

Drug Delivery based on Multiplicity of Various Membrane Transporters

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-12-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Tsuji, Akira メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00049355

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



ペプチド輸送系の組織特異的発現と分子認識多様性
を利用した腫瘍選択的薬物デリバリー

(課題番号 12557204)

平成 12 年度～平成 13 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 14 年 3 月

研究代表者 辻 彰
(金沢大学薬学部教授)

金沢大学附属図書館



8011-05270-5

12557204
28

ペプチド輸送系の組織特異的発現と分子認識多様性
を利用した腫瘍選択的薬物デリバリー

(課題番号 12557204)

平成 12 年度～平成 13 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 14 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 12 年度～平成 13 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 12557204

研究課題 ペプチド輸送系の組織特異的発現と分子認識
多様性を利用した腫瘍選択的薬物デリバリー

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 (金沢大学薬学部 助教授)
崔 吉道 (金沢大学大学院自然科学研究科 助手)

研究経費	平成 12 年度	5,600 千円
	平成 13 年度	4,100 千円
	計	9,700 千円

はじめに

腫瘍組織への抗癌性物質の標的化はがんの化学療法にとって最も重要なファクターである。腫瘍標的化のために抗体を利用した手法や表面修飾リポソームを利用するアプローチが試みられてきているが、いずれも高分子物質を利用した手法であるが故に、最終的に血液中から腫瘍組織細胞内へ抗癌活性物質を送り込む過程に問題を含む。

薬物の組織移行性は、各組織を形成する細胞膜の透過性によって決定される。従来より薬物の細胞膜透過性は、薬物の分子サイズ、脂溶性、イオン化状態などの物理化学的因子によって決まる単純拡散機構に従うものと考えられてきた。しかし、細胞膜を隔てた細胞内外の物質交換機能を有するトランスポータータンパクを介することにより、生理的物質のみならず、薬物の細胞膜透過も進行することが、申請者らの種々研究手法を用いた成果により見いだされてきた。単純拡散に従う細胞膜輸送は非特異的であるため薬物の組織移行性に特異性を期待することは困難である。一方、トランスポーターは生理的役割に応じて組織特異的に発現するため、トランスポーターを介した細胞膜輸送を医薬品にも応用できれば、薬物の組織移行性に高い選択性と効率をもたらすことが可能である。さらに、腫瘍細胞は旺盛な細胞増殖を支えるために多くの栄養物を積極的に取り入れるためのトランスポーター機能を過剰に発現している事例が報告されている。従って、正常組織における分布性が限局され、しかも腫瘍細胞に高発現するトランスポーターを見いだすことは十分可能である。

研究代表者等は、正常な小腸・腎上皮細胞刷子縁膜に特異的に発現し、ジ・トリペプチドを選択的に細胞内に取り込むペプチドトランスポーターに関する多くの研究成果を得てきた。本トランスポーターはペプチドサイズに対しては厳格であるが、構成アミノ酸の認識性は幅広く、実際にペプチド様薬物も認識・輸送する。ペプチドトランスポーター様活性は一部の腫瘍細胞株にも見いだされる。したがって、トランスポーターを介した抗がん剤の腫瘍組織ターゲティングのアプローチとして、正常組織における発現が非常に限局されたペプチドトランスポーターの有用性が期待できる。

本研究では、上述の背景に基づき、腫瘍組織細胞内移行の律速段階である細胞膜透過性を促進し、しかも腫瘍組織特異性を併せ持たすことが可能な「腫瘍組織細胞膜に高い特異性を有する物質輸送トランスポーター分子を用いた全く新しい腫瘍ターゲティング法の開発」を目的とした。

本研究により得られた成果を以下にまとめる。

- 1) ヒト小腸オリゴペプチドトランスポーターhPEPT1 cDNAあるいは空の発現ベクターをHeLa細胞に遺伝子導入し、強制発現細胞（HeLa-hPEPT1）およびmock細胞を得た。HeLa-hPEPT1細胞におけるhPEPT1 mRNAの発現をRT-PCRによって確認することが出来た。HeLa-hPEPT1へのペプチド性抗が

ん剤^[3H]ベスタチン取り込み活性について検討を行ったところ、mock細胞と比較してその取り込み量が約5倍に増加し、非標識のベスタチンの共存による阻害効果、pH依存性等がみられ、hPEPT1が有する輸送活性が再現されることが分かった。

- 2) HeLa-hPEPT1細胞をヌードマウス (Balb/c nu/nu) の背部皮下に移植することにより担がんマウスを作製した。対照動物として、HeLa細胞の親株を同様にマウスに移植し腫瘍を形成させた。両マウスにペプチド構造を有する抗腫瘍薬ベスタチンおよびジペプチドの^[3H]カルノシンを投与し、30分後に血中および腫瘍そのものの組織中の薬物濃度を定量することにより、各化合物の組織移行性を組織対血漿中濃度比 (K_p値) として評価した結果、hPEPT1を発現する腫瘍組織におけるK_p値はそれぞれ2.0および2.5と算出された。これらの値は細胞間液のみ分布する^[14C]イヌリンの値と比べ有意に高く、両化合物が腫瘍細胞内に取り込まれていることが示された。HeLa親株細胞の移植により形成された腫瘍へのペプチド化合物の蓄積が観察されなかったことから、hPEPT1の過剰発現による特異的な腫瘍への蓄積であることが示された。
- 3) hPEPT1発現および非発現細胞へのin vitroでのベスタチンに対する感受性の変化をMTT法により検討したところ、HeLa-hPEPT1細胞では約2 μg/ml以上の濃度において顕著な増殖抑制効果がみられた。一方mock細胞については検討を行ったベスタチン濃度 (0.22~222 μg/ml) で増殖抑制効果はほとんどみられなかった。In vivo実験として担がんマウスにベスタチン(0.5 mg/kg)を28日間経口投与した結果、HeLa-hPEPT1を移植した腫瘍の増殖はmock細胞の腫瘍に比べて顕著に抑制された。これらの結果より、腫瘍細胞にhPEPT1が発現することによりペプチド性化合物の蓄積および感受性が上昇することが示された。
- 4) PEPT1およびPEPT2のmRNA発現量を定量解析し、腫瘍細胞の持つ輸送活性と比較検討することを目的として、ヒト肺、乳腺、胃、結腸、膵臓、膀胱、子宮頸部、皮膚、骨あるいは白血球、リンパ球に由来する各種株化腫瘍細胞を培養後、全RNAを調製し、リアルタイム定量PCR解析を行った。その結果、既知の代表的なオリゴペプチドトランスポーターであるPEPT1の発現量は白血病細胞由来ML-1細胞で最も高く、次いでNakajimaおよびCaco-2に顕著な発現が見られた。PEPT2は殆どの細胞に発現が見られた。これらペプチドトランスポーターの発現量を放射性標識グリシルザルコシンおよびベスタチンの取り込み活性と比較した結果、トランスポーター発現量と輸送活性とが必ずしも一致しないことから、新規のペプチドトランスポーターの存在が示唆された。
- 5) PEPT1発現アデノウイルスの作成し、in vivoにおけるペプチド性薬物の組織移行性改善を肝臓を用いて達成することにも成功した。

- 6) 更に本研究期間中には、腫瘍細胞の増殖に関与するLarge neutral amino acid transporter LAT1およびそのホモログであるLAT2が、血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞にも発現することをラット初代培養脳毛細血管内皮細胞および初代培養細胞をSV40の導入により株化したRBEC1細胞を用いて明らかにした。これら細胞のロイシン輸送の速度論的解析からLAT1およびLAT2は血液脳関門においてシステムLとして重要な役割を持つことを明らかにすることが出来た。
- 7) がん細胞に発現するOCTN、OATP等のトランスポーターのクローニングならびに機能特性解析、種々トランスポーター群の体内動態制御への利用法についての検討も行った。

本研究による成果は、以上のように腫瘍細胞に発現するトランスポート活性を利用することにより、ペプチド様構造を有する抗腫瘍薬を腫瘍組織特異的に送達することが可能であることを理論的に実証するものである。今後、PEPT1、PEPT2の輸送特性を更に詳細に明らかにし、その構造認識に適合する抗腫瘍薬を開発すれば、簡便な経口投与により腫瘍組織特異的に薬理活性を発現することが期待できると思われる。

本科学研究費によって上述の研究を展開できたことに感謝致します。

発表を行った研究成果を、学術論文・学会発表に分けて以下に示します。

平成14年3月
金沢大学薬学部
教授
辻 彰

研究発表

学会誌（総説を含む）

- 1) Nakanishi, T., Tamai, I., Takaki, A., Tsuji, A., Cancer cell-targeted drug delivery utilizing oligopeptide transport activity. *Int. J. Cancer*, **88**, 274-280 (2000).
- 2) Hirohashi, T., Suzuki, H., Chu, X.Y., Tamai, I., Tsuji, A., Sugiyama, Y., The function and expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 265-270 (2000).
- 3) Ogihara, T., Tamai, I., Tsuji, A., Structural requirements of substrates for stereoselective monocarboxylate transport in Caco-2 cells. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **6**, 161-165 (2000).
- 4) Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Sai, Y., Kobayashi, D., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A., Molecular and functional characterization of organic Cation/Carnitine transporter family in mice. *J. Biol. Chem.*, **275**, 40064-40072 (2000).
- 5) Mayatepek, E., Nezu, J., Tamai, I., Oku, A., Katsura, M., Shimane, M., Tsuji, A., Two novel missense mutations of the OCTN2 gene (W283R and V446F) in a patient with primary systemic carnitine deficiency. *Hum. Mutat. (Online)* **15**, 118 (2000).
- 6) Tamai, I., Nezu, J., Uchino, H., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A., Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 251-260 (2000).
- 7) Tamai, I., Tsuji, A., Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.* **89**, 1371-1388 (2000).
- 8) 辻 彰, 薬物の生体膜輸送機構解析を基盤とした体内動態抑制に関する研究, *薬物動態*, **15**, 112-135 (2000).
- 9) 辻 彰, 消化管吸収過程における薬物間相互作用, *月刊薬事*, **42**, 287-293 (2000).
- 10) 辻 彰, 薬物の血液脳関門透過性の改善. *Pharm. D.*, **2**, 1-5 (2000).

- 1 1) 玉井郁巳, 小腸上皮トランスポーター群の分子機構論的解析と薬物の経口デリバリーへの応用. 薬学研究の進歩, **16**, 77-88 (2000).
- 1 2) 玉井郁巳, 辻 彰, トランスポーターが関与する薬物動態と病態. 薬事新報, **2141**, 9-15 (2000).
- 1 3) 玉井郁巳, 大橋力也, 根津淳一, 奥飛鳥, 嶋根みゆき, 崔 吉道, 辻 彰, OCTN トランスポーターファミリーの組織分布・輸送機能の多様性. 薬物動態, **15**, 182-188 (2000).
- 1 4) Naruhashi, K., Tamai, I., Inoue, N., Muraoka, H., Sai, Y., Suzuki, N. and Tsuji, A., Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 in intestinal secretion of grepafloxacin in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 344-349 (2001).
- 1 5) Kido, Y., Tamai, I., Uchino, H., Sai, Y., Suzuki, F. and Tsuji, A., Molecular and functional identification of large neutral amino acid transporter LAT1 and LAT2 and their pharmacological relevance at the blood-brain barrier. *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 497-503 (2001).
- 1 6) Naruhashi, K., Tamai, I., Inoue, N., Muraoka, H., Sai, Y., Suzuki, N. and Tsuji, A., Active intestinal secretion of new quinolone antimicrobials and the partial contribution of P-glycoprotein. *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 699-709 (2001).
- 1 7) 玉井郁巳, 崔吉道, 根津淳一, 奥飛鳥, 嶋根みゆき, 小泉昭夫, 辻 彰, 薬物トランスポーター群の遺伝子多型, 日本動態 **16**, 127-133 (2001)
- 1 8) Toyobuku H, Sai Y, Tamai I, Tsuji A. Enhanced delivery of drugs to the liver by adenovirus-mediated heterologous expression of human oligopeptide transporter PEPT1. *J Pharmacol Exp Ther*, ; in press

口頭発表

招待講演

- 1) Tsuji, A., Tamai, I., "Restricted brain entry of ebastine caused by P-glycoprotein in the blood-brain barrier", International Sendai Histamine Symposium, November 2000, Sendai, JAPAN.
- 2) Tamai, I., Tsuji, A., "Transporter-mediated drug interaction", International Conference on Drug-Drug Interactions, June 2000, Baltimore, USA.
- 3) Tsuji, A., Tissue selective drug delivery utilizing transporters, Millennial World Congress of Pharmaceutical Sciences, April 16-20, 2000, San Francisco, USA.
- 4) 玉井郁巳、辻 彰、第 48 回日本化学療法学会西日本支部総会シンポジウム “排出タンパク質による薬剤耐性”、京都、2000 年 12 月。
- 5) 玉井郁巳、辻 彰、第 74 回日本薬理学会年会シンポジウム、血液脳関門における輸送機構と脳へのドラッグデリバリー、“血液脳関門排出輸送系による薬物の中枢性副作用回避”、横浜、2001 年 3 月 21-23 日。
- 6) 玉井 郁巳、辻 彰、トランスポーター研究によるドラッグデリバリー戦略の新展開、日本農芸化学会、京都、2001 年 3 月 24-27 日。
- 7) 玉井郁巳、日本薬学会第 121 年会シンポジウム、薬物輸送・排泄の分子機構、“吸収・排泄型トランスポーター群の分子認識・輸送の多様性と遺伝子多型”、札幌、2001 年 3 月 28-30 日。
- 8) 玉井郁巳、辻 彰、第 106 回日本解剖学会総会シンポジウム、膜輸送タンパク質から脳機能を探る、“血液脳関門における薬物トランスポーター” 高知県南国市、2001 年 4 月 2-4 日。
- 9) 玉井郁巳、福井県立大学大学院特別講義、“薬物動態とトランスポーター”、福井、2001 年 4 月 26 日。
- 10) 玉井郁巳、ドラッグフォーラムオオサカ、“薬物動態とトランスポーター”、2001 年 6 月 20 日、大阪。

- 11) I. Tamai, P-Glycoprotein-mediated interaction between amiodarone and its CPY3A4-metabolite in intestine, 第 19 回生物薬剤学研究会, 東京, 2001 年 6 月 8-9 日
- 12) 玉井郁巳、日本薬剤学会第 26 回製剤セミナー、“ペプチドトランスポーターを用いた薬物デリバリー”、木更津、2001 年 7 月 20 日。
- 13) 玉井郁巳、安全性評価研究会「奈川フォーラム」、 “トランスポーターの生理機能と薬物動態”、奈川（長野県）、2001 年 9 月 1 日。
- 14) 崔 吉道, 玉井 郁巳, 辻 彰, 消化管トランスポーターの発現変動と薬物吸収制御への応用, 第 16 回日本薬物動態学会, 2001 年 10 月 17-19 日, 神戸.
- 15) 玉井 郁巳, 辻 彰, トランスポーター研究によるドラッグデリバリー戦略の新展開, 日本農芸化学会, 京都, 2001 年 3 月 24-27 日.

一般発表

- 1) Sai, Y., Nakanishi, T., Takaki, A., Koshida, M., Matsumura, N., Saitoh, Y., Tamai, I., Tsuji, A., Selective delivery of peptide anticancer drugs via oligopeptide transporter expressed in cancer cells, FIP 2000, April 16-20 (2000), San Francisco, USA.
- 2) 玉井郁巳, 崔 吉道, 辻 彰, ペプチドトランスポーターを利用した腫瘍への薬物デリバリー, 第 16 回日本 DDS 学会, 2000, 7, 秋田.
- 3) 加ヶ美徹, 豊福秀一, 崔 吉道, 玉井郁巳, 辻 彰, アデノウイルスベクターを用いたペプチドトランスポーター遺伝子導入による薬物の組織, 第 16 回日本薬物動態学会, 2001 年 10 月 17-19 日, 神戸.
- 4) 崔 吉道, 豊福秀一, 玉井郁巳, 辻 彰, トランスポーター発現アデノウイルスを用いたペプチド性薬物の体内動態制御, 第 17 回 DDS 学会, 2001 年 7 月 12-13 日, 大阪.
- 5) 橋谷 瞳, 崔 吉道, 玉井郁巳, 辻 彰, アデノウイルスベクターを利用した消化

管組織への外来遺伝子導入と機能発現, 第 120 年会日本薬学会, 2001 年 3 月 28-30 日, 札幌.

- 6) 豊福秀一, 氷見長夫, 崔 吉道, 玉井郁巳, 辻 彰, 肝ターゲッティングを目指したアデノウイルスベクターによるトランスポーター遺伝子発現, 第 120 年会日本薬学会, 2001 年 3 月 28-30 日, 札幌.
- 7) 豊福秀一, 氷見長夫, 崔 吉道, 玉井郁巳, 辻 彰, 臓器選択的ドラッグデリバリーを目指したアデノウイルスベクターによるトランスポーター遺伝子発現, 日本薬剤学会第 16 年会, 2001 年 3 月 22-24 日, 東京.
- 8) 崔 吉道, 橋谷 瞳, 玉井郁巳, 辻 彰, アデノウイルスベクターを利用した肝臓への有機アニオントランスポーターOAT1 の遺伝子導入と機能発現, 日本薬剤学会第 16 年会, 2001 年 3 月 22-24 日, 東京.
- 9) Sai, Y., Toyobuku, H., Hashitani, H., Tamai, I., and Tsuji, A., Heterologous expression of renal organic anion transporter OAT1 and intestinal oligopeptide transporter PEPT1 by adenovirus-transduction, Pharma Conference 01, Switzerland, August 5-9, 2001.

著 書

- 1) 玉井郁巳、小泉昭夫、辻 彰、薬物作用に関係したトランスポーター、薬物動態・作用と遺伝子多型、澤田康文等 編、医薬ジャーナル社、東京（2001）。
- 2) A. Tsuji, Transporter-mediated drug delivery and targeting: What are opportunities?, Control and diseases of sodium-dependent transport proteins and ion channels. T. Suketa, E. Carafoli, M. Lazdunski, K. Mikshiba, Y. Okada, E.M. Wright, eds. Excerpta Medica, International Congress Series 1208, Elsevier, Amsterdam, 307-310 (2000).
- 3) A. Tsuji, Specific mechanisms for transporting drugs into brain. The blood-brain barrier and drug delivery to the CNS. D.J. Begley, M.W. Bradbary, J. Kreuter eds., Marcel Dekker, Inc., New York, 121-144 (2000).
- 4) 辻 彰、トランスポーターと吸収・分布・排泄、薬物代謝学、加藤隆一、鎌滝哲也編、東京化学同人、東京、111-120 (2000).
- 5) 辻 彰、生体膜透過、総合薬剤学、杉山雄一、山本恵司編、南山堂、東京、3-23 (2000).