

平成 29 年 9 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15181

研究課題名(和文) プロスタグランジン輸送体を作用標的とする新規抗炎症薬の提唱

研究課題名(英文) Study on prostaglandin transporter as a novel target for anti-inflammatory drugs

研究代表者

中西 猛夫 (Nakanishi, Takeo)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：30541742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究成果により、炎症を媒介するケミカルメディエータであるprostaglandin(PG) E2は、炎症組織で活性化されるマクロファージ細胞(M₁)内に発現するPGトランスポーター(OATP2A1)により、リソゾーム等の酸性オルガネラに貯留された後、炎症刺激に伴って開口分泌されることが示された。げっ歯類動物を用いたOATP2A1の遺伝的および化学的抑制は内毒素による発熱効果を減弱させたことから、OATP2A1は解熱薬の新規標的として期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study indicates that an important chemical mediator prostaglandin (PG) E2 is transported into acidic organelles including lysosome via OATP2A1, which is a transporter with high affinity to PGE2, in macrophages activated under inflammatory condition, and then it is secreted by exocytosis. Since genetic and chemical suppression of Oatp2a1 attenuated endotoxin-induced fever in rodent models, OATP2A1 is expected to be a novel target for antipyretic drugs.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：トランスポーター プロスタグランジン 炎症 発熱 抗炎症薬 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)は Cyclooxygenase(COX)1/2 を阻害することで炎症増悪因子である prostaglandin(PG)_{E2} 産生を抑制し、解熱・鎮痛作用を発揮する。しかし、消化器障害や腎障害など臨床で重大な問題を抱えるため、副作用のない抗炎症治療薬の開発が求められている。

研究開始時点において、炎症局所において誘導される COX-2 により細胞内で産生される PGE₂ は、細胞膜 PGE₂ 受容体に細胞外から作用し生理活性を発揮する。しかし、産生された PGE₂ の細胞内からの分泌機構には定説がなく、十分に理解されていなかった。

SLCO2A1 遺伝子によりコードされる OATP2A1 は、PGE₂ に高い親和性を持つトランスポーター(輸送体)PGTとして単離され、細胞膜に発現し PGE₂ 取込みに働く輸送体として機能解析が行われてきた。申請者らは、ヒト気道上皮細胞(*J. Endocrinol.*, 217:265, 2013)や大腸癌細胞からの PGE₂ 分泌に OATP2A1 が関与することを見出し、さらに独自に作出した *Slco2a1*^{-/-} マウスから調製された腹腔マクロファージ細胞(Mφ)を内毒素(リポ多糖、以下 LPS)により活性化すると、*Slco2a1* 野生型(WT)と比較し、PGE₂ 分泌が有意に減少することを確認していた。しかし、Mφにおける OATP2A1 の発現や PGE₂ 動態調節作用については、情報は限られていた。

2. 研究の目的

本研究申請においては、LPS で刺激された Mφ からの PGE₂ 分泌が *Slco2a1* 欠損により減少すること、Mφ 細胞質に OATP2A1 が発現したことから、PGE₂ は OATP2A1 により細胞小胞やオルガネラに貯留されるため細胞内での代謝を免れ、炎症刺激にตอบสนองして開口分泌されるという仮説をたて、Mφ における OATP2A1 の発現や機能を明確にし、炎症刺激に伴う PGE₂ 分泌における役割を解明することを主目的に研究を実施した。本研究成果は、COX1/2 に代わる抗炎症薬の作用点として OATP2A1 の合理性を評価するものである。

3. 研究の方法

- (1) 腹腔 Mφ(以下、PMφ)の調製 4% BBL™ Thioglycollate Medium Brewer Modified (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 2 mL をマウスの腹腔内に投与後 4 日目に、氷冷 phosphate buffered saline (PBS, 5 mL) で腹腔内を洗浄し腹腔細胞を回収した。PBS 2 mL に再懸濁し、DMEM 培地(含 10% FBS)で播種した。2 hr 後に、非接着細胞を PBS で洗浄し、接着細胞を腹腔 Mφ として得た。

- (2) RNA 抽出および RT-PCR マウス組織あるいは細胞から RNAiso Plus®(Takara Bio)を用い total RNA を抽出した。抽出した RNA は逆転写反応に供し、cDNA を調製した。得られた cDNA を鋳型とし、各遺伝子に対する配列特異的なプライマーを用い、real-time PCR 装置(Mx 3000p; Agilent Technologies, CA)による PCR 反応を実施し、それぞれの遺伝子の mRNA 発現をハウスキーピング遺伝子(Hprt 等)の発現量によって正規化し、相対定量を行った。
- (3) Western Blot 動物組織あるいは細胞を RIPA buffer(含 protease inhibitor cocktail)中でホモジネートし、遠心操作により上清を回収し Western Blot に供した(タンパク質 20 μg)。10% SDS-polyacrylamide を用いて分離し、セミドライ式で PVDF 膜に転写した。5% skim milk/TBS-T を用いて室温で 1 hr ブロッキングした後、一次抗体に rabbit anti-Cox-2 IgG (1:500)、rabbit anti-15-Pgdh IgG (1:200)及び rabbit anti-GAPDH IgG (1:5000)を用いて 4°C で一晩反応させた後、HRP-conjugated anti-rabbit pig IgG (Millipore, 1:5,000, 室温 1hr)と反応させた。引き続き、化学発光により抗原抗体反応を可視化し、目的のバンドの発光強度を CS analyzer (ATTO)により定量した。
- (4) 免疫組織化学染色 深麻酔下でマウスの下大静脈を切断し、4%パラホルムアルデヒド(PFA/PBS 溶液)で全身還流を行った後、脳を摘出した。さらに 4% PFA/PBS 溶液で浸漬固定(4°C、一晩)した後、パラフィン切片(厚さ 4 μm)および凍結切片(厚さ 10 μm)をそれぞれ作製した。組織切片は、guinea pig anti-Oatp2a1 IgG(1:150)、rat anti-F4/80 IgG(1:100)あるいは rat anti-CD34 IgG(1:50)と反応(4、一晩)させたのち、HRP または蛍光標識された anti-guinea pig または anti-rat 二次抗体を用いて、目的タンパク質の組織発現を DAB 染色(オールインワン顕微鏡 BZ-9000; Keyence, Osaka)または蛍光染色(共焦点レーザー顕微鏡 LSM 710 Carl Zeiss, Germany)により評価した。
- (5) PGE₂ 取込み PMφ や RAW264 細胞をそれぞれ 4-well プレートに播種し 1 日間培養後、取込み試験に用いた。取込み反応は 37°C において、³H]PGE₂ (3 nM, 0.49 μCi/ml)を含む transport buffer を添加し開始した。各ウェルに氷冷した transport buffer を加えて反応を停止した後、繰り返し細胞を洗浄し残存する基質を除去した。細胞内基質量は、細胞を 0.5% (w/v) Triton X-100 を用いて溶解し、溶解液中の放射能を液体シンチレーションカウンター(LSC-6100, Aloka, Tokyo)により定量した。またタンパク質量は

- Bradford 法に従い、BSA を標準として Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) により定量した。
- (6) LC-MS/MS による PGE₂ 分析 目的の試料からギ酸(2%)存在下、クロロホルムまたは酢酸エチル溶液に抽出された PGE₂ を LC-MS/MS を用いて分析した。PGE₂ などのエイコサノイドを分析カラム (Mercury MS, C18, 20 × 4.0 mm, Luna 3 μm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) により分離し、API3200TM (AB Sciex, Foster City, CA) により ESI 法に従い質量分析を実施した。PGE₂ の Q1 は 351.1 (m/z)、Q3 は 271.1 (m/z)、PGF₂α の Q1 は 353.2 (m/z)、Q3 は 193.2 (m/z)、15-keto PGE₂ の Q1 は 349.2 (m/z)、Q3 は 331.2 (m/z)、内標準である PGE₂-d₄ の Q1 は 355.1 (m/z)、Q3 は 275.2 (m/z) で測定した。イオン源パラメータは、Collision Gas (CAD): 3、Curtain Gas (CUR): 10、Ion Source Gas 1 (GS1): 80 psi、Ion Source Gas 2 (GS2): 80 psi、Ion Spray voltage (IS): -4500 V、Temperature (TEM): 600°C に設定した。マススペクトルは、Analyst[®] 1.6 Software で解析した。
- (7) マウス直腸温測定 マウスの直腸温は直腸体温計 TD320 (Shibaura electronics, Saitama, Japan) のプローブをマウスの肛門から 2.5 cm 挿入後約 5 秒間温度を計測し、直腸温(体温)測定した。体温測定は午前 8:00 に開始し、午後 10:00 まで 1 hr 毎に測定した(マウス飼育室の点灯および消灯時刻は、それぞれ午前 8:45 および午後 8:45)。LPS (投与量 100 μg/kg body) は生理食塩水に溶解し、午前 11:00-11:30 に投与した。陰性対照として生理的食塩水のみを投与した。
- (8) 微小透析法による脳間質液中 PGE₂ 濃度測定 ペントバルビタール(50 mg/kg, i.p.) で麻酔したマウスの頭部をステレオタキシスで固定した。頭蓋骨表面のプレグマから前方 0.9 mm、左側 0.1 mm、深さ 4.0 mm に小さい穴を開けガイドカニューレ(CMA7 用, CMA, Stockholm, Sweden) を挿入した。歯科用セメントで固定後 1 日目に、透析プローブ(CMA7, 膜長: 1.0 mm, 直径 0.38 mm, CMA) を挿入した。プローブ挿入から 5 日後、フリームービング条件下で Krebs-Ringer リン酸バッファーを 3 hr 灌流(2 μL/min) した。LPS (100 μg/kg, i.p.) 投与後 6 hr 灌流した。サンプルは 60 分おきに回収し、ギ酸および酢酸エチルを用いて PGE₂ を抽出し、LCMS8050 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) で測定した。灌流終了後、脳を単離し 4% PFA/PB で固定後(4、一晚)、パラフィン組織切片を作製し、プローブの挿入位置を顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

本研究においては、Mφ からの PGE₂ 分泌にプロスタグランジン輸送体 OATP2A1 が関与することを明らかにするために、Oatp2a1 をコードする遺伝子 *Slco2a1* の野生型 (WT) および欠損型 (*Slco2a1*^{-/-}) マウスから PMφ を調製し、細胞内 Oatp2a1 の発現局在、細胞内 PGE₂ 動態および Ca²⁺ 依存的 PGE₂ 分泌を検討した。免疫組織学的なアプローチから得られた Oatp2a1 細胞内局在と密度勾配遠心法により分画された各画分における PGE₂ 取込み実験の結果から、Oatp2a1 は細胞内 PGE₂ の酸性コンパートメント(リソソームを含むオルガネラ等)への貯留に働くことが示唆された。さらに、リポ多糖 (LPS) 等により活性化された PMφ からの PGE₂ 分泌は、*Slco2a1* 欠損 (Fig. 1) あるいは Ca²⁺キレート剤(EGTA)添加 (Fig. 2) により有意に減少した。しかし、WT

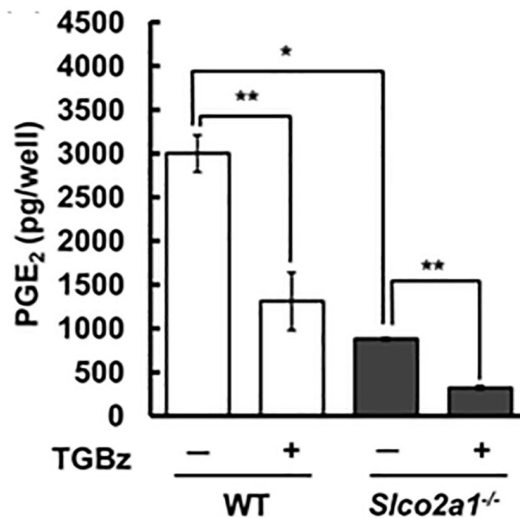


Fig. 1 Effect of *Slco2a1* deletion and TGBz T34 on extracellular PGE₂ in PMφ
PMφ from *Slco2a1*^{+/+} and *Slco2a1*^{-/-} were activated for 8 hr by LPS in the presence or absence of OATP2A1 inhibitor TGBz T34 (25 μM). Extracellular PGE₂ was determined by LC-MS/MS.

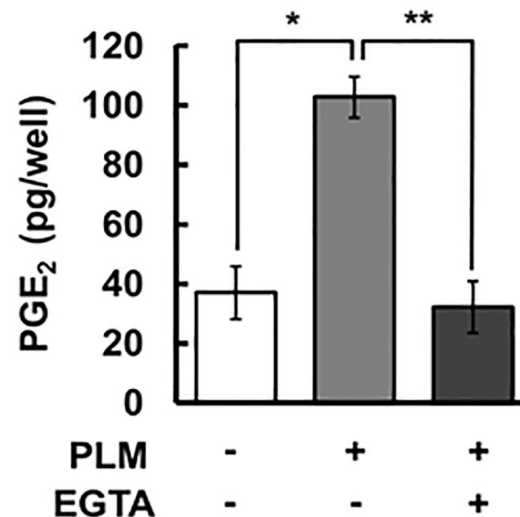


Fig. 2 Effect of Ca²⁺ chelator on extracellular PGE₂ in PMφ
PMφ were activated for 6 hr by plasma obtained from LPS-treated mice in the presence or absence of EGTA (2 mM). Extracellular PGE₂ was determined by LC-MS/MS.

および *Slco2a1*^{-/-}由来 PMφ において、COX2 や PGE₂ 分解酵素(15-PGDH)の発現に有意な変化は見られなかった。したがって、Oatp2a1 は PMφ 内の PGE₂ 動態調節因子として重要であり、PGE₂ の開口分泌に間接的に関与することを報告した(*Biochem Pharmacol*, **98**:629-638, 2015)。

さらに、Mφ に加えて、OATP2A1 の発現高いヒト大腸癌細胞 LoVo 細胞においても、細胞内に発現する OATP2A1 が同様のメカニズムで PGE₂ 分泌に関わることを報告した(*Exp Cell Res*, **341**:123-131, 2016)。

Mφ から分泌される PGE₂ は炎症において重要な役割を果す。本研究により初めて提唱された Mφ における OATP2A1 の役割を *in vivo* で検討した。論文投稿準備中のため、現時点では詳細な結果について非公開とする。

以上、OATP2A1 は解熱・鎮痛薬の作用点として今後の研究成果が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)*; 責任著者を示す。

1. Kamo S, Nakanishi T^{*}, Aotani R, Nakamura Y, Gose T, Tamai I. Impact of FDA-approved drugs on the prostaglandin transporter OATP2A1/SLCO2A1. *J Pharm Sci*, in press. 査読有, DOI: 10.1016/j.xphs.2017.04.046
2. Kasai T, Nakanishi T, Ohno Y, Shimada H, Nakamura Y, Arakawa H, Tamai I. Role of OATP2A1 in PGE₂ secretion from human colorectal cancer cells via exocytosis in response to oxidative stress. *Exp Cell Res*, 査読有, **341**:123-131, 2016. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.02.002
3. 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*, 査読有, **98**:629-638, 2015. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.10.009

[学会発表](計 14件)

1. Nakanishi T, Kamo S, Aotani R, Tamai I. プロスタグランジン輸送体 OATP/SLCO2A1 阻害作用を持つ医薬品の探索, 日本薬学会第 137 年会, 口頭発表, 仙台, 2017.3.24-26.
2. Nakamura Y, Nakanishi T, Shimada H, Shimizu J, Tamai I. Attenuation of endotoxin-induced fever in prostaglandin transporter OATP2A1 global and macrophage-specific knockout mice. Globalization of Pharmaceutics Education Network (GPEN) Conference, Poster, Lawrence, KS, Nov. 9-12, 2016.

3. Gose T, Nakanishi T, Tamai I. プロスタグランジン輸送体 OATP2A1 機能阻害によるマウスマクロファージ PGE₂ 動態の変動, 日本薬物動態学会 31 年会, ポスター発表, 松本, 2016.10.13-14.
4. Aotani R, Nakanishi T, Kamo S, Gose T, Tamai I. FDA 承認薬ライブラリを用いた OATP2A1 阻害薬の探索, 日本薬物動態学会 31 年会, ポスター発表, 松本, 2016.10.13-14.
5. Nakanishi T. 炎症性疾患におけるプロスタグランジントランスポーターの新規役割, 日本薬物動態学会第 31 年会シンポジウム 12, Matsumoto, 2016.10.15.
6. Nakanishi T, Tamai I. Alteration in PGE₂ disposition by subcellular localization of prostaglandin transporter, OATP2A1/SLCO2A1. The 21st International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Davis, CA, Oct. 2-6, 2016.
7. Nakamura Y, Nakanishi T, Shimada H, Tamai I. Prostaglandin Transporter OATP2A1 Contributes to PGE₂ Secretion from Macrophages in Response to Inflammatory Stimulation, The 1st Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics, ポスター発表, 京都, 2016.6.24.
8. Shimizu J, Nakamura Y, Shimada H, Maruyama S, Nakanishi T, Tamai I. Inflammatory Fever Induced by LPS is Attenuated in Macrophage Specific OATP2A1 Knockout (Mφ-*Slco2a1*^{-/-}) Mice, The 1st Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics, ポスター発表, 京都, 2016.6.24.
9. Nakanishi T. Unappreciated role of prostaglandin transporter OATP2A1 in inflammatory diseases. The 11th International Meeting of the International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) in Busan, South Korea, 2016.6.15.
10. Nakamura Y, Nakanishi T, Shimada H, Shimizu J, Tamai I. プロスタグランジン輸送体 *Slco2a1* 遺伝子欠損マウスにおけるリポ多糖誘発性体温上昇の抑制, 日本薬学会第 136 年会, 口頭発表, 横浜, 2015.3.27.
11. Nakanishi T, Nakamura Y, Shimada H, Gose T, Kou J, Sakiyama S, Tamai I. OATP2A1 のプロスタグランジン E2 動態調節を介した炎症制御に関する研究, 第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 口頭発表, 熊本, 2015.11.19.
12. Kamo S, Nakanishi T, Aotani R, Gose T, Tamai I. FDA 承認薬ライブラリを用いたプロスタグランジントランスポーター OATP2A1 の阻害剤探索, 口頭発表, 日本薬学会北陸支部第 127 回例会, 富山,

2015.11.15.

13. Nakamura Y, **Nakanishi T**, Shimizu J, Shimada H, Tamai I. Pyrogenic effect of endotoxin is attenuated in organic anion transporting polypeptide (OATP) 2A1 knockout (*Slco2a1^{-/-}*) mice. 日本薬物動態学会 30 年会, ポスター発表, 東京, 2015.11.12-14.
14. Shimada H, **Nakanishi T**, Nakamura Y, Maruyama S, Tamai I. The role of OATP2A1/*SLCO2A1* in PGE₂ Secretion from Macrophages, 日本薬物動態学会 30 年会, 1st Pre-doctoral Symposium for Front-Line Scientists, 東京, 2015.11.12-14.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 猛夫 (Takeo Nakanishi)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号: 30541742

(2) 研究分担者

川井 恵一 (Keiichi Kawai)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号: 30204663

(3) 連携研究者

中道 範隆 (Noritaka Nakamichi)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号: 10401895

(4) 研究協力者

中村 吉伸 (Yoshinobu Nakamura)
金沢大学大学院博士後期課程