

人工染色体ベクターを用いて作製した 薬物動態関連遺伝子ヒト化マウス

千葉大学・大学院薬学研究院

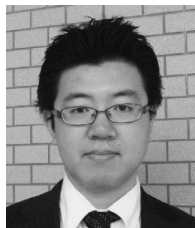
小林カオル

鳥取大学・大学院医学系研究科

香月康宏



小林カオル



香月康宏

1. HAC ベクターシステムの開発

トランスジェニック技術は遺伝子を破壊または導入

し、その表現型を解析することにより、これらの遺伝子がどのような機能を持つかを知る上で非常に重要な技術となっている。しかし、クローン化 DNA 断片を使用するこれまでのトランスジェニック技術では、細菌人工染色体 (BAC) を用いても導入可能な DNA は通常 150 kb が限界であり、哺乳動物の遺伝子としては珍しくない 200 kb、あるいはそれを超える大きさを持つ遺伝子や遺伝子クラスターの導入は不可能であった。哺乳動物の遺伝子は制御領域も含めると数百 kb 以上に及ぶことがあり、それらの全てを含む DNA 領域を導入できないことが原因で遺伝子本来の発現を量的・質的に本来の生理的発現パターンに再現できなかった。これらの問題を解決するために、巨大なヒト遺伝子、複数のヒト遺伝子を比較的安定な形で導入可能である微小核細胞融合法 (Microcell-Mediated Chromosome Transfer; MMCT) を用いて、単一ヒト染色体あるいはその断片をマウス胚性幹 (ES) 細胞へ導入し、その ES 細胞からキメラマウスを作製することにより、10 Mb 以上の機能的なヒト染色体断片を保持するマウスの作製と子孫への伝播が可能となった¹⁾。これによりインビボでのヒト遺伝子の機能解析と巨大なヒト遺伝子を保持する「ヒト型」モデル動物の作製が可能となった。

一方で、上記単一ヒト染色体あるいはその断片をマウスに導入する方法の問題点として種々のマウス組織においてヒト染色体の安定性が異なり、子孫伝達がすべての染色体で可能である訳ではないことが明らかとなった。そこで特定のヒト染色体領域をマウス個体内でも安定に保持し、安定な子孫への伝達が可能なマウスを作製することを目的として、染色体改変技術を利用した以下の方法を開発してきた。すなわち 1) 高頻度相同組換えを示すトリ DT40 細胞ハイブリッド、2) 人工テロメア配列による染色体断片化、

3) Cre-loxP システムによる染色体転座を利用して、望みの領域のみを含むヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome; HAC) 構築技術の開発を行った。自然ヒト染色体断片では余分なヒト遺伝子が数多く残っており、機能解析用のベクターや遺伝子治療用ベクターには適さない。この問題点を解決するために、ヒト 21 番染色体の長腕、短腕の遺伝子を人工テロメアの移入により切除し、セントロメア近傍に loxP サイトを導入した、HAC ベクターを開発した²⁾。

2. HAC ベクターへの遺伝子搭載方法

HAC ベクターへの遺伝子搭載方法は環状インサート型と染色体転座型の 2 つのクローニング方法に分けられる。環状インサート型クローニングでは plasmid, BAC, PAC, YAC 由来の loxP を含む環状ベクターと Cre をコトランスフェクションすることでインサートが挿入された HAC ベクターを得ることができる。染色体転座型クローニングでは目的とするヒト染色体を相同組み換え頻度の高いトリ DT40 細胞中で目的遺伝子よりテロメア側を切断し、目的遺伝子よりセントロメア側へ loxP を導入する。次にその改変染色体を MMCT 法にて HAC 保持 CHO 細胞へ導入後、Cre を導入することで、HAC 上へ目的染色体領域をクローニングすることが可能となる。上述した HAC ベクター上への 2 つのクローニング方法と DT40 での相同組換えを用いれば、Mb オーダーの遺伝子、複数の遺伝子が導入可能な遺伝子導入用 HAC ベクターが作製できる^{3,4)}。さらに、マルチインテグレースシステムを HAC ベクターに適用し、最大 5 つの環状 DNA を HAC ベクターに搭載することが可能となった⁵⁾。最近では、以下に紹介するヒト化モデル動物だけでなく、遺伝子安定高発現細胞の作製⁶⁾、遺伝子細胞治療^{7,8)}にも利用されてきている。

3. HAC ベクターシステムを用いた CYP3A ヒト化マウス (CYP3A-HAC マウス) の作成

市販薬の約 50% を代謝する薬物代謝酵素 cytochrome P450 3A (CYP3A) は主に肝と小腸に発現しており、経口投与された薬物の血中濃度の制御に重要な役割を果たしている。このため、CYP3A で代謝される薬物のバイオアベイラビリティは肝代謝にくわえ、消化管代謝を考慮する必要がある。また、CYP3A の阻害や誘導に関連した薬物相互作用の事例は非常に多く、ヒトにおける CYP3A を介した薬物相互作用の予測は、新規医薬品の開発において重要な課題となっている。しかしながら、CYP3A の特性は動物とヒトで異なるため、ヒトにおけるバイオアベイラビリティや薬物相互作用を動物実験から予測するには限界がある。そこで、上述の HAC ベクターシステムの染色体転座型クローニング方法を用いて、ヒト CYP3A 遺伝子クラス

ター(CYP3A4, CYP3A43, CYP3A5, CYP3A7)およびその制御領域を含む約700 kbをHACベクターにクローニングした。次にそのCYP3A-HACベクターをマウスES細胞へMMCT法にて導入し、キメラマウスを作製後、交配することで、CYP3A-HACベクターを導入したマウス(CYP3A-HACマウス)を作製した。また、完全なCYP3Aヒト化マウスを作製するために、マウスの内在性*Cyp3a*遺伝子クラスターが破壊されたマウス(Cyp3a-KOマウス)を作製し、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスを作製した。このように、任意のヒト遺伝子をクローニングしたHACベクターを導入したマウスを作製後、対応する内在遺伝子破壊マウスと交配することで、任意のヒト遺伝子ヒト化マウスが作製できる。

4. CYP3A分子種の発現プロファイル

ヒト型CYP3A遺伝子クラスターを導入したマウス(CYP3A-HACマウス)では、ヒト組織と同様に肝臓と小腸にCYP3A4 mRNAの発現が認められた。また、成体期特異的に発現するCYP3A4は成体期に、胎仔期特異的に発現するCYP3A7は胎仔期にそれぞれ発現し、CYP3A分子種の時期特異的な発現も再現された。さらに、マウス*Cyp3a*遺伝子クラスターをノックアウトし、ヒトCYP3Aクラスターを導入したCYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスでは、CYP3A誘導剤により肝と小腸におけるCYP3A4 mRNAおよびCYP3Aタンパクの発現が強く誘導された。

5. 薬物代謝能

CYP3A-HAC/KOマウスにおける薬物代謝能を明らかにするため、野生型マウス、Cyp3a-KOマウスおよびCYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスの肝ミクロソームを用いてCYP3A基質であるトリアゾラムの代謝活性を測定した。内在性マウスCyp3aのノックアウトにより代謝活性はほぼ完全に消失し、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスにおいては市販のプールドヒト肝ミクロソームの30%程度に相当する活性値を示したことから、HACベクターにより導入したヒトCYP3Aは機能的であることが示唆された。ヒト肝ミクロソームのCYP3A活性には大きな個人差が存在するが、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスの肝ミクロソームにおける代謝活性は、低活性のヒト肝ミクロソームに相当すると考えられる。これに対し、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスの小腸ミクロソームにおける代謝活性はプールドヒト小腸ミクロソームにおける代謝活性とも同等の値であった。このことより、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスはCYP3Aを介した小腸代謝に関するインビボモデルとして応用可能であると考えられた。また、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスの肝におけるCYP3A4の発現量を高めるため、マウスに導入するHACベクター

のコピー数を増やす等の対策について現在検討中である。

一方、ヒトCYP3Aの代表的基質であるミダゾラムの代謝に関しては、マウスではCYP2C分子種が一部寄与する⁹⁾。このため、Cyp3a-KOマウスでも野生型の半分程度の活性が認められ、その活性はCYP3A誘導剤投与により上昇した。この原因として、Cyp3aのノックアウトによるCYP2C分子種の発現増加およびCYP3A誘導剤によるマウスCYP2Cの誘導が挙げられる¹⁰⁾。これらの結果より、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスを用いたバイオアベイラビリティの予測に関しては、薬物代謝におけるCYP2C分子種の寄与を無視できないことが示唆された。CYP3AのノックアウトによるマウスCYP2C分子種の発現増加は、十分量のCYP3A4を発現したCYP3A4トランスジェニックマウスでは、野生型マウスにおける発現レベルまで減少している¹¹⁾。したがって、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスにおいても、CYP3A分子種の発現量を増加させることによりマウスCYP2C分子種の発現が低下するのではないかと期待している。

6. 薬物動態研究への応用

インビトロ実験系を用いた薬物相互作用の予測に関しては、ヒト肝ミクロソーム、P450発現系、ヒト初代培養肝細胞、レポータージーンアッセイ等の実験系が検討され、その有用性が示されている。一方、インビボ実験系を用いた薬物相互作用の予測については、肝臓と消化管の両方にヒトCYP3Aを発現するようなモデル動物がないために、CYP3Aによる薬物代謝の種差が常に問題となってきた。そこで、代表的なCYP3Aの阻害機構であるmechanism-based inhibition (MBI)に焦点をあて、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスがヒトにおける薬物相互作用を再現できるか否かについて検討した。エリスロマイシンはヒトCYP3Aに対してMBI作用を示す代表的な阻害剤であるが、ラットおよびマウスのCYP3Aに対しては非常に弱いMBI作用しか示さない¹²⁾。しかし、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスの肝ミクロソームにおけるトリアゾラム代謝に対しては、ヒト肝ミクロソームを用いた場合と同様にエリスロマイシンがMBI作用を示した。CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスの小腸ミクロソームについても、ヒト小腸ミクロソームを用いた場合と同様にエリスロマイシンによるMBI作用が認められた。他の複数のCYP3A阻害剤を用いて検討した結果、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスの肝ミクロソームとヒト肝ミクロソームではCYP3Aを介するトリアゾラム代謝に対するCYP3A阻害剤の作用が良く一致することが明らかとなった。このことより、CYP3A-HAC/Cyp3a-KOマウスはCYP3Aの阻害に関する薬物相互作用を予測する有用なモデルとなる可能性が考えられた。

7. 今後の展望

CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスはヒト CYP3A 遺伝子クラスターを導入した世界で初めての CYP3A ヒト化マウスである。このマウスは肝と小腸の両方に CYP3A4 を発現していることから、ヒトにおける CYP3A を介した代謝をインビボで評価するうえで有用なモデル動物といえる。一方、現在の CYP3A-HAC/Cyp3a-KO マウスは内在性マウス CYP2C の発現が正常マウスに比べて高い、CYP3A4 の誘導に関与する核内受容体 pregnane X receptor がヒト化されていない、といった問題も残されている。現在、これらの問題の解決に取り組むと同時に、インビボでの評価についても検討を進めている。将来的には、CYP3A だけでなく、他の CYP 分子種、トランスポーター、核内受容体などのヒト薬物動態関連遺伝子をマウスに導入した新たなモデル動物の作製を行い、新薬開発に役立てたい。

参考文献

- 1) Tomizuka, K., Yoshida, H., Uejima, H., Kugoh, H., Sato, K., Ohguma, A., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M. and Ishida, I.: Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice. *Nat. Genet.*, **16**: 133-43 (1997).
- 2) Kazuki, Y., Hoshiya, H., Takiguchi, M., Abe, S., Iida, Y., Osaki, M., Katoh, M., Hiratsuka, M., Shirayoshi, Y., Hiramatsu, K., Ueno, E., Kajitani, N., Yoshino, T., Kazuki, K., Ishihara, C., Takehara, S., Tsuji, S., Ejima, F., Toyoda, A., Sakaki, Y., Larionov, V., Kouprina, N. and Oshimura, M.: Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis. *Gene Ther.*, **18**: 384-93 (2011).
- 3) Kazuki, Y. and Oshimura, M.: Human artificial chromosomes for gene delivery and the development of animal models. *Mol. Ther.*, Epub Jul 12 (2011).
- 4) Hoshiya, H., Kazuki, Y., Abe, S., Takiguchi, M., Kajitani, N., Watanabe, Y., Yoshino, T., Shirayoshi, Y., Higaki, K., Messina, G., Cossu, G. and Oshimura, M.: A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene. *Mol. Ther.*, **17**: 309-17 (2009).
- 5) Yamaguchi, S., Kazuki, Y., Nakayama, Y., Nanba, E., Oshimura, M. and Ohbayashi, T.: A method for producing transgenic cells using a multi-integrase system on a human artificial chromosome vector. *PLoS One*, **6**: e17267 (2011).
- 6) Kurosaki, H., Hiratsuka, M., Imaoka, N., Iida, Y., Uno, N., Kazuki, Y., Ishihara, C., Yakura, Y., Mimuro, J., Sakata, Y., Takeya, H. and Oshimura, M.: Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome. *J. Hum. Genet.*, Epub Aug 11 (2011).
- 7) Kazuki, Y., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Osaki, M., Kajitani, N., Hoshiya, H., Hiramatsu, K., Yoshino, T., Kazuki, K., Ishihara, C., Takehara, S., Higaki, K., Nakagawa, M., Takahashi, K., Yamanaka, S. and Oshimura, M.: Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.*, **18**: 386-393 (2010).
- 8) Tedesco, F. S., Hoshiya, H., D'Antona, G., Gerli, M.F., Messina, G., Antonini, S., Tonlorenzi, R., Benedetti, S., Berghele, L., Torrente, Y., Kazuki, Y., Bottinelli, R., Oshimura, M. and Cossu, G.: Stem cell-mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.*, **3**: 96ra78 (2011).
- 9) Perloff, M. D., von Moltke, L. L., Court, M. H., Kotegawa, T., Shader, R. I. and Greenblatt, D. J.: Midazolam and triazolam biotransformation in mouse and human liver microsomes: relative contribution of CYP3A and CYP2C isoforms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**: 618-628 (2000).
- 10) van Waterschoot, R. A., van Herwaarden, A. E., Lagas, J. S., Sparidans, R. W., Wagenaar, E., van der Kruijssen, C. M., Goldstein, J. A., Zeldin, D. C., Beijnen, J. H. and Schinkel, A. H.: Midazolam metabolism in cytochrome P450 3A knockout mice can be attributed to up-regulated CYP2C enzymes. *Mol. Pharmacol.*, **73**: 1029-1036 (2008).
- 11) van Waterschoot, R. A., Rooswinkel, R. W., Wagenaar, E., van der Kruijssen, C. M., van Herwaarden, A. E., Schinkel, A. H.: Intestinal cytochrome P450 3A plays an important role in the regulation of detoxifying systems in the liver. *FASEB J.*, **23**: 224-231 (2009).
- 12) Aueviriyavit, S., Kobayashi, K. and Chiba, K.: Species differences in mechanism-based inactivation of CYP3A in humans, rats and mice. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**: 93-100 (2010).