

本研究は、ラットで確認されているジェニピンの Mrp2 の胆管膜上へのトランスロケーション作用ならびに肝組織中 GSH レベルの上昇作用が、ヒト肝細胞でも観察されるか否かについて検討した。

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。本マウスの内訳は、Table 2-1 に併記したように、高置換マウスが 6 匹、中置換マウスが 3 匹であった。

Table 2-1 The chimeric mice used in the present study, and drug-treatment.

Substitution grade	Identification number	Body weight (g)	Drug treatment
Higher	CTE68-2	22.86	vehicle (water)
	CTE68-3	10.91	vehicle (water)
	CTE65-2	14.35	vehicle (water)
	CTE66-11	20.23	genipin
	CTE73-2	18.54	genipin
	CTE74-3	16.37	genipin
Median	CTE72-3	16.37	geniposide
	CTE72-9	9.09	geniposide
	CTE66-11	18.56	geniposide

B-2.薬物投与および肝組織摘出

genipin および geniposide は、投与直前に各々20 mg/ml, 35 mg/ml になるように温精製水にて溶解し、薬物溶液は0.1 ml/10 g bodyweight の割合で強制経口投与した。また、比較対照として担体としての精製水のみを同率で投与した。各薬物処理群および対照群の例数は各々3例とした。

肝臓摘出は、genipin および担体投与では2時間後、geniposide 投与は24時間後に行った。摘出肝臓は写真撮影された後、直ちに検査目的に最適な方法にて処理された。

B-3.ヒト肝の Mrp2 の免疫組織化学的解析

光学顕微鏡によって Mrp2 の局在を調べるために、ジェニピン、ジェニポシド、ないしは担体を投与したヒト肝細胞キメラマウスから採取された肝組織(50 mg)は、OTC コンパウンド(Miles, Elkhart, ID)に包埋して液体窒素にて凍結し、6 μm 厚の切片を作製しスライドにマウントした。既報に従って、cytokeratin-8 と Mrp2 に対するポリクロナル抗体を用いて免疫染色を行った。

B-4.肝組織中の GSH 量の測定

肝組織中の GSH レベルを測定す

るため、ジェニピン、ジェニポシド、ないしは担体を投与したヒト肝細胞キメラマウスから採取された肝組織(70-80 mg)は、1 ml の氷冷 metaphosphoric acid (MPA)溶液でホモジネートし、超遠心(45000rpm, 4℃, 10min)して得られた上清は0.2mm フィルターで濾過後測定に供した。調製液中の GSH 量は GSH アッセイキット(GSH-400, Oxis, Portland, OR)で測定した。

C. 研究結果

C-1.ヒト肝組織における Mrp2 の免疫組織化学的局在に対するジェニピンの影響

肝病理切片における Mrp2 の免疫組織化学的解析を行った。結果は Fig. 2-1 に示した。光学顕微鏡による観察で、keratin-8 に特異的に染色されるヒト肝組織細胞切片部の概ね毛細胆管に Mrp2 は発現していた。ジェニピン投与マウスの肝の Mrp2 の免疫染色は毛細胆管においてより広範に観察された。

C-2.肝組織における GSH レベルに対するジェニピン、ジェニポシドの影響

結果は Fig. 2-2 に示した。ジェニポシド投与24時間後に採取した肝組織

の GSH レベルは顕著に増加したが、ジェニピン投与 2 時間後に採取した肝組織の GSH レベルは対照群(Cont)に比較して若干低下していた。

既に、100 mg/kg のジェニピン投与後の肝組織中の GSH レベルの経時的変化を Balb/c マウスで検討しており、GSH レベルは、GSH 排泄の急激な亢進により投与後 1 時間後に一過性に低下すること、その後は、おそらくは急な GSH レベルの低下によって代償的に誘導される GSH 合成系の賦活によって上昇に転じること、ジェニピンないしはジェニポサイド投与の 24 時間後には GSH レベルは投与前のレベルより高くなること、などを確認している。本研究において、ジェニピン投与 2 時間後で GSH レベルが低下し、ジェニポシド投与 24 時間後で上昇していたのは、Balb/c マウスで見られた上述の変化とよく一致しており、同様の GSH 排泄促進作用が起こったことを間接的にではあるが示唆している。

D. 考察

単回経口投与されたジェニピンが、ヒト肝細胞キメラマウスのヒト肝細胞の胆管膜上へのヒト Mrp2 の局在を促進することが明らかになった。ジェニポサイドについては現在解析中であるが、肝組織中の GSH レベル

の動態から同様の作用があったと推察される。今まで実験動物でしか確認されていなかったジェニピンの Mrp2 に対する作用がヒト肝細胞でも観察できたことは、ジェニピンのヒトでの作用を示唆するデータとして極めて重要である。ジェニピンは毒性と安定性の問題から医薬品として開発されていないが、ジェニピンの母構造であるジェニポサイドを高含量で含み、臨床で医療用製剤として使用されている茵陳蒿湯の作用機序を、ヒト肝臓でも推察させる貴重なデータである。現在、胆管閉鎖症や肝移植後の肝機能不全の改善薬が臨床で求められているが、満足できる治療法が確立されているとはいいがたい。ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、ジェニピンだけではなく、茵陳蒿湯のヒト肝細胞の Mrp2 に対する作用を解明することは、当該疾患における新しい治療法の可能性を拓くものであると考えている。

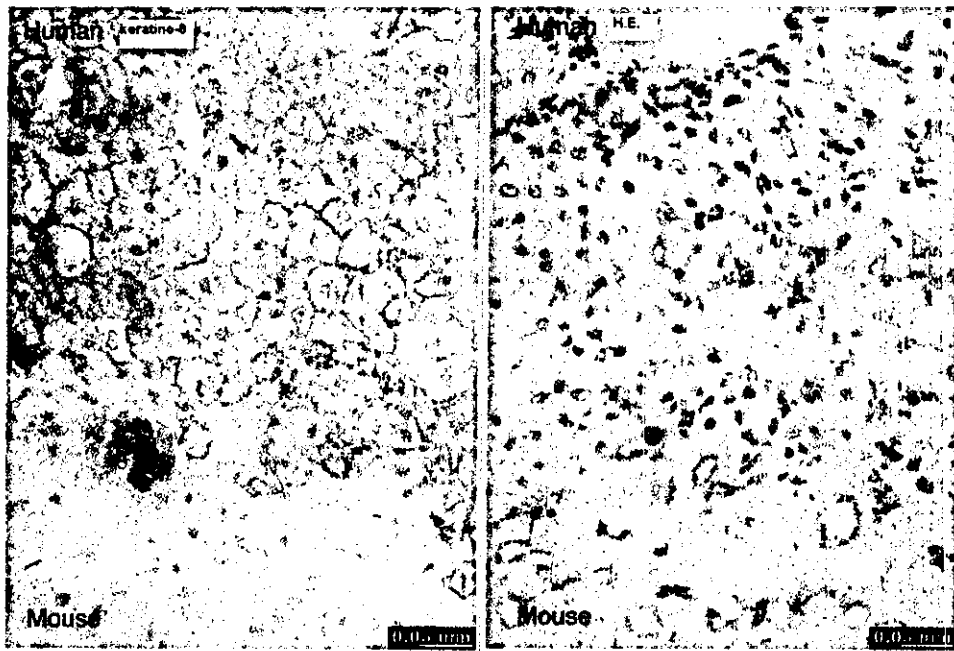
F. 研究発表

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

A



B

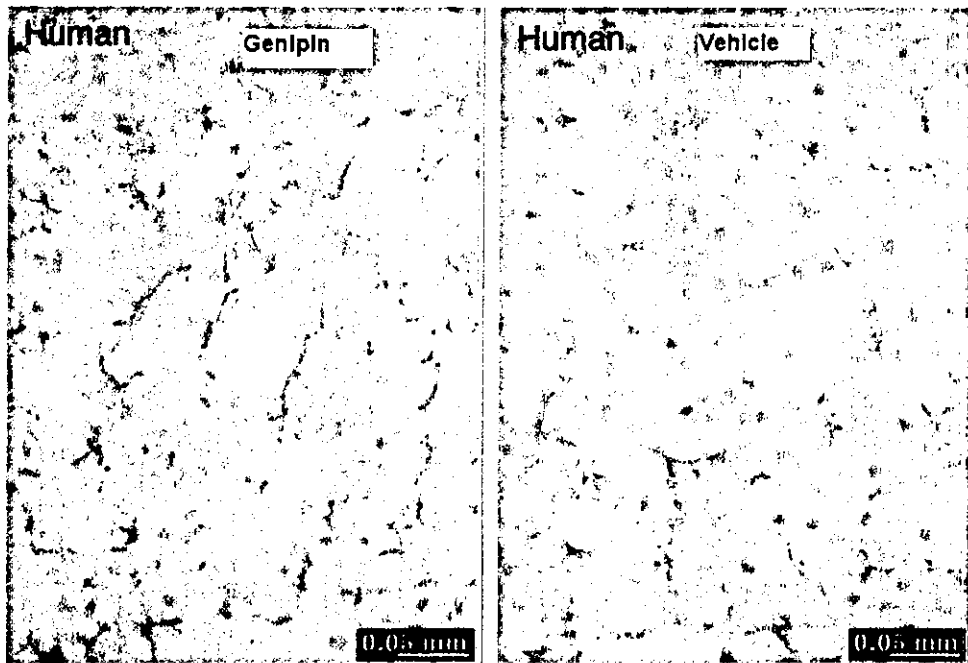


Fig. 2-1 Immunohistochemical localizations of keratino-8 and Mrp2 in the livers of chimeric mice (light microscopic view). Liver tissue sections were prepared from livers 2 hours after oral administration of vehicle or genipin. (A) Anti-human Keratino-8 polyclonal antibody immunostaining shows human hepatic cells, and (B) Mrp2 polyclonal antibody immunostaining shows a diffuse and linear pattern outlining the canalicular membrane (CM) domain of each keratino-8 stained liver section from vehicle and genipin-treated chimeric mice. (Bars = 50 μ m)

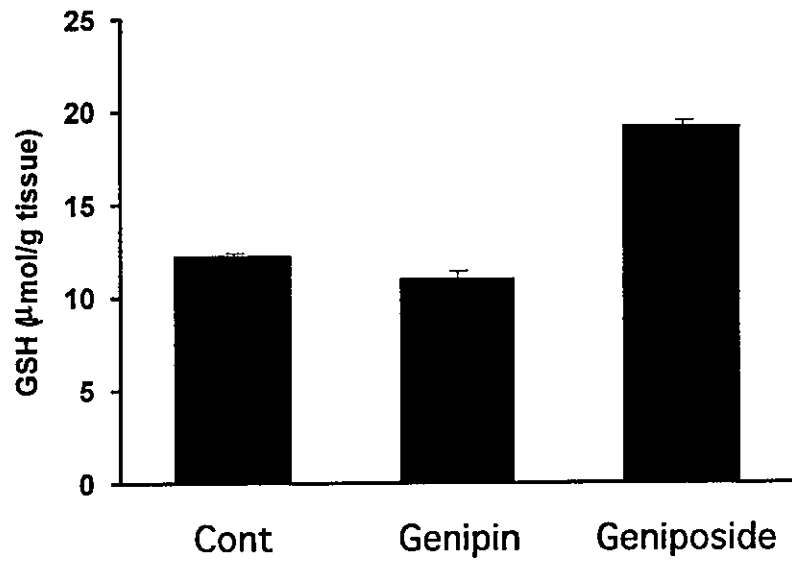


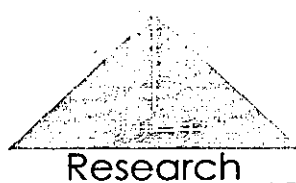
Fig. 2-2 Hepatic GSH levels in the chimeric mice. GSH concentrations were measured as according to GSH assay kit's method. The GSH levels were expressed as mean \pm SEM of three determinations.

研究成果の刊行物・別刷り

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
立野 知世 吉里 勝利	ヒト肝細胞キメラ マウス	薬 事	46	1877- 1881	2004
Chise Tateno Toru Horie Katsutoshi Yoshizato	Chimeric mice with human hepatocytes	The Cell	36	328-332	2004
Miki Katoh Tomohito Matsui Miki Nakajima Chise Tateno Miho Kataoka Yoshinori Soeno Toru Horie Kazuhide Iwasaki Katsutoshi Yoshizato Tsuyoshi Yokoi	Expression of human cy tochromes P450 in chim eric mice with humaniz ed liver	Drug Metabolism and Disposition	32	1402- 1410	2004
立野 知世 吉里 勝利	ヒトの肝細胞を持つマ ウス	LABIO 21	19	6-10	2005
立野 知世 吉里 勝利	ヒト肝細胞を導入した スキッドマウス	摘出ヒト組 織/細胞を 用いた非臨 床研究		印刷中	2005
Masuhiko Nishimura Tsuyoshi Yokoi Chise Tateno Miho Kataoka Eiji Takahashi Toru Horie Katsutoshi Yoshizato Shinsaku Naito	Induction of human CYP1A2 and CYP3A4 in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver	Drug Metabolism And Pharmacokin etics	20	印刷中	2005
Miki Katoh Tomohito Matsui Miki Nakajima Chise Tateno Yoshinori Soeno Toru Horie Kazuhide Iwasaki Katsutoshi Yoshizato Tsuyoshi Yokoi	In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver	Drug Metabolism and Disposition	33	印刷中	2005



ヒト肝細胞キメラマウス

立野 知世, 吉里 勝利

TATENO Chise, YOSHIKATO Katsutoshi

広島県産業科学技術研究所 知的クラスター創成事業 吉里プロジェクト
広島大学大学院理学研究科

はじめに

医薬品開発研究においては、候補化合物が医薬品として認可されるまで15年もの年月と200億円の研究費を要する。臨床試験に入るまでの薬効試験、安全性試験、薬物代謝試験などの多くの試験はマウスやラットなどの齧歯類やイヌ、サルを用いて行われている。化学物質の多くは肝臓で代謝・解毒されるが、齧歯類とヒトの肝臓では、代謝活性に大きな違いがあることが知られている。臨床試験の段階で開発中止となる医薬候補品は60%に達するが、その原因の約8割が、種差に起因するものである。また、肝がんという深刻な疾患をもたらすB型およびC型肝炎ウイルスは、ヒトの体内の肝細胞にしか感染しないことが知られており、このことが、ウイルス感染のメカニズム解明や治療法の開発に大きな遅れをもたらしている。もし、ヒト肝細胞で置換された肝臓をもつキメラマウスを薬効試験や安全性試験に、あるいは肝炎ウイルス感染モデルとして利用することができれば、医薬品開発における経費削減と時間の短縮に大いに寄与すると考えられる。

肝障害モデルマウスへの異種肝細胞移植

Sandgrenらは、albumin enhancer/promoterにurokinase plasminogen activator (uPA) の遺伝子を接続した遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した¹⁾。彼らは当初、uPAの性質を調べるために、大量に蛋白質を合成して分泌することができる肝臓でuPAが発現されるように導入遺伝子をデザインした。このuPAが大量に発現しているマウスの肝細胞は小さな脂肪滴を大量にもっており肝臓は白い。RhimらはこのuPAマウスに、マウス正常肝細胞を移植すると、障害肝に生着・増殖し、移植した肝細胞で置換されることを示した²⁾。彼らはさらに、uPAマウスとT細胞をもたないnudeマウスを掛け合わせ、uPA/nudeマウスにラット正常肝細胞を移植した。ラット肝細胞はuPA/nudeマウス肝臓の中で増殖して完全に置換し、ラット肝細胞キメラマウスが作出された³⁾。

その後、ヒト肝細胞キメラマウスの作製の検討がいくつかのグループにより行われた。Dandriらは、uPAマウスとT細胞、B細胞をもたないRag2ノックアウトマウスを掛け合わせ、新鮮ヒト肝細胞を移植した。ヒト肝細胞による置換率は最高で15%であった。彼らはこのマウスへのB

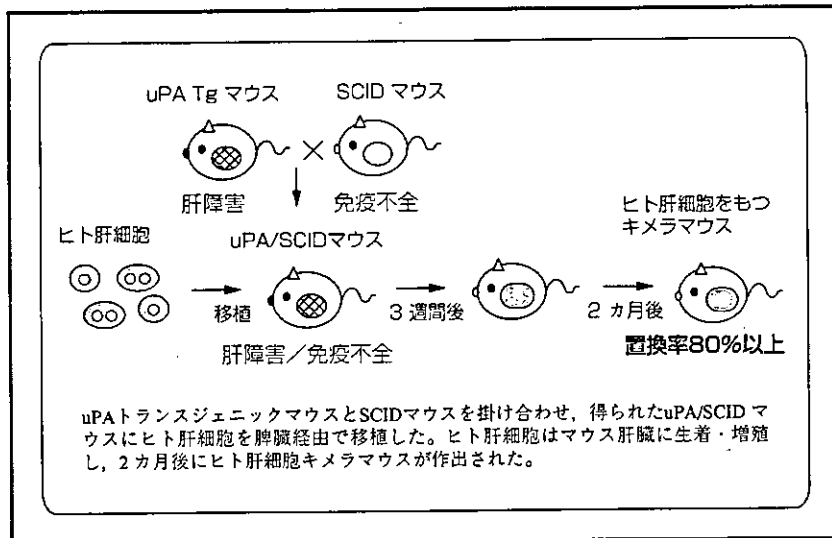


図1 ヒト肝細胞キメラマウスの作製

型肝炎ウイルスの感染成立を証明した⁴⁾。

Mercerらは、uPAマウスとT細胞、B細胞、NK細胞をもたないSCID (severe combined immunodeficiency disease) -bgマウスを掛け合わせuPA/SCIDマウスを作製した⁵⁾。このマウスに凍結融解ヒト肝細胞を移植したところ、マウス血清中のヒトアルブミン濃度は最高で2mg/mLに上昇した(血中に換算すると約1mg/mL)。彼らはこのマウスにC型肝炎ウイルスを感染させ、キメラマウス血清から別のキメラマウスへの感染の成立も証明した⁵⁾。

これらの研究により、ヒト肝細胞キメラマウスはヒト肝炎感染モデルマウスとして有用なことが示された。われわれは、uPAマウスとSCIDマウスを掛け合わせ、uPA/SCIDマウスを作製しヒト肝細胞キメラマウスの作製を試みた。ヒト肝細胞キメラマウスもラット肝細胞キメラマウスと同様にヒト肝細胞で完全に置換させることが可能かどうか、また、ヒト肝細胞で置換されたマウス肝臓はヒト型の薬物代謝活性をもつかどうかについて調べた。

高置換ヒト肝細胞キメラマウスの作製

まず、ヒト肝細胞キメラマウスドナーに、12歳男児の凍結融解肝細胞を用いた。生後3~4週のuPA/SCIDマウスの肝臓へ $5 \sim 10 \times 10^5$ 個の細胞を脾臓経由で移植した(図1)。ヒト肝細胞のマウスへの生着および増殖は、マウス血中のヒトアルブミン濃度でモニタリングした。マウスのヒトアルブミン濃度は移植後対数的に増加し、30~40日頃から増加のスピードが遅くなった。60日頃からヒトアルブミン濃度の増加は止まり一定濃度を維持した(図2)。この間、ヒトアルブミン濃度が3mg/mL以上になったマウスで体重が減少し死亡するケースがみられた⁶⁾。死亡した個体では、主に腎臓障害が観察され、尿細管と糸球体にヒト補体(hC3)および、ヒト膜侵襲複合体(hMAC)の沈着がみられた⁶⁾。このことは、キメラマウス肝臓のヒト肝細胞が産生したヒト補体が活性化されマウス細胞を攻撃したことを意味する。そこで、われわれは、キメラマウスに補体抑制剤(フサン、メシル酸ナファモスタット)を投

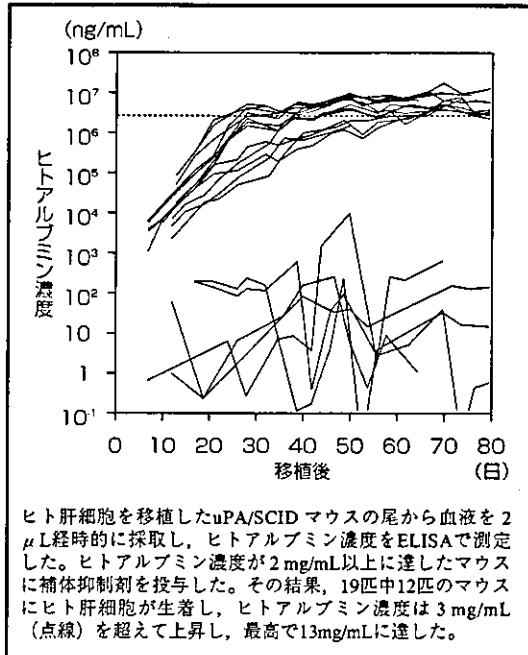


図2 ヒト肝細胞を移植したマウス血中のヒトアルブミン濃度

与することにより、3 mg/mL以上のヒトアルブミン値を示すマウスの体重減少と死亡を防ぐことが可能となることを見出した。この方法により、ヒトアルブミン濃度は最高で13mg/mLに達した(図2)⁶⁾。

キメラマウスのヒト肝細胞による置換率を求めるために、肝臓の凍結切片を作製し、ヒト特異的サイトケラチン8/18抗体による免疫染色、またはヒトcDNAプローブを用いた*in situ* hybridizationを実施し、染色した切片の面積あたりの陽性領域の割合を置換率とした(図3)。その結果、マウス血中ヒトアルブミン濃度と置換率には相関があり、5 mg/mLのヒトアルブミン値を示すマウスのヒト肝細胞による置換率は約70%であった。キメラマウスにフサンを投与することにより、最高で置換率96%のキメラマウスが得られた⁶⁾。



図3 サイトケラチン8/18抗体を用いた組織染色

キメラマウス肝臓におけるヒトチトクロームP450発現

キメラマウス肝臓よりTotal RNAを抽出し、ヒトチトクロームP450 (hCYP) の分子種hCYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4のmRNAについて、ABI 7700を用いてリアルタイム定量性RT-PCR法により発現量(コピー数)を測定した。その結果、置換率が高くなるほどhCYPの高い発現量がみられた。hCYPのそれぞれのコピー数をヒトglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (hGAPDH) のコピー数で割ると、ドナーの値と非常に近い値を示した(図4)⁶⁾。リファンピシンはhCYP 3A4の発現量を誘導することが知られている。キメラマウスにリファンピシンを50mg/体重kgの投与量で4日間腹腔内投

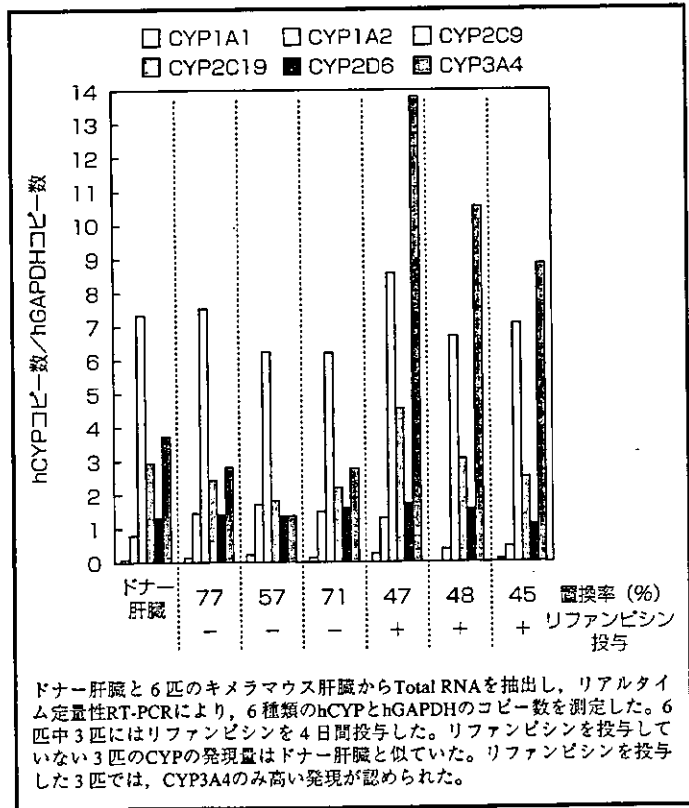


図4 キメラマウスにおけるhCYP mRNAの発現量

与し、5日目に肝臓を採取した。hCYP mRNAの発現量を同様に測定したところ、hCYP3A4のみが高い値を示した(図4)。

また、CYP2C9の薬物代謝活性をジクロフェナクを基質として測定したところ、キメラマウス肝臓にも活性がみられた。ヒト肝細胞による置換率が高くなるほど、CYP2C9の高い活性がみられた⁶⁾。

おわりに

われわれは、マウス肝臓の90%以上がヒト肝細胞で置換されたヒト肝細胞キメラマウスを作製した。このマウスの肝臓には、ヒト肝臓と同程度のヒト型CYPのmRNAが発現しており、薬物代謝

活性も認められた。また、薬物によるCYPの選択的誘導も認められた。このキメラマウスはヒト肝炎ウイルスに対する抗ウイルス薬の開発だけでなく、新薬開発のための非臨床試験における薬物動態試験や肝毒性試験などに利用可能と考えられた。

【参考文献】

- 1) Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, et al : Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. Cell, 66 : 245-256, 1991
- 2) Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, et al : Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. Science, 263 : 1149-1152, 1994
- 3) Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL :

- Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 92 : 4942-4946, 1995
- 4) Dandri M, Burda MR, Török E, et al : Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus. Hepatology, 33 : 981-988, 2001
- 5) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al : Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. Nat Med, 7 : 927-933, 2001
- 6) Tatenno C, Yoshizane Y, Saito N, et al : Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. Am J Pathol (in press)

製剤技術と 品質管理の 専門情報誌	PHARM TECH JAPAN	9 月号 Vol.20 No.10	株式会社 じほう
特集：医薬品製造におけるクリーンテクノロジー			
■注射剤製造の概要とクリーン化 —第14改正日本薬局方およびその解説書から— 三宅康夫 (千代田化工建設)			
■アイソレーターシステムの現状と展望 川崎康司 (エアレックス)			
■レポート：トーアエイヨー 製剤技術センターのクリーン化設備			
ARTICLES			
■植物由来カプセル開発検討報告 柴田一郎 (富士カプセル)			
■医薬品における脱酸素剤使用の現状と今後の展開 榊原好久 (三菱ガス化学)			
■FDA査察 “よい結果を出すためのポイント” (4) 山岡尚志 (タックオフィス)			
Study of GMP			
■製剤GMPガイドライン(2) 製薬協GMP専門委員会の提案 重光 真 (明治製菓)			

Chimeric Mice With Human Hepatocytes - A New Tool for Pre-Clinical Evaluation of New Chemical Entities -

Chise Taten¹, Toru Horie², and Katsutoshi Yoshizato^{1,3}

From ¹Yoshizato Project, CLUSTER, Prefectural Institute of Industrial Science, ²PhoenixBio Co., Ltd, ³Department of Biological Science, Developmental Biology Laboratory, Hiroshima University, Higashihiroshima, Hiroshima, Japan.

2004年36巻7月臨時増刊号（通巻471号）

細胞 The Cell（p.30～p.34）

ニューサイエンス社

New Science Co.LTD.

Chimeric Mice With Human Hepatocytes - A New Tool for Pre-Clinical Evaluation of New Chemical Entities -

Chise Tateno¹, Toru Horie², and Katsutoshi Yoshizato^{1,3}

From ¹Yoshizato Project, CLUSTER, Prefectural Institute of Industrial Science
²PhoenixBio Co., Ltd, ³Department of Biological Science, Developmental Biology
Laboratory, Hiroshima University, Higashihiroshima, Hiroshima, Japan.

Key words
human hepatocytes,
chimeric mice,
cytochrome P450

Abstract

Human hepatocytes were transplanted into urokinase-type plasminogen activator-transgenic SCID mice (uPA/SCID mice), which are immunodeficient and undergo liver failure. The transplanted cells were characterized in terms of their *in vivo* growth potential and functions. The human hepatocytes progressively repopulated the murine host liver when treated with a drug that has anti-human complement factor activity, and these mice developed livers with replacement index values as high as 96%. The human hepatocytes in the murine host liver expressed mRNAs for a variety of human cytochrome P450 (hCYP) subtypes, in a manner that was similar to the donor liver. The mRNAs for hCYPs were induced in the liver in a CYP type-specific manner when the mice were treated with drugs. From these results, we conclude that the chimeric mouse developed in the present study is a useful model for assessing the functions and pharmacological responses of human hepatocytes.

Introduction

Researchers have developed humanized (chimeric) mice by partially repopulating the mouse liver with human hepatocytes. Dandri and colleagues transplanted fresh human hepatocytes into mice that were generated by crossing mice transgenic for urokinase-type plasminogen activator (uPA) with mice that carried a deletion of the recombinant activation gene-2 (RAG-2)¹⁾. The replacement index (RI) of the resulting chimeric liver was 15% at most. Human hepatitis B viruses were able to infect and replicate in the humanized uPA/RAG-2 mice¹⁾. Humanized mice were also produced by transplanting human hepatocytes into uPA/SCID mice, and these mice have been utilized for infection studies with human hepatitis C viruses²⁾.

Recently we succeeded in generating uPA/SCID mice with livers that were almost completely repopulated with human hepatocytes. The livers of the chimeric mice were tested for normal expression of the various forms of human cytochrome P450 (hCYP), which play central roles in metabolizing medicines in the human liver³⁾. We also examined whether the chimeric liver showed induction of the appropriate hCYP subtype when the mouse was administered a drug with known specificity for a certain CYP subtype in the human liver³⁾.

1-3-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, Hiroshima 739-8526, Japan.
Fax: (+81) 82-424-1492 E-mail: kyoshiz@hiroshima-u.ac.jp

1. Repopulation of mouse livers with human hepatocytes in the presence of complement inhibitor

The present study was performed with the approval of the ethics board of the Hiroshima Prefectural Institute of Industrial Science and Technology. The uPA^{+/+}/SCID^{+/+} mice were generated by crossing uPA mice (B6SJL-TgN(Alb1Plau)144Bri) with SCID mice (Fox Chase SCID C.B-17/1cr-scid Jcl). Liver tissues were isolated from a 12-year-old Japanese donor. Hepatocytes were isolated and stored in liquid nitrogen. We also used commercially available frozen human hepatocytes, which represent hepatocytes from a 9-month-old-Caucasian boy (IVT079; *In Vitro* Technologies Inc.)⁹. These hepatocytes were thawed and transplanted with $5.0-7.5 \times 10^5$ viable hepatocytes via spleen into the uPA^{+/+}/SCID^{+/+} mice at 20 to 30 days after birth.

Blood samples were collected periodically from the tail vein, and the levels of human albumin (hAb) was determined by ELISA. In this instance, the chimeric mice could not survive when the level of hAb in the host blood exceeded 3 mg/ml, which corresponded to RI > 50%. Atrophy and necrosis of the kidney and pancreas were observed in these mice. However, there was neither severe necrosis nor inflammation in the human hepatocyte-repopulated livers. Depositions of human complement 3 (hC3) and human membrane attacking complexes (hMAC) were observed in the kidneys⁹. The currently available data strongly suggest that chimeric mice die due to human complement-induced disorders in organs other than the liver, particularly the kidneys. The administration of Futhan (nafamostat mesilate, 6-amidino-2-naphthyl p-guanidinobenzoate dimethanesulfonate; gifted by Torii Pharmaceutical Co., Ltd.), which is an anti-complement drug that inhibits the C5/C3 convertase⁹. The host animals were injected intraperitoneally with 200 μ l of 1.5 mg/ml Futhan "once every 2 days", "once per day", and "twice per day", when the hAb concentrations are between 2 and 4 mg/ml, 4 and 6 mg/ml, and > 6 mg/ml, respectively. The administration of Futhan had a remarkable effect on the chimeric mice, in that these mice survived for long

periods of time (> 6 months) and showed steady gains in body-weight within the two months post-transplantation, and sustained high levels of hAb, ranging from 3 to 13 mg/ml (Fig. 1). The animals appeared normal and showed high RI values (~96% maximally). Thus, it seems likely that Futhan functions as an anti-complement factor(CF) agent, as one would expect. We believe that activated hCFs produced by propagated human hepatocytes attack the cells of the host mouse. Futhan has been shown to be effective in the therapy of acute pancreatitis⁹ and pulmonary vascular injury⁶, and in the prolongation of xenograft survival⁷. Thus, it appears that Futhan not only suppresses CFs, but also functions as a serine protease inhibitor to prevent secondary injuries caused by proteases that leak from injured tissues.

The chimeric livers were characterized morphologically and histologically with respect to the extent of chimerism, as estimated by the concentrations of hAb in the host blood. The red nodules that were distributed sporadically in the livers of mice whose hAb levels were below the level of detection may represent colonies of transgene-deleted host hepatocytes, as reported previously⁹. The livers of mice that had 1-5 mg/ml hAb in the blood were chimeric, in that they contained both white and red areas. The livers of mice with hAb blood levels of > 5 mg/ml were all red-colored.

To identify human hepatocytes in the chimeric livers, liver sections of mice were subjected to human specific cytokeratin 8/18 (hCK8/18) immunostaining (Fig. 2). We confirmed that the regions that were positive for the immunostaining coincided almost exactly with those that showed positive *in situ* hybridization staining with human DNA probes in the corresponding serial section⁹. We calculated the RI as the ratio of area occupied by hCK8/18-positive hepatocytes to the entire area examined in immunohisto-chemical sections of seven lobes. RI values correlated well with the hAb concentrations in the blood of chimeric mice (Fig. 3). The correlation graph suggests that mice with > 5 mg/ml hAb in the blood should have RI > 70%. Thus, approximately 30% of transplanted mice with human hepatocytes were considered to have RI > 70%.

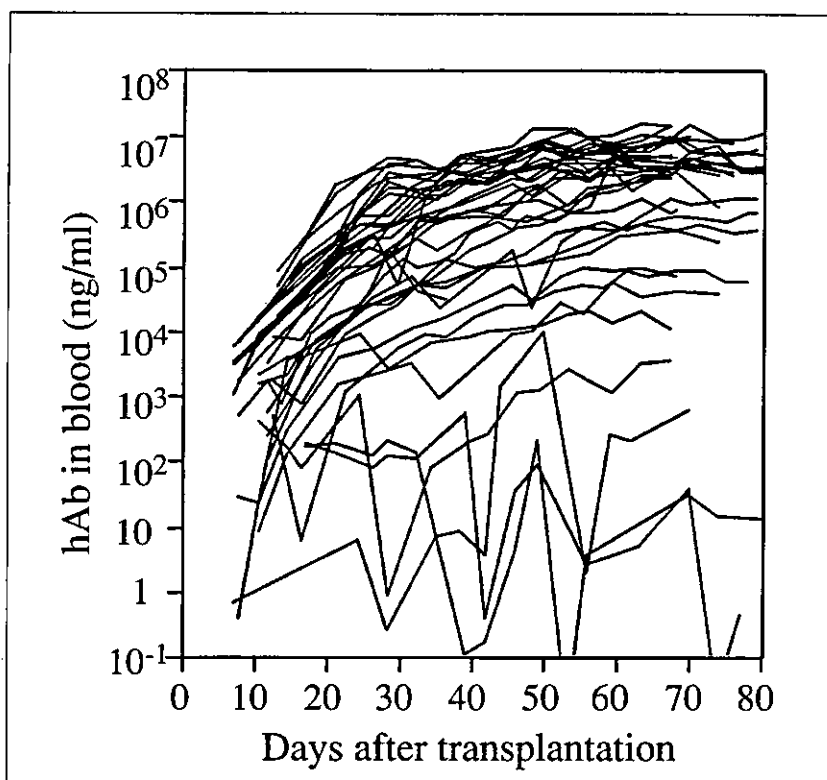


Fig. 1 Humanized mice with human hepatocytes. The $uPA^{-/-}SCID^{-/-}$ mice were transplanted with human hepatocytes. The mice were treated with Futhan according to the regimen described in the text.

2. Expression of hCYP proteins and mRNAs in the livers of chimeric mice

CYP isoforms play central roles in the metabolism of chemicals and medicines. The livers of the chimeric mice were tested for normal expression of the various forms of human hCYP.

hCYP2C9 protein was detected in the microsomal fraction of chimeric liver by Western blotting⁹. CYP2C9 preferentially catalyzes diclofenac via its diclofenac 4'-hydroxylation activity⁹. Diclofenac is an appropriate substrate for measuring the activity of human-specific CYP in chimeric mouse livers, because the microsomal fractions of the control $uPA^{-/-}SCID^{-/-}$ mice showed very low levels of activity for this enzyme. Liver microsomes were prepared from chimeric mice and treated with diclofenac, to test their ability to metabolize the drug. The level of diclofenac 4'-hydroxylase of the mouse with RI = 0% was similar to those of the control mice, while the levels of this enzyme in the remaining chimeric mice increased with increasing RI values⁹. From this, we

conclude that human hepatocytes in chimeric livers retain pharmacological activity against diclofenac via the production of hCYP2C9.

Total RNA samples were isolated from the liver tissues of the donor and chimeric mice. The mRNAs for six hCYPs, hCYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4, were quantified by quantitative RT-PCR using the total RNA samples. The hCYP sequences were not amplified in the control $uPA^{-/-}SCID^{-/-}$ mouse livers, which indicates that the primers used are specific for human genes. The mRNA level for each hCYP in each individual chimeric mouse correlated well with the RI value for that mouse. The relative copy numbers of the hCYPs were obtained by normalizing the observed copy numbers against the copy number of human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The hCYP expression profile of each chimeric mouse was similar to that of the donor. This suggests that the human hepatocytes in the chimeric mice express the six hCYP genes in a semi-normal fashion, as is the case in the human body.

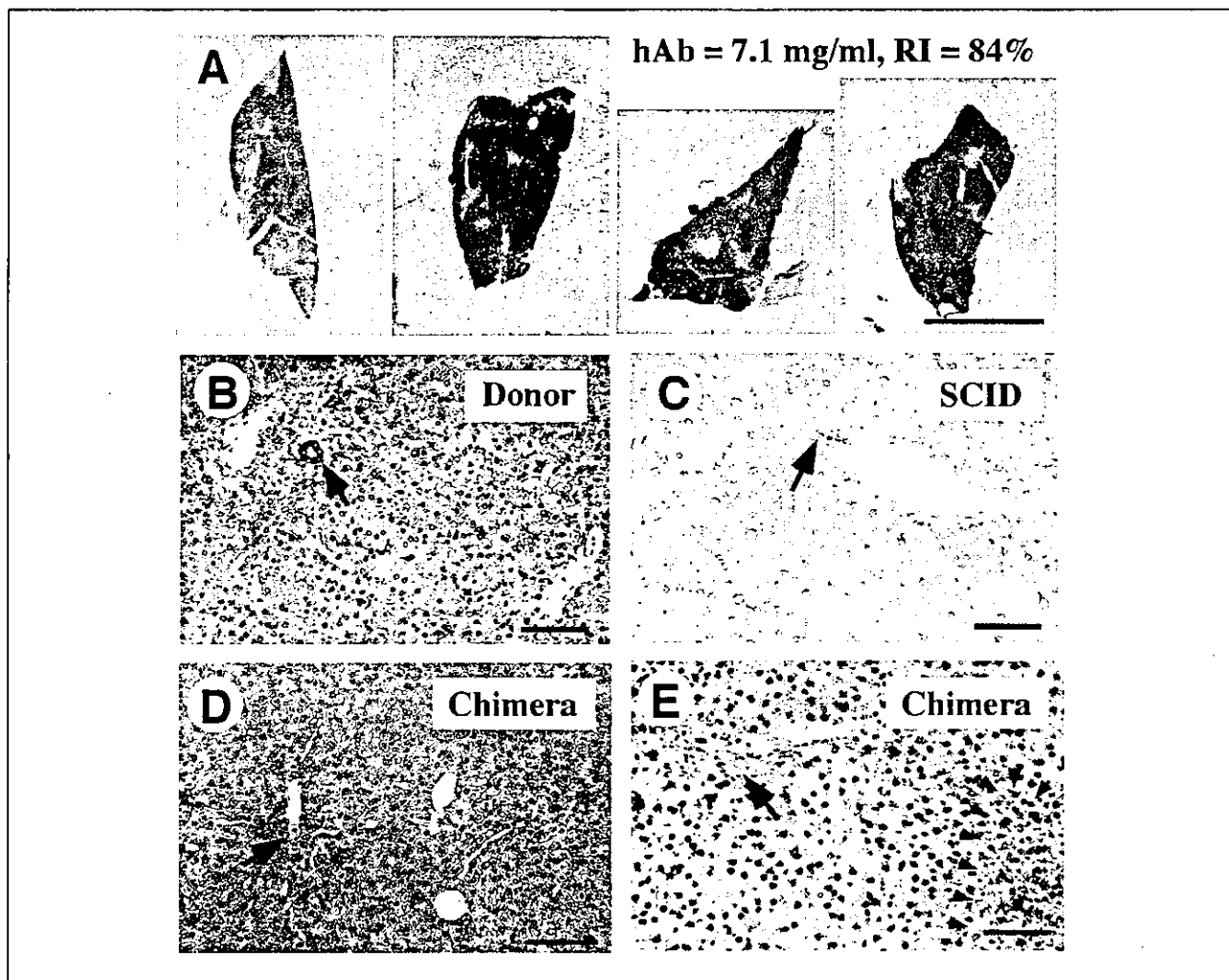


Fig. 2 Demonstration of mouse liver chimerism.

Histological serial sections were prepared from six liver lobes of a chimeric mice, and stained with anti-hCK8/18 antibodies. (A) Photos are tissues of one of the median and the left lateral lobe, one of the right lateral lobes, and one of the caudate lobe from left to right. RI was determined from the stain as 84%. Bar, 5 mm. (B) Donor liver stained with anti-hCK8/18 antibodies. (C) $uPA^{+}/SCID^{-/-}$ mouse liver stained with anti-hCK8/18 antibodies. (D) Chimeric liver stained with anti-hCK8/18 antibodies. (E) Chimeric liver stained with *in situ* hybridization using human DNA probes. Bars from (B) to (E), 100 μ m.

We also examined whether the chimeric liver was capable of responding to CYP-inducing chemicals. Rifampicin and 3-methylcoranthrene (3-MC) were used as specific inducers of CYP3A, and CYP1A1 and 1A2, respectively^(10, 11). Chimeric mice were injected intraperitoneally with rifampicin or 3-MC. The mRNA levels of six hCYPs in the liver tissues were measured 24 hours later. Rifampicin treatment enhanced the expression 5.8-fold. This level of induction was specific for hCYP3A4 among the six hCYPs tested. The administration of 3-MC enhanced the expression levels of the CYP1A1 and CYP1A2 mRNAs to 10.0-fold and

6.4-fold, respectively.

Conclusion

The prediction of human responses to test drugs based upon data obtained from experiments with laboratory animals such as rodents is not practical because there are considerable differences in the metabolism of drugs between animals and humans. Recently, we developed the method to yield "chimeric mice"/"humanized mice" whose hepatocytes are near-completely replaced with human hepatocytes⁽³⁾. These

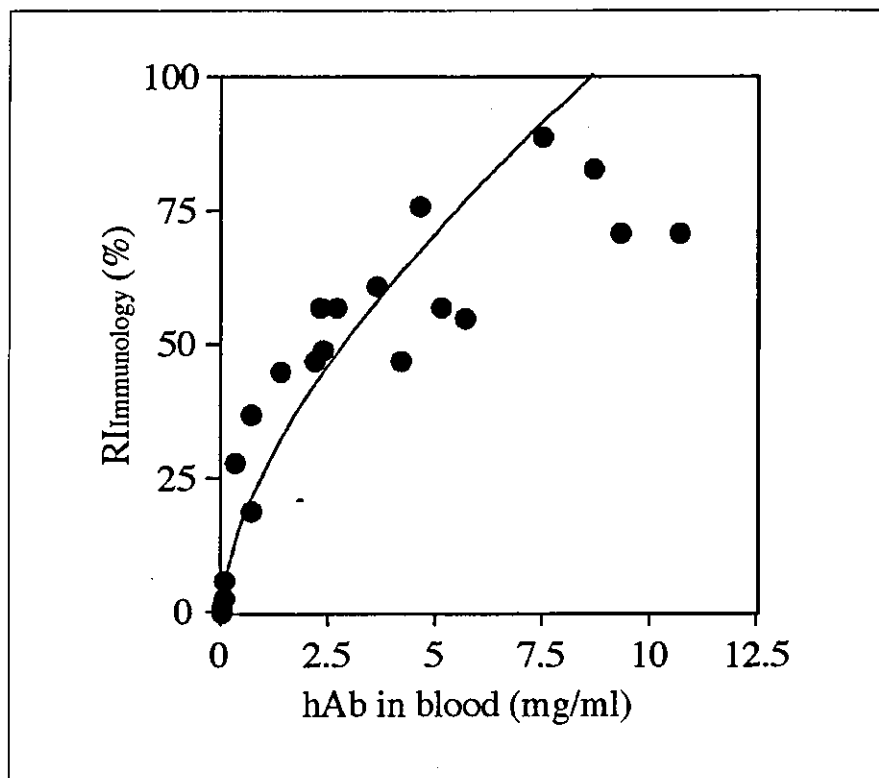


Fig. 3 Correlation between RI and the hAb concentration in mouse blood. The hAb concentration is plotted against the corresponding RIimmunology. The RIimmunology values were obtained by immunostaining with anti-CK8/18.

mice show the humanized metabolism toward test drugs. The utilization of chimeric mice into pre-clinical evaluation for the metabolism and toxicity of test drugs will much shorten the period of discovery and development of new chemical entities, and will much reduce the cost for such activity.

References

- 1) Dandri M, Burda MR, Török E, *et al.*: *Hepatology*. 33: 981-988, 2001.
- 2) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, *et al.*: *Nat Med*. 7: 927-933, 2001.
- 3) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, *et al.*: *Am J Pathol*. (in press)
- 4) Inagi R, Miyata T, Maeda K, *et al.*: *Immunol Lett*. 27: 49-52, 1991.
- 5) Iwaki M, Ino Y, Motoyoshi A, *et al.*: *Jpn J Pharmacol*. 41: 155-162, 1986.
- 6) Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K. *Am J Respir Crit Care Med*. 155: 711-718, 1997.
- 7) Miyagawa S, Shirakura R, Matsumiya G, *et al.*: *Transplantation*. 55: 709-713, 1993.
- 8) Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, *et al.*: *Cell*. 66: 245-256, 1991.
- 9) Leemann T, Transon C, Dayer P, *et al.*: *Life Sci*. 52: 29-34, 1993.
- 10) Bowen WP, Carey JE, Miah A, *et al.*: *Drug Metab Dispos*. 28: 781-788, 2000.
- 11) Kato R, *Pharmacol Ther*. 6: 41-98, 1979.

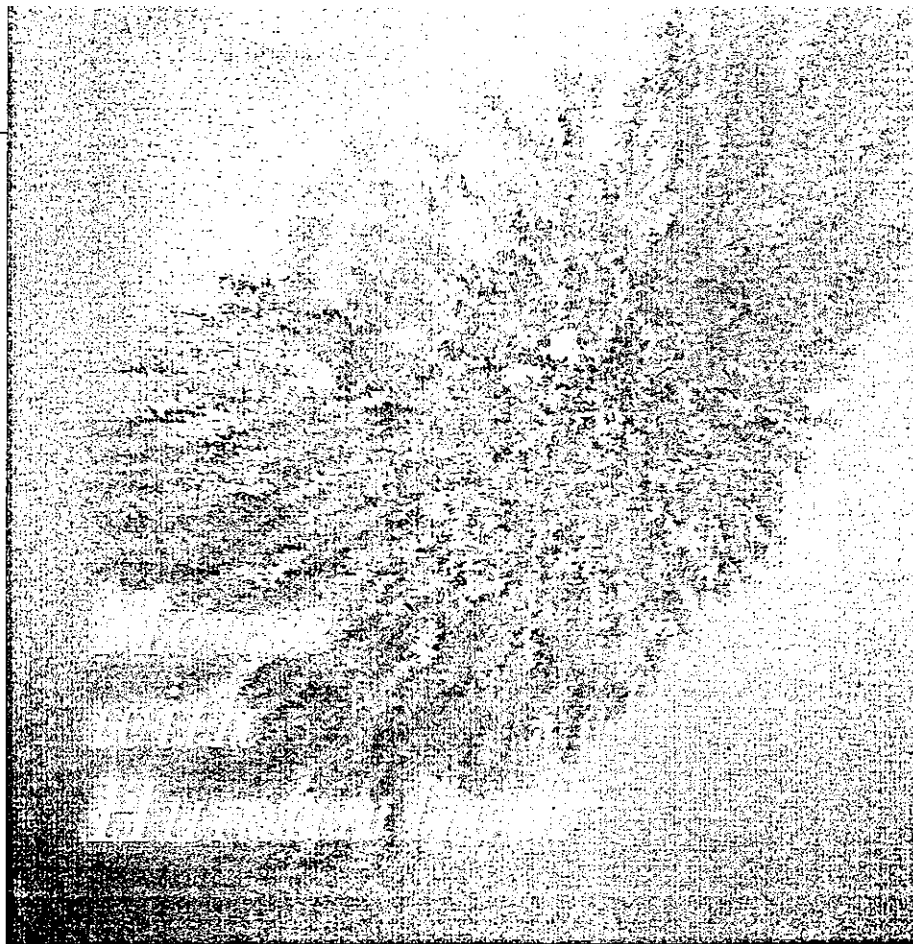
☆

☆

☆

特集

「ヒトの肝細胞を持つマウス」



立野 知世

広島県産業科学技術研究所 知的クラスター創成事業 吉里プロジェクト

吉里 勝利

広島大学大学院理学研究科生物科学専攻発生生物学研究室 教授

はじめに

医薬品開発には10年以上の年月と約300億円の費用がかかるといわれている。多くの化学物質から医薬品候補を選択するために、マウス、ラット、イヌ、サルなど用いて、薬効試験、安全性試験が行われる。これらの動物で有効性と安全性が確認された候補医薬品について、臨床試験が行われる。しかし、動物とヒトでは、肝臓における薬物の代謝能力が大きく異なることが知られている。肝臓の主要薬物代謝酵素であるシトクロ-

ムP450 (CYP) は1A, 2C, 2D, 3Aなどの多くの分子種から成るが、それぞれの分子種の発現の割合は動物種によって大きく異なる。したがって、動物種によって薬物動態が大きく異なることが原因となり、臨床試験において薬効がみられなかったり、毒性が現れたりすることから、約半分の医薬候補品が開発中止となる。このことは、莫大な労力と費用の無駄となっている。これらの無駄を最小限に留めるために、米国Food and Drug Administrationは前臨床試験において、ヒトの肝細胞を用いたin

vitro試験を推称している。しかし、in vitroの試験では限界がある。そこで、ヒト肝細胞を持つマウスが存在すれば、ヒトの薬物動態や肝毒性などをin vivoで予測するための強力なツールとなるのではないかと考えられる。

また、ヒト肝炎ウイルスであるHBVやHCVはヒトあるいはチンパンジーの体内の肝細胞にしか感染しない。このため、これらのウイルスの感染メカニズムの解明や抗ウイルス剤の開発の進展は遅い。HBVやHCVに感染するヒト肝細胞を持つキメラマウスは、抗ウイルス剤のスクリーニングにも有効であると考えられる。

ヒト肝細胞を持つ

キメラマウスの作製

これまで、いくつかの研究施設により異種動物の肝細胞を持つキメラマウスの開発が試みられてきた。ヒト肝細胞を移植した場合、宿主動物の免疫反応により排除されず、移植した肝細胞がホストの肝臓の中で増殖できる環境が必要である。このため、免疫不全の性質を持つnudeマウス、SCIDマウスあるいはRag2ノックアウトマウスが利用されている。また、肝細胞に増殖刺激を与える必要性から、肝障害の性質を持つuPAト

ランスジェニックマウス¹⁾が利用されている。uPAトランスジェニックマウスは、アルブミンエンハンサープロモーターにウロキナーゼプラスミノージェンアクチベーターを接続した遺伝子が導入されたもので、肝臓特異的にuPAが作られ分泌される¹⁾。uPAが肝細胞に大量に発現しているため、このマウスの肝細胞には小さな脂肪滴が多数存在し、肉眼的には白い肝臓が観察される。RhimらはこのuPAトランスジェニックマウスとnudeマウスを掛け合わせ、uPA/nudeマウスを作製し、ラット肝細胞を移植した。その結果、ラット肝細胞で100%置換されたキメラマウスを作出することができた²⁾。DandriらがuPA/Rag2ノックアウトマウスにウッドチャックの肝細胞を移植したところ、30~60%置換された³⁾。さらに、DandriらやMercelらが、ヒト肝細胞をそれぞれuPA/Rag2ノックアウトマウスおよびuPA/SCIDマウスに移植したところ、その置換率は最高で約15%および約50%であった⁴⁾。

私達は、マウス肝臓のほとんどがヒト肝細胞で置換されたマウスを作製するために、広島大学・自然科学研究支援開発センター・動物実験施設と共同で、uPAトランスジェニックマウスとSCIDマウ

スを掛け合わせ、uPA/SCIDマウスを作製した。これら二種類の遺伝子をホモ接合体として持つマウスは、免疫不全と肝障害を同時に持つため体重増加の抑制が見られるが、多くのマウスは生存することができる。生後約20日で体重約5gのuPA/SCIDマウスに麻酔をかけ、左脇腹を約5mm切開し、脾臓から50万個から100万個のヒト肝細胞を注射器を用いて移植した。脾臓に移植した多くの肝細胞は脾静脈を介して肝臓に流れる。移植に用いた肝細胞は、大腸癌の肝臓転移などで肝臓を部分切除した患者の切除肝から、あるいは米国から輸入した凍結保存ヒト肝細胞を融解して用いた。患者から正常肝細胞を分離する際は、倫理委員会で承認を受け患者からインフォームドコンセントを得た上で実施した⁶⁾。

私たちは、12歳男児の肝細胞を4匹のuPA/SCIDマウスに移植した。ヒト肝細胞のマウスへの生着・増殖の程度を知るために、マウスの尾から2 μ mlの血液を継時的に採取し、マウス血中のヒトアルブミン濃度をモニタリングした。4匹とも、マウス血中のヒトアルブミン濃度は対数的に増加し、移植後約50日以降はプラトーに達した(図1)。4匹中2匹の