

原 著

デキストラン硫酸ナトリウム誘発性潰瘍性大腸炎ラットにおける
肝および腸バリア機能の変動

熊谷 茉歩,* 石井 敬, 森本かおり, 富田 幹雄

Changes in Function of Liver and Intestinal Barrier during Ulcerative Colitis
Induced Sodium Dextran Sulfate in Rat

Maho KUMAGAI,* Makoto ISHII, Kaori MORIMOTO, and Mikio TOMITA

Department of Drug Absorption and Pharmacokinetics, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku medical and Pharmaceutical University.

(Received November 20, 2019)

We investigated the expression levels of major ATP-binding cassette transporters such as P-glycoprotein (P-gp) and CYP metabolic enzymes in the liver and small and large intestines during ulcerative colitis (UC). In addition, we examined the involvement of tight junctions (TJ) such as intestinal epithelial cells with barrier functions by measuring membrane resistance (Rm), relative activity of P-gp evaluated by a P-gp substrate, and rhodamine 123 (Rho123) permeability in the presence or absence of a specific P-gp inhibitor, verapamil. Expression levels of both P-gp and CYP decreased in the liver, suggesting a secondary loss of barrier function in UC. A decrease in P-gp and an increase in CYP was observed in the jejunum and colon, but not in the ileum. In control conditions, the permeability of Rho123 in the serosal to mucosal direction was greater than that in the reverse direction, as observed in an in vitro diffusion chamber method. The inhibition of Rho123 permeability was observed in the presence of verapamil, indicating P-gp was sufficiently expressed and was working fine in the small and large intestines. In contrast, a decrease in the relative activity of P-gp and Rm, and Rho123 hyperpermeability in both directions was observed in UC, when compared with control conditions. These data indicate that hyper-permeability of Rho123 in the small intestine resulted from not only P-gp dysfunction, but also the decrease in Rm. The plasma concentration profile of Rho123 after intravenous and oral administrations showed that UC affected Rho123 absorption from the small intestine and liver functions, as evaluated by Rho123 elimination.

Key words — ulcerative colitis, small intestine, tight junction, membrane resistance, P-glycoprotein, Rho123 disposition

緒 論

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative Colitis: UC) は大腸に潰瘍やびらんを形成し、腹痛や下痢、血便などの症状を呈する炎症性腸疾患である。再燃と寛解を繰り返す原因不明の難治性疾患であり、本邦の特定疾患に指定されている。潰瘍性大腸炎の発症メカニズムはいまだ解明されていないが、遺伝的素因や免疫異常、腸内細菌叢の変化や食事など様々な因子が複雑に関与しているといわれている。¹²⁾ 消化管は食物の消化吸收を担う部位であるため、異物との接触が多い。そのため、腸管上皮細胞は外界とのバリアとして機能しているが、潰瘍性大腸炎で

は上皮バリアが不完全になっていることが知られている。³⁾ 大腸においては、粘液層の変化や密着結合の脆弱化により腸内細菌が流入しやすく、^{4,5)} 粘膜透過性亢進により大腸炎が生じるといった、⁶⁾ 大腸バリア機能の低下と病態の関連が報告されている。小腸においては、UC患者の空腸において病理組織学的変化が認められた報告や、⁷⁾ 大腸の粘膜が治癒しているにもかかわらず、下痢や腹痛などの症状がある患者において回腸の粘膜透過性亢進が認められた報告があり、⁸⁾ 大腸に加えて小腸のバリア機能低下が示唆されている。

腸管粘膜上皮細胞を介する吸収ルートを生理解剖学的に大別すると、経細胞輸送と細胞間隙輸送に分類できる。経細胞輸送は主に脂溶性の薬物、細胞間隙輸送は主に水溶性の薬物が透過する。経細胞ルートには代謝および排泄による異物排除機

構が介在している。代謝酵素である Cytochrome P450 (CYP) 3A4 および排泄型トランスポーターである P-糖タンパク質 (P-glycoprotein; P-gp) は小腸上皮細胞に存在し薬物を含む化学物質に対し、バリア機能として働き、バイオアベイラビリティの変動に寄与していることが知られている。^{9,10)} また CYP3A4 の基質と P-gp の基質の多くは重複しており,¹⁰⁾ CYP3A4 の発現は消化管下部から上部へと発現量が上昇し、反対に P-gp は消化管上部から下部へと発現量が上昇することから、消化管上部の CYP で代謝を免れた異物を消化管下部の P-gp によって排泄することで体内への異物流入を制御し、CYP と P-gp の双方連携により消化管の異物排除機構が構築されていることも知られている。¹¹⁾

また、消化管で排除できなかった薬物異物は、門脈から肝臓に流入し、肝臓で代謝を受ける。特に CYP は肝臓に多く発現し、薬物異物代謝で最も重要な酵素であるため、CYP の発現や活性の変動は肝初回通過効果に影響を及ぼす。さらに、肝臓の P-gp は胆管側膜に存在し、胆汁排泄に関与している。

UC 時の病態変動としては、UC 患者の結腸において、CYP および P-gp の発現はともに上昇するという報告や、¹²⁾ 炎症組織において P-gp が低下するという報告があるものの、¹³⁾ UC 患者の小腸および肝臓における CYP および P-gp 発現変動に関する報告はない。また、UC モデルマウスにおいては小腸および肝臓で CYP や P-gp の報告はあるが、^{14,15)} UC モデルラットを用いた検討や P-gp 機能の評価や部位差を検討した報告はない。また、一方、細胞間隙ルートは Tight junction (TJ) による細胞間の密着結合によりバリアが形成されている。結腸における TJ の機能低下についての報告は数多くあるが、^{16,17,18)} 小腸についての報告はない。

以上の背景のもと本研究では、CYP3A, P-gp および TJ の3つのバリア機構に着目し、mRNA 発現レベルに加えて、in vitro 系にて物質の透過性と TJ との関連性ならびに部位差について評価し、さらに in vivo 体内動態への影響を検討した。

方 法

動物

7週齢の Wistar 系雄性ラット (Japan SLC, Japan) を用いた。飼料と水は自由に与え、温度 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)、恒湿 ($55 \pm 5\%$)、12時間の明暗サイクル

(明期 7:00~19:00) の人工環境下で飼育した。すべての実験は、東北医科薬科大学の動物実験倫理委員会の承認を受けて実施した。

潰瘍性大腸炎モデルラットの作製

ラットに 5% DSS (Dextran sulfate sodium salt, MP Biomedical) 溶液を7日間自由飲水させることで大腸炎を誘発させた。体重、便性状、血便の有無を毎日観察し、既報に従い Disease activity index (DAI) スコアを算出し、¹⁴⁾ 重症度を評価した。本研究では、重症度が中等度以下 (DAI スコア 8 以下) のモデルラットを使用した。また、実験前日に絶食をしてから実験に用いた。

Hematoxylin-Eosin (HE) 染色

断頭後、結腸を摘出し、10%中性緩衝ホルムアルデヒド液に浸して固定後、パラフィン包埋をし、 $4\mu\text{m}$ にスライスした。脱パラフィン後、ヘマトキシリン溶液で15分染色し、1%塩酸アルコールで脱色分別した。その後1%エオジンで30秒染色し、脱水処理をして封入した。

ラット臓器組織からの RNA 抽出および cDNA 合成

断頭後開腹し、肝臓、空腸、回腸および結腸を摘出し、肝臓は切片を、腸管は切り開き、粘膜を擦過したものを RNA later Solution (Invitrogen) に浸漬し、 4°C で over night 後、溶液から組織を取り出し RNA 抽出を行うまで -80°C に保存した。RNA の抽出は FastGene™ RNA Premium Kit (日本ジェネティクス) を用いて行い、Qubit RNA BR Assay Kit (Invitrogen) および Qubit 3.0 Fluorometer (Life technologies) にて RNA 濃度を測定し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) に従って total RNA $2\mu\text{g}$ から cDNA を作製した。

Real time PCR による mRNA 相対発現量

CYP3A 分子種、P-gp をコードする遺伝子である MDR1A および PXR (Pregnane X Receptor) の各組織の発現量変動を real time PCR により検討した。CYP3A 分子種は CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A62 の5種を用い、3A1, 3A2 に関しては肝臓に多く発現し、消化管において検出されないことが知られているため、¹⁹⁾ 空腸、回腸および結腸では 3A1, 3A2 を除いた3種で検討を行った。Table 1 に示したプライマーおよび THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いた。Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems) で 95°C 60秒加熱後、 95°C 15秒および 60°C 60秒を40サイクル反応させ、内部標準に β -actin を用いて、

Table 1. Primer sequence for real time PCR.

Target	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
CYP3A1	GCAGGAGGAGATCGACAGG	CCAGGTATTCCATTTCATCA
CYP3A2	CGTCTGGATTCTAAGCATAAGCA	TGGAATTATTATGAGCGTTCAGC
CYP3A9	ACCTGGCTGCTCCTGGTT	AATTCCATGTGAATGAGTTCCA
CYP3A18	CCAATGTGCAAAAGAACTCC	AGAGCATCATAGGTGACAGGTG
CYP3A62	TCCAGAAGAACTGCAGGATG	CTACCAGGACATCATAGGTCACAG
MDR1A	GCAAATGTAGGAAACAACCGTA	ATAGTAGGCGTACGTGGTCATTT
PXR	AGCAGTGGCCACCTAACAGT	CCAACATGGTTCCACCTCTC
β -actin	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	GCCTGGATGGCTACGTACA

$\Delta\Delta Ct$ 法により相対発現量を算出した。

In vitro diffusion chamber 法

ラットの腸管を用いて, in vitro で腸管セグメントごとの粘膜透過性の評価を行った。断頭後, 腸管を摘出し, シート状に切り開いた。粘膜側を洗浄し筋層剥離後, chamber に固定した。chamber は 37°C のヒートブロックにセットし, 漿膜側 (Serosal side; S 側) に Glucose-HEPES-phosphate buffered Ringer's solution (Glucose-HPBR) buffer を 3.5 mL, 粘膜側 (Mucosal side; M 側) にはバッファまたは 100 μ M Verpamil 溶液を 3.5 mL 添加し, 15 分間プレインキュベーションした。なお, バッファは 95% O₂/5% CO₂ gas でバブリングし, 酸素過飽和状態で pH 7.4 に調製して用いた。吸収 (MS) 方向と排泄 (SM) 方向の 2 群に分け, P-gp の基質である Rhodamine123 (Rho123) を基質として実験を行った。プレインキュベーション後, ドナー側は 10 μ M Rho123 3.5 mL, レシーバー側はバッファ 3.5 mL に入れ替え, 15 分間隔でレシーバー側から 200 μ L ずつサンプリングをし, その都度バッファを 200 μ L 加え Volume 補正した。Rho123 の濃度は Infinite M1000 (TECAN) を用いて, 蛍光強度 (Ex; 485 nm, Em538 nm) を測定して算出した。

見かけの透過係数 (apparent permeability coefficient; P_{app}) の算出は以下の式から算出した。

$$P_{app} = \frac{dA}{dt \cdot C_0 \cdot S}$$

ただし, $\frac{dA}{dt}$: 腸管粘膜を介した Rho123 の透過速度 (pmol/s)

C_0 : 初濃度 (μ M)

S : 腸管粘膜の表面積 (cm²)

P-gp 相対活性 (relative activity) は以下の式から算出した。

$$\text{吸収方向 (MS)} \quad \frac{P_{pass} - P_{app}}{P_{pass}}$$

$$\text{排泄方向 (SM)} \quad \frac{P_{app} - P_{pass}}{P_{app}}$$

ただし, P_{app} : permeability without Verapamil

P_{pass} : permeability with Verapamil

膜抵抗値の算出

Chamber に Glass Barrel Micro-Reference Electrode (Precision Instrument Desing 製) を挿入し, Short-Circuit-Current Amplifier (NIHON KOHDEN) に接続し, 膜電位を測定しオームの法則に従い膜抵抗値 (R_m) を算出した。

静注および経口投与後の体内動態

Rho123 溶液 0.2 mg/kg および 2.0 mg/kg を頸静脈投与および経口投与後, 頸静脈から採血を行った。10000 rpm, 3 min で遠心し, 血漿をサンプルとして, 蛍光強度を測定して血中濃度を測定した。静注後のデータは 2-コンパートメントモデルで解析を行い, MULTI を用いた非線形最小二乗法により薬物動態学的パラメータを算出した。

結 果

潰瘍性大腸炎モデルラットの作製

ヒト UC と同様の症状を引き起こすことから, 動物実験には DSS 誘発性 UC モデルが汎用されており, ²⁰⁾ 本モデルにおいても UC 患者で認められる軟便や血便といった症状が観察された。組織病理学的にも control (Fig. 1-a) に対して DSS (Fig.

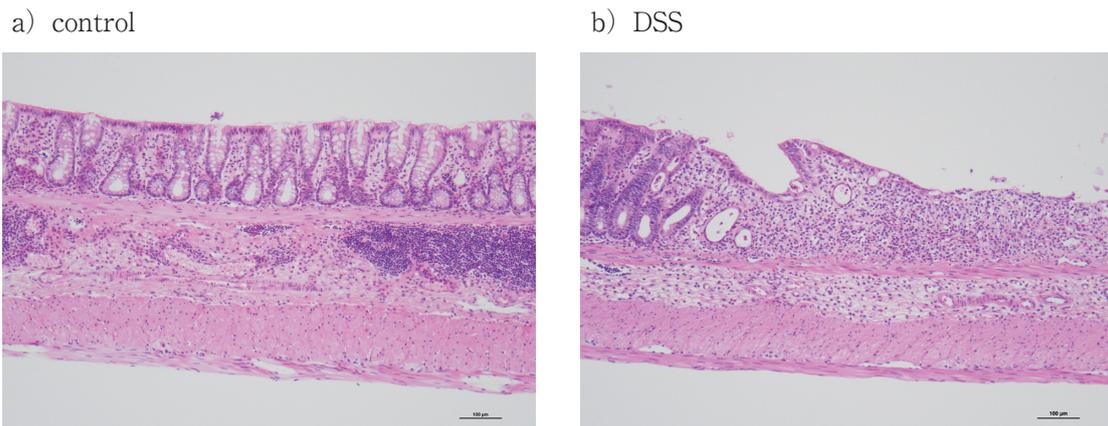


Fig. 1. Histopathological findings in colons of DSS induced colitis rat. Experimental colitis was induced by drinking 5%DSS water during 7 days. After overnight fasting, the colon was removed, and stained with hematoxylin and eosin. (a) Control, (b) DSS

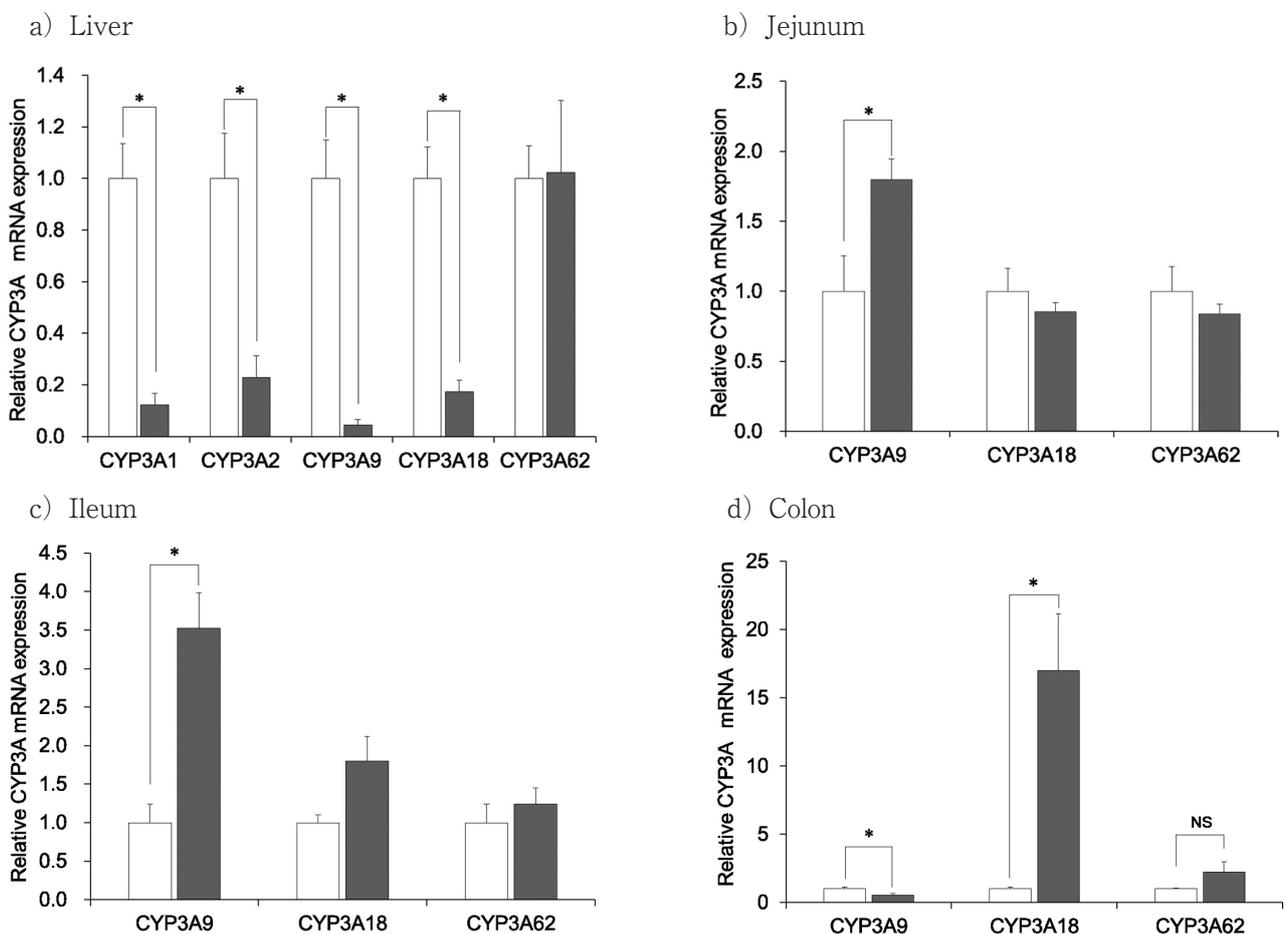


Fig. 2. Change in the relative expression level of various CYP3A mRNAs in the liver (a), jejunum (b), ileum (c) and colon (d) during DSS-induced colitis rat. Expression levels of CYP3A mRNAs were determined by real-time PCR. Open and closed columns represent the control and DSS-treated rat, respectively. Data are expressed as the mean \pm S.E. for 4-5 rat per group. *Significantly different from the control at $P < 0.05$.

1-b) において、びらんや陰窩の消失が認められ、潰瘍性大腸炎モデルラットが作製できた。

肝臓および腸管における mRNA 相対発現量

肝臓において CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18 mRNA 発現量は control 群に比較し DSS 群で有意

に低下が認められ、CYP3A62 では変化が認められなかった (Fig. 2-a). 空腸および回腸においては、CYP3A9 は control 群に比較し DSS 群で有意に上昇が認められ、他の分子種は変化がなかった (Fig. 2-b, c). 結腸では、control 群に比較し DSS 群にお

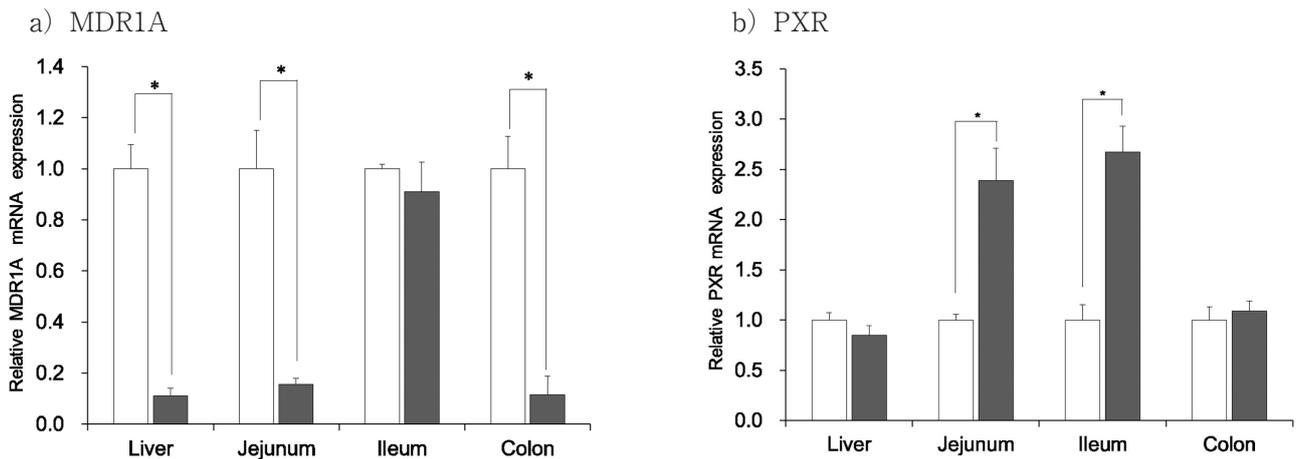


Fig. 3. Change in the level relative expression of MDR1A (a) and PXR (b) mRNAs in the liver, jejunum, ileum and colon during DSS-induced colitis rat. Expression levels of MDR1A and PXR mRNAs were determined by real-time PCR. Open and closed columns represent the control and DSS-treated rat, respectively. Data are expressed as the mean \pm S.E. for 4-5 rat per group. *Significantly different from the control at $P < 0.05$.

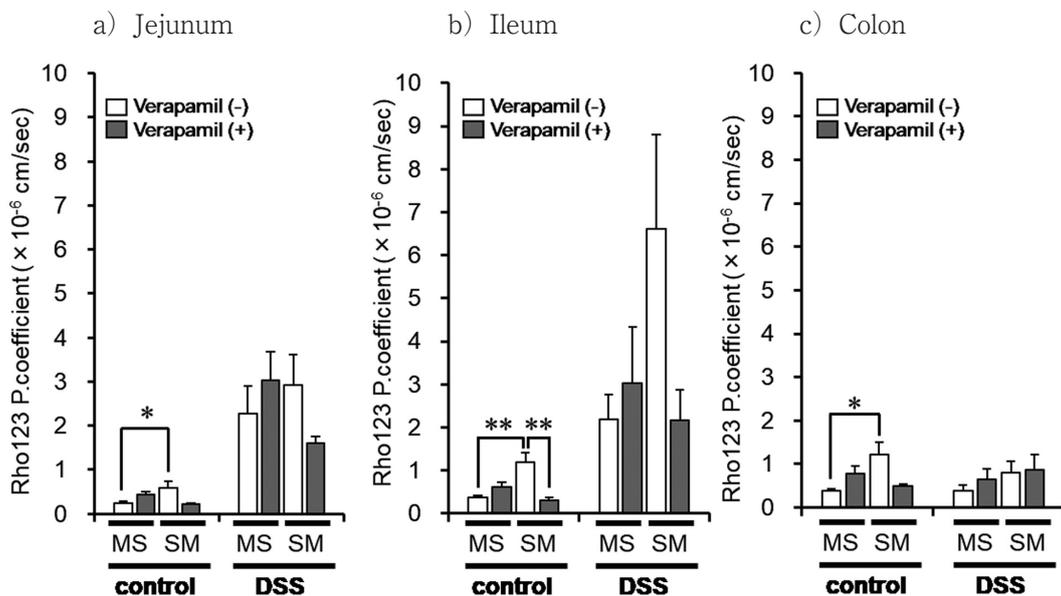


Fig. 4. Rho123 permeability coefficient in the mucosal to serosal and serosal to mucosal direction in jejunum (a), ileum (b) and colon (c). Open and closed columns represent permeability in the absence verapamil and presence verapamil, respectively. Data are expressed as the mean \pm S.E. for 4-11 rat per group. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

いて CYP3A9 は有意に低下が認められ、逆に CYP3A18 は有意に上昇し、CYP3A62 に関しては上昇傾向であった (Fig. 2-d).

P-gp の mRNA 発現量は肝臓、空腸および結腸においては、control 群に比較し DSS 群で有意に低下が認められたが、回腸では変化が認められなかった (Fig. 3-a).

核内受容体である PXR の発現量は肝臓および結腸では変化が認められなかったが、空腸および回腸では DSS 群で有意に上昇が認められた (Fig. 3-b).

P-gp および TJ 機能評価

空腸、回腸および結腸において control 群において Verapamil 非存在下の MS に比較し SM で有意に上昇していることから、Rho123 の排泄方向へのベクトル輸送が認められた (Fig. 4)。これに対して、Verapamil の添加により吸収方向の透過上昇、排泄方向の透過低下がみられたことから、空腸、回腸および結腸いずれの部位においても P-gp が十分に発現し機能していることが確認された。一方 DSS 群では、control 群で認められたベクトル輸送

Table 2. Relative activity of P-gp assessed using Rho123 permeability coefficient in the presence or absence of verapamil in jejunum, ileum and colon.

	MS		SM	
	control	DSS	control	DSS
jejunum	0.45	0.25	0.65	0.45
ileum	0.40	0.28	0.73	0.67
colon	0.50	0.38	0.59	-0.08

Each value represents the mean of 4-11 independent experiments.

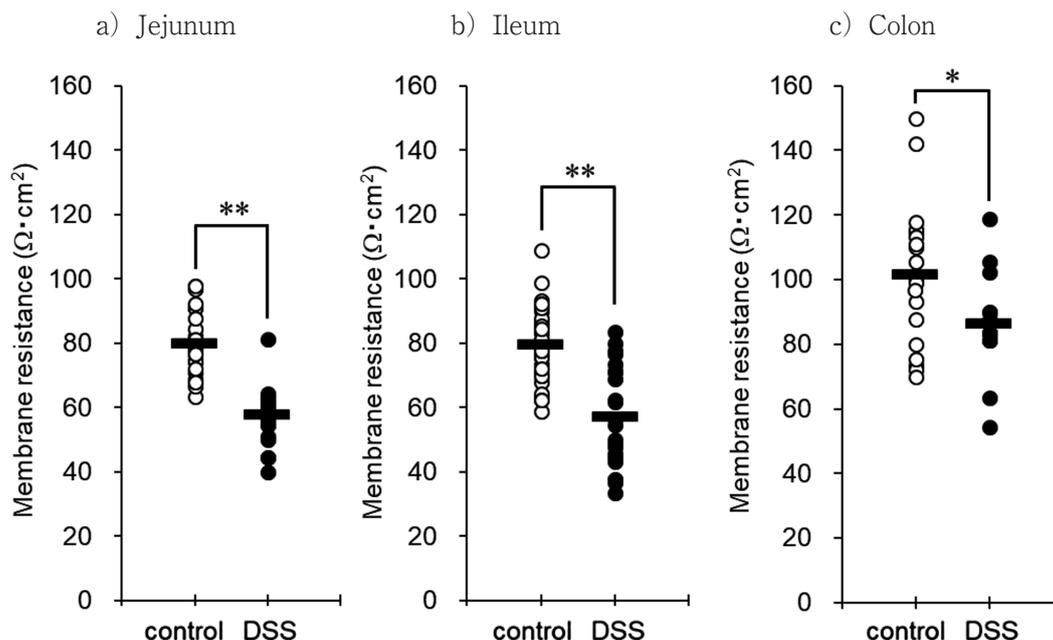


Fig. 5. Change in membrane resistance across jejunum (a), ileum (b) and colon (c) in DSS-induced colitis rat. Open and closed circle represent control and DSS-treated rat, respectively. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

が低下し、Verapamil 添加による効果も低下したことから、P-gp の機能低下が示された。さらに、P-gp の相対活性を算出し定量的な評価をしたところ、いずれの部位においても吸収および排泄方向の両方向からの評価で control 群に比較し、DSS 群において P-gp 相対活性の低下が認められた (Table 2)。なお、回腸においては、空腸および結腸に比較し P-gp 相対活性の低下は小さかった。

TJ 機能の指標である膜抵抗値は、いずれの部位においても control 群に比較し DSS 群で有意に低下が認められた (Fig. 5)。結腸では control は $103.4 (\Omega \cdot \text{cm}^2)$ から $78.8 (\Omega \cdot \text{cm}^2)$ に低下し、空腸および回腸は 78.6 および $78.3 (\Omega \cdot \text{cm}^2)$ から 55.5 および $64.2 (\Omega \cdot \text{cm}^2)$ に低下した。

Rho123 静注および経口投与後の体内動態

Rho123 静注後の体内動態は 2-コンパートメントモデルによって解析を行い、 $\alpha \cdot \beta$ 相が求められ、

control 群に比較して DSS 群において β 相の低下が認められた ($p = 0.05$) (Fig. 6-a)。また、control 群に比較し DSS 群において、血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) が約 1.4 倍上昇し、全身クリアランスが 73% に低下した (Table 3)。経口投与後の最高血中濃度 (C_{\max}) は control 群に比較し DSS 群において上昇し、投与量で補正した C_{\max}/D では有意な上昇が認められた (Fig. 6-b)。さらに、経口投与後の血中濃度推移から算出した AUC および吸収速度定数 k_a は有意な上昇が認められ、経口クリアランス (CL/F) および消失速度定数 k_{el} の有意な低下も認められた (Table 3)。

考 察

UC は大腸に潰瘍やびらんを形成する炎症性腸疾患であることから、炎症部位である結腸のバリア

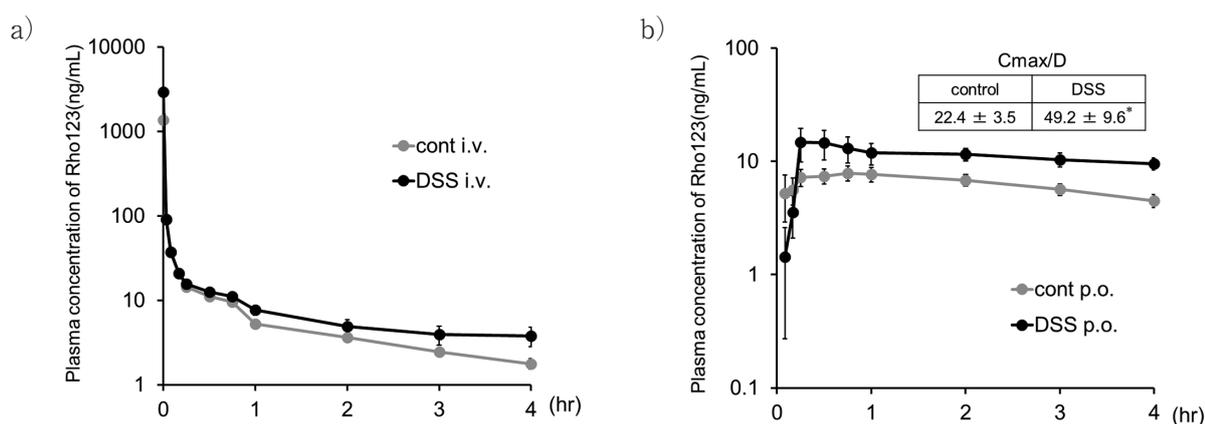


Fig. 6. Plasma concentration curve of Rho123 after its intravenous and oral administration. Rho123 solution was prepared using 1%DMSO and were intravenously (i.v.) and oral administration (p.o.) administered to the rats at a dose of 0.2 mg/kg and 2.0 mg/kg, respectively. The total clearance (CL_{tot}) of Rho123 was calculated by dividing the i.v. dose by the area under the plasma concentration curve (AUC), which was obtained by fitting the plasma concentration to a 2-compartment model using the program MULTI.

Table 3. RPharmacokinetic parameters of Rho123 after its intravenous (0.2 mg/kg) and oral (2 mg/kg) administration.

	Control		DSS	
	i.v.	p.o.	i.v.	p.o.
AUC (ng · min/mL)	3052 ± 302	1976 ± 158	4309 ± 798	3732 ± 429**
CL (mL/min/kg)	68.6 ± 7.8	—	50.7 ± 7.7	—
CL/F (mL/min/kg)	—	1047 ± 75.9	—	592.8 ± 82.5**
V_1 (mL/kg)	183.9 ± 39.3	—	78.8 ± 13.5*	—
α phase (hr^{-1})	19.0 ± 0.47	—	18.4 ± 1.48	—
β phase (hr^{-1})	0.55 ± 0.03	—	0.29 ± 0.09	—
k_a (hr^{-1})	—	2.37 ± 0.12	—	4.8 ± 0.46**
k_{el} (hr^{-1})	—	0.21 ± 0.02	—	0.05 ± 0.01**
$t_{1/2}$ (hr) (calculate from β phase)	1.28 ± 0.08	—	3.17 ± 0.89	—
$t_{1/2}$ (hr) (calculate from k_{el})	—	3.36 ± 0.23	—	13.5 ± 3.04**

Data are expressed as the mean ± S.E. for 4-6 rat per group.

**p < 0.01, *p < 0.05, significantly different compared with the control.

機能変動に関する報告は多数あるが、小腸のバリア機能に対する詳細な検討はない。そのため、本研究ではDSS誘発性大腸炎ラットの消化管上皮細胞において、経細胞バリアであるP-gp、CYP、および細胞間隙バリアであるTJに着目し、それらのバリア機能の変動ならびに部位差について検討を行った。

肝臓のCYP3A mRNA発現量は、control群に比較しDSS群においてCYP3A1、3A2、3A9、3A18で有意な低下が認められた。特に肝臓の中で最も発現量が多いCYP3A2の有意な低下が示され、これらの結果はUCモデルマウスを用いたCYP3AのmRNAおよびタンパク発現量低下の報告と一致している。^{14,21)} 一方で、ラットにおけるCYP3A2活

性低下も報告されていることから、²²⁾ 肝臓においてはCYP3Aの発現低下により薬物代謝の低下が起これと考えられた。

空腸および回腸におけるCYP3A mRNA発現量を比較してみると、両部位ともDSS群においてCYP3A9の有意な上昇が認められた。しかし、正常時における空腸と回腸のCYP3A分子種の発現プロファイルが異なることがすでに報告されており、その報告によると空腸においてはCYP3A9が最も高く、回腸においてはCYP3A62が最も多く存在すること、また、回腸に存在するCYP3A62はCYP3A9の5倍ほど発現量が高いことが示されている。¹⁹⁾ そのため、空腸においては、CYP3A9のmRNA発現量上昇を介する代謝亢進が考えられ

たが、回腸において最も存在量の多いCYP3A62発現量の変化が認められず、他の分子種で発現上昇が認められていることから、代謝の変動に関しては基質により変動の有無が生じると考えられた。また、結腸についても同様に考えると、結腸に最も多く発現しているCYP3A分子種はCYP3A62であり、発現量は上昇傾向にあるが、分子種によって発現変動が異なることから、回腸と同様に基質によって代謝の変動が異なることが考えられた。さらにUCモデルマウスでは、小腸上部においてヒトCYP3A4に該当するCYP3A11の発現量が低下することや、¹⁴⁾ 小腸ミクロソームを用いた検討においてCYP3Aで代謝されるニフェジピンの代謝速度が低下しているため、²³⁾ 小腸のCYP3Aに関しては種差の影響が大きいと考えられた。

ラットCYP3A分子種の中でCYP3A62は、ヒトCYP3A4および3A5と最もアミノ酸配列の相同性が高いことが示されている。しかしながら、代謝能は低いこともいわれており、¹⁹⁾ これはラットの代謝をヒトに外挿することは困難であることを意味するものである。²⁴⁾ よって、腸管CYP3Aによる初回通過効果の変動についてはさらなる検討が必要である。

P-gp mRNA発現量に関しては、肝臓、空腸および結腸において、DSS群で有意に低下が認められたが回腸では変化が認められず、小腸P-gpの発現変動に空腸と回腸における部位差が存在することを明らかにした。

本結果を各部位で最も多く発現しているCYP3A分子種とP-gpに焦点を当てて考察すると、空腸および結腸ではP-gpのmRNA発現低下に伴い、CYPが上昇または上昇傾向にあり、回腸においてはP-gp、CYPともに変化が認められないことから、消化管におけるP-gpとCYPの変動は相補的である可能性が考えられた。

また、P-gpおよびCYP3Aの転写活性化に関与している核内受容体：PXRの発現量に関する検討において、いずれの分子種とも相関が認められなかった。一般にPXRが活性化すると、レチノイドX受容体 (retinoid X receptor, RXR) とダイマーを形成し、細胞質から核内に移行し標的配列に結合することでCYP3AやP-gpの発現を増加させる。²⁵⁾ 今回の実験においては、細胞質と核内に存在するPXRを区別していないため、PXRの発現量は変化せずに核内への移行量が上昇している可

能性も考えられた。特に、肝臓においては多くのCYP3A分子種とP-gpの発現の低下が認められており、UCモデルマウスの肝臓においてPXRの核内移行量が上昇したという報告もあることから、²⁶⁾ PXRの発現量が変わらず核内移行量が上昇する可能性が考えられた。消化管においてはUC患者においても、UCモデルマウスにおいても、PXRの発現変動は認められないという報告があることから、^{14,27)} 潰瘍性大腸炎時のCYP3AおよびP-gpの発現変動はPXRの発現変動に依存しない系により制御されていると考えられ、PXRの核内移行量や他の核内受容体についてさらなる検討が必要である。

次に、P-gpの機能変動についてP-gpの特異的阻害剤であるVerapamilを用いて検討した。空腸および結腸では排泄方向のベクトル輸送がcontrol群に比較しDSS群で低下し、Verapamil添加によるRho123の透過係数から評価したP-gp機能も減弱した。一方、回腸ではP-gpの機能は空腸および結腸に比較して残存していると考えられ、これはmRNAの結果と同様であり、小腸間においても空腸と回腸での部位差が存在すると考えられた。膜抵抗値の変動はいずれの部位において有意に低下が認められ、TJ機能の低下を介した細胞間隙ルートの開口が考えられた。Rho123は脂溶性かつ塩基性でありP-gpの基質となるが、カチオン性であることからカルボニル基が表面に出ている細胞間隙ルートも通過することが知られている。²⁸⁾ そのため、Rho123の膜透過係数はcontrol群に比較しDSS群において全体的に上昇が認められた。

空腸と回腸にみられる部位差に関して考察してみると、大腸粘膜の透過性亢進により腸内細菌や細菌の内毒素などが血中に流入し、肝臓で炎症を起こすという報告や、^{5,21)} UC患者において胆汁の組成変動が起こるといった報告があることから、²⁹⁾ 大腸から肝臓および胆管を経由し、二次的に空腸の障害を引き起こすのではないかと推察した。また、潰瘍性大腸炎では胆汁うっ滞を引き起こす原発性硬化性胆管炎などの合併症が知られている。胆汁うっ滞により肝臓のP-gpの発現上昇およびCYPsの発現低下が起こることや、³⁰⁾ 小腸の透過性の亢進が引き起こされるという報告もあることから、³¹⁾ 胆汁うっ滞によって肝臓および小腸の双方に影響が及ぶことも考えられた。胆汁うっ滞が起こると、小腸へ流入する胆汁量が低下すると胆汁酸をリガンドとする核内受容体であるfarnesoid

X receptor (FXR) の活性化が抑制され、FXR の標的遺伝子である P-gp や CYP の発現が低下する可能性が考えられた。しかしながら、本研究では消化管において P-gp と CYP が同じ発現変動を示さないことから、P-gp と CYP では異なるメカニズムにより発現変動が起こっている可能性が推測された。

Rho123 静注後の血中濃度推移から薬物動態学的パラメータを算出したところ、DSS 群において β 相の低下に伴う全身クリアランスの低下が認められた。一方、経口投与の検討において k_a の上昇による C_{max} の増大が示された。さらに、 C_{max}/D で比較すると有意な上昇として示されたことから、消化管吸収過程において DSS 群で変動があると考えられた。また、Rho123 は P-gp の基質である一方、細胞間隙ルートを通過する性質もあり、in vivo の結果は P-gp および TJ の双方の機能低下により血中濃度が上昇したと推察された。さらに、経口投与の検討においても CL/F および k_{el} の有意な低下から、クリアランス臓器の機能低下による血中濃度の消失遅延が示された。UC は大腸で炎症が生じる疾患であるが、小腸のバリア機能低下による吸収増大およびクリアランス臓器の機能低下による血中濃度の上昇が認められ、副作用発現につながる可能性が考えられた。

消化管上皮細胞は外界とのバリアであり、体内への薬物異物の流入のバリアとして働く。本研究では CYP3A、P-gp および TJ の3つのバリア機構に着目し、バリアの変動と部位差を明らかにした。潰瘍性大腸炎患者においては、大腸のバリア機能の低下だけではなく、小腸や肝臓といった経口投与後の初回通過効果に寄与する組織臓器のバリア機能および薬物代謝活性の低下も考慮し薬物療法を行っていく必要がある。今後、バリア機能低下のメカニズムや部位差を明らかにすることで、疾患や合併症のメカニズムの解明や新たな治療法につながることを期待される。

謝辞 HE 染色において形態学的組織学的見地からのご指導を賜りました。東北医科薬科大学医学部病理学教室中村保宏教授に衷心より感謝申し上げます。また、標本作製に関して多大なるご協力をいただきました組織・病理標本センター伊勢和恵氏に心より感謝の意を表します。

利益相反

著者全てにおいて、開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Gajendran M, Loganathan P, Jimenez G, et al., *Disease-a-Month* (2019).
- 2) Azimi T, Nasiri MJ, Chirani AS, Pouriran R, Dabiri H., *Apmis*, **126**, 275–283 (2018).
- 3) Martini E, Krug SM, Siegmund B, Neurath MF, Becker C., *Cmgh*, **4**, 33–46 (2017).
- 4) Johansson ME V, Gustafsson JK, Holmen-Larsson J, et al., *Gut*, **63**, 281–291 (2014).
- 5) Woo JK, Choi S, Kang JH, et al., *BMC Complement. Altern. Med.*, **16**, 1–9 (2016).
- 6) Tanaka H, Takechi M, Kiyonari H, Shioi G, Tamura A, Tsukita S., *Gut*, **64**, 1529–1538 (2015).
- 7) Chakravarti KR, Sehgal AK, Chakravarti RN, Chnuttani PN., *Am. J. Dig. Dis.*, **18**, 191–198 (1973).
- 8) Chang J, Leong RW, Wasinger VC, Ip M, Yang M, Phan TG., *Gastroenterology*, **153**, 723–731 (2017).
- 9) Wachter VJ, Salphati L, Benet LZ., *Drug Deliv. Rev.*, **46**, 89–102 (2001).
- 10) Pal, D. & Mitra, A. K., *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **1**, 323–339 (2006).
- 11) Thörn M, Finnström N, Lundgren S, Rane A, Lööf L., *J. Clin. Pharmacol.*, **60**, 54–60 (2005).
- 12) Plewka D, Plewka A, Szczepanik T, et al., *Pathol. Res. Pract.*, **210**, 242–249 (2014).
- 13) Gutmann H, Hruz P, Zimmermann C, et al., *Digestion*, **78**, 154–162 (2008).
- 14) Kawachi S, Nakamura T, Miki I, et al., *J. Pharmacol. Sci.*, **124**, 180–191 (2014).
- 15) Iizasa H, Genda N, Kitano T, et al., *J. Pharm. Sci.*, **92**, 569–576 (2003).
- 16) Das P, Goswami P, Das TK, et al., *Virchows Arch.*, **460**, 261–270 (2012).
- 17) Oshima, T., Miwa, H. & Joh, T., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **23**, 3–7 (2008).
- 18) GünzelDorothee, Yu ASL., *Physiological Reviews*, **93**, (2013).
- 19) Matsubara T, Kim HJ, Miyata M, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 1282–1290 (2004).
- 20) Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M. & Vijay-

- Kumar, M., *Curr. Protoc. Immunol.*, **104**, Unit 15.25. (2014).
- 21) Kusunoki Y, Ikarashi N, Matsuda S, et al., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **30**, 1618–1626 (2015).
- 22) Huang Y, Hu N, Gao X, et al., *Chem. Biol. Interact.*, **232**, 38–48 (2015).
- 23) Hu N, Huang Y, Gao X, et al., *Chem. Biol. Interact.*, **271**, 48–58 (2017).
- 24) Cao X, Gibbs ST, Fang L, et al., *Pharm. Res.*, **23**, 1675–1686 (2006).
- 25) Christians U, Schmitz V, Haschke M., *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **1**, 641–654 (2005).
- 26) Kusunoki Y, Ikarashi N, Hayakawa Y, et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **54**, 17–27 (2014).
- 27) Blokzijl H, Vander Borghet S, Bok LIH, et al., *Inflamm. Bowel Dis.*, **13**, 710–720 (2007).
- 28) Troutman MD, Thakker DR., *Pharm. Res.*, **20**, 1200–1209 (2003).
- 29) Tiratterra E, Franco P, Porru E, Katsanos KH, Christodoulou DK, Roda G., *Ann. Gastroenterol.*, **31**, 266–272 (2018).
- 30) Kawase A, Kazaoka A, Yamamoto R, Minakata R, Shimada H, Iwaki M., *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **22**, 457–465 (2019).
- 31) Verbeke L, Farre R, Verbinnen B, et al., *Am. J. Pathol.*, **185**, 409–419 (2015).