

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670600

研究課題名(和文) 動脈屈曲症候群ATS原因遺伝子GLUT10輸送基質同定からの疾患発症因子の解明

研究課題名(英文) Analysis of disease-onset by identifying the transport substrate for Arterial Tortuosity Syndrome (ATS) disease gene GLUT10

研究代表者

福田 宏嗣 (Fukuda, Hirotsugu)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：70526269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は動脈屈曲症候群ATS原因遺伝子として知られるグルコーストランスポーター10 (SLC2A10)のタンパク質としての機能、特に物質輸送能の解明から、血管病発症機序の解明と新規治療法開発のための標的分子の同定を行うことを目的とした。本事業期間、アフリカツメガエル卵母細胞を用いたGLUT10の輸送活性の解明を試み、GLUT10発現卵母細胞でのadenosineおよびglucoseの有意な取り込み増加を認めた。しかしその後輸送活性低下状況が続きGLUT10変異体輸送活性評価に至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the mechanism of onset for hereditary cardiovascular diseases and finding novel target for developing novel therapeutics by analyzing protein function of glucose transporter 10 (GLUT10) which is known as a cause of arterial tortuosity syndrome (ATS), particularly from the point of substrate transport. We performed the transport studies using Xenopus oocytes expression system and found that GLUT10 mediates the uptake of both glucose and adenosine significantly. But unfortunately, we could not proceed our further study due to the very low expression of GLUT10 protein in Xenopus oocytes and we could not reached a goal although we tried to overcome such problem that sometime happens in Xenopus oocytes system.

研究分野：医学

キーワード：動脈屈曲症候群 遺伝子変異 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

動脈屈曲症候群 (Arterial tortuosity syndrome: ATS) は、全身結合織の脆弱性に起因する稀な常染色体劣勢遺伝病で、動脈壁中膜弾性線維破壊による主要動脈における屈曲、伸長、狭窄、動脈瘤形成を主徴とする (Wessels *et al. Am J Med Genet*, 2004)。2006 年に、ATS 患者の遺伝子解析の結果、グルコーストランスポーターファミリーの GLUT10 (*SLC2A10*) がその原因遺伝子であることが指摘された (Coucke *et al, Nat Genet*, 2006)。そこで GLUT10 の Loss-of-function 変異が TGF シグナルの抑制因子である decorin のグルコース依存性転写減少がその発症機序である事が推測されたが、GLUT10 によるグルコースを含めた基質輸送は長らく未解明のままであった。最近 GLUT10 はミトコンドリアのビタミン C トランスポーターであるとの報告も出た (Lee *et al. Hum Mol Genet*, 2010) が、細胞への遺伝子強制発現を基にした実験であり、人工的な結果とも言える。

2008 年、研究分担者の安西らはグルコーストランスポーター GLUT9 が尿酸輸送体であり、その遺伝子変異により腎性低尿酸血症を発症することを世界に先駆けて報告した (Anzai *et al. J Biol Chem*, 2008)。安西らはアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた輸送基質未同定 (オフアン) トランスポーターの輸送基質探索を得意とし実績を残している。

申請者らは、ヒト血管内皮由来細胞 HUVEC に GLUT10 遺伝子が発現する事、および GLUT10 タンパク質の卵母細胞膜上での発現を見出し、さらには GLUT10 による RI 標識ヌクレオシドの取込み増加を確認したため、GLUT10 が細胞膜上ではヌクレオシドトランスポーターとして働く可能性を見出し、今回の申請に至った。

2. 研究の目的

GLUT10 が細胞膜のヌクレオシドトランスポーターとして働くか否かを解明することを目的とし、動脈屈曲症候群 ATS 疾患発症変異体におけるヌクレオシド輸送活性との関連性の検討を行う。

3. 研究の方法

1) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた GLUT10 によるヌクレオシド輸送活性の解析 (安西、Jutabha)

ヒト GLUT10 cDNA から *in vitro* transcription により作成した GLUT10 cRNA を microinjection 法により卵母細胞に注入し、2-3 日経過後に RI 標識ヌクレオシドをトレーサーとして用いる取込み実験を行う。これにより GLUT10 による時間依存性および濃度依存性、輸送駆動力などの輸送特性を明らかにする。さらにヌクレオシド類似化合物を用いて、GLUT10 による輸送がど

のような化合物と相互作用するかのリストを作成し、その後の GLUT10 作動薬・阻害薬創製に向けた基盤情報を得る。

2) 動脈屈曲症候群 ATS 起因 GLUT10 遺伝子変異体作成 (安西・福田)

これまでに動脈屈曲症候群 ATS 患者から見出されている GLUT10 の遺伝子変異体を、ヒト GLUT10 cDNA を鋳型として用いる部位指定突然変異法により作成し、その遺伝子配列をシーケンシングにより確認する。作成された変異体は次年度にその輸送活性測定に用いる。

4. 研究成果

本事業期間において、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた GLUT10 の輸送活性の解明を試みた。初年度である平成 25 年度に RI 標識 adenosine (0.5 μ M) 負荷により GLUT10 発現卵母細胞では cRNA の代わりに水を注入した対照卵母細胞に比し有意な取込み増加を認め、ヌクレオシド輸送活性を見出し、GLUT10 は細胞膜上に発現することを確認した。そこで ATS で同定されている 6 つのアミノ酸置換を伴う変異体の作成に移った。2 年目になる平成 26 年度に変異体の機能解析に進む予定であったが、GLUT10 発現卵母細胞での有意なヌクレオシド輸送が得られない状態となり、指標輸送基質の変更が必要となった。その結果 RI 標識グルコースが有意な取込みを示すことがわかり、補助事業期間の延長を申請し承認を得た。しかし最終年度になる平成 28 年度、有意なグルコース輸送活性を得ることができず、GLUT10 cRNA の再作成などを試みたが、状況の改善には至らず事業期間終了を迎えた。

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 10 件)

1. Tsuchiya G, Hori T, Onizawa N, Otani N, Tanaka-Nakadate S, Iseki T, Ouchi M, Hayashi K, Jutabha P, Anzai N, Oba T, Fukuda H. Molecular mechanism of the urate-lowering effects of calcium channel blockers. *Dokkyo J Med Sci*. 査読有, 43(1): 23-29, 2016.
2. Ljubojević M, Breljak D, Herak-Kramberger CM, Anzai N, Sabolić I. Expression of basolateral organic anion and cation transporters in experimental cadmium nephrotoxicity in rat kidney. *Arch Toxicol*. 査読有, 90(3):525-541, 2016. doi: 10.1007/s00204-015-1450-8
3. Mishima M, Hamada T, Maharani N, Ikeda N, Onohara T, Notsu T,

- Ninomiya H, Miyazaki S, Mizuta E, Sugihara S, Kato M, Ogino K, Kuwabara M, Hirota Y, Yoshida A, Otani N, Anzai N, Hisatome I. Effects of Uric Acid on the NO Production of HUVECs and its Restoration by Urate Lowering Agents. *Drug Res (Stuttg)*. 査読有, 66(5):270-274, 2016. doi: 10.1055/s-0035-1569405
4. Bulacio RP, Anzai N, Ouchi M, Torres AM. Organic Anion Transporter 5 (Oat5) Urinary Excretion Is a Specific Biomarker of Kidney Injury: Evaluation of Urinary Excretion of Exosomal Oat5 after N-Acetylcysteine Prevention of Cisplatin Induced Nephrotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 28(8):1595-602, 2015. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00176.
 5. Takayanagi K, Shimizu T, Tayama Y, Ikari A, Anzai N, Iwashita T, Asakura J, Hayashi K, Mitarai T, Hasegawa H. Downregulation of transient receptor potential M6 channels as a cause of hypermagnesiuric hypomagnesemia in obese type 2 diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有, 308(12):F1386-97, 2015. doi: 10.1152/ajprenal.00593.2013.
 6. Abe H, Kamai T, Hayashi K, Anzai N, Shirataki H, Mizuno T, Yamaguchi Y, Masuda A, Yuki H, Betsunoh H, Yashi M, Fukabori Y, Yoshida K. The Rho-kinase inhibitor HA-1077 suppresses proliferation/migration and induces apoptosis of urothelial cancer cells. *BMC Cancer*. 査読有, 14:412, 2014. doi: 10.1186/1471-2407-14-412.
 7. Anzai N. Organic solute transporters and diseases: potential therapeutic targets. *Curr Mol Pharmacol*. 査読有, 6(2):65, 2013.
 8. Hayashi K, Jutabha P, Endou H, Sagara H, Anzai N. LAT1 Is a Critical Transporter of Essential Amino Acids for Immune Reactions in Activated Human T Cells. *J Immunol*. 査読有, 191(8):4080-5, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1300923
 9. Hayashi K, Jutabha P, Kamai T, Endou H, Anzai N. LAT1 is a central transporter of essential amino acids in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Sci*. 査読有, 124(4):511-3, 2014.
 10. Nakata T, Matsui T, Kobayashi K, Kobayashi Y, Anzai N. Organic cation transporter 2 (SLC22A2), a low-affinity and high-capacity choline transporter, is preferentially enriched on synaptic vesicles in cholinergic neurons. *Neuroscience*. 査読有, 252: 212-221, 2013. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.011
- 〔学会発表〕(計6件)
1. 堀 貴行, 大谷直由, 大野雄太, 大内基司, 福田宏嗣, 安西尚彦. 腎排泄型動物モデルの創製とカルシウム拮抗薬の尿酸降下作用の検討. 第89回日本薬理学会年会. 2016年3月9日~11日. 横浜市.
 2. 堀 貴行, 大谷直由, 大野雄太, 大内基司, 福田宏嗣, 安西尚彦. 腎尿酸排泄型動物マウスの創製と尿酸降下作用の検討. 第49回日本痛風・核酸代謝学会総会. 2016年2月18日~19日. 豊中市.
 3. 安西尚彦, 大内基司, 大谷直由, Jutabha P. ヒトの尿酸代謝:オーバービュー. 第88回日本薬理学会年会. 2015年3月18日~20日. 名古屋市.
 4. 土屋 豪, 堀 貴行, 鬼澤信之, 大谷直由, 大内基司, Jutabha P, 福田宏嗣, 安西尚彦. カルシウム拮抗薬による尿酸降下作用の解析. 第48回日本痛風・核酸代謝学会総会. 2015年2月19日~20日. 新宿区.
 5. 土屋 豪, 鬼澤信之, 堀 貴行, Jutabha P, 大谷直由, 長谷川元, 福田宏嗣, 安西尚彦. Ca拮抗薬による尿酸降下作用の解析. 第37回日本高血圧学会年会. 2014年10月17日~19日. 横浜市.
 6. 土屋 豪, Jutabha P, 岡本和久, 花田健治, 阿部篤朗, 福田宏嗣, 安西尚彦. Molecular mechanism of urate-lowering effects of calcium channel blockers. 第87回日本薬理学会年会. 2014年3月21日. 仙台市.
- 〔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: 該当無し
6. 研究組織
- (1)研究代表者
福田 宏嗣 (HIROTSUGU FUKUDA)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70526269
 - (2)研究分担者
安西 尚彦 (ANZAI NAHIKO)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70276054

(3)連携研究者

Jutabha Promsuk (JUTABHA PROMSUK)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号： 9 0 5 4 1 7 4 8

(4) 研究協力者

土屋 豪 (GO TSUCHIYA)

獨協医科大学・医学部・大学院生

堀 貴行 (TAKAYUKI HORI)

獨協医科大学・医学部・大学院生

大野 雄太 (YUTA OHNO)

獨協医科大学・医学部・研究生