

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) 人工染色体技術を用いたヒト化マウス/ラットおよび多機能細胞による創薬支援
(プログラム名) (英語) Support of drug discovery by humanized mice/rats and multifunctional cells
using artificial chromosome technology

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) 香月 康宏
(英語) Yasuhiro Kazuki

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人鳥取大学・染色体工学研究センター・准教授
(英語) Tottori University・Chromosome Engineering Research Center・Associate Professor

II 補助事業の概要

本事業の目的は独自の人工染色体技術で開発したヒト化モデルマウス/ラットおよび多機能細胞を支援に活用することで、ヒトに対する安全性予測の向上、および医薬品開発のスピードアップと成功確率の向上を目指す。

(1) 支援

(1-1) 支援: 動物モデルの拡充

各研究機関への支援体制のために3Rを順守したヒト化動物試験環境の拡充を行い、当初計画予定の外部研究機関が滞り無く、試験実施を行える動物数の確保ができた。各系統において繁殖を行い、受精卵を凍結した。どの系統においても、雄よりも雌の方が伝達率が高い傾向にあった。また、伝達率に系統間の差はなかった。

(1-2) 支援: 薬物動態試験

上記動物モデルを活用して8件の薬物動態試験の支援を行った。

(1-3) 支援: 完全ヒト抗体産生動物を用いたヒト抗体シーズ取得試験

完全ヒト抗体産生動物を用いたヒト抗体シーズ取得試験に関しては、12件の支援を行った。動物の提供、および完全ヒトモノクローナル抗体の作製を行った。特筆すべき1つの成果として、国立感染症研究所への支援成果に

より、SARS-CoV-1 と SARS-CoV-2 に交差し、高い中和活性を持つモノクローナル抗体を獲得した (Onodera et al., 2021, Immunity)。

(1-4) 細胞モデルによる支援および高度化

我々がこれまで開発してきた人工染色体導入高機能化 HepG2 細胞や Caco2 細胞などの細胞モデルについて、支援を希望する研究機関に配布し、評価方法などを指導することで、7 件の支援を行った。さらに、高度化として、我々が作製した薬物代謝酵素および関連因子複数搭載型 HepG2 細胞に胆汁吸収・排泄に関わるトランスポーター遺伝子の搭載を行った。

(2) 高度化

(2-1) 高度化：ヒト化 CYP3A マウスを用いた CYP3A 活性マーカー評価試験法の開発

ヒト化 CYP3A マウスに CYP3A 誘導剤 (pregnenolone 16 α -carbonitrile, PCN) を投与したところ、投与量依存的に肝臓中 CYP3A4 タンパク量が増加した。この時、肝臓中 CYP3A4 タンパク量は、肝臓中および血漿中の 4 β 位水酸化コレステロールおよび 25 位水酸化コレステロール濃度との間に有意な正の相関性を示したことから、血漿中 4 β 位水酸化コレステロールおよび 25 位水酸化コレステロール濃度は肝臓中 CYP3A4 タンパク量を反映することが示唆された。以上のことから、ヒト化 CYP3A マウスは CYP3A 活性バイオマーカーの評価および探索に有用なモデルであることが示された。また、ヒト化 CYP3A マウスにクラリスロマイシンを 5 日間繰り返し経口投与した後に、CYP3A 基質であるトリアゾラムを経口投与したところ、代謝物血中濃度に対するトリアゾラム血中濃度の比はクラリスロマイシン投与により低下することに加え、門脈中代謝物血中濃度に対するトリアゾラム血中濃度の比 (Portal CR) もクラリスロマイシン投与により低下することが示された。以上のことから、ヒト化 CYP3A マウスへプローブ薬としてトリアゾラムを経口投与した際の Portal CR が小腸代謝活性マーカーとして有用であることが示された。

(2-2) 高度化：ヒト化 CYP3A/PXR マウスを用いた酵素誘導試験法の開発

ヒト化 CYP3A/PXR マウスにヒト PXR 活性化剤であるリファンピシンを投与した後に、トリアゾラムを経口投与したところ、トリアゾラムの門脈血中濃度はリファンピシン投与により低下し、代謝物 (1' 位水酸化体および 4 位水酸化体) の濃度は上昇した。また、リファンピシンを投与したヒト化 CYP3A/PXR マウスの小腸切片を用いたイメージング質量分析により、代謝物 (水酸化体) に相当するシグナルの増強が認められた。これらの結果より、リファンピシンを投与したヒト化 CYP3A/PXR マウスの小腸において、トリアゾラムの代謝 (水酸化体生成) が亢進していることが明らかとなった。以上のことから、ヒト化 CYP3A/PXR マウスは、小腸における代謝亢進を予測する有用なモデルであることが示唆された。

(2-3) 高度化：Cyp3aK0/Cyp2cK0/CYP3A-MAC マウスを用いた試験法の開発

Cyp3aK0/Cyp2cK0/CYP3A-MAC マウスにヒト CYP3A の代表的基質であるトリアゾラムまたはミダゾラムを経口投与し血中濃度推移を解析した結果、代謝物である 1' 位水酸化体の血中濃度は Cyp3aK0/Cyp2cK0 マウスと比較して高い値を示した。以上のことから、Cyp3aK0/Cyp2cK0/CYP3A-MAC マウスは CYP3A に関する *in vivo* 機能解析を行う上で有用な試験系と考えられた。

(2-4) 高度化：MDR1 ヒト化マウスを用いた脳移行性試験法の開発

MDR1 ヒト化マウスに 7 種類の P-glycoprotein 基質を尾静脈内投与し、投与 0.5, 1 および 2 時間後の脳内および血漿中薬物濃度から脳-血漿濃度比および K_p, brain を算出することにより、各マウスにおける P-glycoprotein 基質の中枢移行性を比較した。その結果、Mdr1a/1b-K0 マウスにおける各薬物の脳-血漿濃度比および K_p, brain

は、野生型マウスおよびMDR1 ヒト化マウスに対して高値を示した。興味深いことに、MDR1 ヒト化マウスにおける Kp, brain 値および P-gp transport activity per molecule は野生型マウスに対して高値を示す傾向が認められた。以上のことから、MDR1 ヒト化マウスはヒトとマウスの間の P-gp の種差を克服したモデル動物として、P-gp 基質の中枢移行性の予測に有用であることが示唆された。

(2-5) 高度化：ヒト化 MDR1 マウスを用いた脳誘導試験法の開発

ヒト化 MDR1 マウスに pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN) を腹腔内投与し、MDR1 基質であるベラパミルの脳内移行と脳毛細血管における MDR1 タンパク量変化を測定した。ベラパミルの脳内移行は PCN 投与により低下したのに対し、MDR1 タンパク量は PCN 投与による影響を受けなかった。この結果より、PCN 投与によるベラパミルの脳内移行の低下は MDR1 の脳における発現量増加とは異なる要因による可能性が考えられた。

(2-6) 高度化：CYP3A ヒト化ラットを用いた薬物動態試験法の開発

CYP3A ヒト化ラットに CYP3A 誘導剤を投与したところ、トリアゾラム投与後の血中代謝物濃度は 1' 位水酸化体が 4 位水酸化体よりも高値を示した。CYP3A-KO ラットでは、CYP3A 誘導剤の有無によらず、1' 位水酸化体と 4 位水酸化体の血中濃度が同定とであった。以上のことから、CYP3A ヒト化ラットは誘導剤を投与することにより、ヒト CYP3A の特性を反映した薬物代謝および血中動態を示し、CYP3A 基質の薬物動態予測に有用なモデルとなることが示唆された。

(2-7) 高度化：UGT2 ヒト化ラットを用いた薬物動態試験

UGT2 ヒト化ラットおよび正常ラット(Wistar)にジドブジン (AZT) を静脈内投与し、AZT および AZT 代謝物 (AZT-Glu) の尿中および胆汁排泄率を評価したところ、正常ラットに比べ、UGT2 ヒト化ラットにおいて尿中および胆汁中における AZT 代謝物の排泄率が高かった。ヒトにおける排泄率もラット/マウスに比べ高いことから、UGT2 ヒト化ラットがヒトを外挿できることが示された。

(2-8) 高度化：遺伝子多型動物の作製

ヒト化動物への単一 SNP 改変 (MDR1 ; G2677T) を行うために、ヒト MDR1 人工染色体を保持した ES 細胞への Cas9 およびガイド RNA 共発現プラスミドと環状 DNA の遺伝子導入を行った。PCR-RFLP 法にてゲノム改変の確認をしたところ、目的の変異が導入できたことを確認した。さらに、構築したヒト MDR1 (改変型) 人工染色体を保持した ES 細胞から SNP 改変 MDR1 人工染色体を有するキメラマウスを作製した。さらに正常マウスあるいは Mdr1a/1b-KO マウスと交配することで子孫伝達個体を得ることに成功した。得られた MDR1 遺伝子改変型マウス (hMDR1-MAC 2677T) と野生型 MDR1 ヒト化マウス (hMDR1-MAC 2677G) を用い、脳毛細血管における P-glycoprotein タンパク質の発現量及び P-glycoprotein 基質ベラパミルの中枢移行制御能について遺伝子型による差異を比較した。脳毛細血管における P-glycoprotein タンパク質発現量は野生型と変異型でほぼ等しいのに対し、P-glycoprotein タンパク質のベラパミル輸送活性は、変異型の方が野生型よりも低値を示した。これらの結果より、MDR1 遺伝子の 2677G>T 変異は、少なくとも脳毛細血管における P-glycoprotein タンパク質発現量を変化させずに、輸送能を低下させることが示唆された。以上より、MDR1 遺伝子の特定の SNP に関する研究にヒト多型 MDR1 マウスの活用が有用である可能性が示された。

(2-9) 高度化：複数遺伝子ヒト化動物の作製

製薬企業からのニーズの高いヒト主要代謝酵素 CYP3A 遺伝子に追加する形で、トランスポーターMDR1 を組み合わせ、CYP3A/MDR1 人工染色体ベクターを保持する CYP3A/MDR1 導入マウスと各種 KO マウスとの交配により完全な CYP3A/MDR1 ヒト化マウスの系統化に成功した。

(2-10) 高度化：完全ヒト抗体産生動物を用いた完全ヒト抗体評価法の開発

完全ヒト抗体産生マウスで組換えにより再編集される抗体遺伝子(抗体レパトア)を詳細に解析し、ヒト個体内で行われる遺伝子再編集がマウス内でも忠実に再現できていることを明らかにした (Satofuka et al, 2022, Nat. Commun.)。

(3) 連携

ケミカルシーズ・リード探索ユニット(構造展開領域)、ケミカルシーズ・リード探索ユニット(ライブラリー・スクリーニング領域)、バイオリジカルシーズ探索ユニットなどとの連携を進めて、共同研究論文を発表した。

(4) 人材育成についての実績及び成果

JST・地域産学官共同研究拠点事業(とっとりバイオフィロンティア事業)および文科省・地域科学技術実証拠点整備事業の中で鳥取県産業振興機構と連携して、1) バイオテクニシャン動物管理者養成(合計30講座245名)、2) 染色体工学技術スペシャリスト養成(合計43講座1088名)、3) バイオビジネスマインド養成(合計9講座356名)、を通じて人材育成に取り組んだ。本事業に参画している研究者および技術補佐員も上記に参画することでキャリアパスに繋がるスキルを習得し、支援や高度化研究にフィードバックした。高度な専門人材を育成し、地域における人材の厚みを拡大することで、①地元企業への就職、②人材を切り口にした企業誘致、③誘致企業への就職、を支援した。

The purpose of this project is to accelerate drug development and improve its probability of success by utilizing humanized mice/rats and multifunctional cells developed by our artificial chromosome technology.

(1) Research support

(1-1) Expansion of animal models

To support each research institution, we expanded the humanized animal test environment in compliance with the principles of the 3Rs, and we were able to secure the number of animals that could be tested without delay at the external research institute as originally planned. Breeding was carried out in each line, and fertilized eggs were frozen. In all strains, females tended to have higher transmission rates than males. In addition, there were no differences in transmission rates among these strains.

(1-2) Pharmacokinetic tests

Eight pharmacokinetic studies were supported using the above animal models.

(1-3) Human antibody production using fully human antibody-producing animals

We provided support for 12 human antibody production using fully human antibody-producing animals. One notable achievement was the generation of a monoclonal antibody with high neutralizing activity that crossed with SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 (Onodera et al., 2021, Immunity).

(1-4) Support using cell models and the sophistication

We distributed the cell models such as artificial chromosome-introduced highly functional HepG2 cells and Caco2 cells to several research institutes, and provided guidance on evaluation methods (7 supports). Furthermore, as an advancement, we loaded the transporter genes involved in bile absorption and excretion into the drug-metabolizing enzymes and HepG2 cells carrying multiple related factors.

(2) Advanced research

The following advanced research project goals were achieved, and their results were used for the supports as described above.

(2-1) Development of CYP3A activity marker evaluation test method using humanized CYP3A mice

(2-2) Development of enzyme induction test method using humanized CYP3A / PXR mice

(2-3) Development of test method using Cyp3aKO / Cyp2cKO / CYP3A-MAC mice

(2-4) Development of brain blood-brain barrier test method using MDR1 humanized mice

(2-5) Development of brain induction test method using humanized MDR1 mice

(2-6) Development of pharmacokinetic test method using CYP3A humanized rats

(2-7) Pharmacokinetic test using UGT2 humanized rats

(2-8) Generation of humanized mice with defined SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

(2-9) Generation of multi-gene humanized animals

(2-10) Human antibody repertoire analyses using fully human antibody-producing animals

(3) Cooperation

We have published several joint research papers in collaboration with the Chemical Seeds and Lead Search Unit (Structural Development Area and Library Screening Area), and Biological Seeds Search Unit.

(4) Achievements and achievements in human resource development

In collaboration with the Tottori Prefectural Industrial Promotion Organization, we worked on human resource development.