

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460208

研究課題名(和文)非攪拌水層の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of unstirred water layer

研究代表者

岸本 久直 (KISHIMOTO, Hisanao)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80723600

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)：薬物の消化管吸収は主に単純拡散によって行われるが、特に脂溶性薬物の多くは、腸管上皮細胞の管腔側表面を覆う水溶性の粘液層である非攪拌水層の透過が膜透過の律速段階と考えられている。しかし、薬物吸収と非攪拌水層との関連性について分子レベルで検討した報告は無く、薬物の細胞膜透過における役割は不明である。本研究では、薬物の腸管吸収に及ぼす非攪拌水層の影響及び消化管部位差を定量的に明らかにし、一酸化窒素(NO)が非攪拌水層に対して作用することで消化管部位特異的な吸収促進効果を望めるといふ、新規の吸収促進機構を提唱した。

研究成果の概要(英文)：In the intestinal absorption of lipophilic drugs mediated by simple diffusion, the rate-limiting step has been considered to be the drug permeation process through an unstirred water layer (UWL). Although UWL may play a role in intestinal drug absorption, the contribution remains unknown at the molecular level. On the other hand, nitric oxide (NO) has been known to increase the intestinal permeability of water-soluble compounds by modulating paracellular pathway. However, it is unclear whether NO can enhance the absorption of lipophilic drugs through the transcellular pathway. In this research project, we demonstrated the contribution of the UWL to the absorption of lipophilic drugs, and that the effect of UWL on intestinal absorption is dependent on the intestinal regions, where the expression of mucin molecules may be regulated. Furthermore, we found that NO has the capability to enhance the intestinal absorption of lipophilic drugs by modulating the UWL function.

研究分野：医療系薬学

キーワード：消化管吸収 非攪拌水層 粘液層 吸収促進 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

薬物の体内動態において最も予測困難とされている過程の一つに「腸管吸収」が挙げられる。新薬開発において、できる限り早い段階にヒト腸管での薬物の吸収性を予測することができれば、臨床開発の成功率向上、研究開発費の削減及び限りある資源の節約に繋がる可能性が見込まれる。

しかし、薬物の腸管吸収性については、ヒト腸管由来の培養細胞 (Caco-2 細胞) を用いた *in vitro* 評価系や各種実験動物を用いた *in vivo* 評価系が汎用されているが、未だヒト腸管での薬物の吸収挙動を高精度に予測することは困難である。製薬企業各社においても、培養細胞や人工脂質膜 (PAMPA) などを用いた評価系に加えて、GastroPlus に代表されるようなヒト体内動態予測ソフトウェアの開発及び導入が進み、薬物の腸管吸収予測に関する研究は盛んに行われているが、未だヒトでの腸管吸収性を高精度且つ正確に予測するための方法論の確立には至っていない。その要因の一つとして腸管の生理機能と薬物吸収との関係性について十分な理解がなされていないことが挙げられる。

一般に、薬物の腸管吸収は受動拡散と呼ばれる膜輸送形式によって行われ、多くの脂溶性薬物では Fick の法則に従い、単純拡散によって生体膜を透過するとされている。しかし、このような法則性にも関わらず、ヒト腸管での薬物吸収の予測が非常に困難であることを考えると、生理的条件下においてこの法則は絶対的ではなく、何らかの制御因子が関わっている可能性が推察される。本研究課題ではこの制御因子として腸管上皮細胞の表面構造に着目した。

腸管上皮細胞の管腔側表面は、酸性粘液多糖からなるグリコカリックスで覆われており、この粘膜層は非攪拌水層を形成し、薬物吸収時における障壁となることが古くから指摘されてきた。薬物の腸管吸収性は薬物固有の物理化学的要因だけでなく腸管膜の生理学的要因により支配されているが、特に脂溶性が高く細胞膜透過性の高い薬物においては、この非攪拌水層の透過が膜透過の律速段階と考えられている。従って、薬物の腸管吸収において非攪拌水層は重要な役割を担っており、その生理的役割を理解することは、今後の医薬品開発において極めて重要であると考えられる。しかし、非攪拌水層の主要構成タンパク質としてムコ多糖タンパク質である mucin が同定されているにも関わらず、薬物吸収と mucin との関連性について分子レベルで検討した報告は無く、薬物の細胞膜透過における mucin の役割は不明である。

一方、我々はラット腸管を用いた *in situ* 吸収実験において、体内で一酸化窒素 (NO) 放出作用を有する sodium nitroprusside (SNP) が paracellular marker である fluorescein isothiocyanate dextran 4000 (FD-4) だけでなく、P-glycoprotein (P-gp)

の基質である rhodamine123 (Rho123) の腸管吸収性を P-gp 非依存的に増大させることを見出した (Takizawa et al, *Eur J Pharm Sci.* 49(4):664-70, 2013, Takizawa et al, *Int J Pharm.* 450(1-2):31-5, 2013)。このような吸収性の変化は、粘液層除去剤である dithiothreitol (DTT) を用いた場合においてのみ認められることから、NO 供与体である SNP が、非攪拌水層の機能低下を惹起することを見出し、非攪拌水層における薬物の透過性を制御できる可能性や、その吸収促進への応用を着想するに至った。しかし、薬物の腸管吸収に対する非攪拌水層自体の影響について詳細が不明な状況にあり、NO と mucin の相互作用に関する検討は未だなされていない。従って、薬物の腸管吸収における NO と mucin の関連性を明らかにすることは、腸管吸収を制御する因子の特定だけでなく、NO による吸収促進効果の分子機構の解明を通じて、非攪拌水層を標的とする新たな吸収改善機構を介した NO の有用性を示すことが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、薬物吸収を制御する分子機構の一つとしての mucin の関与を明らかにすること及び薬物の吸収促進剤としての NO の有用性評価を目的とし、以下の項目について検討した。

- (1) 薬物の腸管膜透過性に対する非攪拌水層 (mucin) の影響を、脂溶性及び水溶性薬物を用いて定量的に評価する。
- (2) 非攪拌水層に対する NO の影響について検討し、非攪拌水層を標的とした吸収改善策としての NO の有用性を評価する。

3. 研究の方法

薬物の腸管膜透過性に対する非攪拌水層の影響を定量的に評価するため、脂溶性の異なる薬物の腸管膜透過性に及ぼす粘液層除去剤である dithiothreitol (DTT) の影響について検討を行った。被験薬物には脂溶性の異なる transcellular marker として flurbiprofen, rifampicin, naproxen, propranolol, griseofulvin, diclofenac, antipyrine, theophylline を用い、ラット摘出腸管を用いた *in vitro* Sac 法により薬物の膜透過性を評価した。また、ラット腸管における mucin 遺伝子 (rMUC1, 2, 3A, 4, 5AC, 13) の発現解析を real time RT-PCR 法により行った。

また、非攪拌水層に対する NO の影響を検討するために、NO 供与体である 1-hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene (NOC7) を用い、NOC7 添加時における各種脂溶性薬物 (griseofulvin, diclofenac, antipyrine, theophylline) の吸収量の変化を *in vitro* Sac 法により検討した。

4. 研究成果

(1) 脂溶性薬物の腸管膜透過性に及ぼす腸管粘液の影響

脂溶性薬物の膜透過性に対する非攪拌水層の影響を評価するため、典型的な難溶性脂溶性薬物である griseofulvin の膜透過性に対する粘液層除去剤の影響を、ラット腸管各部位（十二指腸部、空腸部、回腸部、結腸部）で評価した。薬物の膜透過性評価はラット摘出腸管を用いた *in vitro* Sac 法により行い、粘液層除去剤である dithiothreitol (DTT) を投与することで腸管吸収性に対する粘液層の影響を評価した。DTT の検討濃度として 10 mM を選択し、10 min の前処理条件にて検討した結果、DTT 前処理により griseofulvin の膜透過係数 (P_{app}) は、十二指腸及び空腸部で有意に上昇し、その変化率はそれぞれ 2.6 倍、1.4 倍となった。一方、回腸及び結腸部では変化は認められず、DTT 前処理による効果は、腸管上部ほど顕著であることが示された。脂溶性薬物の腸管吸収が、主に上部腸管において行われることを考慮すると、本実験系において、粘液層が脂溶性薬物の腸管膜透過性に対する律速段階として機能することが確認された。以後の検討では、DTT 前処理条件における脂溶性の異なる薬物の腸管膜透過性及び粘液層除去効果を評価し、粘液層の生理学的性質と薬物吸収との関係性について検討した。

まず、脂溶性の異なる様々なモデル薬物を用い、ラット腸管各部位（十二指腸部、空腸部、回腸部、結腸部）における膜透過性に対する DTT 前処理の影響を評価した。Rifampicin ($\log D_{pH6.5}$: 2.56)、griseofulvin ($\log D_{pH6.5}$: 2.17)、antipyrine ($\log D_{pH6.5}$: 1.22)、propranolol ($\log D_{pH6.5}$: -0.32) をモデル薬物として選択し、先の検討と同様に *in vitro* Sac 法により膜透過性の変化を評価したところ、rifampicin は十二指腸部、空腸部、回腸部において、griseofulvin 及び antipyrine は十二指腸部、空腸部において膜透過係数 (P_{app}) が上昇し、propranolol について変化は認められなかった。これらの結果から、DTT 前処理による膜透過性の変化は、上部腸管ほど顕著であり、さらに変化の程度は、実験条件下における $\log D$ 値が高いモデル薬物ほど顕著であることが示された。これらの結果より、腸管表面における粘液層が脂溶性薬物の膜透過に対する制御因子となり、その物理化学的性質が腸管部位によって異なることが示唆された。

脂溶性薬物の腸管膜透過性に対する粘液層の影響を詳細に検討するため、さらに物理化学的性質の異なる薬物をモデル薬物として選択し、DTT 前処理による膜透過性の変化を評価した。なお本検討においては、DTT 前処理による影響が顕著に認められた、ラット十二指腸部及び空腸部に限定し、これまでと同様の検討を行った。これまでの検討で用いた薬物に加え diclofenac ($\log D_{pH6.5}$: 1.79)、

flurbiprofen ($\log D_{pH6.5}$: 1.50)、naproxen ($\log D_{pH6.5}$: 0.70)、theophylline ($\log D_{pH6.5}$: -0.80) を選択し膜透過性の変化を検討した結果、薬物の腸管膜透過性に対する粘液層の影響は、高い $\log D$ 値を有し生体内において非電荷である薬物ほど、膜透過性に対する粘液層の影響が大きいことが示された（表 1）。

表 1 脂溶性薬物の膜透過性に対する DTT の影響

		Physiological Charge (pH6.5)	Log D (pH6.5)	Duodenum		Jejunum	
				P_{app} (10^5 cm/s)	P_{app} (10^5 cm/s)		
Griseofulvin	CTRL	0	2.17	0.78 ± 0.29	3.52 ± 0.76		
	DTT			2.02 ± 0.66 **	4.96 ± 1.46 *		
Antipyrine	CTRL	0	1.22	1.29 ± 0.40	2.45 ± 0.52		
	DTT			1.79 ± 0.37 *	3.56 ± 0.38 *		
Theophylline	CTRL	0	-0.80	0.90 ± 0.29	1.26 ± 0.37		
	DTT			0.98 ± 0.40	1.81 ± 0.62 *		
Diclofenac	CTRL	-1	1.79	0.25 ± 0.17	0.75 ± 0.35		
	DTT			0.33 ± 0.20	0.80 ± 0.25		
Flurbiprofen	CTRL	-1	1.50	0.50 ± 0.05	1.86 ± 0.43		
	DTT			0.60 ± 0.03 *	2.33 ± 0.89		
Naproxen	CTRL	-1	0.70	1.13 ± 0.05	2.06 ± 0.72		
	DTT			1.07 ± 0.22	1.82 ± 0.55		
Rifampicin	CTRL	+1	2.56	1.34 ± 0.53	2.03 ± 1.11		
	DTT			2.35 ± 0.90	3.20 ± 0.78 *		
Propranolol	CTRL	+1	-0.32	0.45 ± 0.06	0.67 ± 0.32		
	DTT			0.40 ± 0.13	0.67 ± 0.17		

脂溶性薬物の膜透過性に対する粘液除去剤の影響について考察を深めるため、DTT 処理後のラット腸管腔内における遊離粘液量を定性的または定量的に評価した。

粘液の分子実体はムコ多糖タンパク質である mucin である。mucin は、apomucin と呼ばれる 10~80 残基のペプチドからなる繰り返し構造を持つコアタンパクが無数の糖鎖によって修飾されてできた巨大分子の総称である。ヒトでは少なくとも 19 種類が存在し、腺細胞などが産生する分泌型 mucin (MUC2, 5AC, 5B, 6) と、疎水性の膜貫通部位を持ち細胞膜に結合した状態で、主に上皮細胞に存在する膜結合型 mucin (MUC1, 3A, 3B, 4, 12, 17) がある。従って、ラット腸管内における遊離粘液の定量は、粘液の主成分である mucin を測定対象とし、構造内のタンパク質を coomassie brilliant blue (CBB) 染色により、糖鎖量（主に酸性糖鎖）を alcian blue 染色により検出した。

DTT 処理後（10 mM 及び 30 mM）のラット腸管内液を SDS-PAGE にて泳動した後に CBB 染色した結果、DTT 未処理群に比較して明らかな泳動像の変化が認められた。また、alcian blue 染色により、腸管内液中の糖鎖量を定量した結果、DTT の処理濃度依存的に糖鎖量が増大した。さらに、その効果は腸管上部ほど顕著であることが示された。これらの結果より、ラット腸管内への DTT 処理によって管腔内のタンパク質の組成が変化し、その主たる成分は糖タンパク質であることが示唆された。これらの知見は、DTT による粘液除去作用が定量的に示され、さらに除去効果が腸管上部ほど顕著であることが示された。また、DTT による粘液除去効果の部位差が、脂溶性薬物の腸管膜透過性に対する DTT の効果と同様の傾向を示したことから、薬物

の膜透過に対しては、腸管上部に局在し酸性糖鎖を豊富に有する mucin が影響を及ぼしている可能性が高いと推察された。

次に、粘液層の分子実体である mucin に着目し、ラット腸管各部位における mucin 遺伝子発現量を real-time RT-PCR により解析し、その結果、ラット消化管において rMUC1、2、3A、4、5AC、13 の発現が認められ、その発現パターンは、消化管全体に発現が認められる分子種 (rMUC4、13)、消化管下部で発現が顕著である分子種 (rMUC2、3A)、消化管上部で発現が顕著である分子種 (rMUC1、5AC) に分類された。特に、膜透過性に与える粘液層の影響が顕著であった腸管上部において、発現量が高いことが確認された rMUC5AC については、分子内に酸性糖鎖を多く有し、alcian blue 染色の反応性が高いことが予想される。従ってこれら知見を踏まえると、rMUC5AC が薬物の腸管膜透過性に影響を与える粘液成分である可能性が考えられた。

以上の結果は、薬物の消化管膜透過機構において粘液層を中心とした腸管表面構造をより詳細に理解し、ヒト腸管における薬物吸収の高精度予測を可能にするための基盤情報を提供し、医薬品開発における腸管吸収の適正な評価法を確立する上での有用な知見となるものと考えられた。

(2) 非攪拌水層を標的とした吸収促進剤としての NO の有用性評価

経細胞輸送を介した薬物の消化管吸収に及ぼす一酸化窒素 (NO) の影響について詳細な検討を行った。本検討において、細胞内経路 (transcellular route) に対する影響をより明確に評価するために、細胞間隙経路 (paracellular route) に対する NO 供与体の吸収促進効果が可逆的であることを利用し、transcellular route に対しては NO 供与体の前処理条件を選択することで、両吸収経路の差別化を図った。NO 供与体である NOC7 を用い、NOC7 前処理時 (5 mM, 30 min) における薬物の吸収量の変化についてラット摘出腸管を用いた *in vitro* Sac 法により検討したところ、脂溶性薬物である griseofulvin の膜透過性は十二指腸部特異的に有意に上昇し、空腸部より下部では変化は認められなかった。一方、paracellular marker として一般的に用いられる FD-4 の膜透過性に変化は認められなかった。Paracellular route を標的とした NO 供与体による吸収促進効果には部位差が認められないことが報告されているため、本検討で認められた transcellular route に対する作用は、これまでに報告されている作用機序と異なることが示唆された。

NO による脂溶性薬物の吸収促進効果について詳細に検討するために、十二指腸部を用いて脂溶性の異なる各種化合物に対する NO の効果を検討したところ、NO による膜透過性の変化率は griseofulvin > diclofenac >

antipyrine > theophylline の順となり、脂溶性が高い薬物ほど NO による吸収促進作用を受け易いことが示された (図 1)。

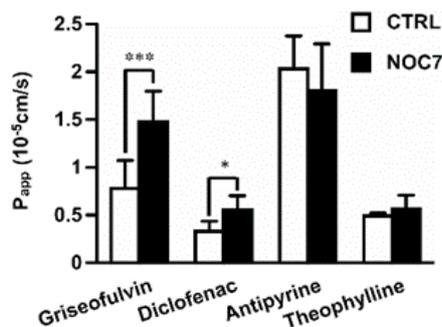


図 1 脂溶性薬物の膜透過性に対する NO の影響

さらに *in situ* closed loop 法により、十二指腸部に作成した loop より投与した griseofulvin の吸収量が、NOC7 前処理時において有意に増加したことから、ラット whole-body においても NOC7 の吸収促進効果が認められた。以上の結果より、薬物の脂溶性の大きさに応じて NO 供与体による吸収促進効果が強くなることから、NO は transcellular route を介した受動拡散による腸管膜透過を制御する何らかの因子に対して影響を及ぼしていることが示された。

この NO 供与体による効果を明らかにするため、脂溶性薬物の吸収制御因子として一般的に知られている非攪拌水層に対する影響を検討した。非攪拌水層は水溶性の粘液層で構成されているため、粘液層除去剤である DTT を用い、griseofulvin の粘膜透過性に対する NOC7 と DTT の併用効果による影響を検討した。DTT 単独前処理による膜透過性の変化は NOC7 単独前処理時と同等であったのに対し、NOC7 と DTT の併用前処理時においては併用による相加効果は認められなかった。DTT による griseofulvin の吸収促進効果は NO による効果と同様に腸管上部で特異的である傾向を示し、DTT が粘液層を除去することにより薬物の膜透過性を亢進することから、NO と DTT の作用点が共に粘液層であることが示唆された。これらの知見から、NOC7 により放出された NO が、DTT と同様に粘液層に対して影響を及ぼしたことにより脂溶性薬物の膜透過性を上昇させたと考えられた。

以上の結果より、NO は transcellular route を介した受動拡散による薬物吸収に対して吸収促進効果を有することが示された。さらに、その吸収促進機構として、NO が粘液層に対して影響を与えることによって、transcellular route を介した難溶性脂溶性薬物の膜透過性を増大させることを見出し、粘液層における薬物の透過性を制御することで部位特異的な吸収促進効果が望めるといふ、新規吸収促進効果を提唱するに至った

以上、本研究では腸管上皮細胞表面に存在する水溶性の粘液層である非攪拌水層の主要構成タンパク質 mucin に着目し、薬物吸収を制御する分子機構の解明に対し非常に有用な情報を得ることができたと考える。さらに、非攪拌水層の拡散律速により腸管粘膜透過性が制限されている難溶解性脂溶性薬物に対し、その粘膜透過性を向上させることができる新規の吸収促進作用を見出した。

本検討で得られた成果は、新規吸収促進技術の発展及び有用性拡大に有益な情報となると考えられ、今後、新薬開発における経口投与製剤開発の可能性をさらに拡大させるものと期待される。

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)

Hisanao Kishimoto, Kaori Miyazaki, Yusuke Takizawa, Yoshiyuki Shirasaka, and Katsuhisa Inoue: Absorption-enhancing effect of nitric oxide on the absorption of hydrophobic drugs in rat duodenum. *J Pharm Sci*, 105, 729–733, 2016.

[学会発表](計 7 件)

宮崎歌織、岸本久直、瀧沢裕輔、白坂善之、井上勝央：経細胞輸送を介した薬物の消化管吸収に及ぼす一酸化窒素の影響。日本薬剤学会第 30 年会, 2015 年 5 月 21 日 – 23 日 (長崎)

Hisanao Kishimoto, Kaori Miyazaki, Yusuke Takizawa, Yoshiyuki Shirasaka, Katsuhisa Inoue: Effect of nitric oxide on the intestinal absorption of lipophilic drugs in rat. 日本薬物動態学会第 30 回年会, 2015 年 11 月 12 日 – 14 日 (東京)

岸本久直、宮崎歌織、村谷美穂、瀧沢裕輔、白坂善之、井上勝央：脂溶性薬物の腸管吸収に与える粘液層の影響。日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日 – 29 日 (横浜)

宮崎歌織、岸本久直、村谷美穂、白坂善之、井上勝央：経粘膜透過を介した薬物の腸管吸収に及ぼす粘液層の影響。日本薬剤学会第 31 年会, 2016 年 5 月 19 日 – 21 日 (岐阜)

岸本久直：一酸化窒素による難吸収性薬物の腸管促進効果に関する研究に関する研究に関する研究。第 33 回製剤設計研究会, 2016 年 9 月 10 日 (東京)

Hisanao Kishimoto, Nanami Murata, Miho Muratani, Kaori Miyazaki, Yoshiyuki Shirasaka Katsuhisa Inoue: Effects of mucosal protective agents on the expression levels of mucus layer components in human intestinal cell lines. 日本薬物動態学会第 31 回年会, 2016 年 10 月 13 日 – 15 日 (長野)
宮崎歌織、岸本久直、村谷美穂、田野文音、白坂善之、井上勝央：脂溶性薬物の腸管膜透過性に及ぼす腸管粘液の影響及び mucin 発現解析。日本薬剤学会第 32 年会, 2017 年 5 月 11 日 – 13 日 (大宮)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 久直 (KISHIMOTO, Hisanao)
東京薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：80723600

(2) 研究分担者

井上 勝央 (INOUE, Katsuhisa)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：50315892