

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03173

研究課題名(和文)人工染色体技術による複合的ヒト化薬物代謝モデルラットの作製

研究課題名(英文) Generation of humanized rats expressing multiple drug-metabolizing enzyme-related genes using mammalian artificial chromosome technologies

研究代表者

香月 康宏 (KAZUKI, Yasuhiro)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：90403401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：薬物代謝関連遺伝子をヒトと実験動物で置き換えたヒト化動物は、ヒト特異的な薬物代謝や安全性を予測する上で大きな役割を果たすと考えられる。本研究では実験動物の中でも経時採血が可能、毒性試験等の背景データが豊富なラットを用いてヒト化動物を作製することを目的とした。具体的にはマウス人工染色体技術およびゲノム編集技術を用いて、ヒト特異的な薬物代謝・誘導に関わる以下の2種類のヒト化ラットの作製を行った。CYP3A遺伝子群およびPXR遺伝子を保持する完全ヒト化CYP3A/PXRラット、さらにCYP3A遺伝子群およびMDR1遺伝子を保持する完全ヒト化CYP3A/MDR1ヒト化ラットの作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したヒト薬物代謝関連遺伝子をヒト化したモデルラットはこれまでに開発されたヒト化マウスの特徴と、マウスにはないラットの特徴(経時採血が容易、背景データが豊富など)の両方の特徴を兼ね備えており、これまでのヒト化マウスよりも、ヒトの薬物代謝や毒性を予測するために有用なモデルになると考えられる。また、複合的なヒト化ラットの作製を行った本研究開発によって、ヒトに対する安全性予測が向上すると共に、医薬品開発のスピードアップと成功確率が向上し、新薬開発の低コスト化、ひいては国民医療負担を減らすことにつながるインパクトを与え、ライフ・イノベーションの推進に大きく貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Humanized animals, in which drug metabolism-related genes of experimental animals are replaced into those of humans, are considered to play a major role in predicting human-specific drug metabolism and safety. In this study, we aimed to generate humanized animals using rats that can collect blood over time and have abundant background data such as toxicity tests among experimental animals. Specifically, using mouse artificial chromosome technology and genome editing technology, we generated the following two types of humanized rats that are involved in human-specific drug metabolism and induction. We have successfully generated fully humanized CYP3A/PXR rats that retain the CYP3A gene cluster and PXR gene, and fully human CYP3A/MDR1 rats that retain the CYP3A gene cluster and MDR1 gene.

研究分野：染色体工学

キーワード：リサーチバイオリソース ヒト化モデル動物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一般的に新薬開発過程における薬物代謝・安全性試験は実験動物を用いて進められているが、実験動物とヒトでは薬物代謝酵素やその関連因子の特性に種差があり、実験動物で得られた結果からヒトでの薬物代謝や安全性を予測できない場合が多い。したがって、薬物代謝関連遺伝子をヒトと実験動物で置き換えたヒト化動物は、ヒト特異的な薬物代謝や安全性を予測する上で大きな役割を果たすと考えられる。これまでにヒト化薬物代謝モデルマウスが作製されてきたが、薬物代謝酵素遺伝子は多くが Mb 単位の巨大な遺伝子クラスターとして存在するため、従来技術では一部の遺伝子しか導入できないという問題点があり、実用化には至っていないのが現状である。

我々はこの課題を克服するために、Mb サイズの遺伝子・複数の遺伝子が制限なく搭載可能なマウス人工染色体(MAC)ベクターの開発を試みてきた。これまでに人工染色体技術を用いて、本研究提案の基盤となる「ヒト化 CYP3A マウス」の開発に成功した。薬物代謝に最も重要とされる CYP3A 遺伝子クラスター(3A4, 3A5, 3A7, 3A43 からなる)の約 1 Mb の染色体領域を染色体クロニング法を用いて MAC ベクター上に搭載し、内在の Cyp3a 遺伝子群を破壊したマウスに CYP3A-MAC を導入することで、「完全にヒト型化」した CYP3A-MAC マウスの作製にも成功した。また、ヒト薬物代謝に重要とされる CYP2C クラスター、UGT2 遺伝子クラスター、MDR1、PXR 遺伝子のヒト化マウスの作製にも成功し、薬物代謝能がヒト肝臓・小腸と同等であることが確かめられている。

一方、ラットは経時採血が可能、これまでの毒性試験や発癌試験はラットが多く用いられたきたため背景データと比較可能、などの特徴を兼ね備えており、マウスよりも有用なモデル動物であるが、技術的ハードルの高さから複合的な遺伝子を持つヒト化薬物代謝モデルラットはこれまでに作製されていない。我々は研究分担者である生理研の平林らによって樹立されたラット ES 細胞へ上記人工染色体技術を適用することで CYP3A 導入ラットの作製に世界で初めて成功した。また、任意部位を切断することで部位特異的に効率的に変異挿入が可能なゲノム編集技術(TALEN/CRISPR)により、Cyp3a 遺伝子破壊ラットの作製にも成功した。さらに、CYP3A 導入ラットと Cyp3a 遺伝子破壊ラットを交配することで完全ヒト化 CYP3A ラットの作製に成功した。さらに UGT2 遺伝子クラスター(1.5Mb, 10 遺伝子群)についても、同様の手法を用いてヒト化ラットの作製に成功した。一方、種差に関わる CYP 遺伝子群、トランスポーター、核内受容体などについてヒト化できていないのが現状である。以上のことから、人工染色体技術を用いて、これまでに成功している CYP3A や UGT2 以外のヒト薬物代謝関連遺伝子群をラットに導入し、ゲノム編集技術を用いて対応するラット遺伝子を破壊することで、ヒトの薬物代謝や毒性を外挿できるヒト薬物代謝モデルラットを開発できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では医薬品開発のスピードアップと成功確率の向上を目指して、実験動物の中でも経時採血が可能、毒性試験等の背景データが豊富なラットを用いてヒト化動物を作製することを目的とした。具体的には 1) 巨大な遺伝子・複数の遺伝子が搭載可能な独自の人工染色体技術を用いて、ヒト特異的な薬物代謝に関わる、CYP3A 遺伝子群、PXR 遺伝子群、MDR1 遺伝子などのヒト遺伝子群をラットへ導入し、2) ゲノム編集技術を用いて上記に対応したラット遺伝子群を破

壊し、3)複合的に薬物代謝関連遺伝子をヒト化したラットを作製し、4)薬物代謝や安全性を評価し、ヒトを外挿できるモデル動物の作製を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) Pxr 破壊ラットの系統維持

これまでに作製済みの Pxr 破壊ラットの雄と雌を交配し、得られた子孫個体について Pxr 遺伝子領域特異的なプライマーを用いて PCR 解析を行い、Pxr 遺伝子破壊を確認した。

#### (2) Cyp3a 破壊ラットの系統維持

これまでに作製済みの Cyp3a 破壊ラットの雄と雌を交配し、得られた子孫個体について Cyp3a 遺伝子領域特異的なプライマーを用いて PCR 解析を行い、Cyp3a 遺伝子破壊を確認した。

#### (3) Mdr1 破壊ラットの系統維持

これまでに作製済みの Mdr1 破壊ラットの雄と雌を交配し、得られた子孫個体について Mdr1 遺伝子領域特異的なプライマーを用いて PCR 解析を行い、Mdr1 遺伝子破壊を確認した。

#### (4) 完全ヒト化 CYP3A/PXR ラットの作製

ヒト CYP3A 遺伝子導入ラット、ヒト PXR 遺伝子導入ラット、ラット Cyp3a 破壊ラット、ラット Pxr 破壊ラット、をそれぞれ交配し、得られた子孫個体について、上述のそれぞれの遺伝子領域特異的なプライマーを用いて PCR 解析を行い、遺伝子破壊、遺伝子導入を確認した。

#### (5) 完全ヒト化 CYP3A/PXR ラットの in vitro 解析

(4) で作製したヒト化 CYP3A/PXR ラットを用いて、in vitro での評価を実施した。ヒト化 CYP3A/PXR ラットにおける薬剤応答性を確認するため、ヒト PXR 活性化剤リファンピシンを経口投与し、肝および小腸における CYP3A4 mRNA をリアルタイム PCR により定量した。また、肝ミクロソームを調製し、CYP3A 基質であるトリアゾラム代謝活性を測定した。

#### (6) 完全ヒト化 CYP3A/PXR ラットの in vivo 解析

(4) で作製したヒト化 CYP3A/PXR ラットを用いて、in vivo での評価を実施した。ヒト化 CYP3A/PXR ラットにおける薬剤応答性を in vivo で確認するため、ヒト PXR 活性化剤リファンピシンを経口投与した後に、CYP3A 基質であるトリアゾラムを経口投与し、経時的に採血し、得られた血漿を用いてトリアゾラムおよびその代謝物濃度を LC-MS/MS を用いて測定した。

#### (7) CYP3A-MDR1-MAC 導入ラットの作製

これまでに作製済みのヒト CYP3A 遺伝子クラスターとヒト MDR1 遺伝子が搭載された人工染色体ベクター (CYP3A-MDR1-MAC) をラット ES 細胞に微小核細胞融合法を用いて導入した。CYP3A および MDR1 遺伝子領域特異的なプライマーを用いて PCR 解析を行い、FISH 解析を用いて、目的の CYP3A-MDR1-MAC が導入されたクローンを選定した。さらに選定したラット ES クローンをを用いてキメララット作製を行った。さらに正常ラットとの交配によって、子孫伝達個体を得た。

#### (8) 完全ヒト化 CYP3A/MDR1 ヒト化ラットの作製

ヒト CYP3A/MDR1 遺伝子導入ラット、ラット Cyp3a 破壊ラット、ラット Mdr1 破壊ラット、をそれぞれ交配し、得られた子孫個体について、上述のそれぞれの遺伝子領域特異的なプライマーを用いて PCR 解析を行い、遺伝子破壊、遺伝子導入を確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) Pxr 破壊ラットの系統維持

得られた Pxr 破壊ラット子孫個体について PCR 解析を行い、全ての個体において Pxr 遺伝子破壊を確認した。

#### ( 2 ) Cyp3a 破壊ラットの系統維持

得られた Cyp3a 破壊ラット子孫個体について PCR 解析を行い、全ての個体において Cyp3a 遺伝子破壊を確認した。

#### ( 3 ) Mdr1 破壊ラットの系統維持

得られた Mdr1 破壊ラット子孫個体について PCR 解析を行い、全ての個体において Mdr1 遺伝子破壊を確認した。

#### ( 4 ) 完全ヒト化 CYP3A/PXR ラットの作製

得られた子孫個体について、PCR 解析を行い、雄由来からは 20-30%、雌由来からは 40-50%の頻度で目的の完全ヒト化 CYP3A/PXR ラットが得られた。これらの個体を以下の( 5 )および( 6 )の解析に使用した。

#### ( 5 ) 完全ヒト化 CYP3A/PXR ラットの in vitro 解析

( 4 ) で作製したヒト化 CYP3A/PXR ラットに、ヒト PXR 活性化剤リファンピシンを経口投与し、肝および小腸 CYP3A4 発現量および酵素活性への影響を調べた。肝および小腸における CYP3A4 mRNA をリアルタイム PCR により定量し、ヒト化 CYP3A4 ラットとの比較を行ったところ、リファンピシン投与による CYP3A4 mRNA の増加は CYP3A/PXR ラットのみ認められた。また、肝ミクロソームを調製し、CYP3A 基質であるトリアゾラム代謝活性を測定することにより、作製したヒト化 CYP3A/PXR ラットにおいて機能的な酵素誘導が引き起こされるか検討したところ、ヒト化 CYP3A/PXR ラットのみ酵素活性の上昇が認められた。

#### ( 6 ) 完全ヒト化 CYP3A/PXR ラットの in vivo 解析

( 4 ) で作製したヒト化 CYP3A/PXR ラットに、ヒト PXR 活性化剤リファンピシンを経口投与した後、CYP3A 基質であるトリアゾラムを経口投与した。経時的に採血し、得られた血漿を用いてトリアゾラムおよびその代謝物濃度を LC-MS/MS を用いて測定したところ、リファンピシン前投与によるトリアゾラム血中濃度の低下、および代謝物濃度の上昇が認められた。作製したヒト化 CYP3A/PXR ラットは機能的な酵素誘導が引き起こされることを明らかとなった。

#### ( 7 ) CYP3A-MDR1-MAC 導入ラットの作製

CYP3A-MDR1-MAC をラット ES 細胞に微小核細胞融合法を用いて導入したところ、薬剤選択によって 24 クローンを樹立した。次に PCR 解析を行ったところ、12 種類のヒト CYP3A およびヒト MDR1 遺伝子領域特異的な PCR プライマーで全てが陽性であったクローンは 24 クローン中、19 クローンであった。また、FISH 解析を行ったところ、目的の核型で独立に CYP3A-MDR1-MAC が保持されているクローンは 24 クローン中、6 クローンであった。次にラット胚 49 個に上記 ES 細胞をインジェクションし、仮親の子宮に移植したところ、GFP 陽性のキメラ個体が 16 匹出生した。さらに正常ラットとの交配によって、子孫伝達個体を得た。雄由来からは 20-30%、雌由来からは 40-50%の頻度で CYP3A-MDR1-MAC 導入ラットが得られた。

#### ( 8 ) 完全ヒト CYP3A/MDR1 ヒト化ラットの作製

得られた子孫個体について、PCR 解析を行い、雄由来からは 20-30%、雌由来からは 40-50%の頻度で目的の完全ヒト化 CYP3A/MDR1 ラットが得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 香月加奈子、香月康宏	4. 巻 293
2. 論文標題 染色体導入技術とゲノム編集技術によるヒト化動物・疾患モデル細胞の作製	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 812-819
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森脇崇史、香月康宏	4. 巻 52
2. 論文標題 マウス人工染色体を用いたヒト化マウス・ラット作製と創薬研究への応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 424-427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岸間菜々美、山崎匡太郎、香月康宏	4. 巻 41
2. 論文標題 哺乳類ゲノムをデザイン・構築・解析するための染色体工学技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学（羊土社）	6. 最初と最後の頁 424-428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18958/7189-00002-0000373-00	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 6件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 染色体工学技術の開発と応用
3. 学会等名 第5回ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 マウス/ヒト人工染色体によるヒト化動物作製と創薬研究への応用
3. 学会等名 第10回 実験動物科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Genki Minegishi, Kaoru Kobayashi, Miyuki Sato, Mayaka Ehara, Kanako Kazuki, Satoshi Abe, Yasuhiro Kazuki
2. 発表標題 PXRとCYP3Aを同時にヒト化したラットの薬物間相互作用解析における有用性
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 染色体工学技術によるデザイナー細胞・動物の作製と応用
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 15.0 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 染色体工学技術によるヒト化モデル動物・多機能細胞の作製と創薬研究への応用
3. 学会等名 第32回 新薬創製談話会「シン・新薬創製談話会」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 染色体工学技術によるデザイナー細胞・動物の作製と創薬研究への応用
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 染色体工学技術によるヒト化モデル動物・多機能細胞の作製と創薬研究への応用
3. 学会等名 第4回医薬品毒性機序研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 人工染色体技術によるデザイナー細胞・動物の作製とゲノム動作原理の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 ヒト/マウス人工染色体によるデザイナー細胞・動物の作製と創薬研究への応用
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 マウス/ヒト人工染色体によるヒト化モデル動物の作製と創薬研究への応用
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 Application for drug discovery using mammalian artificial chromosomes and genome editing technology
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 マウス人工染色体とゲノム編集によるヒト化モデル動物の作製と創薬研究への応用
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 人工染色体技術を用いた創薬研究への応用
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 人工染色体技術によるデザイナー細胞・動物の作製と創薬研究への応用
3. 学会等名 令和2年度BINDS公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 香月康宏
2. 発表標題 人工染色体を用いたデザイン細胞・動物の創成
3. 学会等名 第3回ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

〔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
研究 分担者	平林 真澄  (HIRABAYASHI Masumi)  (20353435)	生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・准教授   (63905)	

	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
研究 協力者	小林 カオル  (KOBAYASHI Kaoru)  (30255864)		

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
---------	---------