

氏名（本籍）	五十嵐信智	（千葉県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙第199号	
学位授与年月日	平成24年9月26日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	浸透圧性下剤硫酸マグネシウムおよび大腸刺激性下剤ピサコジルの瀉下作用における大腸アクアポリン3の役割	
論文審査委員	主査	教授 杉山 清
	副査	教授 鈴木 勉
	副査	教授 高山 幸三

## 論文内容の要旨

近年、食物繊維や水分の摂取不足、瀉下剤の乱用、運動不足、高齢化に伴う腸管機能の低下などにより、便秘症が問題となっている。また、緩和医療に用いられるモルヒネなどのオピオイドの副作用による便秘症も、患者の QOL の観点から重要な課題となっている。

一方、臨床において重度な便秘症患者には、第一選択薬として浸透圧性下剤（ $\text{MgSO}_4$  や  $\text{MgO}$ ）が処方され、効果が認められない場合には大腸刺激性下剤（ピサコジルやセンノシド）など作用機序が異なる瀉下剤が併用される。

浸透圧性下剤は消化管ではほとんど吸収されず、腸管内の浸透圧を上昇させることにより、生理的条件下とは逆に水を血管側から管腔側へと移動させるため、下痢が発生すると考えられている。一方、大腸刺激性下剤は、腸管上皮細胞の  $\text{PGE}_2$  の産生を促進し、 $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  の活性を阻害することにより腸管内浸透圧を高め、腸管側から血管側への水の吸収を減弱させるため、瀉下作用を発現すると考えられている。また、大腸刺激性下剤は腸管の蠕動運動を促進することも、瀉下作用のメカニズムの一つと考えられている。しかしながら、これら瀉下剤が大腸において、どのようなメカニズムで水を移動させるかについての詳細は全く不明であった。しかも、複数の瀉下剤が併用されているのにもかかわらず、併用効果に関するエビデンスはほとんどなかった。

一方、大腸の上皮細胞は **tight junction** が強固なため、大腸での水の輸送は大腸粘膜上皮細胞に優位に発現している水チャネルであるアクアポリン 3

(AQP3) を介して行われると考えられている。しかしながら、大腸における AQP3 を介した水の輸送については、ほとんど解明されていなかった。

そこで本研究では、AQP3 に着目し、浸透圧性下剤および大腸刺激性下剤の瀉下作用における AQP3 の役割を明確にするとともに、両薬剤の併用効果を解明することにより、瀉下剤を適正に使用するためのエビデンスを提供することを試みた。本研究では、浸透圧性下剤として  $MgSO_4$  を、大腸刺激性下剤としてピサコジルを用い、以下の検討を行った。

1. ラットに  $MgSO_4$  を経口投与した際の糞中水分量と大腸 AQP3 の発現変動の関係を解析するとともに、AQP3 の発現変動メカニズムを検討した。
2. ラットにピサコジルを経口投与した際の糞中水分量と大腸 AQP3 の発現変動の関係を解析するとともに、AQP3 の発現変動メカニズムを検討した。
3. AQP3 活性化阻害剤である  $HgCl_2$  および  $CuSO_4$  を用いて、大腸での水の輸送における AQP3 の役割について検討した。
4.  $MgSO_4$  とピサコジルとを併用した場合に、瀉下作用がどのように変化するかについて調べるとともに、そのメカニズムについて検討した。

#### 1. $MgSO_4$ の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割および AQP3 発現変動メカニズムの解明

浸透圧性下剤  $MgSO_4$  の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割について検討した。まず、ラットに  $MgSO_4$  を経口投与し、糞中水分量の変動と大腸内浸透圧あるいは AQP3 発現量の変動との関係について検討した。その結果、糞中水分量は  $MgSO_4$  投与により、2 時間目以降有意に増加し、投与 4 時間後から 8 時間後にかけて重度の下痢が発生することがわかった。それに対して、大腸内浸透圧は 2 時間後にはピークに達し、浸透圧の変動パターンと下痢発生のパターンが異なることが明らかとなった。このことより、 $MgSO_4$  による瀉下作用は、従来から考えられている腸管内浸透圧の上昇のみでは説明できないことが明らかとなった。一方、大腸 AQP3 のタンパク質発現量は  $MgSO_4$  投与により経時的に増加し、この変化と下痢発生の経時変化が符合することがわかった。以上の結果から、 $MgSO_4$  の瀉下作用が単に浸透圧の変化のみによってもたらされるものではなく、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現増加を伴って、極めて合理的に生じている可能性が示唆された。

次に、 $\text{MgSO}_4$ による大腸 AQP3 の発現増加メカニズムをヒト結腸癌由来 HT-29 細胞を用いて調べた。 $\text{MgSO}_4$ は水溶液中で  $\text{Mg}^{2+}$ と  $\text{SO}_4^{2-}$ に解離し、浸透圧を上昇させる。一方、AQP3 は浸透圧の上昇に伴い、発現量が増加する。そこで、 $\text{MgSO}_4$ による AQP3 の発現増加が浸透圧の上昇に起因するものであるか否かを検討した。その結果、 $\text{MgSO}_4$ による AQP3 の発現増加は、浸透圧の上昇に起因したものではないことが明らかとなった。

続いて、 $\text{MgSO}_4$ による AQP3 の発現増加作用が  $\text{Mg}^{2+}$ あるいは  $\text{SO}_4^{2-}$ に起因するものであるか否かについて、種々のマグネシウム塩および硫酸塩を用いて検討した。その結果、 $\text{MgSO}_4$ による AQP3 の発現増加には  $\text{SO}_4^{2-}$ は関与せず、 $\text{Mg}^{2+}$ のみが重要な役割を担っていることが明らかとなった。

細胞内に取り込まれた Mg は、アデニル酸シクラーゼ (AC) を活性化することが知られている。さらに、AC の活性化は cAMP を増加させ、PKA の活性化を介して核内転写因子 cAMP-response element-binding protein (CREB) をリン酸化することが知られている。リン酸化された CREB は、AQPs の転写を促進し、発現量を増加させる。そこで、 $\text{MgSO}_4$ による AQP3 発現増加メカニズムについて、この経路に焦点を絞り検討した。その結果、 $\text{MgSO}_4$ は細胞内 Mg 濃度を増加させること、AC および PKA を活性化すること、および CREB のリン酸化を亢進することが明らかとなった。

以上の結果から、 $\text{MgSO}_4$ は細胞内 Mg 濃度を増加させることにより、AC 活性、PKA 活性および CREB のリン酸化を亢進させ、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 を増加させることが明らかとなった。

## 2. ビサコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割および AQP3 発現変動メカニズムの解明

ビスコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割を検討した。ラットにビスコジルを経口投与したところ、大腸の AQP3 のタンパク質発現量が投与 2 時間後から著明に低下した。また、AQP3 の発現低下と下痢発生の経時変化が相関していた。以上の結果から、ビスコジルは大腸の AQP3 の発現量を低下させることにより、腸管側から血管側への水の移動を抑制し、瀉下作用を示している可能性が示唆された。

次に、ビスコジルがどのようなメカニズムで AQP3 の発現量を低下させるかについて検討した。まず、ビスコジルが直接、大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現量を低下させた可能性について HT-29 細胞を用いて調べた。その

結果、ビスコジルが直接 AQP3 の発現量を低下させている可能性は低いことが明らかとなった。

続いて、ビスコジルが間接的に大腸の AQP3 の発現量を低下させた可能性について検討した。ビスコジルは大腸マクロファージを活性化すること、マクロファージが活性化すると炎症性サイトカインの分泌が亢進し、COX2 の発現増加を介して PGE<sub>2</sub> が分泌されること、および TNF- $\alpha$  や PGE<sub>2</sub> は AQP3 の発現量を低下させることが知られている。そこで、ビスコジルが直接マクロファージを活性化し、TNF- $\alpha$  や PGE<sub>2</sub> を分泌させるか否かをマクロファージ Raw264.7 細胞を用いて検討した。その結果、ビスコジルはマクロファージを直接活性化し、TNF- $\alpha$  および PGE<sub>2</sub> の産生および分泌を亢進することがわかった。さらに、PGE<sub>2</sub> が HT-29 細胞の AQP3 の発現を著明かつ速やかに低下させることが明らかとなった。

以上の結果から、ビスコジルは直接、大腸のマクロファージを活性化させることにより PGE<sub>2</sub> の産生および分泌を亢進すること、およびこのマクロファージの産生する PGE<sub>2</sub> がパラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現を低下させていることが明らかとなった。

### 3. AQP3 活性化阻害剤の大腸での水の輸送に及ぼす影響

上述したように、大腸の AQP3 の発現量の変動により水の輸送能が変動することが明らかとなったものの、AQP3 の発現量ではなく、AQP3 の機能を変化させた場合、大腸の水の輸送能にどのような影響を及ぼすかについては全く不明であった。そこで、AQP3 の機能を阻害した際に大腸における水の輸送能がどのように変化するかについて AQP3 活性化阻害剤である HgCl<sub>2</sub> および CuSO<sub>4</sub> を用いて検討した。HgCl<sub>2</sub> および CuSO<sub>4</sub> をラットに直腸内投与した結果、投与 1 時間以内に下痢が発生することがわかった。一方、これらは大腸内浸透圧および AQP3 の発現量に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

以上の結果から、大腸粘膜上皮細胞に局在する AQP3 の機能を阻害すると下痢が発生することが明らかとなった。また、生理的条件下では AQP3 を介して水は管腔側から血管側に輸送され、糞中水分量が調節されていることも確認できた。

#### 4. MgSO<sub>4</sub>とピサコジルとの併用効果およびそのメカニズムの解明

これまで、複数の瀉下剤を併用した場合、瀉下作用が増強するか否かについての明確なエビデンスはなかった。そこで、MgSO<sub>4</sub>およびピサコジルを併用した場合、瀉下作用が増強するか否かを検討した。その結果、MgSO<sub>4</sub>とピサコジルを併用しても糞中水分量の変動パターンおよび変化率には両薬剤の相加効果あるいは相乗効果は見られず、ピサコジル単独投与時のそれらとほぼ同様であることが明らかとなった。一方、併用投与した際の大腸内浸透圧はControl群に比べて高く、MgSO<sub>4</sub>単独投与時とほぼ同程度であることがわかった。また、併用投与時の大腸のAQP3のタンパク質発現量はControl群に比べて有意に低く、この低下率はピサコジル単独投与時とほぼ同程度であることが明らかとなった。

以上のことから、MgSO<sub>4</sub>とピサコジルを併用した際の瀉下作用はMgSO<sub>4</sub>単独時よりも減弱し、ピサコジル単独時の場合とほぼ同程度であることが明らかとなった。さらに、MgSO<sub>4</sub>とピサコジルを併用した場合の大腸粘膜上皮細胞のAQP3の発現パターンが、ピサコジル単独投与時とほぼ同様になることがその理由として考えられた。

本研究の結果から、浸透圧性下剤および大腸刺激性下剤の瀉下作用において、大腸のAQP3の発現量が重要な役割を担っていることが明らかとなった。加えて、大腸AQP3の機能を阻害すると、下痢が発生することも明らかとなった。AQP3はヒトの腸管において最も多く発現しているAQPである。今後、腸管AQP3の発現および機能と水の移動についてさらなる研究を展開することにより、AQPをターゲットとした新たな瀉下剤や止瀉剤の開発が可能になるものと考えられる。

さらに本研究により、瀉下剤の併用が必ずしも瀉下作用を増強しないことが初めて明らかとなった。薬物の服用数の増加は薬物間相互作用の増加につながるため、安易な併用は避けるべきである。今後、瀉下剤に関してもその治療効果に対するエビデンスを明確にし、適正使用を図ることが必要であると考える。

## 論文審査の結果の要旨

近年、食物繊維の摂取不足や高齢化に伴う腸管機能の低下などにより、便秘症が問題となっている。臨床において、重度な便秘症患者には、第一選択薬として浸透圧性下剤 ( $\text{MgSO}_4$  や  $\text{MgO}$ ) が処方され、効果が認められない場合には大腸刺激性下剤 (ピサコジルやセンノシド) など、作用機序が異なる瀉下剤が併用される。しかしながら、これまでに浸透圧性下剤や大腸刺激性下剤が大腸において、どのようなメカニズムで水を移動させるかについての詳細は全く不明であった。しかも、複数の瀉下剤が併用されているのにもかかわらず、併用効果に関するエビデンスはほとんどなかった。そこで本研究では、大腸での水の輸送に重要な役割を担っていると考えられているアクアポリン3 (AQP3) に着目し、これら瀉下剤の瀉下作用における AQP3 の役割を明確にするとともに、両薬剤の併用効果を解明することにより、瀉下剤を適正に使用するためのエビデンスを提供することを試みた。

まず、浸透圧性下剤  $\text{MgSO}_4$  の瀉下作用における大腸 AQP3 の役割について、ラットを用いて検討した。その結果、ラットの糞中水分量の増加パターンと大腸 AQP3 のタンパク質の発現パターンが符合していることがわかった。このことから、 $\text{MgSO}_4$  の瀉下作用が単に浸透圧の変化のみによってもたらされるものではなく、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現増加を伴って、極めて合理的に生じている可能性が示唆された。また、 $\text{MgSO}_4$  は細胞内 Mg 濃度を増加させることにより、アデニル酸シクラーゼの活性化、プロテインキナーゼ A の活性化および cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化の亢進を介して、大腸粘膜上皮細胞の AQP3 を増加させていることが明らかとなった。

次に、大腸刺激性下剤ピサコジルの瀉下作用における大腸 AQP3 の役割を検討した。その結果、ピサコジルは大腸の AQP3 の発現量を低下させることにより、腸管側から血管側への水の移動を抑制し、瀉下作用を示している可能性が示唆された。そこで、このことを確かめる目的で、AQP3 を介した水輸送を阻害することが知られている  $\text{HgCl}_2$  あるいは  $\text{CuSO}_4$  をラットに直腸内投与し、水の輸送に及ぼす影響を調べた。その結果、大腸内浸透圧および大腸 AQP3 の発現量を変化させることなく、投与1時間以内に下痢が発生することがわかった。これらのことから、大腸粘膜上皮細胞に局在する AQP3 の機能を阻害すると下痢が発生することが明らかとなり、ピサコジルによる AQP3

の減少が下痢発生のメカニズムであることが明らかとなった。また、ピサコジルは直接、大腸のマクロファージを活性化させることにより PGE<sub>2</sub> の産生および分泌を亢進すること、およびこのマクロファージの産生する PGE<sub>2</sub> が、パラクライン因子として大腸粘膜上皮細胞に作用し、AQP3 の発現を低下させていることが明らかとなった。

最後に、MgSO<sub>4</sub> およびピサコジルを併用した場合、瀉下作用が増強するか否かを検討した。その結果、MgSO<sub>4</sub> とピサコジルを併用した際の瀉下作用は、MgSO<sub>4</sub> 単独時よりも減弱し、ピサコジル単独時の場合とほぼ同程度であることが明らかとなった。さらに、MgSO<sub>4</sub> とピサコジルを併用した際には大腸粘膜上皮細胞の AQP3 の発現パターンが、ピサコジル単独投与時とほぼ同様になることがその理由として考えられた。

本研究の結果から、浸透圧性下剤および大腸刺激性下剤の瀉下作用において、大腸の AQP3 の発現量が重要な役割を担っていることが明らかとなった。今後、腸管 AQP3 の発現および機能と水の移動についてさらなる研究を展開することにより、AQPs をターゲットとした新たな瀉下剤や止瀉剤の開発が可能になるものと考ええる。さらに、本研究により、瀉下剤の併用が必ずしも瀉下作用を増強しないことが初めて明らかとなった。薬物の服用数の増加は、薬物間相互作用の増加につながるため、安易な併用は避けるべきである。今後、瀉下剤に関しても、その治療効果に対するエビデンスを明確にし、適正使用を図ることが必要であると考ええる。

以上のように、本論文内容は瀉下剤の研究を通して大腸の AQP3 の役割を明確にしたものであり、AQP 研究に対して資するところは大きい。加えて、瀉下剤の適正使用を実施する上でも、有益な基礎的情報を提供するものである。よって、博士（薬学）の学位に十分に値するものと考ええる。