

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460194

研究課題名(和文) アクアポリン10の核酸塩基輸送機能：核酸塩基及び関連薬物の小腸吸収における役割

研究課題名(英文) Nucleobase Transport Function of Aquaporin 10: Its Role in the Intestinal Absorption of Nucleobases and Analogous Drugs

研究代表者

湯浅 博昭 (Yuasa, Hiroaki)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20191471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：aquaporin 10が主要核酸塩基類(adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil)の他、核酸塩基誘導体医薬品である5-fluorouracil及び6-mercaptopurineに対する輸送機能を有することを見い出すことができた。また、その輸送機能が、非飽和性を特徴とするチャネル様であることが示唆された。一方で、Caco-2細胞(小腸上皮細胞モデル)でのその関与を検証するには至らなかった。今後、Caco-2細胞のモデルとしての妥当性を含めての研究の継続・展開を要すると思われる。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin 10 was found to be capable of transporting major nucleobases (adenine, guanine, cytosine, thymine and uracil), and also 5-fluorouracil and 6-mercaptopurine, which are drugs derived from nucleobases. The transport of those compounds was suggested not to be saturable, being mediated by its channel-like function. On the other hand, its operation could not be confirmed in the Caco-2 cell as an intestinal epithelial cell model. More detailed studies should be needed to further clarify the potential role of aquaporin 10 in the intestinal absorption of nucleobases and analogous drugs. It may also be needed to examine a possibility that the Caco-2 cell might not be suitable as a model to assess the transport of this class of compounds.

研究分野：薬物動態学

キーワード：アクアポリン10 チャネル トランスポーター 核酸塩基 小腸 吸収

1. 研究開始当初の背景

生体膜を介する物質輸送に働くトランスポーター(輸送担体)群の同定が進展し、薬物を含む様々な内因性及び外来性物質群の体内動態の主要メカニズムとしての膜輸送の分子機構の理解が急速に深まりつつあるが、核酸塩基輸送の領域に関しては、トランスポーターがほとんど未同定のままであり、未解明な部分が多い。このような状況の下、最近、我々は、ラット小腸に特異的に高発現し、uracil等の主要な核酸塩基類の上皮細胞取込を担う SNBT1 (sodium-dependent nucleobase transporter 1) の同定に成功した (Yamamoto et al., J. Biol. Chem., **285**, 6522 - 6531, 2010)。この SNBT1 は哺乳類で初めて同定された核酸塩基特異的なトランスポーターであり、Nature Chemical Biology (**6**, 170, 2010) の Research Highlights に取り上げられる等、画期的な成果として高い評価を得た。しかし、興味深いことに、ヒトでは SNBT1 が欠損していることも同時に明らかとなり、汎用の実験動物であるラットとの間の核酸塩基輸送における種差の問題が浮かび上がってきた。すなわち、ヒトにおける核酸塩基輸送の把握を目指すに当たって、新たに深刻な課題に直面することとなった。また、この問題は、SNBT1 が関わる核酸塩基類の小腸での吸収及び関連の動態において特に重大とみられる。

核酸塩基以外の輸送を主機能とするトランスポーターが核酸塩基輸送機能を併せ持つ例は知られており、ヒトにおけるものとして、ヌクレオシドトランスポーターである ENT1 (equilibrative nucleoside transporter 1) 及び ENT2 の他、アクアグリセロポリン類の一つである aquaporin 9 (AQP9) がある。しかし、両 ENT 及び AQP9 の小腸での発現はごく低レベルないし検出不能レベルとされており、ヒト小腸での核酸塩基吸収に働くトランスポーターに関しては、事実上、同定されたものは皆無のままと言える。

2. 研究の目的

我々は、アクアグリセロポリン類について、glycerol 輸送機能に焦点を当てた研究を進めてきており、小腸上皮細胞の管腔側膜(刷子縁膜)での発現が知られているヒト AQP10 がトランスポーター様(飽和性)とチャネル様(非飽和性)の輸送様式を併せ持つというユニークな性質を有すること等を、新たに見出した (Ishii et al., Cell Physiol. Biochem., **27**, 749 - 756, 2011)。このようにユニークな性質を持つ AQP10 について、さらに未解明な機能や生理的役割がある可能性を想定し、次の研究展開を探る中で、前述した AQP9 (AQP10 のパラログ) の核酸塩基輸送機能に着目し、同様に核酸塩基輸送機能を持つ可能性を考えた。すなわち、ヒト小腸で働くトランスポーターの把握において課題

を抱える核酸塩基輸送研究と未解明機能の探索を進める AQP10 に関する研究との間に接点を見出し、"ヒト小腸での核酸塩基吸収(上皮細胞取込)への AQP10 の関与"を仮説として考え、AQP10 の核酸塩基輸送機能を探ることにした。また、核酸塩基類及び関連薬物の小腸吸収における AQP10 の役割を探ることにした。

3. 研究の方法

(1) クローン化 AQP10

先に報告された AQP9 の例では、チャネル輸送の前提の下での adenine 及び uracil 等の一部の核酸塩基の輸送活性の提示に留まり、基質認識特性等を含む輸送機能の詳細は不明なままである。このため、adenine/uracil (プリン塩基/ピリミジン塩基)を区別しない点で、AQP10 は AQP9 と共通の特徴を示しているが、輸送機能の把握の手掛かりはほとんどない。本研究では、遺伝子導入により AQP10 を強制発現させた HEK293 細胞一過性発現系及び MDCKII 細胞安定発現系を用い、トランスポーター様(飽和性)及びチャネル様(非飽和性)の輸送様式を併せ持つという AQP10 のユニークな性質を踏まえ、核酸塩基類の細胞内取込評価により、核酸塩基輸送に働くメカニズムを探った。また、基質認識特性の検討や特異的阻害剤の検索等も試みた。

(2) 小腸上皮細胞モデル

ヒト小腸上皮細胞モデルとして Caco-2 細胞が汎用されるが、核酸塩基輸送に関する情報は乏しい。本研究では、核酸塩基類の細胞内取込の解析等により、AQP10 の関与の検証及び AQP10 の役割の把握に取り組んだ。また、ヒト小腸での核酸塩基及び関連薬物の吸収の評価系としての Caco-2 細胞の利用可能性を探った。

4. 研究成果

(1) AQP10 の核酸塩基輸送機能

クローン化 AQP10 を導入した哺乳類細胞発現系 (MDCKII 細胞及び HEK293 細胞)での検討により、主要核酸塩基類 (adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil) に対する AQP10 の輸送活性を確認できた。また、uracil 誘導体である 5-fluorouracil 及びプリン塩基誘導体である 6-mercaptopurine (共に抗がん剤) に対する輸送活性を見出すことができた。

特に高い輸送活性が見られた uracil に焦点を当て、詳細な輸送解析を試みた。まず、HEK293 細胞一過性発現系において見られた AQP10 による [³H]uracil 輸送は (図 1)、高濃度の非標識体 uracil を共存させても低下せず (図 2)、非飽和性の特徴を示した。また AQP10 のトランスポーター様機能の高親和性基質(競合阻害物質)である glycerol を高濃度で共存させても輸送阻害を生じなかつ

た(図2)。このような特徴から、AQP10によるuracil輸送は、非飽和性を特徴とし、glycerolによる競合的阻害を受けることのないチャネル様機能によるものと考えられた。

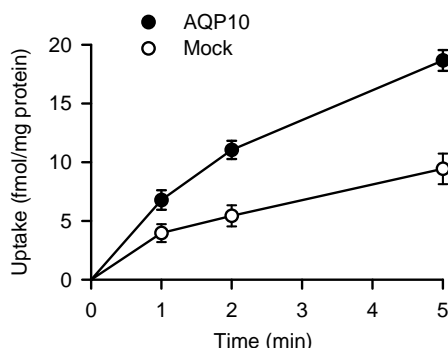


図1. HEK293細胞での ^3H uracil取込みに及ぼす一過性AQP10導入の効果

AQP10を一過性に導入した細胞(●)及び導入していない細胞(○)での ^3H uracil(8 nM)の取込の経時変化を評価した(37℃, pH 7.4)。データは平均値±標準誤差(例数8)で示している。AQP10導入による取込み増大が、AQP10によるuracil輸送を表している。

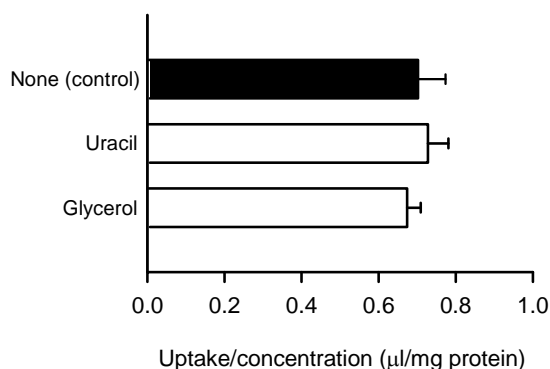


図2. HEK293細胞一過性発現系でのAQP10による ^3H uracil取込みに及ぼすuracil及びglycerolの影響

AQP10特異的な ^3H uracil(8 nM)の取込を、非標識のuracilまたはglycerol(何れも10 mM)の存在下及び非存在下で評価した(2 min, 37℃, pH 7.4)。データは平均値±標準誤差(例数8)で示している。uracil, glycerolによる取込低下を生じていないことが、AQP10を介するuracil輸送の非飽和性、非競合性を示唆している。

チャネル様機能の特性として、基質の濃度勾配に応じて、細胞への取込と同様に細胞からの排出にも機能することが期待される。この点を検証するために、高度に濃縮的なuracil取込に働くSNBT1(GFP付加体)を安

定発現させたHEK293細胞でのuracil取込に対するAQP10の一過性発現(共導入)の効果を検討した。その結果、AQP10の導入によりuracil取込は顕著に低下し、AQP10が濃度勾配に応じた基質(uracil)排出にも働くことが示唆された。このような双方向性の輸送特性は、AQP10によるuracil輸送がチャネル様機能によるものであることをさらに裏付けるものである。

MDCKII細胞安定発現系においても、HEK293細胞一過性発現系での結果と同様に、非飽和性であることに加え、トランスポーター様機能で予想されるようなglycerolによる競合阻害を受けないことが確認された。さらに、 Na^+ 要求性や H^+ 濃度勾配に対する要求性もないことが明らかとなり、チャネル様の機能特性がさらに裏付けられた。また、弱い核酸塩基輸送活性を持つENT1/2の特異的阻害剤(NBMPR, dipydamole)や代表的な競合基質のuridineによるAQP10介在性uracil輸送の阻害は見られず、阻害剤に対する感受性の面で、AQP10のチャネル様機能はENT1/2とは異なる特性を有することが示唆された。

(2) Caco-2細胞の核酸塩基輸送機能

Caco-2細胞(小腸上皮細胞モデル)では、6-mercaptopurine輸送については、ヌクレオシド類による阻害等の特徴から、ENT(ヌクレオシドトランスポーター)様トランスポーターの関与の可能性が示唆された一方で、AQP10関与による輸送の特徴を確認するには至らなかった。5-fluorouracil輸送については、チャネルあるいはトランスポーターの関与を示唆する特異的輸送は見られなかった。

6-mercaptopurine輸送に関わるENT様トランスポーターの実体を探ったところ、ENT2が高い6-mercaptopurine輸送活性を示し、その関与が示唆された。一方で、類縁体であるENT1には、6-mercaptopurine輸送活性は見られなかった。また、5-fluorouracilに対しては、両ENT共に輸送活性を示さず、トランスポーター関与の特徴が見られないというCaco-2細胞での5-fluorouracilの輸送特性と矛盾しなかった。

(3) アクアグリセロポリン類の核酸塩基輸送機能：AQP10との比較

AQP10と同じくアクアグリセロポリン類に属する他のAQP類(AQP3, AQP7, AQP9)の5-fluorouracil及び6-mercaptopurineに対する輸送活性についても検討したところ(クローン化体のHEK293細胞一過性発現系及びMDCKII細胞安定発現系を利用)、AQP9のみでAQP10と同様の輸送活性が見られた。また、AQP3及びAQP9は、プリン核酸塩基類(adenine, guanine)に対する高い輸送活性も示したが、ピリミジン核酸塩基類(cytosine, thymine, uracil)に対する輸送活性は低かった。さらに、AQP7は、両タイプの核酸塩基類の何れに対しても、ほとんど輸送活性を示さなかった。

ただし、AQP7 についても、促進拡散型の高いグリセロール輸送活性は見られ、アクアグリセロポリンとしての基本特性は保持されていた。

以上より、核酸塩基輸送機能は、アクアグリセロポリン類に共通のものではなく、特に AQP10 に特徴的な機能とみられる。また、AQP3 及び AQP9 は、部分的に同様の機能を有するとみられる。この両者のうち、AQP3 については、小腸上皮細胞の血管側膜での発現が示唆されているため、管腔側膜で発現しているとされている AQP10 と連携して、一部の核酸塩基類の腸管吸収過程に関与している可能性が考えられる。しかし、AQP9 については、肝臓特質的に発現しているため、核酸塩基類の腸管吸収への関与の可能性は小さいと考えられる。

(4) まとめ

AQP10 が主要核酸塩基類(adeine, guanine, cytosine, thymine, uraci1) の他、核酸塩基誘導体医薬品である 5-fluorouraci1 及び 6-mercaptopurine に対する輸送機能を有することを見出すことができた。一方で、Caco-2 細胞(小腸上皮細胞モデル)でのその関与を検証するには至らなかった。今後、Caco-2 細胞のモデルとしての妥当性を含めての研究の継続・展開を要すると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Takahiro Katano, Yuko Ito, Kinya Ohta, Tomoya Yasujima, Katsuhisa Inoue, Hiroaki Yuasa

Competitive inhibition of AQP7-mediated glycerol transport by glycerol derivatives.

Drug Metab. Pharmacokinet., **29**, 348-351 (2014).

doi:10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-121

査読有。

Takahiro Katano, Yuko Ito, Kinya Ohta, Tomoya Yasujima, Katsuhisa Inoue, Hiroaki Yuasa

Functional characteristics of aquaporin 7 as a facilitative glycerol carrier.

Drug Metab. Pharmacokinet., **29**, 244-248 (2014).

doi:10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-121

査読有。

[学会発表](計6件)

湯浅博昭, 水野加奈子, 保嶋智也, 太田欣哉

核酸塩基類似薬物の腸管吸収機構: ヒトとラットとの比較.

日本薬学会第 31 年会, 2016 年 5 月 19 日 - 21 日(岐阜).

水野加奈子, 田島健太郎, 太田欣哉,

湯浅博昭

Caco-2 細胞における 6-mercaptopurine 輸送の解析.

日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日 - 28 日(神戸).

田島健太郎, 水野加奈子, 太田欣哉, 湯浅博昭

Caco-2 細胞におけるプリン型核酸塩基類の輸送の解析.

第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2014 年 11 月 20 日 - 21 日(徳島).

Kentaro Tajima, Kanako Mizuno, Kinya Ohta, Hiroaki Yuasa

Carrier-mediated uptake of adenine in Caco-2 cells.

19th NA ISSX/29th JSSX Meeting, Oct. 19 - 23, 2014 (San Francisco, California, U.S.A.).

水野加奈子, 太田欣哉, 湯浅博昭

Caco-2 細胞における 5-fluorouraci1 輸送の解析.

日本薬学会第 29 年会, 2014 年 5 月 20 日 - 22 日(さいたま).

伊藤悠子, 太田欣哉, 井上勝央, 湯浅博昭

aquaporin 10 の新たな機能としての核酸塩基輸送: HEK293 細胞一過性発現系における uraci1 輸送の解析.

日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日 - 30 日(熊本).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 博昭 (YUASA HIROAKI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 20191471

(2) 研究分担者

太田 欣哉 (OHTA KINYA)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 90448704