

腸内フローラによる薬物動態制御機構の解明

清水 美貴子
慶應義塾大学薬学部 講師

緒言

近年、国民の健康志向の高まりに伴い、サプリメントをはじめとする様々な健康食品が販売され、誰もが手軽に利用するようになった。その中でも特定保健用食品は、その有効性や安全性を厚生労働省が認めているものであり、消費者からの信頼は高い。今後、健康食品を何らかの疾病の改善目的で積極的に摂取する場合、薬物治療を行っていることは少なくなく、高齢化に伴いそのような傾向は益々増加することが予想される。しかし一方で、食品成分が薬物代謝酵素や薬物輸送担体の機能に影響を与え、薬効や副作用に影響を及ぼす事例が知られ、適正な医薬品の使用にとって大きな問題となっている^{1,2)}。

乳酸菌をはじめとするプロバイオティクスは、経口摂取後、小腸に定着し、腸内フローラの改善や消化管免疫機能の改善をすることで、様々な作用を発現する³⁾。小腸は食物を始め、経口摂取された薬物や異物の代謝・吸収・排泄において重要な臓器であり、様々な薬物代謝酵素や輸送担体が存在し、薬物・異物代謝に大きく寄与している⁴⁾。しかし、これまでプロバイオティクスによる薬物代謝酵素や薬物輸送担体への影響に関する研究は行われていなかった。

我々は、ヒト培養細胞および動物を用いた研究により、プロバイオティクスの一つである *Lactobacillus casei* (*L.casei*) が消化管での薬物代謝酵素や薬物輸送担体の遺伝子発現や機能を阻害あるいは誘導し、医薬品の体内動態を変化させることを明らかにした。本現象に科学的エビデンスを与えるためには、プロバイオティクスによる薬物代謝酵素や薬物輸送担体の制御機構を明らかにする事が重要である。

本研究において、我々は、まず、プロバイオティクスによる CYP1A1 と CYP3A4 の制御機構の解明を行った。CYP1A1 はダイオキシン類などの発がん性物質の代謝活性化に関与しているため (図 1)、その酵素活性の変動が発がんリスクの変化に影響を与える可能性があ

る⁵⁾。そこで我々は、小腸における CYP1A1 機能に対するプロバイオティクスの影響を調べることで、プロバイオティクスがもつ発がんリスク軽減作用や予防効果のメカニズムの解明につながるのではないかと考えた。また、CYP3A4 は現在市場に出ている医薬品の半数以上の代謝に関与しており、その酵素活性の変動が多くの薬物の体内動態、さらに効果や副作用に影響を与える⁶⁾。健康食品との相互作用の事例としては、グレープフルーツジュースやセントジョーンズワートが小腸の CYP3A4 を阻害あるいは誘導するため、併用する医薬品の効果が増減するという報告がある⁷⁾。したがって、プロバイオティクスによる CYP3A4 制御機構の解明は、乳酸菌食品と医薬品との相互作用を考えるうえで重要である。さらに、これら制御物質の同定を目指し検討を行った。

実験方法

ヒト消化管のモデルとして 3 週間培養した Caco-2 細胞を用いた。プロバイオティクスは、*Lactobacillus* 属として *L.casei*、*Bifidobacterium* 属として“特定保健用食品”として市販されている菌種 (以下、*Bifidobacterium*) を

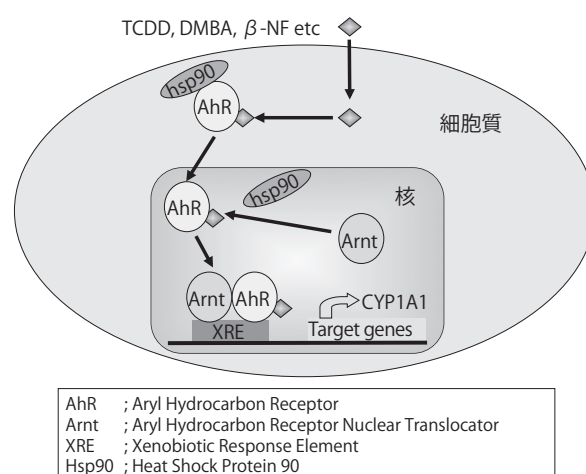


図 1 AhR による CYP1A1 遺伝子転写活性化機構

用いた。

プロバイオティクスの培養菌液を暴露した Caco-2 細胞から RNA を抽出し、CYP1A1 および CYP3A4 の遺伝子発現量の変化を Real-time PCR を用いて測定した。両酵素の活性は、各酵素の特異的基質を添加し、その代謝物量を HPLC および LC/MS にて定量する事で評価した。

次に、aryl hydrocarbon receptor (AhR) の誘導剤および阻害剤を用いて、プロバイオティクスによる CYP1A1 誘導機構の解明を試みた。また、CYP1A1 のプロモーター活性の変化を electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により評価した。

さらに、CYP3A4 阻害機構の解明のために、CYP3A4 を制御することが報告されている転写因子の遺伝子発現量やタンパク発現量の変化を Real-time PCR や Western blotting にて評価した。

最後に、CYP1A1 誘導および CYP3A4 阻害成分の解析を目的とし、プロバイオティクスの培養菌液、濾液、生菌および死菌を Caco-2 に暴露し、両酵素の遺伝子発現量と酵素活性を測定した。

結 果

1. CYP1A1

Caco-2 細胞において、*L.casei* および *Bifidobacterium* の菌数および暴露時間依存的に、CYP1A1 遺伝子発現の有意な増加が認められた。CYP1A1 活性についても同様の結果が得られた。そこで次に、*L.casei* に対して CYP1A1 誘導機構の解明を試みた。*L.casei* 暴露による CYP1A1 活性の誘導効果は、 α -naphthoflavone (α -NF) によって完全に抑制された。さらに、低濃度の β -NF による CYP1A1 活性の誘導に対し、*L.casei* は相加・相乗効果を示したが、高濃度の β -NF の誘導効果に対しては阻害作用を示した。また、*L.casei* 暴露により、AhR/ AhR nuclear translocator (AhR/Arnt) の xenobiotic responsive element (XRE) への結合が促進された。

CYP1A1 の遺伝子発現および活性は、*L.casei* の培養菌液、濾液、生菌で有意に増加したが、死菌による影響は認められなかった。

2. CYP3A4

CYP3A4 の遺伝子発現および活性は、今回検討に用いた *L.casei* および *Bifidobacterium* の菌数および暴露時間依存的に有意に減少した。さらに両菌種は、CYP3A4 転写調節因子の一つである CCAAT/enhancer

binding protein (C/EBP β) の遺伝子発現およびタンパク発現を有意に増加させた。その他の CYP3A4 転写調節因子 (核内受容体) の遺伝子発現およびタンパク発現に対する影響の有無は菌種によって異なっていた。

CYP3A4 の遺伝子発現および活性は、*L.casei* の培養菌液、濾液、生菌で有意に減少したが、死菌による影響は認められなかった。

考 察

2 大腸内細菌である *Lactobacillus* 属と *Bifidobacterium* 属を Caco-2 細胞に暴露した時、CYP1A1 の誘導および CYP3A4 の阻害作用が認められた。これら制御機構としては以下のように考えられる。

1. CYP1A1 誘導機構

EMSA を用いた解析の結果、*L.casei* は、AhR/Arnt の XRE への結合を促進し、CYP1A1 の転写活性を促進することで CYP1A1 の遺伝子発現や活性を誘導することが明らかとなった。また、*L.casei* は他の強力な AhR アゴニストと共存した場合は、部分アゴニストとして働き、CYP1A1 活性を抑制することが示された。したがって、*L.casei* は、小腸で CYP1A1 による発がん物質の過度の代謝活性化を抑制すると考えられる。

また、*L.casei* の生菌自身および菌が産生する物質に CYP1A1 の誘導作用があると推察される。

2. CYP3A4 阻害機構

今回検討を行った両菌種による CYP3A4 の遺伝子発現および活性の低下は、C/EBP β の誘導を介して転写レベルで起こる可能性が示された。また、影響が認められた C/EBP β を含む複数の CYP3A4 転写調節因子は、単独あるいは複合的に作用して、CYP3A4 の転写抑制を行っていると考えられる。さらに、菌種の違いによって、各転写調節因子への影響の程度に違いがあることが示唆された。今後は、これらの詳細を解明するために、CYP3A4 のプロモーター解析を行う予定である。

また、*L.casei* の生菌自身および菌が産生する物質に CYP3A4 の阻害作用があると推察される。今後さらに検討を行い、CYP1A1 および CYP3A4 を制御する物質を同定したいと考える。これら制御物質の同定や、制御物質を多く含む菌種を明らかにすることで乳酸菌を含む腸内細菌を制御および利用し、疾患予防や薬物療法の効率化が図れる可能性が高いと考える。

要 約

ヒト消化管モデル Caco-2 細胞を用いた実験により、*Lactobacillus* 属と *Bifidobacterium* 属の菌数および暴露時間依存的な CYP1A1 の誘導および CYP3A4 の阻害作用が認められた。*L.casei* では、小腸での AhR との相互作用を介して、経口摂取された発がん物質の過度な代謝活性化を抑制する可能性が示唆された。この作用が、プロバイオティクスが持つ発がんリスクの軽減作用および予防効果につながっているかもしれない。また、両菌種は、CYP3A4 の転写抑制作用を介して、CYP3A4 活性を阻害することが明らかとなった。この結果は、医薬品が CYP3A4 代謝を受ける場合には、その体内動態がプロバイオティクスとの併用により変化し、効果や副作用に影響を与える可能性を示唆するものであった。

謝 辞

助成いただきました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝致します。本研究の共同研究者は、明治薬科大学微生物学教室の杉田隆博士、北里研究所研究部の竹内修博士であり、両博士に感謝致します。なお、本研究報告の内容は、現在投稿準備中であることを申し添えます。

参考文献

- 1) H. Takanaga, et al, : *Br. J Clin. Pharmacol.*, 49, 49-58, 2000.
- 2) A. John, et al, : *Clin. Pharmacol. Ther.*, 66, 338-45, 1999.
- 3) L. V. Hooper, et al, : *Science*, 291:881-884, 2001.
- 4) M. F. Paine, et al, : *D. M. D.*, 34, 880-886, 2006.
- 5) R. Vrzal, et al : *Biomed Papers*, 148, 3-10, 2004.
- 6) F. P. Guengurich, : *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39, 1-17, 1999.
- 7) Joseph I. Boullate, Vincent T. Armeniti, : 薬物代謝における特定食品と栄養素でない食事成分の効果 : 食品 - 医薬品相互作用ハンドブック (城西大学薬学部医薬栄養学科訳), pp.152-164, 丸善株式会社、2005.