

研究課題「蛋白質輸送を規定する細胞極性形成メカニズム解析」 テトラヒドロピリミジン系薬の新たな中枢神経作用点の同定

奥田隆志、三澤日出巳（薬理学講座）

コリン作動性神経は末梢だけではなく中枢神経系にも存在し、運動、学習・記憶、睡眠・覚醒など多くの重要な生理機能に関与する。アルツハイマー病などの認知症患者脳では前脳基底部から大脳皮質などの広範な領域に投射するコリン作動性神経の変性・脱落が顕著であり、認知機能障害の原因となることで知られる。本邦で現在唯一認可されているアルツハイマー病治療薬はコリン作動性神経賦活作用をもつコリンエステラーゼ阻害剤ドネペジルのみであり、しかも有効な患者の割合と効果持続時間は限定的である。ドネペジルとは作用点の異なる新たなコリン作動性神経賦活薬に対する医学的・社会的要請は強い。

コリン作動性神経末端には特異的に高親和性コリン取り込み系が存在し、細胞外からのコリン取り込みを行うことでアセチルコリン合成に必須な前駆体供給の役割を果たす。コリン取り込みはアセチルコリン合成の律速段階であるため、高親和性コリン取り込み系を担うコリントランスポーターはコリン作動性神経における重要な機能素子であると考えられてきた。この実体は長らく謎であったが、2000年に我々は世界に先駆けて高親和性コリントランスポーター（CHT1）をクローニングすることに成功してその分子実体を明らかにした（Okuda et al., *Nature Neurosci.*, 2000）。また、中枢神経系における免疫組織化学的解析により CHT1 がコリン作動性神経に特異的に局在することを初めて明らかにした（Misawa et al., *Neuroscience*, 2001）。CHT1 はアセチルコリン合成・放出の制御に極めて重要な役割を果たすとともに、アルツハイマー病などの認知症やその他のコリン作動性神経変性疾患に対する創薬に向けての新しい標的でもある。

最近我々は CHT1 の機能調節機構に関する研究の過程で、培養細胞系での CHT1 の細胞内移行が基質であるコリンによって促進されるとともに自身の阻害剤に感受性を示すことを見出した（奥田ら、薬理学会年会発表、2009）。培養細胞強制発現系、前脳基底部初代培養神経細胞、脳シナプトソーム画分いずれの系においても、CHT1 の細胞内移行は阻害剤であるヘミコリニウム-3（HC-3）によって阻害され、結果的に細胞表面の発現量が増大する。この CHT1 の機能的特性を利用して細胞内移行の阻害活性を指標とした新たなコリントランスポーター阻害剤評価系を構築した。培養細胞系におけるリガンド結合実験を基にしたこの評価系におけるスクリーニングにより、約千種類の化合物ライブラリーの阻害剤の探索を行った結果、テトラヒドロピリミジン系薬の強力かつ競合的な高親和性コリン取り込み阻害作用を見出したことを報告する。

最初に我々は 293 細胞におけるヒト CHT1 遺伝子の安定的高発現細胞株 (293-hCHT1) を樹立し、親水性の CHT1 リガンドである HC-3 を用いてインタクト細胞での $[^3\text{H}]\text{HC-3}$ 結合実験の条件検討を行った。特異的 HC-3 結合活性により細胞表面 CHT1 発現量を評価できることを利用して 293-hCHT1 細胞における hCHT1 の細胞内移行を解析し、その阻害活性を指標とした化合物スクリーニングが実現可能であることを明らかにした上で、市販化合物ライブラリー (1040 種類) のスクリーニングを行った。HC-3 を陽性対照として化合物 (50 μM) を一種類ずつスクリーニングした結果、最も強力に hCHT1 の細胞内移行を阻害する化合物の一つとしてモランテルを見出した。モランテルは、濃度・処理時間依存的に細胞内移行を阻害し (IC_{50} : 2 μM)、結果的に hCHT1 の細胞表面発現量を約 2 倍に増大させた。高親和性コリン取り込み阻害作用について調べたところ、293-hCHT1 細胞における $[^3\text{H}]\text{コリン}$ 取り込み活性を特異的に阻害した (K_i : 3 μM)。モランテル (5 μM) 存在下での $[^3\text{H}]\text{コリン}$ 取り込み活性の反応速度論的解析を行ったところ、 V_{max} 値に変化はなく K_m 値のみ 2.5 倍増加したため、阻害様式は競合的であると考えられる。また、コリン取り込み活性だけではなく、特異的 HC-3 結合活性も競合的に阻害した (K_i : 10 μM)。モランテルと同様にテトラヒドロピリミジン骨格を有するピランテル、オキササンテルについても解析したところ、同様のコリン取り込み活性阻害作用が観察された (K_i : 10-20 μM)。これらの化合物はラット脳から調製されたシナプトソーム画分の高親和性コリン取り込み活性も競合的に阻害した。これらテトラヒドロピリミジン系薬は古くから駆虫薬として知られ、線虫などの神経筋接合部におけるニコチン性アセチルコリン受容体に作用して脱分極性神経筋遮断により痙攣性麻痺を引き起こすと考えられている。線虫 *C. elegans* における CHT1 オーソログである CHO-1 についても安定的高発現細胞株 (293-CHO-1) を樹立してコリン取り込みを解析したところ、これらの薬は CHT1 と同様にコリン取り込み活性を競合的に阻害した (K_i : 2 μM)。なお、同じくニコチン性アセチルコリン受容体を標的とする駆虫薬であるイミダゾチアゾール系化合物のレバミゾールでは以上のような阻害作用は観察されなかった。これらの結果から、テトラヒドロピリミジン系薬 (モランテル、ピランテル、オキササンテル) は線虫から哺乳類に至るまでコリン作動性神経末端における高親和性コリン取り込みを特異的かつ競合的に阻害し、アセチルコリン合成抑制という従来想定されていなかった新たな作用機序をもつと考えられる。

シグナル伝達分子を標的としたがん細胞の増殖抑制機構の解析

生化学講座 笠原 忠、園田 よし子、多胡 めぐみ

【研究の目的】 チロシンキナーゼ JAK2 は様々なサイトカインシグナルにおいて中心的な役割を担い、その制御機構の破綻が多くの疾患の原因と成り得ることが知られている。2005 年に、真性赤血球増加症 (*polycythemia vera*) の患者遺伝子より JAK2 点変異体 (V617F) が見出された。これまでに私達は、同変異体の過剰発現が血球細胞の無秩序な異常増殖を引き起こし、腫瘍形成を誘導することを明らかにしてきた。さらに、JAK2V617F 変異体発現細胞において、細胞増殖・生存に関わるキナーゼである ERK、Akt および転写因子である STAT5 の恒常的な活性化が誘導されることを見出している。本研究では、JAK2V617F 変異体により誘導される細胞増殖および腫瘍形成に及ぼす STAT5 の影響を検討した。また、近年、小児急性白血病患者において、JAK2 の点変異 (L611S) が同定された。V617 に近傍であることから、その変異が JAK2 の活性に影響を与える可能性があると考え、JAK2 L611S 変異体のシグナル伝達機構および生理機能を解析した。本研究を通し、疾患に関連した JAK2 変異体のシグナル伝達機構を解明することにより、最終的には、シグナル分子を標的とした新しい治療法あるいは予防法の開発をめざす。

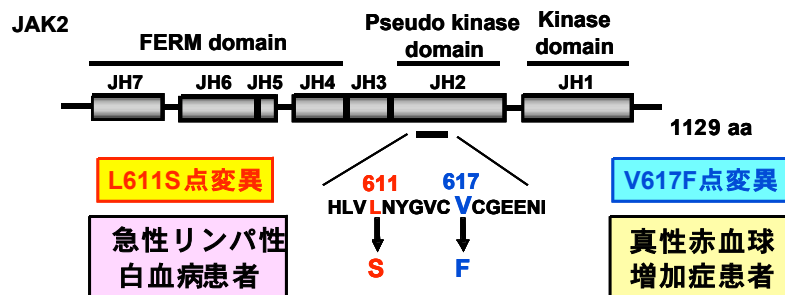


図1 JAK2 の構造と点変異

【方法】

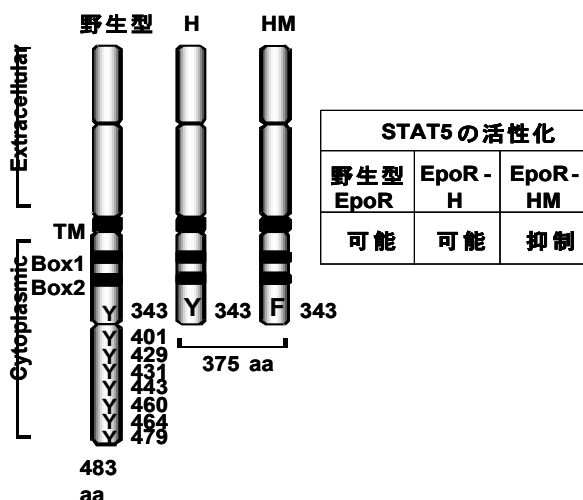
- ① 細胞: マウス BaF3 細胞に空ベクター、野生型 JAK2 および JAK2 変異体 (V617F) (L611S) に、野生型 Epo 受容体 (EpoR)、Epo 受容体欠損変異体 (EpoR-H) あるいは STAT5 の結合に必要な 343 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した Y343F 変異を有する Epo 受容体欠損変異体 (EpoR-HM) をレトロウイルスにより発現させた細胞株を樹立した。
- ② 細胞死の検討: トリパンブルー染色法により細胞生存率を測定した。DNA ラダーの検出および細胞周期の解析によりアポトーシス誘導能を検討した。
- ③ 腫瘍形成能の検討: 各細胞株 (1×10^7 cells) をヌードマウスに皮下投与により移植し、腫瘍形成能を検討した。細胞投与から 10 日間、JAK2 阻害剤 AG490 (500 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$) をマウスに腹腔内注射により投与した。
- ④ DNA アレイ法: EpoR と共に、野生型 JAK2 あるいは JAK2 V617 変異体を発現した BaF3 細胞株間での遺伝子発現の差異を DNA アレイ法により解析した。また、JAK2 V617 変異体と共に、EpoR-H あるいは EpoR-HM を発現した BaF3 細胞間で DNA アレイ (東レ、3D-Gene) を行った。

【結果・考察】

- ① JAK2 V617F 変異体による Epo 非依存的細胞増殖、抗アポトーシス作用、ヌードマウスにおける腫瘍形成には、EpoR との共発現が必要であった。
- ② 細胞内ドメインを 108 アミノ酸欠失した EpoR-H との共発現により、JAK2 V617F 変異体は、Epo 非依存的細胞増殖、抗アポトーシス作用および腫瘍形成能を示した。一方、Y343F 変異により STAT5 の活性化を阻害した EpoR-HM との共発現では、JAK2 V617F 変異体の作用は顕著に抑制された。
- ③ EpoR-HM と JAK2 V617F 変異体を発現した細胞に、恒常的な活性化型 STAT5 (STAT5 1*6) を導入すると、Epo 非依存的細胞増殖および腫瘍形成能が観察された。
- ④ 野生型 JAK2 発現細胞と比較して、JAK2V617F 変異体発現細胞では、STAT5 依存的に、SOCS1, CIS だけでなく、癌原遺伝子である Pim 1, Pim 2, Myc およびアポトーシス制御因子である Bcl-2 の発現が増強していた。
- ⑤ JAK2 L611S 変異体は恒常的な活性化型を示し、JAK2 V617F 変異体と同様に、Epo 非依存的細胞増殖、抗アポトーシス作用および腫瘍形成を誘導した。JAK2 阻害剤 AG490 の投与により、JAK2 L611S 変異体による腫瘍形成は有意に抑制され、移植マウスの生存期間は延長した。

以上の結果より、JAK2 V617F 変異体による異常な細胞増殖および腫瘍形成に、STAT5 の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかになった。STAT5 の標的遺伝子が、JAK2 V617F 変異体の下流シグナルの実行因子である可能性が示唆され、今後、shRNA を用いたノックダウン法により、各分子の機能を明確にしていきたいと考えている。また、V617F 変異だけでなく、L611S 変異もまた、JAK2 の恒常的な活性化を誘導することが明らかになり、JAK2 の限られた領域 (JH2 ドメイン) が活性制御に大きく寄与することが考えられ、今後、JAK2 の活性制御機構の解明に繋がると期待される。

A. EpoR変異体の構造とSTAT5活性化



B. ノードマウスにおける腫瘍形成

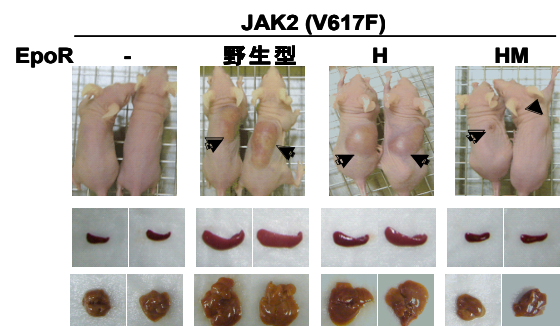


図 2 腫瘍形成に及ぼす STAT5 の役割

薬物動態に関与するトランスポーターを介した相互作用解明

薬剤学講座

西村友宏、登美斉俊、崔 吉道、中島恵美

胎盤、脳、網膜、精巣など血液組織関門を形成する組織においてはトランスポーターにより生体物質および薬物の移行が厳密に制御されている。胎盤は母体から胎児への栄養物の供給を制御し、また母体中の異物の胎児への暴露を防ぎ、胎児中の不要物質を回収する等の機能を持つ重要な器官である。しかしながら胎盤におけるこれら物質輸送の機構は充分には解析されていない。妊婦における薬物治療では薬物およびその代謝物等の胎児移行により胎児毒性が発現することが心配される。胎盤におけるトランスポーターの薬物との相互作用および機能の制御機構は、薬物治療および毒性の個人内・個人間での変動要因として重要な可能性がある。

1) 核酸系抗ウイルス薬の胎盤透過機構

妊婦における抗 HIV 治療においてジドブジン(AZT)は同類薬であるジダノシン(ddI)と比較して強い胎児毒性を示すが、母体における毒性は ddI の方が強い。我々はこの原因として AZT の母体-胎児血中濃度比は ddI に比べ顕著に高いことに着目した。すなわち、AZT は母体血に比べ胎児血中に濃縮的に移行するのに対し、ddI の胎児移行性は限定的である。そこで、AZT が ddI に比べ速い胎盤透過性が母体-血中濃度比の差をとり、結果的に強い毒性発現を示すとの仮説を立て検証した。ラット胎盤への $[^3\text{H}]$ AZT および $[^3\text{H}]$ ddI の取り込み輸送クリアランスは AZT が ddI に比べ顕著に高く、また AZT の取り込み輸送は飽和性であったことから、AZT を選択的に輸送するトランスポーターが胎盤において機能すると考えられた。ラット血液胎盤関門モデル細胞株 TR-TBT18d-1 においても AZT は ddI と比較して顕著に取り込まれ、高活性なトランスポーターが機能していることが示された。一方、ddI の取り込み輸送には ENT2 が一部関与していることが示された。現在、AZT の取り込み輸送に関与するトランスポーターの同定中である。

2) DHEAS による AZT の取り込み輸送促進作用

硫酸抱合エストロゲンである DHEAS が TR-TBT18d-1 細胞において AZT の取り込み輸送を促進する作用に我々は着目した。AZT の薬理標的部位である CD4(+)T リンパ細胞において AZT の移行を促進することで新規の抗 HIV 治療法の開発につながる。そこでモデル細胞として Molt-4 細胞を用いて、AZT の取り込み輸送に及ぼす促進剤の影響を調べた。AZT は Molt-4 細胞においても飽和性を示し、主にトランスポーターを介して取り込まれることが示された。さらに DHEAS によりトランスポーターの親和性を改善することにより、取り込み促進効果が得られた。AZT は細胞内において thymidine と拮抗して逆転写酵素の基質となることでその効果を発揮するため、促進剤の thymidine 取り込みへの影響も重要である。そこで DHEAS による thymidine 取り込みの影響を検討したところ、むしろ thymidine 取り込みは抑制された。このことは DHEAS

添加により、AZT の取り込み上昇と thymidine の取り込み減少を同時に達成し、AZT の薬理効果が改善される可能性を示唆している。

3) Ezrin の胎盤の生理機能に及ぼす影響

Ezrin は ERM(Ezrin/Radixin/Moesin)ファミリーに属するアダプタータンパク質であり、細胞骨格である β -actin と細胞質および細胞膜タンパクを結合する作用がある。我々は ezrin KO マウス胎児の成長が野生型マウスに比べて遅いことに着目し、胎盤における ezrin が栄養物輸送に関与するかを検討した。胎盤においては ezrin が radixin および moesin よりも転写レベルで高い発現をしており、またその発現は妊娠中期において最も高い。Ezrin が関与する栄養物輸送を解明するため、胎児血のメタボローム解析により生理的代謝物の一斉分析を行った。その結果、一般的に胎児成長に関与するとされるアミノ酸類には顕著な変化は認められなかった。一方、hypotaurine が ezrin KO マウスにおいて顕著に減少していることが見出された。hypotaurine の胎盤における生理作用の詳細は未解明であるが、我々はこれまでに少なくとも taurine が胎盤においてストレス保護作用があることを見出している。hypotaurine は taurine よりも強い抗酸化作用を有しており、hypotaurine 減少が ezrin KO マウスの成長遅延の原因であると考え、現在胎盤における hypotaurine 輸送機構と ezrin による影響を検討中である。

4) エリスロマイシンの胎盤低透過性のメカニズム

エリスロマイシンは血液胎盤関門の透過性が低く、他の臓器に比べて胎児への移行性は低い。しかしながら血液胎盤関門において薬物の排出輸送に主に関与する排出トランスポーターである P-gp および BCRP はエリスロマイシンを輸送しない。したがって、新規の排出輸送機構が胎盤に存在し、エリスロマイシン排出輸送に関与すると考えられた。胎盤の流入する胎児血側から母体血側への輸送は飽和性を示し、トランスポーターの関与が示唆された。また胎盤より刷子縁膜小胞を調製し、エリスロマイシン輸送を検討したところ、プロトンとの交換輸送が存在することが示された。これまでにプロトンとの交換輸送が胎盤関門機能を担っているとの報告はない。今後はこの排出輸送の分子機構を解明することでエリスロマイシンの移行制限機構を解明したい。

以上により、各種薬物、栄養物の胎盤におけるトランスポーターを介した動態およびその制御機構の解明を進めている。また一部にはトランスポーターを利用した組織送達を検討し、薬理効果の改善、副作用の低減を目指した成果を示している。これらの結果は博士前期および後期の学生により積極的に遂行され、国内外での学会発表や、国際英文雑誌に公表する等、優れた人材が育っている。今後はさらに多様な薬物にも応用するとともに、これまでの成果をより深化させ、胎盤における薬物輸送の分子機構の全体像を明らかにしていきたい。

消化管での薬物代謝酵素・薬物輸送担体機能に対する機能性食品（ビタミン，プロバイオティクスなど）の影響

衛生化学講座 清水美貴子，田村悦臣

近年，数多くのいわゆる「健康食品」（サプリメント）が市場に出回り，「健康志向」の高まりは一種の社会現象となっているが，「健康食品」の安全性の評価については必ずしも十分に確立しているとは言えない．特に，「健康食品」を何らかの疾病（特に病名が定まっていない場合が多い）の改善・治療の目的で飲食する人は，他に医薬品を摂取している場合が多く，併用する医薬品に対する食品成分の影響が問題となってくる．事実，食品成分が薬物代謝酵素やトランスポーターの機能に影響を与え，薬効や副作用に影響を及ぼす事例が知られ，適正な医薬品の使用にとって大きな問題となっている．そのような背景のもと，本講座では消化管に存在する薬物代謝酵素群やトランスポーターの機能およびその遺伝子発現に対する飲料（果汁，緑茶，コーヒー，ハーブ等）や機能性食品（乳酸菌，ビタミン等）の影響を調べ，医薬品の使用に際しての安全性を評価することを目的として研究を進めている．今回のオープン・リサーチでは，ヒト消化管モデルとして Caco-2 細胞，食品成分として，抗酸化作用を持ち果汁やサプリメントとして多用されるビタミン C と乳酸菌 *L.casei* に着目し，Caco-2 細胞の薬物代謝に対する効果について研究を推進している．

20 年度は，ビタミン C による Caco-2 細胞における抱合反応の阻害のメカニズムについて解析を行った．また，乳酸菌については，昨年度 Caco-2 細胞で認められた *L.casei* による抱合活性阻害効果を *in vivo* で検証し，さらに，発がん物質の解毒に関与することが知られている CYP1A/1B の活性に対する *L.casei* の影響について検討した．

【方法】

① ビタミン C(VC)の効果

Caco-2 細胞は 10%血清を含む MEM 培地で 3 週間培養した．通常培養した Caco-2 細胞および VC により 24 時間処理した Caco-2 細胞からミクロソーム及びサイトゾルを調製し，*in vitro* における UGT および SULT 活性を測定し，さらに，VC の影響を調べた．さらに，UGT および SULT 遺伝子の発現を real-time PCR にて測定した．

② 乳酸菌の効果

(1) 抱合活性に対する影響

一晩絶食させた 8 週齢 SD 系雄性ラットに，Pentobarbital 麻酔下，*L.casei* の十二指腸投与 (2×10^9 CFU/kg) および AP (20 mg/kg) の静脈内投与，十二指腸投与または門脈内投与を行った．血漿中の AP，AP-glucuronide (AG) および AP-Sulphate (AS) 濃度の時間推移を HPLC にて定量した．

(2) CYP1A/1B に対する影響

3 週間培養した Caco-2 細胞に *L.casei* ($10^6 \sim 10^9$ CFU/mL) の培養液を 24~96 時間暴露し，real-time PCR にて CYP1A1 および 1B1 遺伝子発現，EROD 活性測定にて CYP1A 活性を測定した．

【結果と考察】

① ビタミン C の効果

Caco-2 細胞より調製した UGT 活性に対し，*in vitro* では VC は弱い阻害を示した ($IC_{50}=100$ mM)．一

方, SULT 活性に対しては阻害効果は見られなかった. しかし, VC で細胞を 24 時間処理すると, 細胞内の UGT 活性は 25 mM VC で約 14 倍に増加し, また, SULT 活性は 50 mM VC で 1/3 に低下した. VC 処理細胞の UGT および SULT 遺伝子の発現を調べたところ, UGT1 ファミリー遺伝子の発現はすべて上昇し, また, SULT1A1, SULT1A3 遺伝子の発現は抑制されていた (図 1). 以上のことから, VC により細胞内の UGT 活性は増加するが, VC が共存するとグルクロン酸抱合反応は見かけ上阻害されること, また, 硫酸抱合阻害は VC による SULT 遺伝子発現の抑制により起きている可能性が示唆された.

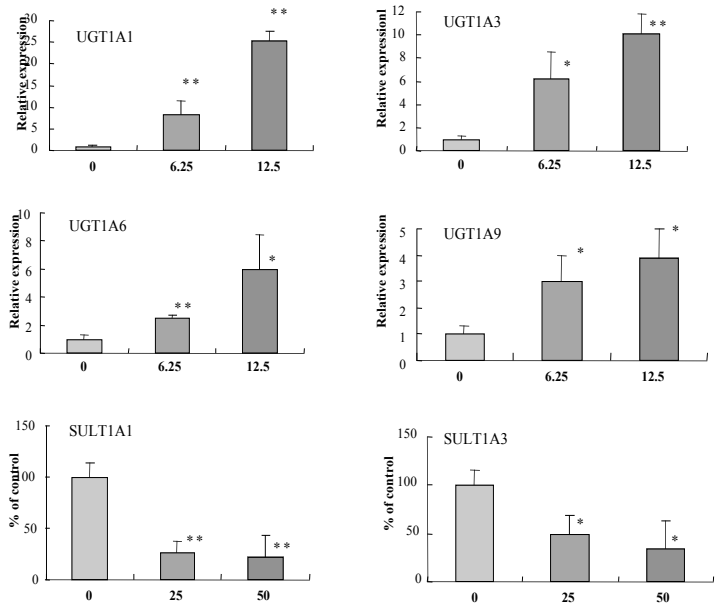


図 1. VC による抱合酵素遺伝子発現への影響 VC (mM)

② 乳酸菌の効果

(1)抱合活性に対する *L.casei* の影響

ラットに AP を十二指腸投与したとき, AG および AS の AP に対する AUC 比 (AG/AP, AS/AP) は, *L.casei* の併用により有意に減少した (図 2). 一方, AP の静脈内および門脈内投与時の AG/AP および AS/AP 比に対する *L.casei* 併用の影響は認められなかった. 従って *L.casei* は小腸の UGT や SULT 活性を低下させることで, AP の体内動態を変化させた可能性が高いと考えられる.

(2) CYP1A/1B に対する *L. casei* の影響

CYP1A1, CYP1B1 遺伝子発現および CYP1A 活性は, *L.casei* の濃度および暴露時間依存的に誘導された. この誘導には AhR が関与するが, 他の強力な AhR アゴニストと併用した場合, *L.casei* は部分アゴニストとして働き CYP1 酵素活性を抑制することが明らかとなった. 従って, 発がん物質の過度な代謝活性化を *L.casei* が抑制する可能性が示唆された.

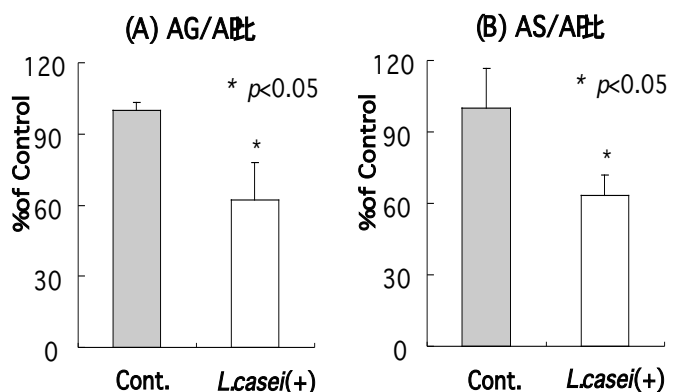


図 2 AP と *L. casei* を十二指腸投与したときの AUC 比

【今後の方針】

- VC により UGT および SULT 遺伝子の発現制御が起こることが明らかとなったので, この制御の分子機構を明らかにする. また, VC 摂取による抱合反応の変動を個体レベルで明らかにしていきたい.
- プロバイオティクスとして, *Lactobacillus* 属に加え, *Bifidobacterium* 属を用いて, 消化管における薬物代謝酵素およびトランスポーターの遺伝子発現および機能に対する効果と, その調節機構の解明を特に転写調節因子や免疫関連遺伝子発現の変化との関連性を中心に調べる.

オープンリサーチ研究

「効率的医薬品開発のための薬物動態に影響を及ぼす因子の解析」

分担研究課題 「トランスポーター阻害物質の薬物動態に及ぼす影響」

化学療法学講座 教授 杉本芳一

化学療法学講座 准教授 野口耕司

1. 当該研究の成果が研究プロジェクトに果たす役割

薬剤耐性と関連した薬物排出トランスポーター阻害作用をもつ物質の探索とその影響の解析

2. 研究内容

(1) P-糖タンパク質阻害薬 Dofequidar について、薬物特異性、トランスポーター特異性および薬物の体内動態に及ぼす影響を調べる。また、Dofequidar の効果に影響を及ぼす因子について調べる。

(2) 現在新たに臨床導入されつつある、またはこれから臨床導入される protein kinase 阻害薬について、トランスポーター阻害作用を有するか、およびそれ自体がトランスポーターの基質となるかについて調べる。

3. 平成 21 年度報告書要旨

前年度では、キノリン骨格を有する分子量 655.7 の化合物、Dofequidar fumarate (dl-5-[3-{4-(2,2-diphenylacetyl)piperazin-1-yl}-2-hydroxypropoxy]quinoline・3/2 fumarate、開発コードは MS-209 あるいは TM-511) と、P-糖タンパク質の阻害活性、特に MS-209 のトランスポーター特異性を検討した。ヒト白血病細胞 K562、ヒト HeLa 由来がん細胞 KB-3-1 に *MDR1*、*BCRP*、*MRP1* のそれぞれの遺伝子を導入した細胞を用いて、K562/MDR および KB/MDR の vincristine 耐性、KB/BCRP の SN-38 耐性、KB/MRP1 の VP-16 耐性に対する MS-209 の効果を検討した。MS-209 はこれまで P-糖タンパク質と MRP1 の阻害剤として知られていたが、これらの結果により、MS-209 は P-糖タンパク質に選択性の高い阻害剤であるということが示された。

今年度では、最近本邦でも臨床導入された分子標的薬剤の protein kinase 阻害薬と、薬物排出トランスポーターの活性阻害について検討を進めた。2007

年に国内承認されたエルロチニブ（商品名タルセバ）は、ゲフィチニブに続く新規 EGFR 阻害薬であり、切除不能な再発・進行性で、がん化学療法施行後に増悪した非小細胞肺癌に適応となっている分子標的薬剤である。このエルロチニブが、P-糖タンパク質や BCRP の薬剤排出活性に影響を与えるか否かを検討するため、ヒト白血病細胞 K562 とそれに *MDR1*、*BCRP* のそれぞれの遺伝子を導入した細胞、K562/MDR と K562/BCRP の細胞を用いて、これらの細胞の抗がん剤耐性等に対するエルロチニブの効果を検討した。その結果、エルロチニブは、BCRP による SN-38 耐性やミトキサントロン耐性形質、ミトキサントロン細胞外排出、エストロン-3 硫酸の輸送活性を効果的に競合阻害形式で抑制した。一方、P-糖タンパク質に対する効果を検討したところ、エルロチニブは P-糖タンパク質によるビンクリスチン耐性やその細胞外排出、その輸送活性を効果的に阻害できるものの阻害形式は複合型であることが示唆され、また他の P-糖タンパク質の輸送基質であるミトキサントロンに対しては、その耐性形質や細胞外排出はほとんど抑制できないことが示された。以上の結果より、エルロチニブは BCRP に対しては競合阻害形式で阻害活性を示すものの、P-糖タンパク質に対しては、その阻害活性は、輸送基質に依存するということと、その阻害形式は単純な競合阻害では無いということが明らかになった。今回の結果より、エルロチニブは、薬剤排出トランスポーターとその基質薬剤の組合せごとに複雑な阻害効果をもたらすことが明らかになり、薬物療法時のエルロチニブによる薬物相互作用予測においては、単純な予想は危険であることが示唆される。

4. 論文発表

- (1) Usuda J, et al., Lung Cancer 2009 May 22. [Epub ahead of print]
- (2) Mashima T, et al., Cancer Sci 2009 May 13. [Epub ahead of print]
- (3) Noguchi K, et al., Cancer Sci 2009 May 12. [Epub ahead of print]
- (4) Katayama K, et al., Anticancer Res 29:1059-1065, 2009
- (5) Kato N, et al., Chembiochem 23:920-928, 2009
- (6) Noguchi K, et al., Adv Drug Deliv Rev 31:26-33, 2009
- (7) Mashima T, et al., Oncogene 28:9-19, 2009
- (8) Katayama K, et al., Oncogene 27:1677-1686, 2008

白内障発症前後でのアスコルビン酸トランスポーターの発現の解析

分子機能生理学講座 岡 美佳子 中澤 洋介 竹鼻 眞

白内障は水晶体が白濁する疾病である。その原因は老化、紫外線、遺伝性、先天性など様々である。外科的手術によって混濁水晶体を人工透明眼内レンズと置き換える治療が一般的であるが、混濁の原因を特定し、予防や薬物による発症の遅延が可能になれば患者数が激減することは明らかであり、現在明らかにされていない発症原因の解明が待たれている。従って白内障においては、現在のところ外科的手術以外に治療法がなく、治療よりも予防が現実的である。

食習慣などについてのアンケート調査による疫学調査では、アスコルビン酸の摂取量が多いほど、老人性白内障と診断される率が低くなり、老人性白内障の手術を受ける率も低くなることが判明している。

水晶体混濁の主たる原因は、紫外線などにより発生するフリーラジカルや活性酸素種に因るところが大きいとされている。事実、水晶体内には、これらによる酸化障害を防御する還元型グルタチオンやアスコルビン酸、スーパーオキシドデスムターゼなどの水晶体を還元状態に保つための分子が高濃度に含まれている。アスコルビン酸に関しては、水晶体中でリサイクルされており、紫外線等によって生じたラジカルをアスコルビン酸が補足すると、アスコルビン酸はアスコルビン酸フリーラジカルとなる。これはアスコルビン酸フリーラジカル(AFR)還元酵素およびデヒドロアスコルビン酸(DHA)還元酵素により、NADHを介してアスコルビン酸に還元され、水晶体中の還元状態を維持している。

房水からの水晶体へのアスコルビン酸の輸送は、ナトリウム依存性アスコルビン酸トランスポーター (SVCT2) によって行われている。また、DHA はグルコーストランスポーターの一種 GLUT1 によって細胞内にとりこまれ、アスコルビン酸に還元される。これらの酵素とトランスポーターによって水晶体中のアスコルビン酸濃度は保たれている。

糖尿病の罹患により白内障発症リスクは高まる。それに加え、糖尿病発症時、水晶体中のアスコルビン酸濃度は減少する。しかしながら濃度の減少が何に起因するのかははっきりしていない。そこで、濃度の減少が何に起因するのかを検討し、アスコルビン酸濃度の回復が可能であるかどうかを検討する事を本研究の目的とした。

水晶体は、常に還元状態を維持することによって透明性を保ち、また、網膜の光傷害に対する近紫外線フィルターとしての役割もある。

糖尿病性白内障では、水晶体中のアスコルビン酸量が減少している事がこれまでに報告されている。そこで本研究では、水晶体中のアスコルビン酸量の減少がアスコルビン酸トランスポーターの減少によるものか否かについて検証した。

SD ラット腹腔にストレプトゾトシンを注射する事で糖尿病を発症させた。

糖尿病発症は血糖値を測定する事で確認し、血糖値 **200** 以上のラットのみ測定に用いた。**GLUT1** と **SVCT2** の発現量は、**mRNA** の発現量をリアルタイム **PCR** によって検討した。

その結果糖尿病発症ラットの **GLUT1**、**SVCT2** の発現量はともに正常ラットとほぼ同値であった。

前回の中間報告で、白内障モデルを用いた実験では、糖白内障時には **AFR** 還元酵素の活性が低下している可能性を示した。また、アスコルビン酸欠乏動物では、**AFR** 還元酵素活性が上昇が認められた。これは、水晶体内のアスコルビン酸濃度を維持するために **AFR** 還元酵素活性が上昇していると思われた。

今後はアスコルビン酸の給餌によって水晶体アスコルビン酸濃度の回復がおこなうかどうかを検討し、白内障遅延効果について検討を行う予定である。