

医療分野研究成果展開事業/研究成果最適展開支援プログラム (AMED・A-STEP)

平成 28 年度終了課題 事後評価報告書

プロジェクトリーダー (企業責任者)	積水メディカル株式会社 創薬支援事業部 研究員 神村 秀隆
研究責任者	国立大学法人鳥取大学 染色体工学研究センター 特任教授 押村 光雄
支援タイプ	ハイリスク挑戦タイプ
研究開発実施期間	平成 24 年 10 月 - 平成 28 年 9 月
研究開発課題	複数の遺伝子を搭載できるマウス人工染色体を用いた創薬支援ツール -次世代ヒト肝キメラマウスの開発-

1. 研究開発の目的

肝障害を有する免疫不全マウスにヒトの肝細胞を移植した「ヒト肝キメラマウス」は、開発中の薬物のヒトでの代謝、薬物動態、安全性予測のモデル動物として期待されている。しかし、共存するマウス肝細胞の影響を完全に排除することは出来ず、特にマウスで代謝され易い化合物はヒト肝細胞による置換率が 90%以上であってもマウス型の代謝しか示さない場合が頻繁に認められる。そこで、複数の遺伝子を搭載できる人工染色体技術を利用して、小腸並びに肝でのみホストマウスの代謝能を抑制した肝障害/免疫不全マウスを開発することを目的とした。このマウスにヒト肝細胞を移植することにより、評価化合物を選ばない汎用性に富んだ評価モデル動物の作製が可能となる。

2. 研究開発の概要

① 成果

薬物代謝を司る遺伝子を、部分欠失させる配列 (F 配列) で挟んだ改変型の免疫不全マウス ES 細胞、並びにそのホモマウス個体を作製した。一方、小腸及び肝での F 配列作動遺伝子、更に肝障害付与因子等の遺伝子を搭載した複数のマウス人工染色体 (MAC) を作製し、上記改変 ES 細胞に導入した。これらの ES 細胞を、ホストマウス (黒色) 胚盤胞に注入して毛色キメラを作製した。肝障害因子 C を搭載した MAC (C タイプ) を有する毛色キメラ♂と免疫不全マウス♀との交配により、2 世代産仔まで得られ、目的の遺伝子の広範囲欠失が確認された。肝障害因子 D を搭載した MAC (D タイプ) を有する毛色キメラ♂と免疫不全マウス♀との交配により、1 世代産仔まで得られた。何れのマウスも現在は凍結受精卵として維持されている。また、マウス代謝能抑制の効果を定量的に示すために、薬物動態力学による解析手法を開発した。

研究開発目標	成果および達成度
①免疫不全マウス ES 細胞に代謝制御遺伝子を導入し、次世代にも伝播されるマウスを得る。	①目的改変部位をホモで保有するマウスを得ることができ、その子孫伝達も確認した (達成度 100%)。
②MAC 技術によって導入された肝障害付与遺伝子/F配列作動遺伝子が安定的に発現し、次世代にも伝播される免疫不全マウスを得る。	②種々の遺伝子コンストラクトを作製し、無処理ES細胞に導入して免疫不全マウス作製を試みた。しかし、途中で①の代謝制御遺伝子改変 ES 細胞に直接 MAC を導入することとして、本目標のマウス個体作製作業は中断した (達成度 60%)。

<p>③目的遺伝子の検出法を開発し、ES 細胞のクローニング過程ならびにマウス各作製段階で、当該遺伝子の導入された細胞あるいはマウスの個体選別を正確に行う。</p>	<p>③開発した目的遺伝子の検出法は、ES 細胞の各改変段階、マウス個体作製段階、1世代以降のマウス個体選別に応用された(達成度 100%)。</p>
<p>④肝障害遺伝子を有して、さらに代謝関連遺伝子が KO された免疫不全マウスを得る。</p>	<p>④MAC/C タイプ系は2世代作製まで進行した。作製途中に、目的遺伝子の欠失システムの作動が確認された。一方、MAC/D タイプ系は1世代作製まで進行した(達成度 70%)。</p>
<p>⑤組織特異的代謝関連遺伝子 KO マウスの薬物代謝能が、コントロールマウスと比較して、広範に抑制されている。</p>	<p>⑤上記、肝障害遺伝子を有して、さらに代謝関連遺伝子がホモで KO された免疫不全マウスが得られていないことから、本試験は開始されていない(達成度 0%)。</p>
<p>⑥移植したヒト肝細胞が生着し、ヒト肝細胞による肝置換率が 70%以上になる。</p>	<p>⑥上記、肝障害遺伝子を有して、さらに代謝関連遺伝子がホモで KO された免疫不全マウスが得られていないことから、本試験は開始されていない(達成度 0%)。</p>
<p>⑦多岐に亘るモデル化合物の代謝様式がヒト型を示す。肝毒性薬物の投与によって、毒性バイオマーカーの変動が認められる。</p>	<p>⑦既存のヒト肝キメラマウスを用いて、代謝関連遺伝子が抑制された際の評価系を確立した。そして創薬において、Phase-I 開始以前に臨床薬物動態を効率良く予測できる可能性が示された(達成度 30%)。</p>

② 今後の展開

MAC/C 及び MAC/D タイプ何れのマウス凍結受精卵も人工染色体を保持し、代謝関連遺伝子改変部位はヘテロと考えられる。そこで、今後は MAC/D タイプを中心に凍結卵からマウス個体を作製し、自然交配によりホモ化を行う。得られたマウスを用いて、肝障害惹起並びに、代謝関連遺伝子の欠失を確認する。次いで、ヒト肝細胞を移植して「次世代ヒト肝キメラマウス」を作製する。当該マウスに、ヒト肝に比べてマウス肝で速やかに代謝される薬物を投与して、代謝パターンがヒト型になることや、臨床での血漿中濃度推移の予測が可能であることを確認する。

3. 総合所見

本研究開発課題については、ヒト肝細胞移植による目標とする動物モデルの作製には至らなかったが、ヒト肝キメラマウスの作製には成功し、機能検証は残るものの一定の成果は得られたと判断される。

本研究開発課題で目指す動物モデルは、薬物代謝の評価ツールとして有用であり、応用範囲も広がり、市場も大きいと考えられ、今後も着実に事業化に向けて推進されることを期待する。