19S2-10 アミノ酸による粘膜保護作用の機構解析：吸収促進剤による粘膜傷害性の改善

○花田聖徳、角辻賢太、遠藤洋子、大河原賢一、檜垣和孝、木村聰城郎
岡山大学 薬学部

ELUCIDATION OF MECHANISMS BEHIND CYTOPROTECTIVE EFFECTS OF AMINO ACIDS: IMPROVEMENT OF MUCOSAL INJURY CAUSED BY ABSORPTION ENHANCER

K. Hanada, K. Kadotsuji, Y. Endo, K. Ogawara, K. Higaki and T. Kimura
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University

【目的】近年、combinatorial chemistry, HTS などの技術の導入により、優れた薬理活性を有する新薬開発候補化合物が数多く見出されるようになってきた。しかし、これらの中には難水溶性、難吸収性を示すものが少なくなく、経口製剤化を困難にしている。脂質系の吸収促進剤の利用は、薬物の溶解性と膜透過性を共に改善し得る有用な手段のひとつであるが、それに伴う粘膜への傷害性のため、実用化が困難となっている。

我々のこれまでの検討により、中鎖脂肪酸塩ラウリン酸ナトリウム (C12) は、ラット結腸において、分子量が異なる種々の難吸収性薬物の吸収を改善すること、しかし、同時に膜傷害の指標とされる消化管粘膜からのリン脂質やタンパク質、LDH などの生体成分の漏出を亢進していることを確認した。一方、L-glutamine や taurine などのアミノ酸を C12 と併用投与することにより、C12 の吸収促進効果を維持したまま、消化管粘膜への傷害性を軽減できることを明らかにした¹⁾。この結果は、安全性の高い有効な吸収促進剤の開発の可能性を示すものと考えられる。本研究では C12 の吸収促進効果とアミノ酸が粘膜傷害を軽減する作用機構に焦点を当てて、種々の検討を行った。

【実験方法】1) C12 による吸収促進効果と粘膜傷害性の評価：Wistar 系雄性ラットによる in situ closed loop 法 (結腸部 10 cm)、及び Caco-2 細胞を用いて、C12 及び各種アミノ酸の薬物吸収への影響をフェノールレッド (PR) の吸収を指標として、また、膜傷害性への影響をリン脂質、タンパク質、LDH の漏出²⁾を指標として評価した。

2) Transepithelial Electrical Resistance (TEER) の測定：結腸粘膜あるいは Caco-2 細胞を培養した Snapwell を拡散チャンバーに装着し、電気生理学的手法により TEER を測定した。

3) 細胞内 Heat shock protein70 (HSP70) の発現に対する C12 及びアミノ酸の影響：細胞内 HSP70 の発現は、ラット結腸粘膜、及び Caco-2 細胞において、吸収実験あるいは、膜透過実験終了後の細胞について、Western Blot 法により評価した。

4) 細胞内 Ca^{2+} 濃度に対する C12 及びアミノ酸の影響：細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は Caco-2 細胞に Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fluo-3/AM を取り込ませた後、C12 やアミノ酸を含んだ薬液を滴下し、共焦点レーザー顕微鏡を使用して蛍光強度を測定することにより評価した。

5) ヒスタミン遊離に対する C12 及びアミノ酸の影響：Wistar 系雄性ラットの結腸部分を拡散チャンバーに装着し、C12 などを含む薬液を粘膜側に添加して、一定時間後の粘膜側、漿膜側へのヒスタミン遊離量をそれぞれ測定した³⁾。

【結果・考察】C12 はラット結腸及び Caco-2 細胞において有意な PR の透過性の亢進と顕著な粘膜構成成分の漏出 (Fig.1)、及び経時的な TEER の減少を引き起こした。しかし、C12 と各種アミノ酸を併用投与することで PR の透過性に影響を与えることなく、粘膜傷害性と TEER の減少が抑制されることが明らかとなった¹⁾。

これらアミノ酸による粘膜保護作用の機構を解

Fig.1 Effect of Amino Acids on Absorption Enhancement and Local Toxicity Induced by Sodium Laurate in Rat Large Intestine

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of four experiments.

* $p < 0.05$; compared with 10 mM C12 alone.

明するために、我々はまず HSP70 に着目して検討を行った。HSP70 は細胞内で合成され、熱刺激やある種の化学物質の暴露により発現誘導され、細胞保護作用を示すことが知られている⁴⁾。そこで我々は C12 及び各種アミノ酸適用時の HSP70 の発現量を Western Blot 法により検討した。その結果、C12 により若干の誘導が認められたが、C12 と L-glutamine 併用投与時のみに顕著な HSP70 の誘導が起こっていることが明らかとなった。そこで、HSP70 合成阻害剤の quercetin を同時投与することで各種アミノ酸による粘膜保護作用への HSP70 の関与を検討したところ、L-glutamine の場合のみ、その粘膜傷害抑制効果が消失した。これらの結果は L-glutamine が細胞内 HSP70 を誘導することで粘膜傷害を軽減していることを強く示唆するものであった。

一方、上記の結果は、L-glutamine 以外のアミノ酸の粘膜保護効果には、HSP70 は直接関与していないことを同時に示すものであった。そこで我々は、細胞内濃度の過度な上昇が細胞機能障害を引き起こすことが知られている細胞内 Ca^{2+} に着目した。C12 及び各種アミノ酸を併用投与した際の Caco-2 細胞内の Ca^{2+} 濃度変化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討したところ、C12 単独適用時には細胞内 Ca^{2+} 濃度が急激に上昇したのに対し、各種アミノ酸併用投与時には、いずれのアミノ酸においても細胞内 Ca^{2+} は低いレベルに維持されることが明らかとなった (Fig.2)。このことより、各種アミノ酸は C12 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制することで、粘膜保護作用を示す可能性が考えられた。

Fig. 2 Effect of Sodium Laurate and Amino Acids on Intracellular Ca^{2+} Level in Caco-2 Cells

また、C12 は消化管粘膜からのヒスタミンの放出を顕著に亢進することが明らかとなった。このことは、C12 を消化管内に投与することでヒスタミンなどの炎症性メディエーターが放出され、その結果、粘膜傷害が惹起するものと考えられた。この C12 により亢進したヒスタミンの遊離は、各種アミノ酸の併用投与により有意に抑制された。ヒスタミンがその貯蔵細胞から遊離されるためにはその細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が必須であることから、アミノ酸は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑えることで、貯蔵部位からのヒスタミンの遊離を低下させているものと考えられた。

このように、アミノ酸による粘膜保護作用には、様々な機構が関与していることが示唆されてきた。今後、さらに詳細な機構解析を行い、臨床応用可能な吸収促進剤の開発につなげていきたいと考えている。

[Abstract] To develop the absorption enhancing formulation with local toxicity low enough for the practical use, we have investigated the effect of amino acids on the local toxicity and the absorption enhancement caused by sodium laurate (C12), used as an absorption enhancer. As a result, the absorption of phenol red (PR), an unabsorbable marker, was enhanced significantly by applying 10 mM C12 and the addition of amino acids did not change this absorption-enhancing effect of C12 in *in situ* colon loop study. On the other hand, although C12 significantly increased the elution of phospholipids, proteins, and lactate dehydrogenase from colon, which are biological markers for local toxicity, amino acids significantly attenuated this mucosal injury caused by C12. In the present study, we tried to elucidate the mechanism involved in the protective effects of amino acids against mucosal injury caused by C12, and HSP70 was suggested to be involved in the cytoprotection by L-glutamine. Furthermore, the attenuation of intracellular Ca^{2+} level and of histamine release, which are enhanced by C12, were also suggested to be mechanisms behind the cytoprotective action of amino acids.

[References] 1) Yata T et al. J. Pharm. Sci. in press, 2001. 2) Swenson ES et al. Pharm. Res. 11:1132-1142, 1994. 3) May CD et al. J. Allergy. 46: 12-20, 1970. 4) Sanders MM et al. J. Cell. Physiol. 146: 180-190, 1991.