

高血糖ストレスによる NO 合成酵素を介した腸管 P 糖タンパク質の機能変容

名和文花, 藤田(濱邊)和歌子, 中本賀寿夫, 徳山尚吾*

Nitric Oxide Synthase-mediated Alteration of Intestinal P-glycoprotein under Hyperglycemic Stress

Ayaka NAWA, Wakako FUJITA-HAMABE, Kazuo NAKAMOTO, and Shogo TOKUYAMA*
Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University,
1-1-3 Minatojima, Chuo-ku, Kobe 650-8586, Japan

(Received October 8, 2010)

P-glycoprotein (P-gp), one of the important drug-efflux pumps, is known to be affected by pathological conditions such as inflammation or infection. Recently, it is reported that high glucose or hyperglycemia can alter P-gp expression levels at the blood-brain barrier or in kidney, although the details are still unknown. Here, we analyzed the alteration of intestinal P-gp expression and function in the development of diabetes and elucidated the mechanisms. Type 1 diabetes was induced in male ddY mice by an i.p. injection of streptozotocin (STZ) (230 mg/kg). We analyzed ileal P-gp expression and drug efflux activity using western blot analysis and an *in situ* closed loop method, respectively. Additionally, we analyzed ileal nitric oxide synthase (NOS) activity using colorimetric method. A significant reduction of P-gp expression level in ileum was found on day 9 after STZ administration. In contrast, a remarkable decrease in drug efflux activity was observed on days 3 and 9. Interestingly, NOS activity in ilea was significantly increased on day 9. The decrease of P-gp expression levels observed on day 9 was completely suppressed by L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME), a broad range NOS inhibitor, or aminoguanidine, a specific inducible NOS (iNOS) inhibitor. In addition, P-gp expression level in ileum was significantly decreased by administration of NOR5, a NO donor. These results indicate the possibility that NO, produced by iNOS in the ileum, is involved in the alteration of ileal P-gp expression and function under STZ-induced diabetic conditions.

Key words—diabetes; nitric oxide synthase; P-glycoprotein (P-gp)

1. はじめに

近年、わが国において食生活の欧米化や生活スタイルの変化に伴い、糖尿病、高血圧、脂質異常症など、いわゆる生活習慣病が社会問題となっている。なかでも糖尿病はその罹患者数の増加が社会的にも問題視されており、厚生労働省による平成 19 年国民健康・栄養調査では「糖尿病が強く疑われる人」「糖尿病の可能性が否定できない人」は合わせて約 2210 万人、すなわち、国民の 5 人に 1 人が糖尿病予備軍以上と推定されている疾患である。事実、入院患者の約 2 割が糖尿病を併発しているという報告もある。糖尿病患者が多種の薬物を同時に服用して

いる可能性も容易に予想されるが、特にその場合にはそれぞれの医薬品間の相互作用や薬物動態に影響を及ぼすような因子の動きに注意する必要がある。最近、solute carrier transporter (SLC) 群や ATP binding cassette transporter (ABC) 群に分類されるような薬物輸送に係わるトランスポーターの変動が薬理作用発現に大きな影響を及ぼすことが報告され始めている。¹⁻³⁾ また、薬物動態だけでなく、その異常が加齢による疾患の発症にも係わると言われており、生活習慣病の治療薬開発の標的分子とも考えられている。⁴⁾

P 糖タンパク質 (P-glycoprotein: P-gp) は ABC トランスポーターに属する薬物排出ポンプの 1 つである。P-gp は分子量約 180 kDa の 12 回膜貫通型のタンパク質であり、ATP の加水分解エネルギーにより薬物を細胞内から細胞外へ汲み出している。ヒトでは *MDR1* 遺伝子にコードされ、げっ歯類では

神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 (〒650-8586 神戸市中央区港島 1-1-3)

*e-mail: stoku@pharm.kobegakuin.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム GS05 で発表したものを中心に記述したものである。

mdr1a と *mdr1b* に相当することが知られている。⁵⁾ 生体内においては、小腸、血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB)、肝臓、腎臓など正常組織にも発現しており、幅広い基質特異性を有し、カルシウム拮抗剤を始めとしてピンカアルカロイド系抗がん剤や抗生物質など種々の薬物の体内動態に影響を及ぼしている。特に小腸上皮細胞管腔側膜における P-gp は経口投与された薬物の吸収に大きく影響を及ぼすと考えられる。⁶⁾ 実際に *mdr1* のノックアウトマウスにおいて HIV プロテアーゼ阻害剤やチロシンキナーゼ阻害剤などの P-gp の基質となる薬剤は経口投与後のバイオアベイラビリティが上昇することが報告されている。^{7,8)} 加えて、P-gp は薬物輸送だけでなく、ステロイドホルモンなど生体内物質も輸送することが知られている。⁹⁾ さらに近年では、イオンチャネル活性制御機能を有することも明らかにされ、その機能変動が生理環境に及ぼす影響も大きいと予想される。¹⁰⁾

一方、P-gp は炎症やてんかんなどの病態時にその発現や活性が変動することが知られるが、^{11,12)} このような病態時の機能的変化とその機序解明は薬物治療を考える上でも重要な検討課題である。糖尿病病態時における P-gp 発現変動に関しては BBB においてその発現が減少し、肝臓や腎尿細管では増加するという報告がある。¹³⁻¹⁵⁾ しかしながら、薬物の吸収において重要な役割を果たす腸管での P-gp 発現変動の報告はない。そこで本研究では、糖尿病病態時における腸管 P-gp の発現並びに機能的変動について解析し、その変動機序の解明を試みた。

2. 1型糖尿病モデルマウスにおける随時血糖値並びに血清インスリン濃度の経日的変化

Streptozotocin (STZ, 230 mg/kg, i.p.) により作製した 1 型糖尿病モデルマウスの随時血糖値及び血清インスリン濃度を、それぞれ小型血糖値測定器具及び enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて検討した。

随時血糖値は、control 群では 30 日後まで変化は認められなかったが、STZ 群においては STZ 投与 1 日後から control 群と比較して有意な随時血糖値の上昇が認められ、その後、高血糖状態が維持された [Fig. 1(A)].¹⁶⁾

一方、血清インスリン濃度は control 群では変化は認められなかったが、STZ 群では STZ 投与 3 日後からわずかな減少が認められた。さらに 9 日後には有意な減少が観察され、15 日後には 0 に近い値を示した [Fig. 1(B)].¹⁶⁾ これらの変化は STZ による選択的膵臓 β 細胞の破壊に起因すると考えられる。^{17,18)} 同時に、摂餌量、飲水量、尿量の増加及び体重増加の抑制が観察され、¹⁶⁾ インスリン枯渇による解糖系の低下やタンパク質、脂肪分解の促進などの代謝異常が生じたと考えられる。血清インスリン濃度の減少に伴う血糖値の上昇と、体重増加の抑制や尿量その他の増加が 30 日後まで持続して観察されたことから、¹⁶⁾ 本観察期間においては病態の悪化が進行し続けていたと推測される。

3. 1型糖尿病モデルマウスにおける回腸 P-gp 発現及び Rhodamine123 (Rho123) 排出能の変化

これまでに、糖尿病病態時における P-gp の発現変動は BBB や肝臓、腎臓などにおいて報告されているが腸管での報告はない。そこでわれわれは血糖

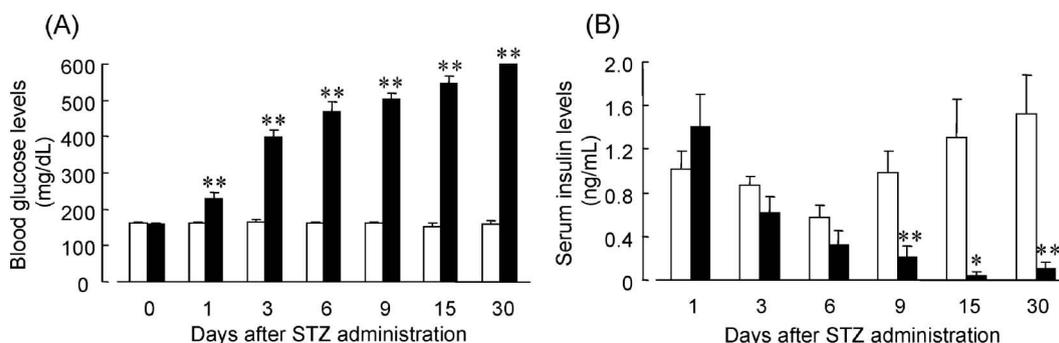


Fig. 1. Changes in Blood Glucose Levels and Serum Insulin Levels after STZ Administration

At indicated periods after STZ administration, blood glucose levels (A) and serum insulin levels (B) were measured. Control (open column): $n=6-37$, STZ (closed column): $n=6-53$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ vs. Control, unpaired Student's *t*-test. Adapted from Ref. 16).

値の上昇時期である STZ 投与 3, 9 日後の腸管 P-gp 発現及び Rho123 排出能を検討する目的として, それぞれ western blot 法及び *in situ* closed loop 法を用いて検討を行った。

STZ 群における P-gp 発現は STZ 投与 3 日後では control 群と比較してなんら差は認められなかったが, 9 日後においては有意な減少が認められた [Figs. 2(A) and (B)].¹⁶⁾ 一方, P-gp の Rho123 排出能は STZ 投与 3 並びに 9 日後において, control 群と比較して STZ 群では有意な低下が認められた [Fig. 2(C)].¹⁶⁾ しかしながら, STZ 投与 15 日後には P-gp 発現及び Rho123 排出能の回復が認められ, 血糖値の上昇に伴った P-gp 発現並びに活性変化は一過性であることが示唆された (図には示していない)。

こうした P-gp 発現の変化は空腸, 十二指腸においても類似した挙動が観察されたことから (データは示していない), この変化は回腸特異的なものではなく小腸全体で生じているものと考えられる。また, P-gp 発現減少と同時に Rho123 排出能低下も認められていることから, 排出能低下には少なくとも一部にこの P-gp 発現減少が関与すると考えられ

る。しかしながら, P-gp の Rho123 排出能低下が P-gp 発現減少に先行して STZ 投与 3 日後から生じたことから, 初期には基質との感受性や ATP との親和性の低下など, 機能的修飾が直接生じていた可能性が示唆される。特に, P-gp はその細胞内ドメインに PKA や PKC によるリン酸化部位を有し, そのリン酸化により ATPase 活性の強さや基質の輸送能が制御されることが知られている。¹⁹⁾

4. 1 型糖尿病モデルマウスにおける回腸 NOS 活性の変動

NOS は L-アルギニンを基質として NO を合成する酵素として知られている。^{20,21)} *In vitro* において血管内皮に存在する P-gp の機能が NOS により低下すると報告されていることから,²²⁾ 本研究では糖尿病病態時における一過性の腸管 P-gp の発現並びに機能低下の機序に対する NOS の関与に着目した。

回腸における NOS 活性を比色定量法を用いて解析したところ, STZ 投与 3 日後では control 群と STZ 群の間になんら差は認められなかったが, 9 日後で STZ 群に有意な活性上昇が観察された (Fig. 3).¹⁶⁾ 図には示していないが NOS 活性の上昇は STZ 投与 15, 30 日後においても観察され, 腸管上

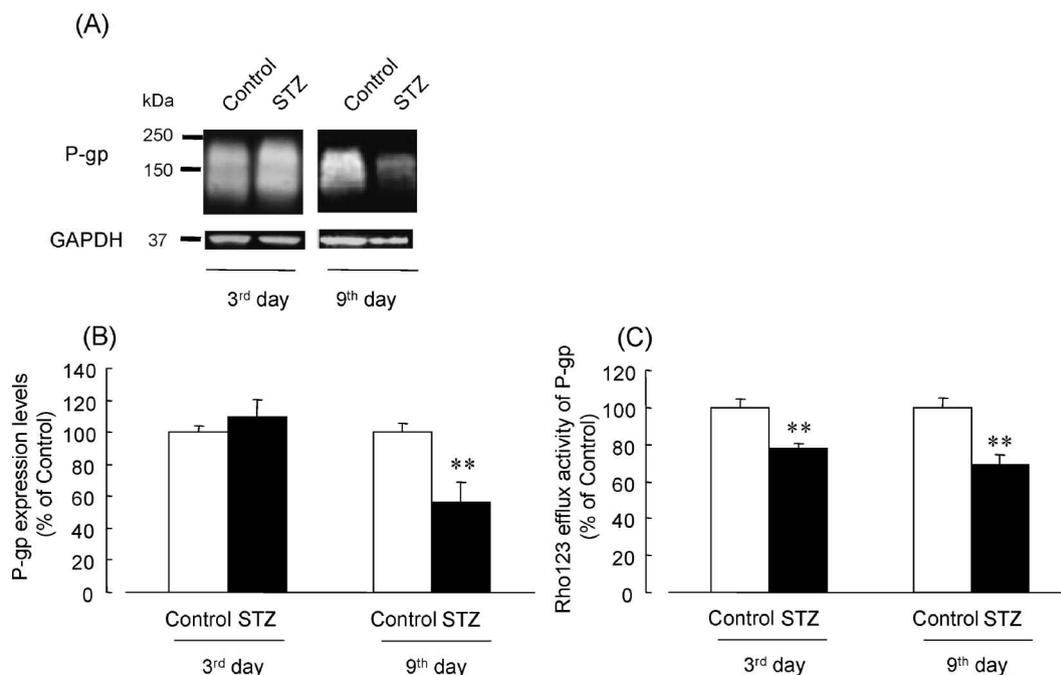


Fig. 2. Changes in Ileal P-gp Expression Levels and Activity after STZ Administration

At indicated periods after STZ administration, P-gp expression levels were analyzed by western blot (A, B). (A) represents a typical western blot image. Relative levels of P-gp expression were analyzed by the ratio of P-gp/GAPDH (B). Mice were anesthetized on days 3 and 9 after STZ administration and ileal P-gp activity (Rho123 efflux activity of P-gp) was analyzed using the *in situ* closed loop method (C). Control (open column): $n=6-8$, STZ (closed column): $n=5-6$, ** $p < 0.01$ vs. Control, unpaired Student's *t*-test. Adapted from Ref. 16).

皮細胞における NOS 活性は、血糖値上昇と連動して持続的に上昇し続けることが示唆される。

5. 1型糖尿病モデルマウスにおける P-gp 発現減少に対する iNOS の関与

非特異的 NOS 阻害剤 L-NAME (1 mg/ml) を STZ 投与直後から 9 日間自由摂取させた後、回腸における NOS 活性及び P-gp 発現を解析した。

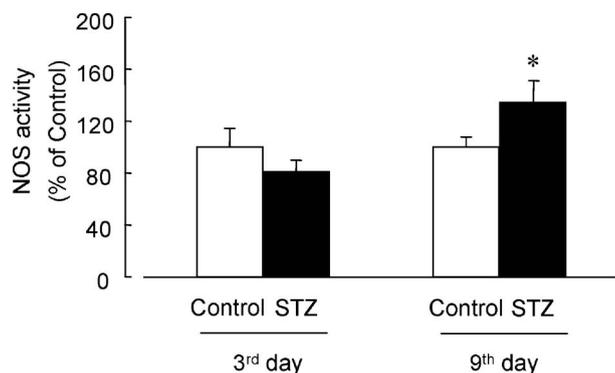


Fig. 3. Changes in Ileal NOS Activity after STZ Administration

At indicated periods after STZ administration, NOS activities were measured. Control (open column): $n=4-13$, STZ (closed column): $n=7-8$, * $p<0.05$ vs. Control, unpaired Student's *t*-test. Adapted from Ref. 16).

STZ 投与 9 日後において、control 群と比較して STZ 群では NOS 活性の有意な増加が認められたが、L-NAME によりその増加は抑制された [Fig. 4(A)].¹⁶⁾ 加えて control 群でも、L-NAME により NOS 活性の有意な減少が認められた [Fig. 4(A)].¹⁶⁾

STZ 群で認められた P-gp 発現の有意な減少は、L-NAME により完全に抑制された。また、control 群の P-gp 発現に対する L-NAME の単独作用は認められなかった [Figs. 4(B) and (C)].¹⁶⁾ これらの知見は、糖尿病病態時における P-gp 発現減少に NOS 活性上昇が関与することを示唆している。その一方で、STZ 投与 9 日後における P-gp の Rho123 排出能低下に対する、L-NAME の影響はわずかであった (データは示していない)。

NOS には 3 種類のアイソザイムが存在するが、恒常的に発現している構成型 (constitutive NOS: cNOS) と免疫系の刺激により発現が誘導される誘導型 (inducible NOS: iNOS) に大きく分けられる。構成型はさらに神経型 (neuronal NOS: nNOS) 及び内皮型 (endothelial NOS: eNOS) に分類される。神経型及び内皮型がそれぞれ神経系、血管内皮に分

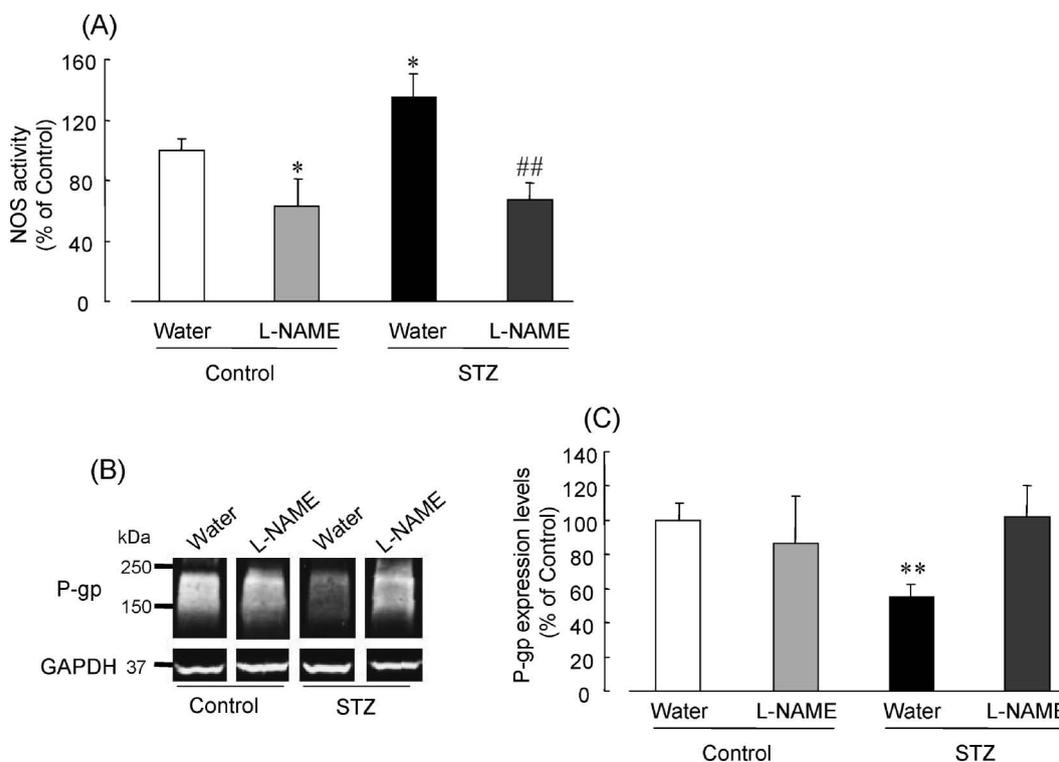


Fig. 4. Effect of Non-selective NOS Inhibitor on the Reduction of Ileal P-gp Expression Levels after STZ Administration

On day 9 after STZ administration, NOS activity (A) and P-gp expression levels (B, C) in the cytosolic (A) and crude membrane fraction (B, C) of ileal mucosal epithelial cells were measured. (B) represents a typical western blot image. L-NAME (1 mg/ml) was added to the drinking water for 9 d. $n=3-13$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ vs. Control (water), ## $p<0.01$ vs. STZ (water), one-way ANOVA and Scheffe's test. Adapted from Ref. 16).

布が限局しているのに対し、誘導型は肝細胞や消化管上皮細胞、グリア細胞など多くの組織に広範囲な分布が確認されているため、本研究では特に誘導型に着目し、iNOS 特異的阻害剤 Aminoguanidine (AG) (1 mg/ml) を 9 日間自由摂取させた後、回腸における NOS 活性及び P-gp 発現を解析した。

STZ 投与 9 日後において control 群と比較して STZ 群で認められた有意な NOS 活性の上昇は、AG により完全に抑制された。また、control 群において AG による NOS 活性への影響は観察されなかった [Fig. 5(A)].¹⁶⁾ 一方、STZ 群において観察されていた P-gp 発現の有意な減少は、AG により完全に抑制された [Figs. 5(B) and (C)].¹⁶⁾ 以上の結果から、糖尿病病態時における、iNOS 活性上昇が P-gp 発現減少に影響している可能性が考えられた。AG は抗糖化作用を有しているが、²³⁾ AG 群において、その随時血糖値に全く影響がなかったことから、P-gp 発現減少抑制はそれによるものではないと推測される。

6. 回腸 P-gp 発現に対する NO ドナーの影響

NO ドナーである NOR5 (10 mg/kg, p.o.) をマウスに 6 日間投与し、回腸における NO 量及び P-

gp 発現量をそれぞれ比色定量法、western blot 法を用いて解析した。

NOR5 投与 6 日後において回腸 NO 量は有意に増加した [Fig. 6(A)].¹⁶⁾ 同時に、NOR5 群における回腸 P-gp 発現は有意に減少した [Figs. 6(B) and (C)].¹⁶⁾ これらの知見から、腸管上皮細胞における NO 量の増加が細胞膜上の P-gp 発現を減少させることが強く示唆された。

7. おわりに

今回、糖尿病病態時における iNOS を介した P-gp 発現減少とそれに伴う Rho123 排出能の低下を明らかにした。このような病態の発症並びに進行時期における著しい変動は、特に治療開始するような時期であることを考慮すると、薬物治療上も無視できない知見であると考えられる。また、P-gp の一過性的変動が糖尿病やその合併症の進行に影響する可能性も否定できない。事実、糖尿病の合併症の一つである糖白内障では水晶体に発現する P-gp が浸透ストレスやアルドースの過剰生産により発現誘導され、その発症並びに進行に寄与するとの報告もある。¹⁰⁾ 近年、先進国において小児における 1 型糖尿病患者が増加しているとの報告もあり、²⁴⁾ 本研究で

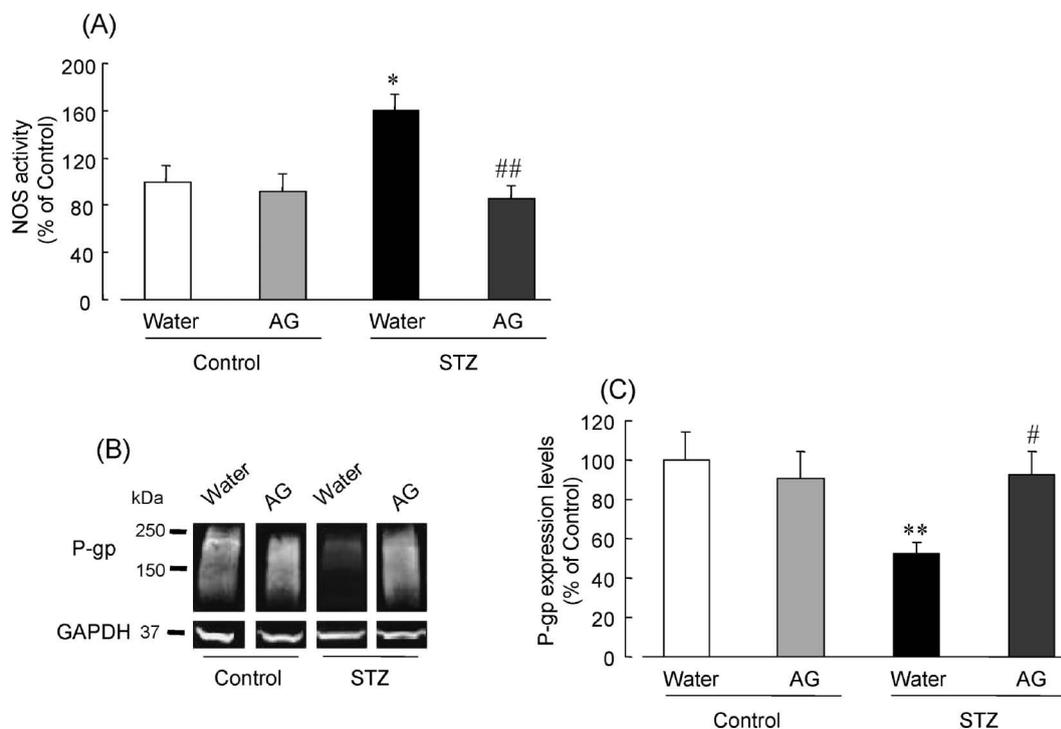


Fig. 5. Effect of an iNOS Specific Inhibitor on the Reduction of Ileal P-gp Expression Levels after STZ Administration

On day 9 after STZ administration, NOS activity (A) and P-gp expression levels (B, C) in the cytosolic (A) and crude membrane fraction (B, C) of ileal mucosal epithelial cells were measured. (B) represents a typical western blot image. Aminoguanidine (AG) (1 mg/ml) was added to the drinking water for 9 d. $n=3-12$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ vs. Control (water), ## $p<0.01$, # $p<0.05$ vs. STZ (water), one-way ANOVA and Scheffe's test. Adapted from Ref. 16).

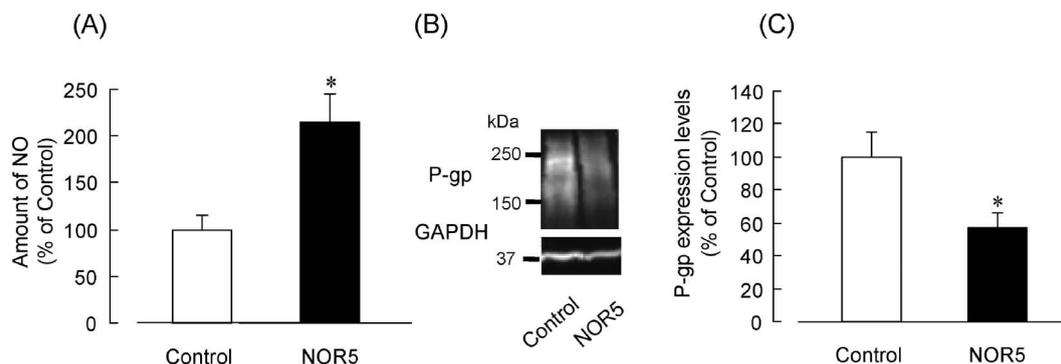


Fig. 6. Effect of NO Donor on Ileal P-gp Expression Levels

On day 6 after NOR5 (10 mg/kg, p.o.) administration, amount of NO (A) and P-gp expression levels (B, C) in the cytosolic (A) and crude membrane fraction of ileal mucosal epithelial cells were measured. (B) represents a typical western blot image. Control (open column): $n=5$, NOR5 (closed column): $n=7$, $*p < 0.05$ vs. Control, unpaired Student's t -test. Adapted from Ref. 16).

得られた知見が多くの患者の適切な薬物治療遂行の一助となれば幸いである。

REFERENCES

- Zhou S., Chan E., Pan S. Q., Huang M., Lee E. J., *J. Psychopharmacol.*, **18**, 262–276 (2004).
- Itoh T., *Yakugaku Zasshi*, **126**, 723–735 (2006).
- Watanabe T., Kusuhara H., Maeda K., Shitara Y., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **328**, 652–662 (2009).
- Jimenez S. G., Childs B., Valle D., *Nature*, **409**, 853–855 (2001).
- Cornwell M. M., *Cancer Treat. Res.*, **57**, 37–56 (1991).
- Mizuno N., Niwa T., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **125**, 200–206 (2005).
- Marchetti S., De Vries N. A., Buckle T., Bolijn M. J., Van Eijndhoven M. A., Beijnen J. H., Mazzanti R., van Tellingen O., Schellens J. H., *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 2280–2287 (2008).
- Suzuki H., Sugiyama Y., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **12**, 3–12 (2000).
- Ueda K., Okamura N., Hirai M., Tanigawara Y., Saeki T., Kioka N., Komano T., Hori R., *J. Biol. Chem.*, **267**, 24248–24252 (1992).
- Miyazawa T., Kubo E., Takamura Y., Akagi Y., *Exp. Eye Res.*, **84**, 246–253 (2007).
- Zhao Y. L., Du J., Kanazawa H., Sugawara A., Takagi K., Kitaguchi K., *Eur. J. Pharmacol.*, **445**, 115–123 (2002).
- Tishler D. M., Weinberg K. T., Hinton D. R., *Epilepsia*, **36**, 1–6 (1995).
- Liu X. D., Pan G. Y., Xie L., Hou Y. Y., Lan W., Su J., *Acta Pharmacol. Sin.*, **23**, 225–229 (2003).
- Van Waarde W. M., Verkabe H. J., Wolters H., Havinga R., Baller J., Bloks V., Muller M., Sauer P. J. J., Kuipers F., *Gastroenterology*, **122**, 1842–1852 (2002).
- Toramonchi G., Xei P., Wallner E. I., Danesh F. R., Kanwar Y. S., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **291**, 972–980 (2006).
- Nawa A., Fujita W., Tokuyama S., *Life Sci.*, **86**, 402–409 (2010).
- Szkudeliski T., *Physiol. Res.*, **50**, 536–546 (2001).
- Lenzen S., *Diabetologia*, **51**, 216–226 (2008).
- Idriss H., Urquidi V., Basavappa S., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **46**, 287–292 (2000).
- Penelope J. A., Bernd M., *Cardiovasc. Res.*, **43**, 521–531 (1999).
- Michael A. M., *J. Biol. Chem.*, **268**, 12231–12234 (1993).
- Bauer B., Anika M. S. H., Miller D. S., *Mol. Pharmacol.*, **71**, 667–675 (2007).
- Thornalley P. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **419**, 31–40 (2003).
- Patterson C. C., Dahlquist G., Harjutsalo V., Joner G., Feltbower R. G., Svensson J., Schober E., Gyürüs E., Castell C., Urbonaitė B., Rosenbauer J., Iotova V., Thorsson A. V., Soltész G., *Diabetologia*, **50**, 2439–2442 (2007).