

学位論文題名

ヌクレオシド系化合物の細胞膜輸送機構の解明 およびその体内動態への関与に関する研究

学位論文内容の要旨

【序論】

生体内においてヌクレオシドは DNA や RNA 合成の原料として必要不可欠であるが、水溶性が高く、細胞膜の透過にはトランスポーターを介した輸送が必要である。ヌクレオシドトランスポーター（以下 NT）はヌクレオシドの細胞膜透過に重要な輸送担体であり、大きく分けて Na⁺依存性の CNT と Na⁺非依存性の ENT の二つのファミリーに分類される。NT は生体内ヌクレオシドだけでなく、抗ウイルス薬や抗腫瘍薬といったヌクレオシド誘導体も輸送することが知られている。一方、一部のヌクレオシド系化合物が有機アニオントランスポーター（OAT）に輸送されるという報告もあり、これらトランスポーターがヌクレオシド系薬物の体内動態に重要な役割を有していると考えられている。そこで本研究ではヌクレオシド系化合物の細胞膜輸送機構およびその体内動態への関与を明らかにすることを目的とした。

【結果・考察】

1) ヌクレオシド系化合物の細胞膜透過におけるトランスポーターの関与

ヌクレオシド系化合物の細胞膜透過に各トランスポーターがどの程度関与しているかを調べる目的で hCNT1, 2, 3, hENT1, 2 発現 *Xenopus laevis* oocyte（以下 oocyte）を用いて取り込み実験を行った。基質にはプリンヌクレオシドとしてアデノシンとリバビリン（抗ウイルス薬）、ピリミジンヌクレオシドとしてウリジンとゲムシタピン（抗腫瘍薬）を用いた。その結果、CNT, ENT とともに報告されている基質認識性と同様の傾向を示した。さらにこれまでに報告の無いリバビリン取り込みに関して詳細に検討した結果、K_m 値は hCNT2: 18.0 μM, hCNT3: 14.2 μM, hENT1: 3.46 mM, hENT2: 3.71 mM となり、その親和性は CNT が高く、ENT は低いことが示唆された。一方 hOAT1, 3 発現 oocyte を用いた検討において、ヌクレオシドは hOAT1, 3 共に阻害はするが輸送されないことが示唆された。

2) CNT と ENT が局在化した細胞および局在化していない細胞におけるリバビリン輸送

C 型慢性肝炎の治療薬であるリバビリンについて、その細胞膜輸送にどの NT がどの程度寄与しているかは不明である。小腸や腎臓の上皮細胞では刷子縁膜側に CNT、基底膜側に ENT が局在しているのに対し、その他の臓器では CNT と ENT は局在化せず細胞膜表面に共存している。そこで CNT と ENT が局在化した細胞のモデルとしてマウス腸管を、また CNT と ENT が局在化していない細胞のモデルとしてヒト胎盤由来 BeWo 細胞を用いてリバビリン輸送を評価した。

2-1) マウス腸管からのリバビリン吸収における CNT の寄与

腸管からのリバビリンの吸収に関与する可能性のある CNT2 と CNT3 のそれぞれの寄与を明らかにする目的でマウス腸管を用いた灌流実験を行った。CNT2 はピリミジンヌクレオシドを認識しないが CNT3 はそれを認識するため、CNT3 の阻害剤として CNT3 に比較的親和性の高いチミジンを、阻害剤非存在下での吸収量から阻害剤存在下での吸収量を差し引くことで CNT3 を介するリバビリンの輸送を見積もった。その結果、チミジン存在下においてリバビリン消失の減少が認められ、消失速度定数はチミジン非存在下では $0.174 \text{ min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、チミジン存在下では $0.148 \text{ min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ となり、小腸におけるリバビリン取り込みには CNT2 の方が CNT3 よりも優位である可能性が示唆された。

2-2) BeWo 細胞へのリバビリン取り込みにおける NT の寄与

次に BeWo 細胞を用いて取り込み実験を行った。まず CNT と ENT の関与を明らかにする目的で、リバビリン取り込みに及ぼす Na^+ および ENT 特異的阻害剤である NBMPR の影響について検討した。その結果、NBMPR 存在下において CNT 依存的取り込みが、 Na^+ 非存在下において ENT 依存的取り込みが認められた。しかし Na^+ 存在下では NBMPR を添加することで取り込み量の上昇が認められた。一方、リバビリンと同じプリンヌクレオシドであるアデノシンを用いて同様な実験を行った結果、リバビリンと同様に CNT 依存的取り込みと ENT 依存的取り込みが認められたが、 Na^+ および NBMPR 存在下における取り込み量の上昇は認められなかった。

3) hCNT3-hENT1 共発現 oocyte によるリバビリン取り込み

BeWo 細胞を用いたリバビリン取り込み実験において Na^+ および NBMPR 存在下での取り込み量が Na^+ 存在下、NBMPR 非存在下に比べて上昇した機構を解明するために、hCNT3-hENT1 共発現 oocyte を用いて種々検討した。

3-1) hCNT3-hENT1 共発現 oocyte のリバビリン取り込みにおける Na^+ および NBMPR の影響

hCNT3-hENT1 共発現 oocyte のリバビリン取り込みにおける Na^+ および NBMPR の影響を検討した結果、BeWo 細胞と同様に Na^+ および NBMPR 存在下において高い取り込み量を示した。さらに Na^+ および NBMPR 存在下と NaCl を NMDG Cl に置換した条件下におけるリバビリン取り込みの濃度依存性を検討した結果、速度論的パラメーターは hCNT3, hENT1 それぞれを単独で発現させた場合とほぼ同じ値を示した。さらに電気生理学的手法を用いて、リバビリン取り込みに伴って生じる電流を測定したところ、hCNT3 の基質輸送に伴う電流は NBMPR による影響を受けなかった。

3-2) hCNT3-hENT1 共発現 oocyte のリバビリン取り込みにおける hENT1 の影響

3-1) の結果より、 Na^+ 存在下における取り込み量と Na^+ および NBMPR 存在下における取り込み量の差は、双方向性のトランスポーターである hENT1 を介した排出が起きているためではないかという仮説を立て、hENT1 の発現量を変化させて取り込み実験を行った。その結果、hENT1 の発現量が上昇するにつれて Na^+ 存在下における取り込み量が減少した。したがって CNT と ENT が共発現した細胞では取り込まれたリバビリンが ENT によって排出される可能性が示唆された。

4) hCNT3-hENT1 共発現 oocyte のリバビリン取り込みにおける動力学シミュレーション

上述の検討において、oocyte の容積から換算すると、細胞内にリバビリンが飽和する前に hENT1 を介した排出が起きているものと考えられた。そこでこの現象を説明するために、数理モデルを作成し検証した。その結果、細胞内に取り込まれたリバビリンは細胞膜内側の表面において局所的に高濃度になることが示唆された。また 10 分間の取り込みにおける細胞内リバビリン量のシミュレーション値は実測値を反映した。よって hCNT3-hENT1 共発現 oocyte において、細胞内に取り込まれたリバビリンは、hCNT3 により細胞膜内側に局所的に濃縮され、さらに生

じた細胞内外の濃度勾配により、双方向性のトランスポーターである hENT1 を介して排出される可能性が示唆された。臓器によって NT の発現量や分布が異なるため、この結果はヌクレオシド系薬物の各臓器への分布を予測する上で有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	菅 原	満
副 査	教 授	井 関	健
副 査	教 授	加 茂	直 樹
副 査	准教授	宮 内	正 二

学 位 論 文 題 名

ヌクレオシド系化合物の細胞膜輸送機構の解明 およびその体内動態への関与に関する研究

生体内においてヌクレオシドは DNA や RNA 合成の原料として必要不可欠であるが、水溶性が高く、細胞膜の透過にはトランスポーターを介した輸送が必要である。ヌクレオシドトランスポーター（以下、NT）は、大きく分けて Na⁺依存性の CNT と Na⁺非依存性の ENT の二つのファミリーに分類される。NT は生体内ヌクレオシドだけでなく、抗ウイルス薬や抗腫瘍薬といったヌクレオシド誘導体も輸送することが知られている。一方、一部のヌクレオシド系化合物が有機アニオントランスポーター（OAT）に輸送されるという報告もあり、これらトランスポーターがヌクレオシド系薬物の体内動態に重要な役割を有していると考えられている。本研究はヌクレオシド系化合物の細胞膜輸送機構およびその体内動態への関与を明らかにすることを目的とした。

第一章では、ヌクレオシド系化合物の細胞膜透過に各トランスポーターがどの程度関与しているかを調べる目的で種々トランスポーターを強制発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いて取り込み実験を行った。その結果、ヌクレオシド系化合物は CNT、ENT に比較的高い特異性をもって認識され、その親和性は CNT が高く、ENT は低いことが示唆された。一方、有機アニオン発現卵母細胞を用いた検討において、ヌクレオシドは阻害剤としては働くが輸送されないことが示唆された。本結果は、ヌクレオシド系化合物の体内動態を検討する上で、考慮すべきトランスポーターは NT の各分子種に絞り込むことができることを示唆する有用な知見であると評価できる。

第二章および第三章では、体内動態への NT の寄与が十分に明らかになっていない C 型慢性肝炎の治療薬であるリバビリンをモデルとして、その細胞膜輸送にどのトランスポーターがどの程度寄与しているかを明らかにすることを目的

に検討を加えた。また、小腸や腎臓の上皮細胞では刷子縁膜側に CNT, 基底膜側に ENT が局在しているのに対し、その他の臓器では CNT と ENT は局在化せず細胞膜表面に共存していることから、CNT と ENT が局在化した細胞のモデルとしてマウス腸管を、また CNT と ENT が局在化していない細胞のモデルとしてヒト胎盤由来 BeWo 細胞を用いてリバビリン輸送を評価した。その結果、極性を有する（トランスポーターが局在している）上皮細胞においては、頂側膜からの濃縮的な基質取り込みと、測定膜からの細胞外への流出により、一方向性の輸送を作り出していることを明らかにした。一方で、CNT と ENT が共存する細胞においては、両者の輸送活性の和より小さな取り込み量しか示さず、細胞内濃度の制御機構をさらに詳細に検討する必要性を示した。本結果は、薬物の各種トランスポーターに対する親和性やそのトランスポーターの細胞膜局在性、発現量の違いにより、標的とする臓器への到達度や蓄積性が制御されることを示唆しており、トランスポーターを標的とした薬物送達を検討する上で有用な知見と考えられる。

第四章では、上述のアフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現系による検討において認められた「CNT と ENT が共存する細胞においては、両者の輸送活性の和より小さな取り込み量しか示さない」現象の機構を解明した。この現象は卵母細胞の容積から換算すると、細胞内リバビリン濃度が飽和する前に逆に排出が起きていると仮定すると説明づけられることから、数理モデルを作成しその可能性を検証した。本数理モデルは、細胞内における基質の拡散過程を考慮した新規な解析法である。その結果、細胞内に取り込まれたリバビリンは細胞膜内側の表面において局所的に高濃度になることが示唆された。また、シミュレーション値は実測値を反映した。したがって、CNT3-ENT 共発現細胞において、細胞内に取り込まれたリバビリンは、CNT3 により細胞膜内側に局所的に濃縮され、さらに生じた細胞内外の濃度勾配により、双方向性のトランスポーターである ENT を介して排出される可能性が示唆された。臓器によって NT の発現量や分布が異なるため、この結果はヌクレオシド系薬物の各臓器への分布を予測する上で有用な知見と評価できる。

発表会および口頭試問においては、多数の出席者を得て討論し、質疑には的確に回答した。また、4 人の審査担当者による審査の結果、本論文「ヌクレオシド系化合物の細胞膜輸送機構の解明およびその体内動態への関与に関する研究」は学位論文の水準に達しており、山本 崇は博士（薬学）として十分な知見と能力を有しているものと認めた。