

## 先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実施状況報告書(平成25年度)

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	医薬品開発支援のための染色体工学技術によるヒト型薬物代謝モデル動物の作製
研究機関・ 部局・職名	鳥取大学・染色体工学研究センター・助教
氏名	香月 康宏

### 1. 当該年度の研究目的

薬物代謝関連遺伝子をヒトと実験動物で置き換えたヒト化動物は、ヒト特異的な薬物代謝や安全性を予測する上で大きな役割を果たすと考えられる。薬物代謝酵素遺伝子は多くが Mb 単位の巨大な遺伝子クラスターとして存在するため、従来技術では一部の遺伝子しか導入できないという問題点があり、実用化には至っていないのが現状である。昨年度までに上述の課題を克服するため、ヒト特異的な薬物代謝に関わる、第一相酵素 CYP 遺伝子群、第二相酵素 UGT 遺伝子群、トランスポーター、CYP 誘導を制御する核内受容体、をそれぞれ人工染色体ベクターに搭載し、各種人工染色体をマウス ES 細胞に導入することでキメラマウスを作製することに成功した。本年度は、各人工染色体ベクターを保持する子孫伝達マウスやラットを作製することで、それらの性能を *in vivo* で確認することを目的とする。

### 2. 研究の実施状況

ヒト特異的な薬物代謝に関わる遺伝子のうち、人工染色体ベクターに搭載された CYP2C, MDR1 の各ベクターを保持するキメラマウスと正常マウスとを交配することで子孫伝達マウスを作製し、上記 F1 マウスから以下の実験に用いるための F2 コロニーを作製したところ、効率的に F2 マウスを繁殖できることを確認した。さらにそれらの種々の組織で各クラスターの遺伝子の発現を確認したところ、ヒトと同様のパターンで時期特異的、組織特異的に各遺伝子が発現し、代謝能がヒト化していることが確かめられた。また、CYP3A マウスを用いて、胎仔培養システムを用いることでサリドマイド投与実験を行ったところ、正常マウス胎仔では四肢の奇形が出なかったのに対し、CYP3A マウス胎仔において特異的に四肢の奇形が観察された。ヒト化 PXR/CYP3A マウスを交配により作製し、バイオアベイラビリティ評価、薬物相互作用の評価、薬物の初回通過効果を検討することで、作製したヒト化 PXR/CYP3A マウスがヒトの代謝を一部ではあるが再現することを確認できた。一方、当初の計画を変更し、重要性の高い組み合わせである CYP3A-PXR、CYP3A-MDR、CYP3A-CYP2C を組み合わせた人工染色体を作製することに成功した。今後、上記のマウスの評価を行っていく予定である。また、ヒト化マウスの作製に成功した CYP3A および UGT2 について、ラット ES 細胞にそれぞれの人工染色体を導入することでヒト化 CYP3A ラットおよびヒト化 UGT2 ラットを作製することに成功し、ヒトと同様のパターンで時期特異的、組織特異的に各遺伝子が発現していることが確かめられた。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 7 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Takehara S, Schulz TC, Abe S, Takiguchi M, Kazuki K, Kishigami S, Wakayama T, Tomizuka K, Oshimura M, <b>Kazuki Y.</b> A novel transchromosomal system: stable maintenance of an engineered Mb-sized human genomic fragment translocated to a mouse chromosome terminal region. <i>Transgenic Res.</i> 2014 Feb 2. [Epub ahead of print]</li> <li>2. Kazuki K, Takehara S, Uno N, Imaoka N, Abe S, Takiguchi M, Hiramatsu K, Oshimura M, <b>Kazuki Y.</b> (2013 Dec 6) Highly stable maintenance of a mouse artificial chromosome in human cells and mice. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 442(1-2):44-50. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.171. Epub 2013 Nov 9.</li> <li>3. Hashimoto M, Kobayashi K, Watanabe M, <b>Kazuki Y.</b>, Takehara S, Inaba A, Nitta S, Senda N, Oshimura M, Chiba K. (2013 Aug) Knockout of mouse Cyp3a gene enhances synthesis of cholesterol and bile acid in the liver. <i>J Lipid Res.</i> 54(8):2060-8. doi: 10.1194/jlr.M033464. Epub 2013 May 24.</li> </ol> <p>(掲載済み一査読無し) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>香月康宏</b>、押村光雄：染色体工学技術とゲノム編集技術の融合による医学・薬学研究への応用——今すぐ始めるゲノム編集、山本卓 編集、実験医学別冊（羊土社）、p81-82（2014）</li> <li>2. <b>香月康宏</b>、押村光雄：遺伝子改変法②HAC/MAC——ES・iPS細胞実験スタンダード、中辻憲夫 監修・末盛博文 編集、実験医学別冊（羊土社）、p300-315（2014）</li> <li>3. <b>香月康宏</b>、押村光雄：安全遺伝子導入のためのヒトおよびマウス人工染色体ベクター——In vitro 毒性・動態評価の最前線、小島肇夫 監修、シーエムシー出版、p174-182（2013）</li> <li>4. 宇野愛海、<b>香月康宏</b>、押村光雄：ヒト人工染色体を用いた遺伝子・再生医療へ向けて、再生医療 Vol.12, No.4, p34-51（2013）</li> </ol> <p>(未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 11 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Uno N, Yakura Y, Kurosaki H, Uno K, Katoh M, Hiratuka M, Ohbayashi T, <b>Kazuki Y.</b>, Oshimura M : Human and mouse artificial chromosomes and their applications (2) : construction of promoter-specific expression systems for various aims. (2014 Jan16-18, JAPAN) 7<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium</li> <li>2. <b>香月康宏</b> Generation of humanized model mice of drug metabolizing enzymes using human artificial chromosomes (2013年11月東京) 日本薬物動態学会平成25年度奨励賞受賞講演</li> <li>3. 宇野愛海、宇野勝、<b>香月康宏</b>、押村光雄（平成25年10月26-27日、広島）人工ヌクレアーゼを用いた新規人工染色体改変技術の開発へ向けて、第3回ゲノム編集研究会</li> <li>4. <b>香月康宏</b>、佐久間哲史、小林カオル、阿部智志、平林真澄、千葉寛、山本卓、押村光雄（平</li> </ol>

	<p>成 25 年 10 月 26-27 日、広島) 染色体工学技術とゲノム編集技術によるヒト化モデル動物の作製、第 3 回ゲノム編集研究会</p> <p>5. Hashimoto M, Kobayashi K, Watanabe M, <u>Kazuki Y</u>, Takehara S, Inaba A, Nitta SI, Senda N Oshimura M, Chiba K. Enhanced synthesis of cholesterol and bile acid in the liver of <i>Cyp3a</i>-knockout mice. (2013 Sep29-Oct3, CANADA) 10<sup>th</sup> ISSX meeting</p> <p>6. Deguchi T, <u>Kazuki Y</u>, Kurihara A, Takehara S, Oshimura M and Izumi T. A NOVEL HUMANIZED UGT2 MOUSE MODEL CONTAINING THE HUMAN UGT2 CLUSTER FOR ASSESSING DRUG GLUCURONIDATION (2013 Sep29-Oct3, CANADA) 10<sup>th</sup> ISSX meeting</p> <p>7. Tsukazaki Y., Senda N., Yamada S., Kubo K., <u>Kazuki Y.</u>, and Oshimura M. High sensitivity and simultaneous quantitation method for arginine vasopressin and desmopressin in human plasma determined by LC-MS/MS/MS (2013 June. 9-13, USA) 61<sup>st</sup> ASMS</p> <p>8. <u>Kazuki Y.</u> Mouse artificial chromosome vectors for animal transgenesis. (2013. Aug12-13, USA) 117<sup>th</sup> OMICS Group conference Genetic Engineering &amp; Genomically modified organisms</p> <p>9. Uno N, Ueda K, Iida Y, Yakura Y, Kurosaki H, Uno K, Osaki M, Ohbayashi T, <u>Kazuki Y</u>, Hiratuka M, Oshimura M. Toward safe and effective gene- and cell-therapies using human artificial chromosomes and stem cells. (2013. Aug12-13, USA) 117<sup>th</sup> OMICS Group conference Genetic Engineering &amp; Genomically modified organisms</p> <p>10. Iida Y, Kazuki Y, Kouprina N, Larionov V, Oshimura M. Stable and removable human artificial chromosomes with different markers and their potential applications. (2013. Aug12-13, USA) 117<sup>th</sup> OMICS Group conference Genetic Engineering &amp; Genomically modified organisms</p> <p>一般向け 計 1 件</p> <p>1. 染色体工学技術を用いたヒト化薬物代謝モデル動物の作製と創薬研究への応用 (2014 年 2 月東京) 『染色体工学が切り拓いた新領域と医学・薬学応用への挑戦』鳥取大学染色体工学研究センター研究成果発表会、参加人数 100 名</p>
<p>図 書</p> <p>計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 0 件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>1. 2013 年 10 月 18 日 お知らせ・トピックス、「医学系研究科 香月助教が日本薬物動態学会 学会 奨励賞を受賞しました。」 <a href="http://www.tottori-u.ac.jp/dd.aspx?itemid=10954#moduleid1019">http://www.tottori-u.ac.jp/dd.aspx?itemid=10954#moduleid1019</a></p>

様式19 別紙1

<p>国民との科学・技術対話の実施 2.21 状況</p>	<p>「国民との科学・技術対話」の推進のための活動として、JST および鳥取県が支援する「地域産官学連携拠点」事業と連携して、H23 年に整備された上記支援のための産官学連携研究施設「とっとりバイオフィロンティア」において、バイオ関連専門技術者の人材育成ならびに既存の産学官連携組織を活用した産業振興を促進した(H25. 6. 21 ; 参加者 8 名、H25. 9. 9-10 ; 参加者 9 名、H26. 3. 18 ; 参加者 8 名)。また、インターネットを通じた研究成果の情報発信を行い、一般市民向けセミナーの開催を実施することで国民に理解しやすい形で本事業を説明した(H26.2.21:参加人数 100 名)。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計 0 件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	117,000,000	65,000,000	52,000,000	0	0
間接経費	35,100,000	19,500,000	15,600,000	0	0
合計	152,100,000	84,500,000	67,600,000	0	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	587,646	52,000,000	0	52,587,646	52,587,646	0	0
間接経費	3,933,817	15,600,000	0	19,533,817	19,533,817	0	0
合計	4,521,463	67,600,000	0	72,121,463	72,121,463	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	30,757,066	実験試薬、実験器具
旅費	209,060	学会参加旅費
謝金・人件費等	3,615,199	研究支援者に係る賃金
その他	18,006,321	動物飼育費、動物輸送費、検査費用
直接経費計	52,587,646	
間接経費計	19,533,817	
合計	72,121,463	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
CO2培養機(鉄台付)	㈱ヒラサワ製、本 体:CPE-26	1	846,480	846,480	2013/10/4	鳥取大学
超低温フリーザー(フ ルセット)	パナソニックヘルスケア㈱ 製、MDF-594フルセット	1	2,058,000	2,058,000	2013/11/5	鳥取大学
マイクロ冷却遠心機 一式	大塚田中商事㈱ 製、本体:3700、マ イクロ-タ:AF- 2724A	1	688,800	688,800	2013/11/20	鳥取大学
微量高速遠心機 一 式	㈱ミー精工製、本 体:MX-307、ラックイ ンロータ:TMA-300、 ラック:AR015-24	1	916,650	916,650	2013/11/27	鳥取大学
小型恒温振とう培養 機バイオシェイカー	タイテック㈱製、BR- 23FH-MR	2	538,650	1,077,300	2013/12/5	鳥取大学
オートクレーブ	㈱ミー精工製、 LSX-500	1	580,125	580,125	2013/12/12	鳥取大学
LunaFL蛍光・明視野 自動細胞計数値装置	米国Logo Biosystems社製、 L20001、L12000	1	756,000	756,000	2013/12/24	鳥取大学
DS-11NanoPad 微 量分光光度計	和光純薬工業㈱ 製、DS-11	1	997,500	997,500	2014/3/12	鳥取大学