

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07357

研究課題名(和文) 抗炎症作用を有する脂質メディエーターの標的タンパク質の同定と作用機序の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of the target proteins of anti-inflammatory lipid mediator

研究代表者

奥野 利明 (OKUNO, TOSHIAKI)

順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤講師

研究者番号：60361466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SLC02A1遺伝子に関連する慢性腸疾患(CEAS)は、プロスタグランジン(PG)トランスポーターをコードするSLC02A1の機能喪失型変異により発症する。順天堂医院に来院した家族に慢性非特異性潰瘍を発症していることを見出し、遺伝子解析によって新規のSLC02A1変異を同定した。潰瘍を発症している患者で尿中のPG代謝物量の上昇を認めた。さらに新規のSLC02A1変異がPGE2輸送体機能の低下を引き起こし、CEASを誘発することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで知られていなかった新規のSLC02A1の遺伝子変異を同定した。さらに、変異型輸送体に輸送機能がないことを実験的に証明した。本研究で確立した変異型SLC02A1の機能解析法、及び質量分析計を用いた尿中代謝物の測定は、患者さんの負担の少ない方法で病態の解明や治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic intestinal diseases associated with the SLC02A1 gene (CEAS) are caused by loss-of-function mutations in SLC02A1, which encodes a prostaglandin (PG) transporter. We found a family member who presented to Juntendo Hospital with chronic non-specific ulcers and identified a novel SLC02A1 mutation by genetic analysis. The levels of urine PG metabolites in patients with ulcers were much increased. We also showed that the novel SLC02A1 mutation causes loss of PGE2 transporter function and induces CEAS.

研究分野：脂質生化学

キーワード：SLC02A1 CEAS プロスタグランジン 慢性腸疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非特異的多発性小腸潰瘍症は、若年時に発症する小腸潰瘍症であり、長い間原因不明であったが、最近になってプロスタグランジン輸送体(SLCO2A1)の遺伝子変異に起因する疾患であることが明らかにされた(文献1)。しかし、非特異的多発性小腸潰瘍症(CEAS)の病態は十分に明らかになっておらず、発症する原因も明らかではない。従って、CEASの病態解明と治療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

研究代表者らは、順天堂医院に来院した小児患者がCEASを発症していることを見出し、家族の遺伝子解析によってSLCO2A1の新規の遺伝子変異を同定した。この新規遺伝子変異が患者のCEASの症状との関連を明らかにし、新規SLCO2A1変異が患者のCEASの症状に関連があるかことを明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 患者の白血球からゲノムDNAを抽出し、SLCO2A1遺伝子の14エキソンとエキソン-イントロンスプライシング部位をPCRで増幅し、DNAシーケンスを行った。
- (2) 尿中のtetranor-PGEM、tetranor-PGFM、tetranor-PGDMは質量分析計を用いて測定し、クレアチニンはELISAを用いて測定した。
- (3) pcDNA5/FRP/TO-野生型SLCO2A1とpcDNA5/FRP/TO-L563P変異SLCO2A1を作成し、ドキシサイクリンによって誘導される野生型SLCO2A1と変異型SLCO2A1の発現細胞を樹立した。SLCO2A1の発現は、ウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法を用いて確認した。
- (4) プロスタグランジン(PG)E₂の輸送能を明らかにするため、野生型SLCO2A1発現細胞と変異型SLCO2A1発現細胞を1 nM [³H]PGE₂を含む溶液でインキュベーションした。細胞を洗浄後、0.1 N NaOHで溶解し、シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。細胞溶解液のタンパク濃度はBCA法で測定した。

4. 研究成果

- (1) 研究代表者らは、順天堂医院小児科に来院した8才の男児の小腸カプセル内視鏡検査の結果、プロスタグランジン輸送体の変異に起因するSLCO2A1関連小腸症(CEAS)と診断した(図1)。

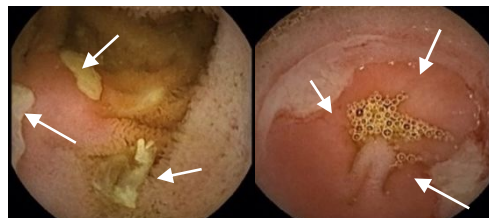


図1:カプセル内視鏡の所見

円形でテーブ状の浅い潰瘍を多数認めた。

- (2) 男児の姉(12才)も間欠的腹痛を訴えたため、小腸カプセル内視鏡を行うことでCEASであると診断した。父、母、および次女とともにSLCO2A1遺伝子の配列を解析したところ、父型のアレルには既知の遺伝子変異が、母型のアレルに新規の遺伝子変異があることを発見した。8才の男児と12才の女児は両方のアレルが変異型SLCO2A1であった(図2)。

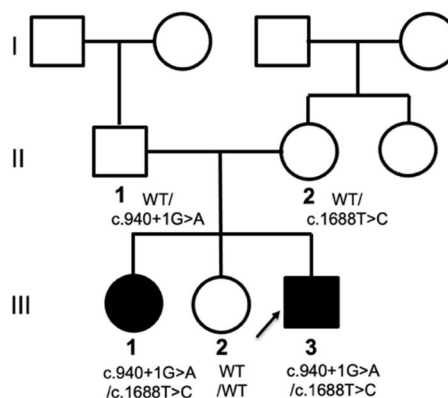


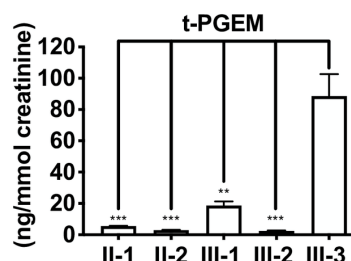
図2:SLCO2A1遺伝子に新規変異を有する慢性腸疾患の家系図

SLCO2A1遺伝子変異c.940+1G>A(スプライスサイト)とc.1688T>C(L563P)を示す。四角は男性、丸は女性を表す。黒色はCEASを発症している家族を示す。

- (3) 尿中のプロスタグランジン代謝物を質量分析計で定量したところ、8才の男児と12才の女児でプロスタグランジン代謝物量が増加していることがわかった(図3)。

図3:尿中のtetranor-PGEMの量

尿中のPGE₂代謝物tetranor-PGEMの量をLC-MS/MSを用いて測定した。CEAS患者であるIII-1とIII-3でtetranor-PGEMの量が増加していた。



(4) SLC02A1 の新規変異によるプロスタグランジン輸送機能を調べるために、新規変異型 SLC02A1 を発現する細胞株を作成した。変異型 SLC02A1 は、正常な SLC02A1 と同様に細胞膜上に発現することを確認した。正常な SLC02A1 を発現する細胞では、プロスタグランジンの細胞内への取り込み能があったが、変異型 SLC02A1 を発現する細胞では、プロスタグランジンの細胞内への取り込み能がほとんどないことがわかった(図 4)。

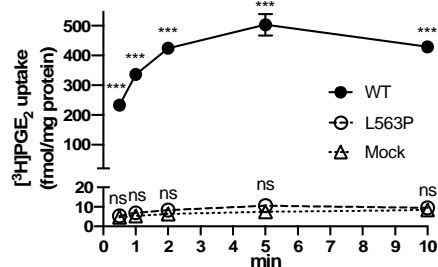


図 4: SLC02A1 と L563P 変異体の PGE₂ 取り込み能

細胞を DOX で処理した後、1 nM の [3H]PGE₂ をインキュベートした。洗浄後、細胞を溶解し、放射能を測定した。

本研究では、これまで知られていなかった新規の SLC02A1 の遺伝子変異を同定した。さらに、変異型輸送体を細胞に発現させることで、変異型輸送体が細胞膜に発現するにもかかわらず輸送機能がないことを再構成の実験で証明した。

尿中のプロスタグランジン代謝物を測定することは、非侵襲的であり、CEAS を迅速に診断する上で有利であると考えられる。また、高感度・高分解能な質量分析計を用いることで、尿中の数百種類の代謝物を定量的に測定することができるため、尿中代謝物の網羅的な分析によって、CEAS の診断や病態解明に貢献できる可能性がある。

本研究で確立した変異型 SLC02A1 の機能解析法、及び質量分析計を用いた尿中代謝物の測定は、患者さんの負担の少ない方法で病態の解明や治療法の開発につながることを期待される。

<参考文献>

- (1) Umeno J, Hisamatsu T, Esaki M, Hirano A, Kubokura N, Asano K, et al. A Hereditary Enteropathy Caused by Mutations in the SLC02A1 Gene, Encoding a Prostaglandin Transporter. PLoS Genet. 2015;11(11):e1005581. pmid:26539716

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Jimbo K., Okuno T., Ohgaki R., Nishikubo K., Kitamura Y., Sakurai Y., Quan L., Shoji H., Kanai Y., Shimizu T., Yokomizo T	4. 巻 15(11)
2. 論文標題 A novel mutation in the SLC02A1 gene, encoding a prostaglandin transporter, induces chronic enteropathy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0241869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0241869.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzumura A., Kaneko H., Funahashi Y., Takayama K., Nagaya M., Ito S., Okuno T., Hirakata T., Nonobe N., Kataoka K., Shimizu H., Namba R., Yamada K., Ye F., Ozawa Y., Yokomizo T., Terasaki H.	4. 巻 69
2. 論文標題 n-3 Fatty Acid and Its Metabolite 18-HEPE Ameliorate Retinal Neuronal Cell Dysfunction by Enhancing Muller BDNF in Diabetic Retinopathy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 724-735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db19-0550.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Horii Y., Nakaya M., Ohara H., Nishihara H., Watari K., Nagasaka A., Nakaya T., Sugiura Y., Okuno T., Koga T., Tanaka A., Yokomizo T., Kurose H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Leukotriene B4 receptor 1 exacerbates inflammation following myocardial infarction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 8749-8763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202000041R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuki K., Bu W., Eckenhoff R. G., Yokomizo T., Okuno T.	4. 巻 525
2. 論文標題 The role of propofol hydroxyl group in 5-lipoxygenase recognition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 909-914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.037.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Uzawa H., Kohno D., Koga T., Sasaki T., Fukunaka A., Okuno T., Jo-Watanabe A., Kazuno S., Miyatsuka T., Kitamura T., Fujitani Y., Watada H., Saeki K., Yokomizo T.	4. 巻 34(10)
2. 論文標題 Leukotriene A4 hydrolase deficiency protects mice from diet-induced obesity by increasing energy expenditure through neuroendocrine axis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 13949-13958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001148R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuno T., Yokomizo T.	4. 巻 152
2. 論文標題 Metabolism and biological functions of 12(S)-hydroxyheptadeca-5Z,8E,10E-trienoic acid.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostaglandins Other Lipid Mediat.	6. 最初と最後の頁 106502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prostaglandins.2020.106502.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasukawa K., Okuno T., Yokomizo T.	4. 巻 21(22)
2. 論文標題 Eicosanoids in Skin Wound Healing.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 8435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228435.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koga T, Sasaki F, Saeki K, Tsuchiya S, Okuno T, Ohba M, Ichiki T, Iwamoto S, Uzawa H, Kitajima K, Meno C, Nakamura E, Tada N, Fukui Y, Kikuta J, Ishii M, Sugimoto Y, Nakao M, Yokomizo T.	4. 巻 18(6)
2. 論文標題 Expression of leukotriene B4 receptor 1 defines functionally distinct DCs that control allergic skin inflammation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Mol Immunol.	6. 最初と最後の頁 1437-1449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-00559-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jo-Watanabe A., Okuno T., Yokomizo T.	4. 巻 20
2. 論文標題 The Role of Leukotrienes as Potential Therapeutic Targets in Allergic Disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 3580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20143580.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okuno T and Yokomizo T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Biosynthesis, biological functions and receptors of leukotriene B4 and 12(S)-hydroxyheptadecatrienoic acid.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cutting-Edge Organic Synthesis and Chemical Biology of Bioactive Molecules	6. 最初と最後の頁 233-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-6244-6_10	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki K, Bu W, Eckenhoff RG, Yokomizo T, Okuno T.	4. 巻 525(4)
2. 論文標題 The role of propofol hydroxyl group in 5-lipoxygenase recognition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 909-914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.037.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishihara E, Nagaoka Y, Okuno T, Kofuji S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Kamimura K, Terai S, Yokomizo T, Sugimoto Y, Fujita Y, Suzuki A, Nishina H.	4. 巻 25(3)
2. 論文標題 Prostaglandin E2 and its receptor EP2 trigger signaling that contributes to YAP-mediated cell competition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 197-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12750.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okuno T., Koutsogiannaki S., Hou L., Bu W., Ohto U., Eckenhoff R. G., Yokomizo T., Yuki K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Volatile anesthetics isoflurane and sevoflurane directly target and attenuate Toll-like receptor 4 system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 14528-14541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901570R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Jagusch H., Werner M., Okuno T., Yokomizo T., Werz O., Pohnert G.	4. 巻 21
2. 論文標題 An Alternative Pathway to Leukotriene B4 Enantiomers Involving a 1,8-Diol-Forming Reaction of an Algal Oxylinin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Org Lett	6. 最初と最後の頁 4667-4670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b01554.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Maruyama N., Takai T., Kamiyo S., Suchiva P., Ohba M., Takeshige T., Suzuki M., Hara M., Matsuno K., Harada S., Harada N., Nakae S., Sudo K., Okuno T., Yokomizo T., Ogawa H., Okumura K., Ikeda S.	4. 巻 74
2. 論文標題 Cyclooxygenase inhibition in mice heightens adaptive- and innate-type responses against inhaled protease allergen and IL-33.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2237-2240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.13831.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koutsogiannaki S., Hou L., Babazada H., Okuno T., Blazon-Brown N., Soriano S. G., Yokomizo T., Yuki K.	4. 巻 33
2. 論文標題 The volatile anesthetic sevoflurane reduces neutrophil apoptosis via Fas death domain-Fas-associated death domain interaction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 12668-12679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901360R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Lee H. C., Tominaga M., Yasukawa K., Ohba M., Takahashi N., Honda K., Okuno T., Takamori K., Yokomizo T.	4. 巻 95
2. 論文標題 Dietary supplementation of omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid does not ameliorate pruritus in murine models of atopic dermatitis and psoriasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 130-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2019.07.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 奥野利明, 横溝岳彦
2. 発表標題 ロイコトリエンB4受容体BLT1、BLT2のリガンド認識機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥野利明, 高橋七瀬, 横溝岳彦.
2. 発表標題 ヒト陣痛における羊水中PGE2蓄積は細胞質型PGE合成酵素依存적である.
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴澤博嗣, 古賀友紹, 佐伯和子, 奥野利明, 綿田裕孝, 横溝岳彦.
2. 発表標題 代謝におけるロイコトリエンA4水解酵素の役割の解析.
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okuno T, Takahashi N, and Yokomizo T.
2. 発表標題 Mechanism of prostaglandin E2 accumulation in amniotic fluid during human labor
3. 学会等名 67th American Society for Mass Spectrometry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okuno T., Takahashi N., Yokomizo T.
2. 発表標題 COX-2, cPGES, and SLC02A1-dependent ammonic PGE2 accumulation during human labor.
3. 学会等名 60th ICBL, International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashimoto Y., Ito N., Saigusa D., Okuno T., Yokomizo T.
2. 発表標題 Lysophosphatidic Acid Mediates Acute Inflammatory Pain in Mice Models.
3. 学会等名 60th ICBL, International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uzawa H., Saeki K., Koga T., Okuno T., Miyatsuka T., Watada H., Yokomizo T.
2. 発表標題 The role of leukotriene A4 hydrolase in metabolism.
3. 学会等名 60th ICBL, International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koutsogiannaki S., Wang W., Bautista J., Okuno T., Yokomizo T., Yuki K.
2. 発表標題 2 integrins affect eicosanoid production and breast cancer growth.
3. 学会等名 60th ICBL, International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koga T., Sasaki F., Saeki K., Okuno T., Nakao M., Yokomizo T.
2. 発表標題 Spatiotemporal regulation of novel DC subsets by LTB4-BLT1 signaling.
3. 学会等名 60th ICBL, International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirakata T., Lee C. H., Yasukawa K., Adachi K., Saeki K., Okuno T., Murakami A., Matsuda A., Yokomizo T.
2. 発表標題 Deficiency of BLT1, the high-affinity receptor for LTB4, alleviates allergic conjunctivitis in mice.
3. 学会等名 60th ICBL, International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okuno T., Jimbo K., Ohgaki R., Kanai Y., Shimizu T., Yokomizo T.
2. 発表標題 Identification of a novel mutation in SLC02A1 gene, encoding a prostaglandin transporter.
3. 学会等名 16th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasukawa K., Lee C. H., Tominaga M., Ohba M., Takahashi N., Honda K., Okuno T., Takamori K., Yokomizo T.
2. 発表標題 The effects of dietary supplementation of an omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid on pruritus in murine atopic dermatitis and psoriasis models.
3. 学会等名 16th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hoshino Y., Ito N., Saigusa D., Okuno T., Yokomizo T.
2. 発表標題 Lysophosphatidic acid mediates formalin-induced inflammatory pain in mice.
3. 学会等名 49th Annual meeting of the society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Publication List http://plaza.umin.ac.jp/j_bio/publication.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------