

プロスタグランジン輸送体OATP2A1を介したマクロファージからのPGE2分泌機構

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/2297/45298

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



氏 名	島田 紘明
学 位 の 種 類	博士（薬学）
学 位 記 番 号	医薬保博甲第34号
学位授与の日付	平成28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 を介したマクロファージからの PGE ₂ 分泌機構
論文審査委員	主査 中西 猛夫 副査 玉井 郁巳 副査 松永 司 副査 檜井 栄一 副査 深見 達基

学位論文要旨

【Abstract】

Prostaglandin (PG) E_2 produced and released from macrophages (M ϕ) plays important roles in inflammation and immune response; however, its secretory process remains unclear. This thesis aimed to evaluate role of a prostaglandin transporter OATP2A1/*SLCO2A1* in PGE $_2$ secretion from M ϕ . Mouse Oatp2a1 protein was found to be expressed mainly in the cytoplasm of murine peritoneal M ϕ (PM ϕ) and M ϕ -derived RAW264 cells, and co-localized with PGE $_2$ as well as lysosomal markers. PGE $_2$ uptake by subcellular fraction containing light lysosomes was reduced significantly with OATP inhibitors as well as in *Slco2a1*^{+/-} PM ϕ . Extracellular amount of PGE $_2$ from Ca²⁺ ionophore-treated or lipopolysaccharide (LPS)-activated *Slco2a1*^{-/-} mice-derived PM ϕ was significantly lower than that from wild type mice (WT). Protein expression of cyclooxygenase-2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase was comparable between LPS-treated PM ϕ from *Slco2a1*^{-/-} and WT. In addition, OATP2A1-mediated PGE $_2$ secretion from M ϕ was also observed in newly established M ϕ -selective *Slco2a1*^{-/-} mice. These results demonstrate a partial contribution of OATP2A1 in PGE $_2$ secretion from M ϕ , where loaded PGE $_2$ by OATP2A1 into acidic compartments, including light lysosomes is secreted in an exocytotic manner in response to Ca²⁺ influx induced by inflammatory stimuli. Our findings provide a new rationale for function of M ϕ related to PGE $_2$, which plays a major role in inflammatory and/or immune disease.

【背景・目的】

プロスタグランジン (PG) E_2 は、cyclooxygenase (COX) /prostaglandin E synthase (PGES) 経路によりアラキドン酸から合成される脂質メディエーターであり、炎症刺激に伴い産生量が増大し、炎症や免疫反応に関与する。PGE $_2$ は細胞内で合成され、細胞膜に発現する PGE 受容体 (EPs) に作用した後、速やかに細胞内へ取込まれて代謝される。PGE $_2$ の細胞内への取込み過程は細胞膜に発現する輸送体の働きにより説明されるが、一般的に細胞からの PGE $_2$ の分泌過程は 1) 単純拡散、2) 輸送体介在性、3) エクソソーム介在性など諸説ある。炎症反応において活性化されたマクロファージ (M ϕ) から放出される PGE $_2$ は炎症反応の進展に関与し、リンパ球の増殖や分化を調節し免疫反応とも深く関わるが、M ϕ からの PGE $_2$ 分泌機構に関する情報は限られている。M ϕ からの PGE $_2$ 分泌には Ca²⁺ イオン依存性[1]やリソソーム酵素の分泌などエキソサイトーシスを伴う現象が報告されて[2]おり、既知の PGE $_2$ 分泌機構と合致しない。当研究室では、PGE $_2$ に高い親和性を有するプロスタグランジン輸送体 OATP2A1/*SLCO2A1* が PGE $_2$ 動態調節因子であること報告してきた[3]。さらに、ミクログリアなど組織定住 M ϕ に OATP2A1 が発現していることが報告されていた[4]。したがって、本研究において、M ϕ における OATP2A1 の機能および細胞内 PGE $_2$ 動態を明らかにすることを目的に研究を開始した。本研究により作出された *Slco2a1*^{-/-} マウスを用いた免疫組織化学染色により腹腔 M ϕ (PM ϕ) において OATP2A1 が主に細胞質に発現することが示された。さらに、OATP2A1 による PGE $_2$ の細胞内動態調節がエキソサイトーシスによる PGE $_2$ 分泌に関わると仮説を立て研究を推進した結果、M ϕ 内で合成された PGE $_2$ の一部が OATP2A1 によりリソソームを含む酸性コンパートメントに貯留され、Ca²⁺ イオン依存的なエキソサイトーシスにより分泌されることが初めて示唆された。

【方法】

Cre/loxP system により、*Slco2a1*^{-/-};CAGCre マウスおよび *Slco2a1*^{lox/lox};LysMcre マウスを作出した。遺伝子型判定は尻尾から抽出したゲノム DNA を用いて PCR により行い、全身における *Oatp2a1* mRNA、タンパク質発現および細胞内発現部位を RT-PCR、Western blotting および免疫組織化学染色法により検討した。*Slco2a1*^{-/-}マウスと野生型 (WT) マウスから単離した PMφ および、マウス Mφ 細胞株 RAW264 細胞を用いて [³H]PGE₂ 取込みおよび PGE₂ 分泌試験を実施した。*Oatp2a1* および PGE₂ の細胞内局在は免疫細胞化学染色法により検討した。Precoll[®]密度勾配遠心法により細胞を分画し、各画分における [³H]PGE₂ 取込み試験を迅速濾過法により実施し、放射能を液体シンチレーションカウンターにより定量し輸送活性を評価した。組織中や細胞内外の内因性 PGE₂ は LC-MS/MS により定量した。

【結果・考察】

本研究では OATP2A1 の生理的役割を検討する目的で *Slco2a1* 欠損マウスを作出した。第 2 章に記述したように、作出された *Slco2a1*^{-/-};CAGCre マウスの各組織および PMφ において、*Oatp2a1* の mRNA 発現は検出されなかった。また WT マウスの免疫組織・細胞化学染色の結果、肺胞上皮、気道上皮、肺血管内皮、腎近位尿細管上皮における *Oatp2a1* の発現は主に細胞膜にみられたが、糸球体周辺細胞や PMφ においては主に細胞質に検出された。これまで、細胞内における OATP2A1 機能は不明であったため、第 3 章においてマウス PMφ および Mφ 細胞株 RAW264 細胞を用い Mφ に発現する OATP2A1 の機能を解析した。

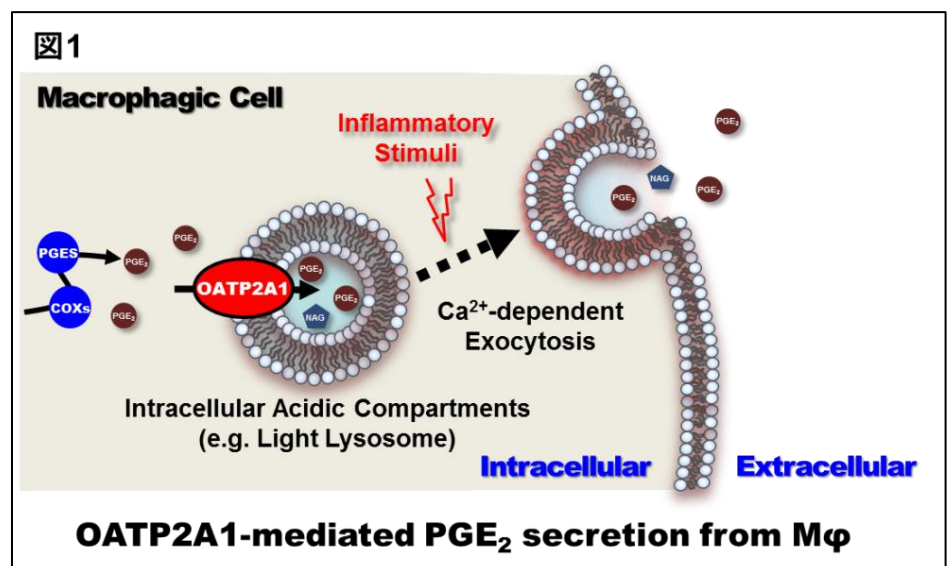
PMφ および RAW264 細胞における [³H]PGE₂ 取込みは、*Slco2a1* 欠損や OATP2A1 阻害剤 TGBz T34 の添加により減少しなかったことから、OATP2A1 が Mφ 細胞膜上で PGE₂ 取込み輸送体として機能しないことが示唆された。さらに、PMφ と RAW264 細胞の *Oatp2a1* の細胞内局在および細胞内 PGE₂ 分布を免疫細胞化学染色により検討した結果、両 Mφ モデル細胞において *Oatp2a1* はリソソームマーカーおよび PGE₂ と部分的に共局在することが示された。したがって Mφ において OATP2A1 はリソソームを含む酸性コンパートメントにおいて機能すると仮説を立て、細胞内に発現する OATP2A1 の機能を解析した。まず、密度勾配遠心法により Mφ を 10 の画分に分画した。得られた 10 画分のうち、最も密度の小さい画分 (Fraction #1) と最も密度の大きい画分 (Fraction #10) にリソソーム酵素活性が検出された。Mφ には密度の異なる二種類のリソソームが存在し、Fraction #1 は light lysosome、Fraction #10 は heavy lysosome をそれぞれ含有すると考えられた。また、各画分における [³H]PGE₂ 取込みを検討した結果、Fraction #1 において取込み量が最も高く、その取込みは OATP 阻害薬 bromosulphophthalein (BSP) や OATP2A1 阻害薬 TGBz T34 存在下で有意に低下した。また *Slco2a1*^{-/-} マウス由来の PMφ から分画した Fraction #1 では WT と比較し、[³H]PGE₂ 取込みが有意に減少した。以上の結果から、OATP2A1 は light lysosome を含む酸性コンパートメントによる PGE₂ 取込みに関与することが示唆された。次に、Mφ からの PGE₂ およびリソソーム酵素の分泌を検討した。炎症性刺激として LPS 処置したマウス由来血漿を PMφ に添加すると、細胞外の PGE₂ 量およびリソソーム酵素活性が有意に増加したが、Ca²⁺キレート剤である EGTA を添加することでいずれの分泌も有意に減少した。さらに、これらの分泌過程に対する Ca²⁺イオンの影響を検討するため、Mφ に対する Ca²⁺イオノフォア ionomycin の作用を検討した。その結果、ionomycin で処置された RAW264 細胞において、細胞外の PGE₂ 量およびリソソーム酵素活性は増加し、EGTA を添加することでいずれの分泌も有意に減少した。また、*Slco2a1*^{-/-} マウス由来 PMφ では、ionomycin

添加による細胞外 PGE₂ 量の増加は、WT と比較して有意に抑制された。したがって、Mφ において OATP2A1 は Ca²⁺イオン依存性のリソソームエキソサイトーシスを伴う PGE₂ 分泌に寄与することが示された。そこで、炎症性刺激に伴う PGE₂ 分泌における OATP2A1 の関与を検討するため、WT と *Slco2a1*^{-/-} マウス由来の PMφ を LPS で刺激し、細胞内外の PGE₂ 量を定量した。*Slco2a1*^{-/-} マウス由来 PMφ では WT と比較して細胞外の PGE₂ 量は減少し、細胞内 PGE₂ 量は増加した。同条件下において、WT および *Slco2a1*^{-/-} マウス由来 PMφ 間で Cox-2 や 15-Pgdh のタンパク質発現量に有意な差はなかった。したがって、OATP2A1 を介した PGE₂ 分泌過程は、COX-2 や 15-PGDH とは独立した細胞外 PGE₂ 量調節機構として重要であると考えられた。以上の結果により、Mφ において合成された PGE₂ の一部が OATP2A1 により light lysosome を含む細胞内酸性コンパートメントへ貯留され、Ca²⁺イオン依存的なエキソサイトーシスに伴い細胞外へ分泌されることが示唆された。しかし *Slco2a1*^{-/-} マウス由来 PMφ から PGE₂ が分泌されたことから、OATP2A1 に依存しない PGE₂ 分泌メカニズムの存在が考えられた。

さらに第 4 章においては、Mφ における OATP2A1 介在性 PGE₂ 分泌機構の生理的意義を解明することを目的に、Mφ 特異的に *Slco2a1* を欠損したマウスの作出を試みた。Mφ 特異的 *Slco2a1* 欠損マウスとして、*Slco2a1*^{fllox/fllox}; *LysMcre* マウスを作出した。*Slco2a1*^{fllox/fllox}; *LysMcre* マウスにおいて、PMφ 特異的に *Slco2a1* exon1 の欠損がみられ、*Oatp2a1* mRNA 発現も WT と比較して約 73%減少し、肺、肝臓、脳、小腸、腎臓、胃、脾臓に比べて PMφ で有意に発現が減少した。また、免疫細胞化学染色の結果、*Slco2a1*^{fllox/fllox}; *LysMcre* マウスの PMφ において、*Oatp2a1* に由来する蛍光は WT と比較して減少した。さらに、*Slco2a1*^{fllox/fllox}; *LysMcre* マウス由来 PMφ では、WT と比較して LPS 処置による PGE₂ 分泌が有意に減少した。したがって、本研究で新規に作出された *Slco2a1*^{fllox/fllox}; *LysMcre* マウスにおいては、*Slco2a1* が Mφ 特異的に欠損し、Mφ からの PGE₂ 分泌が減少することから、Mφ に発現する OATP2A1 の生理的意義を解明するためのモデルとしての有用性が示された。

【結論】

本研究では、Mφ における新しい PGE₂ 分泌機構として、OATP2A1 介在性 PGE₂ 分泌の存在を示した。OATP2A1 は light lysosome を含む細胞内酸性コンパートメントへの PGE₂ の貯留を担い、貯留された PGE₂ は炎症性刺激に応じて Ca²⁺イオン依存的なエキソサイトーシスにより細胞外へ分泌される (図 1)。Mφ から分泌される PGE₂ は、生理的な自然炎症徴候発現 (発熱、痛み) のみならず、T 細胞分化調節など免疫に重要な役割を果たすため、本成果は新たな生命現象理解と免疫疾患治療薬への応用が期待される。今後、本研究で作出した全身性および Mφ 特異的 *Slco2a1* 欠損マウスを活用し、Mφ における OATP2A1 介在性の PGE₂ 分泌の生理的意義の解明が望まれる。



【引用文献】

1. Ulmann L, et al. EMBO J 2010;29:2290-300.
2. Bonney RJ, et al. Biochem J 1978;176:433-42.
3. Shirasaka Y, et al. J Endocrinol 2013;217:265-74.
4. Choi K, et al. J Neuroimmunol 2008;195:81-7.

審査結果の要旨

本研究ではPGE₂の細胞内取込みに働く Organic anion transporting polypeptide (OATP) 2A1(*SLCO2A1*)によるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 動態調節機構の解明を目的とした。各組織の PGE₂ 量は野生型(WT)および *Slco2a1* 遺伝子欠損マウス間で有意な変化は見られず、PGE₂の産生能が高いマクロファージ(Mφ)や肺細胞2型上皮細胞においては細胞膜ではなく細胞質に存在することを見出した。そこで、細胞質に発現する OATP2A1 は PGE₂の細胞内取込み以外に働くと考え、PGE₂分泌能が高いMφを用い OATP2A1 が PGE₂細胞内動態に与える影響について解析を進めた。マウス腹腔 Mφ (PMφ) および RAW264 細胞による [³H]PGE₂ 取込みは *Slco2a1* 欠損および OATP2A1 阻害薬存在下で変化しなかったこと、Mφ 内における OATP2A1 発現はリソソームマーカーおよび PGE₂ と部分的に一致すること、ならびに低密度リソソームを含む細胞画分による [³H]PGE₂ 取込みは OATP2A1 阻害薬により有意に減少することから、Mφ における OATP2A1 は細胞内オルガネラで PGE₂ 調節に働くことを示唆した。さらに、炎症惹起物質 LPS やエキソサイトーシス促進作用を持つ ionomycin に曝露した Mφ において細胞外 PGE₂ が有意に増加したが、WT に比べ *Slco2a1* 欠損では細胞外 PGE₂ は有意に低値を示した。以上より、Mφ における OATP2A1 は、細胞内で合成された PGE₂ を細胞内小胞やオルガネラに蓄積させることによってエキソサイトーシスによる細胞外分泌に寄与することを示した。本研究成果は、炎症反応媒介因子 PGE₂ の新しい分泌機構を示すものであり、輸送体を標的とする PGE₂ 動態調節症薬の開発への応用が期待されるため、審査委員会は本論文が博士（薬学）に値すると判断した。