

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15153

研究課題名(和文)塩基性アミノ酸輸送体を供給経路とするクレアチン脳欠乏症治療薬の開発

研究課題名(英文)Amino acid transporter-based drug development for cerebral creatine deficiency syndrome

研究代表者

寺崎 哲也(Terasaki, Tetsuya)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：60155463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、クレアチントランスポーター(CRT/SLC6A8)機能欠損型クレアチン脳欠乏症における治療薬クレアチンプロドラッグ開発の基盤構築を目的とした。具体的には、標的絶対定量プロテオミクスに基づいて、発達期ラット血液脳関門において、治療薬の脳内送達経路とするトランスポーター分子の発現を明らかにした。さらに、疾患由来線維芽細胞を用いて、トランスポーターを介したクレアチンプロドラッグの細胞内輸送とクレアチン供給効果を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to establish the basis of creatine prodrug therapy for cerebral creatine deficiency with creatine transporter (CRT/SLC6A8) defect. Protein expression of transporters as the potent brain drug delivery pathways was clarified in developing rat blood-brain barrier based on quantitative targeted absolute proteomics. The patient-derived fibroblasts exhibited the cellular transport of the chemically synthesized creatine prodrug followed by the creatine generation.

研究分野：薬物送達学

キーワード：血液脳関門 クレアチントランスポーター

1. 研究開始当初の背景

(1) クレアチンの生理的役割と生合成・

輸送・代謝の分子機構

クレアチンは、クレアチンキナーゼを介し、ATP と結合してクレアチンリン酸に変換され、高エネルギーリン酸の貯蔵体としての役割を担っている。特に、エネルギー需要が高い脳では、クレアチンキナーゼによって貯蔵体であるクレアチンリン酸から迅速にATP を再生している (図 1)。

クレアチンは、主に肝臓や腎臓において、Arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) 及び Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT)による二段階の酵素反応によって生合成される他、食事から摂取される(図 1)。循環血液中から、細胞内へのクレアチンの取り込みは、Na⁺, Cl⁻の濃度勾配を使ってクレアチンを能動輸送する、クレアチントランスポーター (CRT/SLC6A8) が関与する (図 1)。私達は、これまでに脳内のクレアチンは、主に血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) 及び神経細胞に発現している (CRT/SLC6A8) を介して循環血中から神経細胞へと供給されることをマウスで報告した (文献 , ,)。

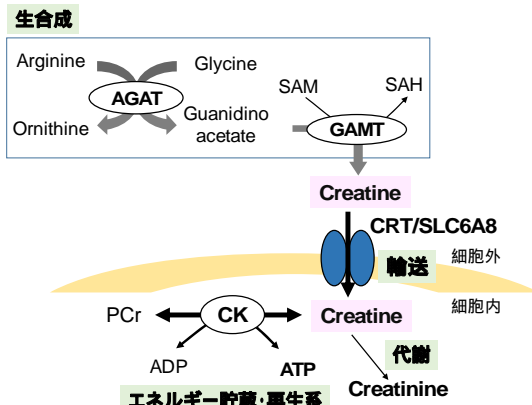


図 1 クレアチン (Creatine) の役割と生合成・輸送・代謝経路

AGAT, Arginine:glycine amidinotransferase; GAMT, Guanidinoacetate methyltransferase; SAH, S-Adenosyl homocysteine; SAM, S-Adenosyl methionine; PCr, Phosphocreatine; CRT/SLC6A8, Creatine transporter; CK, Creatine kinase; ATP, Adenosine triphosphate; ADP, Adenosine diphosphate

(2) クレアチン脳欠乏症とクレアチントランスポーター (CRT/SLC6A8)

2001 年に CRT/SLC6A8 欠損型のクレアチン

脳欠乏症 (CRT-D) の症例が初めて報告された (文献)。CRT-D は、発達期に脳内のクレアチンが著しく欠乏し、X 連鎖精神遅滞を主症状とする他、知的障害や言語発達の遅れ、てんかん発作が報告されている (文献)。CRT-D は精神遅滞男性の 0.3-3.5%、X 連鎖精神遅滞患者の約 2% が罹患、世界で最大 100 万人が罹患していると推定され、頻度の高い疾患の一つとされている。(文献)。従って、CRT-D は、精神遅滞の中でも原因が分かっていることから、早期診断・発達段階における治療介入を行うことが重要であるが、CRT-D に対する有効な治療法は確立されていない。

(3) クレアチン脳欠乏症の治療戦略

クレアチン脳欠乏症のうち、合成酵素 (AGAT または GAMT) 欠損型においてはクレアチンの経口投与が有効である。一方で、CRT-D 患者に対してクレアチンの経口投与を行っても、脳内クレアチン濃度は回復せず、効果を示さないことが報告されている (文献)。そこで、CRT-D の治療には、神経発達期において脳内クレアチンレベルを回復する方法論を確立することが必須である。具体的には、クレアチン合成系を活性化するか、BBB を介して、クレアチンプロドラッグを脳神経細胞内に輸送する方法があげられる。特に後者では、CRT/SLC6A8 以外の輸送経路で、クレアチンプロドラッグを脳内及び神経細胞内へと輸送する必要があり、BBB や神経細胞に発現するトランスポーターを利用することが有効な方法であると考えられる (図 2)。

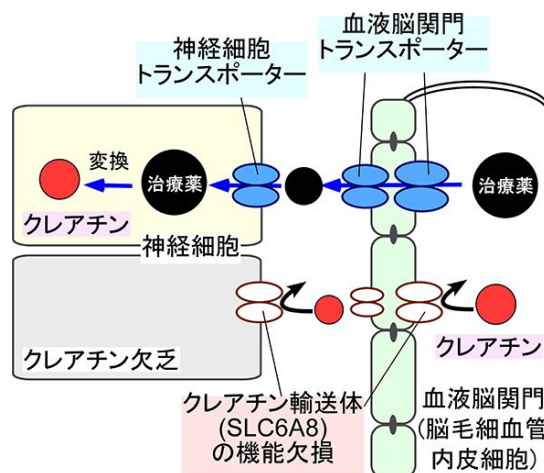


図 2 CRT/SLC6A8 機能欠損型クレアチン脳欠乏症の治療薬開発戦略

これまでに、脳特異的 Slc6a8 ノックアウトマウスにおいて、シクロクレアチン投与によって、認知機能の上昇が見られたことが報

告されている(文献)。さらに、脂溶性を増大させて細胞膜透過性を上昇させたクレアチン構造類似体を用いて、CRT/SLC6A8 を介さずに細胞内に供給するというクレアチン補充戦略が試みられてきたが、BBB を介して脳神経細胞内に輸送されることは明らかにされていない。そこで、CRT/SLC6A8 以外のトランスポーターを利用し、BBB を介して脳神経細胞内へクレアチンを供給する治療薬の開発は、CRT-D における精神遅滞治療の突破口となる可能性が高い(図 2)。

2. 研究の目的

本研究では、発達脳におけるクレアチン合成システムの解明と、小児発達期の BBB において、クレアチンプロドラッグを輸送可能な輸送体分子を同定することを目的とした。さらに、BBB と神経細胞に発現するアミノ酸トランスポーターを利用して細胞内に輸送されるクレアチンプロドラッグを分子設計し、CRT-D 患者由来線維芽細胞に対する細胞内クレアチン供給効果を実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発達脳におけるクレアチン合成システムの解明と、発達期BBBにおける輸送体タンパク質の発現解析

発達脳におけるクレアチン合成システムの解明は、マウス発達脳とGAMT特異抗体(文献)による免疫組織化学的手法を用い、GAMT発現細胞を同定することで行った。発達期BBBにおける輸送体タンパク質の発現解析は、ラット発達脳から脳微小血管画分を単離し、標的絶対定量プロテオミクス的手法(文献)を用いて、輸送担体タンパク質を絶対定量することで行った。

(2) クレアチンプロドラッグの細胞内輸送解析

クレアチンプロドラッグの輸送活性は、CRT機能正常(WT)及びCRT-D症例由来ヒト線維芽細胞を用いて解析した。取り込み活性は、細胞内クレアチンプロドラッグ量、生成物として細胞内クレアチン、代謝物としてクレアチンを液体クロマトグラフィー-質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて定量した。本実験は、関係機関の倫理委員会の承認のもと行った。

4. 研究成果

(1) 発達脳におけるクレアチン合成システムの解明と、発達期 BBB における輸送体タンパク質の発現

マウス発達期の脳において、クレアチン合成酵素 GAMT は、生後 7-14 日までは、神経・グリア前駆細胞、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトおよびペリサイトに広範に発現するが、成熟に伴って神経細胞及びペリサイトにおける発現は著しく低下した(発表論文)。さらに、アストロサイトにおいて、クレアチン生合成前駆体で GAMT の基質となるグアニジノ酢酸の能動的な取り込み機構が存在し、その機構には GABA トランスポーターが関与することを明らかにした(発表論文)。以上の結果から、発達に伴って、アストロサイトはグアニジノ酢酸を取り込んでクレアチンを自ら生合成する機能をもつ一方で、神経細胞は、循環血液またはグリア細胞由来のクレアチンを CRT/SLC6A8 を介して取り込む必要があることが示唆された。さらに、ラット発達期 BBB においてタンパク質発現量が増大するアミノ酸トランスポーターのサブタイプを同定し、脳毛細血管内皮細胞における血液側膜及び脳側膜における局在性を明らかにした(発表論文)。以上の結果から、脳内クレアチンレベルを回復させるためには、クレアチン合成系を活性化する方法ではなく、発達期 BBB で輸送活性化されるアミノ酸トランスポーターを輸送体として、クレアチンプロドラッグを創製することが有用であることが示唆された。

(2) クレアチンプロドラッグの分子設計とトランスポーターを介した細胞内輸送

アミノ酸トランスポーターの輸送基質の分子構造を模したクレアチンプロドラッグを分子設計し、化学合成を行った。まず、SLC6A8 変異症例由来線維芽細胞における基質アミノ酸の取り込み特性が示されたことから、SLC6A8 機能を欠失した細胞においてアミノ酸トランスポーターが機能することが示唆された。アミノ酸トランスポーターの基質となる放射性標識³H 標識基質の取り込みは、プロドラッグ共存下で有意に阻害された。さらに、症例由来線維芽細胞とプロドラッグをインキュベーションした結果、細胞内クレアチン量が増加するプロドラッグを同定した。以上の結果から、プロドラッグはアミノ酸輸送系を介して細胞内に供給可能であることが示唆され、クレアチンプロドラッグを用いた治療薬開発の基盤的研究となった。

< 引用文献 >

Ohtsuki S, Tachikawa M, Takanaga H,

Shimizu H, Watanabe M, Hosoya K, Terasaki T (2002) The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1327-35.

Tachikawa M, Fukaya M, Terasaki T, Ohtsuki S, Watanabe M. Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis. *Eur J Neurosci* 20:144-60.

Tachikawa M, Hosoya K, Ohtsuki S, Terasaki T (2007) A novel relationship between creatine transport at the blood-brain and blood-retinal barriers, creatine biosynthesis, and its use for brain and retinal energy homeostasis. *Subcell Biochem* 46:83-98.

Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ, Jakobs C (2001) X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* 68:1497-500.

van de Kamp JM, Mancini GM, Salomons GS (2014) X-linked creatine transporter deficiency: clinical aspects and pathophysiology. *J Inher Metab Dis* 37:715-33.

Kurosawa Y, Degrauw TJ, Lindquist DM, Blanco VM, Pyne-Geithman GJ, Daikoku T, Chambers JB, Benoit SC, Clark JF (2012) Cyclocreatine treatment improves cognition in mice with creatine transporter deficiency. *J Clin Invest* 122:2837-46.

Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, Terasaki T (2013) A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS* 10:21.

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)

Tachikawa M, Watanabe M, Fukaya M, Sakai K, Terasaki T, Hosoya K (2018) Cell-Type-Specific Spatiotemporal Expression of Creatine Biosynthetic Enzyme S-adenosylmethionine: guanidinoacetate N-methyltransferase in Developing Mouse Brain. *Neurochem Res* 43:500-510. 査読有

DOI: 10.1007/s11064-017-2446-y.

Tachikawa M, Yashiki A, Akanuma S, Matsukawa H, Ide S, Minami M, Hosoya K (2018) Astrocytic -aminobutyric acid (GABA) transporters mediate guanidinoacetate transport in rat brain. *Neurochem Int* 113:1-7. 査読有

DOI: 10.1016/j.neuint.2017.11.013.

Tachikawa M, Hirose S, Akanuma S, Matsuyama R, Hosoya K (2018) Developmental changes of L-arginine transport at the blood-brain barrier in rats. *Microvas Res* 117:16-21. 査読有

DOI: 10.1016/j.mvr.2017.12.003.

〔学会発表〕(計 3件)

立川正憲：中枢薬剤学-Connecting the dots、SNPEE 2017 特別講演「Glocal Pharmaceuticals ~ 那由多の可能性を世界へ~」、日本薬学会第32年会、2017年5月13日、さいたま

太田悠介、立川正憲、吉田将人、土井隆行、和田敬仁、寺崎哲也：クレアチン脳欠乏症治療を指向したカチオン性アミノ酸トランスポーターを輸送経路とするクレアチンプロドラッグの開発、日本薬学会第137年会、2017年3月24-27日、仙台

大森広太郎、立川正憲、太田悠介、内田康雄、寺崎哲也：発現量変動に基づく脳発達期におけるラット血液脳関門の細胞膜タンパク質群の分類化、日本薬学会第137年会、2017年3月24-27日、仙台

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0 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

寺崎 哲也 (TERASAKI, Tetsuya)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：60155463

(2) 研究分担者

立川 正憲 (TACHIKAWA, Masanori)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：00401810

吉田 将人 (YOSHIDA, Masahito)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：80511906