

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830041

研究課題名(和文)モノアミントランスポーターPMATの機能解析と阻害剤開発

研究課題名(英文)Analysis of plasma membrane monoamine transporter in brain

研究代表者

吉川 雄朗 (Yoshikawa, Takeo)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70506633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：plasma membrane monoamine transporter (PMAT)は脳内に存在するモノアミン輸送体の一つである。しかしモノアミン濃度調節におけるPMATの役割は未だに不明のままであったため、PMAT遺伝子を欠損したマウスの作製により、PMATの機能を明らかにしようと考えた。本研究によりPMAT遺伝子を欠損したマウスの作製を終えることが出来たが、未だに十分な匹数が確保できておらず、今後PMAT欠損による影響を検討していく。またPMAT阻害剤の開発にも着手し、いくつかの候補化合物を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Plasma membrane monoamine transporter (PMAT) is one of the monoamine transporters in brain. However, the role of PMAT in the regulation of monoamine concentration remains to be elucidated. In the present study, we generated PMAT-deficient mice, but analysis of PMAT-deficient mice is now on going. We also try to develop specific inhibitors against PMAT. We performed high-throughput screening to get PMAT specific inhibitors and got some candidate compounds until now.

研究分野：薬理学

キーワード：モノアミン トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

セロトニンやドパミンなどのモノアミン神経伝達物質は、神経終末からシナプス間隙へと放出された後、プレシナプスに存在するトランスポーターを介して速やかに再取り込みされ、神経伝達が終息する。この再取り込み機構を介したモノアミン濃度調節は、神経活動の制御に深く関わっている。

近年、ニューロンに加えてアストロサイトもモノアミン取り込みに関わっていることが複数のグループから報告された。またモノアミンの不活化を行う monoamine oxidase や catechol O-methyltransferase などの酵素が、アストロサイトにも発現していることは古くから報告されており、モノアミン濃度調節におけるアストロサイトの重要性に注目が集まっている。しかしながら、アストロサイトによるモノアミン取り込みにどのトランスポーターが重要なのかについては、不明のままであった。

我々はアストロサイトによるモノアミン輸送に重要なトランスポーターを同定すべく研究に着手した。そして plasma membrane monoamine transporter (PMAT) という複数のモノアミン (セロトニン、ドパミン、ノルエピネフリン、ヒスタミン) を輸送できるトランスポーターが、アストロサイトにおけるモノアミン輸送に最も重要であることを明らかにした。

2. 研究の目的

これまでの研究により、PMAT がアストロサイトにおけるモノアミン輸送に極めて重要であることを示す事ができた。しかし、アストロサイトに発現する PMAT の *in vivo* における役割については、未だに十分に検討できていない。そこで本研究では、1) PMAT を欠失したマウスを作製し、モノアミン取り込みにおける PMAT の役割を *in vivo* の系で明らかにすることを目的とする。

また PMAT の阻害剤には、PMAT 以外のトランスポーターにも阻害作用を併せ持つ非特異的な阻害剤しか存在していなかった。そのため、薬理的に簡便に PMAT の機能を検討することができず、円滑に研究を進める上で大きな妨げとなっていた。そこで、2) PMAT 特異的阻害剤の候補となるヒット化合物の同定を目的とする。

3. 研究の方法

international mouse phenotyping consortium より PMAT の targeting vector を購入し、定法に基づいてノックアウトマウスを作製する。最初に得られたマウスは全身で PMAT を欠失したマウスとなるため、このマウスと FLP-CAG マウスとを交配させることにより、PMAT flox マウスを得ることが出来る。得られた PMAT flox マウスと GFAP-Cre マウスとを交配させて、アストロサイト特異的 PMAT 欠損マウスを作製する。得られたマウスにお

いて、マイクロダイアリス法を用いてモノアミン濃度を測定すると共に、行動薬理的評価を行う。

またヒト PMAT のモノアミン活性については報告されていたが、マウス PMAT の輸送活性については不明のままであった。トリチウムラベルされたモノアミンを用いて輸送活性について測定を行った。

トランスポーターの阻害実験には RI を用いることが多いが、コストが高いことや RI 汚染のリスクなどがあり、ハイスループット性が乏しい。我々は、モノアミンと類似の構造を持つ蛍光物質に着目し、これらの物質が PMAT の基質となる可能性を考えた。そして化合物 X が PMAT により輸送されることを確認の上、PMAT を安定発現させた CHO 細胞を作製した。これらを用いてスクリーニングを行う。

4. 研究成果

まず PMAT 全身欠損マウスの作製を行い、F1 ヘテロマウスを得た。F1 ヘテロマウスと FLP-CAG マウスとの交配により PMAT flox マウスを得ている。現在、まだ解析に足りうる匹数が確保できていない。

次にマウス PMAT のモノアミン輸送能について評価した。マウス PMAT がヒト PMAT と同様にセロトニン、ドパミン、ノルエピネフリン、ヒスタミンの全てを輸送できることを確認した (図1)。次に動態解析を行い、親和性と最大輸送能を算出し、マウスの PMAT はセロトニンとヒスタミンの輸送能が高いことが明らかとなった。

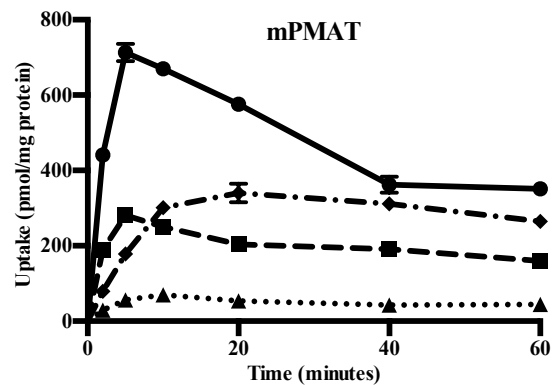


図1 マウス PMAT による時間依存的なモノアミン輸送能

また細胞外 Na⁺あるいは Cl⁻濃度、細胞外 pH による輸送能変化についての評価を加え、PMAT の輸送能は細胞外 Na⁺や Cl⁻の濃度に依存しないこと、また酸性条件下で輸送能が高く、塩基性条件下では輸送能が著しく低下することも明らかとなった。薬物阻害実験では、decynium-22 や imipramine によって阻害されやすいことも示された。

次に阻害剤のスクリーニング系についての検討を行った。モノアミンと類似の構造を

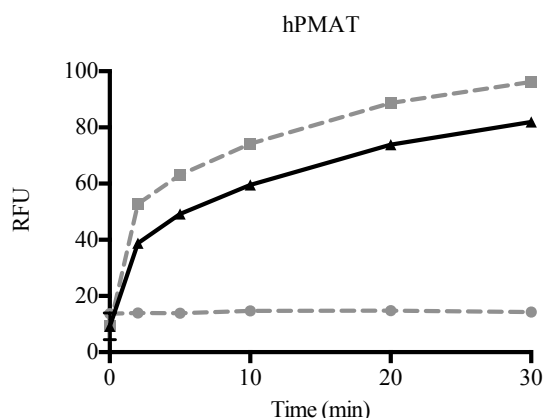


図2 蛍光物質を用いた PMAT 阻害剤スクリーニング系の評価

持つ蛍光物質を用いたスクリーニング系を構築し(図2)、Z' factor を算出したところ 0.71 と計算された

東北大学より化合物ライブラリーを頂戴し、384 プレートを用いて約 6,000 化合物に対するスクリーニングを実施し、現在7つの候補化合物を得ている。今後これらの化合物からリード化合物を得られるよう研究を進めていく。

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 11 件)

- 1) Saito-Hakoda A, Uruno A, Yokoyama A, Shimizu K, Parvin R, Kudo M, Saito-Ito T, Sato I, Kogure N, Suzuki D, Shimada H, Yoshikawa T, Fujiwara I, Kagechika H, Iwasaki Y, Kure S, Ito S, Sugawara A. Effects of RXR Agonists on Cell Proliferation/Apoptosis and ACTH Secretion/Pomc Expression. *PLoS One* 10: e0141960, 2015 査読有
- 2) Sato H, Ito C, Hiraoka K, Tashiro M, Shibuya K, Funaki Y, Yoshikawa T, Iwata R, Matsuoka H, Yanai K. Histamine H1 receptor occupancy by the new-generation antipsychotics olanzapine and quetiapine: a positron emission tomography study in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 232: 3497-3505, 2015 査読有
- 3) Iida T, Yoshikawa T**, Matsuzawa T, Naganuma F, Nakamura T, Miura Y, Mohsen AS, Harada R, Iwata R, Yanai K. Histamine H3 receptor in primary mouse microglia inhibits chemotaxis, phagocytosis, and cytokine secretion. *Glia* 63: 1213-1225, 2015 (**: corresponding author) 査読有
- 4) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Hiraoka K, Watanuki S, Shidahara M, Miyake M, Ishikawa Y, Matsuda R, Inami A, Yoshikawa T, Tago T, Funaki Y, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai

H, Kudo Y. [(18)F]THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 42: 1052-61, 2015 査読有

- 5) Murakami M, Yoshikawa T, Nakamura T, Ohba T, Matsuzaki Y, Sawamura D, Kuwasako K, Yanagisawa T, Ono K, Nakaji S, Yanai K. Involvement of the histamine H1 receptor in the regulation of sympathetic nerve activity. *Biochem Biophys Res Commun* 458: 584-589, 2015 査読有
- 6) Suzuki H, Sumiyoshi A, Matsumoto Y, Duffy BA, Yoshikawa T, Lythgoe MF, Yanai K, Taki Y, Kawashima R, Shimokawa H. Structural abnormality of the hippocampus associated with depressive symptoms in heart failure rats. *Neuroimage* 105: 84-92, 2015 査読有
- 7) Kasajima A, Fujishima F, Morikawa T, Kawasaki S, Konosu-Fukaya S, Shibahara Y, Nakamura T, Yoshikawa T, Iijima K, Koike T, Watanabe M, Shibata C, Sasano H. G-cell hyperplasia of the stomach induces ECL-cell proliferation in the pyloric glands in a paracrine manner. *Pathol Int* 65: 259-263, 2015 査読有
- 8) Yoshikawa T, Nakamura T, Shibakusa T, Sugita M, Naganuma F, Iida T, Miura Y, Mohsen A, Harada R, Yanai K. Insufficient intake of L-histidine reduces brain histamine and causes anxiety-like behaviors in male mice. *J Nutr* 144: 1637-1641, 2014 査読有
- 9) Nakamura T, Yoshikawa T**, Naganuma F, Mohsen A, Iida T, Miura Y, Sugawara A, Yanai K. Role of histamine H3 receptor in glucagon-secreting α TC1.6 cells. *FEBS Open Bio* 5: 36-41, 2014 (**: corresponding author) 査読有
- 10) Naganuma F, Yoshikawa T**, Nakamura T, Iida T, Harada R, Mohsen A, Yamato M, Yanai K. Predominant role of plasma membrane monoamine transporters in monoamine transport in 1321N1, a human astrocytoma-derived cell line. *J Neurochem* 129: 591-601, 2014 (**: corresponding author) 査読有
- 11) Mohsen A, Yoshikawa T**, Miura Y, Nakamura T, Naganuma F, Shibuya K, Iida T, Harada R, Okamura N, Watanabe T, Yanai K. Mechanism of the Histamine H3 Receptor-mediated Increase in Exploratory Locomotor Activity and Anxiety-like Behaviours in Mice. *Neuropharmacology* 81: 188-194, 2014 (**: corresponding author) 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- 1) 吉川雄朗、長沼史登、三浦大和、矢内敦、堀米愛、中村正帆、望月貴年、谷内一彦、Mechanism of brain histamine clearance、第

- 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸（神戸国際会議場）
- 2) 吉川雄朗、長沼史登、三浦大和、矢内敦、堀米愛、中村正帆、望月貴年、谷内一彦、脳内ヒスタミンのクリアランス機構について、日本生化学会東北支部第 81 回例会、2015 年 5 月 9 日、仙台（さくらホール）
- 3) Nakamura T, Yoshikawa T, Naganuma F, Iida T, Miura Y, Yanai K, H1-knocked out mouse had high sensitivity to isoflurane anesthesia, European Histamine Research Society 44th annual meeting, 2015 年 5 月 6 日～9 日、スペイン（マラガ）
- 4) Naganuma F, Yoshikawa T, Nakamura T, Miura Y, Matsuzawa T, Yanai K, Analysis of histamine N-methyltransferase deficient mice, European Histamine Research Society 44th annual meeting, 2015 年 5 月 6 日～9 日、スペイン（マラガ）
- 5) 吉川雄朗、中村正帆、長沼史登、三浦大和、谷内一彦、脳内ヒスタミン研究におけるマイクロダイアリシスの使用について、第 25 回マイクロダイアリシス研究会、2014 年 12 月 20 日、東京（東京女子医大）
- 6) 吉川雄朗、グリア細胞とヒスタミンとの関連について、2014 年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム、2014 年 12 月 1 日～13 日、東京（ホテル東京ガーデンパレス）
- 7) 吉川雄朗、長沼史登、三浦大和、柳生彩乃、谷内一彦、ヒスタミン代謝酵素欠損マウスの解析、第 65 回日本薬理学会北部会、2014 年 9 月 26 日～27 日、福島（コラッセ福島）
- 8) 吉川雄朗、原田龍一、古本祥三、渋谷勝彦、岩田錬、谷内一彦、無細胞蛋白質合成法を用いた PET イメージングプローブ作製、第 65 回日本薬理学会北部会、2014 年 9 月 26 日～27 日、福島（コラッセ福島）
- 9) Fumito Naganuma, Takeo Yoshikawa, Tadahiko Nakamura, Tomomitsu Iida, Yamato Miura, Kazuhiko Yanai, The mechanism of monoamine transport by human astrocytes, 17th world congress of basic & clinical pharmacology, 2014 年 7 月 13 日～18 日、南アフリカ（ケープタウン）
- 10) Tadahiko Nakamura, Takeo Yoshikawa, Kazuhiko Yanai, Expression and Function of Histamine H3 receptor in Pancreatic Islets, 17th world congress of basic & clinical pharmacology, 2014 年 7 月 13 日、南アフリカ（ケープタウン）
- 11) Miura Y, Yoshikawa T, Shibakusa T, Sugita M, Yanai K, Importance of histidine intake for histaminergic nervous system, European histamine research society 43rd annual meeting, 2014 年 5 月 7 日～10 日、フランス（リヨン）

- 12) Miura Y, Yoshikawa T, Naganuma F, Nakamura T, Iida T, Harada R, Mohsen A, Yanai K, Analysis of mouse polyspecific transporters, European histamine research society 43rd annual meeting, 2014 年 5 月 7 日～10 日、フランス（リヨン）
- 13) Iida T, Yoshikawa T, Asami Y, Naganuma F, Miura Y, Nakamura T, Mohsen A, Iwata R, Yanai K, The inhibitory effect of histamine in mouse primary microglia, European histamine research society 43rd annual meeting, 2014 年 5 月 7 日～10 日、フランス（リヨン）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 雄朗 (YOSHIKAWA, Takeo)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70506633

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：