

細胞間隙を介した OTC 薬の腸管吸収における  
薬物相互作用の評価

岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室 教授

いかり あきら  
五十里 彰

**細胞間隙を介した OTC 薬の腸管吸収における  
薬物相互作用の評価**

主任研究者 岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室 教授 五十里 彰  
(〒 501-1196 岐阜県岐阜市大学西 1-25-4 電話番号：058-230-8124)

分担研究者 富山大学生命科学先端研究センター 教授 田淵 圭章  
分担研究者 静岡県立大学食品栄養科学部 准教授 林 久由

**要旨**

経口摂取した薬物は、主に小腸で吸収されて体内に取り込まれる。この吸収過程には細胞内を通る経細胞経路と細胞間を通る傍細胞経路の2種類の経路が関与する。細胞膜に発現する薬物トランスポーターを介した経細胞輸送の特性は明らかになってきたが、傍細胞経路を介する吸収機構については、大部分が不明である。本研究では、正常マウス由来の MCE301 細胞とヒト大腸癌由来の Caco-2 細胞を用いて、lucifer yellow (LY、細胞間透過性の分子マーカー) と電解質の透過性に対する OTC 薬成分の効果を検討した。OTC 薬として使用頻度の高いクロモグリク酸、クロルフェニラミン、ジフェンヒドラミン、グリチルリチン酸、ロキソプロフェン、イブプロフェン、インドメタシンを MCE301 細胞に短時間処理したところ、クロルフェニラミンは電気抵抗値 (TER) を低下させ、LY 透過性を増加させた。同様の効果が Caco-2 細胞でも観察された。一方、グリチルリチン酸は TER を増加させ、LY 透過性を低下させた。他の薬物は TER と LY 透過性を有意に変化させなかった。クロルフェニラミンの作用機序を検討したところ、プロテインホスファターゼ -2A の活性化を介して、オクルディンのリン酸化量と細胞内局在を変化させることにより、TER と LY 透過性を変化させることが示唆された。グリチルリチン酸の作用機序については今後の検討が必要である。次に、OTC 薬成分の長時間処理の効果を検討したところ、クロルフェニラミン、ロキソプロフェン、インドメタシンは LY 透過性を増加させた。また、これらの OTC 薬成分は複数のクローディン mRNA 量を変化させたため、長時間処理による低分子化合物の透過性の変化はクローディン発現の変化に起因すると示唆された。以上のように、OTC 薬に含まれる各種成分により、細胞間隙を介した低分子化合物の透過性が変化することが初めて解明された。LY 透過性を増加させる成分は、本剤だけでなく併用剤の吸収を促進させることが示唆されるため、過剰投与や個人差などに特に注意する必要がある。今後、細胞間透過性に対する他の OTC 薬成分の効果や併用効果を分子レベルで調べることにより、飲み合わせの安全性を裏付けるデータの蓄積が必要

である。

## 1. 調査研究目的

近年のセルフメディケーションの推進により、一般の人が薬局やドラッグストアで OTC 薬を購入する機会が増えている。薬には患部に合わせていろいろな剤形があるが、服用のしやすさから経口摂取される OTC 薬が多く販売されている。経口摂取された薬物は胃で溶かされ、腸から吸収されて体内に入る。腸管を覆う上皮細胞の膜はリン脂質二重膜で形成されており、水溶性薬物の透過性が低い。そのため、カチオン性およびアニオン性の薬物は、細胞膜に発現する薬物トランスポーターを介して輸送される。

腸管上皮細胞は細胞間にタイトジャンクションを形成し、低分子化合物や電解質の細胞間透過性を制御する。タイトジャンクションは4回膜貫通型タンパク質のクローディンやオクルディン、裏打ちタンパク質の ZO-1 や ZO-2、細胞骨格タンパク質のアクチンなどによって構成される<sup>1)</sup>。クローディンは20種類以上のサブタイプが存在することが報告されている。各クローディンの発現部位と特徴は異なっており、クローディン-2はナトリウム透過性を亢進させるのに対し、クローディン-4はナトリウム透過性を抑制する<sup>2,3)</sup>。また、クローディン-16は二価カチオンに対する透過性を亢進する<sup>4)</sup>。このように電解質透過性とクローディンの関係は明らかになってきたが、低分子化合物の透過性に対する効果は十分に解明されていない。

これまで腸管吸収に関する研究は、主にヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞を用いて実施されてきた。Caco-2 細胞は細胞膜に各種薬物トランスポーターを発現するが、シトクロム P450 などの薬物代謝酵素の発現量が低い。また、がん組織由来の細胞であるため、正常細胞と腸管吸収の特性が異なると考えられる。そのため、正常組織由来の細胞を用いて腸管吸収機構を解析するとともに、多くのエビデンスが積み重ねられてきた Caco-2 細胞との差異を検討する必要がある。本研究では、共同研究者の田淵らが樹立した正常マウス由来の腸管細胞を用いて、細胞間隙を介した低分子化合物の腸管吸収における OTC 薬成分の作用と動物種差の影響を解明するため、下記の3課題に取り組んだ。

- (1) 腸管上皮細胞をトランスウェルに培養し、低分子化合物 (lucifer yellow、LY) の上皮膜間輸送と電解質透過性に対する OTC 薬成分の効果を検討し、動物種差の影響を解明する。
- (2) クローディンサブタイプの発現を変化させ、LY と電解質透過性に対する影響を解明する。
- (3) LY 透過性を変化させた OTC 薬成分について、分子レベルで作用機序を解明する。

## 2. 調査研究方法

### 2.1. 細胞とトランスフェクション

実験にはヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞 (American Type Culture Collection より入

手) および正常マウス結腸由来の MCE301 細胞 (共同研究者の田淵らが樹立) を使用した。細胞は 5 ~ 10% 牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle Medium で培養した。Lipofectamine 2000 を用いて、ヒトクローデイン -5/pTRE2-hyg ベクターを MCE301 細胞にトランスフェクションした。100  $\mu$ g/ml ハイグロマイシン B 入りのメディウムで約 1 ヶ月間培養後、リングクローニング法によりクローデイン -5 発現細胞を選別した。安定発現株を樹立後は、50  $\mu$ g/ml ハイグロマイシン B 入りのメディウムで細胞を培養した。

## 2.2. RNA 抽出と reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

TRI reagent (コスモバイオ) を用いて細胞から RNA を抽出した。ReverTra Ace (東洋紡) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調製した。半定量的 PCR 法では PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム染色によりバンドの位置を確認した。定量的リアルタイム PCR 法では、Thermal Cycler Dice Real-Time PCR System (タカラバイオ) または Real time PCR Eco (アズワン) を用いて mRNA 量を測定した。

## 2.3. SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロット

Lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecylsulfate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) を用いて、細胞内タンパク質を抽出した。界面活性剤への溶解性を調べる際には、細胞を CSK-1 buffer (0.5% Triton X-100, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, and 10 mM Tris-HCl, pH7.4) で 10 分間処理後、遠心 (1,000 x cfg, 5 分間) 処理によって可溶性画分を抽出した。細胞残渣を lysis buffer で溶解し、遠心 (2,000 x cfg, 10 分間) 処理によって不溶性画分を抽出した。12.5% SDS- ポリアクリルアミドゲルにサンプルをアプライ後、100 ~ 120V で約 90 分間電気泳動した。ゲルを PVDF 膜に転写後、2% スキムミルクで 30 分間処理することによりブロッキングを行った。その後、各種一次抗体 (1,000 倍希釈) を 4°C で約 16 時間処理した。PVDF 膜を洗浄後、二次抗体を室温で 60 ~ 90 分間反応させた。EzWestLumi plus (アトー) または ImmunoBasic (和光純薬工業) を用いて、各タンパク質のバンドを検出した。

## 2.4. 免疫沈降法

Lysis buffer で溶解した細胞抽出液を、protein G sepharose および occludin 抗体と混合し、ローターで攪拌しながら 4°C で約 16 時間インキュベートした。遠心 (1,000 x cfg, 1 分間) と洗浄の処理を 3 回繰り返した後、沈殿物を sample buffer で溶出し、2.3. の電気泳動に使用した。

## 2.5. 蛍光免疫染色

細胞をカバーガラス入りの培養皿で培養後、OTC 薬成分を 1 時間処理した。冷メタノールで固定後、0.5% Triton X-100 / PBS 溶液で細胞を可溶化した。4% ブロックエースで

ブロッキング後、各種一次抗体（100倍希釈）を4℃で約16時間処理した。一次抗体を洗浄後、Alexa-488またはAlexa-458を付加した二次抗体を室温で90分間反応させた。カバーガラスをスライドガラスに固定後、共焦点レーザー顕微鏡（LSM700、Zeiss）を用いて、標的タンパク質の細胞内局在を解析した。

## 2.6. 細胞間透過性の測定

細胞をトランスウェルに播種後、3～4日毎に培地を交換した。OTC薬成分を指定時間処理後、volt ohmmeter（ミリポア）を用いて上皮膜間電気抵抗値（TER）を測定した。また、管腔側溶液に0.5 mg/ml LY溶液を添加してから指定時間後に血流側溶液を回収し、インフィニット F200 PRO（テカン）を用いてLY透過性を測定した。

## 3. 調査研究成果

### 3.1. Caco-2細胞とMCE301細胞におけるクローディンサブタイプの発現比較

半定量的PCR法により、Caco-2細胞とMCE301細胞におけるクローディンサブタイプの発現量を比較した。Caco-2にはクローディン-6を除いて、クローディン-1～クローディン-8が発現していた（Fig. 1）。一方、MCE301細胞にはクローディン-5を除いて、クローディン-1～クローディン-8が発現していた。ヒトと齧歯類の腸管細胞では、クローディンサブタイプの発現様式が異なることが推察された。

### 3.2. MCE301細胞におけるクローディン-5発現による細胞間透過性の変化

低分子化合物の細胞間透過性に対する動物種差の影響を検討するため、クローディン-5を安定発現するMCE301細胞を樹立した。クローディン-5の発現を、FLAGおよびクローディン-5抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した（Fig. 2）。FLAGタグを付加したクローディン-5の推定サイズである28 kDa付近にバンドが観察されたことから、クローディン-5安定発現細胞の樹立が確認された。クローディン-5発現・非発現細胞を用いて細胞間透過性を調べたところ、クローディン-5の発現によってTERが増加し、LY透過性が低下した。腸管細胞においてクローディン-5は電解質及び低分子化合物に対する細胞間透過性を低下させる働きがあることが明らかになった。

### 3.3. MCE301細胞における細胞間透過性に対するOTC薬成分の短時間処理の効果

OTC薬として使用頻度が高い成分の中から、クロモグリク酸、クロルフェニラミン、ジフェンヒドラミン、ロキソプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、グリチルリチン酸の7種類の効果を検討した。まず、即効性効果を検証するため、処理時間を1時間に設定した。MCE301細胞を抗ヒスタミン薬のクロルフェニラミンで処理したところ、TERが低下しLY透過性が増加した（Fig. 3）。一方、抗炎症薬のグリチルリチン酸で処理すると、TERが増加しLY透過性が低下した。他の5種類のOTC薬成分により、

TER と LY 透過性は有意に変化しなかった。以上の結果から、クロルフェニラミンとグリチルリチン酸を含む OTC 薬の服用により、低分子薬の吸収量（細胞間透過性）が変化することが示唆された。

#### 3.4. クロロフェニラミンとオクルデインの界面活性剤溶解性に対するクロルフェニラミンの効果

クロルフェニラミンの作用機序を解明するため、比較対象として抗ヒスタミン薬のジフェンヒドラミンとともに、クロロフェニラミンとオクルデインの界面活性剤溶解性に対する効果を検討した。タイトジャンクションに分布するタンパク質は、細胞骨格系タンパク質に結合しているため、界面活性剤に対する溶解性が低い<sup>5)</sup>。一方、細胞質内に分布するタンパク質は界面活性剤に対する溶解性が高い。短時間のクロルフェニラミンとジフェンヒドラミン処理により、クロロフェニラミン-1～クロロフェニラミン-8の溶解性は有意に変化しなかった (Fig. 4)。ただし、クロロフェニラミン-5と-6はバンドが検出されなかったため、解析対象から除外した。一方、クロルフェニラミン処理により、オクルデインの溶解性が有意に増加した。以上の結果から、クロルフェニラミンはオクルデインの細胞内局在を変化させることが示唆された。

#### 3.5. オクルデインの細胞内局在に対するクロルフェニラミンとカンサリジンの効果

オクルデインの細胞内局在は、リン酸化によって調節されることが報告されている<sup>6)</sup>。タンパク質のリン酸化は、各種キナーゼやホスファターゼによって調節されるため、セリン/スレオニンホスファターゼのプロテインホスファターゼ-2A (PP-2A) の活性を調べたところ、クロルフェニラミン処理により有意に活性が増加し、この効果は PP-2A 阻害剤のカンサリジン共処理によって阻害された (Fig. 5)。また、クロルフェニラミン処理によってオクルデインのリン酸化量が低下し、カンサリジンは部分的ではあるがオクルデインの脱リン酸化を抑制した。さらに、界面活性剤に対するオクルデインの溶解性も、カンサリジンの共処理によりコントロールレベルに回復した。免疫蛍光染色によりオクルデインの細胞内局在を調べたところ、コントロール細胞でオクルデインは ZO-1 とともに主にタイトジャンクションに分布した。クロルフェニラミン処理により ZO-1 の分布は変化しなかったが、オクルデインの蛍光がタイトジャンクションから消失した。このオクルデインの局在変化は、カンサリジン共処理により阻害された。以上の結果から、クロルフェニラミンはオクルデインを脱リン酸化させ、タイトジャンクションへの分布を阻害することが示唆された。

#### 3.6. クロルフェニラミンによる細胞間透過性の増加に対するカンサリジンの効果

上述のように、クロルフェニラミン処理により TER が低下したが、この効果はカンサリジン共処理により有意に阻害された (Fig. 6)。同様に、クロルフェニラミン処理による LY 透過性の増加も、カンサリジン共処理により阻害された。これらの効果は、オクルデイン

ンの界面活性剤溶解性や細胞内局在に対するカンサリジンの効果と一致する。

### 3.7. MCE301 細胞における細胞間透過性に対する OTC 薬成分の長時間処理の効果

本研究において、クロルフェニラミンやグリチルリチン酸の短時間処理により、オクルデインの細胞内局在が変化することが初めて明らかになった。OTC 薬は長期間にわたって服用されることがある。そこで、細胞間透過性に対する OTC 薬成分の長時間処理の影響を検討した。その結果、クロルフェニラミン、イブプロフェン、インドメタシン、グリチルリチン酸処理によって TER が有意に増大した (Fig. 7)。一方、ロキソプロフェン処理により TER が有意に低下した。興味深いことに、クロルフェニラミン、ロキソプロフェン、インドメタシン処理によって LY 透過性が増大したことから、電解質と低分子化合物の透過性が相関しないことが明らかになった。

### 3.8. クローデインとオクルデインの mRNA 発現量に対する OTC 薬成分の効果

TER の増加は、イオン透過型クローデインの発現低下、イオン非透過型クローデインの発現増加に起因すると考えられる。クローデイン mRNA 発現量に対する OTC 薬成分の効果調べたところ、カチオン非透過型ポアを形成するクローデイン-4 の発現が、ロキソプロフェンとグリチルリチン酸の処理で増加した (Fig. 8)。また、クローデイン-8 の発現がロキソプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、グリチルリチン酸処理により増大した。これらのクローデイン発現の増大が、TER の増加を引き起こしたと考えられる。一方、カチオン透過型ポアを形成するクローデイン-2 やイオン非透過型のオクルデインの発現が、ロキソプロフェン処理により増加した。これらの発現と低分子化合物透過性の関係は十分解明されていないが、ロキソプロフェンによる LY 透過性の増大に寄与することが考えられる。

### 3.9. Caco-2 細胞における細胞間透過性に対する OTC 薬成分の短時間処理の効果

ヒトとマウスの腸管吸収の差異を解明するため、Caco-2 細胞を用いて LY 透過性に対する OTC 薬成分の効果調べた。クロルフェニラミンの短時間処理 (2 時間) により、LY 透過性が増加した (Fig. 9)。この効果は MCE301 細胞における効果と一致する。一方、MCE301 細胞とは異なり、ロキソプロフェン、イブプロフェン、ジフェンヒドラミン、インドメタシン処理で LY 透過性が低下した。

### 3.10. Caco-2 細胞における細胞間透過性に対する OTC 薬成分の長時間処理の効果

細胞間透過性に対する OTC 薬成分の長時間処理の影響を解明するため、Caco-2 細胞を OTC 薬成分で 24 時間処理した。TER はクロルフェニラミン、ロキソプロフェン、イブプロフェン処理により有意に増大し、グリチルリチン酸処理により低下した (Fig. 10)。これに対応し、LY 透過性はクロルフェニラミン、ロキソプロフェン、イブプロフェン処

理により低下し、グリチルリチン酸処理により増大した。一方、クロルフェニラミン、ジフェンヒドラミン、インドメタシン処理により TER と LY 透過性は有意に変化しなかった。

#### 4. 考察

OTC 薬成分による LY 透過性の評価において、Caco-2 細胞と MCE301 細胞を用いて動物種差の影響を検討したところ、クロルフェニラミンの短時間処理で LY 透過性が増大するという共通の特徴が観察された。一方、MCE301 細胞ではロキソプロフェン、イブプロフェン、ジフェンヒドラミン、インドメタシン処理で LY 透過性が有意に変化しなかったが、Caco-2 細胞では LY 透過性が低下した。これらの細胞間では少なくともクローディン-5 とクローディン-6 の発現量が異なっており、OTC 薬成分の LY 透過性に対する効果の違いは内在的に発現するクローディンの発現様式に起因することが考えられる。Caco-2 細胞においてクローディン-5 の発現増加により、低分子化合物の細胞間透過性が低下することが報告されている 7)。クローディン-5 を過剰発現した MCE301 細胞で、クローディン-5 は ZO-1 とともにタイトジャンクションに分布した。さらに、非発現細胞と比較して、TER が増加し LY 透過性が低下した。以上の結果から、クローディン-5 は腸管における低分子化合物に対する透過性を制御する際に、重要な役割を担うことが示唆された。クローディン-5 はヒト腸管に発現するが、マウス腸管に発現しないため、薬物の傍細胞的腸管吸収における動物種差に影響を及ぼすことが強く示唆される。

マウスの腸管において、クローディンサブタイプの発現パターンは成長と共に変化することが報告された 8)。生後腸管のバリアー機能は未発達であるが、3 週間でタイトジャンクションが形成される。この過程において、クローディン-3、-7、15 が増加する。一方、クローディン-2 の発現は成長と共に低下する。そのため、薬物の傍細胞的腸管吸収は年齢の影響も受けることが示唆される。

クロルフェニラミンの短時間処理により、オクルディンのリン酸化量の低下、界面活性剤に対する溶解性の増加、タイトジャンクションからの解離が観察された。一方、界面活性剤に対するクローディンの溶解性は変化しなかったことから、クロルフェニラミンの効果はオクルディンの細胞内局在の変化に起因すると示唆された。オクルディンは、424、438 番目のスレオニン残基、490、508 番目のセリン残基、474 番目のチロシン残基がリン酸化される 9)。これらのリン酸化部位はカルボキシ末端部に存在し、裏打ちタンパク質である ZO-1 との結合に影響を及ぼす。オクルディンのリン酸化に参与するプロテインキナーゼは不明であるが、本研究によりクロルフェニラミンが PP-2A の活性を増加させ、オクルディンのリン酸化スレオニン量を低下させることが示唆された。エタノール代謝物のアセトアルデヒドは、PP-2A とオクルディンの結合量を増加させ、オクルディンのリン酸化スレオニン量の低下を介して、低分子化合物の透過性を低下させることが報告されている。タイトジャンクションを介した低分子化合物透過性の制御において、PP-2A とオクルディンは重要な役割を担うことが示唆される 10)。



OTC 薬成分の長時間処理において、ロキソプロフェン処理によってLY 透過性が有意に増加した。クローデイン及びオクルデインの発現に対する効果を調べたところ、クロルフェニラミンはクローデイン -2、-4、-8 とオクルデインの発現量を増加させることが明らかになった。クローデイン -4 とオクルデインは低分子化合物の透過性を低下させる働きを有するため、ロキソプロフェンの効果には関与しないと示唆された。クローデイン -2 と -8 の発現が低分子化合物の細胞間透過性に及ぼす影響は十分に解明されていないため、siRNA を用いたノックダウン解析などの検討が必要である。また、少なくともクロルフェニラミンはオクルデインの細胞内局在を変化させるため、タンパク質の発現量と細胞内局在を組み合わせて、今後詳細に解析する必要がある。

## 5. まとめ

腸管における低分子化合物の細胞間透過性の制御において、動物種差の影響は不明であったが、本研究によりヒトとマウスで低分子化合物の透過性が異なること、OTC 薬成分に対する感受性が異なることが明らかになった。抗ヒスタミン薬のクロルフェニラミンは低分子化合物に対する細胞間透過性を増加させたが、同薬効を有するジフェンヒドラミンは細胞間透過性を変化させなかった。また、ヒスタミン未処理細胞でクロルフェニラミンが効果を発揮したため、主作用とは異なる機序で細胞間透過性を増加させることが示唆された。OTC 薬成分と細胞間透過性の関係は網羅的に検討されていないため、検討成分を増やすことにより新たなデータベースの構築が必要である。高齢者や炎症性腸疾患などの罹患者では腸管バリア機能が低いため、薬剤や食事成分の影響を受けやすいと推察される。本研究成果を基に、腸管に優しい OTC 薬の選択基準の策定につながることを期待される。

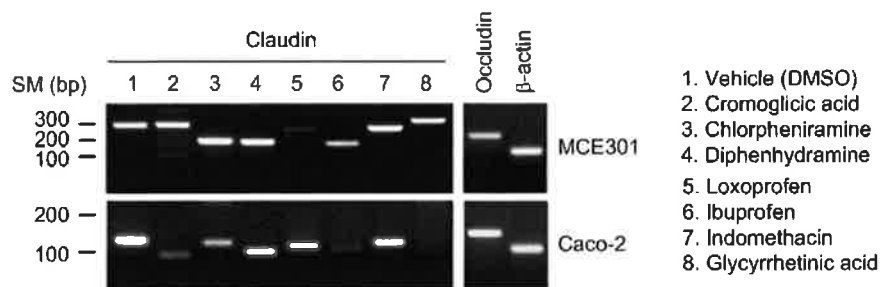
## 6. 調査研究発表（口頭又は誌上発表）

本調査研究成果の一部について、Biological & Pharmaceutical Bulletin への掲載が決定した。また未発表の成果については、口頭および学術論文として発表を準備中である。

## 7. 引用文献

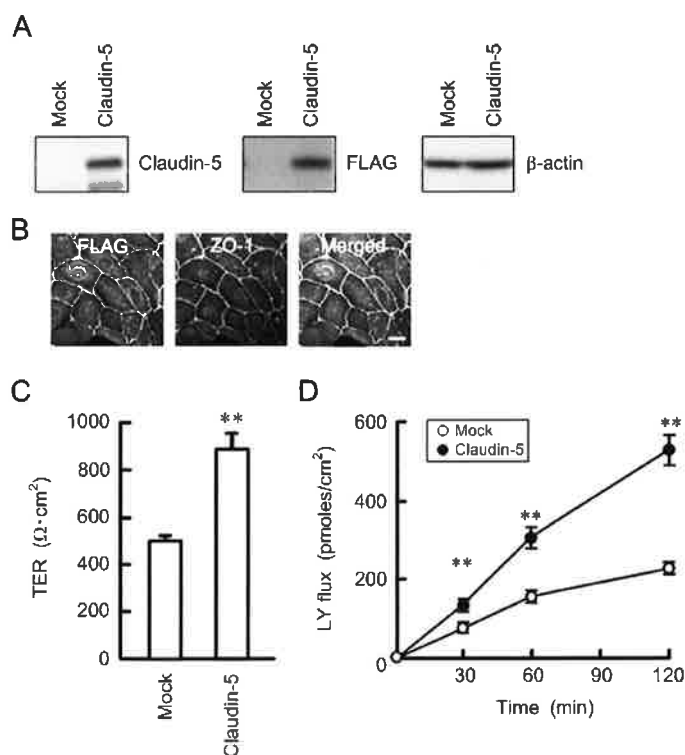
- 1) Tsukita S, Furuse M, and Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 285-293 (2001).
- 2) Hou J, Gomes AS, Paul DL, and Goodenough DA. Study of claudin function by RNA interference. *J. Biol. Chem.*, 281, 36117-36123 (2006).
- 3) Hou J, Renigunta A, Yang J, and Waldegger S. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 18010-18015 (2010).
- 4) Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli

- A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, and Lifton RP. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science*, 285, 103-106 (1999).
- 5) Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK, and Madara JL. Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.*, 113, 1771-1781 (2000).
  - 6) Clarke H, Soler AP, and Mullin JM. Protein kinase C activation leads to dephosphorylation of occludin and tight junction permeability increase in LLC-PK1 epithelial cell sheets. *J. Cell Sci.*, 113, 3187-3196 (2000).
  - 7) Hering NA, Andres S, Fromm A, van Tol EA, Amasheh M, Mankertz J, Fromm M, and Schulzke JD. Transforming growth factor-beta, a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells. *J. Nutr.*, 141, 783-789 (2011).
  - 8) Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, and Anderson JM. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns*, 6, 581-588 (2006).
  - 9) Dorfel MJ, and Huber O. Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 807356 (2012).
  - 10) Dunagan M, Chaudhry K, Samak G, and Rao RK. Acetaldehyde disrupts tight junctions in Caco-2 cell monolayers by a protein phosphatase 2A-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 303, G1356-1364 (2012).



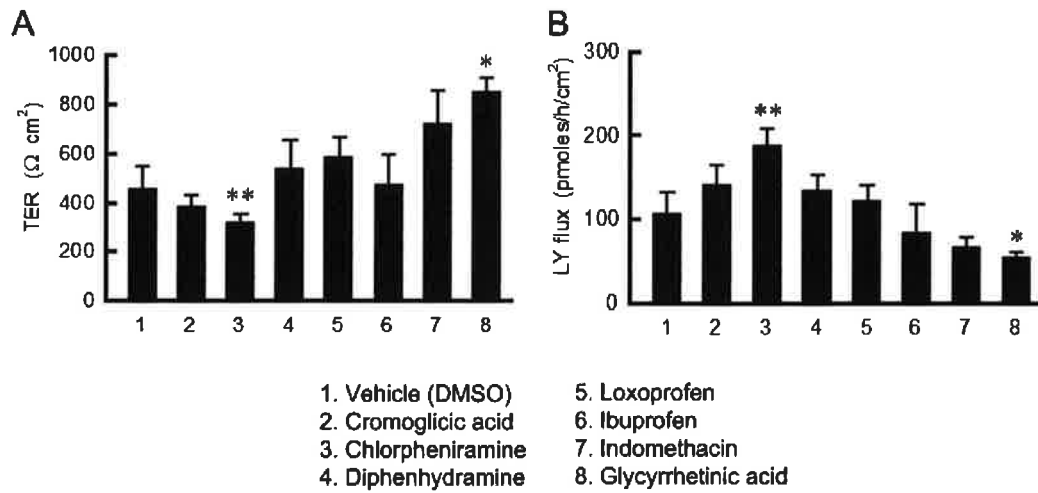
**Fig. 1 Expression of claudin and occludin in MCE301 and Caco-2 cells**

Total RNA was isolated from Caco-2 and MCE301 cells. Semi-quantitative RT-PCR was performed using primers pair of claudin-1- -8, occludin, and  $\beta$ -actin. PCR products were separated on 2% agarose gel.

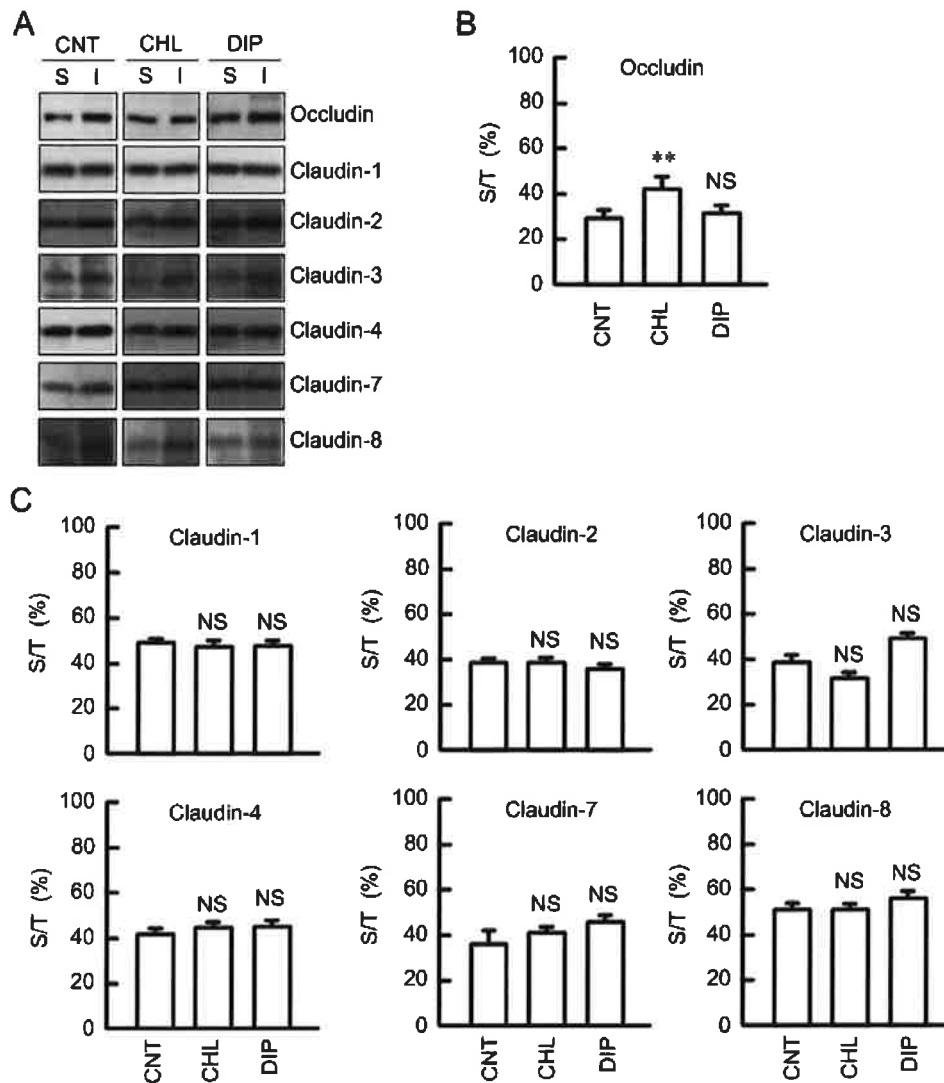


**Fig. 2 Effects of claudin-5 expression on paracellular permeability in MCE301 cells**

(A) MCE301 cells were transfected with FLAG-tagged claudin-5/pTRE2 vector. The expression of claudin-5 was confirmed by anti-FLAG and anti-claudin-5 antibodies. (B) The cells were immunostained with anti-FLAG (green) and anti-ZO-1 (red) antibodies. Merged image was shown in the right. Scale bar indicates 20  $\mu$ m. (C) TER was measured using volt-ohmmeter. (D) LY flux from the apical to basal chambers was measured using transwell inserts. \*\*  $P < 0.01$  significantly different from mock.

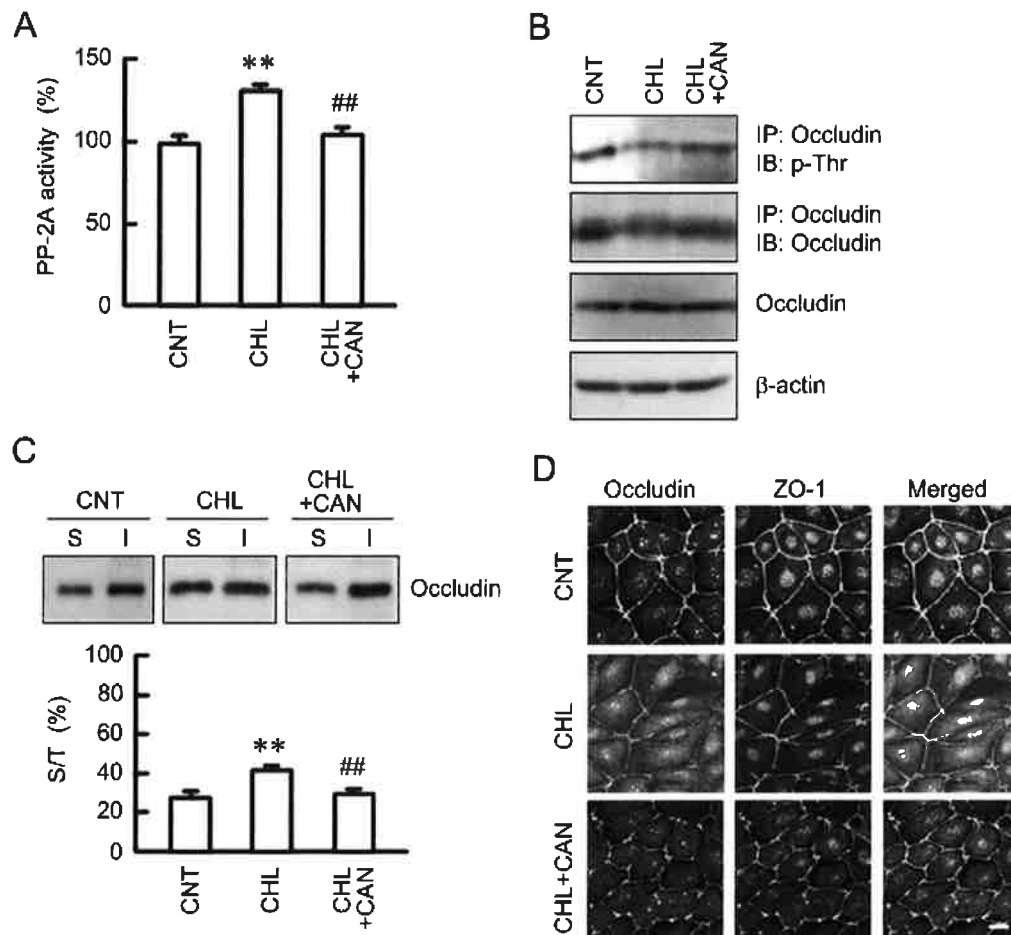


**Fig. 3** Effects of short term treatments of OTC compounds on paracellular permeability MCE301 cells were incubated in the presence and absence of 50  $\mu\text{M}$  OTC compounds for 1 h. (A) Paracellular permeability to ions was measured using volt-ohmmeter. (B) LY flux from the apical to basal chambers was measured using transwell inserts. \*\*  $P < 0.01$  significantly different from vehicle.



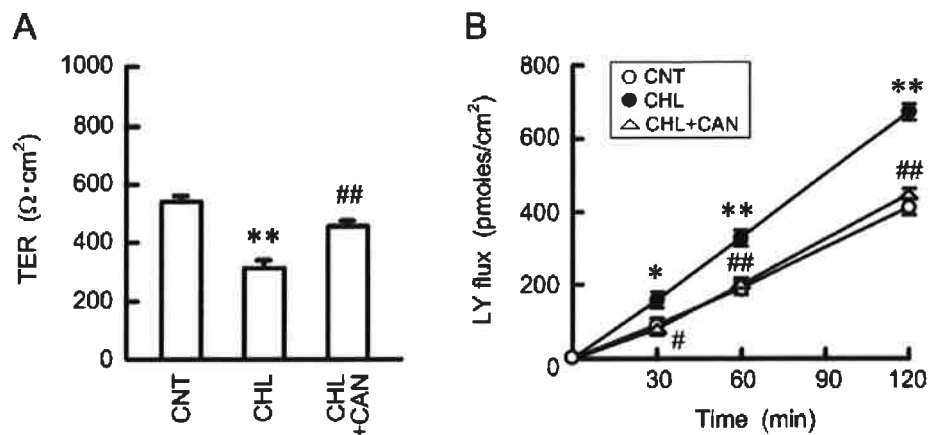
**Fig. 4 Effects of chlorpheniramine and diphenhydramine on detergent solubility of claudins and occludin**

(A) RT-PCR was performed using primers pair of claudin-1- claudin-8, occludin, and  $\beta$ -actin. The PCR products were analyzed on an agarose gel. The size marker is indicated on the left. (B and C) The cells were in the presence and absence of 50  $\mu$ M chlorpheniramine (CHL) or 50  $\mu$ M diphenhydramine (DIP) for 1 h. Detergent soluble (S) and insoluble (I) fractions were isolated using 0.5% Triton X-100 solution. After Western blotting of claudins and occludin, the expression levels in soluble fractions were represented relative to the total levels (S/T).  $n = 3-4$ . \*\*  $P < 0.01$  significantly different from control (CNT). NS, not significantly different.



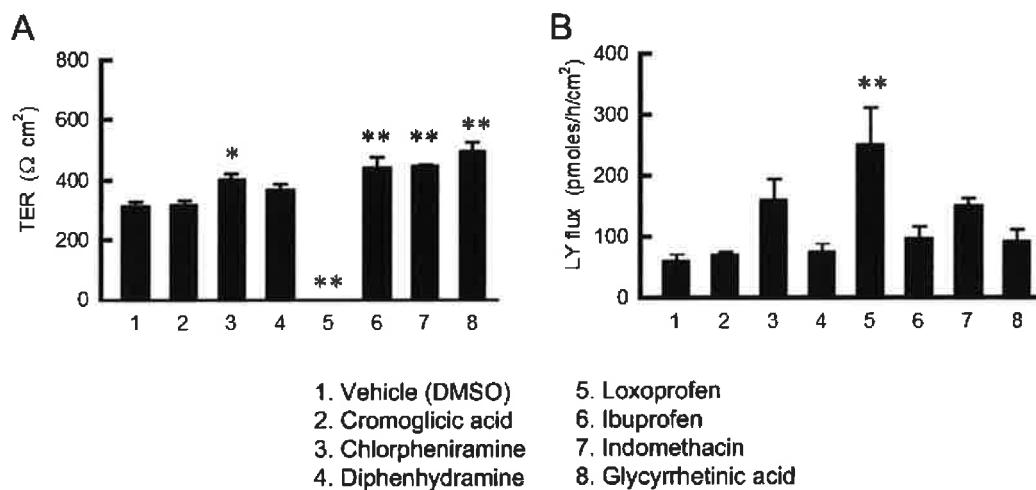
**Fig. 5 Effects of chlorpheniramine and cantharidin on detergent solubility, phosphorylation, and intracellular localization of occludin**

MCE301 cells were in the presence and absence of 50  $\mu$ M chlorpheniramine (CHL) and 1  $\mu$ M cantharidin (CAN) for 1 h. (A) PP-2A activity was examined using pNPP. (B) Total cell lysates were blotted with anti-occludin and  $\beta$ -actin antibodies. For the immunoprecipitation assay, the immunoprecipitants were blotted with anti-p-Thr and occludin antibodies. (C) After Western blotting of occludin, the expression levels in soluble fractions were represented relative to the total levels. (D) The cells were immunostained with anti-occludin (green) and anti-ZO-1 (red) antibodies. Merged images were shown in the right. Scale bar indicates 20  $\mu$ m. \*\*  $P < 0.01$  and ##  $P < 0.01$  significantly different from control (CNT) and CHL, respectively.



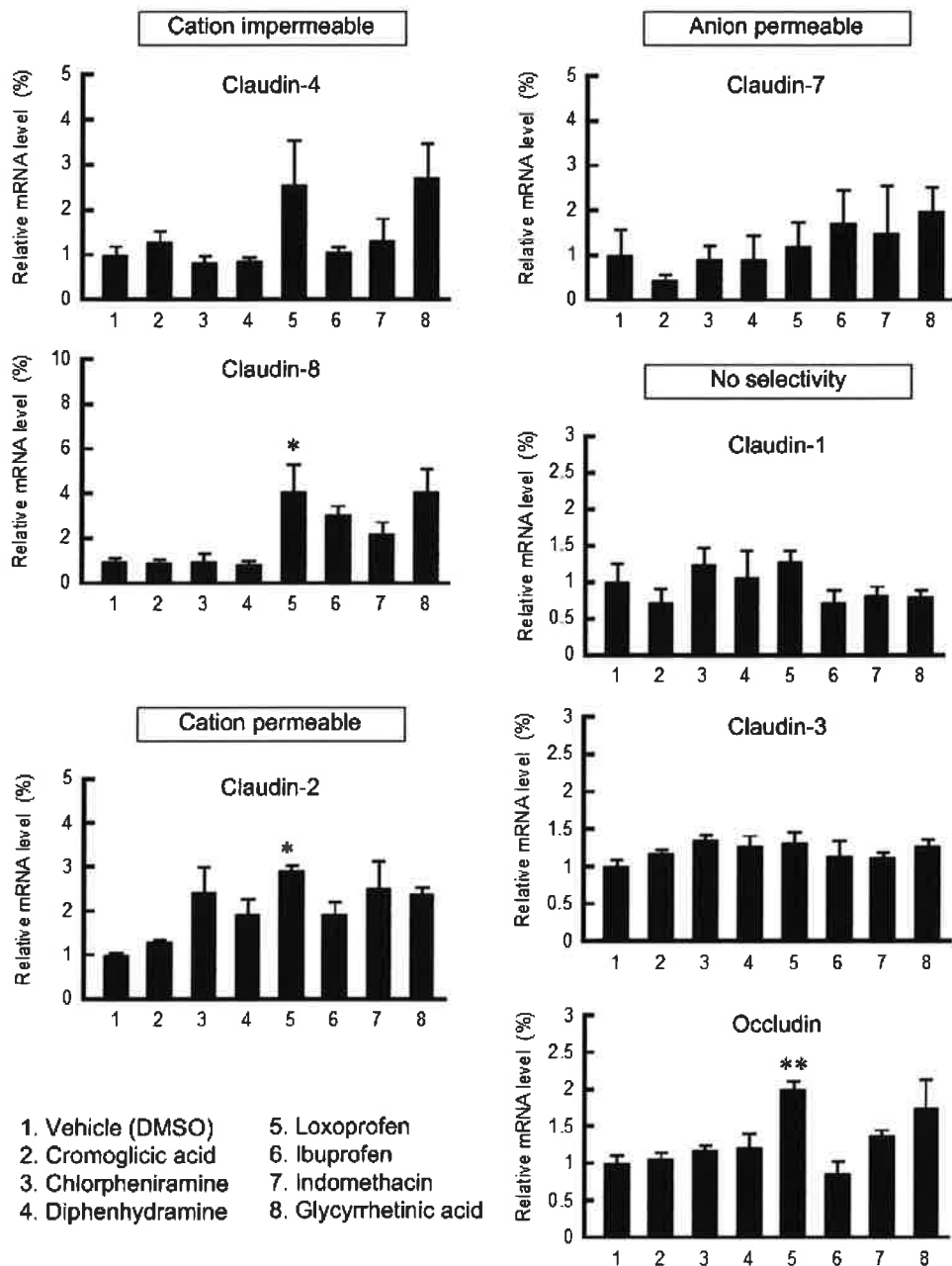
**Fig. 6. Effects of chlorpheniramine and cantharidin on paracellular permeability**

MCE301 cells were incubated in the presence and absence of 50  $\mu$ M chlorpheniramine (CHL) and 1  $\mu$ M cantharidin (CAN) for 1 h. (A) TER was measured using volt-ohmmeter. (B) LY flux from the apical to basal chambers was measured using transwell inserts. \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$  significantly different from control (CNT). ##  $P < 0.01$  and #  $P < 0.05$  significantly different from CHL.



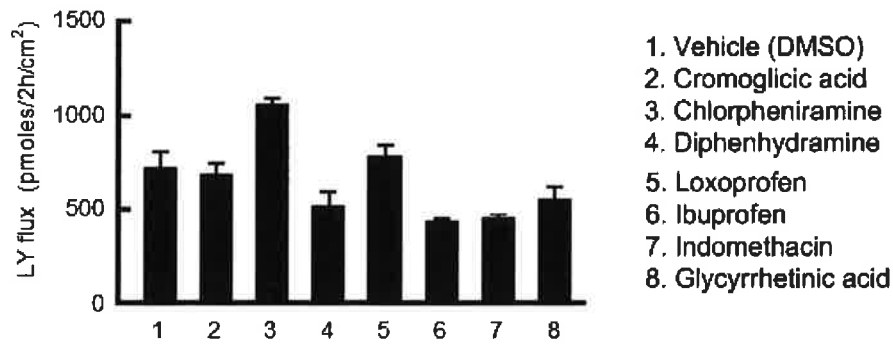
**Fig. 7 Effects of long term treatments of OTC compounds on paracellular permeability**

MCE301 cells were incubated in the presence and absence of 50  $\mu$ M chlorpheniramine (CHL) and 1  $\mu$ M cantharidin (CAN) for 24 h. (A) TER was measured using volt-ohmmeter. (B) LY flux from the apical to basal chambers was measured using transwell inserts. \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$  significantly different from vehicle.



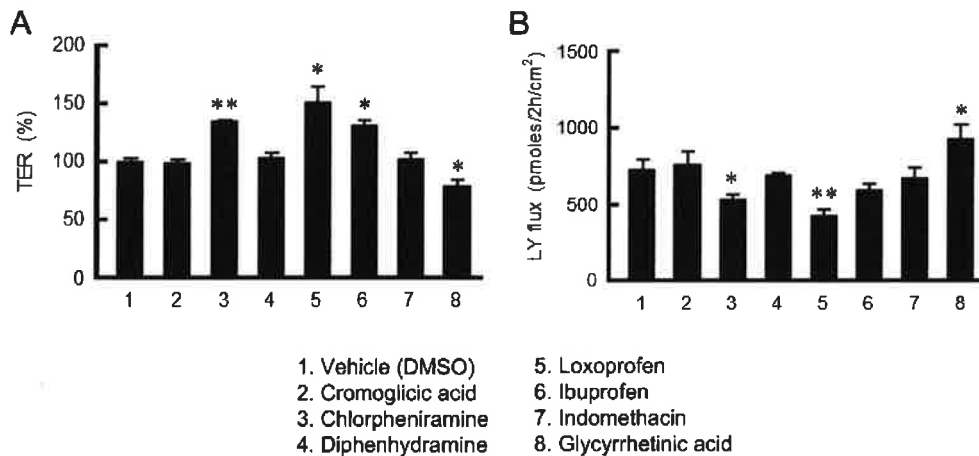
**Fig. 8 Effects of OTC compounds on mRNA expression of tight junctional protein**  
 MCE301 cells were incubated in the absence and presence of 50  $\mu$ M OTC compounds for 8 h. Real time PCR was performed using primers pair of claudin-1- -4, -7, and -8, occludin, and  $\beta$ -actin. \*\*  $P < 0.01$  significantly different from vehicle.





**Fig. 9** Effects of short term treatments of OTC compounds on paracellular permeability in Caco-2 cells

Caco-2 cells were incubated with 0.1 mM LY in the presence and absence of 100  $\mu$ M OTC compounds for 2 h. LY flux from the apical to basal chambers was measured using transwell inserts. \*\*  $P < 0.01$  significantly different from vehicle.



**Fig. 10** Effects of long term treatments of OTC compounds on paracellular permeability in Caco-2 cells

Caco-2 cells were incubated in the presence and absence of OTC compounds (10  $\mu$ M diphenhydramine, 5  $\mu$ M glycyrrhetic acid, and 50  $\mu$ M of other compounds) for 24 h. (A) TER was measured using volt ohmmeter. (B) LY flux from the apical to basal chambers was measured using transwell inserts. \*\*  $P < 0.01$  and \*  $P < 0.05$  significantly different from vehicle.

**Estimation of drug-drug interaction in colonic absorption of OTC medicine  
through intercellular junction**

**Name: Akira Ikari, Professor**

**Affiliation: Laboratory of Biochemistry, Department of Biopharmaceutical  
Sciences,  
Gifu Pharmaceutical University**

**Address: 1-25-4 Daigaku-nishi, Gifu 501-1196, Japan**

**Tel: 81-58-230-8124**

**Abstract**

People can buy over-the-counter-medicine for self-treatment in the pharmacy and drug stores. Many OTC drugs are taken orally. Then, the drugs are mainly absorbed from the small intestine into the blood. This process is regulated by two routes; one is paracellular pathway and the other is intercellular pathway. The function of various transporters expressing in the apical and basolateral membranes of intestinal epithelial cells has been well characterized. In contrast, claudins and occludin, components of the tight junctions (TJs), determine the paracellular permeability to ions and low molecular weight compounds, but the properties for permeability has not been clarified in detail. In the present study, we examined the effects of eight OTC drugs including cromoglicic acid, chlorpheniramine, diphenhydramine, loxoprofen, ibuprofen, indomethacin, and glycyrrhetic acid on transepithelial electrical resistance (TER) and permeability to lucifer yellow (LY), a marker of paracellular permeability, using murine colonic MCE301 and human colonic Caco-2 cells. Short term treatment of chlorpheniramine significantly decreased the steady state of TER and increased permeability to LY, whereas the effects of diphenhydramine were not significant. Both anti-histamine drugs did not change solubility of claudins to 0.5% Triton X-100 solution. In contrast, the detergent solubility and intracellular localization of occludin were significantly increased by chlorpheniramine. Furthermore, the changes of TER, permeability to LY, and tight junctional localization of occludin caused by chlorpheniramine were recovered by cantharidin, a potent PP-2A inhibitor. These results suggest that chlorpheniramine could increase paracellular permeability to low molecular weight compounds mediated by the internalization of occludin in the colonic epithelial cells. On the contrary, long term

treatment of chlorpheniramine, loxoprofen, and indomethacin increased permeability to LY. These drugs changed the mRNA levels of various claudins. This is the first report showing that some OTC drugs can change paracellular permeability to low molecular weight compounds. In the future study, we have to investigate the effects of other OTC drugs and combinational effects of OTC drugs on paracellular permeability to low molecular weight compounds.