

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870695

研究課題名(和文) スフィンゴシン1リン酸輸送体を標的とした新規免疫抑制剤の開発

研究課題名(英文) Establishment of a rapid method for measuring sphingosine-1-phosphate transporter activity

研究代表者

小林 直木 (Kobayashi, Naoki)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：90532250

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)：スフィンゴシン1リン酸(S1P)は、赤血球から血液中に放出される物質であり、リンパ球が血液中で働くために必要不可欠である。私は、赤血球から血液中へS1Pを放出する働きを持つ“S1P輸送体”が新しい免疫抑制剤の標的として有望であると考えている。本研究では、蛍光物質を使ってS1P輸送体の働きを簡単に調べる方法を確立した。この方法は、赤血球のS1P輸送体の働きを抑制する薬を探すのに有用である。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a signal transmitter released from erythrocytes, and essential for migration of lymphocytes to the bloodstream. An S1P transporter, which exports the S1P from erythrocytes to blood plasma, can be considered a potential target for immune-suppressive drugs. In this study, a rapid method to measure the activity of erythrocyte S1P transporter was established. This method is useful for screening of drugs that possess the ability to suppress the activity of the S1P transporter in erythrocytes.

研究分野：細胞膜輸送体の機能と生理的役割

キーワード：蛍光プレートリーダー

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は、血漿中に存在する脂質メディエーターであり、主に赤血球、血小板、血管内皮細胞において産生され、細胞外へ放出される。特に、血管内皮細胞と赤血球は恒常的に S1P を血漿中へ放出していることから血漿中 S1P の主な供給源となっている。血漿中の S1P は、リンパ球の細胞膜に存在する S1P 受容体に結合し、リンパ球の遊走を促進することから、胸腺および二次リンパ組織から血液中へのリンパ球移動に必須である。

私たちはこれまでに、赤血球、血小板、血管内皮細胞からの S1P 放出が細胞膜の輸送体を介していることを明らかにしてきた。血管内皮細胞には、「SPNS2」という S1P 輸送体が存在し、血漿中の S1P 濃度とリンパ球数を正常に保つために必須であった。このようなことから私は血管内皮細胞や赤血球の S1P 輸送体が新規免疫抑制剤の有望な標的に成り得ると考えている。

2. 研究の目的

本研究開始時の研究目的は下記の通りである。

- (1) 赤血球を用いた S1P 輸送体阻害剤のスクリーニング系を確立し、赤血球 S1P 輸送体の阻害剤同定へつなげる。
- (2) 血管内皮細胞の S1P 輸送体 SPNS2 の安定発現細胞を用いた S1P 輸送体阻害剤のスクリーニング系を確立し、SPNS2 の阻害剤同定につなげる。
- (3) 光架橋性 S1P アナログを用いて、赤血球の S1P 輸送体を同定する。
- (4) S1P ビオチンを用いて、血小板の ATP 依存性および Ca^{2+} 依存性 S1P 輸送体を同定する。

本研究では、赤血球の S1P 輸送体に着目し、S1P 輸送体を阻害する化合物のスクリーニングに必要な、簡便で多検体処理可能な S1P 輸送体活性測定系の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) 赤血球からの NBD-S1P 放出解析

ラットの血液から調製した赤血球に NBD-スフィンゴシンを加え、37 °C で一定時間インキュベートした。NBD-スフィンゴシンは赤血球内でスフィンゴシンキナーゼ 1 によりリン酸化され、NBD-S1P が合成される。細胞内の NBD-S1P 量と細胞外の NBD-S1P 量を定量するため、赤血球懸濁液をバッファー (上清) と赤血球 (沈殿) に遠心分離し、それぞれ脂質抽出を行った。TLC により解析する場合には、改変した Bligh-Dyer 法により酸性条件下で脂質抽出を行った。TLC により脂質を展開後、ChemiDoc MP により、蛍光を発するバンドを撮影した。96 ウェル蛍光プレートリーダー

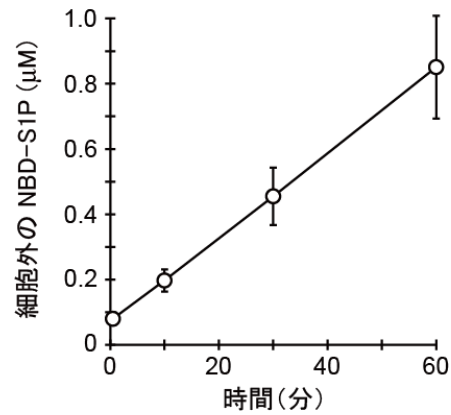


図 1. 赤血球からの NBD-S1P 放出

により解析する場合には、アルカリ性条件下で脂質抽出を行い、水層を分取後、ジメチルホルムアミドを添加し、蛍光を測定した。

(2) 脂質抽出を必要としない NBD-S1P 放出活性検出

赤血球懸濁液の遠心分離まで(1)と同様の手順で実験を行い、遠心分離したバッファー (上清) の蛍光を 96 ウェルプレートリーダーにより直接測定した。

4. 研究成果

(1) 赤血球からの NBD-S1P 放出

NBD-スフィンゴシンを赤血球に添加すると、細胞内へ取り込まれ、リン酸化されて NBD-S1P が合成された。合成された NBD-S1P は時間依存的に細胞外へ放出された (図 1)。赤血球からの NBD-S1P 放出は、細胞外からの刺激を必要とせず、時間依存的であるという点で、赤血球からの S1P 放出と同様であった。私はこれまでに、赤血球の S1P 輸送体が ATP 依存性であり、ABCA 輸送体の阻害剤である Glyburide により阻害されることを見いだしている。そこで、赤血球からの NBD-S1P 放出に対する Glyburide の影響を調べたところ、赤血球の S1P 輸送体と同様、Glyburide により阻害された。さらに、赤血球において、NBD-S1P が S1P 輸送体を介して輸送されるかどうかを検証するため、赤血球からの NBD-S1P や S1P の放出がそれぞれ細胞内の S1P や NBD-S1P による競合阻害を受けるかどうかを解析した。NBD-スフィンゴシンを赤血球とインキュベートし、細胞内で NBD-S1P を合成させた後、バッファーを除き、スフィンゴシンを含むバッファーもしくは含まないバッファーと交換した。その結果、スフィンゴシンを添加した場合には細胞内で S1P が合成され、それとともに NBD-S1P の細胞外への放出が阻害された (図 2 上)。また、スフィンゴシンと、その 10 倍もしくは 50 倍量の NBD-スフィンゴシンをバッファーに添加し、

S1P の放出を見たときには、細胞内 NBD-S1P により、細胞外への S1P 放出が阻害された(図 2 下)。以上の結果より、赤血球において NBD-S1P は S1P 輸送体を介し、細胞外へ放出されることを明らかにした。

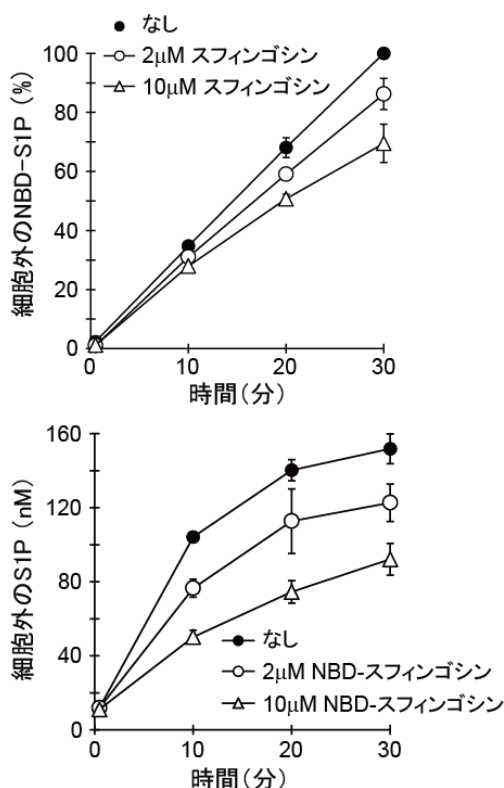


図 2 . 赤血球内 S1P 及び NBD-S1P による NBD-S1P 及び S1P 放出の競合阻害

(2) 赤血球からの NBD-S1P 放出解析における実験条件の最適化

本研究では、赤血球細胞外のバッファーからアルカリ性条件で脂質抽出し、水層の蛍光をプレートリーダーにより測定することで、赤血球から放出された NBD-S1P を定量することが分かった。これまで、S1P 輸送体の活性測定には、TLC, HPLC または LC-MS/MS による S1P の定量が必要であったが、本研究においてクロマトグラフィーによる S1P の分離を必要としない迅速な方法が確立できた。私はさらに、脂質抽出の方法を簡便にし、NBD-S1P の検出感度を上昇させるため、赤血球懸濁液の BSA 濃度、脂質抽出時の KCl 溶液・水・メタノール・ジメチルホルムアミド添加の有無・添加量を検討した。その結果、0.1% BSA を含むバッファーで赤血球をインキュベートし、脂質抽出においてはクロロホルム/メタノール、アンモニア水、クロロホルムを順に添加し、得られた水層にジメチルホルムアミドを添加して蛍光測定する方法が最適であった。

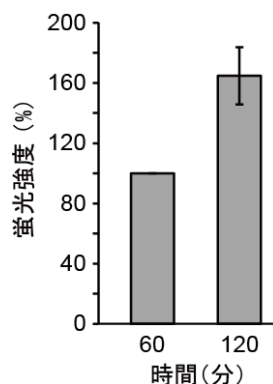


図 3 . 赤血球における NBD-S1P 放出の直接的な検出

(3) 脂質抽出を必要としない NBD-S1P 輸送体活性検出法

通常、赤血球の細胞外へ放出された NBD-S1P を定量するためには、脂質抽出により NBD-スフィンゴシンを除く必要がある。私は、赤血球懸濁液の BSA 濃度を 0.1% にすることで、NBD-スフィンゴシンを赤血球に添加してから 1 時間後には、NBD-スフィンゴシンがほとんど細胞内へ取り込まれることを見出した。そこで、NBD-スフィンゴシンを赤血球に添加してから 1 時間後と 2 時間後の細胞外のバッファーの蛍光を直接蛍光プレートリーダーで測定したところ、細胞外 NBD-S1P の増加に伴い、蛍光強度の増加が観察された(図 3)。この結果より、赤血球懸濁液を遠心分離後の上清の蛍光を測定することで、脂質抽出をせずに S1P 輸送体活性を検出できることが明らかになった。今後、赤血球における NBD-S1P 輸送体活性測定法を多検体処理可能な系で確立し、阻害剤のスクリーニングにつなげたい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Goda M., Oda K., Oda A., **Kobayashi, N.**, and Otsuka M., Involvement of the Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporter in Testosterone Release from Cultured Pig Leydig Cells. *Pharmacology*, **100**, 31-39 (2017) 査読有 DOI: 10.1159/000460822

Kobayashi, N., Otsuka, M., Yamaguchi, A., and Nishi, T., Fluorescence-based rapid measurement of sphingosine-1-phosphate transport activity in erythrocytes. *Journal of Lipid Research*, **57**, 2088-2094 (2016) 査読有 DOI: 10.1194/jlr.D071068

西 毅, 久野 悠, **小林 直木**, 山口 明人,
Update Review 新しい創薬標的としての
脂質メディエーター分泌輸送体. *実験医
学*, **34**, 2356-2361 (2016) 査読無
[https://www.yodosha.co.jp/yodobook/bo
ok/9784758101554/](https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758101554/)

小林 直木, サリドマイド誘導体レナリド
ミドの抗腫瘍効果はどのように発現する
か. *ファルマシア*, **50**, 1145-1145
(2014) 査読有
[http://doi.org/10.14894/faruawpsj.50.
11_1145](http://doi.org/10.14894/faruawpsj.50.11_1145)

[学会発表](計3件)

Kobayashi, N., Otsuka, M., Yamaguchi,
A., and Nishi, T., Fluorescence-based
rapid measurement of sphingosine
1-phosphate transport activity in rat
erythrocytes, 14th International
Conference on Bioactive Lipids in
Cancer, Inflammation, and Related
Diseases (Budapest) July 13, 2015 “**Ono
Pharmaceutical Travel Awards**”

小林直木, 大塚正人、山口明人、西毅、ス
フィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の蛍光標識
体を用いた赤血球 S1P 輸送体の活性測定、
BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会・
第 88 回日本生化学会大会 合同大会)(神
戸) 2015 年 12 月 1 日

小林直木, 山口明人、西毅、蛍光標識スフ
ィンゴシン 1 リン酸 (S1P) を用いた赤血
球 S1P 輸送体の活性測定、日本薬学会 第
135 年会 (神戸) 2015 年 3 月 28 日

[図書](計1件)

Kobayashi N., Nishi T., Springer,
Methods in Molecular Biology (A Rapid
Fluorescence Assay for Measuring
Sphingosine-1-Phosphate Transporter
Activity in Erythrocytes), 2017, 10 (in
press)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 直木 (KOBAYASHI, Naoki)
摂南大学・薬学部・助教
研究者番号：9 0 5 3 2 2 5 0