

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域

(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) S1P 輸送体による細胞遊走制御機構の解明と輸送体を標的とした新しい創薬基盤技術の創出

(英語) Creation of a novel approach for drug development by elucidation of the regulation mechanism of cell migration with S1P transporters

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学産業科学研究所 准教授 西 毅

所属 役職 氏名： (英語) Tsuyoshi Nishi, Associate Professor, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

実施期間： 平成28年10月 1日 ～ 平成29年 3月 31日

分担研究 (日本語)

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

細胞間情報伝達物質であるスフィンゴシン1リン酸 (S1P) は、細胞内でスフィンゴシンがリン酸化されることにより生成し、細胞膜の輸送体によって細胞外へ放出されることで機能する。我々は血管内皮細胞に発現する S1P 輸送体として SPNS2 を同定し、この輸送体分子がリンパ球の血中へ

の移行を制御していることを明らかにしてきた。

本研究では S1P 輸送体分子を標的として細胞の遊走制御機構を明らかにするとともに新しい創薬基盤の確立を目指している。

本年度は以下の研究を進めた。

1、S1P 輸送体の活性の簡便な検出系の構築

S1P 輸送体の活性の測定には細胞内から細胞外へと移行した S1P 量を測定する必要がある。がしかし、S1P の定量には複雑な抽出ステップや特別な機器が必要であるため、創薬などのハイスループットの測定には適していない。そこで、簡便に通常の分光機器を用いて活性を測定する方法の開発を進めている。その中で S1P 分子に蛍光基が結合した NBD-S1P を用いることで赤血球における S1P 輸送活性を測定できる方法を見いだすことに成功した。赤血球に NBD-スフィンゴシンを添加すると細胞内に取り込まれて細胞内で NBD-S1P へと変換される。この細胞内の NBD-S1P は時間依存的に細胞外へ放出され、この輸送は S1P によって競合的に阻害される。細胞外には最初に添加した NBD-スフィンゴシンが存在するが時間とともに細胞内に取り込まれ、2 時間以上ではほとんどが NBD-S1P となることから、細胞外液をとって蛍光強度を測定するだけの単純な操作で赤血球の S1P 放出活性を測定できる。これらの結果は JLR 誌に報告した。この方法は赤血球の S1P 輸送体の阻害剤の探索に有益であると考えている。

しかし、NBD-S1P は同じ S1P 輸送体でも SPNS2 では輸送基質とはならなかった。このため SPNS2 に対しては新しく輸送基質になりうる S1P アナログの合成を進め、これまでに合成に成功した。このアナログが確かに SPNS2 によって輸送されることをこれまでに明らかにしており、この化合物を用いた簡便な測定系の構築を進めている。現在までにある特定の条件では輸送活性が測定できる濃度でこのアナログを検出できることを見出しているが、細胞を用いた簡便なアッセイ系の確立にはいたっておらず、条件の検討などを進めている。

2、赤血球における S1P 輸送体の同定

我々は生化学的な解析から赤血球に S1P 輸送体が存在することを示し、その分子の同定を目指して研究を進めてきた。その過程で S1P にクロスリンカーが結合した化合物を用いて赤血球膜から分子の同定を試みたところ、この分子とクロスリンクするタンパク質のスポットが 2 次元電気泳動でいくつか得られた。質量分析によってそのタンパク質を同定したところ、Bnad3 や CD36 などの赤血球で比較的メジャーに発現している分子であった。これらが S1P を輸送するかを我々の構築している細胞を用いた測定系で調べたが、いずれも単独での S1P 輸送活性を示さなかった。赤血球は核を持たないために、遺伝子操作などによる解析に向いていないため、我々は赤血球のモデル細胞で S1P 放出活性を持つ細胞を探索した。その中で、前駆細胞では S1P 放出活性を持たないが赤血球様の細胞に分化することで S1P 放出活性を示す細胞を同定することに成功した、この細胞を用いてマイクロアレイ解析によって候補遺伝子をいくつか絞り込み、その中の 1 つが単独で S1P 輸送活性を持つことを見出した。この細胞が赤血球における S1P 輸送体分子であると考えて解析を進めている。

Sphingosine 1-phosphate (S1P) is an intercellular signaling molecule that is produced inside the cells by phosphorylation of sphingosine and is exported outside the cells by its specific transporters. Previously we identified SPNS2 as a S1P transporter in the endothelial cells and demonstrated an essential role of SPNS2 in lymphocytes migration into blood from the thymus and secondary lymphoid organs.

In this experiment, we are trying to clarify the regulation of the cell migration with a comprehensive analysis of S1P transporters and establish a strategy to develop a novel transporter oriented drugs.

1) Development of convenient method to measure the S1P transport activity

Various methods were reported to determine the amount of S1P, However, these methods required multiple steps and specific equipment. For adaptation of S1P transport assay to high-throughput screening, it is required more rapid and easy to use method for determine the S1P transport activity.

Using the intact erythrocytes, we success to construct a rapid method for measuring the activity of the erythrocyte S1P transporter by using the fluorescent S1P analog NBD-S1P. This method does not require chromatography performed with HPLC, LC-MS/MS or TLC methods. Furthermore, S1P transporter activity can be detected by measuring the increase in fluorescence intensity in the extracellular buffer after two hour incubation with NBD-sphingosine without performing lipid extraction.

2) Identification of erythrocyte S1P transporter

So far, we demonstrated the presence of S1P transporter in erythrocyte and have been trying to determine the S1P transporter molecules. Using a S1P analogue which have photoactivatable crosslinker domain, we identified various crosslinked proteins, such as band 3 and CD36, with S1P analogues. However, these proteins have no S1P transport activity, when these proteins were expressed in CHO cells over-expressing Sphk1. We also searching the model cells that show S1P export activity and erythrocyte like properties. Recently we identified the model cells and candidate gene of S1P transporter in erythrocyte with microarray analysis.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 1件）

1. KOBAYAH I N. HISANO Y. OTSUKA M. YAMAGUCHI A. NISHI T. Fluorescence-based measurement of sphingosine 1-phosphate transport activity in erythrocyte. *J. Lipid Res.* 2016, **57**, 2088-2094.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) S1P 輸送体による細胞遊走制御機構の解明と輸送体を標的とした新しい創薬基盤技術の創出
(英語) Creation of a novel approach for drug development by elucidation of the regulation mechanism of cell migration with S1P transporters

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学産業科学研究所 准教授 西 毅
所属 役職 氏名： (英語) Tsuyoshi Nishi, Associate Professor, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

実施期間： 平成 28年10月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 脂溶性情報伝達物質 S1P 輸送の構造的基盤解明と構造情報を基にした阻害剤候補化合物の探索
開発課題名： (英語) Investigation of the structural basis for lipophilic signal transmitter S1P transport and inhibitor screening based on the crystal structure of S1P transporter.

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学産業科学研究所 特任准教授 中島良介
所属 役職 氏名： (英語) Ryosuke Nakashima, Specially Appointed Associate professor, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者： 大阪大学・産業科学研究所・西 毅 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域

(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation, “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名：(日本語) S1P 輸送体による細胞遊走制御機構の解明と輸送体を標的とした新しい創薬基盤技術の創出

(英語) Creation of a novel approach for drug development by elucidation of the regulation mechanism of cell migration with S1P transporters

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学産業科学研究所 准教授 西 毅

所属 役職 氏名：(英語) Tsuyoshi Nishi, Associate Professor, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

実施期間：平成 28年 10月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 分子ツールとしての Alkyne-Sph 誘導体および SPNS2 輸送機能阻害剤の合成

開発課題名：(英語) Synthesis of alkyne-Sph derivatives as molecular tools and exploratory study on inhibitors for SPNS2 transporter

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学産業科学研究所 教授 加藤修雄

所属 役職 氏名：(英語) Nobuo Kato, Professor, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者： 大阪大学・産業科学研究所・西 毅 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし