

Ide T, Sata M, Takaguchi K, Toyoda H, Kumada T, Shimada N, Kato K, Tsubota A, Izumi N. IL28B gene and very early viral kinetics (Week-1) predict sustained virological response to triple therapy in chronic hepatitis C patients with genotype 1b and high viral load. The Liver Meeting, The 64th Annual Meeting of the AASLD 2013 (2013. 11. 1-5 Washington, DC, USA).

Takaguchi, Toyota H, Seno T, Baba N, Nagano T, Kumada T, Kato K, Shimada N, Ide T, Sata M, Tsubota A. P.S.204. EASL The International Liver Congress 2013, 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (Amsterdam, Netherlands).

安部 宏, 島田紀朋, 厚川正則, 坪田昭人, 関 伸嘉, 会田雄太, 石黒晴哉, 井家麻紀子, 加藤慶三, 相澤良夫. IL28BゲノタイプおよびHCV G1bコア70番アミノ酸置換から見たテラプレビル, リバビリン, ペグインターフェロン3剤併用療法の治療効果の検討. 第49回日本肝臓学会総会 (2013. 6. 6 東京)

加藤慶三, RGT研究会. 早期ウイルス動態からのTelaprevir 3剤併用療法の治療効果予測の検討. 第49回日本肝臓学会総会 (2013. 6. 6 東京)

島田紀朋, 厚川正則, 坪田昭人, 安部 宏, 加藤慶三, 井家麻紀子, 佐藤祥之, 立花浩幸, 米澤 健, 戸田剛太郎, 相澤良夫. TVR3剤併用療法のウイルス陰性化時期別の治療成績の検討. 第49回日本肝臓学会総会 (2013. 6. 6 東京)

中川 愛, 厚川正則, 島田紀朋, 坪田昭人, 近藤千紗, 糸川典夫, 福田 健, 松下洋子, 檜原義之, 長田祐二,

中塚雄久, 岩切勝彦, 坂本長逸. C型慢性肝炎に対する3剤併用療法の治療効果に寄与する因子～スタチン併用も含め～. 第49回日本肝臓学会総会 (2013. 6. 6 東京)

近藤千紗, 厚川正則, 島田紀朋, 坪田昭人, 糸川典夫, 中川 愛, 橋本知実, 福田 健, 松下洋子, 城所秀子, 檜原義之, 中塚雄久, 金沢秀典, 岩切勝彦, 坂本長逸. 血小板数低値のC型慢性肝炎に対するPSE先行3剤併用療法について. 第49回日本肝臓学会総会 (2013. 6. 6 東京)

石黒晴哉, 関 伸嘉, 会田雄太, 安部 宏, 井家麻紀子, 加藤慶三, 島田紀朋, 坪田昭人, 相澤良夫. C型慢性肝炎Genotype2に対する治療効果とIL28B遺伝子多型との関連性. 第49回日本肝臓学会総会 (2013. 6. 6 東京)

神田達郎, 厚川正則, 島田紀朋, 篠崎正美, 三上繁, 星野容子, 加藤慶三, 中本晋吾, 千葉哲博, 新井誠人, 今関文夫, 坪田昭人, 横須賀収. B型慢性肝炎に対するPeginterferon alfa-2a単独およびSequential Therapy施行時のHBs抗原量の推移に関する検討～多施設共同研究～. 第49回日本肝臓学会総会 (2013. 6. 6 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし 3. その他

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
降幡知巳、 坪田昭人、 千葉寛	リバビリン輸送 を担う核酸トラ ンスポーターと そのC型肝炎治療 における役割	楠原洋之	医学のあゆみ 「トランスポ ーターと疾患 研究の最前 線」	医歯薬出 版株式会 社	東京	2013	113- 119

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Furihata T, Mizuguchi M, Suzuki Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chiba K.	Identification of primary equilibrative nucleoside transporter 1 mRNA isoform resulting from alternative promoter usage in human hepatocytes.	Drug Metab Pharmacokine		In press.	2014
Furihata T, Kishida S, Sugiura H, Kamiichi A, Iikura M, Chiba K.	Functional analysis of purine nucleoside phosphorylase as a key enzyme in ribavirin metabolism.	Drug Metab Pharmacokine	29 (2)	211-214	2014
Chiba K.	Perspective of humanized mouse models for assessing PK/PD and toxic profile of drug candidates in preclinical study.	Drug Metab Pharmacokine	29 (1)	1-2	2014
Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, Kushida T, Furihata T, Tanaka H, Matsuura T.	Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in Poor Virologic Response to Interferon-Based Combination Therapy for Chronic Hepatitis C.	PLoS One	9 (5)	e97078	2014
Shimada N, Tsubota A, Atsukawa M, Abe H, Ide T, Takaguchi K, Chuganji Y, Toyoda H, Yoshizawa K, Ika M, Sato Y, Kato K, Kumada T, Sakamoto C, Aizawa Y, Sata M.	A 48-week telaprevir-based triple combination therapy improves sustained virological response rate in previous non-responders to peginterferon and ribavirin with genotype 1b chronic hepatitis C: A multicenter study.	Hepatol Res.		In press.	2014

Atsukawa M*, Tsubota A*, Shimada N, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Fukuda T, Matsushita Y, Narahara Y, Osada Y, Yamaguchi H, Nakatsuka K, Iwakiri K, Kawamoto C, Sakamoto C.	Effect of fluvastatin on 24-week telaprevir-based combination therapy for hepatitis C virus genotype 1b-infected chronic hepatitis C.	Eur J Gastroenterol Hepatol.	In press.		2014
Atsukawa M*, Tsubota A*, Shimada N, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Narahara Y, Iwakiri K, Nakatsuka K, Kawamoto C, Sakamoto C.	Serum 25-hydroxy- vitamin D3 levels affect treatment outcome in pegylated-interferon/ ribavirin combination therapy for compensated cirrhotic patients with HCV genotype 1b and high viral load.	Hepatol Res.	In press.		2014
Atsukawa M*, Tsubota A*, Shimada N, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Kidokoro H, Narahara Y, Nakatsuka K, Iwakiri K, Kawamoto C, Sakamoto C.	Efficacy of alfacalcidol on PEG-IFN/ribavirin combination therapy for elderly patients with chronic hepatitis C: a pilot study.	Hepat Mon.	13	e14872	2013
Akihito Tsubota, Tomomi Furihata, Yoshihiro Matsumoto, Kan Chiba.	Sustained and rapid virological responses in hepatitis C clinical trials	Clinical Investigatio	3 (11)	1083-1093	2013
Shimada N, Toyoda H, Tsubota A, Ide T, Takaguchi K, Kato K, Kondoh M, Matsuyama K, Kumada T, Sata M.	Baseline factors and very early viral response (week 1) for predicting sustained virological response in telaprevir-based triple combination therapy for Japanese genotype 1b chronic hepatitis C patients: a multicenter study.	J Gastroenterol.	In press.		2014
Shimada N*, Tsubota A*, Atsukawa M, Abe H, Ika M, Kato K, Sato Y, Kondo C, Sakamoto C, Tanaka Y, Aizawa Y.	α -Fetoprotein is a surrogate marker for predicting treatment failure in telaprevir-based triple combination therapy for genotype 1b chronic hepatitis C Japanese patients with the IL28B minor genotype.	J Med Virol.	86	461-72	2014

Tsubota A*, Shimada N, Atsukawa M, Abe H, Kato K, Ika M, Matsudaira H, Nagatsuma K, Matsuura T, Aizawa Y.	Impact of IL28B polymorphisms on 24-week telaprevir-based combination therapy for Asian chronic hepatitis C patients with hepatitis C virus genotype 1b.	J Gastroenterol Hepatol.	29:	144-50	2014;
Aizawa Y, Shimada N, Abe H, Seki N, Aida Y, Ishiguro H, Ika M, Kato K, Tsubota A.	Serum lipoprotein profiles and response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic HCV genotype 1b infection.	Hepat Mon.	13	e8988	2013
Yoshizawa K, Abe H, Aida Y, Ishiguro H, Ika M, Shimada N, Tsubota A, Aizawa Y.	Serum apolipoprotein B-100 concentration predicts the virological response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with chronic hepatitis C virus genotype 1b.	J Med Virol	85	1180-90	2013
Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; Japanese AHB Study Group (Appendix; Tsubota A)	Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults.	Hepatology	59	89-97	2014
Nagatsuma K, Hano H, Murakami K, Shindo D, Matsumoto Y, Mitobe J, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Owada M, Ikegami M, Tsubota A, Ohkusa T, Aizawa Y, Takagi I, Tajiri H, Matsuura T.	Hepatic stellate cells that coexpress LRAT and CRBP-1 partially contribute to portal fibrogenesis in patients with human viral hepatitis.	Liver Int	34	243-52	2014
Abe H, Aida Y, Ishiguro H, Yoshizawa K, Seki N, Miyazaki T, Itagaki M, Sutoh S, Ika M, Kato K, Shimada N, Tsubota A, Aizawa Y.	New proposal for response-guided peg-interferon-plus-ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C virus genotype 2 infection.	J Med Virol	85	1523-33	2013

Kanda T, Kato K, Tsubota A, Takada N, Nishino T, Mikami S, Miyamura T, Maruoka D, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O.	Platelet count and sustained virological response in hepatitis C treatment.	World J Hepatol.	5	182-8	2013
Kanda T, Nakamoto S, Nishino T, Takada N, Tsubota A, Kato K, Miyamura T, Maruoka D, Wu S, Tanaka T, Arai M, Mikami S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O.	Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 2 who failed previous interferon therapy.	Int J Med Sci.	10	43-9	2013
Itokawa N, Atsukawa M*, Tsubota A*, Kondo C, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Kidokoro H, Kobayashi T, Narahara Y, Nakatsuka K, Kanazawa H, Iwakiri K, Sakamoto C.	Lead-in treatment with interferon- β /ribavirin may modify the early hepatitis C virus dynamics in pegylated interferon alpha-2b/ribavirin combination for chronic hepatitis C patients with the IL28B minor genotype.	J Gastroenterol Hepatol.	28	443-9	2013
Atsukawa M*, Tsubota A*, Kondo C, Itokawa N, Narahara Y, Nakatsuka K, Hashimoto S, Fukuda T, Matsushita Y, Kidokoro H, Kobayashi T, Kanazawa H, Sakamoto C.	Combination of fluvastatin with pegylated interferon/ribavirin therapy reduces viral relapse in chronic hepatitis C infected with HCV genotype 1b.	J Gastroenterol Hepatol.	28	51-6	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

(次項)

リバビリン輸送を担う核酸トランスポーターと そのC型肝炎治療における役割

Role of nucleoside transporters in ribavirin-based anti-hepatitis C therapy



降幡 知巳

Tomomi FURIHATA

千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究室

◎核酸誘導体リバビリンはC型肝炎標準療法の一翼を担う薬剤である。リバビリンは高い水溶性のためにそのままでは細胞膜を透過できず、核酸トランスポーターを介して細胞内に取り込まれる。これまでに複数の核酸トランスポーター分子種がリバビリンを基質とすることが報告されており、肝細胞核酸トランスポーターによるリバビリン取込みはその肝細胞内濃度を、また小腸上皮細胞核酸トランスポーターによるリバビリン吸収はその血中濃度を規定する一因となると考えられている。リバビリン肝細胞内濃度および血中濃度はいずれもリバビリン薬効発現を規定する要因であることから、肝細胞や小腸上皮細胞の核酸トランスポーターの機能や発現量はC型肝炎治療効果に大きな影響を及ぼすと考えられる。したがって、核酸トランスポーターはリバビリンを用いたC型肝炎治療において、その効果を規定する因子として重要な役割を担っていると考えられる。



Key Word : C型肝炎治療, リバビリン, 核酸トランスポーター, 肝細胞

リバビリン(ribavirin: RBV)は抗C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV)活性を有する核酸誘導体である(図1)。RBVはインターフェロン α との併用により持続的ウイルス学的著効(sustained virological response: SVR; 「サイドメモ1」参照)率を相乗的に上昇させることから、これらの併用療法がC型肝炎治療の標準療法として用いられてきた。また、今後はここにテラプレビルなどHCVプロテアーゼ阻害剤を加えた併用療法がC型肝炎治療の主流となっていくと考えられるが、テラプレビルの治験成績ではRBVなしには十分な治療効果が得られないことが明らかとなっている¹⁾。したがって、RBVはC型肝炎の標準療法の一翼を担う薬剤として今後も重要な役割を担うと考えられ、その薬効発現に影響を及ぼす要因を明らかにすることは臨床上重要な課題であると考えられる。

RBVは経口薬であり、服用後は消化管から吸収

サイド
メモ
1

持続的ウイルス学的著効(sustained virological response)

ウイルス持続陰性化, 持続性ウイルス陰性化, sustained virologic responseとも呼ばれる。SVRはC型肝炎治療における治療目標であり, “治療中に血中HCV RNAが検出限界以下となり, 治療終了後24週でもその状態が維持されていること”と定義される。SVRを達成したほとんどの患者においてその後長期間にわたりHCV陰性化が維持されることから, SVRの達成は一般的に治癒とみなされる。しかし, その後の肝炎再燃率がゼロではないこと, 肝癌発症リスクは低下するものの依然残されていることから, 継続的な検診が必要である。治療中ではrapid virologic response(治療開始後4週で血中HCV RNAが検出限界以下), early virologic response(治療開始後12週で血中HCV RNAが検出限界以下または2 log以上低下)が治療効果の判断基準として用いられている。

されて血中に入り、その後肝に到達して薬効を発揮する。これらの過程においてRBVは細胞膜を透過する必要があるが、RBVは水溶性が非常に高いため、その透過には細胞膜上に発現するトランスポーターの介助が必要である。このRBVトランスポーターとして、これまでに複数の核酸トランスポーター分子種が同定されてきた。したがって、これら核酸トランスポーターはRBV肝細胞内取込みやRBV消化管吸収に必須の役割を担っていると考えられる。

そこで本稿ではまず核酸トランスポーターについて概説し、つぎに肝および小腸上皮細胞における核酸トランスポーターの役割、最後に臨床におけるC型肝炎治療効果と核酸トランスポーター機能との関連について概説する。

核酸トランスポーターとリバビリン輸送

核酸トランスポーターはおもに細胞膜上に発現するトランスポーターであり、 Na^+ 依存性能動輸送型の concentrative nucleoside transporters (CNTs, *SLC28*)と基質濃度依存性促進拡散型の equilibrative nucleoside transporters (ENTs, *SLC29*)に分類される(表1)²⁾。おもなCNT分子

種としてCNT1, CNT2, CNT3が同定されており、これらは異なる基質認識性を有する。この基質認識性と一致して、RBVはCNT2およびCNT3の基質となるが、CNT1の基質にはならない³⁾。一方、これまでに4種のENT遺伝子が同定されているが、このうちENT1およびENT2は基質や阻害剤への親和性には差異が認められるものの、ともに幅広い核酸・核酸塩基を基質とし、RBVを基質とすることも報告されている³⁾。著者らがヒト細胞を用いてこれらNT分子種によるRBV輸送を解析したところ、ENT1, CNT2, CNT3によるRBV取込みは認められたものの、ENT2によるRBV取込みは認められなかった。この理由は不明であるが、前述の報告は*Xenopus oocytes*を用いた解析であり、宿主細胞の差異がENT2の機能に差異を生じた可能性が考えられる。詳細は割愛するが、複数のヒト細胞を用いて解析してもENT2によるRBV輸送活性は認められないこと、ヒトENT2のグアノシン輸送活性は低いこと、マウスやラットENT2でもRBV輸送活性は認められないことから⁴⁾、ENT2はRBVを基質としないと著者らは考えている。したがって、RBVの細胞内取込みには、CNT2, CNT3, ENT1が関与しており、これらの組織発現プロファイルや発現量、局在がRBVの細胞膜透過に関与すると考えられる。

サイド
メモ
2

核酸トランスポーターの種差

ここでいう種差とは、ある遺伝子ファミリーの分子種数、基質認識性、発現プロファイルなどについてヒトと実験動物の間、あるいは動物種間に認められる違いを意味する。著者らはリバビリン輸送研究を通じて、核酸トランスポーターにも種差が存在することを明らかとしたので簡単に紹介したい。本文記述のとおりCNT2はヒト肝細胞にほとんど発現しておらず、マウス肝細胞においても発現していない。しかし、ラット肝細胞ではCNT2が高く発現しており、核酸取込みに関する寄与も大きい。一方で、ラットおよびマウス肝非実質細胞ではともにCNT2の発現が認められる(ヒトの肝非実質細胞については不明)。このCNT2発現の差異の分子機構やその生物学的意義は不明であるが、核酸という生命の根源をなす化合物の輸送を担うトランスポーターに、これだけの種差があることは興味深い知見ではないであろうか。

肝細胞核酸トランスポーターによるRBV取込みとその薬効発現における役割

RBVの薬効発現機序は完全には解明されていないが、RBVは肝細胞内でリン酸化されておもな抗HCV活性を発揮すると考えられている(図1)。したがって、RBVが薬効を発揮するためにはRBVは肝細胞内へ取り込まなければならない。これまでに著者らはヒト肝細胞3検体を用いて解析を行い、これらヒト肝細胞におけるRBV取込みトランスポーターはENT1であることを明らかとした(図2)⁵⁾。ヒト肝細胞には、ENT2, CNT1も発現していたが、上述のとおりこれらによるRBV取込みは認められなかった。また、これまでに動物やヒトの肝細胞にCNT2やCNT3が発現するとの報告も散見されるが^{4,6,7)}、著者らの解析で

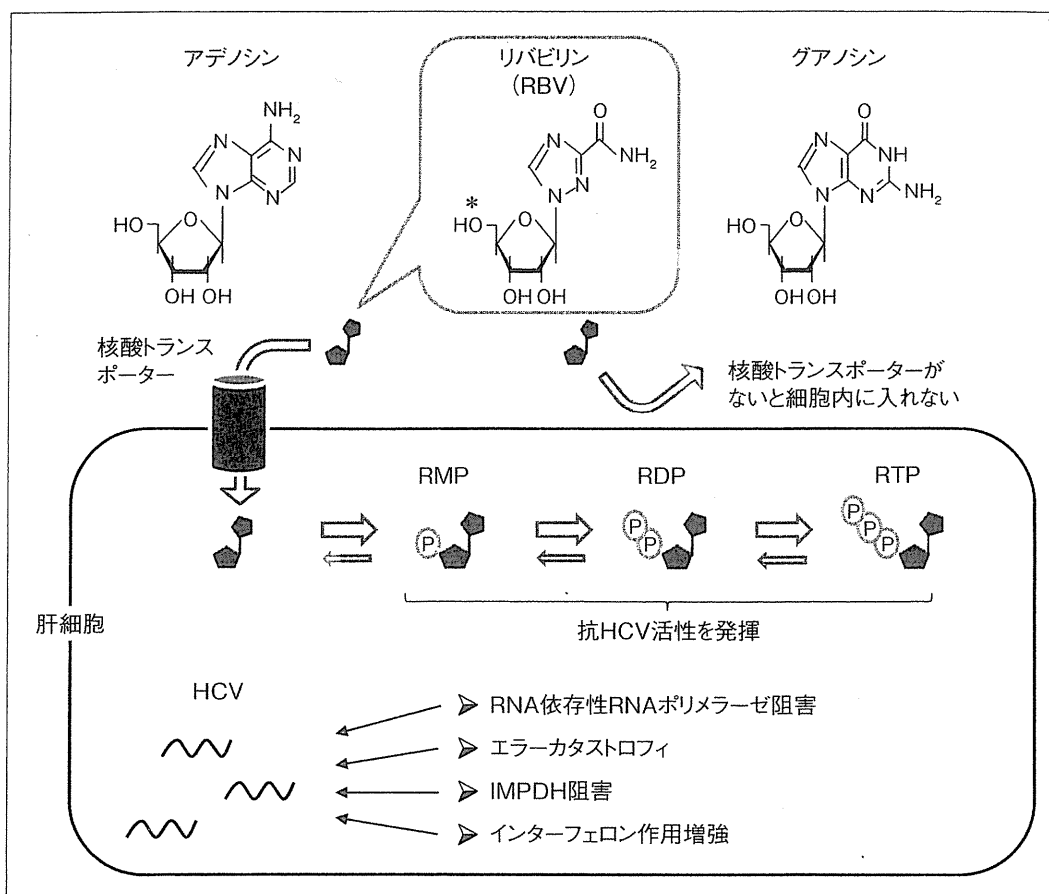


図 1 RBVの構造と推定細胞内作用機序

RBVはプリン誘導体であり、その構造はグアノシンおよびアデノシンと類似する。RBVはきわめて水溶性が高く、細胞内には核酸トランスポーターにより取り込まれる。RBVは他のヌクレオシドと同様に細胞内で*の位置の水酸基がリン酸化(P)を受け、活性本体であるリン酸化体(RMP, RDP, RTP)へと変換される。これらリン酸化体は核酸トランスポーターの基質にはならないため、細胞内に蓄積する。

はヒト肝細胞におけるこれらCNT分子種の発現はきわめて低かった。手術切除直後に凍結保存したヒト正常肝組織を用いて解析してもCNT2およびCNT3の発現は非常に低かったことから、すくなくとも平時にはヒト肝細胞においてこれらCNT分子種はほとんど機能していないと著者らは考えている。

ENT1によるRBV輸送はその薬効発現に重要であると考えられる。そこで著者らはヒト肝細胞と同様にRBVトランスポーターとしてENT1をもつHCV複製モデル細胞(OR6細胞)を用い、RBV薬効発現におけるENT1の役割を解析した。OR6細胞は岡山大学の加藤宣之教授らによりヒト肝癌由来Huh-7細胞をもとに開発された細胞であり、ルシフェラーゼを組み込んだHCVゲノムを安定的に細胞に導入することによりHCV複製

活性をルシフェラーゼ活性として検出することが可能な細胞となっている⁸⁾。このOR6細胞を用いてENT1阻害剤存在下(ENT1の機能が50%となる濃度に設定)または非存在下でRBVのEC₅₀値を解析したところ、阻害剤存在下におけるRBVのEC₅₀値は非存在下の約2倍となった(図2)⁹⁾。また、これらOR6細胞にRBV一定濃度(150 μM)で72時間曝露したところ、ENT1機能50%の細胞では対照の細胞と比較し、HCV複製活性が2倍以上高値であった(図2)。これら細胞においてはENT1の機能に応じてRBVの細胞内取込みおよび細胞内蓄積量が変化しており、これがRBVの薬効発現の強さを規定したと考えられる。

以上よりヒト肝細胞におけるRBV取込みトランスポーターはENT1であり、ENT1はRBVを取り込んでその細胞内蓄積量を規定することによ

表 1 主要なヒト核酸トランスポーターとその特徴

遺伝子名	機能	基質認識性*	リバビリン輸送能**
SLC28 A1 CNT1	Na ⁺ 依存性能動輸送	Py 選択的に認識	×
A2 CNT2		Pu 選択的に認識	○
A3 CNT3		Py・Pu ともに認識	○
SLC29 A1 ENT1	基質濃度依存性促進拡散	Py・Pu ともに認識	○
A2 ENT2		Py・Pu ともに認識	○/×

Pu：プリンヌクレオシド，Py：ピリミジンヌクレオシド。

*：基質認識には例外があるので，注意が必要(例：ウリジンは上記すべての核酸トランスポーターにより認識される)。なお，ENTは核酸塩基も基質とすることが知られている。

**：○はリバビリンを基質とすること，×は基質としないことを示す。ENT2は両方の報告があることから○/×とした(本文参照)。

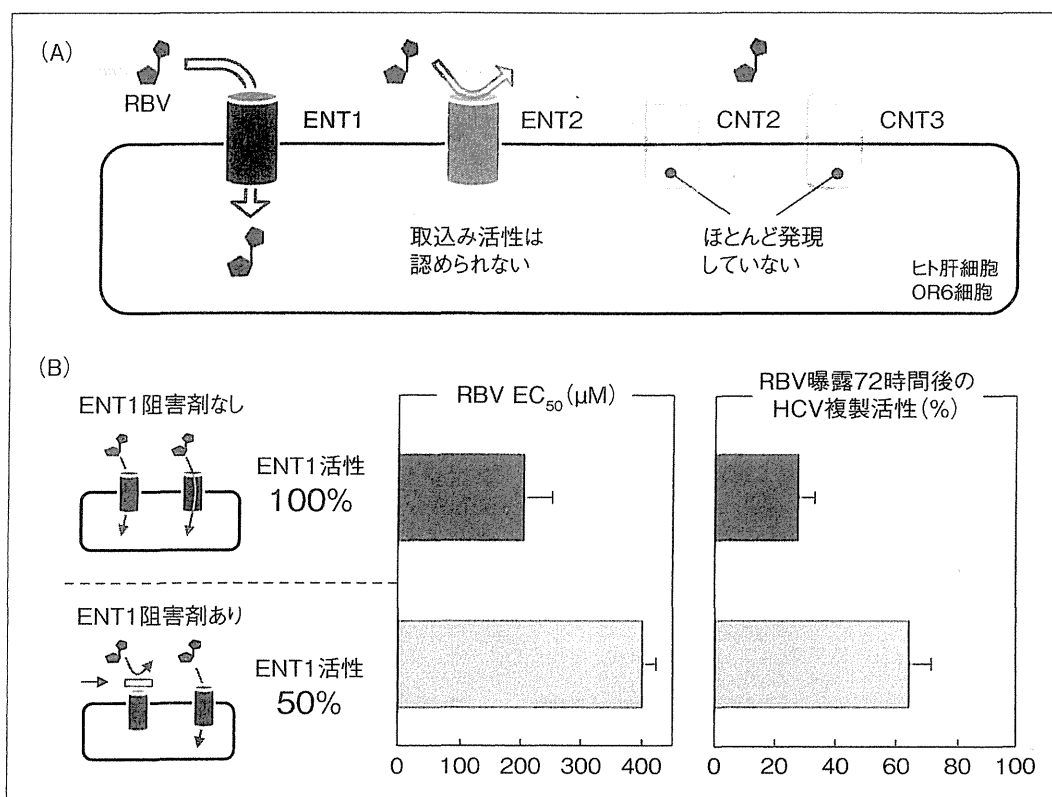


図 2 RBV取込みを担う肝細胞核酸トランスポーターとそのRBV薬効発現における重要性^{5,9)}

A：ヒト肝細胞およびHCV複製モデル細胞(OR6細胞)では，ENT1がRBV取込みトランスポーターとして機能する。

B：RBV薬効発現におけるENT1の役割を解析するため，ENT1阻害剤存在下・非存在下のOR6細胞を用いてRBVの薬効レベル(EC₅₀値)を解析した。ENT1阻害剤は細胞のENT1活性が非存在下の50%となる濃度で用い，RBVは1~3,162 μMの範囲で用いた。また，一定RBV濃度(150 μM)で一定時間(72時間)曝露時におけるこれら細胞間のHCV複製活性を比較した。水(RBVの溶媒)曝露時の各細胞の値をそれぞれ100%としている。

りRBVの薬効発現を規定すると考えられる。

小腸上皮細胞に発現する核酸トランスポーターのRBV吸収における役割

RBVは服用後，小腸上皮細胞を介して体内に吸

取される。Unadkatらのグループは，膜ベシクルを用いた解析からヒト小腸上皮頂端膜側にはENTsおよびCNT3に由来する内因性ヌクレオシド取込み活性はほとんど認められず，CNT1およびCNT2の活性のみが認められることを明らかに

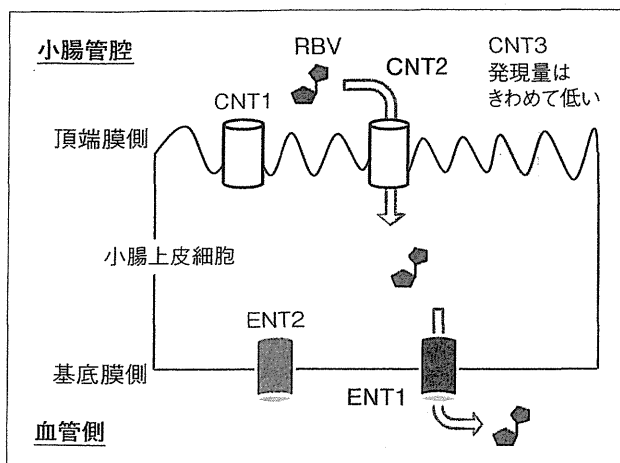


図3 ヒト小腸におけるRBV吸収機序

小腸上皮細胞ではCNT1およびCNT2が頂端膜側に、ENT1およびENT2が基底膜側に発現する。RBVはまずCNT2により小腸管腔から吸収され、ENT1を介して細胞内から血流へと排出される。

した(図3)¹⁰⁾。また、同グループは膜ベシクルおよびマウス個体を用いた解析から、ヒトおよびマウス小腸上皮細胞へのRBV取込みにはほぼCNT2のみが関与することを明らかとしている^{11,12)}。

一方、ヒト小腸においてCNT3 mRNAの発現は低く上記結果と一致するが、ENT1およびENT2 mRNAは高く発現することが知られている。Unadkatらのグループによるヒト小腸組織免疫染色の結果から、これらENTsは小腸上皮細胞の基底膜側に局在していることが明らかとなった(図3)⁷⁾。そこで同グループはRBV吸収における小腸上皮細胞ENT1の役割を明らかとするため、Ent1ノックアウトマウス(Ent1^{null})を用いて解析を行った¹²⁾。その結果、小腸管腔からのRBV取込みに対しEnt1欠損の影響は認められないが、Ent1^{null}ではRBV小腸組織内濃度が野生型マウス(Ent1^{wt})より高く、さらにEnt1^{null}のRBV血中濃度はEnt1^{wt}より低くなることが明らかとなった。したがって基底膜側に局在するEnt1は、小腸上皮細胞内RBVを血液側に排出する機能を有すると考えられる。

以上より、小腸において上皮細胞へのRBV取込みは頂端膜側に発現するCNT2により行われ、細胞内から血液へのRBV排出はENT1により行われると考えられる。小腸上皮細胞におけるCNT2

の能動的輸送とENT1の促進拡散の連携は元来食事由来核酸の効率的な吸収機構として機能していると考えられるが、核酸類似体であるRBVはこの機構を利用して体内に吸収されているのであろう。

臨床におけるC型肝炎治療応答と核酸トランスポーターによるRBV輸送との関連

ここまで*in vitro*試験および動物*in vivo*試験から得られた知見をまとめてきた。そこで最後に、核酸トランスポーターの機能と臨床におけるC型肝炎治療応答との関連についてまとめてみたい(図4)。

これまで臨床において、高いRBV血中濃度(または血中濃度時間曲線下面積)と良好な治療効果には関連が認められることが知られている。この機序として、RBV血中濃度が高いほど肝細胞に取り込まれるRBV量が増大し、その結果、良好な治療効果が得られる、という可能性が考えられる。著者らおよびこれまでの報告によるとENT1によるRBV輸送のKm値は数百μM程度であり、臨床で認められるRBV血中濃度範囲(約1~15μM, RBVはほとんど血中蛋白質に結合しない)においてその取込みはほぼ直線的に上昇すると考えられる^{3,5,9)}。また、著者らがOR6細胞を用いた解析においても細胞外RBV濃度が高いほどRBVは細胞内に蓄積し、その蓄積量に伴って抗HCV効果が増大していくことが明らかとなっている⁹⁾。したがって、高い血中濃度が良好な治療効果と関連する要因は、この肝細胞ENT1による濃度依存的なRBV取込みにある可能性が考えられる。

では患者によって血中濃度が変動する要因は何であろうか? RBVの血中濃度は全身にわたる多くの要因の組合せにより規定されるが、小腸上皮細胞のCNT2やENT1の機能および発現量はそれら要因のひとつとなると考えられる。たとえば、最近、CNT2遺伝子翻訳領域内のrs11854484における遺伝子型がTTの患者では、他の遺伝子型と比べ治療開始後4週目および8週目におけるRBV血中濃度が高い傾向にあることが報告された¹³⁾。rs11854484はアミノ酸置換を伴う遺伝子多型であるが、*Xenopus oocytes*を用いた解析から

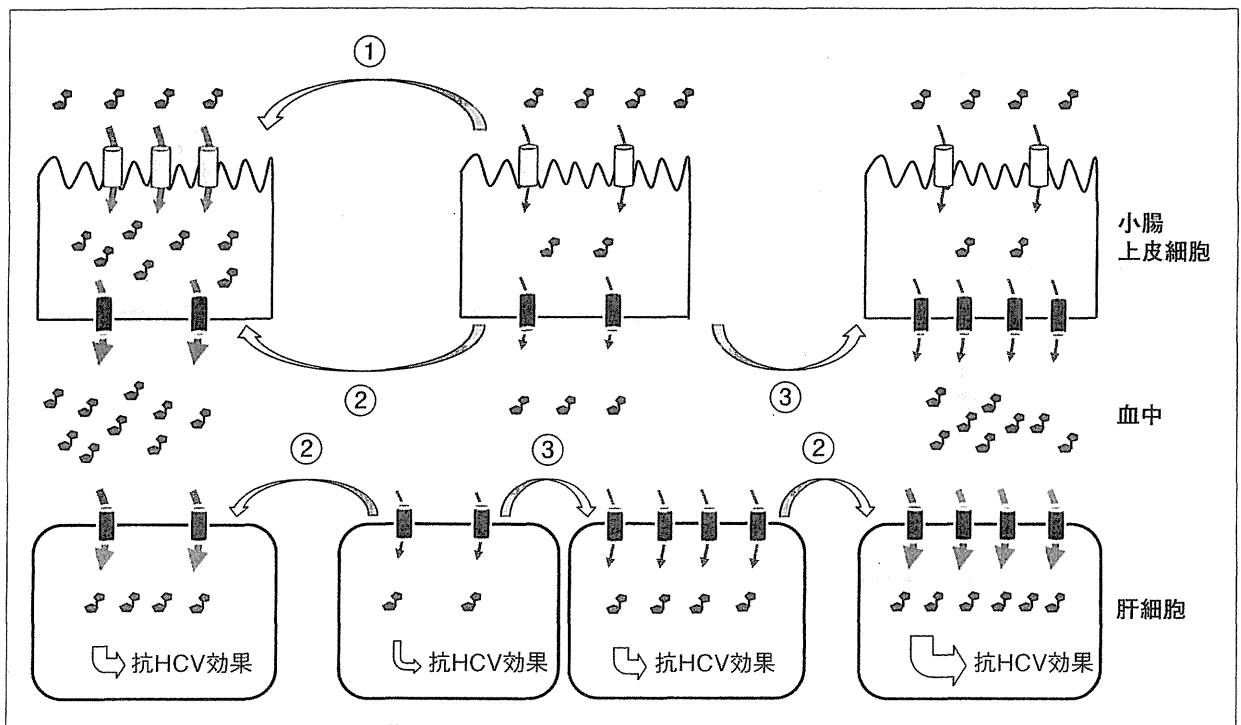


図4 核酸トランスポーター機能とRBV治療効果との関連のモデル

小腸上皮細胞のCNT2やENT1の機能・発現量の亢進・低下はRBV血中濃度の上昇・低下の要因となる。RBV血中濃度が高ければ肝細胞ENT1によるRBV取込みは上昇し、肝細胞内濃度は高くなる。また、肝細胞ENT1の機能・発現量の亢進・低下は肝細胞濃度の上昇・低下の要因となる。これらの組合せが肝細胞濃度を規定する要因となり、ひいてはRBV治療効果を規定する要因となる可能性が考えられる。CNT2やENT1の機能・発現量変動の要因には、遺伝的要因のほか、環境的要因も考えられる。
 ①CNT2発現量・機能の亢進・低下、②ENT1によるRBV濃度依存的な輸送、③ENT1発現量・機能の亢進・低下。

はこの置換はCNT2の機能にほとんど影響しないと報告されていた¹⁴⁾。したがって、rs11854484の機能については今後再検証を行う必要があるが、本多型は哺乳動物細胞においてCNT2活性や安定性に影響を及ぼす可能性が考えられる。また、このような遺伝的要因に加え、これまでにプリン体を多く含む食事によりRBVの血中濃度が減少するとの報告もある¹⁵⁾。これはおそらくCNT2やENT1の基質となる食事由来のプリン体がRBVと競合した結果、RBV吸収量が減少したためと推察される。これまでに患者間におけるRBVの生物学的利用率には28~85%と大きな個人差があることが知られており、患者ごとのRBV血中濃度の規定要因を明らかとするためには今後上述のようなRBV吸収過程に着目した研究を進めていくことも重要であると考えられる。

一方、臨床においてはRBV血中濃度に差がなくてもSVR達成に個人差が生じることが知られている。核酸トランスポーターの視点からこの個

人差を考えてみると肝細胞におけるENT1機能の個人差が関与する可能性が考えられる。これまでに、SVRを達成した患者の多くは治療中にrapid virological response (RVR)を達成していたことが明らかとなっている¹⁶⁾。RVRは治療早期に血中よりHCV RNAが認められなくなる状態であり、この治療応答プロファイルは図2の結果(ENT1の機能が低いほど早いRBV薬効発現が認められる)とよく一致する。また、最近ではENT1の遺伝子多型と良好な治療効果との関連を示す報告もなされている。欧米人患者においてはrs760370の遺伝子多型GGが良好なRVR達成率と関連し(多変量解析におけるodds ratio [95%CI]=15.9 [2.8-92.2])¹⁷⁾、また日本人患者においてはrs6932345の遺伝子型AAが良好なSVR達成率と関連すること(多変量解析におけるodds ratio [95%CI]=1.85 [1.06-3.21])が見出されている¹⁸⁾。これら多型の機能は不明であるものの、両者は近接して存在していることから、何らかの共通の機序を介し

て肝細胞ENT1機能を上昇させている可能性がある。以上, *in vitro* および *in vivo* 解析より得られている知見を考え合わせると, 肝細胞におけるENT1機能や発現量の個人差がその患者の治療応答に關与する可能性は高いと考えられる。

おわりに

本稿では, ENT1やCNT2のRBV体内動態における役割およびそれらの機能変動がRBV薬効発現を変動させる可能性について概説した。近年, C型肝炎治療においては*IL28B*遺伝子多型やウイルスコア変異が治療効果予測因子として個別化医療の発展など治療の質の向上に貢献してきているが, RBV薬効発現や血中濃度を規定するENT1やCNT2についてもその遺伝的機能変動因子はあらたな治療効果予測因子となる可能性がある。*IL28B*遺伝子など既知の遺伝子と核酸トランスポーターはそれぞれ異なる治療効果発現機序に關与することから, これら因子を組み合わせるにより現在の治療効果予測精度をさらに向上させることが可能となると期待される。また, ENT1やCNT2の環境的機能変動因子(併用薬・食事・疾患など)が明らかとなれば, これを応用した治療法の開発や注意喚起などを行うことが可能となると期待される。

本稿では誌面の都合上割愛したが, ENT1やCNT3はRBVによる溶血性貧血となんらかの關連を有する可能性があることも報告されている^{19,20)}。この点も含め, 核酸トランスポーターと

RBVに関する研究の発展が今後のC型肝炎治療の質の向上に大きく貢献することを期待したい。

文献

- 1) Hézode, C. et al.: *N. Engl. J. Med.*, **360**: 1839-1850, 2009.
- 2) Molina-Arcas, M. et al.: *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **7**: 426-434, 2009.
- 3) Yamamoto, T. et al.: *Eur. J. Pharmacol.*, **557**: 1-8, 2007.
- 4) Furihata, T. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**: 3035-3038, 2010.
- 5) Fukuchi, Y. et al.: *J. Hepatol.*, **52**: 486-492, 2010.
- 6) Ibarra, K. D. et al.: *J. Virol.*, **83**: 4538-4547, 2009.
- 7) Govindarajan, R. et al.: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **293**: R1809-R1822, 2007.
- 8) Ikeda, M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**: 1350-1359, 2005.
- 9) Iikura, M. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**: 1407-1413, 2012.
- 10) Patil, S. D. and Unadkat, J. D.: *Am. J. Physiol.*, **272**: G1314-G1320, 1997.
- 11) Patil, S. D. et al.: *Pharm. Res.*, **15**: 950-952, 1998.
- 12) Moss, A. M. et al.: *Mol. Pharmaceutics*, **9**: 2442-2449, 2012.
- 13) Rau, M. et al.: Impact of genetic SLC28 transporter and ITPA variants on ribavirin serum level, hemoglobin drop and therapeutic response in patients with HCV infection. *J. Hepatol.*, 2012. (in press)
- 14) Owen, R. P. et al.: *Pharmacogenet. Genomics*, **15**: 83-90, 2005.
- 15) Li, L. et al.: *J. Clin. Pharmacol.*, **49**: 661-667, 2009.
- 16) Poordad, F. et al.: *Clin. Infect. Dis.*, **46**: 78-84, 2008.
- 17) Morello, J. et al.: *J. Infect. Dis.*, **202**: 1185-1191, 2010.
- 18) Tsubota, A. et al.: *Liver Int.*, **32**: 826-836, 2012.
- 19) Jarvis, S. M. et al.: *Br. J. Pharmacol.*, **123**: 1587-1592, 1998.
- 20) Doehring, A. et al.: *Pharmacogenet. Genomics*, **21**: 289-296, 2011.

* * *

Identification of primary equilibrative nucleoside transporter 1 mRNA isoforms resulting from alternative promoter usage in human hepatocytes

Tomomi Furihata, Misa Mizuguchi, Yuki Suzuki, Shogo Matsumoto, Kaoru Kobayashi, Kan Chiba.

Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba 260-8675, Japan.

*, This work was supported by Grants (20790128 and 22790145) from the Ministry of Education, Sciences, Sports and Culture of Japan and partially supported by a Special Funds for Education and Research (Development of SPECT Probes for Pharmaceutical Innovation) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan and a research grant from the Takeda Science Foundation (Osaka, Japan), the Japanese Research Foundation for Clinical Pharmacology (Tokyo, Japan), the Hamaguchi Foundation for the Advancement of Biochemistry (Chiba, Japan), and the Research Foundation for Pharmaceutical Sciences (Tokyo, Japan).

Conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

Running title: Hepatic ENT1 mRNAs resulting from alternative promoter usage

a) Corresponding author: Tomomi Furihata, Ph.D.

Tel/Fax: +81-43-226-2894 E-mail: tomomif@faculty.chiba-u.jp

Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuou-ku, Chiba-shi, Chiba, Japan 260-8675

c)

The number of text pages: 22 (from the beginning of introduction to the end of discussion)

The number of tables: 1 (+ two supplemental tables)

The number of figures: 5 (+ one supplemental figure)

The number of words in summary: 193

The number of words in text: 5206

Summary

Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) transports various nucleoside analogues into cells. Although the single hENT1 promoter region (P1) and the mRNA isoform (a1) have been characterized previously, we have recently identified additional promoter regions P2 and P3 (which primarily generate c1/2/3 mRNAs and d1/2/3/4 mRNAs, respectively) in the human liver. Therefore, this study aimed at identifying the primary hENT1 mRNA isoforms expressed in human hepatocytes, while simultaneously obtaining functional evidence of alternative hENT1 promoter usage. Our results showed that the expressions of hENT1c1, d3, and (to a lesser extent) c2 mRNAs were strikingly predominant over the other mRNA isoforms in human hepatocytes, that the abundant expression of these mRNAs was consistent with the high levels of P2 and P3 promoter activity, and that these promoters were significantly marked by transcriptionally-active histone modification in hepatic cells. To summarize, our results demonstrate that, resulting from the manipulated alternative promoter usage, hENT1c1 and d3 (and c2) mRNAs are primarily expressed in human hepatocytes, which suggests that they may play important roles in controlling hENT1 expression levels in those cells. Our findings are expected to provide significant insights into the molecular machinery of hENT1 expression control.

Keywords

Equilibrative nucleoside transporter, SLC29A1, alternative promoter, 5'-untranslated region, hepatocytes, gene expression, human

Introduction

Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1, *SLC29A1*) is a representative member of the ENTs that are responsible for cellular facilitative nucleoside transport and is widely expressed throughout the body.^{1,2)} The hENT1 protein is localized primarily at the cellular plasma membrane where it can transport a variety of endogenous nucleosides including adenosine and inosine. These nucleosides are ligands for adenosine receptors that possess pleiotropic functions, and it has been shown that hENT1 plays an important role in regulating adenosine receptor activity by facilitating extracellular adenosine uptake. A well-known example is dipyridamole, which is clinically used as a vasodilator and antithrombotic agent. It has been considered likely that the pharmacological actions induced by dipyridamole are primarily due to its potent inhibitory effect on hENT1-mediated adenosine uptake, which results in an increase in extracellular adenosine availability for the receptors on platelets and vascular endothelial cells.³⁾

In addition to endogenous nucleosides, a variety of nucleoside analogues are transported into the cells by hENT1, after which they are pharmacologically activated via phosphorylation.⁴⁾ Therefore, it has become evident that hENT1 plays important roles in anti-viral and anti-cancer therapies where various nucleoside analogues are prescribed. Recently, we and other researchers have shown that uptake level of ribavirin, an anti-hepatitis C guanosine analogue, by hENT1 is among the determinant factors that govern its antiviral action *in vitro*,^{5,6)} and that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *SLC29A1* gene (rs6932345 and rs760370) are associated with virological responses in chronic hepatitis C patients.^{7,8)} hENT1 also plays a key role in transporting cytotoxic nucleoside analogues into tumor cells. It has been shown that hENT1 functions as a primary gemcitabine uptake transporter,⁹⁾ and clinical studies have provided results showing the association of hENT1 protein levels with overall survival and/or disease-free survival in pancreatic cancer patients who were treated with gemcitabine.^{10,11)}

Based on the understanding that the hENT1 expression level can significantly affect pharmacological potency of nucleoside analogues, it is important to understand its expression mechanisms in target cells. While the detailed mechanisms regulating hENT1 expression levels have not yet been fully clarified, the region just upstream from the translational start site has been characterized as its promoter region.¹²⁾ Accordingly, the binding sites for several transcription factors (TFs), such as the peroxisome proliferator-activated receptor α and the hypoxia inducible factor, have been reported within that region.¹³⁻¹⁶⁾ Furthermore, the SNP within the region is also reported to be functional.^{17,18)} Based on these reports, this region appears to be dedicated to the regulation of hENT1 expression. Meanwhile, in addition to the above-mentioned region (designated the P1 promoter), we have identified two other promoter regions (P2 and P3) approximately 3.7 and 7.7 kbp (respectively) upstream from the translational start site in the human liver (Fig. 1).¹⁹⁾ These

promoters generate several hENT1 mRNA isoforms containing different 5'-untranslated regions (5'-UTRs) (hENT1a1, b1/2/3/4, c1/2/3, and d1/2/3/4 mRNAs). Although these results suggest that the *SLC29A1* gene is equipped with an alternative promoter system for its expression control, the results raise two particularly relevant questions: what functional differences exist among the promoters? and, what mRNA isoforms are predominantly expressed in human liver cells as well as other tissues?

In the present study, we sought to identify the primary hENT1 mRNA isoforms expressed in human hepatocytes, one of the target cells for nucleoside analogues, and to simultaneously obtain evidence for alternative promoter usage of the *SLC29A1* gene.

Materials and methods

Cells and cell culture

Eight human hepatocyte lines (HH187, HH225, HH229, HH268, HH278, HH283, HH291, and HH314) were purchased from Tissue Transformation Technologies (Edison, NJ) or Biopredic international (Rennes, France). The donor characteristics of these lines are shown in Table s1. Pooled (50-donor) human hepatocytes were obtained from Celsis (Baltimore, MD). The Ethics Committee of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, approved the use of human samples in this study.

Three human hepatoma-derived cells (HepG2 cells, Huh-7 cells, and FLC7 cells) and 293FT cells were used in this study. The HepG2 cells, the Huh-7 cells, and the 293FT cells were obtained from Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan), Cell Resource Center for Biomedical Research (Tohoku University, Sendai, Japan), and Life Technologies (Carlsbad, CA), respectively. The FLC7 cells were provided by Dr. Seishi Nagamori (Kyorin University, Tokyo, Japan). The HepG2 cells, the Huh-7 cells, and the FLC-7 cells were respectively cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (Life Technologies), RPMI1640 medium (Life Technologies), and D-MEM/F-12 (Life Technologies). The 293FT cells were grown in D-MEM supplemented with Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids (Life Technologies), GlutaMAX (Life Technologies), and G418 disulfate salt (500 µg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Each medium was supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, penicillin and streptomycin, and all cells were maintained at 37°C with 5% CO₂.

cDNA cloning and *in vitro* transcription

hENT1a1, hENT1c1 and hENT1d3 cDNA were obtained from human liver cDNA¹⁹⁾ by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers (Table s2). Each hENT1 cDNA product was separately cloned into pcDNA3.1(-)Neo vector (Life Technologies). The DNA sequence of each insert was confirmed by the method described previously.¹⁹⁾

hENT1a1, hENT1c1 and hENT1d3 mRNA were produced from the above-prepared plasmids using an *in vitro* transcription T7 kit (Takara Bio, Shiga, Japan). Template plasmids were eliminated by DNase I digestion.

Total RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA isolation from hepatic cells was performed using a Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol, and

the genomic DNA was eliminated via DNase I digestion. cDNA synthesis from the extracted RNA (1 µg) was performed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit with random hexamers (Life Technologies), as described previously.¹⁹⁾ cDNAs for the standard curves were also synthesized from each hENT1 mRNA isoform at different copy numbers [1, 5, 25, 50, 100, 250 copies ($\times 10^3$)].

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)

The expression levels of the hENT1 mRNA isoforms in human hepatic cells were analyzed by a SYBR green-based qPCR method using specific primers for total hENT1 mRNA, as well as hENT1a1 mRNA, all hENT1b mRNA isoforms, all hENT1c mRNA isoforms, and all hENT1d mRNA isoforms (hereafter referred to as hENT1b, hENT1c, and hENT1d, respectively). The expression levels of hENT1 mRNA isoforms were normalized using the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression level. In addition, hENT1a1, hENT1c, and hENT1d mRNA copy numbers (copies/µg total RNA) were determined using the standard curves.

RNA ligase-mediated 5'-rapid amplification of cDNA ends (RLM-5'-RACE) and reverse-transcriptase PCR (RT-PCR)

RLM-5'-RACE was performed using a GeneRacer RLM-RACE Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. cDNA for RLM-5'-RACE was prepared from HH187 and HepG2 cells. The first RT-PCR was performed using specific primers for hENT1c, hENT1d, or the adaptor. Subsequently, the nested PCR was performed using different primer sets, after which the products were applied to DNA sequence analysis.

RT-PCR for detection of hENT1c and 1d mRNA isoforms expression was performed using primer sets that were designed to span an exon α .

Short-hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown of hENT1d mRNA

In order to archive an isoform-specific mRNA knockdown, it is necessary to design an RNAi target sequence within the 5'-UTR region of each mRNA isoform. Based on this requirement, an hENT1d mRNA-specific shRNA sequence was identified using the Target Sequence Selector (Clontech, Mountain View, CA). Because we were unable to design an hENT1c mRNA-specific shRNA (see the supplemental material), only the hENT1d mRNA could be applied to the isoform-specific knockdown experiment.

The shRNA target sequence for hENT1d mRNA knockdown (dKD-shRNA, Table s2 and Fig. 1) and the scramble shRNA sequence (control-shRNA, Table s2) were independently inserted

into the RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector (Clontech). The retrovirus carrying dKD-shRNA or control-shRNA was then separately transduced into HepG2 cells to develop the shRNA-expressing cells (dKD-HepG2 cells or control-HepG2 cells).

Transient transfection and luciferase reporter gene assay

Transient transfection and luciferase reporter gene assays were performed primarily via the previously described methods.¹⁹⁾ Preparation of pGL4.17 firefly luciferase reporter plasmids (Promega, Madison, WI) containing the P1 promoter region (-1883/+143), the P2 promoter region (-2000/+29, previously referred to as P2.1), or the P3 promoter region (-1945/+141) was described in the previous study.¹⁹⁾ pGL4.70 renilla luciferase reporter plasmids (Promega) were used as an internal control.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Chromatin immunoprecipitation assays were performed in HepG2 cells and FLC7 cells using a ChIP-IT kit (Active Motif, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. Sheared chromatin was prepared from cross-linked cells using a sonicator. Magna ChIP protein G magnetic beads (Millipore, Bedford, MA), anti-histone H3 acetylated lysine 9 (H3K9ac) antibodies (Millipore), anti-histone H3 antibodies (Abcam, Cambridge, UK) and normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were used. "Input DNA" was referred to the sample prepared from chromatin using the same treatments, except for immunoprecipitation.

A SYBR green-based qPCR method was used for quantification of precipitated DNA amounts of the P1 and P2 promoters or the 3'-intergenic region (2723 bp downstream from translation stop codon). A fluorescence probe-based qPCR was used for detection of the P3 promoter region. Values are represented as fold enrichment, and then the values of H3K9ac were normalized for the value obtained from the unmodified histone H3 antibodies (H3K9ac/H3).

Sequence analysis and others

The normalized CpG dinucleotides (CpG) content in the promoter region (-500/+500, where +1 indicated the position of the most upstream transcription start site in the region) was calculated.^{20,21)} When searching the upstream open reading frame (uORF) in 5'-UTR, the Kozak sequence²²⁾ was taken into consideration.

The primer sequences and their positions are shown in Table s2 and Fig. 1, respectively. Detailed information about the above procedures is provided in a supplemental material.