

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16416

研究課題名（和文）ピリドキシンの腸管吸収の分子機構の解明と癌治療戦略への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of intestinal absorption of pyridoxine and its application to therapeutic strategy for cancer

研究代表者

山城 貴弘（Yamashiro, Takahiro）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・助教

研究者番号：20826614

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類で初めてのピリドキシシン（ビタミンB6）トランスポーターとして、PDXT（pyridoxine transporter）を同定し、その輸送特性が明らかとなった。さらに、Caco-2細胞（ヒト小腸上皮細胞モデル）においてPDXTの機能的発現が確認され、PDXTがピリドキシシンの腸管吸収に関与することが示唆された。一方で、ラットのPDXTにはピリドキシシン輸送機能が認められず、ヒトとラットにおいて、その吸収に動物種差があるものと考えられる。また、PDXT機能と大腸癌との関連性を見出すには至らず、今後のさらなる検討を要すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水溶性ビタミンは、その物理化学的な性質（高水溶性）から、単純拡散による小腸上皮細胞膜の透過は困難であり、その腸管吸収にはトランスポーターが関与することが知られている。しかしながら、水溶性ビタミンに分類されるビタミンB群及びビタミンCの中で、唯一、ビタミンB6のトランスポーターのみが未同定のままであり、大きな課題となっていた。本研究により、ピリドキシシントランスポーターとしてPDXTが同定され、腸管吸収に関与していることが示唆された。本研究結果は、ピリドキシシンの腸管吸収機構の解明を進展させ、腸管からの十分な吸収の確保ないし吸収不足に起因する欠乏症の回避等に役立つものである。

研究成果の概要（英文）：PDXT was identified as the first pyridoxine transporter in mammals, and its transport profile was clarified. The functional expression of PDXT was confirmed in Caco-2 cells as a human intestinal epithelial cell model, suggesting that PDXT is involved in the intestinal absorption of pyridoxine. On the other hand, rat PDXT was suggested not to be able to transport pyridoxine, indicating species difference in its absorption between human and rat. In addition, a relationship between PDXT function and colorectal cancer could not be found, and further studies should be needed to clarify the potential role of PDXT in carcinogenesis and cancer cell growth.

研究分野：薬物動態学

キーワード：ピリドキシシン トランスポーター 腸管吸収 ビタミン 動物種差

1. 研究開始当初の背景

ピリドキシンはピリドキサール、ピリドキサミンと共にビタミン B6 に属する水溶性ビタミンの一つである。ビタミン B6 は、アミノ酸、糖質、脂質だけでなく神経伝達物質である生理活性アミンの代謝反応の補酵素として働いている。また、ホルモンバランスの調節や免疫系の維持などにも働き、生体の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。そのため、ビタミン B6 が欠乏するとペラグラ様症候群をはじめとして、舌炎、神経障害、貧血、痙攣発作などの様々な疾患が引き起こされる。

古くから、ピリドキシン及びピリドキサール(リン酸エステル)はビタミン B6 欠乏症の予防及び治療のための経口医薬品としても用いられている他、ビタミン B6 の疾患予防効果も注目されており、心不全や虚血性心疾患などのリスクを低下させるという報告もある。また、ビタミン B6 (ピリドキシンを含む)が抗腫瘍作用を有するとの報告も相次いでなされている。したがって、ビタミン B6 の効率的な摂取は、様々な疾患の予防・治療に役立つとみられ、特に癌治療への適用は、大きく期待される場所である。

他のビタミンと同様に、ビタミン B6 も生体内では十分に合成されず、その供給は食物からの摂取に依存しているため、腸管からの十分な吸収の確保ないし吸収不足に起因する欠乏症の回避等の観点から、その吸収機構を把握することは重要である。水溶性ビタミンは、その物理化学的な性質(高水溶性)から、単純拡散による小腸上皮細胞膜の透過は困難であり、その腸管吸収にはトランスポーターが関与すると考えられてきた。実際に、現在までに様々な水溶性ビタミントランスポーターが同定されている。しかしながら、水溶性ビタミンに分類されるビタミン B 群及びビタミン C の中で、唯一、ビタミン B6 のトランスポーターのみが未同定のままであり、大きな課題となっていた。

2. 研究の目的

水溶性ビタミンの腸管吸収におけるトランスポーターの重要性は広く認識されており、実際にトランスポーターの同定も進展してきた。その中で、ビタミン B6 の輸送に関わるトランスポーターのみが不明なままであるが、Caco-2 細胞(ヒト小腸上皮細胞モデル)をはじめとした様々な細胞種において、トランスポーター介在性とみられるピリドキシン輸送が報告されている。そこで、他の水溶性ビタミンと同様にビタミン B6 についても、小腸からの吸収過程においてトランスポーターが関与するとの仮説に従い、その分子実体の同定を試みた。方法としては、ヒト染色体 DNA データベースから、トランスポーター様タンパク質をコードする遺伝子群を抽出した。続いて、その候補遺伝子群の中から、expressed sequence tag (EST) データベース解析により、小腸での発現が認められる遺伝子をクローン化し、哺乳類細胞(HEK293 細胞)を用いた遺伝子発現系にて、放射ラベルされたピリドキシンの輸送活性を評価した。以上のような方法でビタミン B6 トランスポーターを探索した結果、ピリドキシンに対する輸送活性を有するトランスポーター(PDXT)を見出すことに成功した。

本研究では、PDXT の詳細な機能解析を進めて、輸送機能特性を明らかにし、小腸におけるピリドキシンの吸収メカニズムを解明することを目的とする。さらに、PDXT を介したピリドキシン吸収と癌細胞増殖能との関連性についても探り、その因果関係の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) PDXT のピリドキシン輸送機能の解析

遺伝子導入試験に汎用されるイヌ腎由来の MDCKII 細胞にヒト PDXT を安定発現させた細胞を用い、解析を行った。輸送機能評価には放射ラベル体のピリドキシンを用い、PDXT の基質親和性や輸送の駆動力、阻害剤感受性等を検討した。また、ピリドキサール、ピリドキサミンに対する PDXT の親和性についても検討した。

(2) ヒト小腸上皮細胞モデルでのピリドキシン輸送解析

ヒト小腸上皮細胞モデルとして汎用される Caco-2 細胞においても、PDXT 安定発現系 MDCKII 細胞と同様のピリドキシン輸送解析を行い、両者においてピリドキシン輸送特性が合致するか検討した。さらに、PDXT 特異的 RNAi による遺伝子発現抑制の影響についても検討し、ピリドキシン輸送における PDXT の寄与を評価した。

(3) ラット組織レベルでのピリドキシン輸送解析

組織レベルでの PDXT 機能を検証するため、ラット小腸の摘出反転腸管組織を用いてピリドキシン取込輸送の解析を行い、分子及び細胞レベルでの PDXT の機能特性と合致するか検討した。

(4) 大腸癌細胞増殖と PDXT の関連性の解析

ビタミン B6 の抗腫瘍作用が注目を集めているが、大腸癌の予防因子であることを示す報告も多数なされている。PDXT は大腸（結腸部位）においても発現しており（遺伝子データベース情報による）腸内細菌由来等のピリドキシン吸収に働いている可能性が考えられる。このことから、大腸癌に特異的なピリドキシンの効能が示唆される背景として、大腸では、腸内細菌由来のピリドキシン供給が加わるために、他の臓器に比べてピリドキシンレベルが高くなり、それが関与している可能性が考えられる。さらに、このため、PDXT の機能が大腸癌の発癌・増殖と関連している可能性が考えられる。そこで、ヒト結腸癌由来である Caco-2 細胞を用いて、PDXT を介したピリドキシン輸送が Caco-2 細胞の増殖に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1) PDXT のピリドキシン輸送機能の解析

はじめに、ヒト PDXT を安定発現させた MDCKII 細胞において、ピリドキシンに対する顕著な輸送活性が確認された (Figure 1)。PDXT のピリドキシン輸送の駆動力を明らかにするために、細胞外 pH の影響を検討したところ、pH の低下に伴い PDXT のピリドキシン輸送活性は増大し、酸性指向型の輸送特性が示された。さらに、酸性指向型の特性が示されたことから、 H^+ との共輸送の可能性を考え、プロトンフォアである FCCP (carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone)、CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) の影響を検討した。その結果、いずれのプロトンフォア処理によっても PDXT の輸送活性は顕著に低下したことから、PDXT のピリドキシン輸送は H^+ との共輸送の可能性があり、少なくとも内向きの H^+ 濃度勾配により促進されることが明らかとなった。また、PDXT のピリドキシン輸送のミカエリス定数 (K_m) は $18.5 \mu M$ と算出され、Caco-2 細胞において報告されているピリドキシン取込の K_m ($12 \mu M$) と同等の値であった。

PDXT のピリドキシン輸送に及ぼすピリドキシン関連化合物の影響を検討したところ、ピリドキサル、ピリドキサミン、4-デオキシピリドキシンで有意な阻害作用が認められた一方で、ピリドキサルリン酸及び 4-ピリドキシ酸では阻害作用は認められなかった。ピリドキサル及びピリドキサミンの IC_{50} は、それぞれ $0.52 mM$ 、 $2.97 \mu M$ と算出され、ピリドキサルへの親和性は低いことが示唆された。さらに、ピリドキサル及びピリドキサミンのピリドキシン輸送への阻害様式を解析したところ、いずれも競合阻害を示した。したがって、ピリドキサル及びピリドキサミンについても PDXT の基質となる可能性が考えられる。

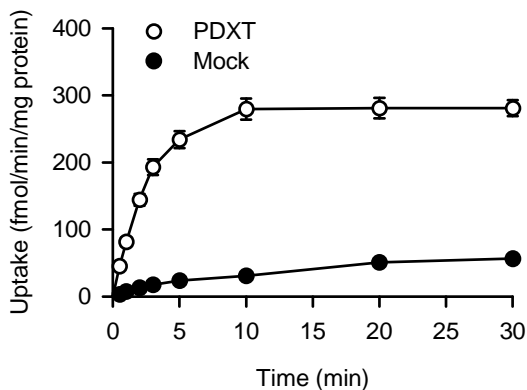


Figure 1. Time course of pyridoxine uptake in MDCKII cells stably expressing PDXT. The uptake of [3H]pyridoxine (5 nM) was evaluated at pH 5.5 and 37°C. Data are presented as the mean \pm S.E. ($n = 4$).

(2) Caco-2 細胞でのピリドキシン輸送解析

ヒト小腸上皮細胞モデルとして汎用される Caco-2 細胞においても、PDXT 安定発現系 MDCKII 細胞と同様の輸送機能解析を行ったところ、同等の輸送特性が確認された。さらに、PDXT 特異的 RNAi による遺伝子発現抑制の影響を検討したところ、PDXT の発現抑制によりピリドキシン取込は有意に低下した (Figure 2)。これらのことから、PDXT はピリドキシンの腸管吸収に関与している可能性が示唆された。

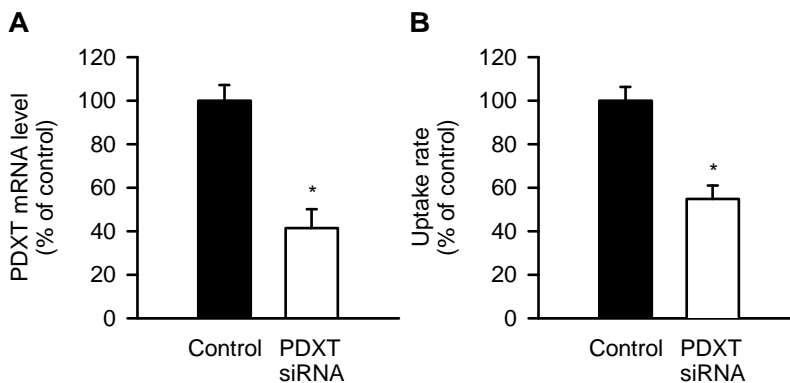


Figure 2. Effect of silencing endogenous PDXT on pyridoxine uptake in Caco-2 cells. (A) The level of PDXT mRNA was assessed by real-time PCR. (B) The uptake of [3H]pyridoxine (5 nM) was evaluated for 3 min at pH 5.5 and 37°C. The uptake rate for control was 28.9 fmol/min/mg of protein. Data are presented as the mean \pm S.E. ($n = 4$). *, $p < 0.05$.

(3) PDXT のピリドキシン輸送機能の動物種差

組織レベルでの PDXT 機能の検証のため、ラット小腸の摘出反転腸管組織を用いてピリドキシン取込輸送の解析を行ったが、PDXT 関与による輸送の特徴を確認するには至らなかった。そこで、ラット PDXT を HEK293 細胞に一過性発現させ、ピリドキシン輸送の評価を行ったが、ピリドキシン輸送機能は認められなかった。したがって、ラット小腸では PDXT のピリドキシン吸収への関与はなく、ヒトとラットにおいて動物種差があるものと考えられる。

(4) 大腸癌細胞増殖と PDXT の関連性の解析

PDXT の機能的発現が認められた Caco-2 細胞を用いて、ビタミン B6 欠乏培地での培養が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。しかし、ビタミン B6 欠乏培地で培養した場合でも、Caco-2 細胞の増殖に変化は認められなかった。今後、Caco-2 細胞のモデルとしての妥当性を含めて、さらなる検討を要すると考えられる。

本研究成果は、ピリドキシンの腸管吸収機構さらには体内動態の解明に向けて、関連研究を大きく進展させるものと考えられる。今後、生体レベルでの PDXT 機能の検証や、ピリドキシン欠乏に起因する各病態との関連性の解明が期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yamashiro Takahiro, Yasujima Tomoya, Hamid M. Said, Yuasa Hiroaki	4. 巻 295
2. 論文標題 pH-dependent pyridoxine transport by SLC19A2 and SLC19A3: Implications for absorption in acidic microclimates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 16998 ~ 17008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013610	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山城貴弘, 保嶋智也, Hamid M. Said, 湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A2/3のpyridoxine/thiamine輸送機構：輸送特性の基質間比較解析
3. 学会等名 日本薬剤学会 第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下紗瑛奈, 山城貴弘, 保嶋智也, 湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A3によるpyridoxine及びthiamineの輸送に対するフラボノイド類の阻害作用の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅浩平, 小川有沙, 山城貴弘, 保嶋智也, 湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A3の脳神経変性疾患関連遺伝子変異と輸送機能との関係
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiro Yamashiro, Tomoya Yasujima, Hiroaki Yuasa
2. 発表標題 Functional identification of SLC19A2/3 as pyridoxine transporters
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Miyake, Shunsuke Takahashi, Takahiro Yamashiro, Tomoya Yasujima, Hiroaki Yuasa
2. 発表標題 Species differences in SLC19A3 for pyridoxine transport function
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下紗瑛奈、山城貴弘、保嶋智也、湯浅博昭
2. 発表標題 SLC19A3に対するフラボノイド類の阻害作用
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2019
4. 発表年 2019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			
米国	University of California, Irvine			