

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）ヒト化マウスを基盤とした創薬支援プラットフォーム
（プログラム名）（英語）A drug discovery platform based on humanized mouse models

実施期間：平成29年10月16日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）末水 洋志
（英語）Suemizu Hiroshi

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
（日本語）公益財団法人実験動物中央研究所・研究部門・部門長
（英語）Central Institute for Experimental Animals
Research Department・Chair of Research Division

II 補助事業の概要

補助事業の成果およびその意義等

創薬開発における課題の1つに実験動物を用いた非臨床試験と臨床試験のギャップがあげられる。活性評価や安全性評価等の非臨床試験で十分に概念実証（Proof Of Concept；POC）したにもかかわらず、臨床試験の成功確率は依然として10%程度に止まっている。わが国のアカデミア研究機関からは標的タンパク質の立体構造解析・シーズ化合物の発見・リード探索／最適化などの優れた基礎研究により数多くの創薬候補物質が発見されてきたのに対し、非臨床試験と臨床試験のギャップを埋めるためのより有用な実験動物モデルの開発と評価プラットフォームの整備はこれまで立ち後れてきた。公益財団法人実験動物中央研究所（実中研）は創立以来70年に渡り、高品質で再現性のある実験動物モデルの開発を行い、創薬を含む医療に貢献してきた。特に世界に先駆けて開発した重度免疫不全マウス（NOGマウス）は、従来の免疫不全マウスと比較して格段にヒト細胞・組織の生着性が高いため、よりヒトに近づいたマウス“ヒト化マウス”として非臨床試験と臨床試験のギャップを埋めるべく、世界中の創薬研究で利用されるに至った。本補助事業では、これらユニークな実験動物を用いて「ヒト化マウスを基盤とした創薬支援プラットフォーム」を展開し、19件のコンサルティングを行い、通常支援16件、企業利用・成果占有利用、および共同研究3件を実施した。

（支援）

NOGマウスにヒト造血幹細胞を移植するとヒトT、Bリンパ球に加え、マクロファージ、顆粒球、さらには肥満細胞の出現も認められるがヒトIL-3とGM-CSFを発現するNOGマウス（NOG-hIL3/GM-CSF）マウスを使うことにより、更に高度なヒト化免疫マウスが作製可能である。本支援事業ではNOG-hIL3/GM-CSFマウスを用いてヒト気管支喘息や食物アレルギーなどの病態モデルを構築し、1）新規開発抗アレルギー抗体医薬候補品の有効性評価、および、2）ヒスタミン遊離因子阻害剤の有効性評価を実施した。それぞ

れ、血中ヒト IgE 濃度の低下や、アナフィラキシー発症の指標である体温低下が抑制されることが確認でき、支援申請者に報告した。3) ヒト化免疫マウスを用いた自己免疫性関節炎モデル作製には EBV 感染が必要であるため、支援申請者の機関にヒト化免疫マウスを提供し、自己免疫性関節炎モデルの確立を進めた。

NOG マウスの肝臓で HSVtk 遺伝子を発現する TK-NOG マウスにガンシクロビルを投与すると肝障害が発症する。このマウスにヒト肝細胞を移植すると生着した細胞が増殖を始め、最終的に肝臓の 8 割以上がヒト肝細胞で構成された“ヒト化肝臓”を保有するヒト肝キメラマウスとなり、ヒトに近似の薬物代謝特性を示すようになる。本支援事業では主にヒト肝キメラマウス、および、その肝細胞を使用した支援を実施した。始めにヒト肝キメラマウスを安定生産するための生着性の高い凍結ヒト肝細胞の選択を行った。ヒト肝キメラマウスを安定的に作製することが可能となったことから、マーモセットの臨床薬物代謝クリアランス(CL) 予測支援の際にヒト CL 実測値と比較を行い、いずれもヒト CL 予測値と同等もしくは小さいことを確認した。このように安定生産したヒト肝キメラマウスからは、純度の高い「ヒト肝細胞」が新鮮な状態で調製することが可能である。ヒト肝キメラマウス由来肝細胞 (Hu-liver cells) を用いて以下の支援を実施した。

- 非凍結ヒト肝細胞を活用した B 型肝炎治療薬による肝毒性発現メカニズムの解析
- 非凍結ヒト肝細胞を活用した肝毒性リスク評価系の確立
- 光増感剤 RNA 複合体の肝毒性試験
- ヒト化キメラマウス由来肝細胞の三次元培養による長期培養手法の確立
- BINDS 支援案件のヒト肝キメラ TK-NOG マウス由来肝臓細胞を使った代謝安定性・代謝物検索および酵素誘導研究
- ヒト肝臓キメラ動物由来の肝細胞を用いた薬物のヒト肝胆系輸送の定量的予測系の構築
- ヒト肝キメラマウス由来肝臓細胞を使った HBV 感染肝細胞に対する薬剤有効性の検討

支援者らは提供した Hu-liver cells について、P450、UGT および SULT 酵素活性など *in vitro* 評価を実施し、論文発表した。また、ヒト肝キメラマウスの *in vivo* 評価として、デスロラタジン、トルブタミド、カルバゼラン、ラモトリジン、BIBX1382 の 5 化合物についてそれぞれ薬物代謝データ取得し、その結果を論文発表した。

高度化研究で使用していた実中研の患者由来がん株 (CIEA-PDX) を新たに支援メニューに加えるため、凍結保存数の少ないゼノグラフト株について担がんマウスを作製して凍結保存バイアル数を確保した。これら CIEA-PDX のうち胃癌 23 株を支援依頼者に提供し、ゲノム・エピゲノム網羅的解析データを取得している。

(高度化)

シトクロム P450 酸化還元酵素 (Por) の肝臓特異的コンディショナルノックアウトマウス (cKO) を作製した。Por cKO マウスでは肝臓における Por タンパク質の発現低下とともに肝薬物酸化酵素活性の顕著な低下が確認できた。Por cKO マウスにヒト肝細胞を移植して Por cKO ヒト肝キメラマウスを作製した。このマウスの薬物代謝特性を明らかにすることを目的として、ヒト P450 の発現分布、薬物代謝酵素遺伝子発現解析、および、活性測定を行ったところ、ヒト肝で得られるデータに極めて近いことが確認できた。Por cKO ヒト肝キメラマウスに化合物 A を静脈内投与してその代謝を調べたところ、7-水酸化体の優位な生成と 4'-水酸化体のごく僅かな生成が認められた。従来のヒト肝キメラマウスでは残存するマウス肝細胞の影響により大量の 4'-水酸化体が生成されていたが Por の欠損により、その影響が消失したと考えられ、ヒトの薬物代謝を精度よく予測できる実験動物に発展する可能性を示すことができた。現在、論文化を進めている。

アレルギー疾患ヒト化マウスモデルとして、ヒト化気管支喘息モデルと全身性アナフィラキシーモデルの開発を行った。ヒト造血幹細胞移植により作製した IL-3/GM-CSF Tg および IL-3/GM-CSF /IL-5 (Triple Tg) ヒト化マウスとヒト IL-33 投与を組合せたヒト化気管支喘息モデルマウスにメサコリンを吸入させたところ

ろ、気道過敏性が有意に亢進した。また、Triple Tg では IL-3/GM-CSF Tg に比べて気管支へのヒト好酸球浸潤が顕著であり、肺胞洗浄液中に好酸球性顆粒である Eosinophil-derived neurotoxin (EDN)の産生も認められた。これらの結果から好酸球性喘息モデル作製には Triple Tg マウスが適しており、疾患モデルとして有用であることを示すことができた。NOG-hIL-3/GM-CSF Tg マウスを用いて牛乳由来アレルゲンを介した全身性アナフィラキシーモデルやハプテン抗原 NP による全身性アナフィラキシーモデルが確立できたことから、アナフィラキシーモデルを 2020 年度より支援事業として展開することができた。

ヒト化免疫マウスを用いた抗腫瘍抗体薬評価系構築をめざし、ヒト化免疫担がん (PDX) モデルマウスの開発を行った。NOG マウスに hPBMC を移植したヒト化免疫マウスは短期間で GVHD を発症するのに対し、MHC Class I 及び II を Knockout した NOG マウス (NOG-MHC KO) に hPBMC を移植したヒト化免疫マウスでは生着性が良好な上、GVHD の発症も大幅に軽減された。治療モデルの対象として、罹患率が高く、免疫チェックポイント阻害剤の標的でもある「肺腺がん」を選び、ヒト化免疫 PDX モデルマウスを作製した。臨床 PD-1 抗体である OPDIVO および Keytruda を NOG マウス、および NOG-MHC KO マウスに投与したところ、NOG マウスでは GVHD 症状の増悪傾向が観察されたが、NOG-MHC KO マウスではそのような作用は認められなかった。これらの結果を踏まえ NOG-MHC KO マウスに hPBMC を移植したヒト化免疫 PDX マウスモデルを構築し、抗 PD-1 抗体の評価を行った。その結果、抗腫瘍効果には大きなバラツキが認められたが、その原因がマウス体内のヒト免疫細胞の割合 (ヒト化キメラ率) のバラツキであることを突き止め、ヒト化キメラ率を一定にすることによりヒト T 細胞による腫瘍増殖抑制評価系の構築が可能であることを明らかにした。

II Summary of Subsidiary Project

Outcomes and Significance of the Subsidiary Project

Bridging the gap between pre-clinical and clinical trials using laboratory animals is an important challenge in drug discovery and development. For 70 years since the Central Institute for Experimental Animals (CIEA) was founded, we have developed high-quality, reproducible experimental animal models and contributed to medical care, including drug discovery. In particular, the severe immunodeficient mouse (NOG mouse) model, which we developed in 2002, has much greater ability to grow human cells and tissues than conventional immunodeficient mice. This model is used in drug discovery research worldwide to bridge the gap between pre-clinical and clinical trials, as a "humanized mouse" model that is more closely related to humans. In this project, we developed a "Drug Discovery Support Platform Based on Humanized Mice" using this unique animal model and we have conducted 19 consulting projects.

Support

We have developed pathological models of human bronchial asthma and food allergy using NOG-hIL3/GM-CSF mice and evaluated the efficacy of 1) newly developed anti-allergy antibody drug candidates and 2) histamine-releasing factor inhibitors. Findings from this work have been published (Ito R. et al., JCI Insight, 2018; Ito R. et al., Int Immunol, 2020). Using fresh and highly pure "human hepatocytes (Hu-liver cells)" prepared from TK-NOG humanized liver chimeric mice, we have supported research on 1) hepatitis B, 2) hepatotoxicity, and 3) drug metabolism/pharmacokinetics. We evaluated the CYP P450, UGT, and SULT enzyme activities of Hu-liver cells and published these results (Uehara S, et al., Xenobiotica, 2018). We also evaluated the drug metabolism/pharmacokinetics of five compounds, desloratadine, tolbutamide, carbazeran, lamotrigine, and BIBX1382, in humanized liver chimeric mice, and these results have also been published.

Advanced

Liver-specific cytochrome P450 oxidoreductase (Por) conditioned knockout (cKO) mice were generated. After intravenous administration of compound A to Por cKO humanized liver chimeric mice, we confirmed predominant formation of the 7-hydroxy metabolite and very little formation of the 4'-hydroxy metabolite. In humanized liver chimeric mice, a large amount of the 4'-hydroxy metabolite was generated due to the influence of remaining mouse hepatocytes, but this effect was abolished by deletion of the Por gene. This result suggests the possibility of developing an experimental animal model that can predict human drug metabolism more accurately than the traditional humanized liver chimeric mouse model. The work is currently being prepared for publication.

Administration of clinical antibodies (Opdivo and Keytruda) for PD-1 antigen to NOG mice and/or MHC Class I and II Knockout NOG mice (NOG-MHC KO) caused worsening of GVHD symptoms in the NOG mice, but not in the NOG-MHC KO mice. Based on these results, we developed a humanized immune PDX mouse model in which NOG-MHC KO mice were implanted with hPBMC and PDX, and we used this model to evaluate the efficacy of the anti-PD-1 antibodies. We found that the antitumor activities of human T cells in this model varied widely, due to variation in the percentage of human immune cells in the mice (chimera ratio). We then showed that it is possible to develop an evaluation system using immune humanized mice with a similar chimera ratio.