

潰瘍性大腸炎発症時における 薬物代謝酵素 cytochrome P450 の発現変動と その変動メカニズムに関する研究

楠 欣 己

星薬科大学 薬動学教室

Analysis about changed of cytochrome P450 and those mechanism in ulcerative colitis

Yoshiki KUSUNOKI

Department of Clinical Pharmacokinetics, Hoshi University

はじめに

潰瘍性大腸炎は、腸管粘膜にびらんや潰瘍を呈する炎症性疾患であり、その罹患患者数は増加傾向にある¹⁾。潰瘍性大腸炎の発症要因は未だに不明であるが、免疫機能の異常を基礎として、ストレスや食生活、遺伝的要因などが複合的に関与して発症する自己免疫疾患であると考えられている²⁾。また、最近では、これらの要因に加え、潰瘍性大腸炎の病態形成に腸内細菌が関与していることも報告されている³⁾。このように潰瘍性大腸炎は、その発症要因の究明が活発に行われているものの、現在のところ、その全容解明には至っていない。

潰瘍性大腸炎は発症すると、活動期と寛解期を繰り返す難治性の疾患である。重度の下痢や血便、腹痛などが生じる活動期は、薬物療法を行うことによって見かけ上、症状が消失する。このような状態は、寛解期と呼ばれているが、寛解期に移行後も、種々の要因により急激な症状の悪化を引き起こし、約4割の患者で再び活動期に移行する⁴⁾。そのため、潰瘍性大腸炎患者では長期にわたって薬物治療を行う必要がある⁵⁾。

潰瘍性大腸炎の治療は対症療法が主であり、軽症時では5-アミノサリチル酸製剤が用いられ、症状が重症化するに従い、ステロイド剤などが使用される。また、最新の治療としては、メサラジンの drug delivery system (DDS) 製剤に加え、分子標的薬のインフリキシマブが積極的に用いられており、臨床実績をあげている^{6,7)}。そのため、現在、製薬企業では、分子標的薬を中心とした新薬開発が活発に行われている。その一方で、シクロスポリンやタクロリムスなどの免疫抑制剤は、潰瘍性大腸炎の中等症から重症時の治療薬として古くから用いられ続けており、一定の効果を示すことから、今日でも多くの患者の治療に選択されている。このように、

潰瘍性大腸炎時には様々な薬物が用いられ、症状の寛解を図っている (Table 1)。

Table 1. Therapeutic agents of ulcerative colitis

Category	Drug
5-aminosalicylic acid	mesalazine, salazosulfapyridine
steroid	prednisolone, budesonide
immunosuppressive drug	cyclosporine, tacrolimus, azathioprine
molecular target drug	infliximab, adalimumab
others	metronidazole, tranilast

このような中、最近、潰瘍性大腸炎患者において、服用した薬物の体内動態が変化し、有害事象を起こす報告が散見されている。例えば、1) 潰瘍性大腸炎患者がシクロスポリンを服用した場合、シクロスポリンの副作用(高血圧)発現率が高くなること⁸⁾、2) 潰瘍性大腸炎患者がシクロスポリンを服用した場合、血中シクロスポリン濃度が上昇すること⁹⁾、3) 潰瘍性大腸炎患者がメトロニダゾールを服用した場合、血中メトロニダゾール濃度が上昇すること¹⁰⁾、4) 潰瘍性大腸炎患者がステロイド剤を服用した場合、ステロイド剤の副作用であるサイトメガロウイルス感染症などの日和見感染症の発症リスクが上昇すること¹¹⁾などが報告されている。これらの報告は、潰瘍性大腸炎患者においては何らかの原因により、服用した薬物の血中濃度が上昇し、副作用の発症リスクが上昇している可能性を示している。このうち、シクロスポリン、メトロニダゾールおよびステロイド剤は、いずれも薬物代謝酵素 cytochrome P450 3A (CYP3A) により代謝される薬物である。

我々は、潰瘍性大腸炎患者では何らかの原因により CYP3A の発現量が低下し、CYP3A の基質であるシクロスポリン等の血中濃度が上昇したため、副作用の発現頻度が上昇したのではないかと考え、この仮説の立証を試みた。

1. 潰瘍性大腸炎モデルマウスの作製

本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いて、潰瘍性大腸炎モデルマウスを作製した¹²⁾。潰瘍性大腸炎患者の活動期では、体重の減少、血便、下痢、大腸の短縮が認められる。そこでまず、作製した潰瘍性大腸炎モデルマウスの症状を確認するために、体重、大腸の長さ、血中ヘモグロビン濃度および体重減少率、下痢の程度および血便の有無から算出した disease activity index (DAI) 値を経時的に測定した。

DSS 投与群の体重は、処置 4 日目から減少し始め、処置 10 日目では、Control 群と比較して約 30% 低下していた。一方、DSS の投与を中止すると体重は増加し、処置 50 日目には Control 群と同程度まで回復した (Figure 1A)。DSS 投与 10 日目における大腸の長さは約 5 cm であり、Control 群 (約 9 cm) に比べて有意に短縮していた。しかし、DSS 投与中止後は回復傾向を示した (Figure 1B)。DSS 投与群の血中ヘモグロビン濃度は、血便が最も重度となる 10 日目でのみ、Control 群に比べて有意に低かった (Figure 1C)。症状の重症度を示す DAI 値は、DSS の投与により著明に上昇

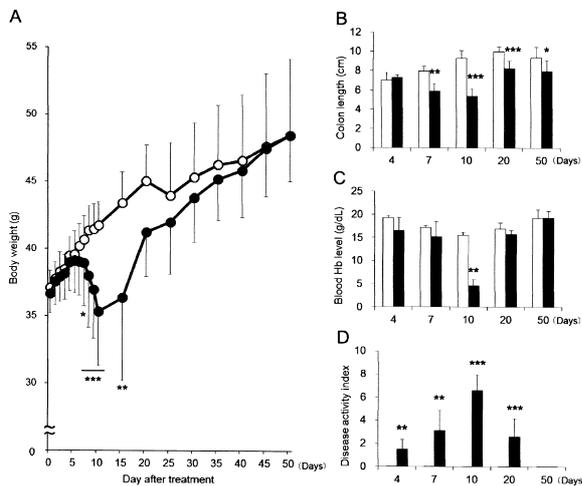


Figure 1. Body weight (A), colon length (B), blood Hb level (C), and disease activity index (D)

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days, and water without DSS for 40 days, ad libitum (DSS group, black). Control mice received water without DSS (white) for 50 days. The body weight (A), colon length (B), blood Hb level (C), and disease activity index (D) were measured. The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group. Student's *t*-test: **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001 vs. control group.

し、10 日目には最高値を示した。それに対して、DSS の投与を中止すると DAI 値は低下し、50 日目では Control 群とほぼ同程度であった (Figure 1D)。

潰瘍性大腸炎患者および DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスでは、大腸の肥厚や炎症性細胞の遊走・浸潤および炎症性サイトカインの上昇が見られる^{5,13,14)}。本モデルマウスの大腸の病変および炎症性サイトカインの発現量の経時変化を調べたところ、DSS の投与により大腸は肥厚し、10 日目では潰瘍が形成されていることが確認できた。また、DSS 投与群の大腸では、炎症性細胞の遊走および浸潤、杯細胞の消失、大腸腺管の異常などが認められた。一方、DSS 投与中止後は大腸の粘膜構造の回復が認められ、処置 50 日目では Control 群とほぼ同程度まで回復していた (Figure 2A)。大腸における炎症性サイトカイン interleukin (IL) -1、IL-6 および tumor necrosis factor (TNF) - α の mRNA 発現量は、DSS 投与開始後から著明に増加した。IL-1

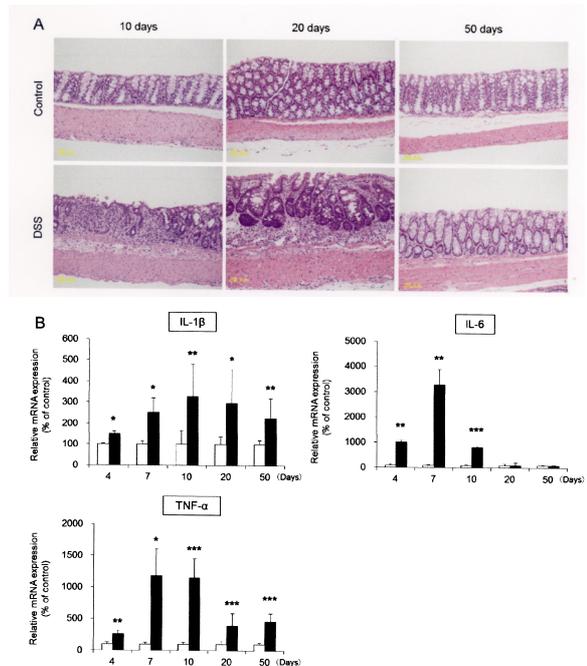


Figure 2. Histology of colon (A) and mRNA expression level of inflammatory cytokines in the colon (B)

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days, and water without DSS for 40 days, ad libitum (DSS group, black). Control mice received water without DSS (white) for 50 days.

A: The colon was fixed in 10% neutral-buffered formalin, paraffinized, and stained using hematoxylin-eosin stain.

B: The mRNA expression levels of inflammatory cytokines in the colon were measured by real-time RT-PCR. β -actin was used as a housekeeping gene, and the averages of the values derived from the control mice were expressed as 100%. The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group. Student's *t*-test: **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001 vs. control group.

は DSS 投与 10 日目、IL-6 および TNF- α は DSS 投与 7 日目において、それぞれ最高値を示した。この炎症性サイトカインの発現増加は、DSS の投与中止により減少した (Figure 2B)。

以上の結果から、本研究では、処置 10 日目のマウスを活動期、処置 50 日目を寛解期のモデルとした。

2. 潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける CYP3A の発現および活性の解析

2-1. 潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける肝臓 CYP3A の発現量の解析

ヒトの CYP3A は、肝臓に最も多く発現している CYP 分子種であり、現在使用されている薬物の 50% 以上の代謝に関与している¹⁵⁾。ヒト CYP3A に対応するマウス CYP3A の分子種としては、CYP3A11、CYP3A13、CYP3A16、CYP3A25、CYP3A41、CYP3A44 および CYP3A57 が同定されている¹⁶⁻¹⁸⁾。マウス CYP3A の基質に関しては不明な点が多いが、ヒトの肝臓に最も多く発現している CYP3A4 とマウスの CYP3A11 は基質特異性が類似していることが知られている^{19,20)}。そこで、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの肝臓における CYP3A11 の mRNA 発現量および CYP3A のタンパク質発現量を経時的に解析した。

DSS 投与群の肝臓における CYP3A11 の mRNA 発現量は、DSS の投与により低下し、大腸病変が最も重度であった投与 10 日目において最も低い値を示した。一方、寛解期に移ると CYP3A11 の発現量は増加し、50 日目では Control 群と同レベルまで回復していた (Figure 3A)。また、タンパク質レベルについても同様に、DSS 投与 10 日目で最低値を示し、50 日目には回復した (Figure 3B)。

2-2. 潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける肝臓 CYP3A 代謝活性の解析

DSS 投与 10 日目の肝臓において、CYP3A の代謝活性がどの程度変化しているかについて、CYP3A の特異的基質であるトリアゾラムを用いて調べた。具体的には、DSS 投与 10 日目のマウスから肝臓ミクロソーム画分を調製し、トリアゾラムと反応させた際の代謝物 (α -ヒドロキシトリアゾラムおよび 4-ヒドロキシトリアゾラム) の生成量を測定することにより、CYP3A の代謝活性を評価した。

その結果、潰瘍性大腸炎活動期には、CYP3A の代謝活性も著明に低下していることがわかった (Figure 4)。以上のことから、潰瘍性大腸炎の活動期には肝臓の CYP3A の発現量が低下し、これに伴って代謝活性が減少した可能性が示唆された。なお、CYP3A の代謝活性の低下の原因としては、CYP3A の量的な減少ば

りなく質的な変化も考えられる。しかし、この点については、詳細な検討を行っていない。

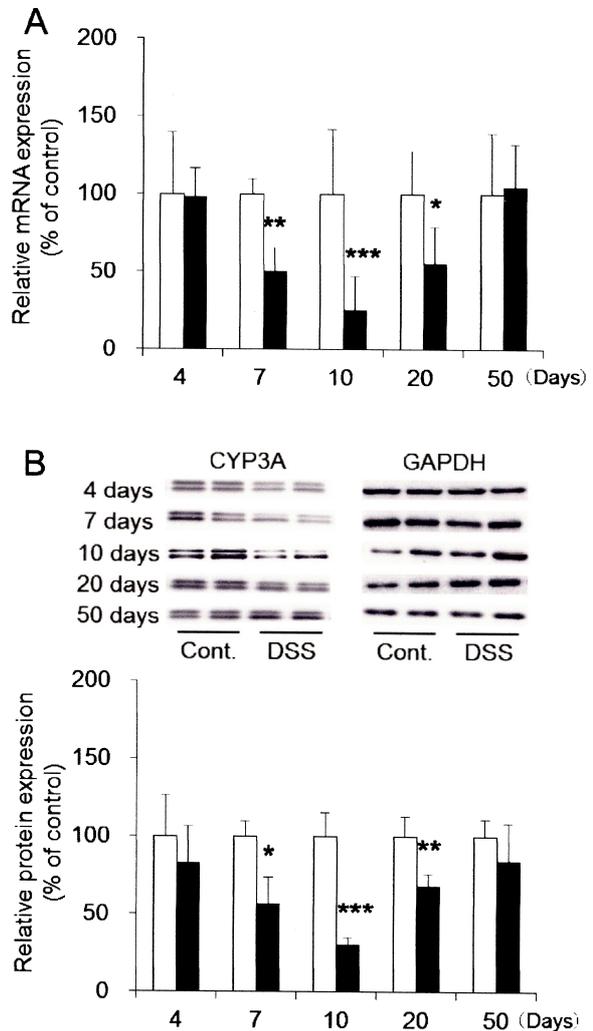


Figure 3. mRNA expression level of CYP3A11 (A) and the protein expression level of CYP3A (B) in the liver

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days, and water without DSS for 40 days, ad libitum (DSS group, black). Control mice received water without DSS (white) for 50 days.

A: The mRNA expression levels of CYP3A11 in the liver were measured by real-time RT-PCR. β -actin was used as a house-keeping gene, and the averages of values derived from the control mice were expressed as 100%.

B: Microsomal fractions were prepared from the liver, and protein expression levels of CYP3A were determined by Western blotting. GAPDH was used as a house-keeping gene, and the averages of values derived from the control mice were expressed as 100%. The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group. Student's *t*-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. control group.

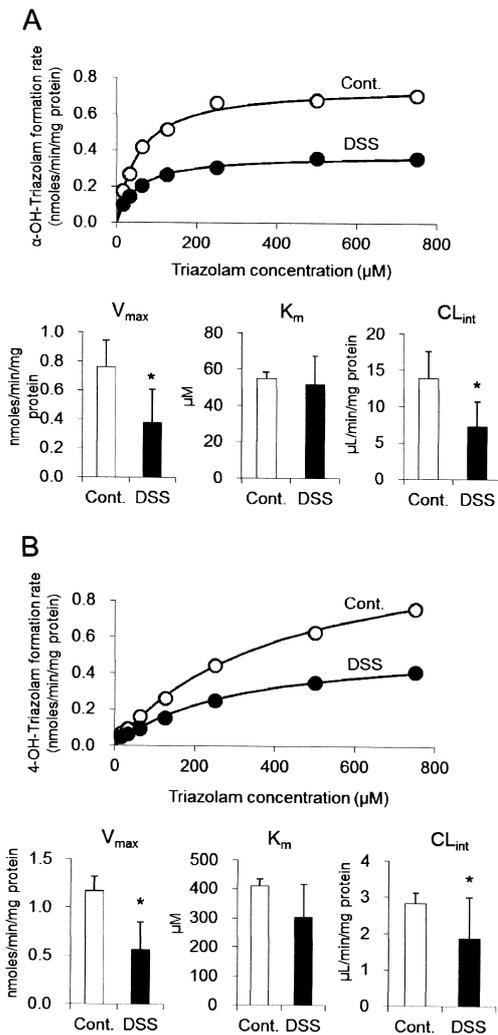


Figure 4. Triazolam metabolic activity in the hepatic microsomal fraction

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days (DSS group). Control mice received water without DSS for 10 days. Microsomal fractions were prepared from the liver, and the activities of the α -hydroxy (A) and 4-hydroxy (B) metabolites of triazolam were determined. The kinetic parameters for each metabolite were also calculated. The figure are presented as the mean and the kinetic parameters as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group. Student's *t*-test: **p*<0.05 vs. control group.

2-3. 潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける小腸 CYP3A の発現量の解析

ヒトの CYP3A は肝臓だけではなく、小腸にも多く発現しており、小腸の CYP3A の発現量の変化は薬物の体内動態を変動させ得る¹⁵⁾。そこで、DSS 投与 10 日目の小腸における CYP3A の発現量が肝臓と同様に低下しているかどうかを調べた。

DSS 投与群の小腸マイクロソーム画分における CYP3A のタンパク質発現量は、Control 群とほぼ同程度であっ

た (Figure 5A)。なお、DSS 投与群の小腸を HE 染色により観察した結果、やや絨毛構造の萎縮が認められるものの、大腸で認められたような腸粘膜の肥厚や炎症性細胞の遊走、浸潤は認められず、Control 群とほぼ同じ所見であった (Figure 5B)。

以上の結果から、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの小腸では CYP3A の発現低下は認められず、肝臓特異的に低下することがわかった。

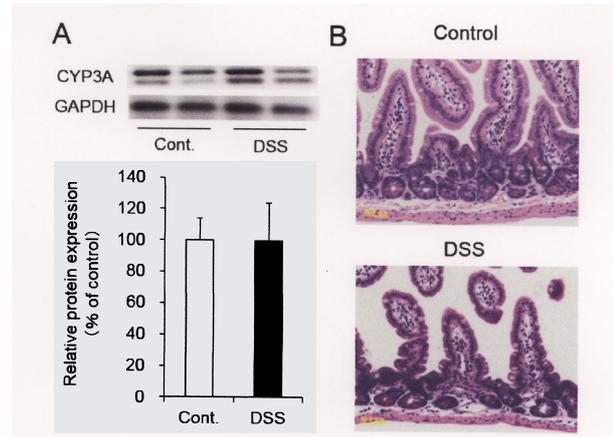


Figure 5. Protein expression level of CYP3A in the small intestine (A) and histology of small intestine (B)

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days (DSS group). Control mice received water without DSS for 10 days.

A : Microsomal fractions were prepared from the small intestine, and protein expression level of CYP3A was determined by Western blotting. GAPDH was used as a house-keeping gene, and the averages of values derived from the control mice were expressed as 100%. The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group.

B : The small intestine was removed, fixed in 10% neutral-buffered formalin, paraffinized, and stained using hematoxylin-eosin.

2-4. 潰瘍性大腸炎モデルマウスの肝臓における CYP3A 以外の CYP 分子種のタンパク質発現量の解析

ヒトとマウスの CYP には、CYP3A 以外にも様々な分子種が存在し、薬物の代謝に関与している。そこで、DSS 投与 10 日目の潰瘍性大腸炎活動期において、肝臓の CYP3A 以外の分子種 (CYP1A、CYP2C、CYP2D、CYP2E) のタンパク質レベルでの発現量が低下しているかどうかを調べた (Figure 6)。その結果、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの活動期では、肝臓における各種 CYP 分子種の発現量が、CYP3A と同様に、大きく低下していることがわかった。以上の結果より、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの活動期では、CYP3A を始めとした種々の CYP 分子種の発現量低下していることがわかった。

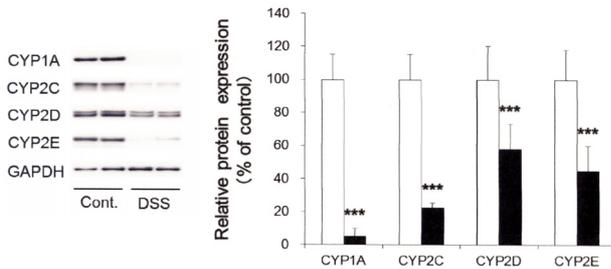


Figure 6. Protein expression levels of CYPs in the liver

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days (DSS group, black). Control mice received water without DSS (white) for 10 days. Microsomal fractions were prepared from the liver, and protein expression levels of CYP1A, CYP2C, CYP2D, and CYP2E were determined by Western blotting. GAPDH was used as a house-keeping gene, and the averages of values derived from the control mice were expressed as 100%. The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group. Student's *t*-test : *** p <0.001 vs. control group.

3. 肝臓 CYP3A の発現低下メカニズムの解析

ヒトの CYP の発現量は、疾病、遺伝的要因、加齢、食生活および腸内細菌の変動など様々な要因により変動することが知られている。一方、潰瘍性大腸炎発症時には、腸内細菌叢が変化すること、腸内細菌を移植すると潰瘍性大腸炎が改善することが報告されている²¹⁾。また、潰瘍性大腸炎患者では、血中 lipopolysaccharide (LPS) 濃度が上昇していることが報告されている²²⁾。さらに、腸内細菌の産生する二次胆汁酸である lithocholic acid (LCA) が、核内受容体 pregnane X receptor (PXR) のリガンドとして機能し、CYP3A の発現を制御していること²³⁾、LPS は肝臓において各種炎症性サイトカインの産生を高めること²⁴⁾、および炎症性サイトカインの濃度が高まると CYP3A の発現が低下することが報告されている²⁵⁾。著者は、以上の知見をもとに、潰瘍性大腸炎活動期に CYP3A の発現量が低下するメカニズムについて、LCA および LPS が関与しているのではないかと考え、解析した。

3-1. LCA を介した肝臓 CYP3A の発現低下メカニズムの検討

LCA は、大腸内に存在する腸内細菌によって産生される。生成した LCA は、門脈を通過して肝臓に到達すると、核内受容体 PXR のリガンドとなり、CYP3A の発現を調節する。したがって、大腸の LCA 量が低下すると、肝臓の PXR の核内移行量が減少し、CYP3A の発現量が低下する²⁶⁾。DSS 投与 10 日目の大腸における LCA 量を解析したところ、DSS 投与群と Control 群との間に差はみられなかった (Figure 7)。このことより、

DSS 投与群の肝臓における CYP3A の発現低下には、LCA の関与は低いことが考えられた。

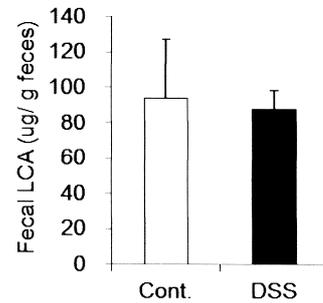


Figure 7. Colonic LCA levels.

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days (DSS group). Control mice received water without DSS for 10 days. LCA was extracted from the feces, and the concentration of LCA was measured using HPLC. The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group.

3-2. LPS を介した肝臓 CYP3A の発現低下メカニズムの検討

LPS は、CYP3A を始め、CYP1A、CYP2B および CYP2C の発現低下に関与することがマウスの実験において立証されている²⁷⁾。一方、潰瘍性大腸炎患者の活動期には、大腸粘膜の透過性が亢進し、血中 LPS 濃度が上昇することも報告されている²²⁾。そこで、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの肝臓における CYP3A の発現低下に、血中 LPS 濃度の上昇が関与しているかどうかを調べた。

血中 LPS 濃度は DSS 投与により経時的に上昇し、DSS 投与 10 日目で最大値となった。一方、DSS の投与を中止すると、血中 LPS 濃度は減少傾向となった (Figure 8)。このことから、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの活動期では、ヒトの潰瘍性大腸炎活動期と同様に、血中の LPS 濃度が上昇していることがわかった。

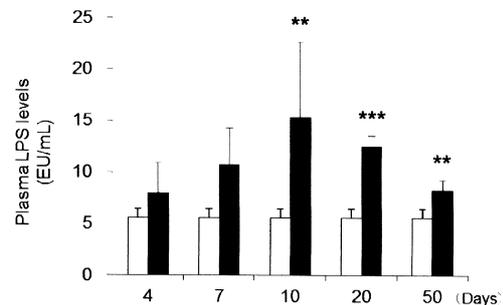


Figure 8. Plasma LPS levels.

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days, and water without DSS for 40 days, ad libitum (DSS group, black). Control mice received water without DSS (white) for 50 days. The plasma LPS levels were measured. The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group. Student's *t*-test : ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. control group.

3-3. 肝臓の炎症性サイトカインの発現量

LPS が肝臓に到達すると、肝臓の炎症性サイトカインの発現誘導を介して、CYP3A の発現が低下する²⁷⁾。一方、肝障害時にも肝臓の CYP3A の発現量は低下することが報告されている²⁸⁾。そこで、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの肝臓における CYP3A の発現低下に、肝臓の炎症性サイトカインの上昇が関与しているかどうかを調べた。

肝臓における IL-1、IL-6 および TNF- α の mRNA 発現量は、DSS 投与開始から著明に増加し、いずれも 10 日目で最高値となった。一方、この発現増加は、いずれも DSS の投与中止により減少した (Figure 9)。これらのことから、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの活動期では、血中 LPS の増加に符合して肝臓の炎症性サイトカインの産生が誘導されていることがわかった。これらのことより、活動期における CYP3A の発現低下には、炎症性サイトカインの発現上昇が関与していることが示唆された。

なお、本モデルでは、明らかな肝障害の発症は認められなかった (Figure 10)。すなわち、潰瘍性大腸炎活動期における CYP3A の発現低下は、肝障害などの明確な肝臓病変の所見を伴わず、引き起こされる可能性が示唆された。

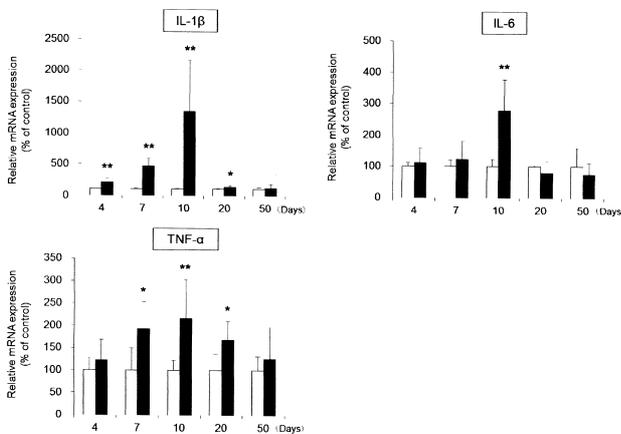


Figure. 9. mRNA expression levels of inflammatory cytokines in the liver.

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days, and water without DSS for 40 days, ad libitum (DSS group, black). Control mice received water without DSS (white) for 50 days. The mRNA expression levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the liver were measured by real-time RT-PCR. β -actin was used as a house-keeping gene, and the averages of values derived from the control mice were expressed as 100%. The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group. Student's *t*-test: **p*<0.05 and ***p*<0.01 vs. control group.

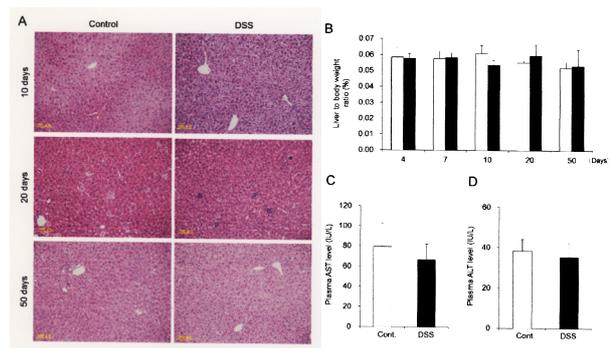


Figure. 10. Histology of liver (A), liver to body weight ratio (B) and plasma aspartate aminotransferase (AST) (C) and alanine aminotransferase (ALT) (D) concentration levels.

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days, and water without DSS for 40 days, ad libitum (DSS group, black). Control mice received water without DSS (white) for 50 days.

A : The liver was removed, fixed in 10% neutral-buffered formalin, paraffinized, and stained using hematoxylin-eosin.

B : The liver to body weight ratio was measured.

C and D : Blood samples were collected to measure AST (C) and ALT (D) levels.

The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group.

3-4. 肝臓における転写因子の核内移行量

炎症性サイトカインの分泌が亢進すると、転写因子 nuclear factor kappa B (NF- κ B) の核内移行が亢進する^{29,30)}。一方、NF- κ B の核内移行量の増加は、CYP3A の転写を抑制し、発現量を低下させる³¹⁾。そこで、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける CYP3A の発現低下が、NF- κ B の核内移行量の増加に起因しているかどうかを調べた。その結果、DSS 処置 10 日目において、DSS 投与群の肝臓核画分における NF- κ B のタンパク質発現は、Control 群に比べて約 2 倍有意に高い値を示した (Figure 11)。したがって、肝臓における CYP3A の発現低下には、NF- κ B の核内移行量の増加が関与している可能性が示唆された。

マウスの CYP3A の発現量は、PXR³²⁾ や constitutive androstane receptor (CAR)³³⁾ などの核内受容体により制御されており、これらの受容体の核内移行量が減少すると、CYP3A の発現量は低下する^{34,35)}。また、同様の CYP3A の制御機構は、ヒトにおいても報告されている。一方、PXR と CAR の合成と核内移行量は、NF- κ B の核内移行量と負の相関があることが知られている^{36,37)}。そこで、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの肝臓において、PXR および CAR の合成および核内移行が抑制されているかどうかを調べた。その結果、DSS 投与群の肝臓における PXR および CAR の mRNA

発現量は、Control 群に比べて低下していた (Figure 12A)。また、DSS 投与群の肝臓核画分における PXR および CAR のタンパク質発現についても、著明に低下していた (Figure 12B)。以上の結果から、肝臓における CYP3A の発現量の低下には、PXR および CAR の合成量の低下と核内移行量の低下が関与していることがわかった。なお、CYP3A の発現制御機構における PXR の関与に関しては、現時点においても一定の見解は得られていないものの、PXR の関与を支持する報告は多く、我々も、PXR が関与しているものと考えている³⁸⁻⁴¹⁾。

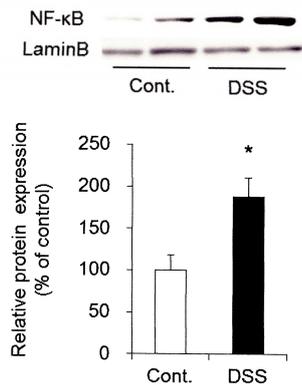


Figure 11. Nuclear translocation of NF- κ B in the liver.

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days (DSS group). Control mice received water without DSS for 10 days. Nuclear fractions were prepared from the liver, and the expression levels of NF- κ B protein were determined by Western blotting. Lamin B was used as a house-keeping gene, and the averages of values derived from the control mice were expressed as 100%.

The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group. Student's *t*-test: * p <0.05 vs. control group.

おわりに

本研究の結果から、潰瘍性大腸炎患者において、シクロスポリン、メトニダゾールおよびステロイド剤等の血中濃度が上昇している理由として、肝臓の CYP3A の発現低下が示唆された。さらに、CYP3A の発現低下メカニズムとして、以下の可能性が示唆された。すなわち、潰瘍性大腸炎時には、大腸の膜透過性が亢進し、LPS が血中に移行し、肝臓に到達する。肝臓に到達した LPS は、肝臓のクッパー細胞の TLR4 に結合し、炎症性サイトカインの産生を増加させる。この炎症性サイトカインが、肝実質細胞に作用することにより NF- κ B を活性化し、PXR および CAR の核移行を減少させる。その結果として、CYP3A の発現を低下させるものと考えられる (Figure 13)。

本研究は、潰瘍性大腸炎モデルマウスを用いて行った

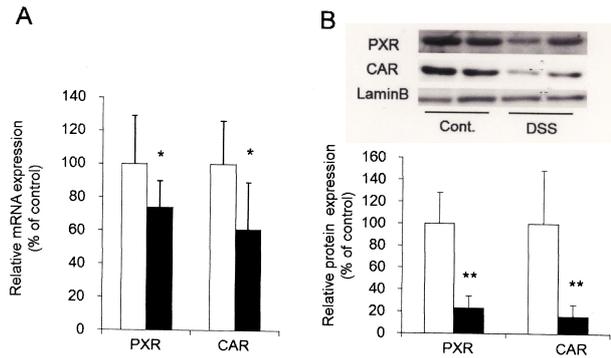


Figure 12. mRNA expression levels and nuclear translocation of PXR and CAR in the liver.

The mice were provided with 3.5% DSS dissolved in drinking water for 10 days (DSS group, black). Control mice received water without DSS for 10 days.

A: The mRNA expression levels of PXR and CAR in the liver were measured by real-time RT-PCR. GAPDH was used as a house-keeping gene, and the averages of values derived from the control mice were expressed as 100%.

B: Nuclear fractions were prepared from the liver, and the expression levels of PXR and CAR protein were determined by Western blotting. Lamin B was used as a house-keeping gene, and the averages of values derived from the control mice were expressed as 100%.

The data are presented as the means \pm S.D. and were obtained from four to eight mice per group. Student's *t*-test: * p <0.05 and ** p <0.01 vs. control group.

ものである。しかし、潰瘍性大腸炎患者の活動期においては、本モデルマウス同様、血中 LPS 濃度が上昇していることが報告されている²²⁾。したがって、本研究で明らかにした活動期における CYP3A 発現低下は、ヒトでも起こり得ると考えられる。今後は、本研究成果をもとに、臨床研究が行われることを期待する。

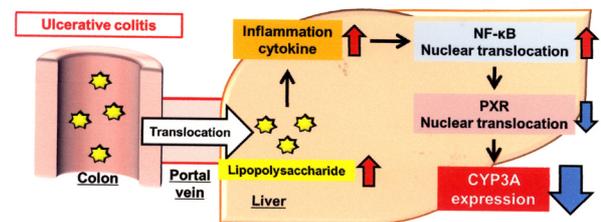


Figure 13. Down-regulate mechanism of hepatic CYP3A in ulcerative colitis

謝辞

本研究を遂行するにあたり、平成 27 年度星薬科大学大谷記念研究助成金を賜りましたことに対し、大谷卓男理事長ならびに田中隆治学長に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行のために多大なるご指導を賜りました星薬科大学薬動学教室杉山清教授 (現食品動態学研究

室特任教授)に心より御礼申し上げます。さらに、本研究を進めるにあたり、ご指導ご協力をいただきました同教室の落合和准教授および五十嵐信智講師に深謝いたし

ます。加えて、本研究を進めるにあたり、ご協力をいただきました同教室の皆様にご感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Asakura K, Nishiwaki Y, Inoue N, Hibi T, Watanabe M, Takebayashi T: Prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in Japan. *J. Gastroenterol.*, **44**, 659-665 (2009).
- 2) Baumgart DC, Carding SR: Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, **369**, 1627-1640 (2007).
- 3) Sartor RB: Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, **134**, 577-594 (2008).
- 4) Lichtenstein GR, Zakko S, Gordon GL, Murthy U, Sedghi S, Pruitt R, Merchant K, Bortey E, Forbes WP: Mesalazine granules 1.5 g once-daily maintain remission in patients with ulcerative colitis who switch from other 5-ASA formulations: a pooled analysis from two randomised controlled trials. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **36**, 126-134 (2012).
- 5) Ordas I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ: Ulcerative colitis. *Lancet*, **380**, 1606-1619 (2012).
- 6) Siegmund B: Management of Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis. *Dig. Dis.*, **33** Suppl 1, 90-94 (2015).
- 7) Burger M, Schmidt C, Teich N, Stallmach A: Medical Therapy of Active Ulcerative Colitis. *Viszeralmedizin*, **31**, 236-245 (2015).
- 8) Balint A, Farkas K, Szucs M, Szepes Z, Nagy F, Wittmann T, Molnar T: Long-term increase in serum cholesterol levels in ulcerative colitis patients treated with cyclosporine: an underdiagnosed side effect frequently associated with other drug-related complications. *Scand. J. Gastroenterol.*, **49**, 59-65 (2014).
- 9) Latteri M, Angeloni G, Silveri NG, Manna R, Gasbarrini G, Navarra P: Pharmacokinetics of cyclosporin microemulsion in patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Pharmacokinet.*, **40**, 473-483 (2001).
- 10) Bergan T, Bjerke PE, Fausa O: Pharmacokinetics of metronidazole in patients with enteric disease compared to normal volunteers. *Chemotherapy*, **27**, 233-238 (1981).
- 11) Kim JJ, Simpson N, Klipfel N, Debose R, Barr N, Laine L: Cytomegalovirus infection in patients with active inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.*, **55**, 1059-1065 (2010).
- 12) Ceredig R, Henderson DC, Nairn RC: Experimental model of ulcerative colitis. *Nature*, **266**, 74-75 (1977).
- 13) De Vry CG, Prasad S, Komuves L, Lorenzana C, Parham C, Le T, Adda S, Hoffman J, Kahoud N, Garlapati R, Shyamsundar R, Mai K, Zhang J, Muchamuel T, Dajee M, Schryver B, McEvoy LM, Ehrhardt RO: Non-viral delivery of nuclear factor-kappaB decoy ameliorates murine inflammatory bowel disease and restores tissue homeostasis. *Gut*, **56**, 524-533 (2007).
- 14) Rogler G, Andus T: Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Surg.*, **22**, 382-389 (1998).
- 15) Thummel KE, Wilkinson GR: In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 389-430 (1998).
- 16) Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW: Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*, **14**, 1-18 (2004).
- 17) Anakk S, Kalsotra A, Kikuta Y, Huang W, Zhang J, Staudinger JL, Moore DD, Strobel HW: CAR/PXR provide directives for Cyp3a41 gene regulation differently from Cyp3a11. *Pharmacogenomics J.*, **4**, 91-101 (2004).
- 18) Lofgren S, Hagbjork AL, Ekman S, Fransson-Steen R, Terelius Y: Metabolism of human cytochrome P450 marker substrates in mouse: a strain and gender comparison. *Xenobiotica*, **34**, 811-834 (2004).
- 19) Perloff MD, von Moltke LL, Court MH, Kotegawa T, Shader RI, Greenblatt DJ: Midazolam and triazolam biotransformation in mouse and human liver microsomes: relative contribution of CYP3A and CYP2C isoforms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 618-628 (2000).
- 20) Zhao XJ, Ishizaki T: The In vitro hepatic metabolism of quinine in mice, rats and dogs: comparison with human liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 1168-1176 (1997).
- 21) Borody TJ, Warren EF, Leis S, Surace R, Ashman O: Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J. Clin. Gastroenterol.*, **37**, 42-47 (2003).
- 22) Pastor Rojo O, Lopez San Roman A, Albeniz Arbizu E, de la Hera Martinez A, Ripoll Sevillano E, Albillos Martinez A: Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, **13**, 269-277 (2007).
- 23) Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH, Kliewer SA: The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 3369-3374 (2001).
- 24) Busam KJ, Bauer TM, Bauer J, Gerok W, Decker K: Interleukin-6 release by rat liver macrophages. *J. Hepatol.*, **11**, 367-373 (1990).
- 25) Renton KW: Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab.*, **5**, 235-243 (2004).

- 26) Toda T, Ohi K, Kudo T, Yoshida T, Ikarashi N, Ito K, Sugiyama K: Ciprofloxacin suppresses Cyp3a in mouse liver by reducing lithocholic acid-producing intestinal flora. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 201-208 (2009).
- 27) Moriya N, Kataoka H, Fujino H, Nishikawa J, Kugawa F: Effect of lipopolysaccharide on the xenobiotic-induced expression and activity of hepatic cytochrome P450 in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 473-480 (2012).
- 28) George J, Murray M, Byth K, Farrell GC: Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology*, **21**, 120-128 (1995).
- 29) Libermann TA, Baltimore D: Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2327-2334 (1990).
- 30) Baeuerle PA, Baltimore D: I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, **242**, 540-546 (1988).
- 31) Pondugula SR, Dong H, Chen T: Phosphorylation and protein-protein interactions in PXR-mediated CYP3A repression. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **5**, 861-873 (2009).
- 32) Matheny CJ, Ali RY, Yang X, Pollack GM: Effect of prototypical inducing agents on P-glycoprotein and CYP3A expression in mouse tissues. *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1008-1014 (2004).
- 33) Tzamei I, Pissios P, Schuetz EG, Moore DD: The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 2951-2958 (2000).
- 34) Gu X, Ke S, Liu D, Sheng T, Thomas PE, Rabson AB, Gallo MA, Xie W, Tian Y: Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents. *J. Biol. Chem.*, **281**, 17882-17889 (2006).
- 35) Li CC, Lii CK, Liu KL, Yang JJ, Chen HW: DHA down-regulates phenobarbital-induced cytochrome P450 2B1 gene expression in rat primary hepatocytes by attenuating CAR translocation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **225**, 329-336 (2007).
- 36) Ghose R, Omoluabi O, Gandhi A, Shah P, Strohacker K, Carpenter KC, McFarlin B, Guo T: Role of high-fat diet in regulation of gene expression of drug metabolizing enzymes and transporters. *Life Sci.*, **89**, 57-64 (2011).
- 37) Ogura J, Terada Y, Tsujimoto T, Koizumi T, Kuwayama K, Maruyama H, Fujikawa A, Takaya A, Kobayashi M, Itagaki S, Takahashi N, Hirano T, Yamaguchi H, Iseki K: The decrease in farnesoid X receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor in the liver after intestinal ischemia-reperfusion. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **15**, 616-631 (2012).
- 38) Ishii M, Toda T, Ikarashi N, Kusunoki Y, Kon R, Ochiai W, Machida Y, Sugiyama K: Gastrectomy increases the expression of hepatic cytochrome P450 3A by increasing lithocholic acid-producing enteric bacteria in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 298-305 (2014).
- 39) Feere DA, Velenosi TJ, Urquhart BL: Effect of erythropoietin on hepatic cytochrome P450 expression and function in an adenine-fed rat model of chronic kidney disease. *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 201-213 (2015).
- 40) Banerjee M, Chai SC, Wu J, Robbins D, Chen T: Tryptophan 299 is a conserved residue of human pregnane X receptor critical for the functional consequence of ligand binding. *Biochem. Pharmacol.*, **104**, 131-138 (2016).
- 41) Zeng H, Li D, Qin X, Chen P, Tan H, Zeng X, Li X, Fan X, Jiang Y, Zhou Y, Chen Y, Wang Y, Huang M, Bi H: Hepatoprotective Effects of Schisandra sphenanthera Extract against Lithocholic Acid-Induced Cholestasis in Male Mice Are Associated with Activation of the Pregnane X Receptor Pathway and Promotion of Liver Regeneration. *Drug Metab. Dispos.*, **44**, 337-342 (2016).

Analysis about changed of cytochrome P450
and those mechanism in ulcerative colitis

Yoshiki KUSUNOKI

Department of Clinical Pharmacokinetics, Hoshi University

The expression levels of cytochrome P450 (CYP) in the liver were analyzed over time in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) mouse model, from the initial active stage to the remission stage, to investigate the relationship between the changes in pathological conditions and CYP expression levels. DSS solution was given to mice for 10 days, after which water without DSS was provided for 40 days. Pathological conditions and CYP expression levels were examined over time. The mechanism for variation in CYP expression was also analyzed. The mRNA expression levels of CYP (CYP3A11, CYP1A2, CYP2C29, CYP2D9, and CYP2E1) decreased as pathological conditions worsened and reached their lowest levels on Day 10 of DSS treatment. Pathological conditions improved following the discontinuation of DSS, and CYP expression levels normalized by Day 50. Blood lipopolysaccharide (LPS) levels, the hepatic expression of inflammatory cytokines, and the nuclear translocation of pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) in the liver exhibited patterns similar to the observed variations in CYP expression levels. The capacity for metabolizing drugs that are substrates of CYP decreases during the active stage of UC but subsequently improves during the remission stage. This decrease in CYP expression was likely caused by the observed reduction in the levels of nuclearly localized PXR and CAR and the increase in the production of inflammatory cytokines triggered by LPS.

【利益相反】

本研究に関連し、開示すべき COI 関係の企業などはありません。