

uPA/SCIDマウスにヒト肝細胞を移植し、マウス血中のヒトアルブミン濃度を測定した。フサンを投与していないマウス(—)のうち、ヒトアルブミン濃度が3 mg/ml(---)を越えたマウスは、死亡または瀕死状態となった。フサンを投与したマウス(—)はヒトアルブミン濃度が3 mg/mlを越えても生存することができ、ヒトアルブミン濃度が10 mg/mlを越えるマウスも見られた。

図1 マウス血中ヒトアルブミン濃度

マウス血中ヒトアルブミン濃度は、2 mg/ml以下でありマウスは80日以降屠殺するまで生存した。一方、残りの2匹はヒトアルブミン濃度が3 mg/ml以上を越えると、体重が減少し、死亡または瀕死状態となり屠殺・解剖した。

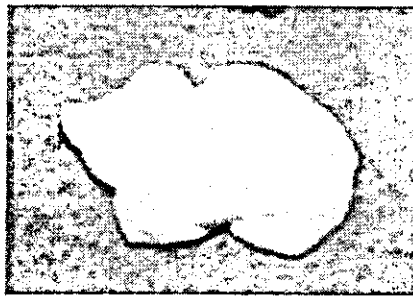
動物は、リンパ球や抗体、NK細胞などの異物に対する反応以外に、補体系により異物を排除する能力を持っている。補体系は本人や同種の細胞には働かないしくみを持っている。主な補体因子は肝臓で作られるため、uPA/SCIDマウスの血中においても、ヒトアルブミンの増加とともに、ヒト補体

因子の濃度の上昇が観察された。実際にヒトアルブミン濃度が3 mg/ml以上で瀕死状態となったマウスの腎臓を調べると、糸球体や尿細管にヒト補体因子や、細胞障害性のある補体系の最終産物であるヒト膜攻撃複合体(MAC)の沈着が観察された。したがって、移植したヒト肝細胞が産生した補体因子が、マウスの腎臓で活性化され、腎障害などによりマウスが死にいたったのではないかと考えた⁶⁾。

通常補体抑制剤として使用されるフサン(nafamostat mesilate, 鳥居製薬から供与)をキメラマウスに投与した。その結果、フサン

の投与により、ヒトアルブミン濃度が3 mg/ml以上のマウスの体重減少は抑えられ、また、長期間生存させることが可能となった。この薬剤の投与により、マウス血中ヒトアルブミン濃度は増加し、高いもので10 mg/mlを超えるものも観察された(図1)。移植後約70~80日のマウスを解剖し、肝臓を肉眼的に観察すると、マウス血中のヒトアルブミンがほとんど検出されなかったマウスの肝臓は白い色を呈していた(図2a)。マウス血中のヒトアルブミン濃度が高いマウスの肝臓ほど赤い領域が増加し、ヒトアルブミン濃度が5 mg/ml以上のマウスでは、肝臓の大部分が赤い色を呈していた(図2b)。

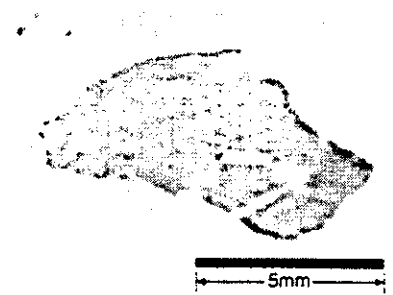
キメラマウスの肝臓の凍結切片を作製し、ヒト肝細胞特異的な抗体、ヒトサイトケラチン8/18抗体により免疫染色を行うと、マウスの肝臓の中に存在するヒト肝細胞のみを染め分けることができる(図2c)。マウスの肝臓切片面積あたりのヒトサイトケラチン8/18抗体陽性面積の割合を、ヒト肝細胞による置換率として表した。その結果、ヒトアルブミン濃度と置換率には正の相関が認められ、1 mg/mlのマウスで約20%、2 mg/mlで約30%、3 mg/mlで約



(a) マウス血中ヒトアルブミン濃度が 0 mg/ml 置換率0%のマウスの肝臓。肝臓のほとんどが障害肝で白い色をしている。



(b) マウス血中ヒトアルブミン濃度が 7.7 mg/ml、置換率89%のマウスの肝臓。障害を持つマウスの肝臓はヒトの肝細胞でほとんど置換されており、肝臓は赤い。



(c) マウス血中ヒトアルブミン濃度が 6.6 mg/ml、置換率84%のマウスの肝臓の凍結切片をヒト特異的サイトケラチン8/18抗体で染色したときの顕微鏡像。染色された領域がヒト肝細胞により置換された部分である。バーは5mm。

図2 ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓およびヒト肝細胞特異抗体を用いた免疫染色

50%、4 mg/mlで約60%、5 mg/ml以上で約70%以上の置換率であった。また、別のドナー肝細胞を用いた場合も同様な結果が得られた⁶⁾。

もともとuPA/SCIDマウスは肝障害を持っているため、血清中のGPTが高く、総アルブミン量が低い。ヒト肝細胞の置換率が高くなるにつれて、GPTは低下し、総アルブミン量は増加する傾向にあった。したがって、ヒト肝細胞に置換されることにより、肝障害が改善されたと考えられる⁶⁾。

このようにして作製されたヒト肝細胞キメラマウスが、最初に述べたように医薬品開発に利用できるかどうか調べるために、キメラマウス肝臓におけるヒト薬物代謝酵素の発現量を調べた。ドナー肝臓とキメラマウス肝臓よりtotal

RNAを抽出し、ヒトCYP分子種のみ反応し、マウスCYP分子種には反応しないプライマーを用いて、real-time定量性RT-PCRを行った。total RNA 1 ng当たりのヒトCYP分子種のCYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6および3A4のmRNAのコピー数を求めた。その結果、キメラマウス肝臓におけるそれぞれのCYP分子種のコピー数は置換率と正の相関が認められた。置換率90%以上のキメラマウス肝臓では、ほぼドナーと同程度のコピー数が観察された。また、ハウスキーピング遺伝子の一つであるヒトGAPDHに特異的なプライマーを用いて同様にヒトGAPDH mRNAのコピー数を求め、それぞれの分子種のコピー数を割ることにより、キメラマウス肝臓の中のヒト肝細胞あたりのそ

れぞれの分子種の発現コピー数を求めることができる。このようにして求めたコピー数は、置換率の異なるキメラマウス間でもほぼ同程度であり、ドナー肝ともほぼ一致していた。したがって、キメラマウスの肝臓におけるヒト肝細胞は、ドナー肝臓におけるヒト薬物代謝酵素のmRNA発現量を維持していることがわかった。さらに、これらCYP分子種の蛋白発現および酵素活性も維持していることも確認した⁶⁾。

今後の展望

これらのヒト肝細胞キメラマウスに薬物を投与し、キメラマウスにおける薬物動態を調べたところ、ヒトでの動態に近いデータも得られている。また、キメラマウスのヒト肝細胞にはHBVやHCV

が感染し増幅できることも確認しており、このキメラマウスは、抗ウイルス剤を含む医薬品開発に貢献できる新しいツールとして期待できる。

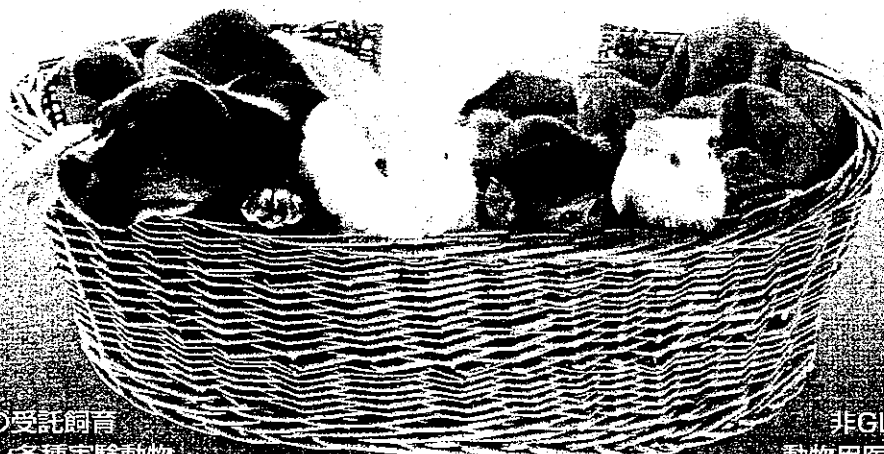
キメラマウス肝臓の中で、ヒト肝細胞は肝特異機能を失うことなく50日で100~200倍に増殖することができる。このようにして増殖させたヒト肝細胞の安全性と有効性が確かめられれば、将来、これらの肝細胞を肝細胞移植やハイブリッド型人工肝臓などの再生医療にも利用可能ではないかと考えている。

参考文献

- 1) Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL: Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 1991, 66:245-256
- 2) Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL: Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 4942-4946
- 3) Dandri M, Burda MR, Gocht A, Török E, Pollok JM, Rogler CE, Will H, Petersen J: Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. *Hepatology* 2001, 34:824-833
- 4) Dandri M, Burda MR, Török 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* 2001, 33:981-988
- 5) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JRT, Tyrrell DLJ, Kneteman NM: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001, 7:927-933
- 6) 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* 2004, 165:901-912

Experimental Animals

Covance R. P. Inc. 代理店: Japan Laboratory Animals, Inc.



取扱品目

各種実験動物の受託飼育
SPF・グリーン各種実験動物
輸入動物 (Covance・Harlan・Vanny) ・ビーグル犬・モンゲレル犬・サル類・遺伝子操作マウスetc.
その他実験動物 獣血液・血清・臓器 床敷 飼料 飼育器具・器材

非GLPの受託試験
動物用医薬品一般販売

株式会社 日本医科学動物資材研究所

〒179-0074 東京都練馬区春日町6丁目10番40号
TEL (03) 3990-3303 FAX (03) 3998-2243

第6章 ヒト組織代替法

第2説 個体レベルでのヒト化動物

第1項 ヒト肝細胞を導入したスキッドマウス

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 動物科学講座 発生生物学教室

1. はじめに

製薬や創薬の開発研究では、長い年月と巨額な費用をかけてラット、マウス、イヌ、及びサルなどの実験動物で薬効と安全性が検証されている。ところが、選択された医薬候補品の約半数が、ヒトと動物での薬物動態の種差が原因となり臨床試験の段階で開発中止となっている。もし、ヒト型の薬物動態を忠実に反映することができる動物モデルがあれば、このような問題は回避されるであろう。ヒトシトクローム P450 (CYP) 分子種を発現するトランスジェニックマウスも作製されている。しかし、マウスが本来持つシトクローム P450 の発現を抑えることができないため *in vivo* における実験結果の解釈は難しい。もし、マウス肝臓をヒト肝細胞ですべて置換することができれば、このマウスを用いて、医薬候補品のヒトにおける薬物動態や肝毒性を予測することができると考えられる。これまで、いくつかの研究グループが、マウス肝臓をヒト肝細胞で置換させる試みを行い、15-50% 置換できることを示した。私たちは最近、マウス肝臓の70%以上をヒト肝細胞で置換させることに成功した。この項では、他の研究グループの取り組みを紹介するとともに、私達の開発した高置換キメラマウスの作製方法及びヒト肝細胞キメラマウスの医薬品開発への利用の可能性について述べる。

2. キメラマウスを作製するための肝障害を持つ実験動物

ホストとなるマウス肝臓を移植したドナー肝細胞で置換させるためには、条件の整った肝障害モデルマウスが必要となる。まず、その肝障害がホストマウスにとって致死的ではないことが必要である。2つ目は、肝障害となる原因が移植したドナー肝細胞に障害を与えないこと、3つ目は、ホスト肝臓が移植した肝細胞にとって生着・増殖できる環境であることが挙げられる。理想的には、ホストの肝細胞の増殖が阻止され、ドナー肝細胞の増殖と同じようなスピードでホスト肝細胞が死んでいくことが望ましい。このような肝障害を持つマウスとしては、アルブミンエンハンサープロモーターウロキナーゼプラスミノージェンアクチベータートランスジェニックマウス (uPA マウス)及びチロシン血漿マウスが知られている。

uPA マウスは、Sandgren らにより uPA の生体内での機能を知ることがを目的として、uPA を肝細胞で大量に産生し分泌するマウスとして作出された (表1)¹⁾。uPA マウスは肝臓が白いマウスとして生まれる。白い肝臓をヘマトキシリン・エオシン (H&E) で染色すると、好塩基性に染色され、小型で萎縮した細胞が認められる。電子顕微鏡で観察すると、肝細胞の中に小さな脂肪滴が多数観察される。このことは、uPA に細胞毒性があることを示している。このマウスの uPA 導入遺伝子は約5つ連続でつながっている¹⁾。細胞分裂の際に導入遺伝子の欠失が生じ、肝細胞が正常な増殖能を回復することによりコロニーが形成され (図1)、ヘミ接合体では生後約8週で遺伝子が欠失したマウス肝細胞で完全に置

換される。したがって、ヘミ接合体では生後約 8 週目以降では正常な血液生化学値を示し、繁殖も可能となる。ホモ接合体の肝細胞では、2つの導入遺伝子を持つため遺伝子の欠失の頻度がヘミ接合体に比べて明らかに低い (図 1)。ホモ接合体マウスでは 1.4×10^4 回に 1 回の細胞分裂の頻度で、uPA 遺伝子の欠失が生じることが知られている¹⁾。

Rhim らはメタロチオネイン (MT) のプロモーターにβ-ガラクトシダーゼ遺伝子が接続された遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスの肝細胞を分離し、 $7.5-17.0 \times 10^5$ 個の肝細胞を uPA ヘミマウスに脾臓から移植し、4-5 週でカドミウムを投与後解剖した (表 1)²⁾。肝臓を X-gal 染色することにより、ドナー細胞を青い細胞として識別することができる。移植した細胞の 3-17%の細胞がマウス肝臓に生着した。移植された正常マウス肝細胞は脾静脈を介してマウス肝臓に生着しコロニーを形成し、最高でマウス肝臓の 80%がドナー肝細胞で置換された。1つのコロニーを 1 個の細胞から形成されたと仮定すると、4-5 週の間で最低で 12 回分裂したと計算された²⁾。

Overturf らは、チロシン血症モデルマウスである fumarylacetoacetate hydrolase (FAH)欠損マウスを用いた (表 1)³⁾。このマウスは FAH を産生できないため、2(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3 cyclohexane dione (NTBC)を飲水で投与し続けることにより肝障害は抑えられ生存することができる。生後 6 週目の FAH 欠損マウスへの NTBC の投与を中止し、β-ガラクトシダーゼ遺伝子が導入されたトランスジェニックマウス (ROSA-26) から肝細胞を分離し脾臓経由で移植した。移植した肝細胞は宿主肝臓に生着し増殖した。このマウスの肝臓から肝細胞を分離し、NTBC の投与を中止した別のチロシン血症マウスに移植した。この操作を繰り返すことにより、ROSA-26 のマウス肝細胞をチロシン血症マウスの肝臓から肝臓へ継代を行った。その結果、マウス肝細胞の増殖は衰えることなく、最低で 69 回分裂したと計算された³⁾。

3. 異種動物肝細胞を持つキメラマウスの作製

Rhim らは、uPA マウスと nude マウスを掛け合わせ、uPA/nude マウスを作製した (表 1)⁴⁾。nude マウスは胸腺がないため T 細胞を持たない。uPA (+/+) /nude マウスにラット肝細胞を移植したところ、ラット肝細胞は uPA (+/+) /nude マウス肝臓に生着し、移植後 8 週目には、マウス肝臓のすべてがラット肝細胞で置換されるマウスも見られた。このキメラマウスの肝臓の構造はきわめて正常で、領域性を示していた。すなわち、正常な肝臓組織は小葉構造の中心静脈周辺の肝細胞がα₂u-globulin を発現している。抗α₂u-globulin 抗体でキメラマウス肝臓切片を免疫染色すると、正常な肝臓と同じく中心静脈周辺の肝細胞のみが染色された⁴⁾。このキメラマウスはラット肝細胞とマウス非実質細胞で構成されているが、血流、マウス非実質細胞及び細胞外マトリックスとラット肝細胞の相互作用によりマウスの小葉における領域性を獲得したものと思われた。

Petersen らは、uPA マウスと recombination activation gene-2 (RAG-2)ノックアウトマウスを掛け合わせ、uPA/RAG-2 マウスを作製した (表 1)⁵⁾。RAG-2 ノックアウトマウスは V (D) J recombinase 活性を欠損しているため機能的な T 細胞と B 細胞を持たない。uPA (+/-) /RAG-2 マウスにウッドチャックの肝細胞を移植した。ウッドチャックの WHV は、HBV と非常に近いことが知られている。5-10 x 10⁵ 個のウッドチャックの肝細胞を uPA (+/-) /RAG-2 マウスに移植し、3 か月後に血清および肝臓を解析した。マウス血清の SDS/PAGE

のゲルを Coomassie blue により染色することにより、マウスアルブミンとウッドチャックアルブミンを泳動の移動度の違いにより検出し、ウッドチャック肝細胞がマウスに生着しているのを確認した。ウッドチャック肝細胞を移植した uPA (+/-)/RAG-2 マウス肝臓からゲノム DNA を抽出し、ウッドチャックのゲノム DNA を用いて Southern blotting により置換率を求めたところ、30-95%であった。WHV に感染しているウッドチャック肝細胞を移植した uPA (+/-)/RAG-2 マウス血清および肝臓には、WHV ウィルスゲノムおよび Whc 蛋白が検出された。また、WHV に感染していないウッドチャック肝細胞を uPA (+/-)/RAG-2 マウスに移植し、 1×10^7 コピーの WHV を含む血清を筋注したところ、4 ヶ月後には WHV DNA が肝臓に検出され、10 ヶ月にわたり血清中に WHV DNA が検出された。さらに、彼らは、WHV に感染しているキメラマウスにインターフェロン α を投与することにより、マウス血清中の WHV コピー数を減少させ、dexamethasone を投与することにより増加させることを示した⁵⁾。

Petersen らは、さらに、uPA (+/-)/RAG-2 マウスにヒト肝細胞を移植した (表 1)⁶⁾。肝臓移植に使われなかった脳死患者の肝臓から分離したヒト肝細胞と、肝腫瘍切除組織の腫瘍周辺組織から採取した肝細胞を分離後速やかに uPA (+/-)/RAG-2 マウスにそれぞれ移植し、マウス肝臓への生着をマウス血清中のヒトアルブミン濃度で調べた。その結果、脳死患者ドナーからの肝細胞は 10 例中 7 例のマウスに検出された。一方、切除肝から分離した肝細胞は 26 例中 1 例も検出されなかった。このことは、切除肝臓は灌流までに 90 分から 4 時間の温阻血時間が存在し、肝細胞の生存率も 40-80%と低かったことが原因と考えられた。マウス血清中のヒトアルブミン濃度を、マウスモノクローナル抗体による Western blotting の結果から求めた。スタンダードとして、マウス血清とヒト血清をさまざまな割合で混合した血清を用いた。その結果、最高でマウス血清に 15%ヒト血清を混合した時に相当するヒトアルブミンが検出された。また、肝臓サンプルからゲノム DNA を抽出し、ヒトゲノム DNA をヒト特異的な Alu 配列に対する PCR と dot blot hybridization により検出した。彼らは、このマウスに 5×10^6 コピーの HBV を含むヒト血清を投与した。その結果、HBV はマウスに感染し、マウス血清 DNA 中に HBV が検出された。また、ヒト血清を 2 種類の HBs 抗原に対する抗体により Western blotting を行った結果、それぞれの抗原のグリコシル化しているバンドとしていないバンドが検出された。したがって、キメラマウス血中には、高ウィルス血症のヒト血清中に見られるのと同様に、ウィルス粒子とその中間体が存在するものと思われる。キメラマウス肝臓を、HBc 抗原に対する抗血清を用いて免疫染色を行った。HBc 抗原は核に存在しているが知られている。HBV に感染したキメラマウスの肝細胞のうち、最高で 15%の肝細胞が HBc 抗原陽性であった。以上の結果は、彼らの作製したキメラマウスは最高でマウス肝細胞の 15%がヒト肝細胞で置換され、このヒト肝細胞は HBV に感染しうることを示している⁶⁾。

Mercer らは uPA マウスと SCID-bg マウスを掛け合わせ、uPA/SCID マウスを作製した (表 1)⁷⁾。SCID マウスは DNA-dependent protein kinase gene に点突然変異があり、immunoglobulin と T 細胞レセプターの recombination が正常にできない。切除肝から分離したヒト肝細胞を凍結保存したものを融解して、uPA (+/-)/SCID マウスまたは uPA (+/+)/SCID マウスに 10^6 個のヒト肝細胞を脾臓から移植した。マウス血清中のヒトアルブミン濃度を抗ヒトアルブミン抗体での dot blotting により求めたところ、uPA (+/+)/SCID マウスでは移植後 7 週ま

でマウス血清中のヒトアルブミン濃度は増加し、最高で約2 µg/mlに達しその後一定の値を示した。一方、uPA (+/-)/SCID マウスでは、マウス血清中ヒトアルブミン濃度はuPA (+/+)/SCID マウスよりも低く、5-6 週目頃より低下しはじめた。このことは、この時期より uPA 遺伝子の欠失により生じたマウス肝細胞コロニーが増殖してくるためと考えられた。抗ヒト肝細胞に対する抗体により、キメラマウス肝臓切片を染色したところ、マウス肝臓の50%以上が陽性であるものも観察された。彼らは、ヒト肝細胞を持つuPA (+/+)/SCID マウスに約 7.4×10^5 コピーの HCV を腹腔内に投与した。その結果、投与後3週目には 10^3 - 10^6 コピーの HCV が検出された。キメラマウス肝臓中に negative-strand viral RNA を血清投与後2-5 週目に検出されたことから、肝臓における HCV の複製が証明された。HCV が感染したマウス血清を別のキメラマウスへ接種し、さらにこれを繰り返した。その結果、いずれのマウス血清にも HCV が検出され、マウスからマウスの HCV の継代は成功した⁷⁾。

4. ヒト肝細胞の分離

私たちは、主に大腸癌などの転移性肝癌の部分肝切除を行う患者から、切除肝に含まれる正常部位の研究利用に対するインフォームドコンセントをいただき、広島県産業科学技術研究所倫理委員会の承認のもと研究を実施している。切除肝から正常部位を切り出し、UW 液で灌流し脱血した。4°Cの UW 液に浸してヒト細胞専用のクリーンルームまで運搬した。クローンベンチ内でEGTAを含むHanks液で約20分間灌流し、0.05%コラゲナーゼで組織がやわらかくなるまで灌流した。その後、肝組織の被膜をとり細胞をほぐした。細胞分散液を50g、2分で遠心分離し、その沈澱を肝実質細胞とした。これらの細胞を保存する場合は、プログラムフリーザーを用いて凍結し、液体窒素に保存した(図2)⁸⁾。

5. 高置換ヒト肝細胞を持つキメラマウスの作製

これまでに述べてきたヒト肝細胞キメラマウスの報告では、ヒト肝細胞置換率は最高で50%であった。私たちは、ドナーがヒト肝細胞であっても工夫すれば完全にマウス肝細胞を置換できるのでないかと考えた。uPA マウスと SCID マウスを掛け合わせ、uPA/SCID マウスを作製した(表1)⁸⁾。生後20-30日目のuPA (+/-)/SCID マウスまたはuPA (+/+)/SCID マウスに3才から72才のドナー由来の分離直後または凍結融解した $5-10 \times 10^5$ 個のヒト肝細胞を脾臓経由で移植した。移植3週目にマウスの肝臓の切片を作製し、ヒト特異的サイトケラチン(hCK)8/18抗体で免疫染色を行った。その結果、ドナーによって、コロニーの数や大は異なるものの、分離直後または凍結融解したヒト肝細胞共、hCK8/18陽性コロニーが観察された⁸⁾。

ヒト肝細胞のuPA/SCID マウス肝臓への生着と増殖を継時的に推定するために、尾から2 µl採血し、マウス血中のヒトアルブミン濃度をヒト特異的なアルブミン抗体を用いてELISAにより定量した。このELISAはマウス血中に存在するヒトアルブミン濃度を約1 µg/ml以上から測定可能であった。uPA (+/+)/SCID マウスまたはuPA (+/-)/SCID マウスに年齢の異なるドナー肝細胞を移植した。通常、移植後約2週目よりマウス血中にヒトアルブミンが検出された。その後、uPA (+/+)/SCID マウスでは移植後7週目頃までヒトアルブミン濃度は対数的に増加し、その後一定の値を示した。一方、uPA (+/-)/SCID マウスに移植した場合は、4週目頃からヒトアルブミン濃度が低下した。ドナーの年齢が低い方が、

マウス血中のヒトアルブミン濃度の上昇スピードが早く、1 mg/ml 以上の高いヒトアルブミン濃度まで達する傾向にあった。ドナー年齢が高いと、ヒトアルブミン濃度の上昇スピードが遅く、最高で 1 mg/ml 程度でプラトーに達した⁸⁾。

そこで、私たちは年齢が低い 12 才のドナーを選択し、uPA (+/+) /SCID マウス 4 匹に 5×10^5 個のヒト肝細胞を移植した。その結果、ヒト肝細胞は 4 匹のマウス肝臓いずれにも生着し、マウス血中のヒトアルブミン濃度が上昇した。2 匹のヒトアルブミン濃度は 3 mg/ml には達せず、移植後 80 日以降解剖するまで生存した。残りの 2 匹のうち 1 匹はヒトアルブミン濃度が 3 mg/ml を超えたが体重が急激に減少し死亡した。残りの 1 匹も同じくヒトアルブミン濃度が 3 mg/ml を超え、その後、体重減少が続き、移植後 63 日目に瀕死状態になったので解剖した。このマウスのヒト肝細胞による置換率は約 50% で肝臓には病変が認められず、腎臓と膵臓に壊死が見られた⁸⁾。これらの観察結果から、私達は、マウス肝臓の中で増殖したヒト肝細胞が産生する物質がホストマウスを攻撃しているのではないかと考えた。

補体は細菌や移植された異種細胞などを認識し、活性化され最終的に膜攻撃性複合体 (MAC) となって細菌や細胞に穴を開ける。この作用には抗体を介したものと介さないものがあるが、私たちが用いているのは SCID マウスであるため、抗体を介した反応は考えにくい。しかし、SCID マウスは Leaky 現象といって、加齢と共に抗体がわずかであるが産生することが知られているため、抗体を介した反応の可能性も考える必要があると思われる。私達は、肝細胞は主な補体因子を産生するため、ヒト肝細胞がヒト補体を産生し、マウス本体に悪影響を及ぼしたのではないかと考えた。そこで、マウス血中のヒト活性型 C3a を測定したところ、ヒトアルブミン濃度の上昇と共に増加した。瀕死マウスの腎臓をヒト C3 とヒト MAC 抗体で免疫染色したところ、糸球体と尿細管に陽性反応が見られた⁸⁾。

そこで、ヒトアルブミン濃度が 3 mg/ml 以上のキメラマウスを作製するためには、ヒト補体の活性化を抑制する必要があると考えた。一般に補体抑制物質としては、コブラ毒が知られているが、最近ではワシントン条約のため入手ができない。私達は、補体抑制効果が高い医薬品として知られている nafamostat mesilate (フサン、鳥居薬品より供与) を投与することにした。まず、uPA (-/-) /SCID マウスの腹腔内に体重 1 g 当たりヒト血清 30 μ l を投与し、9 時間後の血清を採取すると、著しく溶血しており、GPT も上昇していた。また、この時の血清中のヒト C3a 濃度は、キメラマウスの血清中の濃度と近かった。ヒト血清投与 2 時間前にフサンを投与すると、溶血の程度および GPT の上昇は抑えられた⁸⁾。これらの結果から、フサンはキメラマウスに期待通りの効果を示すことができるものと考えられる。

uPA (+/+) /SCID マウスにヒト肝細胞を移植し、マウス血中のヒトアルブミン濃度とマウス体重の変化を調べた。マウス血中のヒトアルブミン濃度が 2 mg/ml を超えるとマウスの体重が減少し始めた。150 μ g/ml のフサンを 200 μ l キメラマウスに 2 日に 1 回投与した。その結果、マウスの体重は増え始め、ヒトアルブミンも上昇した。ヒトアルブミン濃度がさらに増加するとマウス体重は再び減少し始めた。そこで、フサン投与を 1 日 1 回に増やした。その結果、マウスの体重は再び増え始め、ヒトアルブミン濃度も増加した。ヒトアルブミン濃度がさらに増加するとマウス体重が再び減少し始めたため、フサン投与を 1 日

2回とした。その結果、マウスの体重は回復し屠殺するまで生存した(図3)。これらの結果から、マウス血中のヒトアルブミン濃度が2-4 mg/mlのマウスにはフサン投与を1回/2日、4-6 mg/mlのマウスには1回/1日、6 mg/ml以上のマウスには2回/1日とした。このようなスケジュールでフサンをキメラマウスに投与することにより、マウス血中のヒトアルブミン濃度が3 mg/mlを超えてもマウスは生存し、ヒトアルブミン濃度は最高で13 mg/ml以上になった(図4)⁸⁾。

マウス肝臓の各葉の凍結切片を作製し、CK8/18抗体で免疫染色またはヒトcDNAプローブを用いて*in situ* hybridizationを実施し、マウス肝臓の占める面積あたりの陽性面積の割合を求め、ヒト肝細胞による置換率とした(図5)。屠殺時のヒトアルブミン濃度と置換率は正の相関が認められたことから、マウス血中のヒトアルブミン濃度からおおよその置換率を予想することが可能である⁸⁾。

上記方法によって、これまで、日本人の12才のドナー及び米国から購入した9ヶ月と13才のドナーの凍結肝細胞を用いて、置換率70%以上のキメラマウスの作出に成功している。最高で置換率96%のキメラマウスの作製も可能となった⁸⁾。

6. ヒト肝細胞キメラマウスの性質

マウス血中にヒトアルブミンが検出されず、0%の置換率であったマウスの肝臓はほとんどが白色であるが、uPA遺伝子の欠失によるコロニーが少し観察された。マウス血中のヒトアルブミンが検出されたマウスでは、ヒト肝細胞によるコロニーが観察された。uPA遺伝子の欠失によるコロニーは鮮やかな赤色をしているが、ヒト肝細胞由来のコロニーはそれに比べるとやや薄い赤色をしているため肉眼的にも識別できる。置換率70%以上のキメラマウスの肝臓はほぼ肝臓全体が置換されておりやや薄い赤色を呈している(図6)⁸⁾。

高置換ヒト肝細胞キメラマウスは、ホストマウスの肝細胞が少ないため、ヒト肝細胞が本来持っているヒト型の薬物代謝酵素を発現していれば、医薬品開発のための薬物動態試験などに利用可能と考えられる。そこで、キメラマウスの肝臓におけるCYPのmRNAの発現を調べた。キメラマウス肝臓から総RNAを抽出し、1 ng 総RNAからcDNAに逆転写し、このcDNAをテンプレートとしてヒトCYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4に特異的なプライマーを用いて定量性real-time PCRを行った。その結果、それぞれの発現コピー数は、置換率が高いほど高い値を示した。それぞれのキメラマウス肝臓におけるハウスキーピング遺伝子であるヒトGAPDHのコピー数も求め、ヒトCYP1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4のコピー数を割ることにより、キメラマウス肝臓のヒト肝細胞における相対的なコピー数を求めた。その結果、相対的なコピー数はドナー肝臓におけるコピー数とほぼ一致していた(図7)。このことから、キメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞は、ドナー肝臓とほぼ同じレベルでCYP分子種の遺伝子を発現しているものと考えられる⁸⁾。

rifampicinはCYP3A4を、3-methylcolanthrene (3-MC)はCYP1A1および1A2の発現を誘導することが知られている。そこで、ヒト肝細胞キメラマウスにrifampicinまたは3-MCを4日間腹腔内投与した。その肝臓におけるCYPのmRNAの発現量を調べたところ、rifampicinを投与したマウスではCYP3A4が約6倍(図7)、3-MCを投与したマウスではCYP1A1が約10倍に、また、CYP1A2は約6倍に誘導されていた⁸⁾。これらのことから、このヒト肝細胞キメラマウスは、医薬品開発における薬物動態試験などに利用できると考え

ている。

7. 今後の課題

ヒト肝細胞キメラマウスは、カナダやドイツの研究者らが示したように、HBV と HCV を感染させることができ、HBV や HCV の感染のメカニズムの解明や、抗ウイルス剤の開発に利用可能と考えられる。私達が開発した高置換のキメラマウスにおいても、HBV や HCV の感染は可能であった。今後、これまで知られている抗ウイルス薬の効果について調べる予定である。

これまでの私達の経験から、キメラマウスを作製できるドナー肝細胞は限られている。低年齢のドナーの方がマウス肝臓への生着や増殖が良いが、低年齢であってもマウスに生着しないドナー肝細胞も存在する。今後、マウスへのヒト肝細胞の生着および増殖のしやすさを決める因子を明らかにしたいと考えている。それが明らかになれば、さまざまな年齢の、また種々の病気を持つヒト肝細胞から構築されたマウス肝臓も作製できるのではないかと考えている。それが可能となれば、患者の肝細胞を持つキメラマウスを用いて、それぞれの患者にあった薬や医薬品や治療法の検討も行えるのではないかと期待している。

参考文献

- 1) Sandgren E.P., Palmiter R.D., Heckel J.L., Daugherty C.C., Brinster R.L., and Degen J.L.: Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell*, 66:245-256, 1991.
- 2) Rhim J.A., Sandgren E.P., Degen J.L., Palmiter R.D., and Brinster R.L.: Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science*, 263:1149-1152, 1994.
- 3) Overturf K., Al-Dhalimy M., Ou C.-N., Finegold M., and Grompe M.: Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.*, 151:1273-1280, 1997.
- 4) Rhim J.A., Sandgren E.P., Palmiter R.D., and Brinster R.L.: Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:4942-4946, 1995.
- 5) Petersen J., Dandri M., Gupta S., and Rogler C.E.: Liver repopulation with xenogeneic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepatitis B virus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:310-315, 1998.
- 6) Dandri M., Burda M.R., Török E., Pollok J.M., Iwanska A., Sommer G., Rogiers X., Rogler C.E., Gupta S., Will H., Greten H., and Petersen J.: Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology*, 33:981-988, 2001.
- 7) Mercer D.F., Schiller D.E., Elliott J.F., Douglas D.N., Hao C., Rinfret A., Addison W.R., Fischer K.P., Churchill T.A., Lakey J.R.T., Tyrrell D.L.J., and Kneteman N.M.: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.*, 7:927-933, 2001.
- 8) 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.: Near-completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am. J. Pathol.* 165:901-912, 2004.

表1 キメラマウス作製法

ホストマウス	ドナー肝細胞	移植時のマウス日齢	移植細胞数 (x10 ⁵ 個)	置換率 (%、最高で)	用途	文献
uPA (+/-)	MT-lacZマウス	9-18	7.5-17	80	-	Rhimら (1994) ²⁾
FAH (-/-)	ROSA-26マウス	42-48	0.01	95	-	Overturf (1997) ³⁾
uPA (+/+)/nude (+/+)	ラット	10, 15	1-2	100	-	Rhimら (1995) ⁴⁾
uPA (+/-)/RAG2 (-/-)	ウッドチヤック	10-18	5-10	95	WBV感染	Petersenら (1998) ⁵⁾
uPA (+/-)/RAG2 (-/-)	ヒト	13-21	5	15	HBV感染	Dandriら (2001) ⁶⁾
uPA (+/+)/SCID (+/+)	ヒト	5-14	10	50	HCV感染	Mercerら (2001) ⁷⁾
uPA (+/+)/SCID (+/+)	ヒト	20-30	5-10	96	薬物動態	Tatenoら (2004) ⁸⁾

uPA (+/-) /SCID, 6 wks



uPA (+/+) /SCID, 6 wks

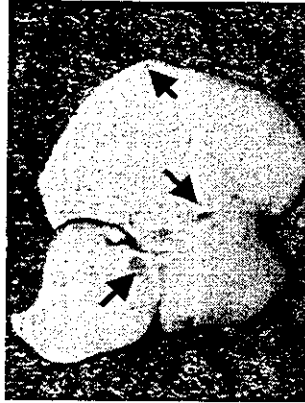


図1. uPA/SCIDマウスの肝臓

ヘミマウス (uPA +/- /SCID) 肝臓は生後6週で導入遺伝子の欠失により生じたマウス肝細胞コロニーが多数観察される。一方、ホモマウス (uPA +/+ /SCID) では、生後6週では小さなコロニーがわずかに観察されるのみである。矢印はマウス肝細胞コロニーを示す

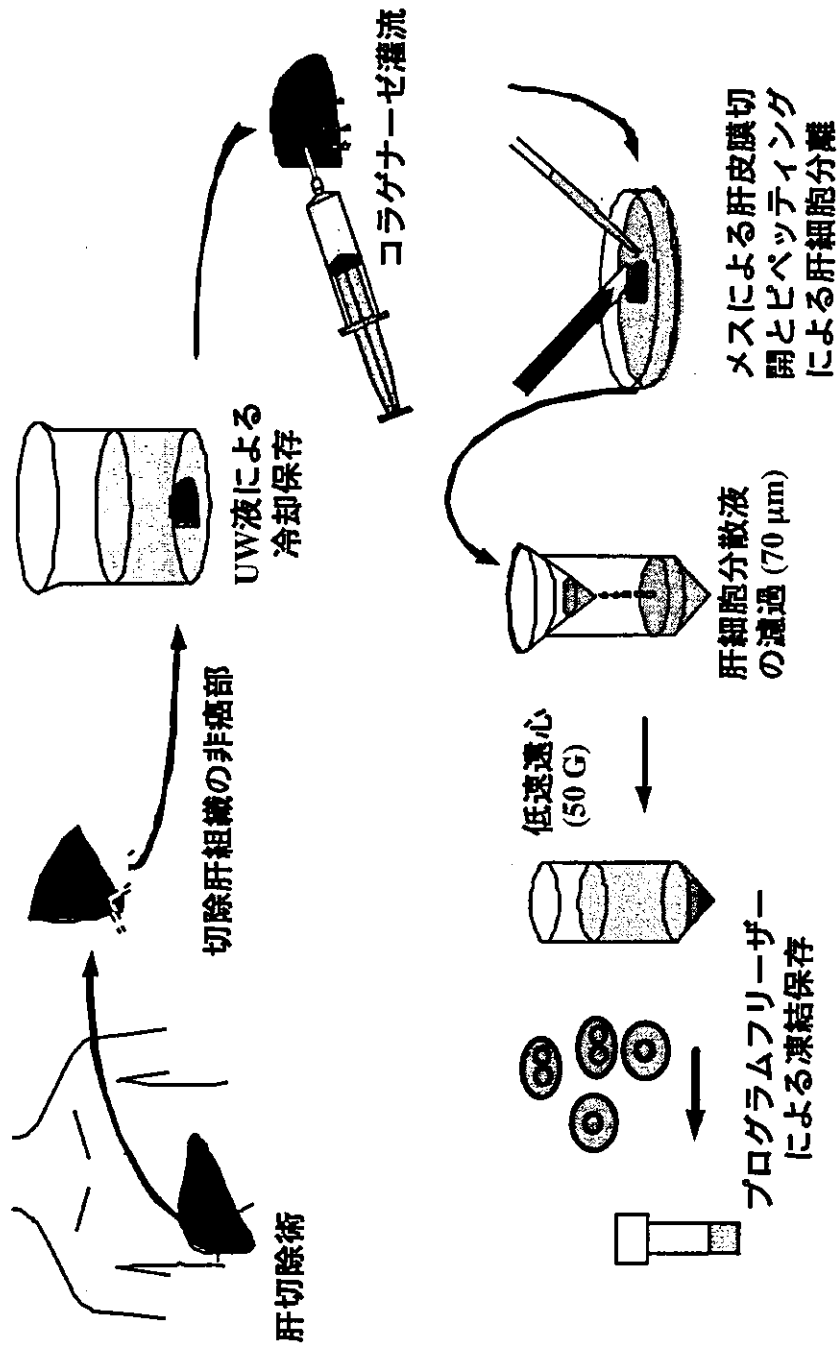
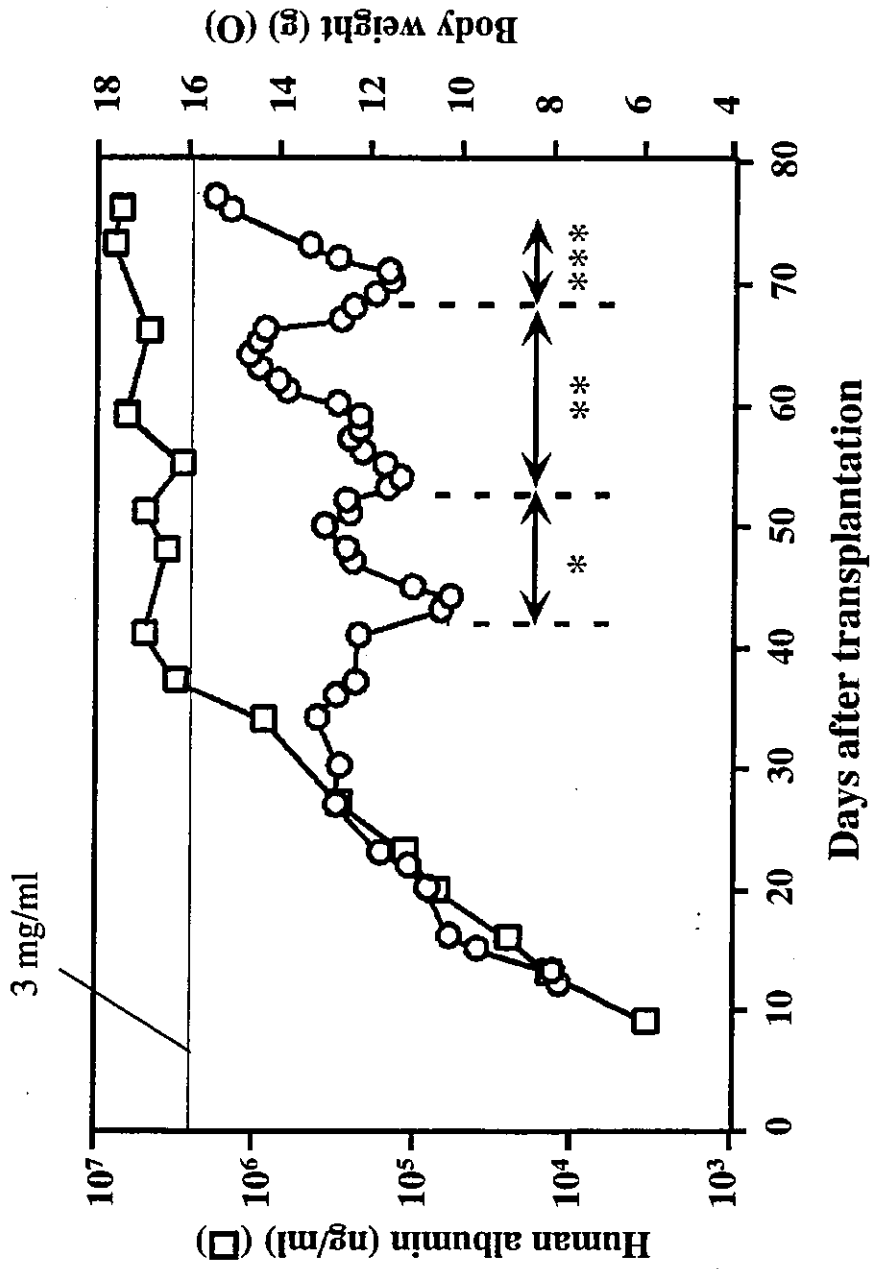


図2. ヒト肝細胞分離の流れ

転移性肝癌などの切除肝から正常部位を切り出し、UW液で脱血する。EGTAを含む緩衝液に続いてコラゲナーゼを含む緩衝液で灌流し、柔らかくなった細胞を分散させる。70 μm のフィルタで濾過後、低速遠心分離により沈澱を採取しプロテグラムフリーザーにより凍結し液体窒素下で保存する。



Futhan投与頻度：* 1回/2日、** 1回/1日、*** 2回/1日

図3. 補体抑制剤投与におけるキメラマウス血中ヒトアルブミン濃度とマウス体重の変化

生後3週の本マウスに 5×10^5 個のヒト肝細胞(12才、男児)を移植し、マウス血中ヒトアルブミン濃度と体重を経時的に測定した。その内の1例を示す。体重の減少が観察されたマウスにFuthanを腹腔内投与し、ヒトアルブミン濃度と体重の経過観察を行った。体重の減少が再び観察された場合、Futhan投与の頻度を増加した。このマウスの最終的ヒトアルブミン濃度は7.1 mg/mlで置換率は82%であった。

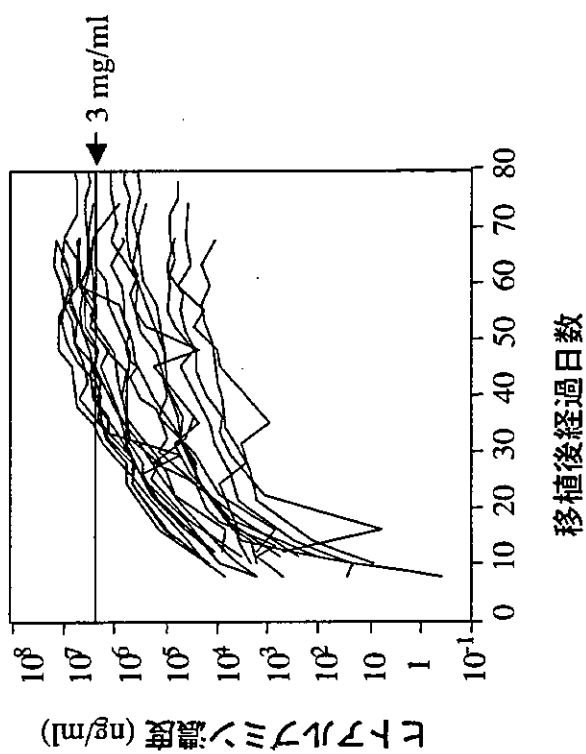


図4 キメラマウス血中のヒトアルブミン濃度の経時的変化
 生後3週の本モマウス22匹に $5-7.5 \times 10^5$ 個のヒト肝細胞(9ヶ月、男児)を移植し、マウス尾から2 μ lの血液を採取し、マウス血中ヒトアルブミン濃度を経時的に測定した。ヒトアルブミン濃度が2 mg/mlを越えた11匹のマウスにはFuthanを腹腔内投与し、最終的に8匹のマウスにおいてヒトアルブミン濃度が3 mg/mlを越えた。

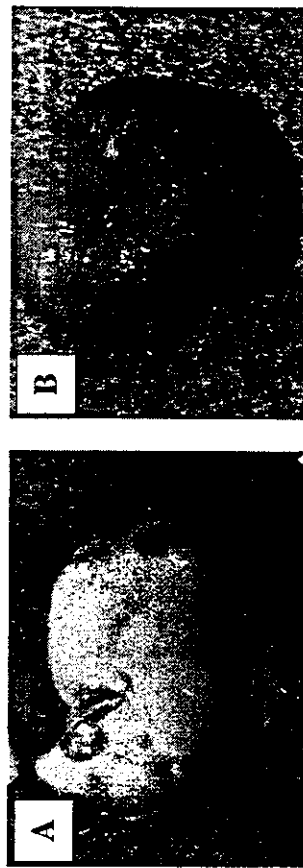


図5 キメラマウス肝臓
生後3週の本モマウスに $7.5-8 \times 10^5$ 個のヒト肝細胞 (9ヶ月、男児) を移植し、移植後71日目 (A) と86日目 (B) に解剖した。ヒトアルブミン濃度が0 mg/mlのマウス (A) は置換率0%であった。ヒトアルブミン濃度が8.7 mg/mlのマウス (B) は置換率82%であった。

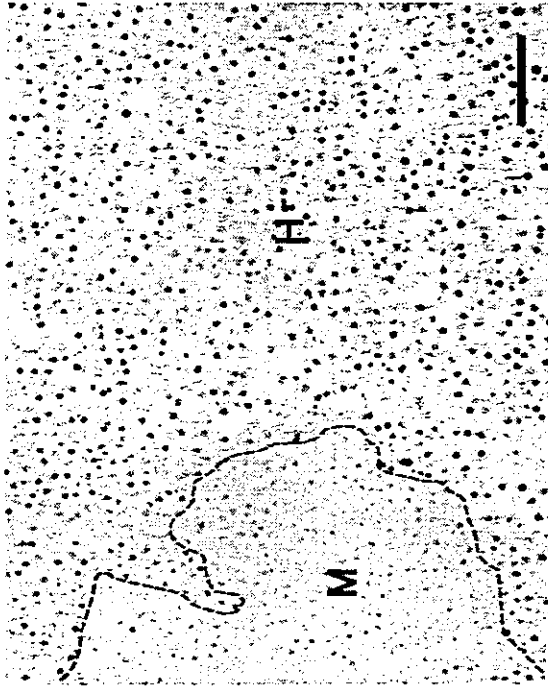


図6 ヒトcDNAを用いた*in situ* hybridizationによるキメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞の検出

生後3週の本モマウスに 4×10^5 個のヒト肝細胞(12才、男児)を移植し、移植後71日目に解剖した。肝臓の凍結切片をヒトcDNAを用いて*in situ* hybridizationを行った。核が濃染している細胞領域(H)がヒト肝細胞に置換された部位で、核が薄い部分がマウス肝細胞領域(M)である。バーは100 μm 。

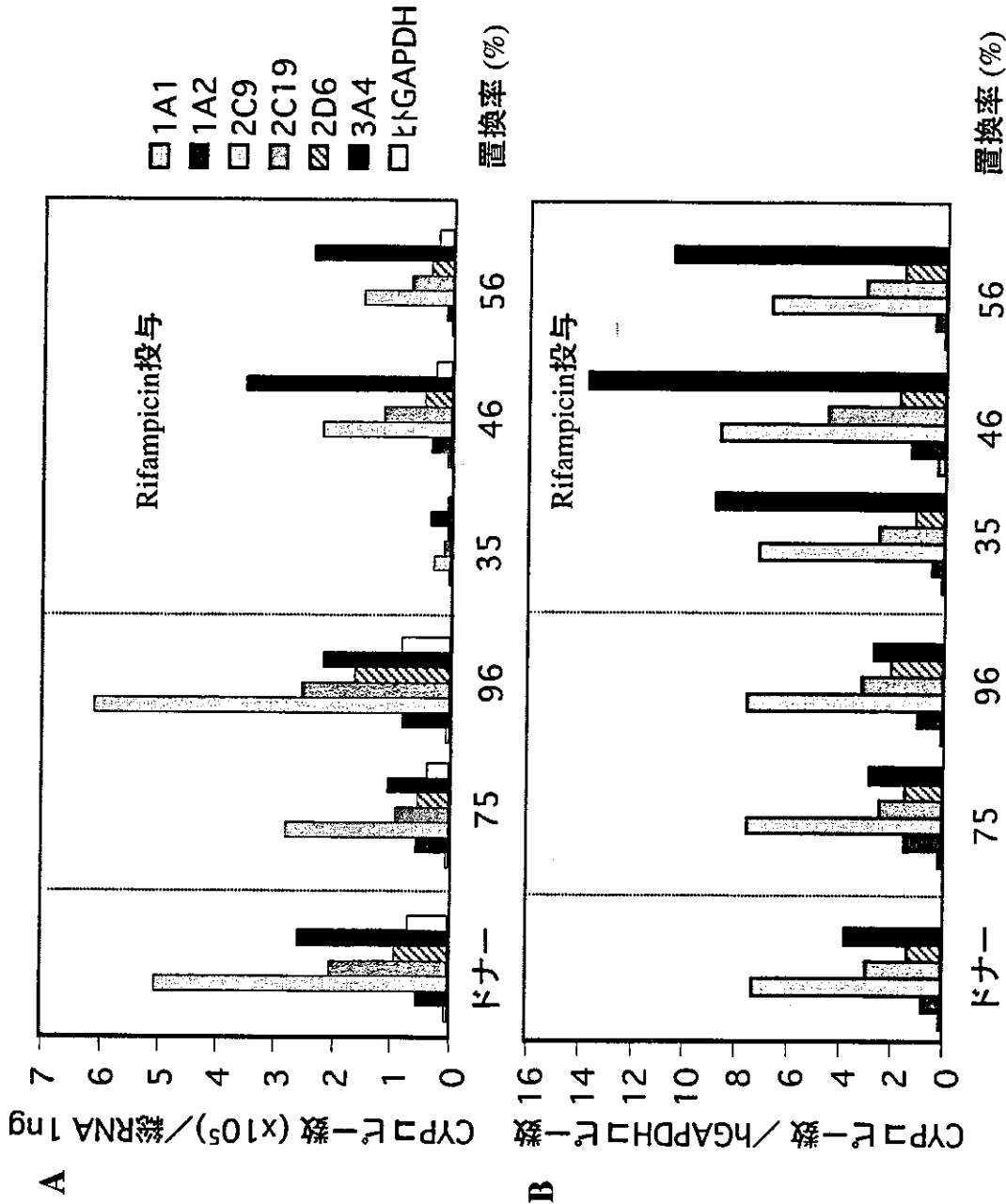


図7 キメラマウス肝臓におけるヒト特異的シトクロームP450mRNAの発現量
 生後3週ホモマウスに4-7.2x10⁵個のヒト肝細胞 (12才、男児) を移植し、移植後70-106日目に解剖した。(A)
 ドナーおよびキメラマウス肝臓から総RNAを抽出し、総RNA 1 ngにおけるヒトCYP分子種とヒトGAPDHの
 mRNAのコピー数をreal-time 定量性RT-PCRにより求めた。コピー数は置換率と相関があり、高置換のキメラ
 マウスのコピー数はドナーのコピー数と近かった。(B) CYP分子種のmRNAのコピー数をヒトGAPDHのmRNA
 のコピー数で割り補正したところ、ドナーとキメラマウス肝臓で同じ発現パターンを示した。Rifampicinを投
 与した (i.p., 50 mg/kg body weight/day, 4 days)キメラマウス肝臓ではCYP3A4のみ誘導された。

EXPRESSION OF HUMAN CYTOCHROMES P450 IN CHIMERIC MICE WITH HUMANIZED LIVER

Miki Katoh, Tomohito Matsui, Miki Nakajima, Chise Tateno, Miho Kataoka, Yoshinori Soeno, Toru Horie, Kazuhide Iwasaki, Katsutoshi Yoshizato, and Tsuyoshi Yokoi

Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa, Japan (M.Kato., T.M., M.N., T.Y.); Hiroshima Prefectural Institute of Industrial Science and Technology, Cooperative Link of Unique Science and Technology for Economy Revitalization, Hiroshima, Japan (C.T., M. Kata., K.Y.); PhenixBio Co., Ltd., Hiroshima, Japan (Y.S., T.H.); Pfizer Japan, Ltd., Aichi, Japan (K.I.); and Graduate School of Science, Hiroshima University, Hiroshima, Japan (K.Y.)

Received July 4, 2004; accepted September 14, 2004

ABSTRACT:

Recently, a chimeric mouse line in which the liver could be replaced by more than 80% with human hepatocytes was established in Japan. Because the chimeric mouse produces human albumin (hAlb), replacement by human hepatocytes could be estimated by the hAlb concentration in the blood of chimeric mice. In this study, we investigated human major cytochrome P450 (P450) in the livers of chimeric mice by mRNA, protein, and enzyme activity using real-time polymerase chain reaction, Western blot analysis, and high-performance liquid chromatography, respectively. Chimeric mice with humanized liver generated using hepatocytes from a Japanese and white donor were used. Human P450 mRNAs were expressed in the liver of chimeric mice, and major human P450 proteins such as CYP1A2, CYP2C9, and CYP3A4 were detected. The expression of P450 mRNA and protein was corre-

lated with the hAlb concentration in the blood. The enzyme activities such as diclofenac 4'-hydroxylase activity, dexamethasone 6-hydroxylase activity, and coumarin 7-hydroxylase activity, activities that are specific to human P450 but not to murine P450, were increased in a hAlb concentration-dependent manner. The chimeric mice with nearly 90% replacement by human hepatocytes demonstrated almost the same protein contents of human P450s and drug-metabolizing enzyme activity as those of the donor. It was confirmed that genomic DNA from the livers of the chimeric mice and that from the liver of the donor exhibited the same genotype. In conclusion, the chimeric mice exhibited a similarly efficient capacity of drug metabolism as humans, suggesting that they could be a useful animal model for drug development.

Recently, efforts have been made toward optimizing drug treatment by taking into account individual differences in drug metabolism, which are regarded as major determinants of the interindividual variability in pharmacokinetics, clinical efficacy, and toxicity of drugs (Lu, 1998). Cytochrome P450 (P450) plays a central role in drug metabolism in human liver. One of the isoforms, CYP3A4, is predominantly expressed in human liver and has been reported to be responsible for the metabolism of more than 50% of the clinical drugs (Pelkonen et al., 1998). In addition, several human P450s have been shown to be polymorphic due to single nucleotide polymorphisms, gene deletions, and gene duplications (Ingelman-Sundberg, 2002). These polymorphisms can also affect the pharmacokinetics, safety, and efficacy of the drugs. Detailed analyses of drug metabolism catalyzed by human P450s are very important in drug development.

Various approaches have been used to evaluate the metabolism of

drug candidates in humans at early preclinical stages. In vitro approaches using human liver microsomes (HLM), recombinant human P450 microsomes, human hepatocytes, and cDNA-expressing cells have been reported. These in vitro models have various advantages and limitations, as have been described previously (Gomez-Lechon et al., 2003; Rodrigues and Rushmore, 2003). Briefly, HLM are commercially available and can be stored for years with minimal or no loss of P450 enzyme activities, but it is impossible to use them for P450 induction studies. Although human hepatocytes retain all the drug-metabolizing enzymes, the enzyme activities are decreased during culture. These human-derived samples are limited in supply. In addition, although in vivo approaches using experimental animals are able to clarify the pharmacokinetics of drugs in the whole body, human and animal P450s are known to often be functionally distinct.

Several attempts have been made to develop bioartificial livers. Watanabe et al. (2003) established the immortalized human hepatic stellate scavenger cells that could be used as a bioartificial liver. Although this model was shown to express CYP3A4 and CYP2C9 proteins, the enzyme activities in these cells were not clarified. It was reported that the livers in urokinase-type plasminogen activator (uPA)/recombinant activation gene-2 mice could be repopulated with

This work was supported by a Research on Advanced Medical Technology, Health, and Labor Sciences Research grant from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://dmd.aspetjournals.org>.

doi:10.1124/dmd.104.001347.

ABBREVIATIONS: P450, cytochrome P450; HLM, human liver microsomes; uPA, urokinase-type plasminogen activator; SCID, severe combined immunodeficient; hAlb, human albumin; RI, replacement index; PCR, polymerase chain reaction; COH, coumarin 7-hydroxylase activity; HPLC, high-performance liquid chromatography; PTXOH, paclitaxel 6 α -hydroxylase activity; DICOH, diclofenac 4'-hydroxylase activity; MPOH, S-mephenytoin 4'-hydroxylase activity; DBOH, debrisoquine 4'-hydroxylase activity; DEXOH, dexamethasone 6-hydroxylase activity.

TABLE 1

Sequence of the primers used in the present study

Primer	Sequence
CYP1A1 S	5'-ATGACCAGAAGCTATGGGTC-3'
CYP1A1 AS	5'-GCACGCTGAATCCACCC-3'
CYP1A2 S	5'-GCTTCTACATCCCCAAGAAAT-3'
CYP1A2 AS	5'-TCCCCTGGCCAGGACT-3'
CYP2A6 S	5'-AGCAACAGGCCTTTCAGTT-3'
CYP2A6 AS	5'-CCCAATGAAGAGGTTCAAC-3'
CYP2C8 S ^a	5'-AGATCAGAAATTTCTCACCC-3'
CYP2C8 AS ^a	5'-AACTCGTGTAAAGAGCAACA-3'
CYP2C9 S	5'-CAGATCTGCAATAATTTTCTC-3'
CYP2C9 AS	5'-CTTCAATAGTAAATTCAGATG-3'
CYP2C19 S ^a	5'-ATTGAATGAAAACATCAGGATTG-3'
CYP2C19 AS ^a	5'-GAGGTTGTTGATGTCCATC-3'
CYP2D6 S	5'-GGTGTGACCCATATGACATC-3'
CYP2D6 AS	5'-CTCCCCGAGGCATGCACG-3'
CYP3A4 S	5'-CCAAGCTATGCTCTTCACCG-3'
CYP3A4 AS	5'-TCAGGCTCCACTTACGGTGC-3'
CYP3A5 S	5'-AGTGTCTTTTCCTTCACTTA-3'
CYP3A5 AS	5'-TTCAACATCTTCTTGCAAGT-3'

S, sense primer; AS, antisense primer.

^a From Klose et al. (1999).

approximately 15% normal human hepatocytes isolated from adult liver and that these mice could be inoculated with human hepatitis B virus (Dandri et al., 2001). Mercer et al. (2001) have reported the generation of chimeric uPA^{+/+}/SCID mice with human cells occupying a portion of the cross-sectional liver area, and these mice could be successfully infected with human hepatitis C virus. These studies were valuable for the development of new treatments against hepatitis virus and for the progress of regenerative medicine; however, the replacement of mouse liver with human hepatocytes was low and insufficient in these reports (Dandri et al., 2001; Mercer et al., 2001). Recently, chimeric mice in which the livers could be replaced by more than 80% with human hepatocytes were established by Tateno et al. (2004). We speculated that such mice could be used for predicting drug metabolism in humans, since the livers of the chimeric mice were almost completely replaced with human hepatocytes. In the present study, we investigated the expression of human P450s in the livers of such mice to determine whether they can be used as a new tool for studies in drug development.

Materials and Methods

Materials. All primers shown in Table 1 were commercially synthesized at Hokkaido System Sciences (Sapporo, Japan). Polyclonal rabbit anti-human CYP1A2 antibody, polyclonal rabbit anti-human CYP2A6 antibody, and polyclonal rabbit anti-human CYP2C8 antibody were purchased from Nossan (Yokohama, Japan). Polyclonal rabbit anti-human CYP2C9 antibody and human CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5 Western blotting kits were obtained from BD Gentest (Worburn, MA). Recombinant human CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4 expressed in baculovirus-infected insect cells were also obtained from BD Gentest. Recombinant human CYP3A5 was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Debrisoquine, diclofenac, and paclitaxel were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Coumarin, 7-hydroxycoumarin, and dexamethasone were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). *S*-Mephenytoin was obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). (\pm)-4'-Hydroxydebrisoquine and (\pm)-4'-hydroxymephenytoin were purchased from Ultrafine Chemicals (Manchester, UK). Pooled HLM, 4'-hydroxydiclofenac, and 6 α -hydroxypaclitaxel were purchased from BD Gentest. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form, NADP⁺) and glucose-6-phosphate dehydrogenase were purchased from Oriental Yeast (Tokyo, Japan). Nafamostat mesilate was kindly provided by Torii Pharmaceutical (Tokyo, Japan). All other chemicals and solvents were of the highest grade commercially available.

Generation of the Chimeric Mice with Humanized Liver. The present

TABLE 2

Chimeric mice used in the present study

Mouse No.	Donor	hAlb conc.	RI
		mg/ml	%
1	A	0.0	0
2	A	1.6	31
3 ^a	A	2.1	52
4	A	3.5	57
5	A	7.7	89
11	B	0.0	0
12	B	0.6	19
13	B	2.1	60
14	B	9.3	71
15	B	13.7	71
16	B	10.8	88
17	B	13.7	93

A, Japanese, male, 12 years; B, white, male, 9 months.

^a Total hepatic RNA in no. 3 could not be obtained in this study.

study was approved by the Ethics Committees of Kanazawa University and the Hiroshima Prefectural Institute of Industrial Science and Technology Ethics Board. The human liver sample from donor A (Japanese, male, 12 years old) was obtained at autopsy after receiving written informed assent. The cryopreserved human hepatocytes from donor B (white, male, 9 months old) were purchased from In Vitro Technologies (Baltimore, MD). The chimeric mice with humanized liver were generated by the method described previously (Tateno et al., 2004). Briefly, uPA^{+/+}/SCID mice at 20 to 30 days after birth were injected with human hepatocytes through a small left-flank incision into the inferior splenic pole. When necessary, the chimeric mice were treated intraperitoneally with nafamostat mesilate. The concentration of human albumin (hAlb) in the blood of the chimeric mice and the replacement index (RI; the rate of the replacement from mice to humans) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay and anti-human specific cytokeratin 8 and 18 antibody, respectively. There was a good correlation between the hAlb concentration and the RI (Tateno et al., 2004). The male chimeric mice used in this study were 11 to 14 weeks old (Table 2). The uPA^{+/+}/SCID mice, uPA^{+/-}/SCID mice, and uPA^{-/-}/SCID mice were obtained as previously reported (Tateno et al., 2004).

Hepatic RNA Extraction and Real-Time Reverse Transcription-PCR. Human P450 mRNA was quantified by real-time reverse transcription-PCR. Total hepatic RNA was extracted using ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan), and cDNAs were synthesized as described previously (Iwanari et al., 2002). The sequences of primers that were specific to each human P450 are shown in Table 1. PCR was performed using the Smart Cycler (Cepheid, Sunnyvale, CA) with Smart Cycler software (version 1.2b). The PCR conditions were as follows. After an initial denaturation at 95°C for 30 sec, the amplification was performed by denaturation at 94°C for 4 s and annealing and extension at 64°C for 20 s for 45 cycles. Amplified products were monitored directly by measuring the increase of the dye intensity of the SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, OR) that binds to double-strand DNA amplified by PCR. The copy number of mRNA in the cDNA samples was calculated using standard amplification curves. It was confirmed that the primer for human P450s used in this study did not cross-react with murine P450 mRNA. We could not obtain total RNA from chimeric mouse 3.

Genomic DNA Preparation from Livers. Genomic DNA from the liver of donor A and that of the chimeric mice were extracted with phenol/chloroform followed by ethanol precipitation (Brilliant et al., 1991). The genotyping of CYP2A6*4, CYP2C19*2, CYP2C19*3, and CYP3A5*3 was performed as described previously (de Morais et al., 1994; Fukuen et al., 2002; Nakajima et al., 2004).

Liver Microsomes. Liver microsomes were prepared as described previously (Yamazaki et al., 1999a) and stored at -80°C until analysis. The protein concentration was determined using Bradford protein assay reagent (Bio-Rad, Hercules, CA) with bovine gamma globulin as the standard. We could not obtain liver microsomes from donor B.

Immunoblot Analysis of Human P450 Isoforms. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot analysis of human CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5 were performed according to Laemmli (1970), with slight modifications. The liver microsomes