

令和元年5月27日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08363

研究課題名(和文) 小腸上皮における薬物輸送解析のためのエンテロイドを用いた新規手法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new method using enteroid for drug transport analysis in the small intestine epithelium

研究代表者

菅原 満 (Sugawara, Mitsuru)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60332467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエンテロイド(小腸組織培養系)を用いる物質輸送実験系を確立して排出トランスポーターの機能評価へ応用することを目的とした。取り込み実験により、P-gpやMrp2によるエンテロイド内腔の基質の存在比は、P-gp阻害剤やMrp2阻害剤、ATP産生阻害剤により初代エンテロイドにおいて低下することが確認された。エンテロイドを用いてP-gpやMrp2による基質の排出を測定できることが示され、本実験系が排出トランスポーターの輸送機能に及ぼす薬物の影響を評価する有用なスクリーニング系として期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管吸収機構を明らかにするための既存の方法には、消化管内の生理的状态を保ったままin vitro系で評価する手法や、排出トランスポーターを簡便に評価する実験系が少ないことが問題点であった。小腸から作製されるエンテロイドは、消化管内の生理的状态を維持するため、有用な物質輸送解析のツールになる可能性がある。本研究の成果は、薬物吸収のメカニズムの解明や、薬物の吸収に及ぼす他の薬物あるいは食品成分の影響(相互作用)の解析に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a mass transport experiment system using an enteroid (small intestine tissue culture system) and apply it to the functional evaluation of efflux transporters. Uptake experiments confirmed that the abundance ratio of the substrate in the enteroid lumen by P-gp and Mrp2 was reduced in the primary enteroid by P-gp inhibitors, Mrp2 inhibitors and ATP production inhibitors. It has been shown that the efflux of the substrate by P-gp and Mrp2 can be measured using an enteroid, and this experimental system can be expected as a useful screening system to evaluate the influence of drugs on the transport function of efflux transporters.

研究分野：薬物動態学

キーワード：エンテロイド トランスポーター p-糖タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管に発現する排出トランスポーターは薬物の吸収性に大きく関与し、種々の物質を細胞質から細胞外へ排出する働きを担う。薬物の消化管吸収機構を明らかにするために考案された既存の方法には、消化管内の生理的状態を保ったまま *in vitro* 系で評価する手法や、小腸管腔側に発現する排出トランスポーターの機能を簡便に評価する実験系が少ないことが問題点であった。

2. 研究の目的

小腸から作製されるエンテロイドは、陰窩に含まれる幹細胞が種々の腸上皮細胞へ分化・増殖し、それら細胞同士が接着して自己組織化したオルガノイドである。立体構造の特性上、エンテロイドは吸収上皮細胞以外の細胞や組織が混在する生理的状態をよく維持しており、実際の小腸を模倣した物質輸送が行われていると考えられるため、*in vivo* 系に近い *in vitro* 系として有用な物質輸送解析のツールになる可能性がある。またエンテロイドを用いた取り込み実験により、小腸血液側から小腸管腔側への輸送を測定することで排出トランスポーターの機能を簡便に評価できると考えられる。

そこで本研究では、エンテロイドを用いる新規の物質輸送実験系を確立して排出トランスポーターの機能評価へ応用することを目的とした。

3. 研究の方法

6~8 週齢の雄性マウスの空腸部から単離した陰窩を、成長因子等を含んだコラーゲンであるマトリゲルで包埋後、4~7 日間培養した。RT-PCR によって P-gp の発現を確認したエンテロイドを使用して、P-gp の基質に蛍光物質である Rhodamine123 を用いた取り込み実験を行った。P-gp 阻害剤にはシクロスポリン A、ベラパミル、キニジンを、ネガティブコントロールにはアンチピリンを用いた。また P-gp による輸送が ATP 依存的事であることを利用し、ATP 産生阻害剤としてアジ化ナトリウムとフッ化ナトリウムを併用した。これらの添加物質が P-gp の輸送機能に与える影響を評価するため、基質添加後に撮影した蛍光画像からエンテロイド内腔への基質の移行率を算出した。培養日数の違い、継代・凍結の有無による発現量変動を測定する場合には、7 日間培養したエンテロイドを使用し、凍結したエンテロイドは 1 ヶ月後に解凍し、一度継代して実験に供した。

4. 研究成果

Rh123 は受動拡散で細胞に取り込まれた後、小腸管腔側に発現する P-gp により細胞外へ排出される。そのため小腸管腔側を内側として閉じた系であるエンテロイドでは、P-gp が機能すると基質は内腔に輸送される。そこで、エンテロイドに Rh123 を曝露させたところ、時間経過に伴いエンテロイド内腔へ蓄積する様子が観察された(図 1)。一方、同様の検討を低温条件下で行ったところ基質の蓄積は認められず、トランスポーターの関与が示唆された。

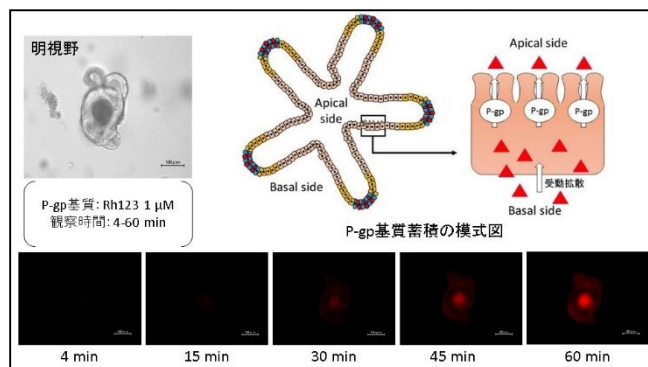


図 1 エンテロイド内腔への基質取り込み

れた。

P-gp 阻害剤であるシクロスポリン A やベラパミル、キニジンを使用して、P-gp 阻害剤の有無が Rh123 の蓄積部位に与える影響を解析した(図 2)。下に示すプロファイルは蛍光画像内の直線に沿った Rh123 の分布を示すもので、コントロールではエンテロイド内腔に蓄積するのに対し、P-gp 阻害剤群ではエンテロイドの上皮細胞内に蓄積することが確認された。これらより P-gp による基質の排出が P-gp 阻害剤によって抑制され、排出されない基質がエンテロイドの上皮細胞内に蓄積することが示唆された。

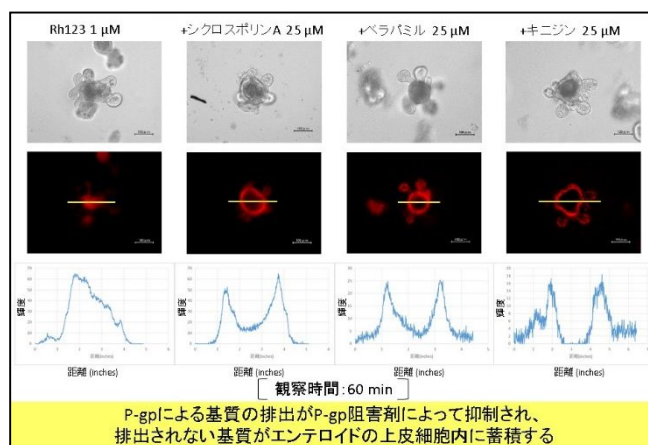


図 2 P-gp 阻害剤による基質蓄積部位の変化

取り込み実験の結果を客観的な指標で評価するため、エンテロイドの輪郭の決定方法を設定した。まず、明視野像に対してネガ・ポジ反転処理と疑似カラー処理で着色し、ヘイズリダクションにより蛍光ボケを除去することによりエンテロイドの輪郭を決定し、図3に示すAからBとCからDの範囲を上皮細胞、BからCの範囲を内腔とした。次に、先ほどの方法で決定したエンテロイドの輪郭を基に、同様の直線を蛍光画像に当てはめた後、図3の下に示す式により、各範囲の蛍光強度からエンテロイド内腔への基質の移行率を算出した。

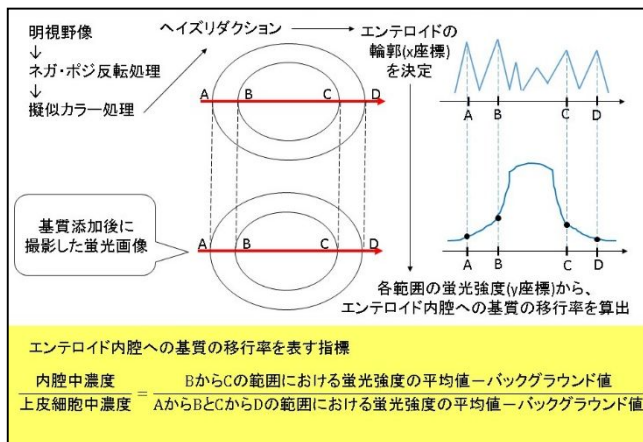


図3 エンテロイド内腔への基質移行率算出法

そこで、先に示した各 p-gp 阻害剤添加やエネルギー枯渇条件が P-gp の輸送機能に与える影響を、本方法により評価した結果(図4)、コントロールと比較して、P-gp 阻害剤群は 0.25 倍に、ATP 産生阻害剤群は 0.46 倍になり、有意に減少した。ネガティブコントロールのアンチピリン群において、有意な増加や減少は認められなかったことより、本実験系が P-gp の評価を行うスクリーニングとして有用であると考えられた。

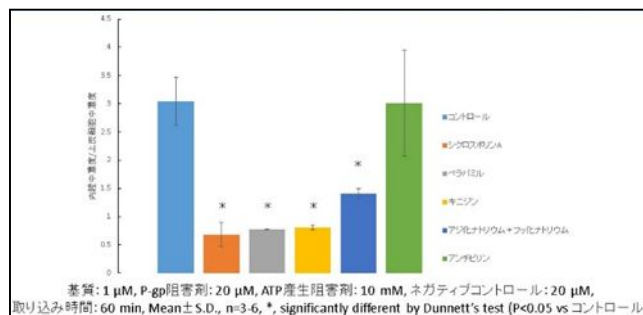


図4 エンテロイド内腔への基質移行率に及ぼす阻害剤の影響

次に、継代・凍結したエンテロイドの形態を観察したところ、初代エンテロイドと同様に成長が認められ、形態的に大きな変化はなかった。Real time PCR により P-gp の発現量を比較した結果、継代後エンテロイドにおいては多少の増加傾向が見られるものの、発現量に有意な差は認められなかった。P-gp 基質である Rh123 を用いて取り込み実験を行ったところ、初代エンテロイド、継代・凍結保存エンテロイドのすべてにおいて、同様にエンテロイド内腔に輸送される様子が見られ、阻害剤添加により内腔移行率が低下した。したがって、継代・凍結保存エンテロイドは P-gp 基質スクリーニング系として使用することが可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

小関千尋、石川岳彦、佐藤夕紀、武隈 洋、菅原 満：エンテロイドを用いた薬物排出トランスポーターの機能解析、日本薬学会第 139 年会、2019 年

佐藤夕紀、中村公則、小関千尋、石川岳彦、島田美紀子、横井友樹、本間直幸、森山隆則、菅原 満：小腸オルガノイドを利用した排出系トランスポーターの基質関与と探索ツールの構築、第 13 回トランスポーター研究会、2018 年

菅原 満：トランスポーターの機能解析と製剤設計、第 32 回北海道薬物作用談話会(招待講演)、2018 年

小関千尋、石川岳彦、佐藤夕紀、武隈 洋、菅原 満：エンテロイドは薬物排出トランスポーターの解析ツールになり得るか、第 32 回北海道薬物作用談話会、2018 年

助畑 歩、武隈 洋、鷲見正人、佐藤夕紀、菅原 満：慢性骨髄性白血病治療薬ダサチニブの消化管吸収に及ぼす消化管内 pH およびトランスポーターの影響、日本薬学会第 137 年会、2017 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：武隈 洋
ローマ字氏名：(TAKEKUMA, yoh)
所属研究機関名：北海道大学
部局名：大学院薬学研究院
職名：准教授
研究者番号（8桁）：00396293

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石川岳彦
ローマ字氏名：(ISHIKAWA, takehiko)
研究協力者氏名：小関千尋
ローマ字氏名：(KOSEKI, chihiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。