

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893044

研究課題名(和文) 動脈硬化症における疾患修飾因子としてのトランスポーターの機能解明

研究課題名(英文) Investigation of transporters as atherosclerosis modifiers

研究代表者

水野 忠快 (Mizuno, Tadahaya)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90736050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、動脈硬化症の修飾因子として機能するトランスポーターを同定し、機能解析を行うことを目的とした研究である。データマイニングより、動脈硬化症時に発現誘導するトランスポーターSLC-Xを見出した。検討を重ねた結果、本トランスポーターは動脈硬化症時だけでなく、広く炎症刺激時に誘導されることが明らかとなった。SLC-Xの機能抑制時には炎症反応の亢進が認められたため、本トランスポーターは炎症反応の制御に参与しているものと推察される。炎症反応は動脈硬化症を始めとする多くの疾患の基盤病態であり、本研究を進めることでこれら疾患の理解が更に深まり、新たな治療法の確立などが期待される。

研究成果の概要(英文)：The study objective is identification and investigation of a transporter which modifies atherosclerosis. By data-mining, I identified a transporter that was greatly upregulated in atherosclerosis model. Further analysis revealed that the transporter expression was increased by several inflammatory stimuli, which indicates that the transporter modifies inflammatory response. Inflammation induces several diseases like atherosclerosis, so this study will be helpful for understanding of these diseases and establishment of a new therapeutic strategy.

研究分野：医療系薬学

キーワード：トランスポーター 炎症

1. 研究開始当初の背景

生体では細胞膜などの生体膜が、例えば細胞内-細胞外、細胞内-オルガネラ内といった、二つの異なるコンパートメント間に生体界面を形成し、両者を独立したものとして確立している。この二つのコンパートメント間における物質の適切な輸送、すなわちある物質を必要としているコンパートメントへ取り込むこと、あるいはあるコンパートメントにおいて不要な物質を別のコンパートメントへと排出すること、は生体の恒常性維持のために重要である。生体界面上に局在し、その物質輸送を担う分子実体の一つがトランスポーターである。その種類は非常に多く、これまでヒトゲノム上において400種類以上のトランスポーター遺伝子が見出されている。しかしながら現状、3割以上のトランスポーターの生理学的な重要性は明らかになっておらず、生体内各コンパートメント間の物質輸送にはまだまだ未解明な点が多い。

このような現状を説明しうる可能性として、状態の変化に应答し、限られた状況下で主に機能するトランスポーターの重要性は通常状態では発見が困難であり、未知とされている可能性が考えられる。実際に抗酸化物質であるグルタチオンの合成に必要なシステチンの輸送を担うトランスポーター、SLC7A11は、酸化ストレスにより強く発現量が上昇し、グルタチオン合成に寄与し細胞の酸化ストレス耐性を上げる方向に働くことが報告されている。また本研究の申請者は、コレステロールトランスポーターであるABCA1を解析し、脂質蓄積時にABCA1の細胞膜上からの分解経路が変化し、分解が亢進することを実際に見出している。このように疾患等、生体の状態に変化が起きた際に変動するトランスポーターは、その疾患状態に应答して制御を受け、物質輸送をダイナミックに制御しているものと推察される。

現在、先進諸国における死亡原因の第一位となっている疾患は動脈硬化症である。米国だけでも1996年の動脈硬化症による死亡者数は100万人近くに達し、癌による死亡の2倍、事故による死亡の10倍を占めており、冠動脈疾患による心臓発作と脳卒中は、他のあらゆる死因の合計をも上回っており、その治療は重要な保健医療的課題の一つである。動脈硬化症の新規創薬標的として期待されている分子の一つにコレステロールトランスポーターABCA1が挙げられる。本トランスポーターは動脈硬化部位に集積する泡沫化マクロファージからコレステロールを排出するといった物質輸送を介して抗動脈硬化作用を持つといった機能が示されている。本研究申請者はこれまでにABCA1の分解経路解析に取り組んできたが、上述のようにまだまだ機能未知なトランスポーターが多く存在していることから、ABCA1のように動

脈硬化症において重要な物質輸送を担うトランスポーターの存在が期待される。

2. 研究の目的

本研究申請者は、上述の研究背景より、動脈硬化症時に発現変動するトランスポーターは同疾患状態における重要な物質輸送を担い、動脈硬化症の修飾因子として機能するという仮説を立て、本仮説に則って生理学的な重要性が未知であるトランスポーターの同定、解析を目的と定めた(図1参照)。本研究を達成することにより、動脈硬化症時に重要な物質輸送とこれを担うトランスポーターの同定につながる他、機能未知トランスポーターを解析することの潜在的な重要性を支持すると期待される。

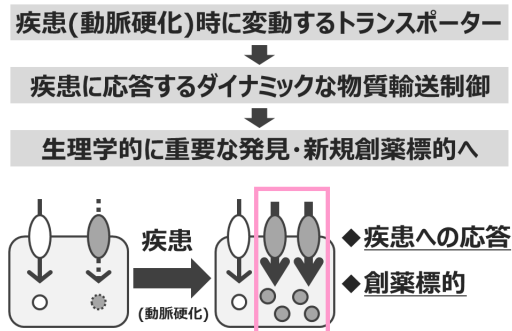


図1. 本研究の目的・戦略

3. 研究の方法

まずマイクロアレイデータベースを用いて動脈硬化症時に変動するトランスポーターの探索を行った。動脈硬化症の基盤となる病態としてマクロファージの泡沫化が挙げられる。そこで動脈硬化症研究において頻用されているモデルである、アセチル化低密度リポタンパク質(LDL)コレステロールや酸化LDLを処理したマクロファージとコントロール細胞との比較を行った。チオグリコレート誘導腹腔内マクロファージ(MPM)を試料に、見出したトランスポーターの発現量を定量的PCR、ウェスタンブロット法を用いて解析し、mRNAレベル、タンパク質レベルでの発現量を解析した。siRNAを用いて本トランスポーターのノックダウン(KD)を行い、炎症性サイトカインの発現量や分泌を定量的PCR、ウェスタンブロット法により解析した。また同じくsiRNAを用いて本トランスポーターをKDしたマクロファージとコントロール細胞とを比較するメタボローム解析を行った。本トランスポーターの発現ベクターを構築し、細胞免疫染色法を用いて細胞内の局在を検討した。さらに磁気ビーズを用いた方法論によりマクロファージ内因性の局在も検証した。CRISPR-Cas9システムを用いて本トランスポーターのノックアウトマウスの構築に取り組んだ。

4. 研究成果

マイクロアレイデータベースより、泡沫化

マクロファージにおいて強く発現量が上昇するトランスポーターとして SLC-X を見出した。本トランスポーターは、in vitro において基質がいくつか報告されているものの、その生理学的重要性は明らかになっていない機能未知なトランスポーターであった。解析を進めた結果、本トランスポーターは泡沫化マクロファージや動脈硬化症時だけでなく、種々の炎症刺激に応じて発現が誘導されることが示唆された。そこで MPM に対し炎症性刺激として頻用されている自然免疫受容体 TLR4 のリガンド、リポポリサッカライド(LPS)処理を施し、本トランスポーターの発現量を定量的 PCR にて検討したところ、非常に強く(30 倍程度)誘導されることを発見した。この発現誘導はウェスタンブロット法によりタンパク質レベルでも確認された。さらに TLR1/2 や TLR7/8 といった他の自然免疫受容体のリガンド処理を施した際にも確認された他、マクロファージに限らず樹状細胞やマイクログリアといった他の細胞種でも認められており、本トランスポーターの機能が生体において広範囲に影響していることを示唆している。自然免疫受容体シグナリングの多くは NFκB 経路を活性化する。そこで NFκB 経路の阻害剤と共に LPS 処理をしたところ、SLC-X の発現量上昇は抑制された。すなわち、本トランスポーターの転写制御には NFκB 経路が関与しているものと推察される(図 2a)。

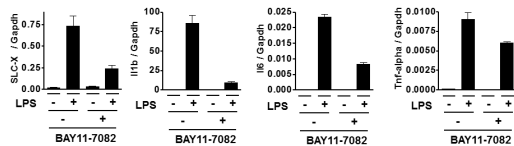


図2a. 炎症刺激によるSLC-Xの発現量上昇

SLC-X がマクロファージにおいてどのような機能を持つか検討を行った。LPS 刺激時を受けたマクロファージの代表的な機能として炎症性サイトカインの産生、および分泌が挙げられる。そこで MPM に対し siRNA をトランスフェクションし、本トランスポーターの KD による炎症性サイトカインの発現量に対する影響を検証したところ、炎症性サイトカインであるインターロイキン 1β (IL1β)、インターロイキン 6 (IL6)の上昇が認められた。さらに培養液中への炎症性サイトカインの分泌を検討したところ、KD 細胞において IL1βの分泌上昇が確認された。IL1βの分泌はインフラマソームの活性化により進行するため、本トランスポーターはインフ

ラマソームの制御に関与しているものと推察される。本トランスポーターの KD 細胞とコントロール細胞を試料とするメタボローム解析を実施し、インフラマソームや炎症に影響する物質の変動が認められるかどうか検証を行ったものの、特筆すべき変動は認められなかった。

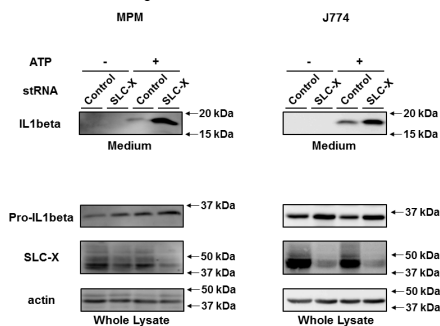


図2b. SLC-XのKDによる炎症性サイトカインの分泌上昇

トランスポーターは二つの異なるコンパートメント間の物質輸送を司るタンパク質であることから、その局在情報は機能を理解する上で不可欠である。そこでまず本トランスポーターのクローニングを行い、HeLa 細胞に対して過剰発現し、細胞免疫染色法を用いて細胞内局在を検証した。その結果、リソソームに局在することが明らかとなった。また MPM、並びに J774 より磁気ビーズを用いてリソソーム濃縮画分を調整し、ウェスタンブロット法によって解析したところ、やはりリソソームへの濃縮が確認されたため、本トランスポーターはリソソーム膜に局在しているものと考えられる。

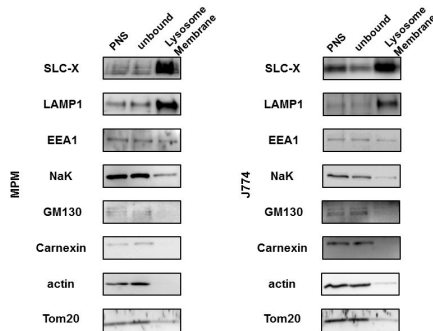


図2c. SLC-Xのリソソーム画分への濃縮

近年開発された遺伝子編集技術である CRISPR-Cas9 システムは迅速に遺伝子組み換え動物を構築する非常に強力な手段である。本システムを用いた方法論により、SLC-X のノックアウトマウスの構築に取り組んだ。現在ホモノックアウトマウスの出征を確認し、個体数の確保に努めており、今夏より個体レベルでの SLC-X の重要性解析に着手できると考えている。

本研究の成果より、炎症制御に関連する新たなトランスポーター-SLC-Xを見出した。SLC-Xはリソソームに局在することから本トランスポーターはリソソーム-細胞質間の物質輸送により炎症制御に関与していると推察される。現在当該基質の探索に取り組んでいる。炎症反応は、動脈硬化の基盤病態であることから、本研究成果は当初の目的を達成しただけでなく、他の炎症性疾患に関しても新たな知見を与えるものであると考えている。本研究成果を礎に、今後、本トランスポーターの基質の同定、個体レベルでの重要性を解析することにより、動脈硬化症、並びに広く炎症反応時における物質輸送の理解が深まり、動脈硬化症治療の新たな戦略が誕生することが期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表代表者; 水野 忠快

発表表題; 炎症制御に関わるリソソームトランスポーター-SLC-Xの機能解析

学会名; 東京大学生命科学シンポジウム

発表年月日; 2016年4月23日

発表場所; 東京大学駒場キャンパス(東京都、目黒区)

〔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〕

ありません

6. 研究組織

(1)研究代表者

東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室

助教

水野 忠快 (Tadahaya Mizuno)

研究者番号: 90736050

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし