

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07171

研究課題名（和文）エネルギー源輸送を担うMCTsの機能解析と治療薬の探索

研究課題名（英文）Functional analysis of MCTs responsible for energy source transport and search for therapeutic agents

研究代表者

小林 正紀（Kobayashi, Masaki）

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：70431319

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）：糖尿病や認知症等の疾患の対策として栄養介入による効果を期待するものが報告され、これは生体内のエネルギー源の重要性を示している。エネルギー源である乳酸等を輸送するヒトモノカルボン酸輸送担体（hMCTs）は、上記疾患との関連が示唆されている。本研究ではhMCTsの中でもhMCT2、11の機能を明らかにすることを試みた。2型糖尿病患者を対象としたhMCT11遺伝子多型に関する臨床研究およびhMCT11一過性発現細胞を用いた検討から、hMCT11が糖代謝と関連することが示唆された。またhMCT2の機能を評価可能な系を確立し、ニューロン由来細胞における乳酸輸送に一部hMCT2が関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により機能が未解明であったhMCT11が糖代謝に関わることを示唆したことから、今後hMCT11と糖尿病病態との関連性のさらなる解明に寄与するものと考えられる。またhMCT2については、機能評価系の確立ならびに細胞レベルでの寄与を示唆したことから、今後hMCT2をターゲットとした新規治療薬の創製につながるものが期待される。

研究成果の概要（英文）：Effects of nutritional intervention as a countermeasure for diseases such as diabetes and dementia have been expected, which indicates the importance of energy sources in human body. Human monocarboxylate transporters (hMCTs), which transport lactate and other energy sources, have been suggested to be associated with the above diseases. In this study, we aimed to clarify the function of hMCT2 and hMCT11 among hMCTs. The results of clinical studies on hMCT11 polymorphisms in patients with type 2 diabetes and studies using hMCT11 transiently expressing cells suggested that hMCT11 is associated with glucose metabolism. We also established a system that can evaluate hMCT2 function and found that hMCT2 is partially involved in lactate transport in neuron-derived cells.

研究分野：医療薬学

キーワード：モノカルボン酸輸送担体（MCT） 乳酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えている我が国において、記憶の維持ならびに糖尿病の進展予防は健康寿命の延伸の観点から重要な課題であることはいうまでもない。これまでラットにおいてアストロサイトからのモノカルボン酸輸送担体(MCT) 1, 4 による乳酸排出と MCT2 を介したニューロンへの乳酸供給、すなわちアストロサイト-ニューロン乳酸シャトルが記憶形成に重要であること、また糖尿病病態によって記憶形成能が低下したモデルラットにおいて脳の MCT2 発現が低下することが明らかとされている。これは、MCT を介した乳酸等のエネルギー源輸送が記憶形成に深く関わることを強く示唆するものである。また近年、MCT の 1 つである MCT11 が、糖尿病関連遺伝子として注目されており、特に 5 つの一遺伝子多型 (以下、5 SNP haplotype) が糖尿病の発症と関連し、この多型が肝臓の MCT11 の機能低下を誘導することで糖尿病病態や脂質代謝異常に関与することが示唆されている。MCT2、MCT11 は基質として乳酸あるいはピルビン酸を輸送することが示唆されているが、詳細な機能解析は行われていない。さらにこれら分子のヒトにおける遺伝子多型と病態との関連についても検討の余地が残されている。したがって糖尿病や認知症と MCT との関連を理解するには、機能の詳細が未だ不明である MCT2 および MCT11 の役割を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病・認知症に深く関与するとされているヒトモノカルボン酸輸送担体(hMCT)2 および hMCT11 に着目し、その機能・発現について基礎研究・臨床研究により明らかにすることを目的とした。具体的な検討項目としては、発現系を用いて hMCT2、hMCT11 の機能を解析するとともに、細胞レベルにおける役割を検証した。さらにこれらの遺伝子多型と病態との関連についても検討を加えた。本検討により糖尿病・認知症の予防・治療方法の開発の一助となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) hMCT 遺伝子多型と病態に関する臨床研究は、2 型糖尿病患者 85 名を対象に hMCT11 の変異型である 5SNP haplotype の有無により 2 群に分け、2 群間の糖尿病関連検査値の調査を行った。またヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞ならびにヒト肝癌由来細胞である HepG2 細胞に野生型 hMCT11 プラスミドを導入した細胞を構築し、細胞内乳酸およびグルコース濃度を比色アッセイにより測定した。輸送実験は放射標識された L-乳酸および 2-deoxy-D-glucose を用いて行った。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞に hMCT2 とその補助タンパク質である embigin を共発現させ、hMCT2 の輸送特性を放射標識された L-乳酸を用いて評価した。また細胞レベルにおいて hMCT の阻害剤存在下や各 hMCT の siRNA による発現抑制条件下での L-乳酸取り込みを解析することで、hMCT の寄与について検証した。細胞は、肝由来細胞として HepG2 細胞、Huh-7 細胞を、ニューロン由来細胞としてヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を分化させて用いた。

4. 研究成果

(1) 臨床研究では hMCT11 の変異型である 5SNP haplotype の有無で 2 群に分け、これら群間における糖尿病関連検査値を比較した結果、空腹時血糖、総コレステロールならびに LDL コレステロールにおいて有意な差が見られた。一方で、2 群間の合併症の有無および使用薬については、差は認められなかった。次に *in vitro* において、hMCT11 の発現増大を確認した hMCT11 一過性発現 HEK293T 細胞においてグルコース取り込み量が減少すること、また細胞内のグルコース濃度は上昇することが示唆された。一方で、hMCT11 一過性発現 HepG2 細胞ではグルコース輸送・細胞内グルコース量に有意な差は認められなかった。次にこれらの細胞における糖、脂質代謝関連因子の発現変動があるか否かを Real-time PCR により評価した結果、hMCT11 一過性発現 HEK293T 細胞において、解糖系の律速酵素でありグルコースからグルコース 6-リン酸への変換を触媒するヘキソキナーゼ 2 の発現が有意に上昇した。したがって hMCT11 が糖代謝に影響を及ぼすこと、またその機能が細胞間あるいは組織間で異なる可能性が示された。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞に hMCT2 とその補助タンパク質である embigin を共発現させることで、顕著な乳酸輸送活性の増大が認められた。また本評価系を用いた検討により、hMCT2 を介した乳酸輸送は時間依存性、濃度依存性、pH 依存性を示した。このことから hMCT2 の機能評価系の樹立に成功し、その輸送特性を明らかとした。続いて hMCT2 の関与が示唆されている肝由来細胞およびニューロン由来細胞を用いて乳酸輸送を解析することで、hMCT2 の寄与を

検証した。hMCT の阻害剤存在下および hMCT の siRNA による各 hMCT の発現抑制条件下における検討結果から、肝由来細胞である HepG2、Huh-7 細胞における乳酸輸送には、hMCT2 よりむしろ hMCT1 と 4 が寄与することが示された。一方で、分化 SH-SY5Y 細胞における乳酸輸送には一部 hMCT2 が関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Mukai Y, Yamaguchi A, Sakuma T, Nadai T, Furugen A, Narumi K, Kobayashi M	4. 巻 43(5)
2. 論文標題 Involvement of SLC16A1/MCT1 and SLC16A3/MCT4 in L-lactate transport in the hepatocellular carcinoma cell line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biopharm Drug Dispos	6. 最初と最後の頁 183-191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bdd.2329.	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 Kimura Y, Higuchi I, Kobayashi M, Furugen A, Narumi K, Suzuki Y, Miyoshi H, Nakamura A, Atsumi T, Iseki K.	4. 巻 37
2. 論文標題 The association between SLC16A11 haplotype and lipid metabolism in Japanese patients with type 2 diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet	6. 最初と最後の頁 100376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2020.100376.	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 Kobayashi M, Narumi K, Furugen A, Iseki K	4. 巻 226
2. 論文標題 Transport function, regulation, and biology of human monocarboxylate transporter 1 (hMCT1) and 4 (hMCT4)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacol Ther	6. 最初と最後の頁 107862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pharmthera.2021.107862.	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 Yamaguchi A, Narumi K, Furugen A, Iseki K, Kobayashi M	4. 巻 529(4)
2. 論文標題 Identification of the essential extracellular aspartic acids conserved in human monocarboxylate transporters 1, 2, and 4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1061-1065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.06.068.	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐久間智也、向井悠斗、山口敦史、石川修平、古堅彩子、鳴海克哉、小林 正紀
2. 発表標題 分化誘導されたヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞における乳酸輸送担体の同定
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 向井悠斗、山口敦史、佐久間智也、古堅彩子、鳴海克哉、小林正紀
2. 発表標題 肝がん由来細胞において乳酸輸送に寄与する輸送担体の同定に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第149回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木雄也、山口敦史、木村有希、樋口一世、鳴海克哉、古堅彩子、小林正紀
2. 発表標題 MCT11が2型糖尿病に関与するメカニズムの研究
3. 学会等名 第34回北海道薬物作用談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口敦史、鳴海克哉、古堅彩子、井関健、小林正紀
2. 発表標題 hMCT1, 2, 4の細胞外アスパラギン酸の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------