

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06695

研究課題名(和文)膜結合型mucinによる薬物吸収制御機構の解明

研究課題名(英文)Evaluation of the molecular mechanism of membrane-bound mucins in intestinal drug absorption.

研究代表者

岸本 久直 (Kishimoto, Hisanao)

東京薬科大学・薬学部・講師

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)：経粘膜投与された全ての薬物は、上皮細胞の表面を覆う粘液層を通過する必要がある。粘液層のバリア機能を担う重要な成分としてmucinと呼ばれる高度に糖鎖修飾された高分子糖タンパク質が挙げられるが、薬物の吸収過程におけるmucinと薬物との相互作用およびmucinの分子種差が及ぼす影響については不明である。本研究では、薬物の吸収性と有効性におけるmucin-薬物相互作用評価の重要性を示しただけでなく、mucinを標的とすることで薬物の細胞膜透過性を亢進できる可能性を示した。今後、薬物の粘膜透過機構における粘液層・mucin層の影響をより詳細に明らかに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、既存の薬物吸収理論において未知とされていた薬物と粘液層との関係性について、mucin-薬物相互作用という観点から分子論的な評価・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新規in vitro評価系の提案に寄与するだけでなく、mucinを標的とした新規吸収改善技術の開発および発展に貢献できるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：All mucosal-delivered drugs have to pass through the mucus layer before absorption through the epithelial membrane and into the circulatory system. Although the interaction between mucins, a heavily glycosylated glycoprotein and a major functional component of mucus, and drugs may be a key barrier hindering efficient drug absorption, there are no reports that describe the contribution of mucins to intestinal drug absorption at the molecular level. In this study, we demonstrated the importance of evaluating mucin-drug interactions in drug absorption, and the potential to enhance drug permeability across cell membranes by targeting mucin. Our data contribute to the understanding of mucin-drug interactions, and it may provide valuable information for drug development strategies.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：粘液層 Mucin Mucin 薬物相互作用 Mucin型糖鎖

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新薬開発の早期段階において、候補薬物の吸収変動要因を明らかにし、ヒトで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ことができれば、臨床試験の成功確率の向上や開発コストの削減など、効率的な医薬品開発の推進に繋がることが見込まれる。特に、薬物の腸管吸収性予測については、ヒト iPS 細胞由来の腸管型上皮細胞や organ on a chip に代表されるマイクロデバイスなどの次世代の生体模倣ツールが多岐にわたり開発され、ヒト体内動態予測を取り巻く研究環境は、近年劇的に変化した。しかし、医薬品化合物の大半を占める脂溶性薬物の吸収制御因子に関する知見は乏しく、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。

薬物の腸管からの吸収性は、薬物分子固有の物理化学的要因(分子量、脂溶性、pKa や電荷など)に加えて、腸管上皮細胞に発現するトランスポーターや代謝酵素、粘膜近傍に形成される粘液層などの腸管上皮表面の生理学的要因により制御されている。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、上皮近傍において非攪拌水層を形成し、低分子から高分子薬物に至るまでの広範囲の薬物に対する最前線の吸収障壁となることが古くから指摘されてきた。これまでは、粘液層の厚みを拡散抵抗として実測値に基づくパラメータを設定し、腸管吸収性評価のためのモデル式に組み込むことで理論的な薬物吸収性が説明可能であるという報告 (*Int J Pharm.* **368**, 116-122, 2009) があるほか、薬物粒子のナノサイズ化や粘液滞留性を付与した添加剤を用いることで粘液層の浸透性を向上させ、低分子のみならず中・高分子薬物の吸収性を改善した報告 (*Adv Drug Deliv Rev.* **124**, 2018) があるなど、国内外で薬物吸収過程における粘液層に着目した報告は多岐にわたる。しかし、既存の報告の殆どが「粘膜」の一部としての粘液層あるいは間接的な考察に留まり、薬物吸収を制御する粘液層の分子機構は未解明である。したがって、今後、医薬品化合物の物理化学的特性がより複雑化・高分子量化することを考慮すると、粘液層の生理学的性質と薬物吸収との関係性について分子レベルで理解を深めることは、今後の医薬品開発において極めて重要な研究課題であると考えられる。

粘液層は水と mucin (MUC)、核酸、脂質、DNA など様々な物質で構成されるが、この mucin と呼ばれる高度に糖鎖修飾されたムコ多糖タンパク質が、粘液層の主要な機能を担う分子であると考えられている。ヒトでは約 20 種類の分子が同定されており、その構造的特徴により、分泌型 (MUC2, 5AC, 5B, 6) と膜結合型 (MUC1, 3A, 4, 12, 13, 16, 17) に分類される。これら分子が形成する複雑な網目状の分子ネットワーク構造は分子ふるいの役割を果たし、分子量だけでなく静電的または疎水性相互作用などにより、様々な薬物の細胞膜透過を制御すると考えられている。しかし、ヒト腸管において様々な分子種が発現し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いて mucin と薬物がどのような相互作用を示すかは不明である。したがって、薬物の吸収過程における mucin 薬物間相互作用の影響および mucin 分子種差を明確化することができれば、腸管吸収を制御する因子の特定が繋がると考えられる。

一方、主要な粘液機能は、mucin 分子の大部分 (50~85%が糖鎖) を担う高密度の mucin 型糖鎖による高い水分保持能が関与しているため、薬物吸収においても重要な制御因子の一つとなることが予想される。したがって、脂溶性薬物の吸収改善という観点で考えた場合、この mucin 型糖鎖が重要な標的となり得ることが予想される。しかし、mucin あるいは mucin 型糖鎖を直接的に標的とした方法論は未確立であり、粘液・mucin 機能へ作用し得る吸収促進剤の積極的な探索は重要な研究課題と考えられる。

2. 研究の目的

粘液層の主要構成タンパク質のうち「mucin」に着目し、「mucin による薬物の吸収制御機構の解明」を介して mucin 薬物間相互作用 (吸収性・安定性など) を評価可能な新規 *in vitro* システムの構築を目的とし、以下の項目について検討した。

- (1) 発現調節可能な膜結合型 mucin 安定発現系培養細胞の樹立
- (2) Mucin-薬物相互作用を評価可能な *in vitro* 評価系の構築
- (3) Mucin 型糖鎖合成酵素阻害剤を用いた脂溶性薬物の膜透過性改善

3. 研究の方法

ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2 および HT29) を用い、膜結合型 mucin のうち MUC1 (細胞内ドメインを除いた Δ CT 型) および MUC13 (いずれも GFP 標識体として) を遺伝子発現調節ツール (Tet-On システム) の下流に組み込み、ヒトゲノム内 AAVS1 領域への遺伝子編集により導入した。MUC1 および MUC13 の発現は蛍光顕微鏡により観察した。次に、mucin 高発現細胞であるヒト肺上皮腺癌由来細胞 (A549) において、内因的に発現する MUC5AC および MUC5B の欠損細胞を CRISPR/Cas9 システムを用いて樹立し、薬物の感受性に対する mucin 欠損の影響を評価した。一方、脂溶性薬物の細胞膜透過に対する mucin 型糖鎖の影響を検討するため、糖鎖合成酵素 GCNT3 の阻害剤である talniflumate (TAL) および末端シアル酸付加反応を担う sialidase の阻害剤である benzyl- α -GalNAc (BnGN) を選択した。これら阻害剤併用時における各種脂溶性薬物 (5-fluorouracil, irinotecan, oxaliplatin, vinorelbine, paclitaxel, nilotinib、

imatinib、gefitinib、erlotinib)の細胞膜透過量の変化について、ヒト結腸癌由来細胞 (HT29) およびヒト肺上皮腺癌由来細胞 (A549) を用いて細胞毒性試験を実施した。このとき細胞表面の mucin 型糖鎖の変化は lectin (PNA, SNA, WGA) を用いた免疫染色により定性的に、MUC タンパク質発現量の変化は Western Blotting により定量的に評価した。さらに、TAL 処理後の脂溶性薬物の細胞膜透過性の変化について評価するために、脂溶性モデル薬物である rosebengal および paclitaxel、nilotinib の細胞内取り込み試験を実施し、LC-MS/MS により定量評価した。

4. 研究成果

(1) 発現調節可能な膜結合型 mucin 安定発現系培養細胞の樹立

極性細胞における種々の脂溶性薬物の細胞膜透過性に及ぼす mucin タンパク質の影響について詳細な検討を行うために、発現調節可能な膜結合型 mucin 安定発現系培養細胞の樹立を行った。薬物吸収を評価する代表的な極性上皮細胞モデルである Caco-2 細胞および HT29 細胞のゲノム遺伝子内 AAVS1 領域に対し、遺伝子発現調節ツール (Tet-On システム) とその下流に MUC1 又は MUC13 を組込んだ遺伝子配列を、CRISPR/Cas9 システムにより導入した。ドキシサイクリン (DOX) により Tet-On システム活性化処理後、GFP 蛍光の経日的 (1~3 日間) な強度増加が確認でき、さらに細胞膜上での発現および局在を蛍光顕微鏡下で確認できたことから、通常、遺伝子導入が困難なこれら培養細胞に対して mucin 遺伝子の導入および発現調節が可能であることが示された (図 1)。以上より、発現調節可能な膜結合型 mucin 安定発現系細胞としての妥当性が示された。

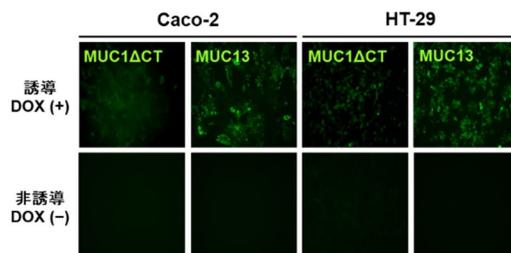


図 1 MUC タンパク質発現誘導 (誘導 48 時間後)

(2) Mucin-薬物相互作用を評価可能な in vitro 評価系の構築

粘液層の主要な構成タンパク質である分泌型 mucin (MUC2、MUC5AC、MUC5B) は、粘膜上皮近傍においてゲル状ネットワークを形成し、上皮細胞表面への薬物の拡散制御に関与すると考えられている。申請者はこれまでに、精製ヒト mucin を用いて、中分子環状ペプチドである cyclosporin A (CsA) との直接的相互作用の可能性を見出している (*Sci Rep.* 12, 6153, 2022)。そこで本研究では、内因性 MUC5AC / MUC5B 欠損 A549 細胞を樹立し、高脂溶性薬物 (nilotinib, imatinib, afatinib, gefitinib, erlotinib, dasatinib) の殺細胞効果に対する MUC5AC / MUC5B 欠損の影響を評価した。その結果、薬物単独では生存率が約 100%に維持されていた濃度条件において、mucin 欠損細胞では生存率が約 40~50%と優位に減少した。同様に、中分子サイズのモデル薬物として CsA および paclitaxel を用いて検討を行い、IC₅₀ 値を算出したところ、mock 細胞に比較して mucin 欠損細胞で約 3 分の 1 に優位に低下し、内因性 MUC5AC および MUC5B 欠損により薬剤感受性が増大したことが示された。さらに、野生型 A549 細胞由来の培養上清中に含まれる MUC5AC および MUC5B の mucin 物性に対する CsA および PAC の影響を、ショ糖密度勾配遠心法により評価したところ、MUC5AC および MUC5B の沈降挙動は薬物存在下において顕著に変動し、CsA および PAC による mucin の凝集沈殿が認められた。これらの結果から、本研究で用いた薬物および CsA と PAC は、粘液層の主要構成タンパク質である mucin と相互作用する可能性が見出され、mucin と薬物の相互作用が薬物の細胞内移行性に重要な役割を担うことが示唆された。以上より、本研究で樹立した内因性 mucin 欠損 A549 細胞を用いることで、腸管だけでなく鼻腔や気道上皮における主要な mucin である MUC5AC および MUC5B と薬物との相互作用を簡易的に評価可能であることが見出され、新たな in vitro 評価系として有用である可能性が示された。

(3) Mucin 型糖鎖合成酵素阻害剤を用いた脂溶性薬物の膜透過性改善

脂溶性薬物の細胞膜透過に対する mucin 糖鎖の影響について検討するため、糖鎖合成酵素 GCNT3 阻害剤である TAL および sialidase の阻害剤である BnGN 併用時における細胞毒性試験を実施した。TAL の濃度は細胞種の感受性に合わせてそれぞれ 10 ~ 150 μM で設定し、薬物濃度は薬物単独で細胞生存率に影響を与えないこと、talniflumate 併用によって細胞生存率の有意な低下が認められることを満たす濃度設定を試みた。その結果、HT29 および A549 細胞ともに、薬物単独で 100%付近に維持されていた細胞生存率が、TAL 併用により優位に低下した (図 2)。特に脂溶性が大きい薬物である nilotinib、gefitinib、erlotinib などは TAL 併用時に約 20 から 40%と顕著に低下した。さらに、A549 細胞においては、殺細胞効果の程度と薬物の脂溶性の高さとの関係に明確な相関性が認められることが明らかとなった。本検討で得られた結果は、脂溶性薬物に対するバリア機能の低下、すなわち mucin バリア機能の低下に起因するものと推察された。一方、A549 細胞において、BnGN 単独作用時および併用作用時どちらの条件でも細

胞生存率に変化は認められず、mucin 型糖鎖合成の作用機序が異なることにより、細胞膜透過性に及ぼす影響が異なることが示唆された。

次に、細胞表面 mucin 型糖鎖に対する TAL の効果を lectin 染色により定性的に評価したところ、TAL 処理 24 時間後において、A549 および HT29 細胞ともに PNA (GalNAc) および WGA (GlcNAc) の結合量の低下が認められ、SNA (シアル酸) の結合量の変化は認められなかった。一方、培養上清中に分泌される mucin 型糖鎖量の変化について評価したところ、TAL 処理 24 時間後において、HT29 細胞は SNA および WGA レクチンの結合量の有意な低下が認められた一方で、A549 細胞は PNA および WGA レクチンの結合量の有意な低下が認められた。別途、mucin タンパク質発現量に対する TAL 処理の影響を評価したところ、HT29 細胞においては MUC1、MUC2、MUC4、MUC5AC および MUC13 が、A549 細胞においては MUC5AC および MUC5B の発現量が TAL の濃度依存的に有意に減少した。以上の結果より、膜結合型 mucin に起因する細胞表面糖鎖および分泌型 mucin に起因する培養上清中の糖鎖量ともに、TAL 処理により減少したことが示され、細胞毒性試験による殺細胞効果の上昇は、mucin 型糖鎖の減少に起因する mucin タンパク質量の減少によるものと推察された。

さらに、脂溶性モデル薬物である rose bengal および paclitaxel, nilotinib の細胞内取込みに対する TAL 処理 (100 μ M, 24 時間) の影響を評価したところ、A549 および HT29 細胞ともに細胞内の薬物濃度が約 2 倍程度に増大することか示され、TAL 処理による脂溶性薬物の細胞膜透過性の亢進が認められた。このことは、TAL の効果により、ムチンバリアが減弱したことによって脂溶性薬物の細胞膜透過性が増大したことを示すものであり、mucin 型糖鎖合成を標的とすることで粘液バリア機能を低下させ、薬物の細胞膜透過性を亢進できる可能性が示された。

以上、本研究では、既存の薬物吸収理論において未知とされていた薬物と粘液層との関係性について、mucin-薬物相互作用という観点から分子論的な評価・考察を可能とし、今後、薬物の腸管膜透過機構における粘液層・mucin 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新規 *in vitro* 評価系の提案に寄与するだけでなく、mucin を標的とした新規吸収改善技術の開発および発展に貢献できるものと期待される。

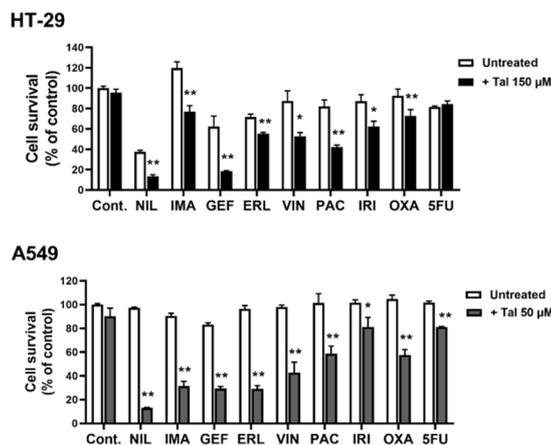


図2 各種薬物と TAL 併用後の細胞生存率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kishimoto Hisanao, Miyazaki Kaori, Tedzuka Hiroshi, Ozawa Ryosuke, Kobayashi Hanai, Shirasaka Yoshiyuki, Inoue Katsuhisa	4. 巻 26
2. 論文標題 Utilization of Sodium Nitroprusside as an Intestinal Permeation Enhancer for Lipophilic Drug Absorption Improvement in the Rat Proximal Intestine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6396 ~ 6396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26216396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kaori, Kishimoto Hisanao, Kobayashi Hanai, Suzuki Ayaka, Higuchi Kei, Shirasaka Yoshiyuki, Inoue Katsuhisa	4. 巻 103
2. 論文標題 The Glycosylated N-Terminal Domain of MUC1 Is Involved in Chemoresistance by Modulating Drug Permeation Across the Plasma Membrane	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 166 ~ 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/molpharm.122.000597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hisanao Kishimoto, Caroline Ridley, Katsuhisa Inoue, David J. Thornton	4. 巻
2. 論文標題 Assessment of polymeric mucin-drug interactions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0306058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊勢 大地、岸本 久直、鈴木 彩佳、宮崎 歌織、樋口 慧、井上 勝央
2. 発表標題 ムチン型糖鎖合成酵素阻害剤talniflumateは脂溶性抗がん剤の細胞膜透過を増強する
3. 学会等名 日本薬学会第38年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸本 久直、伊勢 大地、鈴木 彩佳、宮崎 歌織、樋口 慧、井上 勝央
2. 発表標題 脂溶性抗がん剤の細胞膜透過性に対するムチン型糖鎖の影響
3. 学会等名 第67回薬学会関東支部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 H. Kishimoto, D. Ise, A. Suzuki, K. Miyazaki, K. Higuchi, K. Inoue
2. 発表標題 Inhibition of mucin-type glycosyltransferase enhances membrane permeation of lipophilic anticancer drugs
3. 学会等名 The international joint meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 (ICCP450) and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics (JSSX) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸本 久直、C Ridley, D J. Thornton
2. 発表標題 中分子環状ペプチドと高分子ゲル形成ムチン間での相互作用
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 彩佳、岸本 久直、宮崎 歌織、樋口 慧、井上 勝央
2. 発表標題 抗がん剤の細胞内移行性に与える糖鎖合成酵素阻害剤の影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本 久直、鈴木 彩佳、宮崎 歌織、樋口 慧、井上 勝央
2. 発表標題 脂溶性薬物の細胞膜透過性に対する糖鎖合成酵素阻害剤の効果
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 H Kishimoto, A Suzuki, K Miyazaki, K Higuchi, K Inoue
2. 発表標題 Effect of talniflumate, a glycosyltransferase inhibitor, on mucus barrier function
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 H Kishimoto, A Suzuki, K Miyazaki, K Higuchi, K Inoue
2. 発表標題 The extracellular domain of MUC1 confers anticancer drug resistance and modulates drug permeability.
3. 学会等名 日本薬物動態学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鷹野 遥、岸本 久直、樋口 慧、井上 勝央
2. 発表標題 気液界面を模倣する疎水性溶媒を用いた上皮系培養細胞における粘液産生と細胞形態への影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021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
研究 分担者	樋口 慧 (Higuchi Kei) (10625304)	東京薬科大学・薬学部・講師 (32659)	
研究 分担者	井上 勝央 (Inoue Katsuhisa) (50315892)	東京薬科大学・薬学部・教授 (32659)	

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
---------	---------