

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659085

研究課題名（和文） 樹状細胞に高発現する小胞体膜局在性トランスポーターの機能と免疫系における役割

研究課題名（英文） Functional Characteristics of a Novel Transporter Specifically Expressed in the Endoplasmic Reticulum in Dendritic Cells and its Role in Immune System

研究代表者

湯浅 博昭 (YUASA HIROAKI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20191471

研究成果の概要（和文）：蛍光性プローブ基質としての 5-AF (5-aminofluorescein) の細胞内（小胞体部位）局在集積性評価により，ヒト VOAT1（樹状細胞小胞体膜局在性トランスポーター）に対する抗アレルギー薬群，抗炎症薬群，内因性の脂肪酸（酸化物）類等の特異的阻害活性が見い出された．VOAT1 が脂質性メディエーター類の輸送を介して炎症ないし免疫に関与し，また抗アレルギー薬の薬効にも関与する可能性を示唆する知見であり，定性的（蛍光画像）評価レベルではあるが，VOAT1 の機能特性評価が大きく進展した．ただし，定量的輸送活性評価による裏付けの点で，課題が残った．

研究成果の概要（英文）：Functional characteristics of human vesicular organic anion transporter 1 (VOAT1) were examined by assessing the cellular uptake (accumulation in the endoplasmic reticulum) of 5-aminofluorescein (5-AF) as a fluorescent probe substrate, based on the observation of fluorescent microscopic images. 5-AF uptake was found to be specifically inhibited by several anti-allergic drugs, anti-inflammatory drugs, and endogenous fatty acids, including their oxidative products. These findings suggest that VOAT1 might be involved in the transport of lipid mediators and, thereby, play a role in inflammatory and immunologic processes. It might also be involved in the pharmacologic action of anti-inflammatory drugs. Thus, we could obtain valuable information about the functional characteristics of VOAT1, although it needs to be further validated by quantitative assessments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：トランスポーター，樹状細胞，小胞体，免疫，抗アレルギー薬，創薬標的

1. 研究開始当初の背景

免疫は，1 型ヘルパー T (Th1) 細胞等が担う細胞性免疫と，2 型ヘルパー T (Th2) 細胞等で産生される抗体等が担う体液性免疫からなる．アレルギー疾患には体液性免疫の関与が大きく，Th1 細胞と Th2 細胞とのバラン

スが後者に傾くと (Th1/Th2 比の低下)，IgE 増を経てアレルギーの悪化に繋がる．このため，アレルギー体質の改善には Th1/Th2 比を増大させることが重要とされている．Th1/Th2 バランスの制御には，異物を認識して他の免疫細胞に情報を伝える樹状細胞が

重要な役割を担っており、そのメカニズムの把握は、アレルギー疾患への対処（病態解析、抗アレルギー薬開発を含む治療法の考案）のための基盤として役立つものと期待される。

一方、生体において必要とされる様々な内因性及び外因性物質の体内動態がトランスポーターにより制御されていることが広く認識されるようになってきた。しかし、免疫系におけるトランスポーターの役割を探る取り組みはほとんどなされておらず、未開拓の領域となっている。

そこで、我々は、薬物及び栄養物質等のトランスポーターの同定及び機能解析の経験を生かしながら、免疫系関連のトランスポーターの探索に取り組むことにし、樹状細胞に焦点を当てて検討を開始した。パイオインフォマティクな遺伝子（EST）データベース検索により、樹状細胞に高発現する機能未知のトランスポーター様タンパク質をコードする遺伝子を選別した後、クローン化遺伝子導入発現系細胞（一過性発現）での輸送活性評価により基質検索を行うことにより見いだされたのが、VOAT1 である。基質として見いだされたのは、非生理的な蛍光物質である 5-AF (5-aminofluorecein) であるが、蛍光検出の簡便性を利用し、5-AF (蛍光) の細胞内取り込み状況の画像評価（視覚的把握）により、VOAT1 に関する予備的な評価を行うことができた。特筆されるのは、第 1 に、5-AF を小胞体とみられる細胞内小器官に点在的に局在化集積させる点であり、小胞体膜に局在して物質輸送に働いているものとみられた。第 2 に、抗アレルギー薬である tranilast によって強く阻害される点であり、VOAT1 が tranilast の作用点となっている可能性が考えられた。また、VOAT1 の免疫系における重要な役割が予想された。

2. 研究の目的

本研究では、まず、5-AF (蛍光) の細胞内（小胞体内）集積の評価に基づく VOAT1 の機能特性の把握を目指した。特に、阻害活性を指標とした阻害物質/競合基質（生理的基質候補を含む）の検索を重視し、VOAT1 の免疫系における役割を探ることとした。

5-AF は蛍光性プローブ基質として有用であり、生理的基質が特定された後も、阻害剤スクリーニングをはじめとする VOAT1 機能の迅速評価に利用可能である。しかし、VOAT1 による小胞体内局在化集積性が不利な要因となり、十分な定量精度を確保できない。そこで、その技術的克服にも取り組んだ。

3. 研究の方法

VOAT1 は細胞内（小胞体膜）局在性であるため、基質輸送の結果としての細胞（小胞体）内への基質集積が不十分であり、輸送活性評

価の定量性が確保できていない。一方で、現状において、5-AF (蛍光性プローブ基質) を用いることにより、その局在化集積状況の定性的な蛍光画像評価（視覚的把握）は容易である。

そこで、まず、VOAT1 遺伝子導入発現系細胞 (HEK293 細胞を用いた安定発現系) を用い、小胞体膜における VOAT1 の輸送機能特性に関して、定性的なレベルでの評価を進めた。特に、5-AF 集積に対する阻害活性に基づいて競合基質を含む阻害物質を選別することによる免疫系関連の生理的基質、特異的阻害剤の検索に重点を置いた。なお、試験に際しては、ジギトニンによる細胞膜バリア低減処理によって、各種試験物質等の小胞体膜近傍への移行性を高め、VOAT1 に対する効果が検出し易くなるようにした。

並行して、定量的輸送活性評価のための方策として、VOAT1 を細胞膜に強制局在化させることを試みた。その手法としては、酵母の Ist2p (細胞膜タンパク質) 由来の細胞膜局在化配列 (Ist2p/Ct) の付加による VOAT1 の細胞膜への強制局在化、VOAT1 の小胞体膜局在化配列の不機能化を試みた。これは、VOAT1 を細胞膜を介する基質輸送に働かせることにより、定量評価に十分な細胞内取り込み量を確保することを目指したものである。

4. 研究成果

(1) VOAT1 による 5-AF 輸送に対する阻害物質の検索

VOAT1 の基質等認識特性を探ると共に、その生理的基質及び免疫系における役割を探るため、5-AF の細胞内（小胞体内）局在化集積に対する各種薬物等の阻害活性を検討した。実験にあたっては、薬物等の濃度を 100 μM 、10 μM 、1 μM と段階希釈し、阻害効果の強さを検討した。

① 抗アレルギー薬・抗炎症薬等の影響

100 μM の高濃度においては、tranilast, montelukast, pranlukast, zafirlukast 等の抗アレルギー薬や glibenclamide, benzbromarone, WY-14643 の強い阻害活性が見いだされた。また、indomethacin, diclofenac, etodolac, mefenamic acid といった非ステロイド性抗炎症薬、furosemide, sulfapyrazone, A0-128 にも中程度の阻害活性がみられた。これらについて、10 μM に濃度を下げて検討を行った結果、非ステロイド性抗炎症薬群、WY-14643, furosemide, sulfapyrazone, A0-128 の阻害活性はほとんどみられなくなったが、抗アレルギー薬群、glibenclamide, benzbromarone については依然として強い阻害活性がみられた。さらに、濃度を下げて 1 μM にすると、tranilast, pranlukast を除いては阻害活性がほとんど

みられなくなった (図1). また, tranilast の阻害活性は最も強く, さらに低濃度の0.1 μM においてもみられた. tranilastの臨床用量での最高血中濃度(C_{max})は38.5 μM に達する. 血漿タンパク結合率 (約81.7%)を考慮しても, 非結合型濃度が約7 μM となり, VOAT1阻害活性の認められた0.1 μM を大きく上回る. したがって, 臨床使用時においてtranilastのVOAT1に対する強い阻害が想定され, tranilastの薬効あるいはその他の作用と関連がある可能性が考えられる.

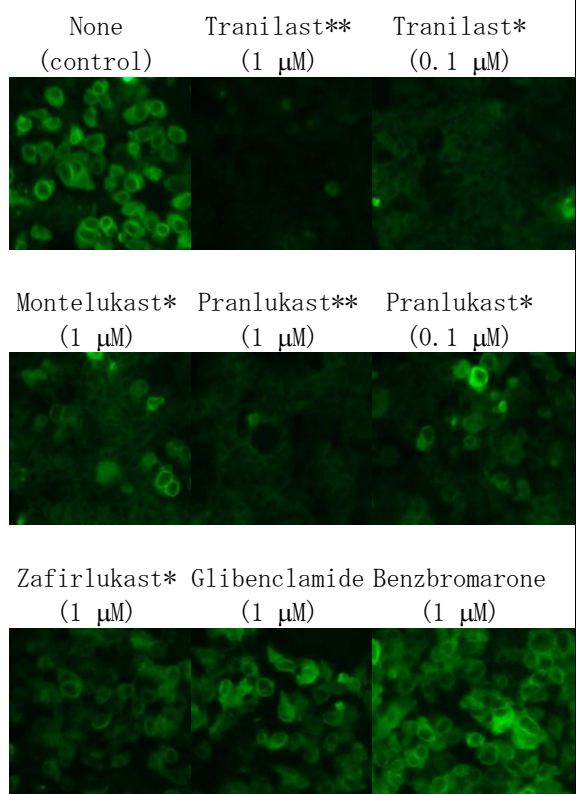


図1. VOAT1による5-AFの細胞内局在化集積に対する抗アレルギー薬・抗炎症薬等の影響

VOAT1安定発現系HEK293細胞における5-AFの取り込みを(10 μM , 30 min, 37°C, pH 7.4), ジギトニン(100 μM)による細胞膜バリア低減処理(5 min, 37°C)の後に検討した. **, 強い阻害; *, 中程度の阻害.

② フラボノイド類の影響

VOAT1が抗アレルギー薬の作用点となっている可能性が示唆されたが, 一方, フラボノイド類には抗酸化作用等を有し, 抗アレルギー的に働くものがあり, 注目されている. そこで, その種のフラボノイド類(100 μM)が抗アレルギー薬と同様にVOAT1阻害活性を有する可能性を考え, 検討を行った. その結果, 強いVOAT1阻害活性を有するものとして, baicaleinとmorinの2種類が見い出された.

また, luteorin, fisetin, apigenin, myricetin, quercetinがやや弱いながら阻害活性を示した. しかし, VOAT1に対する阻害活性の強弱と各種フラボノイドの生理活性強度との相関性は低く, フラボノイド類の作用点としてのVOAT1の役割が明確となるには至らなかった.

③ 脂肪酸(及び酸化物)類の影響

5-AFを用いたVOAT1輸送活性評価は, 簡便なトランスポーター機能評価の手段としての蛍光基質の利用の有用性を示すよい例である. しかし, この蛍光試薬は生体内因性物質ではないため, 一方で生体機能に関わる内因性基質の存在が想定されるところであり, その探索は重要な課題である. そのための取り組みとして, 様々な内因性物質を対象とし, VOAT1阻害活性を有する物質(内因性基質候補)の探索を試みた. その結果, VOAT1阻害活性を示す脂肪酸類(100 μM)が見出され, 特にlinoleic acid及びlinolenic acidの酸化物の阻害活性が強かった. 一方で, 興味深いことに, それらの非酸化体は阻害活性を示さなかった.

脂肪酸類はさまざまな生理的機能を有しており, 特にlinoleic acidやlinolenic acidのような不飽和脂肪酸類は生体内で酸化・代謝され, 種々の生体内反応に関わる例が多い. 炎症反応に関わる脂質メディエーター関連のものもある. VOAT1阻害活性を示した酸化型脂肪酸等がVOAT1の基質となっている可能性が考えられ, また, それを介して炎症ないし免疫に関与している可能性が考えられる. さらに, VOAT1阻害活性を示した抗アレルギー薬等の作用との関連性も考えられる.

なお, 核酸類(核酸塩基類, ヌクレオシド類), ステロイド類, ビタミン類, プロスタグランジン類, アミノ酸類についても検討したが, VOAT1阻害活性を有するものはなかった.

(2) VOAT1の細胞内局在性の制御の検討

定量的輸送活性評価のための方策として, VOAT1を細胞膜に強制局在化させることを考え, 酵母のIst2p(細胞膜タンパク質)由来の細胞膜局在化配列(Ist2p/Ct)の付加によるVOAT1の細胞膜への強制局在化, VOAT1の小胞体膜局在化配列の不機能化, による方法を試みた.

① Ist2pの細胞膜局在化配列の利用

酵母の細胞膜タンパク質であるIst2pは, trans-Golgiネットワークを介する一般的な膜移行メカニズムではなく, そのC末端にある特有の細胞膜局在化配列(Ist2p/Ct)の関わるメカニズムで直接的に小胞体から細胞膜へ移行する. そこで, Ist2p/Ctを融合付加

した VOAT1 修飾体を作製し、そのメカニズムを利用して細胞膜に強制局在化させることを試みた。その結果、局在性にいくらかの変化を生じたが、細胞膜への分布は認められず、Ist2p の細胞膜局在化シグナル効果は確認できなかった。しかし、C 末端修飾の影響が現れたものと考えられ、VOAT1 の小胞体膜へのソーティングにおける C 末端配列の役割が示唆された。

② VOAT1 の小胞体膜局在化配列の不機能化

VOAT1 の小胞体膜へのソーティングに関わる配列の同定をまず試みた。random mutagenesis 法により非特異的に変異を導入した VOAT1 変異体を作製、クローニングし、HEK293 細胞一過性発現系での局在の変化に関するスクリーニングを行った。局在に変化が現れたクローンの塩基配列を解読し、その配列をもとに特異的に point mutation を導入した VOAT1 変異体 (VOAT1-E455X) を作製した。VOAT1-E455X についてあらためて精査したところ、細胞内の小胞体以外の部位へのいくらかの移行がみられたが、細胞膜への分布はほとんどみられなかった。VOAT1 の細胞膜移行にはつながらなかったが、ソーティングにおけるこの部位 (配列) の役割が示唆された。なお、5-AF の局在化集積についても、細胞内分布の変化が大きくないことを反映し、顕著な変化は認められなかった。

(3) まとめ

VOAT1 が脂質性メディエーター類の輸送を介して炎症ないし免疫に関与し、また抗アレルギー薬の薬効にも関与する可能性を示唆する知見を得た。定性的 (蛍光画像) 評価レベルではあるが、VOAT1 の機能特性評価が大きく進展させることができた。

VOAT1 の輸送機能の定量的評価に向けての取り組みとしての細胞膜への強制的局在化手法の検討では、細胞膜局在化を達成するには至らなかったが、細胞内局在の若干の変化を惹起させ、また、局在性決定要因に関わるとみられる情報を得ることはできた。定量的輸送活性評価による VOAT1 機能の裏付けの点で、課題が残ったが、今後の研究展開に役立つ成果であると考えられる。

5. 主な発表論文等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 博昭 (YUASA HIROAKI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20191471

(2) 研究分担者

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

太田 欣哉 (OHTA KINYA)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90448704

(3) 連携研究者

なし