

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 4 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790145

研究課題名（和文）

C型肝炎治療奏功の鍵を握る「小腸リバビリン輸送代謝連関装置」の実体解明

研究課題名（英文）

Characterization of “Ribavirin transportsome” in the small intestine

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）：本研究では、リバビリン薬効発現の規定要因を明らかとすることを目的として、purine nucleoside phosphorylase (PNP) の機能解析をおこなった。その結果、ヒト小腸において PNP はリバビリン代謝を担う主要な酵素であり、その機能レベルはリバビリン吸収量を規定することが明らかとなった。したがって、PNP の機能制御機構やその発現に影響を及ぼす遺伝子多型を解明することにより、リバビリン治療効果の個人差の要因が明らかとなると期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present study was to identify a role of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in ribavirin absorption. We showed that PNP expressed in human small intestine exclusively metabolized ribavirin to inactive nucleobase. We also showed that the level of PNP activity/expression was one of the determinant factors for the level of ribavirin absorption. Therefore, it can be concluded that PNP plays an important role in determining ribavirin plasma concentration through its metabolizing ability in human small intestine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 23 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：薬物代謝、吸収、リバビリン、C型肝炎、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎は我が国における最大の肝癌発症因子である。その治療にはインターフェロン+リバビリン併用療法が用いられ、これは標準療法であると同時に唯一の治療法である。しかしこの併用療法の奏成功率は約 6～7 割にとどまり、残りの症例では治療効果が得られ

ない。日本における患者数は 200 万人に達すること、C型肝炎は自然治癒しないことから、併用療法の奏成功率向上は急務の課題である。治療効果に個人差を生じる原因は不明であるが、高いリバビリン血中濃度を得た患者において治療奏成功率が高いと報告されている。したがって、リバビリン血中濃度を規定するリバビリン経口摂取後の吸収量は、その薬効

発現を規定する重要な因子であると考えられる。リバビリンの吸収に関して、これまでにヒトにおける生物学的利用率は 28-85%と、著しい個体差が存在することが報告されている。リバビリンの主な代謝臓器は肝臓ではないと考えられていることから、小腸における吸収過程に生物学的利用率の大きな個人差の要因があると考えられる。プリン核酸誘導体であるリバビリンは親水性が高く、リバビリンの小腸上皮細胞への取り込みには管腔側細胞膜に発現する concentrative nucleoside transporter 2 (CNT2)が必要であることが報告されている。一方、これまでに小腸における代謝に関する報告はないが、purine nucleoside phosphorylase (PNP) がリバビリン代謝活性を有することは報告されている。したがって、CNT2 および PNP はともにリバビリン吸収量を規定する重要なタンパク質であると考えられる。

さらにここで着目すべき点は、これらタンパク質が機能的複合体【プリン核酸輸送代謝関連装置】を形成している可能性にある。これはプリン核酸の輸送と代謝が独立したプロセスとして存在するのではなく、細胞内ではタンパク質同士が会合/近接することによりひとつの複合体を形成し、これにより高効率な輸送-代謝反応を可能としている、という概念である。これまでに、小腸は食餌中のプリン体全てを尿酸まで代謝しうるほど驚異的なプリン代謝能力を持つこと、サイトゾル酵素であるはずの PNP が他のプリン代謝酵素群と共に小腸上皮細胞管腔側に局在していること、さらに CNTs により取り込まれたリバビリンは他の核酸トランスポーターファミリーで輸送される場合よりも核酸塩基に分解されやすいこと、が報告されており、これらは個々のタンパク質の独立した機能のみでは説明できない。したがって小腸におけるリバビリン吸収は、CNT2 および PNP を構成要素とし、さらに装置形成と機能制御に寄与する scaffold タンパク質や細胞内輸送タンパク質などを加え、その機能や発現が体系的に制御された輸送代謝関連装置によりおこなわれていると考えられる。したがってリバビリン吸収過程の大きな個人差を解明するためには、輸送代謝装置を構成する個々のタンパク質の機能ばかりでなく、装置全体の機能に影響を及ぼす装置形成・修飾機構や構成タンパク質遺伝子の発現制御機構なども明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、リバビリン吸収に関与するプリン核酸輸送代謝関連装置の分子実体とその機能制御基盤を明らかにするため、PNP のリバビリン吸収における役割、CNT2 と PNP の

協調作用、さらにこれらタンパク質の遺伝子機能変動要因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト試料

Human Ileal S9 (Lot No. HIS 045257850005)、Human Jejunal Cytosol (Lot No. HJC 045274220005) は KAC(東京)より購入した。BD UltraPool™ Human Cytosol 150 (Lot No. 38289) は BD Biosciences (Woburn, MA, USA)より購入した。本実験におけるヒト由来試料の利用は、千葉大学大学院薬学研究院の倫理委員会において事前に承認を受けた。

(2) PNP cDNA および CNT2 cDNA クローニング

ヒト小腸 cDNA は、ヒト小腸 total RNA (東洋紡、大阪)から作製し、これを鋳型として、polymerase chain reaction (PCR) により PNP cDNA および CNT2 cDNA をクローニングした。これら cDNA は pcDNA3.1 zeo(-) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に挿入 (PNP/p3.1、CNT2/p3.1)、または pET-14b (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) に挿入し (PNP/pET)、塩基配列の確認をおこなった。また、PNP/pET を鋳型として部位指向的変異導入法をおこない、PNP p. G51S/pET を作製した。

(3) 精製 PNP および PNP p. G51S の作成

精製 PNP および PNP p. G51S は pET 大腸菌発現システム (Merck KgaA) を使い、His-Tag を利用した精製法により作成した。得られた酵素は sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)、および抗 PNP 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。

(4) PNP 活性測定

PNP のイノシン加リン酸分解活性は、生成する尿酸を吸光度法で測定することにより解析した。PNP のリバビリン加リン酸分解活性は、リバビリンを基質とし、代謝物 TCONH₂ の生成量を高速液体クロマトグラフィーにより定量することにより測定した。速度論的パラメーターの解析には DeltaGraph 5 (日本ポラデジタル株式会社、東京) を使い、基質濃度に対する反応初速度をプロットすることにより Michaelis 定数 (Km)、最大反応速度 (Vmax) を算出した。

阻害実験では、PNP 阻害剤としてガンシクロビル (和光、大阪) を用いた。

(5) PNP 強発現 Caco2 細胞の作製

Caco2 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より入手した。PNP/p3.1 を Caco2 細胞にトランスフェクションし、薬剤選択および細胞の単一化をおこない、PNP/Caco2 を作製した。コントロールには、pcDNA3.1 empty を用いて同様に作製した CTRL/Caco2 を用いた。PNP の発現解析は上述の活性測定およびウエスタンブロットによりおこなった。

(6) リバビリン透過アッセイ

PNP/Caco2 および CTRL/Caco2 細胞をインサートメンブレン上に播種し、トランスウェルシステムで2週間の継続培養により単層膜を形成させた。単層膜は経細胞電気抵抗値を測定することにより確認した。リバビリンをインサート培地に添加し、30分後にウェル側から培地を採取し、固相抽出法によりリバビリンを回収した。これを高速液体クロマトグラフィーで測定することにより、リバビリンの透過量を算出した。

(7) PNP mRNA 発現変動解析

PNP mRNA の高い発現が認められる LS180 細胞 (DS Pharma Biomedical, 大阪) を 60-mm dish に播種してコンフルエントにした後、エタノール (1, 2.5, 5%) を 48 時間曝露した。この細胞から cDNA を調製し、プローブ法によるリアルタイム PCR により、PNP mRNA 発現量を解析した。内標には glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を用いた。

(8) CNT2 と PNP の協調作用の解析

HeLa 細胞は American Type Culture Collection より入手した。HeLa 細胞に CNT2/p3.1、PNP/p3.1、または empty pcDNA3.1 プラスミドを単独、または組み合わせてトランスフェクションした。そこから 48 時間後に、 $[^3\text{H}]$

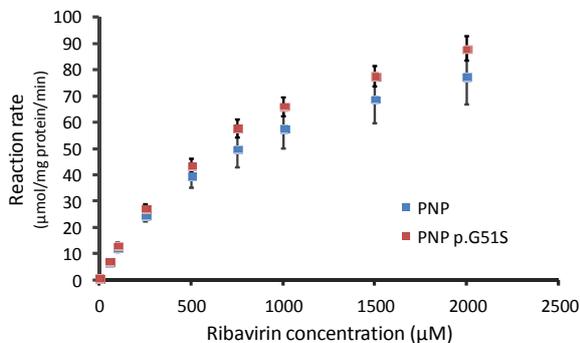


Fig. 1. 精製 PNP および PNP p.G51S のリバビリン代謝活性。PNP とその変異体のリバビリン代謝活性は HPLC により解析をおこない、得られたプロットから速度論的パラメーターを算出した。

リバビリン (Moravek, Brea, CA, USA) を基質としてトランスポートアッセイをおこなった。リバビリンの取り込み活性は液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定することにより算出した。

4. 研究成果

(1) 精製 PNP のイノシンおよびリバビリン加リン酸分解活性および変異 p.G51S の影響

精製酵素を用いて、PNP によるイノシンおよびリバビリン代謝の特性解析および、PNP 遺伝子に高頻度に見出される遺伝子多型 p.G51S の機能解析をおこなった。

まず、精製 PNP によるイノシン加リン酸分解の速度論的パラメーターを解析した。その結果、 K_m 値は 40.2 ± 6.4 (μM)、 V_{max} 値は 40.5 ± 17.8 ($\mu\text{mol/mg/min}$) であった。また同様にリバビリン加リン酸分解の速度論的パラメーターを解析したところ、 K_m 値は 887 ± 93 (μM)、 V_{max} 値は 110 ± 18 ($\mu\text{mol/mg/min}$) であった。一方、精製 PNP p.G51S によるイノシン加リン酸分解では、 K_m 値は 35.2 ± 9.8 (μM)、 V_{max} 値は 36.0 ± 6.8 ($\mu\text{mol/mg/min}$) であった。またリバビリン加リン酸分解では、 K_m 値は 942 ± 76 (μM)、 V_{max} 値は 131 ± 8 ($\mu\text{mol/mg/min}$) であった。

したがって、イノシンほど良好ではないものの、PNP はリバビリンを基質することが明らかとなった。さらに、PNP 遺伝子に存在する遺伝子多型 p.G51S は PNP 機能にほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった (Fig. 1)。

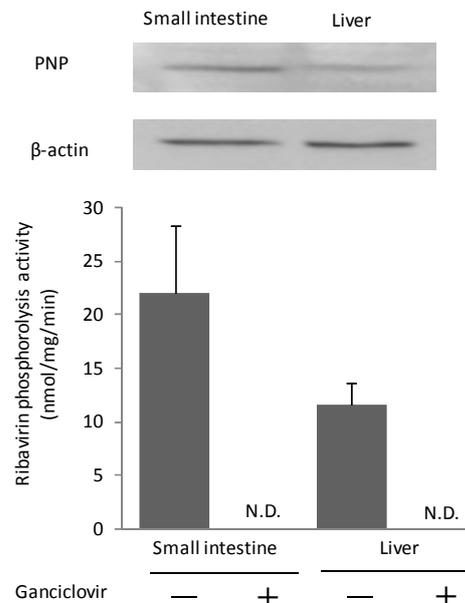


Fig. 2. ヒト小腸における PNP の発現とそのリバビリン代謝活性。上、ウエスタンブロットによる PNP の発現解析。ヒト小腸サイトゾルではヒト肝臓サイトゾルよりも高い PNP 発現が認められた。下、ヒト小腸および肝臓サイトゾルにおけるリバビリン代謝活性。ガンシクロビル (1 mM) は PNP の特異的阻害剤として使用した。N.D., not detected.

(2) ヒト小腸における PNP 発現とリバビリン代謝能

リバビリン吸収におけるヒト小腸 PNP の役割を明らかとするため、まず、ヒト小腸サイトゾルにおける PNP の発現レベルを解析した。

ウェスタンブロットにより PNP の発現を解析したところ、PNP は対照としたヒト肝サイトゾルと比べヒト小腸サイトゾルにおいて高く発現していた (Fig. 2)。これら試料を用いてリバビリン代謝活性を解析したところ、ウェスタンブロットの結果と一致して、ヒト小腸サイトゾルにおいてヒト肝サイトゾルよりも高い活性が認められた。また、これらリバビリン代謝活性は PNP 特異的阻害剤であるガンシクロビルにより消失した (Fig. 2)。

以上より、ヒト小腸において PNP は高く発現し、リバビリンの代謝を担っていると考えられた。

(3) ヒト小腸 PNP のリバビリン吸収における役割

ヒト小腸 PNP の発現レベルがリバビリン吸収量の規定要因となるか解析するため、小腸モデル細胞である Caco2 細胞を用いて PNP 強発現系の作成をおこなった。

Fig. 3 に示すように、PNP を強発現させた PNP/Caco2 細胞では、非導入細胞である CTRL/Caco2 細胞と比較し、約 3 倍高い発現が認められた。

そこで次に PNP の発現レベルとリバビリン細胞膜透過量の関連を解析した。その結果、

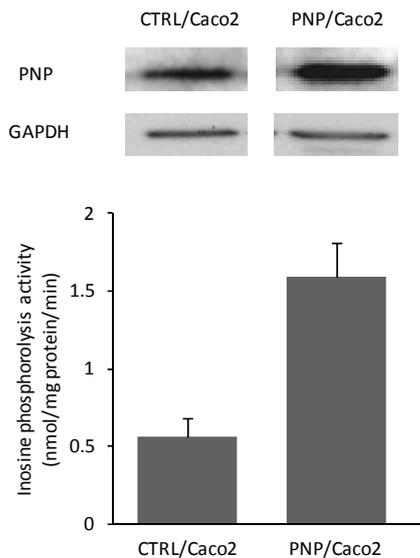


Fig. 3. Caco2細胞を宿主としたPNP強発現系の作成上、ウェスタンブロットによるPNPの発現解析。PNP強発現細胞をPNP/Caco2、非導入細胞をCTRL/Caco2とした。GAPDHは内標として使用した。下、PNP/Caco2およびCTRL/Caco2におけるイノシン代謝活性。

PNP/Caco2 細胞におけるリバビリンの細胞膜透過量は CTRL/Caco2 細胞と比較して優位に少なかった (Fig. 4, $P < 0.05$)。この時、両細胞における密着結合能の指標となる経細胞膜電気抵抗値には差異は認められず、リバビリン細胞内取り込みレベルにも差異は認められなかった。

以上の結果から、小腸に発現する PNP はリバビリンを代謝することにより、その吸収量を規定する要因となる可能性が考えられた。

(4) ヒト小腸 PNP の発現誘導要因の探索

ヒト小腸 PNP の発現変動は、PNP によるリバビリン代謝を変動させる。そこで、PNP が高く発現する LS180 細胞を用いて、その発現変動要因の探索をおこなった。その結果、エタノール (2.5-5%) により、PNP mRNA の発現の上昇傾向 (1.2-1.4 倍) が認められた。これまでに小腸上皮細胞においてリバビリンの細胞内取り込みに関与する CNT2 においても同様にエタノールにより mRNA 発現量の

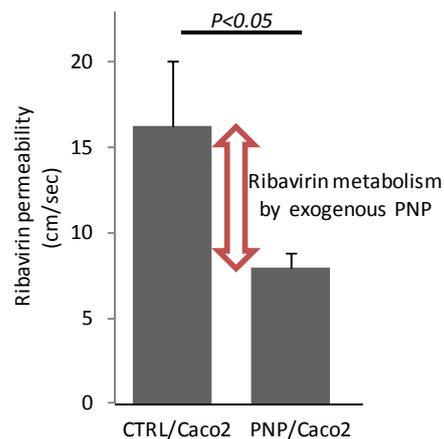


Fig. 4. PNP発現Caco2細胞を用いたリバビリン透過アッセイ PNP/Caco2およびCTRL/Caco2の単層膜を用いて管腔側から基底膜側へのリバビリン透過量を解析した。

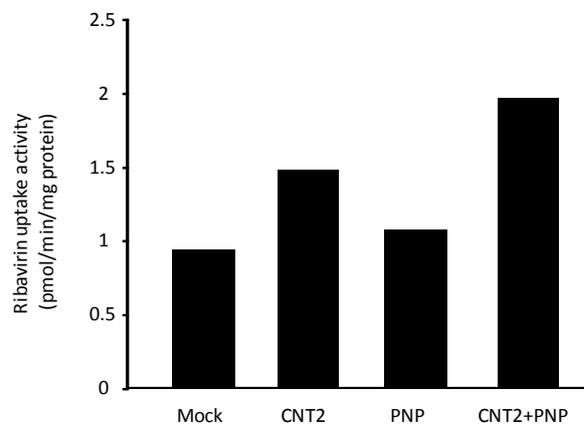


Fig. 5. リバビリン取り込みにおけるCNT2とPNPの協調作用 HeLa細胞にCNT2, PNP, またはCNT2とPNPを発現させてリバビリン取り込み活性を解析した。空プラスミドを導入した細胞(Mock)をコントロールとした。

上昇傾向が認められている (1.5-2 倍、未発表) から、プリン核酸の取り込みと代謝に関わる両タンパク質の発現変動は連動している可能性が考えられた。

(5) リバビリン取り込みにおける CNT2 と PNP の協調作用の解析

遺伝子導入が容易な HeLa 細胞を用い、CNT2 によるリバビリン取り込みに対する PNP の影響を解析した (Fig. 5)。その結果、CNT2 導入細胞でコントロール (Mock) よりも高いリバビリン取り込み活性が認められ、この取り込み活性は PNP 存在下において上昇する傾向が認められた。しかし、PNP のみの導入細胞ではリバビリン取り込み活性の上昇は認められなかった。

したがって、HeLa 細胞において CNT2 によるリバビリン取り込み活性は PNP との協調作用により上昇する可能性が考えられた。

(6) 総括

本研究により、PNP はリバビリン代謝を担う主要な酵素であることが明らかとなり、小腸に存在する PNP の機能的・量的レベルはリバビリン吸収量の決定要因となりうるということが明らかとなった。したがって、小腸 PNP の機能および発現量の個人差は、リバビリンの吸収量の個人差、さらにはリバビリンの薬効発現の個人差を規定する要因となる可能性が考えられる。このような個人差の要因として、PNP 遺伝子に存在する遺伝子多型が考えられる。本研究の結果、PNP 遺伝子に存在する非同義置換 p. G51S は PNP によるリバビリン代謝に影響を及ぼさなかったことから、今後他の遺伝子多型に着目した検討を進めていく必要があると考えられた。

また、本研究の結果、PNP はリバビリンを代謝するのみならず、CNT2 の機能を正に制御することにより、効果的な輸送-代謝系を構築している可能性が見出された。さらに、これらタンパク質の発現がエタノールにより共同して変動したことを考え合わせると、小腸リバビリン輸送代謝関連装置の構成因子は、協調的なメカニズムにより個々の機能および発現が制御されていると考えられる。したがって、リバビリン吸収量の個人差の要因を解明するためには、個々のタンパク質の機能変動要因のみならず、タンパク質間の協調関係を明らかとしていく必要があると考えられる。

以上本研究では、小腸リバビリン吸収メカニズムおよびその変動要因の解明に取り組み、その責任タンパク質の同定および機能制御要因の一端を明らかとした。今後、これら成果を基盤として、さらに詳細なリバビリン

吸収メカニズムの解明とその個人差の要因解明を進めていく必要がある。これら成果は、リバビリン血中濃度の個人差の要因を明らかとすると期待され、さらにはリバビリンによる C 型肝炎治療のさらなる質の向上に貢献できると期待される。

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 8 件)

飯倉 南、降幡知巳、池田正徳、加藤宣之、千葉 寛. C 型肝炎治療薬リバビリン薬効発現における細胞内リバビリン取込み機構の重要性. 第 5 回トランスポーター研究会 2010 年 7 月 10 日 (東京)

岸田 聡、降幡知巳、飯倉 南、福地由希菜、橋詰美里、長井美樹、宮嶋篤志、千葉 寛. マウスおよびラット肝における核酸トランスポーター CNT2 の著しい種差. 第 5 回トランスポーター研究会 2010 年 7 月 10 日 (東京)

Minami Ikura, Tomomi Furihata, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato and Kan Chiba. Ribavirin uptake systems are required for the anti-hepatitis C virus activity of ribavirin. 9th International ISSX Meeting 2010. 9. 5 (Istanbul, Turkey)

飯倉 南、降幡知巳、池田正徳、加藤宣之、千葉寛. C 型肝炎治療薬リバビリン薬効発現における細胞内リバビリン取込み機構の重要性. 日本薬物動態学会第 25 回年会 2010 年 10 月 9 日 (埼玉)

Minami Ikura, Tomomi Furihata, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato and Kan Chiba. Ribavirin uptake systems are required for the anti-hepatitis C virus activity of ribavirin. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 8 日 (神戸)

Satoshi Kishida, Tomomi Furihata, Hanae Sugiura, Atsuko Kamiichi, Kan Chiba. Ribavirin metabolism by purine nucleoside phosphorylase: potential implications for ribavirin first-pass metabolism in the human small intestine. 4th Asia-pacific regional ISSX meeting 2011. 4. 23 (Tainan, Taiwan)

Satoshi Kishida, Tomomi Furihata, Hanae Sugiura, Atsuko Kamiichi, Kan Chiba.

Ribavirin metabolism by purine nucleoside phosphorylase: potential implications for ribavirin first-pass metabolism in the human small intestine. 第26回日本薬物動態学会年会 2011年11月18日(広島)

降幡知巳、福地由希菜、飯倉南、橋詰美里、水口美紗、長井美樹、千葉寛. C型肝炎治療薬リバビリン薬効発現における核酸トランスポーターENT1の重要性. 日光シンポジウム 2011年12月18日(日光)

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/yakubutu/framepage4.html>

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