VNUT を標的とした 2 型糖尿病・NASH に対する創薬研究

蓮澤奈央,^{*,a} 辰島啓太,^b 徳渕里恵,^a 梶島正治,^a 野村政壽^a

VNUT Is a Therapeutic Target for Type 2 Diabetes and NASH

Nao Hasuzawa,^{*,a} Keita Tatsushima,^b Rie Tokubuchi,^a Masaharu Kabashima,^a and Masatoshi Nomura^a^aDivision of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Kurume University School of Medicine; 67 Asahi-machi, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan; and ^bDepartment of Endocrinology and Metabolism, Toranomon Hospital; 2-2-2 Toranomon, Minato-ku, Tokyo 105-8470, Japan.

(Received August 31, 2020)

ATP, used in cells as an energy currency, also acts as an extracellular signaling molecule. Studies of purinergic receptor subtypes have revealed that purinergic chemical transmission plays important roles in various cell types. The vesicular nucleotide transporter (VNUT), the ninth transporter in the SLC17 organic anion transporter family, is essential for vesicular ATP storage and its subsequent release. The VNUT is localized on the membrane of secretory vesicles and actively transports ATP into vesicles using an electrochemical gradient of protons supplied by vacuolar proton ATPase (V-ATPase) as a driving force. ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMPs), contributing to the persistence of chronic inflammation. Chronic inflammation induces systemic insulin resistance, which is the underlying pathology of type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), ranging from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). We previously demonstrated that ATP transported in insulin granules *via* the VNUT negatively regulates insulin secretion. We also found that hepatocytes release ATP in a VNUT-dependent manner, which elicits hepatic insulin resistance and inflammation. VNUT-knockout mice exhibited improved glucose tolerance and were resistant to the development of high fat diet-induced NAFLD. In this article, we summarize recent advances in our understanding of the mechanism of the VNUT, the development of inhibitors, and its pathological involvement in type 2 diabetes and NAFLD. The pharmacological inhibition of the VNUT may represent a potential therapeutic approach for the treatment of metabolic diseases.

Key words—vesicular nucleotide transporter; ATP; purinergic signaling; diabetes; non-alcoholic fatty liver disease

1. はじめに

ATP は細胞内において様々な反応にエネルギーを供給するエネルギー通貨として用いられる。他方で細胞外においては、ATP 及びその分解産物である ADP, AMP, アデノシン等は伝達物質として、プリンシグナルと呼ばれる細胞間情報伝達に係わる。1972 年に Burnstock によって ATP がシグナル伝達に係わるという仮説が提唱されて以来、アデノシン受容体である P1 受容体、イオンチャネル型 ATP 受容体である P2X 受容体、G タンパク結合型 ATP 受容体である P2Y 受容体が発見され、1990 年代ま

で多くの受容体サブタイプの解明が進んだ。¹⁾ その結果、ATP は神経細胞において神経伝達物質として利用されるのみならず、外分泌細胞、神経内分泌細胞、上皮細胞、分泌上皮細胞、炎症細胞、骨細胞、ケラチノサイトなど多くの細胞種において局所シグナル伝達を担っているということが明らかになった。

これに対して、細胞外 ATP の供給源は長い間、傷害された細胞や死細胞からの漏出と考えられており、ようやく今世紀に入ってから正常細胞からの生理的な ATP 分泌が知られるようになった。¹⁾ ATP の輸送体としてはアニオンチャネル・ヘミチャネル・ABC トランスポーター等が提唱され、その中でも細胞膜上の connexin や pannexin などのヘミチャネルが、機械的刺激などにより開口し細胞質の ATP が流出するという説が受け入れられるようになった。これに対して、ATP 小胞分泌は、以前よ

^a久留米大学医学部内科学講座内分泌代謝内科部門 (〒830-0011 福岡県久留米市旭町 67), ^b国家公務員共済組合連合会虎の門病院内分泌代謝科 (〒105-8470 東京都港区虎ノ門 2 丁目 2 番 2 号)

*e-mail: hasuzawa@med.kurume-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 140 年会シンポジウム S09 で発表した内容を中心に記述したものである。

り神経細胞のみならず、内分泌細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、アストロサイトなどで報告されていたが、そのメカニズムや機能は長い間不明のままであった。¹⁾

2000年代半ばに、筆者らの共同研究者である森山教授は、ヒトゲノム情報の中から solute carrier 17 (SLC17) 有機アニオントランスポーターファミリーに、基質のわかっていない9番目のメンバー SLC17A9 が存在することを発見した。²⁾ 続く研究により、SLC17A9 は脳と副腎に高発現し、ATP を基質とすることが明らかになり、このタンパク質は、小胞型ヌクレオチド・トランスポーター (vesicular nucleotide transporter; VNUT) と命名された。³⁾ これまでの研究で、VNUT は神経細胞、グリア細胞、副腎・膵臓等の神経内分泌細胞、外分泌細胞、膀胱上皮細胞、血小板、免疫細胞、上皮細胞等、様々な細胞において機能を果たしていることが分かった。⁴⁾ まさに、プリンシパルが働くあらゆる組織で、VNUT の関与が明らかになってきていると言っても過言ではないだろう。

VNUT の生理的機能と疾患との関連については既にいくつかの総説^{4,5)}があるため、ここではこれまであまり着目されてこなかった VNUT と代謝疾患、特にメタボリックシンドロームとの係わりを中心に、研究の現況と展望を概観することとしたい。メタボリックシンドロームは、内臓肥満・インスリン抵抗性を特徴とし、糖尿病・高血圧等あらゆる生活習慣病の発症リスクを上昇させる。その本質的病態はエネルギー過剰による代謝恒常性破綻と慢性炎症であるが、細胞内のエネルギー代謝の中核を担う ATP は、シグナル分子としてもメタボリックシンドロームの病理に深く関与している。ある研究者らは、細胞外 ATP は代謝異常と炎症をつなぐ“メタボロカイン”として働くと述べている。⁶⁾ 筆者らはこれまでに、VNUT 欠損マウス及び阻害薬を用いて、VNUT が糖尿病や脂肪肝等の代謝疾患において果たす役割の解明、そして VNUT を標的とした創薬に向けた研究を行ってきた。本稿では、VNUT の機能研究及び阻害薬開発の現況を概説し、さらに VNUT を標的としたメタボリックシンドロームに対する新たな治療法開発の試みを紹介する。

2. VNUT の機能

SLC17 ファミリーは、有機アニオンの輸送を行う9つのトランスポーターによって構成されている。9つのサブタイプは、SLC17A1-4 (尿酸)、SLC17A5 (アスパラギン酸)、SLC17A6-8 (グルタミン酸) そして SLC17A9 (ヌクレオチド) の4つに大別される (括弧内は主な輸送基質)。^{7,8)} SLC17A1-4 は腎臓や肝臓で有機アニオンの排出に係わり、その他のメンバーは小胞性の細胞間シグナル伝達に主に係わる。SLC17 ファミリーメンバーは膜電位を輸送の駆動力とする点で共通しており、伝達物質の小胞内取り込みに係わる SLC17A5-9 はすべて、液胞型プロトンポンプ (vacuolar proton ATPase; V-ATPase) が作り出す小胞内の正の膜電位差 (membrane potential difference; $\Delta\psi$) を輸送に利用している [Fig. 1 (A)]. Evans Blue, di-isothiocyanatostilbene disulfonic acid (DIDS), ケトン体は SLC17 ファミリーメンバーに対して共通する阻害作用を持つ。

さらに森山教授らは、精製したトランスポータータンパクをリボソームに組み込み、イオノフォア (バリノマイシン) を使って膜電位差を形成することで、V-ATPase を用いずに輸送を駆動するという構成的生化学の方法を開発し、トランスポーターの詳細な機能解析を可能にした。その結果、VNUT を含む SLC17 ファミリーメンバーはいずれも、基質輸送の駆動エネルギーによる制御とは別に、塩素イオンによるアロステリックな活性制御を受けていることが明らかになった [Fig. 1 (B)].^{9,10)} 結合部位は現在のところ不明であるが、Cl⁻ イオンがトランスポーターに結合することで立体構造に変化が起こり、トランスポーター活性のスイッチ on/off が行われると考えられている。ケトン体は、この Cl⁻ による活性制御スイッチと競合することでトランスポーター阻害作用を発揮する。すなわち、代表的なケトン体であるアセト酢酸 1 mM の添加により、VGLUT2 (SLC17A6) のグルタミン酸輸送に必要な Cl⁻ 濃度は、通常の数 mM から 100 mM 近くまで上昇するが、アセト酢酸の除去によりこの効果は速やかに消失する。⁹⁾ 同様の効果は他の SLC17 ファミリーメンバーにおいても認められるため、ケトン体はトランスポーターの塩素イオン依存性を可逆的に変化させる SLC17 ファミリーに共通のアロステ

Fig. 1. Basic Properties of the Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT)

(A) ATP is accumulated and stored in secretory vesicles through VNUT-mediated active transport, which uses an electrochemical gradient of protons supplied by vacuolar proton ATPase (V-ATPase) as a driving force. The released ATP and the hydrolyzed products, such as ADP, bind to purinoceptors, including ionotropic P2X receptors and metabotropic P2Y receptors. (B) In the purified and reconstituted system, an artificial membrane potential imposed by valinomycin induces VNUT-mediated nucleotide transport, which requires Cl^- in the millimolar range. Ketone bodies, including acetoacetate, inhibit VNUT activity by reducing its affinity for Cl^- , followed by impaired vesicular ATP release. (Color figure can be accessed in the online version.)

リック阻害剤であると考えられる。ケトン体は、絶食時、飢餓時、ケトン食摂取後、運動後、妊娠中などの生理的条件下で、主に肝細胞のミトコンドリアにおいて脂肪酸から合成され、血液循環を通して全身の臓器へと運ばれ、エネルギー源として利用される。¹¹⁾ ケトン体は血液脳関門を通過するため神経細胞やグリア細胞においても利用されるが、興味深いことに、ケトン体は抗てんかん作用を示し、さらにこの作用は炭水化物の摂取により急速に失われることが、以前より知られていた。そのメカニズムは長い間不明であったが、樹下らはアセト酢酸がVGLUTの活動を阻害することで、グルタミン酸神経伝達を抑制し、神経保護作用を発揮することを提唱した。⁹⁾ ケトン体によるトランスポーター活性の制御は、他のSLC17ファミリーメンバーにも共通しており、生体のエネルギー状態が各種小胞性シグナル伝達を直接制御するメカニズムとして注目に値する。

SLC17ファミリーの中で最後に同定されたVNUT (SLC17A9)は、様々な細胞の分泌小胞膜上に発現し、V-ATPaseによって作り出された H^+ イオンの濃度勾配による膜電位差を利用してATPを分泌小胞内に取り込む。⁴⁾ VNUTにより取り込まれた分泌小胞内のATP濃度は数十から数百mMに達し、高度に制御されたプリン作動性化学伝達を

担っている。その生理的機能を明らかにするため、筆者らはVNUT全身knock out (KO)マウスを作製し解析を行った。¹²⁾ 驚くべきことに、VNUTの広範な発現と機能にもかかわらず、VNUT KOマウスには生存、外見、体重、摂餌量、生殖等の一般的表現型、さらに酸素消費量、呼吸商、運動性、行動解析においても、野生型マウスとの差は認められなかった。しかしながら、さらに研究を進めることにより、VNUT KOマウスが、生活習慣病、炎症性疾患、慢性疼痛等に対する耐性を示すことが次第に明らかになってきた。^{12,13)}

生活習慣病との係わりについては、後述するため、ここでは炎症を例にとり、VNUTの生理的機能を紹介したい。細胞外ATPが免疫細胞における炎症応答を惹起することはよく知られている。¹⁴⁾ 傷害された細胞から放出されたATPは、多くのプリン受容体を表面に持つ炎症細胞に、“find-me signal”として認識され、炎症細胞の遊走、サイトカイン分泌、細胞死等を惹起する。ATPは壊死細胞などから非特異的に放出されるのみならず、免疫細胞からシグナル伝達物質としても放出され、オートクリンあるいはパラクリン機構によって炎症の進展を制御する。従来は、免疫細胞間のプリンシグナル伝達にもヘミチャネルを介した細胞内ATPの流出が主に関与すると考えられてきたが、最近の研究で

VNUT を介した小胞性 ATP 分泌が大きな役割を担っていることが明らかになってきている。LPS による刺激を加えると、ヒト単球細胞株の THP1 は ATP を分泌し、分泌された ATP は P2Y₁₁ 受容体を介して炎症性 M1 マクロファージへの分化を誘導する。¹⁵⁾ VNUT 阻害薬のクロドロン酸は、この ATP 分泌を完全に阻害することから、VNUT は単球・マクロファージにおけるプリングナルの開始に重要な役割を果たしていると考えられる。¹³⁾ 好中球においても、細胞外 ATP は P2Y₂ 受容体と A₃ アデノシン受容体を介して遊走を制御するが、好中球の分泌顆粒には VNUT が局在し、ATP 分泌を制御していることが報告された。¹⁶⁾ VNUT KO マウス由来の好中球では ATP 分泌がみられず、遊走能は低下していた。さらに、マウス T 細胞及びヒト T 細胞株 Jurkat 細胞も細胞内に ATP 含有小胞を持ち、VNUT 依存性に ATP を分泌する。¹⁷⁾ ATP 小胞分泌は T 細胞において、P2X₇, P2Y₆ 等の受容体を介して interleukin (IL)-2, IL-6, IL-17 等の炎症性サイトカイン産生を誘発し、Bafilomycin A1 による VNUT の阻害はこれらのサイトカイン分泌を著明に抑制した。

実際、カラゲニンを用いた *in vivo* マウス炎症モデルにおいて、VNUT KO マウスは後肢浮腫の軽減及びサイトカイン分泌の抑制を示した。¹³⁾ VNUT 阻害薬のクロドロン酸は、カラゲニン誘発性の後肢浮腫、血中 TNF- α 及び IL-6 の上昇を劇的に抑制し、その抗炎症効果は、通常用量のジクロフェナクよりも強く、プレドニゾロンと同等であった。¹³⁾

このように炎症細胞間シグナルにおいて、VNUT によるプリングナル伝達化学伝達の開始は重要な役割を果たしている。このほかにも、VNUT は神経内分泌細胞のホルモン分泌制御、味覚・痛覚・内臓痛等の知覚、神経-グリア細胞間相互作用・がん細胞の増殖など、幅広い生理的機能を果たしている。^{4,5)} その詳細についてここで述べることはできないが、VNUT KO マウスが明らかな一般的表現型異常を示さないことから示唆される通り、一般的に VNUT の機能低下よりも機能亢進が様々な疾患の病理に係わっているといえることができる。このため、細胞外 ATP の供給を直接的に制御する VNUT は、プリングナルを対象とする新たな創薬ターゲットとして期待される。

3. VNUT 阻害剤の開発

VNUT 阻害薬は大きく、SLC17 ファミリーに共通する阻害薬と、VNUT により特異的な阻害薬の 2 つに分けられる。前者には、Evans blue, DIDS, ケトン体が含まれ、後者にはクロドロン酸を始めとするビスホスホネート製剤、ATP/ADP 交換輸送体阻害作用を持つ配糖体の一種であるアトラクチル酸が含まれる。⁵⁾

現在のところわかっている、最も強力な VNUT 阻害薬はクロドロン酸である。^{13,18)} クロドロン酸は第一世代の窒素非含有ビスホスホネート製剤 (non-nitrogen bisphosphonates; NNBP) であり、骨粗鬆症を始めとする骨代謝疾患において約半世紀に渡って世界中で使用されてきた。クロドロン酸の骨代謝改善作用は、破骨細胞に対するアポトーシス誘導作用に基づく [Fig. 2(A)]。ビスホスホネート製剤はピロリン酸アナログとしてハイドロキシapatite に強い親和性を持ち、生体内では素早く骨表面に取り込まれる。骨組織を貪食する破骨細胞によって、クロドロン酸が細胞内に取り込まれると、さらに代謝を受けて非加水分解性 ATP 類似体 (AppCCl₂p, AMP とクロドロン酸のエステル体) になり、これがミトコンドリアの ATP/ADP 交換輸送体に対する阻害作用を持つために、エネルギークライシスが引き起こされ、結果的に破骨細胞のアポトーシスが誘導される。¹⁹⁾ AppCCl₂p の ATP/ADP 交換輸送体阻害作用は、IC₅₀ 約 50 μ M であり、生体内では骨組織に結合したクロドロン酸を大量に貪食する破骨細胞のみに特異的にアポトーシス誘導作用を発揮する。しかし、クロドロン酸をリポソーム内に内包化すると、マクロファージにも異物として認識されて貪食され、アポトーシス誘導作用を発揮する。²⁰⁾ このため、クロドロン酸内包リポソームはマクロファージ枯渇剤として動物実験に用いられている。

クロドロン酸が破骨細胞抑制効果のほかに、他のビスホスホネート製剤にはない抗炎症作用及び鎮痛作用を持つことは以前より知られていた²¹⁾ そのメカニズムは長らく不明であったが、2017 年加藤らは、クロドロン酸が VNUT を阻害することによって、抗炎症作用及び鎮痛作用を発揮することを見出した。¹³⁾ その作用機序は、上述の代謝物 AppCCl₂p を介した破骨細胞やマクロファージのアポトーシス

Fig. 2. Mode of Action of Clodronate

(A) Clodronate has a very high affinity for hydroxyapatite crystals and binds rapidly to bone at sites of active bone remodeling, where osteoclasts actively endocytose the degradation products of bone matrix bound to clodronate. Once incorporated intracellularly by osteoclasts, clodronate is metabolized to AMP-clodronate [AppCCl₂p: adenosine 5'-(β,γ-dichloromethylene) diphosphate], which inhibits the mitochondrial ATP/ADP exchanger and induces an energy crisis followed by cell apoptosis. (B) Clodronate inhibits the vesicular nucleotide transporter (VNUT) by a non-metabolite-dependent pathway. It may enter different cells through Na⁺-dependent uptake or endocytosis and binds to the allosteric anion binding sites of the VNUT to shift the Cl⁻ dependence to higher concentrations, followed by the inhibition of VNUT activity and impaired vesicular ATP release. (Color figure can be accessed in the online version.)

誘導とは全く異なる、クロドロン酸の VNUT に対する直接的作用である [Fig. 2(B)]. ATP トランスポーターの研究をこれまで困難なものにしていた理由の 1 つは、ATP が生体内において様々な反応に用いられ代謝を受けることであった。²⁾ 例えば小胞内 ATP の蓄積に必要な膜電位勾配も、小胞膜上の V-ATPase が ATP を分解することで作り出す。ATP とその分解酵素が豊富に存在する生細胞を用いて解析する限り、ATP の輸送の定量化や、クロドロン酸の VNUT への阻害機序（直接作用か、あるいは AMP との代謝物による作用か）を同定するのは困難である。しかし、森山教授らが開発した V-ATPase を用いずに VNUT の ATP 輸送を駆動する構成的生化学の方法により、クロドロン酸は膜電位差や、VNUT の ATP 結合能には影響を与えないこと、クロドロン酸が Cl⁻ と競合することで、強力に VNUT の ATP 輸送を阻害する (IC₅₀ = 15.6 nM) ことが明らかになった。¹³⁾ さらに、クロドロン酸を取り除くとこの阻害効果は速やかに消失し、ATP 輸送活性は完全に回復した。すなわちクロドロン酸は、ケトン体と同様に、VNUT の Cl⁻ イオン依存性を可逆的に変化させることで阻害作用を発揮する、アロステリック阻害薬であることがわかった。

クロドロン酸はこれまでに、神経細胞、ミクログリア、マクロファージ、好中球、消化管上皮細胞、線維芽細胞、シュワン細胞からの ATP 小胞分泌を抑制することが示されている。⁵⁾ 上述の通り、マクロファージ、好中球の ATP 小胞分泌の阻害により、クロドロン酸は強い抗炎症効果を持つ。また同時にクロドロン酸は炎症性疼痛、神経因性疼痛に対して鎮痛効果を持つが、これは末梢組織あるいはニューロンからの VNUT 依存性 ATP 分泌を阻害することにより、痛覚神経の自由終末に位置する P2X3 受容体等のプリン受容体シグナルを抑制することによって考えられている。他方でアストロサイトは、VNUT を高発現しているにもかかわらず、クロドロン酸を細胞内に取り込まないために、VNUT 阻害作用は発揮されない。¹³⁾ この例が示す通り、クロドロン酸の細胞内への取り込み機構の解明は、VNUT 阻害薬のドラッグデリバリーの観点から重要であるが、現在のところ不明な点が多く残っている。神経細胞においては、Na⁺ 依存性の取り込みが確認されている。¹³⁾ また、破骨細胞はエンドサイトーシスによりクロドロン酸を取り込むことがわかっているが、エンドソーム内に取り込まれたクロドロン酸がどのように細胞質内に放出されるのか

Fig. 3. Vesicular Nucleotide Transporter-knockout (VNUT KO) Mice Exhibit Improved Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity¹²⁾ (A) Oral glucose tolerance test. Serum glucose levels were determined at the indicated times after oral injection of glucose in wild-type (WT) and VNUT KO mice. (B) Serum glucose levels during the insulin tolerance test. (C) Following entry of glucose in pancreatic β cells, the activity of glycolysis and the tricarboxylic acid (TCA) cycle within the mitochondria increases, leading to ATP synthesis. Increased ATP/ADP ratio induces the closure of ATP-sensitive potassium channels and subsequent activation of voltage-gated calcium channels, followed by the release of insulin granules. The VNUT is localized at insulin-containing vesicles and accumulates ATP, which negatively regulates insulin secretion through the purinergic receptors. (Color figure can be accessed in the online version.)

は不明であった。最近 Yu らは、リソソーム上に位置する SLC37A3 がエンドソーム内から細胞質へのアレンドロン酸やゾレンドロン酸等のビスホスホネートの放出経路となっていることを報告しているが、²²⁾ 同様のメカニズムがクロドロン酸の細胞質への取り込みにも当てはまるのか否か、また破骨細胞やマクロファージ以外の細胞種でも機能しているのか、更なる研究が待たれる。

VNUT を標的とした創薬の試みにおいては、製剤のバイオアベイラビリティの向上も解決すべき課題の 1 つである。ビスホスホネート製剤は一般に、腸管吸収効率が低く、さらに生体内では素早く骨組織に分布する。腸管吸収効率や組織分布特性を変更するような製剤の開発が、クロドロン酸の VNUT 阻害薬としてのドラッグリポジショニング戦略として期待される。その他、トランスポーターの構造解析に基づく分子デザインによる阻害薬の開発も、期待される戦略の 1 つである。この点で、アトラクチロイドとクロドロン酸がいずれも、VNUT とミトコンドリア ATP/ADP 交換輸送体の両方に阻害作用を持つことは、これらに共通する結合部位構造

の存在を示唆しており、注目に値する。

4. VNUT と血糖制御

VNUT KO マウスは、体重・摂餌量・運動能等の一般的表現系においては野生型マウスとの差異を示さないが、空腹時血糖の低下、経口血糖負荷試験における血糖上昇の軽減、インスリン負荷試験における血糖低下幅の増加等、全体として耐糖能の改善、2 型糖尿病に対する耐性を示す [Figs. 3 (A) and (B)].¹²⁾

膵 β 細胞のインスリン顆粒には、インスリンとともに様々なシグナル伝達物質が貯蔵され、共分泌されることでインスリン分泌を修飾しているが、ATP 及び ADP もその 1 つとして知られていた。²³⁾ 細胞外に分泌された ATP は、複数の P2X 受容体と結合することでインスリン分泌を促進する一方で、P2Y1 受容体と結合すると、インスリン分泌を抑制するとの報告もある。さらに、ATP の分解産物であるアデノシンはアデノシン受容体を介してインスリン分泌を抑制する。これらの作用は複雑で、ATP は濃度などの条件によりインスリン分泌に対して促進作用・抑制作用の両方を持つと考えられて

きた。²³⁾

筆者らは2014年に、豚ランゲルハンス島の α 細胞及び β 細胞にVNUTの局在があること、さらにインスリン分泌顆粒上にVNUTが存在していることを明らかにした。¹²⁾野生型及びVNUT KOマウスの単離ラ氏島を高濃度グルコースで刺激すると、野生型ではATPの分泌がみられたが、KOマウスでは分泌がみられなかった。さらに、この条件下におけるインスリン分泌はKOマウスで野生型の約1.5倍に増加していた。0.1 mMのATPの添加は、野生型及びKOマウスの両方で高濃度グルコース刺激によるインスリン分泌を完全に抑制した。これらの結果より、インスリンとともにVNUT依存性に小胞分泌されるATPは、ネガティブフィードバックによりインスリン分泌を抑制することが明らかになった [Fig. 3(C)].¹²⁾

さらに、VNUT KOマウスは*in vivo*でインスリン感受性の亢進を示した。空腹時及び経口血糖負荷時の血中インスリン濃度は野生型と同等であったが、空腹時血糖及び経口血糖負荷後の血糖は有意に低下していた [Figs. 3(A) and (B)].¹²⁾ またインスリン負荷試験でも、VNUT KOマウスの血糖低下は野生型よりも有意に大きく、また肝組織のインスリン誘発性AKTリン酸化も増強していた。AKTリン酸化の増強はVNUT KOマウスの骨格筋にはみられなかった。すなわち、VNUTは主に肝臓におけるインスリン抵抗性の原因となっていると考えられる。¹²⁾ 実際肝細胞において、ATPによるP2Y₁₃受容体刺激はインスリンシグナルを阻害するとの報告がある。²⁴⁾

これらの結果を総合すると、VNUT依存性ATP小胞分泌は、様々なプリン受容体を介しながら、豚 β 細胞からのインスリン分泌を抑制し、肝臓におけるインスリン抵抗性を惹起すると考えられる。糖代謝におけるプリンシグナルの影響は複雑で、しばしば受容体サブタイプによって相反する作用を及ぼすが、筆者らの結果は、VNUT依存性ATP小胞分泌が2型糖尿病の2つの病態、すなわちインスリン分泌不全及びインスリン抵抗性を促進することを示唆している。実際、コントロール不良の2型糖尿病患者では、末梢血単核球のP2X₇受容体発現が増加し、さらにATP分解酵素であるCD39の発現とHbA_{1c}には相関がみられるという報告もあり、2

型糖尿病におけるプリンシグナルの亢進による慢性炎症とその代償性メカニズムの存在を示していると考えられる。²⁵⁾ つまり、VNUTの阻害は2型糖尿病に対して、プリンシグナルの過活性化を抑えることでインスリン分泌とインスリン感受性の両方を同時に改善する新たな治療戦略として期待される。

VNUT阻害薬の2型糖尿病に対する効果については更なる研究が必要であり、現在進行中である。筆者らはこの点で、VNUTを含むSLC17ファミリーがケトン体によってアロステリックに阻害されるという前述の事実に注目している。従来糖尿病治療においては、過剰なケトン体産生が引き起こす重篤な代謝性アシドーシスであるケトアシドーシスが注目され、ケトン体は臨床的に忌避すべきものと見なされてきた。しかし最近の研究で、ケトン体は抗炎症作用を持ち、心臓や肝臓に対して保護的な作用を持つことが明らかになってきた。¹¹⁾ 糖尿病治療薬のSGLT2阻害薬は、尿糖排泄の増加により血中のケトン体を増加させることが明らかになっているが、EMPA-REGトライアルで認められたSGLT2阻害薬による心血管死の抑制の機序として、ケトン体の増加が寄与している可能性も示唆されている。²⁶⁾ ケトン体の抗炎症作用や臓器保護作用は、ケトン体のグルコースに変わる効率のよいエネルギー源としての作用だけでなく、hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCA2) やGPR41等の受容体を介したシグナル分子としての作用が関与していると考えられている。これらの機序に加えて、ケトン体によるVNUTの阻害は、2型糖尿病におけるインスリン抵抗性や慢性炎症を抑制すると考えられ、VNUT阻害薬の2型糖尿病に対する効果とともに、今後解明すべき研究課題の1つである。

5. VNUTと脂肪肝炎

肝臓は、肝細胞を始め種々の間葉系細胞、胆管上皮細胞等が複雑な細胞間シグナル伝達を行う、全身の代謝恒常性の中枢機関である。これらの細胞はいずれもプリン受容体を発現しており、プリンシグナルは糖代謝、脂質代謝、炎症、腫瘍、免疫応答等の制御に深く関わっている。²⁷⁾ 肝臓において、メタボリックシンドロームは非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) という表現型をとる。NAFLDの存在は、インスリン抵抗性を悪化させ、2型糖尿病の発症リスク、心血管疾患

リスクを増加させる。²⁸⁾ さらに、NAFLDの一部は、進行性の炎症と線維化を伴い、肝硬変や肝がんの発生母地となる非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) を呈する。肝線維化の進行は、肝疾患関連死のみならず全死亡リスクを上昇させる。²⁹⁾ NAFLD 及び NASH の罹患率は上昇傾向にあり、公衆衛生上の大きな問題となっているが、食事療法以外の有効な確立された治療法がないのが現状である。

筆者らは、NAFLD 及び NASH に対して、VNUT が及ぼす効果に着目し研究を行っている。高脂肪食誘発性マウス NASH モデルにおいて、VNUT KO マウスでは炎症及び線維化が著明に抑制される。³⁰⁾ クロドロン酸の投与は、食餌性マウス NASH モデルにおいて、NAFLD activity score、炎症性サイトカイン発現、肝脂肪蓄積を抑制した。³¹⁾ これらの知見は、VNUT が肝臓においても、代謝恒常性破綻と炎症の治療標的である可能性を示している。

プリン受容体の中でも特に炎症に関与している P2X7 受容体の KO マウスは、アルコール性³²⁾ 及び食事性脂肪肝炎、³³⁾ さらにアセトアミノフェン誘発性肝障害³⁴⁾ に対して耐性を示す。さらに、アデノシンは肝線維化を促進することが知られており、アデノシン受容体に拮抗作用を持つカフェインの摂取は、肝線維化の進展と、肝疾患関連死を減少させる。³⁵⁾

また、肝臓は生体内におけるケトン体の供給を主に担っているが、ケトン体産生は NAFLD においても細胞保護的に働く。¹¹⁾ そのメカニズムには不明な点が多く残っているが、脂肪酸の供給が肝細胞におけるケトン体産生能を超えると、蓄積したアセチル CoA はクエン酸回路へと誘導され、酸化ストレスの増加により細胞傷害を惹起すると考えられている。¹¹⁾ インスリン抵抗性による高インスリン血症はケトン体産生を抑制し、ケトン体産生の低下は NAFLD を悪化させる。さらに、ケトン体がシグナル分子として、コラーゲン線維を産生する星細胞やクッパー細胞の活性化を制御する可能性も示唆されているが、ここにおいてもケトン体による VNUT を介したプリンシグナルの制御は重要な意義を持つと考えられる。メタボリックシンドロームは、インスリン抵抗性が脂肪酸の蓄積や酸化ストレスの亢進

を介して炎症を惹起し、炎症の存在はさらにインスリン抵抗性を引き起こすという悪循環が、その根本病態である。VNUT の障害は、この悪循環の 2 つの側面を標的とする新しい治療戦略としての可能性を持つと考えられる。

6. まとめ

本稿では、VNUT の生理的機能を、代謝と炎症の関連を中心に概観した。プリンシグナルが炎症において果たす役割については、多くの研究がなされてきたが、代謝との関連については未解明の点が多い。しかし、細胞内に豊富に存在し、そのエネルギー状態を規定している ATP は、ある細胞の代謝状態を他の細胞に直接的に伝達するための、最も原始的なツールの 1 つであると考えられる。実際、プリンシグナリングは植物から動物に至るまであらゆる生物種で広範に用いられており、³⁶⁾ VNUT もまた昆虫や線虫類を含む多くの動物種においてその相同分子種 (orthologue) を持つ。^{2,4)} VNUT の生理的及び病理的機能に関する研究はまだ発展途上にあるが、生体内の微視的環境において代謝状態をシグナルに直接変換するというユニークな機能を持つ VNUT を通して、メタボリックシンドロームの更なる病態解明と、それに基づく新しい治療的アプローチの確立を進めていきたいと考えている。

謝辞 本研究を推進するにあたり、終始ご指導とご支援を賜りました久留米大学客員教授森山芳則教授に深く御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Burnstock G., *Physiol. Rev.*, **87**, 659–797 (2007).
- 2) Moriyama Y., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **135**, 14–19 (2010).
- 3) Sawada K., Echigo N., Juge N., Miyaji T., Otsuka M., Omote H., Yamamoto A., Moriyama Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5683–5686 (2008).
- 4) Moriyama Y., Hiasa M., Sakamoto S., Omote H., Nomura M., *Purinergic Signal.*, **13**, 387–404 (2017).
- 5) Hasuzawa N., Moriyama S., Moriyama Y.,

- Nomura M., *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1862**, 183408 (2020).
- 6) Vaughn B. P., Robson S. C., Burnstock G., *J. Hepatol.*, **57**, 916–920 (2012).
- 7) Reimer R. J., *Mol. Aspects Med.*, **34**, 350–359 (2013).
- 8) Omote H., Miyaji T., Hiasa M., Juge N., Moriyama Y., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **56**, 385–402 (2016).
- 9) Juge N., Gray J. A., Omote H., Miyaji T., Inoue T., Hara C., Uneyama H., Edwards R. H., Nicoll R. A., Moriyama Y., *Neuron*, **68**, 99–112 (2010).
- 10) Omote H., Moriyama Y., *Physiology*, **28**, 39–50 (2013).
- 11) Puchalska P., Crawford P. A., *Cell Metab.*, **25**, 262–284 (2017).
- 12) Sakamoto S., Miyaji T., Hiasa M., Ichikawa R., Uematsu A., Iwatsuki K., Shibata A., Uneyama H., Takayanagi R., Yamamoto A., Omote H., Nomura M., Moriyama Y., *Sci. Rep.*, **4**, 6689 (2014).
- 13) Kato Y., Hiasa M., Ichikawa R., Hasuzawa N., Kadowaki A., Iwatsuki K., Shima K., Endo Y., Kitahara Y., Inoue T., Nomura M., Omote H., Moriyama Y., Miyaji T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E6297–E6305 (2017).
- 14) Junger W. G., *Nat. Rev., Immunol.*, **11**, 201–212 (2011).
- 15) Sakaki H., Tsukimoto M., Harada H., Moriyama Y., Kojima S., *PLoS One*, **8**, e59778 (2013).
- 16) Harada Y., Kato Y., Miyaji T., Omote H., Moriyama Y., Hiasa M., *J. Biol. Chem.*, **293**, 3770–3779 (2018).
- 17) Tokunaga A., Tsukimoto M., Harada H., Moriyama Y., Kojima S., *J. Biol. Chem.*, **285**, 17406–17416 (2010).
- 18) Moriyama Y., Nomura M., *Trends Pharmacol. Sci.*, **39**, 13–23 (2018).
- 19) Lehenkari P. P., Kellinsalmi M., Näpänkängas J. P., Ylitalo K. V., Mönkkönen J., Rogers M. J., Azharyev A., Kalervo Väänänen H., Hassinen I. E., *Mol. Pharmacol.*, **61**, 1255–1262 (2002).
- 20) Frith J. C., Mönkkönen J., Blackburn G. M., Russell R. G. G., Rogers M. J., *J. Bone Miner. Res.*, **12**, 1358–1367 (1997).
- 21) Frediani B., Bertoldi I., *Clin. Cases Miner. Bone Metab.*, **12**, 97–108 (2015).
- 22) Yu Z., Surface L. E., Park C. Y., Horlbeck M. A., Wyant G. A., Abu-Remaih M., Peterson T. R., Sabatini D. M., Weissman J. S., O’shea E. K., *eLife*, **7**, e36620 (2018).
- 23) Suckale J., Solimena M., *Trends Endocrinol. Metab.*, **21**, 599–609 (2010).
- 24) Chatterjee C., Sparks D. L., *PLoS One*, **7**, e36916 (2012).
- 25) García-Hernández M. H., Portales-Cervantes L., Cortez-Espinosa N., Vargas-Morales J. M., Fritche Salazar J. F., Rivera-López E., Rodríguez-Rivera J. G., Quezada-Calvillo R., Portales-Pérez D. P., *Cell. Immunol.*, **269**, 135–143 (2011).
- 26) Qiu H., Novikov A., Vallon V., *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, **33**, e2886 (2017).
- 27) Burnstock G., Vaughn B., Robson S. C., *Purinergic Signal.*, **10**, 51–70 (2014).
- 28) Targher G., Byrne C. D., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **98**, 483–495 (2013).
- 29) Dulai P. S., Singh S., Patel J., Soni M., Prokop L. J., Younossi Z., Sebastiani G., Ekstedt M., Hagstrom H., Nasr P., Stal P., Wong V. W. S., Kechagias S., Hultcrantz R., Loomba R., *Hepatology*, **65**, 1557–1565 (2017).
- 30) Tatsushima K., Hasuzawa N., Wang L., Hiasa M., Sakamoto S., Ashida K., Sudo N., Moriyama Y., Nomura M., *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1867**, 166013 (2021).
- 31) Hasuzawa N., Tatsushima K., Wang L., Kabashima M., Tokubuchi R., Nagayama A., Ashida K., Ogawa Y., Moriyama Y., Nomura M., *Sci. Rep.*, **11**, 5192 (2021).
- 32) Iracheta-Vellve A., Petrasek J., Satishchandran A., Gyongyosi B., Saha B., Kodys K., Fitzgerald K. A., Kurt-Jones E. A., Szabo G., *J. Hepatol.*, **63**, 1147–1155 (2015).
- 33) Blasetti Fantauzzi C., Menini S., Iacobini C., Rossi C., Santini E., Solini A., Pugliese G., *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 8962458 (2017).
- 34) Hoque R., Sohail M. A., Salhanick S., Malik A. F., Ghani A., Robson S. C., Mehal W. Z., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **302**, G1171–G1179 (2012).
- 35) Cronstein B. N., *J. Hepatol.*, **53**, 207–208

(2010).

- 36) Burnstock G., Verkhatsky A., *Acta Physiol.*,
195, 415–447 (2009).