

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860195

研究課題名(和文)下痢や便秘を伴う消化器疾患に対する腸管アクアポリンを標的とした新規治療戦略

研究課題名(英文)A new treatment strategy for diarrhea and constipation via intestinal aquaporin

## 研究代表者

五十嵐 信智 (IKARASHI, NOBUTOMO)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40409363

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)：近年、体内の水の輸送において、アクアポリンが重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。本研究では、下痢や便秘の発症における大腸AQP3の役割について調べた。本研究の結果から、センノシドAによる瀉下作用には、大腸AQP3の発現低下が関与していることが明らかとなった。一方、モルヒネによる便秘には、大腸AQP3の発現増加が関与していることが明らかとなった。今後、大腸AQP3をターゲットとした新たな瀉下剤や止瀉剤の開発が可能になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin (AQP), which are water channels, plays an important role in the water transport in the body. In this study, we investigated the role of colon AQP3 in the development of diarrhea and constipation. It was clarified that sennoside A induced the diarrhea accompanied by the decrease of the colon AQP3. In addition, it was revealed that morphine induced the constipation accompanied by the increase of the colon AQP3. Therefore, new laxatives and antidiarrheals targeting intestinal AQP3 may be developed in the future.

研究分野：医療薬学

キーワード：アクアポリン 下痢 便秘 モルヒネ センノシドA 大腸

1. 研究開始当初の背景

近年、体内の水の輸送にアクアポリン (AQP) が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。AQP は浸透圧勾配により、水やグリセロールを選択的に透過させる水チャネルであり、ヒトにおいて AQP0 から AQP12 までの 13 種類が様々な臓器に発現していることが知られている。腸管には多数の AQP ファミリーの発現が認められており、少なくとも AQP1、AQP2、AQP3、AQP4、AQP7、AQP8、AQP9、AQP10 の 8 種類の存在が知られている。しかしながら、腸管における AQP を介した水の輸送については、ほとんど解明されていなかった。

このような背景の中、申請者はこれまでに、便の水分量を最終的にコントロールしている大腸の粘膜上皮細胞に AQP3 が優位に発現していることを見出し (図 1)、AQP3 が便の水分量を変動させる極めて重要な因子であることを明らかにした (N. Ikarashi, et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver, 2015)。

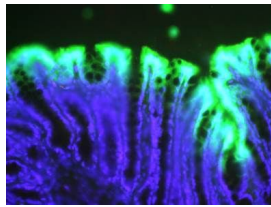


図 1. 大腸粘膜上皮細胞における AQP3 の局在 (青; 核; 緑; AQP3)

2. 研究の目的

本研究では、種々の原因で発症する下痢や便秘においても、AQP3 の発現変化が重要な役割を担っているのではないかと考え、その立証を試みた。下痢を引き起こす薬物として瀉下剤である大黄あるいはその成分であるセンノシド A を、便秘を引き起こす薬物としてモルヒネを用いて、解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 大黄あるいはセンノシド A の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割

ラットに大黄あるいはセンノシド A を経口投与し、糞中水分量を測定した。また、大腸を摘出し、AQP3 のタンパク質発現量を解析した。さらに、大腸の炎症性サイトカインの発現量、マクロファージの活性化の程度およびプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 濃度を調べた。また、Raw264.7 細胞および HT-29 細胞を用いて、メカニズム解析を行った。

さらに、ラットにインドメタシンを腹腔内投与した後、センノシド A を経口投与した際の糞中水分量および大腸 AQP3 のタンパク質発現量を解析した。

(2) モルヒネ誘発性便秘症の発症における

大腸 AQP3 の役割

ラットにモルヒネを経口投与し、経時的に糞中水分量を測定した。また、大腸を摘出し、AQP3 のタンパク質発現量を解析するとともに、セロトニン陽性 EC 細胞の局在を免疫組織化学染色により観察した。さらに、AQP3 機能阻害剤である塩化水銀とモルヒネを併用した場合の下痢の程度を調べた。また、HT-29 細胞を用いて、メカニズム解析を行った。

さらに、ラットにフルオキセチンを経口投与した後、モルヒネを経口投与した際の下痢の程度と大腸 AQP3 のタンパク質発現量を調べた。

4. 研究成果

(1) 大黄あるいはセンノシド A の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割 (R. Kon, N. Ikarashi, et al., J. Ethnopharmacol., 2014)

大黄あるいはセンノシド A の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割について検討した。ラットに大黄を経口投与した結果、大黄は投与 2 時間後にはすでに大腸に到達していた。しかしながら、大黄投与 2 時間後の糞中水分量は投与前と比べて差は見られず、下痢の発症も認められなかった。これに対して、投与 5 時間後から糞中水分量は有意に増加し、重度の下痢が認められた (図 2)。一方、大腸 AQP3 のタンパク質発現量は、下痢が認められなかった投与 2 時間後では、投与前と比べて差は見られなかったものの、投与 5 時間後では投与前の約 20% まで低下していた。また、投与 8 時間後においても、AQP3 のタンパク質発現量は投与前の約 40% であった (図 2)。さらに、この AQP3 の発現低下と糞中水分量の増加には、良い相関関係が見られた。加えて、大黄による大腸 AQP3 の発現低下作用は、大黄に含まれる成分センノシド A 投与時にも認められた (data not shown)。これらのことから、大黄あるいはセンノシド A 投与により大腸粘膜上皮細胞の AQP3 が減少すると、腸管からの水の吸収が抑制され、下痢が発生する可能性が示唆された。

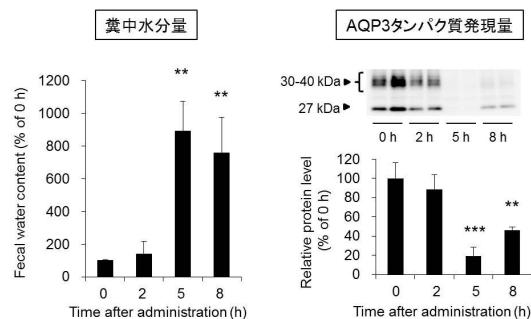


図 2. 大黄投与による糞中水分量および AQP3 タンパク質発現量の変化

次に、センノシド A がどのようなメカニズムで AQP3 の発現量を減少させたかについて調べた。センノシド A は大腸において、活性代謝物レインアンスロンを経て、レインへと変換される。そこでまず、センノシド A、レインアンスロンあるいはレインが直接大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現量を低下させた可能性について、ヒト結腸癌由来 HT-29 細胞を用いて調べた。その結果、センノシド A、レインアンスロンあるいはレインが直接大腸に作用し、AQP3 の発現量を低下させた可能性は低いことがわかった (data not shown)。

続いて、センノシド A、レインアンスロンあるいはレインが間接的に、大腸の AQP3 の発現量を低下させた可能性について調べた。申請者はこれまでに、大腸刺激性下剤であるピサコジルがマクロファージを活性化すること、この活性化されたマクロファージが PGE<sub>2</sub> を分泌し、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現量を減少させることを明らかにした (N. Ikarashi, et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver, 2015)。そこで、センノシド A、レインアンスロンあるいはレインが直接マクロファージを活性化して PGE<sub>2</sub> を分泌させ、大腸の AQP3 の発現量を低下させた可能性について調べた。その結果、Raw264.7 細胞にセンノシド A およびレインを添加した場合は、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の mRNA 発現量および PGE<sub>2</sub> 濃度の上昇は認められなかった。これに対して、レインアンスロンを添加した場合は、COX-2 の mRNA 発現量および PGE<sub>2</sub> 濃度の著明な上昇が認められた (図 3)。以上のことから、大黄あるいはセンノシド A 投与後の AQP3 の発現低下は、活性代謝物レインアンスロンがマクロファージを活性化し、マクロファージから分泌された PGE<sub>2</sub> が、パラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用して生じたものと考えられる。

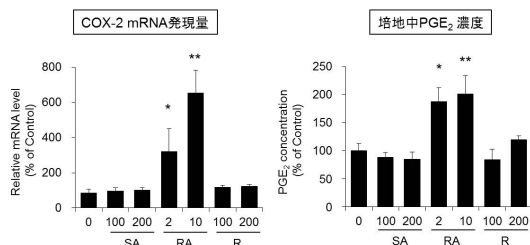


図 3 . Raw264.7 細胞への添加による COX-2 の mRNA 発現量および培地中 PGE<sub>2</sub> 濃度の変化 (SA ; センノシド A、RA ; レインアンスロン、R ; レイン)

最後に、COX 阻害剤インドメタシンをラットに前処置し、大腸 PGE<sub>2</sub> 濃度を低下させることにより、センノシド A の瀉下作用が減弱

するかどうかについて調べた。その結果、インドメタシンを投与することにより、センノシド A の瀉下作用が抑制されるとともに、大腸の AQP3 タンパク質発現量の低下が抑制されることがわかった (図 4)。このことより、センノシド A による大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の急激な発現低下には、PGE<sub>2</sub> が関与している可能性が確認できた。

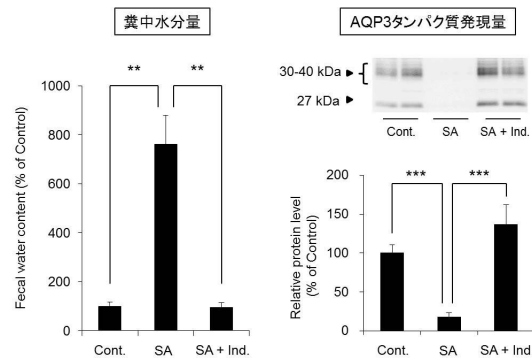


図 4 . センノシド A とインドメタシンを併用した際の糞中水分量および AQP3 発現量の変化

以上の結果から、大黄は大腸の AQP3 の発現量を減少させることにより、腸管側から血管側への水の移動を抑制し、瀉下作用を示している可能性が示唆された。さらに、この AQP3 の減少は、大黄の主成分センノシド A の活性代謝物レインアンスロンが大腸のマクロファージを活性化して PGE<sub>2</sub> の分泌を亢進することによって引き起こされることがわかった (図 5)。

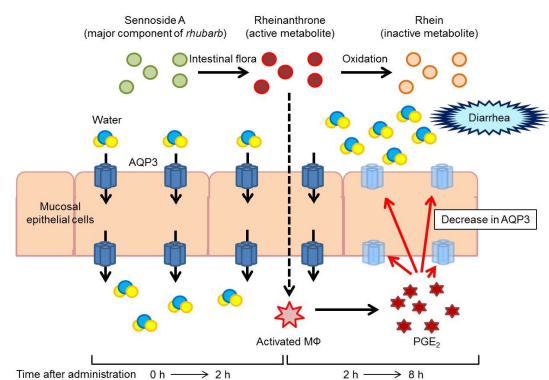


図 5 . センノシド A による下痢発症メカニズム

## (2) モルヒネ誘発性便秘症の発症における大腸 AQP3 の役割 (R. Kon, N. Ikarashi, et al., Toxicol. Sci., 2015)

ラットにモルヒネを単回経口投与した際の便秘の程度と大腸の AQP3 の発現量との関係について調べた。その結果、大腸における AQP3 の発現量は、投与 1 時間後から有意に増加し、この増加は投与 5 時間後まで持続

していることがわかった(図6)。また、この AQP3 の発現増加に伴って、糞中水分量は徐々に低下し、投与5時間後において最も低値を示していた(図6)。以上のことから、モルヒネを投与し便秘が発症した際には、大腸の AQP3 の発現量が増加することがわかった。したがって、モルヒネは大腸の AQP3 の発現を増加させ、腸管側から血管側への水の吸収を亢進し、便秘を引き起こしている可能性が考えられた。

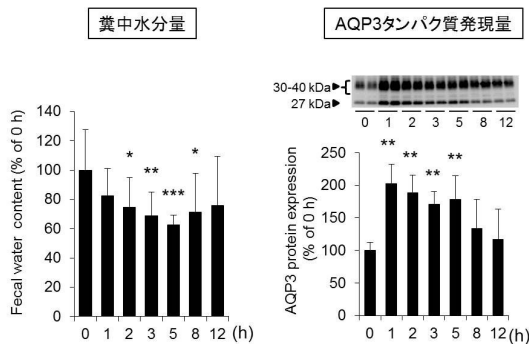


図6. モルヒネ投与による糞中水分量および AQP3 タンパク質発現量の変化

次に、この AQP3 の発現増加がモルヒネによる便秘発症に寄与しているかどうかを調べた。具体的には、AQP3 の水透過機能を阻害する HgCl<sub>2</sub> をモルヒネと併用投与した場合の排便回数および排便総重量を調べた。HgCl<sub>2</sub> 併用群では、排便回数および排便総重量のいずれもモルヒネ単独群のそれと比べて有意に増加していた (data not shown)。以上の結果から、モルヒネ投与時の大腸 AQP3 の発現増加による大腸からの水の吸収亢進は、便秘症発症要因の一つであることが明らかとなった。

続いて、モルヒネがどのようなメカニズムで AQP3 の発現を増加させたのかを調べた。まず、モルヒネあるいはその代謝物が直接大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現を増加させた可能性について、HT-29 細胞を用いて調べた。その結果、モルヒネあるいはその代謝物は、大腸の AQP3 の発現を直接増加させる可能性は低いことが示唆された (data not shown)。

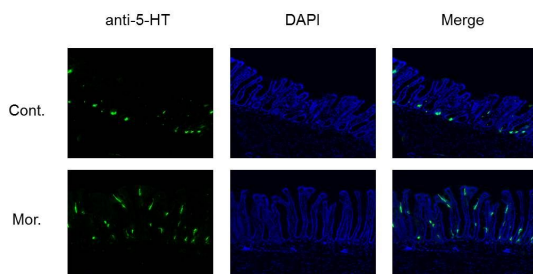


図7. 大腸におけるセロトニン陽性 EC 細胞の局在 (青;核、緑;セロトニン)

次に、モルヒネによる間接的な作用により、大腸の AQP3 の発現が増加しているかどうかを調べた。これまで、モルヒネを投与すると、腸管内セロトニン濃度が上昇することが知られている。そこで、セロトニンに着目し、種々検討した。その結果、モルヒネを投与したラット大腸において、セロトニン陽性 EC 細胞の形態が変化し、その分布も crypt より上層の粘膜層に多くみられた(図7)。一方、セロトニンを HT-29 細胞に添加した結果、AQP3 の発現量が増加していることが確認できた(図8)。加えて、この発現増加は、5-HT<sub>2</sub>、5-HT<sub>3</sub> および 5-HT<sub>4</sub> 受容体の阻害剤前処置では変化が見られなかったが、セロトニントランスポーター阻害剤であるフルオキセチンの前処置により、抑制された(図8)。さらに、セロトニンにより PPAR<sub>γ</sub> の核内移行の亢進が認められたが、フルオキセチンの前処置により、これも抑制された(図8)。これまで、セロトニンが PPAR<sub>γ</sub> を活性化すること、および PPAR<sub>γ</sub> 刺激薬が AQP3 の発現を増加させることが知られている。したがって、セロトニンはセロトニントランスポーターにより細胞内に取り込まれ、PPAR<sub>γ</sub> のリガンドとして機能して AQP3 の発現を増加させた可能性が考えられた。

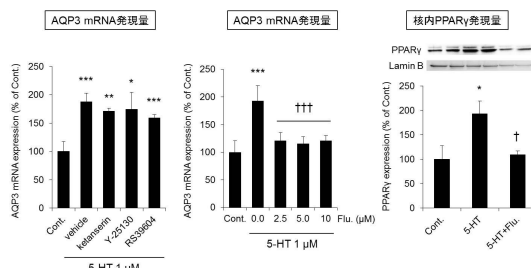


図8. AQP3 の mRNA 発現量および PPAR<sub>γ</sub> の核移行量に及ぼすセロトニン受容体阻害剤およびセロトニントランスポーター阻害剤の影響

最後に、フルオキセチンをラットに前処置することにより、モルヒネ誘発性便秘症の発症が抑制されるかどうかを調べた。その結果、フルオキセチンをラットに前処置することにより、モルヒネによる大腸 AQP3 の発現増加が抑制されるとともに、モルヒネ誘発性便秘症も有意に改善されることがわかった(図9)。

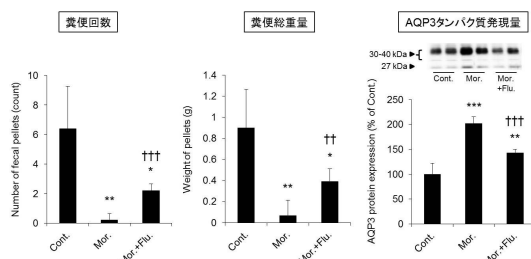


図9. モルヒネによる便秘および大腸 AQP3 の発現増加に及ぼすフルオキセチンの影響

以上の結果から、モルヒネは大腸における AQP3 の発現量を増加させることにより、腸管側から血管側への水の吸収を亢進し、便を硬化することによって便秘を引き起こしている可能性が示唆された。さらに、モルヒネによる AQP3 発現増加は、EC 細胞からのセロトニンの分泌亢進が関与している可能性が考えられた。また、セロトニンによる AQP3 の発現増加メカニズムに関しては、セロトニンがセロトニントランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、PPAR $\gamma$  を活性化し、AQP3 の発現を増加させたものと考えられる (図 10)。

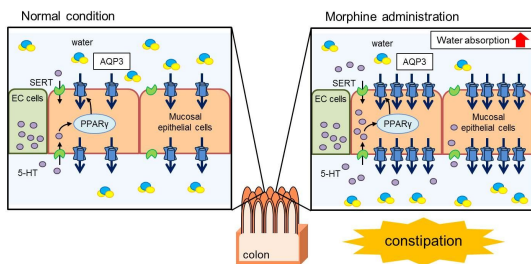


図 10 .モルヒネ誘発性便秘症の発症メカニズム

本研究の結果は、大腸の AQP3 の機能や発現を制御する物質がモルヒネ誘発性便秘症の新規治療薬になり得ることを示唆するものである。加えて、腸管でのセロトニンの作用を調節しているセロトニントランスポーターをターゲットにした薬物が、モルヒネ誘発性便秘症の治療や予防に有効である可能性を示している。今回見出した新しい知見は、新しい便秘の治療薬開発や治療法の提案においても重要なものとなるであろう。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

R. Kon, N. Ikarashi, A. Hayakawa, Y. Haga, A. Fueki, Y. Kusunoki, M. Tajima, W. Ochiai, Y. Machida, and K. Sugiyama, Morphine-induced constipation develops with increased aquaporin-3 expression in the colon via increased serotonin secretion, *Toxicol. Sci.*, 145, 337-347 (2015). (査読あり)

R. Kon, N. Ikarashi, C. Nagoya, T. Takayama, Y. Kusunoki, M. Ishii, H. Ueda, W. Ochiai, Y. Machida, K. Sugita, and K. Sugiyama, Rheinanthrone, a metabolite of sennoside A, triggers macrophage activation to decrease aquaporin-3 expression in the colon, causing the laxative effect of rhubarb extract, *J. Ethnopharmacol.*, 152, 190-200 (2014). (査読あり)

〔学会発表〕(計 10 件)

今理紗子, 五十嵐信智, 早川晃央, 羽賀裕介, 笛木愛華, 落合 和, 杉山 清, モルヒネは大腸 aquaporin-3 の発現量を増加させることにより便秘を誘発する, 第 87 回日本生化学大会, 2014 年 10 月 15-18 日, 京都

五十嵐信智, 今 理紗子, 名古屋智香, 高山朋子, 町田昌明, 落合 和, 杉田和幸, 杉山 清, センノシド A の新規瀉下作用メカニズムの解明とその適正使用に関する研究, 第 8 回日本緩和医療薬学会年会, 2014 年 10 月 3-5 日, 愛媛

今理紗子, 五十嵐信智, 三村綾子, 飯笹朋彦, 早川晃央, 羽賀裕介, 笛木愛華, 落合 和, 杉山 清, モルヒネ誘発性便秘症の発現機序における大腸 aquaporin-3 の役割, 第 8 回日本緩和医療薬学会年会, 2014 年 10 月 3-5 日, 愛媛

今理紗子, 五十嵐信智, 早川晃央, 羽賀裕介, 笛木愛華, 北岡 諭, 落合 和, 杉山 清, モルヒネ誘発性便秘症の新規発症メカニズムの解析, 第 24 回日本医療薬学会年会, 2014 年 9 月 27-28 日, 名古屋

今理紗子, 五十嵐信智, 三村綾子, 飯笹朋彦, 早川晃央, 羽賀裕介, 笛木愛華, 落合 和, 町田昌明, 杉山 清, モルヒネ誘発性便秘症における大腸 AQP3 の役割, 医療薬学フォーラム 2014, 2014 年 6 月 28-29 日, 東京

今理紗子, 五十嵐信智, 名古屋智香, 高山朋子, 町田昌明, 落合 和, 杉田和幸, 杉山 清, 大黃の瀉下作用は、大腸マクロファージの活性化を介した大腸アクアポリン 3 の発現低下により発揮される, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 27-30 日, 熊本

今理紗子, 五十嵐信智, 名古屋智香, 田中嘉一, 町田昌明, 落合 和, 杉山 清, 大黃の瀉下作用は、大腸 PGE $_2$  の産生亢進を介した大腸アクアポリン 3 の発現低下により発揮される, 第 86 回日本生化学大会, 2013 年 9 月 11-13 日, 横浜

五十嵐信智, 今理紗子, 名古屋智香, 落合和, 杉山 清, 大黃およびその主成分センノシド A は大腸アクアポリン 3 の発現低下を介して瀉下作用を発揮する, 第 30 回和漢医薬学会学術大会, 2013 年 8 月 31 日-9 月 1 日, 金沢

今理紗子, 五十嵐信智, 名古屋智香, 楠 欣己, 落合 和, 杉山 清, 大黃は大腸アクアポリン 3 の発現低下を介して瀉下作用を発揮する, 第 64 回日本東洋医学会学術総会, 2013 年 5 月 31 日-6 月 2 日, 鹿児島

今理紗子, 五十嵐信智, 名古屋智香, 落合和, 杉山 清, 大腸刺激性下剤大黄の瀉下作用における大腸 aquaporin-3 の役割, 日本薬剤学会第28年会, 2013年5月23日-25日, 名古屋

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 信智 (IKARASHI NOBUTOMO)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号 ; 40409363