

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 27 年度成果報告書(公開)

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 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
参加機関	国立大学法人 鳥取大学 積水メディカル株式会社
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

ヒト肝キメラマウスは、新薬候補化合物のヒト代謝様式や肝毒性を早期に予測するモデル動物として創薬への応用が試みられている。しかし、マウス小腸や残存するマウス肝細胞の影響がその普及を阻んでいる。本研究では、複数の遺伝子を搭載できるマウス人工染色体を応用して、小腸並びに肝特異的にマウス代謝能を抑制した、次世代ヒト肝キメラマウスを創製することを目的とする。

### 2. 研究開発の概要

免疫不全マウスの主要代謝経路を司る酵素遺伝子に、その働きを制御する遺伝子を組み込む。一方で、その遺伝子を小腸並びに肝で作動させる遺伝子や、肝に障害を付与する遺伝子等をマウス人工染色体(MAC)に搭載する。そして、MAC を前述の免疫不全マウスに導入することに依って、目的とする次世代ヒト肝キメラマウスを創製する。

### 3. 研究開発の成果(平成 27 年度)

#### (1)ヒト肝細胞移植条件の検討【積水メディカル株式会社】

目的とするホストマウスへのヒト肝細胞移植技術を習得する為に、入手可能な既存の肝障害免疫不全マウスへヒト肝細胞を脾臓経由で移植した。肝細胞移植の時期、肝細胞数、分散溶媒等、肝置換率を上昇させる検討を行ったところ、生産する高置換率マウスの割合が高まることが示唆された。この試験を通じて、ヒト肝キメラマウスを作製する技術を獲得した。また、薬物代謝プロファイルの異なる複数のドナーから得られた肝細胞を移植して、移植した肝細胞と、作製されたヒト肝キメラマウスの代謝能の相関を調べる試験を実施した。

#### (2)薬物代謝試験、安全性試験【積水メディカル株式会社】

ヒト肝キメラマウスの創薬応用で期待される用途の一つとして、臨床での未変化体ならびに代謝物の血漿中濃度—時間推移の予測が挙げられる。そこで、マウスの代謝の影響を比較的受け難いモデル化合物と既存のヒト肝キメラマウスを用いて薬物動態試験を実施した。そして、得られた薬物の消失に関する指標をヒト肝置換率(RI)に対してプロットする RI plot 法を考案した。その結果、非臨床段階でヒトでの未変化体や代謝物の血漿中濃度を予測できる可能性が示唆された(Kamimura et al., *Xenobiotica* early online, 2016 年掲載)。この結果より、ホストマウスの代謝能を抑制すれば、代謝の影響を受け易い化合物の血漿中濃度予測も可能

になるものと推察された。

マウス代謝能が抑制されれば、ヒト肝キメラマウスの安全性試験への適用範囲も拡大される。そこで、臨床で肝障害を惹起する薬物の毒性を既存のキメラマウスで示した論文報告の再現性試験や、ヒト肝細胞の障害を特異的に検出する方法の開発に着手した。

### (3) 肝障害/マウス代謝能抑制/免疫不全マウス作製【鳥取大学】

MAC に搭載する、マウス小腸並びに肝で薬物代謝を司る遺伝子を抑制させる遺伝子や、マウス肝に障害を付与する遺伝子の種類、それらのコピー数等の組み合わせで、A, B, C, D、4種の遺伝子コンストラクトを検討している。各遺伝子コンストラクトを搭載した MAC を免疫不全マウス(白色)の ES 細胞に導入し、それらを黒色マウスの胚盤胞に注入して、両者の混じり合った毛色キメラマウスを得た。MAC には蛍光を発する蛋白質(GFP)遺伝子も搭載されている。

本年度は、遺伝子コンストラクトCタイプを導入した雄性毛色キメラマウス C70, C71, C76 と、免疫が正常の雌性マウス(ICR)との交配により、複数の GFP 陽性白色産仔を得た。一部の産仔の肝及び小腸のゲノムを抽出して遺伝子試験(PCR 解析)を行った結果、本プロジェクトで目的とする代謝を司る遺伝子の big gene deletion(広範囲欠失)が起きていることが確認された。次いで、C70, C76 を用いて免疫不全の雌性マウスとの産仔(F1)取得を試みた。その結果、GFP ならびに PCR 陽性の4匹の F1(雄 2 匹,雌 1 匹,未判定 1 匹)産仔が得られ、次世代 F2 取得の試みを開始した。

一方、遺伝子コンストラクトDタイプを導入した免疫不全マウス ES 細胞からも、複数の雄性毛色キメラマウスが得られている。それらと免疫不全雌性マウスとの交配の結果、D134 から4匹の GFP 陽性白色マウスが誕生した。そこで、これらのマウスを継代繁殖し、本 PJ が目的とする機能を保持しているか検証を行うこととした。