

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08399

研究課題名(和文)スフィンゴシン1リン酸(S1P)輸送体によるリンパ球移動の制御機構解明

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of lymphocyte trafficking by sphingosine 1-phosphate (S1P) transporters

研究代表者

小林 直木 (KOBAYASHI, Naoki)

摂南大学・農学部・助教

研究者番号：90532250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン1リン酸(S1P)は、感染症から体を守るために必須の情報伝達物質であり、赤血球や血管内皮細胞から血液中へ放出される。私は赤血球と同様にS1Pを放出する培養細胞株 MEDEP-E14の遺伝子発現解析により、MFSD2Bという輸送体タンパク質がS1Pを細胞内から細胞外へ輸送することを明らかにした。また、MFSD2BによるS1P輸送には電荷を帯びたアミノ酸残基が重要であることも分かった。MFSD2Bはマウスの赤血球にも存在していることから、赤血球のS1P輸送体として働くと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤血球のS1P輸送体MFSD2Bが見つかったことで、体内の主要なS1P輸送体がすべて明らかになった。S1Pは感染症から体を守る働きだけでなく、がん細胞の転移やAlzheimer病にも関与する。MFSD2Bは赤血球だけでなく血小板のS1P輸送体としても働いており、今後MFSD2Bの未知の役割や薬の標的としての可能性が明らかになっていくと期待される。また、MFSD2Bとタンパク質の構造が非常に似ていても運ぶ物質の異なるMFSD2Aやタンパク質の構造がかなり異なっても運ぶ物質が同じSPNS2との比較により、MFSD2BのS1P輸送における詳細なメカニズムが解明できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine 1-phosphate (S1P) is an intercellular lipid mediator essential for host defense against infection. Erythrocytes and endothelial cells release S1P into the blood stream. I analyzed gene-expression profiles of MEDEP-E14 cells that release S1P extracellularly and revealed that mfsd2b is the responsible gene for the S1P release activity. The charged residues D85 and K413 of MFSD2B are essential for the S1P transport in the cells. Expression of MFSD2B in mice erythrocytes strongly suggested that MFSD2B functions as an erythrocyte S1P transporter.

研究分野：生化学

キーワード：赤血球 S1P 輸送体 トランスポーター 情報伝達物質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン 1リン酸 (S1P) は、血漿中に存在する脂質メディエーターであり、主に赤血球、血小板、血管内皮細胞において産生され、細胞外へ放出される(図 1)。リンパ球は細胞膜に S1P 受容体を発現しており、血漿中の S1P を感知することで、胸腺や二次リンパ組織から血液中へ移動する。したがって、S1P は感染症からの生体防御機構において必須の働きをしている。しかし、リンパ球がリンパ組織から血液中へ移動する際の詳細なメカニズムは不明のままであり、私たちはこれらの過程に S1P 輸送体が深く関与すると考えた。

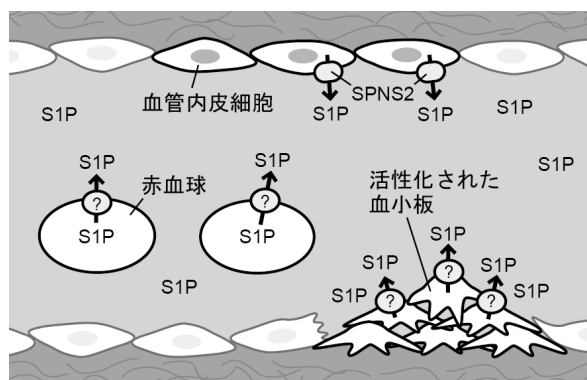


図 1. 血漿中に S1P を放出する細胞

私たちはこれまでに、SPNS2 という輸送体が血管内皮細胞からの S1P 放出を担っていることを明らかにしたが、SPNS2 ノックアウトマウス由来の赤血球および血小板からの S1P 放出は野生型マウスと同様であったことから、SPNS2 以外の未知の S1P 輸送体が赤血球と血小板に存在することが示唆された(図 1)。

### 2. 研究の目的

本研究は、赤血球・血小板の S1P 輸送体を同定し、リンパ球の血液中への移動における S1P 輸送体の関与を明らかにすると共に、S1P 輸送体を標的とした新しい免疫抑制剤創出のための研究基盤を確立することを目的とした。その具体的な内容は下記の通りである。

- (1) 蛍光標識 S1P の輸送活性を指標にした網羅的遺伝子欠損による赤血球の S1P 輸送体の同定
- (2) 新規 S1P 輸送体発現細胞における、蛍光標識 S1P の輸送活性測定系の確立と S1P 輸送体阻害物質の同定

### 3. 研究の方法

- (1) 赤血球様細胞株 MEDEP-E14 における新規 S1P 輸送体の同定

赤血球の S1P 輸送体を同定するため、研究開始当初は、赤血球様細胞株 MEDEP-E14 における蛍光標識 S1P の輸送活性を指標とした網羅的遺伝子スクリーニングを行う予定であったが、結果として、それと同時並行で進めていた MEDEP-E14 細胞の網羅的遺伝子発現解析により成果が得られた。具体的には、MEDEP-E14 細胞とその親株細胞である E14TG2a 細胞 (ES 細胞) において、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、MEDEP-E14 細胞のみで高発現している輸送体遺伝子を抽出し、S1P 産生酵素であるスフィンゴシンキナーゼを安定発現させた CHO 細胞 (CHO/SphK 細胞) にそれらの S1P 輸送体候補遺伝子を発現させることで S1P 輸送活性の有無を調べた。

- (2) 新規 S1P 輸送体 MFSD2B の活性測定系の確立

スフィンゴシンキナーゼを安定発現させた HEK293 細胞 (HEK293/SphK) に S1P 輸送体を発現させ、蛍光標識 S1P である NBD-S1P の輸送活性を測定した。

### 4. 研究成果

- (1) 赤血球様細胞株 MEDEP-E14 における新規 S1P 輸送体の同定

私は、赤血球前駆細胞株の MEDEP-E14 細胞が、細胞内で S1P を合成し、細胞外へ放出する活性を持つことを見出した。一方、MEDEP-E14 細胞の親株細胞であるマウス ES 細胞 E14TG2a においては、S1P が細胞内で少量合成されるのにも関わらず、細胞外へは全く放出されなかった。これらの細胞における S1P 放出能の違いに着目し、マイクロアレイ解析を行ったところ、MEDEP-E14 細胞において特に発現量の多い輸送体遺伝子として *mfSD2b* を同定した。MFSD2B は CHO/SphK 細胞において、S1P を時間依存的に細胞外へ放出した。この S1P 輸送活性は赤血球 S1P 輸送体の阻害剤である Glyburide によって阻害された。GFP を融合した MFSD2B は、CHO 細胞において細胞膜に発現し、同様に S1P 輸送活性を示した。さらに、MEDEP-E14 細胞において CRISPR/Cas9 システムにより *mfSD2b* 遺伝子を欠損させたところ、血漿中での S1P キャリアであるアルブミン (BSA) および HDL への S1P 輸送が大きく減少した(図 2)。また、抗 MFSD2B 抗体を用いたウェスタンブロットにより、MFSD2B がマウス赤血球に高発現していることを確認した。以上の結果から、MFSD2B は MEDEP-E14 細胞および赤血球において、アルブミン (BSA) および HDL を介した細胞外への S1P 輸送を担う主要な輸送体として機能すると考えられる(図 3)。

さらに、MFSD2B による S1P 輸送機構を明らかにするため、MFSD2B の生化学的特徴について解

析した。MFSD2B のホモログである MFSD2A は Na<sup>+</sup>依存性のホスファチジルコリン (LPC) 輸送体として同定されており、Na<sup>+</sup>や LPC の結合に重要な荷電性アミノ酸残基が複数報告されている。それらのアミノ酸残基のうち、MFSD2B において保存されている荷電性アミノ酸残基のアラニン変異体 (D85A、K413A) は活性が大きく減少したことから、これらの残基が S1P の輸送に重要であることが分かった。D85 については基質輸送におけるイオン共役への関与が考えられたが、MFSD2B による S1P 輸送には Na<sup>+</sup>および K<sup>+</sup>濃度勾配が必要なかった。さらに、MFSD2B は血管内皮細胞の S1P 輸送体 SPNS2 と明らかなアミノ酸配列の相同性を示さないが、SPNS2 と同様、DH-S1P, phyto-S1P, C17-S1P および FTY720-P などの S1P アナログを輸送した。

血管内皮細胞の S1P 輸送体である SPNS2 は、リンパ球の体内循環だけでなく、がん細胞の転移や Alzheimer 病に関与することが明らかとなっており、赤血球・血小板 S1P 輸送体である MFSD2B のさらなる生理的役割の解明が期待される。

## (2) 新規 S1P 輸送体 MFSD2B の活性測定系の確立

MFSD2B の迅速な機能解析系の構築と S1P 輸送体阻害剤のスクリーニングに必要なハイスループット S1P 輸送体活性測定系の確立を目的として、HEK293 細胞を用いた蛍光標識 S1P (NBD-S1P) の輸送活性測定を試みた。HEK293/SphK 細胞に NBD-スフィンゴシンを添加したところ、細胞内で NBD-S1P が合成された。しかし、S1P 輸送体を発現させていない HEK293/SphK 細胞から相当量の NBD-S1P が細胞外へ放出された。この内因性の NBD-S1P 放出は MFSD2B の活性を測定する際にはバックグラウンドを上昇させてしまう。そこで、HEK293/SphK 細胞において何らかの内因性の輸送体が NBD-S1P の放出

に関与していると仮定し、NBD-S1P 輸送体の探索を行った。多剤排出輸送体として知られているいくつかの ABC 輸送体を HEK293/SphK 細胞に強制発現させたところ、ABCC1 発現株において NBD-S1P 放出量が増加した。また、siRNA により HEK293/SphK 細胞の *abcc1* 遺伝子を発現抑制したところ、NBD-S1P 放出量が大きく減少した。これらの結果から、HEK293/SphK 細胞に発現している内因性の NBD-S1P 輸送体は ABCC1 であることが強く示唆された。そこで、CRISPR/Cas9 システムにより HEK293/SphK 細胞の *abcc1* 遺伝子を欠損させたところ、HEK293/SphK 細胞からの NBD-S1P 放出量が大きく減少したことから、ABCC1 は HEK293/SphK 細胞における内因性の NBD-S1P 輸送体であることが分かった。この細胞 (HEK293/SphK ABCC1 KO) の使用により、細胞外の蛍光強度を測定する際のバックグラウンドを低下させることができた。さらに、HEK293/SphK ABCC1 KO 細胞において、S1P 輸送体である MFSD2B, SPNS2 を発現させることにより、これらの輸送体の活性測定が可能であることを確認した。一方で、HEK293/SphK ABCC1 KO 細胞から放出される NBD-S1P 量を測定する際、NBD-S1P の前駆体である NBD-スフィンゴシンを細胞に添加すると、NBD-S1P 以外の種々の NBD-スフィンゴシン代謝物が細胞外に見られることが分かった。これらの NBD-スフィンゴシン代謝物由来の蛍光は細胞外 NBD-S1P 特異的な蛍光を測定する際の妨げとなった。そこで、NBD-S1P のキャリアとして、元々使用していた BSA 以外に S1P キャリアである HDL および ApoM を細胞外に添加したところ、いずれのキャリアも NBD-S1P キャリアとして機能し、特に ApoM は NBD-S1P と特異的に結合することが分かった。NBD-S1P のキャリアとして ApoM を使うことにより、細胞外 NBD-S1P 由来の蛍光を特異的に測定できることを明らかにした。

## < 引用文献 >

*Scientific Reports*, 8, 4969 (2018)

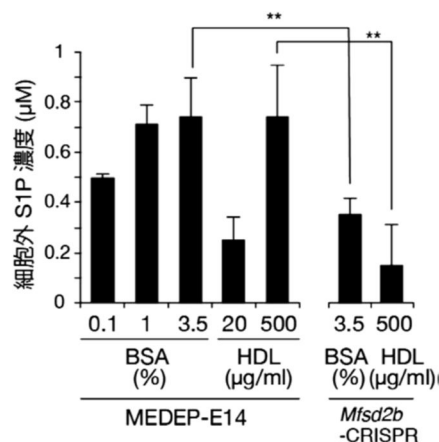


図2. 赤血球前駆細胞株 MEDEP-E14 から BSA および HDL 依存的 S1P 放出 (生化学, 90, 581-587 (2018))

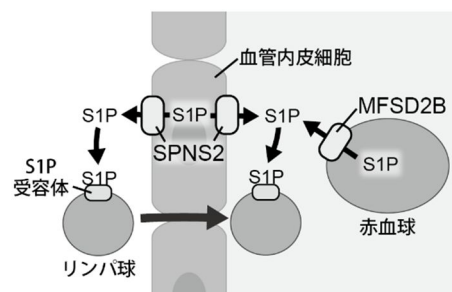


図3. 赤血球・血管内皮細胞から放出される S1P の働き

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小林直木, 久野悠, 西毅	4. 巻 269
2. 論文標題 リゾリン脂質輸送体と疾患制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1082 - 1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小林 直木、西 (川崎) 晶子、西 毅	4. 巻 90
2. 論文標題 新たに同定された赤血球のS1P輸送体MFSD2B	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 581 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小林 直木、西 (川崎) 晶子、大塚 正人、久野 悠、山口 明人、西 毅	4. 巻 60
2. 論文標題 赤血球における新規S1P輸送体MFSD2Bの同定	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 脂質生化学研究	6. 最初と最後の頁 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Naoki, Kawasaki-Nishi Shoko, Otsuka Masato, Hisano Yu, Yamaguchi Akihito, Nishi Tsuyoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 MFSD2B is a sphingosine 1-phosphate transporter in erythroid cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23300-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naoki Kobayashi, Shoko Kawasaki-Nishi, Masato Otsuka, Yu Hisano, Akihito Yamaguchi, Tsuyoshi Nishi
2. 発表標題 Characterization of the novel sphingosine 1-phosphate transporter MFSD2B
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田隼聖, 道下誠也, 小林直木, 大塚正人
2. 発表標題 HEK293/SphK細胞におけるNBD標識スフィンゴシン1リン酸 (NBD-S1P) 輸送体の同定
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Kobayashi, Shoko Kawasaki-Nishi, Masato Otsuka, Yu Hisano, Akihito Yamaguchi, Tsuyoshi Nishi
2. 発表標題 Characterization of the erythrocyte S1P transporter MFSD2B
3. 学会等名 The 2019 FASEB Science Research Conference on Lysophospholipid and Related Mediators: From Bench to Clinic (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林直木, 西(川崎)晶子, 大塚正人, 久野悠, 山口明人, 西毅
2. 発表標題 赤血球の新規S1P輸送体MFSD2B
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 直木, 西(川崎)晶子, 大塚 正人, 久野 悠, 山口 明人, 西 毅
2. 発表標題 赤血球S1P輸送体MFSD2Bの生化学的解析
3. 学会等名 第14回 スフィンゴセラピィ (STC) 研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 直木, 西(川崎) 晶子, 大塚 正人, 久野 悠, 山口 明人, 西 毅
2. 発表標題 赤血球における新規S1P輸送体MFSD2Bの同定
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naaki Kobayashi, Shoko Kawasaki-Nishi, Masato Otsuka, Yu Hisano, Akihito Yamaguchi, and Tsuyoshi Nishi
2. 発表標題 MFSD2B is a novel sphingosine 1-phosphate transporter in erythroid cells
3. 学会等名 2nd Japan-Korea Lipid Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 直木, 西(川崎) 晶子, 大塚 正人, 久野 悠, 山口 明人, 西 毅
2. 発表標題 赤血球の新規スフィンゴシン1リン酸輸送体MFSD2Bの同定
3. 学会等名 第68回 日本薬学会近畿支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 直木、西（川崎） 晶子、大塚 正人、久野 悠、山口 明人、西 毅
2. 発表標題 赤血球前駆細胞株の新規S1P輸送体MFSD2Bの同定
3. 学会等名 第40回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林直木、西（川崎）晶子、土井康平、三木悠史、大塚正人、久野悠、山口明人、西毅
2. 発表標題 赤血球前駆細胞株における新規スフィンゴシン1リン酸輸送体の同定
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林直木、西（川崎）晶子、大塚正人、久野悠、山口明人、西毅
2. 発表標題 MFSD2Bは赤血球前駆細胞株のスフィンゴシン1リン酸輸送体として機能する
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林直木
2. 発表標題 トランスポーターが制御する体内の脂質輸送
3. 学会等名 第10回 摂大農学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------