

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590206

研究課題名(和文) 中枢機能調節因子としての有機イオントランスポーターの生物薬学的研究

研究課題名(英文) Biopharmaceutical Study on Organic Solute Transporters Which Modulate Central Nervous System

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)： アミノ酸や神経伝達物質の脳内での動態は、ニューロン・アストロサイトからの放出と再取り込みにより精密に制御され、その恒常性の維持が脳の高次機能の維持に関わっていると考えられる。本研究では、N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) と carnitine を例に挙げ、マウスより単離した神経細胞およびアストロサイトを用いて、NAAG および carnitine の輸送特性とその輸送に関与するトランスポーターを同定し、NAAG については PEPT2 が、carnitine については GAT1 および OCTN2 が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： In vivo fate of amino acids and neurotransmitters in brain is precisely regulated by release from neuron and/or astrocytes and by their re-uptake, and is responsible for maintenance of brain high-order function. In this study, we investigated the functional characterization of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) and carnitine transporter in mouse primarily cultured neurons and astrocytes. NAAG was found to be taken up by oligopeptide transporter (PEPT) 2 in astrocytes. In addition, carnitine was found to be taken up by GABA transporter (GAT) 1 and carnitine/organic cation transporter (OCTN) 2 in neuron.

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：トランスポーター 中枢神経系 神経伝達物質 再取り込み

### 1. 研究開始当初の背景

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 transporter 群により速やかに回収される。しかしながら、本申請者は、これまでの研究により、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 transporter 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明らかにしてきている (*Glia* **46**, 53-62 (2004); *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 874-881 (2006))。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また重要な役割を果たしている可能性を示しつつある (*Br. J. Pharmacol.* **139**, 435-443 (2003); *Brain Res.* **1075**, 99-108 (2006))。

本申請者は、これまで中枢におけるアミノ酸やペプチド、ニコチン酸、コリンなどのグリア細胞あるいはニューロン内への輸送にかかわる様々な有機イオン transporter の発現と機能解析を精力的に行い、これら transporter の分子の実体について明らかにしてきた (*Brain Res.* **997**, 52-61 (2004); *ibid* **1044**, 33-41 (2005); *J. Neurochem.* **93**, 706-714 (2005); *ibid* **97**, 162-173 (2006))。これら transporter 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 transporter 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る。

### 2. 研究の目的

神経伝達物質あるいは前駆物質の神経細胞内への輸送研究は、1980 年代に入りグリア、ニューロンの初代培養法が確立されるとともに大きく進展した。こうした神経伝達物質の細胞内輸送機構に関する結果は、1990 年代に入り発現クローニングの手法により transporter 遺伝子を単離する際に有用な情報をもたらした。しかしながら、神経伝達物質の前駆物質である中性アミノ酸やコリンなどの細胞内輸送に関わる transporter の分子クローニングの報告は、そのほとんどが 2000 年以降になされたものであり、未だ生理作用が明らかにされていない transporter や分子の実体が未知な transporter も少なくない。また、本申請者が報告した有機イオ

ン transporter (dicarboxylate transporters (NaC2 and NaC3)、 $Na^{+}$ -independent choline transporter (CTL)) などもニューロンやグリアに発現していることが明らかになっているものの内因性基質が不明なため、脳内での生理作用が不明である。本研究では、ニューロン、グリア初代培養細胞を用いて、様々な有機イオン transporter 群の輸送特性・分子の実体を網羅的に明らかにし、これまでグリア、ニューロンにおいて発現部位が不明であった transporter の分布特性、輸送特性を明らかにすることを目的とする。こうした観点からの研究は、中枢における有機イオン transporter の生理作用を解明する上で必須であると考えられるが、神経化学の分野ではこうした transporter に大きな注目が払われてこなかったことなどの理由により、全く進展していないのが現状である。

また、神経伝達物質に関してはその受容体と transporter が機能調節に密接に関わりあっていることは周知であるが、他の有機イオン transporter、例えば  $Na^{+}$ -independent choline transporter や中性アミノ酸 transporter に関してもイオンチャネルや補酵素合成に関与する酵素の機能調節に関わりあっている可能性が、本申請者の研究により示唆されている (*Br. J. Pharmacol.* **139**, 435-443 (2003); *Neurosci. Lett.* **378**, 70-75 (2005), *ibid* **392**, 207-212 (2006), *ibid* **393**, 216-221 (2006))。また、脳の発達段階におけるこれら有機イオン transporter の機能や発現の変動も併せて検討することで有機イオン transporter 群のこれまで明らかにされていなかった生理的役割に関しても明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

マウスニューロン・アストロサイト初代培養系：マウス胎児 (妊娠 15 日齢) の脳各部位より細胞を調製し、ニューロン培養用無血清培地 (DMEM/F-12 + B-27 supplement + antibiotics) あるいはアストロサイト培養用培地 (DMEM + 10% fetal bovine serum) で培養することによりニューロンもしくはアストロサイトの初代培養を得る。有機イオン transporter の機能解析に関しては、放射標識体をプローブとしてグリア・ニューロン初代培養細胞における輸送実験を行う。既に、遺伝子がクローニングされその輸送特性が明らかにされている transporter に関しては、これらの情報を用いて輸送特性の整理を行う。

前記の検討項目における有機イオン transporter 群のうち、本申請者はモノカルボン酸、ジ・トリカルボン酸、コリンの輸送に関わる transporter のニューロンやグリア細胞での輸送特性に関して既に報告しているが、特にジ・トリカルボン酸 transporter に関しては、海外共同研究者である Ganapathy 教授との共同研究により、これまで 3 種の isoform が報告されている  $Na^{+}$ -coupled dicarboxylate transporter (NaC1、NaC2、NaC3)

のうち、NaC2 および NaC3 が大脳皮質ニューロン・グリア細胞にそれぞれ発現し、脳内に高濃度に存在するアミノ酸 *N*-acetyl-L-aspartate (NAA) を内因性の基質として認識している可能性を明らかにしている (J. Neurochem. 93, 706-714 (2005); *ibid*, 97,162-173 (2006); Brain Res. 1081, 92-100 (2006))。一方、Na<sup>+</sup> 非依存的な nicotinate や choline の輸送に関わる transporter の分子的な実体についてはいまだ不明である。そこで、前記の検討項目と並行し、これらの輸送に関わる transporter の発現・機能調節機構に関して、以下の検討を進めた。(i) [<sup>3</sup>H]succinate および [<sup>14</sup>C]α-ketoglutarate、[<sup>14</sup>C]citrate をプローブとして、マウス初代培養ニューロンおよびグリア細胞への NaCs を介した輸送活性を精査する。(ii) 一方、NaC2 や NaC3 の中枢における機能調節機構に関しては不明である。そこで、これら2つの transporter の様々な protein kinase による輸送調節に関して神経薬理学的手法を用いて詳細な検討を加える。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウスアストロサイトにおける *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) の輸送特性

マウスアストロサイトには PEPT2 mRNA の発現が認められ、PEPT2 のモデル基質である Gly-Sar の輸送を検討したところ、これまでの報告と同様 pH 依存的な飽和性の輸送系であり、その  $K_t$  値は、pH 6.0 においては  $77.1 \pm 19.4 \mu\text{M}$ 、pH 7.4 においては  $79.5 \pm 5.5 \mu\text{M}$  であった。また、アストロサイトにおける Gly-Sar 輸送は Tyr-Arg、Phe-Leu、Tyr-Gly、(Gly)<sub>3</sub>、cefadroxil によって顕著に阻害された。一方、アミノ酸である Gly や TRH は高濃度でも Gly-Sar の取り込みを阻害しなかった。さらに Eadie-Hofstee plot が直線性を示したことから、マウスアストロサイトへの Gly-Sar 輸送は1つの輸送系、つまり PEPT2 を介して行われると考えられる。これらの結果は、mPEPT2 発現 C6 glioma 細胞を用いた同様の検討より得られた結果と一致した。次に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 Gly-Sar の輸送を  $IC_{50}$  値  $2.23 \pm 0.4 \text{ mM}$  で有意に阻害した。mPEPT2-C6 glioma 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、マウスアストロサイトにおいて NaC3、OAT3 の mRNA 発現が認められ、saturation kinetics より得られた succinate 輸

送の  $K_t$  値は  $13.5 \pm 2.5 (\mu\text{M})$ 、estrone sulfate 輸送の  $K_t$  値は  $80.9 \pm 27.6 (\mu\text{M})$  であった。OAT3 と NaC3 とを共発現した HeLa 細胞において、5 mM α-ketoglutarate でプレロード後の PAH 取り込みの  $V_{\text{max}}$  値が有意に上昇した (α-KG preload :  $465 \pm 39 \text{ pmol/mg protein/min}$ 、non preload :  $224 \pm 39 \text{ pmol/mg protein/min}$ )。さらにマウスアストロサイトにおける同様の検討でも α-ketoglutarate でプレロードすることにより、わずかではあるものの estrone sulfate 輸送における  $V_{\text{max}}$  値の上昇が認められた (α-KG preload :  $594 \pm 207 \text{ pmol/mg protein/15min}$ 、non preload :  $529 \pm 166 \text{ pmol/mg protein/15min}$ )。これらの結果よりアストロサイトにおいて TCA 回路中間体を細胞外へ輸送する経路が OAT3 を介したものである可能性が示された。

##### (2) マウス大脳皮質ニューロンにおける carnitine の輸送特性と GABA transporter の関与

ニューロンにおける taurine 輸送の親和性は  $K_t = 10.6 \mu\text{M}$  であり、β-alanine や GABA により有意に阻害された。また、ニューロン内への taurine 輸送は Na<sup>+</sup> かつ Cl<sup>-</sup> 依存的であり、taurine 1 分子あたり Na<sup>+</sup> と Cl<sup>-</sup> がそれぞれ 2 分子、1 分子共輸送されることが示唆された。こうした特性は TAUT の輸送特性と一致し、RT-PCR や Western blot の結果からもニューロン内への taurine 輸送には TAUT が関与していることが明らかとなった。また TAUT の輸送活性は days-in vitro (DIV) 1 より DIV 9 まで経日的に増加し、この結果は mRNA やタンパク発現レベルの経日的な上昇と対応していたことから、ニューロンの分化に伴い TAUT の発現・機能が上昇していることが示された。

一方、L-carnitine のニューロンへの取り込みも Na<sup>+</sup> かつ Cl<sup>-</sup> 依存的であり、輸送の親和性を示す  $K_t$  値は 1.81 mM であった。L-Carnitine 取り込みは acetyl-L-carnitine や L-asparagine などによって阻害されたが、OCTN2 の基質となる TEA などの有機カチオンでは阻害されなかった。GABA は L-carnitine 輸送を高親和的に阻害し、阻害曲線より得られる  $K_i$  値  $18.7 \mu\text{M}$  は、ニューロンへの GABA 輸送の  $K_t$  値  $11.2 \mu\text{M}$  と comparable であった。一方 [<sup>3</sup>H]GABA 輸送に対する L-carnitine の  $K_i$  値  $5.96 \text{ mM}$  と L-carnitine 輸送の  $K_t$  値  $1.81 \text{ mM}$  がほぼ近い値を示したことから、L-carnitine と GABA が同一の輸送系を介して細胞内に取り込まれることが速度論的に示された。さらに、GABA transporter (GAT) 1 選択的阻害剤は L-carnitine のニューロン内への輸送を顕著に阻害すること、GAT1 mRNA の強い発現が認められたことを考え合わせると、ニューロン内への L-carnitine の輸送は GAT1 を介す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 5 件)

1. Atsuko Tomaru, Nozomi Morimoto, Mariko Morishita, Kozo Takayama, Takuya Fujita, Kazuya Maeda, Hiroyuki Kusuhara and Yuichi Sugiyama. Studies on the Intestinal Absorption Characteristics of Sulfasalazine, a Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Substrate. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **28** (1), 71-74 (2013). 査読有
2. Hiroyuki Kusuhara, Hidetoshi Furuie, Akihiro Inano, Akihiro Sunagawa, Sakiko Yamada, Chungyong Wu, Shinya Fukizawa, Ichiro Ieiri, Mariko Morishita, Kiminobu Sumida, Hiroshi Mayahara, Takuya Fujita, Kazuya Maeda, and Yuichi Sugiyama. Pharmacokinetic interaction study of sulfasalazine in healthy subjects and the impact of curcumin as an *in vivo* inhibitor of BCRP. *Br. J. Pharmacol.* **166** (6), 1793-1803 (2012). 査読有
3. Atsushi Hosomi, Takeo Nakanishi, Takuya Fujita, and Ikumi Tamai. Extra-renal Elimination of Uric Acid via Intestinal Efflux Transporter BCRP/ABCG2. *PLoS ONE* **7** (2), e30456 (2012). 査読有
4. Hiroshi Kodaira, Hiroyuki Kusuhara, Takuya Fujita, Junko Ushiki, Eiichi Fuse, and Yuichi Sugiyama. Quantitative evaluation of the impact of active efflux by P-gp and Bcrp at the BBB on the predictability of the unbound concentrations of drugs in the brain using cerebrospinal fluid concentration as surrogate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **339** (3), 935-944 (2011). 査読有
5. Keisuke Matsuo, Hayato Koizumi, Yumiko Ishii, Kazuhiko Matsuo, Takuya Fujita, Akira Yamamoto, Mitsuru Akashi, Shinsaku Nakagawa, and Naoki Okada. Intranasal immunization with poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles entrapping antigenic proteins can induce potent tumor immunity. *J Control. Rel.* **152** (2), 310-316 (2011). 査読有

[学会発表](計 6 件)

1. 楠原洋之、宮島真理、高橋佳代、高島忠之、細谷孝充、藤田卓也、渡辺恭良、杉山雄一：アロマトラーゼ阻害剤の脳実質移行性の比較。第 28 回日本 DDS 学会学術集会 2012 年 7 月 5 日、札幌コンベンションセンター（北海道）
2. Chunyong Wu, Hiroyuki Kusuhara, Takuya Fujita, Yuichi Sugiyama. Innovative strategies for drug development using microdosing clinical studies (NEDO microdose-PJ) 2011- (6)- Prediction of D2

receptor occupancy in the human brain by the receptor antagonists. 26<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting 2011 年 11 月 18 日、(Hiroshima, Japan).

3. Atsushi Hosomi, Kouji Ikukawa, Takeo Nakanishi, Takuya Fujita, Ikumi Tamai. Intestinal active secretion of uric acid. 26<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting 2011 年 11 月 16 日、(Hiroshima, Japan).
4. Mari Miyajima, Hiroyuki Kusuhara, Kayo Tkahashi, Takamitsu Hosoya, Tadayuki Takashima, Yasuyuki Watanabe, Takuya Fujita, John D. Schuetz, Yuichi Sugiyama. Characterizing determining factors for brain exposure of aromatase inhibitors. 26<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting 2011 年 11 月 16 日、(Hiroshima, Japan).
5. 守屋友加、藤田卓也：各種動物種における薬物の消化管代謝の予測。日本薬剤学会第 26 年会 2011 年 5 月 31 日、タワーホール船堀（東京都）
6. 藤田卓也、守屋友加：ラット門脈 - 全身血同時採血法による薬物の消化管吸収性評価と P-glycoprotein の寄与。日本薬剤学会第 26 年会 2011 年 5 月 31 日、タワーホール船堀（東京都）

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ritsumei.ac.jp/pharmacy/fujita-t/home.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 卓也（立命館大学・薬学部・教授）

研究者番号：00247785

(2) 研究分担者

守屋 友加（名城大学・薬学部・助教）

研究者番号：100512295