

平成 21年 5月 29日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590156
 研究課題名 (和文) トランスポータの発現および機能変動に基づく新規感染症発症予防システムの開発
 研究課題名 (英文) New Prediction System of Infective Disease Based on Changes in Expression and Function of ABC Transporter
 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：

本研究では、lipopolysaccharide 投与による感染症ラットの薬の体内動態、薬効・副作用の非侵襲的予測システムの開発を目指し、末梢血リンパ球に着目した。その結果、感染症初期段階において、末梢血リンパ球中 PXR mRNA 発現量より回腸 ABC トランスポーター mRNA 発現変動および肝臓 mrp2 mRNA 発現変動を予測できる可能性および、末梢血リンパ球中 PXR mRNA 発現量から、感染症進行時における回腸・肝臓 P-gp および肝臓 mrp2 機能変動を予測できる可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	420,000	4,020,000

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：薬物動態・代謝学

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々のグループでは、感染症病態時には排泄型トランスポーターである mrp2 が結腸上皮細胞頂側膜側に高発現すること、同じ排泄型トランスポーターである P-gp のダウンレギュレーションが誘発されること、等のタンパク発現レベルでの検討を行っている。また、感染症の原因物質である lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 0111:B4) が mrp2 によって管腔側に吐き出されるという機能レベルでの検討も行っている。本研究では、遺伝子診断から、感染症時の薬物治療および感染症発症の予防・予測システムを開発することを目的とする。特に血液サンプル情報という非侵襲

的な方法を確立して、最小限の副作用で最大限の薬理効果を発揮できるようなシステムの開発を目指す。このような非侵襲的な方法は、臨床現場において患者個人の薬物体内動態を予測する際に大変有用である。

2. 研究の目的

各臓器におけるトランスポーター発現の知見を得るためには、現時点では直接体内から臓器を取り出す侵襲的手術が必要なため、トランスポーターの発現変動から疾患の治療・予防を臨床応用することは非実用的である。本研究では、排泄型トランスポーターの網羅的遺伝子発現レベルの解析から、最小限の副作用で最大限の薬理効果を

発揮できるようなシステム構築研究を念頭におき、腸管吸収性と体内動態の予測法の確立を目指す。血液の採取によるリンパ球・赤血球中の遺伝子発現量から体内臓器のトランスポーター発現の知見を得ることを目的とする。このような非侵襲的な方法は臨床現場において患者個人の薬物体内動態を予測する際に大変有用である。

3. 研究の方法

Wistar/ST 系雄性ラット (8 週齢) の腹腔内に生理食塩水に溶解させた LPS の 1mg/kg および 5mg/kg を単回、連続投与することにより、感染症初期段階および感染症進行段階のステージの異なる病態と、重篤度の異なる病態モデルを作成する。腸管組織を摘出し、 -80°C 条件下で冷凍保存する。別途、末梢血リンパ球、赤血球を Lymphosepar II を用いて分離させ、リンパ球画分と赤血球画分を分取する。次に、摘出した腸管組織および採取した血液成分から mRNA を抽出する。抽出した mRNA から逆転写反応により cDNA を合成し、リアルタイム rt-PCR 法 (RT-PCR 法) を用いて、目的とする mRNA の発現量を定量解析する。目的とするトランスポーターの mRNA は、mdr1a、mdr1b、mdr2、sister P-gp、mrp-2、bcrp などの排泄型トランスポーターであり、腸管での遺伝子発現レベルを基準とし、腸管組織および末梢血リンパ球・赤血球での遺伝子発現レベルを比較検討する。別途、トランスポーターの活性との相関性も調査する。以上、網羅的に遺伝子発現レベルを解析し、腸管に最も相関性のあるものを検索し、感染症時の薬物治療および感染症の発症予防・予測システムのための非侵襲的な方法の確立を目指す。機能変動に関しては、ABC トランスポーター基質の腸管吸収および排泄を追い、タンパク発現レベルとの相関関係について考察する

4. 研究成果

感染症の原因物質としてあげられる Lipopolysaccharide (LPS) は、敗血症患者で確認されている細菌由来内毒素であり、敗血症を誘発し、多臓器不全から死へのシナリオが完成されている物質である。この LPS は腸管由来で体内に侵入することが知られているものの、その侵入ルートに関しては未だ解明されていない。そこで LPS のヒト腸管粘膜を介する透過機構の解明と、それに基づいた感染症予防・克服およびターゲット分子の探索を目的とした。

まず、正常ラット腸管における LPS の膜透過機構の解明に着手した。その結果、*in vitro* 膜透過実験を行い、LPS は結腸および回腸において温度・エネルギー依存的に細

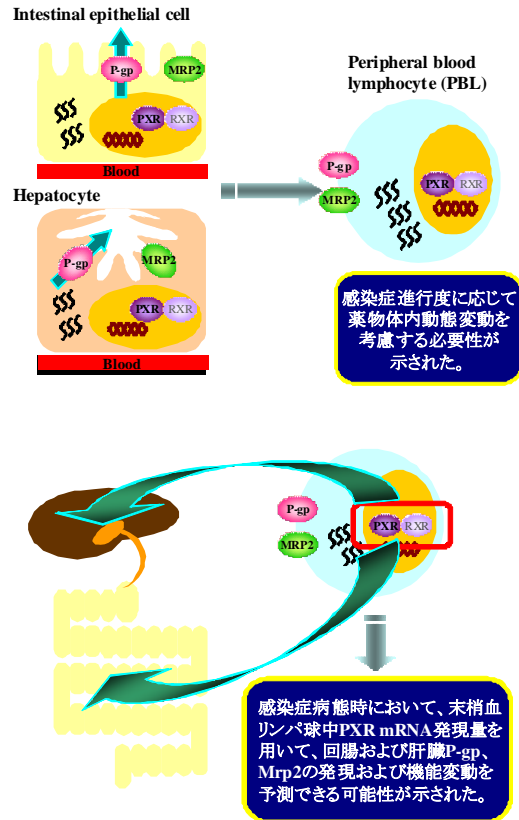
胞内に取り込まれ、その過程に一部 LPS の polysaccharide 部分の構造認識が関与していることを明らかにした。またこの現象は粘膜側、漿膜側いずれの方向からの取り込みにおいても見出された。一方、LPS の細胞内から管腔側への排泄方向の輸送に関しては、verapamil および probenecid の共存下でその輸送が顕著に阻害されたことから、この部分の膜透過過程には、mdr および mrp2 の関与が示された。つまり、LPS は高分子物質であるにも関わらず、LPS の構造認識に基づいた特殊な細胞内ルート (transcellular route) 経路で透過することを明らかにすることができた。さらに興味深いことに、この過程には LPS のシグナル伝達に必須のレセプターとして注目されている Toll-like receptor 4 (TLR4) および CD14 が関与することが明らかになった。また生体防御の面から考慮すると意外なことに、LPS の透過性は吸収方向優位であったが、LPS を腹腔内投与して作成した感染症病態モデルラットにおいては、吸収方向の透過性は低下し、逆に排泄方向の透過性が上昇した。つまり感染症時には生体の恒常性維持のため、異物の体内侵入を防御し、異物排泄能の亢進が誘発されると考えられる。これを確実にするために別途種々の検討を行ったところ、感染症病態時には、吸収に関与する粘膜側の TLR4 および CD14 の消失と、排泄に関与する mdr-1 および mrp2 の発現を明らかにするに至った。部位差に関しては、回腸での mdr、mrp2、TLR4、CD14 の発現レベルも LPS により影響を受けることが示された。さらに、レセプターおよびトランスポーターの発現および局在が正常時と病態時では大きく異なることも判明した。今後、このメカニズムを明らかに出来れば、人為的に体内動態の制御が可能となると考えられる。トランスポーターおよびレセプター以外の膜透過性制御因子として細胞接着部分の Tight Junction (TJ) の機能および LPS の影響を受けないことが示された。

次に LPS 連続投与による感染症の進行段階別 (感染症初期および感染症進行期) による検討を行った。ラットに LPS を単回および 3 日間腹腔内連続投与することで作成し、薬物の吸収部位 (回腸) と解毒排泄部位 (肝臓) での比較を行った。また、LPS による P-Glycoprotein (P-gp) の変動に関与する生体因子の同定も試みた。その結果、LPS による肝臓の P-gp/mdr-1 のダウンレギュレーションには IL-1 β の発現およびそのレベルの維持が強く関与していることが示された。一方、P-gp 基質の静脈内投与後の体内動態 (血中濃度推移、回腸管腔内への分泌クリアランスおよび胆汁排泄クリアランス) を検討したところ、正常ラット、感染症初期

段階およびその進行段階におけるP-gp基質の腸管吸収および体内動態は、回腸および肝臓のP-gp/mdr-1レベルと高い相関が認められた。また、生検を用いた組織および臓器の遺伝子レベルから体内動態を予測可能であることが示された。

これらを踏まえ、ラット回腸、肝臓および末梢血リンパ球中 ABC トランスポーター mRNA 発現量を網羅的に解析した。その結果、感染症病態時における ABC トランスポーターの発現および機能変動が、薬物療法時の副作用発現および薬剤耐性に影響を及ぼす可能性が示された。また、感染症初期段階において回腸および肝臓 PXR mRNA 発現量が低下し、感染症進行によりこれらの PXR mRNA 発現量は回復した。さらに、回腸および肝臓 ABC トランスポーター mRNA と PXR mRNA 発現変動との相関を検討したところ、ABC トランスポーターの発現変動に PXR が関与する可能性が示された。

さらに感染症病態時の末梢血リンパ球に及ぼす影響および体内動態変動予測の可能性について検討したところ、感染症初期段階において、末梢血リンパ球中 PXR mRNA 発現量より回腸 ABC トランスポーター mRNA 発現変動および肝臓 mrp2 mRNA 発現変動を予測できる可能性および、末梢血リンパ球中 PXR mRNA 発現量から、感染症病態時における回腸・肝臓 P-gp および肝臓 mrp2 機能変動を予測できる可能性が示された。



5. 主な発表論文等

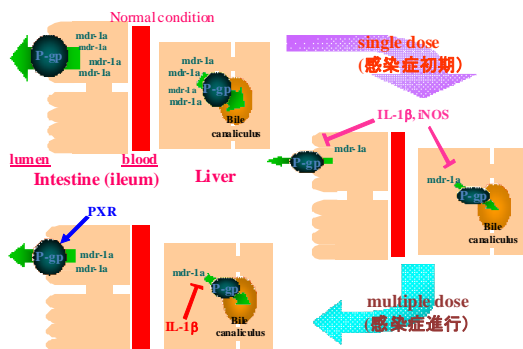
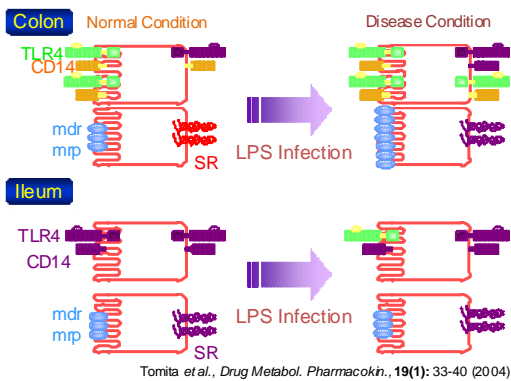
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① M. Hayashi and M. Tomita, Mechanistic Analysis for Drug Permeation Through Intestinal Membrane., *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 22(2), 67-77, 2007, 査読有
- ② M. Tomita, Y. Takizawa, H. Kishimoto, and M. Hayashi, Assessment of ileal epithelial P-glycoprotein dysfunction induced by ischemia / reperfusion using *in vivo* animal model, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23(5), 356-363, 2008, 査読有
- ③ M. Tomita, N. Doi, and M. Hayashi, Effects of lauroylcarnitine and palmitoylcarnitone on transport of ranitidine in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers, *Organ Biology*, 15(4), 377-385, 2008, 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 中池万里子、腸管吸収性および体内動態を予測する非侵襲的システムの開発、日本薬剤学会第22回年会、2007年5



- 月21～23日、大宮ソニックシティー
- ②M. Nakaike, Prediction of intestinal drug absorption and disposition by non-invasive method using peripheral blood lymphocyte, 4th World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery, June20～22, 2007, Kanazawa, Japan
 - ③M. Nakaike, Prediction of intestinal drug absorption and hepatic disposition by non-invasive method using peripheral blood lymphocyte, 22nd JSSX/8th International ISSX Meeting, October 9～12, 2007, Sendai, Japan
 - ④畑中 恵、Lipopolysaccharide 誘発感染症時における薬物体内動態に関する末梢血リンパ球に基づく予測、医療薬学フォーラム 2008/第 16 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2008 年 7 月 12, 13 日、東京

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・講師
研究者番号：60207610

(3) 連携研究者