

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18262

研究課題名(和文) MATE型輸送体のテストステロン輸送体としての生理機能解析とその阻害剤の探索

研究課題名(英文) Physiological analysis of MATE transporters as testosterone transporter

研究代表者

合田 光寛 (GODA, Mitsuhiro)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：40585965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：MATE型輸送体は、腎臓、肝臓における有機カチオン排泄輸送体としての重要性が広く認められている。一方で、有機カチオン排泄以外の機能も示唆されていることから、本研究では、MATE型輸送体のテストステロン輸送体としての機能を明らかにすることを目的に検討を行った。初代培養pig Leydig細胞を用いて、MATE型輸送体がライディッヒ細胞からのテストステロン分泌に関与すること、また、human MATE1のテストステロン輸送に重要なアミノ酸側鎖を同定し、human MATE1がテストステロン輸送に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで有機カチオン輸送体としての機能しか着目されていなかったMATE型輸送体のテストステロン分泌に関する生理的機能を明らかにするだけでなく、脂溶性ホルモンの能動的分泌機構の解明の一助となるものである。テストステロン分泌を効率的に抑制するMATE阻害剤の創薬により、テストステロン感受性前立腺癌に対するホルモン療法の新規治療戦略の創生につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The importance of MATE-type transporters as organic cation excretion transporters in the kidney and liver is widely recognized. On the other hand, functions other than organic cation excretion have been suggested, the aim of this study was to determine the function of MATE-type transporter as a testosterone transporter. Using primary cultured pig Leydig cells, we found that MATE-type transporter may be involved in testosterone secretion from Leydig cells and further suggested that human MATE1 may be involved in testosterone transport.

研究分野：薬理学

キーワード：MATE テストステロン トランスポーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

MATE (Multidrug And Toxic Compound Extrusion) 型輸送体は原核生物から高等真核生物に至るまで広く保存されている多剤排出輸送体ファミリーの一つである。哺乳類においてもホモログが同定されており(SLC47)、腎近位尿管や肝微小胆管の apical membrane に強く発現しており、 $H^+$  との対向輸送によって有機カチオン性 (organic cation,  $OC^+$ ) 薬物の排泄の最終段階を担うトランスポーターとして 2005 年に Otsuka らによって発見され(Otsuka M, et al., *PNAS*. 2005)、その重要性が広く認められている。

一方で、これまでにマウスの MATE ホモログである mMATE2 が精巣 Leydig 細胞特異的に発現していることが報告されており、MATE 型輸送体のテストステロンの輸送への関与が示唆されている。

さらに、ラットの MATE ホモログである rMATE2 が精巣 Leydig 細胞特異的に発現していること(図 1)も確認され、MATE 型輸送体の基質であるシメチジン、ピリメサミンを投与することによりラット血清中テストステロン量が有意に減少することが明らかになった(図 2)。上記の MATE 型輸送体の基質であるシメチジンやペラパミルについては、これらをヒトに投与した際の副作用として血中テストステロンの減少を起こす可能性があることが従来から添付文書にも記載されており、ヒトにおいても、MATE 型輸送体とテストステロン分泌との関連が強く示唆される。

しかし、これまでテストステロンなどの脂溶性ホルモンは細胞膜を容易に通過できることから、その分泌は受動的な拡散によってのみ行われていると考えられており、テストステロン分泌に関わる輸送体などの報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、MATE 型輸送体のテストステロン輸送体としての機能を明らかにするため、初代培養 pig Leydig 細胞を用いた検討、および MATE 型輸送体安定発現株を用いたテストステロン輸送活性評価を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 初代培養 pig Leydig 細胞を用いた検討

生後 2 週齢のブタの去勢により得られた精巣から、コラゲナーゼ処理および Percoll を用いた遠心分離により Leydig 細胞を単離し、実験に用いた。Human chorionic gonadotropin (hCG)(50 IU/mL) 刺激による初代培養 pig Leydig 細胞からのテストステロン分泌及び細胞内テストステロン量に対する各種 MATE 型輸送体基質の影響を評価した。また、これらの薬剤のテストステロン産生酵素(P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c17</sub>, 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD, StAR protein)の発現や酵素活性に対する影響についても評価した。

### (2) ドッキングシミュレーションを用いたテストステロン分泌阻害剤の探索

これまでに、NorM-VC (*Vibrio Cholerae*) など、細菌の MATE 型輸送体の X 線結晶構造解析がなされた (He X, et al., *Nature*. 2010)。その結晶構造から、細菌類での MATE 型輸送体の詳細な輸送機構が解明されつつあり、 $H^+$  や  $OC^+$  の結合ポケットも推定されている。そこで、ホモロジーモデリング法を用いて、hMATE1 および hMATE2K の立体構造を予測した。また、基質との結合を予測するドッキングシミュレーションを用いて、 $OC^+$  の結合ポケットとは異なる、脂溶性ホルモンの結合ポケットとして可能性の高い領域を探索した。

さらに、予測した結合ポケット近傍のアミノ酸残基(V52, I55, L165, N220, S223)を置換した変異型 MATE 型輸送体でもドッキングシミュレーションを行い、テストステロン輸送に関与するアミノ酸残基を探索した。

### (3) MATE 型輸送体を介したテストステロンの輸送活性測定

トランスポーターの輸送活性測定に汎用されている取り込み実験では、脂溶性基質の場合、細胞膜等に付着しやすいなどの理由で、バックグラウンドが高くなり、正確な輸送量の測定が困難である。その問題を解決するため、in vitro 評価系として、MATE 型輸送体を介した脂溶性基質の輸送活性の測定系を確立した(図 3)。図 3 に示しているように、メンブレンインサート上で培養することにより形成される細胞単層膜を用いて、細胞膜を経由した脂溶性基質の輸送量を定量的に評価した。

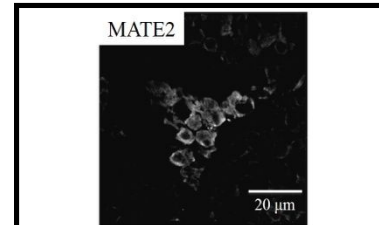


図1: ラット精巣の MATE 2 免疫染色画像  
精巣の Leydig 細胞特異的に MATE 2 陽性反応が認められた

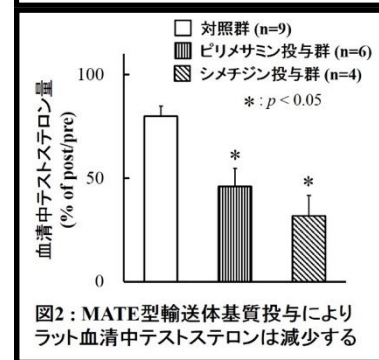


図2: MATE 型輸送体基質投与によりラット血清中テストステロンは減少する

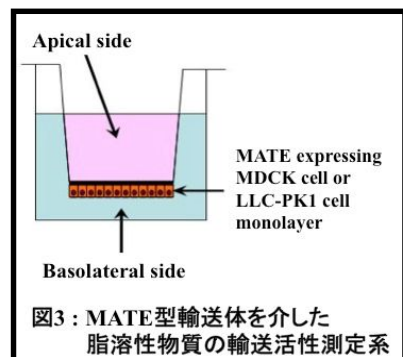


図3: MATE 型輸送体を介した脂溶性物質の輸送活性測定系

## 4. 研究成果

### (1) 初代培養 pig Leydig 細胞を用いた検討

生後2週齢のブタの去勢により得られた精巣から単離した pig Leydig 細胞に pig MATE2 タンパク質が発現していることが明らかになった。hCG (50 IU/mL) 刺激により pig Leydig 細胞からのテストステロン分泌量は有意に増加し、代表的な MATE 型輸送体の基質であるシメチジン、ピリメタミンの共存により濃度依存的に有意に抑制された(図4)。さらに、細胞内テストステロン量に対する各種 MATE 型輸送体基質の影響を評価したところ、シメチジン、ピリメタミン共に細胞内テストステロン量を有意に増加させた。また、これらの薬剤のテストステロン産生酵素(P450scc, P450c17, 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD, StAR protein)の発現や酵素活性に対する影響についても評価した結果、各種テストステロン産生酵素 mRNA 発現量に変化はなく、テストステロン産生量にも影響は認められなかった。

これらの結果から、MATE 型輸送体の基質であるシメチジン、ピリメタミンはテストステロン産生量には影響を与えず、Leydig 細胞からのテストステロン分泌量を減少させることが示唆された。

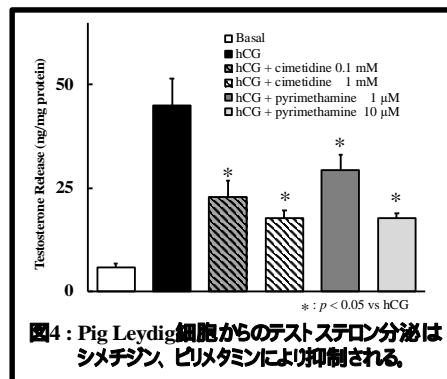


図4: Pig Leydig細胞からのテストステロン分泌はシメチジン、ピリメタミンにより抑制される。

### (2) ドッキングシミュレーションを用いたテストステロン分泌阻害剤の探索

ホモロジーモデリング法を用いて、hMATE1 および hMATE2K の立体構造を予測し、基質との結合を予測するドッキングシミュレーションを用いて、脂溶性ホルモンの結合ポケットとして可能性の高い領域を探索した結果、hMATE1 において、OC<sup>+</sup>の結合ポケットとは異なるテストステロン結合ポケットの存在が示唆された。一方で、hMATE2K においてはテストステロン結合部位は同定できなかった。

さらに、予測した結合ポケット近傍のアミノ酸残基(V52, I55, L165, N220, S223)を置換した変異型 MATE 型輸送体で同様のドッキングシミュレーションを行った結果、hMATE1 V52T ではテストステロンとの結合様式が異なる可能性が示唆された。

### (3) MATE 型輸送体を介したテストステロンの輸送活性測定

ブタ近位尿細管細胞である LLC-PK1 細胞を用いて hMATE1、hMATE2K の安定発現株を作製した。図3で示すような測定系を用いて、テストステロンの経細胞輸送量を比較したところ、hMATE1 安定発現株では、野生型 LLC-PK1 と比較して単位時間あたりのテストステロン輸送量が有意に多かった。また、hMATE1 のテストステロン輸送における駆動力は H<sup>+</sup>である可能性が示唆された。

本研究の結果から、精巣 Leydig 細胞に発現している MATE 型輸送体はテストステロン輸送に関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okada Naoto, Niimura Takahiro, Zamami Yoshito, Hamano Hirofumi, Ishida Shunsuke, Goda Mitsuhiro, Takechi Kenshi, Chuma Masayuki, Imanishi Masaki, Ishizawa Keisuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Pharmacovigilance evaluation of the relationship between impaired glucose metabolism and BCR-ABL inhibitor use by using an adverse drug event reporting database	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 174 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okada Naoto, Kawazoe Hitoshi, Takechi Kenshi, Matsudate Yoshihiro, Utsunomiya Ryo, Zamami Yoshito, Goda Mitsuhiro, Imanishi Masaki, Chuma Masayuki, Hidaka Noriaki, Sayama Koji, Kubo Yoshiaki, Tanaka Akihiro, Ishizawa Keisuke	4. 巻 41
2. 論文標題 Association Between Immune-Related Adverse Events and Clinical Efficacy in Patients with Melanoma Treated With Nivolumab: A Multicenter Retrospective Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Therapeutics	6. 最初と最後の頁 59 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinthera.2018.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kondo Masateru, Imanishi Masaki, Fukushima Keijo, Ikuto Raiki, Murai Yoichi, Horinouchi Yuya, Izawa-Ishizawa Yuki, Goda Mitsuhiro, Zamami Yoshito, Takechi Kenshi, Chuma Masayuki, Ikeda Yasumasa, Fujino Hiromichi, Tsuchiya Koichiro, Ishizawa Keisuke	4. 巻 32
2. 論文標題 Xanthine Oxidase Inhibition by Febuxostat in Macrophages Suppresses Angiotensin II-Induced Aortic Fibrosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 249 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ajh/hpy157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Niimura T, Zamami Y, Imai T, Nagao K, Kayano M, Sagara H, Goda M, Okada N, Chuma M, Takechi K, Imanishi M, Koyama T, Koga T, Nakura H, Sendo T, Ishizawa K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Evaluation of the Benefits of De-Escalation for Patients with Sepsis in the Emergency Intensive Care Unit.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pharm Pharm Sci.	6. 最初と最後の頁 54-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niimura T1, Zamami Y, Imai T, Nagao K, Kayano M, Sagara H, Goda M, Okada N, Chuma M, Takechi K, Imanishi M, Koyama T, Koga T, Nakura H, Sendo T, Ishizawa K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Evaluation of the Benefits of De-Escalation for Patients with Sepsis in the Emergency Intensive Care Unit.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pharm Pharm Sci.	6. 最初と最後の頁 54-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goda Mitsuhiro, Oda Kana, Oda Atsuko, Kobayashi Naoki, Otsuka Masato	4. 巻 100
2. 論文標題 Involvement of the Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporter in Testosterone Release from Cultured Pig Leydig Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pharmacology.	6. 最初と最後の頁 31 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000460822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 近藤 正輝, 今西 正樹, 生藤 来希, 村井 陽一, 福島 圭謙, 堀ノ内 裕也, 石澤 有紀, 合田 光寛, 座間味 義人, 武智 研志, 中馬 真幸, 池田 康将, 藤野 裕道, 土屋 浩一郎, 石澤 啓介
2. 発表標題 キサンチンオキシダーゼ阻害剤による新規血管線維化抑制機構の検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 大学院生シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 合田 光寛, 齊家 和仁, 神田 将哉, 村井 陽一, 吉田 愛美, 新村 貴博, 石澤 有紀, 座間味 義人, 中馬 真幸, 武智 研志, 生田 賢治, 濱野 裕章, 岡田 直人, 堀ノ内 裕也, 池田 康将, 桐野 靖, 中村 敏己, 寺岡 和彦, 石澤啓介
2. 発表標題 ビッグデータを用いたシスプラチン誘発腎障害に対する新規予防薬の探索とその有効性の検証
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻田 巧, 柴田 高洋, 井上 貴久, 山川 裕介, 合田 光寛, 座間味 義人, 桐野 靖, 中村 敏己, 寺岡 和彦, 石澤 啓介
2. 発表標題 周術期乳がん患者のEC両方におけるRDI低下の要因探索と対策
3. 学会等名 日本臨床腫瘍薬学会学術大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 合田 光寛, 齊家 和仁, 神田 将哉, 新村 貴博, 石澤 有紀, 座間味 義人, 中馬 真幸, 濱野 裕章, 生田 賢治, 岡田 直人, 武智 研志, 堀ノ内 裕也, 池田 康将, 桐野 靖, 中村 敏己, 寺岡 和彦, 石澤啓介
2. 発表標題 シスプラチン誘発腎障害に対する新規予防薬の有効性の基礎的検証
3. 学会等名 日本臨床腫瘍薬学会学術大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 座間味 義人, 川尻 雄大, 新村 貴博, 合田 光寛, 岡田 直人, 濱野 裕章, 武智 研志, 中馬 真幸, 堀ノ内 裕也, 石澤 有紀, 池田 康将, 小林 大介, 島添 隆雄, 石澤 啓介
2. 発表標題 大規模医療情報データベースを活用した抗がん剤誘発副作用に対する予防薬の探索
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 年会企画シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新村 貴博, 座間味 義人, 川尻 雄大, 合田 光寛, 岡田 直人, 萱野 純史, 小山 敏広, 今西 正樹, 武智 研志, 中馬 真幸, 堀ノ内 裕也, 石澤 有紀, 池田 康将, 小林 大介, 島添 隆雄, 石澤 啓介
2. 発表標題 ドラッグリポジショニング手法を用いたオキサリプラチン誘発末梢神経障害の予防薬探索
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 合田 光寛, 齊家 和仁, 神田 雅哉, 村井 陽一, 吉田 愛美, 新村 貴博, 石澤 有紀, 座間味 義人, 中馬 真幸, 濱野 裕章, 生田 賢治, 岡田 直人, 武智 研志, 堀ノ内 裕也, 池田 康将, 石澤 啓介
2. 発表標題 シスプラチン誘発腎障害に対する新規予防薬の有効性の検証
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 琴子, 石澤 有紀, 近藤 正輝, 今西 正樹, 座間味 義人, 堀ノ内 裕也, 武智 研志, 合田 光寛, 中馬 真幸, 池田 康将, 石澤 啓介
2. 発表標題 薬物誘発性大動脈瘤または大動脈解離モデルマウスに対するケルセチンの効果
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村井 陽一, 合田 光寛, 齊家 和仁, 神田 将哉, 吉田 愛美, 新村 貴博, 石澤 有紀, 座間味 義人, 中馬 真, 濱野 裕章, 岡田 直人, 武智 研志, 堀之内 裕也, 池田 康将, 石澤 啓介
2. 発表標題 シスプラチン誘発腎障害に対する各種5-HT3受容体拮抗薬の影響
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中馬 真幸, 今井 徹, 栃倉 尚広, 鈴木 慎一郎, 岩淵 聡, 関本 真雄, 中山 貴裕, 座間味 義人, 武智 研志, 今西 正樹, 岡田 直人, 合田 光寛, 近藤 正輝, 菊池 憲和, 吉田 善一, 石澤 啓介, 楊河 宏章
2. 発表標題 敗血症に対する抗菌薬の至適投与法確立に向けた研究 -TDM業務から得られた知見-
3. 学会等名 第28回日本医療薬学会年会 シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齊家 和仁, 合田 光寛, 伊勢 諒, 新村 貴博, 石澤 有紀, 座間味 義人, 中馬 真幸, 濱野 裕章, 岡田 直人, 武智 研志, 今西 正樹, 堀ノ内 裕也, 池田 康将, 土屋 浩一郎, 石澤 啓介
2. 発表標題 シスプラチン誘発腎障害に対する脂質異常症治療薬の影響
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 合田 光寛, 齊家 和仁, 伊勢 諒, 新村 貴博, 石澤 有紀, 座間味 義人, 中馬 真幸, 岡田 直人, 武智 研志, 今西 正樹, 池田 康将, 桐野 靖, 中村 敏己, 寺岡 和彦, 石澤 啓介
2. 発表標題 シスプラチン誘発腎障害に対する新規予防薬の探索と基礎的検証
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田直人, 中馬 真幸, 座間味 義人, 合田 光寛, 今西 正樹, 武智 研志, 桐野 靖, 中村 敏己, 寺岡 和彦, 石澤 啓介
2. 発表標題 血液疾患患者におけるバンコマイシン初回血中濃度が急性腎障害の発現に与える影響
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新村 貴博, 座間味 義人, 川尻 雄大, 牛尾 聡一郎, 内田 真美, 合田 光寛, 岡田 直人, 今西 正樹, 武智 研志, 中馬 真幸, 堀ノ内 裕也, 石澤 有紀, 池田 康将, 石澤 啓介
2. 発表標題 オキサリプラチン誘発末梢神経障害の予防薬探索を目的としたドラッグリポジショニング研究 - 医療ビッグデータを活用した検討 -
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 新村 貴博, 座間味 義人, 川尻 雄大, 牛尾 聡一郎, 石澤 有紀, 合田 光寛, 岡田 直人, 今西 正樹, 武智 研志, 中馬 真幸, 堀ノ内 裕也, 池田 康将, 石澤 啓介
2. 発表標題 医療ビッグデータを活用したオキサリプラチン誘発末梢神経障害に対する予防薬の探索
3. 学会等名 第12回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 合田光寛、池原季、崎谷眞子、小田温子、那須義人、小田果奈、小林直木、大塚正人
2. 発表標題 MATE型輸送体のテストステロン輸送体としての生理機能解析
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2017 第25回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考