

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790141

研究課題名（和文） 破骨細胞における葉酸トランスポーターの同定と輸送機構の解析

研究課題名（英文） Functional characterization of folate transport in osteoclast

研究代表者

井上 勝央 (INOUE KATSUHISA)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50315892

研究成果の概要（和文）：破骨細胞における葉酸輸送機構を解明するために、破骨細胞の細胞膜と形態的・機能的に類似しているリソソーム膜に着眼し、ラット腎リソソームにおける葉酸輸送について検討した。その結果、酸性領域で、著しい濃度依存性及び温度依存性を示す葉酸輸送系の存在が明らかとなった。その K_m は $0.073 \mu\text{M}$ と極めて低く、また、その輸送に対する阻害感受性が、従来から知られている葉酸トランスポーターとは大きく異なっていた。以上より、リソソーム膜や破骨細胞の細胞膜には未知の葉酸トランスポーターが存在すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In order to explore the possibility that the carrier-mediated folate transport system could be involved in the accumulation of methotrexate in osteoclasts, we examined the transport of folate in lysosomes isolated from the rat kidney, since lysosomal membrane has functional similarities of the ruffled border in osteoclasts. It was found that the lysosomal folate transport occurred at an acidic pH (pH 5.0 - 6.0), and was saturable with the Michaelis constant of $0.073 \mu\text{M}$. When we examined the effect of various inhibitors for RFC1 (reduced folate carrier 1) and PCFT (proton-coupled folate transporter) on the lysosomal folate transport, the inhibition profile was found to be different from those of RFC1 and PCFT. These results suggest that lysosomes have a specific folate transport system, which has not been identified, and this transport system may be involved in methotrexate accumulation in osteoclasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：葉酸、トランスポーター、破骨細胞、リソソーム、メトトレキサート

1. 研究開始当初の背景

慢性関節リウマチは、全身の関節に激しい痛みや腫れを伴う自己免疫疾患であり、その患者数は日本人口の約 0.6%にも及ぶ。その病態発症の詳細なメカニズムは不明であるが、その治療には抗炎症薬や免疫抑制剤が有効であることが知られている。特に、葉酸代謝拮抗薬であるメトトレキサート(MTX)は、リウマチ部位における炎症を抑え、関節腔内の滑膜細胞やリンパ球の増殖を抑制することにより関節破壊の進行を抑制するため、リウマチ治療の第一選択薬として最も汎用されている。また、この際に用いられる MTX は、がん治療で用いられる投与量に比較して極めて低量 (4~6 mg/week) で有効である。この強力な薬理効果には炎症部位への特異的な MTX の集積が重要であることが示唆されており、その機構には MTX 及び folate に特異的な輸送担体 (トランスポーター) の関与が指摘されている。

これまでに folate 類の輸送に関わるトランスポーターとしては還元型葉酸トランスポーター (RFC1) が同定されている(Williams et al, JBC 269, 5810-16, 1994)。RFC1 は還元型葉酸や MTX に対して非常に高い輸送活性を有していることから、リウマチ部位における MTX 集積への関与が考えられてきた。しかし、RFC1 の発現はリウマチ部位に特異的でなく、また、リウマチ患者を対象にした RFC1 の遺伝子多型の解析において、機能低下を伴う RFC1 遺伝子変異と MTX による治療効果との間に相関性は認められていない。したがって、RFC1 以外のトランスポーターが関与している可能性が考えられる。一方、最近、我々は、ヘムトランスポーターとして同定された PCFT/HCP1 がプロトン依存性 folate トランスポーターとしての性質を有し、folate と同様に MTX も非常に効率よく輸送することを見出した(Nakai et al, JPET 322, 469-76, 2007)。しかし、PCFT/HCP1 の発現は消化管上部に特異的であり、他では肝臓に発現が見られる程度である。また、ラット関節リウマチモデルを用いて病変部位での PCFT/HCP1 の誘導発現の可能性も検討したが、その発現は認められなかった。このように、リウマチ部位における MTX 輸送に関わる機能性分子は極めて重要とみられ、関心も高いが、依然としてその詳細は不明である。

2. 研究の目的

MTX による抗リウマチ作用の詳細なメカニズムは未だ不明であるが、前述のように炎症部位への集積が重要とされており、作用部位と集積部位は同一であると推察される。そのターゲットとなる細胞の候補として、関節腔内の滑膜細胞やリンパ球も挙げられるが、慢性関節リウマチでは関節の炎症以外に顕著な骨破壊が進行するため、骨吸収に関与する破骨細胞の関与が疑われる。破骨細胞では、極性細胞の頂端 (apical) 細胞膜に相当する波状縁膜が lysosome 膜的機能を有することが知られていることから、通常細胞における lysosome 膜蛋白質の多くが細胞膜へ移行し、細胞膜蛋白質として機能しているものと推察される。したがって、破骨細胞に MTX が選択的に集積する場合においては、一般的な細胞の lysosome 膜に存在する folate トランスポーターが関与する可能性が考えられる。しかし、現在のところ、細胞内の folate 輸送に関わるトランスポーターは同定されていない。

そこで本研究では、破骨細胞における MTX の集積メカニズムを解明するために、lysosome 膜における folate 輸送特性について検討した。

3. 研究の方法

Wistar 系雄性ラット (約 300 g、一晩絶食) を用い、麻酔下で、腎臓を摘出した。腎臓をホモジナイズした後、急速分画遠心法によりリソソームを単離し、リソソーム懸濁液を得た。^[3H] 標識された folate を用い、リソソームへの取り込みを迅速濾過法により評価した。取り込み実験を行うに当たり、^[3H] 標識された folate を含む uptake solution (80 µl) をリソソーム懸濁液 (20 µl, 10 mg protein/ml) に加えて取り込みを開始させ、恒温槽中 (25°C) で所定の時間までサンプルを静置した。取り込み停止時には、氷冷した停止洗浄液 1 ml をサンプルに加えることにより反応を停止させ、直ちにスポイトで全量を吸い取ってメンブレンフィルター上に滴下して、減圧下で濾過した。停止洗浄液でメンブレンフィルターを洗浄後、メンブレンフィルターをカウンティングバイアルに移し、液体シンチレーションカクテルを加えた。

マウスマクロファージ様細胞である RAW264 細胞を常法にしたがって培養し、回

収した細胞をホモジナイズすることにより同様にリソソーム懸濁液を得た。

定量は液体シンチレーションカウンティング法により行った。

4. 研究成果

ラット腎リソソームにおける folate 輸送は、顕著な温度依存性と、酸性域で高い活性を有する pH 依存性を示した (Fig. 1)。また、pH 5.5 での folate 輸送は顕著な飽和性を示した (Fig. 2)。中性指向性である RFC1 とは異なる輸送担体の関与が考えられる。なお、pH 5.5 での folate 輸送の Michaelis 定数 (K_m) は $0.073 \mu\text{M}$ 、最大輸送速度 (V_{max}) は $1.77 \text{ pmol/min/mg protein}$ と算出され、folate に対し極めて高い親和性を示すことが示唆された。一方、MTX による IC_{50} 値は $5.4 \mu\text{M}$ と算出され、その親和性は folate に比べ低いことが示唆された。また、還元型葉酸類も folate 輸送を高い阻害効果を示し、この担体輸送系に親和性を有する可能性が示唆された (Fig. 3)。

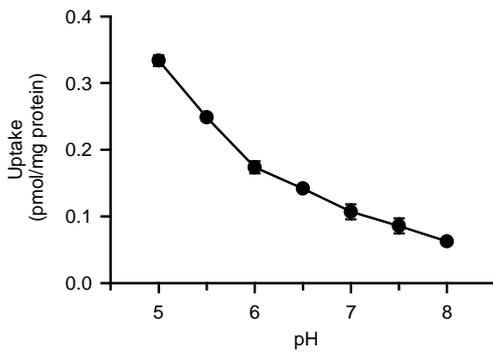


Fig. 1. pH Dependence of Folate Uptake in Rat Kidney Lysosomes. Mean \pm S.E. (n = 3 or 4); uptake of [^3H]folate (10 nM) for 1 min at 25°C.

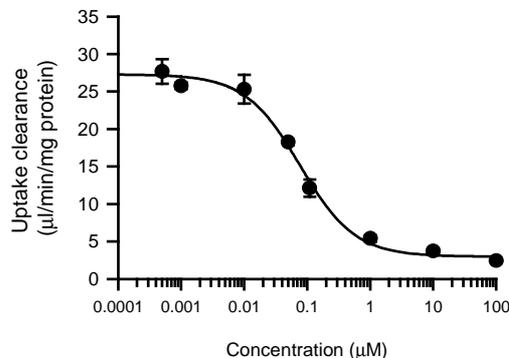


Fig. 2. Concentration Dependence of Folate Uptake in Rat Kidney Lysosomes. Mean \pm S.E. (n = 4); uptake of [^3H]folate for 1 min at 25°C and pH 5.5; solid line, computer-fitted profile.

取込み試験液中の Na^+ を K^+ 、Choline に置

換したもの、 NaCl を mannitol に置換したものの、そして Cl^- を gluconate または SCN^- に置換したものをを用い、folate 輸送に及ぼすイオン置換の影響を検討したところ、 Na^+ を K^+ に、また、 Cl^- を SCN^- に置換した場合、取り込みはやや減少したが、影響は小さく、 Na^+ 、 Cl^- による影響はほとんどないと考えられる (Fig. 4)。

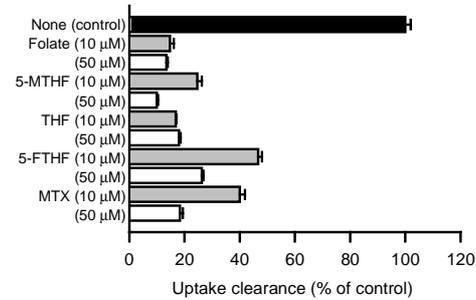


Fig. 3. Inhibitory Effect of Folate and Several Folate Derivatives on Folate Uptake in Rat Kidney Lysosomes. Mean \pm S.E. (n = 3 or 4); uptake of [^3H]folate (10 nM) for 1 min at 25°C and pH 5.5; control, $24.8 \mu\text{l/min/mg protein}$; 5-MTHF, 5-methyl-tetrahydrofolate; THF, tetrahydrofolate; 5-FTHF, 5-formyl-tetrahydrofolate; MTX, methotrexate.

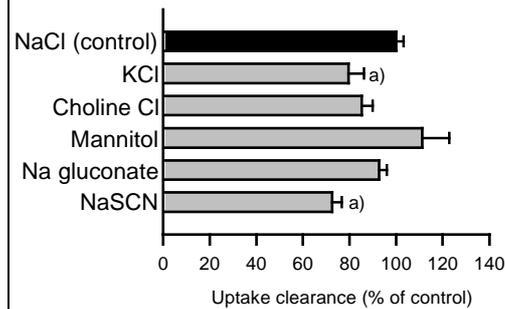


Fig. 4. Ion Dependence of Folate Uptake in Rat Kidney Lysosomes. Mean \pm S.E. (n = 3 or 4); uptake of [^3H]folate (10 nM) for 1 min at 25°C and pH 5.5; control, $24.8 \mu\text{l/min/mg protein}$; a) $p < 0.05$.

次に、各種阻害剤の影響について検討した。RFC1 及び PCFT の阻害剤としても知られている bromsulphthalein, 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate はラット腎リソソームにおける folate 輸送を阻害したが、効果は弱かった。また、他のアニオンは folate 輸送に対してほとんど影響を及ぼさなかった。したがって、この folate 担体輸送系は、OATs (organic anion transporters) に代表されるようなイオン化の状態が基質となる条件として重要である輸送担体とは異なるものと考えられる。また、RFC1 の基質として知られている thiamine pyrophosphate、また、PCFT に対し強い阻害効果を示す sulfasalazine による影響がほとんど見られなかったことから、本担体輸送系は RFC1 及び PCFT とは異なるものであることが示唆

された。

内因性カルボン酸類及び誘導体の影響についても検討したところ、一部の内因性カルボン酸によって folate 輸送が約 2 倍に上昇したことから、本輸送系において、一部の内因性カルボン酸が、活性制御の役割を担っている可能性も考えられる (Fig. 5)。

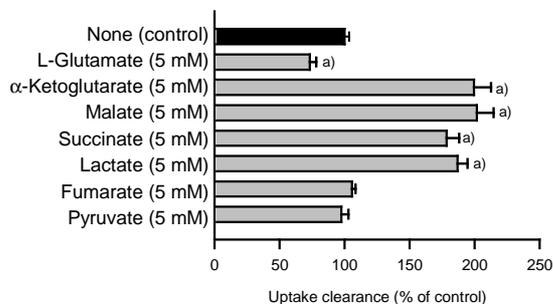


Fig. 5. Effect of Various Compounds of Folate Uptake in Rat Kidney Lysosomes. Mean \pm S.E. (n = 3 or 4); uptake of [3 H]folate (10 nM) for 1 min at pH 5.5 and 25°C; control values, 21.2 μ l/m in/mg protein.

また、破骨細胞の前駆体細胞である RAW264 細胞から調製したリソソームを用いて同様の検討を行ったところ、pH 依存性の folate 輸送が認められ、その輸送はラット腎リソソームで認められた基質特異性や阻害剤感受性に類似していた。

これらの特徴を持つ輸送担体はこれまでに報告されておらず、ラット腎及び RAW264 細胞リソソームに特有の未知の folate 輸送担体が関わっているものと考えられ、おそらく破骨細胞の波状縁膜においても同様の輸送担体が存在すると思われる。未だ不明な点が多いが、本研究での成果が基質認識特性解明の手がかりとなることを期待したい。また、今回見出された folate 担体輸送系のさらなる解明が進み、folate 類似構造を有する抗リウマチ剤や抗がん剤などの開発、ドラッグデリバリーへの応用の可能性等についての研究の進展につながることを期待したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Yasujima T, Ohta K, Inoue K, Ishimaru M, Yuasa H: Evaluation of 4', 6-diamidino-2- phenylindole as a fluorescent probe substrate for rapid assays of the functionality of human multidrug and toxin extrusion proteins. *Drug Metab Dispos*, 38, 715-721, 2010.

2. Yamamoto S, Inoue K, Murata T, Kamigaso S, Yasujima T, Maeda JY, Yoshida Y, Ohta K, Yuasa H: Identification and

functional characterization of the first nucleobase transporter in mammals. *J Biol Chem*, 285, 522-531, 2010.

3. Ohta K, Inoue K, Yasujima T, Ishimaru M, Yuasa H: Functional characteristics of two human MATE transporters: Kinetics of cimetidine transport and profiles of inhibition by various compounds. *J Pharm Pharm Sci*, 12, 388-396, 2009

4. Yamamoto S, Inoue K, Ohta K, Fukatsu R, Maeda J, Yoshida Y, Yuasa H: Identification and functional characterization of rat riboflavin transporter 2. *J Biochem*, 145, 437 - 443, 2009

5. Yuasa Y., Inoue K, Hayashi Y: Molecular and functional characteristics of proton-coupled folate transporter. *J Pharm Sci*, 98, 1608 - 1616, 2009.

6. Ohta K, Imamura Y, Okudaira N, Atsumi R, Inoue K, Yuasa H: Functional characterization of multidrug and toxin extrusion protein 1 as a facilitative transporter for fluoroquinolones. *J Pharmacol Exp Ther*, 328, 628 - 634, 2009.

7. Inoue K, Nakai Y, Ueda S, Kamigaso S, Ohta K, Hatakeya M., Hayashi Y, Otagiri M, Yuasa H: Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. *Am J Physiol*, 294, G660 - G668, 2008.

[学会発表] (計 2 件)

1. 井上勝央、湯浅博昭：葉酸吸収における PCFT/SLC46A1 の役割、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日 (岡山)

2. 井上勝央、石谷 治男、太田欣哉、湯浅博昭：ラット腎リソソームにおける folate 輸送系の機能解析、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日 (京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 勝央 (INOUE KATSUHISA)

名古屋市立大学大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50315892