

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590181

研究課題名(和文)腸神経系が関与する消化管疾患時における薬物吸収挙動の解析

研究課題名(英文)Analysis of drug absorption behavior in the enteric nervous system-related gastrointestinal diseases

研究代表者

檜垣 和孝 (Higaki, Kazutaka)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：60284080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：セロトニン(5-HT)は神経伝達物質、消化管ホルモンとして消化管機能制御に関わっており、5-HT代謝異常は過敏性腸症候群などの消化管疾患と関連している。本課題では、有機アニオンの吸収性を左右する小腸管腔中への分泌に及ぼす5-HT枯渇の影響を検討した。モデル薬物phenol red(PR)は、Caco-2細胞、ラット小腸において排出方向優位に輸送され、その輸送にMRP2、BCRPが寄与していることが示された。5-HT枯渇ラット小腸ではPRの分泌が亢進しており、それがMRP2及びBCRPの活性亢進によること、その亢進は、小腸上皮細胞刷子縁膜上のMRP2及びBCRPの発現亢進によることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Serotonin (5-HT) is related to the regulation of gastrointestinal (GI) function as a neurotransmitter in enteric nervous system (ENS) and GI hormone, and the disorder of 5-HT metabolism is suggested to associate with several GI diseases such as irritable bowel syndrome. In this project, we evaluated the effect of 5-HT depletion on the secretion of organic anions into the small intestinal lumen, influencing their absorption behavior. Phenol red (PR), a model compound, was clarified to be predominantly transported from basal to apical sides in Caco-2 cells and rat small intestine. Furthermore, it was indicated that MRP2 and BCRP contributed to the secretory transport of PR and that the secretory transport of PR was significantly enhanced in 5-HT-depleted rats, which was responsible for the enhancement of MRP2 and BCRP functions, based on their enhanced expression in the brush border membrane of small intestinal epithelial cells of 5-HT-depleted rats.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：腸神経系 セロトニン 有機アニオン系化合物 分泌 Caco-2細胞 ラット単離小腸粘膜 MRP2 BCRP

1. 研究開始当初の背景

腸神経系(Enteric nervous system; ENS)は、小腸を含む消化管の運動・機能を、中枢神経系(Central nervous system; CNS)から伸びる自律神経系を介した制御を修飾するだけでなく、ENS 自体が、効果器である消化管組織に直接作用することにより、高度に制御している。このように高度に発達した神経系を持つ臓器は他になく、そのため ENS は第二の脳とも称されている。ENS は、筋層間神経叢と粘膜下神経叢から成り立っており、前者は主に小腸の蠕動運動や分節運動の制御を、後者は小腸上皮細胞の機能や血流を制御している。また、この2つの神経叢間には密接な線維連絡があり、機能的にも相互に影響を及ぼしていると考えられている。これら神経系の小腸機能に対する影響は、筋肉弛緩・緊張、蠕動運動、水や電解質の吸収・分泌について研究されている。しかし、受動拡散、促進拡散、能動輸送等、様々な機構により起こる薬物の消化管吸収に及ぼす ENS の影響については、依然として、検討例がほとんどないのが現状である。また、近年、様々な消化器疾患に ENS が関与していることが報告されており、疾患時の薬物吸収挙動の変化とその機構解明は極めて重要となる。特に、神経伝達物質及び消化管ホルモンとして小腸の機能維持に重要な役割を担っているセロトニン(5-HT)は、その代謝異常が、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、クローン病等の疾患と関連していることが指摘されており、5-HT 代謝異常時における薬物吸収挙動の変動評価とその機構解明は、より有効な薬物治療を可能とするために極めて重要となる。

2. 研究の目的

薬物の吸収を担う小腸は、その運動および機能を、CNS とは独立した自律神経系である

ENS により支配されている。ENS による小腸運動性の支配、水や電解質の吸収制御に関しては、多くの研究がなされているが、薬物吸収に及ぼす ENS の影響についての検討例は、依然として極めて少ない。本研究の目的は、様々な吸収機構を介して起こる薬物の消化管吸収が ENS により如何に制御されているか、系統的な解析を進めると共に、ENS が関与する消化管疾患、特に、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、クローン病等の関連性が指摘されている 5-HT 代謝異常時における薬物吸収の変化、およびその機構を明らかにすることを目指す。既に、5-HT 枯渇モデルラットを用い、5-HT 枯渇時には、P-糖タンパク質(P-gp)活性増大と小腸上皮細胞刷子縁膜上の発現量の増大、更に細胞間隙経路を介した受動拡散の亢進を明らかにした。そこで本研究課題では、有機アニオン性化合物の小腸管腔中への分泌に焦点を絞り、5-HT 枯渇の影響と機構解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) モデル化合物 phenol red (PR)の輸送方向性と関与する輸送担体の評価: PR が消化管管腔中に分泌される有機アニオン性化合物のモデルとして妥当か否か、まず Caco-2 細胞を用いて輸送の方向性の確認を行った。Caco-2 細胞を Transwell 上に 100,000 cells/well となるように播種し、播種後 14-21 日目の confluent に達したものを実験に用いた。なお、培養液には DMEM に 10%FBS、100 U/ml penicillin、100 ng/ml streptomycin、20 µg/ml gentamycin を添加したものをを用い、培地交換は 2 日ごとに行った。PR は、0.5 mM の濃度になるように apical 側、或いは basal 側に添加し、basal 側、或いは apical 側 Ringer 液 100 µl を経時的に採取し、直ちに同量の Ringer 液を加えた。PR の定量

は、採取した試料と 1N NaOH を 2:1 の割合で混和し、直ちに micro-plate reader により吸光度測定(570 nm)することにより行った。

関与する分泌方向の輸送担体を特定するために、MRP2 の基質である probenecid、indomethacin を、BCRP の基質である novobiocin、mitoxantrone を阻害剤として basal 側に添加し、PR の分泌方向の輸送に対する影響を評価した。

(2) 5-HT 枯渇時における PR 輸送の変化: PR のラット小腸における輸送特性の確認と 5-HT 枯渇ラットの腸における PR 輸送性の評価を行うために、単離小腸粘膜を用いた in vitro 膜透過実験を行った。

一晩絶食したラットを pentobarbital 麻酔下(50 mg/kg)開腹し、Treitz 靱帯より約 5 cm 下部から約 20 cm を空腸部、或いは盲腸より約 5 cm 上部から約 20 cm を回腸部とし摘出した。これを氷冷下、生理食塩水で洗浄、脂肪を除去した後、腸管膜縁に沿ってシート状に切り開き、得られたシート状の小腸粘膜を、漿膜側を上にして広げ、筋層を剥離した後、拡散チャンバーに装着した。膜の両側に Ringer 液を加え、25 分間、37 °C で pre-incubation した後、供与側に薬液を添加し、経時的に、受給側から試料採取を行った。この時、受給側の液量を一定にするため、試料採取量と同量の Ringer 液を補った。輸送阻害の実験は、Caco-2 を用いた実験と同様の方法により行った。

セロトニン枯渇ラットの作製は、Weber らの方法に準じて行った。即ち、*p*-chlorophenylalanine (PCPA) を 1% Tween 80 を含む生理食塩水に懸濁し、ラットに 400 mg/kg/day、連続 4 日間、腹腔内投与を行った。対照群には等量の 1% Tween 80 を含む生理食塩水を同様の条件で投与した。

(3) 5-HT 枯渇時における輸送担体の発現量

評価: 対照群ラット、及び 5-HT 枯渇ラットの腸刷毛縁膜上に発現している MRP2、BCRP 量を Western blot 法により定量的に評価した。

ラット小腸刷毛縁膜画分の調製は、Kessler らの方法に改良を加えて行った。タンパク質の定量は、Lowry 法に準じて行い、タンパク質標準物質としてウシ血清アルブミンを使用した。刷毛縁膜画分の精製の程度は、alkaline phosphatase 活性の測定により判定した。調製した刷毛縁膜画分は使用するまで -85 °C で保存した。

Western blot は、以下に示す方法により行った。刷毛縁膜画分を一定のタンパク量に調製し、sample : sample buffer (0.5 M Tris-HCl (pH6.8), 10 % SDS, β -mercaptoethanol (BCRP 検出時には加えない), 20 % glycerol, 1 % BPB) を 3:1 の割合で混合した後、変性反応を行った。SDS-PAGE に running buffer を満たし、ミニプロテイン TGX ゲル (BIO-RAD 社) をセットした後、調製した試料および分子量マーカーをそれぞれ、16 及び 7.5 μ l で apply し、200 V で 30 分間、電気泳動を行った。電気泳動終了後、gel を transfer buffer で 30 分間振盪し、100 V で 1.5 時間、blotting を行った。得られた nitrocellulose 膜は、blocking PBS (1 % BSA, 5 % skim milk, 0.02 % Anti form) で 1.5 時間振盪後、抗体を加え、さらに振盪した。Tween PBS および PBS で膜を洗浄後、抗体を加えて振盪、膜に ECL 試薬 (GE Healthcare 社) を反応させ、Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare 社) により検出を行った。得られたバンドは Image J、Scion Image により定量的に評価した。

4 . 研究成果

(1) モデル化合物 phenol red (PR) の輸送方

向性と関与する輸送担体の評価: PR の膜透過機構について、Caco-2 細胞を用い詳細な検討を行った。まず、PR の膜透過の方向性について検討するため、PR を Transwell の apical 側または basal 側に 0.5 mM の濃度で添加し、100 分間の透過実験を行った。得られた吸収方向 (A to B) および排出方向 (B to A) の累積透過量と、得られた累積透過量 - 時間曲線において定常状態と考えられる時間域の直線の傾きから、膜透過速度を算出し、さらに算出した膜透過速度より薬物の膜透過性の指標である、見掛けの膜透過係数 (apparent permeability, P_{app}) を Eq.1 に従い、算出した。

$$P_{app} = (dQ / dt) / A / C_0 \quad \text{----- (Eq. 1)}$$

ここで、 dQ/dt は定常状態における膜透過速度 (pmol/min)、 A は膜の表面積 (cm^2)、 C_0 は基質薬物初期濃度 (mM) を示す。

得られた P_{app} は、A to B が 0.10×10^{-6} cm/sec、B to A が 0.23×10^{-6} cm/sec と、排出方向が約 2.3 倍、有意に高い値を示した。この結果より、PR の膜輸送は、排出方向優位、即ち分泌性を示しており、その輸送に輸送担体が寄与していることが示唆された。

そこで次に、この PR の排出方向の透過に寄与している輸送担体を推定するために、種々の阻害剤の影響を検討した。PR 濃度は同じく 0.5 mM に設定し、各阻害剤は PR と同じ basal 側に実験開始と同時に添加した。その結果、MRP2 の基質である probenecid (5 mM)、indomethacin (25 μM) 添加時に、PR の P_{app} が、コントロールのそれぞれ約 36%、44%と有意な減少を示した。また、BCRP の基質である novobiocin の添加は有意な変化を示さなかったが、mitoxantrone (50 μM) 添加時には、PR の P_{app} がコントロールの約 61%まで、有意な減少を示した。この結果より、PR の排出方向の輸送に、MRP2 及び

BCRP が関与していることが示唆された。

一方、P-gp 基質である quinidine、OAT の基質である *p*-aminohippuric acid は、PR の排出方向の輸送に影響を及ぼさなかったことから、PR の輸送に対する P-gp 及び OAT の寄与は無いものと考えられた。

(2) 5-HT 枯渇時における PR 輸送の変化: まず、Caco-2 細胞で認められた PR の排出方向優位な輸送がラット小腸においても認められるか否か、対照群ラットより単離した空腸、回腸粘膜を用いた *in vitro* 膜透過実験により確認した (PR 1 mM)。その結果、空腸、回腸いずれも、排出方向の輸送が有意に高いことが確認された (S to M/M to S ratio, 空腸 2.55, 回腸 1.98)。次いで、5-HT 枯渇ラットより単離した空腸、回腸を用いて PR の輸送を検討したところ、対照群に比し、両部位とも M to S 方向の P_{app} の減少と S to M 方向の P_{app} の有意な増大が認められた。S to M/M to S ratio は、空腸で 7.76、回腸で 3.80 となり、対照群に比し、排出方向の輸送の優位性がより顕著になっていることが明らかとなった。

そこで、5-HT 枯渇ラットで認められた PR の排出方向輸送の亢進について、Caco-2 細胞を用いた検討で示唆された MRP2、BCRP の寄与について、代表的基質共存による阻害実験により、各輸送担体の寄与について定量的な評価を試みた。即ち、PR の排出方向の P_{app} と各基質共存時に得られた P_{app} の差より、各輸送担体を介した輸送を反映する P_{app} を算出した。MRP2 については、2 mM probenecid、或いは 250 μM indomethacin の共存により評価を試みた。Probenecid を用いた場合、空腸における P_{app} は、 0.8×10^{-6} cm/sec (対照群) から 3.7×10^{-6} cm/sec (5-HT 枯渇群) へと有意な増大を示した。回腸では有意ではないものの、 0.9×10^{-6} cm/sec (対照群) から 1.6×10^{-6} cm/sec (5-HT 枯渇群) へと増大傾向が認めら

れた。Indomethacinを用いた場合には、空腸、回腸ともに、 P_{app} の有意な増大が認められ(空腸; 0.6×10^{-6} cm/sec (対照群) 3.4×10^{-6} cm/sec (5-HT枯渇群): 回腸; 0.9×10^{-6} cm/sec (対照群) 2.6×10^{-6} cm/sec (5-HT枯渇群))、5-HTの枯渇により小腸粘膜上のMRP2活性が有意に増大していることが示された。

BCRPについては、1 mM novobiocin、或いは100 μ M mitoxantroneの共存により評価した。Novobiocinを用いた場合、空腸、回腸共に有意な増大が認められた(空腸; 1.7×10^{-6} cm/sec (対照群) 4.1×10^{-6} cm/sec (5-HT枯渇群): 回腸; 1.2×10^{-6} cm/sec (対照群) 2.9×10^{-6} cm/sec (5-HT枯渇群))。また、mitoxantroneを用いた場合、空腸では有意ではないものの増加傾向が示された(1.6×10^{-6} cm/sec (対照群) 3.1×10^{-6} cm/sec (5-HT枯渇群))。回腸では有意な増大が認められた(1.1×10^{-6} cm/sec (対照群) 4.3×10^{-6} cm/sec (5-HT枯渇群))。これらの結果より、5-HT枯渇時には、BCRP活性も亢進していることが示されたと言える。

(3) 5-HT枯渇時における輸送担体の発現量評価: MRP2及びBCRPの発現に及ぼす5-HT枯渇の影響について検討を行った。MRP2は消化管上部で、BCRPは下部で発現が高いことが報告されているため、検討には、それぞれ空腸、回腸を用いた。尚、5-HT枯渇ラットより単離した小腸粘膜の湿重量、総タンパク濃度、homogenate中、刷子縁膜中タンパク濃度は、対照群ラットより単離した小腸粘膜のものと差異のないことが確認された。

単離した小腸刷子縁膜画分を用いて、SDS-PAGEにより分離後、Western blotによりMRP2、BCRPを検出した。定量性を確保するために、異なったタンパク量の刷子縁膜画分を用い、定量的な評価を試みた。Scion imageを用いて、対象タンパク質のバンドの

黒化度と数値化し、タンパク量との関係を検討したところ、対照群ラット、5-HT 枯渇ラット共に、両者に有意な相関関係が確認された。このことから、本手法により、刷子縁膜上の膜タンパク質発現量を定量的に評価できることが確認された。

上記方法に従い検討した結果、MRP2については、5-HT 枯渇ラットにおけるMRP2の発現レベルは、対照群ラットの約2倍から3倍に増大していることが示された。このことから、5-HT 枯渇によるMRP2活性の亢進は、小腸上皮細胞の刷子縁膜上に発現するMRP2量の上昇によるものであることが示された。また、BCRPについても同様に検討したところ、5-HT 枯渇ラットにおけるBCRPの発現レベルは、対照群ラットの約1.5倍に増大していることが示された。このことから、5-HT 枯渇によるBCRP活性の亢進は、少なくとも一部は、小腸上皮細胞の刷子縁膜上に発現するBCRP量の上昇によるものであることが示された。

これらの結果は、また、5-HTがMRP2、BCRPの発現機構に関与している可能性を示すものでもあった。

今後は、5-HTがこれらタンパク質の発現に如何にかかわっているか解明を進めると共に、今回明らかとなった変化が、実際にin vivo 経口吸収挙動にどのような影響を及ぼすか定量的な評価、解析を行っていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計2件)

(1) 三木 朋子、橋本 賢太、大河原 賢一、木村 聰城郎、檜垣 和孝: 有機アニオン性化合物の経口吸収挙動に及ぼすセロトニン枯渇

の影響：日本薬剤学会第26年会
(2011.5.29-31, タワーホール船堀, 東京)。

(2) 中島 駿、岩本 武晴、高梨 雅史、大河原
賢一、木村 聰城郎、檜垣 和孝：セロトニン
症候群発症時における薬物の経口吸収挙動
に関する基礎的研究：日本薬剤学会第27年
会 (2012.5.24 - 26, 神戸国際会議場, 神戸)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/department/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

檜垣 和孝 (HIGAKI KAZUTAKA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：60284080

(2)研究分担者

木村 聰城郎 (KIMURA TOSHIKIROU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
特命教授
研究者番号：10025710

大河原 賢一 (OOGAWARA KENICHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：30291470