

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590182

研究課題名（和文） 炎症性腸疾患における薬物療法と栄養療法の相補的作用機構解明と適切な薬物投与設計

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

研究代表者

林 正弘 (HAYASHI MASAHIRO)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20012669

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 α -リノレン酸は P-糖たんぱく質（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 の基質であるメチルプレドニゾロン（MP）の小腸吸収を抑え、大腸まで送達させることが出来、その結果として MP の治療効果が増大することが見出された。したがって、IBD において MP における薬物療法を遂行するに当たり、必須不飽和脂肪酸の併用は非常に有用な処方となりうることを示された。両脂肪酸の混合比率などの考察を行うことが更なる検討事項である。

研究成果の概要（英文）：Linoleic acid (LA) and α -linolenic acid (α -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 α -LnA have anti-inflammatory effects and regulatory effects on expression and function of P-glycoprotein (P-gp) in intestinal epithelial cells. It suggests that administration of these essential unsaturated fatty acids not only prevent progress of IBD and 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.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
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：炎症性腸疾患、methylprednisolone、P-glycoprotein、薬物療法、栄養療法、必須不飽和脂肪、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、特定に指定されている。UC 患

者数は、毎年約 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 96,993 人と報告されている。本邦における UC 発症メカニズムは完全に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考えられている。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から、感受性因子の同定も進んでいるが、人種差も認められることから、UC 発症の決定要因として確定されていない。

2. 研究の目的

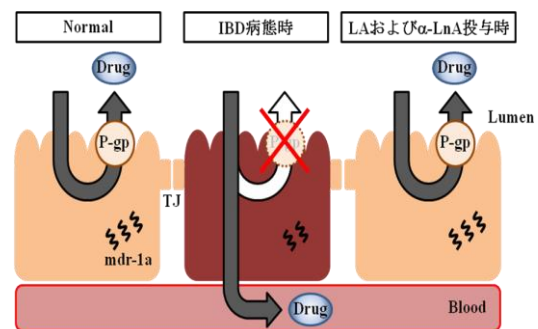
特定疾患に指定されている炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel diseases: IBD)、特に潰瘍性大腸炎(UC)の治療には、薬物療法と栄養療法の双方により、炎症を制御し緩解状態にする方法が行なわれている。本研究では、栄養療法に用いられる必須不飽和脂肪酸であるリノール酸 (LA) および α -リノレン酸 (α -LnA) が病態進行に与える影響および薬物療法に用いられるメチルプレドニゾン (MP) 等の副腎皮質ステロイド剤やシクロスポリン (CyS)等の免疫抑制剤の吸収および体内動態に与える影響を解明し、薬物療法と栄養療法が相補的に臨床的効果を最大限に引き出せる戦略構築を目的とした。

3. 研究の方法

給水ビンにて、7%DSS 溶液を 5 日間自動給水方式で自由摂取させる。給水開始日に DSS 溶液 150mL をセットし、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。対象群には水を自動給水方式にて摂取させる。24 時間ごとに体重測定を行う。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 α -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、標的部位の大腸へ選択的に移行させることが出来るかを検討する。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 薬物療法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提案を。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 の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、尿中排泄実験をおこなうことで、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) DSS 投与による炎症性腸疾患モデルラット (IBD 群) を作成し、必須不飽和脂肪酸の改善効果を検討した。IBD 群では正常群に比べ結腸の長さは減少し、LA 投与群および α -LnA 投与群では結腸の長さが正常群に近づく傾向が見られ、特に α -LnA 投与群では、その増大効果が有意な差として検出された。これらの効果は、LA および α -LnA の炎症抑制効果によるものと推察した。刷子縁膜画分総タンパク量は、IBD 群では正常群に比べ約 70% 程度にまで減少し、障害によるタンパクの脱落と考えられた。一方、P-gp タンパク発現レベルは両群間で変動は見られず、これらの結果を合わせて考えると、P-gp タンパク量が減少傾向を示すことが推測できた。次に P-gp 活性を P-gp 基質である rhodamine123 の分泌方向の膜透過クリアランスから検討した結果、正常群において、P-gp 阻害剤である verapamil 存在下の透過クリアランスは verapamil 不在下に比べ有意に減少し、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 verapamil 存在下、不在下において両者のクリアランスに有意な差が見られなかったことから、病態下での P-gp 活性の低下が示された。rhodamine123 の代わりに、MP を基質として用いた検討においても rhodamine123 の結果と同様であった。これに対して、必須不飽和脂肪酸の病態改善効果を検討したところ、IBD 群で低下した P-gp 活性は LA および α -LnA の投与により回復した。以上より、Scheme 1 に示すように、IBD 群では P-gp タンパク発現レベルの変動はないものの、P-gp 活性の低下が示され、また LA および α -LnA の投与により、IBD 群で低下した P-gp 活性の回復が示された。



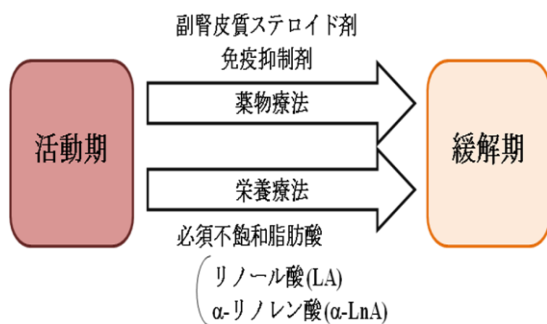
Drug : Methylprednisolone (MP), P-gp : P-glycoprotein, TJ : Tight Junction

Scheme 1 Expression and function of P-gp under various conditions.

(2) 吸収性について評価したところ IBD 群において、MP の空腸からの吸収がコントロール群に比して顕著に上昇した。よって IBD 群では、MP の全身移行による副作用発現の危険が推察された。これに対して、栄養療法に

用いた LA および LnA の共存により、MP の空腸からの吸収は顕著に抑制された。つまり、両必須不飽和脂肪酸は MP の空腸からの吸収を抑えることで、副作用の回避が可能と位置づけられた。MP の腸管各部位の管腔内の濃度を測定したところ、IBD 群において空腸および回腸管腔内の MP の濃度がコントロールに比して顕著に高く、結腸での濃度ははるかに上回った。これに対して、両必須不飽和脂肪酸の共存により、空腸および回腸の MP の濃度は低下し、その分病変部位である結腸への送達が誘導されたと思われる濃度が検出できた。P-gp 機能について相対活性評価から検討したところ、IBD 群において P-gp 相対活性の低下が空腸および回腸において見出された。これに対して、両必須不飽和脂肪酸の共存により、P-gp の相対活性はコントロールレベルに回復した。P-gp のタンパク発現レベルについて検討したところ、IBD 群において P-gp タンパク発現レベルの低下が示され、両脂肪酸はそのレベルをコントロールに回復させた。

以上、炎症性腸疾患における薬物療法および栄養療法について検討した結果、Scheme 2 に示すように、薬物療法のみでは病変部位への MP の送達を可能にすることは困難であり、栄養療法を併用することで、MP の薬物療法効率を高めることが示された。また、栄養療法は MP の全身移行を抑え、副作用の回避を可能にすることが推察できた。このような栄養療法の有用性は LA および LnA による P-gp の機能および発現レベルの修飾に基づいたものであることが明らかとなった。



Scheme 2 Therapeutic strategy on IBD.

(3) さらに、IBD の肝臓、腎臓などのクリアランス臓器の機能に及ぼす影響について検討した。MP 静脈内投与後の血漿中 MP 濃度推移から、全身クリアランスを評価したところ、IBD 群において MP の全身クリアランスの低下が示され、LA および LnA 群においてははその回復が見られた。このことから、両必須不飽和脂肪酸の投与はクリアランス低下を回避できる可能性が考えられた。

肝機能に関しても、IBD 群での胆汁流量の低下に対して、LA および LnA 群においてその回復が認められた。P-gp タンパク発現量も IBD 群で低下が見られ、両脂肪酸投与群においてその回復が示された。

以上、DSS 誘導 IBD モデルラットにおいて、MP の全身クリアランスの低下が認められ、このクリアランスの低下は肝 P-gp 機能・発現低下による胆汁排泄の減少が一因であることが示された。また、LA および LnA の投与によりこれらの低下が回復したことから、両必須不飽和脂肪酸のクリアランス臓器の機能への有用性が示された。

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 11 件)

① Y. Takizawa, H. Kishimoto, T. Kitazato, M. Tomita and M. Hayashi. Changes in protein and mRNA expression levels of claudin family after mucosal lesion by intestinal ischemia/reperfusion. *Int. J. Pharm.* 査読有, 426, 82-89, 2012.

② M. Tomita, R. Ohkubo, S. Ouchi, C. Kawahata and M. Hayashi. Nonlinear intestinal absorption of fluorescein isothiocyanate dextran 4,000 caused by absorptive and secretory transporting system. *Pharmacol. Pharm.* 査読有, 2, 173-179, 2011.

③ M. Tomita, M. Hatanaka, M. Nakaike, T. Kai, C. Kobayashi, H. Murata, A. Tanaka, A. Kanbayashi and M. Hayashi. Changes in the pharmacokinetics of rhodamine123 and bromosulfophtalein in rats treated with lipopolysaccharide. *Organ Biol.* 査読有, 18, 145-150, 2011.

[学会発表] (計 5 件)

① N. Doi, A. Kimura, M. Tomita and M. Hayashi. Enhancing mechanism of drug absorption by acylcarnitines. International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics, 2012 年 1 月 16 日, Hitotsubashi Hall (Tokyo, Japan)

② N. Doi, M. Tomita, A. Kimura and M. Hayashi. Acylcarnitines as useful absorption enhancer in clinical use. International Symposium on BA/BE of

Oral Drug Products. 2011年6月29日, Kobe International conference center (Kobe, Japan).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 正弘 (HAYASHI MASAHIRO)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20012669

(2) 研究分担者

富田 幹雄 (TOMITA MIKIO)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60207610

(3) 連携研究者

()

研究者番号：