

令和元年6月14日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15522

研究課題名(和文)薬物吸収における非攪拌水層構成タンパク質の機能及び分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism and functions of mucus-glycoprotein in intestinal drug absorption.

研究代表者

岸本 久直 (Kishimoto, Hisanao)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80723600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸管上皮細胞の管腔側表面を覆う水溶性の粘液層は、腸管上皮近傍において非攪拌水層を形成することで薬物吸収時の障壁となることが古くから指摘されている。しかし、粘液層の主要構成タンパク質としてムコ多糖タンパク質であるmucinが同定されているにも関わらず、薬物吸収とmucinとの関連性について分子レベルで検討した報告は無く、薬物の細胞膜透過におけるmucinの役割は不明である。本研究では、膜結合型mucinであるMUC1が脂溶性薬物の細胞膜透過において重要な制御因子となる可能性を示し、薬物の腸管吸収において粘液層を中心とした腸管表面構造をより詳細に理解することの重要性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでの薬物吸収理論において粘液層全体への考察に留まっていた脂溶性薬物と粘液層との関係性について分子論的な評価・考察を可能にした。本研究で得られた成果は、医薬品開発における腸管吸収の適正な評価法を確立する上での有益な情報を与えるものと考えられ、ヒト腸管における薬物吸収の高精度予測を可能にするための基盤情報を提供し、医薬品開発の効率化・臨床開発の成功確率向上にも貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The unstirred water layer (UWL) permeation is suggested to be a rate-limiting step in the intestinal absorption of hydrophobic drugs. The major glycoprotein components of the UWL are mucins, which classified into two structural types: secretory and membrane-bound mucins. Each membrane-bound mucin has a large extracellular domain, which is heavily glycosylated, their intestinal expression in gastrointestinal tract may affect intestinal drug absorption. However, there have been no reports that describe the contribution of mucins to intestinal drug absorption at the molecular level. In this research project, we focused on typical membrane-bound type mucins (MUC1 and MUC13) expressed in gastrointestinal tract, and demonstrated that MUC1 could be limit the permeation of hydrophobic drugs. Furthermore, we found that the effect of mucin on the membrane permeation process may be different from molecular types, based on the molecular size of extracellular domain.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：非攪拌水層 膜結合型mucin MUC1 腸管吸収

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

効率的な医薬品開発を推進するためには、その開発初期段階においてヒトでの薬物の経口バイオアベイラビリティや腸管吸収性を正確に予測する必要がある。多くの製薬企業において、ヒト腸管由来の培養細胞 (Caco-2 細胞) や人工脂質膜 (PAMPA) などを用いた *in vitro* 評価系に加えて、ヒト体内動態予測ソフトウェアの開発および導入が進み、薬物の体内動態予測に関する研究は盛んに行われている。しかし、薬物の「腸管吸収性」は経口投与後の薬物体内動態において最も予測困難とされている過程の一つであり、現在までにヒト腸管吸収予測システムの開発を指向した様々な研究が展開され、特に *in silico* 薬物動態予測研究が目覚ましい進歩を遂げている一方で、未だヒトでの腸管吸収性を高精度且つ正確に予測するための方法論の確立には至っていないのが現状である。実際に、既存の *in vitro* 及び *in vivo* 評価系に加え化合物固有の物理化学的性質を指標として推定される吸収率よりも、ヒトに投与した場合の吸収率が低下する事例が多々存在する。そのため臨床試験が進むにつれ、開発の初期で設定した臨床投与量を増量せざるを得ない事例も生じている。その要因として、腸管の生理機能と薬物吸収との関係性について十分な理解がなされていないこと、最適なヒト腸管吸収評価システムが未確立であることが挙げられる。

一般に、薬物の腸管吸収性は、分子サイズや脂溶性、*pKa*、電荷などの薬物固有の物理化学的要因に加え、上皮細胞膜に局在するトランスポーターや代謝酵素、腸管粘膜近傍に形成される水溶性の粘液層などの生理学的要因によって制御されている。なかでも粘液層は腸管上皮細胞の管腔側表面を覆う水溶性粘液多糖からなり、細胞膜近傍を覆うように存在し、腸管上皮近傍において非攪拌水層を形成することで薬物吸収時の障壁となることが古くから指摘されてきた。特に脂溶性が高く、細胞膜透過性の高い薬物においては、この粘液層の透過が吸収過程の律速段階と考えられている。しかし、粘液層の主要構成タンパク質としてムコ多糖タンパク質である mucin が同定されているにも関わらず、薬物吸収と mucin との関係性について分子レベルで検討した報告は無く、薬物の細胞膜透過における mucin の役割は不明である。従って、医薬品化合物の多くが脂溶性であることを考慮すると、ヒト腸管での薬物の吸収挙動を高精度に予測するためには、薬物吸収と mucin との関係性を明らかにする必要がある。

Mucin 分子は、現在約 20 種類ほどが同定されており、線細胞から産生される分泌型 (MUC2, 5AC, 5B, 6) と上皮細胞膜に結合した状態で存在する膜結合型 (MUC1, 3A, 3B, 4, 12, 17) に分類される。特に膜結合型 mucin は高度に糖鎖修飾された巨大な細胞外ドメインを有するため、薬物の腸管吸収性に対し多大な影響を及ぼし得ると想定される。加えて、膜結合型 mucin はサブタイプ間での分子サイズの差が顕著 (最大約 10 倍) であることから、薬物吸収に与える影響に分子種差が存在することが予想される。しかし、培養細胞での安定発現系に関する事例は少なく、また薬物吸収性評価に mucin の存在を考慮した事例も無い。したがって、薬物吸収と膜結合型 mucin の分子種差との関連性を明らかにすることは、腸管吸収を制御する因子の特定だけでなく、高精度且つ正確な腸管吸収予測を可能にするものと考えられる。

一方、これまでに一酸化窒素 (NO) 放出作用を有する試薬として選択した NOC7 (1-hydroxy-2-oxo-3-(*N*-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazene) が NO 放出を介して非攪拌水層の機能低下を惹起することを見出し、非攪拌水層における薬物の透過性を制御できる可能性や、新規吸収促進効果を提唱するに至っている。しかし、薬物の腸管吸収に対する非攪拌水層自体の影響について詳細が不明な状況にあり、NO と mucin の相互作用に関する検討は未だなされていない。これら非攪拌水層へ作用し得る吸収制御機構を積極的に利用することで、非攪拌水層を標的とした吸収改善技術の開発が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

非攪拌水層の主要構成タンパク質のうち膜結合型 mucin に着目し、薬物の腸管吸収を制御する分子機構の一つとしての膜結合型 mucin の関与を明らかにすることを目的とし、以下の項目について検討した。

- (1) 膜結合型 mucin 発現系細胞を樹立し、膜透過性と分子種差との関連性を定量的に評価する。
- (2) 薬物の膜透過性に対する mucin の影響を、物性の異なる薬物を用いて定量的に評価する。
- (3) 非攪拌水層に対する NO の影響を検討し、薬物吸収制御の可能性を評価する。

3. 研究の方法

ヒト乳癌由来細胞 (MCF7 細胞) を用いて、GFP 標識化ヒト MUC1 およびヒト MUC13 安定発現系細胞を作製した。MCF7 細胞中のヒト MUC1 およびヒト MUC13 のタンパク質発現量と mRNA 遺伝子発現量解析は、それぞれ Western Blotting および RT-PCR により評価し、細胞内局在は蛍光顕微鏡下で観察した。脂溶性薬物の細胞膜透過性に対する膜結合型 mucin の影響を評価するため、モデル薬物として抗がん剤である paclitaxel (PTX)、5-fluorouracil (5-FU) および doxorubicin (DOX) を選択し、MUC 安定発現系 MCF7 細胞への抗がん剤作用後の細胞生存率を MTT assay により評価した。また、各種抗がん剤に加えて rosebengal を選択し、細胞内取り込み量を定量的に評価した。

非攪拌水層に対する NO の影響を検討するために、NOC7 に加えて、既に臨床応用されヒトに対する安全性が確認されている NO 供与体である sodium nitroprusside (SNP) を用い、NO 供与体添加時における各種脂溶性薬物 (griseofulvin, antipyrine, flurbiprofen) の吸収量の変

化についてラット摘出腸管を用いた *in vitro* Sac 法により検討した。このとき腸管管腔内に放出された mucin 量を alcian blue 染色により定量評価した。

4. 研究成果

(1) 膜結合型 mucin (ヒト MUC1 およびヒト MUC13) 安定発現系 MCF7 細胞の構築

作製した MUC1 および MUC13 安定発現系 MCF7 細胞における GFP 標識化 mucin タンパク質の細胞内局在を蛍光顕微鏡により観察したところ、GFP の局在は細胞膜上で顕著に高く、導入した MUC1 および MUC13 が細胞膜上に発現していることが示された。また、Western Blotting 及び RT-PCR によりタンパク質発現量および mRNA 遺伝子発現量を評価したところ、empty vector を導入した MCF7-mock 細胞においては MUC1 および MUC13 の発現が認められなかったのに対し、安定発現系細胞においてはタンパク質・mRNA の高い発現を確認した。以上より、膜結合型 mucin 安定発現系細胞としての妥当性が示された。

(2) 脂溶性薬物の細胞膜透過に対する膜結合型 mucin の影響

まず高脂溶性のモデル薬物である paclitaxel (PTX) の細胞膜透過性に対するヒト MUC1 および MUC13 の影響を評価した。PTX (適用濃度範囲; 1 nM ~ 2 mM) 添加 72 時間後の細胞生存率を MTT assay により評価したところ、MCF7-mock 細胞においては約 30%に低下したのに対してヒト MUC1 安定発現系 MCF7 細胞においては約 70%に維持された。MCF7 細胞に対する PTX の LD₅₀ 値は、mock 細胞及び MUC1 安定発現細胞において、それぞれ 0.16 μM 及び 106.02 μM と算出され、MUC1 発現によって PTX に対する感受性が顕著に低下することが示された (図 1)。一方、MUC1 安定発現細胞における PTX の LD₅₀ 値は 0.10 μM と算出され、PTX に対する感受性には、明らかな mucin の分子種差が存在することが示された。同様に、5-FU および DOX 添加後の細胞生存率は、mock 細胞において用量依存的に低下したのに対し、MUC1 安定発現細胞では有意に維持された。また、5-FU 及び DOX の LD₅₀ 値も、MUC1 発現によってそれぞれ上昇したものの、その程度は約 40 倍および約 10 倍であった。一方で、MUC13 安定発現細胞における生存率は mock 細胞と同程度を示し、他の抗がん剤に対しても明らかな分子種差が存在することが示された。

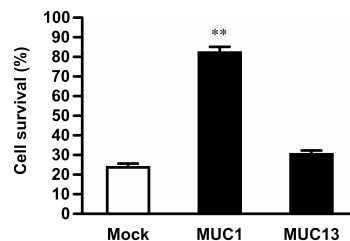


図 1 細胞生存率 (PTX; 1 μM 作用時)

PTX は細胞内において微小管重合を阻害することで細胞障害性を示すため、細胞生存率の維持は細胞内取り込みの低下に起因した結果であると考えられた。本結果の妥当性を示すため、生存率に顕著な差が認められた PTX 10 μM 条件下における細胞内取り込み量を LS-MS/MS により直接定量した結果、MCF7-mock 細胞と比較してヒト MUC1 安定発現系 MCF7 細胞において、細胞内 PTX 量の著しい低下 (約 75%低下) が示された。一方で、PTX は排出型トランスポーターである P 糖タンパク質 (P-gp) の典型的な基質であることから、細胞内への MUC1 遺伝子導入による P-gp への影響を評価した。本検討で用いた MCF7 細胞における P-gp タンパク質及び mRNA 遺伝子発現量は著しく低いことが示され、また MUC1 遺伝子導入による影響は認められないことが示された。これらの結果より、PTX の細胞膜透過に対し、膜上に発現した MUC1 が抑制的に作用した事が示された。以上より、MUC1 は、薬物の膜透過性を制御する重要な生体因子である可能性が示唆された。

次に、PTX と物理化学的性質の異なるモデル薬物として rosebengal を選択し、rosebengal の細胞膜透過に対する MUC1 の影響を評価した。その結果、rosebengal の細胞内取り込み量は MCF7-mock 細胞と比較してヒト MUC1 安定発現系 MCF7 細胞において著しく低下した。一方、ヒト MUC13 安定発現系 MCF7 細胞において rosebengal の細胞内取り込み量は mock 細胞と同程度であり、先の検討と同様に、脂溶性薬物の細胞膜透過に対して明らかな分子種差が存在することが示された。Rosebengal は粘液層が剥離した細胞を染色する性質を有しており、眼表面粘液の損傷を定性的に評価する試薬として汎用されている。したがって、本検討により得られた結果は、MUC1 発現による rosebengal の細胞内取り込みの抑制を示すものであり、PTX による評価と同様、rosebengal の細胞膜透過に対し MUC1 が抑制的に作用した事が示された。

以上の結果より、膜結合型 mucin である MUC1 タンパク質が、脂溶性薬物の膜透過性に対して抑制的に働く可能性が示され、さらに、膜結合型 mucin の有する細胞外ドメインの分子サイズおよび糖鎖修飾に基づいた分子種差が存在することが示された。本検討により得られた結果は、薬物の消化管膜透過機構において粘液層を中心とした腸管表面構造をより詳細に理解することの重要性を示し、ヒト腸管における薬物吸収の高精度予測を可能にするための基盤情報を提供する有用な知見となるものと考えられた。

(3) 非攪拌水層に対する NO の影響および薬物吸収制御の可能性

経細胞輸送を介した薬物の消化管吸収に及ぼす一酸化窒素 (NO) の影響について、吸収性制御の実用化を念頭に、促進改善効果とその分子機構解明に関する詳細な検討を行った。NO 供与体である SNP を用い、SNP 前処理時 (3 mM, 60 min) における薬物の吸収量の変化につ

いてラット摘出腸管を用いた *in vitro* Sac 法により検討したところ、脂溶性薬物である griseofulvin および flurbiprofen の膜透過性は十二指腸部および空腸部において有意に上昇し、回腸部より下部では変化は認められなかった。一方、antipyrine の膜透過性に対する SNP 前処理による効果は、いずれの腸管部位においても認められなかった。さらに SNP 前処理による膜透過性の変化の程度は、実験条件下における logD 値が高いモデル薬物ほど顕著であることが示された。これまでに、NOC7 により放出された NO が、粘液層除去剤である dithiothreitol (DTT) と同様に、腸管粘液層に対して影響を及ぼしたことにより脂溶性薬物の膜透過性を上昇させることを明らかにしている (Kishimoto *et al*, *J Pharm Sci*, **105**:729–733, 2016)。したがって、本検討において得られた SNP による吸収促進効果についても、NO 放出を介して粘液層の機能低下を惹起した可能性が推察された。そこで、SNP による吸収促進効果について作用機序を明らかにすべく、腸管管腔内に放出された mucin 量を定量評価した。その結果、SNP および NOC7 とともに、前処理後の腸管管腔内に放出された mucin 量が上昇することが示され、さらにその効果が上部消化管特異的であることが示された (図 2)。

以上の結果より、SNP は transcellular route を介した受動拡散による薬物吸収に対し、非攪拌水層を構成する mucin に影響を与えることによって機能低下を惹起し、脂溶性薬物の膜透過性を増大させることを見出した。

以上、本研究では、これまでの薬物吸収理論において粘液層全体への考察に留まっていた脂溶性薬物と粘液層との関係性について分子論的な評価・考察を可能とし、今後、薬物の消化管膜透過機構における粘液層の影響をより詳細に明らかにすることの重要性が示された。本研究で得られた成果は、医薬品開発における腸管吸収の適正な評価法を確立する上での有益な情報を与えるものと考えられ、ヒト腸管における薬物吸収の高精度予測を可能にするための基盤情報を提供するのみならず、新たな吸収改善機構を介した Drug Delivery System への発展にも貢献するものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 14 件)

宮崎歌織、岸本久直、村谷美穂、田野文音、白坂善之、井上勝央：脂溶性薬物の腸管膜透過性に及ぼす腸管粘液の影響及び mucin 発現解析. 日本薬剤学会第 32 年会, 2017 年 5 月 11 日 - 13 日 (さいたま)

岸本久直、宮崎歌織、村谷美穂、白坂善之、井上勝央：薬物の経粘膜透過に与える粘液層の影響とその分子メカニズム解明に向けたアプローチ. 第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2017 年 10 月 26 日 - 27 日 (金沢)

宮崎歌織、岸本久直、白坂善之、井上勝央：Regional distribution of mucin molecules in rat small intestine. 日本薬物動態学会 第 32 回年会, 2017 年 11 月 29 日 - 12 月 1 日 (東京)

Hisanao Kishimoto, Kaori Miyazaki, Yoshiyuki Shirasaka, Katsuhisa Inoue : Effect of mucus layer on the transcellular absorption of lipophilic drugs in rat small intestine. *Experimental Biology* 2018, April 21 - 25, 2018 (San Diego, USA)

田野文音、岸本久直、宮崎歌織、大森萌子、白坂善之、井上勝央：脂溶性薬物の腸管吸収における薬物 - 粘液間相互作用の評価. 日本薬剤学会 第 33 年会, 2018 年 5 月 30 日 - 6 月 1 日 (東静岡)

宮崎歌織、岸本久直、大森萌子、白坂善之、井上勝央：薬物の細胞膜透過過程における粘液層構成タンパク質 MUC1 の影響. 日本薬剤学会 第 33 年会, 2018 年 5 月 30 日 - 6 月 1 日 (東静岡)

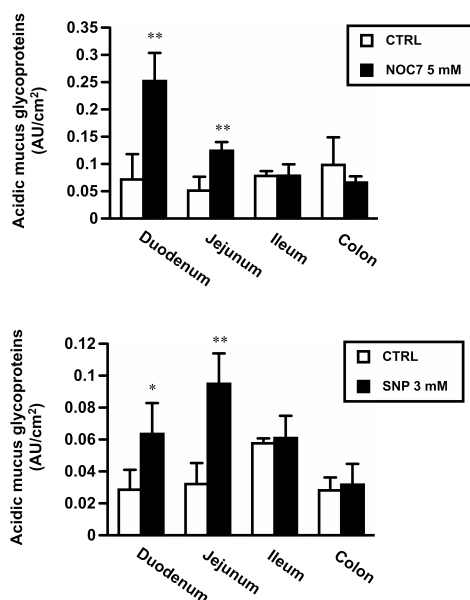


図 2 腸管管腔内中の mucin 量

Kaori Miyazaki, Hisanao Kishimoto, Yoshiyuki Shirasaka, Katsuhisa Inoue, The relation between regional distribution of mucin molecules and intestinal drug absorption in rat small intestine. The 2nd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics, July 10 - 11, 2018 (Seoul, Korea)

岸本久直、宮崎歌織、白坂善之、井上勝央：薬物の腸管吸収過程における粘液層の寄与とその分子メカニズムについて. 2018年度 生理学研究所研究会, 2018年9月6日 - 7日(東岡崎)

Hisanao Kishimoto, Kaori Miyazaki, Yoshiyuki Shirasaka, Katsuhisa Inoue : Evaluation of the transcellular transport of hydrophobic drugs in MUC1-knockout MDCKII cells. 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX, October 1 - 5, 2018, (Kanazawa)

Kaori Miyazaki, Hisanao Kishimoto, Hiroshi Fujisawa, Yoshiyuki Shirasaka, Katsuhisa Inoue : MUC1 is involved in the membrane permeation of hydrophobic drugs. 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX, October 1 - 5, 2018, (Kanazawa)

岸本久直、宮崎歌織、白坂善之、井上勝央：内因性 MUC1 ノックアウト MDCKII 細胞を用いた脂溶性薬物の経細胞輸送評価. 第 40 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2018年10月18日 - 19日(仙台)

宮崎歌織、岸本久直、白坂善之、井上勝央：薬物の生体膜透過機構における膜結合型 mucin の影響. 第 40 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2018年10月18日 - 19日(仙台)

岸本久直：薬物の腸管吸収における粘液層構成タンパク質 mucin の影響. 第 3 回トランスポーター研究会関東部会, 2018年11月17日(千葉)

宮崎歌織、岸本久直、藤澤弘、白坂善之、井上勝央：抗がん剤の細胞膜透過性に対する mucin 分子の抑制効果. 日本薬学会第 139 年会 2019年3月20日 - 23日(千葉)

〔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

東京薬科大学薬学部薬物動態制御学教室 HP

<https://www.ps.toyaku.ac.jp/yakubutsudotai/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。