

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590163

研究課題名 (和文) 薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現に及ぼす腸内細菌の影響

研究課題名 (英文) Effects of intestinal flora on cytochrome P450 and transporter

研究代表者

杉山 清 (SUGIYAMA KIYOSHI)

星薬科大学・教授

研究者番号：80145731

研究成果の概要：

本研究では、腸内細菌が肝臓の薬物代謝酵素 (Cytochrome P450, CYP) の発現変動に関与する可能性について検討を行った。その結果、腸内細菌の変動により CYP の発現が変動することが明らかとなった。このことから、腸内細菌叢の変動が CYP の発現変化を介して薬物動態の変動の一因となっている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：腸内細菌、チトクロム P450、リトコール酸、シプロフロキサシン、PXR、FXR、核内受容体、抗生物質

1. 研究開始当初の背景

薬物動態には大きな個人差があることが知られており、薬物治療を行う上で注視すべき問題となっている。この個人差を引き起こす原因の一つとして、薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) やトランスポーターの発現量の変化が関与すると考えられている。CYP やトランスポーターの発現量を変化させる要因の中には、腸内細菌叢を変動させるものがあることや、腸内細菌叢に個人差が大きいことが知られているが、腸内細菌と CYP、トランスポーターの関わりについての報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌が薬物代謝関連酵素

の発現変動に関与し、薬物動態の個人差を生じる一つの原因になっているであろうとの仮説を立て、この立証を試みた。

3. 研究の方法

(1) 肝臓および小腸における CYP の発現に及ぼす腸内細菌の影響

腸内細菌が CYP の発現に影響を及ぼすか否かを検討するために、腸内細菌が存在しない Germ Free (GF) マウスと Specific Pathogen Free (SPF) マウスの肝臓および小腸における主要な CYP 分子種の mRNA 発現量を検討した。

9 週齢の IQI 系雄性 GF マウスおよび SPF マウスを購入し、肝臓および小腸を摘出しそれぞれ RNA を抽出した後、GeneChip およ

び real-time RT-PCR を用いて mRNA 発現量を定量した。

(2) 肝臓における Cyp3a の発現および活性に及ぼす腸内細菌の影響

GF および SPF マウスの肝臓からマイクロソーム画分を調製し、一次抗体 (Anti-Rat CYP3A2) および二次抗体 (Anti-Rabbit IgG-HRP) を用いて Western Blotting を行った。

次に、各種濃度の triazolam 及び肝マイクロソーム画分、NADPH リジェネレーションシステム溶液を混合した後、37 度で 30 分間インキュベーションを行い、生成する triazolam 代謝物を HPLC により定量することで、Cyp3a の活性を検討した。

(3) 腸内細菌による CYP の発現変動メカニズムの検討

GF マウスおよび SPF マウスの肝臓から RNA を抽出した後、real-time RT-PCR を用いて、PXR および PXR のターゲット遺伝子 (Oatp2、Oct1、Ntcp、PAPSs2、Sult1d1、Mrp3) の mRNA 発現量を定量した。

また、GF マウスにリトコール酸 (LCA, 0.01%あるいは 0.05%) を 4 日間混餌投与した後、肝臓を採取し、real-time RT-PCR を用いて Cyp3a11 および PXR の mRNA 発現量を検討した。なお、LCA を投与していない GF マウスおよび SPF マウスについても同様に行った。

(4) シプロフロキサシン投与による腸内細菌の減少に伴う Cyp3a の発現低下

8 週齢の SPF マウスおよび GF マウスにシプロフロキサシン (CPX, 200 mg/kg/day) を 5 日間混餌投与した。投与終了後、肝臓および糞便を採取し、肝臓から RNA を抽出した後、Cyp3a11 の mRNA 発現量を real-time RT-PCR を用いて定量した。また、肝臓のマイクロソーム画分を調製し、triazolam を基質として Cyp3a の代謝活性を比較した。さらに、糞便サンプル約 200 mg から腸内細菌の DNA を抽出し、real-time PCR を行い各種腸内細菌を定量した。また、HPLC を用いて、LCA の抱合体である肝臓中 tauroLCA (TLCA) を定量した。

4. 研究成果

(1) 肝臓における CYP の mRNA 発現量

GeneChip 解析において、Cyp1 から Cyp3 ファミリーに属する CYP 分子種の中で、一定以上の発現がみられ、GF マウスと比較して SPF マウスの mRNA 量に 2 倍以上の発現増加がみられたものが 8 種あった。Cyp3a13 および Cyp3a25 においては、両者間での発

現量の差は 2 倍以下であったが、SPF マウスの方が高い値を示した。Cyp3a11 は GeneChip において GF マウス、SPF マウス共にシグナル強度が検出可能範囲を上回っていた (図 1)。

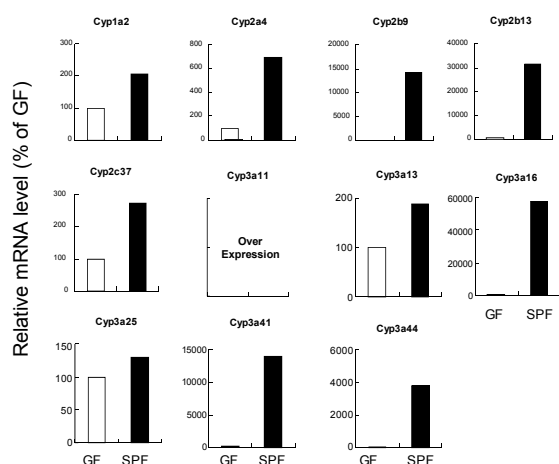


図 1. GF マウスおよび SPF マウスの肝臓における Cyp mRNA 発現量 (GeneChip)

real-time RT-PCR においては GeneChip において 2 倍以上の発現増加がみられた 8 種の mRNA (Cyp1a2、Cyp2a4、Cyp2b9、Cyp2b13、Cyp2c37、Cyp3a16、Cyp3a41、Cyp3a44) に加え、Cyp3a11 および Cyp3a25 の mRNA 量は GF マウスと比較して SPF マウスの方が有意に高い値を示した。Cyp3a13 は有意な差はみられなかったものの上昇傾向がみられた (図 2)。

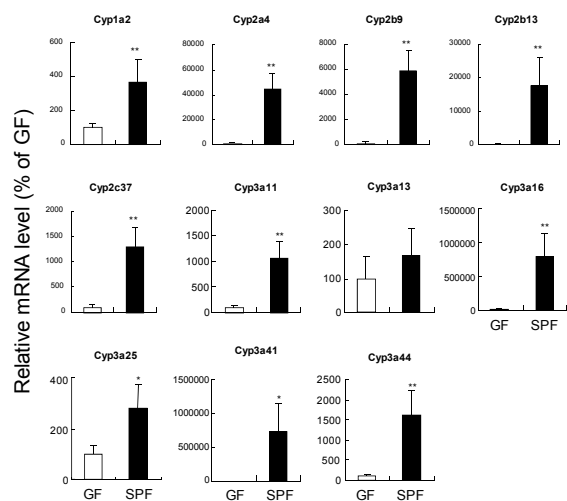


図 2. GF マウスおよび SPF マウスの肝臓における Cyp mRNA 発現量 (real-time RT-PCR)

また、GF マウスおよび SPF マウスの小腸における Cyp mRNA 量は、いずれの分子種についても GF マウスと SPF マウスとの間に有意な差は認められなかった (図 3)。

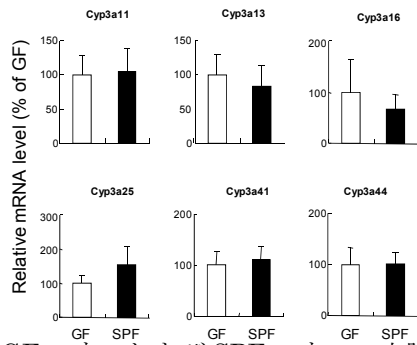


図 3. GF マウスおよび SPF マウスの小腸における Cyp mRNA 発現量 (real-time RT-PCR)

(2) 肝臓における Cyp3a タンパク質発現および代謝活性

臨床で使用される薬物の約 50% は主に CYP3A サブファミリーによって代謝される。CYP3A はヒトの肝臓では総 CYP タンパク質中 30% 以上を占め、マウスにおいても Cyp3a は肝臓における主要な酵素である。そこで、肝臓における Cyp3a タンパク質発現量を Western blotting により測定した。

その結果、SPF マウスの Cyp3a タンパク質発現量は、GF マウスと比較して有意に高い値を示した (図 4)。

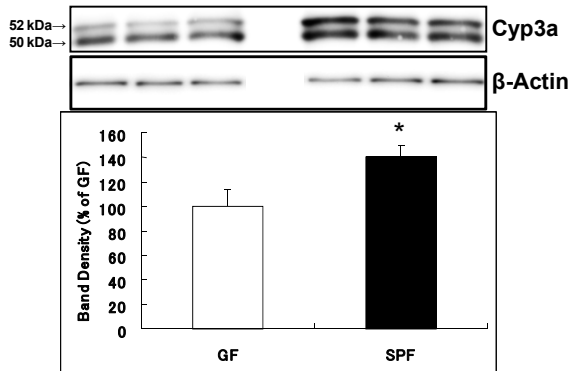


図 4. GF マウスおよび SPF マウスの肝臓における Cyp3a タンパク質発現量

GF マウスおよび SPF マウスの肝臓における Cyp3a の活性を比較する目的で、Cyp3a の基質である triazolam の肝ミクロソーム画分における代謝活性を検討した。Vmax は 4 位水酸化活性 (4-OH) および α 位水酸化活性 (α -OH) 共に GF マウスと比較して SPF マウスの方が高い値を示した。Km 値は 4-OH

において GF マウスと比較して SPF マウスの方が高い値を示した。 α -OH については、両群共に弱い基質阻害 (GF; $K_s=3510 \pm 1430 \mu\text{M}$, SPF; $K_s=21200 \pm 24700 \mu\text{M}$) がみられた。CLint は α -OH において GF マウスと比較して SPF マウスの方が高い値を示した。4-OH および α -OH の CLint の合計値は、GF マウス ($14.0 \pm 0.6 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$) と比較して SPF マウス ($17.8 \pm 1.7 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$) の方が有意に高い値を示した (図 5)。

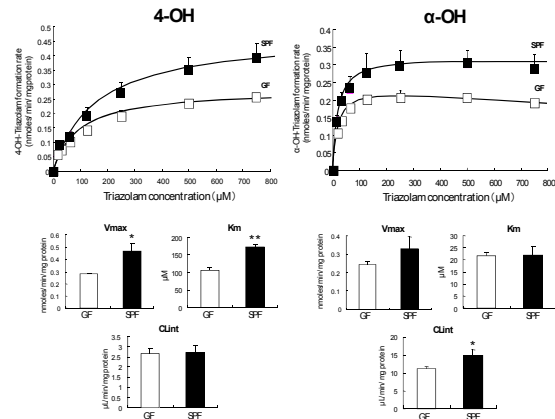


図 5. GF マウスおよび SPF マウスの肝臓における Cyp3a 代謝活性

以上の結果より、Cyp3a のタンパク質レベルでの発現量および活性についても腸内細菌の有無により変動することが明らかとなった。

(3) 肝臓における Cyp3a 発現変動メカニズム

腸内細菌によってのみ産生される LCA が核内受容体である FXR や PXR の強力なリガンドとなり、PXR の発現量を増加させることにより、それ自身の代謝酵素である Cyp3a の発現を増加させることが報告されている。LCA は、*Clostridium* 属や *Bacteroides* 属等の腸内細菌が持つ 7α -dehydroxylase によってケノデオキシコール酸等より産生される物質である。そこで、LCA に着目し、腸内細菌の有無による Cyp3a11 の発現変化が、肝臓中の LCA 量の変化に起因する可能性を検討した。

GF マウスおよび SPF マウスの肝臓における PXR の発現量を real-time RT-PCR を用いて解析した結果、GF マウスと比較して SPF マウスの方が有意に高い値を示した (図 6)。

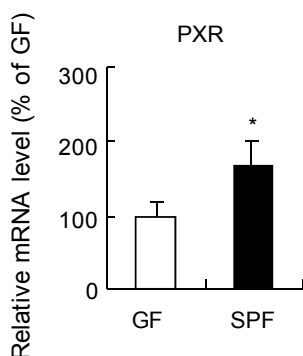


図 6. GF マウスおよび SPF マウスの肝臓における PXR mRNA 発現量

GF マウスに LCA を 4 日間投与した後、肝臓中の Cyp3a11 および PXR の発現量を real-time RT-PCR により解析した結果、LCA 投与群における Cyp3a11 (図 7) および PXR (図 8) の mRNA 発現量は、コントロール群と比較して有意に高い値を示し、SPF マウスと同程度にまで増加していた。

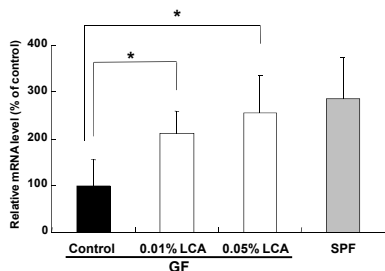


図 7. LCA 投与による肝臓における Cyp3a11 mRNA 発現量

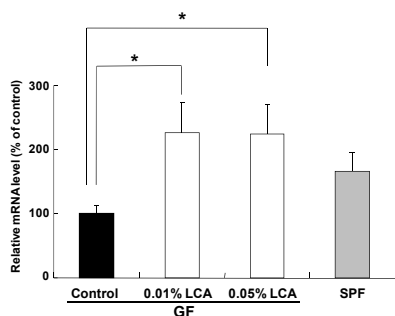


図 8. LCA 投与による肝臓における PXR mRNA 発現量

また、LCA の体内からの消失に関与し、

PXR により発現調節を受けているトランスポーターや抱合酵素の発現について real-time RT-PCR により検討した結果、肝臓における Oatp2、Oct1、Ntcp、Mrp3、PAPSS2 および Sult1d1 の mRNA 量はいずれも GF マウスと比較して SPF マウスの方が有意に高い値を示した (図 9)。

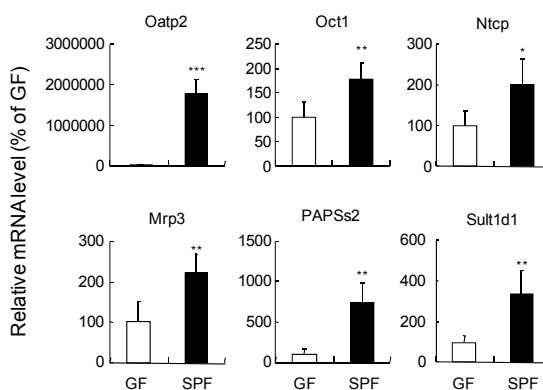


図 9. GF マウスおよび SPF マウスの肝臓における各種トランスポーター mRNA 発現量

以上の結果より、SPF マウスの肝臓では、腸内細菌の産生する LCA が FXR および PXR のリガンドとして機能し、PXR や CAR の活性化を介して各種代謝酵素およびトランスポーターの発現を増加させている可能性が示唆された。

(4) CPX 投与による肝臓における Cyp3a11 発現量の変化

抗生物質を投与すると腸内細菌が減少し、腸内細菌の持つ脱抱合活性、脱配糖体活性、還元活性等が減少し、特に腸肝循環する薬物の体内動態が変化することが知られている。しかし、抗生物質等により腸内細菌が減少し、CYP の発現が低下するとの報告はない。

CPX は、*Bacteroides* 属、*Clostridium* 属などの LCA 産生菌を含む様々なグラム陽性菌、グラム陰性菌および真正菌類に対して広い抗菌スペクトルを有することが知られていることより、CPX 投与による Cyp3a の発現低下に LCA 産生菌の減少に伴う肝臓中の LCA 量の減少が関与している可能性が考えられた。

SPF マウスおよび GF マウスに CPX を 5 日間投与した後、肝臓中の Cyp3a11 の発現量を real-time RT-PCR により解析した。その結果、SPF マウスにおける Cyp3a11 の mRNA 発現量は、コントロール群と比較して CPX 投与群において有意に低い値を示したのに対して、GF マウスにおいては、CPX 投与による有意な変化はみられなかった (図 10)。

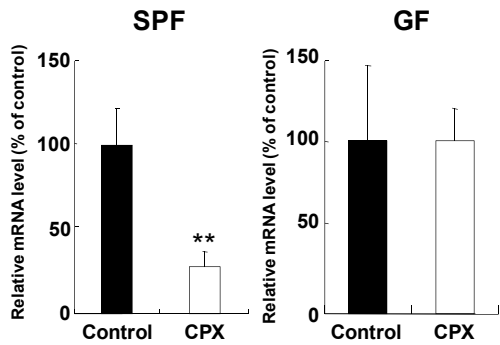


図 10. CPX 投与による肝臓における Cyp3a11 mRNA 発現量

また、triazoram 代謝活性について検討した結果、4 位水酸化活性 (4-OH) において、Vmax はコントロール群と比較して CPX 投与群の方が有意に低い値を示し、Km 値には有意な差はみられず、CLint は CPX 投与群において有意に低い値を示した。α 位水酸化活性 (α-OH) においても、コントロール群と比較して CPX 投与群において Vmax が有意に低い値を示し、Km 値はコントロール群と比較して有意な差はみられなかった。また、両群共に弱い基質阻害がみられた (コントロール; $K_s=1210 \pm 700 \mu\text{M}$, CPX; $K_s=1170 \pm 110 \mu\text{M}$)。CLint はコントロール群と比較して CPX 投与群の方が有意に低い値を示した。4-OH および α-OH の CLint の合計値はコントロール群 ($32.2 \pm 7.0 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$) と比較して CPX 投与群 ($12.1 \pm 1.7 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$) において有意に低い値を示した (図 11)。

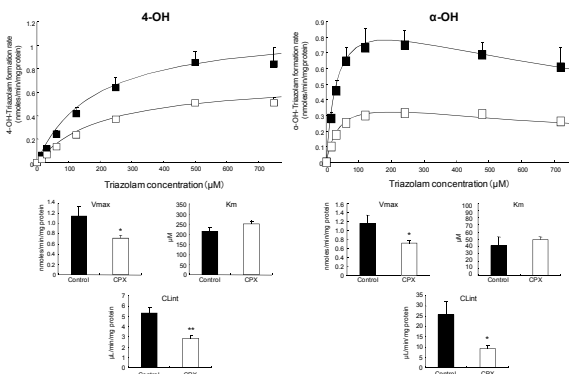


図 11. CPX 投与による肝臓における Cyp3a 代謝活性

SPF マウスに CPX を 5 日間投与した後、糞便中の細菌の DNA を real-time PCR で解析した結果、LCA を産生する腸内細菌である *Bacteroides fragilis*、*Clostridium scindens* および *Clostridium sordelli* の量はいずれもコントロール群と比較して CPX 投与群において有意に低い値を示した (図 12)。

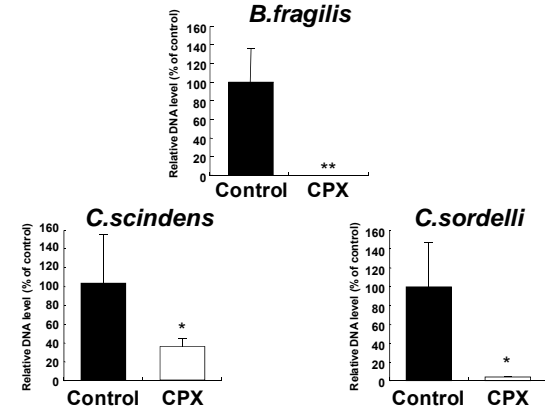


図 12. CPX 投与による糞便中の各種腸内細菌量

また、LCA の抱合体 TLCA の肝臓中含量は、コントロール群と比較して CPX 投与群において有意に低い値を示した (図 13)。

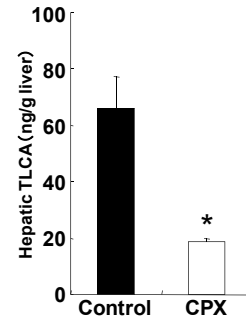


図 13. CPX 投与による肝臓中 TLCA 量

以上の結果より、本研究でみられた SPF マウスの肝臓における Cyp3a11 の発現低下は、CPX 投与による LCA 産生菌の減少に起因する可能性が示唆された。

本研究の結果より、腸内細菌が CYP の発現に影響を及ぼしていることが示唆された。さらに、抗生物質の投与により LCA 産生菌が減少した状況下においても、肝臓中の LCA 量の減少に伴って Cyp3a の発現が低下することが明らかとなった。

抗生物質等の薬物だけでなく、ストレス、

炎症性腸疾患、加齢等によっても腸内細菌が変動することが知られている。本研究の結果は、これらの変動に伴って CYP の発現も変動する可能性を示すものであり、腸内細菌の変動が薬物動態の個人差の変動の一因となっている可能性を示唆するものである。

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 Takahiro Toda, Nobutomo Ikarashi, Kiyomi Ito, Kiyoshi Sugiyama et al., Intestinal flora induces the expression of Cyp3a in the mouse liver, *Xenobiotica*, 39, 323-334 (2009), 査読有
- ② Takahiro Toda, Nobutomo Ikarashi, Kiyomi Ito, Kiyoshi Sugiyama et al., Ciprofloxacin suppresses Cyp3a in the mouse liver by reducing lithocholic acid-producing intestinal flora, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, (in press), 査読有
- ③ 戸田雄大, 五十嵐信智, 伊藤清美, 杉山 渣 他, 抗生物質を投与するとリトコール酸産生菌の減少に伴ってマウスの肝臓における Cyp3a が減少する, *YAKUGAKU ZASSHI*, 129, 601-608 (2009), 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 戸田雄大, 五十嵐信智, 伊藤清美, 杉山 渣 他, 肝臓における CYP の発現に及ぼす腸内細菌の影響, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26-28 日, 横浜
- ② 井桁慎太郎, 五十嵐信智, 伊藤清美, 杉山 渣 他, 肝臓における薬物トランスポーターの発現に及ぼす腸内細菌の影響, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26-28 日, 横浜
- ③ 戸田雄大, 五十嵐信智, 伊藤清美, 杉山 渣 他, 肝臓における CYP の発現に及ぼす腸内細菌の影響, 第 25 回和漢医薬学会大会, 2008 年 8 月 30-31 日, 大阪
- ④ 大井かんな, 五十嵐信智, 伊藤清美, 杉山 渣 他, 肝臓における薬物トランスポーターの発現に及ぼす腸内細菌の影響, 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
- ⑤ Kiyomi Ito, Nobutomo Ikarashi, Kiyoshi Sugiyama et al., Effect of intestinal microbiota on the expression of CYP enzymes, 23rd the Japanese Society for

the Study of Xenobiotics Annual Meeting,
2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日, 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 清 (SUGIYAMA KIYOSHI)

星薬科大学・教授

研究者番号: 80145731

(2) 研究分担者

伊藤清美 (ITO KIYOMI)

星薬科大学・准教授

研究者番号: 60232435

五十嵐信智 (IKARASHI NOBUTOMO)

星薬科大学・助手

研究者番号: 40409363

(3) 連携研究者