

## 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25年 5月 20日現在

機関番号：35413  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590162  
 研究課題名（和文） 妊娠に伴う母体P-糖タンパク質関連化合物の変動とP-糖タンパク質機能への影響解析  
 研究課題名（英文） Interaction of hydrophobic components in female urine before and after childbirth with P-glycoprotein in vitro  
 研究代表者 森 信博 (MORI NOBUHIRO)  
 広島国際大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：70412351

研究成果の概要（和文）：研究成果の概要（和文）：ヒトの尿中にはP-糖タンパク質(P-gp)の基質となる多種多様な内因性物質が排泄される。しかし、妊娠期間中や授乳期間中におけるヒト尿中のP-gpやMRPsの基質となる物質の存在やその濃度についての報告はない。今回、同意が得られた妊婦から出産、授乳期に至るまでの尿（36検体）の提供を受け、尿中の内因性物質の濃度の経日的な変動や日内変動について検討した。その結果、経日的に採取した尿においては、妊娠期間中の早朝尿12検体中2検体で、授乳期間中の3検体中1検体で有意なP-gp阻害活性が認められた。また、1日の朝から夜にかけ経時的に採取した検体でも、早朝または午前中に採取した尿においてP-gp阻害活性が強い傾向が認められた。一方、MRPs-介在性輸送への阻害活性は妊娠および授乳期間中の尿において全く認められなかった。妊娠後期には血中の女性ホルモン濃度が大幅に上昇することが知られている。しかしながら、妊娠期の進行に伴うP-gp阻害活性の変動は特に観察はされず、今回の結果は、既に報告されている男性あるいは非妊娠女性の結果とほぼ大差ないものと考えられた。即ち、妊娠の有無に係らず、早朝のヒト尿には、300 μMのベラパミルに匹敵するP-gp阻害活性が認められることがあり、P-gp基質の薬物を投与した際に、薬効や副作用が増強される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Various endogenous substances including substrates for ABC and SLC transporters expressed in the kidney are excreted into urine. In this study, the first urine in the morning (total 15 samples) and urine in the daytime (total 4 days, 18 samples) were collected at intervals from a young healthy woman before and after childbirth, to examine possible interactions of hydrophobic urine components (methanol extracts) with P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance-associated proteins (MRPs). Four urine samples out of 12 collected before childbirth and one sample out of three obtained after childbirth suppressed P-gp function significantly. No relationship was observed between the P-gp inhibitory potencies of urine extracts and the timing of childbirth. The daytime urine samples showed a clear circadian rhythm, in which three first urine samples in the morning out of four showed the greater P-gp inhibitory potencies than other samples. Interaction of urine extracts with MRPs was not detected in Caco-2 cells. In conclusion, urine contains various endogenous P-gp substrates/inhibitor(s), and the concentration of endogenous P-gp inhibitor(s) was higher in the first urine in the morning. Pregnancy and lactation did not affect the P-gp inhibitory potencies of urine extracts.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度     |           |         |           |

|    |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|
| 年度 |           |           |           |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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：医療薬剤学、妊娠、異物排出ポンプ、P-gp、Mrp2

### 1. 研究開始当初の背景

小腸や腎近位尿細管の上皮細胞、脳毛細血管内皮細胞、肝実質細胞の毛細胆管側膜および胎盤トロホブラスト細胞など、多くの組織で P-glycoprotein (P-gp)、 multidrug resistance-associated proteins (MRPs) や breast cancer resistance protein (BCRP) 等の ABC トランスポーターが発現している。これらのトランスポーターは、基質となる内・外因性物質を ATP 依存的に細胞外に排出する解毒機構としての重要な役割を担っている。P-gp は構造に類似性のない様々な脂溶性の高い物質の輸送に関与するのに対して、MRPs は抱合代謝物など比較的水溶性の高い物質の輸送に関与しており、P-gp の内因性基質としてはエストロゲンやコルチゾールおよびプロゲステロンなどのステロイドホルモンがあり、その抱合体は MRPs の内因性基質として知られている。これまでの研究報告で、健常人やラットの血漿や尿に内因性 P-gp 基質の存在が確認されているが、妊娠期間中や授乳期間中におけるヒト尿中の P-gp や MRPs の基質となる物質の存在やその濃度については、いまだ報告はされていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、妊婦や授乳中の女性における安全性の高い薬物療法を実施するための基礎的情報を得ることを目的として、同意の得られた妊婦から出産、授乳期に至るまでの尿を提供してもらい、妊婦における妊娠・授乳中の内因性 P-gp 関連化合物の尿中への分泌変動を経日および同日経時的に測定し、母体内の異物排出ポンプ機能への影響を考察した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 妊娠尿抽出物

尿は 23 歳の健常妊娠女性から妊娠期間中 12 日間で 33 検体、授乳期間中 3 日間で 3 検体提供された (出産：2010/3/27) (表 1)。採取した尿は、C18 逆相カラム (Bond Elut™) に添加後、蒸留水洗浄、Methanol 抽出を行い、尿中の脂溶性物質を抽出した。Methanol 抽出物は、エバポレーターで溶媒を留去し、使用するまで -30℃ で保存した。

表 1. 使用した尿の採取時期と時間

| 妊娠中期<br>(最終月経後16~27週) |       |         | 妊娠後期<br>(最終月経後28週以降) |       |         | 授乳期<br>(出産: 3/27) |       |         |      |      |     |
|-----------------------|-------|---------|----------------------|-------|---------|-------------------|-------|---------|------|------|-----|
| 採取日                   | 時刻    | 尿量 (mL) | 採取日                  | 時刻    | 尿量 (mL) | 採取日               | 時刻    | 尿量 (mL) |      |      |     |
| 2009/9/29             | 8:30  | 210     | 11/19                | 8:30  | 190     | 7/00              | 190   | 4/22    | 6:30 | 200  |     |
| 10/13                 | 8:35  | 180     |                      | 7:00  | 210     |                   | 8:45  | 45      | 5/15 | 8:00 | 190 |
|                       | 7:00  | 170     |                      | 12:00 | 150     |                   | 11:00 | 65      | 6/2  | 7:00 | 195 |
|                       | 13:00 | 100     | 12/4                 | 17:30 | 100     | 2/4               | 13:50 | 100     |      |      |     |
| 11/5                  | 16:00 | 95      |                      | 21:00 | 125     |                   | 18:00 | 120     |      |      |     |
|                       | 18:00 | 105     | 12/18                | 7:00  | 200     |                   | 21:00 | 125     |      |      |     |
|                       | 22:00 | 120     |                      | 7:10  | 215     |                   | 23:00 | 100     |      |      |     |
|                       |       |         |                      | 12:30 | 160     | 2/8               | 7:00  | 150     |      |      |     |
|                       |       |         | 2010/1/8             | 16:00 | 115     |                   | 7:15  | 160     |      |      |     |
|                       |       |         |                      | 20:00 | 125     |                   | 9:30  | 110     |      |      |     |
|                       |       |         |                      | 23:00 | 130     | 3/5               | 12:30 | 120     |      |      |     |
|                       |       |         | 1/22                 | 6:50  | 195     |                   | 16:00 | 115     |      |      |     |
|                       |       |         |                      |       |         |                   | 19:30 | 125     |      |      |     |
|                       |       |         |                      |       |         | 3/19              | 7:15  | 160     |      |      |     |

#### (2) 実験細胞

ヒト MDR1 (P-gp) 遺伝子を導入したブタ腎近位尿細管上皮細胞 LLC-GA5-COL150 とヒト大腸癌由来細胞 Caco-2 を用いた。LLC-GA5-COL150 細胞 (継代数 6~10) は、10% FBS および 150 ng/mL colchicine を含む Medium 199 を用いて培養した。Caco-2 細胞 (継代数 70~77) は、10% FBS を含む DMEM を用いて培養した。

#### (3) Western blot 解析:

LLC-GA5-COL150 および Caco-2 細胞の粗膜画分を調製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかき、PVDF 膜にタンパク質を転写・ブロッキングし、一次抗体 (P-gp, C219; MRP2, M2III-6; MRP3, D-15) および二次抗体により、P-gp, MRP2, MRP3 を検出した。

#### (4) 蓄積実験

LLC-GA5-COL150 細胞は 7 日間、Caco-2 細胞は 14 日間培養したものを使用した。それぞれの well を PBS (G) で洗浄し、各阻害剤または尿サンプルの存在下、非存在下で基質またはその前駆体を加えて 37℃ で指定時間インキュベートした。なお、P-gp の基質には 20 μM rhodamine 123、阻害剤には 300 μM verapamil (VRP) を用い、MRPs の基質前駆体として 2 μM calcein acetoxymethyl ester (Calcein-AM) (基質: calcein)、阻害剤には 25 μM MK-571 を使用した。タンパク量は、標準品として γ-globulin を用い Bradford 法により定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) P-gp および MRPs の発現と機能の評価

Western blot 解析の結果、LLC-GA5-COL150 細胞で P-gp の発現が確認され、Caco-2 細胞

で P-gp と MRP3 (MRP2 & MRP3) の発現が確認された。LLC-GA5-COL150 細胞における Rho123 の細胞内蓄積量は、P-gp の阻害剤である VRP の共存により約 4.3 倍 (90 分値) の有意な増加がみられた。一方、Caco-2 細胞における calcein の細胞内蓄積量は、MRPs 阻害剤である MK-571 の共存で有意に増加したが、P-gp の阻害剤である VRP の共存でも有意に増加し、MK-571 と VRP の共存ではそれぞれの単独共存群よりもさらに有意な増加を示した。この要因として Calcein-AM が P-gp の基質となることが考えられたため、Caco-2 細胞を用いた蓄積実験はすべて VRP の存在下で行った。

## (2) 尿中の内因性物質による P-gp 阻害活性の経日的・経時的変化

妊娠および授乳期間中の早朝に採取した尿を用い、その脂溶性抽出物のローダミン 123 の細胞内蓄積に及ぼす P-gp 阻害活性を測定した。細胞内蓄積実験の際の尿抽出物の濃度は、実際の尿中濃度と同じになるように設定した。妊娠期間中の 12 検体中 2 検体、および、授乳期間中の 3 検体中 1 検体で、ローダミン 123 の細胞内蓄積の有意な上昇がみられた (図 1)。なお、この阻害活性は出産に向けた経目的な変化という様な傾向は認められなかった。

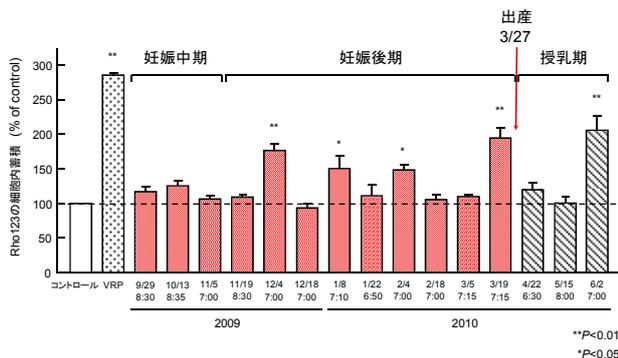


図 1. 尿中の内因性物質による P-gp 阻害活性の経日的変化

妊娠期間中に日中の全尿を経時的に採取し、その尿抽出物の P-gp 阻害活性の日内変動について検討した。4 日分のサンプルのうち、3 日分のサンプルにおいて、早朝に採取した尿で、P-gp 阻害活性が一番強いことが認められた (図 2)。夕方頃の尿の阻害活性はいずれのサンプルでも低いことを考えると、尿抽出物の P-gp 阻害活性、即ち血漿中の P-gp 関連化合物の濃度には、日内変動があるものと考えられた。

## (3) Estriol による P-gp 阻害活性

Rho123 の蓄積量は 500 nM estriol (E3) の共存により約 1.6 倍、1000 nM で約 1.4 倍の増加傾向を示した。

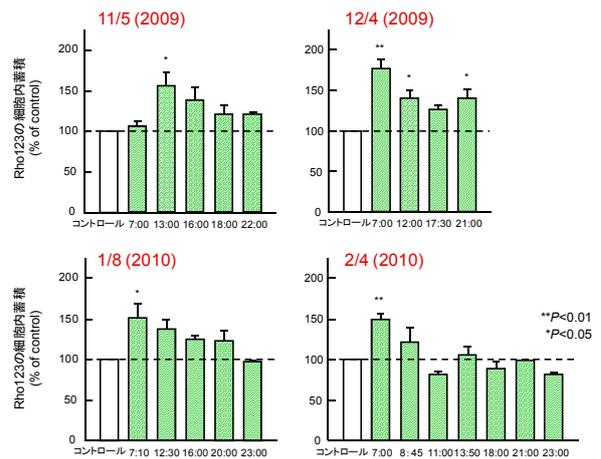


図 2. 尿中の内因性物質による P-gp 阻害活性の日内変動

## (4) 尿中の内因性物質による MRP3 阻害活性の経日的・経時的変化

図 3 は、妊娠および授乳期間中の早朝尿の抽出サンプルの MRP3 阻害活性を検討したもので、妊娠および授乳期間中の早朝尿の抽出サンプルを添加しても細胞内カルセイン蓄積量に変化は認められず、MRPs 阻害活性は全ての尿でみられなかった。また、妊娠期間中の 1 ヶ月に 1 回の割合で、1 日の全尿を経時的に採取した尿においても、MRPs 阻害活性はみられなかった (図 4)。

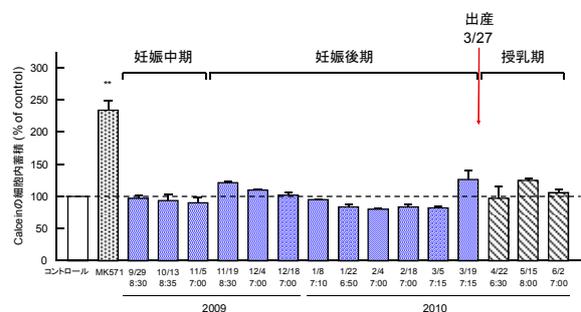


図 3. 尿中の内因性物質による MRP3 阻害活性の経日的変化

## 考察

本研究では、P-gp および MRP3 の機能におよぼす妊娠期・授乳期の尿抽出物の影響について、LLC-GA5-COL150 細胞と Caco-2 細胞を用いて検討した。P-gp の内因性基質には、エストロゲンやコルチゾールなどのステロイドホルモンが挙げられる。特にエストロゲンは妊娠経過とともに血中および尿中濃度が増加し、妊娠末期には血中濃度が非妊娠期の約 100 倍になる。これらのエストロゲンのうち estrone (E1) の約 80%、estradiol (E2) の約 60%、E3 の約 90% が抱合型として存在している。また、尿中濃度は非妊娠期の 500~1000

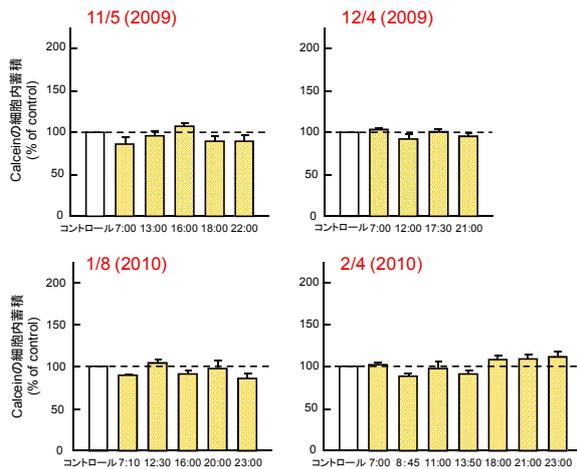


図4. 尿中の内因性物質による MRP<sub>s</sub> 阻害活性の日内変動

倍となり、尿中エストロゲンの90%がE3とその抱合型である。出産後、それらの濃度は急激に低下し、E1およびE2は4日目、E3は7日目に非妊娠期のレベルに戻ることが知られている。さらに、ホルモンの血中や尿中濃度は日内変動があるものも多く、エストロゲンやプロゲステロンの産生を刺激する黄体形成ホルモン (LH) は、睡眠中に分泌が上昇するとされている。

経口的に採取した尿においては、妊娠期間中の早朝尿 12 検体中 2 検体で、授乳期間中の 3 検体中 1 検体で有意な P-gp 阻害活性が認められた。また、1日の朝から夜にかけて経時的に採取した検体でも、早朝または午前中に採取した尿において P-gp 阻害活性が強い傾向が認められた。一方、MRP<sub>s</sub>-介在性輸送への阻害活性は妊娠および授乳期間中の尿において全く認められなかった。

妊娠後期には血中の女性ホルモン濃度が大幅に上昇することが知られている。しかしながら、妊娠期の進行に伴う P-gp 阻害活性の変動は特に観察はされず、今回の結果は、既に報告されている男性あるいは非妊娠女性の結果とほぼ大差ないものと考えられた。即ち、妊娠の有無に係らず、早朝のヒト尿には、300 μM のベラパミルに匹敵する P-gp 阻害活性が認められることがある。外因性 P-gp 基質薬物の動態におよぼす内因性 P-gp 基質の日内変動など、さらに検討する必要があると考えられる。

#### 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 1 件)

- ① Nobuhiro Mori, Haruka Iwamoto, Tomoharu Yokooji, Teruo Murakami  
Characterization of intestinal absorp

-tion of quinidine, P-glycoprotein substrate, given as a powder in rats. *Parmazie* 67(5) 384-388, 2012 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 森 信博、横大路智治、岩元陽香、村上照夫

Characterization of intestinal absorption of quinidine, a P-glycoprotein substrate, in rats - Solution vs Powder -  
日本薬物動態学会第 26 回年会 (2011. 11. 17)

- ② 亀田祐希、横大路智治、森 信博、村上照夫

妊娠期・授乳期尿中の内因性物質と ABC トランスポーターとの相互作用解析  
第 51 回日本薬学会 日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会 (2012. 11. 11)

- ③ 村上照夫、横大路智治、森信博

Modulation of ABC transporter-mediated host defense and detoxification mechanism by endogenous and exogenous compounds.  
9th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference (2013. 5. 14)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森 信博 (MORI NOBUHIRO)  
広島国際大学・薬学部・准教授  
研究者番号：70412351

##### (2) 研究分担者

村上 照夫 (MURAKAMI TERUO)  
広島国際大学・薬学部・教授  
研究者番号：20136055

##### (3) 研究分担者

横大路 智治 (YOKOOJI TOMOHARU)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院  
研究者番号：70389120