

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07173

研究課題名（和文）血液精巣関門インフラックス輸送機構の解明と精巣内薬物送達への応用

研究課題名（英文）Influx transport system for nutrients and drugs at the blood-testis barrier and its application

研究代表者

久保 義行（Kubo, Yoshiyuku）

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：20377427

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）：本研究課題では、血液精巣関門に存在するインフラックス輸送機構に着目し、その薬物送達への応用に向けた基盤を構築することを目的とした。

栄養物であるtaurineに着目し、in vivoおよびin vitro解析を実施した結果、血液精巣関門におけるtaurine輸送にタウリントランスポーター（TAUT/SLC6A6）の寄与を明らかとした。また、核酸系逆転写酵素阻害薬であるzidovudineに着目して解析を実施した結果、血液精巣関門におけるzidovudine輸送機構の存在とその基質特異性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で採用したin vivoおよびin vitro解析手法によって、血液精巣関門を介した栄養物・薬物インフラックス輸送機構の一端が明らかとなった。精巣では、精子形成などに加え、腫瘍やヒト免疫不全ウイルス（HIV）などの感染症、男性不妊、精巣毒性といった病態が知られる。Taurineは精子形成に重要な栄養物であり、zidovudineは精巣関門を透過可能な抗ウイルス薬であることから、これら疾患の原因究明や薬物療法向上に有用な知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the influx transport mechanism in the blood-testis barrier (BTB). The analyses by means of in vivo and in vitro approaches showed the facilitative taurine transport system in the BTB, and the knockdown analysis suggested the involvement of taurine transporter, TAUT/SLC6A6, there. In addition, in vivo and in vitro approaches were applied to the study of zidovudine, a nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor (NRTI). The results showed the carrier-mediated influx transport system for zidovudine at the BTB, and its substrate specificity would be helpful in the development of brand-new NRTIs.

研究分野：分子生物薬剤学

キーワード：血液精巣関門 膜輸送 トランスポーター セルトリ細胞 タウリン HIV 抗ウイルス薬

1. 研究開始当初の背景

薬物の吸収や分布、排泄に重要な薬物輸送機構を担うトランスポーターの研究は、薬物動態予測の精密化や薬物送達法の開発に繋がり、これにより安全な医薬品創成と適切な薬物療法の実施が期待される。本研究では、血液精巣関門において循環血液側から精細管内腔への物質輸送を担うインフラックス輸送機構に着目し、その生理学的意義と薬剤学的有用性の両面を検証する。血液精巣関門は Sertoli 細胞同士の密着結合で形成されており、これが血液と精細管内腔を隔離するとともに、血液精巣関門を介した栄養物供給 (インフラックス輸送) や老廃物排泄 (エフラックス輸送) によって、精子形成に至適な精細管内環境が維持・制御されると想定される。精巣では、腫瘍やヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) などによる感染症、不妊症、生殖毒性などの病態が知られ、その治療法向上には、血液精巣関門インフラックス輸送機構を創薬応用した新規薬物送達法の開発や薬物動態予測・毒性回避が期待された。

2. 研究の目的

血液精巣関門インフラックス輸送機構は、生殖やホルモン分泌を担う精巣内部の恒常性維持に寄与する重要な生理機構である一方、これに関わる知見・理解は不十分と言わざるを得ない。本研究では血液精巣関門に、1) どのようなインフラックス輸送機構が存在するか?、2) どのような機能特性を有するか?、3) 分子実体は何か?、4) どのように方向性輸送を担うか?、5) 個体でどのような役割を有するか?、などを解析する。これによって、血液精巣関門に存在する多様なインフラックス輸送機構を分子レベルで解明し、その生理的重要性と薬剤学的有用性を明らかとし、血液精巣関門インフラックス輸送機構を薬物送達に応用するための基盤を構築する。

3. 研究の方法

血液精巣関門における³H]taurine や³H]zidovudine (azidothymidine; AZT)の移行性や輸送を評価するために *in vivo* および *in vitro* 解析を実施した。*In vivo* 解析法として、integration plot 解析を実施し、*in vitro* 解析として、マウス由来 Sertoli 細胞株 (TM4 細胞) における取り込み輸送解析を実施した。*In vitro* 解析において、細胞への取り込み量は cell/medium ratio (C/M ratio) として算出した。TauT (SLC6A6) に関しては、siRNA を用いたノックダウン解析を実施するとともに、発現解析として、Western blot 解析や定量的 real-time PCR、免疫組織学的解析で実施した。

4. 研究成果

男性不妊症の発症には精巣内酸化ストレスが関与し、精子の形成数減少および運動能低下などの造精機能障害を誘発することが報告されている。準必須アミノ酸である taurine は酸化作用を示すことが知られており、特に精巣では、酸化ストレスに起因する造精機能障害が taurine の経口投与によって改善することが報告されている。このため、循環血液から精巣内への taurine 移行過程の解明が taurine の男性不妊治療への応用に有益な知見となると考えられた。マウスを用いた integration plot 解析の結果、³H]taurine の精巣移行クリアランスが、難透過性マーカーの精巣移行クリアランスと比して約 3 倍高値を示したことから、血液精巣関門には、taurine を循環血液から精細管内腔へ輸送する機構の存在が示唆された。TM4 細胞における³H]taurine 取り込み解析を実施した結果、温度依存性や濃度依存性が示され、血液精巣関門における taurine 輸送が担体介在型輸送であると示唆された。TM4 細胞における³H]taurine 輸送の k_m 値は 13.5 μM と見積もられ、既知の taurine transporter (TauT/SLC6A6) を介した taurine 輸送の k_m 値 (4.5 μM) と近似した。TM4 細胞による³H]taurine 取り込みは、TauT の基質である β -alanine や hypotaurine によって有意に阻害され、血液精巣関門における taurine 輸送に TauT の関与が示唆された。TauT をターゲットとしたノックダウン解析の結果、TM4 細胞における³H]taurine 取り込みと TauT タンパク質発現量はそれぞれ 53% および 57% 減少したことから、血液精巣関門での taurine 輸送における TauT の寄与率は 90% 以上と算出された。マウス精巣を用いて免疫組織化学的解析を実施した結果、生殖細胞や血液精巣関門の実体細胞である Sertoli 細胞に TauT の発現が示唆された。以上から、血液精巣関門における循環血液から精巣、特に生殖細胞への taurine 輸送の大部分が TauT によって担われることが示唆された。

HIV は免疫機能低下や関連の日見感染や神経機能障害などを誘発する重篤な疾患である。主要な HIV 感染媒体の 1 つとして精液が挙げられ、血液中に HIV が検出されない患者においても、精巣において検出されるケースが知られる。HIV は循環血液と精細管内腔を隔てる血液精巣関門を経て精細管内腔に侵入し、血液中の HIV 治療薬を回避することから、より優れた HIV 治療の実現に BTB を介した効率的な HIV 治療薬送達法の開発が重要となる。HIV 治療薬の多数は関して低い精液移行性が知られる一方、逆転写酵素阻害剤 (nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI) である zidovudine (azidothymidine; AZT) は、

その積極的な精液中への移行性が報告されている。このため、血液精巣関門には AZT を循環血液から精細管内腔に輸送する機構の存在が考えられた。マウスを用いた **integration plot** 法の結果から、 $[^3\text{H}]\text{AZT}$ の精巣移行クリアランスは難透過性マーカーに比して約 2 倍高いことが示され、血液精巣関門において AZT を循環血液から精細管内腔へ輸送する機構が示唆された。TM4 細胞による $[^3\text{H}]\text{AZT}$ 取り込みは、温度依存性および濃度依存性 ($k_m = 20 \mu\text{M}$) を示し、血液精巣関門における AZT 輸送が担体介在型輸送であることが示唆された。AZT を基質とする分子として、ENT2 や Na^+ 依存性ヌクレオシドトランスポーター・CNTs、有機アニオントランスポーター・OATs のなどが知られるが、各種依存性解析や阻害解析の結果、AZT 輸送機構におけるこれら分子の寄与は小さいことが示唆された。TM4 細胞では、非標識 AZT や thymidine によって $[^3\text{H}]\text{AZT}$ 取り込みが顕著に阻害された。さらに、多様なヌクレオシドアナログを用いた解析を実施した結果、AZT 輸送機構が pyrimidine 塩基の 2'-deoxynucleoside を選択的に認識することが示された。以上から、血液精巣関門における AZT 取り込み輸送機構に新規トランスポーター分子の関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Takeru Ito, Yoshiyuki Kubo, Shin-Ichi Akanuma, Ken-Ichi Hosoya	4. 巻 12
2. 論文標題 Functional characteristics of 3'-azido-3'-deoxythymidine transport at the blood-testis barrier.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2022.122044	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 Yoshiyuki Kubo, Sakiko Ishizuka, Takeru Ito, Daisuke Yoneyama, Shin-Ichi Akanuma, Ken-Ichi Hosoya	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of TauT/SLC6A6 in Taurine Transport at the Blood-Testis Barrier	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo12010066	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保 義行、清水 雄斗、赤沼 伸乙、細谷 健一
2. 発表標題 血液精巣関門における担体介在型nicotine輸送の特徴
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 伊藤 武、久保 義行、赤沼 伸乙、細谷 健一
2. 発表標題 血液精巣関門 (BTB) における3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) 輸送機構
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水雄斗、久保義行、赤沼伸乙、細谷健一
2. 発表標題 血液精巢関門におけるnicotineの輸送特性
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京大学薬学部薬物動態学研究室 https://www.bbb-teikyo.com/blank
--

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	細谷 健一 (Hosoya Ken-ichi) (70301033)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	
研究分担者	赤沼 伸乙 (Akanuma Shin-ichi) (30467089)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授 (13201)	

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