

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07209

研究課題名(和文) 脳-腸-肝異物解毒機構の相関と変動に基づく脳精神疾患薬物治療戦略の構築

研究課題名(英文) Changes in xenobiotic detoxification system by the brain disease and mental disorder

研究代表者

加藤 美紀 (Kato, Miki)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70345594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん発作により、てんかん治療薬の標的部位である脳内の異物解毒機構だけでなく、薬物動態を制御する肝臓や小腸においても、異物解毒機構が変動することが明らかになった。その変動は、酵素により異なることも明らかにした。また、ストレス負荷によっても、脳や肝の異物解毒機構の一部が変動する可能性を明らかにした。本研究で採用したモデルでは、脳-腸-肝において、類似した挙動を示した異物解毒因子は認められなかったが、脳精神疾患により脳だけでなく肝や小腸の異物解毒機構が変動する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高度化、複雑化に伴い、うつ病などの精神疾患や、てんかんのような神経活動の異常により引き起こされる脳疾患の罹患率が増加している。近年、第二の脳とも言われる腸と脳の機能的関連性が注目されている。薬物は一般的に生体内で異物解毒機構により解毒されて、薬理効果を失う。疾患による異物解毒機構の変動について、脳だけでなく、小腸、肝について明らかにしたことで、薬物の生体内での動態の変化を標的臓器だけでなく消失臓器を考慮して評価することが可能と考えられ、薬物治療の適正化のためにも貴重な情報を提供できたと考える。

研究成果の概要(英文)： This study has shown that status epilepticus affects the expression of some drug metabolizing enzymes and drug transporters in the liver and small intestine, where epileptiform activity was not propagated. The changes in their expression varied among the enzymes. Furthermore, stress affected the expression of some drug metabolizing enzymes in the brain as well as in the liver and small intestine. However, there was no relationship concerning their alteration between tissues. Therefore, we clarified that the drug metabolizing enzymes and drug transporters in the brain, liver, and small intestine would be changed by both brain disease.

研究分野：薬物動態学

キーワード：異物解毒機構 薬物代謝酵素 脳精神疾患 UDP-グルクロン酸転移酵素 シトクロムP450 発現変動

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳科学は21世紀の自然科学の柱の一つである。社会の高度化、複雑化に伴い、うつ病などの精神疾患や、てんかんのような神経活動の異常により引き起こされる脳疾患の罹患率が増加している。本邦でのうつ病とてんかんの患者数はそれぞれ約300万人、100万人と言われている。両疾患ともに薬物療法が主たる治療法になっているが、薬物療法に抵抗性を示す難治性のもが増加している。従って、脳精神疾患の薬物治療戦略の適正化は、最重要かつ必須の課題であり、社会的ニーズが高い。より良い薬物治療戦略を提言できれば、我が国の医療・福祉の向上に貢献できる。

第二の脳とも言われる腸は、自律神経系やホルモン、サイトカインを介して、脳と密接に関連していることが明らかになっている。たとえば、脳が感じた精神的ストレスは、腸には蠕動運動の異常というかたちで伝達される。一方で、腸内細菌叢の異常などの腸内環境の情報は神経系を介して大脳に伝わり、抑うつや不安などの情動変化を引き起こす。近年、脳と腸の機能的関連性、すなわち「脳腸相関」が注目され、盛んに研究が進められている。

脳神経疾患に対する薬物治療効果の適正化のためには、標的部位(脳内)での薬物動態を理解する必要がある。薬物動態は、代謝的解毒反応と細胞外への排泄反応から成る異物解毒機構により決定づけられる。はシトクロム P450 (CYP) や UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) などの薬物代謝酵素により行われ、は異物排泄トランスポーターを介して行われる。脳内の薬物動態は脳の異物解毒機構の影響を受けるが、小腸、肝臓などの異物解毒機構によっても制御される。これまで、脳精神疾患が脳-小腸-肝臓での異物解毒機構に及ぼす影響について研究されていない。また、脳腸相関は、異物解毒機能にもあてはまる可能性があるが、そのような視点から未だ検討されていない。つまり、脳神経疾患による生体内異物解毒機構への影響を考慮しないまま、漫然と薬物治療が行われてきた。脳精神疾患の薬物治療の最適化のために脳内薬物動態を解明するには、これまでに多くの研究者が尽力してきた併用薬による異物解毒機構の変動だけでなく、疾患による異物解毒機構の変動を明らかにすること、脳だけでなく、小腸、肝の異物解毒機構の変動を明らかにする必要があると考えた。疾患により異物解毒機構が変動するのであれば、その変動をふまえて薬物の体内動態を予測し、薬物治療を行うことで有効かつ副作用の少ない適切な薬物治療を実施できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳精神疾患による脳-腸-肝異物解毒機構の変動と相関、および変動メカニズムの解明である。

3. 研究の方法

本実験は名城大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

(1) 実験材料

TRIzol 試薬は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) より購入した。ReverTra Ace qPCR Kit は TOYOBO (Osaka, Japan) より購入した。SYBR Premix Ex Taq は TAKARA BIO (Shiga, Japan) より購入した。マウス抗 Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 抗体 (sc133088) は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) より、ウサギ抗 Nrf2 抗体 (ab31163)、ウサギ抗 signal transducer and activator of transcription 5B (STAT5B) (Ser731) 抗体は GeneTex (Irvine, CA, USA) より購入した。NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) より購入した。

(2) てんかん重積発作 (SE) モデルの作製

ラットにカイニン酸 (KA) を腹腔内投与することで、脳のグルタミン作動性神経が増加し、興奮をもたらす。これがヒトの側頭葉てんかん発作状態と同様の神経細胞障害パターンを起こすことから、SE の動物モデルとして広く使用されている (Bertoglio et al., *Front. Neurol.*, 8, 588 (2017))。そこで、7 週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに KA を 10 mg/kg またはコントロールとして生理食塩水を単回腹腔内投与した。KA 投与後、2.5 時間行動観察を行い、てんかん発作の有無を Morales-Garcia らの評価尺度 (*J. Neurosci. Res.*, 87, 3687-3696 (2009)) により判定した。評価尺度として、Stage 0: 無反応 (NR)、Stage 1: 口、顔の歪み、Stage 2: 頷き、Stage 3: 前肢クローヌス、Stage 4: 立ち上がり、Stage 5: 立ち上がり後、転倒と設定した。Stage 4 または Stage 5 が 10 分以上持続したラットを SE とした。KA 投与 24 時間後に臓器を摘出した。

(3) 拘束ストレス (RS) モデルラットの作製

8 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットに、1 日 3 時間、連続 7 日間の拘束ストレスを与えた (RS 群)。ストレス負荷の評価として、拘束中のラットの糞便について、プリストルスケールを用いて評価した。また、拘束終了直後のコルチコステロン値を Corticosterone ELISA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を用いて測定した。連続 7 日間の拘束ストレス後に臓器を摘出した。

(4) RNA抽出およびリアルタイムPCR

TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Kit を用いて得られた cDNA 溶液と、標的遺伝子に特異的なプライマー、SYBR Premix Ex Taq を用いて、リアルタイム PCR を行った。

(5) SDS-PAGE ウェスタンブロット法による標的タンパク質の定量

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit により核タンパク質を抽出した。ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った後、polyvinylidene difluoride 膜に電氣的に転写した。その後、抗体を用いて、標的タンパク質を定量した。

(6) 統計学的処理

有意差検定には一元配置分散分析または Student 's-t 検定を用いた。なお、 $p < 0.05$ の時、有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) てんかんによる肝、小腸、腎臓の異物解毒機構の変動

我々は以前に、SE によりラット脳 CYP2D4 mRNA 発現量は減少するが、UGT1A1 や UGT1A6、UGT1A7 mRNA 発現量は増加することを明らかにしている (Asai et al., J. Pharm. Sci., 107, 975-978 (2018); Asai et al., Biopharm. Drug Dispos., 39, 75-82 (2018))。しかし、SE がラット肝臓、小腸および腎臓の薬物代謝酵素およびトランスポーターの mRNA 発現に及ぼす影響は未解明であった。そこで本研究では、SE がラット肝臓、小腸および腎臓の薬物代謝酵素と薬物トランスポーターの mRNA 発現に及ぼす影響について検討した。その結果、肝臓の CYP1A1、CYP1A2、CYP2C11、CYP2D1、CYP2J3、CYP3A1/23 および CYP3A2 の mRNA 発現量は、全ての群で有意な変動は認められなかった。また、UGT1A1 は SE による影響は認められなかったが、UGT1A6 はコントロール群と NR 群では変化が認められなかったが、SE 群で有意に減少した (図 2)。

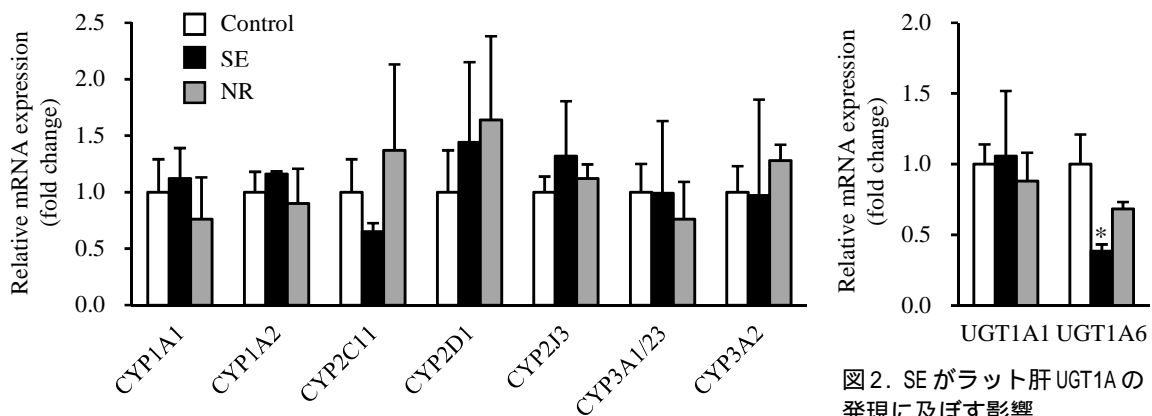


図 1. SE がラット肝 CYP の発現に及ぼす影響

ラット小腸の CYP2D1、CYP2J3、および UGT1A1 mRNA 発現量は全ての群で有意な変化は認められなかった (図 3)。CYP1A1 は SE により有意に低下した。一方、肝と同様に、UGT1A6 の mRNA 発現量はコントロール群と NR 群では変化が認められなかったが、SE 群では有意に減少した。

ラット腎臓の UGT1A1 と UGT1A6 発現量は全ての群で有意な変化は認められなかった (図 4)。

従って、SE による脳以外の臓器に対する影響はそれほど大きくはなかったが、一部の薬物代謝酵素に影響を及ぼすこと、また、酵素の変動は臓器により異なることも明らかになった。

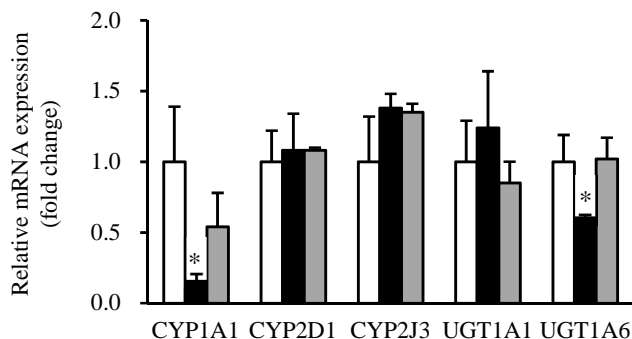


図 3. SE がラット小腸 CYP と UGT1A の発現に及ぼす影響

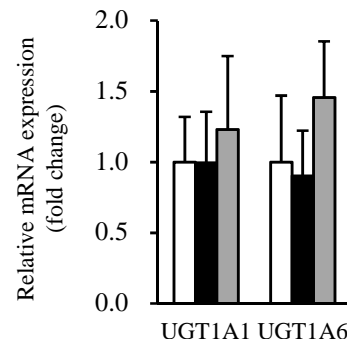


図 4. SE がラット腎 UGT1A の発現に及ぼす影響

ラット肝、小腸、腎臓での BCRP、MRP2 の mRNA 発現量は全ての群で有意な変化は認められなかった (図 5)。薬物トランスポーターとして重要である ATP-binding cassette B1 を検討できて

いないため、薬物輸送に関わるトランスポーターについては更に調査を進める必要があると考えられる。

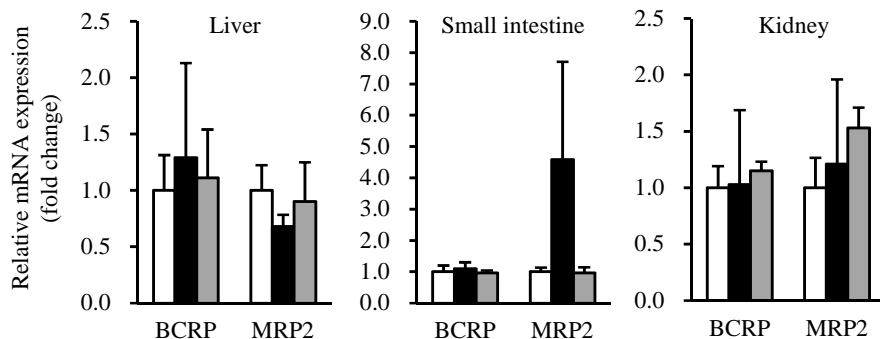


図 5. SE がラット薬物トランスポータの発現に及ぼす影響

以上より、少なくとも SE モデルラットにおいては、脳、肝、腸において同一の酵素が SE により同様の影響を受けているわけではないことが明らかになった。

ラットの CYP1A1 と UGT1A6 発現は、核内受容体である多環芳香族炭化水素受容体 (AhR) と Nrf2 を介して誘導される。5-ヒドロキシトリプトファン (5-HT) は、AhR を介して CYP1A1 を誘導する内因性化合物である (Manzella et al., Sci. Rep., 8:6103 (2018))。5-HT が細胞外で枯渇することにより、けいれんの閾値が低下することで、SE を誘発することが報告されている (Maia et al., Brain Res. Bul., 134, 109-120 (2017))。従って、SE 群では、5-HT の枯渇により CYP1A1 の発現が低下した可能性が考えられる。一方で、SE は Reactive oxygen species (ROS) の産生を誘発することが報告されている。そこで SE が AhR と Nrf2 の発現に及ぼす影響について検討したところ、ラット肝、小腸および腎臓の AhR と Nrf2 は、全ての群で変化が認められな

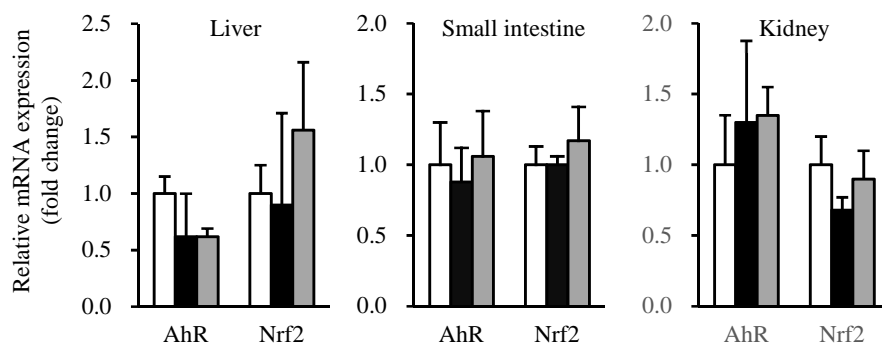


図 6. SE がラット核内受容体の発現に及ぼす影響

かった (図 6)。AhR は、mRNA 発現量に変動が認められなくても核内移行量が促進されることがあるため、AhR や Nrf2 の核内移行量を検討する必要があると考えられる。

(2) てんかんによる脳の異物解毒機構の変動メカニズムの検討

てんかん発作により、肝や小腸では発現の変動が認められなかったが、脳内での発現が低下した CYP2J3 について、その変動メカニズムの検討を行った。CYP2J3 は signal transducer and activator of transcription 5B (STAT5B) の核内移行量が増加すると、発現が低下することが報告されているが、SE により、小脳、皮質、海馬での STAT5B の核内移行量に増加は認められなかった。CYP2J3 の発現調節を担うペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) の核内移行量についても検討する必要があると考えられる。

(3) 拘束ストレスによる肝、小腸、腎臓の異物解毒機構の変動

ヒトにおけるストレスによる精神疾患を再現するモデルとして、げっ歯類のストレスモデルが用いられている。負荷するストレスとして、拘束ストレスや強制水泳などが広く使用されている。慢性的なストレスを与えることが、うつ病症状のモデルラットを作製するのに適しており、ヒトにおけるうつ病症状を模倣すると考えられる。反復的な拘束ストレスは、慢性的なストレスを与えるとされているため、本研究ではストレス負荷の方法として 7 日間の反復的な拘束ストレスを与えることを選択した。拘束ストレスを負荷することにより、プリストルスケールは、コントロール群で 4.0、RS 群で 4.7 と有意に増加した。RS 群の個体は拘束中、全て軟便が観察された。ラット血漿中コルチコステロン濃度はコントロール群で 3.0 pg/mL、また、RS 群で 3.6 pg/mL と増加傾向であった。4 週間の慢性的なストレスを受けたラットにおいて、血清中コルチコステロン濃度は、コントロール群と比較して 1.39 倍に有意に増加した時、ストレスが負荷されたと判断されている (Safari et al., Int. J Environ. Res. Public. Health, 17, 6675 (2020))。本検討において、RS 群の血漿中コルチコステロン濃度は、コントロール群と比較して 1.22 倍に増加したため、軽度のストレスが負荷されたと考えた。

拘束ストレスにより、肝に発現する多くの CYP や UGT 発現量に変化は認められなかったが、

CYP3A1/23 mRNA は、RS 群で 1.9 倍に有意に増加した (図 7)。1.9 倍の mRNA の増加が、どの程度酵素活性を増加させるかについて、更に検討する必要があると考えられる。7 週間、摂水や食事の制限、ケージの傾斜、ストロボ照明などの軽度慢性ストレスを負荷したラットにおいて、肝 CYP2C11 発現量が減少し、CYP3A1/23 発現量が増加した (Kot et al., *Drug Metab. Dispos.*, 45, 1336-1344 (2017)) との報告がある。ストレス負荷の方法は異なるが、CYP3A1/23 が変動したとの結果は、本検討と類似した傾向を示している。しかし、CYP2C11 については本検討結果と一致しなかった。従って、ストレスの種類や負荷方法、期間の違いにより、薬物代謝酵素の発現量に及ぼす影響は異なると思われた。一方、小腸や腎臓の UGT に変動は認められなかった。従って、本検討でのストレス負荷は、軽度の軟便を引き起こす程度の軽いものであり、確かに腸管内の環境変化により便の性状変化が引き起こされたと考えられるが、この程度のストレス負荷では、肝や小腸、腎臓での代謝酵素の発現に影響を及ぼさないと考えられる。

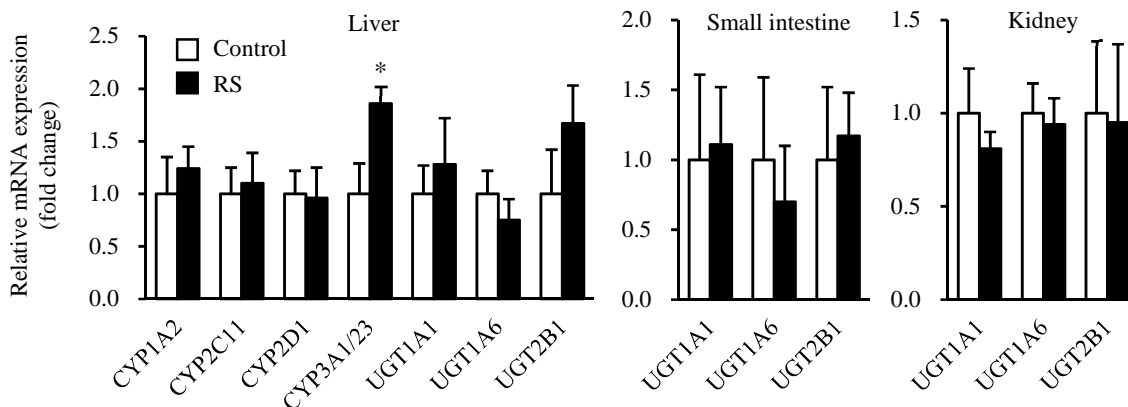


図 7. RS がラット薬物代謝酵素の発現に及ぼす影響

拘束ストレスにより、UGT1A6 mRNA 発現量は、視床において、0.66 倍に有意に減少した (図 8)。線条体、視床、および皮質における前頭前野は、前頭前野-皮質下回路を構成している。この回路は、脳において感情的処理に関与し、最もうつ病と関連していると言われている。この回路が障害を受けると視床の機能が抑制されるという報告がある (Zhang et al., *CNS Neurosci. Ther.*, 22, 994-1003 (2018))。UGT1A6 は、AhR や Nrf2 などの核内受容体によって発現が制御されているが、これら核内受容体の核内移行性に変動が認められなかったため、その他の因子による影響と考えられた。脳以外の臓器では UGT1A6 の発現は変動しなかったため、少なくとも本検討で用いた軽い拘束ストレスの負荷では、他の臓器との間に薬物代謝酵素発現変動の連関は認められないと考えられた。一方、CYP2D4 や UGT1A1、UGT2B1 の発現量には変化が認められなかった。脳内には異物代謝だけでなく生体内基質の代謝に関わる CYP2J や CYP4F が存在するため、そのような代謝酵素についても検討する価値があると考えられる。

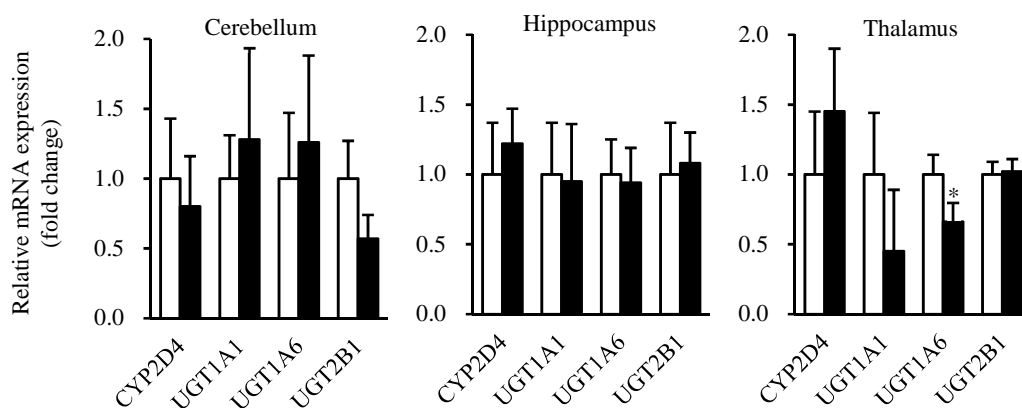


図 8. RS がラット脳薬物代謝酵素の発現に及ぼす影響

以上より、脳精神疾患は脳内だけでなく、脳外臓器の異物解毒機構に影響を及ぼすこと、また、その影響は疾患によって異なる可能性があることを明らかにした。しかし、脳、小腸、肝の臓器で、脳精神疾患による当該薬物酵素の発現への影響が類似していたわけではなかったため、連関については明確な評価はできなかった。特に、ストレス負荷については、本検討では軽度なものであったため、ストレス負荷強度をはじめとした脳精神疾患モデル動物の作製方法を考慮した上で、さらに検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 草川里奈、加藤美紀、小島綾華、澤田紘平、榊原有季子、灘井雅行
2. 発表標題 てんかん重積状態がラットの薬物代謝酵素の発現量に及ぼす影響
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本紗季、加藤美紀、小島綾華、榊原有季子、灘井雅行
2. 発表標題 拘束ストレスがラットUDP-グルクロン酸転移酵素の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------