

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18957

研究課題名(和文)新規白内障治療薬の開発を目指したアキアポリン0の機能解明

研究課題名(英文) Investigation of AQP0 functions for making anti-cataract drug that targets for AQP0

研究代表者

中澤 洋介 (Nakazawa, Yosuke)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教

研究者番号：60411708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水晶体特異的な水チャネルであるアキアポリン0 (AQP0) の物質透過能および、細胞接着能について検討した。

(1) 物質透過能解析は、AQP0を恒常的に発現させたL細胞(L-AQP0)および、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて検討した。その結果、AQP0は水だけではなくアスコルビン酸を透過することが明らかとなった。また(2) 細胞接着能解析の結果、L-AQP0とベクターコントロールあるいは、L-AQP0とAQP1安定発現L細胞の間で接着は認められなかったが、L-AQP0同士のみ組み合わせでのみ接着細胞が観察された。

研究成果の概要(英文)：(1) The permeation assay of AQP0 was used the stable L-cell line expressing AQP0. As the result, AQP0 can permeate ascorbic acid ex vivo, and also indicate that there is a difference between the import and export of ascorbic acid via AQP0 channel.

(2) The cell adhesion assay of AQP0 was revealed that AQP0 could bind directly to the opposing membrane through the C-loop domain. We also found that 109Pro and 110Pro were important amino acids for cell adhesion, but mutations in the C-loop of AQP0 did not affect AQP0 water permeability.

研究分野：医療薬学、生物学

キーワード：水晶体 水チャネル 白内障 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

(1) 水晶体は光学系として機能を果たすため、透明性を維持する必要がある。一方で、無血管無神経組織であるため、水晶体の細胞間での物質移動・物質輸送機構は厳密に制御されている。水晶体は、外側をカプセルで覆われており、水やビタミン、酸素といった生命活動に必要な物質は、血液が流過して生成された房水より取り込んでいる。

栄養物質は、角膜側に存在する一層の上皮細胞へ取り込まれ、その後水晶体の大部分を占める線維細胞へ拡散される。そのため、上皮細胞-線維細胞、あるいは線維細胞間の接着や物質透過機能の探索は、水晶体透明性維持機構を知る上で非常に重要である。

この水晶体が何らかの原因で混濁すると、白内障と呼ばれる疾患となる。白内障は、世界中の盲目の原因の第1位となっている。唯一の治療法は、混濁した水晶体を摘出し人工眼内レンズを挿入する外科的手術であるが、手術後の後発白内障発症など、問題点は数多く残っている。このことから、白内障発症抑制にむけた抗白内障薬の探索は急務であり、そのために水晶体の特性を明らかにすることは大変有意義である。

(2) 我々は水晶体線維細胞の膜タンパク質の60%以上を占めるAQP0に着目し検討を行ってきた。その結果、水晶体内アスコルビン酸濃度とAQP0の発現量に高い相関性があることを明らかにし、またAQP0が水だけではなくアスコルビン酸を透過させ、水晶体内の抗酸化物質拡散に寄与することも報告した。本論文は、AQP0が水以外の化合物を透過させることを証明した最初の論文であり、分子量約176で抗酸化物質のアスコルビン酸がAQP0チャンネルを通過できることはAQP0研究者だけではなく、他のAQPファミリー研究においても大きなインパクトを与えた。

(3) 一方、AQP0は細胞の接着にも関与することが示唆されているが、直接的データはいまだ報告されていない。しかし、AQP0変異を持つ遺伝的家系では、水晶体線維細胞の接着が減弱し、早期に白内障を発症することから、AQP0の細胞接着機能もまた、水晶体透明性維持に重要であることが推察される。しかし、細胞接着機能に関与するAQP0部位はいまだ明らかにされていない。

AQP0はチャンネル機能と細胞接着機能を合わせ持つことで、水晶体内の物質輸送のジャンクション機能を果たすことができると推察される。そのためAQP0のチャンネル特性と細胞接着機能に関与する部位の同定は、AQP0ジャンクション機能調節機構を解明する上で重要である。

2. 研究の目的

AQP0の物質透過能は加齢に伴い低下する

ことが知られており、AQP0の機能低下が水晶体内抗酸化物質拡散低下を引き起こし、白内障を誘引すると考えられる。

本研究ではAQP0のチャンネル特性および、ジャンクション機能を検討することで、アスコルビン酸を含めた水晶体内物質透過機序を明らかにし、AQP0を標的とし水晶体内抗酸化物質濃度均一化による抗白内障効果を発揮する、新しいメカニズムの抗白内障薬の開発を目指した。

また、AQP0のチャンネル機能および、水晶体内物質輸送機構を解明し、水晶体透明性維持機構を明らかにし、新しい抗白内障薬を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AQP0のチャンネル機能の解明

本研究では、AQP0のアスコルビン酸以外に透過する低分子化合物の探索を行う。また、化合物の電荷、あるいは分子量によるAQP0チャンネル透過の差異を明らかにする。

具体的には、AQP0を安定的に発現させたL細胞および、AQP0を一過性に発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞の系を用いた。

どちらの細胞系でも、低分子を高濃度を含む培地で一定時間培養し、培養後、細胞内の濃度をHPLCもしくは、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターを用いて測定した。

(2) AQP0の細胞接着能、およびジャンクション機能の解析

AQP0の細胞接着能の解析は、cell tracker 試薬を用いて検討した。AQP0を安定的に発現させたL細胞にcell tracker Red 試薬を取り込ませ、単層に培養した。単層培養後、上からcell tracker Blue 試薬を取り込ませたL細胞を滴下し、接着培養させた。一定時間培養後、上層細胞/下層細胞比をフローサイトメーターにより検討した。

また、AQP0の細胞接着に必要なドメインの探索は、AQP0の各細胞外ループ領域(A-loop, C-loop, E-loop 領域)をグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)に融合させた発現ベクターを作成し、GST pull down 法により結合部位を同定した。

4. 研究成果

AQP0のチャンネル機能の解明は、アフリカツメガエルとL-cellを用いて検討した。その結果、ルシファーイエロー(カチオン性低分子)、DAPI(アニオン性低分子)ともに透過しないことが明らかとなった。さらにその他の低分子化合物も検討したがいずれもAQP0チャンネルポアを透過しなかった。

そこで、AQP0の機能を制御する新規候補タンパク質の検討を行った。その結果、水晶体に発現している中間径フィラメントであるフィレンシンが直接の相互作用を介してAQP0の物質透過能を負に制御することが明らかとなった。

次に、細胞接着能について検討した。古くより AQPO は、物質透過能と細胞間接着能の二つの機能を持つことが推察されていたが、直接的なデータはいまだ報告されていなかった。そこで本採択課題では、GST pull-down 法により結合部位を同定した。その結果、AQPO は C-loop を介して互いに結合することが明らかとなった。さらに AQPO の細胞接着能を L 細胞を用いて検討した。その結果、AQP1 およびベクターコントロールにくらべ、AQPO 発現 L 細胞で有意な細胞接着が認められた。さらに C-loop の中で細胞接着に關与するアミノ酸の同定を目指し、いくつかの変異を導入した AQPO を用いて検討した。その結果、C-loop の V109, V110 が深く關与していることが示唆された。一方でこの領域に変異を入れても水透過能に影響を与えないことが明らかとなった。

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 12 件)

Yosuke Nakazawa, Mikako Oka, Megumi Funakoshi-Tago, Hiroomi Tamura, Makoto Takehana. The extracellular C-loop domain plays an important role in the cell adhesion function of aquaporin 0. *Current Eye Research*. 査読あり. 2017 (42) 617-624. DOI: 10.1080/02713683.2016.1217547.

上野 祥奈, 山岡 咲絵, 伊藤 吉將, 小竹 武, 中澤 洋介, 長井 紀章. ピーズミル破碎に伴うプレノキシ点眼剤の薬物溶解速度および分散安定性の改善. *薬学雑誌*. 査読あり. 2017 (137) 635-641. DOI: 10.1248/yakushi.16-00267.

中澤 洋介. 細胞間接着分子による白内障発症機序. *日本白内障学会誌*. 査読あり. 2017 (29) 34-36. DOI: 10.14938/cataract.09-007

Ishimori Nana, Oguchi Jun, Nakazawa Yosuke, Kobata Kenji, Funakoshi-Tago Megumi, Tamura Hiroomi. Roasting Enhances the Anti-Cataract Effect of Coffee Beans: Ameliorating Selenite-Induced Cataracts in Rats. *Current Eye Research*. 査読あり. 2017 (42) 864-870. DOI: 10.1080/02713683.2016.1262877.

Noriaki Nagai, Yosuke Nakazawa, Yoshimasa Ito, Kazutaka Kanai, Norio Okamoto, Yoshikazu Shimomura. A Nanoparticle-based Ophthalmic Formulation of Dexamethasone Enhances

Corneal Permeability of the Drug and Prolongs its Corneal Residence Time. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 査読あり. 2017(40) 1055-1062. DOI: 10.1248/bpb.b17-00137.

Yosuke Nakazawa, Mikako Oka, Makoto Takehana. Model for Studying Anti-allergic Drugs for Allergic Conjunctivitis animals. *Open Medicine*. 査読あり. 2017(12) 231-238. DOI: 10.1515/med-2017-0034.

Yuki Uchihara, Fumihito Ueda, Kenji Tago, Yosuke Nakazawa, Tomoyuki Ohe, Tadahiko Mashino, Shigenobu Yokota, Tadashi Kasahara, Hiroomi Tamura, Megumi Funakoshi-Tago. Alpha-tocopherol attenuates the anti-tumor activity of crizotinib against cells transformed by NPM-ALK. *PLoS One*. 査読あり. 2017(12) e0183003. DOI: 10.1371/journal.pone.0183003

Nakazawa Yosuke, Nagai Noriaki, Ishimori Nana, Oguchi Jun, Tamura Hiroomi. Administration of antioxidant compounds affects the lens chaperone activity and prevents the onset of cataracts. *Biomedicine and pharmacotherapy*. 査読あり. 2017(95) 137-143. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.055

Noriaki Nagai, Fumihiko Ogata, Hiroko Otake, Naohito Kawasaki, Yosuke Nakazawa, Kazutaka Kanai, Norio Okamoto, Yoshikazu Shimomura. Co-instillation of nano-solid magnesium hydroxide enhances corneal permeability of dissolved timolol. *Experimental Eye Research*. 査読あり. 2017(165) 118-124. DOI: 10.1016/j.exer.2017.10.002

Saori Deguchi, Hiroko Otake, Yosuke Nakazawa, Noriko Hiramatsu, Naoki Yamamoto, Noriaki Nagai. Ophthalmic Formulation Containing Nilvadipine Nanoparticles Prevents Retinal Dysfunction in Rats Injected with Streptozotocin. *International Journal of Molecular Sciences*. 査読あり. 2017 (18) 2720-2730. DOI: 10.3390/ijms18122720.

11 Yosuke Nakazawa, Mikako Oka, Hiroomi Tamura, Makoto Takehana. Effect of hesperetin on chaperone activity in selenite-induced cataract. *Open Medicine*. 査読あり. 2016 (11) 183-189.

DOI: 10.1515/med-2016-0035.

- 12 Mikako Oka, Yosuke Nakazawa, Noriyasu Hada, Fumiyuki Kiuchi, Yukari Matsushima, Koji Chiba, Makoto Takehana. Evaluation of the inhibitory effects of Rokumigan and Hachimi jioogan on cataract formation in a rat model of streptozotocin-induced type 1 diabetes. Journal of the Japanese Society for Cataract Research. 査読あり. 2016 (28) 97-105. DOI: 10.14938/cataract.08-004

〔学会発表〕(計 12 件)

中澤洋介(代表者) コーヒーによる肥満誘導白内障予防効果の検討 日本薬学会第 138 年会大会 2018 年

中澤洋介(代表者) ヘスペレチンおよびその誘導体の白内障予防効果の検討 日本薬学会第 138 年会大会 2018 年

Yosuke Nakazawa(代表者) The sub-cellular expression patterns of the mechano-sensitive channels TRPV1/4 in the mouse lens are modulated by changes in zonular tension. The 5th International Conference on the Lens 2017 年

中澤洋介(代表者) ニルバジピンナノ結晶点眼剤の開発と網膜症への適応. 第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2017 年

中澤洋介(代表者) ラノステロールを用いたナノ結晶点眼剤の開発と白内障治療薬としての有用性評価. 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2017 年

中澤洋介(代表者) MCF-7 細胞におけるエストロゲン受容体の発現に対するコーヒーの影響. 第 61 回日本薬学会関東支部大会 2017 年

中澤洋介(代表者) 水晶体に含有するアスコルビン酸フリーラジカル還元酵素の同定. 第 56 回日本白内障学会総会/第 43 回水晶体研究会 2017 年

中澤洋介(代表者) 白内障抑制効果をもつコーヒー成分の解析 第 60 回日本薬学会関東支部大会 2017 年

中澤洋介(代表者) 抗悪性腫瘍剤による併発白内障と思われる 1 例 第 55 回日本白内障学会総会/第 42 回水晶体研究会 2017 年

- 10 中澤洋介(代表者) コーヒーによる白内障抑制効果の検討 第 55 回日本白内障学会総会/第 42 回水晶体研究会 2017 年

- 11 中澤洋介(代表者) 細胞外領域 C-loop を介したアクアポリン 0 の細胞間接着 第 55 回日本白内障学会総会/第 42 回水晶体研究会 2017 年

- 12 中澤洋介(代表者) 水晶体特異的水チャネルであるアクアポリン 0 の機能解明と、それを標的とした新規白内障治療薬の可能性 第 12 回 慶應義塾大学先端研究センター医工薬コモンズ 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕(計 0 件)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 洋介 (NAKAZAWA Yosuke)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号: 60411708

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし