

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：32425

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14989

研究課題名（和文）細胞内GTP量制御を用いた新規細胞膜透過性制御機構の開発

研究課題名（英文）Development of novel cellular membrane permeability control mechanism using regulation of intracellular GTP amount

研究代表者

瀧沢 裕輔 (Takizawa, Yusuke)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40453807

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では消化管からの薬物の新規吸収制御機構として、細胞内GTP量の変化によるTJの制御の可能性に着目し研究を展開した。GTP生成のde novo経路において律速酵素であるIMPDHの阻害剤であるMPAの暴露により、細胞内GTP量を減量させ、TJへの影響を検討した。TJ開口の指標となる経上皮膜間抵抗値は、MPAの濃度および暴露時間依存的な上昇が認められた。MPA暴露により細胞内ATP量は変化せず、細胞内GTP量のみ減少によるTJ構成促進機構の解明には至らなかったが、細胞内GTP量制御による消化管粘膜透過性制御の新規システムの可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物の消化管吸収は、経口投与製剤の効果発現のための最初の障壁であり最大の障壁ともいえる。現在、難溶性・難吸収性の薬物が増加していることから、消化管における吸収制御技術の向上は経口投与製剤の開発および使用において極めて重要な課題である。これまでに薬物の吸収促進剤を含めた吸収制御に関する研究は数多くなされてきているが、臨床応用に至った例は数少ない。したがって、消化管吸収における吸収制御技術を目的とし、その可能性を見出すことができた本研究は、社会的ニーズが高い研究であるといえる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the possibility of regulating the tight junction (TJ) by altering intracellular guanosine triphosphate (GTP) levels as a novel mechanism for regulating drug absorption from the gastrointestinal tract. Mycophenolic acid (MPA), an inhibitor of Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH), the rate-limiting enzyme in the de novo pathway of GTP production in cells, reduced intracellular GTP levels and affected TJ. The trans-epithelial electrical resistance (TEER), an indicator of TJ opening, increased in a concentration- and exposure time-dependent manner of MPA. On the other hand, the amount of intracellular ATP was not affected by MPA exposure.

Although we were unable to clarify the detail mechanism of TJ enhancement by MPA exposure, we found the possibility of a novel system for regulating gastrointestinal mucosal permeability by regulating intracellular GTP levels.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：Guanosine triphosphate Tight junction Mycophenolic acid IMPDH inhibitor Paracellular pathway

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

Guanosine triphosphate (GTP)はATPに次ぐ第二の細胞内エネルギー通貨として位置付けられているが、その細胞内量はATPの5分の1から10分の1(0.5~1mM)と少ないため、ATPと比較すると研究報告は少なく、その中でGTPの増減による生体膜機能変化に関する研究(薬物体内動態に及ぼす影響に関する研究)はほぼ存在しない。しかしながら、Gタンパク質の基質であるGTPは、タンパク質合成やシグナル伝達の原因となる様に、多くの生体メカニズムに関与し、さらにRhoAなどのRhoファミリーGタンパク質が、細胞間接着に関与するTight junctionの制御に関与していること、薬物トランスポーターの発現制御に関わる核内受容体であるLXRの制御にも関与していることから、細胞内GTPの増減は生体物質および薬物の膜透過性(吸収性)を変動させる可能性が考えられる。

従って、細胞内GTP量の増減は、GTPが起因となるtight junctionの構造変化を含む細胞内機能変動が影響するpassive transportに関しては勿論のこと、ATPが関与する薬物のactive transportの両膜透過経路透過性の変動を誘発する可能性が十分に考えられる。

## 2. 研究の目的

腎移植後の免疫抑制療法や、ループス腎炎(全身性エリテマトーデス)の薬物治療に用いられるミコフェノール酸モフェチル(Mycophenolate mofetil, MMF)の作用機序はInosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH)の阻害によるde novo経路によるGMP(GDP、GTP)生成の抑制である(Scheme 1)。臨床現場においてMMFは他の医薬品と併用して用いられることが多いため、細胞内GTP減少状態による細胞膜透過性を含む細胞の機能変化は、併用薬物の吸収性ひいては薬理効果の発現に直結する可能性が考えられる。従って本研究では、細胞内GTP量の変化による薬物の膜透過性変動の相関性を明らかにすることで、より安全な薬物投与設計の立案のための基礎的データを得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 使用細胞: 本研究では薬物の消化管吸収に焦点を当てた検討を行うことから、腸上皮細胞株を用いて検討を行う。多くのがん細胞で正常細胞と比較してGTP生成能が亢進されていることが知られていることから、腸の正常細胞(IEC6)とがん細胞(Caco-2)を用いて検討を行う。

(2) 細胞内ヌクレオチドの測定: HPLCによる細胞内GTPとATPの両ヌクレオチドの同時測定条件を設定し、定量を行う。

(3) 膜透過実験: Paracellular route および transcellular route を介した膜透過に対するMPAの影響を検討する。Paracellular route を介する膜透過性の変動評価は、2種類の分子サイズの異なるParacellular markerとして、分子量が376.32である5(6)-Carboxyfluorescein (5-CF)と、平均分子量が70,000であるfluorescein isothiocyanate dextran 70,000 (FD-70)を用いて、Transwell®を用いた膜透過実験により行う。さらに、Paracellular route 透過性の指標ともなるTEER値の測定も行う。Transcellular route を介した膜透過に関しては、passive transportとP-gpによる輸送に関して検討を行う。Transcellular markerとしてはβ-naphtholを選択し、P-gpを介した膜透過性の変動は、P-gp基質として汎用されているRhodamine123 (Rho123)を用いて、Transwell®を用いた膜透過実験により行う。P-gp機能評価変動を行うためにはP-gp阻害実験を併せて行う必要があるため、P-gp阻害剤としてVerapamilを用いて検討を行う。

(4) タンパク発現解析: Western blottingにより各種タンパクの発現量の変化を検討する。

## 4. 研究成果

(1) MPAによる細胞内GTP量およびATP量の変化: MPAをCaco-2細胞に2, 4, 96時間させた条件における細胞内GTPおよびATP量の測定を行った(Fig. 1)。MPAの濃度および作用時間依存的な細胞内GTP量の減少が認められた。また、salvage経路の基質物質であるグアノシン(Guo)添加条件においても、細胞内GTP量はCTRL以上にはならないことが認められた。一方で、薬液添加2および4時間後までは、MPAによるGTP量の減少効果はGuoの併用により認められなかったが、96時間後においてはGuo併用条件においてもGTP量の減少が認められた。一方で、細胞内ATP量に大きな変化は認められなかった。また薬液添加2時間後から96

時間後までにおいて、MPAによるATP量の減少効果はGuoの併用により認められなかった。

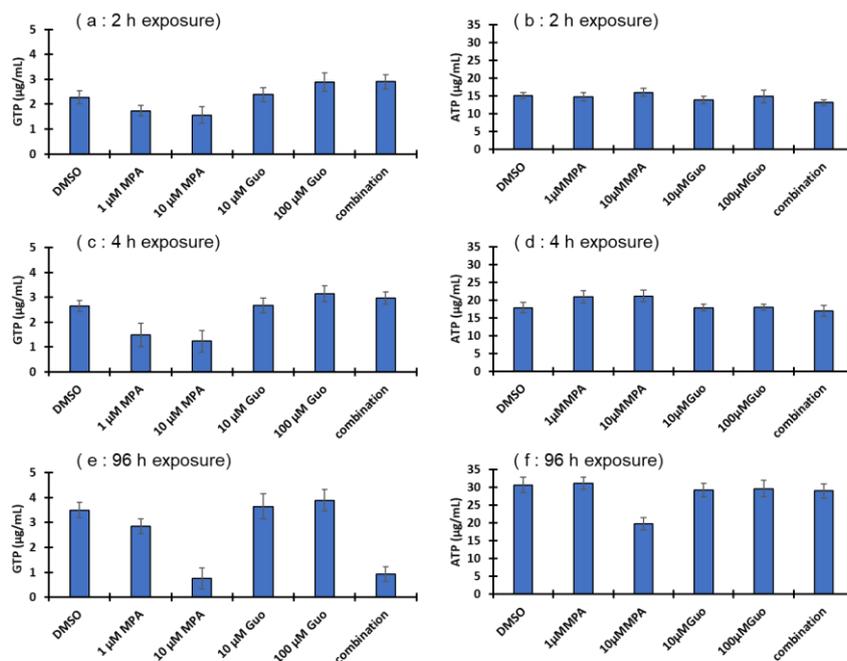


Fig. 1 Effect of MPA and Guo on intracellular GTP (a, c, e) and ATP (b, d, f) concentration in Caco-2 cells. Exposure time: 2 h (a, b), 4 h (c, d), 96 h (e, f). n=5 each condition.

(2) MPA 暴露による Paracellular route への影響：先行論文では MPA 暴露による Tight junction (TJ)の指標となる TEER の減少が報告されていたが、本検討においては Caco-2 細胞の TEER は減少ではなく、MPA の濃度依存的、時間依存的な TEER の上昇促進効果が認められた (Fig. 2)。また、MPA と Guo の併用による TEER の上昇抑制効果が認められた。

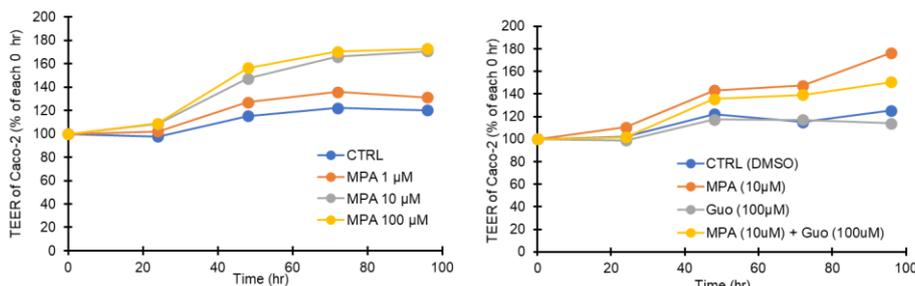


Fig. 2 Effect of MPA and Guo on TEER of Caco-2 cells. n=3-6 for each condition.

一方、Paracellular marker である 5-CF の透過量は、MPA および Guo 暴露による有意な変化は認められなかった。また TJ 構成因子である Claudin のタンパク発現量には、MPA の濃度依存的な増加が認められた (Fig. 3)。

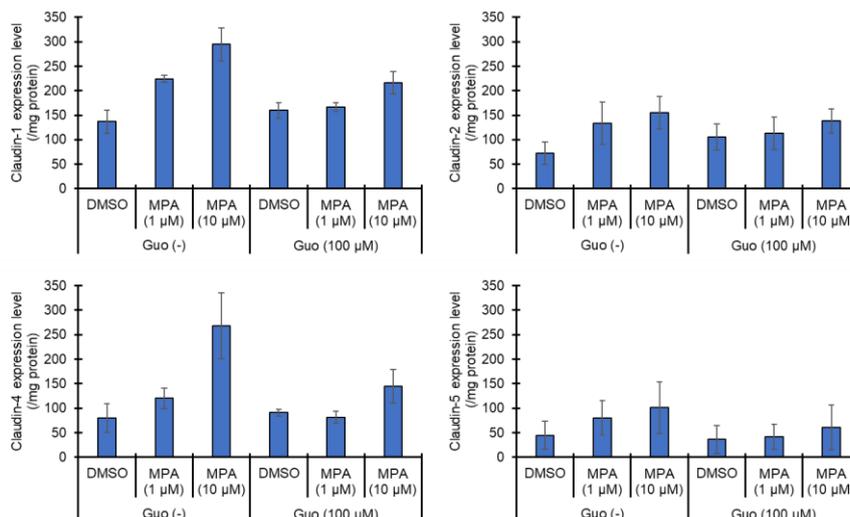


Fig. 3 Effect of MPA and Guo on claudin-1 (a), claudin-2 (b), claudin-4 (c), and claudin-5 (d) protein expression level in Caco-2 cells. n=3 for each condition.

Fig. 1 で MPA の濃度依存的に細胞内 GTP 量は減少しているが、Guo では細胞内 GTP 量は変化していないことが認められた。Fig. 2 では MPA の濃度依存的・時間依存的な膜抵抗値の上昇促進が認められたが、Guo 単独では膜抵抗値に変動はみられず、MPA と Guo の併用では膜抵抗値の上昇抑制効果が認められた。これらの結果から、細胞内 GTP 量と膜抵抗値に負の相関性があると考えられる。

一方で、これまでに MPA の暴露により MLCK が活性化され pMLC が増加するため TJ が開口されると報告がなされているが、本研究で得られた結果と逆である。しかしながら、MPA による IMPDH 阻害により、細胞内 GTP は減少するため、低分子量 G 蛋白である RhoA の活性化が抑制されると考えられる。従って、RhoA の活性化が抑制されると TJ の開口に抑制的に働くと考えられるため、MPA による TJ への影響は議論の余地がある。

(3) MPA 暴露による Transcellular route への影響 : MPA を 96 時間暴露後の Transcellular marker である  $\beta$ -naphthol の膜透過には変化は認められなかったが、MPA と  $\beta$ -naphthol の共存下での検討においては、MPA の濃度依存的な  $\beta$ -naphthol の膜透過量の減少傾向が認められた (Fig. 4)。一方、P-gp 基質である Rho123 の膜透過に対しては、どちらの条件においても有意な変化は認められなかった (Fig. 4)。また、P-gp のタンパク発現量にも変化は認められなかった (Fig. 5)。

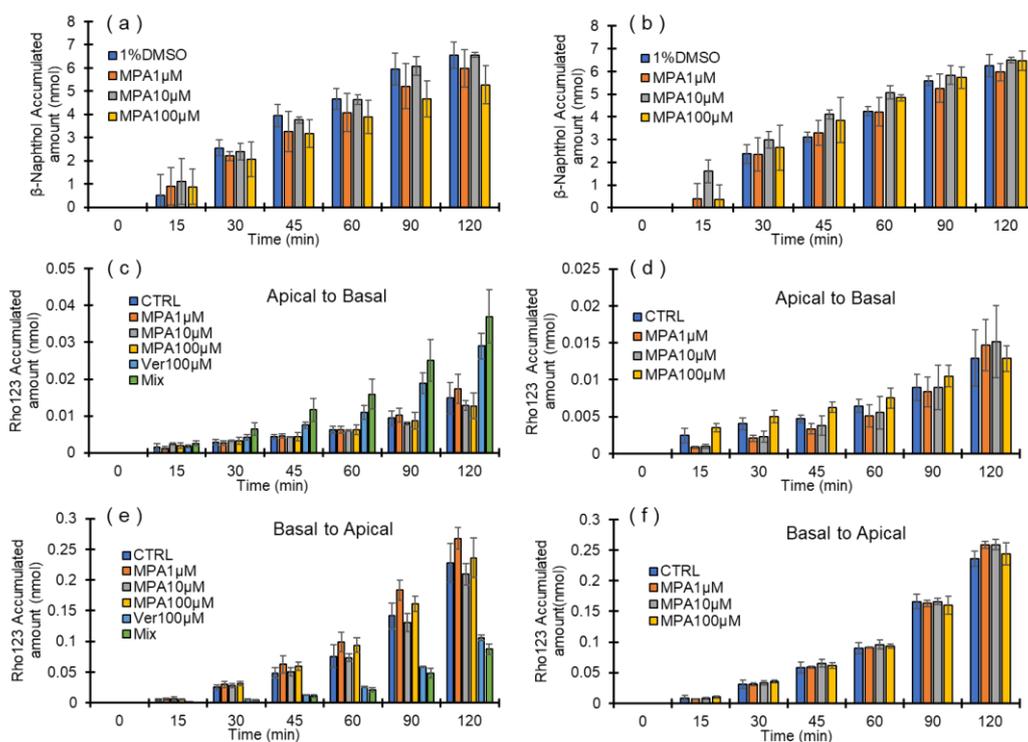


Fig. 4 Effect of MPA on membrane transport of  $\beta$ -naphthol (a, b) and Rho123 (c – f). (a), (c), (e): coexistence condition of substrates and MPA. (b), (d), (f): 96 hr exposure of MPA. n=3-4 for each condition

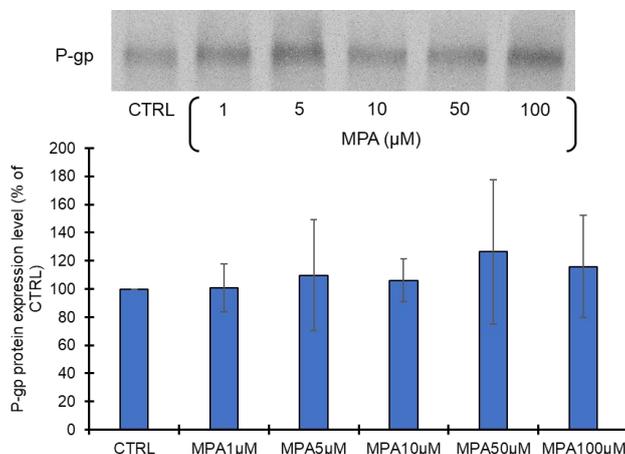


Fig. 5 Effect of MPA on P-gp protein expression level in Caco-2 cells. n=3 for each condition.

Fig. 4 および Fig.5 の結果から、細胞内 GTP 量の減少は Transcellular route を介した受動拡散および P-gp には影響を及ぼさないことが確認された。しかし、Fig. 4a において MPA の濃度依存的な  $\beta$ -naphthol の膜透過量の減少傾向が認められているため、薬物間相互作用が生じる可能性が示唆された。

(4) TJ 開口時における MPA の TJ への影響：TJ 開口作用を有する吸収促進剤であるカプリン酸ナトリウム(C10)を用いて、MPA の暴露による TJ 開口抑制効果の有無の検討を行った。C10 は MLC のリン酸化を促進して pMLC を増加させることにより TJ を開口することが報告されているが、C10 の濃度依存的に増加した pMLC に対して、MPA 添加による pMLC の減少は認められず、逆に C10 と MPA の両方を暴露させた条件で pMLC が最大値を示した。さらには、paracellular marker である 5-CF および FD-70 の膜透過性に対して、C10 単独条件よりも、C10 と MPA を両方暴露させた条件の方が paracellular marker の透過量が多いことが認められた。

本研究において、MPA の暴露により細胞内 GTP 量を減少させることで、細胞内経路による薬物の膜透過には変化が生じない可能性が高いことが認められた。その一方で、TJ には変化が生じることが認められた。しかしながら TJ の開口方向に作用するのか閉口方向に作用するのに関しては、議論の余地がある。

MPA 暴露条件により、MPA の濃度依存的なタンパク量の減少が認められていることから、本研究で認められた MPA による TEER の強化は、MPA による TJ に対する特異的なメカニズムによるものではなく、免疫抑制剤である MPA の暴露により細胞増殖サイクルが異常をきたし細胞増殖機能が低下したことで細胞間の接着が強くなった可能性が考えられる。しかしながらその詳細に関しては不明であることから、さらなる研究が必要である。

本研究では、MPA による細胞内 GTP 量の減少による TJ への影響の詳細なメカニズムの解明には至らなかったが、細胞内 GTP 量を変化させることで Paracellular route を介した膜透過性制御の可能性を見出すことができたため、本研究成果は、新規吸収制御技術の開発において有益な情報となりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 瀧沢裕輔、高橋優斗、栗田拓朗、中島孝則
2. 発表標題 経口投与製剤の溶出性および膜透過性に対する併用薬の影響 ~ミコフェノール酸モフェチルを用いた検討~
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Takizawa, Yuya Komura, Yuki Nakamura, Minoru Sadaoka, Nobuyuki Niwa, Takuro Kurita, Takanori Nakajima
2. 発表標題 Effect of Mycophenolic Acid on Membrane Permeability via Paracellular Route and Transcellular Route
3. 学会等名 1st AASP Young Scientist Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------