

平成21年5月1日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790126  
 研究課題名（和文）ビタミン結合タンパク質の動態解析とその特性を利用した薬物送達ベクターへの応用  
 研究課題名（英文）Pharmacokinetic properties of vitamin-binding proteins and these application to vector for drug delivery  
 研究代表者  
 永井 純也 (NAGAI JUNYA)  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
 研究者番号：20301301

## 研究成果の概要：

ビタミンと特異的に結合する内因性タンパク質は、そのビタミンを必要とする組織に効率的かつ選択的に輸送される。本研究では、まず、ヒト腸由来 Caco-2 におけるキュビリン（内因子-ビタミン B<sub>12</sub> 複合体の腸管吸収に関与するエンドサイトーシスレセプター）の発現および機能について解析した。さらに、ヒト網膜芽細胞腫由来 Y79 細胞においてもキュビリンが発現していること、そのリガンドであるアルブミン（ビタミン A が結合することが知られる）がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることを見出した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

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：ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでに受容体介在性エンドサイトーシスが関与する薬物の組織移行について解析を進めてきた。中でも、エンドサイトーシス受容体・メガリンに焦点をあてた研究を行ってきた。メガリンは腎近位尿細管腔側に高発現しており、生理学的役割の一つとして糸球体ろ過された vitamin D binding protein (DBP) や retinol-binding protein (RBP) を含むタンパク質の尿細管再取り込みに重要な役割を果たしている。また、アミノグリコシド系抗生物質（以下、アミノ

グリコシド) がメガリンと親和性を有するという情報に基づき、研究代表者はアミノグリコシドの腎移行におけるメガリンの関与についての解析に着手し、メガリンがアミノグリコシド腎移行を担う重要な受容体であることを明らかにした。さらに、そのメガリンを分子標的としたアミノグリコシド腎毒性防御のためのドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発へと展開し、実用化にむけた特許化も進めている。また、平成14年6月から1年間にわたり、メガリンおよびキュビリン介在性エンドサイトーシスに関する研究

で世界をリードしているデンマーク・オーフス大学 Christensen 教授の研究室に留学する機会に恵まれ、メガリンやキュビリンの機能・発現の制御機構に関する研究を行った。こうした一連のエンドサイトーシス研究に従事する過程において、生体にとって必須なビタミンが特定の内因性タンパク質と結合し、メガリンやキュビリンといった受容体を利用することで、標的組織への運搬が効率良く行われていることを認識した。そこで、研究代表者はこのシステムを DDS に利用できる可能性があるかと判断したことが、本研究の着想に至った経緯である。

## 2. 研究の目的

生体内には、ある特定のビタミンと特異的に結合するタンパク質が存在する。それらの内因性タンパク質は結合したビタミンを生体内に保持するとともに、標的とする組織に効率的かつ選択的に輸送することから、それらのビタミン結合タンパク質は生体が獲得したビタミンの内因性ベクターであると捉えることが出来る。本研究では、これらビタミン結合タンパク質の動態制御因子について解明するとともに、その制御因子を利用した薬物の吸収改善および眼組織選択的デリバリーの開発を進めていくための基礎的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

**細胞培養：**Caco-2 細胞は、1% MEM、1% L-glutamine、10%ウシ胎児血清を含む DMEM を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (37°C、5% CO<sub>2</sub>-95% air) 内で培養した。培地交換は継代後 1 週目までは 2 日毎、2 週目からは毎日、実験あるいは継代の前日にも行い、実験には 20-22 日間培養したものを用いた。なお、本実験には passage 26~45 の Caco-2 細胞を用いた。

Y79 細胞は、10%ウシ胎児血清を含む RPMI1640 を用いて、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5%CO<sub>2</sub>-95% air) 内で浮遊状態にて培養した。細胞 (passage 20~39) は 4~6 日間培養後、約 1:10 の割合で希釈することにより継代した。

**mRNA 発現解析：**細胞より抽出した total RNA を用いて RT-PCR 法あるいは real-time PCR 法によって解析を行った。

**取り込み実験：**実験には 35 mm dish 上で 20~22 日間培養した Caco-2 細胞、あるいは poly-L-lysine-coated dish (35 mm dish) 上で培養した Y79 細胞を用いた。培地を除去した細胞に PBS (G) を添加し、プレインキュベーション後、基質溶液を添加し、一定時間インキュベーションした。インキュベーション後、0.1% TritonX-100 で細胞を可溶化したサンプルを蛍光分光光度法によって定量した。

**経上皮輸送実験：**実験には 6well Transwell® 上で 20~22 日間培養した Caco-2 細胞を用いた。培地を除去した細胞を洗浄し、プレインキュベーション後、基質溶液を apical 側あるいは basal 側に添加し、一定時間インキュベーションした。インキュベーション後、基質溶液添加側とは反対側の溶液をサンプリングし、蛍光分光光度法によって定量した。

**細胞障害活性：**XTT 法によって評価した。

## 4. 研究成果

本研究によって得られた主な成果について、(1) ヒト腸由来 Caco-2 細胞を用いた実験と (2) ヒト網膜芽細胞腫由来 Y79 細胞を用いた実験とに分けて、以下に述べる。

### (1) ヒト腸由来 Caco-2 細胞を用いた実験による成果

分子量約 44,000 の糖タンパク質である内因子 (Intrinsic Factor, IF) は、食物中から遊離したビタミン B<sub>12</sub> と結合し、IF-ビタミン B<sub>12</sub> 複合体を形成する。その複合体は、回腸において IF を認識するキュビリンと呼ばれるエンドサイトーシスレセプターによって上皮細胞内に取り込まれ、ビタミン B<sub>12</sub> の全身循環中への移行に重要な役割を果たしている。そこで、この IF を経口デリバリーのベクターとして利用し、消化管におけるキュビリンを介したエンドサイトーシスを利用することによって難吸収性薬物の吸収が改善できる可能性を考えた。こうした可能性について解析を進めていくため、ヒト消化管における薬物吸収の in vitro モデルとして汎用される Caco-2 細胞を用いた実験を行った。まず、Caco-2 細胞におけるキュビリンの発現について検討するため、PCR 解析を行った結果、播種後 2 日目においてキュビリン mRNA 由来のバンドが観察された。また、Caco-2 細胞は、播種後に小腸上皮様の細胞に分化するまで、2~3 週間程度の日数が必要とされる。そこで、キュビリン mRNA の発現と培養日数の関係についてリアルタイム PCR 解析を行ったところ、播種後 7 日、14 日、21 日と経日的にキュビリン mRNA が上昇していることが観察された。そこで、キュビリンのリガンドであるアルブミンを用いて、20 日間前後培養した Caco-2 細胞におけるトランスサイトーシス解析を行ったところ、アルブミンは吸収方向である頂側膜側から側底膜側へ経上皮輸送されることが観察された。

今後、こうしたトランスサイトーシス特性を利用した薬物デリバリーへの応用について、さらなる解析が期待できる。

(2) ヒト網膜芽細胞腫由来Y79細胞を用いた実験による成果

網膜は視覚機能を司る重要な組織であるが、その機能が正常に発揮され、かつ維持されるためには、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンEなどのビタミン類を血液中から網膜へと取り込む必要がある。従って、この輸送システムを利用することによって、網膜に効率よく薬物をデリバリーできる可能性が考えられる。小児期に発症する網膜芽細胞腫の治療は原則として眼球摘出であるが、近年では、眼球を温存するために、抗がん剤による全身化学療法が行われている。そこで本年度は、全身的に投与した場合においても、網膜芽細胞腫で選択的に抗腫瘍効果を発揮させるためのベクターの探索とそのDDSに向けた応用について解析した。

ヒト網膜芽細胞腫由来Y79細胞における各種エンドサイトーシスレセプターの発現をRT-PCRによって解析した結果、腎近位尿細管においてレチノール結合タンパク質の取り込みに重要であるメガリンmRNAは検出されなかった。一方、アルブミンをリガンドとして認識するキュビリンmRNAの発現が認められた。また、Y79細胞におけるアルブミンの細胞内取り込みは、温度依存性やエネルギー依存性を示すと共に、検討した数種の高分子リガンドの中で顕著に高い取り込みクリアランスを示すことが認められた。さらに、光感受性物質chlorin e6を結合したアルブミンの細胞内取り込みに温度依存性が観察されるとともに、光照射によって細胞障害活性が著しく高まることが観察された。

以上、Y79細胞を用いた解析によって、アルブミンをキャリアーとすることで網膜芽細胞腫に比較的選択的かつ効率的に薬物をデリバリーできる可能性が示唆された。また、Y79細胞で観察されたアルブミンのエンドサイトーシスは、アルブミンがレチノール(ビタミンA)と結合することから、網膜におけるその生理学的意義を考える上でも重要な知見になりうるものと思われる。

#### 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8件)

1. Yumoto R, Hamada S, Okada K, Kato Y, Ikehata M, Nagai J, Takano M. Effect of ursodeoxycholic acid treatment on the expression and function of multidrug resistance-associated protein 2 in rat

intestine. J Pharm Sci, 査読有り, 2009, in press

2. Tagawa M, Yumoto R, Oda K, Nagai J, Takano M. Low-affinity transport of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line. RLE-6TN. Drug Metab Pharmacokinet, 査読有り, 23, 2009, 318-327
3. Taogoshi T, Nagai J, Yumoto R, Takano M. Transport of prostaglandin E1 across rat erythrocyte membrane. Biol Pharm Bull, 査読有り, 31, 2008, 1288-1291
4. Murakami S, Nagai J, Fujii K, Yumoto R, Takano M. Influences of dosage regimen and co-administration of low-molecular weight proteins and basic peptides on renal accumulation of arbekacin in mice. J Antimicrob Chemother, 査読有り, 61, 2008, 658-664
5. Ikehata M, Yumoto R, Nakamura K, Nagai J, Takano M. Comparison of albumin uptake in rat alveolar type II and type I-like epithelial cells in primary culture. Pharm Res, 査読有り, 25, 2008, 913-922
6. Yokooji T, Murakami T, Nagai J, Takano M. Role of intestinal efflux transporters in the intestinal absorption of methotrexate in rats. J Pharm Pharmacol, 査読有り, 59, 2007, 1263-1270
7. Patanasethanont D, Nagai J, Matsuura C, Fukui K, Sutthanut K, Sripanidkulchai BO, Yumoto R, Takano M. Modulation of function of multidrug resistance associated-proteins by Kaempferia parviflora extracts and their components. Eur J Pharmacol, 査読有り, 566, 2007, 67-74
8. Yokooji T, Murakami T, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Site-specific bidirectional efflux of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione, a substrate of multidrug resistance-associated proteins, in rat intestine and Caco-2 cells. J Pharm Pharmacol, 査読有り, 59, 2007, 513-520

[学会発表] (計8件)

1. 田中宏則、永井純也、湯元良子、高野幹久、ヒト網膜芽細胞腫由来Y79細胞におけるエンドサイトーシス特性の解析～抗がん剤デリバリーへの応用にむけて～、第47回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2008年11月9日、岡山市
2. 佐藤公也、永井純也、満井尚子、湯元良

子、高野幹久、消化管IgG輸送における neonatal Fc receptor (FcRn)の役割について ～ヒト腸上皮細胞株Caco-2を用いた解析～、第47回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2008年11月9日、岡山市

3. 石川由佳、永井純也、湯元良子、高野幹久、網膜芽細胞腫由来Y79細胞におけるP-糖タンパク質および多剤耐性関連タンパク質の発現と機能、第23回日本薬物動態学会年会、2008年10月31日、熊本市
4. 藤井健司、永井純也、村上幸子、湯元良子、高野幹久、アミノグリコシド腎移行阻害能を有するペプチドの動態制御による低用量化の試み、日本薬剤学会第23年会、2008年5月20日、札幌市
5. 本永正矩、永井純也、今安美貴、満井尚子、湯元良子、高野幹久、ヒト肝由来 HepG2細胞における IgG の取り込み特性 ～ neonatal Fc receptor の関与について～、日本薬学会第128年会、2008年3月26日、横浜市
6. 永井純也、満井尚子、湯元良子、高野幹久、培養ヒト腸上皮細胞Caco-2におけるIgGのトランスサイトosis特性の解析、第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2007年11月27日、仙台市
7. 満井尚子、永井純也、湯元良子、高野幹久、ヒト腸由来 Caco-2 細胞における IgG のトランスサイトosis特性～neonatal Fc receptor の関与について～、第46回日本薬学会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2007年11月11日、高知市
8. 永井純也、藤井健司、齊藤正樹、湯元良子、高野幹久、塩基性ペプチド、低分子量タンパク質及びそれらのコンジュゲートによるアミノグリコシド系抗生物質の腎移行阻害効果の比較解析、日本薬剤学会第22年会、2007年5月23日、さいたま市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

永井 純也 (NAGAI JUNYA)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：20301301

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者

高野 幹久 (TAKANO MIKIHISA)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：20211336