

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460195

研究課題名(和文)炎症性腸疾患時のタクロリムスの薬物体内動態と薬効制御におけるマイクロRNAの役割

研究課題名(英文) Role of microRNA on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in inflammatory bowel disease

研究代表者

池村 健治 (IKEMURA, Kenji)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70513935

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)：DSS誘発潰瘍性大腸炎モデルラットにおいて、免疫抑制薬であるタクロリムスの経口吸収が増加することが明らかとなり、その機構の一部に小腸粘膜のP-糖タンパク質発現量の減少が関与する可能性が示唆された。さらに、潰瘍性大腸炎モデルラットの小腸においてマイクロRNAの発現変動が認められた。miRNAは小腸上皮細胞に発現する薬物動態制御タンパク質の発現・機能を制御することから、タクロリムスの体内動態変動の個体内・個体間変動の要因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our study demonstrates that oral absorption of tacrolimus (an immunosuppressant) was increased in dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis rats, and this is attributable to decreased intestinal P-glycoprotein. In addition, the altered expression of miRNAs in the small intestine were observed in DSS-induced ulcerative colitis rats. MiRNAs regulate the expression and function of proteins regulating pharmacokinetics in intestinal epithelial cells. Therefore, miRNAs could be significant factors affecting inter- and intra-individual variations in the pharmacokinetics of tacrolimus.

研究分野：医療薬学

キーワード：マイクロRNA 潰瘍性大腸炎 P-糖タンパク質 タクロリムス

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は、原因不明の難治性疾患であり、患者数は増加の一途を辿っている。治療薬のタクロリムス(TAC)は、体内動態の個人差が大きく、その要因には薬物代謝酵素 CYP3A、薬物排泄トランスポータ P-糖タンパク質(P-gp)の発現量が関与することが報告されている。これらの発現量は遺伝子多型では説明できない要因が存在し、個人差の予測を困難にしている。近年、薬物動態関連遺伝子の発現制御におけるマイクロ RNA(miRNA)の重要性が注目されているが、炎症性腸疾患時の CYP3A 及び P-gp の発現変動と miRNA 発現変動を結びつけた研究は未だ報告がなく、miRNA の薬物体内動態や薬効発現への寄与も不明である。

2. 研究の目的

炎症性腸疾患時の TAC の体内動態変動と薬物体内動態変動における miRNA の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)潰瘍性大腸炎モデルラットを用いた *in vivo* 体内動態実験

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 群及び Sham 群に TAC を経口投与した後、経時的に採血を行い、全血中 TAC 濃度は、LC-TOFMS により測定した。

(2)小腸及び大腸における CYP3A 活性及び P-gp 発現量の評価

採血終了後に小腸、大腸及び肝臓を摘出し、P-gp 及び CYP3A mRNA 発現量は RT-PCR 法により測定した。また、各臓器の粗膜画分に発現する P-gp 発現量は Western blot 法により、ミクロソーム中 CYP3A 活性は、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。

(3)潰瘍性大腸炎モデルラットの小腸における miRNA 発現変動の網羅的解析

DSS ラットの small intestine における miRNA 発現変動を microarray 法により解析し、2倍以上の発現変動が認められた miRNA を抽出した。

(4)Mdr1a 3' 非翻訳領域(3'-UTR)に対する miRNA の予想結合部位の探索

Microarray 解析により特定した miRNA の中から、*in silico* 法により Mdr1a mRNA の 3'-UTR を標的とする miRNA 候補を抽出した。

(5)培養細胞を用いた miRNA による P-gp の発現調節機構に関する検討

miRNA 阻害剤及び miRNA 前駆体を培養ヒト腸上皮細胞 Caco-2 細胞に導入後、P-gp のタンパク質発現量及び mRNA 発現量を Western Blot 法及び RT-PCR 法により評価した。

4. 研究成果

(1)潰瘍性大腸炎モデルラットにおける TAC の体内動態解析

DSS ラットに TAC を経口投与したところ、Sham 群に比べ、血中濃度は有意に高く(図1)、血中濃度から算出した、血中濃度-時間曲線下面積及び最高血中濃度はそれぞれ約 2.7 倍、約 2.4 倍に有意に増加し、経口クリアランスは約 40%まで減少していた。一方で、消失速度定数に 2 群間で有意な差は認められなかった。

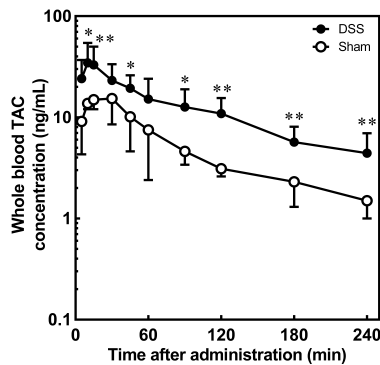


図1 DSS ラットと Sham ラットにおける TAC 経口投与後の血中濃度推移

平均値 ± 標準偏差 (n=5),
*: p<0.05, **: p<0.01

(2) DSS ラットと Sham ラットの small intestine 及び大腸における CYP3A 活性及び CYP3A mRNA 発現量の比較

DSS ラットと Sham ラットの small intestine、大腸及び肝臓における CYP3A 活性(図2)及び mRNA 発現量について比較を行ったところ、全ての部位において DSS 投与による影響は認められなかった。

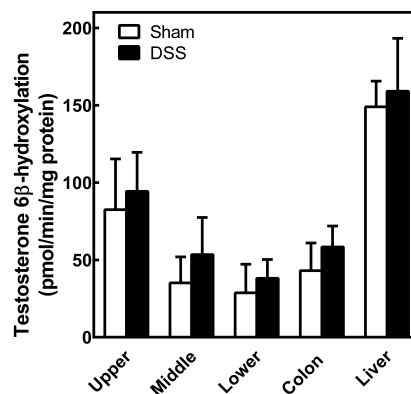


図2 DSS ラットと Sham ラットにおける small intestine 及び大腸における CYP3A 活性

平均値 ± 標準偏差 (n=5)

(3) DSS ラットと Sham ラットの small intestine 及び大腸における P-gp 及び Mdr1a mRNA 発現量の比較

DSS ラットと Sham ラットの small intestine 及び大腸における P-gp 発現量(図3)及び Mdr1a mRNA 発

現量について比較を行ったところ、Sham ラットに比べ、DSS ラットの P-gp 発現量及び Mdr1a mRNA 発現量はすべての部位において、顕著な低下が認められた。

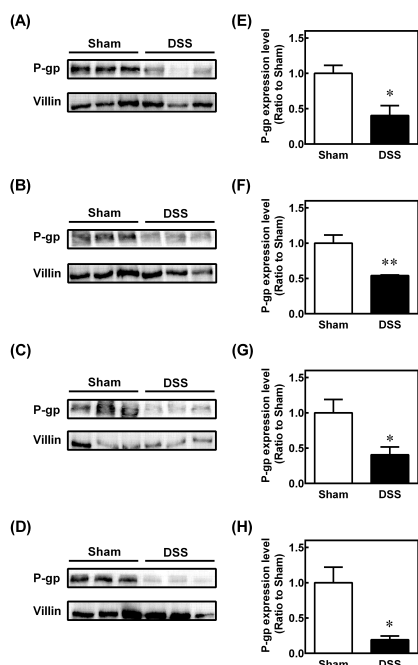


図3 DSS ラットと Sham ラットの小腸及び大腸の P-gp 発現量の比較

(A), (E): 小腸上部、(B), (F): 小腸中部、(C), (G): 小腸下部、(D), (H): 大腸、平均値 ± 標準偏差 (n=5), *: p<0.05, **: p<0.01

(4) DSS ラットと Sham ラットの小腸及び大腸における核内受容体の mRNA 発現量の比較

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 ラットにおける P-gp の発現低下に対する PXR 及び VDR の役割について検討を行った。その結果、DSS ラット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。

以上の結果より、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルラットにおいて、TAC の経口吸収が増加することが明らかとなり、その機構の一部に小腸粘膜の P-gp 発現量の減少が関与する可能性が示唆された。さらに、DSS ラットにおける小腸 P-gp 発現量低下には核内受容体である 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示唆された。

(5) DSS ラットの腸における miRNA 発現変動の網羅的解析及び *in silico* 解析

DSS ラットの腸における miRNA 発現変動を microarray 法で解析した結果、Sham 群に比べ、56 種類の miRNA 発現量が顕著に減少し、11 種類の miRNA 発現量が顕著に増加していた。さらに、これらの 67 種類の中から標的予想プログラムを用い Mdr1a mRNA の 3' -UTR を

標的とする miRNA 候補を抽出した結果、発現上昇が認められた miR-494 のみが Mdr1a mRNA の 3' -UTR に相補的配列を有していた。

(6) Caco-2 細胞を用いた P-gp の発現調節に及ぼす miR-494 の役割に関する検討

miR-494 の miRNA 阻害剤及び miRNA 前駆体を Caco-2 細胞にトランスフェクション後、P-gp のタンパク質発現量及び mRNA 発現量を Western Blot 法及び RT-PCR 法により評価したが、miRNA 阻害剤及び miRNA 前駆体による有意な変化は認められなかった。

以上の結果より、DSS ラットにおける小腸 P-gp 発現量低下には miR-494 を介した発現調節の寄与は少なく、他の間接的制御が関与する可能性が示唆された。本研究成果は、潰瘍性大腸炎における TAC の臨床使用に有用な情報を提供するものと考えられる。今後、miRNA 発現変動と小腸 P-gp 発現変動についてさらなる検討を進め、miRNA を指標とした個別化薬物療法の実現に向けたエビデンス構築が期待される。

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7件)

Ikemura K, Oshima K, Enokiya T, Okamoto A, Oda H, Mizuno T, Ishinaga H, Muraki Y, Iwamoto T, Takeuchi K, Katayama N, Okuda M. Co-administration of proton pump inhibitors ameliorates nephrotoxicity in patients receiving chemotherapy with cisplatin and fluorouracil: a retrospective cohort study. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読有, 2017, 掲載確定, DOI:10.1007/s00280-017-3296-7

Ikemura K, Hamada Y, Kaya C, Enokiya T, Muraki Y, Nakahara H, Fujimoto H, Kobayashi T, Iwamoto T, Okuda M. Lansoprazole exacerbates pemetrexed-mediated hematologic toxicity by competitive inhibition of renal basolateral human organic anion transporter 3. *Drug Metab Dispos*. 査読有, 44(10):1543-1549. 2016, DOI:10.1124/dmd.116.070722

池村健治, 薬物体内動態変動要因の分子生物学的解析による個別化薬物療法に向けた科学的基盤構築に関する研究, 薬学雑誌, 査読有, 135(9):1037-1041. 2015, DOI:10.1248/yakushi.15-00169.

[学会発表](計18件)

Ikemura K, Hamada Y, Kaya C, Enokiya T,

Muraki Y, Nakahara H, Fujimoto H, Kobayashi T, Iwamoto T, Okuda M., Lansoprazole exacerbates pemetrexed-mediated hematological toxicity by competitive inhibition of renal basolateral human organic anion transporter 3. 2016 AAPS ANNUAL MEETING AND EXPOSITION, 2016年11月13日～17日, Denver (U.S.A)

榎屋友幸、池村健治、濱田裕悟、村木優一、岩本卓也、西川晃平、杉村芳樹、奥田真弘、腎移植術後早期のタクロリムス血中濃度の一過性上昇とCYP3A5遺伝子多型との関連、第33回日本TDM学会学術大会、2016年5月28日～29日、栃木県総合文化センター（栃木県宇都宮市）

柳田航平、池村健治、川寄達也、岩本卓也、鍋倉智裕、奥田真弘、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、日本薬学会第135年会、2015年3月26～28日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

池村健治、岩本卓也、奥田真弘、腸管薬物トランスポータの発現調節機構にmicroRNAの役割、第9回トランスポーター研究会、2014年6月14～15日、名古屋市立大学薬学部（愛知県名古屋市）

池村健治、薬物体内動態変動要因の分子生物学的解析による個別化薬物療法に向けた科学的基盤構築に関する研究、第60回日本薬学会東海支部総会大会、2014年7月5日、鈴鹿医療科学大学薬学部（三重県鈴鹿市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池村 健治 (IKEMURA, Kenji)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70513935

(2) 研究分担者

奥田 真弘 (OKUDA, Masahiro)
三重大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：70252426

岩本 卓也 (IWAMOTO, Takuya)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30447867

荒木 俊光 (ARAKI, Toshimitsu)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70343217

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者
該当なし