



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第1550号
学位記番号	第319号
氏名	古川 純士
授与年月日	平成28年3月31日
学位論文の題名	ENBT1 の核酸塩基トランスポーターとしての同定と代謝酵素との機能的協同の解析及び応用利用
論文審査担当者	主査： 林 秀敏 副査： 湯浅 博昭，牧野 利明，山村 壽男

氏 名	ふるかわ じゅんじ 古川 純士
学位の種類	博士（薬科学）
学位の番号	薬博第 319 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 31 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ENBT1 の核酸塩基トランスポーターとしての同定と代謝酵素との機能的協働の解析及び 応用利用
論文審査委員	（主査）教授 林 秀敏 （副査）教授 湯浅 博昭 ・ 教授 牧野 利明 ・ 准教授 山村 壽男

論文内容の要旨

【序論】

核酸塩基は、核酸の構成成分であり、細胞の正常な機能や増殖に不可欠な生体内化合物である。哺乳類における核酸の生合成経路には、アミノ酸などを出発物質として一から合成する *de novo* 経路と、食餌由来あるいは不要となった核酸（核酸塩基及びヌクレオシド）を再利用する *salvage* 経路が存在する。特に、後者の経路は、核酸塩基の合成に必要な多量の ATP を節約できるという利点があり、肝細胞を除くほとんどの細胞において主要な核酸合成経路となっている。ただし、*salvage* 経路においては、細胞外から核酸塩基やヌクレオシドを取り込む必要があり、この過程には特異的な核酸輸送系の関与が指摘されている。核酸輸送に関しては、ヌクレオシド輸送の研究が先行しており、輸送系の分子実体として、*equilibrative nucleoside transporters* (ENTs) や *concentrative nucleoside transporters* (CNTs) などが既に同定されている。ヌクレオシド輸送に関する研究が先行したのは、核酸塩基よりもヌクレオシドの利用が優位であるとされているためであるが、古くから赤血球などにおいて核酸塩基の特異的な輸送の報告が多数あり、核酸塩基利用の必要性も無視できないとみられる。しかし、核酸塩基輸送系の分子実体に関しては、一部の ENT の弱い核酸塩基輸送能が知られているのみで、実質的には不明のままであった。

このような状況のもと、最近になって、哺乳類における核酸塩基特異的なトランスポーターとして *rat sodium-dependent nucleobase transporter 1* (rSNBT1) が当研究室において同定された。しかしながら、rSNBT1 の *ortholog* が欠損しているヒトにおいては、核酸塩基トランスポーターは未だ不明のままであった。

本研究では、ヒトにおける核酸塩基の動態を明らかにするため、核酸塩基輸送系の分子実体の同定に取り組み、アミノ酸トランスポーター群である *solute carrier (SLC) 43 family* に属する機能未知のトランスポーター様タンパク質として知られていた SLC43A3 を、核酸塩基輸送能を有するトランスポーターとして同定することに成功した。さらに、その輸送様式が促進拡散型であることが見出されたことを踏まえ、このトランスポーターを *equilibrative nucleobase transporter 1* (ENBT1) と命名することとした。この ENBT1 の同定及び輸送機能解析と合わせて、核酸塩基利用における細胞内核酸塩基代謝酵素との協働的機能の解析にも取り組んだ。そして、その応用利用の試みとして、ヒト単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ (HSV-TK) による代謝活性化によって抗がん剤として働くプリン核酸塩基類似薬物である *ganciclovir* (GCV) の ENBT1 による輸送及び HSV-TK による代謝との機能的協働についての解析に取り組んだ。なお、この GCV と HSV-TK を組み合わせて用いる抗がん療法は、HSV-TK/GCV 自殺遺伝子治療として提唱され、開発が進められている

新しい治療法である。最後に、各種の臓器由来細胞やモデル細胞での細胞膜輸送における ENBT1 の寄与の評価に利用できる特異的阻害剤として decynium-22 を見出し、その阻害特性の評価等に取り組んだ。

【本論】

1. ENBT1 の核酸塩基トランスポーターとしての同定と核酸塩基代謝酵素との機能的協働

HEK293 細胞において、ヒト ENBT1 の一過性導入による adenine 及び hypoxanthine の著しい取り込み上昇が見出され、これらの核酸塩基に対する ENBT1 の高い輸送能が示唆された (Fig. 1)。

ENBT1 の核酸塩基輸送能は、ENBT1 を安定発現させた MDCKII 細胞においても確認された。さらに、この ENBT1 安定発現系 MDCKII 細胞を用いた検討により、ENBT1 はプリン塩基およびピリミジン塩基のヌクレオシド類 (adenosine, uridine 等) やピリミジン塩基類 (uracil 等) に対しては輸送活性をほとんど示さないことが明らかとなり、ENBT1 のプリン塩基特異性が示唆された。また、ENBT1 の主要な基質である adenine の輸送解析において、ENBT1 は Na^+ や H^+ への依存性を示さないことが見出され、生体エネルギーの供給により形成されるこれらのイオン類の濃度勾配を必要としない、促進拡散型の輸送様式で機能することが示唆された。

ENBT1 の安定発現系 MDCKII 細胞での adenine 取り込みの速度論解析では、Michaelis 定数 (K_m) が $0.94 \mu\text{M}$ と得られた。一方で、hypoxanthine 取り込みに対する adenine の IC_{50} は $13 \mu\text{M}$ であり、大きく異なった。一般に、トランスポーターの輸送基質は競合阻害物質となり、 K_m と IC_{50} は理論的には一致する。ここで見られた両者の乖離の問題については、adenine 取り込みの K_m が adenine phosphoribosyltransferase (APRT) による adenine 代謝の K_m に近いことと、本研究では ^3H 標識体の adenine を用いていることから、APRT による代謝過程 (APRT への親和性) を主に反映した見かけの K_m が取り込み (^3H 標識体の adenine 及び代謝物の蓄積) 過程の解析から評価されている可能性が考えられる。ENBT1 を介して細胞内に取り込まれた adenine が salvage 酵素である APRT によって代謝されて細胞内に蓄積する一方で、細胞内 adenine 濃度は低く維持され、細胞外との濃度勾配に依存した促進拡散型の ENBT1 介在 adenine 輸送が効率的に進行するものと考えられ、ENBT1 と APRT が機能的協働関係にあるとみることができる。一方で、adenine は guanine 代謝に関わる hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) に親和性を持たないので、 IC_{50} は ENBT1 への作用 (ENBT1 への親和性) を反映しているものと考えられる。guanine 及び hypoxanthine に関しても、adenine の場合と同様に、取り込みの見かけの K_m と adenine 取り込みに対する IC_{50} との間に乖離がみられ、ENBT1 と HPRT1 との機能的協働が示唆された。

ENBT1 と核酸塩基代謝酵素との機能的協働について、さらに検証するため、APRT/HPRT1 欠損の A9 細胞 (マウス繊維芽細胞由来) を用いて検討を行った。ヒト ENBT1 のみを一過性に導入した場合には、adenine 取り込みの変化はみられなかったが、ENBT1 をヒト APRT と共に導入した場合には、APRT のみを導入した場合を上回る adenine 取り込みがみられ、APRT との機能的協働による ENBT1 介在性 adenine 取り込みの増大が示唆された。guanine に関しても、同様に、ヒト HPRT1 との機能的協働によるとみられる ENBT1 介在性取り込みの増大が確認された。これらの結果より、adenine 及び guanine のそれぞれに特異的な代謝酵素の存在下において、代謝処理により ENBT1 による各核酸塩基の輸送が効率

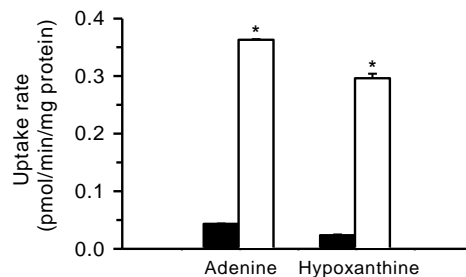


Fig. 1. ENBT1 mediates the uptakes of adenine and hypoxanthine. The uptakes of [^3H]adenine and [^3H]hypoxanthine (5 nM for each) were evaluated at 37°C and $\text{pH } 7.4$ for 1 min in HEK293 cells transiently expressing ENBT1 (open bars) and mock cells (filled bars) for control. *, $p < 0.05$. Data are presented as the means \pm S.E. ($n = 4$).

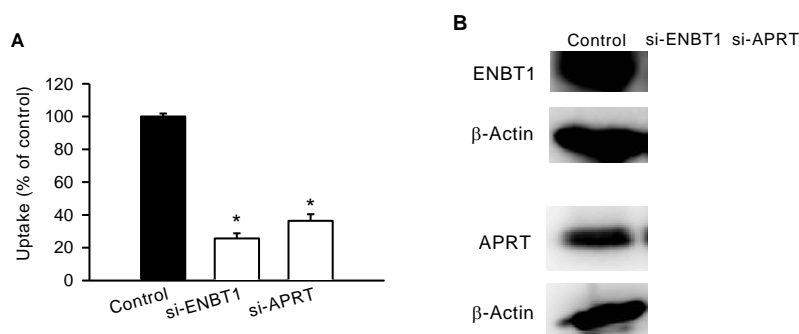


Fig. 2. Effect of silencing of ENBT1 and APRT on [^3H]adenine uptake in HeLa cells. (A) The uptake of [^3H]adenine (5 nM) was evaluated at 37°C and $\text{pH } 7.4$ for 1 min in HeLa cells transfected with siRNA for ENBT1 or APRT. *, $p < 0.05$. Data are presented as the means \pm S.E. ($n = 4$). (B) The endogenous protein levels for ENBT1, APRT and β -actin in those cells were analyzed by western blotting.

的に進行することが示唆された。さらに、内因性の adenine 取り込みが認められる HeLa 細胞において、ENBT1 及び APRT の特異的 siRNA による遺伝子発現抑制が adenine 取り込みに与える影響についても検討したところ、ENBT1 の発現抑制による adenine 取り込みの低下は著しく（70%程度）、APRT の発現抑制の効果（60%程度の低下）と同等であった（Fig. 2）。この結果は、salvage 経路による adenine 利用において、ENBT1 を介する供給（取り込み輸送）が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

ENBT1 の生理的な役割を探索するため、ヒト組織における ENBT1 の発現分布を real-time PCR 法により検討したところ、全ての組織で発現が認められたが、肝臓で最も発現が高く、次いで肺での発現が高いことが明らかとなった。さらに、肝臓においては、蛍光免疫染色により、ENBT1 は肝実質細胞の類洞膜（血管側膜）に局在していることが明らかとなった（Fig. 3）。これらの結果より、de novo 経路が活発に働く肝臓では、核酸塩基が多量に生成されて、他の諸臓器への供給源となっており、その際における肝実質細胞から血中への排出輸送経路として、ENBT1 が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。核酸塩基の供給を受ける側の諸臓器では、ENBT1 が核酸塩基の取り込み輸送経路として働き、細胞内の核酸代謝酵素と連携して構成される salvage 経路の最初の段階の役割を担っているものと考えられる。また、恒常的に強い酸化ストレス等に曝され易く、それに由来する損傷の修復等のために高い salvage 経路活性を有する肺においては、肝臓と並んで ENBT1 の発現が高くなっている可能性が考えられる。

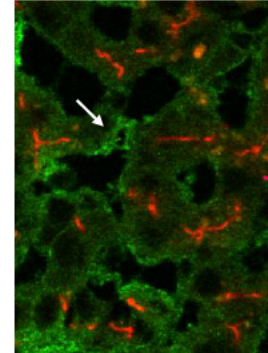


Fig. 3. Subcellular localization of ENBT1 in human liver. The immunofluorescent image shows ENBT1 (green, white arrow) and P-glycoprotein (red, pink arrow) in the human liver.

2. HSV-TK/GCV 自殺遺伝子治療における ENBT1 の役割：ENBT1 と代謝酵素との機能的協働の応用利用

ウイルス由来のリン酸化酵素による代謝に始まる活性化過程を経て作用する抗ウイルス薬として知られる GCV は、宿主細胞に対する殺細胞効果も示す。一方で、抗ウイルス治療では副作用となる、この宿主細胞への作用をがん治療に応用する試みとして、がん組織の細胞特異的に HSV-TK の遺伝子を導入し、発現させたいと、GCV を投与して殺細胞作用を惹起させる治療法（HSV-TK/GCV 自殺遺伝子治療法）が提唱されており、非がん組織への副作用を回避できる治療法として期待されているが、その有効性は十分には検証されていない。そこで、この治療法的前提となる GCV の細胞内取り込みのメカニズムが未解明であること及び、プリン核酸塩基類似の化学構造を持つ GCV の取り込みに ENBT1 が関与する可能性があることに着目し、ENBT1 と代謝酵素の機能的協働の応用利用の観点から、ENBT1 による GCV 輸送及び HSV-TK/GCV 自殺遺伝子治療における ENBT1 の役割を探索することにした。

HEK293 細胞において、ヒト ENBT1 の一過性導入による GCV (^3H 標識体) の著しい取り込み上昇が見い出され、GCV に対する ENBT1 の高い輸送能が示唆された。比較のため、一部の核酸塩基類に対する輸送能が知られている ENT1 及び ENT2 に関しても同様の検討を行ったが、これらは GCV に対する輸送活性をほとんど示さなかった。ENBT1 の GCV 輸送能は、ENBT1 の安定発現系 MDCKII 細胞においても確認された。さらに、GCV 取り込みの速度論解析により、Michaelis 定数は 1.82 mM と得られ、adenine (ENBT1 への親和性の指標としての IC_{50} が 13 μM) に比べて、GCV の ENBT1 への親和性はかなり低いことが示唆された。なお、同細胞での adenine 取り込みに対する GCV の IC_{50} は 1.67 mM であり、 K_m とほぼ一致した。これは、GCV ウイルス由来のリン酸化酵素の存在しない通常の細胞においては、GCV が代謝を受けないため、 K_m と IC_{50} が共に ENBT1 への親和性を反映したものとなることによると考えられる。

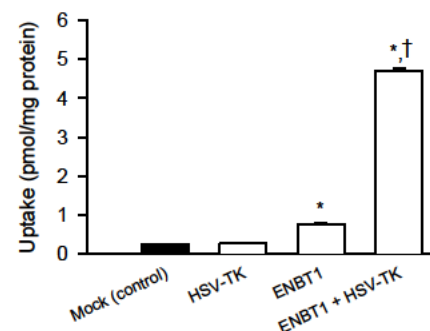


Fig. 4. Effect of transient expression of ENBT1 and HSV-TK on GCV uptake in HEK293 cells. The uptake of [^3H]GCV (60 nM) was evaluated at 37°C and pH 7.4 for 5 min in HEK293 cells transfected with a plasmid for ENBT1 and one for HSV-TK with 1:1 ratio (1 μg of total plasmid). Each plasmid was replaced with empty pCI-neo vector when it was not used. *, $p < 0.05$ compared with mock; †, $p < 0.05$ compared with ENBT1. Data are presented as the means \pm S.E. ($n = 4$).

ENBT1 の GCV 輸送能が見出されたことを受け、ENBT1 と HSV-TK との機能的協働の解析を試みることにした。HEK293 細胞において、HSV-TK のみを一過性に導入した場合には、GCV 取り込みは低いままで、変化はなかったが、ENBT1 を HSV-TK と共に導入した場合には、ENBT1 のみを導入した場合を上回る GCV 取り込みがみられ、HSV-TK との機能的協働による ENBT1 介在性 GCV 取り込みの増大が示唆された (Fig. 4)。HSV-TK による GCV の代謝により、細胞内 GCV 濃度が低く維持され、ENBT1 を介する促進拡散型の GCV 輸送が効率的に進行すると共に、GCV 代謝物の細胞内蓄積が進んだものと考えられる。さらに、ENBT1 及び HSV-TK を導入した安定発現系 MDCKII 細胞において、臨床で想定される水準の GCV 濃度 (30 μM) で、同様に両者の機能的協働による GCV 取り込みの増大が確認された。また、両者の共発現細胞においてのみ、GCV 存在下での 72 h の培養後の細胞生存率の低下 (殺細胞効果) がみとめられた (Fig. 5)。この殺細胞効果は、GCV 濃度依存的に強くなり、30 μM で最大となった (70%程度の生存率低下)。HSV-TK または ENBT1 のみを導入した細胞では、mock 細胞の場合と同様に、試験濃度の全範囲 (100 μM まで) において、殺細胞効果はみられなかった。

ここまでの結果から、ENBT1 は GCV の細胞内取り込み経路として、その殺細胞効果の惹起に大きく関与するものと考えられる。ENBT1 以外の GCV トランスポーターが関与する場合がある可能性を否定できないが、少なくとも、がん細胞における ENBT1 の発現の有無 (程度) は、GCV の殺細胞効果に影響し、HSV-TK/GCV 自殺遺伝子治療の成否に関わる要因となり得ると考えられる。そこで、この仮説の検証のため、種々のがん由来モデル細胞株を用い、HSV-TK の一過性導入の効果を比較検討することにした。その結果、ENBT1 高発現細胞 (Caki-1、HeLa、HepG2) では、GCV 取り込みの増大と細胞生存率の低下がみられた一方で、ENBT1 低発現細胞 (A549、HCT-15、MCF-7) では、いずれの変化も見られず、仮説の妥当性が示唆された。さらに、HeLa 細胞では、HSV-TK の存在下において (一過性導入)、ENBT1 特異的な siRNA を用いての ENBT1 遺伝子発現抑制による GCV の取り込み及び殺細胞効果の低下も確認できた。

以上より、ENBT1 を高発現するがん種・細胞を特定し、それらに対象を絞って HSV-TK/GCV 自殺遺伝子治療を適用することが、有効性を確保し、効果的な治療を実施するうえで重要と考えられる。

3. ENBT1 特異的阻害剤としての decynium-22 の阻害特性

各種の組織由来細胞等での核酸塩基関連医薬品等の取り込みにおける ENBT1 の寄与に関する情報は、その種の医薬品等の体内動態特性を的確に把握し、開発及び使用を効率的ないし効果的に行ううえで有用である。また、一般に、薬物等の細胞膜輸送における各種トランスポーターの寄与を探る目的で、特異的阻害剤による阻害率を指標とする手法が汎用されている。そこで、ENBT1 に関して、特異的阻害剤の検索及びその阻害特性の把握を試みることにした。

核酸塩基関連医薬品等の細胞膜輸送における ENBT1 の寄与の評価に際しては、一部の核酸塩基等に対する輸送活性が知られている ENT1 及び ENT2 の寄与との識別が特に重要となると考えられるが、各種薬物等を用いた一連の ENBT1 阻害試験において、ENT1/2 の特異的阻害剤として知られる dipyrindamol (200 μM) が阻害活性を示さず、また ENT1 の特異的阻害剤として知られる NBMPR (200 μM) の阻害活性もかなり弱い一方で、赤血球等での核酸塩基輸送の阻害剤として知られる decynium-22 (10 μM) が強い阻害活性を示すことが見出されている。そこで、decynium-22 の ENBT1 特異的阻害剤として利用可能性を探ることにした。adenine をモデル核酸塩基基質としての、ヒト ENBT1 の一過性発現系 HEK293 細胞での取り込み阻害解析により、decynium-22 の IC_{50} は 2.90 μM と得られた。ヒト ENT2 も一過性発現系 HEK293 細胞において adenine 輸送活性を示したが、decynium-22 の IC_{50} は 111 μM であり、阻害活性は極めて弱いことが明らかとなっ

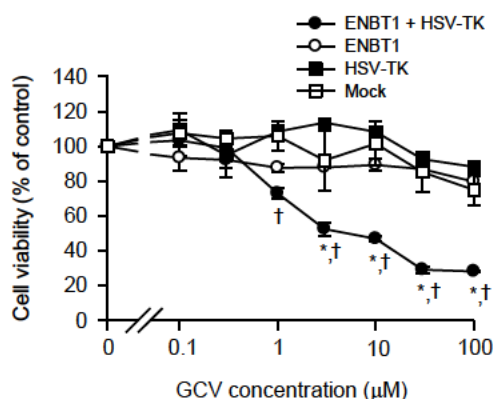


Fig. 5. Effect of cooperative role of stably expressed ENBT1 and HSV-TK on GCV-induced cytotoxicity in MDCKII cells. The cells were cultured for 72 h in the presence or absence (control) of GCV and the numbers of cells were determined by MTT assays. *, $p < 0.05$ compared with the value for mock cells at each GCV concentration; †, $p < 0.05$ compared with the value in the absence of GCV for control in each type of cells. Data are presented as the means \pm S.E. ($n = 4$).

た。したがって、両トランスポーターが共に働いている場合、10 μ M の decynium-22 で、ENBT1 による輸送のみを選択的かつ完全に阻害でき、ENBT1 の寄与を把握できると考えられる。なお、ENT1 には、adenine 輸送活性は認められなかった。

この原理の適用例として、HepG2 細胞での adenine 取り込みにおける ENBT1 の寄与の評価を試みた。その結果、adenine 取り込みは decynium-22 (10 μ M) によりほぼ完全に阻害され、ENBT1 の寄与がほぼ全てであることが示唆された。また、dipyridamol (10 μ M) は阻害活性を示さず、ENT1/2 の関与はないことが確認された。

【結論】

本研究では、ENBT1 を新たに核酸塩基トランスポーターとして同定し、プリン核酸塩基を特異的に認識し、促進拡散型の輸送様式で機能するとみられる特性を明らかにした。さらに、細胞内の核酸塩基代謝酵素と機能的協働関係にあり、代謝産物の生成・蓄積と連動して、細胞内核酸塩基濃度が低く維持されることで、細胞外との濃度勾配に依存した促進拡散型の ENBT1 介在核酸塩基輸送が効率的に進行することが示唆された。また、ENBT1 の生理的な役割としては、de novo 経路が活発に働く肝臓（実質細胞）から血中への核酸塩基の排出輸送経路（供給経路）としての可能性が注目される。一方で、核酸塩基の供給を受ける側の諸臓器では、ENBT1 が核酸塩基の取り込み輸送経路として働き、細胞内の核酸代謝酵素と連携して構成される salvage 経路の最初の段階の役割を担っているものと考えられる。

プリン核酸塩基類似の化学構造を持つ GCV の取り込みに ENBT1 が関与する可能性があることに着目し、ENBT1 と代謝酵素の機能的協働の応用利用の観点から、ENBT1 による GCV 輸送及び HSV-TK/GCV 自殺遺伝子治療における ENBT1 の役割を探ることにも取り組んだ。これにより、ENBT1 が高い GCV 輸送能を持つことが明らかとなり、GCV の代謝活性化及び殺細胞効果の惹起につながる GCV の供給経路としての ENBT1 の重要性が示唆された。

最後に、核酸塩基関連医薬品等の細胞膜輸送における ENBT1 の寄与の評価に利用可能な特異的阻害剤として、decynium-22 が見出された。

本研究の成果は、核酸代謝の異常を端とするような病態の解析や、核酸塩基類似医薬品等の開発及び使用の最適化のための基礎情報として有用と考えられる。

【基礎となる報文】

1. Furukawa J., Inoue K., Maeda J., Yasujima T., Ohta K., Kanai Y., Takada T., Matsuo H. and Yuasa H.
Functional identification of SLC43A3 as an equilibrative nucleobase transporter involved in purine salvage in mammals.
Sci. Rep., 5, 15057 (2015).
2. Furukawa J., Inoue K., Ohta K., Yasujima T. and Yuasa H.
Role of ENBT1 in a suicide gene therapy using herpes simplex virus thymidine kinase with ganciclovir.
Manuscript in preparation
3. Furukawa J., Inoue K., Ohta Y., Yasujima T. and Yuasa H.
Validation of decynium-22 as an ENBT1-selective inhibitor.
Manuscript in preparation

論文審査の結果の要旨

核酸塩基及び類似薬物の細胞膜輸送に関わる核酸塩基特異的なトランスポーターの存在が指摘されてきているが、その機能や分子実体については不明な点が多い。また、ヒトで欠損している sodium-dependent nucleobase transporter 1 (SNBT1) がラットで同定され、核酸塩基類等の体内動態に著しい動物種差がある可能性も新たな問題として浮かび上がってきた。本研究は、このような背景の下で、ヒトにおける核酸塩基トランスポーターの同定及び機能解析に取り組んだものである。

まず、solute carrier (SLC) 43 family に属する機能未知のトランスポーター様タンパク質として知られていた SLC43A3 を核酸塩基トランスポーターとして同定することに成功した。また、その輸送様式が促進拡散型であることが見い出された。

ことを踏まえ、このトランスポーターを equilibrative nucleobase transporter 1 (ENBT1) と称することとした。さらに、プリン核酸塩基類を基質として特異的に認識するという特性や、各種臓器細胞での核酸塩基利用に際しての供給経路としての役割及び核酸塩基代謝酵素との協働的機能を明らかにすることができた。その応用利用の観点からの研究にも取り組み、がん治療法としての herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir (HSV-TK/GCV) 自殺遺伝子治療における GCV トランスポーターとしての ENBT1 の役割も明らかにした。この取り組みでは、GCV の代謝活性化及び殺細胞効果の惹起の前提となる GCV の細胞内への供給のための経路としての ENBT1 の重要性を示すことができた。

以上のように、ヒトにおいて見いだされた初の核酸塩基トランスポーターとして ENBT1 を同定し、その機能解析及び応用利用の観点からの研究を進展させることができた。これらは、核酸塩基類似医薬品の開発の効率化及び使用の最適化のための基盤となる価値ある成果である。論文での表現も妥当であり、博士論文として合格であると判定する。