



Title	腸管モデル細胞における α -defensin5分泌と排出系トランスポーター発現との関連性に関する研究
Author(s)	保田, 元気
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第14412号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14412
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/84560
Type	doctoral thesis
File Information	Genki_Yasuda.pdf



博士学位論文

腸管モデル細胞における α -defensin 5 分泌と
排出系トランスポーター発現との関連性に関する研究

保田 元気

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

臨床薬剤学研究室

令和 3 年 3 月

目次

序論	1
第一章 Caco-2 細胞は α -defensin 5 を分泌する	
第一節 緒言	4
第二節 実験材料および実験方法	5
第三節 研究結果と考察	12
第四節 小括	21
第二章 α -Defensin 5 は TNF- α 発現を介して P-gp 発現量・輸送能を変動させる	
第一節 緒言	22
第二節 実験材料および実験方法	23
第三節 研究結果と考察	27
第四節 小括	43
第三章 Afatinib は α -defensin 5 分泌および P-gp 発現量・輸送機能を変動させる	
第一節 緒言	44
第二節 実験材料および実験方法	46

第三節 研究結果と考察.....	48
第四節 小括.....	57
総括.....	58
参考文献.....	60

略語表

ABC transporters	Atp binding cassette transporters
ALP	Alkaline phosphatase
ATCC	American type culture collection
BCRP	Breast cancer resistance protein
B2M	β -2 Microglobulin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DSMZ	Deutsche sammlung für mikroorganismen und zellkulturen
EGFR-TKIs	Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HBSS	Hank's balanced salt solution
HRP	Horseradish peroxidase
HER2	Human epidermal growth factor receptor type 2
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase
HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1
IL-8	Interleukin 8
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF-kB	Nuclear factor-kappa B

P-gp	P-glycoprotein
PVDF	Polyvinylidene difluoride
SDHA	Succinate dehydrogenase
SOD	Superoxide dismutase
TBP	Tata binding protein
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha

序論

小腸は飲食物を消化・吸収する器官であると同時にヒトの免疫の60%を担う巨大な免疫器官であり、小腸陰窩底部のパネート細胞を介して分泌される抗菌ペプチド、 α -defensin 5は病原微生物の排除と腸内細菌叢の共生に深く関与する[1]。近年、腸管モデル細胞であるCaco-2細胞において α -defensin 5を処理することで炎症性サイトカインであるInterleukin-8 (IL-8)の分泌を増加させることが報告されている[2,3]。IL-8発現は好中球やT細胞等の走化性活性を示す[4-8]ことから、この α -defensin 5はIL-8発現を調節することで生体内の防御機構として重要な役割を果たしていることが考えられる。その一方で、炎症性腸疾患患者の回腸における小胞内 α -defensin 5発現の減少が増悪因子となることが知られている[9,10]ことから、 α -defensin 5発現変動が病態と深く関連する可能性が示されている。さらに、経口抗がん薬もまた α -defensin 5発現に影響を及ぼす[11]ことから副作用や病態との関連が示唆されている。しかしながら、これらの検討は α -defensin 5発現のみの評価であり、 α -defensin 5分泌に関しては検討されていない。

一方、小腸上皮細胞には異物や薬物の輸送を担うトランスポーターが発現しており、ATP binding cassette (ABC) transporters である P-glycoprotein (P-gp) は薬物等の異物の排泄に関与していることが知られている。また、同じく ABC transporters である Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) は薬物の排泄みならず様々な病態に関与することから、排出系トランスポーター発現および機能の変動は異物である基質薬物の体内動態や病態に影響を及ぼす [12-14]。したがって、これら排出系トランスポーターの異物排除の働きは、腸管の免疫機能と協調して働くことが推察されるが、排出系トランスポーターと腸管免疫機能との関連性についての報告は少ない。

腸管モデル細胞である Caco-2 細胞は P-gp や BCRP を発現し、輸送能を測定することが可能なことから、経口抗がん薬等の医薬品や健康食品成分との相互作用の検討に汎用されている [15-17]。

以上の背景から Caco-2 細胞において α -defensin 5 の分泌を測定することができれば、 α -defensin 5 の分泌が炎症性腸疾患等の病態に及ぼす影響や腸管免疫機能と排出系トランスポーターとの関連性を検討することが可能となる。そこで、腸管免疫機能を評価する指標として腸管粘膜を防御する α -defensin 5 と主要な排出系トランスポーターである P-gp、BCRP の発現量

および輸送機能との関連性について明らかにすることを目的として、種々
検討した。

第一章 Caco-2 細胞は α -defensin 5 を分泌する

第一節 緒言

ヒト小腸・刷子縁膜には Alkaline phosphatase (ALP)が発現している。また、消化管モデル細胞である Caco-2 細胞において培養日数の経過に伴い ALP 活性は増加し、微絨毛様の構造を形成することから、小腸上皮細胞様の指標として知られている[18]。一方で、前述のとおり α -defensin 5 と関連する IL-8 発現もまた培養日数の経過に伴い増加し、細胞増殖に関与することが報告されている[19]。従って、Caco-2 細胞の培養日数が α -defensin 5 分泌に影響を及ぼす可能性が考えられる。さらに、セルバンクの異なる Caco-2 細胞においてグルコース輸送担体の輸送活性が異なる[20]ことから、各セルバンクの Caco-2 細胞で α -defensin 5 の分泌を含めた様々な遺伝子発現量が異なることが推察される。そこで我々は、American type culture collection (ATCC)、Deutsche sammlung für mikroorganismen und zellkulturen (DSMZ)、RIKEN の Caco-2 細胞の培養条件が α -defensin 5 分泌に及ぼす影響を検討した。

第二節 実験材料および実験方法

第一項 使用薬物・試薬(購入先)

- ・ Alkaline Phosphatase Assay Kit (BioAssay Systems: QFAP-100)
- ・ Human α -defensin 5 ELISA kit (LifeSpan Biosciences: LS-F37993)
- ・ Human α -defensin 5 peptide (ペプチド研究所)

第二項 使用細胞

使用細胞は ATCC、DSMZ、RIKEN より購入した Caco-2 細胞を使用した。Caco-2 細胞は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に 10% FBS、1% ペニシリンストレプトマイシン、1% Non-essential Amino Acids (NEAA) を添加したものを培養液とし、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

第三項 細胞生存率

細胞生存率は 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay および Trypan blue 染色により評価した。Caco-2 細胞は $0.6-1.8 \times 10^4$ cells/well となるよう調整し、96wells プレートに播種した。MTT を PBS(-)で最終濃度を 5 mg/mL になるように調製しストック溶液とした。Caco-2 細胞を PBS(-)で洗浄した後、MTT 溶液を細胞培地で 250 μ g/mL となるよう混合し、200 μ L/ well 添加後 1 時間インキュベートした。細胞を PBS(-)で洗浄後、Dimethyl sulfoxide (DMSO)を 200 μ L 添加し、ホルマザンを溶解した。ホルマザン溶解液をマイクロプレートリーダー(Tecan)で 562 nm の吸光度を測定した。トリパンプルー染色は 0.4% トリパンプルー (BIO-RAD)を用い、Caco-2 細胞懸濁液 5 μ L と等量混合し、TC20™ 全自動セルカウンター (BIO-RAD) を使用して細胞数及び細胞生存率を測定した [21,22]。

第四項 ALP 活性および α -defensin 5 分泌の測定法

Caco-2 細胞は、 $0.6-1.8 \times 10^4$ cells/well になるよう調整し 96 wells プレートに播種した後、7日間間隔で28日間まで培養した。サンプル採取の24時間前から上清中に分泌されたALP活性をAlkaline Phosphatase Assay Kit (BioAssay Systems: QFAP-100)により測定した。上清中の α -defensin 5分泌量はHuman α -defensin 5 ELISA kit (LifeSpan Biosciences: LS-F37993)を用いてELISA法により測定した。

第五項 RNA 抽出法

Caco-2 細胞は PBS (-)で洗浄した後、ISOGEN II 1 mL を加えて激しくボルテックスし、RNase free 水を 400 μ L 加え転倒混和した。室温で 15 min 静置した後、15,000 \times g で 15 min 遠心を行い、上清を回収した。イソプロパノールを 900 μ L、上清 800 μ L 転倒混和し、室温で 10 min 静置した後、15,000 \times g で 10 min 遠心分離を行った。その後、アスピレーターを使用し上清を抜去、500 μ L の 75% エタノールを加え 12,000 \times g で 5 min 遠心し再度エタノールを除去することを 2 回繰り返した。これによって得られた沈殿を 10-20 μ L の RNase free 水で溶解し RNA 溶液とした。その後、以下の式を用いて total RNA 濃度を算出した。

Total RNA concn. = O.D. 260 nm × Dilution rate × 40 (ng / μL)

その後、逆転写反応を ReverTra Ace (Toyobo)を用いて行った。Table 1 に示す反応液を調製し、30°Cにて 10 min、その後 42°Cにて 60 min、最後に 99°Cにて 5 min の条件で反応させた。

Table 1 Composition of reaction solution for reverse transcription

Component	Volume
5 × RT Buffer	2 μL
dNTP Mix (10 mM each dNTP)	1 μL
Random primer (150 ng / μL)	0.5 μL
ReverTra Ace	0.5 μL
Template RNA (1 μg)	Variable
Nuclease-free water	Variable
Total volume	10 μL

第六項 Real-time PCR 法

Table 2 に示した塩基配列およびプロダクトサイズのプライマーを使用し、それぞれの mRNA 量を KAPA SYBR Fast qPCR kit (KAPA Biosystems) を用いた Real time PCR 法で定量した。反応及び検出には Mx3005P(Agilent Technologies)を使用した。Table 3 に示す反応液を調製し、95 °Cにて 30 sec、その後 90°Cにて 10 sec、各プライマーのアニーリング温度で 30 sec、72 °Cにて 10 sec を 40 回繰り返して反応させた[23,24]。

Table 2 Primer list

product name		sequence	Tm	product size
β-ACTIN	forward	TGGCACCCAGCACAATGAA	60.2	186
	reverse	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	61.7	
18S	forward	GTTGGTTTTTCGGAAGTGGAGGC	60.0	204
	reverse	GTCGGCATCGTTTATGGTTCG	59.4	
HPRT1	forward	GGACTAATTATGGACAGGACTG	55.7	195
	reverse	GCTCTTCAGTCTGATAAAATCTAC	55.1	
GAPDH	forward	CAATGACCCCTTCATTGACC	56.4	106
	reverse	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	58.6	
B2M	forward	CAGCGTACTCCAAAGATTCAGG	59.1	84
	reverse	CCCAGACACATAGCAATTCAGG	59.1	
HMBS	forward	ATTGCTATGTCCACCACAGG	57.6	249
	reverse	GGTTTCTAGGGTCTTCCCAAC	57.9	
TBP	forward	GGATAAGAGAGCCACGAACC	57.8	136
	reverse	GCTGGAAAACCCAACCTCTG	57.2	
SDHA	forward	TGGAGACCTAAAGCACCTGAAG	59.7	183
	reverse	TACTCATCAATCCGCACCTTG	58.1	
mdr1/P-gp	forward	CAGACAGCAGGAAATGAAGTTGAA	59.7	81
	reverse	TGAAGACATTTCCAAGGCATCA	58.2	
BCRP	forward	CAGGTCTGTTGGTCAATCTCACA	60.5	77
	reverse	TCCATATCGTGGAAATGCTGAAG	58.3	
IL-8	forward	AGAGTGATTGAGAGTGGACC	56.3	118
	reverse	ACTTCTCCACAACCCTCTG	56.3	
IL-6	forward	TACCCCCAGGAGAAGATTCC	57.8	166
	reverse	AGTGCTCTTTTGCTGCTTTC	59.0	
IL-1β	forward	TGAGCTCGCCAGTCAAATGA	59.7	199
	reverse	CATGGCCACAACAACCTGACG	60.0	
TNF-α	forward	TCTTCTCGAACCCCGAGTGA	60.3	164
	reverse	ATGAGGTACAGGCCCTCTGA	59.7	
IL-2	forward	TCAAACCTCTGGAGGAAGTGCT	61.3	125
	reverse	CATGAATGTTGTTTCAGATCCCTT	57.7	

Table 3 Component of reaction solution for real time PCR

Component	Volume
Master mix	5 μL
Nuclease-free water	3.6 μL
Primer mic (10 μM each)	0.2 μL
Rox Low	0.2 μL
Template DNA	1 μL
Total volume	10 μL

第七項 統計解析

実験結果は平均±標準偏差または標準誤差で示した。また、有意差の検定は2群比較では Student's t-test、多群比較では Dunnett's test または Tukey test を用いた。

第三節 研究結果と考察

第一項 Caco-2 細胞は細胞播種から 14 日以降に細胞分化を生じる

初めに、培養日数が Caco-2 細胞の分化に及ぼす影響について明らかとするため、培養日数の経過に伴う ALP 活性を検討した。また、3 種の Caco-2 細胞は 7 日でコンフルエントとなるように細胞播種数を調整し、7 日間隔で 7-28 日間培養を行い、サンプル採取の 24 時間前から培養液中に分泌された ALP 濃度を測定した。

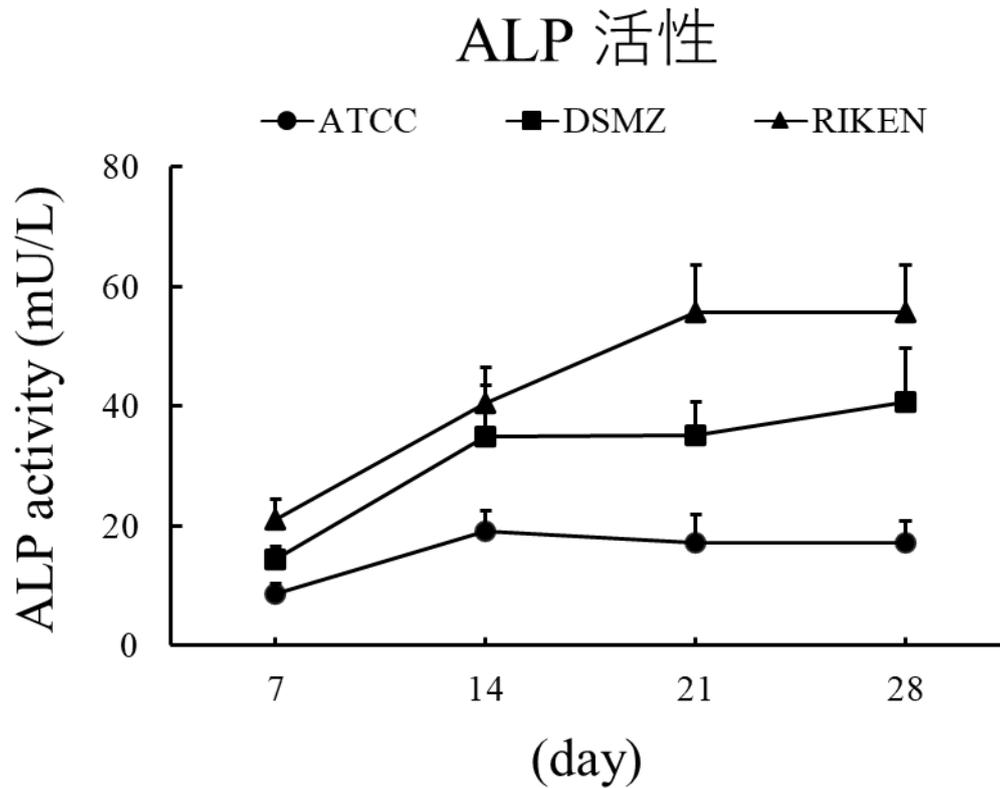


Fig. 1. Different culture days effect on alkaline phosphatase activity (ALP) levels in each Caco-2 cell. Data are presented as the means with S.D. (error bars) from 9 determinations.

その結果、いずれの Caco-2 細胞においても細胞播種から 14 日以降に横ばい傾向を示した。したがって、Caco-2 細胞は細胞播種から 14 日以降に細胞分化を生じることが明らかとなった (Fig. 1)。

第二項 Caco-2 細胞は α -defensin 5 を分泌する

次に、培養日数の経過が α -defensin 5 分泌に及ぼす影響を明らかにするため、前項と同様にサンプル採取の 24 時間前から上清中に分泌された α -defensin 5 分泌量を ELISA 法により測定した。

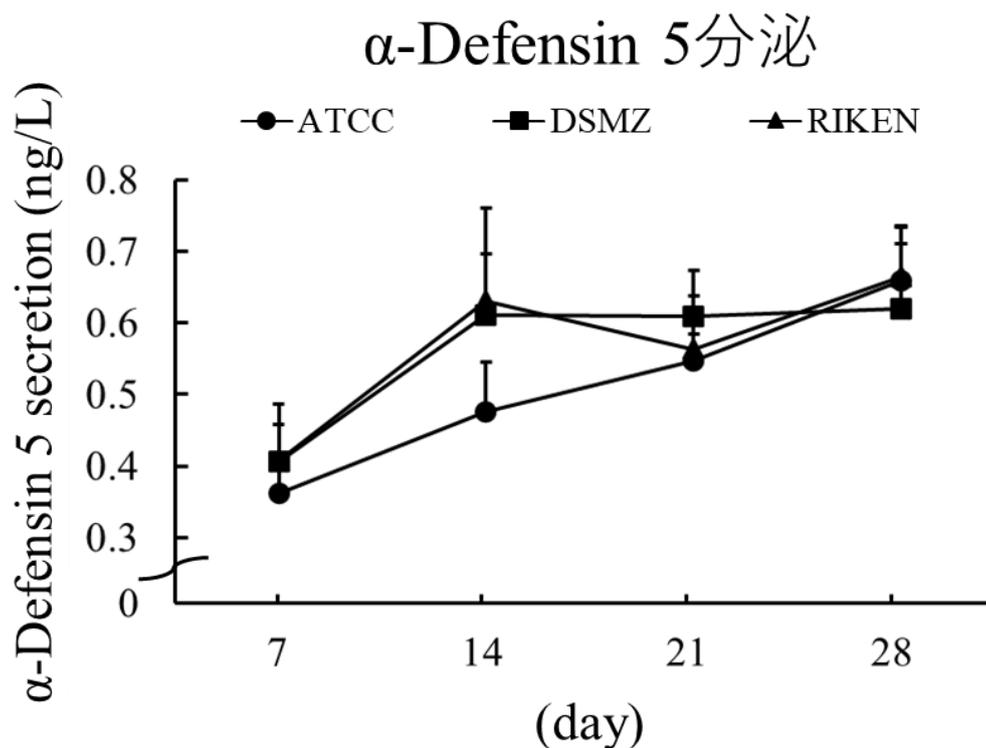


Fig. 2. Different culture days effect on α -defensin 5 secretion levels in each Caco-2 cell. Data are presented as the means with S.D. (error bars) from 9 determinations.

その結果、DSMZ および RIKEN の Caco-2 細胞においては細胞播種から 14 日後に横ばい傾向となった一方で、ATCC の Caco-2 細胞における α -defensin 5 分泌量は培養日数の経過に伴い直線的に増加した (Fig. 2)。以上の結果から、いずれの Caco-2 細胞においても α -defensin 5 が分泌されることが明らかとなった。また、ATCC の Caco-2 細胞の α -defensin 5 分泌量に直線性が見られたことから、以降の検討には ATCC の Caco-2 細胞を用いることとした。

第三項 培養日数の経過はサイトカイン mRNA 量に影響を及ぼす

α -Defensin 5 曝露は炎症性サイトカインである IL-8 発現量を増加させることが報告されている [2,3]。そこで培養日数の経過が IL-8 やその他のサイトカインの mRNA 量に与える影響を検討するため、遺伝子発現解析の補正を行うためのハウスキーピング遺伝子の発現量を測定した。また、ハウスキーピング遺伝子は Caco-2 細胞に発現する 18S、 β -ACTIN、GAPDH、TBP、SDHA、HMBS、HPRT1、B2M の遺伝子を用いた。

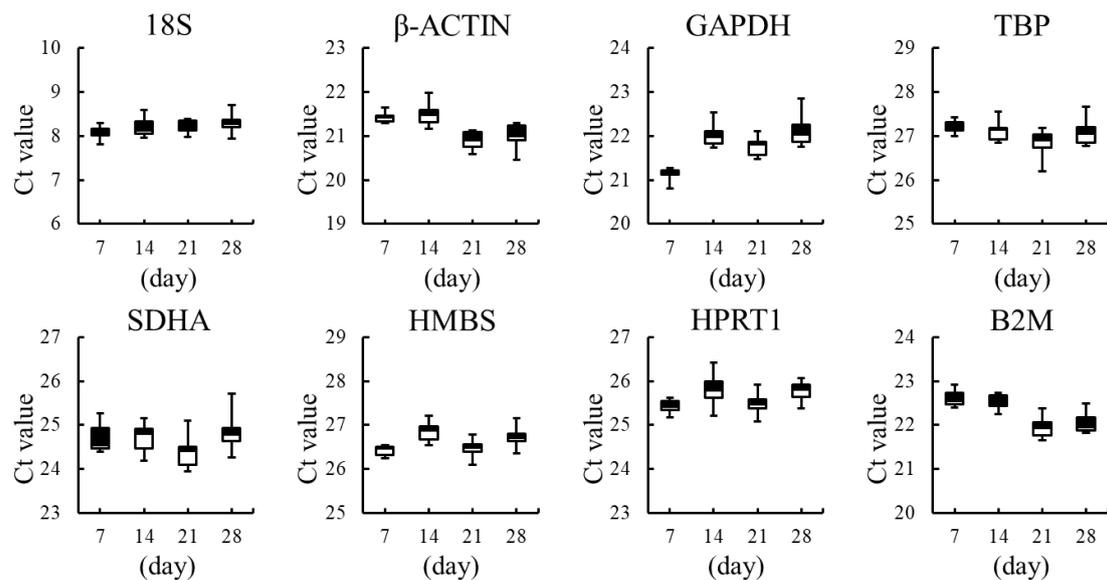


Fig. 3. Different culture days effect on housekeeping genes mRNA levels that 18S, β -ACTIN, GAPDH, TBP, SDHA, HMBS, HPRT1 and B2M in ATCC Caco-2 cells. Data are presented as the median with maximum or minimum range from 9 determinations.

その結果、18S は最も培養日数の影響を受けないことが明らかとなった(Fig. 3)ことから、以降の検討にハウスキーピング遺伝子として 18S を用いることとした。次に、培養日数の経過がサイトカイン発現に及ぼす影響を明らかとするため、同条件化における IL-8、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-2 mRNA 量を測定した。

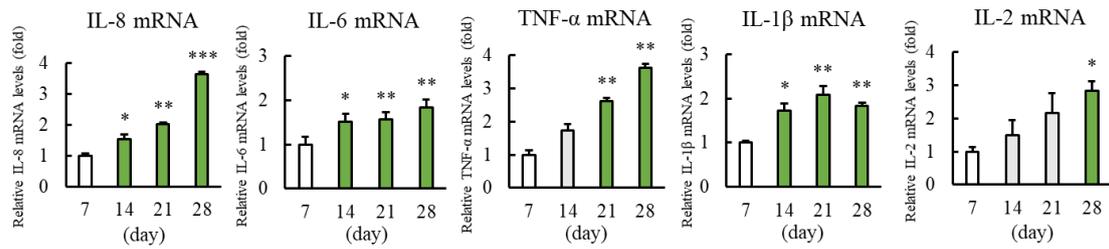


Fig. 4. Different culture days effect on IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β and IL-2 mRNA levels in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S housekeeping gene. Data are presented as the means with S.E. (error bars) from 3 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, *P<0.001 vs. cell culture for 7 days by Dunnett's test.**

その結果、IL-8を始めとするいずれのサイトカインの mRNA 量は培養日数の経過に伴い上昇し、特に IL-8、IL-6 ならびに TNF- α の mRNA 量は α -defensin 5 分泌と同様の傾向を示した(Fig. 4)。したがって、これらサイトカイン発現変動と α -defensin 5 分泌が関連している可能性が示された。

第四項 α -Defensin 5 分泌機序にサイトカイン発現が関与する

そこで次に、サイトカイン発現変動に α -defensin 5 が関与するかを検証した。ヒト回腸内における α -defensin 5 濃度は 6~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であること [10] から、18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう調整して Caco-2 細胞を処理した。その後、24 時間後におけるサイトカイン mRNA 量を測定した。

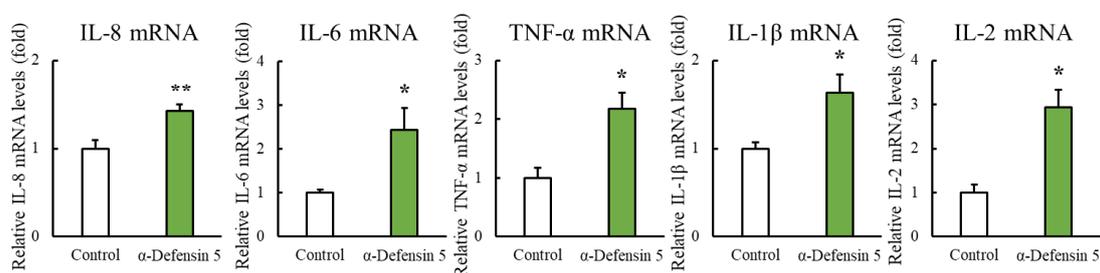


Fig. 5. Effect of 24 h exposure to 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -defensin 5 on mRNA of IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β and IL-2 mRNA levels in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S housekeeping gene. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control by t-test.

その結果、 α -defensin 5 曝露はいずれのサイトカインの mRNA 量を上昇させた (Fig. 5)。これらの結果から、 α -defensin 5 分泌はサイトカイン発現と関連することが示唆された。

α -defensin 5 の分泌の機序として、細菌の構成成分を認識した後に、転写に関連する nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の経路が関与し、 α -defensin 5 の合成が促進されることが報告されている (Fig. 6a) [25]。一方で、サイトカイン発現もまた NF- κ B 経路と一部関連し、フィードバックを受けることが報告されている (Fig. 6b) [26]。したがって、 α -defensin 5 と TNF- α を始めとするサイトカイン発現の間に NF- κ B 経路を介したシグナル経路が影響している可能性が推察される。

一方で、Caco-2 細胞から分泌される α -defensin 5 濃度はヒト回腸内濃度より低いことが示された。この α -defensin 5 濃度の差は細胞数の違いによるものであることが考えられるが、Caco-2 細胞において培養日数の経過に伴うサイトカイン発現変動は培養期間の長期的な α -defensin 5 曝露による影響の可能性も考えられる。

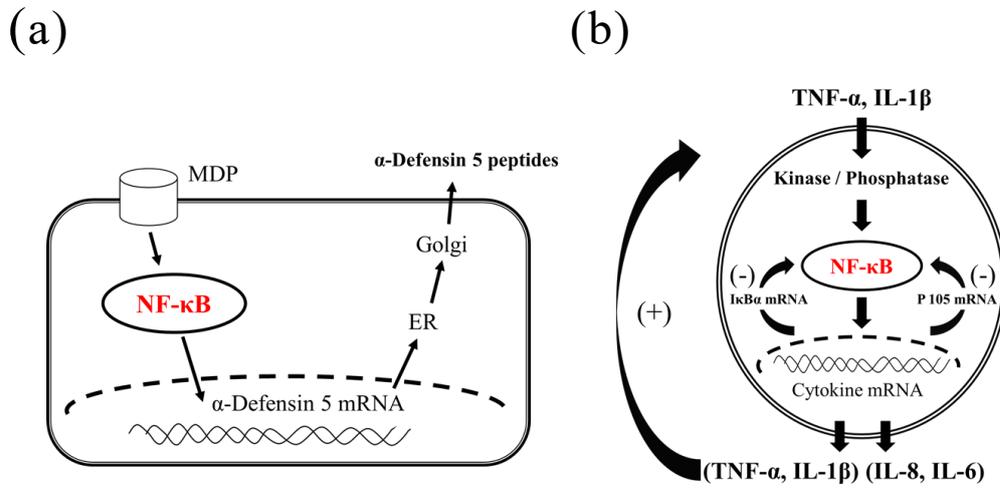


Fig. 6. Graphical abstract of research conducted by Yang E et al, titled “The roles and functions of Paneth cells in Crohn’s disease: A critical review [25]”. (a) and Blackwell T S et al, titled “The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation [26]”. (b)

第四節 小括

1. 3種のCaco-2細胞は細胞播種から14日以降に細胞分化を生じ、 α -defensin 5を分泌した。
2. α -defensin 5の分泌の機序にサイトカイン発現が関与することが示唆された。

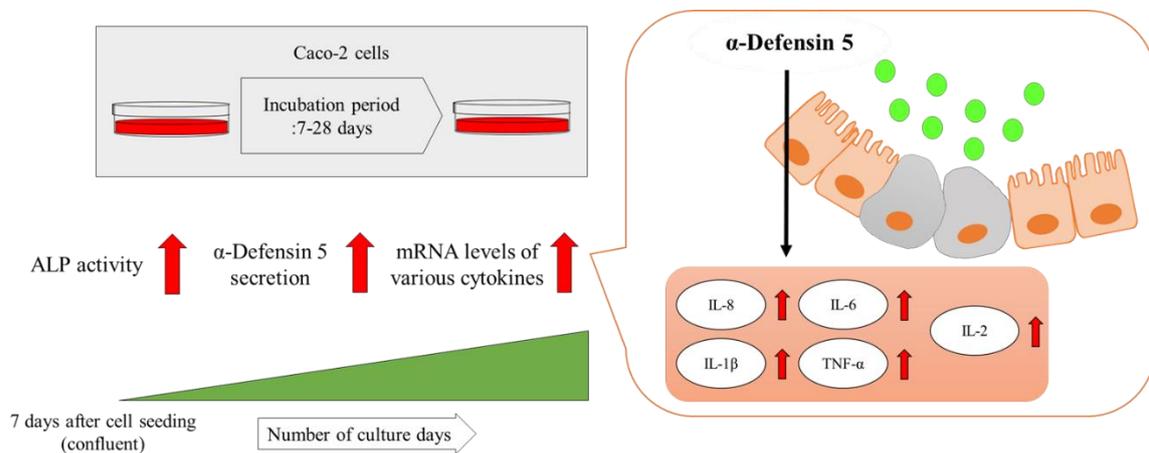


Fig. 7. Graphical abstract of research conducted by Yasuda G et al, titled

“Analysis of α -defensin 5 secretion in differentiated Caco-2 cells:

Comparison of Cell Bank Origin [27]”.

第二章 α -Defensin 5 は TNF- α 発現を介して P-gp 発現量・輸送能を変動させる

第一節 緒言

Caco-2 細胞において様々なトランスポーターが発現していることから、腸管上皮細胞モデルとして医薬品や健康食品成分がトランスポーターに及ぼす影響に関する研究に汎用されている [28-34]。

また、異物排除の働きを担う排出系トランスポーターである P-gp および BCRP の発現および輸送機能はサイトカイン発現と関連することが報告されている [23,24,35,36]。したがって、これまでの検討によりサイトカイン発現との関連が示唆された α -defensin 5 が P-gp および BCRP 発現に影響を及ぼす可能性が推測される。

そこで、Caco-2 細胞における α -defensin 5 分泌が主要な排出系トランスポーターである P-gp および BCRP の発現量・輸送能に及ぼす影響を明らかにすべく種々検討を行った。

第二節 実験材料および実験方法

第一項 使用薬物・試薬(購入先)

- ・ Human α -defensin 5 peptide(ペプチド研究所)
- ・ Human TNF-alpha Recombinant (PeproTech Inc.)

第二項 使用細胞

使用細胞は ATCC より購入した Caco-2 細胞を使用した。Caco-2 細胞は DMEM に 10%FBS、1%ペニシリンストレプトマイシン、1%NEAA を添加したものを培養液とし、37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。

第三項 細胞生存率

第一章 第二節 第三項で述べた。

第四項 RNA 抽出法

第一章 第二節 第五項で述べた。

第五項 Real-time PCR 法

第一章 第二節 第六項で述べた。

第六項 タンパク質発現量評価

Total タンパク質は Caco-2 細胞を 1% Triton X-100、0.1% SDS、プロテアーゼインヒビター(Roche)を PBS(-)の緩衝液で可溶化し抽出した。また、タンパク質の定量は BSA を標識タンパク質とし、Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo) を用いて行った。P-gp はライセートとローディングバッファー 4% SDS、10% 2-mercaptoethanol、20% glycerol、0.004% bromophenol blue、0.125 M Tris-HCl、pH 6.8)を 1:1 で混合した。BCRP はライセートとローディングバッファーと 9M Urea を 1:4:5 で混合した。P-gp は 7.5 %、BCRP は 10% SDS-PAGE で分離し、15V の電圧を 90 分かけ、PVDF 膜に転写した。転写バッファーは P-gp のみ不連続バッファー(1 液:0.3 M Tris、pH 10.4、20 % Methanol、2 液: 25 mM Tris、pH 10.4、20 % Methanol、3 液: 25 mM Tris、pH 7.6、20 % Methanol、40 mM 6- aminocaproic acid)を用い、純セルロース製ブロッキング用ろ紙(GE Healthcare)に 1 液は 4 枚(陽極側のろ紙)、2 液は 2 枚(ゲルと接するろ紙)、3 液(ゲル、メンブレン、陰極側のろ紙)は 2 枚をそれぞれの液を浸した。BCRP は連続バッファーを用いて

転写した。BCRP は 1 %、P-gp は 5%となるよう 0.05%の Tween 20 を含む PBS 洗浄バッファー にスキムミルクを溶解させ、ブロッキング剤とし室温で 1 時間ブロッキングした。1 次抗体は、Anti-Actin Antibody (Millipore)を PBS 洗浄バッファーに 2,000 倍希釈し、一晩 4°Cでインキュベートした。

Anti-P Glycoprotein, Mouse-Mono [C219] (GENETEX, Inc.)を 2.5%スキムミルクを含んだ PBS 洗浄バッファーを用いて 100 倍希釈、Anti-BCRP/ABCG2 抗体 [BXP-21] (abcam)を 0.5%スキムミルクを含んだ PBS 洗浄バッファーを用いて 500 倍希釈し、一晩 4 °Cでインキュベートした。Horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体は、goat anti-mouse IgG1 抗体 (Southern Biotech)を 2.5%スキムミルクを含んだ PBS 洗浄バッファーで 1,000 倍希釈、mouse anti-rabbit IgG 抗体(Santa Cruz Biotechnology)を 0.5% スキムミルクを含んだ PBS 洗浄バッファーで 1,000 倍希釈し、1 時間室温でインキュベートした。蛍光検出用試薬 ECL(GE Healthcare) または ECL prime (GE Healthcare) を用いて化学発光させ、画像解析装置 ImageQuant LAS 4000 システム(GE Healthcare)を用いて可視化した。画像解析は ImageJ を用いた [23,24,35]。

第七項 P-gp 輸送能評価

P-gp 輸送能は Rhodamine123 蓄積量を測定することで評価した。Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)で Caco-2 細胞を 10 min プレインキュベートした後、10 μ M Rhodamine123 in HBSS を加え 1 時間インキュベートした。その後、HBSS で 2 度洗浄し、1% Triton X in HBSS で細胞を溶解させた後、BCA 法によりタンパク定量を行った。さらに、そのライセートに 1:1 Acetonitrile を加え、遠心分離した後、上清を回収した。サンプルは 96 well Black plate (Coster®)に入れ、マイクロプレートリーダー(Tecan)で 500/550 nm の蛍光強度を測定した[37,38]。

第八項 統計解析

実験結果はすべて平均 \pm 標準誤差で示した。また、有意差の検定は 2 群比較では Student's t-test、多群比較では Dunnett's test を用いた。

第三節 研究結果と考察

第一項 培養日数の経過は P-gp 発現を変動させる

まず、培養日数の経過が腸管免疫機能と関連する可能性のある P-gp および BCRP 発現量に及ぼす影響を検討した。

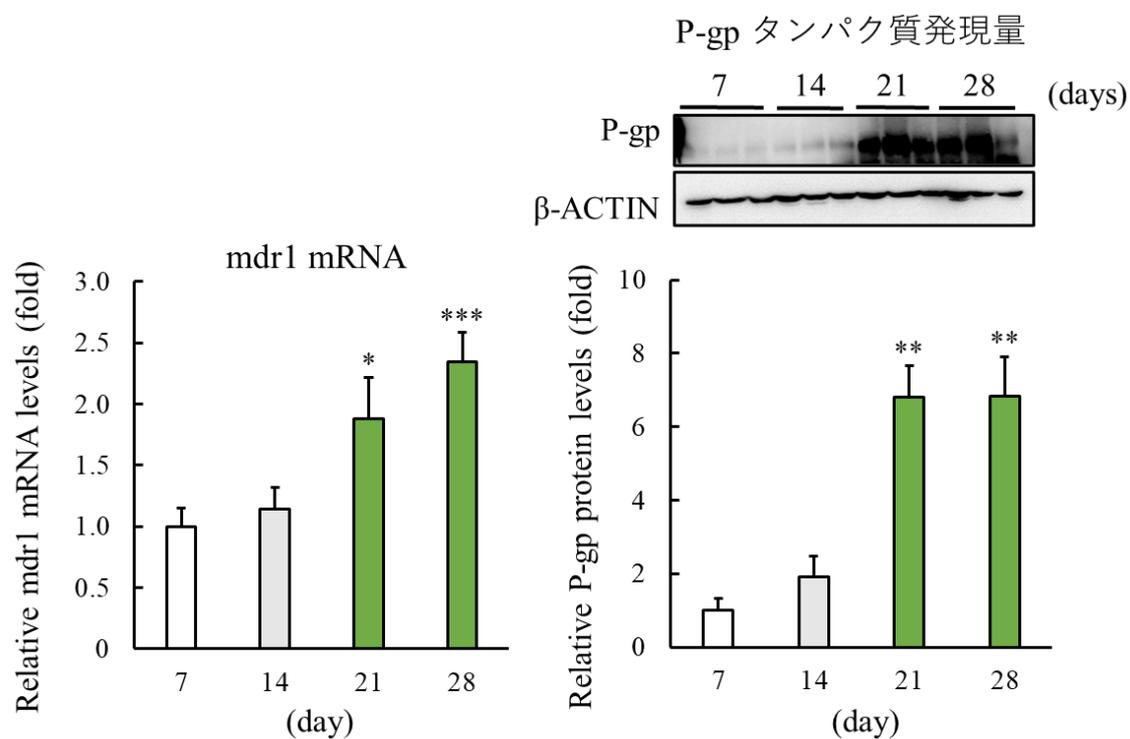


Fig. 8. Different culture days effect on mdr1 mRNA levels or protein levels in

ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S

housekeeping gene. Data are presented as the means with S.E. (error bars) from

3 independent experiments. * <0.05, ** <0.01, * <0.001 vs. cell culture for 7**

days by Dunnett's test.

その結果、細胞播種から 21 日以降において P-gp mRNA 量およびタンパク発現量は上昇した(Fig. 8)ことから、培養日数の経過は P-gp 発現量に影響を及ぼすことが明らかとなった。

次に、培養日数の経過が BCRP 発現量に及ぼす影響について同様に検討した。

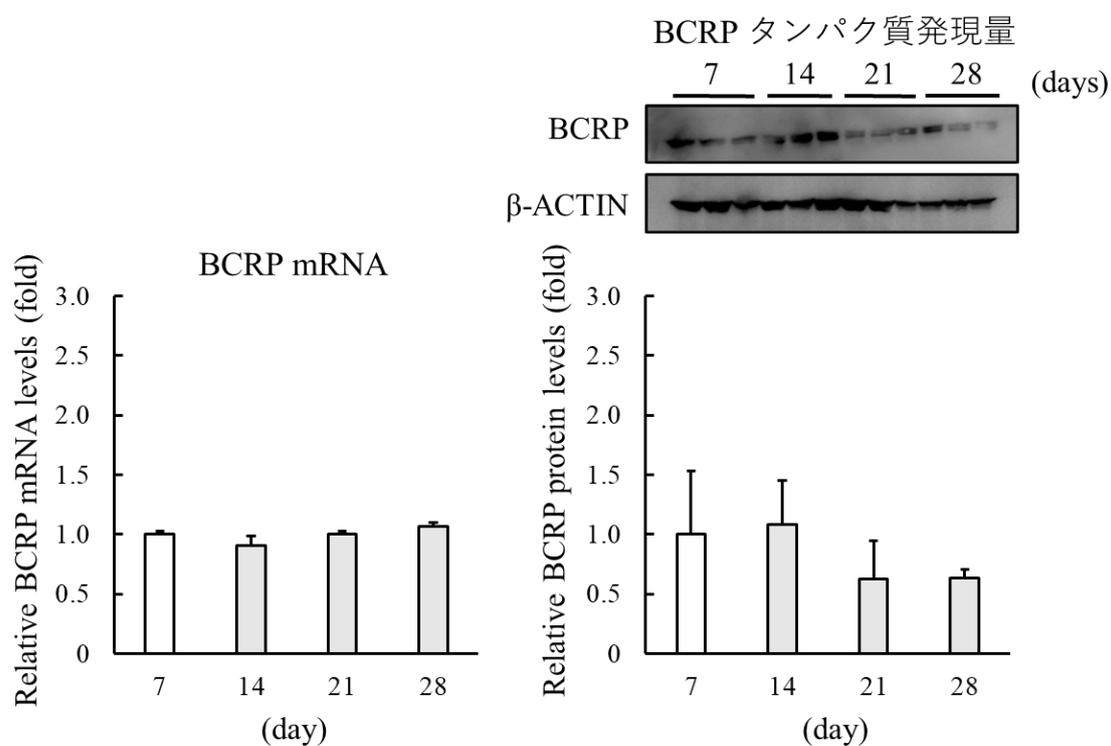


Fig. 9. Different culture days effect on BCRP mRNA levels or protein levels

in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S

housekeeping gene. Data are presented as the means with S.E. (error bars) from

3 independent experiments.

その結果、培養日数の経過は BCRP mRNA 量およびタンパク発現量を変動させなかった(Fig. 9)ことから、培養日数は BCRP 発現に影響を及ぼさない可能性が示された。

第二項 α -defensin 5 曝露は P-gp 発現量・輸送機能を上昇させる

前章において、 α -defensin 5 が培養日数の経過に伴い上昇することが示されている。したがって、 α -defensin 5 の P-gp 発現変動への関与を明らかにするため、18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -defensin 5 処理後 24 時間後における P-gp 発現量を測定した。

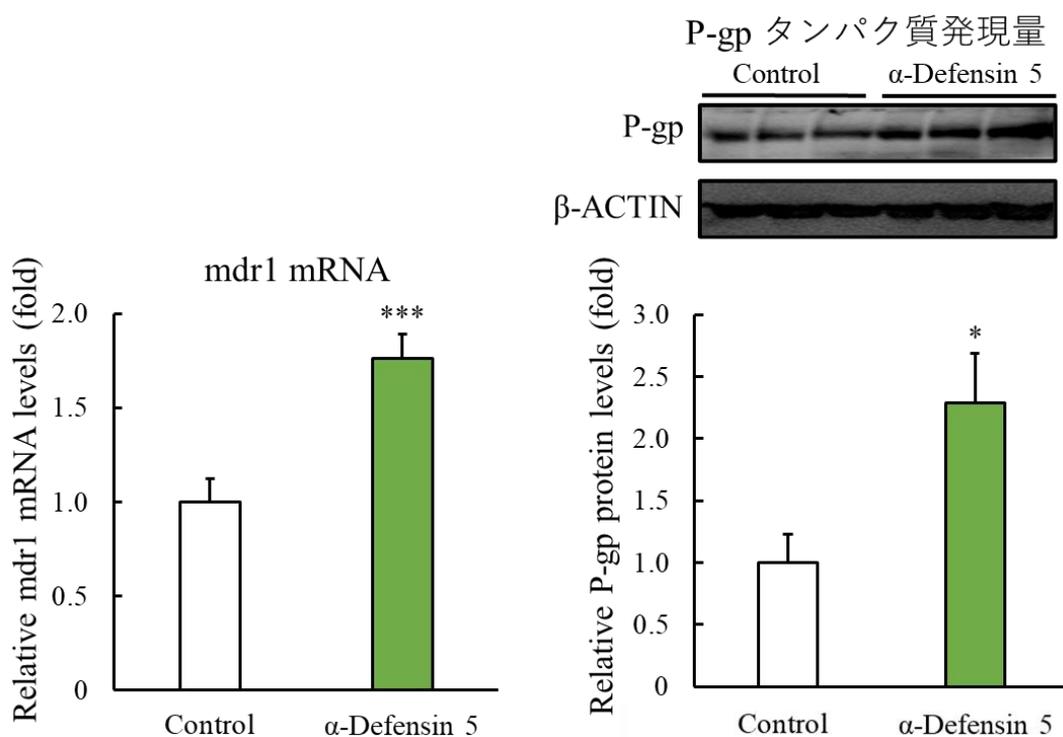


Fig. 10. Effect of 24 h exposure to 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -defensin 5 on *mdr1* mRNA

levels or protein levels in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were

normalized to the 18S housekeeping gene. Data are presented as means with

S.E. (error bars) of 3 independent experiments. * $P < 0.05$, * $P < 0.001$ vs.**

control by t-test.

その結果、 α -defensin 5 曝露は *mdr1* mRNA 量および P-gp 発現量を有意に上昇させた (Fig. 10)。この結果から、 α -defensin 5 は P-gp 発現変動に関与することが示唆された。

次に、 α -defensin 5 処理時における P-gp の機能変動を明らかとすべく、基質である Rhodamine 123 の細胞内蓄積量を評価することとした。

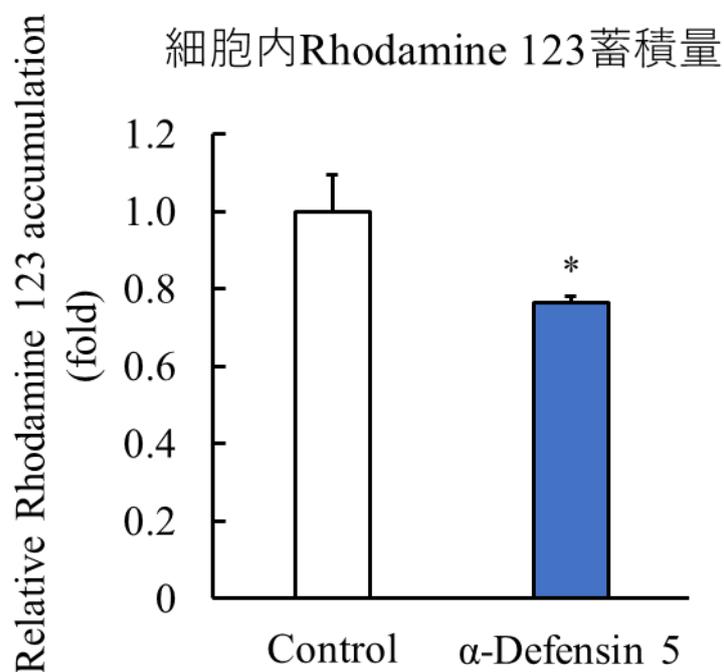


Fig. 11. Effect of 24 h exposure to 18 μ g/mL α -defensin 5 on Rhodamine 123 accumulation in ATCC Caco-2 cells. Rhodamine 123 accumulation were normalized to amount of protein. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. *P < 0.05 vs. Control by t-test.

その結果、 α -defensin 5 曝露は細胞内 Rhodamine 123 蓄積量を低下させた (Fig. 11) ことから、P-gp の機能亢進が示された。以上の結果から、 α -defensin 5 曝露時における P-gp の機能亢進は P-gp 発現増大によるものであること、 α -defensin 5 は P-gp の発現および機能と協調して異物排除の働きをする可能性が示された。さらに、P-gp 発現量は TNF- α 発現に関連することが報告されている [35,39]。したがって、 α -defensin 5 曝露により誘導されたサイトカイン発現が P-gp 発現量に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

第三項 α -defensin 5 は BCRP 発現量に影響を及ぼさない

次に、 α -defensin 5 処理時における BCRP 発現量を測定した。

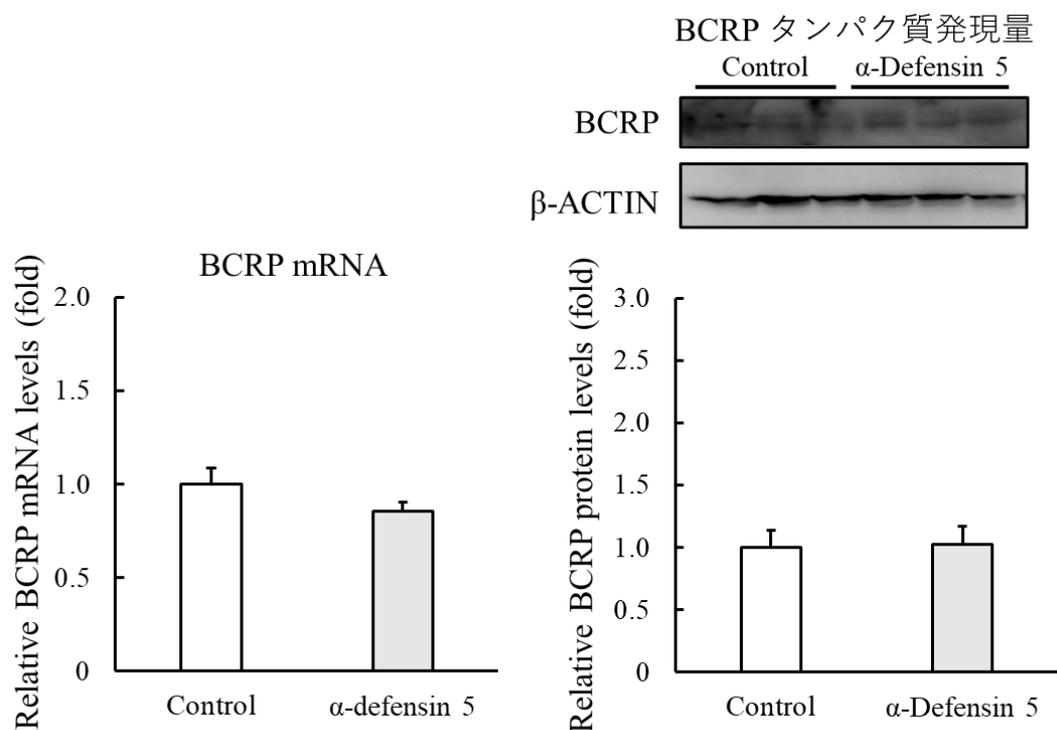


Fig. 12. Effect of 24 h exposure to 18 μ g/mL α -defensin 5 on BCRP mRNA levels or protein levels in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S housekeeping gene.

その結果、 α -defensin 5 曝露は BCRP mRNA 量およびタンパク発現量を変動させなかった(Fig. 12)。この結果は、前述のとおり培養日数の経過により α -defensin 5 分泌が変動する一方で、BCRP 発現は変動しなかった(Fig. 9) ことと相関することが考えられる。

第四項 α -defensin 5 は酸化ストレス応答性に影響を及ぼす

次に、 α -defensin 5 による P-gp 発現量および機能変動の機序について明らかにすることとした。これまでの検討において α -defensin 5 により誘導されることが示されたサイトカイン発現と関連の深い酸化ストレス応答性に着目した。そこで、 α -defensin 5 処理が酸化ストレス応答性に関連する Superoxide dismutase (SOD) の mRNA 量に及ぼす影響を測定した。

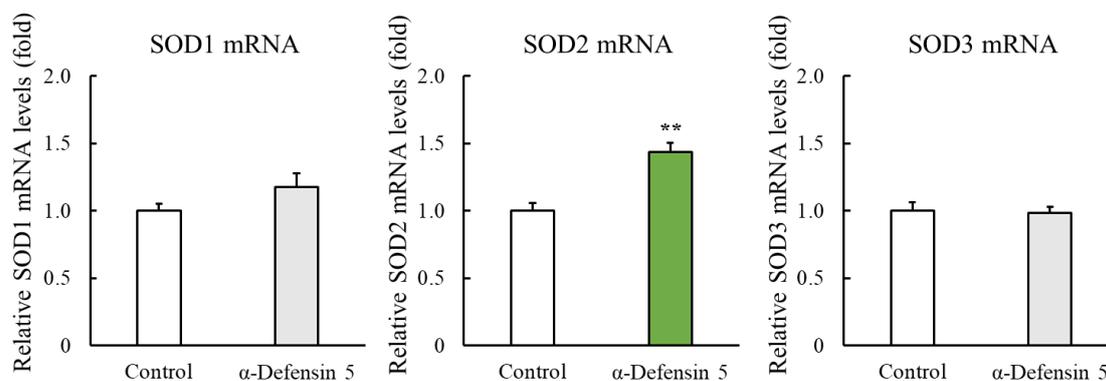


Fig. 13. Effect of 24 h exposure to 18 μ g/mL α -defensin 5 on mRNA of SOD1, SOD2 and SOD3 in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S housekeeping gene. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. **P < 0.01 vs. control by t-test.

その結果、 α -defensin 5 曝露は SOD1 および SOD3 mRNA 量を変動させなかったが、SOD2 mRNA 量を有意に上昇させた(Fig. 13)。この結果から、 α -defensin 5 は酸化ストレス応答性に影響を及ぼすことが明らかとなった。

SOD2 はミトコンドリアに局在し、TNF- α が誘導する ROS に応答し抗酸化作用を示す(Fig. 14) [40]。また、そのシグナルに NF- κ B 経路を一部介することから、TNF- α や IL-1 β 発現と関連することが報告されている。したがって、 α -defensin 5 曝露時における SOD2 発現変動に TNF- α が関与することが推察された。

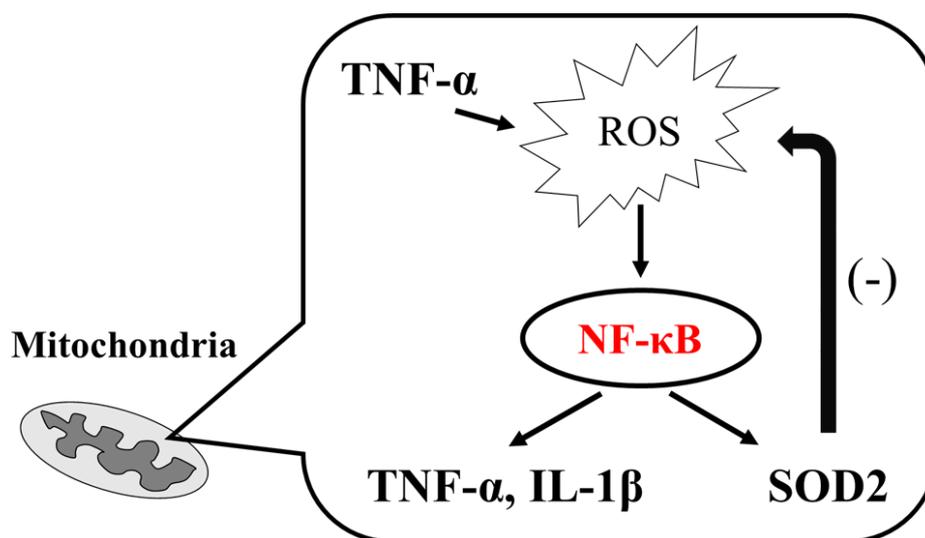


Fig. 14. Graphical abstract of research conducted by Zuo J et al, titled “TNF- α -mediated upregulation of SOD-2 contributes to cell proliferation and cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma [40]”.

第五項 TNF- α は酸化ストレス応答性を変動させる

そこで、P-gp の発現および輸送機能に影響を及ぼす可能性のある TNF- α が酸化ストレス応答性と関連するかを明らかとするため、TNF- α recombinant を用いて TNF- α 曝露が酸化ストレス応答性に及ぼす影響を検討した。

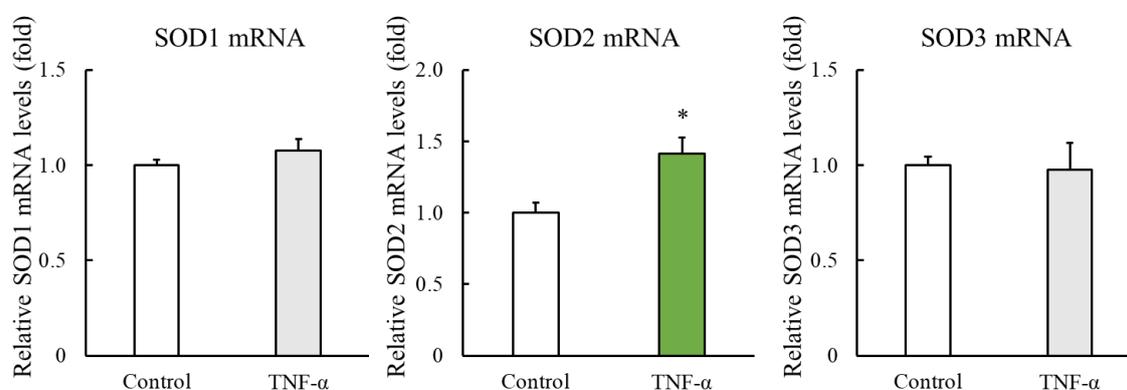


Fig. 15. Effect of 24 h exposure to 100 ng/mL TNF- α on SOD1, SOD2 and SOD3 mRNA levels in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S housekeeping gene. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. *P < 0.05 vs. control by t-test.

その結果、TNF- α 処理において SOD2 の mRNA 量を有意に上昇させた (Fig. 15)ことから、TNF- α は酸化ストレス応答性を誘導する可能性が示され

た。またこの結果は、 α -defensin 5 曝露が SOD1-3 mRNA 量に及ぼす影響と同様の傾向を示している。

第六項 TNF- α はサイトカイン発現量を上昇させる

これまでに α -defensin 5 処理がサイトカイン発現と関連が示されたが、これらのサイトカイン発現変動に TNF- α が関与するかを検証するため、TNF- α 処理時におけるサイトカインの mRNA 量を測定した。

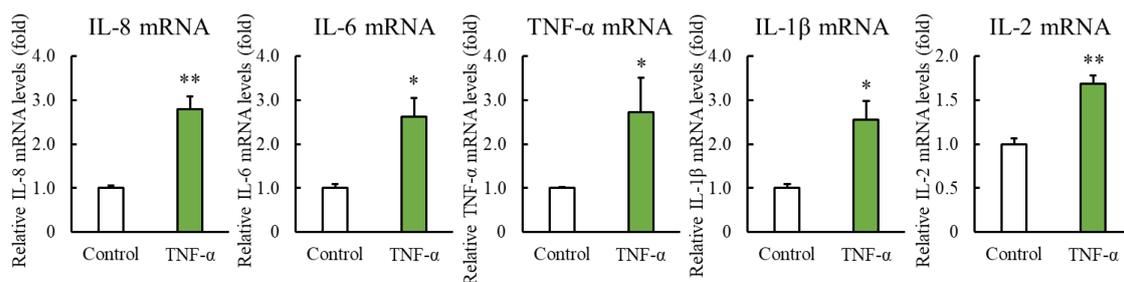


Fig. 16. Effect of 24 h exposure to 100 ng/mL TNF- α on IL-8, IL-6, TNF- α ,

IL-1 β and IL-2 mRNA levels in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were

normalized to the 18S housekeeping gene. Data are presented as means with

S.E. (error bars) of 3 independent experiments. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control

by t-test.

その結果、TNF- α 曝露はいずれのサイトカインの mRNA 量を上昇させ (Fig. 16)、これまでに検討した α -defensin 5 処理時の結果と同様の傾向を示した。したがって、 α -defensin 5 曝露時におけるサイトカインの発現上昇に TNF- α が関与している可能性が示された。

第七項 TNF- α は P-gp 発現量および輸送機能を上昇させる

TNF- α 処理が P-gp 発現を変動させるかを明らかにするため、TNF- α 処理時における P-gp 発現量を測定した。

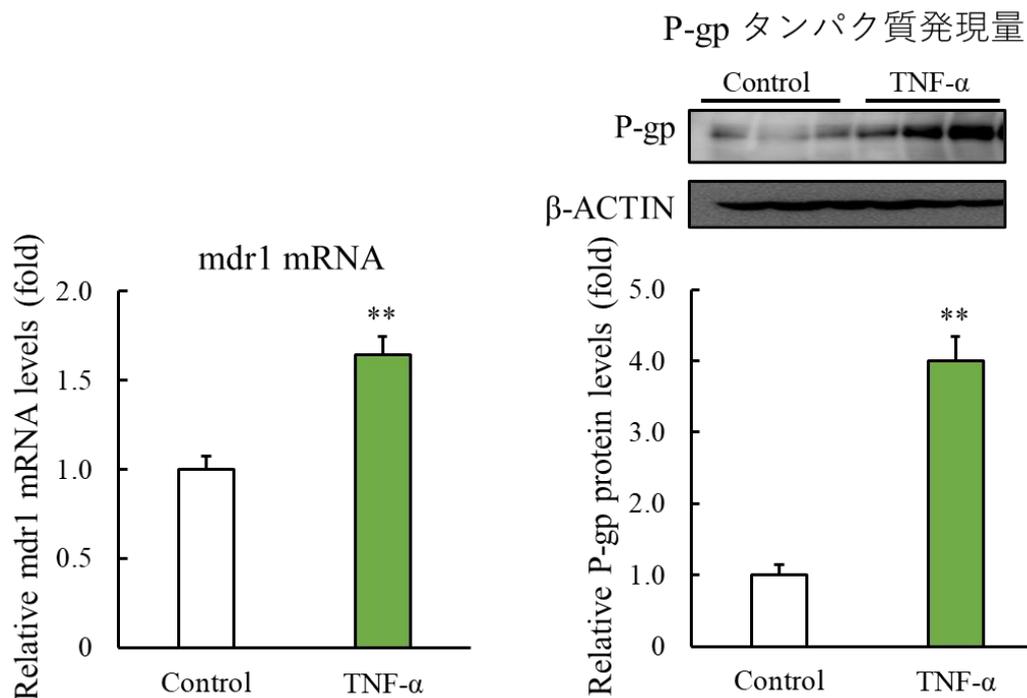


Fig. 17. Effect of 24 h exposure to 100 ng/mL TNF- α on mdrl mRNA levels or P-gp protein levels in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S housekeeping gene. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. **P < 0.01 vs. control by t-test.

その結果、TNF- α 曝露は mdrl mRNA 量およびタンパク発現量を上昇させた(Fig. 17)。この結果から、 α -defensin 5 曝露時における P-gp 発現変動に TNF- α が関与する可能性が示唆された。

次に、TNF- α 処理が P-gp の輸送機能に及ぼす影響についても検討した。

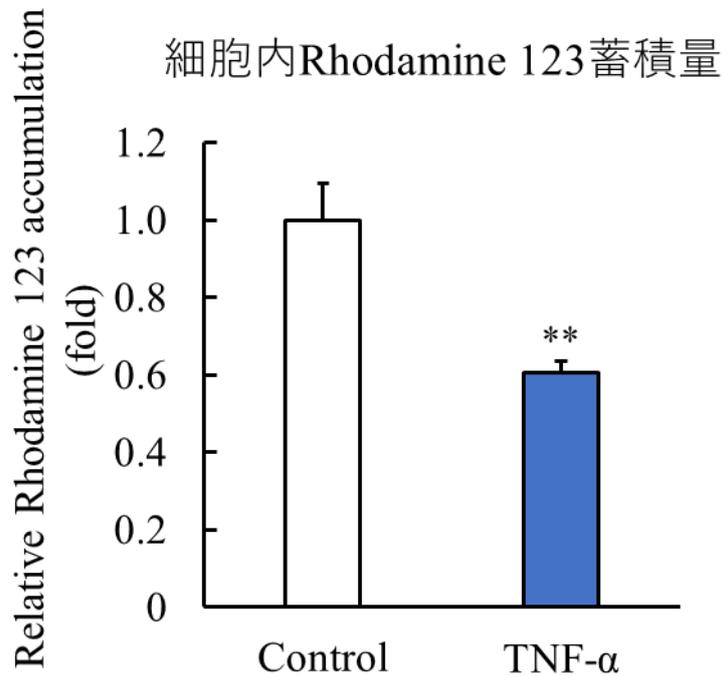


Fig. 18. Effect of 24 h exposure to 100 ng/mL TNF- α on Rhodamine 123 accumulation in ATCC Caco-2 cells. Rhodamine 123 accumulation were normalized to amount of protein. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. *P < 0.05 vs. Control by t-test.

その結果、TNF- α 曝露は細胞内 Rhodamine 123 蓄積量を有意に低下させた(Fig. 18)ことから、P-gp の機能亢進が示唆された。以上の結果から、 α -defensin 5 曝露時における P-gp 発現および機能変動に TNF- α が関与する可能性が示された。

第八項 TNF- α 曝露は α -defensin 5 分泌能を変動させない

最後に、 α -defensin 5 と TNF- α のどちらが上流のシグナルとして作用しているかを明らかとするため、TNF- α 処理時の α -defensin 5 分泌を測定した。

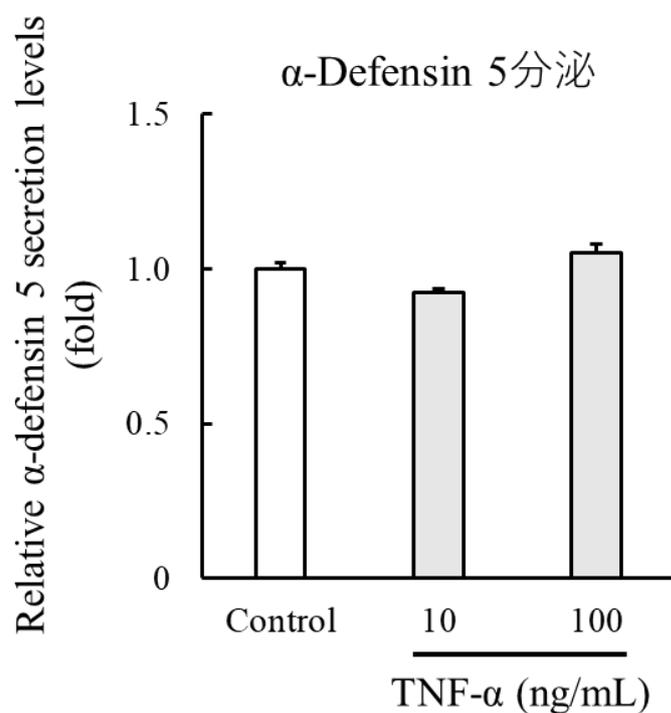


Fig. 19. Effect of 24 h exposure to 10-100 ng/mL TNF- α on α -defensin 5 secretion levels in ATCC Caco-2 cells. α -Defensin 5 secretion levels were normalized to the cell viability. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments.

その結果、TNF- α 曝露は α -defensin 5 分泌能を変動させなかった(Fig. 19)。以上の結果から、 α -defensin 5 が上流のシグナルとなり TNF- α 発現を上昇させ、P-gp 発現量および輸送機能に影響を及ぼしていることが示唆された。

第四節 小括

1. Caco-2 細胞の培養日数の経過に伴い α -defensin 5 分泌および P-gp 発現は変動した一方で、BCRP 発現は変動しなかったことから、 α -defensin 5 は P-gp 発現および輸送機能と関連することが示唆された。
2. TNF- α は P-gp 発現および機能を上昇させたが、 α -defensin 5 分泌に影響を及ぼさないことから、 α -defensin 5 曝露時における TNF- α の発現上昇が P-gp 発現および機能を変動させる可能性が示された。

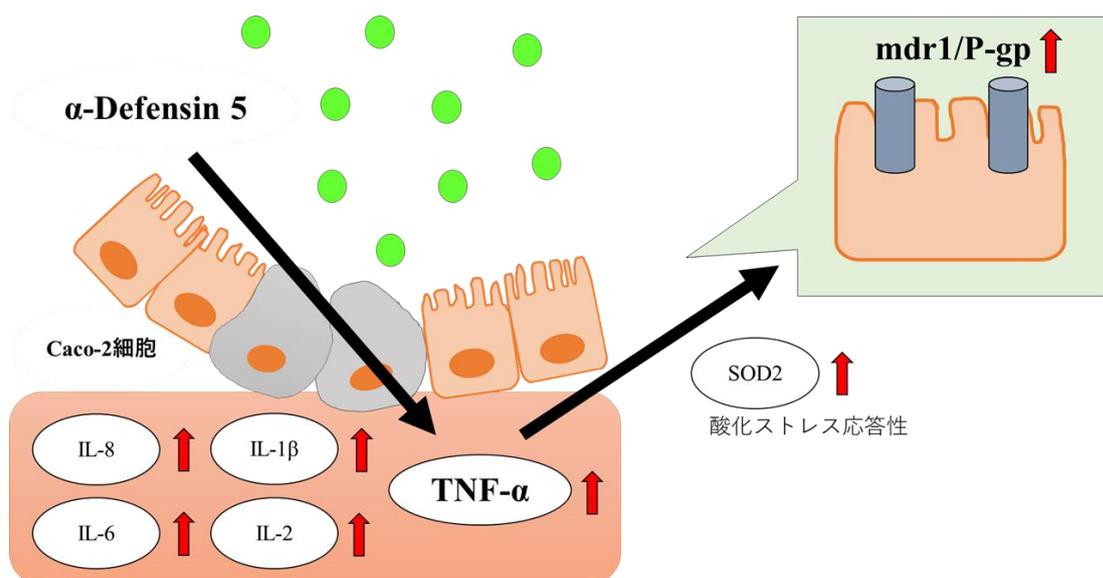


Fig. 20. Summary of section 2

第三章 Afatinib は α -defensin 5 分泌および P-gp 発現量・輸送機能を変動

させる

第一節 緒言

Afatinib (GIOTRIF®)は第二世代の Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs)であり、EGFR 遺伝子変異陽性の手術不能または再発非小細胞肺癌に適応をもつ経口抗がん薬である[41-44]。Afatinib は EGFR-TKI 作用に加えて、human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) 阻害作用も併せもち、高頻度に消化管障害が生じる[45,46]ことから α -defensin 5 分泌に影響を及ぼすことが推察される。しかしながら、Afatinib が α -defensin 5 分泌に及ぼす影響に関する報告は皆無である。Afatinib が α -defensin 5 分泌に影響を及ぼすことが明らかとなれば、Afatinib 服用時に生じうる腸管免疫機能の変動および、これまでに α -defensin 5 との関連が示された P-gp の基質薬物の体内動態に及ぼす影響に関するエビデンスの一旦となる可能性が考えられる。

本章では、Afatinib が α -defensin 5 分泌に及ぼす影響を評価し、 α -defensin 5 との関連が示唆された P-gp の発現および機能との関連性を明らかにすることを目的とし種々検討した。

Afatinib は 1 日 1 回 40 mg 投与されることから、ヒト小腸における Afatinib 曝露濃度は約 77 μM と算出される [47]。そこで、Afatinib 濃度を 50 μM となるよう培養液に溶解し用いた。

第二節 実験材料および実験方法

第一項 使用薬物・試薬(購入先)

・ Afatinib(ChemScience)

第二項 使用細胞

第一章 第二節 第二項で述べた。

第三項 細胞生存率

第一章 第二節 第三項で述べた。

第四項 RNA抽出法

第一章 第二節 第五項で述べた。

第五項 Real-time PCR 法

第一章 第二節 第六項で述べた。

第六項 タンパク質発現量評価

第二章 第二節 第五項で述べた。

第七項 P-gp 輸送機能評価法

第二章 第二節 第六項で述べた。

第八項 統計解析

実験結果はすべて平均±標準誤差で示した。また、有意差の検定は2群比較では Student's t-test を用いた。

第三節 研究結果と考察

第一項 Afatinib は α -defensin 5 分泌を上昇させる

Afatinib が α -defensin 5 分泌に及ぼす影響を明らかにするため、Afatinib 曝露時における α -defensin 5 分泌量を測定した。

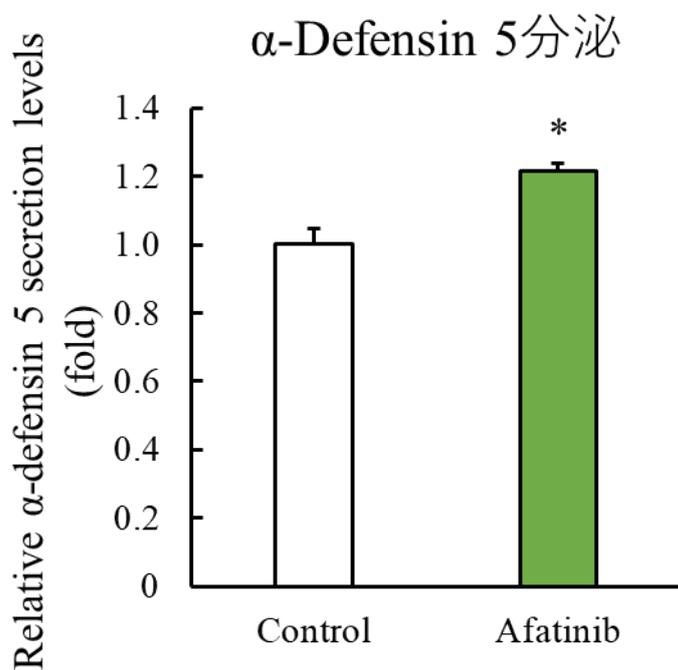


Fig. 21. Effect of 24 h exposure to 50 μ M Afatinib on α -defensin 5 secretion levels in ATCC Caco-2 cells. α -Defensin 5 secretion levels were normalized to the cell viability. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. *P < 0.05 vs. Control by t-test.

その結果、Afatinib 曝露は α -defensin 5 分泌を有意に上昇させた (Fig. 21)。前述のとおり Afatinib は EGFR に作用するが、EGFR のシグナルの一部に NF- κ B 経路が関与することが報告されている (Fig. 22) [48]。したがって、Afatinib 曝露時における α -defensin 5 分泌変動には NF- κ B 経路を介した影響が関連していることが考えられる。

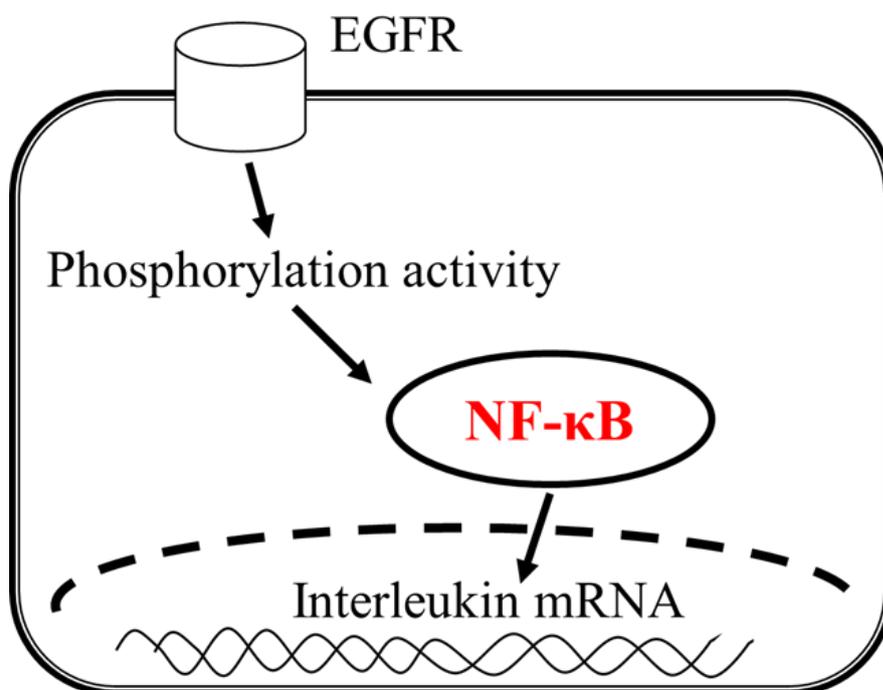


Fig. 22. Graphical abstract of research conducted by Pan D et al, titled “MALT1 is required for EGFR-induced NF- κ B activation and contributes to EGFR-driven lung cancer progression [48]”.

第二項 Afatinib はサイトカイン mRNA 量を変動させる

Afatinib が NF- κ B 経路に影響を及ぼす可能性が示されたことから、同じく NF- κ B シグナルに深く関与し、 α -defensin 5 との関連が示されたサイトカイン mRNA 量に及ぼす影響を検討した。

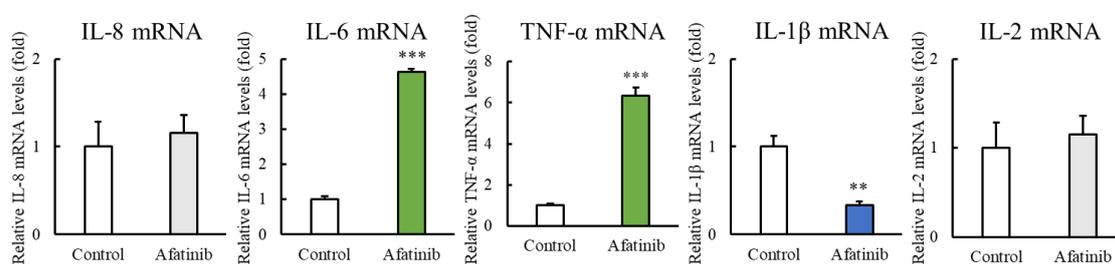


Fig. 23. Effect of 24 h exposure to 50 μ M Afatinib on TNF- α , IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-2 mRNA levels in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S housekeeping gene. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. **P < 0.01, *P < 0.001 vs. control by t-test.**

その結果、AfatinibはIL-6およびTNF- α のmRNA量を上昇させたが、IL-1 β のmRNA量は低下し、IL-8およびIL-2のmRNA量に影響を与えなかった(Fig. 23)。これらの結果はAfatinibがNF- κ B経路に影響を及ぼしていると推察されるが、同様にNF- κ B経路と関連するIL-1 β 発現量が低下している点やIL-8発現量が変動していない点を考慮すると、AfatinibのEGFR-TKI以外の作用も影響している可能性がある。さらに、Afatinib曝露時にTNF- α の発現が上昇したことから、酸化ストレス応答性に影響を及ぼす可能性が示された。

第三項 Afatinib は酸化ストレス応答性を変動させる

これまでの検討により、TNF- α は SOD の mRNA 量に影響を及ぼすことが示されている。また、Afatinib 処理は TNF- α mRNA 量を上昇させたことから、Afatinib は酸化ストレス応答に影響を及ぼす可能性が示された。そこで次に、Afatinib が酸化ストレス応答性に及ぼす影響を明らかにするため、Afatinib 処理時における SOD の mRNA 量を測定した。

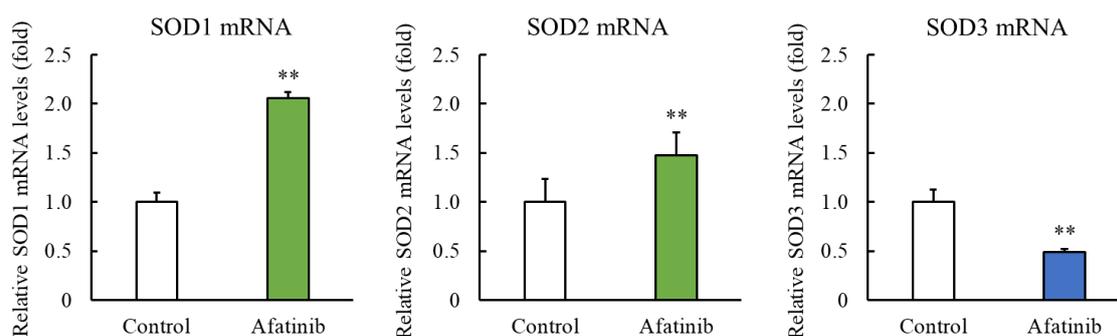


Fig. 24. Effect of 24 h exposure to 50 μ M Afatinib on SOD1, SOD2 and SOD3 mRNA levels in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S housekeeping gene. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. **P < 0.01 vs. control by t-test.

その結果、SOD1 および SOD2 の mRNA 量を上昇させ、SOD3 の mRNA 量を低下させた(Fig. 24)。Afatinib は ROS を生じることが報告されている [49]ことから、これら酸化ストレス応答性の変動に Afatinib 誘導性の ROS による影響と TNF- α を含めたサイトカイン発現変動による影響が関与している可能性が示された。これまでの検討により、TNF- α は P-gp 発現および輸送機能を変動させることが示されているため、Afatinib 処理時における TNF- α 発現変動が P-gp 発現および輸送機能に影響を及ぼすことが示唆された。

第四項 Afatinib は P-gp 発現量および輸送機能を上昇させる

Afatinib 処理はこれまでの検討により P-gp 発現および輸送機能と関連が示された TNF- α 発現を上昇させた。そこで、Afatinib 処理が P-gp の発現量に及ぼす影響を明らかとするため、Afatinib 曝露時における *mdr1* mRNA 量および P-gp タンパク質発現量を測定した。

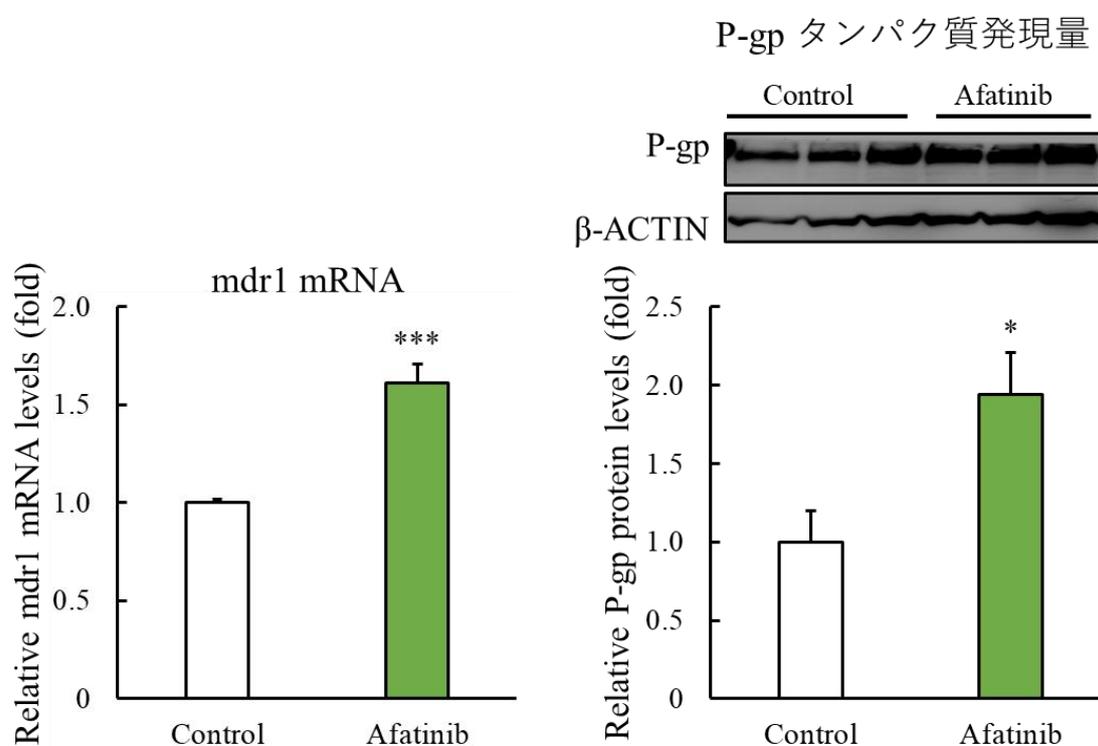


Fig. 25. Effect of 24 h exposure to 50 μ M Afatinib on *mdr1* mRNA levels or P-gp protein levels in ATCC Caco-2 cells. Transcript levels were normalized to the 18S housekeeping gene. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$ vs. control by t-test.**

その結果、Afatinib 曝露は P-gp の発現量を上昇させた(Fig. 25)。以上の結果から、Afatinib 処理時における P-gp 発現変動に TNF- α が影響を及ぼしている可能性が示された。

最後に、Afatinib 曝露時における P-gp の輸送機能を測定した。

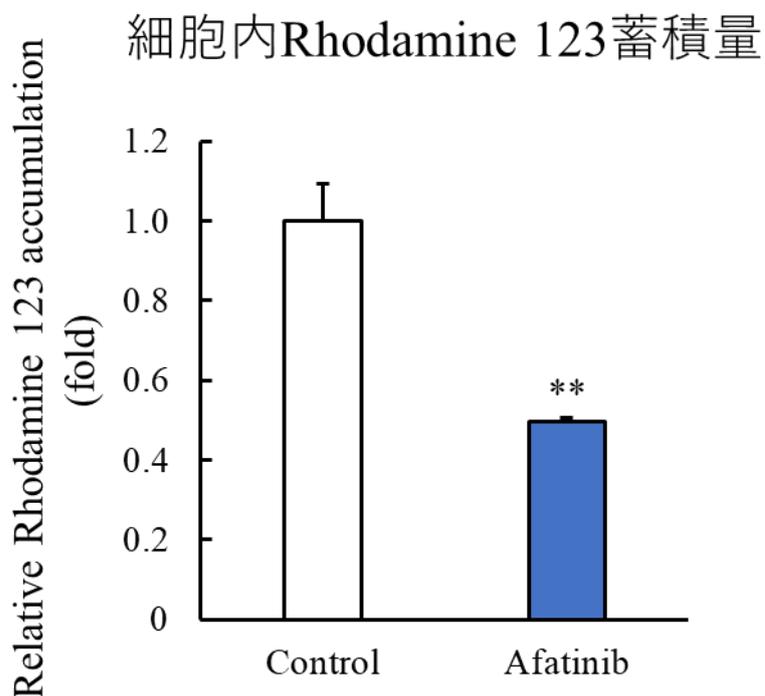


Fig. 26. Effect of 24 h exposure to 50 μ M Afatinib on Rhodamine 123 accumulation in ATCC Caco-2 cells. Rhodamine 123 accumulation were normalized to amount of protein. Data are presented as means with S.E. (error bars) of 3 independent experiments. *P < 0.05 vs. Control by t-test.

その結果、Afatinib 曝露は細胞内 Rhodamine 123 蓄積量を有意に低下させた (Fig. 26)。したがって、Afatinib は P-gp 発現増大を誘導し、機能を亢進させることが推察された。

第四節 小括

1. Afatinib は α -defensin 5 分泌および TNF- α の mRNA 量を上昇させた。
2. Afatinib 曝露時における P-gp の発現および機能は上昇したことから、P-gp の発現および機能変動の一部に α -defensin 5 分泌が関与している可能性が示された。

以上の結果から、Afatinib は異物として認識され、異物に対する防御力を高めるため Caco-2 細胞における α -defensin 5 分泌を上昇させ、P-gp 発現量および輸送機能を誘導させた可能性が考察された。

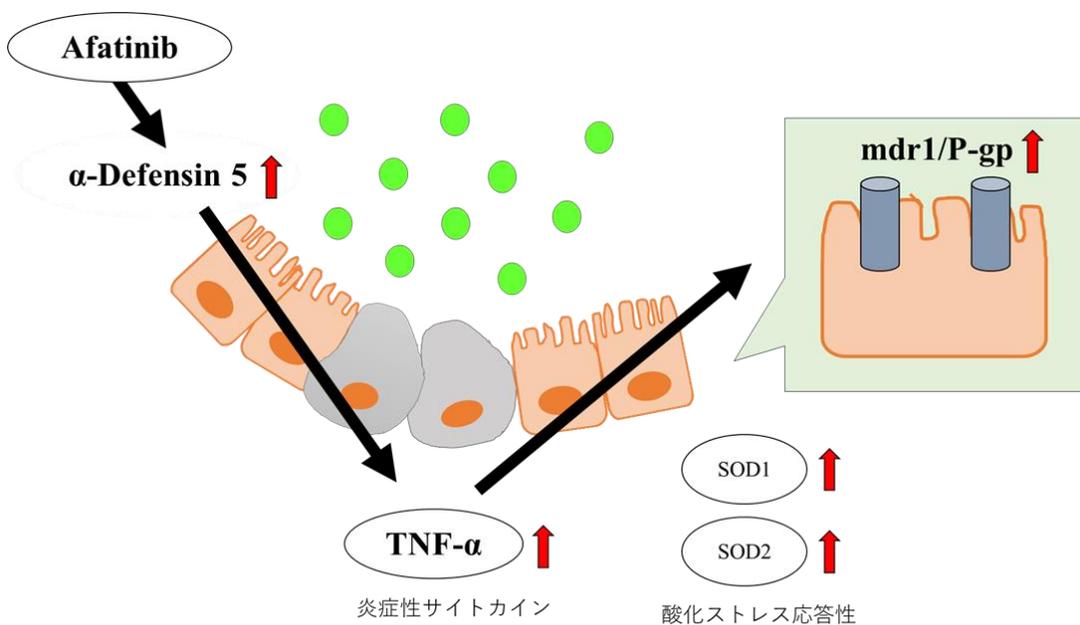


Fig. 27. Summary of section 3

総括

本研究では、Caco-2 細胞における α -defensin 5 分泌量の測定と異物排泄ならびに基質薬物の治療効果に影響を及ぼす主要な排出系トランスポーターである P-gp 発現および輸送機能との関連性を検討した。その結果、Caco-2 細胞は α -defensin 5 を分泌し、その分泌機序に炎症性および炎症抑制性サイトカインが関与することが示唆された。次に、 α -defensin 5 は異物の排泄に関わる P-gp の発現および機能を上昇させ、腸管における防御機能を誘導している可能性が示された。最後に、Afatinib に対して抵抗性を高めるため Caco-2 細胞における α -defensin 5 分泌と P-gp の発現量・輸送機能を向上させた可能性が示された。

以上の結果より、 α -defensin 5 分泌は P-gp の発現および機能と協調することが明らかとなったことから、 α -defensin 5 発現との関連が報告される病態や P-gp の基質薬物の体内動態に影響する可能性の一旦を見出すことができた。今後、さらに α -defensin5 分泌を変動させる可能性のある医薬品や健康食品成分等の化合物を検討し、 α -defensin 5 分泌とその影響に関するエビデンス構築の必要があるが、その第一歩として α -defensin 5 分泌と排出系

トランスポーターである P-gp との関連性を本研究で明らかにすることができた。

参考文献

- [1] Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjöberg J, Amir E, Tegatz P, Barman M, Hayward M, Eastwood D, Stoel M, Zhou Y, Sodergren E, Weinstock GM, Bevins CL, Williams CB, Bos NA. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.*, 11, 76–83 (2010).
- [2] Lu W, de Leeuw E. Pro-inflammatory and pro-apoptotic properties of Human Defensin 5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 436, 557–562 (2013).
- [3] Zhao A, Lu W, de Leeuw E. Functional synergism of Human Defensin 5 and Human Defensin 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 467, 967–972 (2015).
- [4] Kelvin DJ, Michiel DF, Johnston JA, Lloyd AR, Sprenger H, Oppenheim JJ, Wang JM. Chemokines and serpentine: The molecular biology of chemokine receptors. *J. Leukoc. Biol.*, 54, 604-612 (1993).
- [5] Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice G C, Wood W I. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*, 253, 1278-1280 (1991).
- [6] Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science*, 253, 1280-1283 (1991).

[7] Lee J, Horuk R, Rice GC, et al. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J. Biol. Chem.*, 267, 16283-16287 (1992).

[8] Gayle RB 3d, Sleath PR, Srinivason S, et al. Importance of the amino terminus of the interleukin-8 receptor in ligand interactions. *J. Biol. Chem.*, 268, 7283-7289 (1993).

[9] Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima HJ, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell α -defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 18129–18134 (2005).

[10] Elphick D, Liddell S, Mahida YR. Impaired luminal processing of human defensin-5 in Crohn's disease: Persistence in a complex with chymotrypsinogen and trypsin. *Am. J. Pathol.*, 172, 702–713 (2008).

[11] Takahashi N, Kobayashi M, Ogura J, Yamaguchi H, Satoh T, Watanabe K, Iseki K. Immunoprotective effect of epigallocatechin-3-gallate on oral anticancer drug-induced α -defensin reduction in Caco-2 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 37, 490–492 (2014).

[12] Takano M, Yumoto R, Murakami T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacol. Ther.*, 109,137-161(2006).

[13] Wessler JD, Grip L T, Mendell J, Giugliano RP. The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 61, 2495-2502 (2013).

[14] Ristic B, Sikder MOF, Bhutia YD, Ganapathy V. Pharmacologic inducers of the uric acid exporter ABCG2 as potential drugs for treatment of gouty arthritis. *Asian. J. Pharm. Sci.*, 15, 173-180 (2020).

[15] Rege BD, Kao JP Y, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 16, 237-246 (2002).

[16] Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, Artursson P. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299, 164-170 (2001).

[17] Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, Karlbom U, Lazorova L, Gråsjö J, Kindmark A, Artursson P. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29, 269-277 (2006).

[18] Matsumoto H, Erickson RH, Gum JR, Yoshioka M, Gum E, Kim YS. Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology*, 98, 1199-1207 (1990).

[19] Laurent F, Eckmann L, Savidge TC, Morgan G, Theodos C, Naciri M, Kagnoff MF. *Cryptosporidium parvum* infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines. *Infect. Immun.*, 65, 5067–5073 (1997).

[20] Steffansen B, Pedersen MDL, Laghmoch AM, Nielsen CU. SGLT1-mediated transport in Caco-2 cells is highly dependent on cell bank origin. *J. Pharm. Sci.*, 106, 2664–2670 (2017).

[21] Zhang Z, Feng S. The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials*, 27, 4025-4033 (2006).

[22] Dodane V, Khan AM, Merwin JR. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int. J. Pharm.*, 182, 21-32 (1999).

[23] Terada Y, Ogura J, Tsujimoto T, Kuwayama K, Koizumi T, Sasaki S, Maruyama H, Kobayashi M, Yamaguchi H, Iseki K. Intestinal P-glycoprotein expression is multimodally regulated by intestinal ischemia-reperfusion. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 17, 266-276 (2014).

[24] Ogura J, Kuwayama K, Takaya A, Terada Y, Tsujimoto T, Koizumi T, Maruyama H, Fujikawa A, Takahashi N, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Yamaguchi H, Iseki K. Intestinal ischemia-reperfusion increases efflux for uric acid via paracellular route in the intestine, but decreases that via transcellular route mediated by BCRP. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 15, 295-304 (2012).

[25] Yang E, Shen J. The roles and functions of Paneth cells in Crohn's disease: A critical review. *Cell. Prolif.*, e12958 (2020).

[26] Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 17, 3-9 (1997).

[27] Yasuda G, Kobayashi M, Kubota A, Narumi K, Furugen A, Satoh T, Suzuki N, Iseki K. Analysis of α -defensin 5 secretion in differentiated Caco-2 cells: Comparison of Cell Bank Origin. *Biol. Pharm. Bull.*, Accepted.

[28] Custodio JM, Wu C, Benet LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 60, 717-733 (2008).

[29] Ebert B, Seidel A, Lampen A. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis*, 26, 1754-1763 (2005).

[30] Brand W, Schutte ME, Williamson G, Zanden JJ, Cnubben NHP, Groten JP, Bladeren PJ, Rietjens IMCM. Flavonoid-mediated inhibition of intestinal ABC transporters may affect the oral bioavailability of drugs, food-borne toxic compounds and bioactive ingredients. *Biomed. Pharmacother.*, 60, 508-519 (2006).

[31] Shimizu M. Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 232-241 (2010).

[32] Wagner D, Spahn-Langguth H, Hanafy A, Koggel A, Langguth P. Intestinal drug efflux: formulation and food effects. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 50, S13-S31 (2001).

[33] Hung TV, Suzuki T. Short-Chain Fatty Acids Suppress Inflammatory Reactions in Caco-2 Cells and Mouse Colons. *J. Agric. Food. Chem.*, 66, 108-117 (2018).

[34] Kovacs-Nolan J, Zhang H, Ibuki M, Nakamori T, Yoshiura K, Turner P V, Matsui T, Mine Y. The PepT1-transportable soy tripeptide VPY reduces intestinal inflammation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1820, 1753-63 (2012).

[35] Ogura J, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Alteration of Mrp2 and P-gp expression, including expression in remote organs after intestinal ischemia-reperfusion. *Life. Sci.*, 82. 1242-1248 (2008).

[36] Jing W, Safarpour Y, Zhang T, Guo P, Chen G, Wu X, Fu Q, Wang Y. Berberine Upregulates P-Glycoprotein in Human Caco-2 Cells and in an Experimental Model of Colitis in the Rat via Activation of Nrf2-Dependent Mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 366, 332-340 (2018).

[37] Störmer E, Perloff MD, Moltke LL, Greenblatt DJ. Methadone Inhibits Rhodamine123 Transport in Caco-2 Cells. *Drug. Metab. Dispos.*, 29, 954-956 (2001).

[38] Li L, Fu Q, Xia M, Xin L, Shen H, Li G, Ji G, Meng Q, Xie Y. Inhibition of P-Glycoprotein Mediated Efflux in Caco-2 Cells by Phytic Acid. *J. Agric. Food. Chem.*, 66, 988-998 (2018).

[39] Xie Q, Zhang J, Liu M, Liu P, Wang Z, Zhu L, Jiang L, Jin M, Liu X, Liu L, Liu X. Short-chain fatty acids exert opposite effects on the expression and function of p-glycoprotein and breast cancer resistance protein in rat intestine. *Acta. Pharmacol. Sin.*, doi: 10.1038/s41401-020-0402-x (2020).

[40] Zuo J, Zhao M, Liu B, Han X, Li Y, Wang W, Zhang Q, Lv P, Xing L, Shen H, Zhang X. TNF- α -mediated upregulation of SOD-2 contributes to cell proliferation and cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.*, 42, 1497-1506 (2019).

[41] 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社, ジオトリフ錠®インタビューフォーム, 3 (2020).

[42] Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, Chen YM, Park K, Kim SW, Caicun Z, Oberdick M, Shahidi M, Yang CH. An irreversible inhibitor of EGFR/HER1 and

HER2 + best supportive care (BSC) versus placebo + BSC in patients with NSCLC failing 1-2 lines of chemotherapy and erlotinib or gefitinib (LUX-Lung 1). *Ann. Oncol.*, 21, 1 (2010).

[43] Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, Chen YM, Park K, Kim SW, Lorence R, Shahidi M, Yang CH. Subgroup Analysis of LUX-Lung 1: A Randomized Phase III Trial of Afatinib (BIBW 2992) + Best Supportive Care (BSC) versus Placebo plus BSC in Patients with NSCLC Failing 1-2 Lines of Chemotherapy and Erlotinib or Gefitinib. *J. Thorac. Oncol.*, 5, S557-S558 (2010).

[44] Murakami H, Tamura T, Takahashi T, Nokihara H, Naito T, Nakamura Y, Nishio K, Seki Y, Sarashina A, Shahidi M, Yamamoto N. Phase I study of continuous afatinib (BIBW 2992) in patients with advanced non-small cell lung cancer after prior chemotherapy/erlotinib/gefitinib (LUX-Lung 4). *Cancer. Chemother. Pharmacol.*, 69, 891-899 (2011).

[45] Lin NU, Winer EP, Wheatley D, Carey LA, Houston S, Mendelson D, Munster P, Frakes L, Kelly S, Garcia A A, Cleator S, Uttenreuther FM, Jones H, Wind S, Vinisko R, Hickish T. A phase II study of afatinib (BIBW 2992), an

irreversible ErbB family blocker, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing after trastuzumab. *Breast Cancer. Res. Treat.*, 133, 1057-1065 (2012).

[46] Yang J CH, Reguart N, Barinoff J, Kohler J, Uttenreuther FM, Stammberger U, O'Brien D, Wolf J, Cohen EEW. Diarrhea associated with afatinib: an oral ErbB family blocker. *Expert. Rev. Anticancer. Ther.*, 13, 729–736 (2013).

[47] McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J. Pharm. Pharmacol.*, 60. 63-70 (2008).

[48] Pan D, Jiang C, Ma Z, Blonska M, You M J, Lin X. MALT1 is required for EGFR-induced NF- κ B activation and contributes to EGFR-driven lung cancer progression. *Oncogene*, 35, 919-928 (2016).

[49] Hu X, Shi S, Wang H, Yu X, Wang Q, Jiang S, Ju D, Ye L, Feng M. Blocking autophagy improves the anti-tumor activity of afatinib in lung adenocarcinoma with activating EGFR mutations in vitro and in vivo. *Sci. Rep.*, 7, 4559 (2017).

謝辞

本研究を遂行する機会を与えて頂き、学位論文を作成するにあたり終始ご懇篤なご指導・ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 小林 正紀 准教授に厚く御礼申し上げます。また、本論文の副査としてご審査を賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬物動態解析学研究室 菅原 満 教授、同大学大学院薬学研究院臨床病態解析学研究室 武田 宏司 教授、ならびに北海道医療大学薬学部 井関 健 教授に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり多くのご助言、ご助力を賜りました北海道科学大学薬学部 山田 武宏 教授、同大学薬学部 鈴木 夏子 准教授、北海道医療大学薬学部 窪田 篤人 助教、北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 鳴海 克哉 助教、ならびに古堅 彩子 助教に謹んで感謝致します。

北海道薬科大学在学時に進学に向けた基礎をご指導頂いた北海道科学大学薬学部 渡辺 一弘 教授、同研究室 佐藤 隆司 教授、同大学薬学部 鈴木 裕治 講師に厚に厚く御礼申し上げます。

私の研究環境の維持など本研究を遂行するにあたり多くの面でご助力いただきました臨床薬剤学研究室のすべての方々に心から感謝致します。

最後に心身両面で支えて下さった家族、友人ら大切な方々に深く感謝の意を示します。

令和3年3月 保田 元気