

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390040

研究課題名（和文）P-糖蛋白/CYP3A ヒト型マウスの創製とヒト薬物動態研究への有用性

研究課題名（英文）Creation of CYP3A<sup>-</sup> and P-glycoprotein-humanized mouse and its application to the study of drug metabolism and disposition

研究代表者

千葉 寛 (CHIBA KAN)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40159033

研究成果の概要（和文）：

最も重要な薬物代謝酵素である CYP3A をヒト人工染色体技術を応用してヒト型化したマウス（CYP3A-HAC マウス）を作成し、薬物動態研究への有用性を検討した。その結果、CYP3A-HAC マウスはヒトとほぼ同じ CYP3A の特性を示すことが明らかとなり、ヒトにおける薬物動態の評価に有用であることが示された。一方、P-糖蛋白及び pregnone X receptor をヒト化したマウスについては、作成が終了し、現在有用性に関する評価を行っている。

研究成果の概要（英文）：

CYP3A is the most important subfamily of cytochrome P450s in humans, which metabolizes around 50% of therapeutic agents. We have created humanized mouse (CYP3A-HAC mouse) which carries human CYP3A instead of mouse Cyp3a, using human artificial chromosome system. This mouse shows similar characteristics as human for the tissue- and stage-specific expression of CYP3A genes and metabolism of various therapeutic agents. Thus, this mouse is considered to be valuable for the prediction of human drug metabolism. As for P-glycoprotein- and pregnane X receptor-humanized mice, they have also been developed and their function and valuableness for the prediction of human drug metabolism are undertaken.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物代謝・応用動物

1. 研究開始当初の背景  
市販薬の約 50% を代謝する薬物代謝酵素で

ある cytochrome P450 3A (CYP3A) は主に肝と小腸に発現しており、経口投与された薬物

の血中濃度の制御に重要な役割を果たしている。このため、CYP3A で代謝される薬物のバイオアベイラビリティは肝代謝にくわえ、消化管代謝を考慮する必要がある。また、CYP3A の阻害や誘導に関連した薬物相互作用の事例は非常に多く、ヒトにおける CYP3A を介した薬物相互作用の予測は、新規医薬品の開発において重要な課題となっている。しかしながら、CYP3A の特性は動物とヒトで異なるため、ヒトにおけるバイオアベイラビリティや薬物相互作用を動物実験から予測するには限界がある。そこで、HAC ベクターシステムの染色体転座型クローニング方法を用いて、ヒト CYP3A 遺伝子クラスター (CYP3A4, CYP3A43, CYP3A5, CYP3A7) およびその制御領域を含む約 700kb を HAC ベクターにクローニングした。次にその CYP3A-HAC ベクターをマウス ES 細胞へ MMCT 法にて導入し、キメラマウスを作製後、交配することで、CYP3A-HAC ベクターを導入したマウス (CYP3A-HAC マウス) を作製した。また、完全な CYP3A ヒト化マウスを作製するために、マウスの内在性 Cyp3a 遺伝子クラスターが破壊されたマウス (Cyp3a-KO マウス) を作製し、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスを作製した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は CYP3A-HAC マウスが薬物動態研究に有用なヒト型モデルとなりうるかについて検証するとともに、CYP3A に加えて P-糖蛋白 (PGP)、pregnane X receptor (PXR) などをヒト化したマウスを作成し、これらのヒト化マウスの有用性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物

野生型マウス (C57BL/6Cr)、Cyp3a ノックアウトマウス (Cyp3a-KO)、および Cyp3a-KO のバックグラウンドを持つ

CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスは 10-18 週齢の雄を使用した。本研究は実験動物の取り扱いガイドラインに従って行われ、鳥取大学および千葉大学の動物実験委員会において承認された。

### (2) 誘導剤投与

PCN は corn oil に溶解し、100 mg/kg/day の用量でマウス (野生型、Cyp3a-KO および CYP3A-HAC/Cyp3a-KO) に 4 日間腹腔内投与した。また、コントロールとしては corn oil を同一条件で投与した。

### (3) mRNA 発現量の測定

各個体の肝臓および小腸上部から total RNA

を抽出し、逆転写により cDNA を得た。これを鋳型とし RT-PCR 法あるいは TaqMan プロブを用いたリアルタイム PCR 法により mRNA 量を測定した。

### (4) 酵素活性の測定

常法により肝および小腸ミクロソームを調製し、CYP3A 基質であるトリアゾラムの  $\alpha$  位および 4 位水酸化活性を測定した。代謝物の定量は HPLC-UV 法により行った。

## 4. 研究成果

### (1) CYP3A 分子種の発現プロファイル

ヒト型 CYP3A 遺伝子クラスターを導入したマウス (CYP3A-HAC マウス) では、ヒト組織と同様に肝臓と小腸に CYP3A4 mRNA の発現が認められた (図 1)。

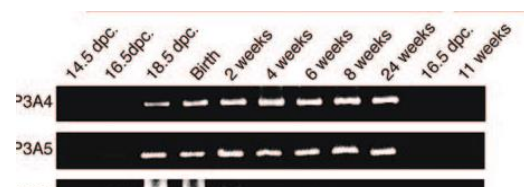
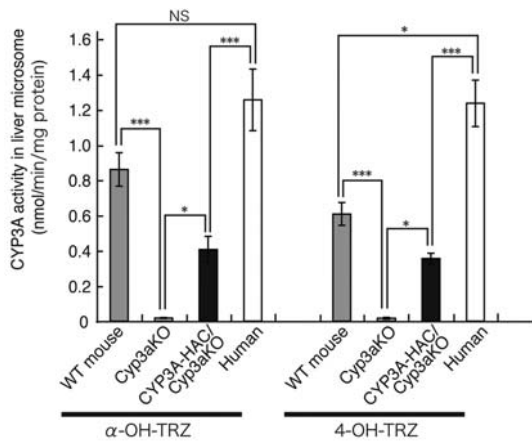


図 1. CYP3A-HAC マウスの各種臓器におけるヒト CYP3A 分子種の発現

また、成体期特異的に発現する CYP3A4 は成体期に、胎仔期特異的に発現する CYP3A7 は胎仔期にそれぞれ発現し、CYP3A 分子種の時期特異的な発現も再現された。さらに、マウス Cyp3a 遺伝子クラスターをノックアウトし、ヒト CYP3A クラスターを導入した CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスでは、CYP3A 誘導剤により肝と小腸における CYP3A4 mRNA および CYP3A タンパクの発現が強く誘導された。

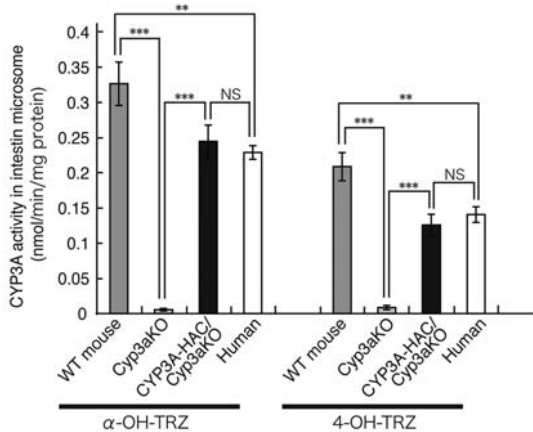
### (2) 薬物代謝能

CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスにおける薬物代謝能を明らかにするため、野生型マウス、Cyp3a-KO マウスおよび CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの肝ミクロソームを用いて CYP3A 基質であるトリアゾラムの代謝活性を測定した。内在性マウス Cyp3a のノックアウトにより代謝活性はほぼ完全に消失したが、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスにおいては市販のプールドヒト肝ミクロソームの 30%程度に相当する活性値を示したことから、HAC ベクターにより導入したヒト CYP3A は機能的であることが示唆された (図 2)。ヒト肝ミクロソームの CYP3A 活性には大きな個人差が存在するが、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの肝ミクロソームにおける代謝活性は、低活性のヒト肝ミクロソームに相当すると考えられる。



**図 2. 野生型、Cyp3a-KO、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスおよびヒトの肝ミクロソームにおけるトリアゾラム水酸化活性**

これに対し、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの小腸ミクロソームにおける代謝活性はプールドヒト小腸ミクロソームにおける代謝活性とも同等の値であった (図 3)。このことより、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスは CYP3A を介した小腸代謝に関するインビボモデルとして応用可能であると考えられた。また、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの肝における CYP3A4 の発現量を高めるため、マウスに導入する HAC ベクターのコピー数を増やす等の対策について現在検討中である。



**図 3. 野生型、Cyp3a-KO、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスおよびヒトの小腸ミクロソームにおけるトリアゾラム水酸化活性**

一方、ヒト CYP3A の代表的基質であるミダゾラムの代謝に関しては、マウスでは CYP2C 分子種が一部寄与する。このため、Cyp3a-KO

マウスでも野生型の半分程度の活性が認められ、その活性は CYP3A 誘導剤投与により上昇した。この原因として、Cyp3a のノックアウトによる CYP2C 分子種の発現増加および CYP3A 誘導剤によるマウス CYP2C の誘導が挙げられる。これらの結果より、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスを用いたバイオアベイラビリティの予測に関しては、薬物代謝における CYP2C 分子種の寄与を無視できないことが示唆された。CYP3A のノックアウトによるマウス CYP2C 分子種の発現増加は、十分量の CYP3A4 を発現した CYP3A4 トランスジェニックマウスでは、野生型マウスにおける発現レベルまで減少している。したがって、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスにおいても、CYP3A 分子種の発現量を増加させることによりマウス CYP2C 分子種の発現を低下させるのではないかと期待している。

### (3) ヒト CYP3A 阻害作用の予測

インビトロ実験系を用いた薬物相互作用の予測に関しては、ヒト肝ミクロソーム、P450 発現系、ヒト初代培養肝細胞、レポータージェンアッセイ等の実験系が検討され、その有用性が示されている。一方、インビボ実験系を用いた薬物相互作用の予測については、肝臓と消化管の両方にヒト CYP3A を発現するようなモデル動物がないために、CYP3A による薬物代謝の種差が常に問題となってきた。そこで、代表的な CYP3A の阻害機構である mechanism-based inhibition (MBI) に焦点をあて、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスがヒトにおける薬物相互作用を再現できるか否かについて検討した。エリスロマイシンはヒト CYP3A に対して MBI 作用を示す代表的な阻害剤であるが、ラットおよびマウスの CYP3A に対しては非常に弱い MBI 作用しか示さない。しかし、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの肝ミクロソームにおけるトリアゾラム代謝に対しては、ヒト肝ミクロソームを用いた場合と同様にエリスロマイシンが MBI 作用を示した。CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの小腸ミクロソームについても、ヒト小腸ミクロソームを用いた場合と同様にエリスロマイシンによる MBI 作用が認められた。他の複数の CYP3A 阻害剤を用いて検討した結果、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスの肝ミクロソームとヒト肝ミクロソームでは CYP3A を介するトリアゾラム代謝に対する CYP3A 阻害剤の作用が良く一致することが明らかとなった (図 4)。このことより、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスは CYP3A の阻害に関する薬物相互作用を予測する有用なモデルとなる可能性が考えられた。

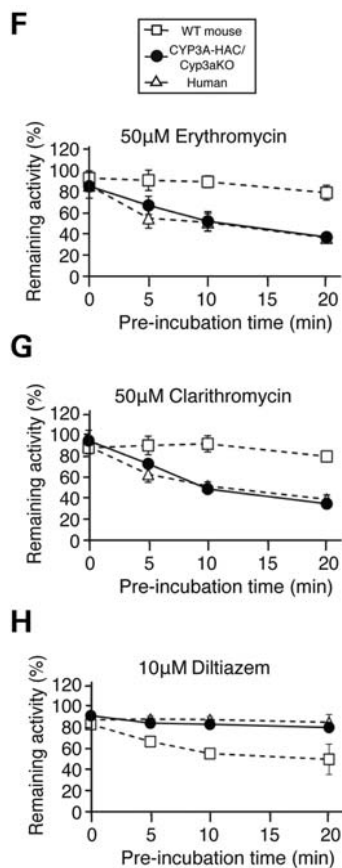


図4. 野生型、CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスおよびヒトの肝ミクロソームにおけるトリアゾラム 4 位水酸化活性に対するエリスロマイシン、クラリスロマイシンおよびジルチアゼムによる時間依存的阻害

(4) P-糖蛋白及び PXR のヒト型マウスを作成が終了し、CYP3A-HAC マウスと掛け合わせることで、CYP3A-PGP-HAC 及び CYP3A/PXR-HAC マウスの作成を現在行っている。完成次第、機能評価と薬物動態研究への有用性を検証したい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

(1) Kazuki Y, Kobayashi K, Aueviriyavit S, Oshima T, Kuroiwa Y, Tsukazaki Y, Senda N, Kawakami H, Ohtsuki S, Abe S, Tagiguchi M, Hoshiya H, Kajitani N, Takehara S, Kubo K, Terasaki T, Chiba K, Tomizuka K, Oshimura M. Trans-chromosomal mice containing a human CYP3A cluster for prediction of xenobiotic metabolism in humans. *Hum Mol Genet.* 査読有, 22(3):578-92 (2013).

(2) Aueviriyavit S, Kobayashi K, Chiba K. Species differences in mechanism-based inactivation of CYP3A in humans, rats and mice. *Drug Metab Pharmacokinet.* 査読有, 25(1):93-100 (2010).

[学会発表] (計12件)

Mio Watanabe, Sasitorn Aueviriyavit, Kaoru Kobayashi, Nahoko Iuchi, Yasuhiro Kazuki, Mitsuo Oshimura and Kan Chiba HUMANIZED CYP3A MICE: (2) FUNCTIONAL EXPRESSION OF HUMAN CYP3A ISOFORMS IN CYP3A-HAC MICE AND INHIBITION OF CYP3A VIA MECHANISM-BASED INACTIVATION (ポスター発表) 9th International ISSX Meeting · Istanbul Turkey · 2010/9/4-8

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 寛 (CHIBA KAN)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号: 40159033

(2) 研究分担者

小林 カオル (KOBAYASHI KAORU)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 30255864

降幡 知巳 (FURIHATA TOMOMI)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 80401008

(3) 連携研究者

香月 康宏 (KAZUKI YASUHIRO)  
鳥取大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90403401