

プロスタグランジン輸送体OATP2A1を介したPGE2 分泌と炎症への影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/48145

This work is licensed under a Creative Commons
Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0
International License.



氏 名	御勢 智香
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	医薬保博甲第89
学位授与の日付	平成29年3月22日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	プロスタグランジン輸送体 OATP2A1 を介した PGE2 分泌と炎症への影響
論 文 審 査 委 員	主査 玉井 郁巳
	副査 加藤 将夫
	副査 中島 美紀
	副査 檜井 栄一
	副査 中西 猛夫

学位論文要旨

【Abstract】

Prostaglandin E₂ (PGE₂) plays important roles in inflammation and immune responses. PGE₂ concentration near PGE receptors can be regulated by membrane transporters, including OATP2A1/SLCO2A1 with a high affinity to PGE₂. Although OATP2A1 has been characterized as an influx transporter expressed at the plasm membranes, our laboratory recently reported that OATP2A1 loads PGE₂ into intracellular acidic compartments in murine macrophages (Mφ), contributing to PGE₂ exocytosis. Therefore, the present thesis aimed to study physiological role of OATP2A1 in inflammation by measuring PGE₂ and orally administered eicosapentaenoic acid-derived PGE₃ in *Slco2a1*^{-/-} mice. PGE₃ transport studies demonstrated that PGE₃ is a new substrate of OATP2A1 with lower affinity than PGE₂. PGE₂ and PGE₃ were detected the most in the spleen of lipopolysaccharide (LPS)-treated mice. Moreover, the absence of *Slco2a1* lowered amount of the both PGEs significantly in the spleen, and caused splenomegaly in aged mice (46-80 weeks). Since a large amount of Mφ are contained in the spleen, effect of the absence of OATP2A1 function on intracellular disposition of PGE₂ in murine peritoneal Mφ and RAW264 cells was studied. *In vitro* studies suggested that PGE₂ secretion decreased, and PGE₂ metabolites increased under Oatp2a1-impaired conditions. Hence, OATP2A1-mediated PGE₂ transport in splenic Mφ may maintain PGE₂ signals and contribute the spleen's function under inflammatory conditions.

【背景・目的】

プロスタグランジ (PG) E₂ は、ω-6 系脂肪酸のアラキドン酸 (AA) から産生される生理活性脂質である。炎症性刺激により細胞内で cyclooxygenase-2 (COX-2) /PGE synthase (PGES) を介して産生された PGE₂ は、細胞外で PGE 受容体 (EP1-4) に作用することで炎症や免疫応答に関与し、この炎症や免疫応答のバランス制御の破綻は様々な疾患と関連する。PGE₂ 輸送体の中でも OATP2A1 は PGE₂ に対して高い親和性 (110 nM) を有し(1)、全身の組織に広く発現しており、特に PG の主要代謝臓器である肺に高い発現を示す(2)。細胞形質膜に発現する OATP2A1 は、PGE₂ を細胞内に取込むことで細胞内の代謝酵素 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) による PGE₂ の不活性化を促進する(3)。一方当研究室では、マクロファージ (Mφ) の細胞内コンパートメントに発現する OATP2A1 は炎症性刺激に応じた PGE₂ 分泌に関与することを示した(4)。したがって、PGE₂ の生理作用に対する OATP2A1 の生理的役割を解明するためには、細胞あるいは組織ごとに OATP2A1 の発現と PGE₂ 動態を関連付ける必要がある。

そこで、本研究では、炎症時 AA 由来 PGE₂ と同時に ω-3 系脂肪酸のエイコサペンタエン酸から産生される PGE₃ が抗 PGE₂ 作用を有することに着目し(5)、第一章において、生体内の PGE₂ および PGE₃ 分布や PGE₂ の作用における OATP2A1 の役割について検討した。さら

に、Mφが多く存在する脾臓において *Slco2a1*^{-/-}マウスの組織 PGE₂ および PGE₃ 量が野生型 (WT) マウスと比べて低下することを突き止めた。炎症反応により免疫系の細胞が活性化し、脾臓へ集積することで脾腫が起こる。一方で、PGE₂ 合成抑制は脾腫と関連することなどから(6)、脾臓において PGE₂ シグナルの低下は炎症反応の増悪による脾臓の肥大化に関わることが考えられた。Mφ から分泌される PGE₂ は炎症や免疫反応において重要な役割を果すことから(7)、第二章、第三章においては、脾臓における Mφ からの PGE₂ 分泌に寄与する OATP2A1 の生理的役割を検証した。

【方法】

OATP2A1、OATP1B1、OATP2B1、OAT1、OCT1 または OCT 2 遺伝子過剰発現 HEK293 細胞を用いて、PGE₃ の輸送活性を評価した。PGE₃ の前駆体であるエイコサペンタエン酸エチルエステル (EPA-E) を経口投与し、lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与することで炎症を誘発させた *Slco2a1*^{-/-}マウスと WT マウスから単離した組織 PG 類は LC-MS/MS により定量した。OATP2A1 過剰発現 HEK293 細胞を用いて、OATP2A1 を介した PGE₂ の取込みに対する PGE₃ の阻害試験を行い、IC₅₀ を算出した。Cox-2 と 15-Pgdh タンパク質発現は Western blotting により、Oat2a1 と Cox-2 mRNA 発現は qRT-PCR により定量した。脾臓における Oat2a1 および F4/80 (Mφ マーカー) 陽性細胞部位は免疫組織化学染色法により評価した。脾臓組織構造は HE 染色により評価した。*Slco2a1*^{-/-}マウスと WT マウスから単離した腹腔 Mφ およびマウス Mφ モデル RAW264 細胞を用いて PGE₂ 分泌および代謝試験を行い、細胞内外の PGE₂ と PGE₂ 代謝物 (15-keto PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto PGE₂、13, 14-dihydro-15-keto PGA₂) は LC-MS/MS により定量した。

【結果・考察】

炎症モデルマウスにおける組織 PGE₂ および PGE₃ 量に与える OATP2A1 の影響

輸送体過剰発現 HEK293 細胞を用いた PGE₃ 取込み試験の結果、PGE₃ の取込みは OATP2A1 (HEK/2A1) または OATP1B1 (HEK/1B1) 発現細胞で対照細胞 (HEK/Mock) と比べて有意に増加し、基質となることが示された。取込み時間 1 分における HEK/2A1 細胞の PGE₃ 取込み活性は、HEK/1B1 細胞と比べて 8 倍高かった。また、HEK/2A1 細胞による PGE₂ 取込みに対する PGE₃ の阻害試験の結果、PGE₃ の IC₅₀ 値は 0.590 μM と算出された。次に、PGE₂ および PGE₃ が細胞外へ分泌される場合は、細胞内コンパートメントへ OATP2A1 が両化合物を取込むことで細胞質での不活性化を妨げ、組織中濃度の維持に働くという仮説を立て、炎症時における両化合物の全身組織分布における OATP2A1 の役割について検討した。PGE₃ が対象組織で検出できるように EPA-E (1000 mg/kg) を経口投与し、LPS で炎症を誘発させた WT および *Slco2a1*^{-/-}マウスの各組織 PGE 量を比較した。その結果、*Slco2a1*^{-/-}マウスにおいて肺では PGE₂ および PGE₃ 量が上昇し、逆に脾臓では低下する変動がみられた。一方、胃・大腸・腎臓・肝臓の PGE₂ および PGE₃ 量に変化はみられなかった。また、炎症により

誘導される合成酵素 Cox-2 の各組織の mRNA 発現量は、WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスで差がなかった。したがって、OATP2A1 の機能は肺と脾臓における PGE₂ および PGE₃ 分布に相反する様式で反映されることが示された。PGE₂ 輸送に対する PGE₃ の IC₅₀ 値は 0.590 μM であり、LPS および EPA-E を処置した WT マウスの肺の PGE₃ 濃度は 0.009 μM、脾臓の PGE₃ 濃度は 0.8 μM であったことから、脾臓において PGE₃ は OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌輸送を低下させることで PGE₂ の代謝・分解を促進し、その結果 PGE₂ の作用を抑制すると考えられた。

脾臓における OATP2A1 の役割

OATP2A1 による脾臓内 PGE₂ 調節の意義について検討した。脾臓における *Oatp2a1* の発現部位を免疫組織化学染色により評価した結果、*Oatp2a1* は赤脾髄に存在する Mφ および杆状細胞に発現することが示された。そこで、*Slco2a1* 欠損による脾臓 PGE₂ 量の低下は、Mφ の OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌の消失により PGE₂ の代謝による不活性化が促進したと考えられた。

免疫反応の活発化に伴い脾腫が引き起こされること、PGE₂ は免疫抑制作用を示すことから(8-11)、本研究で見出した OATP2A1 の活性低下が引き起こす脾臓 PGE₂ 量の低下は、炎症反応の増悪による脾臓の肥大化と関連する可能性がある。PBS 投与 WT マウスの脾臓と比べて LPS 処置 WT マウスで体重 1g あたりの脾臓湿重量（相対重量）が増加し、LPS 処置により脾臓の *Oatp2a1* mRNA 発現量が低下した。したがって、脾臓 *Oatp2a1* の機能低下は脾臓の肥大化に寄与することが示唆された。炎症反応の増悪による脾臓の肥大化における OATP2A1 の役割について、急性炎症モデルとして LPS を腹腔内投与したマウス、および加齢により様々な組織に慢性的な炎症が惹起されることから、高週齢マウス（42-88 週齢）を用いて WT と *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓の相対重量を比較した。高週齢の WT マウスと比較して *Slco2a1*^{-/-}マウスで脾臓の相対重量は増加したが、LPS 誘発性急性炎症モデルでは両マウス間で差がみられず、OATP2A1 は加齢に伴う慢性炎症を抑制することが示唆された。高週齢マウスの脾臓において、*Slco2a1* 欠損により有意に PGE₂ 量が低下したが、Western blotting の結果から合成酵素 Cox-2 のタンパク質発現に変化がないこと、ならびに代謝の律速酵素 15-Pgdh の発現は *Slco2a1* 欠損により有意に低下したことから、*Slco2a1* 欠損による PGE₂ 量の低下は、PGE₂ の合成・代謝酵素の発現変動では説明できないことが示された。したがって、OATP2A1 は脾臓内の PGE₂ 分布を変動させ PGE₂ シグナルを調節することで、加齢に伴う慢性炎症の抑制に関与することが示唆された。高週齢 *Slco2a1*^{-/-}マウスの脾臓組織切片の HE 染色の結果、白脾髄において核の青色染色部位の低下、細胞質の膨張が観察された。白脾髄では免疫細胞が成熟し免疫応答が行われることから、*Slco2a1* 欠損により免疫応答に異常が生じる可能性が考えられた。

PGE₂ 分泌における細胞内 OATP2A1 の役割

Slco2a1 欠損による脾臓 PGE₂ 量の低下は、Mφ の OATP2A1 を介した細胞内コンパートメ

ントへの PGE₂ 取込みが消失し、細胞質の代謝酵素による PGE₂ の不活性化が促進したことによるという仮説を検証することを目的に、*Slco2a1*^{-/-}マウス由来腹腔 Mφ および OATP2A1 阻害剤 (TGBz) 処置 RAW264 細胞を用いて OATP2A1 の役割を PGE₂ とその代謝物を測定することで評価した。その結果、Mφ の OATP2A1 活性を抑制した時、PGE₂ と代謝物の総量に対する細胞外 PGE₂ 比は減少、総代謝物比は増加した。したがって、細胞内 OATP2A1 は PGE₂ の分泌を通じて PGE₂ 代謝の抑制に作用することが新たな機能として示された。以上の結果から、脾臓 Mφ に発現する OATP2A1 は脾臓内 PGE₂ 濃度調節に関わり、機能が抑制されることで脾臓内 PGE₂ シグナルが低下することが示唆された。

【結論】

以上、本研究では *Slco2a1* 欠損マウスで組織 PGE₂ 量が低下した脾臓に着目し、OATP2A1 が有する PGE₂ 分泌機能を解析した。その結果、OATP2A1 は脾臓内の Mφ に発現すること、そして炎症時の PGE₂ 分泌に働き、その結果慢性炎症の増悪抑制に働くことを示すことができた。さらに、OATP2A1 は PGE₃ にも親和性を有することから、PGE₃ による OATP2A1 を介した PGE₂ の作用調節の可能性についても示唆することができた。

【引用文献】

1. Pucci ML, Bao Y, Chan B, et al. Cloning of mouse prostaglandin transporter PGT cDNA: species-specific substrate affinities. *Am J Physiol* 1999;277:R734-41.
2. Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 1995;268:866-9.
3. Nomura T, Lu R, Pucci ML, Schuster VL. The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. *Mol Pharmacol* 2004;65:973-8.
4. Shimada H, Nakamura Y, Nakanishi T, Tamai I. OATP2A1/SLCO2A1-mediated prostaglandin E2 loading into intracellular acidic compartments of macrophages contributes to exocytotic secretion. *Biochem Pharmacol* 2015;98:629-38.
5. Yang P, Jiang Y, Fischer SM. Prostaglandin E3 metabolism and cancer. *Cancer Lett* 2014;348:1-11.
6. Montrose DC, Nakanishi M, Murphy RC, et al. The role of PGE2 in intestinal inflammation and tumorigenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2014;116-117:26-36.
7. Stenson WF, Parker CW. Prostaglandins, macrophages, and immunity. *J Immunol* 1980;125:1-5.
8. Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, et al. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest* 2001;108:1229-35.
9. Sharma S, Yang SC, Zhu L, et al. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin

E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:5211-20.

10. Qian X, Zhang J, Liu J. Tumor-secreted PGE₂ inhibits CCL5 production in activated macrophages through cAMP/PKA signaling pathway. *J Biol Chem* 2011;286:2111-20.

11. Kojima F, Frolov A, Matnani R, Woodward JG, Crofford LJ. Reduced T cell-dependent humoral immune response in microsomal prostaglandin E synthase-1 null mice is mediated by nonhematopoietic cells. *J Immunol* 2013;191:4979-88.

審査結果の要旨

プロスタグランジン(PG)E₂は生理的に重要な炎症メディエータであり、OATP2A1/SLCO2A1はPGを細胞内に取り込むトランスポーターである。炎症時における組織PGE₂量調節に対するOATP2A1の役割を明らかにするため、本研究では、組織PGE₂およびPGE₃量に対するSlco2a1欠損の影響がSlco2a1^{-/-}マウスを用いて評価された。OATP2A1過剰発現細胞を用いた輸送解析によりPGE₃がOATP2A1の基質であることが初めて明らかにされた。リポ多糖(LPS)投与により炎症を惹起させると、Slco2a1^{-/-}マウス肺、大腸、胃では、アラキドン酸(AA)およびエイコサペンタエン酸(EPA)で補正したPGE₂およびPGE₃量はそれぞれ増加したが、脾臓では減少した。さらに、炎症による免疫系細胞の蓄積に伴い生じる脾腫に脾内PGE₂が関わるため、脾OATP2A1のPGE₂調節に対する役割が検討された。LPS誘発性急性炎症モデルでは、野生型およびSlco2a1^{-/-}マウスで脾重量は変化しなかったが、高週齢(40週令以上)のSlco2a1^{-/-}マウスでは、体重で補正した脾臓重量は増加し、脾PGE₂量は有意に減少した。免疫組織化学染色およびRT-PCRにより脾内F4/80陽性細胞でOatp2a1の発現が示唆されたため、マウスMφにおけるPGE₂分泌に対するOATP2A1の役割が検討された。MφOATP2A1活性抑制により、PGE₂総量に対する細胞外PGE₂量および総代謝物量比が増加した。したがって、OATP2A1機能低下によるMφPGE₂分泌能低下はPGE₂代謝を促進するため、脾内PGE₂量減少に寄与し、加齢に伴う脾臓肥大化に関与することが示唆された。本研究はOATP2A1による新しい組織PGE₂量調節機構を提唱するものであり、炎症制御手法の開発に貢献することから博士(薬学)に値すると判定された。