

培養細胞系を用いた経細胞的薬物輸送機構の解明

著者	辻 彰
著者別表示	Tsuji Akira
雑誌名	平成5(1993)年度 科学研究費補助金 一般研究(B) 研究成果報告書
巻	1992-1993
ページ	9p.
発行年	1994-03
URL	http://doi.org/10.24517/00049360



培養細胞系を用いた経細胞的薬物輸送機構の解明

課題番号 04452305

平成5年度科学研究費補助金 一般研究B
研究成果報告書

平成6年3月

研究代表者 辻 彰
(金沢大学薬学部・教授)

培養細胞系を用いた経細胞的薬物輸送機構の解明

課題番号 04452305

平成5年度科学研究費補助金 一般研究B
研究成果報告書

平成6年3月

研究代表者 辻 彰
(金沢大学薬学部・教授)



8000-30335-3

金沢大学附属図書館

はしがき

活発なエネルギー代謝機能を有し、luminalとabluminal膜の極性を保持した培養細胞系は、従来の単離刷子縁膜小胞、単離側底膜小胞、単離上皮細胞や単離脳毛細血管系を用いた膜輸送実験法の問題点を克服した実験系であり、薬物動態を細胞レベルで実証できる特徴を有している。

本研究は、tight junctionの存在によって物質の透過が主として経細胞ルートによって進行する小腸および脳毛細血管における薬物の細胞膜透過機構に対し、すでに刷子縁膜小胞系や脳灌流法などの手法から裏付けられた我々の新説を、適切な培養細胞系によって実証することによって、薬物の組織細胞膜輸送研究における培養細胞系の有用性を確立することを目的とした。この目的達成のため、薬物の組織分布研究に経験と実績を持つ研究分担者の協力を得て、小腸ではヒト結腸由来上皮細胞継代培養系(Caco-2)あるいは遺伝子発現系として汎用されるアフリカツメガエル卵母細胞系(oocytes)を用いて、脳ではウシ脳毛細血管内皮細胞初代培養系(BCEC)を用い、2年間の研究によって、下記に示すように世界に先駆けた発見を含め、培養細胞実験系が薬物動態の細胞レベルでの研究に有用であることを裏付ける成果を得ることができた。

- 1) 従来、薬物の腸管吸収に適用される「pH分配仮説」に対し、我々が提唱する「プロトンとの共輸送あるいは重炭酸イオンとのpH依存的交換輸送による二次性能動輸送」仮説を、Caco-2を用いて実証する研究を行った。その結果、安息香酸およびサリチル酸のCaco-2細胞における輸送特性は小腸刷子縁膜小胞系で得られた現象と同様であり、その輸送速度は蛋白質修飾剤およびプロテアーゼ処理によって著しく減少した。このことより、安息香酸およびサリチル酸のpH依存的輸送は、pH分配仮説に従う受動拡散透過よりも、プロトンとの共輸送系を介した二次性能動輸送に基づくものであり、これに関与する輸送系はモノカルボン酸構造を有する化合物にのみ親和性があることが明らかとなった。
- 2) 薬物の担体介在輸送の実証および輸送蛋白の分子機構的解析を行うために、ラット、ウサギおよびヒトの小腸上皮細胞から抽出したmRNAを注入したoocytesを用いて検討した。その結果、oocyte膜上に発現したジペプチド輸送蛋白は、小腸刷子縁膜小胞系で得られたと同様に、種差を問わず β -ラクタム抗生物質を共通してプロトン勾配を駆動力として輸送することが実証された。
- 3) 脳毛細血管内皮細胞luminal側に存在する「P-糖蛋白質(P-gp)が血液脳関門において排出ポンプとして機能する」という我々が提唱する仮説を、BCECを用いて実証する実験を行った。ウシ脳皮質切片およびその初代培養細胞いずれにおいても、免疫学的手法により内皮細胞血管側にP-gpが局在することが確認できた。 $[^3\text{H}]$ ビンクリスチンおよび $[^3\text{H}]$ シクロスポ

リンAの血管側からの細胞内への取り込みは、種々のP-gp機能阻害剤、モノクローナル抗体MRK16および代謝阻害剤の処理により増加したことから、これらの薬物はP-gpによってATP依存的に細胞外へ排出されていることが明らかとなった。以上の結果は、内皮細胞に存在するtight junctionによって親水性物質の脳移行が制限されるばかりでなく、P-gpの排出機能によって脂溶性で細胞毒性のある物質の脳移行が制限されるといふ、血液脳関門の新しい概念を提示するものである。

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： 寺崎 哲也 (金沢大学薬学部・助教授、
現東京大学薬学部・助教授)
玉井 郁巳 (金沢大学薬学部・講師)

研究経費

平成4年度	4,400千円
平成5年度	2,300千円
計	6,700千円

研究発表

(1) 学会誌

- 1) T. Terasaki, S. Takakuwa, A. Saheki, S. Moritani, T. Shimura, S. Tabata and A. Tsuji, Absorptive-mediated endocytosis of an adrenocorticotrophic hormone (ACTH) analogue, ebitatide, into the blood-brain barrier: Studies with monolayers of primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Pharm. Res.*, **9**, 529 - 534 (1992).
- 2) 辻 彰、薬物の血液脳関門透過性、*Info Medica*, **3**, 2 - 3 (1992).
- 3) 寺崎哲也、辻 彰、血液脳関門特殊輸送系を利用した脳内ドラッグデリバリー戦略、*ファルマシア*, **28**, 358 - 362 (1992).
- 4) 辻 彰、小腸 脳における薬物の担体介在輸送、*TDM研究*, **9**, 66 - 72 (1992).
- 5) A. Tsuji, T. Terasaki, Y. Takabatake, Y. Tenda, I. Tamai, T. Yamashita, S. Moritani, T. Tsuruo and J. Yamashita, P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Life Sci.*, **51**, 1427 - 1437 (1992).
- 6) T. Terasaki, A. Kadowaki, H. Higashida, K. Nakayama, I. Tamai and A. Tsuji, Expression of Na⁺-dependent uridine transport system of rabbit small intestine: Studies with mRNA-injected *Xenopus laevis* Oocytes, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 493 - 496 (1993).
- 7) 寺崎哲也、辻 彰、ペプチド性薬物およびオリゴヌクレオチドの脳へのデリバリー、*BIOMedica*, **8**, 396 - 400 (1993).
- 8) 辻 彰、P-糖蛋白質と血液脳関門(II)、*Molecular Medicine*, **30**, 748 - 755 (1993).
- 9) 辻 彰、薬物の血液脳関門透過性、*Physicians' Therapy Manual*, **6**, 4 (1993).
- 10) A. Tsuji, I. Tamai, A. Sakata, Y. Tenda and T. Terasaki, Restricted Transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein, *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1096 - 1099 (1993).
- 11) A. Tsuji, A. Saheki, I. Tamai and T. Terasaki, Transport mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors at the blood-brain barrier, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **267**, 1085 - 1090 (1993).
- 12) A. Tsuji, H. Takanaga, I. Tamai and T. Terasaki, Transcellular transport of benzoic acid across Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier-mediated transport mechanism. *Pharm. Res.*, **11**, 30 - 37 (1994).
- 13) A. Saheki, T. Terasaki, I. Tamai and A. Tsuji, *In vivo* and *in vitro* blood-brain barrier transport of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors. *Pharm. Res.*, **11**, 305 - 311 (1994).
- 14) H. Takanaga, I. Tamai and A. Tsuji, pH-Dependent and carrier-mediated transport of salicylic acid across Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, in press.

(2) 学会発表

- 1) A. Tsuji, T. Terasaki and A. Saheki, Comparative blood-brain barrier permeability of pravastatin sodium and simvastatin or lovastatin, XI. In "International Symposium on Drug Affecting Lipid Metabolism", Florence, Italy, May, 1992.
- 2) 玉井郁巳、担体輸送系を介した薬物細胞透過機構研究 - 小腸上皮細胞膜透過を中心にして -、第 10 回生物薬学研究会、京都、1992 年 6 月、講演要旨集 43 - 51 頁。
- 3) 寺崎哲也、玉井郁巳、佐伯 憲、米田 勝、辻 彰、臓器間特異的細胞膜担体輸送と分子設計：小腸及び血液脳関門におけるHMG-CoA還元酵素阻害剤の輸送特性の比較、第 8 回日本 DDS 学会、札幌、1992 年 7 月、講演要旨集 311 頁。
- 4) 玉井郁巳、天田由幸、寺崎哲也、辻 彰、高島靖志、山嶋哲盛、山下純宏、脳毛細血管内皮細胞に発現するP-糖蛋白質の汲み出し機能による薬物中枢移行制御、第 8 回日本 DDS 学会、札幌、1992 年 7 月、講演要旨集 310 頁。
- 5) 高島靖志、山嶋哲盛、山下純宏、玉井郁巳、天田由幸、寺崎哲也、辻 彰、正常脳毛細血管内皮細胞に発現するP-糖蛋白質の機能 I：初代培養細胞に発現するか、第 51 回日本癌学会総会、大阪、1992 年 9 月、講演要旨集 133 頁。
- 6) 玉井郁巳、天田由幸、高島靖志、山嶋哲盛、山下純宏、寺崎哲也、辻 彰、正常脳毛細血管内皮細胞に発現するP-糖蛋白質の機能 II：血液脳関門としての役割、第 51 回日本癌学会総会、大阪、1992 年 9 月、講演要旨集 124 頁。
- 7) 高島靖志、山嶋哲盛、山下純宏、玉井郁巳、天田由幸、寺崎哲也、辻 彰、脳毛細血管内皮細胞におけるP-糖蛋白質の発現と機能、第 51 回日本脳神経外科学会総会、鹿児島、1992 年 10 月。
- 8) 玉井郁巳、天田由幸、坂田 篤、寺崎哲也、辻 彰、高島靖志、山嶋哲盛、山下純宏、森谷修三、脳毛細血管内皮細胞に発現するP-糖蛋白質の薬物中枢移行制御機構、第 23 回薬物代謝と薬効毒性シンポジウム、京都、1992 年 10 月、講演要旨集 151 - 154 頁。
- 9) 高長ひとみ、玉井郁巳、寺崎哲也、辻 彰、ヒト大腸由来培養上皮細胞 (Caco-2) におけるモノカルボン酸系薬物のpH依存的担体輸送、第 7 回日本薬物動態学会年会、京都、1992 年 10 月、講演要旨集 60 頁。
- 10) 仙丸瑞穂、玉井郁巳、寺崎哲也、辻 彰、血液脳関門におけるタウリンのNa⁺及びCl⁻依存的担体輸送、第 7 回日本薬物動態学会年会、京都、1992 年 10 月、講演要旨集 70 頁。
- 11) 富沢直子、門脇 敦、玉井郁巳、寺崎哲也、辻 彰、小腸ジペプチド輸送タンパク質遺伝子導入によるセフチブテン輸送活性の発現、第 14 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、大阪、1992 年 11 月、講演要旨集 5 - 6 頁。
- 12) 坂田 篤、天田由幸、玉井郁巳、寺崎哲也、辻 彰、高島靖志、山嶋哲盛、山下純宏、森谷修三、P-糖蛋白質によるサイクロスポリンAの脳毛細血管内皮細胞からの排出、日本薬学会北陸支部第 87 回例会、富山、1992 年 11 月、講演要旨集 22 頁。

- 13) 小林寛行、玉井郁巳、辻 彰、寺崎哲也、鎌田 信、若宮建昭、ペプチドの脳デリバリー : Absorptive-mediated endocytosis による脳毛細血管内皮細胞内在化量と構造相関、日本薬学会第 113 年会、大阪、1993 年 3 月、講演要旨集 90 頁。
- 14) 玉井郁巳、細胞膜担体輸送を利用した薬物動態制御、第 11 回生物薬剤学研究会、東京、1993 年 6 月、講演要旨集 37 - 45 頁。
- 15) 小林寛行、玉井郁巳、辻 彰、鎌田 信、若宮建昭、寺崎哲也、ペプチドの脳送達法の開発 - Absorptive-mediated endocytosis における基質認識特性 -、第 2 回 DDS カンファランス、静岡、1993 年 6 月、講演要旨集 17 頁。
- 16) 坂田 篤、河津剛一、出口芳春、佐伯 憲、玉井郁巳、辻 彰、高島靖志、山嶋哲盛、山下純宏、寺崎哲也、薬物の脳送達障壁 : 血液脳関門における分子量閾値と P-糖蛋白質、第 2 回 DDS カンファランス、静岡、1993 年 6 月、講演要旨集 18 頁。
- 17) A. Tsuji, Active transport pathways for beta lactams in GI tract and the kidney. *In* "18th International Congress of Chemotherapy", Stockholm, Sweden, June, 1993.
- 18) Akira Tsuji, Delivery across the blood-brain barrier, *In* "International Symposium : Delivery of Protein Drugs - The Next 10 Years - ", Kyoto, Japan, September, 1993.
- 19) 富沢直子、竹内敏之、玉井郁巳、寺崎哲也、東田陽博、中山耕造、辻 彰、遺伝子発現系を用いた β -ラクタム抗生物質の小腸上皮細胞担体輸送の実証、第 8 回日本薬物動態学会年会、千葉、1993 年 10 月、講演要旨集 181 - 184 頁。
- 20) 小林寛行、玉井郁巳、鎌田 信、若宮建昭、寺崎哲也、辻 彰、ペプチドの脳デリバリー : Absorptive-mediated endocytosis の基質認識特性とペプチドの脳内移行性、第 8 回日本薬物動態学会年会、千葉、1993 年 10 月、講演要旨集 257 頁。
- 21) 高長ひとみ、玉井郁巳、辻 彰、小腸上皮細胞アニオン交換輸送体を介したモノカルボン酸系薬物の pH 依存的吸収、第 8 回日本薬物動態学会年会、千葉、1993 年 10 月、講演要旨集 245 頁。
- 22) 竹内敏之、富沢直子、林喜代美、玉井郁巳、辻 彰、東田陽博、中山耕造、 β -ラクタム抗生物質の小腸上皮細胞輸送に担体は介在するか? - 遺伝子発現系による実証と動物 - ヒト間の発現活性比較 -、日本薬学会北陸支部第 89 回例会、金沢、1993 年 11 月、講演要旨集 11 頁。
- 23) 玉井郁巳、担体輸送系を介した薬物の組織細胞膜透過の機構論的研究、日本薬学会北陸支部第 89 回例会、金沢、1993 年 11 月、講演要旨集 1 - 2 頁。
- 24) 小林寛行、梶田昌裕、玉井郁巳、辻 彰、鎌田 信、若宮建昭、血液脳関門における Absorptive-mediated endocytosis : C 末端構造修飾の脳毛細血管内皮細胞内在化量への影響、日本薬学会第 114 年会、東京、1994 年 3 月、講演要旨集 4 巻 49 頁。
- 25) 張 敏、玉井郁巳、辻 彰、小腸における β -ラクタム抗生物質 Cephalexin の立体選択的吸収、日本薬学会第 114 年会、東京、1994 年 3 月、講演要旨集 4 巻 106 頁。

- 26) 阪中浩二、大西俊正、坂田 篤、玉井郁巳、辻 彰、山嶋哲盛、山下純宏、血液脳関門におけるP-糖蛋白質の機能発現：薬物排出活性とATP含量との対応、日本薬学会第114年会、東京、1994年3月、講演要旨集4巻49頁。
- 27) 高長ひとみ、前田 宏、中谷 糸、玉井郁巳、辻 彰、東田陽博、小腸におけるモノカルボン酸系薬物のpH依存的担体輸送：遺伝子発現及びアミノ酸化学修飾による担体介在輸送の実証、日本薬学会第114年会、東京、1994年3月、講演要旨集4巻107頁。
- 28) 繁原英治、鈴木裕子、北沢栄一、玉井郁巳、辻 彰、Caco-2細胞を用いた薬物の吸収性の評価 (第1報) 経口セフェム系抗生物質バナンの吸収と代謝、日本薬学会第114年会、東京、1994年3月、講演要旨集4巻106頁。