

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460210

研究課題名(和文) 中枢神経系における有機イオントランスポーターの生物薬学的研究

研究課題名(英文) Biochemical properties of various organic ion transporters in central nervous system

研究代表者

藤田 卓也 (FUJITA, Takuya)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：00247785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、中枢系におけるアミノ酸 transporter(s)やジカルボン酸 transporter (s)、オピオイドペプチド transporter(s)をはじめとする様々な有機イオン transporters が中枢において部位特異的に発現・機能していることを解析した後、脳におけるこれら transporters の発現・機能調節機構に関して、主として神経化学的・生化学的な手法を駆使して解析を進めた。その結果、神経細胞株で発現が示唆されていたNa<sup>+</sup>依存性エンケファリン transporterが、マウス大脳皮質神経細胞に機能発現していることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we characterized the expression and function of various organic solute transporters, such as amino acid transporter(s), dicarboxylate transporter(s), and opioide peptide transporters, in the central nervous system. After these experiments, functional regulation of these transporters was determined with neurochemical and biochemical techniques. We found that Na<sup>+</sup>-dependent enkephalin transporter, which is reported to be expressed in cultured neuronal cell line, is expressed functionally in mouse cerebrocortical neurons.

研究分野：薬物動態学

キーワード：有機イオントランスポーター 初代培養神経細胞 クエン酸回路 エンケファリン輸送

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内情報伝達系は情報伝達物質の情報を細胞内へ転換する機構であり、その反応系の発動は主として細胞膜上の刺激に始まる。神経系においてはシナプスを中心とした神経伝達物質による情報伝達機構の解明が特に進められており、多数の受容体や機能分子が明らかにされている。ニューロンよりシナプス間隙中に放出された神経伝達物質はグリア細胞が有する一連の transporter 群により速やかに回収される。一方、痛みは末梢の感覚受容器で感受され、他の感覚情報とともに脊髄後角に入力する。そこで情報の修飾・統合を受けた後、視床を介して大脳感覚皮質に伝えられ知覚される。中枢神経における感覚情報処理機構は視覚において高度の解析がなされているが、一般体性感覚に関しては脊髄レベルにおいても、大脳皮質のレベルにおいても未だほとんど明らかではない。特に痛覚に関しては QOL の立場から、また医療経済の立場からその解明が急務である。現在、痛み関連の分子として、サブスタンス P、プロスタグランジン、エンケファリン、カプサイシンなどに対する受容体の分子のクローニングが行われ、ノックアウト動物を用いた行動解析が行われている。エンケファリンなどに代表されるオピオイドペプチドの脳内での terminator 機能としては、peptidase による分解・不活化が考えられるが、セロトニンやノルエピネフリンなどの神経伝達物質の terminator 機能と同様 transporter を介した神経細胞内への再取り込み機構の存在の可能性も考え得る。

本申請者は、これまでに中枢におけるアミノ酸やペプチド、ニコチン酸、コリンなどのグリア細胞あるいはニューロン内への輸送にかかわる様々な有機イオン transporter の発現と機能解析を精力的に行い、これら transporter の分子実体について明らかにしてきた (*Brain Res.* **997**, 52-61 (2004); *ibid* **1044**, 33-41 (2005); *J. Neurochem.* **93**, 706-714 (2005); *ibid* **97**, 162-173 (2006))。これら transporter は、中枢において単なる栄養物質の供給に関与しているのみならず、神経伝達物質の再合成、浸透圧調整をはじめとして様々な生理作用を有していると考えられるが、神経伝達物質の再吸収に関与する transporter 以外は詳細な検討が行われているとは言い難いのが現状である。本申請者は、これまでの研究により、グリア細胞自身がシナプス間隙からの神経伝達物質の回収に関与する transporter のみならず、情報伝達物質に対する様々な受容体、チャネルをも発現していることを明らかにしてきている (*Glia* **46**, 53-62 (2004); *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 874-881 (2006))。

一方、オピオイドペプチドの輸送を担う特異的 transporter の存在は、これまで全く報告がなされていなかったが、2003 年に本申請者の海外共同研究である米国 Georgia

Regent University・Ganapathy 教授らの研究グループが培養網膜上皮細胞株 (ARPE-19) でその存在の可能性を初めて報告した (*Hu et al. Biochem. J.* **375**, 17-22 (2003))。すなわち、オピオイドペプチド類の ARPE-19 への輸送は Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> 依存性であり、その輸送の親和性は 0.4 - 40 μmol/L であることを明らかにした。しかしながら、癌化細胞株以外の正常細胞においてこうした輸送系が存在するとの報告はなされておらず、脳内での分布に関しても不明である。

### 2. 研究の目的

本研究においては、中枢において多種多様に発現している有機イオン transporter 群の分子的・機能的実体を主としてニューロン、グリア初代培養細胞を用いてさらに網羅的に解析することを第 1 の目的とし、様々な有機イオン transporter が中枢の機能維持に大きく関与していることを明らかにする。さらに、これら有機イオン transporter の発現分布、機能変動の解析を通じて、有機イオン transporter を介したニューロン-グリア間のクロストーク、イオンチャネルや受容体の機能調節など、中枢における有機イオン transporter の生理的な役割についても研究を進めることを第 2 の目的とする。さらに、「エンケファリンやダイノルフィンなどのオピオイドペプチドに対する特異的な輸送機構の存在を証明し、その分子実体を同定すること」を目的として、(i) マウスあるいはラット脳より単離した初代培養細胞あるいはシナプトソームを用いてその輸送特性を検討し、(ii) この輸送に関わる遺伝子の分子クローニングを行うことを第 3 の目的とする。

### 3. 研究の方法

【中枢における有機イオン transporter の発現・機能解析】

(1) マウス (ラット) ニューロン・アストロサイト初代培養系：本申請者が行っている手法に基づき、マウス胎児 (妊娠 15 日齢)、ラット胎児 (妊娠 18 日齢) の脳各部位より細胞を調製し、ニューロン培養用無血清培地 (DMEM/F-12 + B-27 supplement + antibiotics) あるいはアストロサイト培養用培地 (DMEM + 10% fetal bovine serum) で培養することによりニューロンもしくはアストロサイトの初代培養を得る。

(2) 本研究での解析の対象となる有機イオン transporter 群の脳内各部位でのニューロン・グリアにおける発現を、初代培養細胞より単離した mRNA を用いたマイクロアレイ解析により網羅的に解析する。脳内での強い発現が確認された有機イオン transporter に関しては、さらに詳細な遺伝子発現量を real-time PCR により検討する。また、脳発達段階での有機イオン transporter 遺伝子の発現変動に関しても同様に検討を進める。

(3) 上述有機イオン transporter の機能解析

に関しては、放射標識体をプローブとしてグリア・ニューロン初代培養細胞における輸送実験を行う。既に、遺伝子がクローニングされその輸送特性が明らかにされている transporter に関しては、それらの情報を用いて輸送特性の整理を行う。

脳各部位での様々な有機イオン transporter 群の発現解析、機能解析を上記の方法により網羅的に行うことで、ニューロン・グリアにおける有機イオン transporter 発現の差異、部位間差等を整理する。

【中枢における受容体・イオンチャネルの機能や発現を直接的あるいは間接的に制御する因子としての有機イオン transporter の研究】

本申請者は、これまでの科学研究費補助金による研究により、中性アミノ酸輸送系システムLと電位依存性カルシウムチャンネルとの機能的連関に関して研究を遂行し、カルシウムチャンネルの機能がシステムLを介したGABAの構造類似体であるgabapentinの細胞内輸送により調節されている可能性を明らかに出来た。こうした transporter・チャンネル・受容体機能連関に関する仮説が他の transporter に関しても適用できるか否かを明らかにするために、本検討で得られる中枢における有機イオン transporter の発現や機能調節機構の情報に基づいてさらに検討を進める。

#### 4. 研究成果

【マウス大脳皮質初代培養神経細胞におけるエンケファリンの輸送特性】

ロイシンエンケファリンの大脳皮質初代培養神経への輸送は、Na<sup>+</sup> 依存性輸送と Na<sup>+</sup> 非依存性輸送の2つの輸送系を介して行われていることが明らかとなった(図1)。

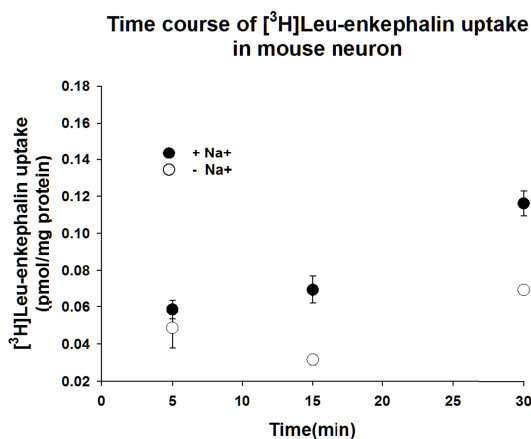


図1 マウス初代培養大脳皮質神経細胞におけるロイシンエンケファリンの時間依存的取り込み：(●) Na<sup>+</sup>含有 buffer；(○) Na<sup>+</sup>非含有 buffer

Na<sup>+</sup> 依存性なロイシンエンケファリン輸送の K<sub>m</sub> 値はおよそ 120 μmol/L、Na<sup>+</sup> 非依存性な輸送の K<sub>m</sub> 値は 10 μmol/L であった。Na<sup>+</sup> 非依

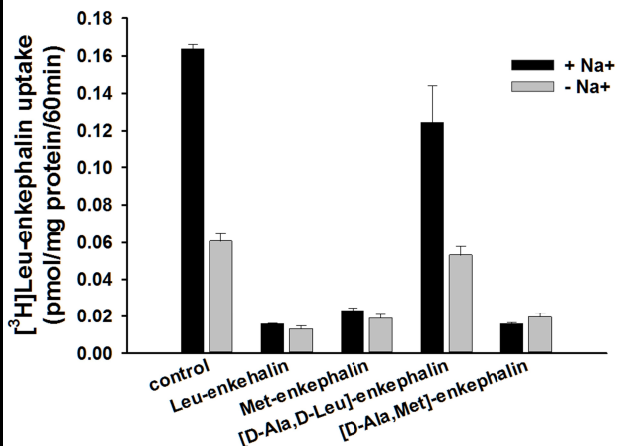


図2 マウス初代培養大脳皮質神経細胞におけるロイシンエンケファリンの取り込みに対する各種エンケファリン誘導体の阻害効果

存的な輸送の本体は、有機アニオン transporter OATP であることが報告されており、K<sub>m</sub> 値の比較からも今回の検討の結果と一致していた。

一方、Na<sup>+</sup> 依存性な輸送に関しては、Ganapathyらの報告による K<sub>m</sub> 値とほぼ comparable であった。

ロイシンエンケファリンの取り込みは、全てのエンケファリン誘導体で有意に阻害された(図2)。

【N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) のアストロサイトにおける輸送特性】

NAAG は、哺乳類の中枢神経系において比較的高濃度に存在するニューロペプチドであり、N-acetyl-L-aspartate と L-glutamate より合成される。NAAG はペプチダーゼによる加水分解を受け、再び N-acetyl-L-aspartate と L-glutamate を生成することから、脳内における L-glutamate 前駆体であると考えられる一方で、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR3 の選択的アゴニストであることから、脳内における NAAG の動態は重要であると考えられる。

NAAG はラット脳より単離した peptide transporter PEPT2 と作用することが明らかとなっているが、NAAG 輸送に関する transporter の分子実態に関する検討はほとんど行われていない。そこで、マウス脳内における NAAG の輸送に関して精査した。マウスアストロサイトには PEPT2 の発現が認められ、PEPT2 のモデル基質である glycylsarcosine (Gly-Sar) の輸送を検討したところ、その輸送の K<sub>m</sub> 値は pH6.0 において 77 μmol/L、pH7.4 において 80 μmol/L であった。また、種々のジ・トリペプチドによりその輸送は顕著に阻害された。NAAG はマウスアストロサイトおよび PEPT2 発現系細胞における Gly-Sar の輸送を IC<sub>50</sub> 値 2.2 mmol/L で阻害したが、輸送の飽和性は認め

られなかった。

【有機アニオン transporter OAT3 とジカルボン酸 transporter NaDC3 との機能的連関】

エネルギー代謝の非常に大きな脳では、citrate、 $\alpha$ -ketoglutarate、malate 等の各種 TCA 回路中間体がエネルギー供給源として大変重要である。本申請者は、これまでにニューロン、アストロサイトへの TCA 回路中間体の輸送特性および TCA 回路中間体の輸送に關与するトランスポーターの同定に關して検討を重ねており、ラット大脳皮質由来のアストロサイト初代培養系において、 $\text{Na}^+$ -coupled dicarboxylate transporter NaDC3/NaC3 が succinate の輸送を担っていることを明らかにしている。また、アストロサイトには organic anion transporter OAT3 が発現していることも明らかにしている。アストロサイトにおける OAT3 の機能に關しては検討がなされておらず、その生理的意義は不明であるものの、アストロサイト内で合成された TCA 回路中間体を細胞外に放出する経路として關与している可能性があることから、本研究では、マウス大脳皮質より単離した初代培養アストロサイトにおける NaDC3/NaC3 と OAT3 との機能的連関について検討を行った。

マウスアストロサイトにおいて NaDC3/NaC3、OAT3 の mRNA 発現が認められ、saturation kinetics より得られた succinate 輸送の  $K_m$  値は  $13.5 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$ 、estrone sulfate 輸送の  $K_m$  値は  $80.9 \pm 27.6 \mu\text{mol/L}$  であった。OAT3 と NaC3 とを共発現した HeLa 細胞において、5 mM  $\alpha$ -ketoglutarate でプレロード後の PAH 取り込みの  $V_{\text{max}}$  値が有意に上昇した ( $\alpha$ -KG preload :  $465 \pm 39 \text{ pmol/mg protein/min}$ 、non preload :  $224 \pm 39 \text{ pmol/mg protein/min}$ )。さらにマウスアストロサイトにおける同様の検討でも  $\alpha$ -ketoglutarate でプレロードすることにより、わずかではあるものの estrone sulfate 輸送における  $V_{\text{max}}$  値の上昇が認められた ( $\alpha$ -KG preload :  $594 \pm 207 \text{ pmol/mg protein/15min}$ 、non preload :  $529 \pm 166 \text{ pmol/mg protein/15min}$ )。これらの結果よりアストロサイトにおいて TCA 回路中間体を細胞外へ輸送する経路が OAT3 を介したものである可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Ito M., Kusuvara H., Ose A., Kondo T., Tanabe K., Nakayama H., Horita S., Fujita T. and Sugiyama Y. Pharmacokinetic modeling and monte carlo simulation to predict interindividual variability in human exposure to oseltamivir and its active metabolite, Ro 64-0802. *AAPS J.* **19**, 286-297 (2017). 査読有 doi: 10.1208/s12248-016-9992-0
- (2) Kono Y., Iwasaki A., Matsuoka K. and Fujita

T. Effect of mechanical agitation on cationic liposome transport across an unstirred water layer in Caco-2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 1293-1299 (2016). 査読有 doi: 10.1248/bpb.b16-00050

- (3) Kono Y., Miyoshia S. and Fujita T. Dextran sodium sulfate alters cytokine production in macrophages *in vitro*. *Pharmazie* **71**, 619-624 (2016). 査読有 doi: 10.1691/ph.2016.6688

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 結城綾子、西村春香、後藤真耶、船橋理子、河野裕允、藤田卓也、HepG2 細胞での  $\text{Na}^+$  依存性クエン酸輸送における金属イオンの影響, 第 25 回クリニカルファーマシーシンポジウム: 医療薬学フォーラム 2017, 2017 年 7 月 1 日, 鹿児島市民文化ホール(鹿児島県・鹿児島市)(発表確定)
- (2) 西村春香、松岡芹香、結城綾子、河野裕允、角本幹夫、藤田卓也、神経細胞における  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  依存性エンケファリン輸送特性の検討, 第 25 回クリニカルファーマシーシンポジウム: 医療薬学フォーラム 2017, 2017 年 7 月 1 日, 鹿児島市民文化ホール(鹿児島県・鹿児島市)(発表確定)
- (3) 船橋理子、河野裕允、藤田卓也、アミノ酸枯渇時のヒトアストロサイトにおける system A アミノ酸トランスポーターの適応調節機構, 日本薬学会第 31 年会, 2016 年 5 月 21 日, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)
- (4) 片山紗希、河野裕允、藤田卓也、LPS および  $\text{IFN-}\gamma$  の添加時におけるヒト肝細胞様細胞 HepaRG の CYP 発現特性の検討, 日本薬学会第 31 年会, 2016 年 5 月 20 日, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)
- (5) 船橋理子、河野裕允、藤田卓也、ヒトアストロサイトにおける system A アミノ酸トランスポーターの適応調節機構, 第 23 回クリニカルファーマシーシンポジウム: 医療薬学フォーラム 2015, 2015 年 7 月 5 日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
- (6) 岡田智文、由利龍嗣、河野裕允、寺田智祐、藤田卓也、5-アミノサリチル酸プロドラッグの Caco-2 細胞における代謝特性の検討, 第 23 回クリニカルファーマシーシンポジウム: 医療薬学フォーラム 2015, 2015 年 7 月 5 日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
- (7) 由利龍嗣、西貴弘、河野裕允、寺田智祐、藤田卓也、PEPT1 を標的とした 5-アミノサリチル酸プロドラッグの輸送特性の検討, 日本薬学会第 30 年会, 2015 年 5 月 23 日, 長崎新聞文化ホール(長崎県・長崎市)

〔その他〕

ホ ー ム ペ ー ジ :  
<http://research-db.ritsumeai.ac.jp/Profiles/40/0003910/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 卓也 (FUJITA Takuya)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：00247785

(2) 連携研究者

桂 敏也 (KATSURA Toshiya)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：10283615

(3) 研究協力者

Vadivel Ganapathy

Texas Tech University・Health Sciences  
Center・教授