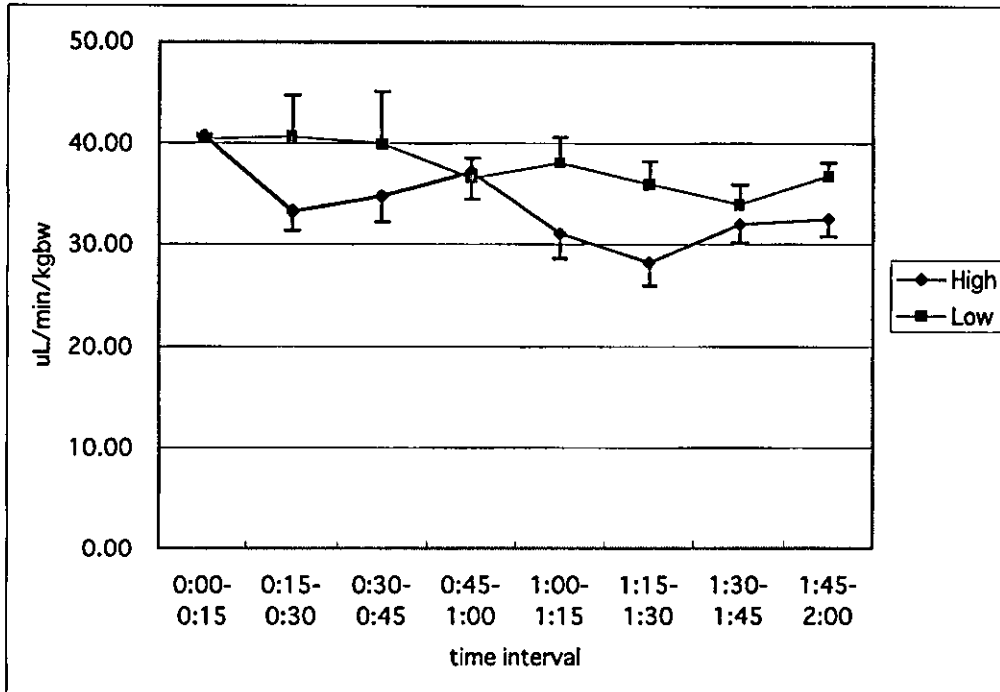


Figure 1-2. Bile flow rate (uL/min/kgbw) of mice transplanted with humanized liver with low (<1%) or high (>60%) replacement index

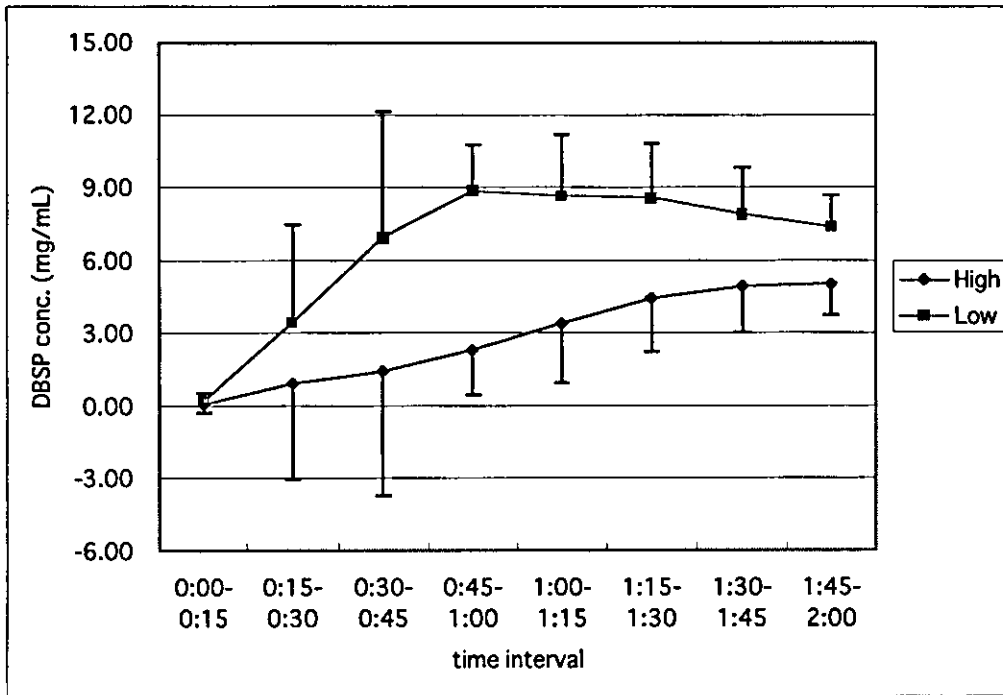


Figure 1-3. DBSP concentration in bile (mg/ml) of mice transplanted with humanized liver with low (<1%) or high (>60%) replacement index

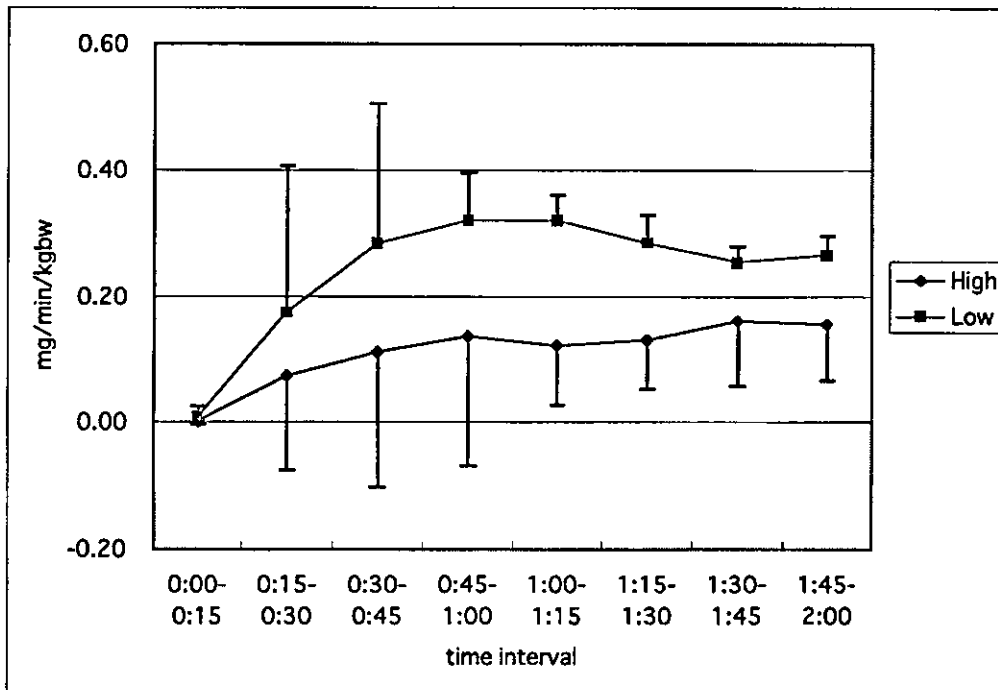


Figure 1-4. Biliary excretion of DBSP (mg/min/kgbw) of mice transplanted with humanized liver with low (<1%) or high (>60%) replacement index

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漢方薬由来活性成分ジェニピンの
有機陰イオン・トランスポータ Mrp2 への作用に関する研究

主任研究者 横井 毅 金沢大学薬学部 教授
協力研究者 正田 純一 筑波大学臨床医学系 講師

研究要旨

茵陳蒿湯は黄疸、肝硬変症の治療薬として薬価基準にも収載されている漢方薬である。しかし、現代の医療現場ではその有用性がいまだ十分認知されているとはいいがたい。茵陳蒿湯の胆汁分泌亢進作用の活性成分は20年以上前から知られていたが、その作用機序の解明は最近になって初めて明らかにされた（Shoda et al, 2004）。茵陳蒿湯の主要成分であるジェニポサイドは経口投与の後腸内細菌によって活性本体ジェニピンに変換される。ラットを用いた基礎研究で、ジェニピンはラット肝細胞の有機陰イオン輸送蛋白である multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2)の胆管膜へのトランスロケーションを促進してグルタチオン (GSH) やビリルビンの排泄を促進して胆汁酸非依存性胆汁分泌を亢進すること、また1週間連投によって Mrp2 の発現量自体も増加させ同時に肝臓グルタチオン量を増加させることがこれまでの研究で明らかになっている。これらの作用は、茵陳蒿湯の黄疸や胆汁うっ滞に対する有用性を強く示唆するものである。しかしながらこれらの作用の有無はヒト肝臓ないしはヒト肝細胞ではまだ検討されていない。

そこで、本研究では、ヒト肝細胞キメラマウスにジェニピン、ジェニポサイド及び茵陳蒿湯を経口投与し、キメラマウス中のヒト肝細胞においてもこれらの薬物の作用が認められるかどうかを、mRNA 発現量、蛋白発現量、免疫組織化学的検討を指標として解析した。まずジェニピン、ジェニポシドを単回経口投与し、ヒト肝細胞における Mrp2 の胆管膜上への局在及び肝臓中グルタチオン量の変化を検討したところ、ジェニピンが投

与後 2 時間でヒト胆管膜上への Mrp2 のトランスロケーションを誘導すること、ジェニポサイドが投与後 24 時間で肝臓中グルタチオン(GSH)量を顕著に増加させることが認められた。これより、キメラマウスにおいてもジェニポサイドからジェニピンへの変換が起こること、ジェニピンがヒト肝細胞の Mrp2 の胆管膜上へのトランスロケーションを促進することが示唆された。臨床現場で現在実際に使用が可能な薬剤は茵陳蒿湯であるので、今後は、茵陳蒿湯が同様の作用をヒト肝細胞において有するか、またラットにおいてジェニピン及び茵陳蒿湯の 1 週間連続投与で観察されている Mrp2 やその他の薬物輸送蛋白の発現誘導などが認められるかどうかを検討する必要がある。肝臓の輸送蛋白の動態に関する詳細な研究を実際に臨床で行うことは至難であり、動物実験からヒトでの作用を外挿するのは不確実性がつきまとう。ヒト肝細胞の *in vitro* 初代培養系には一定の有用性が認められるが、培養細胞の *physiology* は *in vivo* の状態とは種々の点で乖離していることも周知の事実である。ヒト肝細胞を有するキメラマウスは、肝疾患の発症機序の解明や医薬品開発および医療に大きく貢献するものであり、本研究は現在治療手段の限られている胆汁うっ滞や黄疸などの肝胆道疾患に対する新しい治療法の可能性を拓くものである。

A. 研究目的

既に臨床で使用されている漢方薬である茵陳蒿湯の研究にはヒトあるいはヒト由来組織から得られたデータが最も意義あるものである。しかし、莫大な費用と時間の問題を差し置いても、臨床において薬剤の薬理作用を詳細に検討・証明することは現実には不可能なことが多い。したがって、このような研究は実験動物を用いて行われるのが常である。茵陳蒿湯の胆汁酸分泌機能亢進作用については、その活性本体のひとつであるジェニ

ピンについて、ラットを用いてその作用機序 (Mrp2 のトランスロケーションの促進作用) が詳細に明らかにされている。しかし、ラットとヒトの肝細胞では、Mrp2 のアミノ酸配列は同一ではなく、また胆汁生成・輸送やトランスポータ類にも種々の異同があり、その特性が異なる可能性が十分に考えられるため、ヒトでも同じ作用が発現している保証はない。この点を解決するために、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた研究を実施することは非常に価値があると考えられる。