

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293035

研究課題名(和文) 合理的プロドラッグ創製を可能にするヒトCESインビトロ・インビボ試験系の構築

研究課題名(英文) Establishment of in vitro and in vivo models for human CES which promote rational development of ester-based prodrugs

研究代表者

千葉 寛 (Chiba, Kan)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40159033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エステル型プロドラッグの開発に有用なヒトCESモデルの開発を目的とした。CES1 mRNAに対するRNAiおよびCES2遺伝子の導入により、Caco-2細胞からCES2/CES1A1KD-Caco2を作製した。本細胞はCES1活性を欠失し、CES2活性を保持しており、さらに単層膜形成能も認められた。したがって、CES2/CES1A1KD-Caco2はヒト小腸型CES分子種機能プロファイルを有しており、エステル型プロドラッグ吸収評価に有用な細胞であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Carboxylesterase (CES) plays important roles in ester-type prodrug activation. It has been known that CES isoform expression profile of Caco-2 cells, widely-used human intestine model cells, differs from that of the human intestine. Therefore, we aimed to develop Caco-2 cells possessing human intestinal CES expression profile. Utilizing short-hairpin RNA against human CES1 mRNA and human CES2 expression retroviral system, CES2/CES1-KD/Caco-2 cells were developed. As seen in the human intestine, the CES2/CES1-KD/Caco-2 cells showed activity of CES2 but not CES1. Moreover, the cells showed the high transepithelial electric resistance value, indicating that the cells retained tight junction function. To summarize, we have successfully established a new Caco-2 cells that show the human intestine-like CES isoform expression profile. Thus, the CES2/CES1-KD/Caco-2 cells are expected to be a useful tool for ester-type prodrug development.

研究分野：薬学

キーワード：薬物代謝 試験系 プロドラッグ CES

## 1. 研究開始当初の背景

創薬技術の発達に伴い薬理活性を持つ化合物が高効率に生み出されるようになった。しかしその一方では、医薬品として不適格な体内動態特性を持つ化合物も多く候補化合物として開発の俎上に上るようになっていく。プロドラッグ (PD) 化は、これらの化合物の体内動態特性を適正化させるために最も汎用されている創薬技術である。そのため、低分子医薬品に占める PD の割合は年々増加しており、2001 年から 2008 年にかけて世界で認可された低分子医薬品の 33%が、そして 2009 年に販売額が最も高かった医薬品 100 品目の 15%が PD とされている。

現在使用されている PD の半数がエステル化体である。エステル化合物の加水分解にはいくつかの酵素が関わっているが、EPD の活性化に主要な役割を果たしているのはカルボキシエステラーゼ (CES) である。CES はアミノ酸配列の相同性から 5 つのファミリーに分類されており、EPD の活性化に関わっているのは CES1 と CES2 ファミリーである。CES1 と CES2 の臓器分布は大きく異なっており、ヒトの場合、CES1 は主に肝臓に発現しているのに対し、CES2 は小腸と肝臓に主に発現している。

経口投与された PD は小腸から吸収され肝臓を通過して体循環に入る。そのため、EPD の活性化体への変換は、小腸では CES2 により、肝臓では CES1 と CES2 によって行われる。一方、CES1 と CES2 の基質特異性は大きく異なっており、CES1 はアシル基が嵩高いものを、逆に CES2 はアルコール基が嵩高いものを優先的に加水分解する。これらの相違は EPD の活性化体の生物学的利用率に大きな影響を与えている。例えば CES2 の基質となる EPD は小腸上皮細胞内で加水分解を受け、生成した活性化体を受動拡散やトランスポーターによって管腔側に排出されるため、血液中に移行する活性化体の量は減少する。従って、活性化体の生物学的利用率を高めるためには CES2 による代謝を抑え、肝臓の CES1 によって効率的に活性化体への変換が生じるような化合物をデザインするのが効率的であり合理的と考えられる。

現在、このようなヒト CES の持つ特徴を生かした EPD の創製戦略を行うに当たって大きな壁がいくつか存在する。その一つは、ヒトと実験動物の CES の種差である。例えばヒトと異なり、サル小腸には CES1 と CES2 が共に発現しており、イヌではいずれも発現していない。また、ヒト肝に存在する CES2 はラット肝に発現していない。さらに、マウス・ラットの血漿には CES1 が高いレベルで発現しているがヒトの血漿中には CES は存在しない。したがって、このようなヒトと実験動物における CES 臓器分布の種差は、動物実験からヒトへの外挿に際し大きな障壁となっている。一方、ヒト腸管からの吸収予測にはヒト結腸

がん由来の細胞株である Caco-2 細胞が用いられている。しかし、Caco-2 細胞に発現している主要な CES 分子種は CES1 であり CES2 の発現はきわめて少ない。そのため、Caco-2 細胞の単層膜を用いて行った ESP の小腸透過性予測は実測と大きな隔たりを生じる可能性を内在している。さらにヒト肝がん由来細胞においても CES1 および CES2 の発現量が著しく低い場合、ヒト EPD 活性化の評価には不適切である。

これらの問題を解決する方法の一つは CES のヒト型動物を作成することである。申請者らはヒト人工染色体 (HAC) ベクターを用いた「P-糖蛋白/CYP3A ヒト型マウスの創製とヒト薬物動態研究への有用性」に関する共同研究を鳥取大学の香月らと平成 21 年から行ってきた。これまでに CYP3A クラスターヒト型マウス、P-糖蛋白ヒト型マウス、PXR-CYP3A ヒト型マウスなどの創製に成功し、CYP3A クラスターヒト型マウスについては、CYP3A4 が腸管と肝臓特異的に発現している事、胎児肝に胎児期特異的な CYP3A 分子種である CYP3A7 が発現し、成熟マウスでは成人型の CYP3A4 が発現している事、このヒト型動物がヒトにおける薬物動態や毒性の有用なモデル動物となる事などを明らかにした。

HAC の利点の一つは上流域を含めた大きな遺伝子の安定的導入が可能なことである。CES の臓器発現に大きな種差が存在する点、上流域を含めた遺伝子導入が可能で HAC ベクターを用いることで解決可能である。さらに複数の遺伝子クラスターを形成しているヒト CES 遺伝子の導入発現には HAC が最適と考えられる。さらに HAC ベクターは培養細胞にも導入可能であり、HAC-CES を Caco-2 に導入すればヒト小腸における PD の吸収を評価する理想的な *in vitro* 系ができ、肝がん細胞に導入すれば安定で高い CES 発現を有する肝モデル細胞ができると考えられる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、ヒト CES の特徴に基づく ESP 創製の合理的戦略を可能にする *in vitro* 及び *in vivo* 評価系の構築であり、具体的には、HAC ベクターを用い、ヒトにおける EPD 活性化を的確に評価する 1) CES1/CES2 ヒト型マウスと、2) ヒト CES1/CES2 の安定発現細胞系を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養法

ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 細胞およびヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293FT 細胞は、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入し使用した。Caco-2 細胞は Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 和光、大阪) に、10% (v/v) 非働化

ウシ胎仔血清および 1% penicillin/Streptomycin を加えた培地で培養を行った。CES1 ノックダウン Caco-2 細胞(後述)は 10% 非動化 FBS、1% Pen/St、10  $\mu$ g/mL Puromycin を加えた DMEM 培地で培養を行った。CES1 ノックダウン/CES2 安定発現 Caco-2 細胞(後述)は、10%非動化 FBS、1% Pen/St、10  $\mu$ g/mL Puromycin、600  $\mu$ g/mL G-418 を加えた DMEM 培地で培養した。HEK293FT 細胞は、10% FBS、1% Pen/St、1% L-Alanyl-L-Glutamine、1% MEM Non Essential Amino Acid、G-418 500  $\mu$ g/mL を加えた DMEM 培地で培養した、全ての細胞は 5% CO<sub>2</sub>/95% Air の気相下、37%インキュベーターで継代培養した。

## (2) CES1 ノックダウン Caco-2 細胞の作製

ヒト CES1 遺伝子を標的とした Mission shRNA レンチウイルスパーティクルを Sigma 社より購入し、使用した。Caco-2 細胞を 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに 1.0 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/flask の濃度で播種した。翌日、ポリブレン 8  $\mu$ g/mL(ナカラバイオ、京都)を加えた DMEM 培地に変更し、レンチウイルスを 6.0 $\times$ 10<sup>4</sup> TU/flask の濃度で感染させた。続いて Puromycin 10  $\mu$ g/mL で細胞を選択し、継続的な培養を行った後、最も CES1 ノックダウン効率の高い細胞クローンを単離した。

## (3) CES2 レトロウイルスの作製

CES2 cDNA をヒト小腸 cDNA からクローニングし、pDON AI2-Neo レトロウイルスプラスミド(タカラバイオ、滋賀)に組み込んだ。CES2 発現用レトロウイルスプラスミドとパッケージングプラスミドを、HEK293FT 細胞に co-transfection し、CES2 レトロウイルスを作製した。

## (4) CES2 安定発現 Caco-2 細胞の作製

shCES1/Caco-2 細胞を 25cm<sup>2</sup> フラスコに 1.0 $\times$ 10<sup>4</sup> Cells/flask の濃度で播種した。1 日後、細胞が接着している事を確認した後、ポリブレン 8  $\mu$ g/mL を加えた DMEM 培地に交換し、CES2 レトロウイルスを shCES1/Caco-2 細胞に感染させた。1 週間後、G418 600  $\mu$ g/mL による選択を行い、継続的な培養を行った後、最も CES2 活性の高い細胞を単離する事で、CES1 ノックダウン/CES2 安定発現 Caco-2 細胞クローン(shCES1/CES2/Caco-2)を樹立した。

## (5) Total RNA の抽出および cDNA の合成

Caco-2 細胞、shCES1/Caco-2 細胞、shCES1/CES2/Caco-2 細胞から Total RNA を Nucleospin RNA II (タカラバイオ 滋賀)を用いてプロトコールに従って抽出した。cDNA の合成は、精製した RNA をテンプレートとして、High Capacity cDNA Reverse Transcription

kit with random primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いてプロトコールに従って行った。

## (6) 定量的 real-time PCR

Caco-2 細胞、shCES1/Caco-2 細胞、shCES1/CES2/Caco-2 細胞から作製した cDNA をテンプレートとして定量的 real-time PCR を行った。PCR および DNA 増幅の検出には Eco Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いた。CES1 および CES2 mRNA 発現量の算出には、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA の発現量を用いて補正する相対定量法 ( $\Delta \Delta$  Ct 法)を用いた。

## (7) S9 分画の調整

Caco-2 細胞、shCES1/Caco-2 細胞、shCES1/CES2/Caco-2 細胞を 2.0 $\times$ 10<sup>6</sup> の濃度で 100-mm culture dish に播種し、100%コンフルエンスになるまで培養した。その後、各種細胞を cell scraper で回収し、SET buffer (pH=7.4)に懸濁した。この細胞懸濁液を超音波ホモジナイザーで破碎し、総タンパク質を抽出した後、9000 g、4 $^{\circ}$ C、30 分の条件で遠心分離した。遠心後、上清を S9 として回収し、S9 中に含まれるタンパク質の濃度を DC protein assay kit (BIO-RAD, USA) で定量した。全ての S9 は -80 $^{\circ}$ C 中で保存した。

## (8) Native PAGE CES 活性染色法

標準的なプロトコールに従い、1% Nonidet-P40 を含有した 7.5% (v/v) ポリアクリルアミドゲルを作製した。細胞から抽出した S9 20  $\mu$ g を solubilization buffer に溶解し、ポリアクリルアミドゲルの各レーンにアプライした後、10mA の電流で電気泳動する事で、Native PAGE を行った。電気泳動終了後、CES 活性染色液 (2.148 mM  $\alpha$ -naphthyl acetate in 4% acetone、3.672 mM Fast Blue RR salt、10 mM Tris-HCl (pH=7.0)) でゲルを染色することで、CES の活性を評価した。

## (9) CES 加水分解活性測定

*p*-nitrophenyl acetate (PNPA) を基質として、CES による加水分解活性を解析した。細胞から抽出した S9 0.1mg/mL に、PNPA 100  $\mu$ M、100  $\mu$ M Potassium phosphate buffer (pH=7.4) を混合し、37 $^{\circ}$ C の水浴中 1 分間 pre-incubation した。その後、メタノールに溶解した PNPA を最終濃度 100  $\mu$ M になるようにサンプルに混合し、37 $^{\circ}$ C の水浴中で 2 分間 incubation した。また、CES の阻害剤として Bis-*p*-nitrophenyl phosphate (BNPP) 100  $\mu$ M を用いた。に 2 分後、メタノールを反応液に加える事で、酵素反応を停止した。

サンプル中に存在する代謝物 (p-nitrophenol) の濃度は、検量線法により 405nm の波長における代謝物の吸光度を測定することで解析した。

#### (10) 経上皮電気抵抗値の測定

Caco-2 細胞、shCES1/Caco-2 細胞、shCES1/CES2/Caco-2 細胞を、 $1.0 \times 10^5$  cells/well の濃度で transwell insert (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) に播種した。WPI Endohm6 chamber と Millicell ERS-2 のプロトコールに従い、21日間経時的に Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗値 (Trans-Epithelial Electric Resistance) (TEER) を測定した。培地交換は3日ごとに行った。

#### (11) Immunocytochemistry

Caco-2 細胞、shCES1/CES2/Caco-2 細胞を transwell insert (12well 用) に  $2.0 \times 10^5$  cells/insert の濃度で播種し、12日間培養した。培地交換は3日ごとに行った。12日後、TEER 値が  $600 \Omega/\text{cm}^2$  以上あることを確認した後、10分間 4%パラホルムアルデヒドで固定した。細胞固定後、0.2% Triton-X で10分間浸透反応を行った後、5%スキムミルクで60分ブロッキング処理した。ブロッキング反応終了後、各細胞に抗  $\beta$ -catenin, 抗 occluding, 抗 ZO-1 抗体 (1% BSA 含有 PBS で100倍に希釈) で60分間1次抗体反応を行った。その後、FITC 標識抗ラビット IgG 抗体 (1%BSA 含有 PBS で100倍希釈) で60分2次抗体反応を行った。抗体反応終了後、500倍に希釈した TOPRO-3 で各細胞を30分反応させる事で、核の染色を行った。FITC で標識した各タンパク質の細胞内局在は、Zeiss LSM700 で観察する事で解析した。

#### (12) 統計解析

Caco-2 細胞と、shCES1/Caco-2 細胞または shCES1/CES2/Caco-2 細胞との間の mRNA 発現量、タンパク質活性の平均値の差は、student's t-test により統計解析した。いずれの解析においても P 値が 0.05 以下の場合において有意差ありとした。統計計算は Excel 統計ソフト Statcel 第3版 (OMS 出版, 埼玉) を使用した。

### 4. 研究成果

#### (1) CES1 ノックダウン Caco-2 細胞の作製

CES1 を標的とした shRNA を、レンチウイルスにより Caco-2 細胞に感染させ、Puromycin による選択を行う事で、CES1 ノックダウン Caco-2 細胞を樹立 (shCES1/Caco-2) した。shCES1/Caco-2 細胞、Caco-2 細胞 (親細胞)

および shControl/Caco-2 細胞における CES1 mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR 法により測定したところ、shCES1/Caco-2 細胞において最も低い値が認められた (図 1)。

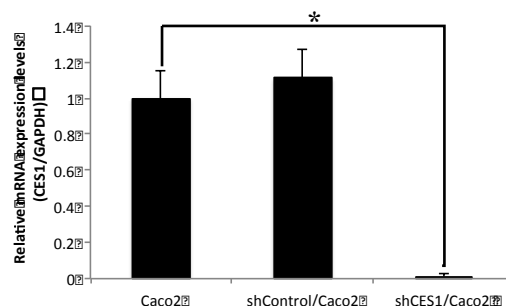


図 1. Caco-2, shCES1/Caco-2, shCES1/Caco-2 細胞における CES1 mRNA 発現量解析

各細胞の cDNA を作製し、定量的リアルタイム PCR により CES1 の mRNA 発現量を解析した。\*, P<0.01.

続いて、CES1 の酵素活性を CES 活性染色、および PNPA を基質とした CES 代謝活性測定により解析したところ、shCES1/Caco-2 細胞において Caco-2 細胞と比較して有意に低い CES1 活性が認められた。さらに、BNPP により CES 活性を阻害した条件下で PNPA 加水分解活性測定を行ったところ、shCES1/Caco-2 において、CES の酵素活性がほぼ完全に消失していることが明らかとなった。(図 2)

以上の結果より、Caco-2 細胞の CES1 機能をほぼ完全にノックダウンした shCES1/Caco-2 細胞が樹立されたと考えられた。

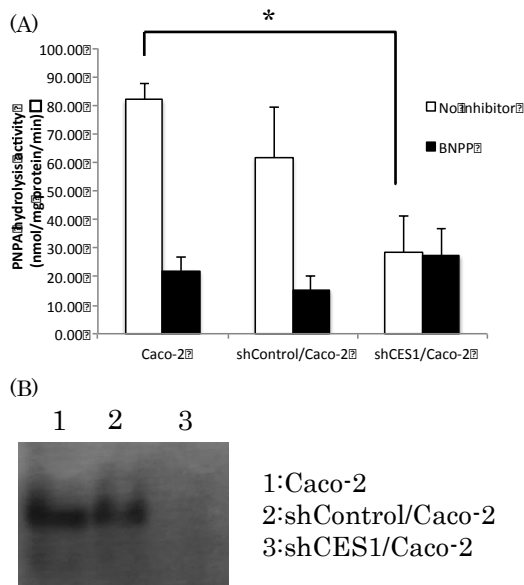


図 2. Caco-2, shCES1/Caco-2, shCES1/Caco-2 細胞における CES1 活性解析

(A) Caco-2 細胞より S9 を調整し、PNPA (100  $\mu$ M) を基質とした CES 加水分解活性測定を行った。また BNPP (100  $\mu$ M) を用いる事で、CES に対する BNPP の阻害試験を行った。\*, P<0.01.

(B) 酢酸  $\alpha$  ナフチルを基質として Native PAGE により CES1 の活性染色を行った。

## (2) CES1 ノックダウン/CES2 安定発現 Caco-2 細胞の作製

続いて shCES1/Caco-2 細胞にヒト CES2 を安定発現させることにより、ヒト小腸と同じ CES 分子種発現プロファイルを持つ Caco-2 細胞の作製をおこなった。ヒト CES2 レトロウイルスを shCES1/Caco-2 細胞に感染させ、その後 G-418 による選択を行う事で、CES2 安定発現 shCES1/Caco-2 細胞 (shCES1/CES2/Caco-2) を樹立した。対照として、レトロウイルスのみを感染させた shCES1/Mock/Caco2 を作成した。これらの細胞について CES2 mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR 法により解析したところ、親 Caco-2 細胞、shCES1/Caco-2 細胞、shCES1/Mock/Caco2 細胞と比べ、shCES1/CES2/Caco-2 細胞において有意に高い CES2 mRNA の発現が認められた (図 3)。

続いて、shCES1/CES2/Caco-2 細胞における CES2 の機能を、CES 活性染色および PNPA を基質とした CES 代謝活性測定により解析した。その結果、shCES1/CES2/Caco-2 細胞において最も高い CES 酵素活性が認められた。(図 4)。この CES 活性は、阻害剤である BNPP により有意に抑制された。

以上の結果より、shCES1/CES2/Caco-2 細胞は、Caco-2 細胞とは異なり、CES1 の機能がなく CES2 の機能を保持したヒト小腸型の CES 分子種発現プロファイルを持つ細胞であると考えられた。

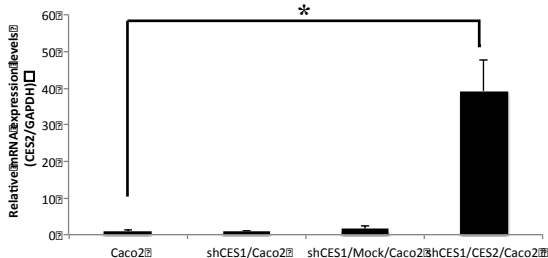


図 3. Caco-2, shCES1/Caco-2, shCES1/Mock/Caco2, shCES1/CES2/Caco2 細胞における CES2 mRNA 発現量解析  
各細胞の cDNA を作製し、定量的リアルタイム PCR により CES2 の mRNA 発現量を解析した。\*, P<0.01.

## (3) shCES1/CES2/Caco-2 細胞の機能解析

樹立した shCES1/CES2/Caco-2 細胞の小腸モデルとしての有用性を明らかにするために、まず薬剤吸収解析に必須の機能である単層膜形成能について、TEER 値計測により解析した。Caco-2、shCES1/Mock/Caco-2、または shCES1/CES2/Caco-2 細胞を transwell insert に播種し、21 日間経時的に TEER 値を測定した。その結果、shCES1/CES2/Caco-2 細胞において、Caco-2 細胞と同様に高い TEER 値が認められた。また、shCES1/CES2/Caco-2 細胞の TEER 値は day12 において最も高い TEER 値 ( $1656 \pm 259 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) を示すことが明

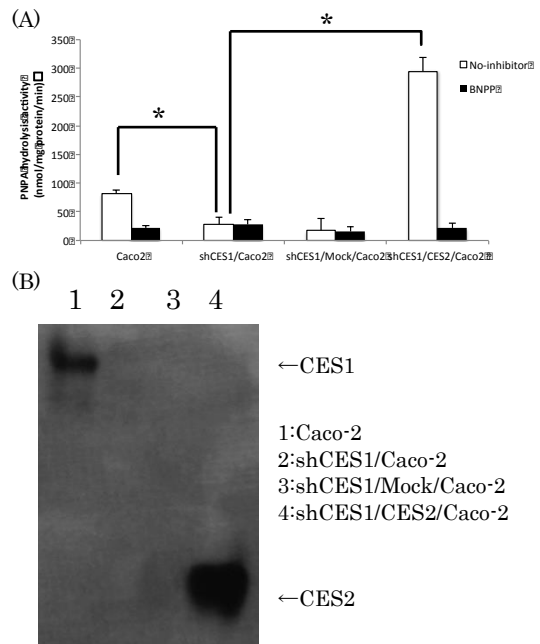


図 4. Caco-2, shCES1/Caco-2, shCES1/Mock/Caco-2, shCES1/CES2/Caco-2 細胞における CES 活性解析

(A) Caco-2 細胞より S9 を調整し、PNPA (100  $\mu\text{M}$ ) を基質とした CES 加水分解活性測定を行った。また BNPP (100  $\mu\text{M}$ ) を用いる事で、CES に対する BNPP の阻害試験を行った。\*, P<0.01.

(B) 酢酸  $\alpha$  ナフチルを基質として Native PAGE により CES1 の活性染色を行った。

らかとなった (図 5)。

また、単層膜形成に関与する密着結合タンパク質 (Occludin, ZO-1) 及び接着結合タンパク質 ( $\beta$ -catenin) の細胞内局在を、immunocytochemistry により解析したところ、shCES1/CES2/Caco-2 細胞において、Caco-2 細胞と同様に occludin, ZO-1,  $\beta$ -catenin が細胞膜上に発現していることが明らかとなった。

以上の結果より、Caco-2 細胞の機能の一つである単層膜形成能が shCES1/CES2/Caco-2 細胞において保持されている事が明らかとなった。

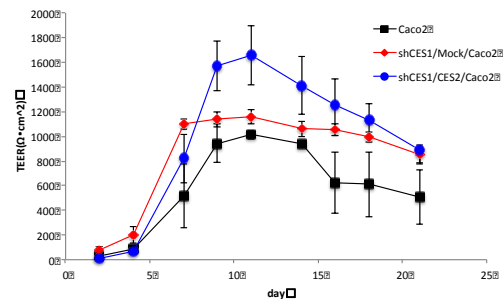


図 5. 経上皮電気抵抗 (TEER) 値の測定

Transwell insert に播種したそれぞれの Caco-2 細胞の TEER 値を 21 日間測定し、本細胞に必須の単層膜形成能を評価した。

## (4) まとめ

本研究により、Caco-2 細胞からヒト小腸の

CES プロファイルを持つ shCES1/CES2/Caco-2 細胞の樹立に成功した。この細胞はヒト小腸型の CES 分子種機能プロファイルを有し、さらに単層膜形成能を有することが明らかとなった。今後、ヒト小腸におけるエステル型プロドラッグの吸収評価系としての本細胞の有用性を明らかとすることにより、本細胞の医薬品開発への貢献が期待される。

一方、CES1/CES2 ヒト型マウスは、ゲノム CES クラスターの組み換えの困難さから、目標達成に至らなかった。今後、MAC ベクターを用いるなど異なるアプローチによりヒト型マウスもしくはラットの作製を試みる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Mizoi K, Takahashi M, Haba M, Hosokawa M. Synthesis and evaluation of atorvastatin esters as prodrugs metabolically activated by human carboxylesterases. *Bioorg Med Chem Lett*. 査読有 2016;26:921-3.
2. Ohura K, Nakada Y, Kotani S, Imai T. Design of Fexofenadine Prodrugs Based on Tissue-Specific Esterase Activity and Their Dissimilar Recognition by P-Glycoprotein. *J Pharm Sci*. 査読有 2015;104:3076-83.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/yakubutu/framepage4.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

千葉 寛 (CHIBA, Kan)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号： 40159033

##### (2) 研究分担者

今井 輝子 (IMAI, Teruko)

熊本大学・薬学部・教授

研究者番号： 70176478

細川 正清 (HOSOKAWA, Masakiyo)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号： 70181500

小林 カオル (KOBAYASHI, Kaoru)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号： 30255864

降幡 知巳 (FURIHATA, Tomomi)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号： 80401008

#### (3) 連携研究者

香月 康宏 (KAZUKI, Yasuhiro)

鳥取大学・医学研究院・准教授

研究者番号： 90403401