

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390054
 研究課題名（和文） 中枢機能調節因子として機能する有機イオントランスポーター群の生物薬学的研究
 研究課題名（英文） Biopharmaceutical Study on Organic Ions Transporters Which Act as Central Nervous System Modulators
 研究代表者
 藤田 卓也（FUJITA TAKUYA）
 立命館大学・薬学部・教授
 研究者番号：00247785

研究成果の概要：本研究では、グリア細胞自身が神経伝達物質の回収に関与するトランスポーターのみならず、情報伝達物質に対する様々な受容体、チャネルをも発現している知見をもとに、中枢神経系に発現する生体有機イオンに対する様々なトランスポーターがイオンチャネルや受容体の機能発現の調節を担っている可能性も見出した。さらに、中枢における生体物質輸送にかかわる様々な有機イオントランスポーターの発現と機能解析を精力的に行い、これらトランスポーターの分子実体について明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,700,000	0	4,700,000
2007年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
総計	15,100,000	3,120,000	18,220,000

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：中枢神経系、トランスポーター、神経化学、受容体、薬物輸送、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

生体内のきわめて多彩でかつ複雑な生命現象は、組織を構成する細胞集団の高度に統合された細胞応答の上に成立している。この機能統合には細胞間の情報伝達が必要であり、神経系、内分泌系、免疫系などが細胞外情報伝達系として知られている。一方、細胞内情報伝達系は情報伝達物質の情報を細胞内へ転換する機構であり、その反応系の発動は主として細胞膜上の刺激に始まる。神経系においてはシナプスを中心とした神経伝達物質による情報伝達機構の解明が特に進められており、多数の受容体や機能分子が明らかにされている。ニューロンよりシナプス間隙中に放出された神経伝達物質はグリア細胞が有する一連のトランスポーター群によ

り速やかに回収される。研究代表者である藤田は、グリア細胞自身がシナプス間隙からの神経伝達物質の回収に関与するトランスポーターのみならず、情報伝達物質に対する様々な受容体、チャネルをも発現していることをこれまでに明らかにしてきた。さらに、抗てんかん作用や鎮痛作用を有する GABA 誘導体 gabapentin の電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VGCC) に対する作用がアミノ酸 transporter system L を介した輸送により調節される可能性も見出し、中枢における神経機能の維持にアストロサイトなどのグリア系細胞も重要な役割を果たしている可能性を示してきた。

これらトランスポーターは、中枢において単なる栄養物質の供給に関与しているのみ

ならず、神経伝達物質の再合成、浸透圧調整をはじめとして様々な生理作用を有していると考えられるが、神経伝達物質の再吸収に関与するトランスポーター以外は詳細な検討が行われているとは言い難いのが現状であった。

2. 研究の目的

上記背景をもとに、以下の2点を本研究の主要な目的とした。

- (1) 中枢において多種多様に発現している有機イオントランスポーター群の分子的・機能的実体を主としてニューロン、グリア初代培養細胞を用いてさらに網羅的に解析すること。
- (2) さらに、これら有機イオントランスポーターの発現分布、機能変動の解析を通じて、有機イオントランスポーターを介したニューロン-グリア間のクロストーク、イオンチャネルや受容体の機能調節など、中枢における有機イオントランスポーターの生理的な役割についても明らかにすること。

3. 研究の方法

- (1) マウスあるいはラット胎仔より調製したグリア細胞あるいはニューロン初代培養系を用いて、消化管、肝臓、腎臓などで報告されている有機イオントランスポーター群の発現を RT-PCR 法を用いて網羅的に解析する。
- (2) 発現が確認されたトランスポーターにおいては、主として放射標識体を用いて細胞内輸送実験を行い、遺伝子発現が確認されたトランスポーターが実際に機能しているか否かの確認を行うとともに、文献から脳内で基質となり得る生体物質が存在するかの情報を収集し、中枢での生理機能を明らかにしていく。
- (3) こうしたトランスポーターの発現が、他のイオンチャネル(特にカルシウムチャネル)や受容体の機能に影響をおよぼすか否かを検討する。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系に発現する TCA 回路中間体の輸送にかかわるトランスポーターの同定:

ラット新生児およびマウス胎児大脳皮質より調整したアストロサイトあるいはニューロン初代培養系を用いて、ジ・トリカルボン酸輸送系の機能解析およびこの輸送を担うトランスポーターの同定を行った。すなわち、中枢神経系における Na^+ /ジカルボン酸共輸送系の細胞分布を明らかとするため、代表的基質である succinate および citrate を用

いて種々の輸送実験を行った。アストロサイトにおける succinate および citrate の輸送には顕著な Na^+ 依存性、飽和性が認められ、succinate に高親和性、citrate に低親和性の輸送性を示し、かつ見かけ上 1 つの輸送系を介した輸送であることが示された。また succinate の輸送は citrate により競合阻害された。さらに Na^+ 依存的な succinate 輸送は起電的であり、 NaC3 の基質となる C_4 - C_5 のジカルボン酸によって阻害されたが、トリカルボン酸である citrate では約 50%程度しか阻害せず、モノカルボン酸ではまったく阻害されなかった。また Li^+ の濃度依存的な阻害効果も認められた。ラットニューロンにおける succinate および citrate の輸送においても顕著な Na^+ 依存性、飽和性が認められたが、succinate と citrate は同程度の親和性の輸送性を示し、これらジカルボン酸の輸送能はアストロサイトの場合よりも低いことが示された。 NaC2 の基質となる C_4 - C_5 のジカルボン酸およびトリカルボン酸である citrate によって阻害されたが、モノカルボン酸では阻害されなかった。さらに RT-PCR 解析、Western blot 解析および蛍光免疫染色法によりアストロサイトでは NaC3 、ニューロンでは NaC2 のみの発現が確認された。以上の結果より、TCA サイクル中間体である succinate および citrate はラットアストロサイトまたはニューロンにおいて同一の輸送系により基質認識され、また、succinate および citrate を輸送するトランスポーターはアストロサイトおよびニューロンで異なることが明らかとなった。さらにその異なる Na^+ 共役カルボン酸輸送系はアストロサイトでは NaC3 、ニューロンでは NaC2 であることが明らかとなった。

(2) *N*-acetyl-aspartate (NAA) および *N*-acetylaspartylglutamate (NAAG) は、ジ・トリカルボン酸トランスポーターとなりえるか?

ニューロン、アストロサイトへの TCA 回路中間体の輸送特性および TCA 回路中間体の輸送に関与するトランスポーターとして Na^+ -coupled dicarboxylate transporter NaC3 および NaC2 を同定することができた。*N*-acetylaspartylglutamate (NAAG) は、哺乳類の中枢神経系において比較的高濃度存在するニューロペプチドであり、グルタミン酸レセプターサブタイプ mGlu3 レセプターの選択的アゴニストであることから、脳における NAAG の動態は重要と考えられる。そこで、脳における NAAG 動態に関わるトランスポーターの同定とその生理的な役割に関する検討を進めた。NAAG はジペプチド誘導体であると同時にトリカルボン酸を有することから、peptide transporter PEPT2 や、上記

NaC2 あるいは NaC3 の基質となる可能性を考えマウスアストロサイトおよびニューロン初代培養系を用いた輸送実験を中心に検討を行った。

マウスアストロサイトにおける NAAG の輸送特性について検討したところ、その輸送活性は非常に低く、飽和性の輸送は認められなかったが、NAAG はモデルジペプチドである [³H]Gly-Sar の輸送を有意に阻害した。mPEPT2-C6 glioma 発現系を用いた検討においても同様の結果が得られたことより、NAAG は PEPT2 の阻害剤とはなるものの基質としては認識され難いことが示唆された。また、NaC2 を発現するマウス初代培養ニューロン、hNaC2-HeLa、mNaC3-HeLa における NAAG の輸送を検討した結果、いずれも NAAG の輸送活性は認められなかった。一方、NAAG の加水分解産物である N-acetylaspartate (NAA) は NaC3 の良好な基質となることが明らかとなり、グリア細胞系への acetyl-基の提供に NaC3 が深く関与している可能性が示唆された。

(3) アストロサイト内へのニコチン酸の輸送に關与するトランスポーターの同定

ニコチン酸は NAD⁺ や NADP⁺ といった補酵素の構成成分であるとともにアストロサイトにおいて受容体を介した細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇を惹起する NAADP の構成成分でもある。NAD⁺ の再利用および NAADP の合成を考えた場合、脳内でのニコチン酸の動態は生理的にも重要であると考えられ、本年度はラット大脳皮質初代培養アストロサイトを用いて、ニコチン酸の細胞内への輸送特性と輸送に關与しているトランスポーターの同定を行った。アストロサイトにおけるニコチン酸輸送には、顕著な pH 依存性・濃度依存性が認められたものの、Na⁺ 依存性はほとんど認められなかった。また、各種代謝阻害剤やプロトノフォア、MCT 特異的阻害剤によりアストロサイトへのニコチン酸輸送は顕著に阻害された。さらにニコチン酸のアストロサイトへの輸送は種々のモノカルボン酸により有意に阻害された。RT-PCR および Western blotting により、MCT1、MCT2、MCT4 の mRNA およびタンパク質の発現を確認した。さらに、アストロサイトにおけるニコチン酸輸送に対する L-lactate の阻害定数が Ki > 10mM であることを考え合わせると、アストロサイトにおけるニコチン酸の輸送には低親和性の MCT4 が關与していることが示唆された。

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13件)全て査読有論文業績に関しては、

<http://research-db.ritsumei.ac.jp/Profiles/40/0003910/theses1.html>

を参照できる。

1. T. Uchiyama, T. Fujita, H.J. Gukasyan, K.-J. Kim, Z. Borok, E.D. Crandall and V.H.L. Lee. Functional characterization and cloning of amino acid transporter B⁰⁺ (ATB⁰⁺) in primary cultured rat pneumocytes. *J. Cell. Physiol.*, **214**, 645-654 (2008).
2. A. Ose, H. Kusuhara, K. Yamatsugu, M. Kanai, M. Shibasaki, T. Fujita, A. Yamamoto and Y. Sugiyama. P-glycoprotein restricts the penetration of Oseltamivir across the blood-brain barrier. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 427-434 (2008).
3. K. Morimoto, M. Nakakariya, Y. Shirasaka, C. Kakinuma, T. Fujita, I. Tamai and T. Ogihara. Oseltamivir (Tamiflu) efflux transport at the blood-brain barrier via P-glycoprotein. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 6-9 (2008).
4. Y. Hayashi, K. Takayama, Y. Suehisa, T. Fujita, J.-T. Nguyen, S. Futaki, A. Yamamoto and Y. Kiso. Development of oligoarginine-drug conjugates linked to new peptidic self-cleavable spacers towards effective intestinal absorption. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 5129-5132 (2007).
5. V. Ganapathy and T. Fujita. Identity of the high-affinity sodium/carboxylate cotransporter NaC3 as the N-acetyl-L-aspartate transporter. *Adv Exp Med Biol.* **576**, 67-76 (2006).
6. T. Ogihara, M. Kamiya, M. Ozawa, T. Fujita, A. Yamamoto, S. Yamashita, S. Ohnishi and Y. Isomura. What kinds of substrates show P-glycoprotein-dependent intestinal absorption? Comparison of verapamil with vinblastine. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **21**, 238-244 (2006).
7. T. Fujita, A. Shimada, M. Wada, S. Miyakawa and A. Yamamoto. Functional expression of taurine transporter and its up-regulation in developing neurons from mouse cerebral cortex. *Pharm. Res.* **23**, 689-696 (2006).
8. M. Wada, A. Shimada and T. Fujita. Functional characterization of Na⁺-coupled citrate transporter NaC2/NaCT expressed in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex. *Brain Res.* **1081**, 92-100 (2006).
9. E. Yodoya, M. Wada, A. Shimada, H.

- Katsukawa, N. Okada, A. Yamamoto, V. Ganapathy and **T. Fujita**. Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* **97**, 162-173 (2006).
10. Q. Wu, M. Wada, A. Shimada, N. Okada, A. Yamamoto and **T. Fujita**. Functional characterization of Zn^{2+} -sensitive GABA transporter expressed in primary cultures of astrocytes from rat astrocytes. *Brain Res.* **1075**, 99-108 (2006).
 11. M. Oka, M. Wada, Q. Wu, A. Yamamoto and **T. Fujita**. Functional expression of metabotropic γ -aminobutyric acid GABA_B receptor in primary culture of astrocytes from rat cerebral cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 874-881 (2006).
 12. **T. Fujita**, A. Shimada, N. Okada and A. Yamamoto. Functional characterization of Na^+ -independent choline transport in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **393**, 216-221 (2006).
 13. A. Shimada, Y. Nakagawa, H. Morishige, A. Yamamoto and **T. Fujita**. Functional characteristics of H^+ -dependent nicotinic acid transport in primary cultures of astrocytes from rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **392**, 207-212 (2006).

〔学会発表〕(計10件)

1. 小平浩史 *et al.* 脳脊髄液中薬物濃度が脳中遊離型薬物濃度の指標となるための条件解析. 日本薬剤学会第24年会. 2009.5.23. 静岡県コンベンションセンター(静岡)
2. H. Kodaira *et al.* Can drug concentration in the cerebrospinal fluid be a surrogate for the unbound concentration of CNS drugs in the brain? 第23回日本薬物動態学会年会. 2008.10.30. 熊本市市民会館(熊本)
3. S. Fujiwara *et al.* Transport characteristics of *N*-acetyl-L-aspartate mediated Na^+ -coupled dicarboxylate transporter NaC3 and its functional linkage with organic anion transporter OAT3. 8th International ISSX meeting. 2007.10.12. 仙台国際センター(仙台市)
4. A. Ose *et al.* Analysis of distribution mechanism of oseltamivir in the brain. 2007.11.27. 仙台国際センター(仙台市)
5. S. Fujiwara, *et al.* Functional characterization of Na^+ -independent choline transport in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex. Pharmaceutical Sciences World Congress. 2007.4.

Amsterdam (Netherlands).

6. 藤原史織 *et al.* Na^+/Cl^- 依存性 GABA トランスポーター-GAT1 の関与. 第21回日本薬物動態学会年会. 2006.11. 江戸川区民センター(東京)
7. 松元靖浩 *et al.* ラット初代培養アストロサイトにおける H^+ 依存性ニコチン酸輸送機能特性. 第21回日本薬物動態学会年会. 2006.11. 江戸川区民センター(東京)
8. 松元靖浩 *et al.* ラットアストロサイトにおける H^+ 依存性ニコチン酸の輸送特性. 第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会. 2006.10. 京都薬科大学(京都)
9. 藤原史織 *et al.* マウス大脳皮質ニューロンにおけるカルニチンの輸送機構: Na^+/Cl^- 依存性 GABA トランスポーター-GAT1 の関与. 第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会. 2006.10. 京都薬科大学(京都)
10. Takuya Fujita: Functional characterization of organic solute transporters in central nervous system. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium on Drug Delivery and Therapy. 2006.4. Seoul (Korea),

〔図書〕(計1件)

1. V. Ganapathy and **T. Fujita**. Identity of the high-affinity sodium/carboxylate cotransporter NaC3 as the *N*-acetyl-L-aspartate transporter. *Adv Exp Med Biol.* **576**, 67-76 (2006).

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
藤田 卓也 (FUJITA TAKUYA)
立命館大学・薬学部・教授
研究者番号: 00247785
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし