

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：72611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03150

研究課題名(和文)薬物動態解析に寄与する複合型ヒト肝キメラマウスの開発と創薬研究への活用

研究課題名(英文)Development of a composite humanized liver chimeric mouse that contributes to pharmacokinetic studies and its application to drug discovery research

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・研究部門・部門長

研究者番号：40332209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では主要な2つの血漿タンパク、アルブミン(Alb)と α 1酸性糖タンパク質(Agp1)を欠損するヒト肝キメラマウスを作製することにより、マウス血漿タンパクの影響が低減されたヒト型ADMEモデルの開発をめざした。作製されたAlb/Agp1 double KOヒト肝キメラマウスの肝臓におけるヒト薬物代謝関連遺伝子の発現はヒト肝キメラマウスの肝臓と同等であり、2つの血漿タンパク欠損の影響は限定的と考えられた。このモデルを用いてヒト薬物代謝クリアランス予測を行ったところ、Diazepamではヒト実測値との間に大きな乖離があったものの、KetoprofenとUCN-01ではヒト実測値に近似した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物の代謝・動態には実験動物とヒトとの間に大きな種差があり、モデル動物のヒト型化が学術上の課題である。ヒト肝細胞保有マウスの開発により肝臓における薬物代謝の種差を定性的、定量的に評価することが可能になったが、体内分布を左右する血漿タンパクの組成は依然としてマウス型であった。本研究では薬物と結合する主要な2つの血漿タンパク(アルブミンと α 1酸性糖タンパク質)を欠損したヒト肝細胞保有マウスを開発した。ヒト型肝薬物代謝に加え、体内分布もヒト型化されたADMEヒト型モデルは、より精緻なヒト薬物代謝・動態予測モデルになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a human ADME model with reduced effects of mouse plasma proteins by generating humanized liver chimeric mice deficient in two major plasma proteins, Albumin (Alb) and Alpha-1-acid Glycoprotein 1 (Agp1). The expression of human drug metabolism-related genes in the liver of Alb/Agp1 double KO humanized liver chimeric mice was similar to that of traditional humanized liver chimeric mice, suggesting that the effect of these plasma protein deficiencies was limited. In this model, there was a large discrepancy between the predicted and measured drug metabolism clearance value for Diazepam in humans. However, the predicted value of drug metabolism clearance in humans for Ketoprofen and UCN-01 provided by Alb/Agp1 double KO humanized liver chimeric mice was similar to the measured value in humans.

研究分野：実験動物学

キーワード：ヒト肝キメラマウス 薬物動態 ヒト肝細胞 薬物体内分布 タンパク結合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新薬開発における候補物質の体内動態(吸収-Absorption、分布-Distribution、代謝-Metabolism、排泄-Excretion; 総称して ADME)の検討は開発薬の効果や有害事象(毒性)を把握する上できわめて重要である。とくに肝臓における薬物代謝は、効果と毒性発現が薬の一次/二次代謝物によるのか、あるいは非代謝物によるのかが化合物毎に異なるので重要な検討課題である。しかし、薬物代謝には実験動物とヒトとの種差が際立っており、モデル動物のヒト型化が学術上の課題であった。肝臓による薬物代謝をヒト化することを企図して開発されたヒト肝細胞保有 TK-NOG マウス(ヒト肝キメラマウス)を用いることにより薬物代謝の種差を定性的、定量的に評価することが可能となったが、分布に関わる血漿タンパクの組成は依然としてマウス型であり、精緻な薬物動態予測にはそのヒト化が重要と考えられた。

2. 研究の目的

薬物代謝酵素特性の種差を克服するため肝臓をヒト肝細胞で置換したヒト肝キメラマウスが開発され、薬物代謝機能と胆汁中への薬物排泄機能がヒトに近づいた。すなわち種差の影響を軽減することが可能となった。一方、薬物の体内分布を決定する血漿タンパク質の組成はヒト肝キメラマウスにおいても依然としてマウス型であることが判明し、体内分布に関して種差を克服できていないことが明らかとなった。本研究では体内動態を大きく左右するにもかかわらず、これまで注目されることのなかった“薬物の分布”に着目し、種差を克服するため薬物と結合する血漿タンパク質をヒト型化した ADME ヒト型モデルの開発をめざした。

3. 研究の方法

多くの低分子医薬品は肝臓で産生されるアルブミンや $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質などの血漿タンパクと結合して体内動態が制御されている。ヒト肝キメラマウスではヒト血漿タンパクの他、残存するマウス肝細胞が産生するマウス血漿タンパクも存在することから、血漿タンパクのヒト型化のため前記2つの主要血漿タンパクを欠損するマウスを開発した。すなわち、1)アルブミン遺伝子ノックアウトマウス、2) $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質遺伝子ノックアウトマウス、3)それら複合マウス、更に4)アルブミンのリサイクリングを制御するヒト胎児性 Fc γ 受容体遺伝子ノックインマウスを作製した。主要血漿タンパクをヒト型化した3)アルブミン、 $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質遺伝子2重欠損(Alb/Agp1 dKO)ヒト肝キメラマウスを作製し、Diazepam(アルブミン結合性)、Ketoprofen(アルブミン結合性)および、UCN-01(Agp1 結合性)についてヒト代謝クリアランス予測試験を実施した。

4. 研究成果

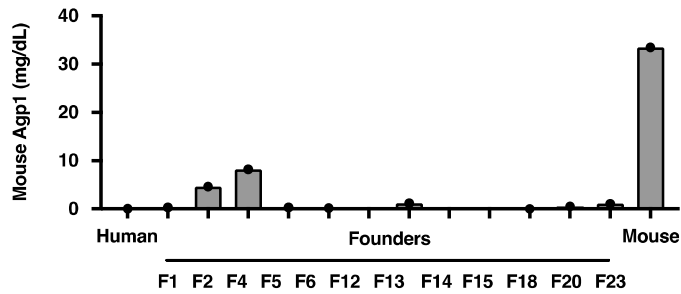
1) アルブミン遺伝子ノックアウト NOG マウスの作製 (Alb KO) と肝臓のヒト化

2011年、Mutant Mouse Resource & Research Centers (MMRRC)より取り寄せた B6;129S5-Alb^{tm1Lex/Mmcd} マウスを NOG マウスに戻し交配を開始し、8回の戻し交配により NOG-Alb KO マウスを樹立した。本研究ではヒト肝細胞移植に必要な肝傷害を誘導するため樹立した NOG-Alb KO マウスと TK-NOG マウスを交配し、TK-NOG-Alb KO マウスを系統化した。TK-NOG マウスは雄性不妊であるため、作製できる動物の数は雌性マウスの数に依存する。そこで、計画的な生産が行えるよう、体外受精・胚移植を行い雌雄合わせて57匹の産仔を取得し、遺伝子検査により TK-NOG-Alb KO マウス27匹を選別した。これらのマウスと自然交配で得たマウスを合わせて19組の自然交配群を構築し、90匹の産仔を取得した。遺伝子検査の結果33匹の TK-NOG-Alb KO マウスが得られ、これらのマウスにガンシクロビル投与を行い、肝細胞移植に適した肝傷害を示した18匹の TK-NOG-Alb KO マウスに凍結ヒト肝細胞を移植した。そのうち、14匹では移植8週後の血中ヒトアルブミン濃度が5.5 mg/mLを越え、推定ヒト肝細胞置換率が70%を越えることを確認した。

2) $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質遺伝子ノックアウト NOG マウスの作製 (Agp1 KO)

NOG マウスの受精卵を用いて CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行い、Agp1 遺伝子の第1 第5エクソン間の欠損を試みた。12 匹のファウンダーマウス取得に成功し、そのうち 7 匹では血中 $\alpha 1$ 酸性糖タンパクレベルが ELISA で検出限界以下であることが確認され、これらのマウスを NOG-Agp1 KO 系統として樹立した(図 1)。血中の $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質量はアルブミン量の 1%程度と存在量が少ないことから、アルブミン・ $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質の 2 重欠損モデルとして開発を進めた。

図1 NOG-Agp1 KO ファウンダーマウスの血中 マウスAgp1 タンパク量



3) Alb/Agp1 double KO NOG マウスの作製と肝臓のヒト化

TK-NOG-Alb KO マウスと NOG-Agp1 KO マウスで 9 組の自然交配群を構築し、74 匹の産仔を取得した。遺伝子検査の結果、TK 遺伝子を有し、かつ Alb 遺伝子と Agp1 遺伝子の両方が欠損した TK-NOG-Alb/Agp1 dKO マウス 7 匹の取得に成功した。しかし、雄性マウスが不妊症であることから生産効率が著しく低く実験系の確立が困難であった。そこで 2021 年、雄性不妊を回避した次世代型 TK マウス (NOG-TKm30) の系統化に成功したことから、Alb KO, Agp1 dKO 系統それぞれの遺伝背景を NOG-TKm30 に置換した。NOG-TKm30-Alb KO 系統については 13 組の自然交配群を構築し、76 匹 (平均産仔数 5.8 匹) の産仔の取得に成功し、うち 31 匹が Alb ホモ欠損個体であることを確認した。これらの個体ではマウスアルブミンタンパクが検出限界以下であることを確認した(図 2)。また、Agp1 KO 系統については Alb KO 系統との複合系統として 13 組の自然交配群を構築し、73 匹 (平均産仔数 5.6 匹) の産仔の取得に成功し、うち 35 匹が Alb/Agp1 2 重ホモ欠損個体であることを確認した。NOG-TKm30 遺伝背景のマウスと TK-NOG マウスではガンシクロビル感受性が大きく異なることから、これらのマウスにてヒト肝細胞移植に適した肝傷害誘導条件検討を行い、雌では 0.01 mg/mL ValGCV の 72 時間飲水投与、雄では 0.025 mg/mL ValGCV の 72 時間飲水投与が投与方法として至適であると判断し、本条件を以降の実験で使用した。これらマウスの生産を継続し、10 匹の NOG-TKm30-Alb/Agp1 dKO マウスを取得した。前記条件にて肝細胞傷害を誘導した後、

図2 NOG-TKm30-Alb/Agp1 dKOマウスの血中マウスアルブミン量

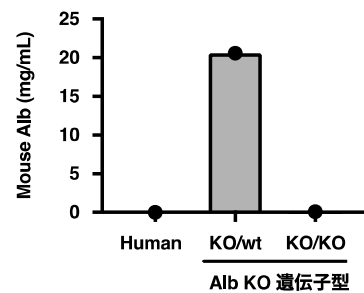
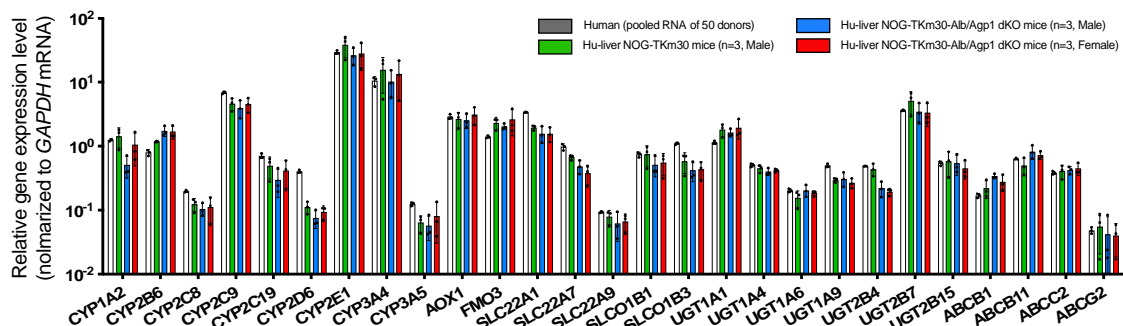


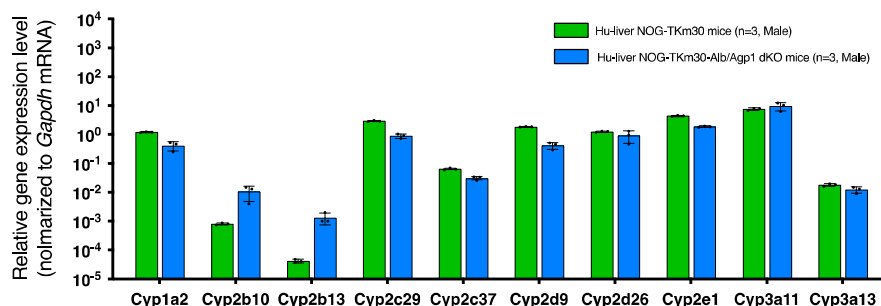
図3 ヒト肝キメラ NOG-TKm30-Alb/Agp1dKOマウスの肝薬物代謝関連遺伝子の発現比較



凍結ヒト肝細胞を移植してヒト肝キメラ NOG-TKm30-Alb/Agp1 dKO マウスを作製した。それらのマウス肝臓におけるヒト薬物代謝関連遺伝子の発現量解析した結果を図 3 に

示す。ヒト化肝臓における薬物代謝関連遺伝子の発現量に大きな差が認められなかったことから、宿主マウスのアルブミン、および、 $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質を欠損させたことによる影響は極めて小さいものと思われた。また、ヒト化肝臓マウスに残存するマウス肝細胞

図4 ヒト肝キメラ NOG-TKm30-Alb/Agp1 dKOマウスの残存マウス肝薬物代謝関連遺伝子の発現比較



の薬物代謝関連遺伝子の発現もまた、宿主マウスのアルブミン、 $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質欠損により大きな影響を受けることはなかった (図4)。これらの結果から、2つの主要な血漿タンパク (アルブミン、および、 $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質) を欠損した宿主マウスを基盤としたヒト肝キメラマウスでは低分子医薬品の体内動態がヒトに近づくことが期待された。

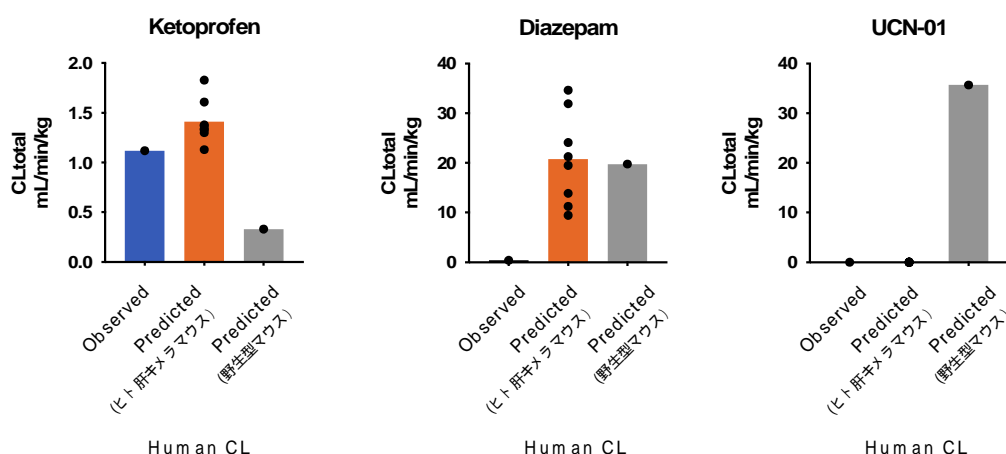
野生型マウスとヒト肝キメラ NOG-TKm30-Alb/Agp1 dKO マウスで薬物の代謝能、および、血中タンパク結合能のヒト化により薬物代謝クリアランスに差が生じるかどうかをアロメトリックスケーリングによるヒト予測で評価を行った。

$$Clearance_{human} = Clearance_{humanized-liver\ mice} \times (BW_{human} / BW_{humanized-liver\ mice})^{0.75}$$

図5 ヒトクリアランス予測値算出の計算式

アルブミンに結合性の高い化合物として Ketoprofen と Diazepam を用い、 $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質に結合性の高い化合物として UCN-01 を用いてそれぞれを野生型 ICR マウス、ヒト肝キメラ NOG-TKm30-Alb/Agp1 dKO マウスに静脈内投与し、液体クロマトグラフィー・質量分析法により血中薬物濃度を経時的に測定した。ヒトクリアランス予測値は図5の式

図6 ヒト肝キメラ NOG-TKm30-Alb/Agp1 dKOマウスを用いたアロメトリックスケーリングによるヒト薬物代謝クリアランスの予測



により計算した。Ketoprofen、Diazepam、および、UCN-01 の薬物代謝クリアランスヒト実測値との比較を図6に示す。アルブミンに結合性の高い Ketoprofen のヒト肝キメラ NOG-TKm30-Alb/Agp1 dKO マウスにおけるヒト薬物代謝クリアランス予測値は、ヒト実測値に大きく近づき、良好であった。また、 $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質に結合性の高い UCN-01 のヒト肝キメラ NOG-TKm30-Alb/Agp1 dKO マウスにおけるヒト薬物代謝クリアランス予測値は、ほぼヒト実測値と同様に低値であり良好であった。一方、アルブミンに結合性の高

い Diazepam についてはヒト肝キメラ NOG-TKm30-Alb/Agp1 dKO マウスを用いてもヒト薬物代謝クリアランス予測値は野生型マウスと同レベルであり、ヒト実測値との間に大きな乖離が見られた。

4) ヒト化胎児性 Fc γ 受容体を発現する NOG マウスの作製

ヒト型胎児性 Fc γ 受容体(FcRn)は 2 ミクログロビン(B2M)と 2 量体を形成するため両タンパクを融合させた一本鎖タンパクとして発現する遺伝子導入マウスの作製を試みた。NOG マウスの受精卵前核期に B2M-FcRn 発現ユニットをマイクロインジェクション法により注入し、定法に従い遺伝子導入マウスを作出した。取得した 26 匹のファウンダーマウスのうち、導入遺伝子を有する個体は 1 個体であった。この個体におけるヒトアルブミンの血中半減期を野生型マウスと比較したところ、半減期の延長は認められなかった。また、抗 FcRn 抗体を用いて血液細胞におけるヒト FcRn 分子の発現を調べたところ、FACS 解析で陽性所見は得られなかった。FcRn 分子はアルブミンの他、イムノグロブリンのリサイクリングにも関与することから、低分子化合物のみならず抗体医薬品の体内動態制御に重要な分子である。そのため、ヒト FcRn 分子の発現が本来の発現を反映するように、マウス FcRn 遺伝子領域にヒト FcRn 遺伝子を挿入したノックインマウスの作製に計画を変更した。マウス FcRn 遺伝子の翻訳開始コドン ATG 以降をヒト FcRn 遺伝子配列に置換するため、NOG マウスの受精卵を用いた CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行い、28 匹のファウンダーマウスを取得した。PCR 解析による 1 次スクリーニングで 14 個体がヒト FcRn 遺伝子を保有することが判明した。これらの個体について、相同組換え配列の 5'側、および、3'側を認識する PCR プライマーとヒト FcRn 遺伝子を認識するプライマーで解析したところ、7 個体で PCR 産物が認められ、うち 3 個体では期待通りの産物サイズであった。これら 3 個体について塩基配列解析を行った結果、相同領域、および、ヒト FcRn 遺伝子コーディング領域に変異がない 1 個体のヒト FcRn 遺伝子ノックインマウス(NOG-FcRn KI)の取得に成功した。

体内分布のヒト型化による薬物動態特性の外挿性と予測確度の向上をめざした本研究では、3 系統の遺伝子改変マウスの作製を行った。B6/129 ES を使って作製されたアルブミン欠損マウスは NOG マウスへの戻し交配により免疫不全化されたが、繁殖効率の低さが影響し動物数の確保に支障があった。そこで NOG-AKIb KO マウスについては、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で異なる系統の開発を進めており、今後、繁殖性の改善について検証を行う予定である。また、ヒト FcRn 遺伝子ノックインマウスについては機能評価を進めるとともに、2 量体の他方、ヒト 2 ミクログロビンのヒト型遺伝子発現の必要性を検討する予定である。

本研究では主要血漿タンパク(アルブミンと α 1 酸性糖タンパク)を欠損するマウスを宿主とすることにより血漿タンパクの組成を高度にヒト型化することに成功した。今後は本モデルマウスの有用性を示すため、タンパク結合性に種差のある化合物について解析データの収集を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uehara Shotaro, Higuchi Yuichiro, Yoneda Nao, Kawai Kenji, Yamamoto Masafumi, Kamimura Hidetaka, Iida Yuichi, Oshimura Mitsuo, Kazuki Yasuhiro, Yamazaki Hiroshi, Hikita Hayato, Takehara Tetsuo, Suemizu Hiroshi	4. 巻 42
2. 論文標題 An improved TK-NOG mouse as a novel platform for humanized liver that overcomes limitations in both male and female animals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100410 ~ 100410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2021.100410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------