

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460184

研究課題名(和文) -3系および -6系脂肪酸由来エイコサノイドの細胞外放出機構に関する研究

研究課題名(英文) Mechanisms of prostanoids release from the cells

研究代表者

山口 浩明 (Yamaguchi, Hiroaki)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：80400373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エイコサノイドの細胞外放出について解析を行った。LC/MS/MSによる細胞内および細胞外エイコサノイドの一斉定量系を新規に確立し、培養細胞系あるいは細胞膜小胞輸送実験系に応用した。プロスタノイド産生細胞として汎用されるA549細胞において、PGE₂、PGF₂、TXB₂が細胞外に放出された。各種阻害剤やMRP4 siRNAを用い、これらの細胞外放出におけるMRP4の寄与を評価したところ、PGE₂とPGF₂の細胞外放出には部分的にMRP4が寄与し、一方でTXB₂の細胞外放出にMRP4は寄与しないことを明らかとした。EPA由来3型プロスタノイドにおいても同様の結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to estimate the contribution of transporters to the prostanoids release from the cells. We established the LC/MS/MS analytical methods and applied to the in vitro studies using determination of prostanoids released from culture cells and vesicular transport assay. In the experimentes using MRP inhibitors and MRP4 siRNA, MRP4 partly contributes to the release of PGE₂ and PGF₂ but not TXB₂ from A549 cells. EPA-derived prostanoids also showed similar results.

研究分野：薬物動態学

キーワード：プロスタノイド トランスポーター 細胞外放出

1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症誘発に関わる -6 系脂肪酸由来エイコサノイドおよび収束に関わるレゾルビンやプロテクチンなどの specialized pro-resolving mediator (SPM) を含め、脂質メディエーターの細胞外放出機構についてはほとんど明らかとされていない。脂質メディエーターは、それらの分子内に親水性の官能基を有することからなんらかのタンパク質が細胞外放出機構として働いていると考えられている。

(2) 複数の有機アニオントランスポーター (organic anion transporter (OAT) ファミリー、organic anion transporting polypeptide (OATP) ファミリー、multidrug resistance-associated protein (MRP) ファミリー) がエイコサノイドを輸送することが報告されている (J. Pharmacol. Exp. Ther. 301:293-298, 2002; Science 268:866-869, 1995; Curr. Med. Chem. 15:1981-2039, 2008)。エイコサノイドの作用発現を考えた場合、細胞内で産生されたエイコサノイドが細胞外に放出されて受容体に結合する必要がある。しかしながら、内因的に産生される脂質メディエーターの細胞外放出に関わるトランスポーターの寄与を明らかにした報告は皆無である。

(3) 申請者は、トランスポーター機能解析とともに脂質メディエーター、特にエイコサノイドを中心とした生体内微量分子の分析系の確立を行っている。細胞外のみならず細胞内の主要プロスタノイドの一斉定量系を構築している (J. Chromatogr. B 879:3378-3385, 2011)。

(4) ヒト肺がん細胞株 A549 におけるプロスタノイドの細胞外放出を検討したところ、PGE₂ と TXB₂ の細胞外放出に対する MRP 阻害剤の感受性が異なっていた。

2. 研究の目的

脂質メディエーター、特にエイコサノイドの細胞外放出機構について、これまでに未同定の放出機構の解明も含めた解析を行い、エイコサノイド放出制御による炎症性疾患治療の可能性について基礎的情報を蓄積することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LC/MS/MS による細胞内および細胞外エイコサノイドの一斉定量系を確立した。

(2) MRP4 発現膜小胞輸送系を用いてエイコサノイドの輸送特性を解析した。

(3) A549 細胞より調製した膜小胞を用い、PGE₂ の輸送特性を解析した。

4. 研究成果

(1) エイコサペンタエン酸由来 3 型プロスタノイドである PGE₃、PGD₃、PGF₃、TXB₃、17-6-keto PGF₃ の細胞内および細胞外量の定量系を確立した。分析法バリデーションの実施により、高精度・高確度な方法であることを確認した。本法を A549 細胞に応用したところ、細胞内では PGE₃ と TXB₃、細胞外では PGE₃、PGF₃ および TXB₃ が観察された (図 1)。

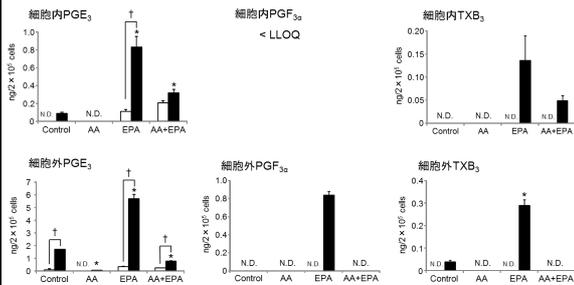


図1 A549細胞における細胞内および細胞外の3型プロスタノイド

AA: アラキドン酸添加, EPA: エイコサペンタエン酸添加, AA+EPA: アラキドン酸+エイコサペンタエン酸添加
□: A23187刺激なし ■: A23187刺激あり

(2) MRP4 発現細胞膜小胞を用い、PGE₃、PGF₃ および TXB₃ の輸送特性を解析した。これらのプロスタノイドは ATP 依存的に MRP4 により輸送されることが明らかとなった (図 2)。

また、MRP4 を介した輸送の見かけのミカエリス定数 (K_m) は、2.9 μM (PGE₃)、12.1 μM (PGF₃) および 11.9 μM (TXB₃) であった。

各種阻害剤を用いた検討より、これらの 3 型プロスタノイドは、既知の MRP4 基質と同様の阻害剤感受性を示したことから、MRP4 の新規基質であることを明らかにした。

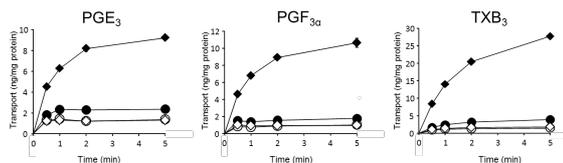


図2 MRP4を介したPGE₃、PGF_{3a}、TXB₃の輸送

○: コントロール細胞-ATPなし ●: コントロール細胞-ATPあり
◇: MRP4過剰発現細胞-ATPなし ◆: MRP4過剰発現細胞-ATPあり

(3) A549 細胞におけるプロスタグランジン放出における MRP4 の寄与を見積もるために、阻害剤を用いた検討と siRNA を用いた検討を行った。阻害剤を用いた検討では、ジピリダモールが PGE₂、PGF₂ および TXB₂ の細胞外放出を有意に阻害した。しかし、PGE₂、PGF₂ に比べ TXB₂ への阻害の程度は弱かった。一方で、プロベネシドは、PGE₂、PGF₂ 阻害せず TXB₂ を有意に阻害した (図 3)。siRNA を用いて MRP4 をノックダウンしたところ、PGE₂ と PGF₂ は有意に細胞外放出量の低下が認められたが、TXB₂ の細胞外放出量は変動しなかった (図 4)。上記の結果より、PGE₂ と PGF₂ の細胞外放出に関して MRP4 は部分的に寄与していること、また TXB₂ の細胞外放出に MRP4 が寄与しないことを明らかとした。3 型プロスタノ

イドについても同様の検討を行い、2型プロスタノイドと同様の結果を得た。

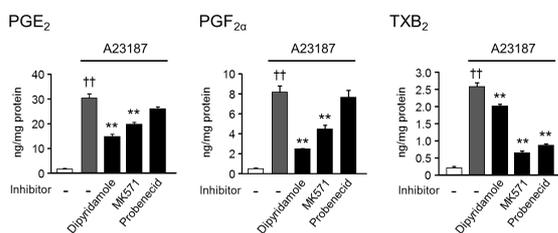


図3 A549細胞におけるMRP4を介したPGE₂、PGF_{2α}、TXB₂の細胞外放出に及ぼす各種阻害剤の影響

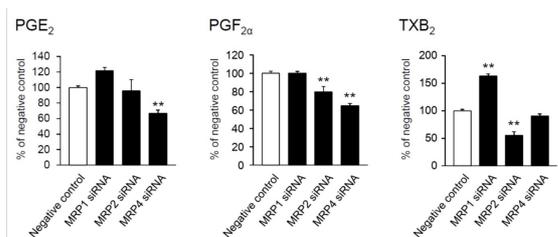


図4 A549細胞におけるPGE₂、PGF_{2α}、TXB₂の細胞外放出に及ぼすMRP1、MRP2およびMRP4 siRNAの影響

(4)MRP4 以外のプロスタノイド放出タンパク質の輸送特性を精査するため、A549細胞より調製した膜小胞におけるATP非依存的なPGE₂の輸送を解析した。種々の駆動力に関する検討を行ったところ、pH依存的な輸送が認められた。また、阻害剤の感受性は、これまでプロスタノイドを輸送すると報告されているトランスポーターのものとは異なることより、新規プロスタノイド放出トランスポーターの存在が示唆された。

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19件)

石井英昭、山口浩明、眞野成康、Chemical and Pharmaceutical Bulletin、査読有、Shifting the linear range in electrospray ionization by in-source collision-induced dissociation、64巻、2016、356-359

小原拓、山口浩明ら、他11名(2番目)、Advances in Pharmacoepidemiology & Drug Safety、査読有、Prevalence, determinants, and reasons for non-reporting of adverse drug reaction by pharmacists in Miyagi and Hokkaido regions of Japan、4巻、2015、191、DOI: 10.4172/2167-1052.1000191

佐々木将太郎、小林正紀、山口浩明ら、他3名(5番目)、PLoS One、査読有、Involvement of histidine residue His382 in pH regulation of MCT4 activity、10巻、2015、e0122738、DOI: 10.1371/journal.pone.0122738

小倉次郎、桑山果織、山口浩明ら、他9名(11番目)、Biochemical Pharmacology、査読有、Reactive oxygen species derived from xanthine oxidase interrupt dimerization of breast cancer resistance protein, resulting in suppression of uric acid excretion to the intestinal lumen、97巻、2015、89-98、DOI: 10.1016/j.bcp.2015.06.021

前川正充、島田美樹、山口浩明ら、他7名(9番目)、Annals of Clinical Biochemistry、査読有、Focused metabolomics using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for analysis of urinary conjugated cholesterol metabolites from patients with Niemann Pick disease type C and 3-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency、52巻、2015、576-587、DOI: 10.1177/0004563214568871

古堅彩子、山口浩明、眞野成康、Biomedical Chromatography、査読有、Simultaneous quantification of leukotrienes and hydroxyeicosatetraenoic acids in cell culture medium using liquid chromatography/tandem mass spectrometry、29巻、2015、1084-1093、DOI: 10.1002/bmc.3395

山口浩明ら、他4名(1番目)、Analytical Chemistry、査読有、A novel extraction method based on a reversible chemical conversion for the LC/MS/MS analysis of the stable organic germanium compound Ge-132、87巻、2015、2042-2047、DOI: 10.1021/ac504466u

佐々木愛、福田隼、山口浩明ら、他6名(9番目)、Analytical and Bioanalytical Chemistry、査読有、Determination of -6 and -3 PUFA metabolites in human urine samples using UPLC/MS/MS、407巻、2015、1625-1639、DOI: 10.1007/s00216-014-8412-5

佐藤紀宏、山口浩明ら、他3名(2番目)、Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences、査読有、Organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3 play an important role in uremic toxin handling and drug-uremic toxin interactions in the liver、17巻、2014、475-484

山口浩明ら、他7名(1番目)、Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences、査読有、972巻、2014、73-80、

DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.09.043

田中伸明、山口浩明、眞野成康、PLoS One、査読有、Transport of eicosapentaenoic acid-derived PGE₃, PGF₃, and TXB₃ by ABCC4、9巻、2014、e109270、DOI: 10.1371/journal.pone.0109270

田中伸明、山口浩明ら、他6名(2番目)、Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids、査読有、Quantification of intracellular and extracellular eicosapentaenoic acid-derived 3-series prostanoids by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry、91巻、2014、61-71、DOI: 10.1016/j.plefa.2014.04.005

辻本高志、小倉次郎、山口浩明ら、他6(8番目)、International Journal of Pharmaceutics、査読有、Effect of oxidative stress on expression and function of human and rat organic anion transporting polypeptides in the liver、458巻、2013、262-271、DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.10.013

丸山創、小倉次郎、山口浩明ら、他7名(9番目)、Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences、査読有、Intestinal ischemia-reperfusion suppresses biliary excretion of hepatic organic anion transporting polypeptides substrate、16巻、2013、722-731

鈴木貴宏、山口浩明ら、他4名(2番目)、Antimicrobial Agents and Chemotherapy、査読有、Megalin contributes to kidney accumulation and nephrotoxicity of colistin、57巻、2013、6319-6324、DOI: 10.1128/AAC.00254-13

大竹翔、小林正紀、山口浩明ら、他9名(10番目)、Biological and Pharmaceutical Bulletin、査読有、Regulation of the expression and activity of glucose and lactic acid metabolism-related genes by protein kinase C in skeletal muscle cells、36巻、2013、1435-1439、DOI: 10.1248/bpb.b13-00141

古堅彩子、山口浩明ら、他5名(2番目)、Prostaglandins & Other Lipid Mediators、査読有、Contribution of multidrug resistance-associated proteins (MRPs) to the release of prostanoids from A549 cells、106巻、2013、37-44、DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2013.08.002

佐々木将太郎、小林正紀、山口浩明ら、他4名(5番目)、PLoS One、査読有、Crucial residue involved in L-lactate recognition by human monocarboxylate transporter 4 (hMCT4)、8巻、2013、e67690、DOI: 10.1371/journal.pone.0067690

小林正紀、合田圭祐、山口浩明ら、他8名(10番目)、International Journal of Pharmaceutics、査読有、Regulation of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) expression by statins: involvement of SREBP-mediated gene regulation、452巻、2013、36-41、DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.04.019

〔学会発表〕(計25件)

小原拓、吉田真貴子、山口浩明、赤坂和俊、松浦正樹、佐藤真由美、村井ユリ子、土屋文人、北田光一、眞野成康、本邦の薬剤師におけるファーマコビジランスに関する認識と展望、日本薬学会第136年会、2016年3月26~29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

菊地正史、野田あおい、田中雅樹、高橋阿希子、松田安史、星川康、久道周彦、山口浩明、岡田克典、眞野成康、イトラコナゾールの併用によりシロリムストラフ濃度が高値を示したリンパ脈管筋腫症患者の2例、第25回日本医療薬学会年会、2015年11月21~23日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

野田あおい、田中雅樹、高崎新也、鈴木裕之、菊地正史、川崎芳英、伊藤明宏、久道周彦、山口浩明、荒井陽一、眞野成康、アキシチニブの血中濃度が上昇しなかった腎細胞癌患者の一例、第25回日本医療薬学会年会、2015年11月21~23日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

前川正充、小椋哲雄、菊地正史、田中雅樹、中曽根正皓、野田あおい、矢内一成、鈴木博也、赤坂和俊、久道周彦、山口浩明、眞野成康、薬毒物中毒原因物質のLC/MS/MS分析システムの検討、第25回日本医療薬学会年会、2015年11月21~23日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

前川正充、島田美樹、飯田隆、成田綾、山口浩明、眞野成康、尿中抱合型コレステロール代謝物によるニーマンピック病C型の化学診断の可能性、第37回胆汁酸研究会、2015年11月7日、横浜ホテルニューグランド(神奈川県横浜市)

前川正充、成田綾、大野耕策、飯田隆、島田美樹、山口浩明、眞野成康、ニーマンピック病C型の診断マーカーとしての尿中抱合型コレステロール代謝物の性能評価、第55回

日本臨床化学会年次学術集会、2015年10月30日～11月1日、大阪大学コンベンションセンター（大阪府吹田市）

山口浩明、島田康弘、武田知也、中村宜司、眞野成康、可逆的化學変換を利用した新規抽出法による有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 定量法の開発、第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2015年08月21～22日、長崎大学文教キャンパス（長崎県長崎市）

石井英昭、島田美樹、山口浩明、眞野成康、HILIC/MS/MSによるヒト血漿中5-FU及び代謝物の一斉測定系の確立、第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2015年08月21～22日、長崎大学文教キャンパス（長崎県長崎市）

原佳史、山口浩明、眞野成康、LC/ESI-MS/MSを用いる血中キヌレニン経路代謝物の一斉定量法の開発、第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2015年08月21～22日、長崎大学文教キャンパス（長崎県長崎市）

阿部一樹、鈴木裕之、山口浩明、眞野成康、LC/ESI-MS/MSを用いた尿中アシルカルニチンの一斉定量法の構築、第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2015年08月21～22日、長崎大学文教キャンパス（長崎県長崎市）

小原拓、山口浩明、松浦正樹、村井ユリ子、土屋文人、北田光一、眞野成康、本邦のファーマコビジランスに関する薬剤師の認識、第18回日本医薬品情報学会総会・学術大会、2015年6月27～28日、岡山大学創立五十周年記念館（岡山県岡山市）

松浦正樹、小原拓、山口浩明、村井ユリ子、土屋文人、北田光一、眞野成康、本邦の薬剤師における副作用報告経験の実体、日本病院薬剤師会東北ブロック第5回学術大会、2015年6月6～7日、山形テルサ（山形県山形市）

山口浩明、分離分析法を活用した TDM、第32回日本 TDM 学会・学術大会、2015年5月23～24日、キッセイ文化ホール（長野県松本市）

田中申明、山口浩明、眞野成康、EPA 由来プロスタグランジン及びトロンボキサンのABCC4を介した細胞外放出、日本薬学会第135年会、2015年3月25～28日、兵庫医療大学（兵庫県神戸市）

山口浩明、関口穂乃佳、猪俣翔、山岸裕、丸山健一、眞野成康、トランスポーター機能評価に用いる新規蛍光基質の開発、第8回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2014年11月15～16日、熊本大学薬学部（熊

本県熊本市）

山口浩明、阿部高明、眞野成康、Identification of the OATP1B3-specific compound LST-02、19th North American Regional ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting、2014年10月19～23日、San Francisco（USA）

佐藤紀宏、山口浩明、古川巧馬、阿部高明、眞野成康、Organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3 play an important role in uremic toxin handling and drug-uremic toxin interactions in the liver、19th North American Regional ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting、2014年10月19～23日、San Francisco（USA）

相馬真志、菊地正史、前川正充、鈴木裕之、久道周彦、山口浩明、島田美樹、眞野成康、カラムスイッチング LC/ESI-MS/MS を用いるミコフェノール酸の血中濃度測定法の構築、第24回日本医療薬学会年会、2014年09月27～28日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

有賀伸、木下一郎、山口浩明、清水康、天野虎次、田口純、本間理央、合田智宏、山田武宏、井関健、秋田弘俊、DCF 療法（ドセタキセル、シスプラチン、5-FU 併用療法）における各抗がん薬の血中濃度解析、第12回日本臨床腫瘍学会学術集会、2014年7月17～19日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

田中申明、山口浩明、古堅彩子、井関健、3型プロスタノイドの細胞外放出におけるMRP4の寄与、日本薬学会第134年会、2014年3月27日～30日、熊本大学黒髪キャンパス（熊本県熊本市）

②山口浩明、駒澤宏紀、日高和宏、井関健、Alteration of kidney transporters in adenine-induced chronic renal failure rats、28th JSSX Annual Meeting、2013年10月09日～2013年10月11日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

②佐藤紀宏、山口浩明、古川巧馬、井関健、Drug-uremic toxin interaction through organic anion transporting polypeptides、28th JSSX Annual Meeting、2013年10月09日～2013年10月11日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

③山口浩明、藤川あす歌、田中申明、伊藤創、椎田成、山田武宏、本間理央、清水康、竹内啓、天野虎次、木下一郎、秋田弘俊、井関健、DCF 療法（ドセタキセル、シスプラチン、5-FU 併用療法）における各抗がん薬の血中濃度解析、日本医療薬学会第23回年会、2013年9

月 21 日～23 日、仙台国際センター（宮城県
仙台市）

〔その他〕

ホームページ等

東北大学病院 薬剤部

<http://www.pharm.hosp.tohoku.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

山口 浩明 (YAMAGUCHI, HIROAKI)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：80400373