

令和元年6月27日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04664

研究課題名(和文)膜輸送体メタボロームによる炎症性腸肝疾患バイオマーカーの探索と発症機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of disease biomarkers using metabolome analysis targeted to transporters

研究代表者

加藤 将夫 (KATO, YUKIO)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：30251440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の中と外との間での物質のやり取りに働くタンパク質群に膜輸送体がある。本研究は腸や肝臓における炎症時に、その存在量が増加する膜輸送体OCTN1に焦点を当て、OCTN1の炎症時における役割や、輸送を担う生体内物質(生体内基質)の解明、さらには生体内基質解明の方法論の確立を目的とした。その結果、生体内物質を有機化学的にアミノ化した後に網羅的に定量することでOCTN1の生体内基質を解明する技術(構造選択的メタボロミクス)を確立するとともに、OCTN1が慢性腎臓病モデルマウス、さらには腎臓病患者においてその生体内基質の一つであるエルゴチオネインを取り込むことで障害に対する防御に働く可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜輸送体はさまざまな疾患に関係する。実際、本研究でもOCTN1と慢性腎臓病の関連が示唆されたが、多くの遺伝子レベルの研究からも、疾患と膜輸送体との関係が示されつつある。一方、本研究では膜輸送体の生体内基質を解明するための新たな手法として構造選択的メタボロミクスを確立した。よって、この手法を今後応用・発展させることにより、さまざまな膜輸送体と疾患との間に働く生体内物質を解明する手段となることが期待される。このことは、疾患の原因の解明につながるばかりでなく、見つけられた物質を疾患の診断や予後の予測、さらには治療に使うことができるかもしれない。このように病気の研究、診断、治療に有意義な知見を得た。

研究成果の概要(英文)： Transporters are involved in influx and efflux of endogenous compounds through cellular plasma membranes. The present study focused on one of such transporters OCTN1. OCTN1 is a unique transporter since its expression is known to be up-regulated in inflammatory conditions in certain organs such as gut and liver. The aim of the present study is to understand pathophysiological roles of OCTN1, to clarify its endogenous substrates, and to establish methodology to identify endogenous substrates. In the present study we have constructed structure-selective metabolomics in which endogenous compounds are first concentrated using transporter function, and amino group in endogenous compounds are comprehensively derivatized, followed by quantification of the compounds using LC-TOFMS. Based on this technique, we identified endogenous substrate of OCTN1. In addition, we also clarified that OCTN1 and its endogenous substrate may play a protective role in chronic kidney disease mice and patients.

研究分野：薬物治療学

キーワード：膜輸送体 メタボロミクス 薬物動態 薬物相互作用 医薬品開発

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クローン病(CD)と肝線維化は病態の定量的かつ簡便な把握法と根本的治療法の確立が求められる疾患である。CDは寛解と増悪とを繰り返す炎症性腸疾患であり、非侵襲的診断法の確立は患者にとって benefit となる。また増悪の時期が簡便に把握できれば、薬物治療への患者の積極的関与とQOLの改善につながる。したがって病態を定量的かつ簡便に把握できるCDのバイオマーカー(BM)開発と疾患の発症・増悪機序の解明が必要である。一方、肝線維化は肝実質細胞が有する旺盛な再生能力を著しく阻害し治癒を困難にするが、根治薬はない。疾患の進行を防ぐ観点から線維化のBMの確立が求められるが、肝は予備能があるため既存のBMは疾患がかなり進行した状態しか把握できない問題点がある。

本研究はCD腸管組織や肝線維化に働く肝臓星細胞などの炎症部位に高発現し、食物由来抗酸化物質エルゴチオネイン(ERGO)を細胞内に取り込む膜輸送体 carnitine/organic cation transporter (OCTN1)を利用し、メタボローム技術を組み合わせることで、これら疾患のBMと疾患の発症もしくは増悪機序の一端を明らかにする。研究代表者はこれまで *octn1* 遺伝子欠損マウス(*octn1*^{-/-})を作製し、メタボロミクスの技術を応用することによって、OCTN1の生体内基質としてERGOを同定した[1]。OCTN1はさまざまな臓器に発現し、細胞外に存在するERGOを細胞内に取り込むため、マウス血液中および臓器中には食物由来のERGOが高濃度で存在する一方、*octn1*^{-/-}では血液中およびすべての臓器中ERGO濃度が検出限界である[1]。疾患時のOCTN1の役割を解明し、その生体内基質探索に有用な方法論を確立できれば、疾患とOCTN1との関係、OCTN1と当該生体内基質との関係を解明できることになり、疾患に及ぼす当該生体内基質の役割の解明につながる。このことは、疾患の治療および診断の両面において有益と考えられる。

2. 研究の目的

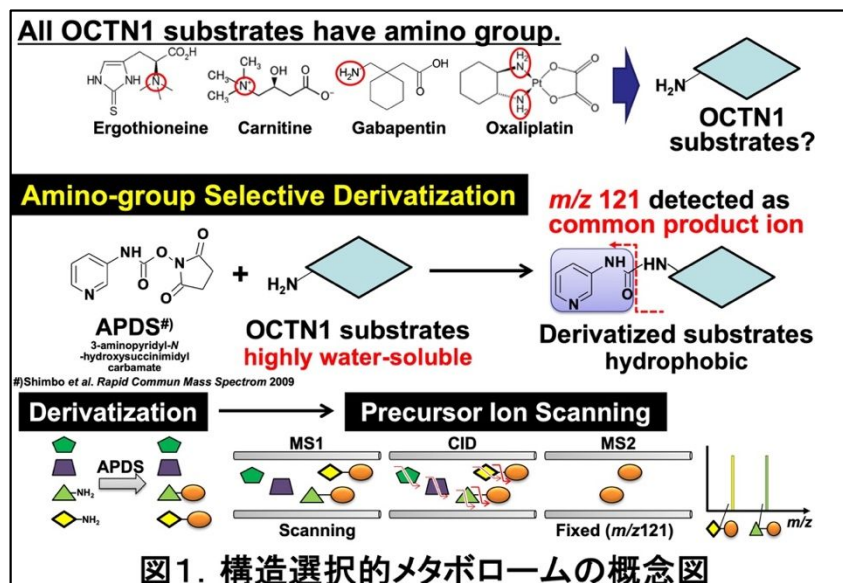
OCTN1発現細胞とメタボローム技術を組み合わせることで、OCTN1の生体内基質を探索する新規方法論を確立する。OCTN1の活性化を起こす遺伝子多型(L503F)は、白人のCD罹患と相関する。すなわちOCTN1はCDの原因遺伝子である。さらに、申請者らが作製した*octn1*^{-/-}を用いた炎症性腸疾患モデルでは、ERGOを摂取しない環境下で野生型と比べ症状の軽減が見られる。これらの結果はOCTN1がCDの原因物質あるいはCDを増悪させる物質を細胞内に取り込むことで炎症を増悪させることを示唆する。従って、OCTN1の生体内基質の解明は、CDの原因・増悪物質の探索においても有用かもしれない。一方で、OCTN1の生体内基質であるERGOは、強力な抗酸化物質であり、OCTN1とERGOは炎症から生体を防御する働きを持っている可能性がある。本研究においては、慢性腎障害と脳における役割について解明することを目的とする。

3. 研究の方法

構造選択的メタボロミクスの確立

OCTN1遺伝子発現細胞であるHEK293/OCTN1細胞(対照として、vectorのみを導入した

HEK293/mock細胞)に、基質源であるデキストラン硫酸(DSS)腸炎モデルマウス組織抽出物を添加し、一定時間取り込ませることで、OCTN1基質を細胞内に濃縮的に取り込ませたのち、誘導体化試薬であるAPDS(3-aminopyridyl-N-



hydroxysuccinimidyl carbamate)を用い、アミノ基を特異的に修飾した。その後、質量分析装置 LC-MS/MS を用い、APDS 部分を選択的に認識する precursor ion scanning を行うことで、HEK293/OCTN1 細胞に選択的に取り込まれ、かつ、アミノ基を有する化合物のみを選択的に検出した。

慢性腎障害に及ぼす OCTN1 および ERGO の役割

野生型マウスおよび *octn1*^{-/-} の片腎を摘出後、虚血再灌流を起こすことで慢性腎障害(CKD)マウスを作製し、腎切片を作製して病変を観察した。CKD 患者血液中 ERGO 濃度を高速液体クロマトグラム(HPLC)で測定した。

脳における OCTN1 および ERGO の役割

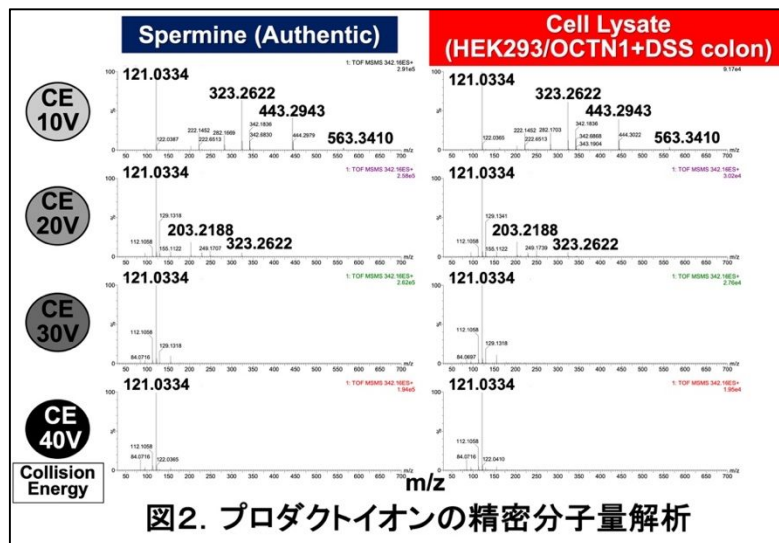
マウス胎児脳より採取した神経幹細胞を播種後、ERGO を添加し、一定時間経過後に細胞を免疫染色して、神経細胞 (β III-tubulin がマーカー) とグリア細胞 (GFAP がマーカー) の割合をカウントした。ERGO を多く含むタモギタケエキス末をマウスに混餌投与後に脳馬海切片を作製し、神経新生のマーカー (doublecortin) を免疫染色で観察した。

4. 研究成果

構造選択的メタボロミクスの確立

クローン病の罹患率の高い OCTN1 遺伝子多型は OCTN1 のアミノ酸変異 L503F を伴う。L503F 変異は Caucasian では 30% 程度の割合で見られる一方、日本人にはほとんど見られないことがわかっている。L503F 変異は ERGO をはじめとする多くの基質の取り込み活性が野生型 OCTN1 に比べて高い gain-of-function の性質がある。クローン病の病態には炎症が深く関与しており、このような高い活性を持つ OCTN1 が腸管内の何らかの物質を取り込むことがその一因である可能性もあるが、原因物質の特定には至っていない。我々は、DSS 腸炎モデルマウス組織抽出物を基質源として用い、そこに含まれる OCTN1 基質の解明を目指すことで、そのような原因物質の存在が示唆できないか検討を行った。

従来のメタボローム解析よりも、OCTN1 への特異性を高めた方策として、構造選択的メタボロミクスを開発した。すなわち、OCTN1 の基質は総じてアミノ基を有することに着目した。そこで、遺伝子発現細胞である HEK293/OCTN1 細胞 (対照として、vector のみを導入した HEK293/mock 細胞) に、基質源である DSS 腸炎モデルマウス組織抽出物を添加し、一定時間取り込ませることで、OCTN1 基質を細胞内に濃縮的に取り込ませたのち、検体に含まれる化合物中のアミノ基を特異的かつ網羅的に修飾した (図 1)。その後、質量分析装置 LC-MS/MS を用い、APDS 部分を選択的に認識する precursor ion scanning を行うことで、HEK293/OCTN1 細胞に選択的に取り込まれ、かつ、アミノ基を有する化合物のみを選択的に検出することを試みた (図 1)。その結果、炎症組織に存在する OCTN1 基質として spermine を見出した (図 2)。実際、細胞抽出液で検出されたピークのプロダクトイオンは、spermine 標品のプロダクトイオンと、さまざまな collision energy (CE) において一致していたことから、spermine がピークであると特定された (図 2)。マウス腹腔マクロファージを lipopolysaccharide (LPS) で処理することで活性化させた時の炎症性サイトカイン放出は *octn1*^{-/-} で野生型に比べ低下し、マクロファージ内の spermine 濃度も *octn1*^{-/-} で野生型に比べ低い傾向にあった。このように、OCTN1 には抗酸化物質 ERGO を取り込むことで組織を保護しつつも、いったん炎症が起こった場合にはむしろ炎症を悪化させる二面性を持つことが考えられる。



慢性腎障害に及ぼす OCTN1 および ERGO の役割

野生型マウスと *octn1*^{-/-}において慢性腎臓病モデルを作製し、腎切片において酸化ストレスマーカー4-hydroxy-2-nonenal(4-HNE)を染色したところ、野生型に比べ *octn1*^{-/-}で顕著に酸化ストレスが亢進していた。腎機能の悪化や炎症の亢進、線維化も *octn1*^{-/-}で顕著に観察された。慢性腎臓病患者においても、腎機能低下と血中 ERGO 濃度が相

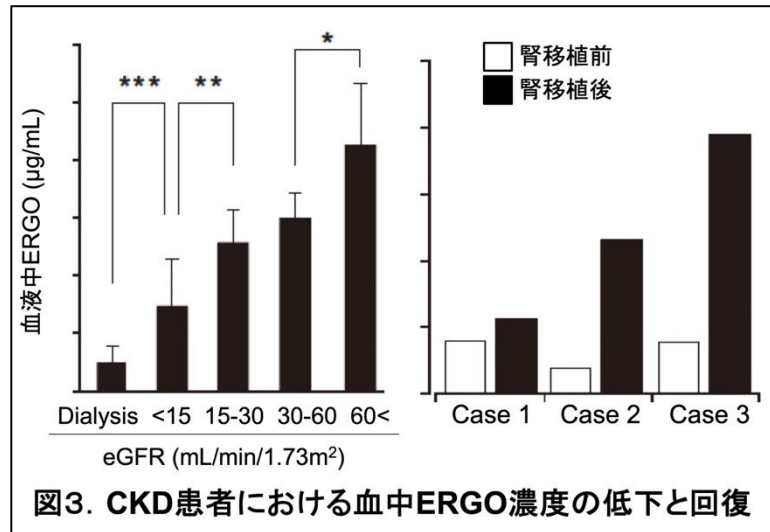


図3. CKD患者における血中ERGO濃度の低下と回復

関するとともに、腎移植後には腎機能とともに ERGO の血中濃度も回復した (図3)。したがって、腎臓の病態と OCTN1 や ERGO が関係し、腎障害に対して保護的に働くものと考えられた。本研究では、このほか、OCTN1 が蝸牛線条内皮に発現し、その遺伝子変異が劣性非症候性難聴の一種である DFNB60 を引き起こすことを示した。現在までに、OCTN1 ないし基質である ERGO が種々の臓器疾患に対して防御的に働くことが示唆されており、このことは、OCTN1 がほとんどすべての臓器に発現するとともに、ERGO も血液中とすべての臓器に存在することと対応する。また、OCTN1 と ERGO が正常な状態よりもむしろ病態時に重要な役割を果たすと考えれば、快適な環境下で飼育された正常な *octn1*^{-/-}と野生型との比較では、phenotype の違いが見られなかったこと[1]も、説明できるかもしれない。

脳における OCTN1 および ERGO の役割

脳は血液脳関門によって異物の侵入を防いでいる臓器であるが、ERGO はマウス脳組織にも検出される。哺乳類において ERGO は体内で合成されないことから、脳に存在する ERGO も食物由来と考えられる。ERGO は水溶性の高いアミノ酸の一種であり、OCTN1 を発現しない細胞にはほとんど取り込まれないことから、膜透過性は極めて低い。*octn1*^{-/-}の脳組織に ERGO が検出されないことから、ERGO が膜輸送体 OCTN1 によって脳に取り込まれていることが示唆される。生体にとって異物である ERGO を膜輸送体によって脳に取り込んでいることから、ERGO が脳において何らかの役割を果たす可能性があると考え、さらに研究を行った。

脳における免疫担当細胞であるミクログリアにおいて OCTN1 の機能的発現を検討した。ミクログリアを LPS で処理すると活性化が起こり、炎症性サイトカインが放出される。ミクログリアの活性化に伴い OCTN1 の発現量や ERGO の取り込み活性が増加した。*octn1* 遺伝子のノックダウンや *octn1*^{-/-}より調製したミクログリアでは、このような炎症性サイトカイン放出が促進されることから、OCTN1 がミクログリア活性化に対して抑制的に働くことが示唆された。一方、その後のミクログリアの肥大化は、*octn1*^{-/-}では起こりづらいことが示唆された。OCTN1 は異なる複数のメカニズム

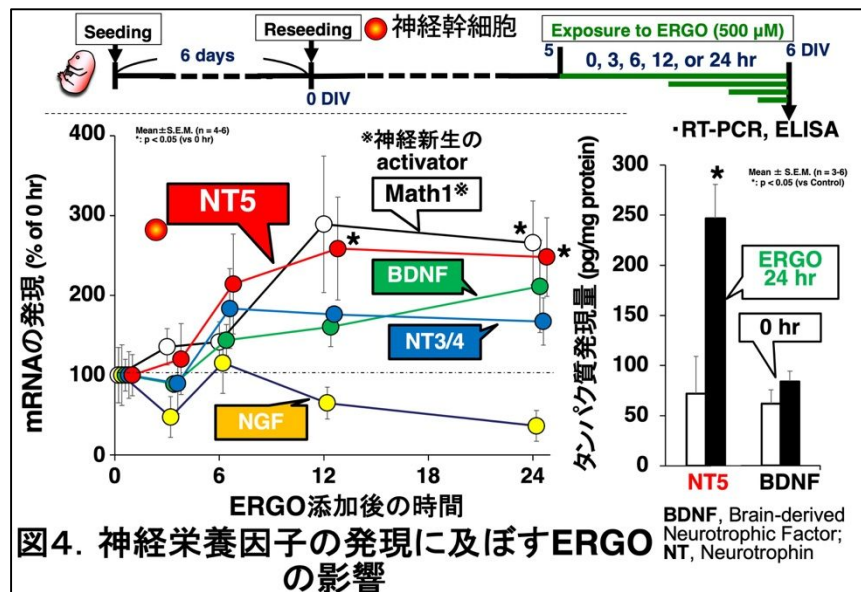


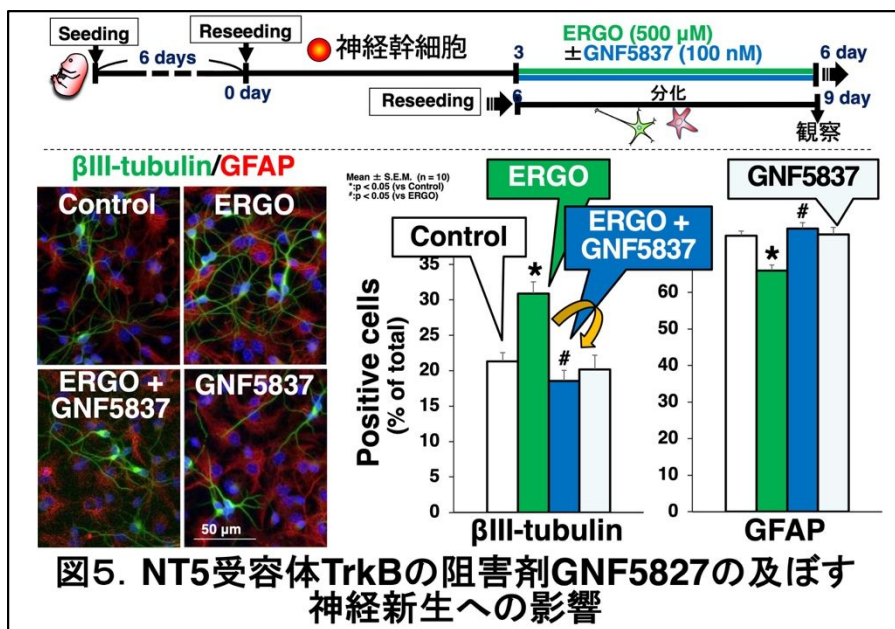
図4. 神経栄養因子の発現に及ぼす ERGO の影響

に關与しており、ミクログリアの活性化に及ぼす役割についても二面性のあることが示唆された。

OCTN1 はヒトおよびマウス神経細胞に発現し、マウス培養神経細胞では ERGO の細胞内への取り込みが確認され、*octn1* 遺伝子をノックダウンすると取り込みは顕著に低下した。一方で、グリア細胞には明確な OCTN1 の発現は認められなかった。したがって、OCTN1 は神経細胞に機能的に発現すると考えられる。さらに、OCTN1 の機能的発現は自己増殖能と多分化能を有する神経幹細胞(neural stem cell, NSC)にも観察され、その遺伝子発現量を見る限り、SLC22 family に属する他の有機カチオン膜輸送体よりもはるかに高かった。マウス大脳皮質由来 NSC に ERGO を添加した後に培養すると、神経細胞マーカー (βIII tubulin) 陽性細胞の割合を増加させる一方、アストロサイトマーカー (GFAP) 陽性細胞の割合を減少させる。すなわち、ERGO には神経幹細胞の神経細胞への分化 (神経新生) 促進作用があるが、この作用は *octn1*^{-/-}では見られなかった。したがって、OCTN1 による取り込みが神経新生作用に必須であること、ERGO が細胞内で作用していることが示唆された。

NSC に ERGO を添加すると、神経栄養因子 neurotrophins (NT)の一種である NT-5 の遺伝子発現が顕著に増加し、NT-3/4 も若干増加した (図 4)。NT-5 についてはタンパク質量の発現増加も確認できた (図 4) ほか、マウス *in vivo* で ERGO を投与しても、神経幹細胞が豊富に存在する海馬歯状回で NT-5 のタンパク質量が顕著に増加することを見出している。マウス神経幹細胞に ERGO を添加後には、細胞内情報伝達経路の一種である mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) シグナルのタンパク質である mTOR 及びその下流の S6K1 (p70 ribosomal

protein S6 kinase) のリン酸化も観察され、NT5 受容体 TrkB (tropomyosin receptor kinase B) の阻害剤 GNF5827 を添加すると ERGO による神経新生も抑制された (図 5)。以上より、神経新生への影響。ERGO の作用には、細胞内情報伝達の活性化と、神経栄養因子 NT-5 の発現増



加を介したその受容体 TrkB の活性化が少なくとも一部関与することが明らかとなった。

神経幹細胞は脳の海馬に多く存在し、アルツハイマー型認知症やうつ病患者では海馬の萎縮が起こる。また抗うつ薬の中には神経新生を促進するものが知られる。このように神経新生は疾患と密接に関係することから、ERGO による脳機能に及ぼす作用を次に、*in vivo* で検討した。マウスに ERGO を多く含むタモギタケエキス末を混餌投与したところ、海馬歯状回において未熟な神経細胞のマーカーである doublecortin 陽性細胞の数が増えていた一方、血漿中や脳中 ERGO 濃度が ERGO を含まない対照餌摂取群に比べ高かった。したがって、経口摂取された ERGO が脳内に到達し神経新生を促すことが示唆された。この ERGO 摂取マウスでは、対照餌摂取群に比べ、自発運動量に変化がない一方、強制水泳試験や尾懸垂試験における無動時間が対照群と比較し有意に短縮されたことから、ERGO による抗うつ作用が示唆された。

【引用】

1) Kato Y *et al.* Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm Res* 27(5): 832-840, 2010.

〔雑誌論文〕(計 18 件)

- 1) Ishimoto T, Masuo Y, Kato Y, and Nakamichi N. Ergothioneine-induced neuronal differentiation is mediated through activation of S6K1 and neurotrophin 4/5-TrkB signaling in murine neural stem cells. *Cell Signal* 53: 269-280, 2019.
- 2) Masuo Y, Ohba Y, Yamada K, Al-Shammari AH, Seba N, Nakamichi N, Ogihara T, Kunishima M, Kato Y. Combination metabolomics approach for identifying endogenous substrates of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm Res*, 35(11): 224, 2018.
- 3) Ishimoto T, Nakamichi N, Nishijima H, Masuo Y, Kato Y. Carnitine/organic cation transporter OCTN1 negatively regulates activation in murine cultured microglial cells. *Neurochem Res* 43(1): 107-119, 2018.
- 4) Shinozaki Y, Furuichi K, Toyama T, Kitajima S, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Isozumi N, Nagamori S, Kanai Y, Sugiura T, Kato Y, Wada T. Impairment of the carnitine/organic cation transporter 1-ergothioneine axis is mediated by intestinal transporter dysfunction in chronic kidney disease. *Kid Int* 92(6): 1356-1369, 2017.
- 5) Masuo Y, Nagamori S, Hasegawa A, Hayashi K, Isozumi N, Nakamichi N, Kanai Y, Kato Y. Utilization of liver microsomes to estimate hepatic intrinsic clearance of monoamine oxidase substrate drugs in humans. *Pharm Res* 34(6): 1233-1243, 2017.
- 6) Nakamichi N, Nakayama K, Ishimoto T, Masuo Y, Wakayama T, Sekiguchi H, Sutoh K, Usami K, Iseki S, Kato Y. Food-derived hydrophilic antioxidant ergothioneine is distributed to the brain and exerts antidepressant effect in mice. *Brain Behav* 6(6): e00477, 2016.
- 7) Ben Said M, Grati M, Ishimoto T, Zou B, Chakchouk I, Ma Q, Yao Q, Hammami B, Yan D, Mittal R, Nakamichi N, Ghorbel A, Neng L, Tekin M, Shi XR, Kato Y, Masmoudi S, Lu Z, Hmani M, Liu X. A mutation in SLC22A4 encoding an organic cation transporter expressed in the cochlear endothelium causes human recessive non-syndromic hearing loss DFNB60. *Human Genetics* 135(5): 513-524, 2016.

〔学会発表〕(計 24 件)

- 1) 加藤将夫 Pharmacokinetic modeling and application of organs-on-a-chip technology for prediction of drug disposition and interaction, 13th JSCPT (The Japanese Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics) - KSCPT (Korean Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics) Joint Symposium of Clinical Pharmacology, 12月8日、2017、パシフィコ横浜、神奈川県
- 2) Kato Y. OCTN1 - a broad substrate specificity and disease-associated transporter. Meet the Experts: Transporter Conference Tokyo 2017, November 28, 2017, Tokyo Marriott Hotel, Japan.
- 3) Kato Y. Organic cation transporter OCTN1 as possible target for lung pathology. Workshop on Drug Transporters in the Lungs, September 22-23, 2016, Trinity College Dublin, Dublin.

〔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

金沢大学薬学系分子薬物治療学研究室 <http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunyaku/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中道範隆

□ーマ字氏名：Nakamichi, Noritaka

研究協力者氏名：増尾友佑

□ーマ字氏名：MASUO, Yusuke

研究協力者氏名：酒井佳生

□ーマ字氏名：Sakai, Yoshio

研究協力者氏名：加賀谷尚史

□ーマ字氏名：Kagaya, Takashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。