

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17411

研究課題名（和文）ポノプラザンはNrf2パスウェイを利用した小腸潰瘍治療薬になるか？

研究課題名（英文）Could vonoprazan be a small intestinal ulcer drug utilizing the Nrf2 pathway?

研究代表者

西 利男（Nishi, Toshio）

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20244759

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：内視鏡の進歩により、小腸潰瘍が認知されるようになったが、いまだ治療薬の開発には至っていない。ポノプラザンは胃潰瘍治療薬として用いられているが、Nrf2という転写因子を介して抗酸化ストレス酵素を産生させることを小腸でも予備実験で見出したため、小腸潰瘍に対する治療薬の可能性が考えられた。本研究では全長の長い小腸で一般的にポノプラザンがNrf2の転写活性を増大させるか検討した。空腸の口側20から25cmで抗酸化ストレスタンパク質の発現が増大したが、一般的には発現の増加を認めなかった。このため、腸管でも特に長い小腸においてはポノプラザンによる小腸潰瘍治療効果は期待できない結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来より、小腸における遺伝子発現変化を解析するものは多くあったが、小腸を一様なものとして解析するもの又は空腸と回腸として小腸の口側と肛門側の2点で解析することが一般的であった。本研究では、小腸を連続的に解析を行いポノプラザン投与によるヘムオキシゲナーゼ1の発現を解析したが、特定の部位でのみ発現が増加する結果で、ポノプラザン投与により小腸における抗炎症効果を示すものではないことが明らかとなった。小腸に対する治療効果を解析する場合は、解析する点を多くしないと有用性の有無について議論できないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Small intestinal ulcers have come to be recognized due to advancing endoscopy, but therapeutic drugs have not yet been developed. Vonoprazan is used as a therapeutic agent for gastric ulcers, and preliminary experiments revealed that it also induces the production of antioxidant stress enzymes in the small intestine via a transcription factor called Nrf2. In this study, we investigated whether vonoprazan increases the transcriptional activity of Nrf2 in the long small intestine. Although the expression of antioxidant stress proteins increased at 20 to 25 cm on the oral side of the jejunum, no increase in expression was observed during the general phase. Therefore, the effect of vonoprazan in treating small intestinal ulcers cannot be expected, especially in the long small intestine.

研究分野：消化管の炎症

キーワード：ポノプラザン Nrf2

1. 研究開始当初の背景

小腸は胃カメラが届かないため、「暗黒の臓器」といわれていたが、カプセル内視鏡の開発により、初めて小腸を観察できるようになったことで、非ステロイド鎮痛薬が胃潰瘍だけでなく、小腸においても潰瘍病変を示すことが明らかとなった。小腸潰瘍では、従来のプロトンポンプ阻害薬では効果が無いと考えられているが、2014年末に承認されたカリウムイオン競合型アシッドブロッカーであるボノプラザンの小腸潰瘍に対する効果は明らかではない。2014年に胃粘膜保護効果を示すレバパミドはマウスのT細胞にて、抗酸化ストレスタンパク質群の転写制御を行う転写因子 Nrf2 の誘導能を示し、マウスに投与することで脾臓において Nrf2 に制御される抗酸化ストレスタンパク質の HO-1 の発現が増加することが報告された。その後、低用量アスピリン服用患者は胃潰瘍予防にレバパミドが処方されるが、通常の処方量の3倍で処方した場合小腸潰瘍が抑制プラセボに比べ有意に抑制されることを二重盲検比較試験で明らかにされたため、Nrf2 誘導能を有する薬剤に小腸潰瘍治療効果を有している可能性が考えられる。申請者は、小腸で Nrf2 誘導能が報告されていたランソプラゾールが、肝臓でも Nrf2 誘導能を示すことを明らかにし、薬剤性肝炎モデルラットにおいて肝細胞の脱落や食餌性の非アルコール性脂肪性肝炎モデルラットにおいて肝線維化の抑制にランソプラゾールによる Nrf2 の誘導が関与していることを報告した。そこで他の胃潰瘍治療薬にも小腸での Nrf2 の転写活性誘導能がないかと考えボノプラザンによるラット小腸での誘導能を解析した。

2. 研究の目的

- ボノプラザンの小腸潰瘍治療薬の可能性を見出すため、抗炎症作用を示すタンパク質の1つとして知られているヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) 遺伝子を指標とし、ラットの腸全般で効果を示すかを明らかにする。

小腸は、消化管において最も長い臓器であり口側を空腸、肛門側を回腸と命名されているが、実際にはこの部位間の境界は存在せず、口側から肛門側に向かうにつれて組織の形態が徐々に変化しているのが特徴である。既報では、ランソプラゾールがラット小腸で HO-1 の発現を上昇させることが示されたが、小腸全体を解析したものではない。本研究ではボノプラザンの小腸潰瘍に対する治療効果を見出すのが目的であるため、小腸全体で HO-1 の発現上昇が認められるのが好ましい。そこで、ボノプラザンを投与したラットの腸を 5 cm 間隔で採取し、HO-1 の発現が局所的なのか全般的に起こるのかを明らかにし、このメカニズムが Nrf2 依存的であるかどうかについてノックアウトラットを用いて解析する。

また、ボノプラザンの HO-1 発現上昇が小腸全般的に認められる場合は、インドメタシンを投与することで誘発されるインドメタシン小腸潰瘍モデルラットを作製し、ボノプラザンの小腸潰瘍抑制効果について検討を行う。

3. 研究の方法

6週齢の Wistar 系雄ラットまたは Nrf2 ノックアウトラットにボノプラザンまたはオメプラゾール、ランソプラゾール懸濁液を皮下投与し、HO-1 の発現がピークを迎える投与後 3 時間でイソフルランによる深麻酔で安楽死させる。その後速やかに開腹し小腸を採取し、5 cm 間隔で組織サンプルを回収した。RNAlater (キアゲン) で固定を行い、セパゾール (ナカライテスク) により RNA 抽出を行った。逆転写反応は、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) で行い、リアルタイム PCR は KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS) を用いて行った。研究に用いたプライマーの配列は表 1 に示す。小腸潰瘍モデルは既報を参考にし、インドメタシン懸濁液を 10 mg/kg の用量で 2 日間連続皮下投与を行った。ボノプラザンを 30mg/kg の用量で連続投与し、ボノプラザン投与 2 日目、3 日目にインドメタシン投与を行い、4 日目に小腸組織を採取し、遺伝子発現解析およびホルマリン固定を行った組織をパラフィンで包埋し薄切標本作製し HE 染色後に潰瘍面積を画像解析により測定した。

表 1 ラット遺伝子発現解析用プライマー配列

遺伝子	Forward	Reverse	Accession No.
HO-1	ACAGGGTGACAGAAGAGGCTAA	CTGTGAGGGACTCTGGTCTTTG	NM_012580
Gapdh	CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA	GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM_017008

Gapdh: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

#### 4. 研究成果

本研究の予備実験で、ボノプラザンによる H0-1 遺伝子発現上昇は皮下投与 3 時間後で極大を迎えたため、皮下投与後 3 時間で解析を行った。ランソプラゾールとオメプラゾールの H0-1 発現上昇は肝臓において 3 時間であることが報告されており、ランソプラゾールおよびオメプラゾールといったプロトンポンプ阻害薬と比べてボノプラザンがどの程度 H0-1 発現上昇を示すか検討を行ったところ、小腸の口側 20 cm のところでボノプラザンによる H0-1 発現上昇はプラセボコントロールの 4 倍になった。ランソプラゾールおよびオメプラゾールでも 2 倍の発現上昇を認めしたが、ボノプラザンの効能はこれらプロトンポンプ阻害薬よりも効果のあることを示すことができた (図 1)。

しかし、小腸全般的に発現上昇を認めなかったため、小腸潰瘍治療薬として用いることが難しいという結論に至った。

そこで、食事時の油脂の成分の一つであるリノール酸は Nrf2 誘導能を示すことが知られており、ボノプラザンの代わりに小腸潰瘍治療薬として用いられないかと考え、オリーブオイルに溶かしたリノール酸をラットに経口投与し、時間ごとの H0-1 遺伝子の発現変化を解析しようと試みた。

この際、リノール酸投与群ではオリーブオイル投与群と比較し胃内に含まれる内容物が肉眼でもわかる程度に異なることに気が付いた。そこで、本研究の目的とは異なるが、リノール酸投与により、胃の運動を緩やかにすることで、食後の糖吸収を緩やかにできる機能を有している可能性を考えた。ラットをオリーブオイル群およびリノール酸投与群、リノール酸のトリグリセリド体に分け各々の薬物を投与し、直後に OGTT を行ったところ、リノール酸投与群でのみ OGTT 後 30 分および 60 分の血糖がコントロール群 (オリーブオイル投与群) と比較し低下していた。また、この効果はストレプトゾシンを投与して作製したインスリン分泌のできない 1 型糖尿病モデルラットでも同様な効果を認めた。

このため、もともとの目的とは逸脱したが、偶然にもリノール酸投与により血糖上昇を穏やかにし、インスリン分泌能を変化させないメカニズムで食後血糖上昇を抑える治療法の可能性を示すことができた。1 型糖尿病はインスリン分泌ができないため、2 型糖尿病と異なりインスリン注射しか治療方法が存在していない。本研究の知見より、人においても同様に食直前にリノール酸製剤を服用することで、食後の血糖上昇を抑えられる可能性が考えられるため、臨床研究による検証が必要であることを本研究にて見出すことができた。

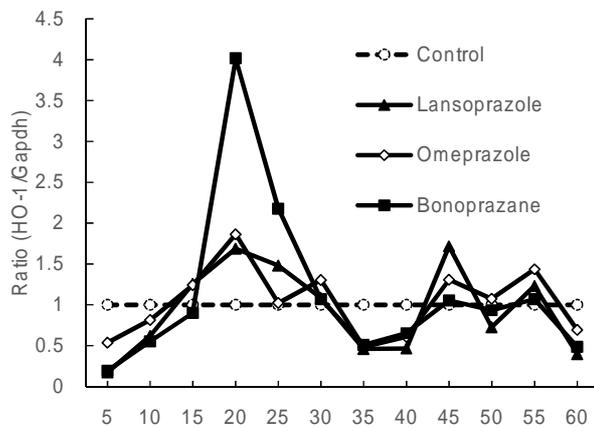


図 1 HO-1 遺伝子は空腸のトライツの靱帯より 20cm 肛門側の位置で誘導される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	山本 悠太  (Yamamoto Yuta)	和歌山県立医科大学・医学部・講師   (24701)	

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