

令和元年6月21日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18956

研究課題名(和文) 抗がん薬の苦味による臓器特異的なP-gpの機能亢進メカニズムと抑制方法の探索

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism and its suppression method of organ-specific increase in P-gp activity induced by bitter taste of anticancer drug

研究代表者

矢野 健太郎 (Yano, Kentaro)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：40644290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小腸の上皮細胞には口腔内と同様に苦味受容体が発現しており、毒物が有する苦味を感知することで毒物センサーとして機能しているものと考えられる。本研究では、薬物の苦味によって、毒物を掃き出すトランスポーターであるP-糖タンパク質が機能亢進するのではないかと考えた。その結果、苦味物質および抗がん薬によってわずか数十分でP-糖タンパク質の輸送機能が亢進することを明らかにした。さらにそのメカニズムとして、苦味受容体の刺激が消化管ホルモンであるコレシストキニン(CCK)の遊離を促進し、CCK受容体の刺激を介してP-糖タンパク質の膜上発現量の増加が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、薬物を始めとした生体異物の苦味が、小腸のP-糖タンパク質の輸送機能を即時的に機能亢進させること、またそのメカニズムにP-糖タンパク質の膜上発現量の亢進が関与していることが示された。これまでに報告されている小腸におけるP-糖タンパク質を介した相互作用には、P-糖タンパク質の基質薬物間での競合阻害による吸収亢進が挙げられる。これに対して本研究結果は、抗がん薬のように苦味を有するP-糖タンパク質の基質薬物同士を経口投与で併用したときには、即時的なP-糖タンパク質の機能亢進を介してそれらの薬物の吸収が低下することを示唆するものであり、新たな相互作用の存在を提案するものである。

研究成果の概要(英文)：Bitter taste receptors are expressed in epithelial cells of the small intestine as in the oral cavity, and it is considered that they function as a sensor of the toxicant's bitter taste. In this study, I investigated whether the bitter taste of the drug also enhanced the function of P-glycoprotein, an efflux transporter of toxic substances. As a result, it was revealed that the bitter taste substance and anticancer drugs enhance the transport function of P-glycoprotein within 90 minutes. Moreover, it was suggested that, as a mechanism, stimulation of the bitter taste receptor promotes the release of the gastrointestinal hormone cholecystikinin (CCK), and the membrane localization of P-glycoprotein is increased through stimulation of the CCK receptor.

研究分野：薬物動態学

キーワード：P-糖タンパク質 苦味 消化管吸収 輸送機能亢進 消化管ホルモン 抗がん薬 即時的

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

P-糖タンパク質 (P-gp) は、がん細胞をはじめ消化管上皮細胞などの細胞膜上に発現し、毒物や薬物の体内への侵入および蓄積を防いでいる。特にがん細胞においては過剰に発現しており、がん多剤耐性に関与している。従って、現在までに多くの研究者ががん多剤耐性を克服すべく、P-gp を直接阻害する薬剤の開発に果敢に取り組んできているが、それらの薬は臓器特異性が欠如しているため、これらの薬剤は脳などの正常組織の P-gp も阻害してしまい、十分な有用性を示すには至っていない。一方、生体は毒物の苦味を感知し、その吸収を回避する。そこで申請者は、抗がん薬などの P-gp 基質となる薬物は、正常な生体にとって毒となるため苦味を有しているのではないかと考え検討した。その結果、非基質群と比較して顕著に強い苦味を有しており、薬物の分子量や脂溶性といった物性値とともに用いることで、P-gp に対する薬物の基質認識性(Km 値)を簡便に推測できることを明らかにした 1)。

これまでに、苦味を感知する受容体(T2R38)は、舌の味蕾だけでなく腸や肺などの上皮細胞にも発現していることが報告されている。中でも消化管においては、苦味物質であり P-gp 基質でもあるフェニルチオカルバミド (PTC) による苦味受容体の刺激 (消化管ホルモン cholecystokinin(CCK)の分泌 CCK の受容体の刺激といった一連のメカニズムを介して P-gp の輸送機能が苦味物質を感知して 9 時間後に亢進される 2)。申請者らは、P-gp の輸送機能はその mRNA 発現量と必ずしも相関しないこと 3)、ezrin, radixin, moesin (ERM) と呼ばれる膜裏打ちタンパク質のうち、消化管においては radixin が P-gp の細胞膜上局在および輸送機能を調節しており、腎臓においてはいずれも関与していないことを明らかにしている 4)。また、脳への薬物の移行を制限している血液脳関門においては、P-gp の膜上発現に moesin が関与していることが報告されている。これらのことから、ERM タンパクによる P-gp の機能調節には臓器差が存在することが示唆される。さらに、トランスポーターの細胞膜上における発現量の変化は、僅か数十分という短時間で引き起こされ、これにもなって輸送機能も変動することを明らかにしている。一方、強い苦味を有する抗がん薬エトポシドは、低分子量 G-タンパク質の Ras homolog gene family, member A (RhoA) や、これによって活性化されるリン酸化酵素である Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK)を介して radixin をリン酸化し、P-gp の膜上発現量と輸送機能を上昇する 5,6)。これに対して、苦味受容体を刺激したときに分泌される CCK もまた、RhoA/ROCK を活性化する。これらのことから、苦味受容体 CCK 分泌 RhoA/ROCK P-gp の膜上発現量増加に基づく即時的な輸送機能の活性化という流れが示唆されるが、これまでにそのような検討はなされていない。

1. Yano K, et al. J Pharm Sci. 2015; 104(9):2789-94. 2. Jeon TI, et al. The Biochemical journal. 2011; 438(1): 33-7. 3. Ogihara T, et al. Drug Metab Pharmacokinet. 2006; 21(3):238-44 4. Yano K, et al. J Pharm Sci. 2013; 102(8):2875-81. 5. Kobori T, et al. J Pharm Sci. 2013; 102(5): 1670-82. 6. Kobori T, et al. Biol Pharm Bull. 2014;37(7):1124-31.

### 2. 研究の目的

これらの部分的な報告を繋ぎ合わせると、がん細胞はエトポシドなどの抗がん薬の苦味を受容し、CCK や RhoA の活性化を介して ERM をリン酸化することで、P-gp の機能上昇による多剤耐性能を獲得することが想定される。しかしながら、その詳細なメカニズムとして、抗がん薬が苦味受容体を刺激するか、苦味刺激後に分泌された CCK が RhoA/ROCK の活性化を介して radixin のリン酸化および P-gp の膜上発現量を増加し、輸送機能を上昇させるのか、さらには、このメカニズムに臓器差が存在しているかについては明らかになっていない。そこで本研究では、**苦味刺激から P-gp 機能亢進までのシグナル因子を明らかにし、臓器特異的にがん多剤耐性を克服し得る新規薬効標的を提示することを目的とする。**

### 3. 研究の方法

#### 1) 苦味物質による P-gp の輸送機能変化

まず、P-gp の膜上発現に基づく輸送機能調節に Radixin が関与しているヒト消化管がん由来 Caco-2 細胞を用い、苦味受容体(T2R38)および CCK 受容体の mRNA 発現量を real time PCR により確認した。P-gp の輸送機能は、基質薬物である rhodamine123 を用いて細胞内取り込み試験および経細胞試験により評価した。このとき、T2R38 を刺激する典型的な苦味物質である PTC によって P-gp の輸送機能が亢進するかを検討した。

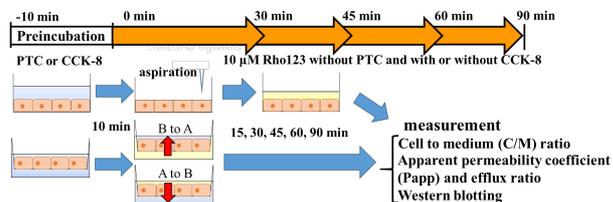


Fig. 1 Time course of uptake and transport study

#### 2) 苦味物質による P-gp 機能亢進に対する CCK の関与

CCK 受容体をあらかじめ阻害した後、苦味物質を添加し P-gp の輸送機能が亢進するかを 1. と同様の実験方法にて評価した。また、Caco-2 細胞に CCK を直接添加した場合にも、P-gp の輸送機能亢進が認められるかについて同様の検討を行なった。

#### 3) CCK による P-gp および ERM タンパクの細胞膜上発現増加

CCK 刺激後の Caco-2 細胞の細胞全体および細胞膜画分を調製し、各画分における P-gp および活性化(リン酸化)された ERM のタンパク発現量を Western blotting 法により定量し、苦味受容体刺激後のメカニズムについて検討した。

#### 4) 苦味物質による P-gp の輸送機能変化

消化管において P-gp の足場タンパクを活性化することに加えて、苦味を有することが確認されているエトポシドを暴露し、1)における検討と同様の手法にて P-gp の輸送機能を評価した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 苦味物質による P-gp の輸送機能変化および 2) 苦味物質による P-gp 機能亢進に対する CCK の関与

まず初めに、Caco-2 細胞において T2R38 および CCK 受容体の mRNA が発現していたことから、苦味物質を感知して以降の細胞内情報伝達が行われ得ることを確認した。そこで、苦味物質である PTC を前処理した後に Rho123 を暴露したところ、90 分程度で Rho123 の細胞内蓄積量が未処理群よりも有意に低下した (Fig. 2A)。またこのとき、CCK 受容体の阻害薬 (YM022) を処理したところ、PTC による Rho123 の細胞内蓄積量の低下が消失した (Fig. 2B)。

これらのことから、PTC による P-gp の輸送機能亢進は、CCK 受容体の刺激を介して数十分という短時間でも引き起こされることが示唆された。

そこで、PTC による Rho123 の細胞内蓄積量の低下が、P-gp の輸送機能亢進によるものであることをより詳細に確認するため、経細胞実験にて Rho123 輸送に対する PTC および CCK 受容体阻害薬の影響を評価した。その結果、消化管から血液方向 (吸収方向、A to B) における Rho123 の輸送速度には、PTC による影響が認められなかったものの、血液側から消化管方向 (排出方向、B to A) への輸送速度は有意に亢進した (Fig. 3)。吸収速度に対する排出速度の比 (efflux ratio) を算出したところ、排出が有意な輸送であることが確認された。一方、YM022 の処理によって、PTC による輸送速度の亢進が消失した。

以上の検討から、苦味物質による即時的な P-gp の輸送機能亢進が示されるとともに、そのメカニズムのひとつに消化管ホルモンの受容体刺激が関与していることが考えられた。

次に、CCK 受容体の刺激が関与していることが考えられたことから、CCK を直接添加した際にも同様の現象が認められるかについて検討を行なった。その結果、取り込み試験において、苦味物質添加時よりもさらに早い時間 (30 分) で Rho123 の細胞内蓄積量の有意な低下が確認された (Fig. 4)。また、経細胞実験においても CCK 添加により、吸収方向よりも排出方向の輸送速度が有意に増加した (Fig. 5)。

したがって、苦味物質添加時と同様に CCK 添加によっても、即時的に消化管の P-gp の輸送

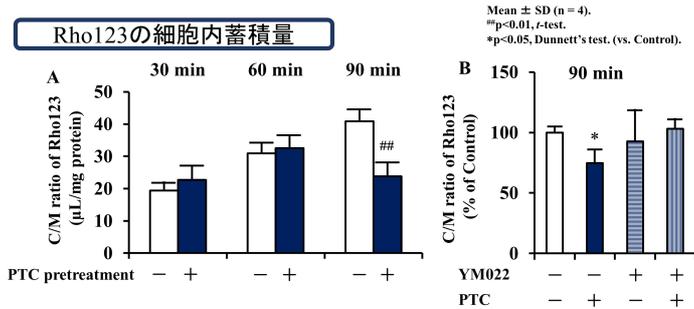


Fig. 2 PTCによるRho123の細胞内蓄積量の変化とCCK受容体阻害薬の影響

Rho123添加90分後の細胞内蓄積量は、PTCの前処理により有意に低下した。このPTCによる低下はYM022により阻害された。

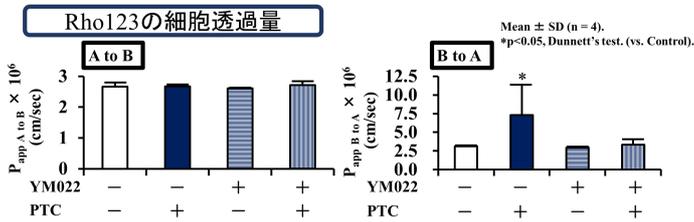


Fig. 3 PTCによるRho123の細胞透過量の変化とCCK受容体阻害薬の影響

Rho123のB to A方向の細胞透過量は、PTCの前処理により有意に増加した。このPTCによる増加はYM022により阻害された。

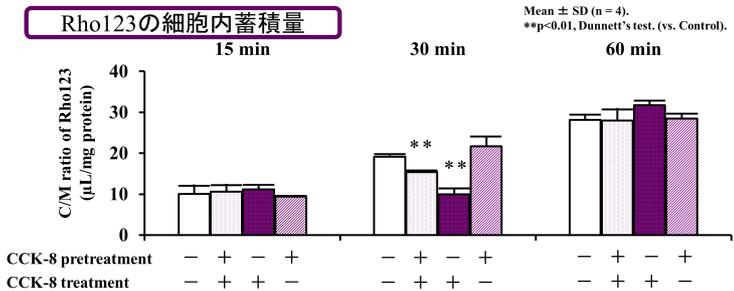


Fig. 4 CCKによるRho123の細胞内蓄積量の変化

Rho123添加30分後の細胞内蓄積量は、CCK処理により有意に低下した。

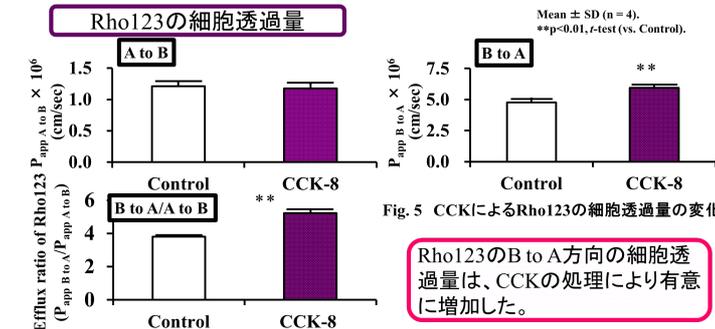


Fig. 5 CCKによるRho123の細胞透過量の変化

Rho123のB to A方向の細胞透過量は、CCKの処理により有意に増加した。

機能が亢進することが明らかとなった。また、CCK は苦味受容体刺激後に分泌される物質であることから、苦味物質添加じよりも早く(90分よりも短い時間で)P-gpの輸送機能を亢進することが想定され、この想定に一致してわずか30分で輸送機能亢進が認められた。

### 3) CCKによるP-gpおよびERMタンパクの細胞膜上発現増加

CCKによってP-gpの輸送機能が亢進したことから、その時のメカニズムに細胞膜上発現量の増加が関与しているかについて検討した。その結果、細胞膜上におけるP-gpのタンパク発現量に有意な増加が認められた。一方、細胞全体においては変化が認められなかった(Fig. 6)。

また、P-gpの膜上発現を支えるERMタンパク発現を評価したところ、P-gp同様に膜上の発現のみ増加が確認された(Fig. 7)。

以上のことから、CCKによるP-gpの輸送機能亢進は、細胞内に用意されていたP-gpがERMタンパクとともに膜上へ移行したことが関与しているものと考えられた。

### 4) 苦味物質によるP-gpの輸送機能変化

抗がん薬であり苦味を有することが確認されているエトポシドを用いて、上記と同様の検討を行なった結果、PTC刺激時と同様に数十分という短時間でRho123の排出亢進が認められている。また、この亢進はYM022によって阻害されたことから、エトポシドによって苦味受容体あるいはCCK受容体のいずれかが刺激され、苦味物質と同様にP-gpの機能が亢進したものと考えられた。現在、このメカニズムについてさらに検討を進めているところである。

## 5. 主な発表論文等

1. K. Yano, T. Tomono, T. Ogihara : Advances in Studies of P-Glycoprotein and Its Expression Regulators, *Biol. Pharm. Bull.*, 41(1), 11-19 (2018). Doi: 10.1248/bpb.b17-00725.
2. S. Koyama, H. Arakawa, M. Itoh, N. Masuda, K. Yano, H. Kojima, T. Ogihara : Evaluation of the metabolic capability of primary human hepatocytes in three-dimensional cultures on microstructural plates, *Biopharm Drug Dispos.*; 39(4), 187-195 (2018). Doi: 10.1002/bdd.2125.
3. T. Tomono, T. Machida, H. Kamioka, Y. Shibasaki, K. Yano, T. Ogihara : Entinostat reverses P-glycoprotein activation in snail-overexpressing adenocarcinoma HCC827 cells, *PLoS ONE*, 13(7), e0200015 (2018). Doi: 10.1371/journal.pone.0200015.
4. K. Morimoto, Y. Tominaga, Y. Agatsuma, M. Miyamoto, S. Kashiwagura, A. Takahashi, Y. Sano, K. Yano, C. Kakinuma, T. Ogihara, M. Tomita : Intestinal secretion of indoxyl sulfate as a possible compensatory excretion pathway in chronic kidney disease, *Biopharm Drug Dispos.*, 39(7), 328-334 (2018). Doi: 10.1002/bdd.2149.
5. Y. Idota, T. Kato, K. Shiragami, M. Koike, A. Yokoyama, H. Takahashi, K. Yano, T. Ogihara : Mechanism of Suppression of Blood Glucose Level by Calcium Alginate in Rats, *Biol. Pharm. Bull.*, 41(9), 1362-1366 (2018). Doi: 10.1248/bpb.b18-00155.
6. T. Kato, Y. Idota, K. Shiragami, M. Koike, F. Nishibori, M. Tomokane, T. Seki, K. Itabashi, K. Hakoda, H. Takahashi, K. Yano, T. Kobayashi, N. Obara, T. Ogihara : Randomized, Double-Blind, Crossover Clinical Trial of the Effect of Calcium Alginate in Noodles on Postprandial Blood Glucose Level, *Biol. Pharm. Bull.*, 41(9), 1367-1371 (2018). Doi: 10.1248/bpb.b18-00156.
7. K. Yano, T. Tomono, M. Kanagawa, S. Akiyama, T. Ogihara : Effect of Phosphate Binder on the Intestinal Absorption of Antihypertensive Drugs, *J Community Pharm. Pharm. Sci.*, 9, 239-245 (2017).

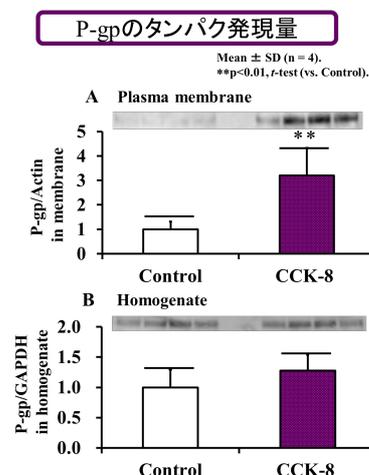


Fig. 6 CCKによるP-gpのタンパク発現量の変化

P-gpの細胞膜上におけるタンパク発現量は、CCKの処理により有意に増加した。一方、細胞全体においては、顕著な差は認められなかった。

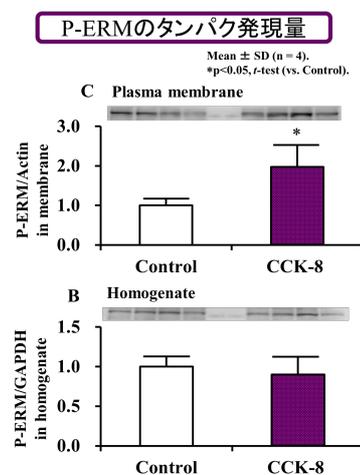


Fig. 7 CCKによるP-ERMタンパクの細胞内局在

P-ERMの細胞膜上におけるタンパク発現量は、CCKの処理により有意に増加した。一方、細胞全体においては、顕著な差は認められなかった。

8. K. Yano, S. Shimizu, T. Tomono, T. Ogihara : Gastrointestinal Hormone Cholecystokinin Increases P-Glycoprotein Membrane Localization and Transport Activity in Caco-2 Cells, J. Pharm. Sci., 106(9), 2650-2656 (2017). Doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.003.

9. T. Tomono, K. Yano, T. Ogihara : Snail-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Enhances P-gp-Mediated Multidrug Resistance in HCC827 Cells, J. Pharm. Sci., 106(9), 2642-2649 (2017). Doi: 10.1016/j.xphs.2017.03.011.

10. T. Tomono, M Kajita, K. Yano, T. Ogihara. Adenovirus vector infection of non-small-cell lung cancer cells is a trigger for multi-drug resistance mediated by P-glycoprotein. Biochem Biophys Res Commun. 476(4):183-7. (2016). Doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.070.

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 17 件)

<シンポジウム>

矢野健太郎 : 膜上局在の調節による P-糖タンパク質およびペプチドトランスポーターの機能制御, 第 61 回日本薬学会関東支部大会若手シンポジウム, 東京, 9/16, 2017.

<学会発表>

1. Yano K, Watanabe Y, Ogihara T: Gastrointestinal Hormone Cholecystokinin and Bitter Substance Increase P-glycoprotein Membrane Localization and Transport Activity in Caco-2 Cells, 33rd JSSX Annual Meeting, 金沢, 10/1-10/5, 2018.

2. Kamioka H, Yano K, Ogihara T: Change in expression of pharmacokinetic factors associated with epithelial mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells, 33rd JSSX Annual Meeting, 金沢, 10/1-10/5, 2018.

3. 町田幸也, 伴野拓巳, 矢野健太郎, 荻原琢男 : HDAC 阻害薬 Entinostat は EMT に伴う P-gp の機能亢進を抑制する, 日本薬剤学会 第 32 年会, 大宮, 5/11-13, 2017.

4. 上岡宏規, 伴野拓巳, 矢野健太郎, 荻原琢男 : 上皮間葉転換による P-糖タンパク質の機能亢進は肺がん細胞の薬剤耐性能を増強する, 第 12 回トランスポーター研究会年会, 仙台, 7/8-9, 2017.

5. 矢野健太郎, 渡邊弥生, 伴野拓巳, 荻原琢男 : 消化管ホルモンであるコレシストキニンによる P-糖タンパク質の細胞膜上発現および輸送機能の亢進, 第 12 回トランスポーター研究会年会, 仙台, 7/8-9, 2017.

6. 荻原琢男, 森本かおり, 井戸田陽子, 小山智志, 矢野健太郎 : P-糖タンパクを介した薬物の脳内移行性の制御 ; Oseltamivir と Cilnidipine の例, 第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 金沢, 10/26-27, 2017.

7. Yano K, Yokozuka Y, Matsumoto E, Koyama S, Ogihara T : Brain Distribution of Spermine, a Neuromodulator, and Change in the Translocation by Breast Cancer Resistance Protein, 32nd JSSX Annual Meeting, 東京, 11/29-12/1, 2017.

8. Tomono T, Kamioka H, Shibasaki Y, Koyama S, Yano K, Ogihara T : Snail-induced Epithelial to Mesenchymal Transition Activates P-gp via Increasing the Scaffolding Protein Moesin, 32nd JSSX Annual Meeting, 東京, 11/29-12/1, 2017.

9. Todokoro I, Tomono T, Kamioka H, Koyama S, Yano K, Ogihara T : Effect of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Snail on Efflux Transporters, 32nd JSSX Annual Meeting, 東京, 11/29-12/1, 2017.

10. Okabe C, Yano K, Fujii K, Kato Y, Koyama S, Ogihara T : The organ-specific regulation of BCRP and P-gp, 32nd JSSX Annual Meeting, 東京, 11/29-12/1, 2017.

11. 矢野健太郎, 清水里織, 荻原琢男 : 消化管ホルモンであるコレシストキニンによる P-gp 機能調節, 日本薬物動態学会第 31 年会, 松本, 10/13-10/15, 2016.

12. 横塚弥衣, 松本映子, 矢野健太郎, 荻原琢男 : BCRP を介した脳興奮物質である Spermine の排出, 日本薬物動態学会第 31 年会, 松本, 10/13-10/15, 2016.

13. 伴野拓巳, 矢野健太郎, 荻原琢男 : Snail 過剰発現による P-gp 機能亢進における Caveolin-1 リン酸化の関与, 日本薬物動態学会第 31 年会, 松本, 10/13-10/15, 2016.

14. 柴崎由実, 伴野拓巳, 矢野健太郎, 荻原琢男 : 肺がん細胞へのリチウム処理による MRP ファミリーの機能変動, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 9/17, 2016.

15. 伴野拓巳, 矢野健太郎, 荻原琢男 : Snail 過剰発現による EMT は HCC827 細胞における BCRP の発現を低下させる, 公益社団法人日本薬剤学会第 31 年会, 岐阜, 5/19-5/21, 2016.

16. 柴崎由実, 伴野拓巳, 矢野健太郎, 荻原琢男 : 肺腺がん細胞へのアデノウイルス感染は Akt のリン酸化を介して P-gp の発現を亢進する, 公益社団法人日本薬剤学会第 31 年会, 岐阜, 5/19-5/21, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.takasaki-u.ac.jp/p\\_yaku/1555/](http://www.takasaki-u.ac.jp/p_yaku/1555/)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 ( 8 桁 ):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名 : 荻原 琢男

ローマ字氏名 : Takuo Ogihara

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。