

氏名	加藤 美紀
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第303号
学位授与の日付	平成18年3月22日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	ヒト肝細胞キメラマウスの薬物動態学的研究
論文審査委員(主査)	横井 毅(医学系研究科・教授)
論文審査委員(副査)	辻 彰(自然科学研究科・教授), 宮本 謙一(医学部附属病院・教授), 加藤 将夫(自然科学研究科・助教授), 中島 美紀(医学系研究科・助教授)

## 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 the chimeric mice. In this study, we investigated human major cytochrome P450 (CYP) and conjugation enzymes in the livers of the chimeric mice. The chimeric mice exhibited a similarly efficient capacity of drug metabolism as humans. 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. It was demonstrated that human CYPs expressed in the chimeric mice were induced by typical CYP inducers, rifampicin and 3-methylcholanthrene, and a specific human CYP3A4 inducer, rifabutin. This chimeric mouse model may be a useful animal model to estimate and predict the in vivo induction of CYPs in humans. Then, we investigated the in vivo drug metabolism of a typical CYP2D6 substrate, debrisoquin, in the chimeric mice, since debrisoquin is mainly metabolized to 4'-hydroxydebrisoquin in human, but not in mice. The in vivo metabolic profile of the chimeric mice may have been humanized. Moreover, CYP2D6 expressed in the liver of the chimeric mice was inhibited by a specific human CYP2D6 inhibitor, quinidine. The excretion profile in the chimeric mice was also humanized in an excretion study using cefmetazole. The chimeric mice with humanized liver would become a useful model in studies of drug metabolism.

薬物動態試験は医薬品開発において必須であり、体内動態を理解することは適正な薬物療法を行う上で重要であると考えられる。ヒトでの体内動態を予測することは難しく、ヒト由来試料を用いて様々な試みが行われてきた。今日ではヒト肝ミクロソーム (HLM) やヒト初代培養肝細胞を用いた実験が一般的であるが、それでもなお、倫理面を含めた試料の供給や、*in vitro* から *in vivo* への外挿など様々な障壁が存在する。2004 年に我が国において樹立された、マウス肝を最大で 95%までヒト肝細胞に置換することが可能なヒト肝細胞キメラマウスが、よりヒトに近い薬物動態試験の新たなモデルとして応用できるか検討を進めた。

体内動態を決定する重要な因子は薬物代謝であり、薬物代謝の中心的な役割を担う酵素は第 I 相反応に関与するチトクロム P450 (CYP) である。CYP は内因性基質だけでなく薬物を含む外来異物の代謝に大きく関与している。そこで CYP のキメラマウスにおける発現とその機能を明らかにすることを目的に mRNA、タンパク質、酵素活性レベルでの検討を行った。その結果、キメラマウスの肝において、ヒト CYP mRNA が発現しており、また、イムノブロット分析の結果から CYP2C9、CYP3A4、CYP1A2、CYP2D6 などの主要なヒト CYP タンパク質が発現していることを明らかにした。全分子種の mRNA 発現量、タンパク質発現量ともにキメラマウスのヒト化の指標であるヒトアルブミン (hAlb) 濃度依存的な増加が認められた。ヒト特異的酵素活性であるジクロフェナク 4'-水酸化酵素活性やデキサメタゾン 6-水酸化酵素活性 (DEXOH)、デブリソキン 4'-水酸化酵素活性 (DBOH) などが認められたことから、キメラマウスに発現するヒト CYP は、ヒトとしての薬物代謝能を有しており、ドナーと同等の薬物代謝能を有することを明らかにした。また、CYP2A6\*4 や CYP2C19\*2、CYP3A5\*3 についてドナーとキメラマウスの遺伝子型を判定することにより、キメラマウスはドナーと同一の遺伝子型、表現型を示すことが明らかになった。以上の結果から、キメラマウスの肝に発現する CYP はドナー肝と同等であり、これまで HLM を用いて行ってきた実験にキメラマウスの肝ミクロソームを用いることは可能と示された。

次に、第 II 相反応に関与する主要な抱合酵素であるグルクロン酸転移酵素 (UGT)、硫酸転移酵素 (SULT)、N-アセチル転移酵素 (NAT)、グルタチオン S-転移酵素 (GST) に関して、第 I 章の CYP と同様にキメラマウスにおける発現とその機能を明らかにすることを目的に mRNA、タンパク質、酵素活性レベルでの検討を行った。抱合反応の中で最も重要で研究が進んでいるものはグルクロン酸抱合反応である。グルクロン酸抱合体は親化合物よりもより親水性が高く、尿や糞に排泄されやすいため、UGT は生体からの異物の排泄に重要な役割を果たす。キメラマウスの肝においてヒト UGT mRNA および UGT タンパク質の発現は hAlb 濃度と高い相関が認められた。ヒト UGT2B7 の指標活性であるモルフィン 6-グルクロン酸抱合活性は hAlb 濃度と相関が

認められたことから、キメラマウスの肝にはヒト UGT が発現しており、抱合活性を有することが明らかになった。硫酸抱合は薬物の解毒や活性化に関与する重要な代謝反応である。キメラマウスの肝に発現する SULT mRNA、タンパク質およびはヒト特異的なエストロン 3-硫酸抱合活性は hAlb 濃度と相関が認められた。従って、キメラマウスでエストロン 3-硫酸抱合活性が認められたことから、キメラマウスにはヒト SULT が発現しており、抱合活性を有することが明らかになった。NAT はアミンやアрилヒドラジンのアセチル化を触媒することが知られている。ヒト肝に主に発現している NAT2 は表現型が slow acetylator (SA) と rapid acetylator に分類されおり、薬物の副作用発現に深く関わっている。キメラマウスの肝ではヒト NAT2 mRNA の発現は hAlb 濃度と相関が認められた、ヒト特異的なスルファメタジン N-アセチル抱合活性が検出されたことからヒト NAT が発現していることを明らかにした。また、ドナー B 由来のキメラマウスでは抱合活性が認められたが、ドナー A 由来のキメラマウスでは活性がほとんど認められず、NAT2\*6/NAT2\*13 の SA であることを明らかにした。CYP の遺伝子多型の結果同様、キメラマウスはドナーの遺伝子型、表現型を保持していると考えられる。一般的に様々な外因性化合物の解毒に関与する GST についても mRNA レベルでの検討が主であるが、発現が認められた。抱合酵素にはヒト特異的な抗体や指標活性がほとんどないため、キメラマウスの肝に発現する抱合酵素について検討することは極めて難しい。しかし、以上の検討より、キメラマウスにおいてヒト UGT、SULT、NAT および GST が発現しており、抱合能を有していると考えられる。キメラマウスの肝にヒト CYP と抱合酵素が発現しているため、*in vitro* で HLM の代用としてだけでなく、キメラマウスを用いることで薬物の第 I 相および第 II 相反応の両者を *in vivo* で評価できる可能性が示された。

CYP の誘導と阻害は多くの薬物相互作用の原因と考えられている。医薬品の候補化合物が CYP を誘導、阻害する可能性について検討することは、ヒトにおける薬物相互作用を予測するためにも極めて重要である。酵素源として頻用されているヒト CYP 発現系や HML を用いても CYP の誘導を予測することはできない。そこで、CYP の発現が証明されたキメラマウスのヒト CYP 誘導実験への応用を目指し、キメラマウスの *in vivo* におけるヒト CYP 誘導能についてリファンピシンと 3-メチルコラントレン (3-MC) を用いて検討を行った。リファンピシンは DEXOH に関して、ドナー A 由来のキメラマウスで 5.2 倍、ドナー B 由来のキメラマウスで 12.0 倍の顕著な増加が認められた。DEXOH はヒト特異的であるため、ヒト CYP3A4 は誘導能を有することが示された。また、ヒト CYP1A2 mRNA とタンパク質は 3-MC の投与により誘導が認められた。キメラマウスの肝に発現するヒト CYP は代表的な CYP 誘導薬であるリファンピシンと 3-MC で誘導されたことから、ヒトの *in vivo* における誘導能を評価する最適な動物モデルとなる可能性が示された。

リファンピシンによりキメラマウスの肝に発現しているヒト CYP3A4 は誘導能を

有することを明らかにしたが、リファンピシンはヒト CYP3A4 だけでなく、マウス Cyp3a も誘導する。そこで、ヒト CYP3A4 の誘導についてヒト CYP3A4 の特異的誘導薬であるリファブチンを用いて検討を行った。本研究における誘導実験条件ではヒト CYP3A4 特異的な誘導薬であるリファブチンにより、DEXOH が 1.9 倍誘導された。これより、キメラマウスのヒト CYP3A4 は誘導能を有していることが明らかになった。また、ヒト CYP3A4、マウス Cyp3a とともにテストステロン 6 $\beta$ -水酸化酵素活性 (TESOH) を触媒する。リファンピシン投与により TESOH と DEXOH がともに 4.1 倍の増加し、誘導率がほぼ同じであったことから、キメラマウスでの TESOH の増加は主にヒト CYP3A4 の誘導による結果と考えられる。

次に CYP が介する薬物相互作用の約 7 割を占める酵素阻害実験の検討を行った。現在のところ、ヒトにおいて CYP の阻害の有無はヒト CYP 発現系や HML を用いて *in vitro* 実験系で予測可能であるが、ヒトの生体内での阻害程度を見積もることは難しい。そこで、*in vivo* の阻害作用を見積もるべく、キメラマウスの阻害試験への応用を検討した。種差のみならず系統差も認められている CYP2D6 の基質であるデブリソキンをキメラマウスに投与し、血清中 4'-水酸化デブリソキン (4-OH デブリソキン) を測定した。キメラマウスでは 4-OH デブリソキンの AUC が高 hAlb 群で低 hAlb 群や uPA<sup>+/+</sup>/SCID 群より顕著に高かった。これより、*in vivo* においてキメラマウスはヒト型の薬物代謝プロファイルを示すことが明らかになった。次にヒト CYP2D6 の特異的な阻害薬であるキニジンの前投与すると、高 hAlb 群で 4-OH デブリソキンの AUC が有意に減少した。これに対し、低 hAlb 群や uPA<sup>+/+</sup>/SCID 群では顕著な変化は認められなかった。キメラマウスにおいて、キニジンによる CYP2D6 の阻害作用が認められたことから、*in vivo* における薬物相互作用を再現できることが示された。また、肝ミクロソームを用いた *in vitro* 実験において、DBOH の速度論的解析を行ったところ、Km 値は高 hAlb 群でヒトと類似した値を示し、低 hAlb 群や uPA<sup>+/+</sup>/SCID 群では Km 値は有意に高かった。また、*in vitro* における阻害実験では、キニジンの Ki 値は高 hAlb 群でヒトと類似しており、uPA<sup>+/+</sup>/SCID 群とは約 600 倍異なる値を示した。これより、*in vivo*、*in vitro* 両実験系においてキメラマウスのヒト CYP2D6 酵素活性がヒト CYP2D6 阻害薬により阻害されることを明らかにした。キメラマウスは HLM や実験動物を用いた *in vivo* 実験よりもさらにヒトに近い状態で、薬物相互作用の検討を行うことができる動物モデルであると考えられる。ヒトへの外挿について様々な検討が行われており、予測方法も改良が重ねられているが、キメラマウスを用いて同様の検討を行うことにより、ヒトにおける薬物相互作用をより詳細に予測することができると期待される。

薬物は一部未変化体で排泄されるものも存在するが、一般的に代謝を受け腎排泄もしくは胆汁排泄される。胆管に排泄されるためには肝細胞を経る必要があるため、ヒトの肝細胞で置換されているキメラマウスの排泄プロファイルについて検討を進めた。ヒトでは腎排泄型、マウスでは胆汁排泄型であるセフメタゾールを指標として、

キメラマウスでの排泄の検討を行ったところ、高 hAlb 濃度のキメラマウスでは尿中排泄率が高く、糞中排泄率が低いヒト型の排泄プロファイルを示した。これに対し、コントロールとして使用した uPA<sup>+</sup>/SCID マウスは糞中排泄率が高値を示した。キメラマウスにおける薬物の排泄については今後、更なる検討が必要と考えられるが、キメラマウスは代謝実験だけでなく排泄実験にも応用できる可能性が示された。

*In vitro* から *in vivo* への外挿、種差、ヒト肝試料の安定供給などこれまでの懸案をクリアできるヒト肝細胞キメラマウスの薬物動態学的実験への応用は、医薬品開発の効率化と薬物治療の最適化にとって極めて有益である。多方面で応用できるキメラマウスについて、薬物代謝酵素を中心とした基礎的な検討を行った本研究は、今後の薬物動態の発展のみならず医薬品開発についても貢献できる情報を提供するものと考えられる。

### 学位論文審査結果の要旨

2004年に我が国において樹立されたヒト肝細胞キメラマウスが、よりヒトに近い薬物動態試験の新たなモデルとして適用できるか検討を行った。キメラマウスの肝には体内動態を決定する重要な薬物代謝酵素であるヒトチトクロム P450 (CYP) やヒト抱合酵素が発現しており、酵素活性を有することを明らかにした。従ってキメラマウスの肝はヒト肝の代替として薬物代謝試験で使用可能であると考えられる。また、CYP の誘導と阻害は多くの薬物相互作用の原因と考えられている。キメラマウスの肝に発現するヒト CYP は代表的な CYP 誘導薬で誘導された。ヒト CYP 特異的な阻害薬により *in vivo* における薬物代謝阻害が認められた。これより、キメラマウスはさらにヒトに近い状態で薬物相互作用の検討を行うことができる動物モデルであることを明らかにした。ヒトでは腎排泄型、マウスでは胆汁排泄型であるセフメタゾールはキメラマウスでは尿中排泄率が高く、コントロールマウスは糞中排泄率が高値を示した。従って、代謝実験だけでなく排泄実験にも適用できる可能性が示された。ヒト肝細胞キメラマウスの薬物動態学的実験への適用は、医薬品開発の効率化と薬物治療の最適化にとって極めて有益である。多方面で応用できるキメラマウスについて、薬物代謝酵素を中心とした基礎的な検討を行った本研究は、今後の薬物動態の発展のみならず医薬品開発についても貢献できる情報を提供するものと考えられる。以上の研究成果は、博士(薬学)として評価できるものであると判定した。