

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790171

研究課題名(和文) Slc6a13によるヒポタウリン輸送の分子機構と新たな酸化ストレス治療戦略

研究課題名(英文) Mechanism of hypotaurine transport by Slc6a13 for oxidative stress defense

研究代表者

樋口 慧 (Higuchi, Kei)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：10625304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒポタウリンの胎盤細胞(TR-TBT18d-1)における酸化ストレスに対する細胞保護効果を明らかにした。その保護効果には抗ヒドロキシラジカル作用、抗ペルオキシラジカル作用が関与することが示唆された。さらに興味深いことに胎盤などの末梢臓器に発現するGABAトランスポーターのひとつであるSlc6a13が、H2O2誘起性酸化ストレスに対するヒポタウリンの細胞保護効果やアポトーシス抑制効果に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We clarified the protective effect of hypotaurine on TR-TBT18d-1 cells, rat placental cell line, exposed with oxidative stress. This study suggested that anti-hydroxyradical and -peroxyradical effects were involved in the protective effect of hypotaurine. Interestingly, the expression of rodent Slc6a13, which is a GABA transporter and express in peripheral organs such as placenta, was contributed to the protection against the oxidative stress and apoptosis induced by hydrogen peroxide.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ヒポタウリン 酸化ストレス Slc6a13 細胞保護効果

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸や核酸などの生体内物質の細胞膜透過には、トランスポーターを介した輸送が重要であることが知られている。胎児への栄養供給を担う胎盤関門の実態である胎盤合体栄養膜にも、多くのトランスポーターが発現している。申請者はヒポタウリンが胎盤・胎児血漿中には母体血漿より 50 倍以上濃縮的に存在することおよびヒポタウリンが Slc6a13 に認識されうることを見出していた。

ヒポタウリンはシステインからタウリンの合成経路におけるタウリンの前駆体である。興味深いことに、ヒポタウリンにはタウリンの中間体として役割だけでなく、抗酸化作用や細胞内 ATP 貯留方向に代謝経路を変化させることにより細胞保護作用があることが報告されていた。しかし、その生体内におけるヒポタウリンの有効性や汎用性の知見は限られていた。さらにヒポタウリンの胎盤・胎児における作用についても不明であった。またヒポタウリンを輸送する Slc6a13 についても、末梢臓器に発現する GABA トランスポーターファミリーのひとつであるが、その生理的役割に関しては明らかになっていなかった。

これらから本研究では、「Slc6a13 がヒポタウリンの特定の臓器における分布に重要な役割を果たしており、ヒポタウリンの細胞保護作用に基づく、生体の防御機構もしくは保護機構として働いている」という仮説に至った。

2. 研究の目的

Slc6a13 は GABA トランスポーターでありながら、中枢だけでなく末梢臓器においても発現することが知られている。申請者は Slc6a13 が生体内物質のヒポタウリンを輸送することを発見しており、さらにヒポタウリンは抗酸化作用や細胞保護効果などを有する大変興味深い効果を有する生体内物質である。そこで本研究では Slc6a13 がヒポタウリンの体内分布の制御に重要な役割を果たしているということ仮説として、Slc6a13 の末梢臓器における生理的役割およびその分子制御機構を明らかにすることを第一の目的とした。第二にヒポタウリンの細胞保護作用メカニズムを解析し、ヒポタウリンによる酸化ストレス病態時の新たな治療戦略の提案を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Slc6a13 の発現するラット胎盤関門モデル細胞株である TR-TBT18d-1 を用いて、ヒポタウリンが細胞保護に働きうるのかを H2O2 による細胞障害に対する保護効果を MTT アッセイ 細胞ライセート中にヒドロキシラジカルに対する除去能を HORAC アッセイ H2O2 誘起性の産生 ROS 軽減効果を DCFH-DA 蛍光量にて評価した。さらに siRNA による

Slc6a13 ノックダウン時における H2O2 による細胞障害に対する保護効果およびヒドロキシラジカルに対する除去能を MTT アッセイおよび HORAC アッセイにて評価した。

(2) ヒポタウリンの細胞保護効果に対する Slc6a13 の役割を明らかにするために、Flp-In T-REx 293 細胞を用いて tetracycline 誘導性のマウス Slc6a13 発現細胞株を作製した。同細胞株を用いてヒポタウリンおよび [³H]GABA 取り込み能およびヒドロキシラジカルの除去能を評価した。さらに 同細胞株において tetracycline 誘導時および非誘導時における H2O2 酸化ストレスに対する細胞保護能を MTT アッセイおよび WST-8 アッセイ 同条件下におけるアポトーシス抑制効果を DNA 電気泳動法にて評価した。

4. 研究成果

ヒポタウリンの細胞保護効果の詳細を明らかにするために、Slc6a13 が発現する胎盤関門モデル細胞株である TR-TBT18d-1 を用いて、酸化ストレスに対するヒポタウリンの効果を検討した。その結果ヒポタウリンが H2O2 処理に対する細胞障害に対して、保護効果を示すことを明らかにした。またヒポタウリン水溶液は、各種抗酸化剤（グルタチオン、タウリン、ビタミン C）などに比べて、低濃度において、高いヒドロキシラジカル除去能が示された。そこでヒポタウリン処理した TR-TBT18d-1 におけるヒドロキシラジカル除去能を検討したところ、無処理の細胞に比べて細胞内ヒドロキシラジカルレベルの低下が観察された。一方で RNA 干渉法により Slc6a13 をノックダウンした細胞と、コントロール細胞において、ヒポタウリンの細胞保護効果について同様の条件で検討したが、有意な差は観察されなかった。これらから細胞内に取り込まれたヒポタウリンが、胎盤細胞内においてヒドロキシラジカル除去に働くことで細胞保護効果を示すことが示唆された。

ヒポタウリンの細胞保護効果における Slc6a13 の役割を明らかにするために、Tet-on システムによる Slc6a13 安定発現株の作成を行った。その結果、tetracycline による発現誘導時に、顕著なヒポタウリンおよび [³H]GABA 取り込み活性上昇を示す安定発現細胞株を得た。本細胞株は Slc6a13 の生理機能解析を行う上で、有用なツールである。実際にその Slc6a13 安定発現株を用いて、ヒポタウリン添加時における細胞内ヒドロキシラジカル除去能を評価したところ、有意なヒドロキシラジカルの除去能の上昇が示された。さらに H2O2 酸化ストレスに対する細胞保護能を MTT アッセイおよび WST-8 アッセイにより検討した。両アッセイ共に Slc6a13 発現誘導時には、ヒポタウリン添加により、有意な細胞保護効果が観察された。さらにその細胞保護効果について、DNA 断片化を電気泳動法により確認したところ、Slc6a13 発現誘導時に

はヒポタウリン添加により、その断片化が抑制されることが確認された。これらから酸化ストレス(H₂O₂)に対して、Slc6a13 がヒポタウリンの細胞内取り込みに寄与することにより、ヒドロキシラジカル除去能を増加およびアポトーシスの抑制が起こることにより細胞保護効果が得られることを明らかにした。

これらより、本研究ではヒポタウリンの胎盤細胞における酸化ストレスに対する細胞保護効果を明らかにした。その保護効果にはヒポタウリンの抗ヒドロキシラジカル作用、抗ペルオキシラジカル作用が関与することが示唆された。さらに Slc6a13 安定発現細胞株を用いた実験より、Slc6a13 発現が H₂O₂ 誘起性酸化ストレスに対するヒポタウリンの細胞保護効果やアポトーシス抑制効果に関与することを明らかにした。本研究結果は末梢臓器に発現する GABA トランスポーター Slc6a13 がヒポタウリン取り込みを介して、酸化ストレス細胞保護効果を示した知見であり、病態時の酸化ストレス軽減戦略に寄与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 3 件)

(1) Nishimura T, Yagi R, Usuda M, Oda K, Yamazaki M, Suda S, Takahashi Y, Okazaki F, Sai Y, Higuchi K, Maruyama T, Tomi M, Nakashima E. System A amino acid transporter SNAT2 shows subtype-specific affinity for betaine and hyperosmotic inducibility in placental trophoblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2014 May;1838(5):1306-12. doi: 10.1016/j.bbame.2014.01.004. Epub 2014 Jan 14. PubMed PMID: 24434061.

(2) Nishimura T, Takanohashi T, Tomi M, Horikoshi M, Higuchi K, Sai Y, Nakashima E. Evaluation of rat in vivo fetal-to-maternal transfer clearances of various xenobiotics by umbilical perfusion. *J Pharm Sci*. 2013 Sep;102(9):3356-63. doi: 10.1002/jps.23551. Epub 2013 Apr 25. PubMed PMID: 23620249.

(3) Oda K, Nishimura T, Higuchi K, Ishido N, Ochi K, Iizasa H, Sai Y, Tomi M, Nakashima E. Estrogen receptor induction by mitoxantrone increases Abcg2 expression in placental trophoblast cells. *J Pharm Sci*. 2013 Sep;102(9):3364-72. doi: 10.1002/jps.23549. Epub 2013 Apr 16. PubMed PMID: 23592396.

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 杉田友紀、Mariam Duereh、樋口慧、西村友宏、崔吉道、登美斉俊、中島恵美., Slc6a13 を介した胎盤へのヒポタウリン供給が示す抗酸化作用., 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013 年 03 月 27 日~2013 年 03 月 30 日

(2) Mariam Duereh、西村友宏、杉田友紀、樋口慧、登美斉俊、中島恵美., ヒポタウリンのヒドロキシラジカル消去活性による胎盤細胞保護効果., 日本動物実験代替法学会第 25 回大会, 東京, 2012 年 12 月 07 日~2012 年 12 月 09 日

(3) Araki H, Higuchi K, Nishimura T, Sai Y, Tomi M, Nakashima E., Effect of ezrin on cellular localization and transport function of Slc6a13., 日本薬物動態学会第 27 回年会, 東京, 2012 年 11 月 20 日~2012 年 11 月 22 日

(4) 荒木光, 樋口慧, 西村友宏, 崔吉道, 登美斉俊, 中島恵美., Ezrin が Slc6a13 の細胞内局在および輸送機能に与える影響., 第 7 回トランスポーター研究会, 京都, 2012 年 06 月 09 日~2012 年 06 月 10 日

(5) Mariam Duereh, 樋口慧, 杉田友紀, 西村友宏, 登美斉俊, 中島恵美., ヒポタウリンによるヒドロキシラジカルからの胎盤細胞保護効果., 日本薬剤学会第 27 年会, 神戸, 2012 年 05 月 24 日~2012 年 05 月 26 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 慧 (Higuchi Kei)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：10625304

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：