

Title	トランスポーターを標的とした有機酸代謝異常治療戦略の開発
Sub Title	Development of a therapeutic strategy for organic acidemia by targeting at membrane transport systems
Author	野口, 幸希(Noguchi, Saki)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>有機酸代謝異常によって生成・蓄積する有機酸は尿中に排出される。グルタル酸や3-ヒドロキシグルタル酸は近位尿細管で分泌を受ける。さらに、メチルマロン酸は近位尿細管で腎毒性を示すことが報告される。近位尿細管に発現するトランスポーターによる有機酸の基質認識を評価するため、まず、近位尿細管上皮の基底（血液側）膜に発現し、有機アニオン系薬物の尿中排泄を担うOAT1/3について、tetracycline誘導性遺伝子発現(Tet-On)細胞株を樹立した。OAT1又はOAT3遺伝子を導入したHEK293細胞から、tetracycline添加によってOAT1又はOAT3タンパク質発現及びp-アミノ馬尿酸又はエストロン硫酸の取り込みが上昇した株を選択した。また、尿細管上皮の頂端（管腔側）膜に発現するOAT4は、基質を取り込み方向にも排出方向にも輸送する。OAT4を介した基質認識及び輸送の方向を検討するため、プロテオリポソームによる評価系構築を試みた。OAT4をリポソーム膜に発現させたところ、OAT4タンパク質の発現及び脂質の小胞化を示すことができた。しかし、OAT4基質であるエストロン硫酸、DHEA硫酸、及びolmesartanのリポソーム内への取り込みは、交換輸送の駆動力となるイオン勾配の有無にかかわらず示されなかった。一方、OAT4による経細胞輸送の評価系は構築できた。OAT4を導入したTet-On型MDCK細胞を単層培養し、tetracycline添加によってOAT4発現を誘導したところ、ヒト尿細管と同様に頂端膜に発現が示された。さらにOAT4発現誘導により、OAT4によって取り込み及び排出の両方向に運ばれるolmesartanの移行は、基底膜側から頂端膜側及び頂端膜側から基底膜側の両方向で上昇した。一方、OAT4によって細胞内への取り込み輸送のみが示されるDHEA硫酸については、OAT4発現によって頂端膜側から基底膜側への移行が基底膜側から頂端膜側への移行よりも顕著に上昇した。これらより、有機酸の輸送評価が可能な細胞系が構築できたと判断した。</p> <p>Organic acidemia is characterized by increased excretion of unusual organic acids in the urine. Of them, for example, glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid are actively secreted in the urine. Moreover, methylmalonic acid exerts renal toxicity in the proximal tubules. Therefore, to evaluate the substrate recognition of the organic acids by organic anion transporters in renal proximal tubules, we firstly established tetracycline inducible OAT1/3 overexpressing cell lines. OAT1 and OAT3 are responsible for the renal secretion of various drugs by basolateral uptake at the blood facing membrane. We selected clones that exhibited tetracycline inducible expression of OAT1 or OAT3 protein and increase of p-aminohippurate or estrone sulfate uptake, respectively. Besides OAT1 and OAT3, OAT4 a bidirectional organic anion transporter is localized at the lumen facing apical membrane of human proximal tubules. To examine the substrate recognition and transport direction of organic acids by OAT4, we tried to construct an experimental system using proteoliposome. Association of OAT4 protein with the liposomal membrane was detected by western blotting. In addition, a dynamic light scattering method revealed that the OAT4 expressing liposome appeared to be present as a liposomal vesicle. However, OAT4-mediated vesicular uptake of OAT4 substrates (estrone sulfate, DHEA-sulfate and olmesartan) were not detected even in the presence of ion gradient of exchangers for the counter-transport. Meanwhile, we successfully established tetracycline inducible OAT4 expressing MDCK cell line to evaluate the transcellular transport. The introduced OAT4 was mainly expressed at the apical membrane of canine kidney epithelial-derived MDCK cells monolayer as maintaining the polarity in the proximal tubules. Furthermore, transcellular transport of olmesartan, a bidirectional (influx and efflux) substrate of OAT4, was enhanced both apical-to-basal and basal-to-apical direction by OAT4 expression induction. On the other hand, transcellular transport of DHEA-sulfate was significantly higher in the apical-to-basal direction than in the basal-to-apical direction. These results are consistent with the previous results that OAT4 transports DHEA-sulfate only influx direction. Thus, we validated the development of optimal assay for OAT-mediated cellular transport of organic acids.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190275

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	薬学部	職名	助教	補助額	500（特B）千円
	氏名	野口 幸希	氏名（英語）	Saki Noguchi		
研究課題（日本語）						
トランスポーターを標的とした有機酸代謝異常治療戦略の開発						
研究課題（英訳）						
Development of a therapeutic strategy for organic acidemia by targeting at membrane transport systems						
1. 研究成果実績の概要						
<p>有機酸代謝異常によって生成・蓄積する有機酸は尿中に排出される。グルタル酸や 3-ヒドロキシグルタル酸は近位尿細管で分泌を受ける。さらに、メチルマロン酸は近位尿細管で腎毒性を示すことが報告される。近位尿細管に発現するトランスポーターによる有機酸の基質認識を評価するため、まず、近位尿細管上皮の基底（血液側）膜に発現し、有機アニオン系薬物の尿中排泄を担う OAT1/3 について、tetracycline 誘導性遺伝子発現(Tet-On)細胞株を樹立した。OAT1 又は OAT3 遺伝子を導入した HEK293 細胞から、tetracycline 添加によって OAT1 又は OAT3 タンパク質発現及び p-アミノ馬尿酸又はエストロン硫酸の取り込みが上昇した株を選択した。また、尿細管上皮の頂端（管腔側）膜に発現する OAT4 は、基質を取り込み方向にも排出方向にも輸送する。OAT4 を介した基質認識及び輸送の方向を検討するため、プロテオリポソームによる評価系構築を試みた。OAT4 をリポソーム膜に発現させたところ、OAT4 タンパク質の発現及び脂質の小胞化を示すことができた。しかし、OAT4 基質であるエストロン硫酸、DHEA 硫酸、及び olmesartan のリポソーム内への取り込みは、交換輸送の駆動力となるイオン勾配の有無にかかわらず示されなかった。一方、OAT4 による経細胞輸送の評価系は構築できた。OAT4 を導入した Tet-On 型 MDCK 細胞を単層培養し、tetracycline 添加によって OAT4 発現を誘導したところ、ヒト尿細管と同様に頂端膜に発現が示された。さらに OAT4 発現誘導により、OAT4 によって取り込み及び排出の両方向に運ばれる olmesartan の移行は、基底膜側から頂端膜側及び頂端膜側から基底膜側の両方向で上昇した。一方、OAT4 によって細胞内への取り込み輸送のみが示される DHEA 硫酸については、OAT4 発現によって頂端膜側から基底膜側への移行が基底膜側から頂端膜側への移行よりも顕著に上昇した。これらより、有機酸の輸送評価が可能な細胞系が構築できたと判断した。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>Organic acidemia is characterized by increased excretion of unusual organic acids in the urine. Of them, for example, glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid are actively secreted in the urine. Moreover, methylmalonic acid exerts renal toxicity in the proximal tubules. Therefore, to evaluate the substrate recognition of the organic acids by organic anion transporters in renal proximal tubules, we firstly established tetracycline inducible OAT1/3 overexpressing cell lines. OAT1 and OAT3 are responsible for the renal secretion of various drugs by basolateral uptake at the blood facing membrane. We selected clones that exhibited tetracycline inducible expression of OAT1 or OAT3 protein and increase of p-aminohippurate or estrone sulfate uptake, respectively. Besides OAT1 and OAT3, OAT4 a bidirectional organic anion transporter is localized at the lumen facing apical membrane of human proximal tubules. To examine the substrate recognition and transport direction of organic acids by OAT4, we tried to construct an experimental system using proteoliposome. Association of OAT4 protein with the liposomal membrane was detected by western blotting. In addition, a dynamic light scattering method revealed that the OAT4 expressing liposome appeared to be present as a liposomal vesicle. However, OAT4-mediated vesicular uptake of OAT4 substrates (estrone sulfate, DHEA-sulfate and olmesartan) were not detected even in the presence of ion gradient of exchangers for the counter-transport. Meanwhile, we successfully established tetracycline inducible OAT4 expressing MDCK cell line to evaluate the transcellular transport. The introduced OAT4 was mainly expressed at the apical membrane of canine kidney epithelial-derived MDCK cells monolayer as maintaining the polarity in the proximal tubules. Furthermore, transcellular transport of olmesartan, a bidirectional (influx and efflux) substrate of OAT4, was enhanced both apical-to-basal and basal-to-apical direction by OAT4 expression induction. On the other hand, transcellular transport of DHEA-sulfate was significantly higher in the apical-to-basal direction than in the basal-to-apical direction. These results are consistent with the previous results that OAT4 transports DHEA-sulfate only influx direction. Thus, we validated the development of optimal assay for OAT-mediated cellular transport of organic acids.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Saki Noguchi	The role of OAT4, a bidirectional organic anion transporter, on drug distribution and excretion in humans	3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceuticals	2019 年 7 月			
Saki Noguchi, Moeko Tobita, Hayumi Atsuta, Rika Kimura, Ayaka Fukumoto, Tomohiro Nishimura, and Masatoshi Tomi	SUBSTRATE RECOGNITION AND CHLORIDE ION DEPENDENT TRANSPORT OF ANGIOTHENSIN II RECEPTOR BLOCKERS BY OAT4	12TH INTERNATIONAL ISSX MEETING	2019 年 7 月			
舟橋和毅、野口幸希、西村友宏、登美育俊	OAT4/OAT3 発現 MDCK 細胞を介した olmesartan 経細胞輸送における OAT4 の役割	日本薬学会第 140 年会	2020 年 3 月			