

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670024

研究課題名(和文) クリックケミストリーを用いた脂質動態の簡便な測定系の構築

研究課題名(英文) Development of simple method for detecting the sphingolipid by using click chemistry

研究代表者

西 毅 (NISHI, TSUYOSHI)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：60403002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：SPNS2輸送体の機能を阻害することで副作用の少ない新しい免疫抑制剤の探索を目指し、阻害剤のスクリーニング系の構築を進めた。あらかじめ蛍光標識したS1Pは培養細胞では元々存在していた多剤排出輸送体の基質となってS1P輸送体とは関係なく放出されることを明らかにした。そこで、培養細胞を用いたSPNS2依存的なS1P放出の簡便な検出のために、Alkyn-スフィンゴシンの合成を進め、クリック反応によって水溶液中であれば蛍光を用いて μ M程度の検出感度で検出できることを見いだした。今後は、これらの系を実際のS1P輸送阻害剤の探索に用いられるように改良を進め、新しい薬の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：S1P transporter should be a good candidate for development of immunosuppressive drugs without severe side effect. However, quantification methods of S1P are time consuming or expensive for high throughput screening. We tried to develop the simple assay method using fluorescent-labeled S1P. The fluorescent-labeled S1P was secreted from various culture cells and was not a substrate of SPNS2. Therefore, to develop the detection system for SPNS2 activity, we tried to synthesize alkyn-labeled sphingosine. We succeeded to synthesize alkyn-labeled sphingosine and fluorescent-labeled azide. These compounds showed click reaction in optimized condition and fluorescent-labeled sphingosine was detected in μ M level. To perform the high throughput screening of SPNS2 inhibitors, further development is necessary to adapt this method for detecting the alkyn-S1P secreted from the cells.

研究分野：生化学

キーワード：S1P 輸送体 クリックケミストリー SPNS2 蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

脂質は細胞膜の構成成分であり、細胞の恒常性の維持などに重要であると共に、刺激に応答した情報伝達物質としても働いていることが分かってきた。しかしながら、細胞間での情報伝達物質として機能する脂質メディエーター等の両親媒性情報伝達物質が輸送されるか、特に細胞外への膜を介した放出機構についてはほとんど分かっていなかった。我々はその中でも特に、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の細胞外放出機構に着目し解析を進めてきた。S1P は脂質メディエーターの 1 種であり、細胞膜の構成成分であるスフィンゴミエリンの代謝物であるスフィンゴシンが細胞内でリン酸化されることで生成される。S1P は細胞外においてその特異的受容体(S1P1-S1P5)に結合することで細胞間の情報伝達物質として働き、細胞遊走、細胞増殖促進などさまざまな機能を示す。その中でも哺乳動物において、S1P は血液中で 1 μ M 程度の高濃度に維持されており、免疫細胞が S1P 濃度の低い 2 次リンパ組織から血液中へ移行する際に血液との間の S1P 濃度勾配を認識していることが明らかとなってきた。しかしながら細胞内で合成された S1P がどのように細胞外へ放出され、濃度勾配を形成するかについてはよくわかっていなかった。

我々はこの細胞外への放出に細胞膜上の輸送体が関与することを世界で初めて実証し、ゼブラフィッシュにおいて生理的に S1P 輸送体として働く分子 SPNS2 を同定することに成功した。また哺乳動物も SPNS2 の相同遺伝子が存在し、ヒト SPNS2 の生化学的解析から多発性硬化症の治療薬として最近承認された免疫抑制剤 FTY720 の活性化型であるリン酸化体の細胞外への輸送活性も持つことを示した。さらに SPNS2 欠損マウスの解析から、SPNS2 が実際に血管内皮細胞からの S1P の細胞外への放出に必須であり、SPNS2 の欠損によりリンパ球の血液中への移行が完全に阻害されることを見だし、リンパ球細胞遊走制御の新しい機構を提唱すると共に輸送体を標的とした安全な免疫抑制剤の開発の可能性を提唱した。

2. 研究の目的

脂質メディエーターの 1 種であるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は細胞間情報伝達物質として働き、リンパ球や癌細胞などの遊走を制御する因子として注目を集めている。この分子は細胞内で合成された後、細胞外へと放出されて標的細胞の膜上の特異的な受容体に結合することで細胞間情報伝達物質として機能する。S1P が免疫細胞の血中への移行を調節していることから、これまで S1P の受容体、合成酵素等を標的とした免疫抑制剤の開発が進められてきており、最も新しい物として S1P 輸送体の機能的アンタゴニストとして機能する FTY720 が開発されたが、

その副作用の問題により多発性硬化症のみの適用で治療薬として認可された。実際、免疫細胞の制御に関わる S1P 受容体 (S1PR1) の欠損マウスや S1P 合成酵素の同時欠損マウスでは血管の形成に異常が生じ、耐性致死となることが分かっている。しかし、我々が同定した血管内皮細胞の S1P 輸送体 SPNS2 は、この輸送体が欠損することで他の組織などに影響を与えることなく血液中へのリンパ球、特に T 細胞の血中への移行のみが完全に阻害されることを見いだした。この輸送体の活性を抑制する分子が、免疫抑制剤や自己免疫疾患など免疫細胞の関与する様々な疾病に対する副作用の少ない治療薬の開発につながるかと考えている。しかし、脂質メディエーター輸送体を標的とした阻害剤のハイスループットスクリーニングのための簡便な測定系が存在しない。そこで本研究では新しい輸送活性測定方法を確立し、阻害剤の迅速な開発に役立てることを目的としている。

3. 研究の方法

これまでの脂質分子の同定方法は抽出後に蛍光標識して HPLC で定量するなどの複雑なステップや、RI や質量分析機などの特別な施設や装置を必要としており、阻害剤探索のための大規模スクリーニングを行うことができないなどの問題点があった。本研究では S1P 輸送体の活性の測定にクリックケミストリーの手法を用い、S1P 輸送体活性の分光計を用いた多サンプルの簡便な定量的測定法を確立することで、一般の研究室に常備されている装置を用いて簡便に阻害剤の大規模スクリーニングを行うことを目指した。

まず検出用のプローブとして末端 Alkyn-スフィンゴシンを合成し、クリックケミストリーによる検出が可能かどうかを確認する。化合物単独で検出感度や定量的な測定の可能性を検討後、細胞を用いて S1P 輸送体によって輸送されるかどうか、輸送された場合にその活性を定量的に観察できるかどうかを調べる。測定は分光学的な方法とこれまでに用いられてきた方法での測定結果を比較することで、活性の測定方法としての有用性を確認する。方法が確立できれば天然物化合物ライブラリーや化合物ライブラリーを活用してスクリーニングを進め、輸送体の阻害剤の開発へと進める。

4. 研究成果

S1P は哺乳動物においてセラミドの代謝物であるスフィンゴシンが細胞内でのリン酸化されることで生成される。私たちはゼブラフィッシュにおいて生理的に機能する S1P 輸送体として見いだした SPNS2 を培養細胞へ強制発現させたアッセイ系で細胞外にスフィンゴシンを加えることで、細胞内の S1P 濃度が上昇し、効率的に S1P 輸送体の活性を測定することが出来ることを明らかにしてきた。

そこでまず最も簡便な方法として、あらかじめ蛍光標識したスフィンゴシンを取り込ませ培地中に放出された蛍光標識体を直接

測定することが出来るかどうかを調べた。蛍光標識したスフィンゴシンは未標識のスフィンゴシンに比べ培地に加えられた量に対する取り込みの割合は小さく、取り込み速度も遅いが、これまでに報告があった通り、細胞内に取り込まれて蛍光標識 S1P が生成することを確認した。しかし、この蛍光標識 S1P は哺乳類培養細胞 (CHO や 293 細胞) を用いた実験で、SPNS2 の発現に非依存的に細胞外へ放出されることが分かった。この放出は既存の多剤排出輸送体である MDR や MRP の阻害剤で部分的に阻害を受けたことから、蛍光標識 S1P は培養細胞に元々存在していた多剤排出輸送体の基質となっており放出されていることが示唆され、SPNS2 による S1P 輸送活性を測定するには適していないことが分かった。また、血中での S1P の恒常性維持に働く赤血球を用いて蛍光標識 S1P の放出を調べたところ、時間依存的に蛍光標識 S1P の放出が観察された。我々はこれまでに赤血球からの S1P 放出は多剤排出輸送体の仲間である ABCA 型の輸送体によって放出されている可能性を報告しており、赤血球からの S1P 放出を阻害する glyburide によって蛍光標識 S1P も同様に阻害されることを見いだした。さらに、赤血球においては S1P と蛍光標識 S1P が同じ輸送体を用いて排出されることを競合実験などにより明らかにした。これらの結果から蛍光標識スフィンゴシンは赤血球からの S1P 放出の阻害剤スクリーニングに用いることが出来ると考えている。予備的な結果として、96 穴プレートを用いて蛍光プレートリーダーを用いた検出が出来ることを確認しているが、この方法は細胞培養液からの有機溶媒を用いた S1Ps 抽出のステップが必要であり、まだ十分に簡便な方法であるとは言えない。現在、直接測定した場合でも蛍光標識スフィンゴシンと蛍光標識 S1P の蛍光を区別できる条件の検討を進めることで、スクリーニング系の開発を進めている。

あらかじめ蛍光標識されている S1P が SPNS2 の基質としては適していないが、S1P のアナログである DH-S1P、phyto-S1P、C17-S1P および FTY720-P は SPNS2 の基質として認識される。このことから、培養細胞を用いて SPNS2 による S1P 輸送活性を測定するには S1P と比較して構造が大きく変化していない基質が必要である可能性がある。そこで、新しいプローブとしてスフィンゴシンの構造を大きく変化させない基質の候補として、Alkyn-スフィンゴシンの合成を進めた。合成はこれまで報告のあった方法を一部改良して用い、活性の測定に十分な量を合成することに成功した。さらに、反応させる蛍光標識アジドについては水酸化クマリン誘導体を用いることとした。この化合物は、Alkyn と反応した後に蛍光を発するようになることが文献で報告されており、細胞外へ放出された Alkyn-S1P と反応することで蛍光が観察されるようになることが期待された。実際に合

成した化合物を用いて水溶液中で反応させることで、予想通り反応生成物において優位な蛍光強度の上昇が観察できることを確認した。生成したクマリン-スフィンゴシン化合物の濃度と蛍光を市販の蛍光計を用いて測定したところ、サブ μM 程度の濃度まで検出できることが分かった。しかし実際の測定に用いる培地などを用いて反応を計時的に観察した場合、バックグラウンドの蛍光強度の上昇が観察され、 $100 \mu\text{M}$ 程度の比較的高濃度で十分な S/N 比で検出することが出来なかった。この原因はアジドと Alkyn の反応が阻害されていて、溶液中の濃度に対して一部の Alkyn-スフィンゴシンしか反応できていないため予想される蛍光強度が得られていないのではないかと考えている。現在、アジドと Alkyn の反応の最適化する条件を検討しており、細胞からの放出を測定する培地の条件と、反応を促進する条件の検討を進めている。また、実際 Alkyn-S1P が SPNS2 の基質になりうるかについても検討を進めており、これらの条件を確立することで、実際の S1P 輸送阻害剤の探索に用いることが出来るように改良を進め、阻害剤のスクリーニングによる新しい薬の開発を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nishi T., Kobayashi N., Hisano Y., Kawahara A. and Yamaguchi A., Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters, *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 759-765 (2014)

〔学会発表〕(計 5 件)

福岡 宇紘、加藤 修雄、新田 孟、樋口 雄介、**西 毅**、スフィンゴシン-1-リン酸輸送体の新規排出定量法の開発、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 27 日、日本大学 理工学部船橋キャンパス/薬学部

小林 直木、山口 明人、**西 毅**、蛍光標識スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) を用いた赤血球 S1P 輸送体の活性測定、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸

Nishi, T., Physiological role of S1P transporters in S1P signaling, FASEB Science Research Conferences, "Lysophospholipid and other Related Mediators - From Bench to Clinic", 2013 年 8 月、Niseko

Nishi, T. Hisano, Y. Kobayashi, N. and Yamaguchi, A., The Physiological

Functions of Lipid Mediator Transporter, SPNS2、Technologies for Medical Diagnostic and Therapy Symposium、2013年10月、Academia Sinica Taipei

小林直木、山口明人、西 毅、光反応性アナログを用いたスフィンゴシン1リン酸(S1P)輸送体の探索、日本薬学会第134年会、2014年3月、熊本

〔図書〕(計 2 件)

Hisano Y., Nishi T. and Kawahara A., Sphingosine 1-phosphate signaling via transporters in zebrafish and mice. " *Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols* ", Ed. Yokomizo T., Murakami, M., Springer, 2015 in press

Kawahara A. and Nishi T., Functional and physiological roles of sphingosine 1-phosphate transporters. In " *Lysophospholipid Receptors: Signaling and Biochemistry* ", Ed. Hla T., Spiegel, S., Moolenaar W. and Chun J., John Wiley & Sons, Inc., 2013, 793(185-200)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 毅 (NISHI, Tsuyoshi)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号:

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし