

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月2日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07102

研究課題名(和文) ヒト化肝臓マウスを用いたヒト特異的肝毒性評価法の開発と毒性発症機序の種差の解明

研究課題名(英文) Development of human specific hepatotoxicity evaluation method using humanized liver mouse and elucidation of species differences in the pathogenesis of toxicity

研究代表者

末水 洋志 (SUEMIZU, HIROSHI)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・部長

研究者番号：40332209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では宿主マウスの肝臓と再構築したヒトの肝臓を持つヒト化肝臓マウスを用いてヒト特異的肝毒性評価法を確立した。d-ガラクトサミン投与により肝傷害を誘導し、血漿アポA遺伝子mRNA、ALTタンパク量、ヒトサイトケラチン量を測定した。マウス、およびヒト特異的TaqManプローブでも、マウス、およびヒトに特異的なALT ELISAでも検出された逸脱マーカーの主成分はマウスのものであった。また、M65 EpiDeath ELISAで検出されるヒトサイトケラチン量はごく僅かであった。これらの結果はヒト化肝臓マウスにおけるd-ガラクトサミンの毒性が主にマウス肝細胞に現れることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新薬開発の初期段階で実験動物において有効性と安全性が十分に確認された開発薬のみが臨床試験へと進められるにもかかわらず、臨床試験の段階で肝毒性が発症し開発中止となる薬剤が未だにない。この問題の克服にはヒトの薬物代謝を再現した動物実験モデルとヒトの肝毒性を高い確度で予見する評価システムの両方が必要である。ヒト化肝臓マウスはヒトの肝細胞を持つことから、ヒト特異的な肝毒性を再現すると考えられており、その毒性評価法の確立は前臨床段階でのヒトにおける副作用予測の精度向上と有害事象の低減に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established an evaluation method for human-specific hepatotoxicity using chimeric mouse with humanized liver, in which the mouse hepatocytes are replaced by human hepatocytes. The plasma levels of apoA mRNA, alanine transaminase (ALT) protein, and human cytokeratin were measured using d-galactosamine induced liver injury in humanized liver of chimeric mouse. The major components of deviant markers detected using species-specific TaqMan assay and ALT ELISA were from mice hepatocytes. Moreover, the amount of human cytokeratin detected using M65 EpiDeath ELISA was very small. These results suggest that the toxicity of d-galactosamine in humanized liver of a chimeric mouse appears mainly in mouse hepatocytes.

研究分野：実験動物学

キーワード：ヒト肝キメラマウス 肝毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新薬開発の初期段階では、齧歯類などの実験動物を用いて様々な試験が実施され、有効性があり且つ、安全性が十分に確認された開発薬のみが臨床試験の段階へと進められる。B 型肝炎治療薬として有望視された Fialuridine (FIAU) は、このような厳しい試験を乗り越えて開発されたにもかかわらず、臨床試験の段階で 15 名の被験者のうち 5 名に重篤な肝障害を発症させ、開発中止となった薬剤である。臨床試験に進む前の段階、すなわち「前臨床」の段階でヒトにおける副作用を十分に予測できればこのような事故を未然に防ぐことができたはずである。そのためにはヒトにおける体内動態を再現した動物実験モデルと肝毒性(副作用)を高い確度で予測できる評価システムの両方が必要である。

2. 研究の目的

マウスの肝臓をヒト肝細胞で置換したヒト肝キメラ TK-NOG マウス(ヒト肝キメラマウス)はヒトの肝臓を対象とした創薬研究に有用なモデルである。ヒト肝キメラマウスには宿主マウスの肝臓と再構築したヒトの肝臓の両方が存在することから、動物種特異的な肝毒性評価が行えると考えた。通常は肝逸脱酵素 ALT の活性上昇を肝毒性の指標とすることが多いが、酵素活性測定でマウス ALT 活性とヒト ALT 活性を区別することはできない。そこで本研究では ALT 活性測定に代わる種特異的な肝毒性評価バイオマーカーの探索を行い、ヒト肝キメラマウスを用いたヒト特異的な肝毒性評価法の確立を試みた。

3. 研究の方法

肝細胞からの逸脱物質のうち、核酸は PCR 法により容易に種の区別が可能であり、また、mRNA を対象とすることにより組織特異性も期待できることから、マイクロアレイ解析を行い肝臓で発現が高い遺伝子としてアポ A 遺伝子を特定した。ヒトとマウスの遺伝子配列のうち共通性の高い領域にプライマー、及び TaqMan プローブを設定し種特異的な肝毒性マーカーとした。また、逸脱物質のうちヒトタンパクの検出には M65 EpiDeath ELISA を用い、中間径フィラメント構成タンパク質サイトケラチンを種特異的な肝毒性マーカーとした。更に一般的な肝逸脱酵素 ALT について、酵素活性ではなく、酵素タンパク量として評価するため、複数の ALT ELISA kit について、ヒト、およびマウスに対する特異性を検証した。肝障害を引き起こすことが知られる d-ガラクトサミン、あるいはチオアセトアミドをヒト肝キメラマウスに投与し、血漿中 ALT 活性、および上記種特異的な肝毒性マーカーの測定を行った。

4. 研究成果

肝細胞が傷害を受けて漏出する物質の量は肝細胞内濃度が高い方が多くなると予想されることから、一般に肝臓で発現が高いと考えられているアルブミンについてヒト、およびマウスアルブミン遺伝子 mRNA の同時検出を試みた。種特異性が確認された既製の TaqMan プローブを用いてヒト、マウス、ヒト肝キメラマウスの肝 cDNA を解析したところ、それぞれ単独では種特異的な増幅が確認できたが、Duplex PCR 法では種特異的な増幅は見られなくなった。既製の TaqMan プローブではプライマー配列が不明であることから、ヒト特異的な TaqMan アッセイとマウス特異的な TaqMan アッセイが干渉するものと思われた。そこで、マイクロアレイ解析によりアルブミンと同様に肝臓で発現が高い遺伝子 5 つ (apolipoprotein H (APOH), apolipoprotein A-II (APOA2), transferrin (TF), serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 1 (SERPINA1), apolipoprotein A-I (APOA1)) を抽出し、プライマー、および TaqMan プローブの設計を行った。ヒトとマウスで共通のプライマー配列が設定でき、且つ、増幅される配列内に TaqMan プローブで識別される配列差が存在したのは APOA1 遺伝子のみであり、これを種特異的な肝毒性マーカーとした。mRNA は細胞外では不安定であると考えられていることから、1) 採血時の抗凝固剤、2) mRNA 調製法について検討を行った。その結果、抗凝固剤として EDTA を用いて血漿を調製し、TRIzol 試薬添加により RNase 活性を急速に不活性化させ、スピнкаラムにて RNA 精製を行う方法を確立した。血漿中 mRNA の定量は細胞内 mRNA の定量と異なり、mRNA が存在するか否かは不明である上、ハウスキーピング遺伝子による補正もできない。そこで各プロセスの成否が確認できるよう、血漿に一定量の synthetic RNA transcript (ThermoFisher 社製 XenoRNA control) をスパイク RNA として添加した。溶出した RNA から逆転写反応により cDNA を調製し、全ての検体でスパイク RNA が

同程度検出されることを確認した。次いでヒトとマウスでプライマー配列、TaqMan プローブ配列が共通な Common APOA1 TaqMan アッセイを作製し、漏出 mRNA の有無を確認した。血漿中に漏出 mRNA が検出された検体について異なる蛍光物質が標識されたヒト、および、マウス特異的 APOA1 TaqMan アッセイで Duplex RT-PCR 解析を行った。コピー数はヒトとマウスの標的配列を含むプラスミド DNA を用いた検量線から求めた。このアッセイ系にて d-ガラクトサミン誘発肝障害モデルの評価を行った (図 1)。

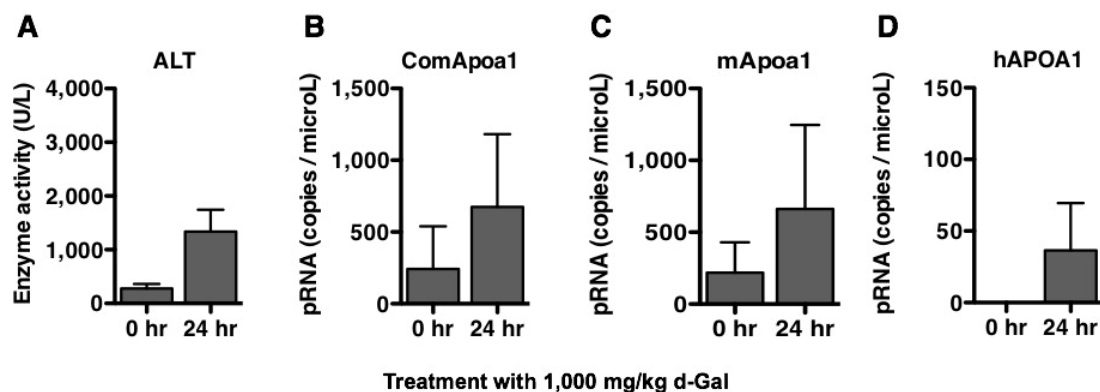


図1 d-ガラクトサミン(d-Gal)誘発肝障害モデルにおける漏出 mRNA の検出

ガラクトサミン投与 24 時間後、逸脱酵素 ALT 活性 (A) は 7 倍以上上昇したのに対し、血中 Common AOPA1 mRNA 量 (B) は 3 倍の上昇に留まった。その内訳を種特異的 APOA1 TaqMan アッセイで解析すると、マウス ApoA1 mRNA 量 (C) が Common APOA1 mRNA 量 (B) とほぼ同等レベルで血中に存在していたのに対し、ヒト特異的な APOA mRNA 量 (D) は、検出されたもののマウス ApoA1 mRNA 量 (C) の僅か 1/10 しか存在せず、漏出 RNA の大部分はマウス由来であることが明らかとなった。

次に逸脱物質のうちヒト細胞から逸脱したタンパクとして中間径フィラメント構成タンパク質サイトケラチンの検出を M65 EpiDeath ELISA にて行った (図 2)。ガラクトサミン投与

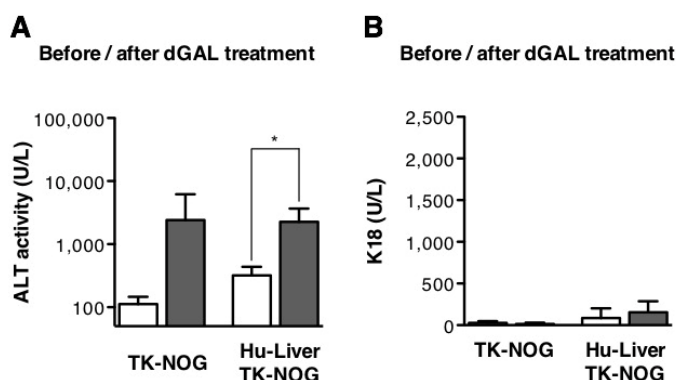


図2 d-ガラクトサミン(dGAL)誘発肝障害モデルにおける漏出ヒトタンパクの検出

24 時間後、ヒト肝キメラマウス (Hu-Liver TK-NOG) 対照マウス (TK-NOG) とともに逸脱酵素 ALT 活性の大幅な上昇が認められた (A)。しかし、ヒト肝キメラマウスにおける血漿中ヒトサイトケラチンの上昇は、漏出 mRNA の結果と同様、ごく僅かであった (B)。これらのことから、ガラクトサミン投与により誘導される肝障害は主としてマウス肝細胞に発生しやすいと考えられた。M65 EpiDeath ELISA が検出するサイトケラチンはヒト細胞由来であり、マウス由来のサイトケラチンは検出しない。すなわち、M65 EpiDeath ELISA はヒト細胞が傷害を受けたか否かの判定キットであり、ヒトとマウスの肝細胞のどちらが傷害を受けたかは断定できないキットである。従来の逸脱酵素マーカー ALT 酵素活性をヒトとマウスの酵素タンパク量として測定することができれば、極めて有用な肝毒性バイオマーカーに位置づけられる。しかし、市販の ALT ELISA kit には種交差反応性に関する情報、特にヒトとマウスの交差性について全く情報がなく、全て検証しなければならなかった。最終的にヒト ALT タンパクに特異的な MyBioSource 社製 Human GPT (Alanine aminotransferase 1) ELISA Kit (Cat. MBS762379)

とマウス ALT タンパクに特異的な MyBioSource 社製 Mouse Gpt (Alanine aminotransferase 1) ELISA Kit (Cat. MBS760371) を見だし、前述と同様、d-ガラクトサミン誘発肝障害モデルについて評価を行った (図3)。1,000 mg/kg ガラクトサミンをヒト肝キメラマウスに腹腔単回投与し 24 時間後に逸脱酵素 ALT 活性 (A) および、マウス ALT タンパク (B)、ヒト ALT タンパク (C) を定量した。ALT 酵素活性はガラクトサミン投与群で有意に高く、7 倍以上高値であった。また、マウス ALT タンパク、ヒト ALT タンパクも溶媒投与群に比し有意に高値であった。しかし、ALT ELISA においても逸脱 ALT タンパクの主成分はマウス由来であり、その変動幅は ALT 酵素活性の変動に較べ小さなものであった。

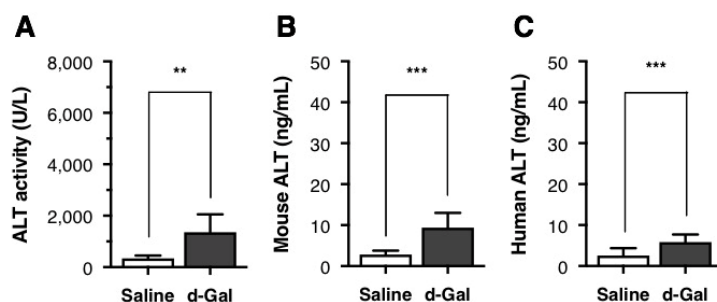


図3 d-ガラクトサミン(d-Gal)誘発肝障害モデルにおける漏出タンパクの検出

チオアセトアミド投与により肝障害を誘導したヒト肝キメラマウスについても種特異的 ALT ELISA 解析を行った (図4)。200 mg/kg チオアセトアミドをヒト肝キメラマウスに腹腔単回投与し 24 時間後に逸脱酵素 ALT 活性 (A) および、マウス/ヒト ALT タンパク (B) を定量した。ALT 酵素活性はチオアセトアミド投与群で溶媒投与群の約 15 倍の高値を示した。種特異的 ALT ELISA にて定量したところ、マウス ALT タンパクはチオアセトアミド投与群で溶媒投与群の約 7 倍高値を示したが、ヒト ALT タンパクは溶媒投与群に比し約 1.3 倍の高値に留まった。このことから、チオアセトアミド投与により誘導される肝傷害は主にマウス肝細胞が標的になると考えられた。

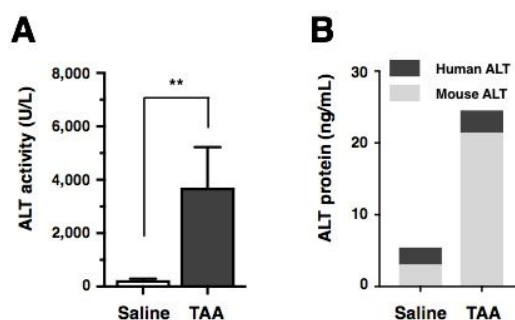


図4 チオアセトアミド(TAA)誘発肝障害モデルにおける漏出タンパクの検出

宿主マウスの肝臓と再構築したヒトの肝臓の両方を保有するヒト肝キメラマウスを用いることにより、同一条件下でマウス、ヒトに対する肝毒性評価が行えると考えた本研究では、肝細胞から逸脱する物質を種特異的に検出する方法として、1) AOPA1 mRNA を標的とした Plasma RNA の検出法の確立、2) M65 EpiDeath ELISA を用いた漏出ヒトサイトケラチンタンパクの検出、3) ヒト ALT/マウス ALT タンパクを特異的に定量できる ELISA 法の確立を行った。今回使用した Hepatotoxicant はいずれもマウス肝細胞に対して強い毒性を示したため、確立した方法がヒト肝細胞における毒性評価に有効か否かを検証するに至らなかった。しかし、予備検討段階ではあるがヒト肝キメラマウスにヒト T 細胞を移入し GVHD 反応を誘起するとヒト肝細胞が排除される過程で、前記、いずれの方法においてもヒト特異的マーカーの大幅な上昇を確認しており、ヒト肝細胞に起こる毒性を確実に検出できると思われる。一方、肝毒性が原因で開発が中止された薬や市場に出たあと有害事象が確認され撤退した薬の中にはイデオシンクラティックな毒性もあり、従来の動物実験モデルでは再現することが困難な薬も多数存在する。本研究ではヒト ALT タンパクとマウス ALT タンパクを区別して定量するアッセイ系を確立したが現行 ELISA 法では検出感度が不十分である上、酵素活性測定に比

し大量の血漿を必要とする。今後、高感度測定法への改良を進め、更に多くの化合物で検証すると同時にイディオシンクラティックな毒性を再現できる動物実験モデルの開発にも着手する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- Use of Cytokeratin-18 ELISA to Detect Human Specific Hepatotoxicity in the Humanized-Liver Mouse, Hiroshi Suemizu, Nao Yoneda, Kenji Kawai and Riichi Takahashi. EuroTox 2107, 10-13/Sep/2017, Bratislava/Slovakia
- Studies on physiological equivalence of human hepatocytes and liver cells harvested from humanized-liver chimeric mice, Hiroshi Suemizu, Yuichiro Higuchi, Nao Yoneda, Hiroshi Yamazaki and Shotaro Uehara. SOT meeting 2019, 10-13/Mar/2019, Baltimore/USA

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。