

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790128  
 研究課題名（和文） C型肝炎治療効果の鍵を握る肝・腎リバビリン輸送機構の解明とその個人差  
 研究課題名（英文） Characterization of ribavirin uptake systems in hepatocytes and renal tubular cells  
 研究代表者  
 降幡 知巳（FURIHATA TOMOMI）  
 千葉大学・大学院薬学研究院・助教  
 研究者番号：80401008

研究成果の概要（和文）：C型肝炎治療奏功の個人差を明らかにするにはリバビリンの肝・腎取り込み機構を明らかにする必要がある。本研究の結果、ヒト肝細胞および腎細胞にリバビリンを取り込むトランスポーターが明らかとなった。さらに本研究ではリバビリンの肝細胞取り込みにおける個人差を明らかとした。今後これらトランスポーターの発現量および機能に個人差を生じる遺伝的・環境的要因を明らかとし、C型肝炎治療法に応用していく必要があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to characterize the major ribavirin uptake transporter(s) in human hepatocytes or renal tubular cells. The results showed that equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) was exclusively involved in ribavirin uptake in human hepatocytes and that the levels of the uptake activity were different among hepatocytes. On the other hand, the results suggest that concentrative nucleoside transporter 3 (CNT3), which was abundantly expressed in human renal proximal tubular cells, would be responsible for renal re-absorption of ribavirin. Genetic or environmental factors that alter the levels of function or expression of ENT1 and CNT3 should be determined in future study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：薬剤反応性、薬学、抗生物質

## 1. 研究開始当初の背景

インターフェロンとリバビリンの併用は唯一のC型肝炎治療法であるが、約4割の患者では効果が得られない。その原因は不明であ

るが、リバビリンの薬効発現には肝細胞への移行が必要であり、さらに効果を高めるためには一定の血漿中濃度を維持しなくてはならないことから、これらを規定する因子であるリバビリンの肝取り込みと腎再吸収に関

わる輸送担体がその治療効果の個人差の原因となっている可能性が考えられる。しかし、その詳細は明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、肝取り込みと腎再吸収に関わるリバビリントランスポーターを同定すること、さらにその遺伝子発現調節機構を解明することにより、C型肝炎治療効果の個人差の原因の一端を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) リバビリン輸送活性測定法

ラット・マウス肝細胞およびヒト肝細胞 (HH283, HH268, HH291) におけるリバビリン取り込み活性の測定は oil filtration 法によりおこなった。MDCK 細胞を用いた取り込み活性測定法はトランスポートアッセイ法によりおこなった。

### (2) mRNA 発現量測定法

ラット・マウス肝細胞 total RNA、ヒト肝細胞 total RNA、ヒト腎 total RNA より cDNA を調製し、これを鋳型として reverse transcription-PCR (RT-PCR) 法およびリアルタイム PCR 法により核酸トランスポーター分子種 mRNA 発現量を定量した。

### (3) cDNA クローニングおよび遺伝子導入法

ヒト腎 cDNA より concentrative nucleoside transporter 3 (CNT3) cDNA を PCR によりクローニングし、pcDNA3.1 ベクターに挿入した。これを MDCK 細胞にリポフェクション法により導入し、Zeocin で選択することにより CNT3 安定発現 MDCK 細胞を作製した。

## 4. 研究成果

本研究で得られた主な成果は以下の 4 項である。

(1) ヒト肝細胞におけるリバビリン取り込み活性を測定した結果、リバビリン取り込みには equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) が最も寄与することが明らかとなった (Fig. 1)。このうち HH291 の ENT1 活性は HH281 および HH268 の 1.7~1.8 倍であり、ヒト肝細胞の ENT1 によるリバビリン取り込み活性には個人差が存在することが明らかとなった。

(2) ヒト肝細胞 cDNA を調製し、RT-PCR およびリアルタイム PCR により ENT1 mRNA 発現量を解析した結果、HH291 において HH283 お

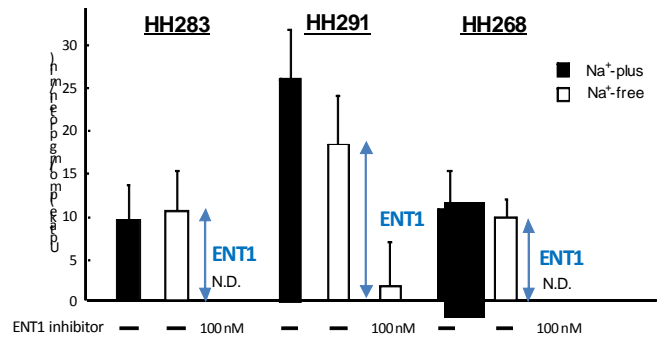
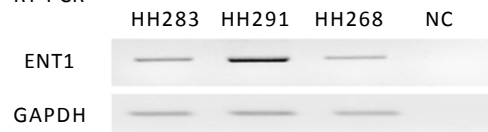


Fig. 1. Ribavirin (10<sup>-6</sup>M) uptake by human hepatocytes. Ribavirin uptake by hepatocytes was analyzed. Each value was calculated by subtracting the activity obtained at 4<sup>o</sup> C from that obtained at 37<sup>o</sup> C at the same ribavirin concentration. Each value is the mean  $\pm$  S.D. of transport activity for three independent experiments, each performed in duplicate.

### RT-PCR



### Real-time PCR

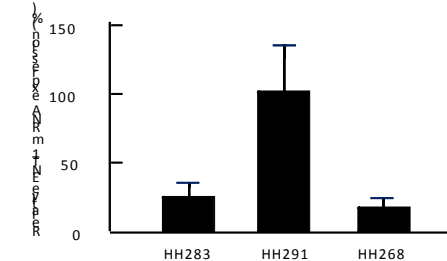


Fig. 2. mRNA expression analysis for ENT1. ENT1 and GAPDH mRNA expressions were detected by RT-PCR. NC, non-template control. ENT1 and CNT2 mRNA expression levels were determined by real-time PCR. The data are shown in relative abundance (%) (mean  $\pm$  S.D.) as the level of ENT1 mRNA in HH291 is set to 100%, respectively. N.D., not detected.

よび HH268 と比較し、約 5 倍高い ENT1 mRNA 発現が認められた (Fig. 2)。したがってヒト肝細胞にリバビリン取り込みの個人差を生じる要因は ENT1 mRNA 発現量の差異であると考えられた。

(3) マウス肝細胞におけるリバビリン取り込み活性を測定した結果、リバビリン取り込みはヒトと同様、ENT1 が最も寄与することが明らかとなった (Fig. 3)。一方、ラット肝細胞を用いて同様に検討した結果、ラットでは CNT2 が主なリバビリントランスポーターであり、ENT1 の寄与は小さかった。したがって、マウスおよびラット、ラットおよびヒトにおいて肝細胞リバビリントランスポーターには大きな種差が存在することが明らかとなった。

(4) MDCK 細胞を用いてヒト腎に高く発現する CNT3 の安定発現系を作製し、リバビリン取り込み活性を解析したところ、CNT3 は高いリバビリン取り込み能を示した。リバビリン取り込み活性を Eadie-Hofstee plot により解析したところ、CNT3 は二つの異なる親和性

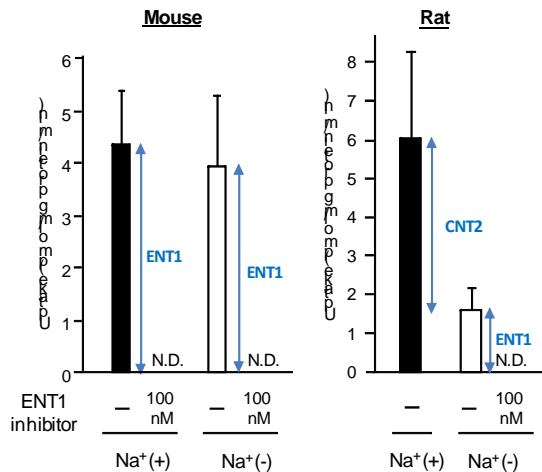


Fig. 3. Ribavirin (1  $\mu$ M) uptake by hepatocytes was analyzed in Na<sup>+</sup>-plus KHB (■) and Na<sup>+</sup>-free KHB (□). In an inhibition assay, effects of NBMPR (100 nM or 100  $\mu$ M) on ribavirin uptake by hepatocytes were analyzed in Na<sup>+</sup>-free KHB. Each value was calculated by subtracting the activity obtained at 4° C from that obtained at 37° C at the same ribavirin concentration. Each value is the mean  $\pm$  S.D. of transport activity for three independent experiments, each performed in duplicate.

部位を持ってリバビリンを輸送することが明らかとなった。したがって、CNT3は腎におけるリバビリンの再吸収過程に主に寄与するトランスポーターであると考えられる。

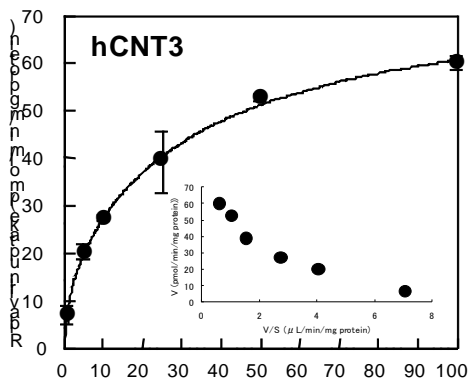


Fig. 4. Kinetic analysis of ribavirin uptake by CNT3 stably expressing MDCK cells. The result was calculated by subtracting the value of mock/MDCCK cells from that of each nucleoside transporter expressing MDCK cells. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of three independent determinations, each performed in duplicate.

上記研究のうち(1)~(3)は論文としそれぞれ受理された。(1)に関しては、Journal of HepatologyのEditorに高く評価され、私たちの報告を基にしたEditorialが掲載巻の冒頭に掲載されている。(3)に関しては、創薬に主に用いられるマウスおよびラットにおいて非常に大きな種差を明らかとしたことから、本成果は核酸アナログの新規創製に際して有用な情報であると評価された。

本研究の遂行によりこれまで不明であったリバビリン肝細胞取り込みの分子実体を明らかとなり、さらにその機能に個人差を生じる要因が初めて明らかとなった。リバビリン薬効発現を規定する要因およびその個人差の一端を明らかとした本研究成果は今後C型肝炎、ひいては肝癌による死亡率を減少させる治療法の確立に貢献できると期待される。

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)

① Furihata T, Fukuchi Y, Ikura M, Hashizume M, Miyajima A, Nagai M, Chiba K. Striking species-difference in the contribution of concentrative nucleoside transporter 2 to nucleoside uptake between mouse and rat hepatocytes. Antimicrob Agents Chemother. 2010, in press. 査読あり

② Fukuchi Y, Furihata T, Hashizume M, Ikura M, Chiba K. Characterization of ribavirin uptake systems in human hepatocytes. J. Hepatol. 2010 52(4):486-92. 査読あり

[学会発表] (計13件)

①飯倉 南、降幡 知巳、福地 由希菜、橋詰 美里、千葉 寛 Characterization of ribavirin uptake system in human hepatocytes 第24回日本薬物動態学会 2009.11.27 京都国際会議場(京都)

②上原 基浩、降幡 知巳、福地 由希菜、飯倉 南、橋詰 美里、宮嶋 篤志、千葉 寛 A species difference in hepatic SLC28A2 gene expression in mice, rats and humans 第24回日本薬物動態学会 2009.11.27 京都国際会議場(京都)

③降幡 知巳、福地 由希菜、橋詰 美里、千葉 寛 C型肝炎治療薬リバビリンのヒト肝取り込みトランスポーターの同定とその遺伝子発現量の個人差 第129回日本薬学会 2009.3.28. 京都国際会議場(京都)

④福地 由希菜、降幡 知巳、橋詰 美里、千葉 寛 肝におけるリバビリントランスポーターの同定・種差・およびヒトにおける mRNA 発現レベルの個人差 第23回日本薬物動態学会 2008.10.30. 熊本

⑤Yukina Fukuchi, Tomomi Furihata, Misato Hashizume, Kan Chiba. Identificatio of Nucleoside transporters involved in the hepatic uptake of ribavirin in mice, rats, and humans. 2nd Asian-Pasific ISSX meeting 2008.5.12. Shanghai

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
降幡 知巳 (FURIHATA TOMOMI)  
千葉大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号：80401008

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし