

脳局在型胆汁酸トランスポーター**SLC10A4** の機能解析

東北大学大学院薬学研究科

医療薬科学専攻

がん化学療法薬学分野

阿部 拓哉

目次

序論	3
第 1 章 SLC10A4 の構造解析	
第 1 節 SLC10A4 のアライメント	6
第 2 節 SLC10A4 のプロテアーゼによる切断実験	10
第 3 節 胆汁酸輸送実験	18
第 4 節 SLC10A4 ノックダウンによる胆汁酸輸送能への影響評価	25
第 5 節 細胞毒性試験	33
総括	36
試薬および実験方法	38
謝辞	45
引用文献	46

略語表

本文中並びに図表中に以下の略語を用いた。

ABC, ATP-binding cassette

ASBT, apical sodium-dependent bile acid transporter

CDCA, chenodeoxycholic acid

DCA, deoxycholic acid

DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate

EGFR, epidermal growth factor receptor

E3S, estrone-3-sulfate

GPCR, G-protein-coupled receptor

LC/MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry

LCA, lithocholic acid

NTCP, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide

PREGS, pregnenolone sulfate

RNAi, RNA interference

SOAT, sodium-dependent organic anion transporter

SLC, solute carrier

TCA, taurocholic acid

TUDCA, tauroursodeoxycholic acid

UDCA, ursodeoxycholic acid

序論

トランスポーターは、生体膜上に存在するタンパク質であり、多くの場合、比較的水溶性で生体膜を透過しにくい薬物及び内因性の化合物の膜透過を介在している。トランスポーターは、細胞内外の栄養素や内因性物質の選択的物質交換を担うことにより生体機能の維持に関与する。また、投与された薬物の吸収、肝代謝や胆汁排泄および腎尿細管分泌等薬物の吸収・分布・排泄過程にも関与している [1]。トランスポーターも代謝酵素の場合と同様、基質認識部位を同じとする薬物が併用された場合、競合阻害が生じ、輸送活性が低下する可能性がある。また、薬物の暴露によるトランスポーターの発現誘導等の報告もなされている [2]。いずれの場合も薬物の効果及び副作用の発現を決定する要因となりうることから、臨床での薬物治療におけるトランスポーターの重要性が認められている [3]。

トランスポーターは **solute carrier (SLC)** トランスポーターと **ATP-binding cassette (ABC)** トランスポーターに大別される。通常、SLC トランスポーターは遺伝子に基づいて命名され、これまでに 51 ファミリー、378 分子が HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org/>) において報告されている [4]。

オーファントランスポーターである **SLC10A4** は、ナトリウム胆汁酸コトランスポーターファミリー (**Solute Carrier 10A, SLC10A**) に属する。SLC10A には、SLC10A4 の他に 5 つの遺伝子、すなわち SLC10A1、SLC10A2、SLC10A3、SLC10A5 そして SLC10A6 が属する。SLC10A ファミリーは、動物、植物、微生物で 50 以上のメンバーが報告されており、特徴的なドメイン (pfam01758) が保存されている。SLC10A1 は別名 **Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide**

(NTCP)、SLC10A2 は別名 apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT)、SLC10A6 は別名 sodium-dependent organic anion transporter (SOAT) と呼ばれている。

SLC10A1 は、cholate、taurocholate 等の bile acid、chenodeoxycholate-3-sulfate 等の bile acid sulfate、estrone-3-sulfate (E3S)、dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) 等の steroid sulfate を基質とする。SLC10A2 は、cholate、taurocholate 等の bile acid を基質とする。SLC10A6 は E3S、DHEAS および pregnenolone sulfate (PREGS) 等の steroid sulfate を基質とする [5]。

SLC10A4 は系統学的に SLC10A1、SLC10A2 および SLC10A6 と 53.5%、54.4% および 51.5% の相同性を持つ [5]。SLC10 ファミリーの基質を系統樹と共に Figure 1 に示した。このような高い相同性を持つにも関わらず、CHO 細胞、HEK293 細胞およびアフリカツメガエル卵母細胞にラット *Slc10a4* を強制発現させた系において taurocholate、E3S、DHEAS および PREGS が、輸送されないことが報告されている [6, 7]。

ヒトにおいて SLC10A4 mRNA は脳、小腸、結腸の順に高発現が示されている [6]。また、SLC10A4 mRNA はヒト胎児中脳において 5 週から 10 週にかけて発現量が増加することから、中脳の発達に関与する可能性が報告されている [8]。ラットおよびマウスにおいて *Slc10a4* mRNA の発現量は脳において最も高く、それ以外の組織においては低い発現レベルを示す [6]。ラット *Slc10a4* mRNA は黒質ドパミン作動性神経に高発現しており、6-hydroxydopamine の黒質への投与により引き起こされる傷害に伴いダウンレギュレーションすることから、ドパミン作動性神経の生存調節に関与する可能性が示唆されている [9]。また、本タンパク質は脳に高発現していることが報告されており、中でもコリン作動性神経における発現が報告されている [6]。以前、脳内で胆汁酸の存在が

報告された。しかしながら、その機能については未だ明らかにされていない [10]。

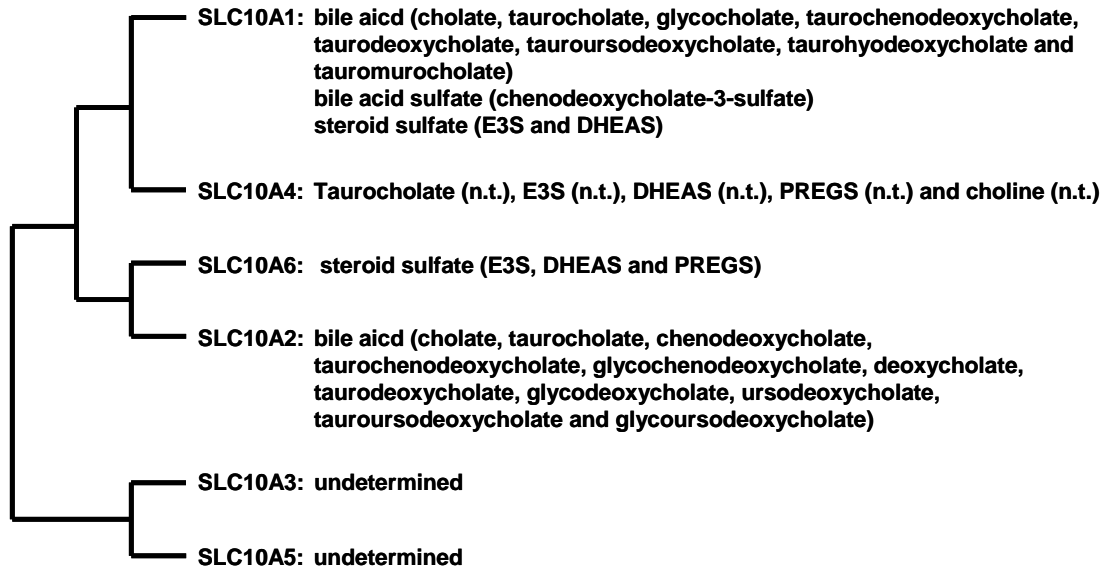


Figure 1. Phylogenetic tree and substrates of SLC10 family.

SLC10A4 は、膜貫通領域において SLC10A1、SLC10A2 および SLC10A6 と特に高い相同性を有することが予測されている [5]。このことから、SLC10A4 において膜貫通領域以外の領域が輸送能に関与する可能性が考えられた。

ヒト小脳髄芽細胞腫由来 TE671 細胞はいくつかの神経様の特徴を持ち、ニコチン性アセチルコリン受容体、アセチルコリンエステラーゼを発現することが報告されている [11, 12]。SLC10A4 はコリン作動性神経に高発現していることから、TE671 細胞に SLC10A4 が発現している可能性が考えられた。以上より、本研究では SLC10A4 の膜貫通領域およびそれ以外の領域と輸送能との関係に着目し、TE671 細胞を用いて SLC10A4 の機能解析を行った。

第 1 章 SLC10A4 の構造解析

第 1 節 SLC10A4 のアライメント解析

```
1 MDGNDNVTLTFAPLLRDNYTLAPNASSLGPGTDLALAPASSAGPGPGLSL
51 GPGPSFGFSPGPTPTPEPTTSGLAGGAASHGSPSPFPRPWAPHALPFWDTP
101 LNHGLNVFVGAALCITMLGLGCTVDVNHFGAHVRRPVGALLAALCQFGLL
151 PLLAFLLLALAFKLDEVA AVAVLLCGCCPGGNLSNLMSLLVDGDMNLSIIM
201 TISSTLLALVLMPLCLWIYSWAWINTPIVQLLPLGTVTLTLCSTLIPIGL
251 GVFIKYKYSRVADYIVKVSLWSLLVTLVVLFIIMTGTMLGPELLASIPAAV
301 YVIAIFMPLAGYASGYGLATLFLHLPNCKRTVCLETGSQNVQLCTAILKL
351 AFPPQFIGSMYMFLLYALFQSAEAGIFVLIYKMYGSEMLHKRDPLDEDE
401 DTDISYKKLKEEEMADTSYGTVKAENIIMMETAQTSL
```

Figure 2. SLC10A4 deduced protein sequence. Molecular weight of SLC10A4 protein was predicted to be 46.5 kDa. The arrow indicates thrombin cleavage site.

Figure 2 に SLC10A4 の 1 次配列を示す。SLC10A4 の構造解析のために SLC10 サブファミリーのアミノ酸配列を EBI ClustalW algorithm によりアライメントした [5]。その結果、胆汁酸等の基質輸送能を持つ SLC10 サブファミリーである SLC10A1、SLC10A2 および SLC10A6 と比較し SLC10A4 の N 末端側の細胞外領域が長いことが推定された (Figure 3)。

SLC10A4 の N 末端配列について、プロテアーゼによる切断の可能性を考え、さらに探索したところ、Arg⁸⁷-Pro⁸⁸ をトロンビンが認識し、切断する可能性が

SLC10A4 の N 末端が基質の輸送に関与することを示すために、プロテアーゼによる切断が考えられた。プロテアーゼにより切断されるのであれば、生理的条件下により近い場合、プロテアーゼによる切断を選択した。トロンビン(Thrombin)は Arg または Lys の C 側を切断するが、切断部位周辺の数残基の違いによっても認識配列が異なる[13, 14]。トロンビンの認識配列を SLC10A4 の Arg⁸⁷-Pro⁸⁸ と仮定した場合、SLC10A4 は 437 残基のタンパク質であり、そのアミノ酸配列から 46.5-kDa と算出されることから、Arg⁸⁷-Pro⁸⁸ の切断により、1-87 残基からなる 8.5-kDa および 88-437 残基からなる 38-kDa の 2 つのペプチドが生成すると考えられる。

トロンビンにより Arg⁸⁷-Pro⁸⁸ で切断された場合、N 末端配列が除去されることが予想された。本研究で使用した抗体の抗原配列を Figure 4 に加えた。anti-N-terminus of SLC10A4 antibody の抗原は細胞外のみであるが、anti-C-terminus of SLC10A4 antibody の抗原は細胞外および細胞内に存在する。

SLC10A4 の N 末端には、N 結合型および O 結合型糖鎖の付加部位が多数存在する可能性が高かった。糖鎖を欠損させた場合、OCT2 において輸送能が減弱し、細胞膜への移動の機能不全等が起こる [15]。OAT1 および OAT4 において糖鎖の欠損は、細胞膜への移動は正常だが、輸送能を減弱させる [15]。このため、SLC10A4 においても糖鎖が輸送能に影響する可能性が考えられた。

第2節 SLC10A4 プロテアーゼによる切断実験

1-2-1. イムノブロットによる SLC10A4 発現細胞の探索およびトロンビンによる切断

SLC10A4 の機能を解析するため、はじめに *in vitro* における SLC10A4 解析系を構築することを計画した。ラットの SLC10A4 はコリン作動性神経に高度な発現が認められている [6]。そこで文献的に検索した結果、アセチルコリン受容体およびアセチルコリンエステラーゼを発現し、神経様の特徴を持つヒト小脳髄芽細胞腫由来 TE671 細胞を用いることとした。そこで、TE671 細胞ライセートを SDS-PAGE によって分離した後、SLC10A4 の 324 – 436 残基を抗原として作製した anti-SLC10A4 antibody (polyclonal anti-C-terminus of SLC10A4 antibody) を用いてイムノブロット解析を行った。結果を Figure 5 (control) に示した。Patrick らによる過去の報告と一致する 90-kDa にバンドが検出され、TE671 細胞における SLC10A4 の発現を確認した[7]。続いて、第1節で予測したトロンビンによる切断部位を検証するために、同様にトロンビン処置した TE671 細胞のライセートのイムノブロット解析を行った。結果を Figure 5 (thrombin) に示した。トロンビン処置した TE671 細胞においては 90-kDa のバンドが薄くなり、35-kDa にバンドが出現した。

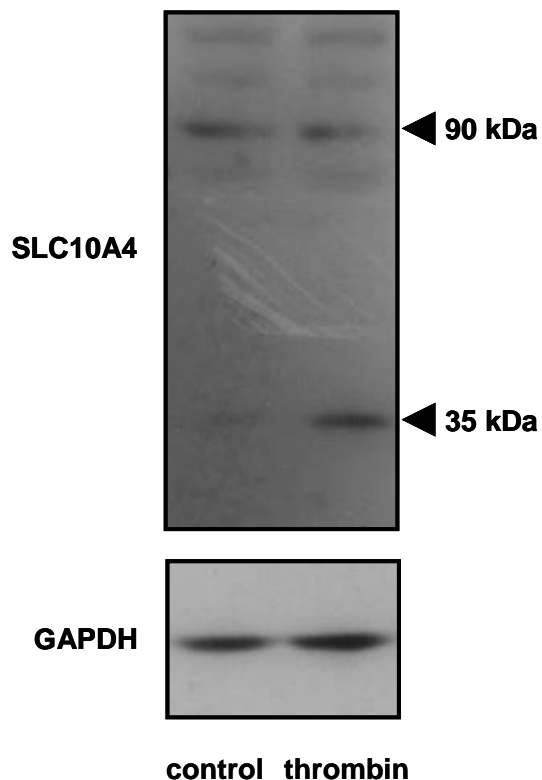


Figure 5. Western blot analysis. Control represents vehicle-treated cells. Thrombin represents thrombin treated cells. A 90-kDa protein was detected, thought to be glycosylated or dimerized SLC10A4, as the expected molecular weight of native human SLC10A4 on the basis of the deduced amino acid sequence is estimated to be 46.5 kDa. The 35-kDa band is predicted to be the fragment of amino acids 88–437 of SLC10A4 produced by thrombin cleavage.

[考察]

イムノブロットにより、通常培養時において TE671 細胞に SLC10A4 が発現していることを確認した。したがって、本研究において TE671 細胞を使用して機能解析を行うこととした。90-kDa のタンパク質は SLC10A4 の糖鎖修飾体であると考えられているが [6, 7]、未修飾の SLC10A4 (437 残基)の分子量は 46.5-kDa であることから 90-kDa のタンパク質は SLC10A4 の 2 量体であること

も考えられる。これを明らかにするためには、glycosidase により糖鎖を切断することが必要となる。SDS-PAGE により 1 量体および 2 量体が検出される例として G-protein-coupled receptor (GPCR) である epidermal growth factor receptor (EGFR) や dopamine D2 receptor が挙げられ、いくつかの GPCR は 2 量体として多彩なシグナル伝達を行うことが知られている [16, 17]。SLC10A4 は 7 回膜貫通構造を持つと予測されていることから、GPCR としての機能も持つ可能性が考えられる [5]。一方、anti-SLC10A4 antibody は SLC10A4 の 324–436 残基に相当するペプチドに対する抗体であるため、35-kDa のタンパク質はトロンビンにより切断された SLC10A4 の C 末端であると考えられる。この結果は、トロンビンの切断部位が Arg⁸⁷-Pro⁸⁸ であるとの仮定より予測された 88–437 残基の分子量がおよそ 35-kDa であることと一致する。

1-2-2. TE671 細胞における SLC10A4 の免疫蛍光染色

1-2-1 において、TE671 細胞における SLC10A4 の発現を anti-SLC10A4 antibody (anti-C-terminus of SLC10A4 antibody) を用いるイムノブロット解析より確認した。続いて、本項では免疫蛍光染色法により TE671 細胞における SLC10A4 発現について評価した。SLC10A4 は 437 残基より構成されるタンパクであり、N 末端の約 100 残基が細胞外に露出していると予測される (Figure 4)。そこで、SLC10A4 の 2–51 残基を抗原として作製された anti-SLC10A4 antibody (anti-N-terminus of SLC10A4 antibody) を用い細胞膜非透過性条件下で免疫蛍光染色を行った結果、TE671 細胞はリング状に染色された (Figure 6A; thrombin (-) and non-permeabilized panel)。この染色パターンは、TE671 細胞の細胞膜上に発現するアセチルコリン受容体の染色パターンに類似していた[18]。このため、

TE671 細胞において、SLC10A4 は細胞膜上に存在すると推定された。TE671 細胞をトロンビン前処置後に同様に染色すると、反応性が減少した (Figure 6A、矢印部分; thrombin (+) and non-permeabilized panel)。定量解析を行ったところ、染色性は 56 ± 2.0 a.u. から 37 ± 0.7 a.u. に減少した (Figure 6B)。一方、細胞膜透過性条件下においては細胞質内も染色され (Figure 6A; thrombin (-) and permeabilized panel)、トロンビン処置により染色性に差は認められなかった (Figure 6A; thrombin (+) and permeabilized panel、6B)。続いて、anti-C-terminus of SLC10A4 antibody を用い、細胞膜非透過性条件下で免疫蛍光染色を行った結果、TE671 細胞はリング状に染色された (Figure 6C; thrombin (-) and non-permeabilized panel)。TE671 細胞をトロンビン前処置後に同様に染色したが、anti-C-terminus of SLC10A4 antibody の染色性に差は認められなかった (Figure 6C; thrombin (+) and non-permeabilized panel、6D)。anti-N-terminus of SLC10A4 antibody の場合と同様に細胞膜透過性条件下においては細胞質内も染色され (Figure 6C; thrombin (-) and permeabilized panel)、トロンビン処置により染色性に差は認められなかった (Figure 6C; thrombin (+) and permeabilized panel、6D)。

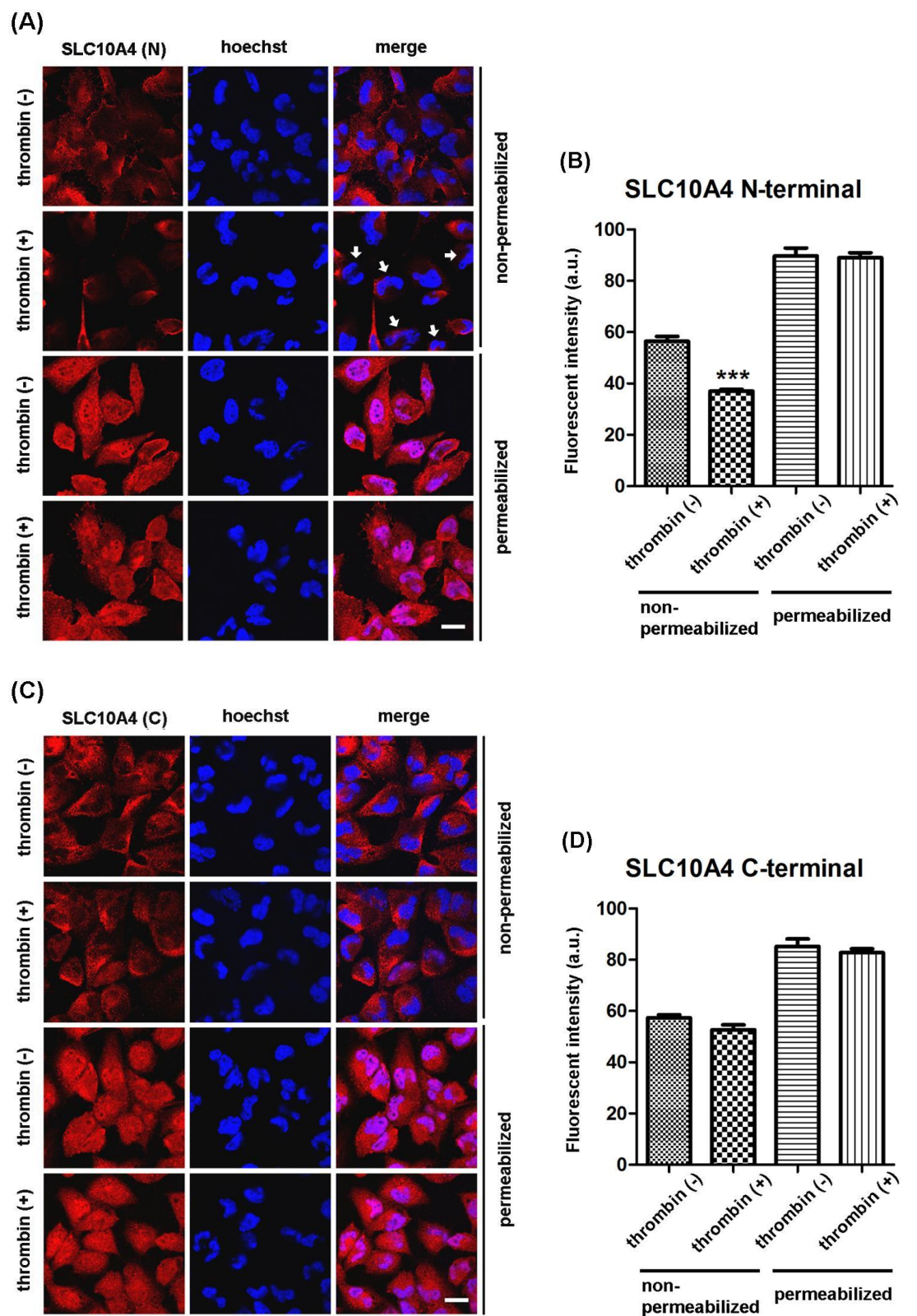


Figure 6. Distribution of SLC10A4 N-terminal and C-terminal (A-D). Cells were

treated with “thrombin (+)” or vehicle “thrombin (-)” for 3 h in the figure. Subsequently, cells were fixed by 4% paraformaldehyde with or without following permeabilization (0.1% triton-X), then stained using anti-SLC10A4 N-terminal (A) and anti-SLC10A4 C-terminal (C) antibody. SLC10A4 expressed on plasma membranes decreased following thrombin treatment [(A), indicated by arrows]. Scale bar indicates 20 μ M. Quantification of fluorescence intensities are shown in (B) and (D). Fluorescent intensities per cell area for SLC10A4 N-terminal and SLC10A4 C-terminal are shown. Measurement for the area was carried out with NIH ImageJ software. Values represent mean \pm SEM; n = 4. ***p < 0.001 compared with “thrombin (-)” in SLC10A4 N-terminal.

[考察]

ラット **Slc10a4** は **N** 末端が細胞外に露出し、**C** 末端が細胞内に存在することが知られている[6]。本研究により、**TE671** 細胞においても **SLC10A4** の **N** 末端が細胞外に露出していることが示唆された。トロンビン処置により細胞膜の **SLC10A4** の **N** 末端に対する反応のみが減弱していたことから、**Krebs-Henseleit buffer** に添加したトロンビンは **SLC10A4** の細胞外領域に作用したと考えられる。しかしながら、トロンビン前処置をしたにもかかわらず、抗 **N** 末抗体に対する反応性が残っていたことは、**N** 末が切断されていない **SLC10A4** が残存していた可能性が考えられる。または、**SLC10A4** ではない、非特異的な反応が起きたことも考えられ、これを回避するためには、**SLC10A4** を発現していない細胞に **SLC10A4** を強制発現させて、評価する必要がある。抗体の抗原配列が **SLC10A4** の 2-51 残基のペプチドであることから、アミノ酸番号 50 以降にトロンビンに

よる切断部位が存在すると考えられる。一方、切断されたペプチドに膜貫通部位が含まれていれば、細胞膜に留まることが予想されるため、トロンビン前処置後の **anti-N-terminus of SLC10A4 antibody** を使用した免疫蛍光染色により、蛍光強度の低下は認められないと考えられる。したがって、トロンビンの認識配列は、膜貫通部位の含まれないおよそ **50-100** 残基の間と示唆される。トロンビンは **Arg** または **Lys** を認識および切断し、凝固系や **PAR** を活性化する等の生理的役割を担っている。トロンビンの特異性を考慮すると、**SLC10A4** の **N** 末端 **50-100** 残基の間に存在する切断部位は **Arg⁸⁷-Pro⁸⁸** であると考えられる。一方、未修飾の **88-437** 残基からなる **SLC10A4** の分子量は **38-kDa** と計算されることから、イムノブロットにて観察された **35-kDa** のバンドは **SLC10A4** の **88-437** 残基であることが考えられる。

トロンビンは生理的役割として、血液中のフィブリノゲンを切断してフィブリン網を形成する以外にも、**GPCR** である **protease-activated receptor (PAR)** を活性化することにより、種々の細胞を直接活性化する [19]。フィブリノゲンは α 鎖、 β 鎖および γ 鎖の **3** 種のフィブリノゲン鎖からなる。フィブリノゲン α の **Arg³⁵-Gly³⁶** およびフィブリノゲン β 鎖の **Arg⁴⁴-Gly⁴⁵** はトロンビンにより切断され、フィブリノペプチド **A** および **B** をそれぞれ生成し、フィブリン網を形成する [13]。一方、**PAR** はこれまでに **4** 種のサブタイプがクローニングされており、**PAR-1**、**-3** および **-4** はトロンビンによって活性化される。**PAR-2** はトリプシンおよび肥満細胞に存在するトリプターゼによって活性化される。ヒトでは **PAR-1** と **PAR-4** が、またマウスやラットでは **PAR-3** と **PAR-4** が血小板の膜上に存在し、トロンビンの血小板活性化作用を媒介している [20]。トロンビンは血小板に対して形態変化、**ADP**、トロンボキサン **A₂**、セロトニン等の遊離、**P**セレクトリン、**CD40L** の細胞外への露出、陰性リン脂質の細胞外露出による抗凝

固活性亢進等を惹起する。また、血管内皮細胞に対しては、von Willebrand factor の放出、P セレクチンの露出、ケモカイン産生、形態変化による血管透過性の亢進を惹起する。血管平滑筋に対しては、収縮、サイトカインの産生、細胞増殖を惹起する。繊維芽細胞に対しては細胞増殖を惹起するほか、T 細胞、好中球および単球等にも作用する [19]。トロンビンの PAR に対する作用は、PAR-1 の Arg⁴¹-Ser⁴²、PAR-3 の Lys³⁸-Thr³⁹、PAR-4 の Arg⁴⁷-Gly⁴⁸ を切断することに起因する。PAR の N 末端は細胞外に露出しており、それがトロンビン等のプロテアーゼにより切断されて新たにできた N 末端がリガンドとなる。また、PAR-3 以外の PARs はそれぞれの tethered ligand のアミノ酸配列に基づいて合成された 5-6 個のアミノ酸からなる PARs 活性化ペプチドを外来性に与えることによって活性化される [14]。

第3節 TE671 細胞を用いた胆汁酸輸送実験

前節の結果を踏まえ、**SLC10A4** の機能解析のために、**TE671** 細胞を用い、トロンビン処置により **SLC10A4** の細胞外に露出する **N** 末端を除去した状態の基質の輸送能を評価することとした。

これまで、トロンビン等のプロテアーゼがトランスポーターの輸送活性に影響を与えることは報告されていない。そこで、トロンビンによって **N** 末端を除去された **SLC10A4** の基質取り込み能を評価することにした。切断型としても機能するトランスポーターである **SLC10A2** はスプライスバリエーションの **truncated-ASBT (t-ASBT)** としても輸送能を保持する [21, 22]。しかしながら、**ASBT** は取り込み型のトランスポーターであり、**t-ASBT** では排出型のトランスポーターとして機能することが知られている。また、**taurocholate** に対する **K_m** 値は **ASBT** において **13 μM**、**t-ASBT** において **35 μM** である [21, 22]。しかしながら、プロテアーゼにより切断されて活性化されるトランスポーターはこれまで報告されていないことから、基質の取り込み能の評価により、本研究の新規性が見出されると考えられる。

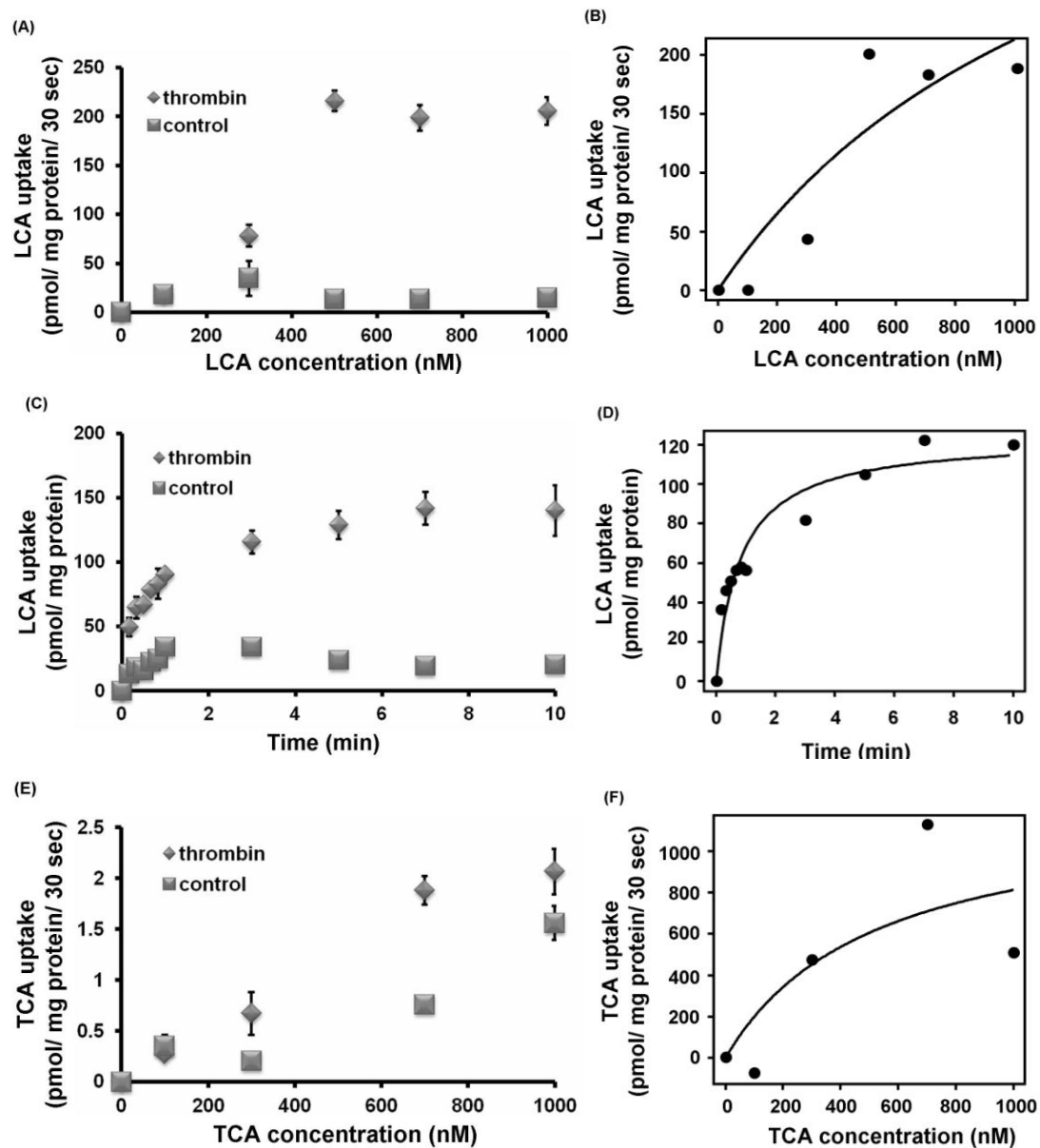
胆汁酸は、肝細胞において界面活性作用により細胞膜を破壊し、活性酸素種を介してネクロシスやアポトーシスを引き起こすことや、胆汁酸自身がデスレセプターを直接活性化し酸化的障害を介してミトコンドリア機能不全をもたらすことが知られている。他方、胆汁酸は消化器系細胞においてアポトーシス抵抗性の細胞に対して選択化合物としての作用として酸化的ストレスや **DNA** 障害に関連する間接的な作用をもたらし、がんプロモーターとしての関与が示唆されている [23]。さらに、各種核内受容体と結合し、胆汁酸の輸送・代謝に関与する遺伝子群の転写発現調節を司ることが判明し、その内因性生理活性物

質としての役割も注目されている [24]。胆汁酸の一種である chenodeoxycholic acid (CDCA)は強力な大腸癌発生のプロモーターであることが示唆されているが、その立体的構造異性体である ursodeoxycholic acid (UDCA) は CDCA とは逆の作用を示すことも知られている [25, 26]。また、lithocholic acid (LCA)は細胞内の caspase-8 を活性化し、アポトーシス誘導作用を示すことが知られている [27]。taurocholic acid (TCA)の作用には、胆管細胞の保護作用、胃上皮細胞の傷害作用等が挙げられる [28-31]。

第 2 節において、SLC10A4 が TE671 細胞の細胞膜に発現しており、N 末端がトロンビン処置により切断・除去されることを示した。この条件下での、胆汁酸をはじめとする基質の取り込みを評価するため、基質として、CDCA、deoxycholic acid (DCA)、LCA および TCA の胆汁酸、硫酸抱合型ステロイドである E3S を選択した。取り込み実験には 24 well plate を用いた。TE671 細胞をトロンビンまたはその溶媒で処置し、基質を添加した培養液で一定時間 37°C でインキュベートした。取り込まれた基質は、LC/MS/MS にて定量した。

TE671 細胞は、トロンビン前処置により LCA および TCA の濃度依存的な取り込み量の増加が認められた (Figure 7A、7E)。トロンビン前処置による取り込み量の増加分を算出するために、トロンビン処置群の取り込み量とコントロール群の取り込み量の差をプロットした (Figure 7B、7D、7F)。トロンビン前処置による取り込み量の増加分を速度論的に求めるために Figure 7B および 7F の値をミカエリスメンテン式に当てはめ、LCA および TCA のミカエリス定数 K_m および最大輸送速度 V_{max} を求めた。その結果、LCA においては、 $K_m = 1300 \text{ nM}$ 、 $V_{max} = 490 \text{ pmol/mg protein/30 sec}$ であり、TCA においては、 $K_m = 520 \text{ nM}$ 、 $V_{max} = 1.2 \text{ pmol/mg protein/30 sec}$ であった。また、LCA 取り込み量の時間依存性は濃度を 300 nM として Figure 7C および 8D に示した。その結果、LCA の

取り込みは、**7 min** で飽和していることが示唆された。一方、**CDCA**、**DCA** および **E3S** の取り込みはトロンビン前処置により増加しなかった (**Figure 7G-7I**)。



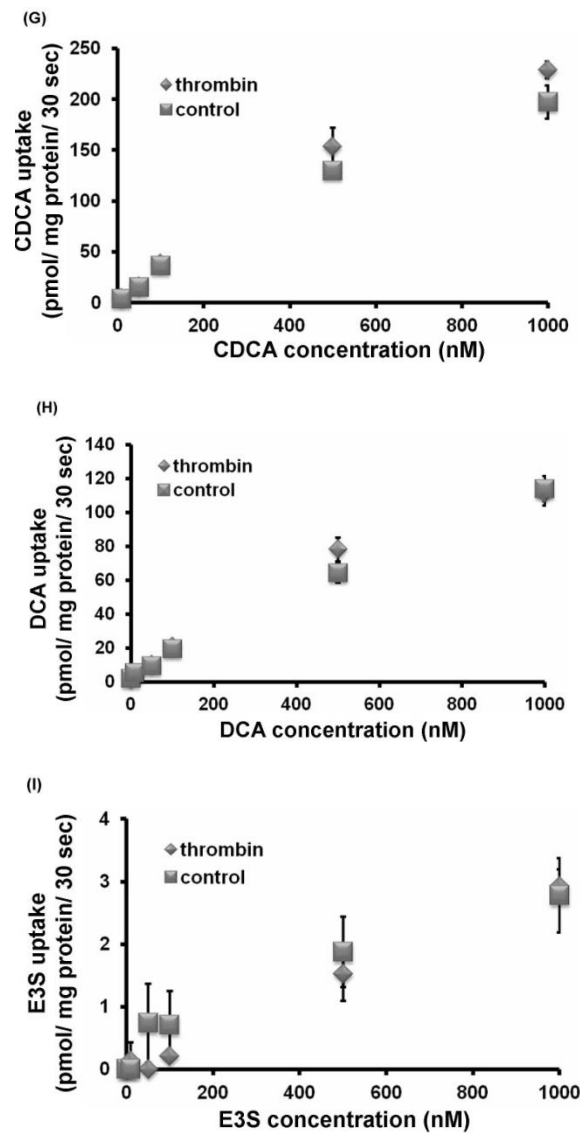


Figure 7. Transport analyses. LCA uptake (A-D). Thrombin indicates uptake by thrombin treated cells. Control indicates uptake by vehicle-treated cells. LCA concentration was between 100 nM and 1000 nM (A). Thrombin-enhanced transport was determined by subtracting the mean value of transport velocity in control cells from that in thrombin-treated cells. Non-linear regression analysis was performed and the value fitted to the Michaelis–Menten equation. $K_m = 1300$ nM, $V_{max} = 490$ pmol/mg protein/30 sec (B). Time course of uptake of LCA by thrombin treated cells and vehicle-treated cells. LCA concentration was 300

nM (C). Thrombin-enhanced transport was determined by subtracting the mean value of transport velocity in control cells from that in thrombin-treated cells (D). TCA uptake (E, F). Thrombin indicates uptake by thrombin treated cells. Control indicates uptake by vehicle-treated cells. TCA concentration was between 100 nM and 1000 nM (E). Thrombin-enhanced transport was determined by subtracting the mean value of transport velocity in control cells from that in thrombin-treated cells. Non-linear regression analysis was performed and the value fitted to the Michaelis–Menten equation. $K_m = 520$ nM, $V_{max} = 1.2$ pmol/mg protein/30 sec (F). CDCA uptake (G). DCA uptake (H). E3S uptake (I). Values represent the mean \pm S.D.; $n = 3$ or 4 .

[考察]

トロンビンにより LCA および TCA の取り込み量は増加したが、CDCA、DCA および E3S の取り込み量に変化が見られなかった。このことから、トロンビン前処置による基質輸送は、基質特異性を持つことが示唆され、トランスポーターが LCA および TCA の輸送に関与する可能性が考えられた。TCA 取り込みの K_m は 520 nM であった。この K_m 値は既存のトランスポーター(BSEP; 4.25 μ M、MRP3; 30 μ M、NTCP; 6.2-11 μ M、ASBT; 9.4-60.2 μ M、OATP1A2; 60-64 μ M、OATP1B1; 10-33.8 μ M、OATP1B3; 5.8 μ M、OATP2B1; 71.8 μ M、および OATP4A1; 14.9 μ M)による TCA の輸送に対する K_m と比較して著しく低かった [21, 32-42]。このことから、既存のトランスポーターがこの輸送に関与する可能性は低いと考えられた。

健康人の胆汁酸の血中濃度については、CDCA は約 250-500 nM、DCA は約 150-400 nM、LCA は約 15-60 nM、TCA は約 100 nM であることが報告されて

いる [43, 44]。トロンビンにより活性化される輸送における LCA および TCA の K_m は、それぞれ 1300 nM および 520 nM であることから、血中の胆汁酸の輸送が可能であると考えられる。

例外はあるが、胆汁酸の細胞毒性は疎水性が高いほど高く、親水性が高いほど低くなる傾向がある [45]。TCA はタウリン抱合型であるため親水性胆汁酸に分類されるが、さらに親水性の高い tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) は神経保護作用を持つことが報告されている [46-48]。神経保護作用を持つ親水性胆汁酸として他に UDCA が挙げられる [49, 50]。したがって、トロンビン処置により TUDCA や UDCA の輸送能が亢進するならば、神経保護の目的に効果を示す可能性が考えられる。本研究において、TUDCA および UDCA の取り込み能は評価しなかったが、今後これらの取り込み能について検討が必要と考える。

第4節 SLC10A4 ノックダウンによる TE671 細胞胆汁酸輸送能への影響評価

第3節において示したトロンビン前処置による LCA および TCA の輸送量の増加に SLC10A4 が関与しているかを検証するために、TE671 細胞において RNAi を用いて SLC10A4 をノックダウンしてその LCA および TCA の輸送能への影響を調べた。

TE671 細胞を SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA (Invitrogen、Carlsbad、CA)、またネガティブコントロールには Stealth™ RNAi Negative Control Medium GC Duplex (Invitrogen、Carlsbad、CA)で処置して、未処置の TE671 細胞の SLC10A4 発現量と比較した。

3種類の SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA 処置群それぞれの SLC10A4 の発現はノックダウンされたことがイムノブロットおよび細胞を蛍光免疫染色により確認された (Figure 8A, 9, 10)。一方、ネガティブコントロール処置群においては SLC10A4 の発現量は未処置細胞に差が見られなかった (Figure 8A, 9, 10)。このノックダウン条件下で、300 nM の LCA について5分間の輸送実験を行ったところ、SLC10A4 をノックダウンした TE671 細胞においてトロンビン前処置による LCA の取り込み量の増加作用が消失した (Figure 8B)。ネガティブコントロールにおいては、RNAi 非処置の TE671 細胞同様にトロンビン前処置による LCA の取り込み量の増加が確認された (Figure 8B)。しかしながら、用いた SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA の単独での処置は SLC10A4 のノックダウン効果が十分ではないと判断したため、続いて、3種類の SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA を同時に処置し、そのときの取り込み量をより詳細に検討した。

その結果、SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA mix 処置群 (Figure 11A、

right lane) の SLC10A4 の発現は単独で用いた時より強力にノックダウンされたことがイムノブロットにより確認された。このノックダウン条件下で、輸送実験を行ったところ、SLC10A4 をノックダウンした TE671 細胞においてトロンビン前処置による LCA および TCA の取り込み量の増加作用が消失した (Figure 11D、11G)。ネガティブコントロールにおいては、RNAi 非処置の TE671 細胞同様にトロンビン前処置による LCA および TCA の取り込み量の増加が確認された (Figure 11C、11F)。

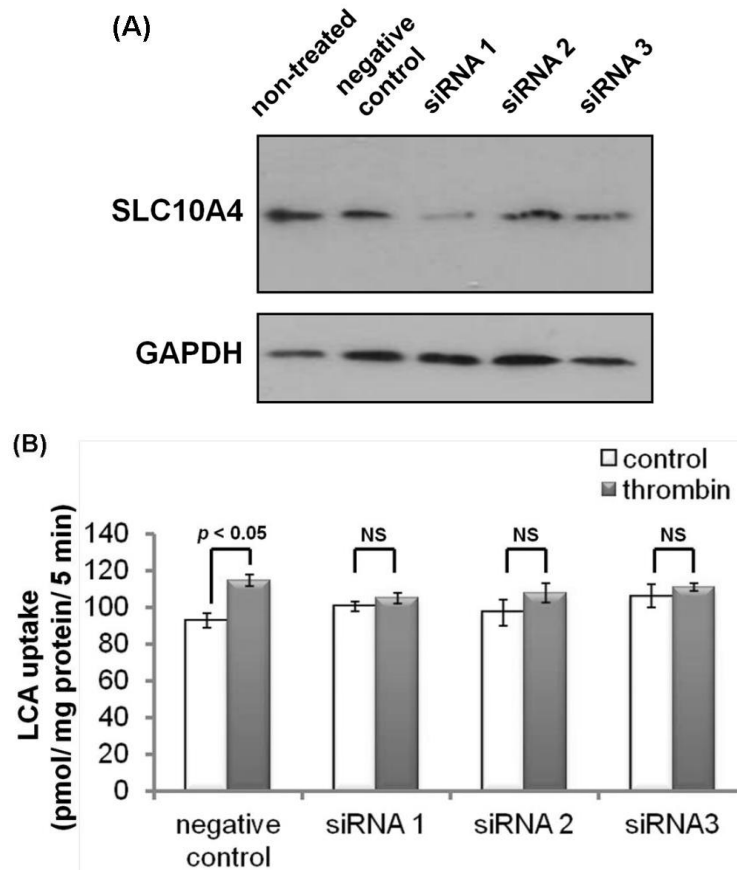


Figure .8. SLC10A4 knockdown experiments. Stealth RNAi SLC10A4 siRNA was used at 100 nM. Stealth™ RNAi Negative Control was used at 10 nM. Western blot analysis demonstrates that the SLC10A4 protein level of the

Stealth™ RNAi Negative Control treated cells is equal to that of non-treated cells, and that of the each of SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA treated cells is decreased (A). Transport analyses: LCA concentration was 300 nM (B). Values represent mean \pm SEM; n = 3 or 4. NS indicates nonsignificant.

Stealth RNAi で処置した細胞を蛍光免疫染色 (non-permeabilized) した結果を以下に示した (Figure 9、10)。

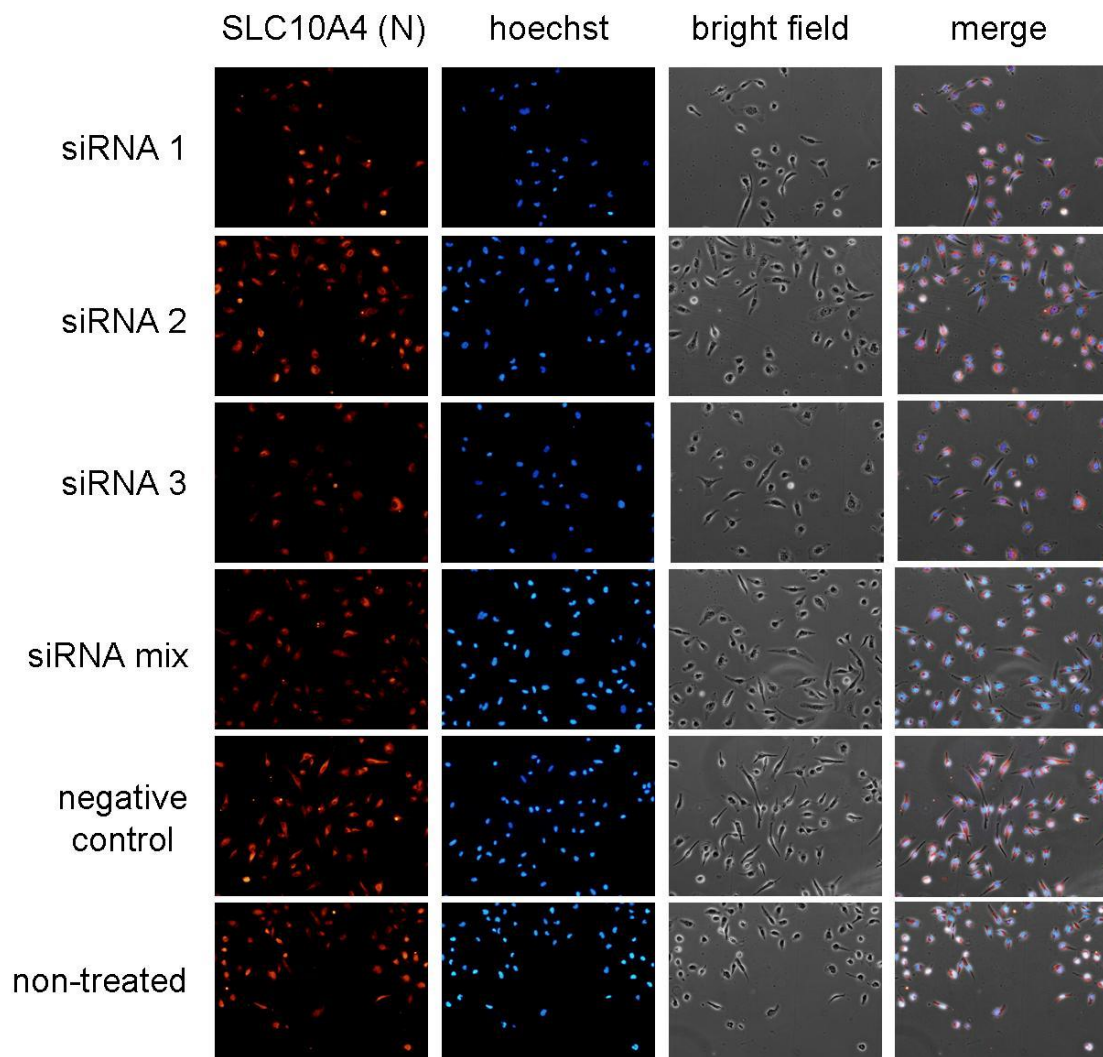


Figure 9. Distribution of SLC10A4 N-terminal. Cells were fixed by 4%

paraformaldehyde, then stained using anti-SLC10A4 N-terminal antibody.

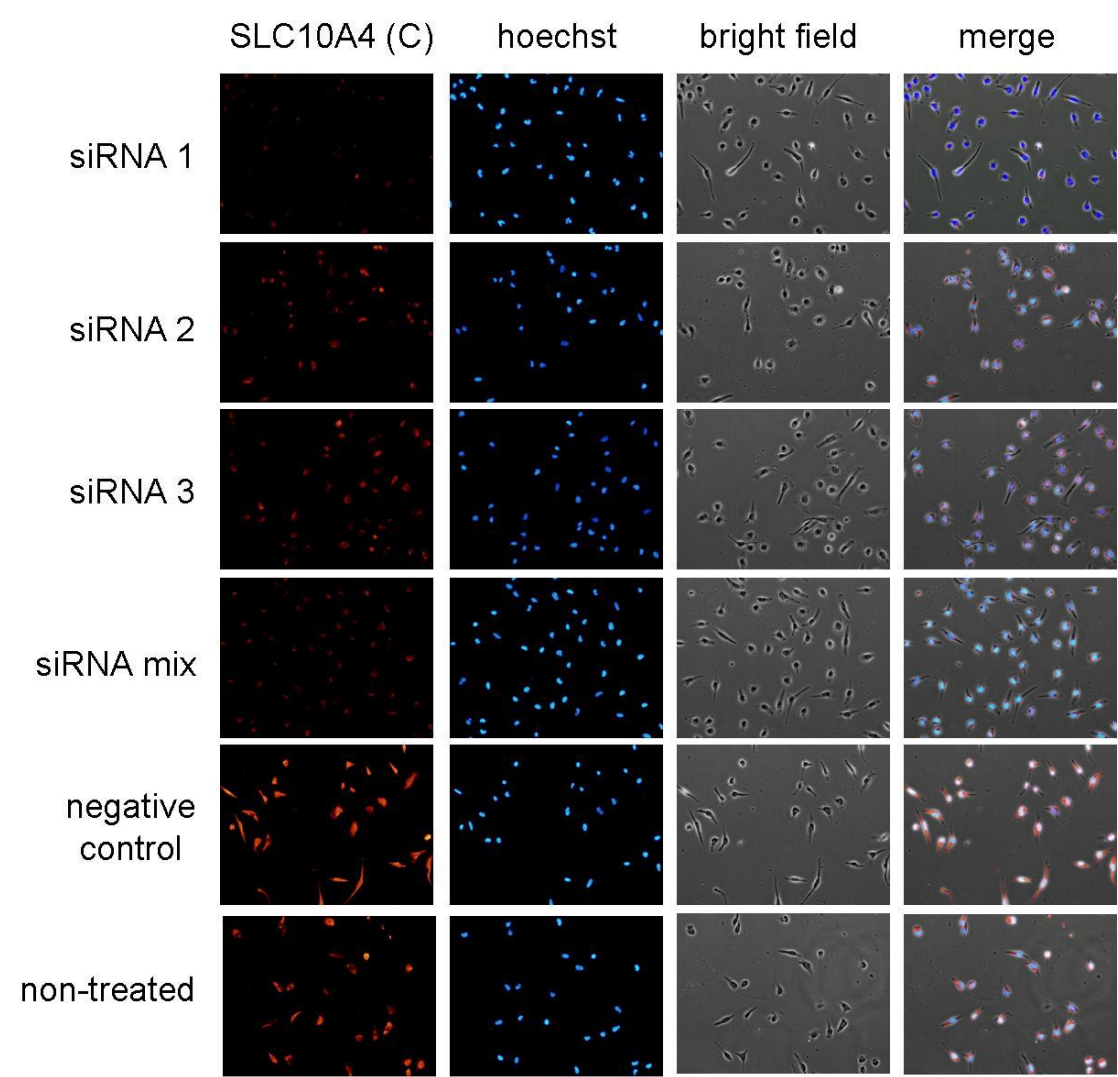
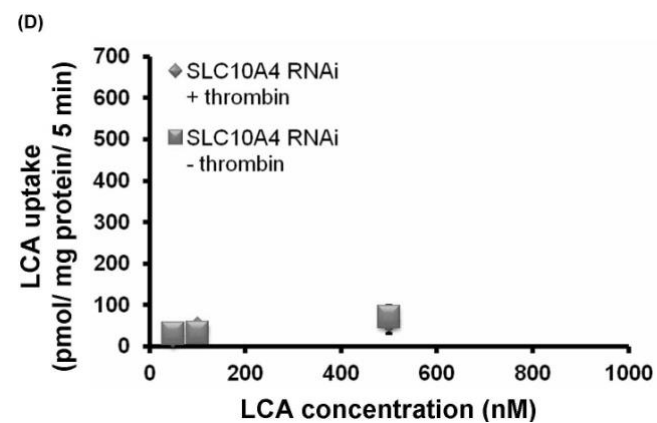
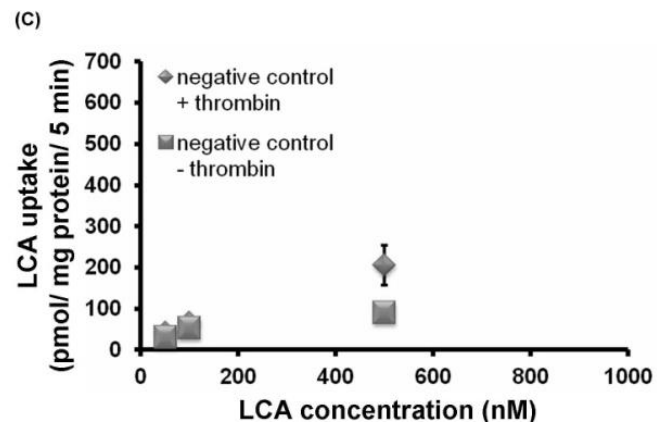
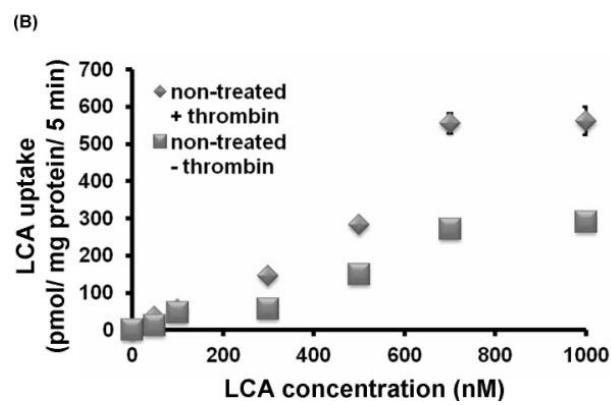
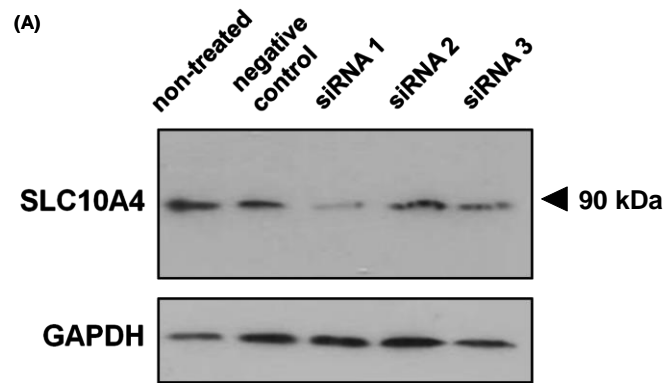


Figure 10. Distribution of SLC10A4 C-terminal. Cells were fixed by 4% paraformaldehyde, then stained using anti-SLC10A4 C-terminal antibody.



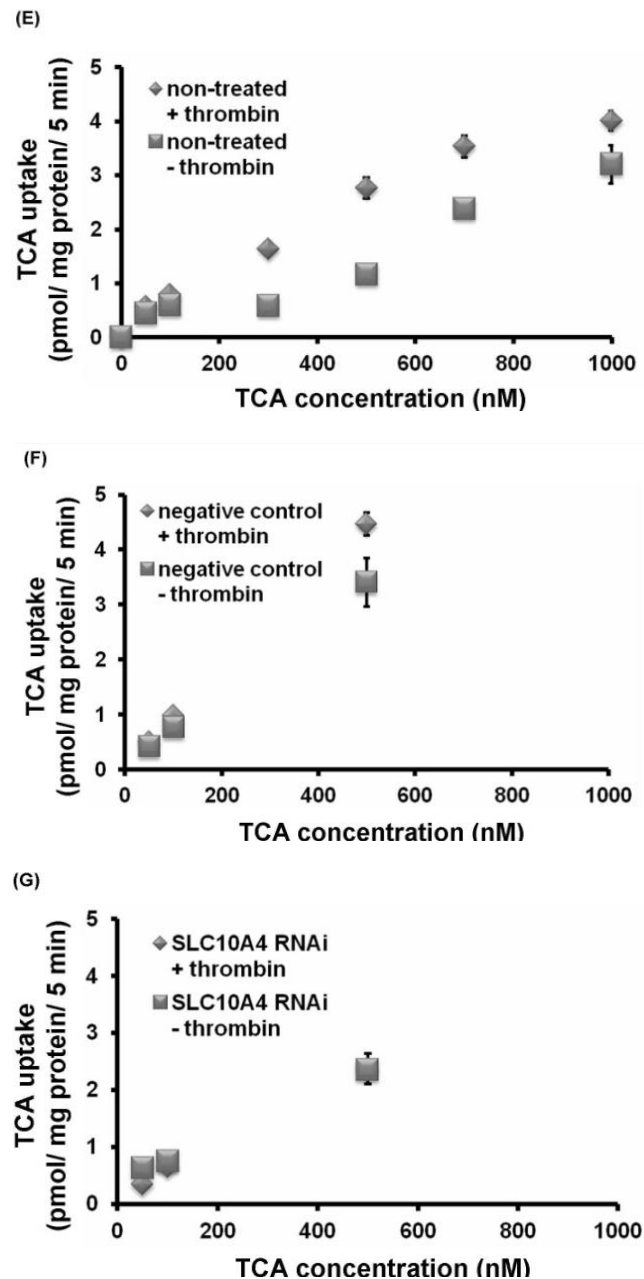


Figure 11. Effects of a mix of three Stealth RNAi SLC10A4 siRNAs on TE671 cells. Western blot analysis demonstrated that the SLC10A4 protein level of the Stealth™ RNAi Negative Control treated cells (center) was equal to that of non-treated cells (left), and that of the SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA treated cells (right) was decreased. 90-kDa is indicated by the arrows. All samples were not treated by thrombin. (A). Transport analyses: LCA uptake

(B-D). Non-treated indicates uptake by the RNAi non-treated cells (B). Negative control indicates uptake by the Stealth™ RNAi Negative Control treated cells (C). RNAi SLC10A4 indicates uptake by the SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA treated cells (D). TCA uptake (E-G). Non-treated indicates uptake by the RNAi non-treated cells (E). Negative control indicates uptake by the Stealth™ RNAi Negative Control treated cells (F). RNAi SLC10A4 indicates uptake by the SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA treated cells (G). Each point represents the mean of three or four experiments. Diamonds: control cells; circles: RNAi-treated cells. Values represent the mean \pm SEM; n = 3 or 4.

[考察]

TE671 細胞において SLC10A4 をノックダウンした場合に、トロンビン前処置による LCA および TCA の取り込み量の増加が認められなくなった事実から、SLC10A4 は通常は低活性型として存在しているが、トロンビンにより活性化されて胆汁酸トランスポーターとして働くことが示唆された。これは、したがって、本分子は **protease-activated transporter** である可能性が高いと考えられる。本研究により予測される SLC10A4 を介した基質輸送メカニズムは下記の通りである (Figure 12)。すなわち、SLC10A4 は通常 Figure 12 の右に示すように細胞外に露出する長い N 末端が基質の輸送を阻害していると推察されるが、トロンビン等のプロテアーゼにより N 末端が除去されると、SLC10A1、SLC10A2 および SLC10A6 と類似の構造となり、基質の輸送能を示すと考えられる。

LCA の取り込み量において、Figure .8(B)の、トロンビン前処置していない control 群と、Figure .7(C)の control 群との間で、異なる結果が得られた。これは、経代数の異なる細胞を用いたためと考えられる。RT-PCR による検討の結

果、TE671 細胞の胆汁酸トランスポーターの mRNA の発現量に、細胞の経代数による増減が認められた。これが、control 群における LCA の取り込み量に關与していたことが考えられる。これを回避するためには、経代数により、胆汁酸トランスポーターの発現量が変わらない細胞を用いた実験系を構築することが必要である。

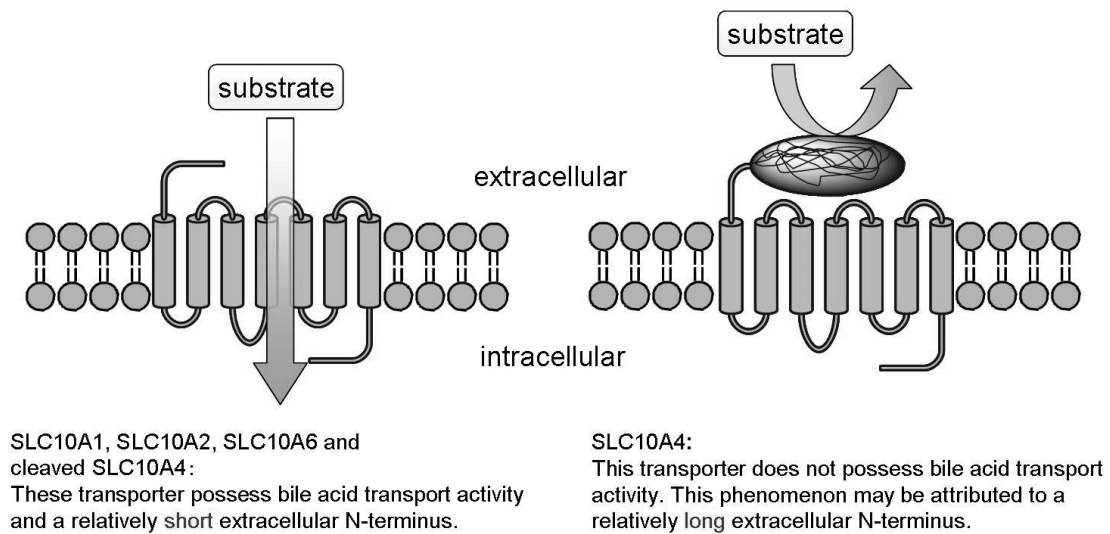


Figure 12. Schema of the predicted transport mechanism via the SLC10A4 transporter.

第 5 節 細胞毒性試験

TE671 細胞において、トロンビンにより活性化する LCA の取り込みは SLC10A4 により行われることを第 2-4 節で示した。SLC10A4 は脳に局在し、特にコリン作動性神経に高度に発現する [6]。一方、TE671 細胞は神経細胞様の特徴を持つ [11, 12]。したがって、TE671 細胞を使用することで神経細胞死に対する SLC10A4 の影響を推測することが可能であると考えられる。そこで、SLC10A4 の生理的な役割を探索するために、LCA のアポトーシス誘導作用を評価した。

TE671 細胞に対する LCA の細胞死誘導作用を MTT assay にて測定した (Figure 13)。LCA の細胞死誘導作用は 10–300 μM で認められ、トロンビンを前処置することにより細胞死誘導作用は増強した。

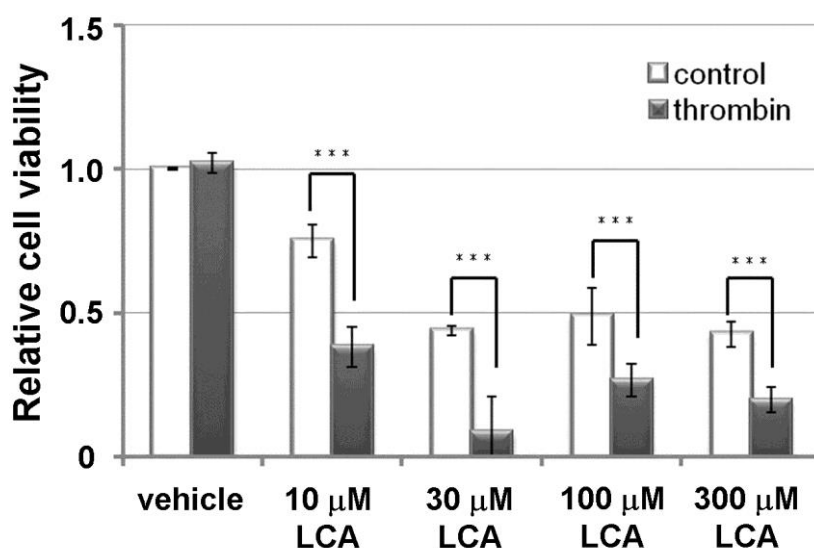


Figure 13. Cell viability assays. The relative susceptibilities of thrombin-treated

TE671 cells to LCA were examined by MTT assay. The relative viabilities are shown for LCA-treated cells relative to vehicle-treated control cells. The cells were treated with LCA or ethanol, as the vehicle for LCA, for 48 h. Open columns: control cells; gray columns: thrombin-treated cells. Each column represents the mean \pm S.D. of three experiments. The significance of differences from the control values were determined by ANOVA followed by Ryan's method. *** $p < 0.005$ thrombin vs. vehicle in thrombin.

[考察]

LCA はアポトーシス誘導活性を持ち、その活性は細胞内の **caspase-8** を活性化することに起因する [27]。トロンビン前処置群において LCA の細胞死誘導作用が増強されていたことからトロンビン前処置した TE671 細胞において LCA の取り込みは促進されていることが示唆される。また、TE671 細胞はアセチルコリン受容体およびアセチルコリンエステラーゼ等を発現していることから神経細胞様の特徴を持つことが知られている。そのため、TE671 細胞は認知症に関連するアミロイド β の研究や神経筋接合部の研究に使用されている [11, 12, 51, 52]。以上のことから、神経細胞モデルである TE671 細胞において、出血の際に活性化されるトロンビンで前処置することにより、SLC10A4 が活性化し、LCA の神経細胞死誘導作用が増強することが示唆された。また、実験的なクモ膜下出血後に認知機能および運動機能の低下が起こることが知られており、出血後にシンバスタチンを投与することによりこれらの機能低下を防止できることがラットで証明されている [53]。実験的な脳出血は、自己全血または、トロンビンを脳内に投与することで引き起こされる[54-57]。また、ヒトにおいてスタチンの長期投与によりパーキンソン病や認知症の罹患率が低下することが報

告されている [58]。認知機能、運動機能およびパーキンソン病にはコリン作動性神経が関与していることが報告されている [59-64]。このコリン作動性神経には **Slc10a4** が高度に発現していることが報告されている [6]。胆汁酸はコレステロール代謝物であるため、スタチン系薬剤の投与により胆汁酸組成に変化すること、スタチン系薬剤が **Slc10a4** の基質となるために **LCA** の取り込みを競合的に阻害する可能性も考えられる。このような所見から、脳出血後の神経変性疾患、特にコリン作動性神経に関連する領域において **SLC10A4** が密接に関与している可能性が提起される。これらの仮説を検証するためにモデル動物を用いた更なる研究が必要であると考えられる。

総括

SLC10A4 の構造解析のために、SLC10 ファミリーをアライメントした結果、SLC10A4 の第一膜貫通領域以前の N 末端が他の SLC10 ファミリータンパク質に比較して長いことが特徴付けられた。そこで、SLC10A4 の N 末端が基質の輸送に関与している可能性を検証し、本研究において、SLC10A4 の N 末端を除去すると基質輸送能が亢進することが示唆された。

即ちヒト小脳由来 TE671 細胞で SLC10A4 が発現していることを確認した。次に、イムノブロットおよび免疫蛍光染色法においてトロンビンにより SLC10A4 の N 末端が除去されていることを示した。

また、TE671 細胞を用いた基質の輸送実験では、LCA および TCA の輸送量がトロンビン前処置により増加したが、CDCA、DCA および E3S の輸送量には差は認められなかった。このことから、トロンビンにより促進される輸送は基質特異性を持つことが示され、基質輸送へのトランスポーターの関与が示唆された。また、LCA および TCA の輸送に対するミカエリス定数 K_m は、TCA を輸送する既知のトランスポーターの値より著しく低いことが示された。このことから、この輸送には既知のトランスポーターは関与していないと考えられた。

さらに、RNAi 法を用いて、TE671 細胞の SLC10A4 をノックダウンすると、トロンビン前処置による LCA および TCA の輸送量の増加が消失した。以上より、SLC10A4 は通常は基質輸送に対し低活性を示すが、トロンビン等のプロテアーゼにより N 末端を切断・除去されると高親和性の胆汁酸トランスポーターとなることが示唆された。すなわち、SLC10A4 は、初めてのプロテアーゼ活性化型トランスポーターである可能性が考えられた。SLC10A3 および SLC10A5 もオーファンタンパク質であるが、これらの N 末端も SLC10A4 同様長いこと

が予想されるため、**SLC10A3** および **SLC10A5** もプロテアーゼ活性化型トランスポーターとして働く可能性が考えられる。

MTT assay 法で **LCA** のアポトーシス誘導作用がトロンビン前処置により増加することを見出した。**TE671** 細胞は神経細胞様の特徴を持ち、**SLC10A4** はコリン作動性神経に高発現していることから、コリン作動性神経の変性疾患に **SLC10A4** が関与している可能性が考えられた。

本研究により、**SLC10A4** は細胞膜に発現し、**native** な状態では低活性であるが、トロンビン処置により、その **N** 末端を切断されて、高活性のトランスポーターとして機能し、**LCA** 等の生理活性物質を輸送することが示された。

試薬および実験方法

試薬

E3S、LCA、TCA および Thrombin は Sigma-Aldrich 社 (St Louis, MO, USA) より購入した。CDCA および DCA は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。 D_4 -LCA、 d_4 -CDCA および d_4 -DCA は CDN Isotopes 社 (Pointe-Claire, Quebec, Canada) より購入した。 D_4 -TCA は Medical Isotopes 社 (Pelham, AL, USA) より購入した。 $^{13}\text{C}_6$ -E3S は Cambridge Isotope Laboratories 社 (Andover, MA, USA) より購入した。

細胞培養

TE671 細胞は宮城大学食産業学部 教授 西川正純 先生より供与されたものを用いた。

100 mm dish (BD FALCON) に Growth medium を用いて、37 °C、5% CO₂-95% Air、飽和水蒸気圧下で行い、80-90 %コンフルエントで TrypLE Express (invitrogen) を用いて継代した。

Growth medium は、Pen-Strep Solution (invitrogen) (50 unit/mL penicillin、50 µg/mL streptomycin)、10 % 非働化 Fetal Calf Serum (FCS、MP Biomedicals Inc) を Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM、GIBCO) に加えて調製した。

イムノブロット

TE671 細胞を 8×10^5 cells/2 mL の濃度で 6 well plate に播腫し、24 時間後に Krebs-Henseleit buffer (118 mM NaCl、23.8 mM NaHCO₃、4.83 mM KCl、0.96 mM KH₂PO₄、1.20 mM MgSO₄、12.5 mM HEPES、10.0 mM glucose and 1.53 mM CaCl₂、adjusted to pH 7.4) で 2 度の洗浄後、4 U/800 μ L のトロンビンまたはその溶媒とした Krebs-Henseleit buffer で置換し、37 °C で 3 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、RIPA buffer (150 mM NaCl、25 mM Tris-HCl (pH 7.8)、5 mM EDTA、1% Nonidet P-40、0.5% (w/v) sodium deoxycholic acid、0.1% (w/v) SDS、および protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)) を用いて TE671 細胞のライセートを回収した。超音波ホモジナイザーにて、DNA を破壊し、ホモジナイズした。タンパク定量には BCA 法を用いた。調製したタンパク質 30 μ g/lane を 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に供した。泳動したタンパク質を PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜の Immobilon-P (MILLIPORE) にパワーサプライ (BIO-RAD) を用いて電圧 60 V、2 時間により転写した。その後、0.05% Tween20 / 5% スキムミルクで 37°C にて 3 時間振盪し、ブロッキングした。さらに 0.05% Tween-20 を含む 20 mM Tris-HCl、pH 7.4 (TBST) で 10 分間振盪を 3 回繰り返して洗浄した。一次抗体には 0.05% Tween20 / 5% スキムミルクで 1000 倍に希釈した rabbit polyclonal anti amino acids 324–436 of the SLC10A4 protein sequence (anti-SLC10A4 C-terminus antibody、Sigma-Aldrich) を使用し、4 °C にて振盪し、一晚インキュベートした。GAPDH の一次抗体には 0.05% Tween20 / 5% スキムミルクで 1000 倍に希釈した

rabbit monoclonal anti-GAPDH antibody (Cell Signaling Technology、Beverly、MA)を使用した。二次抗体には 0.05% Tween20 / 5% スkimミルクで 2000 倍に希釈した horseradish peroxidase-labeled mouse anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology)を用い、37°C にて 2 時間インキュベートした。TBST で 10 分間振盪を 3 回行って洗浄した後、基質として SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo scientific)を加え化学発光させ、X 線フィルム(FUJIFILM)を用いて検出した。

免疫蛍光染色

免疫蛍光染色は 8-well glass slide CC²™ treated (Lab-Tek®II CC²™ Chamber Slide™ System、154941、nunc)を用いて行った。TE671 細胞を 4×10⁴ cells/well/500 μL の濃度で播種し、24 時間後に細胞を Krebs-Henseleit buffer にて 2 度洗浄し、Krebs-Henseleit buffer に溶解した 1 U/200 μL の thrombin で 3 時間処置した。コントロールには thrombin の溶媒とした Krebs-Henseleit buffer を用いた。PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde in phosphate buffer を加え室温で 30 分間インキュベートした。PBS で 3 度の洗浄に続き、細胞膜に透過性を与えるために PBT (0.1% Triton X-100 in PBS)で 15 分間処置した。非透過性の細胞に対しては PBT での処置は行わなかった。PBS で 3 度の洗浄後、1% BSA (Sigma-Aldrich) in PBS で室温下 90 分間インキュベートし、ブロッキングした。PBS で 3 度の洗浄後、細胞に 1 次抗体として blocking solution に溶解した rabbit polyclonal anti amino acids 324–436 of the SLC10A4 protein sequence (anti-SLC10A4 C-terminus antibody、1:200 dilution、Sigma-Aldrich)、または rabbit

polyclonal anti amino acids 2–51 of the SLC10A4 protein sequence (anti-SLC10A4 N-terminus antibody, 1:200 dilution, Sigma-Aldrich) を加え 4 °C で 1 晩インキュベートした。翌日、細胞を PBS で 3 度の洗浄後、blocking solution に溶解した蛍光標識 2 次抗体 Alexa Fluor® 546 Goat Anti-rabbit IgG (1:500 dilution, Molecular Probes) で室温下 60 分間インキュベートした。核染色は Hoechst 33258 solution (1:2000 dilution, Dojindo, Japan) で行った。PBS で 3 度の洗浄後、細胞は Fluorescence Mounting Medium (Dako, Denmark) を用いて封入した。蛍光は Zeiss confocal laser-scanning microscope (LSM700) with X40 water-emergent objective を用いて行った。

輸送実験

LCA、TCA、CDCA、DCA および E3S の取り込みは 24-well plate を用いて行った。TE671 細胞を 2×10^5 cells/well/500 μ L で播種し、24 時間後に Krebs-Henseleit buffer で 2 度の洗浄後、細胞は Krebs-Henseleit buffer に溶解した 1 U/200 μ L of thrombin で 37°C で 3 時間インキュベートした。Krebs-Henseleit buffer で洗浄後、37°C で 10 分間プレインキュベートした。その後、buffer に基質を添加し取り込みを開始した。37°C で設定時間インキュベートした後、buffer を吸引除去し、氷冷 KH buffer にて 2 回洗浄した。続いて、500 μ L の ethanol を加えて、細胞に取り込まれた基質を抽出し [65-67]、それぞれの internal standards として stable isotope-labeled bile acids および $^{13}\text{C}_6$ -E3S を各 well に添加した。溶液を回収し測定まで -80°C で保存した。タンパク定量は BCA™ Protein Assay Kit (Pierce) を使用し、標品には BSA を用いた。

基質の定量

胆汁酸および E3S の定量は LC/MS/MS を用いて行った [68, 69]。サンプルを室温、減圧下乾固させ、残渣を 40 μ L の移動相にて溶解した。フィルターろ過後、10 μ L を LC/MS/MS にて測定した。TCA および E3S の定量は、electrospray ionization probe を付した TSQ Quantum Vantage (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) で行った。LCA、CDCA および DCA の定量は、atmospheric pressure chemical ionization probe を付した TSQ Quantum Vantage (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) で行った。カラムは Capcell Pak C18 MGII Column (5 μ m, 150 mm \times 1.5 mm i.d.; Shiseido, Tokyo, Japan)を用い、40°C で使用した。TCA 分析の移動相は formic acid/water/acetonitrile (0.1:60:40, v/v/v)、LCA 分析の移動相は 20 mM ammonium acetate in water/acetonitrile (40:60, v/v)、E3S、CDCA および DCA 分析の移動相は 20 mM ammonium acetate in water/acetonitrile (65:35, v/v)とした。流速は 200 μ L/min で Ultimate 3000 Pump (Dionex)を用いて行った。mass spectrometric conditions は Table I に示した。

Table I. Mass spectrometric conditions for quantification of bile acids and E3S.

	TCA	E3S	LCA	CDCA	DCA
Spray voltage (V)	- 2500	- 2500			
Discharge current (μ A)			- 4	- 4	- 4
S lens voltage (V)	236	143	190	154	154

S lens voltage for IS (V)	236	159	194	157	157
Collision energy (V)	19	33	19	26	26
Collision energy for IS (V)	26	39	20	28	28
SRM	514.3 > 514.3	349.1 > 269.2	375.3 > 375.3	391.3 > 391.3	391.3 > 391.3
SRM for IS	518.3 > 518.3	355.1 > 275.2	379.3 > 379.3	395.3 > 395.3	395.3 > 395.3

ミカエリス定数 K_m および最大輸送速度 V_{max} の算出

トロンビンにより活性化された LCA および TCA 取り込みの速度式を算出するために、program R (R Development Core Team)を用い、それぞれのパラメーターをミカエリスメンテン式 $v = V_{max} \times s / (K_m + s)$ に当てはめて K_m および V_{max} を導出後、非線形回帰分析にて曲線にフィットさせた。

SLC10A4 のノックダウン実験

SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA (Invitrogen、Carlsbad、CA) を RNA 干渉 (RNAi)として用いた。TE671 細胞を 4×10^5 cells/mL の濃度で播種し、1 時間後に 100 nM Stealth RNAi で処置した。ネガティブコントロールには Stealth™ RNAi Negative Control Medium GC Duplex (Invitrogen、Carlsbad、CA)を 10 nM として用いた。Stealth RNAi は Lipofectamine™ RNAiMAX と混合後、細胞に処

置した。72 時間後、細胞を 4×10^5 cells/mL の濃度で播腫し、24 時間後にイムノブロットおよび輸送実験に用いた。SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNA の配列を Table II に示す。

Table II. Target sequences of the SLC10A4 Stealth Select RNAi™ siRNAs.

1: CATCATGACCATCTCCTCCACGCTT
2: TGGAAACAGGTAGTCAGAATGTGCA
3: CCGCAATTCATAGGAAGCATGTACA

細胞毒性試験

細胞生存数は MTT assay を用いて行った [70]。TE671 細胞を 4×10^4 cells/well の濃度で 96-well plate に播腫した。24 時間後に細胞を Krebs-Henseleit buffer で 2 度洗浄し、トロンビンを 0.2 U/40 μ L で Krebs-Henseleit buffer に溶解し 3 時間処置した。洗浄後、LCA を 10 μ M から 300 μ M として 48 時間処置した。コントロールには、LCA の溶媒として使用した ethanol を用い最終濃度 0.1% とした。LCA 処置から 48 時間後に、Krebs-Henseleit buffer に溶解した 5 mg/mL MTT (DOJINDO) を 20 μ L を各ウェルに添加し、4 時間後に培養液を除去し、100 μ L の DMSO を各ウェルに加え、5 分間振盪し生成したホルマザンを溶解した。ホルマザンの吸光度を micro plate reager にて 570 nm の吸光度を測定した。

謝辞

本研究に際し、御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野 教授 富岡佳久 先生に謹んで御礼申し上げます。

副査として御指導と御激励を賜り、また機器の提供を賜りました東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野 教授 青木淳賢 先生および東北大学大学院薬学研究科薬物療法学分野 准教授 山國徹 先生に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、有益な御助言、御指導を賜りました東北大学大学院薬学研究科薬物療法学分野 助教 川畑伊知郎 先生に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、有益な御助言、御指導を賜りました名古屋大学大学院医学研究科 医療薬学分野 特任講師 中島晶 先生に深く御礼申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、多大なる御指導、御協力を頂きました東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野 准教授 鈴木直人 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、TE671 細胞を快く御恵与下さった宮城大学食産業学部 教授 西川正純 先生に謹んで感謝致します。

研究テーマを御恵与下さった東北大学大学院薬学研究科 薬物療法学分野およびがん化学療法薬学分野 教授 故 菱沼隆則 先生に謹んで感謝致します。

引用文献

1. Tsuji, A., *[Biopharmaceutical studies on molecular mechanisms of membrane transport]*. Yakugaku Zasshi, 2002. **122**(12): p. 1037-58.
2. Nagai, J., *Transporter-mediated drug-drug interaction in renal and hepatic elimination processes*. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2010. **135**(1): p. 34-7.
3. Sugiyama, Y. and K. Maeda, *[Overview: molecular variation, specific tissue localization and genetic polymorphisms of drug transporters]*. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2005. **125**(4): p. 178-84.
4. Hediger, M.A., et al., *The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 465-8.
5. Geyer, J., T. Wilke, and E. Petzinger, *The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2006. **372**(6): p. 413-31.
6. Geyer, J., et al., *Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system*. Neuroscience, 2008. **152**(4): p. 990-1005.
7. Splinter, P.L., et al., *Cloning and expression of SLC10A4, a putative organic anion transport protein*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(42): p. 6797-805.
8. Jørgensen, J.R., et al., *Identification of novel genes regulated in the developing human ventral mesencephalon*. Exp Neurol, 2006. **198**(2): p. 427-37.
9. Zhou, Q., et al., *Identification of nigral dopaminergic neuron-enriched genes in adult rats*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(2): p. 313-26.
10. Mano, N., et al., *Presence of protein-bound unconjugated bile acids in the cytoplasmic fraction of rat brain*. J Lipid Res, 2004. **45**(2): p. 295-300.
11. Syapin, P.J., P.M. Salvaterra, and J.K. Engelhardt, *Neuronal-like features of TE671 cells: presence of a functional nicotinic cholinergic receptor*. Brain Res, 1982. **231**(2): p. 365-77.

12. Siegel, H.N. and R.J. Lukas, *Morphological and biochemical differentiation of the human medulloblastoma cell line TE671*. Brain Res Dev Brain Res, 1988. **44**(2): p. 269-80.
13. Blomback, B., et al., *Studies on Fibrinopeptides from Primates*. Acta Chemica Scandinavica, 1965. **19**(7): p. 1788-1789.
14. Sekiguchi, F., *[Development of agonists/antagonists for protease-activated receptors (PARs) and the possible therapeutic application to gastrointestinal diseases]*. Yakugaku Zasshi, 2005. **125**(6): p. 491-8.
15. Klaassen, C.D. and L.M. Aleksunes, *Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(1): p. 1-96.
16. Liu, Y.C., et al., *Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(28): p. 11332-7.
17. Wang, M., et al., *Schizophrenia, amphetamine-induced sensitized state and acute amphetamine exposure all show a common alteration: increased dopamine D2 receptor dimerization*. Mol Brain, 2010. **3**: p. 25.
18. Cossins, J., et al., *Diverse molecular mechanisms involved in AChR deficiency due to rapsyn mutations*. Brain, 2006. **129**(Pt 10): p. 2773-83.
19. Ishihara, H., *Protease Activated Receptors*. Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis, 2002. **13**(4): p. 311-318.
20. Kawabata, A., *[Physiological functions of protease-activated receptor-2]*. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2003. **121**(6): p. 411-20.
21. Hallén, S., et al., *Identification of a region of the ileal-type sodium/bile acid cotransporter interacting with a competitive bile acid transport inhibitor*. Biochemistry, 2002. **41**(50): p. 14916-24.
22. Lazaridis, K.N., et al., *Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 11092-7.
23. Perez, M.J. and O. Briz, *Bile-acid-induced cell injury and protection*.

- World J Gastroenterol, 2009. **15**(14): p. 1677-89.
24. Oshio, H., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates cyclooxygenase-2 gene transcription through bile acid transport in human colorectal cancer cell lines*. J Gastroenterol, 2008. **43**(7): p. 538-49.
 25. Takano, S., et al., *Early induction of rat colonic epithelial ornithine and S-adenosyl-L-methionine decarboxylase activities by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine or bile salts*. Cancer Res, 1981. **41**(2): p. 624-8.
 26. Khare, S., et al., *Ursodeoxycholic acid suppresses Cox-2 expression in colon cancer: roles of Ras, p38, and CCAAT/enhancer-binding protein*. Nutr Cancer, 2008. **60**(3): p. 389-400.
 27. Goldberg, A.A., et al., *Lithocholic bile acid selectively kills neuroblastoma cells, while sparing normal neuronal cells*. Oncotarget, 2011. **2**(10): p. 761-82.
 28. Terano, A., et al., *Prostaglandin protects against taurocholate-induced damage to rat gastric mucosal cell culture*. Gastroenterology, 1987. **92**(3): p. 669-77.
 29. Ota, S., et al., *Arachidonic acid does not protect against sodium taurocholate damage to rat gastric epithelial cell cultures*. Gastroenterol Jpn, 1987. **22**(3): p. 285-91.
 30. Glaser, S., et al., *Taurocholic acid prevents biliary damage induced by hepatic artery ligation in cholestatic rats*. Dig Liver Dis, 2010. **42**(10): p. 709-17.
 31. Ueno, Y., et al., *Taurocholic acid feeding prevents tumor necrosis factor-alpha-induced damage of cholangiocytes by a PI3K-mediated pathway*. Exp Biol Med (Maywood), 2007. **232**(7): p. 942-9.
 32. Nozawa, T., et al., *Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(2): p. 438-45.
 33. Byrne, J.A., et al., *The human bile salt export pump: characterization of*

- substrate specificity and identification of inhibitors.* Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1649-58.
34. Zhang, D.W., et al., *Characterization of the role of polar amino acid residues within predicted transmembrane helix 17 in determining the substrate specificity of multidrug resistance protein 3.* Biochemistry, 2003. **42**(33): p. 9989-10000.
 35. Hagenbuch, B. and P.J. Meier, *Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter.* J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1326-31.
 36. Kullak-Ublick, G.A., et al., *Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas.* Gastroenterology, 1997. **113**(4): p. 1295-305.
 37. Kullak-Ublick, G.A., et al., *Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver.* Gastroenterology, 1995. **109**(4): p. 1274-82.
 38. Kullak-Ublick, G.A., U. Beuers, and G. Paumgartner, *Molecular and functional characterization of bile acid transport in human hepatoblastoma HepG2 cells.* Hepatology, 1996. **23**(5): p. 1053-60.
 39. Cui, Y., et al., *Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6.* J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 9626-30.
 40. Hsiang, B., et al., *A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters.* J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 37161-8.
 41. Abe, T., et al., *LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers.* Gastroenterology, 2001. **120**(7): p. 1689-99.
 42. Fujiwara, K., et al., *Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner.*

- Endocrinology, 2001. **142**(5): p. 2005-12.
43. Bentayeb, K., et al., *Determination of bile acids in human serum by on-line restricted access material-ultra high-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **869**(1-2): p. 1-8.
 44. Trottier, J., et al., *Profile of serum bile acids in noncholestatic volunteers: gender-related differences in response to fenofibrate*. Clin Pharmacol Ther, 2011. **90**(2): p. 279-86.
 45. Hofmann, A.F. and L.R. Hagey, *Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(16): p. 2461-83.
 46. Monte, M.J., et al., *Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(7): p. 804-16.
 47. Rodrigues, C.M., et al., *Tauroursodeoxycholic acid reduces apoptosis and protects against neurological injury after acute hemorrhagic stroke in rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 6087-92.
 48. Solá, S., et al., *Tauroursodeoxycholic acid prevents amyloid-beta peptide-induced neuronal death via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling pathway*. Mol Med, 2003. **9**(9-12): p. 226-34.
 49. Park, I.H., M.K. Kim, and S.U. Kim, *Ursodeoxycholic acid prevents apoptosis of mouse sensory neurons induced by cisplatin by reducing P53 accumulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(4): p. 1025-30.
 50. Silva, R.F., C.M. Rodrigues, and D. Brites, *Bilirubin-induced apoptosis in cultured rat neural cells is aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by ursodeoxycholic acid*. J Hepatol, 2001. **34**(3): p. 402-8.
 51. Kim, J.K., et al., *GD3 accumulation in cell surface lipid rafts prior to mitochondrial targeting contributes to amyloid- β -induced apoptosis*. J Korean Med Sci, 2010. **25**(10): p. 1492-8.
 52. Liu, C.N. and C.J. Somps, *Telithromycin blocks neuromuscular*

- transmission and inhibits nAChR currents in vitro*. Toxicol Lett, 2010. **194**(3): p. 66-9.
53. Takata, K., et al., *Simvastatin treatment duration and cognitive preservation in experimental subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg Anesthesiol, 2009. **21**(4): p. 326-33.
 54. Takata, K., et al., *Long-term cognitive dysfunction following experimental subarachnoid hemorrhage: new perspectives*. Exp Neurol, 2008. **213**(2): p. 336-44.
 55. Hua, Y., et al., *Brain injury after intracerebral hemorrhage: the role of thrombin and iron*. Stroke, 2007. **38**(2 Suppl): p. 759-62.
 56. Xi, G., G. Reiser, and R.F. Keep, *The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective?* J Neurochem, 2003. **84**(1): p. 3-9.
 57. Xi, G., et al., *Attenuation of thrombin-induced brain edema by cerebral thrombin preconditioning*. Stroke, 1999. **30**(6): p. 1247-55.
 58. Wolozin, B., et al., *Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease*. BMC Med, 2007. **5**: p. 20.
 59. Murata, M., *[The development of therapeutic agents for Parkinson's disease and problems in their clinical application]*. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2008. **131**(4): p. 281-4.
 60. Yamanishi, Y., M. Ueno, and H. Ogura, *Basic research for Alzheimer's disease drugs*. Nihon Yakurigaku Zasshi, 2007. **130**(6): p. 489-93.
 61. Bohnen, N.I. and R.L. Albin, *The cholinergic system and Parkinson disease*. Behav Brain Res, 2011. **221**(2): p. 564-73.
 62. Kobayashi, Y. and T. Isa, *Sensory-motor gating and cognitive control by the brainstem cholinergic system*. Neural Netw, 2002. **15**(4-6): p. 731-41.
 63. Isa, T. and Y. Saito, *The direct visuo-motor pathway in mammalian superior colliculus; novel perspective on the interlaminar connection*. Neurosci Res, 2001. **41**(2): p. 107-13.
 64. Lindsay, R.M., *Trophic protection of motor neurons: clinical potential in motor neuron diseases*. J Neurol, 1994. **242**(1 Suppl 1): p. S8-11.

65. Rust, C., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling modulates taurochenodeoxycholic acid-induced liver injury and cholestasis in perfused rat livers*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(1): p. G88-94.
66. Lee, Y.K., et al., *Liver receptor homolog-1 regulates bile acid homeostasis but is not essential for feedback regulation of bile acid synthesis*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(6): p. 1345-56.
67. Petrovic, V. and M. Piquette-Miller, *Impact of polyinosinic/polycytidylic acid on placental and hepatobiliary drug transporters in pregnant rats*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(10): p. 1760-6.
68. Ando, M., et al., *High sensitive analysis of rat serum bile acids by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal, 2006. **40**(5): p. 1179-86.
69. Hosogi, J., et al., *LC-MS/MS coupled with immunoaffinity extraction for determination of estrone, 17beta-estradiol and estrone 3-sulfate in human plasma*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010. **878**(2): p. 222-7.
70. Liu, H., et al., *Mechanism of apoptotic effects induced selectively by ursodeoxycholic acid on human hepatoma cell lines*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(11): p. 1652-8.

発表論文リスト

1. Journal of biochemistry 2013 Jul;154(1):93-101. Epub 2013 Apr 14.

SLC10A4 is a protease-activated transporter that transports bile acids.