

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007 年度～2008 年度  
 課題番号：19590135  
 研究課題名（和文） 抗がん剤をはじめとするヌクレオシド系薬物のトランスポーター介在輸送と薬効との関係  
 研究課題名（英文） Relation between the efficacy and the activity of transporters of nucleoside analogue  
 研究代表者  
 菅原 満 (SUGAWARA MITSURU)  
 北海道大学・北海道大学病院・准教授  
 研究者番号：60332467

## 研究成果の概要：

ヌクレオシド系薬物を積極的に細胞内に取り込むトランスポーター（CNT）のみを発現する細胞では、これに加えて濃度差にしたがって両方向性に輸送するトランスポーター（ENT）を同時に発現する細胞に比べて低濃度における細胞内蓄積量が多く、薬物曝露後に ENT の活性を阻害することで細胞内への蓄積性を高められる可能性が示唆された。ヌクレオシド系抗がん薬ゲムシタビンをを用いた検討の結果、ENT 活性を阻害した条件下において非阻害条件下に比べて高い殺細胞効果が認められたことから、ENT 阻害剤を使用することにより、低濃度でより高い効果が得られる可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態学

## 1. 研究開始当初の背景

ヌクレオシド系化合物は抗がん剤や抗ウイルス剤として広く臨床に用いられている。その体内動態（組織、細胞内移行）には、これらの化合物を膜輸送するトランスポーターが深く関与している。

抗がん剤では、がん細胞におけるトランスポーターの発現が薬物の作用（薬効）や薬剤耐性に関与するとの報告がある。また、その作用は正常組織では毒性として現れる。一方、抗ウイルス薬（C 型肝炎治療薬）リバビリン

の副作用である貧血の原因は、トランスポーターにより赤血球内に取り込まれ、細胞内でリン酸化されたリバビリンが蓄積し赤血球膜破壊を促進することが原因の一つであることが報告されている。

これらの作用・毒性発現は組織中（細胞内）の薬物濃度に左右されるが、トランスポーターを介して輸送される薬物の組織中（細胞内）濃度と血液中薬物濃度との関係や作用・毒性との関係が明らかにされている例は少ない。これらの関係が明らかになると、薬物

の血液中濃度をもとに有効性を担保したり副作用を回避したりすることが可能となるが (TDM: Therapeutic Drug Monitoring), 現在, このようなモニタリングが可能な抗がん剤, 抗ウイルス剤は非常に少ない。

## 2. 研究の目的

- 1) 細胞に発現するヌクレオシドトランスポーターの種類やそれぞれの特性, 発現量が与える細胞内薬物蓄積量 (濃度) への影響を明らかにする。
- 2) それによって起こる薬効 (殺細胞効果) の変動との関係についてヌクレオシド系抗がん剤を用いて評価する。

## 3. 研究の方法

### 1) BeWo 細胞 Cos7 細胞を用いた取り込み実験

取り込み実験には, 底面積 $1.9\text{ cm}^2$ の24 wellに培養した細胞を用いた。取り込み実験の緩衝液には $140\text{ mM NaCl}$ ,  $5.4\text{ mM KCl}$ ,  $1.8\text{ mM CaCl}_2$ ,  $0.8\text{ mM MgSO}_4$ ,  $5\text{ mM D-Glucose}$ ,  $25\text{ mM Tris}$ をHEPESで $\text{pH}7.5$ に調整したものを用いた。ただし,  $\text{Na}^+$ 非存在下で行う場合は,  $\text{NaCl}$ をNMDGと $\text{HCl}$ に置換した。室温の緩衝液 $1\text{ mL}$ で細胞を洗浄後,  $1\text{ well}$ 当たり $250\text{ }\mu\text{L}$ の基質溶液を添加し, 室温で一定時間インキュベートした。その後, 細胞を氷冷した緩衝液 $1\text{ mL}$ で二回洗浄し,  $1\text{ well}$ 当たり $250\text{ }\mu\text{L}$ の $0.2\text{ M NaOH}$ 含有 $1\%$  SDS溶液で細胞を溶解した。定量は放射性同位元素を用い液体シンチレーションカウンターで測定し, 得られた値を細胞数で補正した。

### 2) トランスポーター発現ocyteを用いた取り込み実験

cRNA を注入することにより目的のトランスポーター蛋白質を発現させた Oocyte を用いた。取り込み実験の緩衝液には $96\text{ mM NaCl}$ ,  $2\text{ mM KCl}$ ,  $1.8\text{ mM CaCl}_2$ ,  $1\text{ mM MgCl}_2$ ,  $5\text{ mM HEPES-Tris}$ ,  $\text{pH}7.4$ を用いた。ただし,  $\text{Na}^+$ 非存在下で行う場合は,  $\text{NaCl}$ をNMDGと $\text{HCl}$ に置換した。取り込み実験は oocyte  $1$ 個当たり $100\text{ }\mu\text{L}$  ND96 となるように基質溶液を添加し, 室温で一定時間インキュベートした。その後, oocyte を氷冷した ND96 で  $5$ 回洗浄し,  $500\text{ }\mu\text{L}$ の $3\%$  SDS 溶液で oocyte を溶解した。定量は放射性同位元素を用い液体シンチレーションカウンターで測定した。

### 3) XTT assay 法による殺細胞効果の評価

XTT Sodium Salt は黄色のテトラゾリウム塩であり, 生細胞中のミトコンドリアに存在するコハク酸デヒドロゲナーゼの作用によって還元されると, オレンジ色のフォルマザン色素 (XTT formazan) を生成する。XTT assay 法はこの反応を利用し, 細胞の生存率を定量化して測定する方法である。生細胞が多いほどより多くの XTT Sodium Salt が還元

されるため, 生細胞数との高い相関関係がみられる。

実験には COS-7 細胞を  $96$  穴ウェルに  $5\sim 10 \times 10^4$  cells/mL の濃度で  $200\text{ }\mu\text{L}$  ずつ播き,  $24$  時間培養したものをを用いた。ゲムシタピンは生理食塩水に溶解されたものを Medium で希釈して濃度を調整した。NBMPR を用いる場合は, DMSO に溶解して  $1\text{ mM}$  に調製したものを  $100$  倍希釈になるよう添加した。また NBMPR を添加しない群にも同様に DMSO を  $100$  倍希釈になるよう添加した。

濃度調整したゲムシタピン含有 Medium を  $100\text{ }\mu\text{L}$  添加し,  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  下でインキュベートした。一定時間後, ゲムシタピン含有 Medium を吸引し, Medium  $200\text{ }\mu\text{L}$  で洗浄後 Medium  $200\text{ }\mu\text{L}$  を加え,  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  下で培養した。一定時間後に Medium を吸引し, XTT 混合溶液 ( $1\text{ mg/mL XTT Sodium Salt} + 25\text{ }\mu\text{M 1-methoxy PMS in PBS}$ ) を  $50\text{ }\mu\text{L}$  添加した。これを  $5\%$   $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$  で  $2$  時間インキュベートし, マイクロプレートリーダーを用いて  $450\text{ nm}$  の吸光度を測定することで, 生成した XTT formazan を定量し, 生細胞量を測定した。

## 4. 研究成果

### 1) トランスポーターによる細胞内薬物蓄積性制御

促進拡散型である ENT, 濃縮型である CNT の両方を発現している BeWo 細胞を用いて取り込み実験を行った。基質としては, 抗がん薬ゲムシタピン, 抗ウイルス薬リバビリンほか, 内因性, 外因性のヌクレオシド系化合物を用いた。まず CNT と ENT の関与を明らかにする目的で, 薬物取り込みに及ぼす  $\text{Na}^+$  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,  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  存在下では予想に反し NBMPR を添加することで取り込み量の上昇が認められた (図 1)。

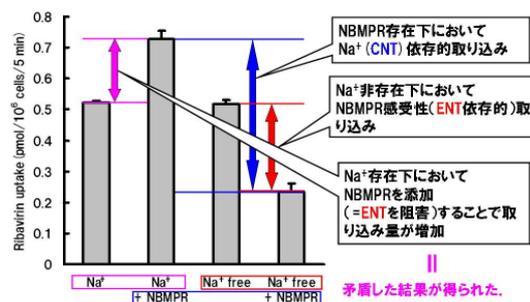


図 1 BeWo 細胞へのリバビリン取り込みにおける CNT と ENT の寄与

そこで,  $\text{Na}^+$  存在下における取り込み量と  $\text{Na}^+$  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 ENT

を介した排出が起きているという仮説を立て、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、ENTの発現量が上昇するにつれてNa<sup>+</sup>存在下における取り込み量が減少した。これらの結果から、CNTとENTが共発現した細胞では取り込まれた薬物がENTによって排出される可能性が示唆された(図2, 3)。

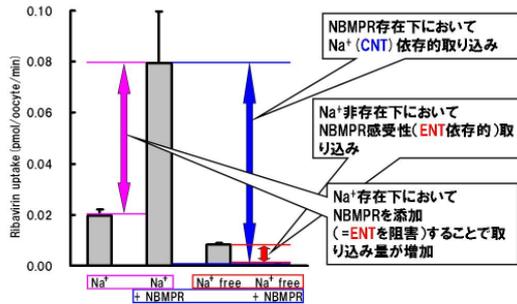
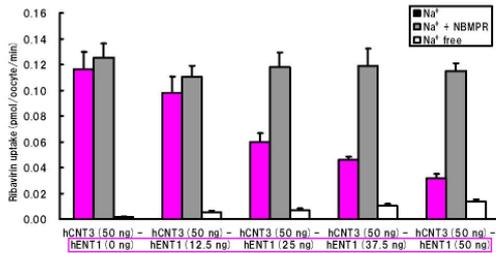


図2 hCNT3-hENT1 共発現 *Xenopus* oocyte のリバビリン取り込みにおけるNa<sup>+</sup>およびNBMPRの影響

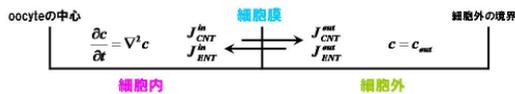


hENT1発現量が上昇するにつれてNa<sup>+</sup>存在下での取り込み量が減少した。

図3 hCNT3-hENT1 共発現 *Xenopus* oocyte のリバビリン取り込みにおけるhENT1発現量の影響

上述の検討において、卵母細胞の容積から換算すると、細胞内に薬物が飽和する前にENT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(図4)を作成し検証した。その結

数理モデルの概図

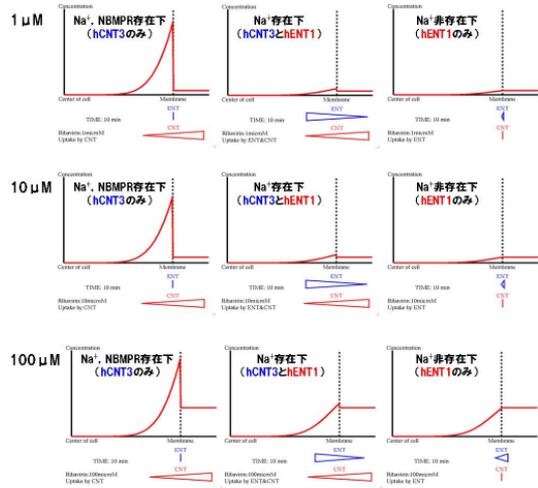


リバビリンの拡散方程式

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \begin{cases} DV^2c & \text{細胞内} \\ J_{CNT}^{in} - J_{CNT}^{out} + J_{ENT}^{in} - J_{ENT}^{out} & \text{細胞膜} \\ 0 & \text{細胞外} \end{cases}$$

図4 hCNT3-hENT1 共発現 *Xenopus* oocyte のリバビリン取り込みの数理モデルの概略図

果、細胞内に取り込まれた薬物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薬物量のシミュレーション値は実測値を反映した(図5, 6)。



リバビリンの濃度が上昇しても細胞膜内側のリバビリンの濃縮は保たれていた。しかし、リバビリン濃度の上昇につれてhCNT3が飽和してきたため、細胞外のリバビリン濃度と比較して細胞膜の内側の濃縮率が低くなる傾向が認められた。

図5 hCNT3-hENT1 共発現 *Xenopus* oocyte の細胞内外におけるリバビリン濃度のシミュレーション

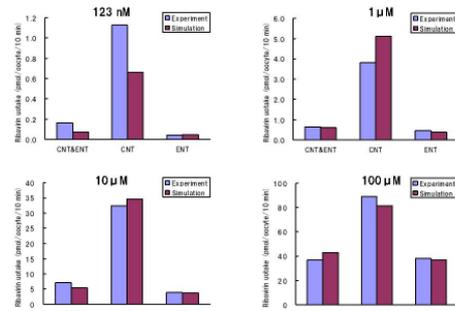


図6 hCNT3-hENT1 共発現 *Xenopus* oocyte の細胞内外におけるリバビリン濃度のシミュレーションと実測値の比較

したがって、CNT-ENT 共発現細胞において、細胞内に取り込まれた薬物は、CNT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。臓器によってトランスポーター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も有用であると考えられる。

## 2) トランスポーターの活性変動と抗がん薬の殺細胞効果との関係

Na<sup>+</sup>依存性ヌクレオシドトランスポーター (CNT) および Na<sup>+</sup>非依存性ヌクレオシドトランスポーター (ENT) が同時に発現している細胞においては、高濃度の基質存在下では ENT による輸送が優位であるのに対し、基質が低濃度の場合には CNT が優位であり、細胞内に取り込まれた薬物は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 ENT を介して排出されることが示唆された。この時、ENT の活性を阻害すると阻害しないときに比べて細胞内への薬物蓄積量が増大した。したがって、ENT 阻害剤を共存することで薬物の細胞外への流出を遅延させ、薬効の持続あるいは低濃度での効果増強が期待できるものと推測された (図 7)。

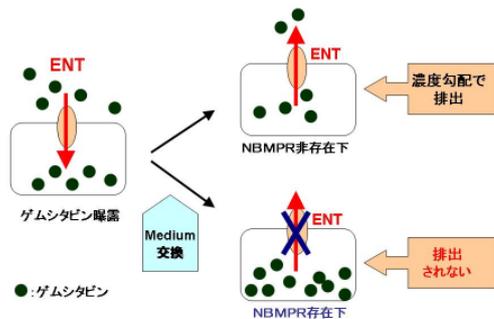


図 7 ENT 阻害による細胞内ゲムシタビン排出抑制

そこで、CNT および ENT の基質であり、抗がん剤であるゲムシタビンの殺細胞効果におよぼす ENT 阻害剤の影響を検討した。アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞を用い、細胞内に取り込まれたゲムシタビンの排出阻害時における殺細胞効果を検討した。ゲムシタビン曝露後、ENT 阻害剤であるニトロベンジル

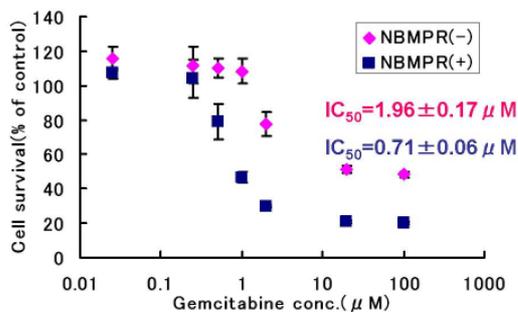


図 8 ENT 排出阻害条件下におけるゲムシタビンの殺細胞効果

メルカプトプリンリボシド (NBMPR) を添加した培地で細胞を培養し、生存率を XTT アッセイ法により測定した。その結果、NBMPR 存在下において細胞生存率の減少が認められた。すなわち、その IC<sub>50</sub> 値は NBMPR 添加時で 0.71 μM に対し非添加時では 1.96 μM であり、ゲムシタビン曝露後に NBMPR を添加して培養した方が高い殺細胞効果が認められた (図 8)。

これらの結果より、ゲムシタビン曝露後の ENT による薬物排出を抑制することにより、より高い抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。これらの成果につき、現在論文作成中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

- 1) Sugawara M., Kuniki K., Yamamoto T., Takekuma Y.: Contribution of concentrative nucleoside transporter 3 (CNT3) in intestinal absorption of ribavirin, 2007 AAPS Annual Meeting, San Diego, CA, Nov. 13, 2007

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 満 (SUGAWARA MITSURU)

北海道大学・北海道大学病院・准教授

研究者番号: 60332467

(2) 研究分担者

平野 剛 (HIRANO TAKESHI)

北海道大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号: 00322826

(2007 年度)

(3) 連携研究者

平野 剛 (HIRANO TAKESHI)

北海道大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号: 00322826

(2008 年度)