

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390030

研究課題名(和文) ヒト型肝臓動物モデルを利用した化学物質のヒトリスク評価

研究課題名(英文) Risk assessment of chemicals using chimeric mice with humanized liver

研究代表者

太田 茂(OHTA, SHIGERU)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：60160503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：世界中で農薬・工業原料・医薬品などの化学物質が用いられているが、ヒトに対するリスク評価が重要となる。実験動物を用いたリスク評価では、実際のヒトとの毒性種差の問題から精度よくリスク評価ができない可能性も想定される。そこで、マウスにヒトの肝細胞を移植した「ヒト肝細胞移植キメラマウス」を用い、化学物質の肝臓における毒性を指標としたリスク評価系の構築を行った。化学物質(医薬品)の体内動態の予測も概ね可能であったことから、肝毒性を引き起こす濃度も指標に加えることで、精度よくリスク評価ができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Various chemicals such as the agrichemicals, industrial materials, and pharmaceuticals have been used in the worldwide. It is important to assess the risk of chemicals for humans. However, the risk assessment using experimental animals could not be enough due to species differences of toxicity between animals and humans. In this study, we conducted the risk assessment using chimeric mice with humanized liver to estimate toxicity in the human liver. It would be possible to estimate the risk assessment (hepatotoxicity) in consideration of plasma concentrations at which hepatotoxicity is observed because the predictability of pharmacokinetics of chemicals (drugs) is good in chimeric mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：ヒト肝細胞移植キメラマウス 化学物質 リスク評価 薬物動態 薬物代謝

1. 研究開始当初の背景

近年、環境化学物質のうち、有害金属、工業原料、農薬などが環境中や動物、ヒトにおいて検出される報告は多く、その毒性が懸念されている。その中で、これら化学物質のヒトへの安全性は、*in vitro*毒性評価や、実験動物を用いた *in vivo* データをもとに評価が行われている。しかし、ヒトと動物での化学物質の体内動態の種差や、毒性感受性の種差、またこれらの個人差などによる不確実さによって、化学物質のヒトへのリスクを見誤る可能性もある。例えば、サリドマイドの催奇形性作用は、実験動物とヒトの種差が著しく、リスク評価が困難であった。化学物質の中には、われわれの生活に欠かせないものも多く存在するが、その有用性と毒性のバランスを考える上で、化学物質のヒトに対するリスク評価を精度よく見積もる評価法の開発が求められている。

2. 研究の目的

実験動物とヒトの化学物質の種差を克服するためにヒト化モデル動物の有用性があげられる。そのひとつに、免疫不全の性質をもつ SCID マウスと肝障害の性質をもつ uPA トランスジェニックマウスを掛け合わせたマウスにヒト肝細胞を移植した「ヒト肝細胞移植キメラマウス」がある。ヒト肝細胞移植キメラマウスは、その肝臓にヒト型の薬物代謝酵素が発現しているために医薬品におけるヒト代謝物予測に応用できる可能性が報告されている。

この背景から、本研究ではヒト肝細胞移植キメラマウスを用いてヒトにおける代謝物予測に留まらず、化学物質のヒトにおける肝臓における肝毒性評価についても、定性的もしくは定量的に予測できると考え、その検証を行うことを目的とした。その中で、様々な薬物代謝酵素によって代謝されることが知られる化合物を用いてヒト肝細胞移植キメラマウスにおける血中動態の予測性を精査する。また化学物質が薬物代謝酵素によって代謝変換され、反応性代謝物の生成に伴う肝毒性および肝臓における甲状腺ホルモン応答性遺伝子の発現を指標とした甲状腺ホルモン系かく乱作用について検証する。さらには、化学物質の長期曝露によって、生体内の薬物代謝酵素が誘導されるケースも考えられ、酵素誘導も評価に加えた。ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いて化学物質の血中動態と毒性の関係が明確になれば、血中濃度をベースとした化学物質の安全域を算出できることも期待される。

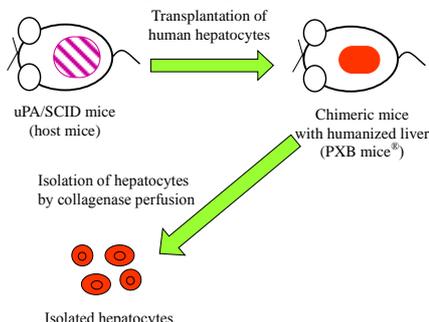


図 1 ヒト肝細胞移植キメラマウスの作成および肝細胞の単離

3. 研究の方法

本研究では uPA/SCID マウスにヒトの肝細胞を移植した「ヒト肝細胞移植キメラマウス」を用いた。ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓におけるヒトの肝細胞の置換率は、約 80% である(置換率は、マウス血液中ヒト型アルブミン濃度から算出)。

ヒト肝細胞キメラマウスに種々の検証化合物を投与し、投与物質の血中濃度測定、肝臓中における各種 mRNA 発現量を評価した。

また、ヒト肝細胞移植キメラマウスからコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を単離し(図 1)、評価化合物を添加し、各種遺伝子の mRNA 量を測定した。細胞内 ATP 濃度測定には、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を使用した。ヒト肝細胞移植キメラマウスおよび単離した肝細胞は株式会社フェニックスパイオより供与していただいた。

4. 研究成果

ヒト肝臓中に発現するチトクローム P450 (CYP) やグルクロン酸転移酵素 (UGT) などで代謝されることが報告されている解熱性鎮痛剤であるイブプロフェン、ナプロキセンをヒト肝細胞移植キメラマウスに投与し、尿中における各代謝物を質量分析装置 (LC/MS/MS) で測定し、その排泄量を評価した。その代謝物排泄プロファイルは概ね報告されるヒトのデータを反映していることを確認できた。ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓にはヒト型の CYP や UGT が発現していることが報告されており、それを支持する結果となった。

また、今まで蓄積してきたヒト肝細胞移植キメラマウスの薬物動態 (PK) のデータとヒトの PK データ報告値を用いて、single species allometric scaling 法 (eq.1,2) によりクリアランス (CL_t) 予測値、分布容積 (V_{dss}) 予測値を算出し、complex Dedrick plot 法 (eq.3,4) により予測血漿中濃度推移を算出した。評価化合物には、CYP、UGT、アルデヒドオキシダーゼ (AOX) で代謝される医薬品を用いた。

Single species allometric scaling

$$\text{Predicted CL}_t = \text{CL}_{\text{PXB mice}} \times (\text{B.W.}_{\text{human}} / \text{B.W.}_{\text{PXB mice}})^a \quad (\text{eq.1})$$

$$\text{Predicted V}_{dss} = \text{V}_{dss \text{ PXB mice}} \times (\text{B.W.}_{\text{human}} / \text{B.W.}_{\text{PXB mice}})^b \quad (\text{eq.2})$$

Complex Dedrick plot

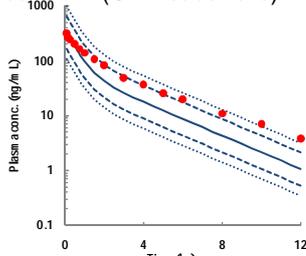
$$\text{Predicted time} = \text{Real time}_{\text{PXB mice}} \times [(\text{B.W.}_{\text{human}})^{b-a} / (\text{B.W.}_{\text{PXB mice}})^{b-a}] \quad (\text{eq.3})$$

$$\text{Predicted plasma concentrations (C}_p) = \text{C}_{p \text{ PXB mice}} \times [(\text{B.W.}_{\text{human}})^{1-b} / (\text{B.W.}_{\text{PXB mice}})^{1-b}] \quad (\text{eq.4})$$

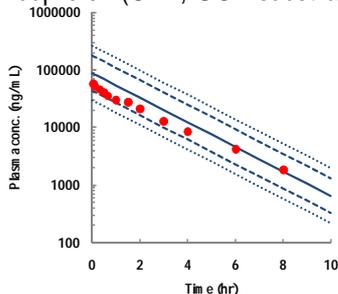
CYP3A4 の基質であるミダゾラム、CYP2C9 および UGT2B7 の基質であるイブプロフェン、AOX の基質であるファスジルの予測血漿中濃度推移は、報告されるヒトの血漿中濃度と概ね反映していた(図 2)。これらは別のヒト肝細胞を移植したヒト肝細胞移植キメラマウスにおいても

予測性は保存していた。一部の化合物(ジアゼパム)において予測が大きく外れたものもあったが(data not shown)、ヒト肝細胞移植キメラマウスは、肝臓で代謝される化合物の血漿中濃度推移予測に有用である可能性が示唆された。しかし、ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓における残存するマウス肝細胞が薬物動態の予測性に与える影響も考慮に入れる必要もある。

Midazolam (CYP substrate)



Ibuprofen (CYP, UGT substrate)



Fasudil (AOX substrate)

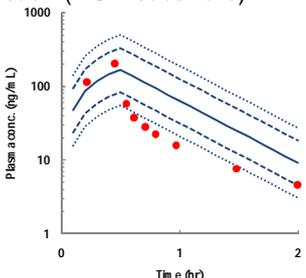


図 2 ヒト肝細胞移植キメラマウスの血漿中濃度から single species allometric scaling および complex Dedrick plot から算出したヒト予測血漿中濃度とヒト血漿中濃度(報告値; Heizmann et al., 1983, Martin et al., 1990, Nakashima et al., 1992)(青実線; 予測血漿中濃度推移、点線; 2倍、3倍の予測範囲、赤点; ヒト血漿中濃度)

ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓より肝細胞を単離し、24 穴プレートに播種後、CYP1A の誘導剤として知られているオメプラゾール(10 μ M) および CYP3A の誘導剤であるリファンピシン(5 μ g/mL)を1日2回96時間曝露させた後、肝細胞に発現するCYP1A2およびCYP3A4のmRNA発現量を測定した。結果、コントロール群に比べ10倍以上のmRNAの発現量の増加が観察された。また、残存するマウス肝細胞で発現しているcyp3a11mRNA発現量変化はヒトCYP3A4発現増加率に比べ低くなり、リファンピシンがげっ歯類よりヒトCYP3Aに特異性が高い誘導剤であるという知見を反映していた(図3)。このことから、ヒト肝細胞移植キメラマウスでは、薬物の誘導評

価にも有用である可能性が示された。今後、評価濃度や検証化合物を変えながらさらに検討を進めていく。

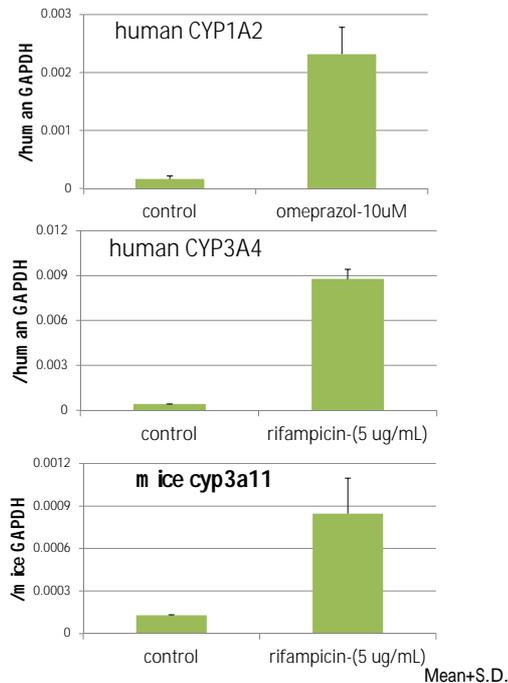


図 3 ヒト肝細胞移植キメラマウス由来肝細胞にオメプラゾール、リファンピシンを曝露後のヒトCYP1A2、CYP3A4、およびマウスcyp3a11のmRNA変動

ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓から単離した肝細胞にアセトアミノフェン(10-40mM)を24時間曝露したところ、濃度依存的に細胞内ATP濃度が減少することが示された。アセトアミノフェンの肝細胞毒性のメカニズムとして、CYP3A4、CYP2E1によって生成する反応性代謝物の寄与が知られていることから、CYP3A4およびCYP2E1に対するsiRNAを添加し、アセトアミノフェン曝露による細胞内ATP濃度を測定した。しかし、siRNAによるATP濃度の変化は見られず、代謝的活性化による毒性は反映されなかった(図4)。今後、試験法の改良しながら検討していく必要がある。

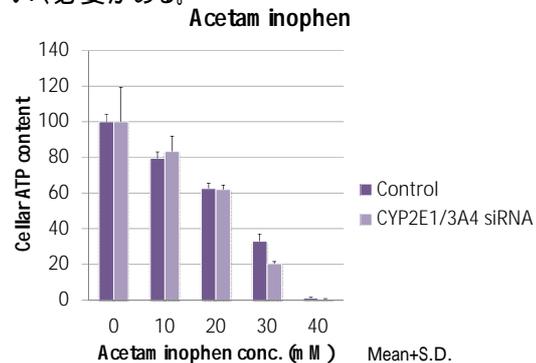


図 4 ヒト肝細胞移植キメラマウス由来肝細胞にアセトアミノフェンを曝露後の細胞内ATP濃度

肝臓中には内分泌ホルモンのひとつ甲状腺ホルモン(T3)に応答する遺伝子が複数発現していることが知られている。本研究ではラットの

試験で応答性があることが分かっている遺伝子を指標に、ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓中でのこれら mRNA 発現について評価した。ヒト肝細胞移植キメラマウスに抗甲状腺薬である propylthiouracil (PTU) を投与後、甲状腺ホルモン T3 を投与し 24 時間後の肝臓中に発現する各 mRNA 量を測定した。

PTU 投与群に対する PTU および T3 併用投与群の mRNA 変化は、DIO1 (type1 deionidase); 2.95 倍、ME (malic enzyme1); 4.37 倍、BCL3 (B-cell lymphoma 3-encoded protein); 0.76 倍、CYP7A1 (cytochrome P4507A1); 1.75 倍、THRSP (thyroid hormone responsive SPOT14); 1.84 倍、PDXK (pyridoxal kinase); 1.52 倍、SLC17A5 (solute carrier family 17 member2); 1.65 倍、UGT1A6; 1.82 倍、UGT1A7; 1.36 倍であった。

臨床で抗不整脈薬として使用されているアミオダロンはその副作用に甲状腺ホルモンに対する影響がある。アミオダロンは、甲状腺ホルモン受容体に対してアゴニスト活性を示すことを見出している (Matsubara et al., 2012)。他にも駆虫薬として用いられているピチオノール、クロサンテル、ラフォキサニドもアゴニスト活性を示した。これらの化学物質の化学構造は、甲状腺ホルモン T3 の部分構造と類似していることに起因していると考えられる。このような化学物質は、他にも存在するものと考えられ、ヒト肝細胞移植キメラマウスにおける肝臓に発現する甲状腺ホルモン応答性遺伝子の発現を指標とした評価系としても利用できる可能性がある。今後、さらなる詳細な検討を行い、その確立を目指す予定である。

本研究で用いたヒト肝細胞移植キメラマウスのホストマウスは雄を主に使用しているが、雌雄におけるヒト肝細胞移植キメラマウス肝臓中薬物代謝酵素の mRNA 量を比較したところ、ホストマウスが雌のときに高い mRNA も見られ、評価の際、雌雄差の背景も考慮にいれる必要がある (図 5)。

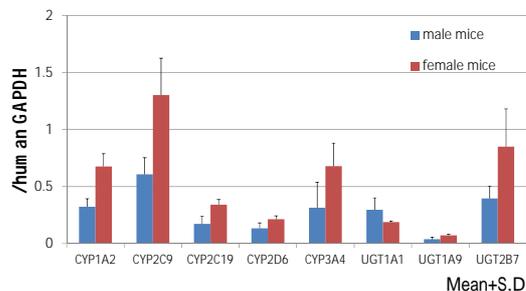


図 5 ヒト肝細胞移植キメラマウス雌雄における肝臓中薬物代謝酵素 mRNA の比較

ヒト肝細胞移植キメラマウスの肝臓ではヒト型の薬物代謝酵素が発現しており、肝臓で代謝される医薬品のヒト血漿中濃度の予測性も概ね高いことが示された。ヒト肝細胞移植キメラマウスの血液中に発現する医薬品の結合タンパクのひとつアルブミンの発現もその一助となる可能性がある。環境化学物質の中には、医薬品同様にさまざま

な薬物代謝酵素で代謝されるものが多く存在しており、化学物質全般のヒトにおける曝露量予測に有用となる可能性がある。肝細胞を用いた試験であるが、薬物代謝酵素の誘導や課題はのこされているものの、アセトアミノフェンによる肝細胞毒性も検出できた。化学物質の高濃度曝露によって薬物代謝酵素の誘導や、肝毒性を引き起こす可能性があることから、これを反映するモデル動物としても有用であるかもしれない。また、肝臓中甲状腺ホルモン応答性遺伝子の発現変化を指標とした甲状腺ホルモン攪乱作用の評価においても有用となる可能性がある。化学物質のヒトにおける1日推定曝露量が算出できれば、ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いることで、血中濃度推移、毒性評価から、化学物質の安全域を算出することができ、化学物質のリスク評価が可能となるものと考えている (図 6)。

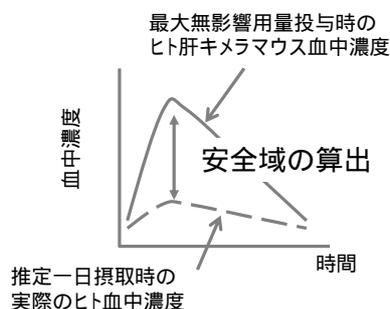


図 6 化学物質の安全域算出の考え方

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8件)

1. Sanoh S, Ohta S. Chimeric mice transplanted with human hepatocytes as a model for prediction of human drug metabolism and pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos.* 2014 Mar;35(2):71-86. doi: 10.1002/bdd.1864. (査読有)
2. Nakamura N, Matsubara K, Sanoh S, Ohta S, Uramaru N, Kitamura S, Yamaguchi M, Sugihara K, Fujimoto N. Cell type-dependent agonist/antagonist activities of polybrominated diphenyl ethers. *Toxicol Lett.* 2013;223(2):192-7. doi:10.1016/j.toxlet.2013.09.007. (査読有)
3. Tanoue C, Sugihara K, Uramaru N, Watanabe Y, Tayama Y, Ohta S, Kitamura S. Strain difference of oxidative metabolism of the sedative-hypnotic zaleplon by aldehyde oxidase and cytochrome P450 in vivo and in vitro in rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2013;28(3):269-73. (査読有)
4. Kamikyouden N, Sugihara K, Watanabe Y, Uramaru N, Murahashi T, Kuroyanagi M, Sanoh

S, Ohta S, Kitamura S.
2,5-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone: a novel major in vitro metabolite of benzophenone-3 formed by rat and human liver microsomes. *Xenobiotica*. 2013;43(6):514-9. doi: 10.3109/00498254.2012.742217. (査読有)

5. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Uramaru N, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2012 ;40(12):2267-72. doi: 10.1124/dmd.112.047555. (査読有)

6. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of in vivo hepatic clearance and half-life of drug candidates in human using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(2):322-8. doi: 10.1124/dmd.111.040923. (査読有)

7. Matsubara K, Sanoh S, Ohta S, Kitamura S, Sugihara K, Fujimoto N. An improved thyroid hormone reporter assay to determine the thyroid hormone-like activity of amidarone, bithionol, closantel and rafoxanide. *Toxicol Lett*. 2012;208(1):30-5. doi:10.1016/j.toxlet.2011.10.004. (査読有)

8. Sanoh S, Nozaki K, Murai H, Terashita S, Teramura T, Ohta S. Prediction of human metabolism of FK3453 by aldehyde oxidase using chimeric mice transplanted with human or rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(1):76-82. doi:10.1124/dmd.111.041954. (査読有)

[学会発表] (計12件)

1. 藤本真美, 佐能正剛, 成富洋一, 佐藤公也, 河村章生, 堀口彩, 杉原数美, 北村繁幸, 堀江透, 立野知世, 太田 茂, ヒト肝細胞移植キメラ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体内動態予測性評価, 日本薬物動態学会第28回年会, 2013年10月9日~2013年10月11日, タワーホール船堀(東京)

2. Sanoh S, Fujimoto N, Naritomi Y, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kitamura S, Horie T, Tateno C, Ohta S. Predictability of plasma concentration-time profiles in humans using chimeric mice with humanized liver. 10th International ISSX meeting, 2013年9月29日~2013年10月3日, Toronto(Canada)

3. 中村直樹, 佐能正剛, 松原加奈, 杉原数美, 浦丸直樹, 北村繁幸, 宮川信一, 井口泰泉, 藤本成明, 太田 茂 新生児期甲状腺ホルモン攪乱の影響-成体期肝遺伝子発現変化-, フォー

ラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2013年9月13日~2013年9月14日, 九州大学(福岡)

4. 松原加奈, 中村直樹, 佐能正剛, 杉原数美, 浦丸直樹, 北村繁幸, 宮川信一, 井口泰泉, 藤本成明, 太田 茂, 環境化学物質による甲状腺ホルモン攪乱作用の in vitro, in vivo 評価, フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012年10月25日~2012年10月26日, 名古屋

5. 松原加奈, 佐能正剛, 藤本成明, 杉原数美, 北村繁幸, 太田 茂, 環境化学物質の転写活性化を介した甲状腺ホルモン攪乱作用, 日本薬学会132年会, 2012年3月31日, 札幌

6. 佐能正剛, 堀口 彩, 杉原数美, 浦丸直人, 立野知世, 堀江 透, 北村繁幸, 太田 茂, ヒト肝細胞移植マウスを用いたイブuproフェンの代謝, 血中動態の予測, 日本薬学会132年会, 2012年3月30日, 札幌

7. 佐能正剛, 野崎和吉, 村井英継, 寺下茂之, 寺村俊夫, 太田 茂, アルデヒドオキシダーゼで代謝される FK3453 におけるヒトおよびラット肝キメラマウスを用いたヒト体内動態予測, 第26回日本薬物動態学会, 2011年11月17日, 広島

8. 堀口 彩, 佐能正剛, 杉原数美, 立野知世, 堀江 透, 北村繁幸, 太田 茂, ヒト肝キメラマウスを用いたイブuproフェンのキラル変換, 第26回日本薬物動態学会, 2011年11月17日, 広島

9. 松原加奈, 佐能正剛, 藤本成明, 杉原数美, 北村繁幸, 太田 茂, 新生仔期ラットへの甲状腺ホルモン様物質曝露による影響評価, フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011年10月28日, 金沢

10. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of PK parameters of human using human chimeric mice. 17th International Society for the Study of Xenobiotics North American Meeting, 2011年10月17日 Atlanta, Georgia, USA

11. 佐能正剛, 堀口 彩, 杉原数美, 立野知世, 堀江 透, 北村繁幸, 太田 茂, ヒトおよびラット肝キメラマウスを用いた医薬品の代謝プロファイルの予測, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会, 2011年7月11日, 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田 茂(OHTA SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号:60160503

(2)研究分担者

佐能 正剛(SANO SEIGO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・
助教

研究者番号:00552267

杉原 数美(SUGIHARA KAZUMI)

広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号:20271067

古武 弥一郎(KOTAKE YAICHIRO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・
准教授

研究者番号:20335649

藤本 成明(FUJIMOTO NARIAKI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号:40243612