

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590216

研究課題名(和文) 炎症性腸疾患に対する薬物療法および栄養療法の機構論的解析に基づいた根治療法の開発

研究課題名(英文) Improvement of inflammatory bowel diseases based on expression and functional changes of P-glycoprotein by methyl prednisolone and essential unsaturated fatty acids

研究代表者

富田 幹雄(TOMITA, MIKIO)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60207610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患( IBD)ラットにおいて、必須不飽和脂肪酸であるリノール酸および  $\gamma$ -リノレン酸はP-糖タンパク質(P-gp)の発現および機能レベルを修飾することにより、P-gp基質である治療薬の全身移行を回避させ、疾患部位の大腸まで効率よく送達させるという、薬物療法と栄養療法の相補的相乗効果が期待できる結果が示された。従って、IBDによってステロイド療法を遂行するにあたり必須不飽和脂肪酸の併用は有効な処方となる。エイコサペンタ塩酸、ドコサヘキサエン酸も検討し、各種脂肪酸の配合比率を考察することで、より良い処方設計を構築することが検討事項である。

研究成果の概要(英文)：Linoleic acid (LA) and  $\gamma$ -linolenic acid ( $\gamma$ -LnA) decrease the absorption of methylprednisolone (MP) from small intestine in inflammatory bowel disease (IBD) model rats and have delivery effects to large intestine to MP. LA and  $\gamma$ -LnA have anti-inflammatory effects and regulatory effects on expression and function of P-glycoprotein (P-gp) in small intestine. It suggests that administration of these essential unsaturated fatty acids not only prevent progress of IBD and but also normalize intestinal absorption and disposition of the drug which is a substrate of P-gp in vivo. More experimental information and data are necessary for more efficient administration schedule of drugs in IBD therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：炎症性腸疾患 Methylprednisolone P-glycoprotein 薬物療法 栄養療法 必須不飽和脂肪酸 Dextran sodium sulfate

### 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (UC) はクローン病とともに突発性炎症性腸疾患に分類される難治性の疾患であり特定疾患に指定されている。UC 患者数は毎年 5,000 人ずつ増加しており、厚生労働省の平成 19 年度の保険・衛生行政業務報告書によると、特定疾患医療受給者証の所持者数は 615,568 人で、人口 10 万対みると 481.8、疾患別では UC が 75.9 と最も高いと報告されている。本邦における UC 発症メカニズムは解明されておらず、食生活の欧米化、細菌や化学物質などの外来因子、免疫寛容の破綻などが関与すると推察されている。また、家族内発症が多いことから、遺伝的要因も指摘されている。感受性因子の同定も進んでいるが、人種差も認められており、未だ UC 発症の決定要因は確定されていない。

### 2. 研究の目的

特定疾患に指定されている炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel diseases; IBD) 特に潰瘍性大腸炎 (UC) の治療には炎症を制御し寛解状態にする方法が行われている。本研究では、薬物療法と栄養療法の双方により寛解状態を導くことを目指し、栄養療法として必須不飽和脂肪酸であるリノール酸 (LA) および $\alpha$ -リノレン酸 ( $\alpha$ -LnA) が病態進行に与える影響およびメチルプレドニゾロン (MP) などの副腎皮質ステロイド剤やシクロスポリン (CysA) などの免疫抑制剤の吸収および体内動態に与える影響を解明し、薬物療法と栄養療法が相補的に臨床効果を最大限に引き出せる戦略構築を目的とした。

### 3. 研究の方法

給水ビンにて 5% DSS 溶液を 1~7 日間自動給水方式で自由摂取させる。給水開始時に DSS 溶液 150mL セットし、5 日間で 75mL 以上摂取したラットを IBD モデルラットとし実験に供する。対照群には水を自動給水方式にて摂取させる。24 時間毎に体重を測定する。栄養療法として必須不飽和脂肪酸である n-6 系の LA および n-3 系の $\alpha$ -LnA を 1% 溶液として、投与前に十分に攪拌し懸濁させ、それぞれ 24 時間ごとに 5 日間胃内投与する。薬物療法としては、MP が臨床にて第一選択薬として使用されている。栄養療法との組み合わせにより MP の小腸からの吸収を抑え、全身移行を回避するとともに、疾患部位の大腸へ選択的に送達させることが出来るか検討する。MP は P-糖タンパク質 (P-gp) の基質であることから、P-gp の発現変動、機能変動を評価することで、MP の薬物療法としての質的向上を必須不飽和脂肪酸の併用により可能とする処方設計する。腸管各部位の膜透過性および吸収性を In vitro 膜透過実験および In situ 吸収実験より行う。別途 MP 静注後の体内動態を非線形最小二乗法によりモデル解析により評価する。胆汁排泄、尿中排泄実験を行うことで、IBD 病態時および必

須不飽和脂肪酸併用によるクリアランス臓器の機能を評価する。

### 4. 研究成果

(1) デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) による炎症性腸疾患モデルラット (IBD 群) を作成し、必須不飽和脂肪酸投与による改善効果を検討した。IBD 群では正常群に比べて体重減少が顕著であった。疾患部位である結腸の長さも減少し、LA 投与群、 $\alpha$ -LnA 投与群では、体重ならびに結腸の長さが正常群に近づく傾向を示した。結腸組織を DAI スコアで評価したところ、IBD 群は重度の症状を示したが、必須不飽和脂肪酸投与群では症状の改善が認められた。好中球が産生する  $H_2O_2$  を MPO 活性にて評価したところ IBD 群では MPO 活性が正常群と比較し有意に上昇し、必須不飽和脂肪酸投与群では正常群の値に回復した。一方、小腸上皮細胞のタンパク量は IBD 群では正常群に比べて減少し、必須不飽和脂肪酸投与群では回復したことから、IBD 群では小腸上皮細胞の膜タンパクの脱落が生じ、必須不飽和脂肪酸はその脱落を回避する作用を有していると推察した。P-gp タンパク発現量を検討したところ同様の結果が得られ、LA ならびに $\alpha$ -LnA は小腸の P-gp タンパク発現量を回復させることが示された (図 1)。

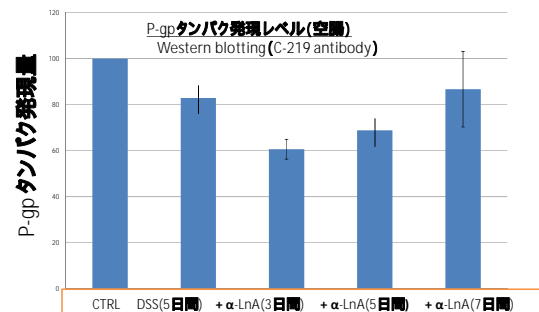


図 1 DSS により低下した P-gp タンパク発現量に対する $\alpha$ -LnA の回復効果

次に、P-gp 相対活性を P-gp の基質である Rhodamine123 の分泌方向の膜透過クリアランスから評価したところ、正常群において P-gp 阻害剤である verapamil 存在下の膜透過クリアランスは verapamil 不在下に比べて有意に低下し、これにより正常群において P-gp の活性が確認できた。これに対して、IBD 群では、Rhodamine123 の膜透過クリアランスは低下し、さらに verapamil 存在下での膜透過クリアランスとの間に有意な差が見なかったことから、病態下での P-gp 活性の低下が示された。MP を基質として用いて同様の検討を行ったところ同様の結果であった。これに対して、必須不飽和脂肪酸投与の影響を検討したところ、IBD 群で低下した P-gp 相対活性は LA および $\alpha$ -LnA の投与により回復した。よって、両脂肪酸は病態下で低下した P-gp の相対活性を誘導する作用を有していることが示された (表 1)。

	相対活性値
CTRL	1.89
DSS	1.41
DSS + LA	2.88
DSS + $\alpha$ -LnA	3.21

表 1 空腸の相対的 P-gp 活性

(2) 別途、Caco-2 細胞を用いて同様な検討を行ったところ、Rhodamine123 の分泌方向の膜透過クリアランスは LA および  $\alpha$ -LnA の濃度依存的に上昇し、verapamil の存在下による阻害の程度は脂肪酸の濃度に関わらず、いずれの条件下においても同レベルの阻害が見られたことから、非炎症系モデルにおいても両脂肪酸が P-gp の相対活性を上昇させることが示された。LA および  $\alpha$ -LnA に加えて、エイコサペンタ塩酸、ドコサヘキサエン酸についても、濃度依存的な P-gp の機能誘導が示された。なお、P-gp タンパクレベルに変動は見られなかった。一方、正常ラットにおいては、LA および  $\alpha$ -LnA は P-gp の発現レベルを上昇させた。しかしながら、mdr-1 および PXR レベルに変動は見られなかった。IBD 群では、P-gp をコードする mdr-1 の発現レベル (図 2) および PXR の発現レベルが LA および  $\alpha$ -LnA 投与により上昇したことから、IBD 時の P-gp の発現が核内レセプターを介した機構であることが示された。よって、必須不飽和脂肪酸の P-gp 発現レベル上昇の機構は、正常時と病態時では異なることが示された。

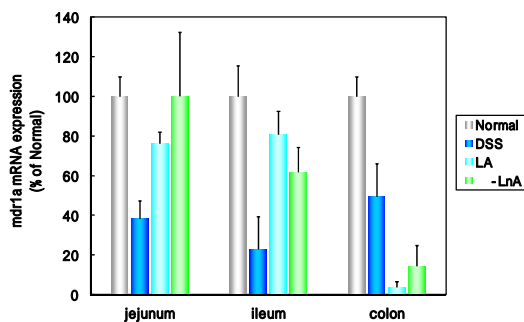
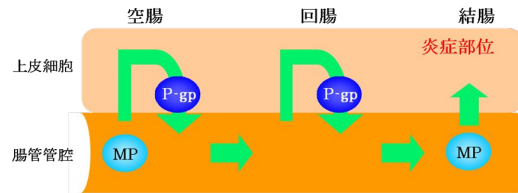


図 2 P-gp をコードする mdr1a mRNA レベルの変動

以上、薬物療法の第一選択薬であるメチルプレドニゾロン (MP) の小腸からの全身移行が抑えられ、MP の大腸ターゲティングが高まると推察できた (Scheme) ことから、現在 MP の小腸からの吸収動態と血中濃度推移の速度論解析を行っている。なお炎症性エイコサノイドを産生する n-6 系の LA および抗炎症性のエイコサノイドを産生する n-3 系の LnA はともに改善効果を示したことから、両脂肪酸の最適な配合比率など、さらなる検討

が必要である。



**IBDモデルラット**  
LAおよび $\alpha$ -LnAの投与は、低下したP-gpタンパク発現を回復させ、かつP-gp相対活性は正常群よりも高まり、MPの全身移行を回避できる。両脂肪酸はMPの小腸吸収を調節できることから、MPの治療成績を向上(大腸ターゲティング)させることが可能である。

Scheme 1 LA、 $\alpha$ -LnA による P-gp 発現調節に立脚した MP の大腸デリバリー

## 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 6 件)

Y. Takizawa, H. Kishimoto, M. Tomita and M. Hayashi. Changes in the expression levels of tight junction components during reconstitution of tight junction from mucosal lesion by intestinal ischemia/reperfusion. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 査読有、**39**, 211-220, 2014.  
DOI: 10.1007/s13318-013-0151-z

Y. Takizawa, T. Kitazato, H. Ishizaka, N. Kamiya, Y. Itoh, M. Tomita and M. Hayashi. Changes in absorption and excretion of rhodamine123 by sodium nitroprusside. Int. 査読有、J. Pharm. **450**, 31-35, 2013.  
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.04.026

M. Tomita, N. Doi, A. Kimura and M. Hayashi. Increases in bioavailability of poorly absorbed drug by acylcarnitine application into intestinal lumen in rats. J. Pharm. Sci. 査読有、**101** 3511-3517, 2012.  
DOI: 10.1002/jps.23214

[学会発表](計 21 件)

横田隼人、熊谷茉歩、飯田 遼、伊藤邦郎、森本かおり、富田幹雄、必須不飽和脂肪酸によるP-糖タンパク質の機能ならびに構造変化、第 53 回日本薬学会東北支部大会、いわき明星大学(福島県いわき市)、2014 年 10 月 5 日

飯田 遼、我妻雄太、森本かおり、富田幹雄、必須不飽和脂肪酸によるP-糖タンパク質の機能ならびに構造変化、第 30 回日本 DDS 学会、慶應義塾大学薬学部

芝共立キャンパス（東京都港区）、2014  
年7月30日

佐賀綾奈、岡部真由子、板垣美保、青川  
歩実、渋谷亜由美、山口 聡、伊藤邦郎、  
瀧沢裕輔、林 正弘、富田幹雄、潰瘍性  
大腸炎ラットの腸管吸収および肝機能に  
対する必須不飽和脂肪酸の影響、日本薬  
剤学会第28年会、ウイנקあいち（愛知  
県名古屋市）、2013年5月25日

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富田幹雄（TOMITA, Mikio）  
東北薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：60207610