

Eicosanoidの細胞外放出過程における multidrug resistance - associated protein (MRP) の寄与に関する研究

学位論文内容の要旨

Eicosanoid は、炭素数 20 の不飽和脂肪酸より生成される prostaglandin (PG)、thromboxane (TX)、leukotriene (LT) および hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) などの生理活性脂質の総称である。その多くはアラキドン酸を出発物質として、cyclooxygenase (COX) 経路を介して PG や TX などの prostanoid に、lipoxygenase (LOX) 経路を介して LT や HETE となる。Eicosanoid は、様々な生理学および病態学的過程に関与していることから、その制御機構に関する知見は重要な意義を持つ。アラキドン酸カスケードにより細胞内で生合成された eicosanoid は、細胞外へ放出され細胞膜上に存在する受容体に作用する。したがって、細胞内から細胞外への放出は eicosanoid が作用を発揮する上で重要な過程であると考えられる。Multidrug resistance-associated protein (MRP) は、ATP-binding cassette (ABC) transporter の C subfamily に分類され、9つのメンバーが様々な生体異物および内因性物質の排出トランスポーターとして同定されている。各 MRP を過剰発現させた反転膜小胞を用いた検討により、いくつかの MRP が eicosanoid 輸送活性を有することが報告されている。しかしながら、prostanoid を含む一部の eicosanoid に関しては、MRP による輸送が細胞外放出過程に関与しているか否か十分な検討がなされていない。一方、eicosanoid は多彩な種類が存在し、それぞれが多彩な生理作用を有することから、高確度・高精度な同時定量法の構築は eicosanoid シグナルにおける複雑な変化を正確に捉える上で重要である。近年、選択性および感度高く複数の化合物を一斉分析できる liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) が有力なツールとなっており、本検討においても採用した。本研究は、LC/MS/MS による高確度・高精度な eicosanoid 一斉定量法を構築し、その定量手法を応用することで、prostanoid 放出過程における MRP の寄与を解明することを目的とした。

1) LC/MS/MS による prostanoid 定量法の構築

COX 経路を介してアラキドン酸から生成される主要な prostanoid (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 , TXA_2) の一斉定量法に関して検討した。なお、 PGI_2 および TXA_2 の半減期は極めて短いため、それぞれ非酵素的代謝物である 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ および TXB_2 として定量法を構築した。Prostanoid は細胞膜上の受容体に作用することから、細胞外へ放出された量に関する情報が重要となる。しかし、放出過程を含めた prostanoid シグナル制御機構を理解する上で、細胞中の存在量に関する情報も有用である可能性があると考えられることから、細胞外に加え細胞中における測定法も検討した。検量線は、細胞外が 0.1–100 ng/mL、細胞中測定法が 0.05–50 ng の範囲で良好な直線性を示した。また、構築した定量法によるバリデーションにより、十分な再現性があることが示された。さらに、本定量法はヒト肺癌由来 A549 細胞をはじめとした種々の細胞に適用できることが示された。A549 細胞をカルシウムイオノフォア A23187 で刺激することにより、時間依存的な細胞外 PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ および TXB_2 の増大が観察された。一方、細胞中においてもそれらの prostanoid が検出されたが、観察した時間内に

において、細胞外と比較して細胞中における変化は小さいことが示された。これらの知見は、prostanoidの細胞膜透過が速いことを支持する結果であると考えられた。

2) LC/MS/MSによるLTおよびHETE定量法の構築

LOX経路を介してアラキドン酸から生成されるLTおよびHETE(LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄, 5-HETE, 8-HETE, 12-HETE, 15-HETE)の一斉定量法について検討を行った。検量線は、LTC₄が0.25–10 ng/mL、それ以外の測定対象に関しては0.025–10 ng/mLの範囲で良好な直線性を示した。構築した定量法によるバリデーションにより、本定量法に十分な再現性があることが示された。さらに、ヒト肥満細胞株HMC-1から放出されるLTおよびHETEの定量に適用できることが確認された。

3) Prostanoid細胞外放出過程におけるMRPの寄与

1) で確立した定量法を用いて、prostanoid放出過程におけるMRPの寄与に関する評価を行った。細胞は、1)の検討においてPGE₂, PGF_{2α}およびTXB₂を産生することが明らかとなったA549を使用し、それらprostanoid放出におけるMRP(特にMRP4)の関与を評価した。A23187もしくは炎症性サイトカインinterleukin-1βにより増大した細胞外PGE₂, PGF_{2α}およびTXB₂は、種々のMRP阻害剤(dipyridamole, MK571, probenecid)の処理により減少した。PGE₂およびPGF_{2α}に対する阻害パターンは類似しており、TXB₂に対する阻害パターンは異なった。また、反転膜小胞を用いてMRP4を介した各prostanoid輸送に対する阻害剤の影響を評価したところ、PGE₂およびPGF_{2α}輸送に対する阻害パターンはA549細胞外で観察されたパターンと類似していた。したがって、MRP阻害剤はMRP4を阻害することにより細胞外PGE₂およびPGF_{2α}を減少させることが示唆された。一方で、TXB₂輸送に対する阻害は細胞レベルで観察された阻害パターンと一致しなかったことから、TXA₂放出にはMRP4以外の因子も寄与している可能性が示唆された。さらに、siRNAによるMRP4ノックダウンにより、細胞外PGE₂, PGF_{2α}およびTXB₂は減少することが示された。これらの結果から、A549細胞からのPGE₂, PGF_{2α}およびTXA₂放出にMRP4を含むMRPが関与していることが推察された。一方、MRP阻害剤やsiRNAを処理した場合においても、細胞外prostanoidは確かな量で検出されたことから、今後MRP以外の経路についても検討することが必要であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	井関	健
副査	教授	菅原	満
副査	准教授	武隈	洋
副査	准教授	山口	浩明

学位論文題名

Eicosanoidの細胞外放出過程における multidrug resistance - associated protein (MRP) の寄与に関する研究

博士學位論文審査等の結果について(報告)

Eicosanoidは、様々な生理学および病態学的過程に関与していることから、その制御機構に関する知見は重要な意義を持つ。アラキドン酸カスケードにより細胞内で生合成され、細胞外へ放出され細胞膜上に存在する受容体に作用する。したがって、細胞内から細胞外への放出は eicosanoid が作用を発揮する上で重要な過程であると考えられる。すでに、いくつかの MRP が eicosanoid 輸送活性を有することが報告されているが eicosanoid 細胞外放出過程への関与については十分な検討はなされていない。

一方、eicosanoid は多彩な種類が存在し、それぞれが多彩な生理作用を有することから、高確度・高精度な同時定量法の構築は eicosanoid シグナルにおける複雑な変化を正確に捉える上で重要である。近年、選択性および感度高く複数の化合物を一斉分析できる liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) が有力なツールとなっており、本研究は、LC/MS/MS による高確度・高精度な eicosanoid 一斉定量法を構築し、その定量手法を応用することで、prostanoid 放出過程における MRP の寄与を解析したものである。

1) LC/MS/MS による prostanoid 定量法および LT および HETE 定量法の構築

COX を介してアラキドン酸から生成される主要な prostanoid (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 , TXA_2) の一斉定量法に関して検討した。Prostanoid は細胞膜上の受容体に作用することから、細胞外へ放出された量に関する情報が重要となる。しかし、放出過程を含めた prostanoid シグナル制御機構を理解する上で、細胞中の存在量に関する情報も有用である可能性があると考えられることから、細胞外に加え細胞中における測定法も検討した。その結果、本定量法はヒト肺癌由来 A549 細胞をはじめとした種々の細胞に適用できることを示した。また、LOX 経路を介してアラキドン酸から生成される LT および HETE (LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 , 5-HETE, 8-HETE, 12-HETE, 15-HETE) の一斉定量法についても検討を加え、ヒト肥満細胞株 HMC-1 から放出される LT および HETE の定量に適用できることが確認された。

2) Prostanoid 細胞外放出過程における MRP の寄与

A549 細胞をカルシウムイオノフォア A23187 で刺激することにより、時間依存的な細胞外 PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ および TXB_2 の増大が観察された。一方、細胞中においてもそれらの prostanoid が検出されたが、観察した時間内において、細胞外と比較して細胞中における変化は小さいことが示された。これらの知見は、prostanoid の細胞膜透過が速いことを支持する結果である。prostanoid 放出過程における MRP の寄与に関する評価を行った。A23187 もしくは炎症性サイトカイン interleukin- 1β により増大した細胞外 PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ および TXB_2 は、種々の MRP 阻害剤に

より減少した。PGE₂およびPGF_{2α}に対する阻害パターンは類似しており、TXB₂に対する阻害パターンは異なった。また、反転膜小胞を用いてMRP4を介した各prostanoid輸送に対する阻害剤の影響を評価したところ、PGE₂およびPGF_{2α}輸送に対する阻害パターンはA549細胞外で観察されたパターンと類似していた。したがって、MRP阻害剤はMRP4を阻害することにより細胞外PGE₂およびPGF_{2α}を減少させることが示唆された。一方で、TXB₂輸送に対する阻害は細胞レベルで観察された阻害パターンと一致しなかったことから、TXA₂放出にはMRP4以外の因子も寄与している可能性が示唆された。さらに、siRNAによるMRP4ノックダウンにより、細胞外PGE₂、PGF_{2α}およびTXB₂は減少することが示された。これらの結果から、A549細胞からのPGE₂、PGF_{2α}およびTXA₂放出にMRP4を含むMRPが関与していることが推察された。

以上、本研究は、LC/MS/MSによるeicosanoid定量法の構築および放出過程におけるMRPの寄与に関する評価を行い、MRP4がprostanoidの放出に一部関与していることを示唆する結果を得ており、prostanoid放出過程さらには制御機構を理解する上で有用な情報を提供できるものと考えられる。したがって、本論文の成果は有意義なものであり、博士(薬科学)の学位を受けるに値するものと認める。