

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590178

研究課題名（和文）分子レベルから見た物質透過バリアー機能解明と新規薬物透過制御法の開発戦略

研究課題名（英文）Studies of barrier function of tight junction in epithelial cell layers and strategic development of novel methods for drug permeation enhancement in cells

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（和文）：

本研究の目的は、生体の上皮細胞層特に tight junction（密着結合）のバリアー機能を分子レベルで解析し、透過促進作用物質の標的分子を解明するとともに、発現・機能が確認された分子を駆使して、新たな薬物透過促進法の構築を図ることである。

薬物透過促進物質（C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin（C-CPE））を作用時の上皮細胞（Caco-2 cells）の密着結合バリアー機能評価について膜電気抵抗値（TER）を指標に行い、バリアー機能が変化した時の変動遺伝子を解析した。その結果、約 45,000 種類の遺伝子中、tight junction 開口時に 4 倍以上発現量が増加した遺伝子は 106 種、1/4 以下に減少した遺伝子は 182 種存在した。細胞接着、細胞内シグナル伝達に関与するファミリーに属する遺伝子が多く含まれている。

35 型アデノウイルス（Ad）カプシドタンパク質中、特に shaft タンパク質（Ad35 Shaft）によりモデル高分子薬物の FITC-dextran 40（FD-40, MW40,000）の HepG2 細胞内取り込みが著明に促進された。クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤を Ad35 Shaft に併用したところ、阻害剤の濃度に依存して FD-40 の細胞内取り込みが抑制された。Ad35 Shaft はクラスリン介在性エンドサイトーシスを誘導して FD-40 を細胞内へ取り組んでいることが考えられる。また、Ad35 Shaft によりルシフェラーゼ発現プラスミドの HepG2 細胞内取り込みが促進され、遺伝子発現効率化に Ad35 Shaft が応用できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to evaluate the barrier function of tight junction (TJ) in epithelial cell layers and to develop novel methods for drug permeation enhancement in cells.

We investigated the expression profiles of gene and the changes in gene expression in Caco-2 cells, when the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE), a permeation enhancement modulator targeted to claudins playing a pivotal role in the barrier function of TJ, was applied in cell monolayers. The formation of TJ barriers in Caco-2 monolayers was monitored by the transepithelial resistance (TER) assay. We investigated approximately 45,000 genes. The expression of 106 genes was increased in 4 times, whereas the expression of 182 genes was decreased in 1/4, when TJ barrier function was decreased by the treatment of C-CPE.

We focused the macropinocytosis induced by adenovirus (Ad) vector for drug delivery, because macropinocytosis can be used delivery of macromolecules, nanoparticles, and so on. It was found that macropinocytosis induced by the fiber shaft protein of Ad type 35 (Ad35 Shaft) can be delivered a model of macromolecular drug, FITC-dextran (M.W. 40,000) in HepG2 cells. Also, we observed the Ad35 Shaft-mediated gene expression of plasmid transduction into HepG2 cells. These results suggested that the fiber shaft protein, especially Ad35 Shaft, is a useful tool for the systems of macromolecular drug therapy and gene delivery into cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：生体膜透過バリアー機能、薬物透過制御法、生体機能利用

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であり、薬物の上皮細胞層および内皮細胞層の薬物透過制御が薬物治療の成否を握っている。現実には生体膜透過性が低い理由から、本質的に適用できない多くの薬物が存在している。また、新たな投与方法・経路への変更が容易ではない薬物も数多い。これらが薬物療法へつながることが可能となれば、医療の進歩に少なからずインパクトを与えることになる。

しかし、これまでこの命題に対する解決法について多くの研究が行われてきているが、解答は得られていない。その理由の一つは、透過促進（吸収促進）を図るための方法として、多くの場合、対象となる難吸収性薬物等に併用する化合物（いわゆる吸収促進剤）に注目が集中し、生体側の機能解析に注意が向けられてきていないからである。新規の吸収促進剤が世界的に検討されてきているにもかかわらず、現在のところ臨床に応用されているものは中鎖脂肪酸のカプリン酸のみである。

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開発を進めてきた。生体膜の物質透過障壁は、本来から生体が持っ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不可欠である。これまで研究された多くの化合物は、強い吸収促進作用が生じて時間経過後バリアー機能が回復しない不可逆的作用を示すものが多い。そこで、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が直腸粘膜において難吸収性薬物の一つであるインスリンの吸収効率を高めることを始めて見出し報告した（*Pharm. Res.* 1998）。さらに、各種NO供与剤による検討結果、鼻腔や小腸からも難吸収性の高分子薬物（ヒト顆粒球形成刺激因子（G-CSF）やFITC-dextranなど）の吸収を促進することを明らかにし報告した（*J. Drug Targeting*, 2000, *J. Pharm. Sci.*, 2000）。その後、他の生理作用に基づく吸収促進機構を検討し、enteric nervous system (ENS)における神経伝達物質に着目、例えば、エピネフリン（アドレナリン）が新たな機能として消化管での吸収促進作用物質として働くことを見出した（*J. Controlled Release*, 2005）。

これら研究の発展として、細胞間のtight junction（密着結合）を標的とした吸収促進法の開発を進めてきている。細胞間隙経路は、ゲノム創薬研究の結果創生される高分子薬物（バイオ医薬品）に対して汎用性の点で優れていると考えられる。近年、密着結合を構成するタンパク質の一つとしてclaudinが同定され、物質透過制御機能を有する分子として報告された。我々は、claudinが細胞間隙経路を介した薬物送達方法の構築に際し標的分子として有用であることを世界に先駆けて見出している（*Mol. Pharmacol.*, 2005, 他）。現在は、claudinファミリーを標的分子とした透過促進作用を有する物質（Permeation Enhancing Modulator、例、C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE))の解明に力を入れ、現象論レベルから生体膜の分子を標的とした実証的機能解析を進めてきている。ヒトでは個体的レベルでのノックアウト、ノックダウンなどの遺伝子の改変は不可能であること

から、個別遺伝子の実証的解析技術としては遺伝子導入技術の利用が現段階では最も有効な方法論になりうる。特に、遺伝子発現を特異的にノックダウンするRN干渉技術は個別遺伝子の実証的解析方法として最適な手法の一つと考えられる。我々は、先に既存の遺伝子導入方法の中で最も遺伝子導入効率が高いとされているアデノウイルス(Ad)ベクターを用いて、Adベクターのファイバー領域を遺伝子工学的に改変すること (*J. Gene Med.*, 2003, ほか) で、例えば*in vitro*評価系でAdベクターの最適化を試み、遺伝子導入効率のよいファイバー改変型Adベクターの開発を報告してきた (*Biol. Pharm. Bull.*, 2006, Placenta, 2006, ほか)。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究の目的は、生体の上皮細胞の密着結合のバリアー機能を分子レベルで解明し、新たな標的分子を同定することにある。また、我々が明らかにした吸収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 Ad ベクター等を使用して解析を試み、薬物透過促進法の構築を図る。

3. 研究の方法

(1) NO 供与剤や C-CPE を用いて、消化管上皮細胞における密着結合バリアー機能と物質透過の上昇に関与する遺伝子、または蛋白質の同定を行う。消化管モデル細胞から密着結合バリアー機能低下時の遺伝子及び蛋白質の回収ヒト大腸癌由来 Caco-2 細胞単層膜を用いて、NO 供与剤や C-CPE を作用させた時の遺伝子および蛋白質の回収を試みる。密着結合バリアー機能評価は膜電気抵抗値 (TER) で評価する。

(2) NO 供与剤、C-CPE 作用時の変動遺伝子及び蛋白質の解析を行う。サブトラクション法、二次元電気泳動法等により顕著に発現の変動がある分子を見出し、スクリーニングにより得られた遺伝子配列はデータベースを用いて決定する。LC-TOF/MS による質量分析やアミノ酸シーケンスを用いて配列決定及び分子の決定を行う。

(3) 同定した消化管上皮細胞における密着結合バリアー機能と物質透過性の上昇に関与する遺伝子またはタンパク質の機能解析

を行うため、RNAi などの技術を用いる。

a) 遺伝子発現系ベクター及び shRNA 発現系の構築

目的分子の過剰発現細胞と低発現細胞を用いて分子の機能評価を行う。目的分子発現プラスミド、さらに shRNA 発現プラスミドを作成する。また、遺伝子導入効率が優れたアデノウイルスベクターを用いた発現ベクターを作成する。

b) 遺伝子発現及び RNAi を用いた機能解析
得られた分子の機能評価を行うため、候補分子の過剰発現または RNAi によるノックダウン Caco-2 細胞を作成する。候補分子の過剰発現、または発現低下細胞を用いて TER 測定によりバリアー機能への関与を検討する。

(4) Ad ベクターのファイバー領域構成タンパク質による細胞内取り込み機能解析

ファイバー改変型 Ad ベクターによる高分子薬物の細胞内取り込みに関与する因子をスクリーニングする。

4. 研究成果

(1) 透過促進物質作用時の TER 変化と変動遺伝子の解析

消化管上皮細胞層の密着結合構成タンパク質と相互作用する薬物透過促進物質 (Permeation Enhancing Modulator) を検討し、ウエルシュ菌エンテロトキシンの毒性活性部分を除いた C 末断片 (C-CPE) や一酸化窒素 (NO) 等を見出している。薬物透過促進物質として C-CPE を作用時の変動遺伝子の解析を行い、Caco-2 細胞層をモデル実験系として用いて、C-CPE の作用による密着結合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スクリーニングし、Sec61 β 、GSTP1、EEF1A1、PGK1 の 4 種の遺伝子の発現が変動することを明らかにした。さらに、同定された遺伝子のうち分子の機能的な面から Sec61 β に着目し、Caco-2 細胞において siRNA を用いて Sec61 β のノックダウンを試み Sec61 β の発現を低下させて、Caco-2 細胞の密着結合バリアー機能形成過程、または C-CPE 作用による密着結合バリアー機能低下過程に及ぼす影響を調べたが、膜電気抵抗値 (TER) はいずれの過程においても変化が少なかった。

次に、密着結合の制御を担う遺伝子群の選出を目的に、Caco-2 細胞層において C-CPE を作用又は除去による密着結合開閉時に発現変動する遺伝子を網羅的にスクリーニングした。細胞培養開始後 TER を経時的に測定し、密着結合の形成を確認後、C-CPE を作用させ

密着結合が開口した場合およびC-CPEを除去し密着結合が再形成された場合においてCaco-2細胞からRNAを回収し、マイクロアレイ解析において各種mRNAの変動を網羅的に解析した。C-CPEを作用させる前に比べて作用後の密着結合開口時に発現量が著しく変動した遺伝子群としてCEACAM及びMMPファミリーが検出された。これらの遺伝子ファミリーは、C-CPE除去後に密着結合が再形成された時にC-CPE作用前の発現量と同程度まで復帰することから、密着結合開口というストレスへの上皮細胞応答へ関連していることが推測される。なお、網羅的解析の結果、約45,000種類の遺伝子中、密着結合開口時に4倍以上発現量が増加した遺伝子は106種、1/4以下に減少した遺伝子は182種存在した。細胞接着、細胞内シグナル伝達に関与するファミリーに属する遺伝子が多く含まれるため、解析を進めている。

(2) 細胞内への高分子薬物輸送システムの検討

次世代の高分子薬物(タンパク質、核酸等)の細胞内への効率的輸送方法の構築を目的として、細胞膜透過能およびエンドソームからの脱出能を有するAdウイルスに着目した。Adが有するこれらの機能を発現する分子の探索を行ってきた。Adカプシドタンパク質中のshaftタンパク質、特に35型Adのshaftタンパク質(Ad35 Shaft)により高分子薬物のモデル化合物として用いたFITC-dextran 40(FD-40, MW 40,000)のHepG2細胞内取り込みが著明に促進されることを見出した。この場合、Shaftタンパク質自身の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡で調べたところ、37℃では細胞内でFD-40と重複して蛍光が観察されたが、4℃の条件下では蛍光が観察されなかった。Ad35 Shaftは、FD-40とともに細胞内へ移行することが明らかとなった。Ad35 Shaftを作用時に、Ad35 Shaftの濃度に依存してFD-40の蛍光強度が増加し、またFD-40は細胞内でドット状に観察されたことから、エンドソーム等の輸送小胞内に局在することが推測される。クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤をAd35 Shaftに併用したところ、阻害剤の濃度に依存してFD-40の細胞内取り込みが抑制され、Ad35 Shaftはクラスリン介在性エンドサイトーシスを誘導してFD-40を細胞内へ取り組んでいることが考えられる。また、Ad35 Shaftを適用時のHepG2細胞への遺伝子導入効率を検討した。ルシフェラーゼ発現プラスミドをモデル高分子薬物として用い、遺伝子発現に及ぼす影響を検討したところ、Ad35 Shaft作用時のルシフェラーゼ活性が有意に増加し、遺伝子発現効率の増大が示唆された。Shaftタンパク質の応用は、高分子物質であるバイオ医薬品ある

いは遺伝子の細胞内への送達効率を高める一つの方法と考えられる。

継続研究として、Ad35 Shaftのアミノ酸配列を変えた変異型タンパク質での取り込み促進作用を比較し、機能ドメインの解析を進めている。

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 H. Kakutani, M. Kondoh, R. Saeki, M. Fujii, Y. Watanabe, H. Muzuguchi, K. Yagi: Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 査読有, **75**, 2010, pp. 213-217. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.03.003
- ② Y. Shimoyama, M. Fujii, Y. Kanda, A. Mizoguchi, H. Oda, N. Koizumi, Y. Watanabe: Effect of application method on skin permeation of carboxyfluorescein incorporated in liposome. *Chem. Pharm. Bull.* 査読有, **58**, 2010, pp. 429-431. https://www.istage.ist.go.jp/article/cpb/58/3/58_3_429/pdf

[学会発表] (計8件)

- ①山岸喜彰、小泉直也、水口裕之、藤井まき子、渡辺善照: 細胞内への高分子薬物輸送方法の構築を目的としたアデノウイルスカプシドタンパク質の解明、日本薬学会第130年会、2010年3月28日、岡山コンベンションセンター(岡山市)。
- ②山岸喜彰、酒井 宏、小泉直也、藤井まき子、水口裕之、渡辺善照: アデノウイルス由来Shaft質による物質取り込み機構の解明、第26回日本DDS学会、2010年6月17日、大阪国際交流センター(大阪市)。
- ③小泉直也、Suree Tom、清水左紀、渡辺善照、安東 星: HIVイメージングシステムの開発、第26回日本DDS学会、2010年6月18日、大阪国際交流センター(大阪市)。
- ④Y. Watanabe, N. Koizumi, Y. Yamagishi, E. Hagiwara, H. Mizuguchi, M. Fujii: Development of a novel therapeutic system of adenovirus gene therapy in combination of macromolecular drug therapy, 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2010年7月22日, Bella Center, Copenhagen, Denmark.

⑤ 莉込亜美、小泉直也、佐々木杏沙、藤井まき子、近藤昌夫、八木清仁、渡辺善照：Caco-2細胞におけるタイトジャンクション開閉時での遺伝子発現変動の解析、日本薬学会 第131年会、2011年3月5日、誌上発表。

⑥ 小泉直也、平井孝昌、藤井まき子、水口裕之、渡辺善照：アデノウイルスベクターの遺伝子導入に及ぼすfiber-shaftの役割、第27回日本DDS学会、2011年6月10日、東京大学本郷キャンパス（東京都）。

⑦ 鷺山真紀子、小泉直也、莉込亜美、佐々木杏沙、松本有未、藤井まき子、近藤昌夫、八木清仁、渡辺善照：タイトジャンクションバリアー機能に關与する遺伝子の解析、第55回日本薬学会関東支部大会、2011年10月8日、東邦大学習志野キャンパス（千葉県）。

⑧ 鷺山真紀子、小泉直也、佐々木杏沙、松本有未、藤井まき子、近藤昌夫、八木清仁、渡辺善照：MDCK細胞におけるタイトジャンクション機能へのSec61b遺伝子の關与、日本薬学会 第132年会、2012年3月30日、北海道大学（北海道）。

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