

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659081

研究課題名(和文)トランスポーターの低温忍容性解析と汎トランスポーター阻害剤の探索開発

研究課題名(英文) Analysis of low temperature tolerance of membrane transporters and development of pan-transporter inhibitors

研究代表者

高野 幹久 (Takano, Mikihiisa)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：20211336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト赤血球膜の促進拡散輸送体GLUT1やENT1、二次性能動輸送体MCT1、培養細胞(A549細胞、HepG2細胞)のGLUTは低温忍容性(氷冷下でも機能する性質)を示すことが明らかとなった。低温忍容性を示す輸送体(トランスポーター)についてその機能を正しく評価するため、汎トランスポーター阻害剤の開発を試みた。その結果、タンパク質変性剤である尿素とホルムアルデヒドおよび2-メルカプトエタノールとグルタルアルデヒドの組み合わせが、汎トランスポーター阻害剤として膜輸送研究に有用であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Low temperature tolerance of membrane transporters, a characteristic showing transport activity even at ice-cold temperature, was examined in human erythrocytes and cultured cancer cells. A facilitative glucose transporter GLUT1 and a facilitative nucleoside transporter ENT1 showed marked low temperature tolerance in erythrocyte membrane vesicles. A secondary active monocarboxylate transporter MCT1 showed low temperature tolerance in erythrocytes. In addition, GLUT1 in culture cells such as A549 and HepG2 also showed low temperature tolerance.

In order to evaluate the function of these transporters properly, I attempted to develop novel pan-transporter inhibitors (stop and washing solutions for transport study). Among various reagents tested, solutions containing urea plus formaldehyde and 2-mercaptoethanol plus glutaraldehyde were found to be effective pan-transporter inhibitors in both membrane vesicle and culture cell studies.

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：薬物動態 生体膜輸送 トランスポーター 低温忍容性 汎トランスポーター阻害剤

1. 研究開始当初の背景

薬物トランスポーターは、薬物の体内動態の支配因子として極めて重要であり、その研究は、医薬品開発段階において、吸収、分布、排泄過程を予測し、優れた動態学的特性を持つ候補化合物をスクリーニングする上で欠かせない。また薬物相互作用の標的ともなることから、臨床において適正な薬物療法を遂行する上で考慮すべき重要な機能タンパク質である。一般に被検物質の膜輸送実験には、培養細胞系や膜小胞系を用い、被検物質を取り込ませた後、氷冷バッファーで洗浄し、取り込まれた被検物質を定量するという手法がとられる。これは恒温動物である哺乳類のトランスポーター機能は氷冷下では停止または著しく低下するとコンセンサスに基づいている。しかし私はこのような考えが成立しないトランスポーターがあることを偶然見出し、そのような場合には輸送機能が評価できない、あるいは誤った解釈に陥る危険性があることに気づいた。

2. 研究の目的

(1) ヒト赤血球膜における薬物輸送研究の過程で、赤血球膜に存在するグルコーストランスポーター GLUT1 およびヌクレオシドトランスポーター ENT1 が氷冷下でも機能する(以下、「低温忍容性を示す」と称す)可能性を偶然見出した。そこで本研究ではまず、GLUT1 や ENT1 について確かなデータを取得するとともに、それ以外にどのようなトランスポーターが低温忍容性を示すのかについてヒトおよびラットのトランスポーター(促進拡散、一次性能動輸送、二次性能動輸送)を対象として系統的に解析し、その普遍性・特殊性を明らかにすることを第一の目的とした。これまでこのような観点から行われた膜輸送研究の事例はなく、その独自性・新規性は高いものと考えられる。

(2) 次にトランスポーターの種類を問わず、低温忍容性を示す全てのトランスポーターの活性を停止させる汎トランスポーター阻害剤(具体的には、輸送反応の停止とその後の洗浄に使用する溶液)について探索・開発し、トランスポーター研究における有用性を実証することを第二の目的とした。汎トランスポーター阻害剤を開発することが出来れば、低温忍容性を考慮することなく適正な輸送実験が行えることになり、全てのトランスポーター研究者にとって、その有用性は極めて高いものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) ヒト赤血球小胞および赤血球膜を用いた輸送実験：同意を得た健常成人から採血し、洗浄赤血球を調製した。赤血球膜小胞は低張溶液で赤血球を溶血させ細胞内容物を除去した後、resealing させることで right-side out (ROVs) あるいは inside out (IOVs) の膜小胞を

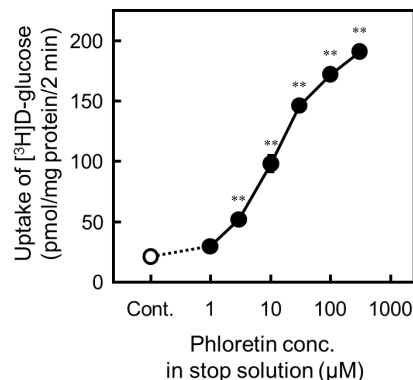
調製した。ROVs は取り込みトランスポーター (SLC transporter)、IOVs は排出トランスポーター (ABC transporter) の機能評価に用いた。膜小胞を用いた輸送実験は迅速ろ過法により行った。赤血球として用いる場合は、洗浄赤血球を基質とインキュベーションし、一定時間後に oil 上に反応停止液を重層したチューブに赤血球懸濁液を添加し、遠心により赤血球を分離した。膜小胞内あるいは赤血球内に取り込まれた³H標識基質体の定量は、液体シンチレーションカウンターにより行った。

(2) 培養細胞を用いた輸送実験：ヒト由来の培養細胞 HepG2 および A549 細胞は、10% ウシ胎児血清を含む DMEM を用い、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂-95% air) 内でコンフルエントになるまで 6~7 日間培養した。細胞と基質を一定時間インキュベーションし、氷冷した反応停止液で洗浄後、細胞内に取り込まれた基質量を測定し輸送活性を評価した。

(3) 汎トランスポーター阻害剤の候補物質：汎トランスポーター阻害剤の候補物質としてタンパク質修飾剤・変性剤である酸 (acetic acid, trichloroacetic acid, sulfosalicylic acid)、有機溶媒 (ethanol, methanol, acetone)、架橋試薬 (formaldehyde, glutaraldehyde)、カオトロピック試薬 (urea, guanidinium chloride, lithium perchlorate)、ジスルフィド結合還元剤 (2-mercaptoethanol, dithiothreitol, tris (2-carboxyethyl) phosphine) を用いた。これら試薬の溶液を単独、あるいは混合し、低温忍容性を示すトランスポーターの輸送実験に用いた。

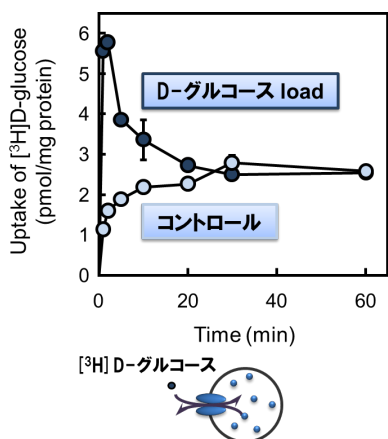
4. 研究成果

(1) ROVs を用いたトランスポーターの低温忍容性解析：グルコーストランスポーター GLUT1 およびヌクレオシドトランスポーター ENT1 の基質として、それぞれ、³H]D-glucose、³H]uridine を用いて輸送実験を行った。



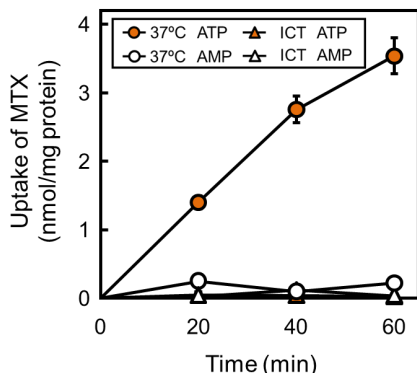
上の図は ROVs に D-glucose を取り込ませた後、通常の氷冷バッファーあるいはそれに

phloretin (GLUT 阻害剤) を添加した溶液で反応停止・洗浄を行った後、膜小胞内に保持されている D-glucose 量を測定したものである。この結果から、phloretin を含まない場合、小胞内に取り込まれた D-glucose は洗浄過程で大部分 efflux されることが明らかである。またその efflux は、phloretin で抑制されたことから、単純拡散によるものではなく、トランスポーターを介した efflux と考えられた。すなわち赤血球膜の GLUT1 は低温忍容性を示すものと考えられる。



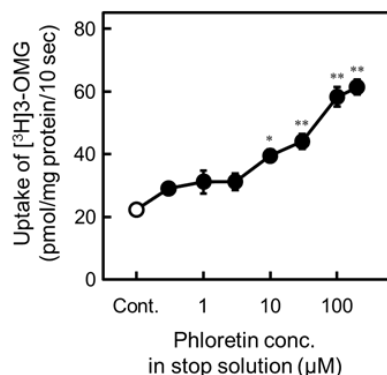
上の図は氷冷下における ROVs への D-glucose 取り込みに及ぼす counter transport 効果について検討した結果である。小胞内に非標識の D-glucose を予め負荷した場合、³H]D-glucose の取り込みが促進され countertransport 効果が観察された。countertransport 効果が見られることは、その輸送にトランスポーターが関与することを示す強力な証拠であり、この結果からも GLUT1 が氷冷下で機能することが分かる。Uridine についても、氷冷下において同様の countertransport 効果が観察されたことや ENT1 の阻害剤である NBMPR によってその取り込みが阻害されたことなどから、赤血球膜の ENT1 も低温忍容性を示すトランスポーターと考えられた。なお、GLUT1 および ENT1 はともに促進拡散輸送体である。

(2) ROVs を用いたトランスポーターの低温忍容性解析：上述のように赤血球膜の促進拡散輸送体 GLUT1 および ENT1 では、著しい低温忍容性が観察された。そこで次に、赤血球膜の能動輸送体について検討を行った。



上の図は、 multidrug resistance-associated protein (MRP)4 の基質である methotrexate (MTX) の取り込みに及ぼす ATP および温度の影響について検討した結果である。MRP4 は ABC トランスポーターの一つであり、ATP の加水分解エネルギーを利用して基質を能動的に細胞内から細胞外へと排出する一次性能動輸送体 (ポンプ) である。37 °C では ATP に依存した MTX 輸送が観察され、ATP 非存在下ではほとんど輸送活性が認められない。このような ATP 依存性は氷冷下 (ICT) では観察されず、輸送活性も認められなかった。従って、MRP4 は低温忍容性を示さないものと考えられた。同様に、MRP5 でも低温忍容性が認められなかったことから、促進拡散輸送体と異なり、一次性能動輸送体は全般的に低温忍容性を示にくいトランスポーターと推察された。

(3) 培養細胞を用いたトランスポーターの低温忍容性解析：ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用い、赤血球で見られた GLUT の低温忍容性が培養細胞系でも観察されるか検討した。なお、培養細胞では細胞内でのグルコース代謝の影響を除くため、非代謝性基質 ³H]3-O-methyl-D-glucose (3-OMG) を用いて輸送活性を評価した。

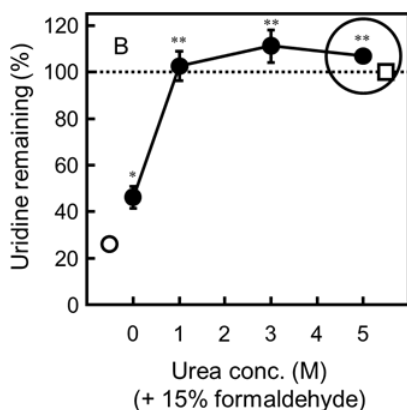
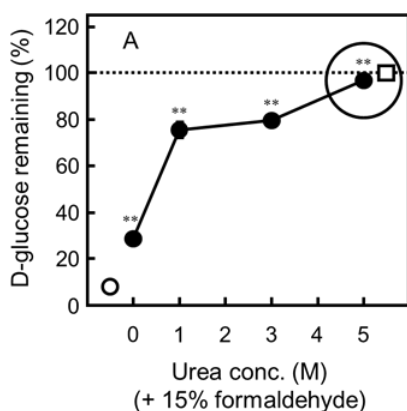


上の図は ROVs の場合と同様に、反応停止・洗浄液中の phloretin の影響について解析した結果である。phloretin 共存により見かけの 3-OMG 取り込み値が上昇したことから、phloretin 非存在下では洗浄中に 3-OMG が細胞内から efflux したのと考えられた。同様の傾向は、ヒト肺がん由来 A549 細胞でも認められた。従って、赤血球や赤血球膜小胞のみならず、輸送実験に汎用される培養細胞系でもある種のトランスポーターは低温忍容性を示し、阻害剤を含まない氷冷バッファを洗浄に用いた場合には、輸送活性の評価を誤る可能性が示唆された。

(4) 汎トランスポーター阻害剤の探索・開発：ROVs における ³H]D-glucose (GLUT1 基質) および ³H]uridine (ENT1 基質) の見かけの取り込み量を指標に、各種タンパク質修飾剤・変性剤の汎トランスポーター阻害剤としての有用性について検討した。具体的には、

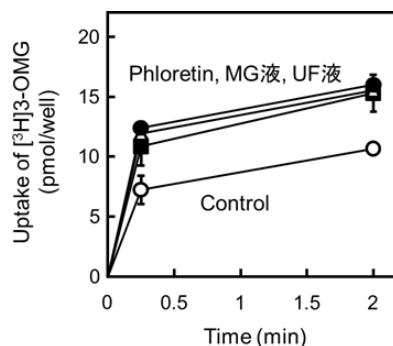
充分濃度の GLUT1 および ENT1 の阻害剤 (phloretin および NBMPR) 存在下での取り込み値を最大値として、タンパク質修飾剤・変性剤の溶液を反応停止・洗浄液として用いた場合の値を評価した。輸送阻害剤と同様の効果を示した場合には、完全な efflux 阻害効果(100%)ありとした。

まず個々のタンパク質修飾剤・変性剤について検討したところ、完全ではないものの formaldehyde、glutaraldehyde、urea、2-mercaptoethanol に両基質の efflux 抑制効果が認められた。そこでさらに、これら試薬を組み合わせることで検討を行ったところ、urea と formaldehyde、2-mercaptoethanol と glutaraldehyde の組み合わせが有効であることが明らかとなった。



上の図の A は D-glucose、B は uridine の取り込み値に及ぼす urea (濃度を变化させた) + formaldehyde (濃度は固定) の影響について検討した結果である。両基質ともに 5M urea+15% formaldehyde (UF 液) を洗浄液として用いた場合にほぼ 100% の値を示した。同様の効果は 0.7M 2-Mercaptoethanol + 1% glutaraldehyde (MG 液) の組み合わせでも観察された。従って膜小胞を用いた輸送実験において、UF 液や MG 液は、汎トランスポーター阻害剤として有用であることが示唆された。

次にこれらの汎トランスポーター阻害剤が培養細胞系でも有用かどうかについて検討した。



上の図は HepG2 細胞に 3-OMG を取り込ませた後、阻害剤を含まないバッファー (Control) あるいは phloretin 添加バッファー、MG 液、UF 液で洗浄し、細胞内に保持された 3-OMG を定量した結果である。これから明らかなように、MG 液、UF 液はともに phloretin 添加バッファーと同じ程度の efflux 抑制効果を示した。この結果は MG 液、UF 液は細胞膜に対する障害等の悪影響を持たないことも示している。

以上の結果を以下にまとめる。

- GLUT や ENT など、ある種のトランスポーターは膜小胞系や培養細胞系において低温忍容性を示すこと
- 低温忍容性を示すトランスポーターが関与する場合、単なる氷冷バッファーでは洗浄中に一旦取り込まれた基質の efflux が起こり、輸送活性・機能を適正に評価できない可能性があること
- そのため低温忍容性を示すトランスポーターが関与する場合には、当該トランスポーターの阻害剤を洗浄液に添加し efflux を防ぐ必要があること
- 本研究で開発した汎トランスポーター阻害剤 (MG 液、UF 液) は、関与するトランスポーターが不明の場合でも適用可能であり、膜輸送実験における新規な洗浄液として極めて有用である可能性が示された。

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 6 件)

1. Nagai, J., Komeda, T., Katagiri, Y., Yumoto, R. and Takano, M.: Characterization of protamine uptake by opossum kidney epithelial cells. Biol. Pharm. Bull., 査読有, 36(12), 1942-1949, 2013 (doi.org/10.1248/bpb.b13-00553)
2. Takano, M., Horiuchi, T., Sasaki, Y., Kato, Y., Nagai, J. and Yumoto R.: Expression and function of PEPT2 during transdifferentiation of alveolar epithelial cells. Life Sciences, 査読有, 93, 630-636, 2013 (doi: 10.1016/j.lfs.2013.08.008)

3. Sogame, Y., Kitamura, A., Yabuki, M., Komuro, S. and Takano, M.: Transport of biguanides by human organic cation transporter OCT2. Biomed. Pharmacother., 査読有, 67, 425-430, 2013 (doi: 10.1016/j.biopha.2013.02.003)
4. Nagai, J., Komeda, T., Yumoto, R. and Takano, M.: Effect of protamine on gentamicin accumulation in opossum kidney epithelial cells. J. Pharm. Pharmacol., 査読有, 65, 441-446, 2013 (doi: 10.1111/jphp.12005)
5. Sawada, T., Nagai, J., Okada, Y., Yumoto, R. and Takano, M.: Gadolinium modulates gentamicin uptake via an endocytosis-independent pathway in HK-2 human renal proximal tubular cell line. Eur. J. Pharmacol., 査読有, 684(1-3), 146-153, 2012 (doi: 10.1016/j.ejphar.2012.03.030.)
6. Nagai, J., Sato, K., Yumoto, R. and Takano, M.: Megalin/cubilin-mediated uptake of FITC-labeled IgG by OK kidney epithelial cells. Drug Metab. Pharmacokinet., 査読有, 26 (5), 474-485, 2011 (doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-022)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 平林悠, 今岡大明, 永井純也, 湯元良子, 高野幹久: 生体膜輸送研究のための新たな輸送反応停止液の探索・開発, 膜シンポジウム 2013, 2013 年 11 月 7 日~8 日, 京都市
2. 平林悠, 今岡大明, 永井純也, 湯元良子, 高野幹久: 氷冷下におけるグルコーストランスポーターの機能, 第 35 回日本膜学会年会, 2013 年 5 月 20~21 日, 東京都
3. 高野幹久: 生体膜と人工膜の研究融合のための相互理解に向けて, 第 35 回日本膜学会年会, 2013 年 5 月 20~21 日, 東京都
4. 今岡大明, 平林悠, 永井純也, 湯元良子, 高野幹久: 哺乳類トランスポーターの低温忍容性の解明, 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2012 年 11 月 15~16 日, 京都市
5. 高野幹久, 鈴木聡, 今岡大明, 永井純也, 湯元良子: 氷冷下におけるヒトのトランスポーター機能, 膜シンポジウム 2011, 2011 年 11 月 18~19 日, 沖縄市
6. 今岡大明, 鈴木聡, 永井純也, 湯元良子, 高野幹久: 哺乳類トランスポーターの低温忍容性とその普遍性に関する検討, 日本薬剤学会第 26 年会, 2011 年 5 月 29 日~31 日, 東京
7. 湯元良子, 鈴木聡, 今岡大明, 永井純也, 高野幹久: ヒト赤血球膜トランスポーターの低温忍容性, 日本膜学会第 33 年会, 2011 年 5 月 12~13 日, 東京都
8. Takano, M., Suzuki, S., Imaoka, H., Nagai, J. and Yumoto, R.: Human transporters that

function at ice-cold temperature - Important notice for transporter research, ISSX 9th International Meeting Istanbul 2010, 4-8 Sep 2010, Istanbul, Turkey

9. 鈴木聡, 湯元良子, 今岡大明, 永井純也, 高野幹久: ヒト赤血球膜の促進拡散トランスポーターは氷冷下でも機能する ~ 薬物相互作用研究上の留意点~, 医療薬学フォーラム 2010, 2010 年 7 月 10~11 日, 広島市
10. 高野幹久, 鈴木聡, 木村衣里, 今岡大明, 永井純也, 湯元良子: トランスポーターの低温忍容性とトランスポーター阻害薬探索研究上の留意点に関する考察, 日本薬剤学会第 25 年会, 2010 年 5 月 12~14 日, 徳島市

〔図書〕(計 1 件)

1. 高野幹久, 南江堂, 薬物排泄実験・腎排泄, 「薬剤学実験法必携マニュアル」, 日本薬剤学会出版委員会編, PP. 194-204, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 幹久 (TAKANO MIKIHISA)
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
 研究者番号: 20211336

(2) 研究分担者

研究者番号:

(3) 連携研究者

湯元 良子 (YUMOTO RYOKO)
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
 研究者番号: 70379915