

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07159

研究課題名（和文）新規ポリアミントランスポーターの機能及び生理的役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Function and Physiological Role of a Novel Polyamine Transporter

研究代表者

湯浅 博昭（Hiroaki, Yuasa）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・教授

研究者番号：20191471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：新規ポリアミントランスポーターとしてのPAMT1の分子機能の解明を進展させることができた。また、PAMT1（mRNA）の臓器分布の評価においては、前立腺での特異的発現がみられた。前立腺モデル細胞（LNCaP細胞等）での十分な機能検証には至らなかったが、アンドロゲン類によるPAMT1発現の上昇がLNCaP細胞でみられたことより、アンドロゲン類による誘導条件下において、PAMT1がポリアミントランスポーターとしての生理的役割を持つ可能性が示唆された。また、関連の研究成果として、OAT10等のオロト酸トランスポーターとしての機能を見出した。新たなポリアミントランスポーター候補も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PAMT1の機能特性及び関連情報の把握は、PAMT1を介した薬物送達、PAMT1を標的としたポリアミン関連疾患治療薬の開発、PAMT1の機能変動を踏まえたポリアミン関連疾患治療法の考案等の可能性に向けた応用取組みのための基盤として重要である。本研究では、そのような応用へ向けての基礎的な情報集積を図るものとしての成果を挙げることができた。

研究成果の概要（英文）：We could make a progress in elucidating the molecular function of PAMT1 as a newly found transporter for polyamines. In addition, in the evaluation of the tissue distribution of PAMT1 (mRNA), PAMT1 was found to be specifically expressed in the prostate. Although we could not fully demonstrate the functional expression of PAMT1 in prostate-derived model cell lines such as the LNCaP cell, PAMT1 expression was found to be increased by androgens, suggesting that PAMT1 may play a physiological role as a polyamine transporter under the conditions in which it is induced by androgens. As related research outcomes, we newly found the orotate transport function of OAT10 and a few other transporters. We also found another novel polyamine transporter candidate.

研究分野：薬物動態学

キーワード：トランスポーター ポリアミン スペルミジン スペルミン ブトレシン 前立腺 薬物送達 創薬標的

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ポリアミン類は、細胞増殖、シグナル伝達等に関わる重要な生理活性物質として知られている。その供給については、体内で生合成される他、栄養物質としての体外からの摂取にも大きく依存しており、体内では、各種生成臓器や吸収臓器である腸管から循環血を経て諸臓器への再分布が生じている。その吸収及び分布過程において必須となる細胞膜透過に際しては、多くの生理活性物質・栄養物質等で一般にみられるように、特異的なトランスポーター(細胞膜内在性輸送タンパク質)に関わる機構により、効率的な輸送が行われると同時に、その調節・制御がなされていると考えられている。一方、高水溶性という特徴から、細胞膜(脂質膜)への分配を要する単純拡散機構での非特異的な膜透過性は低いとみられている。

トランスポーターの関与を示唆するポリアミン類の特異的取込現象は種々の細胞や臓器で知られており、それに基づいて、ポリアミン輸送系の概念が定着している。しかし、ヒトをはじめとする哺乳動物において、その分子実体となるトランスポーターは未同定であり、ポリアミン輸送系の存在の実証という基礎的な観点、及びその機能特性の十分な把握に基づく関連の薬物療法等の展開という応用的な観点から、その同定が大きな課題となっている。各種トランスポーターの同定が進む中で、未同定のままで残るポリアミントランスポーターは、同定が待たれる重要なトランスポーターとなっている。

このような状況の下に、我々は、ポリアミン輸送系の分子実体となるトランスポーターの同定に取組み、ポリアミン特異的とみられる輸送活性を有するトランスポーターを見出すことに成功した。これを polyamine transporter 1 (PAMT1) と称する。PAMT1 は、ヒトをはじめとする哺乳動物において同定された初の特異的なポリアミントランスポーターとなるもので、機能未知とされているヒトのトランスポーター様タンパク質群を対象とした遺伝子導入発現系細胞でのポリアミン輸送活性スクリーニングにより見出された。なお、輸送評価のためのポリアミン基質としてはスペルミジンを、遺伝子導入用の宿主細胞としては COS-7 細胞を用いた。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子導入発現系細胞での解析により、ヒト PAMT1 の分子レベルでの機能解明を目指した。また、ヒト由来モデル細胞系での解析により、細胞レベルでの PAMT1 の機能の検証及び生理的役割(ポリアミン関連の生理現象における役割)の解明を目指した。PAMT1 はポリアミン特異性の高いトランスポーターとみられるが、ポリアミン類似の医薬品等を基質として認識し、細胞内デリバリー経路となる可能性はあり得る。また、生体内因性及び外因性の物質が PAMT1 に対して阻害物質等として作用し、その機能の調節要因ないし変動要因となる可能性も考えられる。このような観点から、その機能特性及び関連情報の把握は、PAMT1 を介した薬物送達、PAMT1 を標的としたポリアミン関連疾患治療薬の開発、PAMT1 の機能変動を踏まえたポリアミン関連疾患治療法の考案等の可能性に向けた応用取組みのための基盤として重要である。本研究は、独自に見出した PAMT1 の機能及び生理的役割の解明を図り、ポリアミン輸送機構研究の新局面を切り拓こうとする点で独自性・創造性の高いものであり、その成果には、応用利用の可能性を含めて、大きな波及効果が期待される。

3. 研究の方法

遺伝子導入発現系細胞でのヒト PAMT1 の機能解析、ヒト由来モデル細胞系での PAMT1 の機能及び生理的役割の解析を中心に取組んだ。遺伝子導入発現系の宿主細胞としては、細胞の持つポリアミン輸送活性が低い点で最適である COS-7 細胞を用いた。PAMT1 の輸送機能の解析においては、ポリアミンとして ^3H 標識のスペルミジン (spermidine) を用い、細胞内取込輸送の評価・解析を行った。

関連のトランスポーター探索において見出されたオロト酸 (orotate) のトランスポーター群については、細胞の持つオロト酸輸送活性が低いという特徴を持つ HEK293 細胞及び MDCKII 細胞を宿主細胞とした遺伝子導入発現系細胞での、 ^3H 標識の orotate の細胞内取込輸送の評価・解析等を行った。

また、PAMT1 及び関連のトランスポーターの発現状況の評価のため、リアルタイム PCR 法による mRNA 発現量の測定、ウェスタンブロット法によるタンパク検出を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子導入発現系細胞でのヒト PAMT1 の機能

ヒト PAMT1 の遺伝子導入一過性発現系 COS-7 細胞での検討において、PAMT1 の spermidine に対する高い取込輸送活性が見出された。その輸送は、 Na^+ 及び Cl^- に対する明確な依存性を示さない一方で、中性域を至適とする pH 感受性を示した。また、膜電位非依存性であった。速度論的解析では、PAMT1 による spermidine 輸送はトランスポーターによる輸送において特徴的な飽和性を示し、そのミカエリス定数は $0.454 \mu\text{M}$ であった。これまでに、分化型 THP 細胞(マクロファージ様モデル細胞)においてポリアミン輸送系の存在が知られているが、膜電位依存性の特徴

を持つことから、膜電位非依存性である PAMT1 とは別種のトランスポーターが働いているものと考えられる。

さらに、ヒト PAMT1 による spermidine 輸送に対する生体内因性ポリアミン類 (spermine、putrescine、agmatine、cadaverine) の特異的阻害効果がみられた。特に spermine の阻害活性が強く、spermidine 輸送のミカエリス定数と同等レベルの阻害定数 (0.285 μM) を示した。その阻害が競合様式であった点と合わせて、spermine も spermidine と同様に PAMT1 の良好な基質である可能性が高いと考えられる。また、その他のポリアミン類についても、PAMT1 の基質である可能性が考えられる。一方、カチオン性生理活性物質群 (histamine、thiamine 等) カチオン性薬物群 (cimetidine、diphenhydramine 等) は阻害効果を示さず、PAMT1 に対する親和性はないとみられた。以上の結果は、PAMT1 がポリアミン類に対する特異性の高いトランスポーターであり、その細胞内取込の制御において生理的に重要な役割を有している可能性を示唆するものである。

(2) 各種臓器及び細胞株における PAMT1 発現

細胞レベルでの PAMT1 の機能及び生理的役割の解析に用いる細胞株の選別、臓器あるいは細胞特異的な PAMT1 の生理的役割の解析等のための参照情報を得るため、リアルタイム PCR 法により PAMT1 (mRNA) の発現状況を検討した。各種臓器に関する検討では、前立腺での特異的発現がみられ、生理的役割を有している可能性が示唆された。一方で、脳、肝臓、腎臓、小腸等の主要臓器を含めて、前立腺以外での発現はほとんどみられなかった。これを受け、前立腺モデル細胞 (PC-3、LNCaP、DU-145) での検討を行ったが、何れにおいても、PAMT1 発現は低く、PAMT1 高発現細胞を見出すことはできなかった。

(3) モデル細胞系での PAMT1 の機能及び生理的役割

前立腺モデル細胞 (PC-3、LNCaP、DU-145) では、spermidine 輸送活性は低く、mRNA 発現レベルに加えて、機能面でも、PAMT1 発現を示唆する知見は得られなかった。

引き続き、LNCaP 細胞 (前立腺モデル細胞) において、ポリアミン取込誘導効果が知られているアンドロゲン類の影響を検討した。アンドロゲン類として、testosterone、dihydrotestosterone、R1881 (合成アンドロゲン) を取り上げた。何れについても、PAMT1 の mRNA 発現及び spermidine 取込を上昇させる傾向がみられ、PAMT1 のタンパク発現を上昇させた例 (R1881) も見られた。さらに検証を要するが、これらの結果は、PAMT1 がアンドロゲン類による誘導を受け、そのような条件下においてポリアミントランスポーターとしての生理的な働きをしている可能性を示唆するものである。

(4) 他のポリアミン及び関連トランスポーターの探索

新規ポリアミントランスポーター候補

他のポリアミントランスポーター等の探索にも平行して取組んだ。これにより、新たにポリアミン輸送活性を持つトランスポーター様タンパク質 (ポリアミントランスポーター候補) を見出すことができた。引き続き、その機能解析等に取組むことを計画しているところである。

新規オロト酸トランスポーターとしての OAT10 の機能的同定

ポリアミントランスポーターとは異なるが、腎尿細管上皮細胞で働くアニオントランスポーターとして知られる organic anion transporter 10 (OAT10) が核酸代謝等に関わる生理活性物質である orotate に対する輸送活性を持つことが新たに見出された。ヒト OAT10 の遺伝子導入一過性発現系 HEK293 細胞及び安定発現系 MDCKII 細胞での検討の結果、既に知られている urate transporter 1 (URAT1) の orotate 輸送活性及び OAT10 の尿酸 (urate) 輸送活性との比較という観点から、OAT10 の orotate 輸送活性は腎尿細管での orotate 再吸収に関与し得るレベルのものであることが示唆された。

ヒト OAT10 の orotate 輸送機能の解析では、2 相性の濃度依存的輸送特性がみられたことから、2 つの異なる基質認識部位がある可能性が示唆された。また、OAT10 は URAT1 と比較して低親和性の orotate トランスポーターであることが示唆された。阻害剤に関する検討では、OAT10 阻害剤として知られる種々の薬物等の阻害効果が確認された他、kynurenate 類等が新たな阻害剤として見出された。さらに、Cl⁻依存性がみられたことから、OAT10 は Cl⁻濃度の高い細胞外からの orotate の取込輸送に有利な特性を有していると考えられる。これは、尿細管上皮細胞の刷子縁膜において orotate の再吸収過程での細胞内取込に働くとみられる OAT10 の役割に適合するものであった。なお、2 相性の濃度依存的輸送特性及び Cl⁻依存性は、OAT10 の輸送機能特性としては、新たに見出された特徴的なものである。

一方、ラット OAT10 では、ヒト OAT10 と異なり、orotate 輸送機能が欠如していることが示唆された。また、マウス OAT10 の orotate 輸送機能も極めて低いことが示唆された。このような動物種差のため、両げっ歯類は、OAT10 が関与する orotate 動態及び関連研究での利用には適さないと考えられる。これは、orotate 動態の解析における実験動物の利用に関わる基礎情報として有用なものである。

その他の新規オロト酸トランスポーターの機能的同定

sodium-dependent monocarboxylate transporter 2 (SMCT2) 及び equilibrative nucleobase transporter 1 (ENBT1) もオロト酸輸送機能を持つことが新たに見出された。共に、遺伝子導入一過性発現系 HEK293 細胞での検討によるものである。SMCT2 については、 Na^+ 依存性の低親和性オロト酸トランスポーターとしての機能が示唆された。その高発現臓器である腎臓(尿細管上皮細胞刷子縁膜に局在)でのオロト酸再吸収への関与の可能性が考えられる。ENBT1 については、促進拡散型(Na^+ 及び Cl^- に対して非依存性)の低親和性オロト酸トランスポーターとしての機能が示唆された。その高発現臓器である肝臓(実質細胞血管側膜に局在)でのオロト酸の取込及び排出への関与の可能性が考えられる。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinoda Yutaro, Yamashiro Takahiro, Hosooka Akira, Yasujima Tomoya, Yuasa Hiroaki	4. 巻 43
2. 論文標題 Functional characterization of human organic anion transporter 10 (OAT10/SLC22A13) as an orotate transporter	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2021.100443	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠田裕太郎, 細岡晶, 保嶋智也, 山城貴弘, 湯浅博昭
2. 発表標題 オロト酸トランスポーターとしてのヒトOAT10の機能的同定
3. 学会等名 第36回日本薬物動態学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠田裕太郎, 細岡晶, 保嶋智也, 山城貴弘, 湯浅博昭
2. 発表標題 オロト酸トランスポーターとしてのSMCT2の機能的同定
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高見華奈, 保嶋智也, 山城貴弘, 湯浅博昭
2. 発表標題 ENBT1のオロト酸輸送機能
3. 学会等名 第43回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本遥香, 高見華奈, 保嶋智也, 山城貴弘, 湯浅博昭
2. 発表標題 ENBT1/SLC43A3によるオロト酸輸送: HEK293細胞一過性発現系及びHepG2細胞での解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
研究分担者	保嶋 智也 (Yasujima Tomoya) (50753555)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師 (23903)	
研究分担者	山城 貴弘 (Yamashiro Takahiro) (20826614)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・助教 (23903)	

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
---------	---------