

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：31101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2019

課題番号：15K08045

研究課題名（和文）プロバイオティクスの薬物動態制御を介した炎症性疾患の予防・治療

研究課題名（英文）Prevention and treatment of inflammatory diseases: control of pharmacokinetics with probiotics

研究代表者

清水 美貴子 (Mikiko, Shimizu)

青森大学・薬学部・教授

研究者番号：90396391

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト小腸モデルCaco-2細胞を用いた実験により、プロバイオティクスは、腸管炎症の抑制および薬物療法の副作用軽減作用を示すことを明らかにした。慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞およびコラーゲン誘発リウマチラットを用いた実験により、炎症シグナル伝達経路の抑制を介して、抗リウマチ作用を有する菌種を見出した。また、抗リウマチ治療薬であるメトトレキサートとの併用により、抗リウマチ効果の増大が認められた。その一要因として、プロバイオティクスがメトトレキサートの体内動態を変化させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病態モデルを用いた本研究の結果、プロバイオティクスは炎症性疾患（炎症性腸疾患および慢性関節リウマチ）の予防・治療効果を示すことが明らかとなった。特に、慢性関節リウマチ治療薬メトトレキサートとの併用において、治療効果の増大を示すと共に、薬物治療の副作用の軽減につながる可能性のある菌種を見出した。また、それらの作用機序についても明らかにした。従って、プロバイオティクス摂取は、炎症性疾患治療薬の適正使用、治療の効率化に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In experiments using human intestinal epithelial-like Caco-2 cells, we found that probiotics suppress intestinal inflammation and reduce the side effects of drug therapy. In experiments using human fibroblast-like synoviocytes-rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis rats, we found a bifidobacteria strain that exerts antirheumatic activity through suppression of signal transduction in inflammatory processes. In addition, it was confirmed that the effect was increased with the combined administration of the antirheumatic agent methotrexate. The results suggest that probiotics may change the pharmacokinetics of methotrexate.

研究分野：薬物動態学 臨床薬理学

キーワード：プロバイオティクス 炎症性腸疾患 間接リウマチ サイトカイン 薬物動態 細胞障害 副作用軽減
メトトレキサート

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患のうち、潰瘍性大腸炎やクローン病等の炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease ; 以下 IBD) は、消化管粘膜に炎症や潰瘍を生じる原因不明の慢性疾患であり、厚生労働省により「特定疾患」に指定されている。主に 10~20 歳代の若年者に発症し、国内における患者数が急増 (2014 年で 16.5 万人) していることから、“腸の現代病”とも呼ばれている。発症要因として、腸内細菌に対する免疫反応の異常が注目され、免疫抑制剤等に加えて、生物学的製剤が登場したことにより、炎症性腸疾患の治療は飛躍的に進歩した。一方で、医療費の高騰や新たな副作用の問題が懸念されている。このような状況下、国内外では、プロバイオティクスを用いた治療法が検討されるようになった。従って、今後、IBD の患者では、治療薬とプロバイオティクスを併用する機会が増加することが予想される。一方、薬物代謝酵素や薬物輸送担体の機能は、炎症 (cytokine 等の免疫機能の変化) により変化することが、最近の *in vitro* および動物を用いた研究で報告されている。また、申請者らは、プロバイオティクスが消化管での薬物代謝酵素や薬物輸送担体の機能を阻害あるいは誘導し、医薬品の体内動態を変化させることを見出している。従って、炎症疾患の程度により、薬物代謝酵素や薬物輸送担体の機能、ひいては、治療薬の体内動態が大きく変動することが予想される。またその現象は、治療薬とプロバイオティクスの相互作用により、更に複雑になると考えた。

また、慢性関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis ; 以下 RA) は全身の関節における慢性・持続性の炎症性自己免疫疾患である。現在、我が国の RA 患者数は約 80 万人であり、年間に約 1 万 5 千人が新たに発症すると言われているが、その病態や原因は未解明な点が多い。現行の RA 治療では、臨床効果および利便性の高い Methotrexate (MTX) が anchor drug として使用されているが、治療反応性や副作用の発現には大きな個体差があり、至適投与量の推定が難しく、症状のコントロールの妨げとなっている。申請者らは、プロバイオティクスは消化管だけでなく RA の標的組織 (滑膜細胞) の薬物代謝酵素や薬物輸送担体機能を変化させ、MTX の効果に影響を及ぼす可能性があると考えた。また、RA に対するプロバイオティクスの有用性に関する報告はないが、免疫系を介した効果が期待できると考えた。更に MTX は、その細胞増殖抑制作用による極めて重篤な消化管障害 (吸収不良症候群) を引き起こすため、プロバイオティクスの腸管バリアー機能に期待した。

2. 研究の目的

当該分野における国内外の動向を踏まえ、本研究では、炎症性疾患の予防・治療における“プロバイオティクス”摂取の臨床的意義を明確にする事を目的に、①炎症性腸疾患における薬物動態制御、②慢性関節リウマチ治療の効率化の観点から、包括的な評価を行った。本研究により、炎症性疾患の予防・治療におけるプロバイオティクス摂取の臨床的有用性と、炎症性疾患治療薬の適正使用に関する情報を発信することができる。

3. 研究の方法

プロバイオティクスとして、代表的な腸内細菌である *Lactobacillus* 属の *L.casei* と、その整腸作用により“特定保健用食品”として市販されている *Bifidobacterium* 属の菌種 (*Bif*) を用いた。

1) 炎症性腸疾患における薬物動態制御

ヒト小腸のモデルとして 3 週間培養した Caco-2 細胞を用い、炎症性 cytokine およびプロバイオティクスを曝露した。細胞から total RNA を抽出後、real-time PCR 法を用いて炎症関連遺伝子および薬物動態関連遺伝子の発現量を測定した。また、cytokine 濃度を ELISA 法にて定量した。炎症および薬物由来の細胞障害の程度は、アポトーシス関連因子のタンパク発現量をイムノブロット法を用いて測定した。

2) 慢性関節リウマチ治療の効率化

① *In vitro* study

ヒト RA のモデルとして慢性関節リウマチ患者由来滑膜細胞 (HFLS-RA) を用い、炎症性 cytokine、プロバイオティクスおよび MTX を曝露した。細胞から total RNA を抽出後、real-time PCR 法を用いて RA 関連遺伝子および薬物動態関連遺伝子の発現量を測定した。また、ELISA 法を用いて cytokine 濃度を定量した。炎症シグナル伝達経路のタンパク発現量はイムノブロット法を用いて測定した。

② *In vivo* study ;

Collagen-induced arthritis (CIA) ラットを作製し、*Bif* および MTX を経口投与後、RA の発症の有無とその推移を評価した。RA 関連遺伝子の発現量は real-time PCR 法、炎症シグナル伝達経路のタンパク発現量はイムノブロット法を用いて測定した。

4. 研究成果

1) 炎症性腸疾患における薬物動態制御

Caco-2 細胞を用いた炎症性腸疾患モデルにおいて、炎症性 cytokine の遺伝子発現量および濃度を減少させ、抗炎症性 cytokine の遺伝子発現量および濃度を増加させる菌種が認められた。これら菌種の曝露は、アポトーシス関連因子のタンパク発現量を減少させた。炎症および薬物由来の細胞障害の抑制効果の程度は菌種により異なっていた。薬物動態関連遺伝子発現量に対する影響も菌種により異なった。

本結果により、腸管炎症の抑制および薬物療法由来の副作用の軽減に役立つ可能性を持つプロバイオティクス菌種を見出すことが出来た。従って、プロバイオティクスとの併用により、IBD に対する薬物療法の効率化が期待できると考えた。

2) 慢性関節リウマチ治療の効率化

① *In vitro* study

HFLS-RA 細胞を用いた RA モデルにおいて、炎症性 cytokine およびシグナル伝達経路の活性化を抑制する菌種が認められた。特に、市販菌種 *Bif* は、RA 治療薬 MTX との併用により、炎症性 cytokine 濃度を相乗的に減少させた。また、これら菌種の曝露により、RA の疾患活動性マーカーの遺伝子発現量が有意に減少し、薬物動態関連遺伝子の発現量の変化も認められたが、それらの程度は菌種により異なった。

本結果より、*in vitro* の培養細胞を用いた病態モデルだけでなく、*in vivo* においてもプロバイオティクスの抗 RA 作用が期待できると考えた。また、MTX と *Bif* の併用による抗炎症作用の相乗効果には、プロバイオティクスによる MTX の体内動態の変化が寄与している可能性が示唆された。

② *In vivo* study

市販菌種 *Bif* を経口摂取させた CIA ラットでは、炎症シグナル伝達経路の抑制に起因する抗 RA 作用が示された。また、*Bif* と MTX との併用により抗 RA 効果の増大が認められた。

以上の *in vitro* および *in vivo* 実験の結果より、プロバイオティクス摂取は抗 RA 効果を示し、特に市販菌種 *Bif* と MTX との併用は、抗 RA 効果の増大につながる可能性が示唆された。

本研究成果により、炎症性疾患の予防・治療におけるプロバイオティクス摂取の臨床的有用性を示す事が出来た。さらに、プロバイオティクス摂取は、炎症性疾患治療薬の適正使用、治療の効率化に寄与できると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Matsuoka Katsuyoshi, Hamada Shunsuke, Shimizu Mikiko, Nanki Kosaku, Mizuno Shinta, Kiyohara Hiroki, Arai Mari, Sugimoto Shinya, Iwao Yasushi, Ogata Haruhiko, Hisamatsu Tadakazu, Nagauma Makoto, Kanai Takanori, Mochizuki Mayumi, Hashiguchi Masayuki	4. 巻 58
2. 論文標題 Factors contributing to the systemic clearance of infliximab with long-term administration in Japanese patients with Crohn's disease: Analysis using population pharmacokinetics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 89 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5414/CP203569	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 Akiyama S, Matsuoka K, Fukuda K, Hamada S, Shimizu M, Nanki K, Mizuno S, Ohtsuka K, Mochizuki M, Watanabe M, Hashiguchi M, Kanai T	4. 巻 34
2. 論文標題 Long term effect of NUDT15 R139C on hematologic indices in inflammatory bowel disease patients treated with thiopurine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1751 ~ 1757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14693	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 Kido Kazuhiko, Shimizu Mikiko, Hashiguchi Masayuki	4. 巻 59
2. 論文標題 Comparing torsemide versus furosemide in patients with heart failure: A meta-analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Pharmacists Association	6. 最初と最後の頁 432 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.japh.2019.01.014	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 Matsuoka Katsuyoshi, Hamada Shunsuke, Shimizu Mikiko, Nanki Kosaku, Mizuno Shinta, Kiyohara Hiroki, Arai Mari, Sugimoto Shinya, Iwao Yasushi, Ogata Haruhiko, Hisamatsu Tadakazu, Naganuma Makoto, Kanai Takanori, Mochizuki Mayumi, Hashiguchi Masayuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Factors predicting the therapeutic response to infliximab during maintenance therapy in Japanese patients with Crohn's disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0204632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0204632	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 Hakamata Jun, Kaneko Yuko, Shimizu Mikiko, Yamaoka Kunihiro, Maruyama Junya, Takeuchi Tsutomu, Mochizuki Mayumi, Hashiguchi Masayuki	4. 巻 41
2. 論文標題 Factors Predicting the Therapeutic Response to Methotrexate in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis: A Hospital-Based Cohort Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1414 ~ 1422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00247	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 Hashiguchi M, Hakamata J, Shimizu M, Maruyama J, Shiga T, Mochizuki M	4. 巻 49(4)
2. 論文標題 Risk factors for Hyperuricemia with HMG-CoA reductase inhibitors identified using a postmarketing surveillance database in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 145-150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hashiguchi Masayuki, Hakamata Jun, Shimizu Mikiko, Maruyama Junya, Shiga Tsuyoshi, Mochizuki Mayumi	4. 巻 56
2. 論文標題 Risk factors for rhabdomyolysis with HMG-CoA reductase inhibitors identified using a postmarketing surveillance database in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 310 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5414/CP203237	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 Hashiguchi Masayuki, Maruyama Junya, Shimizu Mikiko, Takahashi Daichi, Shiga Tsuyoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Risk Factor for Diabetes Mellitus and High Blood Glucose With HMG-CoA Reductase Inhibitors Using a Postmarketing Surveillance Database in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Pharmacology in Drug Development	6. 最初と最後の頁 800 ~ 810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpdd.444	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 Hakamata Jun, Hashiguchi Masayuki, Kaneko Yuko, Yamaoka Kunihiro, Shimizu Mikiko, Maruyama Junya, Takeuchi Tsutomu, Mochizuki Mayumi	4. 巻 28
2. 論文標題 Risk factors for abnormal hepatic enzyme elevation by methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: A hospital based-cohort study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 611 ~ 620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2017.1414765	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 Hakamata J, Hashiguchi M, Tsuru T, Tanaka T, Irie S, Shimizu M, Mochizuki M	4. 巻 48
2. 論文標題 Ethnic and gender differences in genetic polymorphisms of tumor necrosis factor (TNF)- in a Japanese population.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hashiguchi Masayuki, Shimizu Mikiko, Hakamata Jun, Tsuru Tomomi, Tanaka Takanori, Suzaki Midori, Miyawaki Kumika, Chiyoda Takeshi, Takeuchi Osamu, Hiratsuka Jiro, Irie Shin, Maruyama Junya, Mochizuki Mayumi	4. 巻 2
2. 論文標題 Genetic polymorphisms of enzyme proteins and transporters related to methotrexate response and pharmacokinetics in a Japanese population	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40780-016-0069-0	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 Hashiguchi Masayuki, Tsuru Tomomi, Miyawaki Kumika, Suzaki Midori, Hakamata Jun, Shimizu Mikiko, Irie Shin, Mochizuki Mayumi	4. 巻 2
2. 論文標題 Preliminary study for predicting better methotrexate efficacy in Japanese patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40780-016-0047-6	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 Hashiguchi Masayuki, Tanaka Takanori, Shimizu Mikiko, Tsuru Tomomi, Chiyoda Takeshi, Miyawaki Kumika, Irie Shin, Takeuchi Osamu, Hakamata Jun, Mochizuki Mayumi	4. 巻 56
2. 論文標題 Sex Differences in mRNA Expression of Reduced Folate Carrier-1, Folypolyformyl Glutamate Synthase, and -Glutamyl Hydrolase in a Healthy Japanese Population	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1563 ~ 1569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcph.760	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 Hashiguchi Masayuki, Imai Shungo, Uehara Keiko, Maruyama Junya, Shimizu Mikiko, Mochizuki Mayumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Factors Affecting the Timing of Signal Detection of Adverse Drug Reactions	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0144263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0144263	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 Shimizu Mikiko, Hashiguchi Masayuki, Shiga Tsuyoshi, Tamura Hiro-omi, Mochizuki Mayumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Meta-Analysis: Effects of Probiotic Supplementation on Lipid Profiles in Normal to Mildly Hypercholesterolemic Individuals	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0139795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0139795	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 Hashiguchi Masayuki, Ohta Yuriko, Shimizu Mikiko, Maruyama Junya, Mochizuki Mayumi	4. 巻 1
2. 論文標題 Meta-analysis of the efficacy and safety of Ginkgo biloba extract for the treatment of dementia	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40780-015-0014-7	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 清水美貴子、横川直人、杉井章二、瀬戸口京吾、大島美穂、古館澄人、井沼道子、三浦裕也、橋口正行
2. 発表標題 日本人ループス腎炎患者におけるヒドロキシクロロキンの適正使用に関する検討
3. 学会等名 第40回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yokogawa N, Hashiguchi M, Nagai Y, Shimada K, Sugii S, Ohshima M, Setoguchi K, Shimizu M
2. 発表標題 Pharmacokinetics of hydroxychloroquine in systemic lupus erythematosus patients with renal impairment
3. 学会等名 ACR 2019 (American College of Rheumatology) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野奨太、鈴木真伍、清水美貴子、橋口正行、田村悦臣
2. 発表標題 Methotrexateの抗リウマチ効果に及ぼすポリグルタミン酸数の影響と効果発現機構の検討
3. 学会等名 第38回 日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木真伍、清水美貴子、橋口正行、望月真弓、田村悦臣
2. 発表標題 ヒト滑膜細胞を用いたMethotrexate-polyglutamates体の抗リウマチ効果およびその制御機構の解明
3. 学会等名 第37回 日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鈴木真伍、清水美貴子、松本光晴、袴田潤、橋口正行、望月真弓、田村悦臣
2. 発表標題 関節リウマチに対するプロバイオティクスの有用性とメトトレキサートとの相互作用の検討
3. 学会等名 日本薬学会第136年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 班目陽一、清水美貴子、松本光晴、田村悦臣
2. 発表標題 プロバイオティクスのCYP3A4制御を介した脂質異常症治療の有用性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第136年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 清水美貴子、鈴木真伍、村尾直彦、松本光晴、橋口正行、望月真弓、田村悦臣
2. 発表標題 ヒト小腸でのビフィズ菌によるBCRP発現制御機構の解明
3. 学会等名 第36回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 袴田潤、橋口正行、清水 美貴子、丸山順也、望月真弓
2. 発表標題 関節リウマチ患者におけるメトトレキサートの 治療反応性と遺伝子多型の関連のメタアナリシス
3. 学会等名 第18回 日本医薬品情報学会総会・学術大会
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	橋口 正行 (Hashiguchi Masayuki) (10271355)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・准教授 (32612)	