

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）） 総括研究報告書

肝細胞への取り込み機構に着目したC型およびB型肝炎治療薬新規奏功因子の同定

研究代表者 降幡 知巳

研究要旨

本研究事業では、B型およびC型肝炎治療薬の取り込み輸送体（トランスポーター）の機能に着目することにより、難治性肝炎の奏功率を規定する新規宿主因子を明らかにすることを主目的としている。これに準じ、平成26年度は、B型肝炎治療薬エンテカビルおよびテノフォビルの肝細胞取り込み輸送体の同定、直接作用型C型肝炎治療薬による肝薬物トランスポーターに対する新たな阻害機序の解析、C型肝炎患者由来試料を用いた新たな治療奏効規定因子の探索をおこなった。これらはそれぞれ、B型肝炎核酸アナログ治療にける応答性の個人差の要因解明やC型肝炎治療における薬物間相互作用のリスク回避、C型肝炎治療の応答性の個人差の要因解明につながると期待される。本報告書では、各項目の担当研究者より主に得られた成果について報告する。

研究分担者

千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究室
教授 千葉 寛

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター
基盤研究施設 分子細胞生物学
教授 坪田 昭人

A . 研究目的

本研究事業では、B型およびC型肝炎治療薬の取り込みトランスポーターの機能に着目することにより、肝炎治療に貢献する新規宿主因子を明らかにすることを主目的としている。これに準じて平成26年度は（1）B型肝炎治療薬エンテカビルおよびテノフォビルの肝細胞内取り込みトランスポーターの同定、（2）直接作用型C型肝炎治療薬による肝薬物トランスポーターに対する新たな阻害機序の解析、（3）C型肝炎患者の臨床的知見の的確な把握と新たな治療奏効率規定因子の探索をおこなった。上記のうち降幡が担当した（1）に該当する項目について、得られた主な研究成果についてここに報告する。

慢性B型肝炎に用いられる核酸誘導体は、HBVの複製を直接阻害することにより血中HBV DNA量の大きな低下をもたらすことが知られている。特に、エンテカビル（entecavir、ETV）およびテノ

フォビル（tenofovir、TFV）は、従来の核酸誘導体と比較して高い血中HBV DNA陰性化効果に加え、低い耐性変異出現率を示すことから、現在、本邦においてB型肝炎治療の第一選択薬として用いられている。しかし、これら薬剤の薬効発現には、依然として大きな個人差が存在することが知られている。したがって、このような薬効発現の個人差の原因を明らかとするためには、まず、薬剤の薬効発現に関わる機序を一つ一つ明らかとする必要がある。

ETVおよびTFVは、肝細胞内に取り込まれた後に抗ウイルス活性を示すと考えられている。したがって、ウイルス複製の場である肝細胞内への移行は、これら薬剤が薬効を発揮する上で必須の過程であると言える。ETVおよびTFVは水溶性が高く、細胞膜を透過するためには膜上に発現するトランスポーターの介助が必要であると考えられる。これまで、ETVおよびTFVは腎臓に発現するorganic anion transporter 1（OAT1）およびOAT3の基質となることが報告されているが、これらOATsは肝臓に発現していない。したがって、肝臓においてもETVおよびTFVはトランスポーターを介して肝細胞内へ取り込まれる可能性は考えられるものの、これらを基質とする肝取り込みトランスポーターは同定されていない。

一方で、核酸誘導体の中には、その薬効発現に関与する機序として、種々の遺伝子の発現を変動させる作用を有する薬剤があることが知られている。これまでにTFVにおいてもマウスマクロファ

ージやヒト末梢血単核細胞において、ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus, HIV)複製を阻害するサイトカインやケモカインの分泌を増加させることが報告されている。したがってヒト肝細胞においても、ETV や TFV が何らかの遺伝子の発現を変動させることで間接的に抗 HBV 活性を示す可能性が考えられるが、これら薬剤のヒト肝細胞遺伝子の発現に対する影響は不明である。

そこで本研究では、B 型肝炎治療薬の薬効発現に関わる機序を明らかとするため、B 型肝炎治療薬の肝取り込みトランスポーターを同定すること、および TFV により発現が変動するヒト肝細胞遺伝子を同定することを目的とした。

B . 研究方法

試薬

[³H]TFV および非標識 TFV は、Moravec Biochemicals (Brea, CA, USA) および Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada) より購入した。 [³H]ETV および非標識 ETV は、American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA) および Toronto Research Chemicals より購入した。 Organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 の基質である [³H]estradiol-17- β -D-glucuronide (E₂G) および非標識 E₂G は、American Radiolabeled Chemicals および Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。 OATP1B3 の基質である [³H]cholecystokinin-octapeptide sulfated (CCK-8) および非標識 CCK-8 は、PerkinElmer Life Science (Boston, MA, USA) およびペプチド研究所 (大阪) より購入した。 OATP2B1 の基質である [³H]estrone-3-sulfate (E3S) および非標識 E3S は、PerkinElmer Life Science および Sigma-Aldrich より購入した。 OAT2 の基質である [³H]guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cGMP) および非標識 cGMP は、Moravec Biochemicals および Sigma-Aldrich より購入した。 Equilibrative nucleoside transporter (ENT) の基質である [³H]adenosine (Ado) および非標識 Ado は、Moravec Biochemicals および Sigma-Aldrich より購入した。

OATP1B1 阻害剤である rifampicin (RIF) は和光純薬工業より購入した。 OATP および OAT2 阻害剤である bromosulphophthalein (BSP) は Sigma-Aldrich より購入した。 OAT2 阻害剤である indomethacin (IDM) は Sigma-Aldrich より購入した。 ENT 阻害剤である (4-nitrobenzyl) mercaptopurine riboside (NBMPR) は和光純薬工業より購入した。

細胞および細胞培養

白人種5検体混合凍結肝細胞 (lot number XOK) は Bioreclamation IVT (Baltimore, MD, USA) より購入した。 また、単一ドナー白人種凍結肝細胞 (lot number BHL) は Celsis IVT (Baltimore, MD, USA) より購入した。

ヒト胎児腎臓由来 human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞は HUMAN SCIENCE (東京) より入手し、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞センター (仙台) より入手した。 これらの細胞は、10% 非動化 fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) および 50 units/mL penicillin-50 mg/mL streptomycin (Pen/St, 和光純薬工業) を加えた Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (和光純薬工業) を用いて、5% CO₂ / 95% air を気相とした 37 °C の CO₂ インキュベーターで培養した。

ヒト遊離肝細胞における ETV および TFV 取り込み活性解析

ヒト遊離肝細胞の調製

白人種5検体混合凍結肝細胞の融解はプロトコール通りにおこなった。その後、37 °C に加温した In Vitro GRO HT Medium (Bioreclamation IVT) に肝細胞を懸濁し、遠沈管に移して、50 × g、室温で5分間遠心分離した。上清を取り除き、沈殿した細胞を In Vitro GRO KHB buffer (Bioreclamation IVT) で再懸濁した。Trypan blue 染色で生存率が80%以上あること確認し、これをヒト遊離肝細胞とした。

ヒト遊離肝細胞を用いた suspension transport assay

ヒト遊離肝細胞を In Vitro GRO KHB buffer を用いて 2 × 10⁶ cells/mL の濃度に調製し、氷上に静置した。この細胞溶液を 37 °C で3分間プレインキュベーションした後、細胞溶液 150 μL に ETV もしくは TFV を含む In Vitro GRO KHB buffer 150 μL を加え assay を開始した。ETV および TFV の最終基質濃度および最終放射線濃度はともに 1 μM および 0.4 μCi/mL とし、取り込み時間は 1.5 分とした。阻害実験では上記の In Vitro GRO KHB buffer に BSP (200 μM)、NBMPR (100 μM) または溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) を加え、培地中の最終 DMSO 濃度は 0.2% とした。インキュベーション後、下層に 2N NaOH 50 μL、上層に mixture oil (mineral oil: silicone oil = 1:5.4 (w/w), 共に Sigma-Aldrich) を充填した 0.4 mL チューブ (アシスト、東京) に

反応液100 μ Lを分取し、10,000 \times gで30秒間室温にて遠心し反応を停止した。チューブを室温にて一晚静置し、細胞を可溶化した。その後mixture oil層を切断し、NaOH層をscintillation vialに移し、Clear-sol (ナカライテスク、京都) 2 mLを加え、液体シンチレーションカウンター(LSC-6100, Aloka Co., Ltd. 東京)にて放射活性を測定した。また、タンパク質濃度は細胞溶解液10 μ Lを用いて、Pierce[®] BCA[™] Protein Assay Kit (タカラバイオ、滋賀)を用いて測定した。³H]ETVおよび³H]TFVの細胞内取り込み速度は式[1]を用いて算出した。

式[1]

[取り込み活性 (pmol/mg protein/min)]
=[放射能 (dpm)]/[基質溶液放射能 (dpm/nmol)]/[採取量 (mL)] \times [全量 (mL)]
 \times [1000 (pmol/nmol)]/[タンパク濃度 (mg protein/mL)] \times [全量 (mL)]/[取り込み時間 (min)]

OATP安定発現HEK293細胞

OATP1B1、OATP1B3およびOATP2B1安定発現HEK293細胞(OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293およびOATP2B1/HEK293)および空ベクター導入HEK293細胞(Mock-Zeo/HEK293およびMock-Neo/HEK293)はこれまでに樹立したものをを用いた。OATP1B1/HEK293およびMock-Zeo/HEK293の培養では、Zeocin (Invivogen, Carlsbad, CA, USA)を300 μ g/mLの濃度で培地に添加し、また、OATP1B3/HEK293、OATP2B1/HEK293、およびMock-Neo/HEK293の培養ではG418 disulfate salt (Sigma-Aldrich)を400 μ g/mLの濃度で培地に添加した。これらの細胞は5% CO₂ / 95% airを気相とした37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーターで培養した。

OAT2 cDNAクローニングおよびOAT2発現プラスミドベクターの作製

ヒトOAT2、transcript variant 1 (OAT2-546aa) (GenBank accession No. NM_006672)のcDNAクローニングは、ヒト肝cDNAをテンプレートとし、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ)を用いたpolymerase chain reaction (PCR)によりおこなった。得られたPCR産物はZero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen)を用いて、pCR[®]-Blunt[®] -TOPO[®] vector (Invitrogen)へ挿入し、これをOAT2/TOPOとした。作製したプラスミドDNAの塩基配列の解析は、オペロンバイオテクノロジー (東京)に委託した。

続いて、作製したOAT2/TOPOをテンプレートとして、BamHIおよびXhoI処理をおこないOAT2/cDNAを切り出した。得られたDNA断片を、同様に制限酵素処理したpcDNA3.1/Neo(-) vector (Invitrogen)とライゲーションさせ、OAT2/pcDNA3.1を作製した。作製したプラスミドDNAの塩基配列の解析は、オペロンバイオテクノロジー (東京)に委託した。

OAT2安定発現HEK293細胞の樹立

OAT2安定発現HEK293細胞(OAT2/HEK293)は、OAT2/pcDNA3.1をreverse-transfection法によりHEK293細胞に導入し、G418 disulfate saltで薬剤選択をおこなうことにより樹立した。また、細胞単一化はコロニーフォーメーション法によりおこなった。樹立したOAT2/HEK293は、G418 disulfate saltを400 μ g/mLの濃度で添加した培地を用い、5% CO₂ / 95% airを気相とした37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーターで培養した。

OAT1 cDNA クローニングおよびOAT1発現プラスミドベクターの作製

ヒトOAT1、transcript variant 2 (GenBank accession No. NM_153276.2)のcDNAクローニングは、ヒト腎cDNAをテンプレートとし、PrimeSTAR HS DNA polymeraseを用いたPCRによりおこなった。得られたPCR産物をテンプレートとして、PrimeSTAR HS DNA polymeraseを用いてPCRをおこなうことにより、OAT1/cDNAに制限酵素配列を付加した。これをXbaIおよびBamHIで処理し、同様に制限酵素処理したpcDNA3.1/Neo(-) vectorとライゲーションさせることにより、OAT1/pcDNA3.1を作製した。作製したプラスミドは上記に述べた方法で塩基配列の解析をおこなった。

Total RNA 抽出およびcDNA合成

各細胞からのtotal RNA抽出はISOGEN with spin column (Nippon Gene, 東京)を用いてプロトコールにしたがいおこなった。Total RNA中のゲノムDNAの混入の有無は、human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子のプロモーター領域を検出するプライマーを用いたPCR反応により確認した。ゲノムDNAの混入が認められた場合にはDNaseI処理により除去した。cDNA合成はtotal RNA (1.0 μ g)をテンプレートとし、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いてプロトコールにしたがいおこなった。

Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

上記で調製したcDNAをテンプレートとし、PCR反応によりOATP1B1/HEK293におけるOATP1B1 mRNA、OATP1B3/HEK293におけるOATP1B3 mRNA、OATP2B1/HEK293におけるOATP2B1 mRNA、OAT2/HEK293におけるOAT2 mRNAを解析した。また、Mock-Zeo/HEK293およびMock-Neo/HEK293における上記トランスポーター mRNA発現、そして上記各細胞におけるGAPDH mRNAの発現を同様に解析した。

トランスポーター安定発現HEK293細胞およびHepG2細胞を用いた標準基質取り込み活性解析

各トランスポーター安定発現HEK293細胞およびHepG2細胞における基質取り込み活性は以下の方法により解析した。OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293、OATP2B1/HEK293、OAT2/HEK293、Mock-Zeo/HEK293またはMock-Neo/HEK293をそれぞれ 4.0×10^5 cells/mLで、HepG2細胞を 3.0×10^5 cells/mLで、collagen type-I (Sigma-Aldrich) でコートした24-well plateに播種した。その24時間後にsodium butyrate (Sigma-Aldrich) を最終濃度10 mMで曝露し、さらにその24時間後にtransport assayをおこなった。

Transport assayにおけるOATP1B1の基質溶液は、Na⁺-plus Krebs-Hesselei buffer (Na⁺-KHB) (pH 7.4) に³H]E₂Gおよび非標識E₂Gを溶解し、最終基質濃度0.1 μM、最終放射線濃度0.1 μCi/mLとすることにより調製した。OATP1B3の基質溶液はNa⁺-plus KHB (pH 7.4) に³H]CCK-8および非標識CCK-8を溶解し、最終基質濃度0.01 μM、最終放射線濃度0.25 μCi/mLとすることにより調製した。OATP2B1の基質溶液はNa⁺-plus KHB (pH 6.5) に³H]E3Sおよび非標識E3Sを溶解し、最終基質濃度50 μMおよび最終放射線濃度0.25 μCi/mLとすることにより調製した。OAT2の基質溶液はNa⁺-plus KHB (pH 7.4) に³H]cGMPおよび非標識cGMPを溶解し、最終基質濃度2 μMおよび最終放射線濃度0.1 μCi/mLとすることにより調製した。ENTの基質溶液はNa⁺-plus KHB (pH 7.4) に³H]Adoおよび非標識Adoを溶解し、最終基質濃度10 μMおよび最終放射線濃度0.2 μCi/mLとすることにより調製した。

阻害実験では、OATP1B1に対する典型的阻害剤としてRIFを最終阻害剤濃度10 μMの濃度で、OATP1B3およびOATP2B1に対する典型的阻害剤としてBSPを最終阻害剤濃度100 μMの濃度で、OAT2に対する典型的阻害剤としてIDMを最終阻害剤濃度100 μMの濃度で、ENTに対する典型的阻害剤としてNBMPRを最終濃度100 μMの濃度で、そしてコントロールとし

て溶媒であるDMSOを最終濃度0.1%の濃度でそれぞれ基質溶液に加えた。

Transport assayでは、細胞を37 °CのNa⁺-plus KHBで1回リンスした後、上記の基質溶液200 μLを加えて37 °Cで取り込み反応を開始した。E₂G、CCK-8、E₃S、cGMPおよびAdoの取り込み時間は、それぞれ予備検討において基質取り込み活性に線形性が認められた3、5、3、1.5および1分とした。その後、細胞を氷冷したNa⁺-plus KHBで速やかにリンスし、0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS) 加え細胞溶解液とした。細胞溶液中の放射活性は液体シンチレーションカウンター (LSC-6100) にて測定した。また、タンパク質濃度は細胞溶解液10 μLを用いて、Pierce® BCA™ Protein Assay Kitを用いて測定した。基質取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は式[1]を用いて算出した。

トランスポーター安定発現HEK293細胞およびHepG2細胞を用いたTFVおよびETV取り込み活性解析

トランスポーター安定発現HEK293細胞およびHepG2細胞におけるTFVおよびETVの取り込み活性は以下の方法により解析した。OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293、OATP2B1/HEK293、OAT2/HEK293、Mock-Zeo/HEK293またはMock-Neo/HEK293をそれぞれ 4.0×10^5 cells/mLで、またHepG2細胞を 3.0×10^5 cells/mLでcollagen type-Iでコートした24-well plateに播種した。その後、上記10で述べた方法でtransport assayをおこなった。

Transport assayでは、播種した細胞を37 °CのNa⁺-plus KHBで洗浄した後、TFVもしくはETVを含んだNa⁺-plus KHB 200 μL加えることにより反応を開始した。阻害実験では、TFVおよびETVの最終基質濃度および最終放射線濃度はともに1 μMおよび0.25 μCi/mLとし、取り込み時間は1.5分とした。阻害剤として基質溶液にRIF (10 μM)、BSP (100または200 μM)、IDM (100 μM)、NBMPR (100 μM) およびコントロールとして溶媒であるDMSO (0.1%) を加えた。インキュベーション後、細胞を氷冷したNa⁺-plus KHBで速やかにリンスし、0.2% SDSを加え細胞溶解液とした。基質取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は上記で述べた方法で算出した。

OAT1一過性発現HEK293細胞を用いたTFV取り込み活性解析

Lipofectamine™LTX (Invitrogen) 1.2 μL/well、OPTI-MEM® (Invitrogen) 125 μL/well およびOAT1/pcDNA3.1もしくは空のpcDNA3.1 500 ng/well を混合して30分間インキュベーションした。その

後、トランスフェクション溶液とHEK293細胞 (4.0×10^5 cells/mL) をよく混合して、collagen type-I でコートした24-well plateに播種した。この24時間後にsodium butyrateを最終濃度10 mMで曝露し、さらにその24時間後にtransport assayをおこなった。

Transport assayでは、播種した細胞を37 °CのNa⁺-plus KHBで洗浄した後、TFVを含んだNa⁺-plus KHB 200 μ L加えることにより反応を開始した。最終基質濃度および最終放射線濃度はともに1 μ M および0.25 μ Ci/mLとし、取り込み時間を1.5分とした。その後、細胞を氷冷したNa⁺-plus KHBで速やかにリンスし、0.2% SDSを加え細胞溶解液とした。基質取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は上記に述べた方法で算出した。

TFV曝露によるヒト肝細胞mRNA発現変動解析

ヒト肝細胞の調製および播種

単一ドナー由来の白人種凍結肝細胞の融解はプロトコール通りにおこなった。その後、37 °Cに加熱し2% FBSを加えたHepatocyte Culture Medium (HCM, Lonza, Walkersville, MD, USA) に懸濁した肝細胞を遠沈管に移し、50 \times g、室温で3分間遠心分離した。上清を取り除き、沈殿した細胞を2% FBSを加えたHCMで懸濁した。Trypan blue染色で生存率が80%以上あること確認し、これをヒト肝細胞とした。作製したヒト肝細胞をcollagen type-I でコートした12-well plateに 3.0×10^5 cells/mLの細胞濃度で播種した。播種から3時間後、培地を除去し、HCMを用いて培地交換をおこなった。

薬剤曝露時のtotal RNA回収およびcDNAの作製

細胞播種から24時間後に培地を除去し、TFV (10 μ M) または溶媒であるDMSO (0.1%) を含むHCMを添加した。各薬剤曝露後、24時間後に上記で述べた方法でtotal RNAを回収し、回収したtotal RNA (10 ~ 100 ng) をテンプレートとしてcDNA合成をおこなった。

定量的real-time PCR

ヒト肝細胞における各遺伝子の発現量は、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS, Boston, MA, USA) およびEcoTM Illumina real-time PCR system (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いたreal-time PCR法により解析した。ここではCC chemokine ligand (CCL) 3, CCL5, interleukin-8 (IL-8) interferon stimulated gene 15 (ISG15)

myxovirus resistance protein 1 (MxA) および toll-like receptor 3 (TLR3) を解析対象とし、プライマーは各遺伝子特異的に設計した。PCR条件は95 °C 20秒の後、95 °C 3秒、60 °C 20秒、72 °C 1秒を40サイクル繰り返した。Ct法を用いた相対定量法では、各遺伝子と同様の条件で、特異的に設計したプライマーを用いて定量したGAPDHおよび β -actin (ACTB) mRNA発現量を用いて解析した。

統計解析

二群間における平均値の差の検定はStudent's t-testによりおこなった。統計計算にはExcel統計ソフトStatcel第3版 (東京) を使用した。

倫理面への配慮

本研究におけるヒト肝由来試料の使用については事前に千葉大学大学院薬学研究院倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

ヒト肝細胞におけるETVおよびTFV取り込みの解析

白人種5検体混合凍結肝細胞を用いて、ETVの肝細胞内取り込みを解析した。その結果、ETV (1 μ M) の取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は37 °Cにおいて 6.3 ± 0.7 と、4 °Cにおける値 (2.8 ± 0.5) と比較して有意に高く、トランスポーターを介すると考えられるETVの肝細胞内取り込みが認められた。また、100 μ M NBMPRおよび200 μ M BSP存在下でETV取り込み活性を解析した結果、ETV肝細胞内取り込み活性は37 °Cの値と比較して、NBMPR添加により有意に低下し (4.0 ± 1.1)、またBSP添加により4 °Cと同等の値 (2.7 ± 0.7) まで有意に低下した。

一方、同様にTFVの肝細胞内取り込みを解析した結果、TFV (1 μ M) の取り込み活性 (pmol/mg protein/min) は37 °Cにおいて 3.5 ± 0.4 であり4 °Cにおける値 (2.3 ± 0.3) より有意であるが、わずかに高い程度であった。また、100 μ M NBMPRおよび200 μ M BSP存在下でTFV取り込み活性を解析した結果、TFV肝細胞内取り込み活性はそれぞれ4 °Cに近い値 (2.7 ± 0.2 および 2.7 ± 0.4) にまで低下した。

肝細胞内取り込みトランスポーター安定発現HEK293細胞における各トランスポーターの発現および機能解析

ヒト肝細胞を用いた検討において、BSPの存在下ETVの肝細胞内取り込みが消失したことから、BSP感受性の肝取り込みトランスポーターがETVの肝取り込みに関わっていると考えられる。BSP感受性の代表的な肝取り込みトランスポーターとしてこれまでにOATP1B1、OATP1B3、OATP2B1およびOAT2が同定されている。そこでこれらトランスポーターに着目した。

OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293およびOATP2B1/HEK293、および本研究で樹立したOAT2/HEK293を用い、まずこれらにおける各トランスポーターの発現を確認した。それぞれの細胞より調製したcDNAを用いて、各トランスポーターおよびGAPDH mRNA発現をRT-PCR法により解析した。その結果、OATP1B1/HEK293においてOATP1B1 mRNA発現が、OATP1B3/HEK293においてOATP1B3 mRNA発現が、OATP2B1/HEK293においてOATP2B1 mRNA発現が、そしてOAT2/HEK293においてOAT2 mRNA発現が認められた。一方、Mock-(ZeoまたはNeo)/HEK293においてはいずれのトランスポーターのmRNA発現も認められず、また全ての細胞においてGAPDH mRNA発現が認められた。

次に、OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293、OATP2B1/HEK293およびOAT2/HEK293における各トランスポーターの取り込み活性を、それぞれの典型的基質であるE₂G(0.1 μM)、CCK-8(0.01 μM)、E3S(50 μM)およびcGMP(2 μM)を用いて解析した。その結果、いずれの細胞においても基質取り込み活性はMock-(ZeoまたはNeo)/HEK293よりも高く、それらトランスポーターを介した活性は各トランスポーターの典型的阻害剤の存在下、完全に消失した。

トランスポーター安定発現HEK293細胞におけるETV取り込み輸送の解析

上述の肝取り込みトランスポーター安定発現HEK293細胞を用いて、各トランスポーターによるETVの取り込み活性を解析した。その結果、OAT2/HEK293におけるETV取り込み活性値(pmol/mg protein/min)は、14.6 ± 1.5と、Mock-Neo/HEK293の4.3 ± 1.2よりも有意に高く、このOAT2を介したETV取り込み活性は200 μM BSPの存在下で完全に消失した(4.7 ± 2.3)。一方、OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293およびOATP2B1/HEK293における解析では、これらトランスポーターを介したETV取り込みは認められなかった。

NBMPR感受性ETV取り込み機序の探索

ヒト肝細胞を用いた検討では、NBMPRにより部分

的なETV肝細胞内取り込み阻害が認められた。これまでに代表的なNBMPR感受性のトランスポーターとして核酸トランスポーターであるENT1およびENT2が知られているが、NBMPRのOAT2に対する阻害作用は不明である。そこでまずENT1およびENT2を発現するHepG2細胞を用いてETVの取り込みにおけるこれらトランスポーターの関与を解析した。その結果、HepG2細胞においてNBMPR感受性のAdoの取り込み活性は認められたのに対し、NBMPR感受性のETV取り込み活性は認められなかった。そこで次にOAT2/HEK293を用いて、OAT2を介したETV取り込みにNBMPRが及ぼす影響を解析した。その結果、NBMPR添加によりOAT2を介したETVの取り込み活性は完全に消失した。このことからETVはENT1およびENT2の基質ではなく、ヒト肝細胞において認められたNBMPR感受性ETV取り込みはOAT2によるものであることが明らかとなった。

肝取り込みトランスポーターによるTFV取り込み輸送の解析

ヒト肝細胞を用いた検討では、TFVにおいても小さいながらNBMPRおよびBSP感受性の取り込みが認められたことから、ETVと同様に、BSP感受性トランスポーター安定発現HEK293細胞およびHepG2細胞を用いて、各トランスポーターによるTFVの取り込み活性を解析した。その結果、いずれのトランスポーターによる取り込みも認められず、またENTによりTFV取り込みも認められなかった。一方、取り込み実験のコントロールとしてTFVを基質とすることが報告されているOAT1を用いて一過性取り込み実験をおこなったところ、そのTFV取り込み活性値(pmol/mg protein/min)は、10.1 ± 2.2と、空ベクター導入HEK293細胞の2.0 ± 1.6よりも高くOAT1を介したTFV取り込みが認められた。

ヒト肝細胞における各遺伝子発現量に及ぼすTFV暴露の影響

TFVは直接的な抗ウイルス作用に加え、肝細胞において抗ウイルス活性に関わる遺伝子の発現を変動させる作用を有する可能性も考えられる。そこで、TFV(10 μM)をヒト肝細胞に曝露し、CCL3、CCL5、IL-8、ISG15、MxAおよびTLR3 mRNAの発現量を解析した。その結果、ヒト肝細胞におけるCCL3 mRNA発現量はコントロールと比較して、8.7倍(n=2)まで上昇した。一方、他の遺伝子(CCL5、IL-8、ISG15、MxAおよびTLR3)については顕著なmRNA発現変動は認められなかった。

D. 考察

本研究の結果、OAT2はETVのヒト肝細胞内取り込みトランスポーターであることが明らかとなった。OAT2はSLC22A7遺伝子にコードされる12回膜貫通型のトランスポーターであり、幅広い基質認識性を示し、cGMP、p-アミノ馬尿酸およびプロスタグランジンE2などの内因性物質を基質とすることが知られている。またOAT2はアシクロビルやガンシクロビルといった抗ウイルス薬を基質とすることも報告されている。これら抗ウイルス薬とETVの構造的特徴を比べてみると、グアニン骨格を有している点で類似しており、ETVはこれら薬剤と同様の基質結合部位を介してOAT2により輸送されると考えられる。

これまで、OAT2は種々の臓器の中でも肝臓に特に高く発現していることが報告されている。また、肝臓においてはOAT2は類洞膜側に局在することが知られている。したがってETVはOAT2の基質となることで肝臓に効率的に取り込まれると考えられ、このことはETVがB型肝炎治療薬として高い薬効を示す理由の一端を説明する可能性があると考えられる。

さらに、ETV取り込み量が変動すると、それに伴いETVの肝細胞内濃度も変動することが考えられることから、OAT2の機能や発現量の変動はETV薬効発現にも影響を及ぼす可能性がある。これまでにこのような肝取り込みトランスポーターの発現や機能が薬効に影響を及ぼす例として、C型肝炎治療薬リバビリンがある。リバビリンはENT1を介して細胞内に取り込まれることが知られており、ENT1による細胞内取り込み活性が変動すると、それに伴って細胞内リバビリン濃度が変動し、さらにその薬効も変動することが、C型肝炎ウイルス複製モデル細胞を用いた検討から明らかとなっている。したがってENT1によるリバビリン取り込みの様に、OAT2によるETV取り込み活性がその薬効発現を規定しうる役割を担う可能性が考えられる。

しかしながら、本研究の結果のみでは肝細胞においてOAT2以外にもETV肝取り込みに関与し、その薬効発現を規定しうるトランスポーターが存在する可能性は否定できない。これまでにBSP感受性の肝取り込みトランスポーターとして、本検討で着目したトランスポーターの他に、OATP1A2、OAT7およびsodium/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)が報告されており、これらトランスポーターはいずれも肝臓に高く発現し、広い基質認識性を有すると考えられている。しかしながら、これまでにこれらトランスポーターが核酸アナログやグアニン骨格を有する化合物を基質としたとする報告はなく、現時点においてこれらがETVを基質とする可能性については不明である。

さらに、上記以外にも肝細胞においてBSPに感受性を有する肝取り込みトランスポーターが存在する可能性もある。したがって、上記可能性を全て考慮して、OAT2以外のETV肝取り込みトランスポーターの有無を明らかとし、これにより、ETV肝細胞取り込みという観点からその薬効発現に最も寄与するトランスポーターを明らかとする必要がある。

今後、上記のような検討により、OAT2（およびその他ETV肝取り込みトランスポーター）がETV薬効発現規定因子として確立すれば、その機能や発現量を変動させる宿主因子を同定することにつながり、さらにそれらから薬効発現の個人差の一端を説明しうる因子の同定へとつながるかもしれない。

一方、TFVに関しては、その肝細胞内取り込みには寄与が小さいながらもトランスポーターが関与している可能性があるが、本研究ではそのトランスポーターを明らかとすることはできなかった。しかし、TFVはOAT2の基質とならなかったことから、少なくともTFVはETVとは異なる機序で肝細胞内へ取り込まれると考えられる。ヒト肝細胞を用いた検討では、トランスポーターを介したTFV取り込みはETVと同様にBSP添加により低下したことから、BSP感受性の肝取り込みトランスポーターがTFVの肝取り込みに関わっている可能性がある。今後、この特徴を手がかりとしてTFVの肝細胞内取り込み機構に関してさらなる研究を進めていく必要があると考えられる。

また、本研究では上述のような肝取り込み機構とは異なる遺伝子発現変動の視点からTFVの薬効関連因子の探索をおこない、ヒト肝細胞においてTFVによりCCL3 mRNAの発現量が上昇することを初めて見出した。これまで、ヒト末梢血単核細胞においてTFV曝露によりCCL3分泌量が増加すること、およびマウスマクロファージにおいてTFV曝露によりCCL3分泌量が濃度依存的増加することが報告されている。CCL3に関して、これまでCCL3が様々なウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことが複数報告されている。例えば、詳細な作用機序は不明だが、CD8⁺ T細胞から分泌されたCCL3がHIV複製を阻害する作用を有することが明らかとなっている。また、機序は明らかとなっていないが、CCL3ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して、パラミクソウイルス感染5日後におけるウイルス増殖量が高いことが明らかとなっている。さらに、単純ヘルペスウイルスを用いた検討において、CCL3がウイルス粒子のglycoprotein Bに結合することで、エンベロープにポアを作り、抗ウイルス活性を示すことも明らかとなっている。このように、CCL3が様々なウイルスの増殖および複製を抑制する作用を有することが明らかとなっている。

したがってHBVに関してもCCL3は何らかの作用機序により、抗HBV活性を示す可能性が考えられる。今後CCL3のHBV複製に対する作用を明らかとしていくことにより、TFVの新たな抗ウイルス作用発現機序解明の糸口が見出されるかもしれない。

E . 結論

本研究よりETVはOAT2を介して肝細胞内に取り込まれることが明らかとなった。今後、OAT2のETV肝細胞内取り込みにおける寄与を明らかとしつつ、その薬効発現における役割を詳細に明らかとしていく必要があると考えられる。一方、TFVの肝細胞内取り込みに関して、本検討ではTFVの肝取り込みトランスポーターを同定することができなかったが、TFVはヒト肝細胞においてCCL3 mRNA発現量を上昇させることを明らかとした。したがって、今後TFV取り込み機構のさらなる検討を進めるとともに、TFV薬効発現におけるCCL3遺伝子の役割を明らかとしていく必要があると考えられる。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

1. 論文発表

Furihata T, Fu Z, Suzuki Y, Matsumoto S, Morio H, Tsubota A, Matsumoto S, Chiba K. Differential inhibition features of direct acting anti-hepatitis C virus agents against human organic anion transporting polypeptide 2B1. *Int J Antimicrob Agents*. 2015, in press.

Furihata T, Matsumoto S, Fu Z, Tsubota A, Sun Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chiba K. Different interaction profiles of direct-acting anti-hepatitis C virus agents with human organic anion transporting polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:4555-64.

Panigrahi R, Chandra PK, Ferraris P, Kurt R, Song K, Garry RF, Reiss K, Coe IR, Furihata T, Balart LA, Wu T, Dash S. Persistent hepatitis C virus infection impairs ribavirin antiviral

activity through clathrin-mediated trafficking of equilibrative nucleoside transporter 1. *J Virol*. 2015;89:626-42.

2. 学会発表

森尾花恵, 降幡知巳, 付中国, 鈴木雄基, 松本涉吾, 坪田昭人, 千葉寛. 新規直接型C型肝炎治療薬の小腸organic anion transporting polypeptide 2B1阻害プロファイル (神戸、2015年3月)

Suzuki Y, Furihata T, Fu Z, Matsumoto S, Tsubota A, Sun Y, Morio H, Chiba K. Identification of simeprevir and asunaprevir as unique OATP inhibitors with long-lasting properties. 19th North American regional ISSX meeting/29th JSSX annual meeting (San Francisco, USA Oct. 2014)

付中国, 降幡知巳, 松本涉吾, 坪田昭人, 孫雨晨, 鈴木雄基, 森尾花恵, 千葉寛. 新規直接作用型C型肝炎治療薬のOrganic anion transporting polypeptide 1B1/1B3阻害プロファイル 第9回トランスポーター研究会 (名古屋、2014年6月)

Panigrahi R, Chandra PK, Ferraris P, Kurt R, Garry RF, Balart LA, Coe I, Furihata T, Wu T, Dash S. Persistently infected HCV cell culture impairs RBV antiviral activity through clathrin mediated trafficking of ENT1. 2014 AASLD Annual Meeting (Boston)

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし