

# Monocarboxylate transporter9(MCT9)の機能解析および 組織発現分布に基づく生理的意義に関する研究

## 学位論文内容の要旨

SLCスーパーファミリーの1つであるMonocarboxylate transporter (MCT)ファミリーは、内因的・外因的なカルボン酸型化合物の細胞膜輸送に関与するトランスポーターである。14種のアイソフォームのうち、これまでにMCT1-4、6、8、10に関する輸送基質や機能が報告されており、 $H^+$ 共輸送型のMCT1-4の基質として乳酸等の短鎖脂肪酸、促進拡散型のMCT8-10の基質として甲状腺ホルモンなどの生体の恒常性維持に不可欠な生体内物質が報告されている。さらに、促進拡散型のMCT6の基質として医薬品化合物であるブメタニドが報告されている。しかしながら、その他のアイソフォームに関する機能解析の報告はない。また、ニコチン酸等のカルボン酸型化合物の輸送は、MCTファミリーによる輸送が示唆されているものの、そのアイソフォームの特定に至っていない。さらに、腫瘍細胞においてその発現が増加するMCTアイソフォームも存在し、病態進行期におけるMCTの発現変動は、疾患マーカーや新薬開発の標的となる可能性が考えられる。したがって、機能未知のMCTアイソフォームの輸送基質、さらに組織発現分布やその生理的意義を明らかにすることは、将来的な新薬開発や個別化医療の基盤形成において非常に重要である。そこで本研究では、未だ機能解析が行われていないMCT9に着目し、組織発現分布とMCT9発現系による輸送基質の探索ならびに機能解析を行い、病態モデルラットを用いて組織発現分布に基づくMCT9の生理的意義を解析した。

### 1) MCT9の組織発現分布と機能解析

始めに、ヒトおよびラットにおける組織発現分布をタンパク質とmRNA発現レベルについて検討した。その結果、MCT9はヒトおよびラットにおいて共に組織ユビキタスに発現し、特に脾臓、腎臓、精巣、卵巣、肝臓に高発現していることが明らかとなった。しかしながら、ヒトおよびラットにおいて、タンパク質とmRNAの発現分布に相関は認められなかった。

続いて、MCT9安定発現細胞を作製し、MCTファミリーに輸送される化合物や比較的高いカルボン酸型化合物を基質候補化合物として輸送基質の探索を行った。その結果、葉酸が良好な基質であることが明らかとなったため、MCT9を介した葉酸の輸送特性を詳細に解析した。MCT9を介した葉酸の輸送は中性条件下において高値を示し、その輸送特性は、MCT6、8、10と同様に促進拡散型であることが明らかになった。また、MCT9の輸送特性が、他の葉酸トランスポーター (FR $\alpha$ 、PCFT、RFC)の輸送特性と異なることから、MCT9が新規葉酸トランスポーターであることが明らかとなった。次に、各種化合物を用いて葉酸取り込みに対する阻害効果を検討したところ、MCT9は葉酸構造類似体を強く認識し、特にプテロイン酸の構造に対する親和性が高いことが明らかとなった。一方、葉酸が主要な役割を担っているホモシステイン代謝に関わるピリドキシン (VB $_6$ )やシアノコバラミン (VB $_{12}$ )、セリンやシステイン、さらに環状アミノ酸であるヒスチジンやプロリンにより、VMの葉酸取り込みが比較的強く阻害されることが明らかとなった。したがって、生体において高濃度に存在するこれら化合物により、MCT9の輸送機能が影響される可能性が示唆された。

さらに、MCT9が比較的多く発現している腎臓に着目し、HK-2細胞とMCT9 siRNAを用い

て、MCT9の機能解析を検討した。その結果、尿細管膜上皮細胞においてMCT9は20-30%の葉酸の取り込みに寄与しており、MCT9を介した見かけの $K_m$ 値は82.8 nMと算出され、FR $\alpha$  ( $K_m=1-10$  nM)に次ぐ親和性を有することが明らかとなった。また、MCT9を介した葉酸輸送の方向性は、再吸収方向の輸送に対応する頂側膜 (apical)側から側底膜 (basolateral)側の方向が優位であり、MCT9の頂側膜 (apical)側の局在と対応する結果となった。したがって、MCT9は腎臓において葉酸の再吸収に関与していることが明らかとなった。

## 2) 病態時における葉酸トランスポーターの生理的意義

組織発現分布や機能解析の結果から推測された組織発現分布に基づくMCT9の生理的意義をさらに明らかにするために、病態モデルを用いた *in vivo* 系による検討を試みた。そして、MCT9が比較的多く発現し、葉酸の再吸収に寄与することや、葉酸がホモシステイン代謝に関与していることから葉酸トランスポーターの生理的意義が大きいと考えられる腎臓に着目した。さらに、葉酸トランスポーターの発現変動や機能変化が生じることが予想された腎疾患として、近年、広範囲の腎疾患の総称としてCKDが注目を集めていることから、CKD進行下における解析に汎用性が高いと考えられる0.75% adenine 誘発CKDモデルラットを用いた。そして、CKDの進行に伴う各臨床検査値の変化と葉酸トランスポーターの発現変動について解析した。

CKD患者において、血中葉酸量の減少と血中ホモシステイン量の増加といった負の相関が報告されていることから、本モデルにおける血中葉酸量と血中ホモシステイン量の関係を検討した。その結果、本モデルにおいて血中ホモシステイン量と総尿中葉酸量は変動しなかった。一方、血中葉酸量はadenine 摂食期間に依らず、6割程度減少することが明らかとなった。そこで、本モデルによる腎臓、肝臓、小腸各組織における各葉酸トランスポーターの発現変動を検討したところ、腎臓においてMct9とFraの発現レベルは共に減少し、Pcftの発現はmRNAレベルにおいて増加した一方、タンパク質レベルでは変動しなかった。またRfcの発現は、mRNAレベルにおいて減少した一方、タンパク質レベルで増加した。一方、肝臓において、Fraの発現はmRNAレベルにおいて増加した一方、タンパク質レベルでは減少した。またPcftの発現は、mRNAレベルにおいて減少した一方、タンパク質レベルで増加した。さらに、小腸において、Fraの発現は増加した。

このように腎障害による腎臓における葉酸トランスポーターの顕著な発現減少に伴い血中葉酸量は減少したことが示唆された。また、この血中葉酸量の減少、さらに組織内葉酸濃度を正常に戻す方向に対応して各組織葉酸トランスポーターが発現変動して機能していることが考えられる。さらに、本モデルによる臨床検査値と各組織における葉酸トランスポーターの発現変動の関係により、CKD進行早期から血中葉酸量の減少が認められたことから、腎障害のさらなる悪化やその予防を兼ねた葉酸の早期摂取の必要性が示唆された。

以上、本研究により得られた知見がMCTファミリーのさらなる機能解析やCKD治療のさらなる一助になることを期待する。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	井関	健
副査	教授	菅原	満
副査	准教授	山口	浩明
副査	准教授	武隈	洋

学位論文題名

## Monocarboxylate transporter9(MCT9)の機能解析および組織発現分布に基づく生理的意義に関する研究

ヒト全ゲノムの解読によりトランスポーターの遺伝子は約 400 種類存在することが確認されているが、機能が未知でありかつ生理的意義が明らかとされていないトランスポーターが数多く存在している。トランスポーターの機能変動や発現変動は、薬物動態への関与だけでなく、新薬開発等の標的としても注目を集めている。MCTファミリーは、14種のアイソフォームが同定されており、MCT1-4、6、8、10に関する機能解析が既に報告されているが、その他のアイソフォームに関する報告はほとんどない。

本論文は、他の MCT アイソフォームとの相同性が 25%程度と低く、未だ機能解析が進んでいない MCT9 (*SLC16A9*)に着目し、その機能や組織発現分布を *in vitro* および *in vivo* 実験系を用いて検討することで、組織発現分布に基づく MCT9 の生理的意義を見出し、将来的な新薬開発ならびに個別化した薬物療法の基盤形成に向けた有益な知見を得ることを目的としたものである。

第1章では、MCT9発現系を用いてその機能解析を行い、MCT9が葉酸を良好な基質とすることを見だし、その輸送特性に於いて他の葉酸トランスポーターとは異なる新規な葉酸トランスポーターであることを明らかにしている。また、ヒト正常腎由来 HK-2 細胞を用いた検討から、MCT9が頂側膜側に局在して発現していることを明らかにし、このことより本トランスポーターは葉酸の再吸収に関与していることを考察している。

第2章では、0.75%adenine 誘発 CKD モデルラットを用いて葉酸の体内動態と各組織における葉酸トランスポーターの発現変動について解析している。その結果、CKD モデルラットに於いては血中および尿中の葉酸濃度は低下したこと、およびモデルラット腎臓の MCT9 発現量が減少していたことから、MCT9は葉酸の尿細管再吸収に関与することを *in vivo* で明らかにしている。これらの結果は第1章で明らかにした MCT9 の細胞膜局在性ともよく合致する結果である。以上の知見は、MCT9 の機能や組織発現分布、さらに CKD 病態時における葉酸トランスポーターの生理的意義を検討した初の知見であり、MCTファミリーのさらなる機能解析や CKD 治療の一助として有用な情報となり得る。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。