

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590145

研究課題名(和文) 腸神経系による薬物吸収制御に関する統合的解析

研究課題名(英文) Systematic analysis of ENS-regulation of drug absorption

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

**研究成果の概要(和文)：**薬物の受動拡散による膜透過に対する腸神経系の影響を、小分子薬物のモデルとして細胞間隙経路のマーカであるマンニトールを、経細胞経路のマーカであるアンチピリンとフェナセチンを用いて、Caco-2細胞系、ラット単離小腸粘膜を用いた Ussing type chamber により検討した。その結果、アドレナリン作動性神経、コリン作動性神経亢進時のいずれにおいても、有意な変動がないことが明らかとなったが、一方で、高分子モデル薬物 FD-40 (分子量約 40000) の透過は、アドレナリン作動性神経亢進時に有意な低下を、コリン作動性神経亢進時には有意な増加を示すことが明らかとなった。また、セロトニンとクロルギリンの腹腔内投与により作製したセロトニン異常モデルラットによる検討で、小腸粘膜中の P-糖タンパク質活性が著しく上昇すること、その機構の一部として小腸上皮細胞の刷子縁膜中の P-糖タンパク質発現量の増大が寄与していることが明らかとなった。

**研究成果の概要(英文)：**Effect of enteric nervous system on drug absorption via passive diffusion was investigated with Caco-2 cells monolayer or isolated rat intestinal sheet by utilizing mannitol as a marker for transport through paracellular route and antipyrine and phenacetin as a marker for transport through transcellular route. Stimulation of neither adrenergic neuron nor cholinergic neuron affects the mucosal transport of these small molecules. However, adrenergic stimulation decreased or cholinergic stimulation increased the transport of FD-40 across the intestinal mucosa. On the other hand, model rats of serotonin syndrome were prepared by intraperitoneal injection of both serotonin and clorgyline. Utilizing an isolated intestinal sheet from the model rat, the extensive increase in P-glycoprotein activity was observed, which was at least partly attributed to the significant induction of P-glycoprotein expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、アドレナリン、ベタネコール、受動拡散、細胞間隙経路、経細胞経路、セロトニン、P-糖タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

薬物の吸収を担う小腸は、その運動および機能を中枢神経系とは独立した自律神経系である腸神経系(enteric nervous system, ENS)により支配されている。この ENS は、胃を含めた消化管全体に張り巡らされた高度に発達した神経系であり、第二の脳とも称されている。ENS は、組織学的には 2 つの叢、即ち、小腸の最も外側に位置する縦走筋に分布する筋層間神経叢と、その内側の輪状筋に分布する粘膜下神経叢から成り立っている。前者は、主に小腸の収縮、弛緩などをつかさどり、蠕動運動の制御を担っているのに対し、後者は、小腸上皮細胞の機能や血流を制御する働きを持つとされている。また、この 2 つの神経叢間には、密接な線維連絡があると考えられており、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。この運動制御系神経叢である筋層間神経叢は、コリン作動性の secretomotor 系のニューロンから成り立っていることが、また機能制御系神経叢である粘膜下神経叢はコリン作動性ニューロンと VIP 作動性ニューロンから成っていることが、モルモットを用いた研究により明らかになっている。ENS による消化管の制御は、基本的には、これらの神経系において分泌される神経伝達物質、更には 2 次的に分泌されるホルモンなどにより行われていると考えられている。また、ENS はアドレナリン作動性ニューロン、コリン作動性ニューロンを主体としているが、これらに分類されないものを非アドレナリン作動性-非コリン作動性ニューロンと称し、これら 3 つの神経系から構成されている。これら神経系の小腸機能に対する影響は、小腸の筋肉弛緩・緊張、蠕動運動、あるいは水や電解質の吸収・分泌について多くの研究がなされている。しかしながら、薬物の吸収に及ぼす影響について検討した例は、依

然として、ほとんどないのが現状である。従って、様々な吸収特性を持つ薬物について、ENS の影響を系統的に検討・評価・総括することは、学問的に極めて有意義であるばかりでなく、得られた結果は、生理的条件の変化、特に病態時における生理的条件の変化に伴う薬物の吸収特性の変動を理解するための重要な情報となる。

## 2. 研究の目的

消化管からの薬物吸収は、様々な機構により起こることが知られている。最も一般的な受動拡散、輸送担体を介して起こる促進拡散、能動輸送、更に高分子薬物についてはエンドサイトーシスも重要な機構のひとつとなる。また、受動拡散については、細胞間隙経路を介する場合と経細胞経路を介する場合があるなど、薬物の消化管吸収機構は複雑で多岐にわたっている。本研究の目的は、これら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のか系統的に検討・評価し、その制御機構の全貌を明らかにすることにある。更には、生理的条件の変化、特に病態時における生理条件の変化との関連性を明らかにすることにより、有効な薬物治療を行うための論理的な投与設計の立案へと結び付けることを目指すものである。

## 3. 研究の方法

(1)受動拡散による薬物吸収の腸神経系制御の機構解明: これまで、主に難吸収性色素フェノールレッドをモデル化合物として、受動拡散による薬物吸収に対するENSの影響を検討してきたが、近年、フェノールレッドの膜透過には分泌系の輸送担体が関与している可能性が考えられており、ENSによる受動拡散を介した薬物吸収の制御についても再評価が必要と考えた。そこで、小分子薬物の透過に

については、経細胞経路の透過マーカーとしてアンチピリンとフェナセチンを、細胞間隙経路の透過マーカーとしてマンニトールを選択した。これらマーカーの、アドレナリン作動性、コリン作動性神経亢進時の膜透過性変化を、単離小腸粘膜による Ussing type chamberを用いた実験系、及びCaco-2細胞系を用いた実験系により評価した。実験中は、同時に、膜抵抗値を測定した。また、高分子化合物についても FITC-dextran (分子量 4000~40000)を用いて検討を加えた。高分子の透過については、エンドサイトーシスの関与について、コルヒチンを用いることで評価した。

(2) セロトニンによる薬物吸収制御について：セロトニン異常のP-糖タンパク質の活性に及ぼす影響に着目して検討を進めるため、セロトニン及びセロトニンの主要代謝酵素モノアミンオキシダーゼ A (MAO-A)の選択的阻害剤であるクロルギリンをラットに4日間腹腔内投与することによりセロトニン異常モデルラットを作製した。作製したセロトニン異常モデルラットより単離した小腸粘膜を用い、P-糖タンパク質の典型的な基質である rhodamine123 を用いて、Ussing type chamberによる透過実験を行い、P-糖タンパク質の活性変動を評価した。また、Western blot法により発現タンパク量の定量的評価も行った。

#### 4. 研究成果

(1)受動拡散による薬物吸収の腸神経系制御の機構解明：これまで、主に難吸収性色素フェノールレッドをモデル化合物として、受動拡散による薬物吸収に対する ENS の影響を検討してきたが、近年、フェノールレッドの膜透過には分泌系の輸送担体が関与している可能性が考えられており、ENS による受動

拡散を介した薬物吸収の制御についても再評価が必要と考えられた。そこで、小分子薬物の透過については、経細胞経路の透過マーカーとしてアンチピリンとフェナセチンを、細胞間隙経路の透過マーカーとしてマンニトールを選択し、これらマーカーの膜透過性に及ぼすアドレナリン、或いはベタネコールの影響を、粘膜下神経叢、更には細胞膜上の受容体を介した影響を評価できる単離小腸粘膜を用いた Ussing type chamber による実験系、及び細胞膜上の受容体を介した作用のみを評価できる Caco-2 細胞系を用いた実験系により検討した。その結果、いずれの実験系においても、これら小分子の経細胞経路、細胞間隙経路を介した透過に、有意な変化は認められなかった。そこで次に、高分子化合物の透過について、FITC-dextran (分子量 4000~40000)を用いて検討を加えた。Caco-2 細胞を用いた実験の結果、アドレナリンにより、分子量約 20000 の FD-20、同約 40000 の FD-40 の透過が有意に抑制されることが明らかとなった。しかし、分子量約 4000 の FD-4 については変化が認められなかった。また、膜抵抗値には有意な変化は認められなかった。これらのことから、アドレナリンにより、細胞間隙の微弱な閉口が起り、高分子化合物の細胞間隙経路を介した透過が抑制されたものと考えられた。引き続き、上記作用が、いずれのアドレナリン受容体を介した作用であるかを、選択的アドレナリン作動薬を用いて検討した。その結果、 $\alpha_2$ -agonist であるクロニジンによってのみ、FD-40 の透過に抑制が認められたことから、アドレナリンにより認められた作用は、 $\alpha_2$ -receptor を介した作用であるものと考えられた。一方、ベタネコールによりムスカリン受容体を刺激したところ、FD-40 の透過に有意な上昇が認められた。しかしながら、膜抵抗値には有意

な変化は認められず、このことから、ムスカリン受容体の刺激により微弱な細胞間隙経路の開口が起こったものと考えられた。

(2)セロトニンによる薬物吸収制御について：体内に存在する総量の約90%が小腸粘膜のクロム親和性細胞に存在し、消化管ホルモンとして、また腸神経系の神経伝達物質として小腸の機能制御に深く関わっているセロトニンに焦点を絞り、特にセロトニン異常の影響に着目し、検討を進めた。様々な消化管疾患時には、消化管粘膜においてセロトニン異常が報告されており、疾患との関係が示唆されている。しかしながら、セロトニン異常の薬物吸収への影響については報告がない。そこで、セロトニン異常の及ぼすP-糖タンパク質活性への影響を検討することとした。セロトニン及びセロトニンの主要代謝酵素モノアミンオキシダーゼ A (MAO-A)の選択的阻害剤であるクロルギリンをラットに4日間腹腔内投与することによりセロトニン異常ラットを作製した。小腸粘膜を用いたin-vitro膜透過実験の結果、ローダミン123の排出方向の輸送に著しい増大が認められ、セロトニンの慢性的な暴露により、P-糖タンパク質の輸送活性が増大することが明らかとなった。一方、セロトニンのみを投与したラット小腸では、P-糖タンパク質の輸送活性に顕著な変化は認められなかった。また、クロルギリン単独の慢性投与では、ローダミン123の吸収方向の透過性に増加傾向が見られ、P-糖タンパク質の輸送活性が低下している可能性が示唆された。MAO-Aは、セロトニンのみならずノルアドレナリンやアドレナリンも代謝することから、クロルギリンによるMAO-A阻害によるアドレナリン作動性神経の亢進が一部寄与している可能性が推察された。引き続き、セロトニン症候群モデルラットにおいて、小腸粘膜におけるP-糖タンパク質活性が顕著に亢進した

機構について検討を進めた。即ち、セロトニン及びセロトニンの主要代謝酵素MAO-Aの選択的阻害剤クロルギリンをラットに4日間腹腔内投与することによりセロトニン症候群モデルラットを作製し、摘出した小腸より粘膜を剥離し、粘膜ホモジネート中、更に精製して得た刷子縁膜画分中に発現しているP-糖タンパク質をWestern blot法により定量的に評価した。その結果、P-糖タンパク質の発現量は、粘膜ホモジネート中では、コントロールの約1.7倍、刷子縁膜画分中では約3倍に増大していることが明らかとなった。一方、セロトニンのみを投与したラットの小腸では、粘膜ホモジネート中発現量には有意な変化は見られず、刷子縁膜上のP-糖タンパク質が約2倍に上昇することが明らかとなった。また、クロルギリンのみを処理したラットでは、粘膜ホモジネート、刷子縁膜ともに、P-糖タンパク質の発現量には変化は見られなかった。これらの結果は、セロトニン症候群時における、P-糖タンパク質の生合成量の増加、また生合成されたP-糖タンパク質の刷子縁膜へのトラフィックの増大を示唆するものであった。トラフィックの増大については、セロトニンによる5-HT<sub>4</sub>受容体の刺激を介したcAMP上昇が関与している可能性が考えられた。

## 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1件)

- (1) T. Kimoto, M. Takanashi, H. Mukai, K. Ogawara, T. Kimura and K. Higaki: Effect of adrenergic stimulation on drug absorption via passive diffusion in Caco-2 cells. *Int. J. Pharm.*, 査読有, **368** (1-2), 2009, 31-36.

[学会発表] (計4件)

- (1) 岩本 武晴: 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検討: 日本薬剤学会第25年会 (2010.5.12-14, あわぎんホール, 徳島).
- (2) Masashi Takanashi: Evaluation of drug absorption from small intestine in serotonin syndrome: Study of P-glycoprotein and passive diffusion via paracellular route: 第24回日本薬物動態学会年会 (2009.11.27-29, 京都国際会議場).
- (3) 木本 尚宏: 有機アニオン性化合物の消化管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24年会 (2009.5.21-23, 静岡県コンベンションセンター).
- (4) 向井 寛智: 腸神経系によるP-糖タンパク質の薬物輸送活性制御: アドレナリン作動性神経の影響: 日本薬剤学会第23年会 (2008.5.20-22, 札幌コンベンションセンター).

[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 TOKISHIROU)  
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