

# 小腸上皮トランスポーター遺伝子発現系による経口薬物スクリーニングシステムの開発

著者	辻 彰
著者別表示	Tsuji Akira
雑誌名	平成11(1999)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	1998-1999
ページ	11p.
発行年	2000-03
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00049356">http://doi.org/10.24517/00049356</a>



# 小腸上皮トランスポーター遺伝子発現系による 経口薬物スクリーニングシステムの開発

(課題番号 10557214)

平成10年度～平成11年度 科学研究費補助金  
〔基盤研究 (B)(2)〕 研究成果報告書

平成 12 年 3 月

研究代表者 辻 彰

金沢大学附属図書館 (金沢大学薬学部教授)



8000-89016-X

IN  
)  
大学

# 小腸上皮トランスポーター遺伝子発現系による 経口薬物スクリーニングシステムの開発

(課題番号 10557214)

平成10年度～平成11年度 科学研究費補助金  
〔基盤研究 (B)(2)〕 研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 辻 彰  
(金沢大学薬学部教授)

著 者 寄 贈

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費補助金  
(基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

課題番号 10557214

研究課題 小腸上皮トランスポーター遺伝子発現系による  
経口薬物スクリーニングシステムの開発

研究組織 研究代表者：  
辻 彰 (金沢大学薬学部 教授)

研究分担者：  
玉井郁巳 (金沢大学大学院自然科学研究科 助教授)

研究経費	平成 10 年度	2,700 千円
	平成 11 年度	1,500 千円
	計	4,200 千円

## はじめに

経口投与した薬物は一般に単純拡散により消化管から吸収されると考えられているのに対して、研究代表者らを含め複数の研究機関の研究成果によってトランスポーターを介して能動的に吸収され、あるいは異物排出ポンプにより消化管管腔に分泌されるという事例が次々と報告されるようになった。例えば、 $\beta$ -ラクタム抗生物質のみならずペプチド構造を含んだ薬物の消化管吸収にはオリゴペプチド輸送系が関与し、多くの抗癌剤や免疫抑制剤が P-糖蛋白質によって分泌される事実が国内外の多くの研究者により報告されている。しかし、小腸において、生体にとって「必要なもの」と「不必要なもの」を巧妙に選別輸送する機構は依然として不明である。また、生体異物としての薬物を認識し、積極的に体内に吸収するトランスポーターが動物およびヒト小腸上皮細胞に存在するののかという点については一般に懐疑的であった。しかし、ウサギ小腸オリゴペプチド/ $H^+$ 共輸送系 PepT1 のクローニングが 1994 年に報告されて以来、世界中の研究者によって本トランスポーターに多大の関心が寄せられ、1995 年から 1996 年の間に研究代表者らを含め、ヒトおよびラットより PepT1 のクローニングが達成されるに至っている。この遺伝子クローニングとその機能測定の研究成果により、オリゴペプチド/ $H^+$ 共輸送系がペプチド構造を有する薬物の一部を効率良く吸収する機構が実証された。

一方、従来よりモノカルボン酸系薬物の pH 依存的な小腸吸収は、単純拡散機構 (pH 分配仮説) によって説明されてきたが、研究代表者らはプロトンとの共輸送体と思われるトランスポーター遺伝子が消化管に存在することを示唆し、その実体の一つと考えられる遺伝子クローニングに成功した。このような研究代表者らの分子生物学的手法を組み込んだ最近の研究の展開により、モノカルボン酸系化合物の pH 依存的担体介在輸送による組織細胞膜輸送の存在がいくつかの研究機関で支持されるようになった。しかし、リポゾームのような脂質二重層膜系においても、トランスポーター介在輸送と等価な受動拡散による膜透過現象が観察され、未だ研究機関間で解釈の異なる論争分野となっており、モノカルボン酸の腸管からの吸収にトランスポーターが介在するのかどうかについては、早急に解決されるべき課題の一つである。従って、医薬品開発の観点に立った場合、経口剤のデザインは物理化学特性に基づくべきか、対応するトランスポーターに適合するデザインとすべきか、という極めて重要な決断を迫られている。

また、分子量のより大きな生理活性ペプチドのような化合物の消化管吸収性は一般には低い。特に上述したペプチドトランスポーターはトリペプチドまでのサイズの分子しか認識せず、生理活性を有するペプチドの吸収増大化は重要な課題である。研究代表者らはこれまでに血液脳関門において一部の塩基性ペプチドは

吸着介在型エンドサイトーシスあるいはトランスサイトーシスが働き、脳内へのデリバリーに有効であることを示してきた。同様のメカニズムは小腸上皮細胞でも機能する可能性は十分にある。

以上の観点に基づき、本研究においては小腸上皮細胞で働くモノカルボン酸トランスポーターならびにペプチドトランスポーター、および吸着介在型エンドサイトーシスを利用した薬物の消化管吸収促進の可能性について種々検討を行った。

得られた研究成果は、まず第一にモノカルボン酸系化合物輸送については以下の4点である。(1) 小腸上皮細胞で働くモノカルボン酸トランスポーターの中でアニオン交換輸送体として働く分子の実体の一つとしてAE2に着目した。AE2遺伝子をリン酸カルシウム沈殿法によってHEK239細胞にトランスフェクションした後、従来モノカルボン酸トランスポーターの基質として用いてきた安息香酸などの取り込み活性の有無を測定した。その結果、安息香酸のみならずサリチル酸などのモノカルボン酸系薬物の取り込みが増加した。即ち、AE2タンパクは既に小腸上皮細胞刷子縁膜に発現していることが知られているため、AE2がモノカルボン酸系化合物の消化管吸収に働くことを示すことができた。(2) さらに、プロトン/モノカルボン酸共輸送体の実体の一つとして遺伝子クローニングに成功していたMCT1がモノカルボン酸系化合物の一つである安息香酸などを実際に輸送することの実証を試みた。これまで用いてきたアフリカツメガエル遺伝子発現系ではbackground活性が高かったため、MCT1遺伝子の発現極めて低いことが報告されていたMDA-MB231細胞を用いた安定発現細胞株を作製し、種々機能を測定した。その結果、発現ベクターのみをトランスフェクトしたMock細胞への取り込みで補正した安息香酸や乳酸のMCT1安定発現MDA-MB231細胞への取り込みは、pH依存性を示し、また得られたKm値や基質選択性も小腸上皮細胞を用いて得られた結果とほぼ一致するものであった。即ち、pH依存的なモノカルボン酸輸送系としてMCT1が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、従来pH分配仮説による膜透過機構によって説明されてきた安息香酸にMCT1を介した輸送機構も介在することが明らかにされた。(3) さらに、小腸上皮細胞モデルとして用いられているCaco-2細胞において観測されるトランスポーター介在輸送について新たにFractal速度論を用いた解析を行った。その結果、従来単純拡散によって説明可能であった膜透過現象が、トランスポーター介在型輸送によってより合理的に説明できることが強く示された。(4) また、同じくCaco-2細胞を用いた検討結果、経上皮細胞的輸送におけるアニオン交換輸送メカニズムの存在を示すことができた。以上の(1)から(4)の結果はいずれもモノカルボン酸系化合物の小腸上皮細胞膜輸送におけるトランスポーターの重要性を実証するものとなった。

ペプチドトランスポーターの機能特性並びに薬物の経口デリバリーへの応用性については以下の成果が得られた。(5) 消化管吸収性の不十分な抗ウイルス薬アシクロビルをバリンエステル体に誘導化したバラシクロビル(valacyclovir)がオリゴペプチドトランスポーター PepT1 の基質となることをアフリカツメガエル卵母細胞遺伝子発現系を用いた検討により明らかにした。本結果はペプチド結合を持たない化合物であっても PepT1 が基質として認識する可能性のあることを直接的に示す PepT1 の新しい機能特性を提示する成果となるとともに、ペプチドトランスポーターを介した吸収性改善が可能なことを示す成果である。(6) また同様に、PepT1 が幅広い基質認識性を有していることを利用した経口デリバリー法に関する基礎的検討を行った。バイオアベイラビリティが不十分なパーキンソン病治療薬 L-dopa のペプチド誘導体を合成し、その吸収性促進効果について検討を行った。その結果 Caco-2 細胞ならびに PepT1 遺伝子発現系を用いた研究成果として、L-dopa がアミノ酸輸送系を介して吸収されるよりも L-dopa-L-phe がペプチド輸送系を介して膜透過されるほうがより高い L-dopa の吸収性が期待できることが示された。さらに(7) PepT1 の発現は食事によって影響を受けることも示された。

以上、既に研究代表者らが検討を行ってきた小腸ペプチドトランスポーター PepT1 の新たな機能・発現制御特性ならびに経口吸収性改善への応用性について新たな知見を得ることに成功した。

最後に、さらに分子サイズの大きなペプチドの経口デリバリー法の樹立を目的とし、小腸における吸着介在型エンドサイトーシス/トランスサイトーシス機構の有無ならびにその機能特性について Caco-2 細胞ならびに実験動物消化管組織を用いた検討を行った。その結果(8) 小腸には塩基性ペプチドを幅広く取り込むエンドサイトーシス機構が備わっており、(9) 本機構が実際に機能することを蛍光標識したペプチド誘導体の共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により明らかにできた。(10) さらに、本機構が *in vivo* においても十分な capacity を持って働く可能性のあることをラット小腸を用いた検討により実証できた。本結果は、PepT1 を介した小ペプチドのみならず、さらに大きな生理活性ペプチドについても適切な誘導化により膜動輸送機構を利用した消化管吸収性促進が可能であることを示す新しい研究成果となった。

以上、本研究成果は、消化管に備わるトランスポーターあるいは膜動輸送機構が薬物の消化管吸収に機能することを実証するものであり、またそのような膜輸送機構の利用によって新たに薬物の消化管吸収性を制御する手法として有用であることを示すものである。

本科学研究費を頂くことによって研究を展開できたことに感謝しますとともに、その成果を発表論文を用いて以下に示した。

平成 12 年 3 月  
金沢大学薬学部  
教授  
辻 彰



## 研究発表

### 学会誌

1. H. Yabuuchi, I. Tamai, Y. Sai and A. Tsuji. Possible role of anion exchanger AE2 as the intestinal monocarboxylic acid/anion antiporter. *Pharm. Res.*, **15**, 411-416 (1998).
2. T. Ogihara, I. Tamai and A. Tsuji. Application of fractal kinetics for carrier-mediated transport of drugs across intestinal epithelial membrane. *Pharm. Res.*, **15**, 620-625 (1998).
3. P. V. Balimanen, I. Tamai, A. Guo, T. Nakanishi, H. Kitada, F. H. Leibach, A. Tsuji and P. J. Sinko. Direct evidence for peptide transporter (PepT1)-mediated uptake of a nonpeptide prodrug, valacyclovir. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**, 246-251 (1998).
4. I. Tamai, T. Nakanishi, H. Nakahara, Y. Sai, V. Ganapathy, F. H. Leibach and A. Tsuji. Improvement of L-dopa absorption by dipeptidyl derivation, utilizing peptide transporter PepT1. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1542-1546 (1998).
5. Y. Sai, M. Kajita, I. Tamai, J. Wakama, T. Wakamiya and A. Tsuji. Adsorptive-mediated transcytosis of a synthetic basic peptide, 001-C8 in Caco-2 cells. *Pharm. Res.*, **15**, 1305-1309 (1998).
6. Y. Sai, M. Kajita, I. Tamai, J. Wakama, T. Wakamiya and A. Tsuji. Adsorptive-mediated endocytosis of a basic peptide in enterocyte-like Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.*, **275**, G514-520 (1998).
7. Y. Sai, M. Kajita, I. Tamai, M. Kamata, J. Wakama, T. Wakamiya and A. Tsuji. Intestinal absorption of fluorescence-derivatized cationic peptide 001-C8-NBD via adsorptive-mediated transcytosis. *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 841-848 (1998).
8. I. Tamai, Y. Sai, A. Ono, Y. Kido, H. Yabuuchi, H. Takanaga, E. Satoh, T. Ogihara, O. Amano, S. Iseki and A. Tsuji. Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by monocarboxylic acid transporter MCT1. *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 1113-1121 (1999).
9. T. Ogihara, I. Tamai and A. Tsuji. Structural characterization of substrates for the anion exchange transporter in Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1217-1221 (1999).
10. T. Shiraga, K. Miyamoto, H. Tanaka, H. Yamamoto, Y. Taketani,

K. Moriya, I. Tamai, A. Tsuji and E. Takeda. Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H<sup>+</sup>/peptide transporter PepT1. *Gastroenterology*, 116, 354-362 (1999).

## 口頭発表

1. 第 9 回日米生物薬剤学シンポジウム, 1998 年 7 月 29-31 日 (名古屋).  
Alteration of pH Profile of PepT1-Mediated Transport Activity  
among Peptides and Peptide-Mimetic Drugs. 北田英之、中西猛夫、  
崔 吉道、玉井郁巳、F.H.Leibach、辻 彰
2. 第 13 回日本薬物動態学会年会, 1998 年 11 月 11-13 日 (仙台). 消化管  
アニオン交換輸送系の基質認識・輸送特性. 荻原琢男、玉井郁巳、辻 彰
3. 第 13 回日本薬物動態学会年会, 1998 年 11 月 11-13 日 (仙台). ペプチ  
ドトランスポーター PepT1 の分子認識性. 北田英之、高木昭佳、中西猛夫、  
F.H.Leibach、P.V.Balimane、P.J.Shinko、玉井郁巳、辻 彰
4. 第 13 回日本薬物動態学会年会, 1998 年 11 月 11-13 日 (仙台). Caco-  
2 細胞を用いた薬物吸収性スクリーニング法の最適化—トランスポーターを  
介した薬物吸収の評価—. 服部恵美子、多喜陽子、山下伸二、瀬崎 仁、北  
田英之、玉井郁巳、辻 彰
5. 第 13 回日本薬物動態学会年会, 1998 年 11 月 11-13 日 (仙台). 小腸上  
皮細胞トランスポーターを介した有機アニオン性化合物の吸収・分泌. 成橋  
和正、鈴木永雄、玉井郁巳、辻 彰
6. 日本動物実験代替法学会, 第 12 回大会 1998 年 11 月 18-19 日 (仙台).  
Mechanism and Evaluation of Drug Transport across the  
Intestinal Epithelial Cell Membranes. 玉井郁巳、辻 彰
7. 日本薬剤学会第 14 年会, 1999 年 3 月 26-28 日 (岡山). 小腸上皮細胞  
における有機アニオン性化合物の吸収・分泌. 成橋和正、鈴木永雄、玉井郁  
巳、辻 彰
8. 日本薬学会第 119 年会, 1999 年 3 月 29-31 日 (徳島). ペプチドラン  
スポーター PepT1 の ACE 阻害薬の認識・輸送特性. 北田英之、中西猛夫、  
玉井郁巳、辻 彰
9. 日本薬学会第 119 年会, 1999 年 3 月 29-31 日 (徳島). 微小透析法を用  
いた連続的門脈血中濃度測定による薬物の消化管吸収における P-糖蛋白質  
および CYP3A の寄与の検討. 山口佳一、玉井郁巳、辻 彰
10. A. Tsuji, Mechanism of drug absorption and exsorption,

International Symposium, Strategies for Optimizing Oral Delivery: Scientific and Regulatory Approaches, April 19-21, 1999, Kobe, Japan.

11. A. Tsuji, Transporter-mediated absorption and secretion of drugs, International Research Conference on Membrane Transporters: New Perspectives in Drug Delivery and Drug Targeting, August 8-12, 1999 Ascona, Switzerland.
12. 第14回日本薬物動態学会年会. 1999年10月19-21日(浜松). トランスポーター変異動物を用いたニューキノロン系抗菌薬の小腸上皮分泌機構の解析. 成橋和正、井上奈津子、鈴木永雄、玉井郁巳、辻 彰
13. 第14回日本薬物動態学会年会. 1999年10月19-21日(浜松). ニューキノロン系抗菌薬の消化管吸収と分泌にトランスポーターが関与するか? 井上奈津子、成橋和正、玉井郁巳、辻 彰
14. 日本薬学会第120年会. 2000年3月29-31日(岐阜). Caco-2細胞を用いて小腸上皮細胞膜輸送はどこまで反映できるか?—キノロン系抗菌薬をモデル薬物として用いて—. 井上奈津子、成橋和正、村岡弘美、玉井郁巳、崔 吉道、辻 彰