

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590162

研究課題名（和文） ヒト赤血球膜におけるリバビリン輸送のトランスポートソーム解析

研究課題名（英文） Study on the transportsome for ribavirin uptake in human erythrocyte membrane

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（和文）：

抗ウイルス薬リバビリンの赤血球障害はその赤血球内移行と密接に関連している。本研究結果から、リバビリンはヌクレオシドトランスポーター1(ENT1)を介して取り込まれること、一方、ATP依存的な排出は関与しないことが明らかとなった。さらにヒト赤血球膜小胞およびA549細胞において、ENT1およびグルコーストランスポーターは氷冷下でも比較的高活性に機能する、すなわち低温忍容性を有することも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The hemolytic anemia caused by ribavirin would be due to significant intracellular accumulation of the phosphorylated metabolites of ribavirin. Our research suggested that ribavirin uptake in ROVs of erythrocyte is mediated by equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1). On one hand, ribavirin is not effluxed by ATP-dependent transporters. The human erythrocyte transporters such as ENT1 and glucose transporter function even at very low temperatures near 0°C.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医療薬剤学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：赤血球膜、膜小胞、ヌクレオチドトランスポーター、ウリジン、トランスポートソーム、リバビリン、低温忍容性

## 1. 研究開始当初の背景

リバビリンはインターフェロンアルファ-2bなどと併用される抗ウイルス薬であるが、高頻度で貧血が起こる。連携研究者の高野らは、C型慢性肝炎患者において、リバビリンの血漿中濃度が3500 ng/mLを超える場合にはヘモグロビンの濃度低下が著しく、投与中止基準に達する可能性が高いことを報告

した。リバビリンによる赤血球障害は、リバビリンの赤血球内移行と密接に関連するものと考えられるが、移行機構に関する情報は乏しく、特に膜レベルでの解析は見当たらない。一方で申請者は、臨床において併用が禁忌である抗てんかん薬バルプロ酸とカルバペネム系抗生物質の相互作用について、「カルバペネム系抗生物質による赤血球膜の排

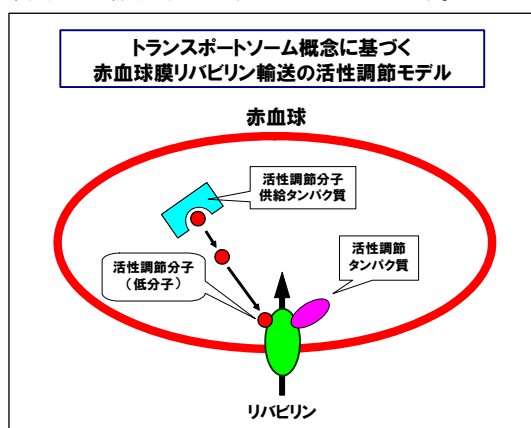
出トランスポーターMRPの阻害が原因となつて、バルプロ酸の赤血球内蓄積が増大し、そのために血漿中濃度が低下する」という新たな分子メカニズムを提唱するなど、「薬物相互作用・有害反応の場としての赤血球と薬物輸送体の役割」について検討を進めてきた。

このような背景から、赤血球膜におけるリバビリンの輸送機構について明らかにすることで、赤血球障害との関係や障害軽減法について新たな知見が得られるものと考え、予試験を開始した。まずヌクレオシドアナログであるリバビリンの輸送に及ぼすウリジンの影響について検討した。その結果、赤血球では $^3\text{H}$ リバビリンの輸送はウリジンで阻害されたが、赤血球膜小胞では予想に反し、その取り込みが大きく上昇するという極めて特異な現象が観察された。 $^3\text{H}$ リバビリンに対する非標識リバビリンの影響でも同様に、赤血球と赤血球膜小胞で乖離が見られ、後者ではその取り込みが著しく促進された。

## 2. 研究の目的

赤血球と赤血球膜小胞におけるリバビリン輸送特性の乖離について説明するため、以下のような仮説を構築した。

- (1) 赤血球ではリバビリン輸送活性は内因性の活性調節因子により、至適条件に保たれている。
- (2) 赤血球膜小胞の調製によって赤血球の内容物は失われる。また、調製条件によっては低分子物質のみならず膜の裏打ちタンパク質やリバビリン輸送体と緩やかに相互作用しているタンパク質も赤血球膜から外れる。これらの成分の中に、リバビリン輸送活性調節因子が存在する（下モデル図参照）。



- (3) 赤血球膜小胞では、内因性の調節因子がないため、リバビリン輸送体の中のアロステリックな活性調節部位が剥き出しの状態にある。非標識リバビリンやウリジンはこの活性調節部位に働き、正の効果をもたらす。このため赤血球膜小胞では、 $^3\text{H}$ リバビリンの輸送が非標識体やウリジンの添加により促進される。

本研究では、このような仮説の妥当性について検証し、リバビリン輸送に関わるトランスポートソーム複合体の存在を実証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒト赤血球におけるリバビリンおよびウリジンの輸送解析

書面にて同意を得たボランティアから採血し、洗浄赤血球を調製した。基質として $^3\text{H}$ リバビリンおよびヌクレオシド輸送系の代表的基質である $^3\text{H}$ ウリジンを用い、阻害剤としては促進拡散系ヌクレオシド輸送の阻害剤である S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBMPR) やジピリダモールを用いた。輸送実験は、初期取り込み速度の評価に優れた inhibitor-oil stop method を用いた。

- (2) 赤血球膜小胞 (ROV, IOV) の調製と小胞のオリエンテーション評価

赤血球から膜の内外を異にする right-side-out 型の小胞 (ROV) および inside-out 型の小胞 (IOV; 反転小胞) を調製した。それぞれの小胞について、赤血球膜の外側に局在する酵素アセチルコリンエステラーゼ、内側に局在する酵素 GAPDH の活性を TritonX-100 存在下、非存在下で測定し、小胞のオリエンテーション (小胞の外向き、内向きの割合)、小胞化率を解析した。

- (3) 赤血球膜小胞を用いたリバビリン、ウリジンおよびグルコースの輸送解析

性状が明らかとなった赤血球膜小胞を用い、赤血球と同様の基質、阻害剤を用いて輸送解析を行った。膜小胞を用いた輸送実験解析は、迅速ろ過法によって行った。

- (4) アミノ酸であるアラニンの輸送特性についても同様に解析した。

- (5) 上記の膜小胞を用いた実験において、洗浄中に基質が小胞から漏出している可能性が考えられたため、氷冷下 (ICT) における輸送実験を行った。

① ROV を用い、 $37^\circ\text{C}$ での取り込み実験を行い、stop solution 中の阻害剤濃度を変化させ、小胞内基質濃度を測定した。

② ROV に基質を添加し、ICT における取り込み実験を行った。また、非標識の基質を  $37^\circ\text{C}$ であらかじめ小胞内に取り込ませた後、 $^3\text{H}$ 標識した基質の取り込み実験を ICT で行い、countertransport 効果が ICT においても認められるか否かについても検討を加えた。

③ ヒト非小細胞肺癌由来 A549 細胞を用いて、赤血球で観察された ENT1 およびグルコーストランスポーター GLUT1 の低温忍容性が普遍的なものかどうかについて解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト赤血球におけるリバビリンおよびウリジンの輸送解析

書面にて同意を得たボランティアから採血後、洗浄赤血球を調製した。洗浄赤血球におけるリバビリンおよびウリジンの輸送はヌクレオシドトランスポーター1(ENT1)阻害剤 NBMPR で阻害された(Fig. 1)。また、 $[^3\text{H}]$ リバビリンの取り込みは非標識リバビリンおよびウリジンにより阻害されたことから、リバビリンはウリジンと同様に ENT1 によって輸送されることが示唆された。

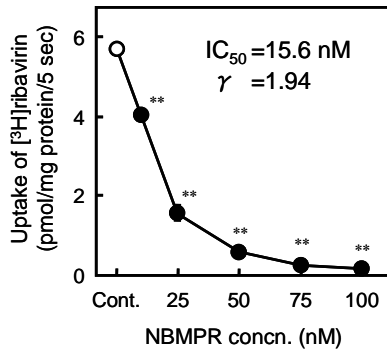


Fig. 1 ヒト洗浄赤血球におけるリバビリンの取り込みに及ぼす NBMPR (ENT1 阻害剤) の影響

##### (2) 赤血球膜小胞 (ROV, IOV) の調製と小胞のオリエンテーション評価

書面にて同意を得たボランティアから採血後、実験実施計画に従い改良した方法を用いて、right side-out 型の小胞 (ROV) および inside-out 型の小胞 (IOV; 反転小胞) を調製した。酵素活性を測定することにより ROV 率は  $76.1 \pm 1.79\%$  (IOVs:  $8.50 \pm 0.93\%$ 、残りは unsealed vesicles)、IOV 率は  $55.6 \pm 2.73\%$  (残りは unsealed vesicles) と算出された。

##### (3) 赤血球膜小胞を用いたリバビリンおよびウリジンの輸送解析

ROV を用い、リバビリンの取り込みに及ぼす ENT1 阻害剤の影響について検討したところ、Fig. 2 に示すように、NBMPR の濃度が 100nM まではリバビリンの取り込みが促進された。

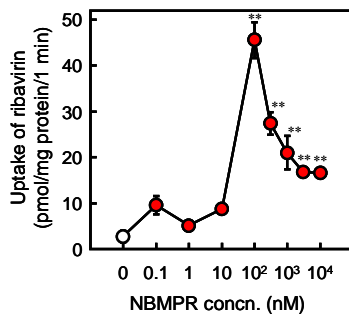


Fig. 2 ROV におけるリバビリン取り込みに及ぼす ENT1 阻害剤 NBMPR の影響

この結果はインタクトな赤血球を用いた(1)の結果と乖離しており、その原因としてトランスポーターの観点から赤血球内の活性調節物質が小胞化する際に消失している可能性が考えられた。

しかし、ROV を用い、23°Cで $[^3\text{H}]$ リバビリンを取り込ませ、stop solutionの ENT1 阻害剤である NBMPR 濃度を変化させたところ、Fig. 3 に示すようにリバビリンの細胞内濃度は上昇した。これはトランスポーターの問題ではなく、氷冷バッファーで洗浄中にリバビリンが小胞から漏出している可能性が考えられた。

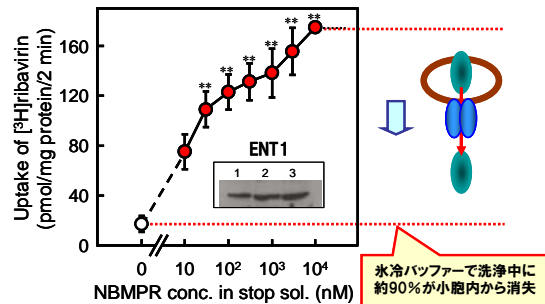


Fig. 3 Stop solution に添加した ENT1 阻害剤 NBMPR による濃度依存的な efflux 阻害

そこで、洗浄中の漏出を抑制するため、阻害剤を含む stop solution を用い、23°Cおよび氷冷下(ICT; ice cold temperature)で再度実験を行ったところ、以下に示すような結果が得られた。

①23°Cおよび ICT において ROV へのリバビリンの取り込みには濃度依存性および飽和性が認められ、それぞれ  $K_m$  は 1887, 3261 ( $\mu\text{M}$ )、 $V_{max}$  は 1.24, 0.33(nmol/mg protein/sec) と算出された(Fig. 4)。

②23°Cおよび ICT において同様に ROV へのウリジンの取り込みにも濃度依存性および飽和性が認められ、それぞれ  $K_m$  は 540, 543 ( $\mu\text{M}$ )、 $V_{max}$  は 328, 74 (pmol/mg protein/sec) と算出された。

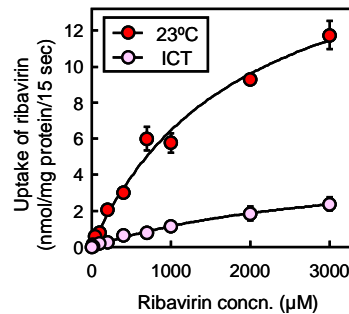


Fig. 4 ROV における  $[^3\text{H}]$ ribavirin 取り込みの濃度依存性

③リバビリンおよびウリジンの両基質間で取り込みの相互阻害も認められた。

④23°Cおよび ICT においてリバビリンの取り込みは ENT1 阻害剤(NBMPR (Fig. 5), ジピリダモール) により阻害され、ウリジンにおいても同様の結果が得られた。

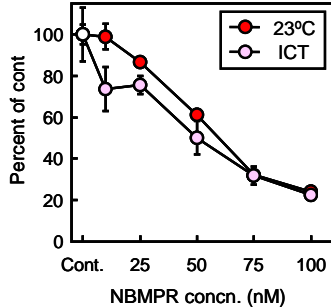


Fig. 5  $[^3\text{H}]$ ribavirin 取り込みに及ぼす NBMPR の影響

⑤さらに、GLUT1 で輸送されるグルコースについても同様に検討した結果、23°Cおよび ICT においてグルコースの ROV への取り込みは GLUT1 阻害剤であるフロレチンにより、阻害された(Fig. 6)。

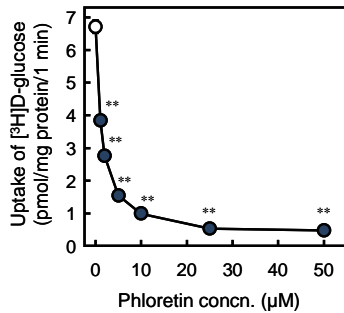


Fig. 6 ICT における  $[^3\text{H}]$ D-glucose の取り込みに及ぼす phloretin の影響

⑥Countertransport 効果について

あらかじめ非標識リバビリンを 37°C で取り込ませた ROV を用い、ICT で  $[^3\text{H}]$ ウリジンの取り込み実験を行った結果、オーバーシュート現象が認められた(Fig. 7)。

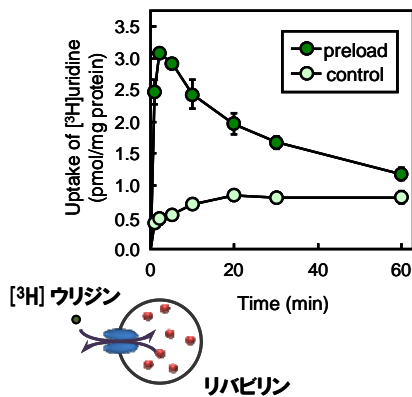


Fig. 7 ICT における  $[^3\text{H}]$ uridine 取り込みに及ぼす非標識 ribavirin の countertransport 効果

さらに、グルコース取り込みについても ICT において同様の結果が得られた(Fig. 8)。

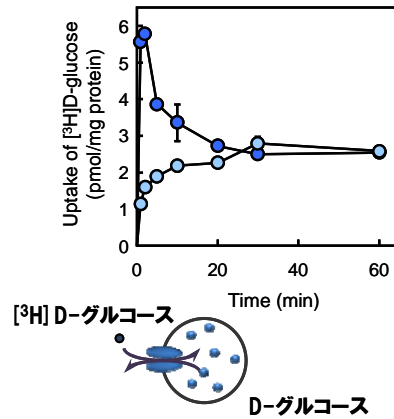


Fig. 8 ICT における  $[^3\text{H}]$ D-glucose 取り込みに及ぼす非標識 D-glucose の countertransport 効果

⑦IOV におけるリバビリンの取り込みに ATP 依存性は認められなかった(Fig. 9)。

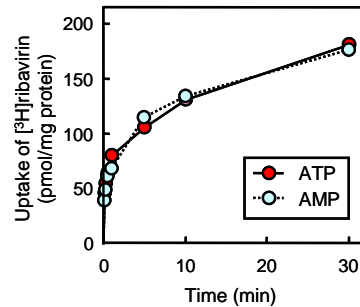


Fig. 9 赤血球反転膜小胞 (IOVs) における ribavirin 取り込みに及ぼす ATP の影響

以上の研究成果により、赤血球膜において、リバビリンはウリジンと共通のトランスポーター、すなわち ENT1 によって輸送されることが膜レベルで明らかとなった。

さらに、ENT1 は低温でも比較的高活性に機能する(低温忍容性を示す)可能性を示す知見を得た。すなわち、赤血球と赤血球膜小胞でリバビリン輸送特性に乖離が見られたが、その原因はトランスポートソームの問題ではなく、リバビリン輸送に関わるトランスポーター ENT1 の低温忍容性にあることを明らかにした。

また、赤血球膜の ribavirin 輸送には、ATP 依存的な排出は関与しないことが示唆された。

さらに GLUT1 も低温忍容性を示すことが明らかとなった。

(4) アミノ酸であるアラニンの赤血球膜輸送解析

①ヒト洗浄赤血球において、Na<sup>+</sup>依存的な<sup>3</sup>Hアラニン取り込みが観察された。またその取り込みは、非標識アラニンで濃度依存的に阻害された(Fig. 10)。一方、赤血球膜小胞(ROVs)を用いた取り込み実験では、アラニンの取り込みにNa<sup>+</sup>依存性は観察されなかった。

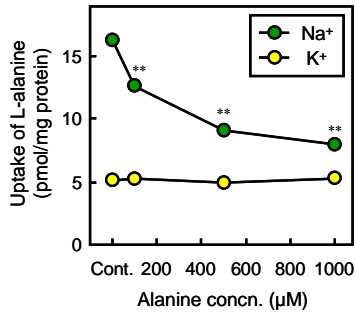


Fig. 10 洗浄赤血球における<sup>3</sup>H]L-アラニン取り込みのNa<sup>+</sup>依存性および非標識アラニンの影響

②Na<sup>+</sup>依存性を示すアラニントランスポーターにASCがある。ASCはNa<sup>+</sup>依存性交換輸送体であるため、赤血球膜小胞内に非標識アラニンを負荷し、<sup>3</sup>Hアラニン取り込みを測定した。その結果、countertransport効果が観察され、トランスポーター介在性輸送系の関与が示唆された。しかし小胞内外のイオン組成を変化させても、Na<sup>+</sup>依存性は観察されず、K<sup>+</sup>存在下でも交換輸送活性が認められた。

以上の結果から、<sup>3</sup>Hアラニン取り込みに関しては、赤血球で観察されたNa<sup>+</sup>依存性には、赤血球内に存在する他の因子による制御が関与する、すなわちトランスポートソームが関与する可能性が示唆されたが、これについてはさらに検討が必要である。

(5) ヒト非小細胞肺癌由来A549細胞におけるENT1およびGLUT1の低温忍容性について

①A549細胞の膜面分においてhENT1のタンパク質発現が確認された。

②A549細胞におけるウリジンの取り込みは、洗浄に用いる氷冷バッファーにENT1阻害剤NBMPRを添加しても有意な差は認められず、洗浄段階でのA549細胞からのeffluxはほとんど起こらないことが示唆された。

③37°CおよびICT(氷冷下)条件におけるウリジンの細胞内取り込みは、NBMPRの濃度依存的に阻害された(Fig. 11)。

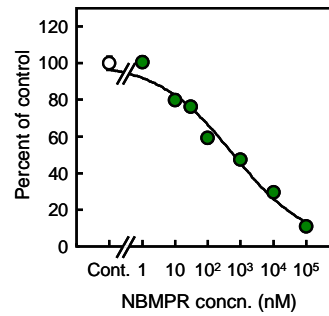


Fig. 11 ICTにおけるA549細胞への<sup>3</sup>H]uridine取り込みに及ぼすNBMPRの影響

④37°C条件下でのウリジン輸送に若干のNa<sup>+</sup>依存性が認められ、A549細胞においてはhENT1以外のシステム(CNT)が関与している可能性が示唆された。

⑤D-グルコースのA549細胞への取り込みは、洗浄に用いる氷冷バッファーにGLUT阻害剤フロレチンを添加しない場合、有意な減少が観察され、hGLUT1はICTにおいても機能している可能性が示唆された。

⑥D-グルコースのA549細胞への取り込みはICT条件下において37°Cと同様、フロレチンにより減少した(Fig. 12)。

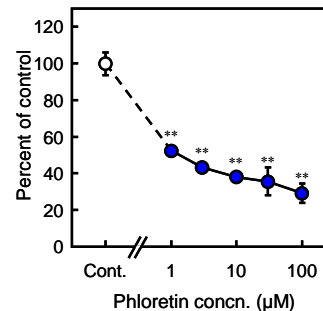


Fig. 12 ICTにおけるA549細胞への<sup>3</sup>H]D-glucose取り込みに及ぼすGLUT1阻害剤phloretinの影響

以上の結果からヒト赤血球膜小胞と同様に、ヒト肺癌由来培養A549細胞においても、ICT条件下でENT1を介したウリジン輸送およびGLUT1を介したグルコース輸送が起こることが示された。

一般に被検物質の膜輸送実験には、膜小胞系や培養細胞系を用い、被検物質を取り込ませた後、氷冷バッファーで洗浄し、取り込まれた被検物質を定量するという手法がとられる。これは恒温動物であるヒトのトランスポーター機能は氷冷下では停止または著しく低下するとのコンセンサスに基づいている。

しかし、本研究成果により ENT1 や GLUT1 のようにトランスポーターによっては低温でも比較的高活性に機能する（低温忍容性を示す）ものもあり、そのような場合には輸送機能が評価できない、あるいは誤った解釈に陥る危険性があることが明らかとなった。

今後は、どのようなトランスポーターが低温忍容性を示すのか、種差はあるのかなどについてヒトおよびラットのトランスポーター（促進拡散、二次性能動輸送など）を対象としてその普遍性・特殊性について明らかにしていきたいと考えている。

#### 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 3 件）いずれも査読有

1. Takano, M., Kimura, E., Suzuki, S. Nagai, J. and Yumoto R.: Human erythrocyte nucleoside transporter ENT1 functions at ice-cold temperatures. Drug Metab. Pharmacokinet., **25**, 351-360 (2010)
2. Yumoto, R., Kimura, E., Suzuki, S., Imaoka, H. and Nagai, J. and Takano, M.: Transport characteristics of ribavirin in human erythrocyte membrane vesicles. Membrane, **34** (3), 152-158 (2010)
3. Yumoto, R. Yamakawa, K., Nagai, J. and Takano, M.: Transport characteristics of multidrug resistance-associated protein 5 in human erythrocyte membranes. Membrane, **34** (3), 152-158 (2009)

〔学会発表〕（計 9 件）

1. 高野幹久、氷冷下におけるヒトのトランスポーター機能、膜シンポジウム 2011、2011 年 11 月 18 日、宜野湾市（沖縄）
2. 今岡大明、哺乳類トランスポーターの低温忍容性とその普遍性に関する検討、日本薬剤学会第 26 年会、2011 年 5 月 29 日、東京都
3. 湯元良子、ヒト赤血球膜トランスポーターの低温忍容性、日本膜学会第 33 年会、2011 年 5 月 12 日、東京都
4. M. Takano, Human transporters that function at ice-cold temperature - Important notice for transporter research -, ISSX 2010, 2010 年 9 月 4-8 日、イスタンブール(トルコ)
5. 鈴木 聡、ヒト赤血球膜の促進拡散トランスポーターは氷冷下でも機能する～薬物相互作用研究上の留意点～、医療薬学フォーラム 2010、2010 年 7 月 10-11 日、広島市
6. 高野幹久、トランスポーターの低温忍容性とトランスポーター阻害薬探索研究上の留意点に関する考察、日本薬剤学会第 25 年会、2010 年 5 月 12-14 日、徳島市

7. Eri Kimura, Mechanism of ribavirin transport across human erythrocyte membranes、第 3 回次世代を担う若手医療薬学科シンポジウム、2009 年 11 月 14-15 日、福岡市

8. 木村衣里、ヒト洗浄赤血球およびヒト赤血球膜小胞におけるウリジン・リバビリン輸送、医療薬学フォーラム 2009、2009 年 7 月 11-12 日、京都市

#### 6. 研究組織

##### (1) 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

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

高野 幹久 (MIKIHISA TAKANO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20211336