

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590145  
 研究課題名（和文） ヒト赤血球膜における薬物輸送と薬物相互作用・有害反応の場としての赤血球  
 研究課題名（英文） Drug Transport in human erythrocyte membrane and drug interaction/adverse reaction in erythrocyte  
 研究代表者  
 湯元 良子 (RYOKO YUMOTO)  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：70379915

研究成果の概要：ヒト洗浄赤血球および赤血球膜小胞(IOVs, ROVs)を用いた研究から、(1)臨床で観察されるバルプロ酸-カルバペネム系抗生物質の相互作用の分子メカニズムとして、異物排出トランスポーターMRP4が関与していること、(2)リバビリンの副作用の溶血性貧血の原因である赤血球内移行にはヌクレオシドトランスポーターhENT1が関与し、その活性調節因子が赤血球内に存在する可能性が示唆された。これらの研究成果は、赤血球における薬物相互作用・有害反応の回避、並びに新たな薬物治療法の開発へと繋がることと期待される。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：医療薬剤学、薬物相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床において、抗てんかん薬バルプロ酸はカルバペネム系抗生物質との併用により血中濃度が低下し、てんかん発作が再発する危険性があるため、両薬物の併用は禁忌となっているが、この相互作用メカニズムは不明である。申請者らはラット赤血球から調製した反転赤血球膜小胞(IOVs; inside-out vesicles)を用い、両薬物の相互作用について、「カルバペネム系抗生物質によるMRP阻害が原因となって、バルプロ酸の赤血球内蓄積が増大し、そのために血漿中濃度が低下する」という新たな分子メカニズムを提唱した。

しかし、種差の問題があり、本分子メカニズムがヒトにおいても成立するか否かは不明であり、さらに赤血球内移行後のバルプロ酸の運命については、現在のところ全く不明であった。

(2) リバビリンはC型慢性肝炎の補助治療薬として有用な薬剤であるが、その副作用である血液毒性により、使用が制限されている。この血液障害の第一ステップは、その赤血球内移行と考えられるが、リバビリンの赤血球膜輸送については情報が乏しく、取り込みや排出を支配するトランスポーターの実体については不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、ヒト赤血球を用い、臨床で観察されるバルプロ酸-カルバペネム系抗生物質の相互作用の分子メカニズムについて、赤血球膜における MRP 輸送とその阻害、および赤血球内移行後のバルプロ酸の運命という観点から解明することを第一の目的とする。

(2) リバビリンの赤血球内移行を支配する取り込みおよび排出トランスポーターについて解明することを第二の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) インフォームドコンセントを取得した健康成人から血液を採取し、膜の表裏を反転させた反転赤血球膜小胞(Inside out vesicles; IOVs)の調製し、赤血球膜上に存在している multidrug resistance-associated protein (MRP)などの ATP 依存性薬物排出トランスポーターの機能を評価した。迅速ろ過法を用い、MRP1,4,5 の基質である 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione (DNP-SG)、MRP1-5,8 の基質であるメトトレキサート (MTX)、MRP2,5 の基質である 5-(and-6)-carboxy- 2',7'dichloro- fluorescein (CDCF)の IOVs への ATP 依存的な取り込み活性を測定し、各種阻害剤共存の影響について検討することにより、ヒト赤血球膜に発現している MRP4 及び MRP5 の機能評価を行った。さらに、各基質の取り込みに及ぼすバルプロ酸およびカルバペネム系抗生物質の影響について検討した。

(2) ヒト洗浄赤血球及びヒト赤血球膜小胞(Right-side out vesicles; ROVs)を用い、リバビリン及びヌクレオシドトランスポーターの代表的基質であるウリジンの輸送の特性について解析した。基質として<sup>3</sup>Hリバビリン、<sup>3</sup>Hウリジンを用いた。

## 4. 研究成果

(1) 調製した膜小胞の方向性に関する検討：調製した IOVs の反転率は 18.6%であり、残りはすべて膜フラグメントであった。また、ROVs に関しては 51%が ROV であり、わずかに IOV が含まれているものの、残りのほとんどは膜フラグメントであった。従って、これら膜小胞を用いることで IOVs, ROVs の輸送特性解析が可能であることが示された。

(2) ヒト赤血球膜における排出トランスポーター MRP 機能について評価し、以下の結果を得た。

① DNP-SG、MTX および CDCF の IOVs への ATP 依存的な取り込み活性に温度依存性および濃度依存性が認められた。さらにその取り込み活性には個体差が認められた(図 1)。また、MTX および DNP-SG の ATP 依存的

な輸送には高親和輸送系と低親和輸送系の二つの輸送系が関与していることが明らかとなった(図 2)。ミカエリスメンテン式より速度論敵解析を行ったところ、MTX の高親和性輸送の Km 値が 23.8 μM、Vmax 値が 0.017 nmol/mg protein/min)、低親和性輸送の Km 値が 256.7 μM、Vmax 値が 0.094 nmol/mg protein/min)と算出された。

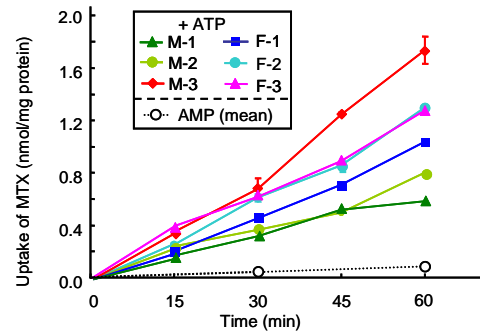


図 1. ヒト IOVs への MTX 取り込みにおける ATP 依存性および個体差

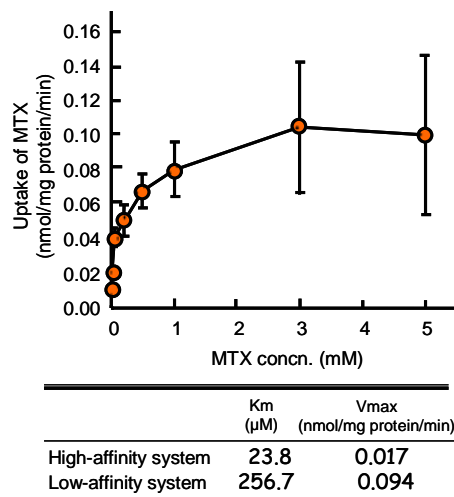


図 2. ヒト IOVs への MTX 取り込みにおける濃度依存性

② 上記 MRP 基質の取り込み活性に及ぼす各種併用薬物の影響を検討したところ、非特異的 MRP 阻害剤であるプロベネシド、MRP4,5 の阻害剤であるスルフィンピラゾン添加により、いずれの基質も取り込みが有意に阻害された。一方、特異的 MRP4 阻害剤であるプロスタグランジン E<sub>i</sub> 添加により、MTX の取り込みは濃度依存的に著しく阻害されたが、CDCF の取り込みに変化は認められなかった(図 3)。ヒト赤血球膜には MRP1,4,5 が発現していることから、DNP-SG の高親和性輸送は MRP1 介在性、低親和性輸送は MRP4 介在性であること、MTX を用いることによって主に MRP4 の輸送特性を、また CDCF を用いることによって MRP5 の輸送特性を

評価できることが示唆された。

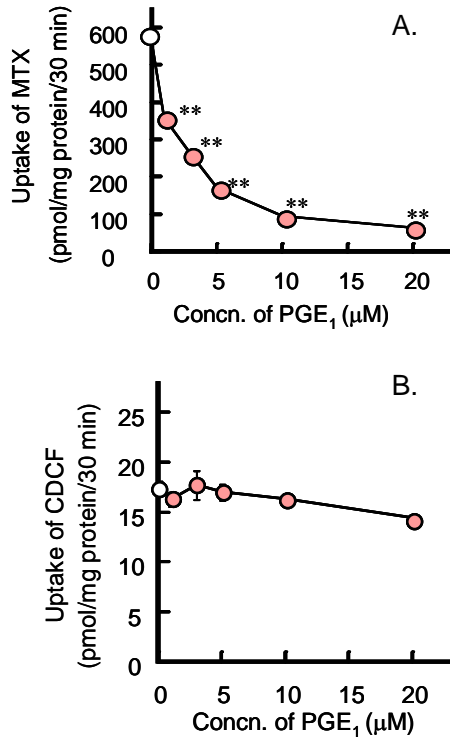


図3. ヒト IOVs における MTX(A)および CDCF(B)の輸送に及ぼすプロスタグランジン E<sub>1</sub>(特異的 MRP4 阻害剤)の影響

③さらに、これら MRP 基質の IOVs への取り込みに及ぼす抗てんかん薬であるバルプロ酸およびカルバペネム系抗生物質であるパニペネムの影響を検討したところ、バルプロ酸はいずれの基質の取り込みも阻害した(図4)。一方、パニペネムは DNP-SG および MTX の取り込みを阻害したが、CDCF の取り込みは阻害しなかった(図5)。

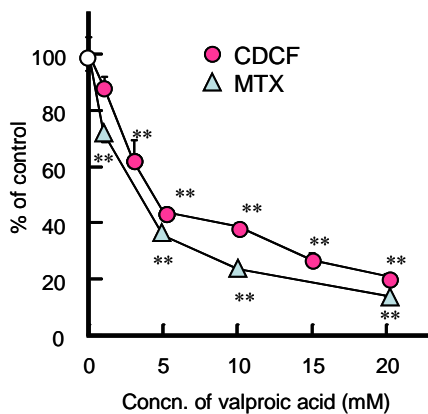


図4. ヒト IOVs における MTX および CDCF の輸送に及ぼすバルプロ酸の影響

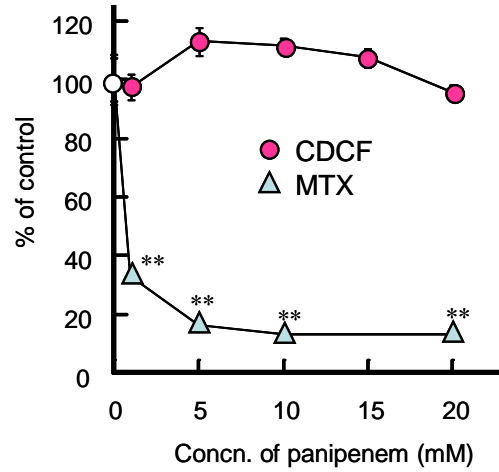


図5. ヒト IOVs における MTX および CDCF の輸送に及ぼすパニペネムの影響

④次に、バルプロ酸自身の輸送について検討したところ、バルプロ酸の IOVs への取り込みには ATP 依存性が認められた。また、ヒト洗浄赤血球において、バルプロ酸の赤血球内蓄積量がパニペネムによって有意に増加し、バルプロ酸排出の阻害が示唆された。

以上の結果から、ヒト赤血球膜に取り込まれたバルプロ酸は通常、MRP4 によって排出されているが、カルバペネム系抗生物質を併用することにより、MRP4 が阻害され、バルプロ酸の赤血球内濃度の上昇および血漿中濃度の減少によりてんかん発作が引き起こされる可能性が示唆された。(図6)。

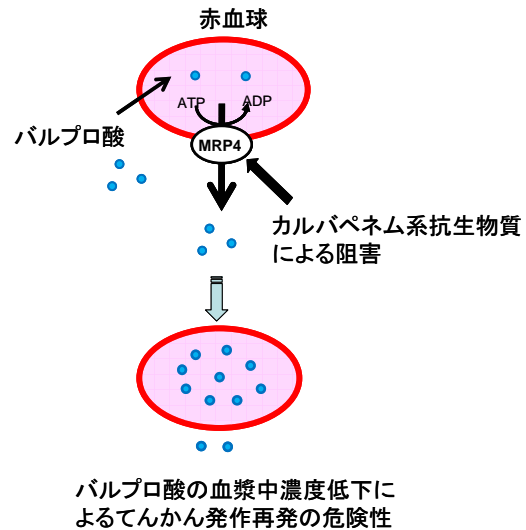


図6. バルプロ酸とカルバペネム系抗生物質の薬物相互作用メカニズム

(2) プリンヌクレオシドアナログであるリバビリンは、インターフェロン II- $\beta$ と併用して C 型慢性肝炎の治療に使用されている有用な薬剤であるが、主な副作用である血液障害は、その赤血球内移行と密接に関係するものと考えられる。そこでヒト赤血球膜におけるヌクレオシドトランスポーター(ENT)の機能について評価し、以下の結果を得た。

①ヒト洗浄赤血球におけるリバビリンの取り込みには濃度依存性(飽和性)が認められ、ミカエリスメンテン式より速度論的解析を行ったところ、Km 値、Vmax 値は、1014  $\mu$ M、76.3 pmol/mg protein/sec と算出された(図 7)。さらに、ヌクレオシドトランスポーターの基質である uridine を用いた場合でも飽和性が認められた(Km 値 130  $\mu$ M、Vmax 値 24.6 pmol/mg protein/sec)。

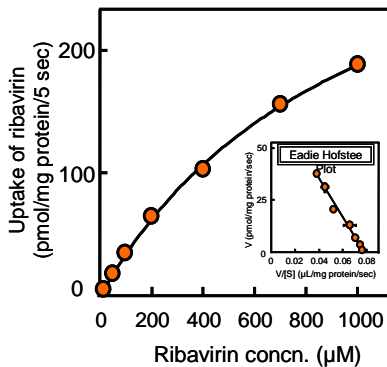


図 7. 洗浄赤血球へのリバビリン取り込みの濃度依存性

②ヒト洗浄赤血球における 15  $\mu$ M [ $^3$ H] リバビリン、 [ $^3$ H] ウリジン輸送に及ぼす、hENT1 阻害剤 NBMPR (0~100 nM)の影響について検討を行った。図 8 に示すように、 [ $^3$ H] リバビリンの取り込みは、NBMPR 濃度依存的に阻害され、IC<sub>50</sub> 値は、15.6 nM となった。 [ $^3$ H] ウリジンの場合、IC<sub>50</sub> 値は 23.5 nM となり、リバビリンの方が NBMPR に対する感受性が強いという結果が得られた。

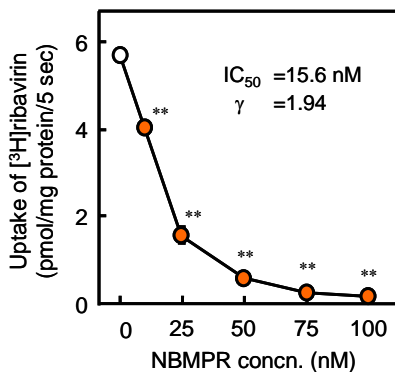


図 8. 洗浄赤血球へのリバビリン取り込みに及ぼす NBMPR の影響

③ヒト赤血球反転膜小胞(IOVs)を用いて 1  $\mu$ M [ $^3$ H] リバビリン、 15  $\mu$ M [ $^3$ H] ウリジン取り込みの時間依存性について検討を行った。結果、 [ $^3$ H] リバビリン取り込みは、5 分まで時間依存的に増加した。さらに、Na<sup>+</sup>勾配による影響は観察されなかったことから、CNT (Concentrative nucleoside transporter)は関与しないことが示唆された(図 9)。

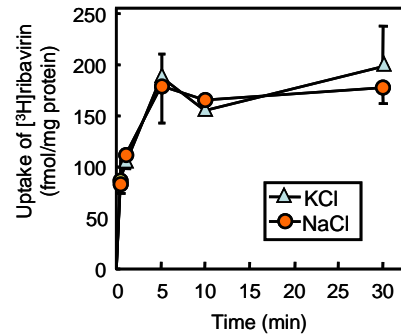


図 9. IOVs へのリバビリン取り込みの時間依存性および Na<sup>+</sup>勾配の影響

④ [ $^3$ H] リバビリンに非標識リバビリン、 [ $^3$ H] ウリジンに非標識ウリジンを加え、IOVs への取り込みに及ぼす濃度依存的な影響について検討を行った。その結果、リバビリン、ウリジンの IOVs への取り込みは、いずれも洗浄赤血球での結果(図 7)と異なり、グラフはシグモイドカーブを示した(図 10)。ミカエリスメンテン式より速度論的解析を行ったところ、Km 値、Vmax、 $\gamma$  値はリバビリンでそれぞれ 29.8 mM、45.6 nmol/mg protein/sec、1.5、ウリジンで 10.2 mM、17.5 nmol/mg protein/sec、1.8 と算出され、IOVs への取り込みにおける基質の親和性は低い値として見積もられた。

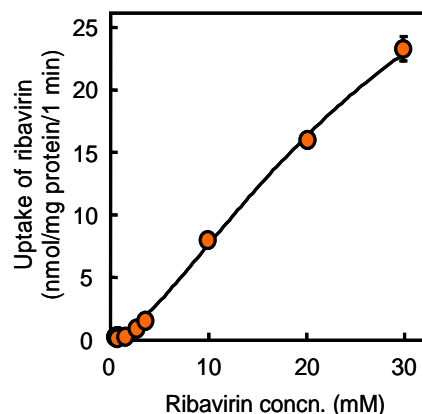


図 10. IOVs へのリバビリン取り込みにおける濃度依存性

⑤15  $\mu\text{M}$ 、10 mM  $^3\text{H}$  リバビリンの IOVs への取り込みに及ぼす NBMPR の影響について検討を行った。15  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$  リバビリンの取り込みは、NBMPR 100 nM のときにコントロールの約 6 倍と最大促進効果を示し、それ以上の濃度では輸送が低下するという二相性が観察された(図 11)。一方、10 mM  $^3\text{H}$  リバビリンの取り込みは、NBMPR によって、濃度依存的に阻害された(図 12)。

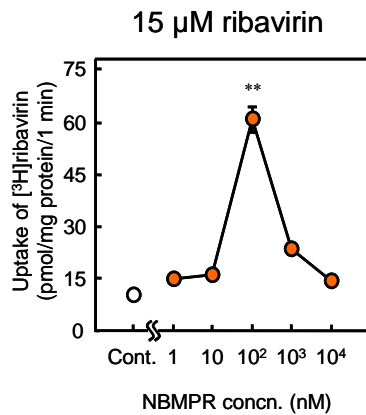


図 11. IOVs への 15  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ ribavirin の取り込みに及ぼす NBMPR の影響

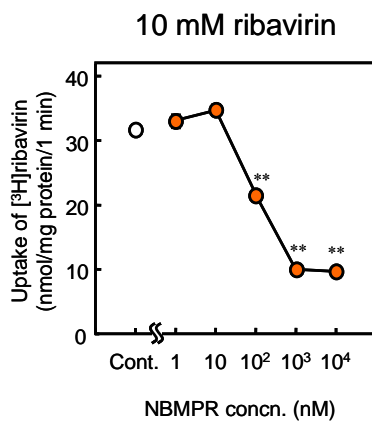


図 12. IOVs への 10 mM  $^3\text{H}$ ribavirin の取り込みに及ぼす NBMPR の影響

従って、ヒト赤血球反転膜小胞において NBMPR は、基質濃度が低い場合には取り込み促進効果を示し、高い濃度では取り込み阻害効果を示した。また他の ENT1 の阻害剤であるジピリダモールによっても同様の結果が得られた。

⑥ヒト赤血球膜小胞(ROVs)を用いてウリジン取り込みの時間依存性と、取り込みに及ぼす NBMPR の影響について検討した(図 13,14)。

その結果ウリジンの取り込みは、時間に依存して増加した。また、ROVs においても、IOVs 同様、300 nM NBMPR で $^3\text{H}$ ウリジンの取

り込みはコントロールの約 12.3 倍と最大促進効果を示し、1000 nM 以上の濃度では取り込みの減少傾向が観察された。

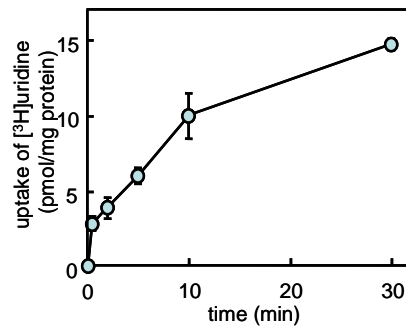


図 13. ROVs への 15  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ uridine の取り込みににおける時間依存性

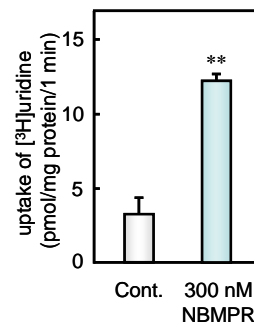


図 14. 15  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ uridine の取り込みに及ぼす NBMPR の影響

このように、リバビリンおよびウリジンなどのヌクレオシドの取り込みに関して、洗浄赤血球と膜小胞において結果の乖離が見られた原因として、インタクトな赤血球内に存在している何らかの物質が通常は hENT1 に作用し活性を調節しているが、赤血球膜を小胞化する際に消失している可能性が考えられた(図 15)。

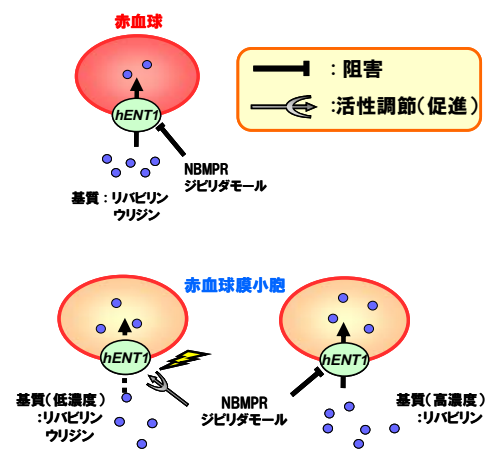


図 15. 洗浄赤血球および膜小胞におけるヌクレオシドトランスポーターの輸送機構

以上の研究成果により、現在まで不明であった臨床におけるバルプロ酸-カルバペネム系抗生物質の相互作用メカニズムとして異物排出トランスポーターMRP4が関与していることが明らかとなり、薬物間相互作用回避の可能性が示唆された。さらに、リバビリンの副作用である溶血性貧血の原因にヌクレオシドトランスポーターhENT1が関与し、その活性調節因子が赤血球内に存在する可能性が示唆された。これらの研究成果は、赤血球における薬物相互作用・有害反応の回避、並びに新たな薬物治療法の開発へと繋がるのが期待される。今後は赤血球内に存在すると予測されたhENT1の活性調節因子について探索を続けていく予定である。

#### 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)

[雑誌論文] (計 2 件) いずれも査読有

① Taogoshi, T., Nagai, J., Yumoto, R. and Takano, M.: Transport of prostaglandin E1 across rat erythrocyte membrane. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**(6), 1288-1291 (2008)

② Hanada, Y., Kimura, E., Nagai, J., Yumoto, R. And Takano, M.: Transport of ribavirin and uridine in human erythrocytes and erythrocyte membrane vesicles., *Yakugaku Zasshi*, **128**(4), 79 (2008)

[学会発表] (計 7 件)

① Yukako Hanada, Eri Kimura, Junya Nagai, Ryoko Yumoto and Mikiyoshi Takano; Transport of ribavirin and uridine in human erythrocytes and erythrocyte membrane vesicles. 第2回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2008年12月20-21日、京都大学薬学部記念講堂

② 木村衣里、花田有歌子、永井純也、湯元良子、高野幹久: 「ヒト赤血球膜小胞を用いたリバビリンの輸送特性解析において観察された特異な輸送促進現象」第18回医療薬学会年会、2008年9月20-21日、札幌コンベンションセンター

③ 湯元良子、山川恵子、木村衣里、永井純也、高野幹久: 「ヒト赤血球膜における異物排出トランスポーターMRPの輸送特性解析」日本膜学会第30年会、2008年5月14-15日、東京理科大学森戸記念館

④ 木村衣里、山川恵子、永井純也、湯元良子、高野幹久: 「ヒト赤血球膜におけるMRP介在性輸送～バルプロ酸とカルバペネム系抗生物質の相互作用との関連性～」第1回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2007年12月15-16日、日本薬学会会長井記念館

⑤ 山川恵子、湯元良子、木村衣里、永井純也、高野幹久: 「ヒト赤血球膜におけるMRP5の機能解

析」第46回日本薬学会中国四国支部学術大会、2007年11月11-12日、高知市文化プラザ

⑥ 湯元良子、山川恵子、木村衣里、濱田夏希、永井純也、高野幹久: 「ヒト赤血球膜におけるMRP介在性輸送とバルプロ酸およびカルバペネム系抗生物質の相互作用」第17回日本医療薬学会年会、2007年9月29-30日、群馬県民会館

⑦ 湯元良子、木村衣里、山川恵子、濱田夏希、永井純也、高野幹久: 「ヒト赤血球膜におけるMRP介在性輸送の解析-バルプロ酸とカルバペネム系抗生物質の薬物相互作用の観点から-」医療薬学フォーラム2007、2007年7月14-15日、山形テレサ

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

湯元 良子 (YUMOTO RYOKO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：70379915

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

高野 幹久 (TAKANO MIKIHISA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：20211336