

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19590159
 研究課題名 (和文) 生体膜の分子を標的とした薬物透過促進法の戦略的構築

研究課題名 (英文) A Novel Strategy for Enhancement of Permeation and Absorption of Drugs by Modulation of Proteins Constructed Barrier Function in Biomembrane

研究代表者

渡辺 善照 (WATANABE YOSHITERU)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70175131

研究成果の概要：本研究では、特に薬物透過障壁として多くの問題が残されている吸収過程に焦点を合わせ、より安全で有効な薬物療法につながるために生体膜透過性の向上あるいは制御法を科学的に構築することを検討した。消化管上皮細胞層における透過性調節の重要ポイントとなる間隙 (タイトジャンクション) を構成するタンパク質 claudin に選択的に作用する物質の C-CPE について、吸収促進作用を示す活性ドメインを見出すことができた。野生型及び変異型 C-CPE を用いて吸収促進作用の分子メカニズムを検討した結果、C-CPE 作用時に小腸粘膜上皮細胞における変動遺伝子を解析できた。詳細は現在検討中である。消化管上皮モデル細胞 (Caco-2 細胞) への遺伝子導入を adenovirus vector を用いて効率よく出来ることを明らかにできた。これらの基盤研究の成果は、薬物治療において適正な効果を得るための薬物透過促進方法の構築に有用な情報を与えるものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：生体膜透過性、タイトジャンクション、タイトジャンクション構成分子、生体機能利用、生体膜透過促進物質、薬物吸収促進作用、遺伝子導入用アデノウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

薬物療法において適正な治療効果を得るためには、薬物を適用部位から作用 (標的) 部位に到達させるまでの過程において生体膜が有するバリアー機能の調節が不可欠と考えられる。特に、吸収過程においては薬物透過の障壁として多くの問題が残されており、より安全で有効な薬物療法につながるために生体膜透過性の向上あるいは制御法を

科学的に構築することは極めて重要である。このような現状を踏まえて我々は、従来の発想とは異なり、安全性の観点から有利と考えられる生体内物質等による生体膜透過を調節する方法の基盤研究を進めてきた。生理作用物質をスクリーニングした結果、一酸化窒素 (NO) 供与剤との併用により NO が直腸粘膜 (*Pharm. Res.*, 1998)、小腸粘膜 (*J. Pharm. Sci.*, 2000) 及び鼻腔粘膜 (*J. Drug Targeting*,

2000) から難吸収性薬物の吸収が適用部位に著明な組織刺激性を示すことなく促進されることを明らかにしてきた。その後、enteric nervous system (ENS)における神経伝達物質に着目、たとえば、エピネフリン(アドレナリン)が消化管での吸収促進作用物質として働くことを見出してきている(*J. Controlled Rel.*, 2005)。これらの研究を発展させ、ゲノム創薬研究の結果創生される薬物に対して汎用性の点で優れていると考えられる上皮細胞間隙経路をターゲットとした吸収促進法の開発を進めてきている。生体膜の物質透過障壁は、本来生体が有している一種の防御機構であり、これを一時的に改変し透過性をあげるには可逆的作用が必要である。これらの命題を達成するために、上皮細胞層の細胞間隙経路の機能解析、特に、タイトジャンクション(TJ)を構成する分子の機能解析と新たな薬物透過促進法を構築することを本研究の目標とした。

2. 研究の目的

現在までに我々が明らかにした薬物透過促進作用物質の標的分子を解明するとともに、発現・機能が確認された標的分子について small interfering RNA (siRNA) 発現ファイバー改変型 adenovirus (Ad) vector を構築し、実証的機能解析を試み薬物透過促進法の構築を図る。薬物透過促進に関して、吸収過程が作用部位への薬物移行の第一段階で極めて重要であることから、上皮細胞層を研究対象の第一選択とした。

(1) 薬物透過促進作用をもたらす物質と標的分子の検討

生体膜(上皮細胞層)における薬物透過促進について、現象レベルから生体膜を構成する分子を標的とした実証的機能解析を進める。

① TJを構成するタンパク質 claudin 等と特異的に相互作用するウエルシュ菌エンテロトキシンの毒性活性部分を除去したC末断片(C-CPE)をモデル作用物質(modulator)として、作用活性部位の探索をする。

Claudin modulator である C-CPE の吸収促進活性ドメインを解析する。

(2) 薬物透過促進物質の作用機構の検討

RNA 干渉の技術およびファイバー改変型 Ad vector を用いた透過促進作用発現時の TJ 構成タンパク質の変動を解析する。

① C-CPE 作用時の小腸粘膜上皮細胞における変動遺伝子を解析する。ヒト消化管上皮細胞モデルとして薬物透過研究や生化学的基礎研究に用いられている Caco-2 細胞において、C-CPE の作用による TJ バリアー機能低下時に発現変動する遺伝子をサブトラクシ

ョン法により網羅的なスクリーニングを行う。
② Adenovirus (Ad) vector を用いた Caco-2 細胞層への効率的遺伝子導入方法の確立を図る。C-CPE 等の薬物促進作用物質の作用機構を TJ 及び細胞内での分子レベルで調べるために、各種の機能性タンパク質を発現させて検討する。

3. 研究の方法

主な方法を下記に示す。

(1) TJ 構成タンパク質 claudin-4

modulator, C-CPE の活性ドメインマッピング

① Alanine scan のための C-CPE 変異体を調製する。

文献に従い、各種の primer を用いて、polymerase chain reaction (PCR) により C 末側各 16 アミノ酸を各々 alanine に置換する。

② Competition assay と Pull-down assay を実施する。

③ 上皮細胞膜電気抵抗値 (TEER) を測定する。

Transwell chamber に播種した Caco-2 細胞層について、TEER 値を計測する。

④ *In situ* 小腸ループ法にて C-CPE の吸収促進作用を評価する。

Fluorescein isothiocyanate (FITC) - dextran 4000 (FD-4, MW4000) を難吸収性モデル薬物として選択し、麻酔下ラットの空腸ループ内に投与し、血漿中 FD-4 濃度を測定する。

(2) C-CPE 作用時の小腸粘膜上皮細胞における変動遺伝子の解析

① C-CPE (野生型、変異体) を Caco-2 細胞に作用時に変動する遺伝子をサブトラクション法で網羅的にスクリーニングする。

Real time PCR で変動遺伝子を確認する。

② Caco-2 細胞において、siRNA のトランスフェクションにより、目的遺伝子(変動が認められた遺伝子)のノックダウンを図る。

③ TJ バリアー機能形成過程における目的遺伝子(ノックダウン遺伝子)の関与を検討する。

(3) Adenovirus (Ad) vector を用いた Caco-2 細胞層への効率的遺伝子導入方法の開発

① Ad vector の調製は、文献に準じ *in vitro* ライゲーション法により作製する。ルシフェラーゼまたは β -galactosidase (Lac Z) 発現カセットは Ad ゲノムの E1 領域に組み込む。

② ルシフェラーゼ発現 Ad vector 又は Lac Z 発現 Ad vector を、24 well dish 又は Transwell に播種した Caco-2 細胞層にそれぞれ作用させた後、ルシフェラーゼ活性又は X-gal 染色により遺伝子導入効率を評価する。

③ Ad vector 等を適用時の細胞障害性の評

価は、培養細胞メディアムを回収し、lactate Dehydrogenase (LDH)活性を測定し行う。

4. 研究成果

本研究課題について、主な成果を記述する。

(1) Claudin-4 modulator, C-CPE の活性ドメインマッピング

[雑誌論文① A. Takahashi ほか]

これまでに研究代表者は、C-CPE が消化管上皮細胞層の TJ に存在する claudin-4 に結合し、TJ を開口させ、難吸収性薬物 (例、FITC-dextran) の吸収効率を高めることを見出し、報告している。この C-CPE の吸収促進活性部位を同定するために、Alanine scan 法として site-directed mutagenesis により吸収促進作用をもつドメインを網羅的に解析した。先に、C-CPE の C 末端側 16 アミノ酸を欠損させた変異体では claudin-4 に対する作用が消失することを明らかにしている。そこで、個々の 16 アミノ酸を alanine に置換した C-CPE 変異体を作成し、野生型 C-CPE と活性を比較した。消化管上皮モデル細胞 Caco-2 細胞 (ヒト結腸癌由来細胞) を用いて、TJ 機能の指標の一つとして上皮細胞膜電気抵抗値

(TEER) を測定した。野生型 C-CPE を Caco-2 細胞層に適用した時の TEER を 100% として、各種変異型 C-CPE を適用時の TEER を相対比較した結果を表 1 に示す。Tyr306、Tyr310、Tyr312 又は Leu315 を alanine に置換した変異体では TEER が低下し、claudin-4 との相互作用が減少することが明らかになった。

表 1 Caco-2 細胞層におけるタイトジャンクション (TJ) の透過バリアー機能に及ぼす野生型及び変異型 C-CPE の影響

野生型又は 変異型 C-CPE	TEER 減少率 (% of C-CPE)
C-CPE	100
Ser304Ala	100.3 ± 0.5
Ser305Ala	100.1 ± 2.3
Tyr306Ala	64.1 ± 4.3*
Ser307Ala	100.4 ± 1.8
Gly308Ala	98.1 ± 0.2
Asn309Ala	104.4 ± 1.3
Tyr310Ala	93.8 ± 1.2
Pro311Ala	101.4 ± 2.3
Tyr312Ala	100.1 ± 1.5
Ser313Ala	104.6 ± 0.8
Ile314Ala	98.3 ± 1.4
Leu315Ala	45.1 ± 5.3*
Gln317Ala	98.8 ± 1.3
Lys318Ala	99.3 ± 0.8
Phe319Ala	103.5 ± 0.9

TJ の透過バリアー機能達成後、野生型又は変異型 C-CPE (20 μg/mL) を添加し、TEER を測定。*) C-CPE の値に対し有意差あり。

A. Takahashi et al., *Biochem. Pharmacol.* 75: 639-1648 (2008).

さらに Tyr306 及び Leu315 の二重変異体を調製し検討したところ、TJ を開裂させる活性が有意に減弱した。これらのことから、Tyr306 及び Leu315 は C-CPE と claudin-4 との相互作用による TJ 機能変化 (開裂) に鍵となる残基であることが示された。一方、ラット in situ 小腸ループ法を用いて野生型 C-CPE と Tyr306 及び Leu315 二重変異体の作用を実際に生体で検証を行った。難吸収性モデル薬物 FITC-dextran 4000 (FD-4) を C-CPE または変異型 C-CPE と同時に空腸内に投与したところ、C-CPE の場合は血漿中 FD-4 濃度 - 時間曲線下面積 (AUC_{0-4h}) が C-CPE を含まない vehicle に比べて有意に (6 倍以上) 増大したが、二重変異体では AUC_{0-4h} の増大が観察されず、吸収促進作用は認められなかった。この結果は、TEER 値測定結果と良く一致した。

上記の結果は、C-CPE を基本とした claudin modulator (claudin の機能を改変させる物質) の新規創製に有用な情報を与えるものである。Claudin は多数のファミリーを有しており、claudin-4 のほか、例えば、皮膚に存在する claudin-1 との相互作用物質の開発にも応用できると考えられる。今回の研究は、claudin 以外の TJ 構成タンパク質 (例、tricellulin) の機能を解析するためにも有用と考えられ、TJ を介した薬物透過促進法を構築するために意義ある成果を得たものと判断する。

(2) C-CPE 作用時の小腸粘膜上皮細胞における変動遺伝子の解析

[学会発表③、⑧ 仙内光子ほか]

野生型及び変異型 C-CPE を用いて吸収促進作用の分子メカニズムを検討した。ヒト消化管上皮細胞モデルとして薬物透過研究や生化学的基礎研究に用いられている Caco-2 細胞を実験系として、C-CPE の作用による TJ バリアー機能低下時に発現変動する遺伝子をサブトラクション法により網羅的にスクリーニングし、7 種の遺伝子の発現が変動することを見出した (表 2)。

表 2 サブトラクション法で同定された変動遺伝子

Sec61β	(Homo sapiens Sec61 beta subunit)
GSTP1	(Homo sapiens glutathione S-transferase pi)
EEF1A1	(Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1)
PGK1	(Homo sapiens phosphoglycerate kinase 1)
FAM50A	(Homo sapiens family with

sequence similarity 50, member A)
ALDH5A1 (Homo sapiens aldehyde
dehydrogenase 5 family, member A1)
CDCP1 (Homo sapiens CUB domain
containing protein 1)

これらのうち、RT-PCR 等で変動が確認された 4 種の遺伝子 Sec61 β 、GSTP1、EEF1A1 及び PGK1 に着目した。これらの分子が TJ の機能に実際に関わっているかを評価するため、同定された遺伝子のうち分子の機能的な面から先ず Sec61 β を対象として、Caco-2 細胞において siRNA をトランスフェクションし Sec61 β のノックダウンを試みた。Sec61 β の発現を低下させて、Caco-2 細胞の TJ バリアー機能形成過程、または C-CPE 作用による TJ バリアー機能低下過程に及ぼす影響を膜電気抵抗値 (TEER) を指標として検討した。しかし、いずれの過程においても TEER の時間的推移が Sec61 β 発現の低下時に変化はなく、Caco-2 細胞の TJ バリアー機能の変動に Sec61 β の関与は小さいことが示唆された。現在、他の遺伝子について精査中である。TJ 開裂に関する分子レベルでの機構の解明は、薬物透過促進法を確立していくために重要である。Claudin と特異的に結合する C-CPE を作用させたときの遺伝子変動と機能性タンパク質発現の詳細な解析を継続する。

(3) Adenovirus (Ad) vector を用いた Caco-2 細胞層への効率的遺伝子導入方法の開発

[学会発表① N. Koizumi ほか、⑥ Y. Watanabe ほか]

消化管上皮細胞モデル実験系として用いられる Caco-2 細胞は、いくつかの薬物代謝酵素や機能タンパク質の発現が少ないことが知られている。本研究課題に関しても、TJ の機能解析を深めるうえで機能タンパク質の発現法を確立することが有用である。代表研究者らは、これまで高い遺伝子導入効率を持つ Ad vector に着目し種々の細胞への遺伝子導入の基礎研究を続けてきたが、Caco-2 細胞に関しては Ad の主な感染受容体である coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) が TJ に局在することから高い遺伝子導入効率が得られにくいことが判明した。そこで、TJ 開裂作用のあるカプリン酸ナトリウム (C10) を併用し、Caco-2 細胞への効率的遺伝子導入方法の確立を試みた。 β -galactosidase (Lac Z) 発現遺伝子を含む Ad vector を、TEER 測定により単層膜形成を確認した Caco-2 細胞に C10 とともに適用した。Caco-2 細胞層の TEER 値は一時的に低下するが Ad vector 及び C10 を除去すると再度 TEER 値は上昇し、TJ 機能は回復した。細胞を X-gal 染色により評価した結果、Ad vector を単独

で適用した時よりも C10 を併用し TJ を開裂させた場合の方が Lac Z の発現が高いことから、C10 併用により Caco-2 細胞への Ad vector による遺伝子導入効率を高められることを明らかにできた。なお、培養メディウム中の lactate dehydrogenase (LDH) 活性測定から、細胞障害性は低いことも判明した。薬物透過促進法を構築していくために、研究戦略上 Caco-2 細胞を用いた基盤研究は重要である。各種の遺伝子導入を図り機能性タンパク質を Caco-2 細胞に発現させる可能性を示唆できた本研究は、薬物透過の研究や遺伝子導入効率が低いほかの細胞への応用にも役立つものと考えられる。

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 1 件)

- ① Azusa Takahashi, Eriko Komiya, Hideki Kakutani, Takeshi Yoshida, Makiko Fujii, Yasuhiko Horiguchi, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Shin-ichi Tsunoda, Naoya Koizumi, Katsuhiro Isoda, Kiyohito Yagi, Yoshiteru Watanabe and Masuo Kondoh, Domain Mapping of A Claudin-4 Modulator, the C-terminal region of C-terminal Fragment of *Clostridium perfringens* Enterotoxin, by Site-directed Mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.* 75: 1639-1648 (2008). 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

- ① Naoya Koizumi, Tomomi Sasaki, Hiroyuki Mizuguchi, Makiko Fujii and Yoshiteru Watanabe, Infectious mechanism of adenovirus vector in Caco-2 cell for permeability study using a transgene expressed intestinal epithelium model. 8th International ISSX meeting, 2007 年 10 月 9-12 日.
- ② Naoya Koizumi, Yoshiaki Yamagishi, Hiroyuki Mizuguchi, Makiko Fujii and Yoshiteru Watanabe, Development of efficient gene transfer system into Caco-2 cell monolayer by adenovirus vector. Pan-Pacific International Partnership Conference on Pharmaceutical and Life Sciences. 4th US-Japan Joint Conference, 2008 年 2 月 26-28 日.
- ③ 仙内光子, 小泉直也, 大内可成子, 浜田華香, 近藤昌夫, 藤井まき子, 八木清仁, 渡辺善照. ウエルシュ菌エンテロトキシン C 末断片 (C-CPE) 作用時の小腸粘膜

上皮細胞における変動遺伝子の解析。
日本薬学会第128年会, 2008年3月26-28日。

- ④ 佐伯理恵, 角谷秀樹, 吉田孟史, 深坂勝広, 鈴木亮, 近藤昌夫, 渡辺善照, 丸山一雄, 八木清仁, ウェルシュ菌エンテロトキシンC末断片(C-CPE)を利用したclaudin-4ターゲティング法の開発。日本薬学会第128年会, 2008年3月26-28日。
- ⑤ 小泉直也, 萩原恵理, 岩島順子, 山岸喜彰, 水口裕之, 藤井まき子, 渡辺善照

,
アデノウイルスカプシド蛋白質を利用した効率的遺伝子導入法の開発。第24回日本DDS学会, 2008年6月29-30日。

- ⑥ Yoshiteru Watanabe, Naoya Koizumi, Hiroyuki Mizuguchi and Makiko Fujii, Efficient gene transfer into human Intestinal epithelial model with Adenovirus vector. The IXth World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2008年7月27日 - 8月1日。
- ⑦ 小泉直也, 山岸喜彰, 萩原恵理, 岩島順子, 水口裕之, 藤井まき子, 渡辺善照, アデノウイルスシャフト蛋白質によるFITC-dextranの細胞内取り込み機構の解明。日本薬学会第129年会, 2009年3月26-28日。
- ⑧ 仙内光子, 山岸喜彰, 小泉直也, 水口裕之, 近藤昌夫, 八木清人, 藤井まき子

,
渡辺善照, ヒト結腸由来Caco-2細胞におけるtight junction分子機構の解析を目的としたclaudin発現システムの確立。日本薬学会第129年会, 2009年3月26-28日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 善照 (WATANABE YOSHITERU)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70175131

(2) 研究分担者

藤井 まき子 (FUJII MAKIKO)

昭和薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50199296

小泉 直也 (KOIZUMI NAOYA)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80433845

(3) 連携研究者

近藤 昌夫 (KONDOH MASUO)

大阪大学大学院・薬学研究科・准教授

研究者番号：50309697