

平成 26 年度
学会報告

潰瘍性大腸炎ラットにおけるタクロリムスの経口吸収増加とその要因

柳田 航平

愛知学院大学 薬学部 薬剤学講座

【概要】

2013年3月、神戸学院大学、兵庫医療大学、神戸サンポーホール、デザイン・クリエイティブセンター神戸で開催された「日本薬学会第135年会」に参加し、以下の研究内容をポスター発表した。

【背景・目的】

潰瘍性大腸炎は、大腸の粘膜に潰瘍やびらんができる炎症性疾患であり、病変部位は直腸から結腸全体までに及び、1970年以降、急激に患者数は増加している。病因に遺伝子的要因、免疫異常、環境要因（食生活など）が挙げられるが、その発症要因の詳細は未だ明らかになっていない。発症年齢のピークは男性で20～24歳、女性で25～29歳にみられ、性差は認められない¹⁾。治療薬には免疫抑制薬、ステロイド、5-アミノサリチル酸などが挙げられる。

潰瘍性大腸炎の治療薬の一つであるタクロリムス(TAC)は体内動態の個体内・個体間変動が大きい為、血中濃度測定に基づく綿密な投与設計が必要とされる。TACは、主に肝臓並びに小腸粘膜に存在するシトクロムP450(CYP)3Aによって代謝され体内から消失する薬物である。また、経口投与されたTACは小腸粘膜並びに肝臓における初回通過効果を受けることが知られており²⁾、その機構にはCYP3Aに加え、小腸粘膜に発現するP-糖タンパク質(P-gp)の関与が指摘されている。

潰瘍性大腸炎患者において、腸管のP-gp発現量及び機能が低下することが報告されており³⁾、TACの体内動態が潰瘍性大腸炎によるP-gpの発現変動の影響を受ける可能性が考えられる。一方で、潰瘍性大腸炎時のP-gpの変動機構やCYP3A活性の発現変動についての報告はなく、TACの体内動態への影響は明らかではない。本研究では潰瘍性大腸炎モデルラットを作製し、TACの体内動態変動とその変動要因に関する検討を行った。

【方法】

1. 潰瘍性大腸炎モデルの作成とモデル評価

Wistar系雄性ラット(9週齢)を用い、5%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)水溶液を7日間、自由飲水させ潰瘍性大腸炎モデルラットを作成した。DSSモデルラットの確認は、Daiらの評価方法⁴⁾に準じ、体重減少、下痢及び血便の重症度で評価するDisease Activity Index(DAI)スコア及び大腸の長さで評価した。

2. *In vivo* 体内動態実験

DSSラット及びShamラットにTAC(1.0 mg/kg)を経口投与した後、経時的に採血を行った。全血中TAC濃度は、Koopらの⁵⁾方法に準じてLC-TOFMSにより測定した。

3. CYP3A活性の測定

In vivo 体内動態実験後に小腸及び大腸からマイクロソーム画分を分離した。

マイクロソーム画分におけるCYP3A活性は既報⁴⁾に基づき、テストステロンの6β水酸化活性を測定することにより評価した。

4. 粗膜画分におけるP-gp発現量の測定

小腸及び大腸の粗膜画分におけるP-gp発現量は、ウエスタンブロット法により評価した。P-gpの検出はC219抗体(Calbiochem)、Villinの検出には抗Villin抗体(Santa Cruz)を用いた。P-gp発現量は、Villin発現量で補正した。

5. Cyp3a, Mdr1a, 核内受容体のmRNA発現量の測定

小腸及び大腸からTotal RNAを抽出し、既報⁵⁾に基づき、Cyp3a9, Cyp3a18, Cyp3a62, Mdr1a, VDR, PXR, GAPDH mRNA発現量をRealtime-PCR法により測定した。各mRNA発現量は、GAPDH mRNA量で補正した。

【結果】

DSS 群では Sham 群と比較し、大腸炎の重症度を示す disease activity index の顕著な増加を示した。DSS 群に TAC を経口投与したところ、TAC の血中濃度 - 時間曲線下面積 (AUC) は Sham 群に比べ約 4 倍増加していた。DSS 群における小腸及び大腸の P-gp mRNA 及びタンパク発現量は、Sham 群と比較して有意に低下していたが、各臓器における CYP3A 活性及び mRNA 発現量は両群間で差が認められなかった。

【考察】

DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルは、大腸粘膜へのびらんや潰瘍形成、大腸の短縮、血便、下痢及び体重減少など、人における潰瘍性大腸炎の病態を反映すると報告されている^{2,6)}。本研究において 5%DSS 摂取 7 日後に、DAI スコアの上昇及び大腸の長さの短縮が認められ、過去の報告と同様の結果であった。

DSS 群に TAC を経口投与したところ、Sham 群に比べ、AUC 及び Cmax はそれぞれ約 2.7 倍、約 2.4 倍に有意に増加し、CL/F は約 40% まで減少していた。一方で、消失速度定数に 2 群間で有意な差が認められなかった。さらに、肝ミクロソームにおける CYP3A 活性に DSS 投与の影響が認められなかったことから、DSS 群における TAC 経口投与後の血中濃度の上昇には、肝代謝能の変動による影響は少なく、小腸における初回通過効果の低下が関与する可能性が示唆された。

次に、小腸における P-gp 発現量について検討を行ったところ、Sham 群に比べ、DSS 群の P-gp 発現量はすべての部位において、顕著に低下していた。一方で、小腸における CYP3A mRNA 及び CYP3A 活性は DSS 投与による影響は認められなかった。また、過去の報告において、DSS ラットの腸管において、細胞間隙を介した薬物輸送に変化が認められないことが報告されている⁷⁾。一方で、本研究で用いた DSS ラットは重度の下痢症状を呈していたが、下痢症状を有する腎移植患者では、小腸並びに肝臓の CYP3A 活性に変化は認められず、小腸における P-gp 活性の減少により、TAC の経口吸収が増加することが報告されている⁸⁾。以上から、DSS ラットにおける TAC の経口吸収増加には、小腸粘膜の P-gp 発現量の減少が関与する可能性が示唆された。

P-gp の転写調節には、核内受容体である PXR 及び VDR が関与することが報告されており、DSS 群での P-gp の発現低下機構における PXR 及び VDR の役割について検討を行った。DSS 群における小腸及び大腸の PXR 及び VDR mRNA 発現量に有意な変動は認められなかった。潰瘍性大腸炎患者における腸管の P-gp 発現量低下には、PXR 非依存的な調節因子が関与することが報

告されている⁹⁾ ことから、DSS 群での P-gp 発現量低下には PXR 及び VDR を介した転写調節の寄与は少なく、別の調節因子が関与している可能性が考えられ、詳細な制御機構についてはさらなる検討が必要である。

【引用文献】

- (1) NPO 法人日本炎症性腸疾患協会編 . 潰瘍性大腸炎の診療ガイド 第 2 版 . 文光堂 . 2011:pp.6-22.
- (2) Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. Clin. Pharmacokinet. 29: 404-430, 1995.
- (3) Englund G, Jacobson A, Rorsman F, Artursson P, Kindmark A, Rönnblom A. Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). Inflamm Bowel Dis. 13: 291-297, 2007.
- (4) Dai C, Zheng CQ, Meng FJ, Zhou Z, Sang LX, Jiang M. VSL#3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF- κ B pathway in rat model of DSS-induced colitis. Mol. Cell Biochem. 374:1-11, 2013.
- (5) Koop DR, Bleye LA, Munar M, Cherala G, Al-Uzri A. Analysis of tacrolimus and creatinine from a single dried blood spot using liquid chromatography tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. 926: 54-61, 2013.
- (6) Gaudio E, Taddei G, Vetusch A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. Dig Dis Sci. 44: 1458-1475, 1999.
- (7) Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology. 98: 694-702, 1990.
- (8) Buyse M, Radeva G, Bado A, Farinotti R. Intestinal inflammation induces adaptation of P-glycoprotein expression and activity. Biochem. Pharmacol. 69: 1745-1754, 2005.
- (9) Lemahieu W, Maes B, Verbeke K, Rutgeerts P, Geboes K, Vanrenterghem Y. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein activity and assimilation of tacrolimus in transplant patients with persistent diarrhea. Am. J. Transplant. 5: 1383-1391, 2005.

【感想】

今回の日本薬学会での発表は、研究テーマの専門分野の先生方と討議を行なうことによって、学生の私にはな

かった考え方を吸収し、自分の視野を広げることができました。このことが自分の研究を考え、自分を成長させる良い機会となりました。

最後になりましたが、後輩の皆さんも自らアンテナをはって積極的に色々な催しに参加してみてください。きっといい勉強になります。

