

トランスポーターの *In Vivo* ヘテロ発現による薬物体内動態の能動制御

崔 吉道

Active Drug Delivery by Heterologous Expression of Membrane Transporters

Yoshimichi SAI

Innovative Pharmaceutics, Graduate School of Natural Science & Technology, Kanazawa University, 13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-0934, Japan

(Received March 13, 2003)

The oligopeptide transporter PEPT1 is predominantly expressed in the brush-border membranes of small intestinal epithelial cells, where it plays pivotal roles in the efficient absorption of di-/tripeptides. PEPT1 has enormous potential as an oral drug delivery target, because it also mediates the intestinal absorption of peptide-mimetic and nonpeptide substrates. We demonstrated that the peptide derivation of amino acid-related drugs is applicable to improve their intestinal absorption. We have found that oligopeptide transport activity is also expressed in cancer cell lines. The tissue distribution of bestatin was significantly increased in solid tumors that overexpress PEPT1 in nude mice. Orally administered bestatin strongly suppressed tumor growth. These results provided the first demonstration of the tumor-selective delivery of a drug by specific transport activity. The absolute degree of PEPT1 mRNA expression in the small intestine was determined using real-time PCR in rats. Starvation of the animals increased the mRNA expression level profoundly in the upper small intestine. The longitudinal expression pattern was well correlated with the intestinal transport of cefadroxil in rats. We constructed a recombinant adenovirus vector encoding PEPT1 cDNA. Heterologous expression of PEPT1 in the liver was successfully achieved by simple intravenous administration of the vector, resulting in increased liver distribution of [³H] carnosine. *In situ* perfusion of the brain with the vector doubled the brain distribution of cefadroxil. Heterologous expression of the drug transporter *in vivo* could be a useful approach for drug delivery.

Key words—membrane transport; oligopeptide; small intestine; adenovirus vector; quantitative-PCR; heterologous expression

1. はじめに

体循環を介してネットワークを構築する生体の各臓器は、栄養物等生体に必要なものを積極的に取り込み利用する一方で、代謝物や薬物等の異物を代謝・解毒し細胞外へと排出する。細胞膜上に発現するトランスポーター群は、これら生体膜輸送過程に対して、その多様な分子認識・輸送機構と発現分布によって重要な役割を担っている。このような生理機能の詳細を明らかにし制御することができれば、薬物の薬効を最大限に発揮させ、毒性を最小限にする道が開かれる。著者の所属する研究室では、これ

まで消化管や肝臓、腎臓、血液脳関門等各組織細胞の生体膜輸送に着目し、これを利用した組織選択性の高い理想的な薬物送達システムの開発を目指した基礎研究を積み重ねてきた。¹⁾ 本稿では、1994年以降に著者が行ってきた研究について概説すると共に、トランスポーターを利用した薬物体内動態制御に関する最近の試みについて紹介したい。

2. 小腸オリゴペプチドトランスポーター PEPT1 の cDNA クローニングと免疫組織化学的解析

著者の所属する研究室ではβ-ラクタム抗生物質の消化管吸収機構に関する研究が1970年代後半から始められ、主に小腸組織や細胞膜小胞などを用いた膜生理学的な実験手法による機能特性の解析から、β-ラクタム抗生物質の消化管吸収機構に有機アニオンやペプチド構造を認識する輸送担体タンパク質が関与することを主張してきた。しかし、当時消化

金沢大学大学院自然科学研究科・創剤科学研究室 (〒920-0934 金沢市宝町13-1)

e-mail: sai@kenroku.kanazawa-u.ac.jp

*本総説は、平成14年度日本薬学会北陸支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

管吸収においてはトランスポーターという概念が受け入れられてはいなかった。¹⁾ 著者はそれまで細胞生物学や生化学を専門としていたが、1994年からこの領域に本格的に参加し始めた。くしくもその年の4月にはオリゴペプチドトランスポーターの分子実体としてPEPT1のcDNAがFeiらにより世界で始めてウサギよりクローニングされNature誌に掲載された。²⁾ この報告は、薬物の消化管吸収に関与するトランスポーターについて分子レベルでの理解が急速に深まるきっかけとなった。著者らは、早速 *in vivo* 消化管吸収実験が容易なラットよりPEPT1のオルソログcDNAを単離し、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた *in vitro* 遺伝子発現系を用いて、その輸送特性の詳細を消化管のそれと比較検討した結果、rat PEPT1を用いた検討でもジトリペプチドに対する基質特異性やpH依存性等が確認された。³⁻⁵⁾ 興味深いことに β -ラクタム抗生物質の中でも消化管吸収が良好で経口剤として用いられるセファドロキシルやセファレキシン、セフラジン、セフチブテン、セフェキシム等がPEPT1の良好な基質となるのに対して、消化管吸収が悪く注射剤として用いられるセファゾリンやトランス-セフチブテンはPEPT1の基質とならず、消化管吸収特性と極めて良い一致が見られた。^{4,5)} さらにPEPT1の消化管吸収に対する寄与の程度を明確にするために、PEPT1 cDNAの翻訳開始部位付近に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製し、小腸の全mRNAを用いて検出される輸送活性に対する効果を検討した結果、セフチブテンやセファドロキシル等の輸送はアンチセンスオリゴヌクレオチドにより特異的かつほぼ完全に消失した。⁴⁻⁶⁾ 一方で著者は、PEPT1に対するポリクローナル抗体を調製し、シヨ糖密度勾配により分画した膜画分のウエスタンブロット解析と光学及び電子顕微鏡レベルでの免疫組織染色により小腸における局在性について検討を行い、PEPT1タンパク質が小腸吸収上皮細胞の刷子縁膜に限局して発現することを明らかにした。⁶⁾ これらの結果から、PEPT1は小腸上皮細胞の刷子縁膜において、種々 β -ラクタム抗生物質の消化管吸収を担う主要なトランスポーターであることを明らかにすることができた。³⁻⁶⁾ 近年PEPT1は、ペプチド類似構造を持つ β -ラクタム抗生物質やACE阻害薬、抗がん薬のベスタチン以外にも、ペプチド

構造を持たない抗ウイルス薬バラシクロビル⁷⁾や、4-アミノフェニル酢酸、⁸⁾ δ -アミノレブリン酸⁹⁾などの化合物をも輸送することが明らかにされ、さらに ω -アミノ基を持ち鎖長の異なるモデル脂肪酸を用いた研究からアミノ基とカルボキシル基とが4CH₂ユニット分の距離を持つ配置が基質としての最低基本構造であることも示唆されている。¹⁰⁾ このような広い基質認識性を持つトランスポーターを今後新たなドラッグデザインに利用することは有効であろう。

3. 薬物のペプチド誘導化による経口デリバリーへの応用

1998年に著者らは、パーキンソン病治療薬として用いられるL-DOPAに着目し、消化管に発現するPEPT1を利用した応用研究に着手した。L-DOPAはアミノ酸輸送系を介して吸収されると考えられているが、そのバイオアベイラビリティは低く、また脱炭酸代謝により生じるドパミンは血液脳関門を透過できない。そこで、L-DOPAの吸収改善を目的として、L-DOPAのカルボキシル基をペプチド結合により保護するとともに、より吸収効率の高いPEPT1の基質へと誘導化することを試みた。¹¹⁾ 小腸モデル培養細胞のCaco-2を用いて、L-DOPA及びそのフェニルアラニルペプチド誘導体(L-DOPA-L-Phe)の経細胞輸送を2時間に渡って測定したところ、L-DOPAの刷子縁膜から側底膜方向への透過は全く検出されず投与量のわずか0.3%がドパミンとして検出されるのみであった(Fig. 1)。それに対してL-DOPA-L-Pheについてはペプチド結合の加水分解は受けるものの2時間までに投与量の約2%のL-DOPAが側底膜側に出現し、ドパミンと併せると約13%にまで透過性を改善することができた。¹¹⁾ 同様の実験をジペプチドであるグリシルサルコシン(10 mM)共存下で行ったところ、L-DOPA-L-Pheの透過は特異的かつ顕著に阻害されたことからL-DOPA-L-Pheがペプチドとしての認識を受けていることが確認され、L-DOPAのペプチド誘導化が有効であることを示すことができた。¹¹⁾ これらの結果は、薬物のバイオアベイラビリティの改善を図るために消化管に発現するトランスポーターの基質認識特性の情報を利用することが有効であり、薬物の化学構造を一部改変することにより、トランスポーターを介してバイオアベイラビ

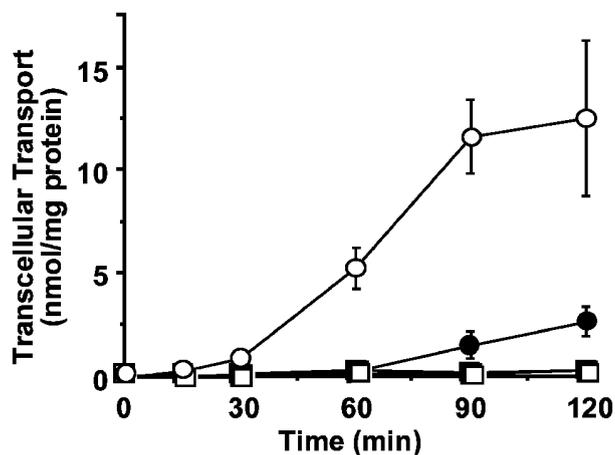


Fig. 1. Time Course of Transcellular Transport of L-DOPA and L-DOPA-L-Phe across the Monolayers of Caco-2 Cells

Caco-2 cells were preincubated at 37°C for 30 min with Hanks' balanced salt solution. The permeated amount of L-DOPA (square) and L-DOPA-L-Phe (circle) were measured as the sum of L-DOPA and dopamine at 37°C by adding a solution containing a test compound at 200 μ M on the apical side at pH 5.5 with (closed) or without (open) 10 mM GlySar. The pH of basolateral side was 7.4. Each point represents the mean \pm SEM of three determinations.

リティーを改善することが可能であることを示すものである。

4. がん細胞に誘導されるペプチドトランスポーターを分子標的とした抗がん薬デリバリー

1997年に著者らは、正常組織では小腸及び腎臓にのみ発現するペプチドトランスポーターが、いくつかのヒト由来がん細胞株にも発現しジペプチド構造を持つ抗がん薬ベスタチンを認識することを見出した。^{12,13} この発見により著者らは、正常組織での発現が限局し、がん細胞にも発現するペプチドトランスポーターが、がん特異的な薬物送達のための分子標的として応用できるのではないかという着想に至った。このことを実証するために著者らは、まず HeLa 細胞を用いて PEPT1 安定発現株を樹立した。PEPT1 を高発現する細胞株はベスタチン取り込み活性が高く、またベスタチン感受性も亢進しベスタチン存在下での細胞増殖が顕著に抑制された。¹² ベスタチンの抗がん作用のメカニズムは従来から免疫賦活作用であると考えられてきたが、最近では *in vitro* でグリオーマのアポトーシスをするという報告もあり実際には不明な点が多い。したがってペプチドトランスポーターの過剰発現によって細胞レベルでのベスタチン感受性が上昇するという結果は大変興味深いものである。HeLa 細胞は造腫瘍性を有

し、ヌードマウスの皮下に移植すると腫瘍を形成することから、この担がんマウスを用いてベスタチンの腫瘍移行性を *in vivo* で検討した (Fig. 2)。その結果、ベスタチンは PEPT1 を高発現する腫瘍に集積するのみならず、ベスタチンの経口投与によって腫瘍の増殖は顕著に抑制されることが示された。¹³ ヒト繊維芽肉腫由来株化細胞である HT-1080 も造腫瘍性を持ち、かつ内因性のペプチド取り込み活性を持つことから同様の検討を行ったが、この場合は、PEPT1 を強制発現した HeLa 細胞ほど顕著な腫瘍増殖抑制効果は見られなかった。その原因としては、HT-1080 細胞のベスタチン感受性があまり高くないことや、HT-1080 細胞のペプチド輸送活性が不十分であったことなどが考えられる。現在著者らは、mRNA 発現レベルとペプチド輸送活性との間の定量的な関係を明らかにすることによって、mRNA 発現レベルから細胞及び組織で見られる輸送活性を予測する試みを進めている。この研究によって *in vivo* において薬物送達のために十分な輸送活性を発揮するために必要な mRNA 発現レベルが明らかになることが期待できる。一方で、様々ながん細胞を用いてペプチドトランスポーターがどのような種類のがん細胞に発現するのか定量的かつ網羅的な解析も進めており、がん細胞で誘導されるトランスポーターを分子標的とした抗がん薬の特異的な送達への応用を検討している。

5. 消化管ペプチドトランスポーターの生理条件下における発現変動と薬物吸収変動

消化管に発現するいくつかのトランスポーターについては、その mRNA レベルやタンパク質レベルで部位差が認められることが知られている。しかしその発現レベルが生理条件などによりどの程度変動するのかの検討は十分になされてはいない。そこで著者らは、摂食及び絶食条件下で飼育したラットより小腸を摘出し、長軸方向に 8 等分した各セグメントより RNA を調製し、トランスポーター発現レベルをリアルタイム定量 PCR 法により検討を行った。¹⁴ その結果、PEPT1 の発現レベルは小腸上部で低く、下部に向かって上昇する傾向が見られ、これまでの報告と一致する結果を得ることができた。さらにその発現レベルを定量的に解析した結果、小腸上部と下部とでその差は約 3 倍 (セグメント 1 : 2.0×10^8 copy/segment, セグメント 8 : 6.6×10^8

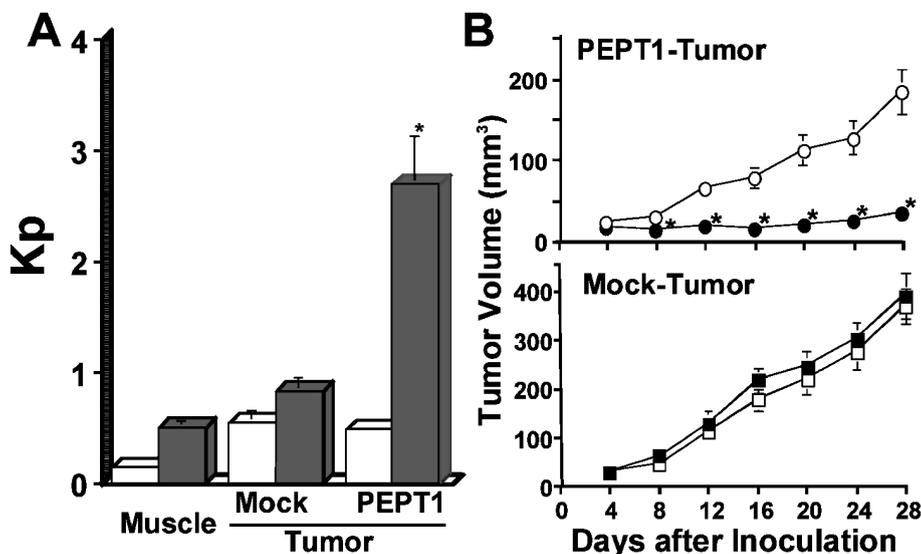


Fig. 2. Tissue-to-Plasma Concentration Ratio (Kp) of Bestatin after i.v. Administration to Mice Bearing HeLa Cell Derived Tumors and the Inhibitory Effect of Orally Administered Bestatin on the Tumor Growth

A: Bestatin (20 mg/kg, closed column) and [¹⁴C] inulin (18.5 MBq/mouse, open column) were administered intravenously to Balb/c nu/nu mice bearing HeLa or PEPT1-transfected HeLa tumors. At 30 min after administration of each compound, plasma and tissue samples were taken, and the concentrations of compounds were determined by HPLC or by its radioactivity. Each value represents the mean \pm SEM of six determinations. *Significantly different ($p < 0.05$) from inulin administration. B: Saline (open symbols) or bestatin (closed symbols) were orally administered at volume of 100 μ l/10 g b.w. for 28 days consecutively to the tumor inoculated mice. Tumor volume was measured every four days. Each value represents the mean \pm SEM of seven animals. *Significantly different ($p < 0.05$) from saline administration.

copy/segment) があることが分かった。さらに PEPT1 mRNA の発現レベルは、絶食により空腸部 (セグメント 2—4) で約 2.5 倍に増加することが明らかとなった。同様に管理されたラットを用いて、小腸のセグメント 1, 4, 8 に対応する組織 (十二指腸, 空腸及び回腸) を用いて PEPT1 の基質であるセファドロキシルを基質として用いて、その吸収の消化管部位差を *in situ* closed loop 法により検討した。その結果、摂食ラットにおけるセファドロキシルの 20 分後のループ内からの消失率は、それぞれ十二指腸 71.2%, 空腸 85.6% 及び回腸 39.9% と部位差が見られた。回腸でセファドロキシル吸収が低いことは PEPT1 mRNA の発現量の部位差と一見矛盾する結果であったが、この際ループ内 pH を実測したところ十二指腸 pH 6.5, 空腸 pH 6.3 及び回腸 pH 7.9 と回腸においてループ内 pH のアルカリ性が起こっていた。そこで、粘膜側 pH を固定するために Ussing chamber 法を用いて粘膜 pH 6.0 の同一条件下で小腸各部位におけるセファドロキシルの膜透過速度を測定した。その結果、吸収方向の見かけの膜透過速度は摂食ラットでは十二指腸 3.27×10^{-6} cm/sec, 空腸 4.97×10^{-6} cm/sec, 回腸 8.17×10^{-6} cm/sec であった。同様に絶食ラットでは十

十二指腸 4.99×10^{-6} cm/sec, 空腸 9.23×10^{-6} cm/sec, 回腸 7.49×10^{-6} cm/sec であった。空腸での絶食時の膜透過速度が摂食時に比べ約 1.8 倍に増大したことは、PEPT1 mRNA 発現量の上昇とよく一致した。そこで、小腸の各セグメント当たりの PEPT1 mRNA 発現量とセファドロキシルの吸収方向の見かけの膜透過速度との比較を検討したところ、 $r^2 = 0.859$ と良好な相関が得られた (Fig. 3)。これらの結果から、ラットにおいて消化管の部位の違いや栄養条件の変化により PEPT1 の発現が変動し、それに伴って輸送機能も変動することが実験的に裏付けられた。¹⁴⁾

6. 栄養条件や種々薬物による消化管トランスポーターの発現変動

薬物併用や食事成分により薬物の吸収性が変動することは、特に治療域の狭い薬物では薬物相互作用として临床上問題となる。近年、薬物や食事の影響によりトランスポーターの発現レベルが変動する例も報告されている。例えば健康人へのリファンピシンの経口投与により小腸 MDR1 の発現が誘導され、経口投与されたジゴキシンの血中濃度が減少すること¹⁵⁾や、同じくリファンピシン投与により十二指腸の MRP2 発現が上昇すること、¹⁶⁾ ラットの食

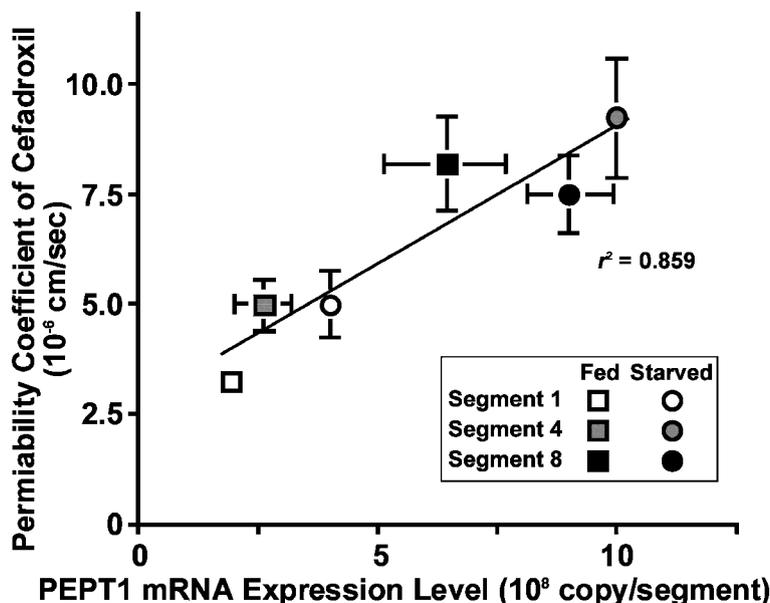


Fig. 3. Correlation between PEPT1 mRNA Expression Level and Permeability Coefficient of Cefadroxil in Intestinal Tissues of Fed and Starved Rats

The small intestine of anesthetized rats were excised and divided into eight segments of the same length, numbered as 1 (proximal) to 8 (distal). Total RNA was extracted and quantitative RT-PCR using a specific primer set was performed. Each value represents mean \pm SEM of three rats. The time course of cefadroxil (1 mM) transport was evaluated with the Ussing chamber. The experimental solution was adjusted to pH 6.0 and 7.4 on the mucosal and serosal sides, respectively. Each value represents mean \pm SEM of 4–9 determinations.

餌に特定のアミノ酸やジペプチドを添加すると PEPT1 の発現が誘導され小腸刷子縁膜小胞へのグリシルサルコシン取り込みの上昇がみられること¹⁷⁾などの報告がなされている。しかしその他の薬物併用や栄養条件の変化によりトランスポーターの発現レベルが変動するか否かについてはこれまでほとんど明らかにされていない。そこで消化管における薬物吸収に重要な PEPT1, MDR1, MRP2, MRP3 に着目して、その発現レベルの変動をより多くの条件下で検討するために、小腸モデルとして単層培養により分化誘導した Caco-2 細胞を用いて検討を行った。¹⁸⁾

培養細胞の増殖・維持に重要な血清、主要なエネルギー源として利用されるグルコースやグルタミンの枯渇、その他の栄養成分としてアミノ酸(リジン)やジペプチド(グリシルグルタミン)、ビタミン(アスコルビン酸)、フラボノイド(クエルセチン)、さらには薬物として all-trans- レチノイン酸、リファンピシン、パクリタキセルやプロゲステロンなどを用いて検討した。その結果、グルコースの枯渇によって、MDR1 の発現が約 10 倍に増加したほか、PEPT1 や MRP2, MRP3 でも若干の発現誘導が見

られた。クエルセチン添加によっては PEPT1 の発現が約 2 倍に上昇し、all-trans- レチノイン酸によっては MDR1 が顕著に誘導された。しかしリファンピシンやパクリタキセルは *in vivo* において転写因子である PXR を介して肝臓や小腸の MDR1 や CYP3A4 を協調的に誘導することが知られているが、PXR を発現していない Caco-2 細胞を用いた実験ではこれら薬物による MDR1 や CYP3A4 の発現誘導は見られなかった。Caco-2 細胞は薬物の消化管吸収を評価する細胞モデルとして繁用されているが、PXR を介する遺伝子発現誘導を目的とする実験系としては適切でないことが明らかとなった。PXR を介した MDR1 や CYP3A4 の発現誘導試験には Caco-2 と同じく大腸がん由来細胞である LS-180 細胞が有用であり、著者らは最近 LS-180 を用いてアミオダロンやミダゾラム、ニトレンジピンなどの P-糖タンパク質の基質も MDR1 及び CYP3A4 を誘導することを見出した。¹⁸⁾ 薬物の吸収に関わるトランスポーターの発現変動は薬物動態を解析する上で重要な情報を提供するので、*in vivo* において併用される薬物によって引き起こされる遺伝子発現変動を的確に反映する *in vitro* 実験系が必

要であり、今後もより多くの薬物についても検討を行っていく必要がある。

7. トランスポーターのヘテロ発現による薬物デリバリー

前述のように発現を誘導する薬物を併用し外的にトランスポーター発現レベルを制御することで、薬物の消化管吸収や組織分布を改善できる可能性は十分考えられる。一方で著者らは、トランスポーターの発現を積極的に制御することによる能動的な新しい薬物動態制御法の樹立を目指した研究に着手した。¹⁹⁾ その基本戦略は、分子標的として適当なトランスポーターの発現していない臓器に対して、薬物に対する基質認識性の高い PEPT1 や OAT, OCT, OATP などのトランスポーター遺伝子を *in vivo* で一過性に強制発現させることにより新たな輸送機能を付与し、基質となる薬物の体内動態を積極的に制御することにある。本稿では最後にその一部を紹介したい。

著者らは遺伝子発現のためのベクターとして非増殖性組換えアデノウイルスベクターに着目した。アデノウイルスベクターは休止期や分裂速度の遅い細胞へも遺伝子を導入することができ、脳や肺、冠状動脈、骨格筋、皮膚、網膜、心臓、肝臓、腎臓、腹膜、骨髄等幅広い細胞への高い遺伝子導入効率や *in vivo* 遺伝子導入が容易であることから、 α -1 アンチトリプシン欠損症や嚢胞性線維症などの遺伝子治療に用いられた。Phase I 治験によってベクター自身の細胞毒性や免疫反応などの課題も明らかにされているが、それを克服したより安全で効率の高いベクターの開発が多くの研究者により進められている。アデノウイルスベクターによる導入遺伝子の発現は一般に遺伝子導入後 2—4 日で最高に達するが、導入遺伝子は通常宿主細胞の染色体外に存在するため宿主細胞の分裂に伴いコピー数を減少し、*in vivo* で約 4 週間の一過性の発現を示す。著者らはこのベクターを用いて、ペプチド性及び非ペプチド性の様々な薬物を基質とする PEPT1 を蛍光タンパク質でキメラ化標識し、相同組換え受容性の大腸菌株と 293 細胞を用いて PEPT1 発現アデノウイルス (AdhPEPT1-EYFP) を作成した。²⁰⁾ 同様に陰性対照として蛍光タンパク質 GFP のみを発現するコントロールウイルス (AdGFP) も作製した。アデノウイルスベクターにより誘導されたトランスポー

ターの *in vitro* での薬物輸送活性を評価するため、multiwell dish 上に培養した HeLa 細胞や HepG2 細胞にウイルスを感染させ、 $[^3\text{H}]$ グリシルサルコシンや $[^3\text{H}]$ カルノシンの細胞内取り込みを測定した。その結果、AdhPEPT1-EYFP 感染細胞においては AdGFP 感染細胞や非感染細胞と比べて顕著な取り込み活性が誘導された。誘導されたペプチド輸送活性は基質親和性や pH 感受性等従来の方法で測定される PEPT1 の輸送特性を保持していた。そこで、本ベクターを用いて PEPT1 活性を *in vivo* でも誘導できるかマウスを用いて検討した。²⁰⁾ 一匹当たり 1×10^9 あるいは 1×10^{10} PFU (Plaque-Forming Unit) の AdhPEPT1-EYFP を投与したマウスにおける PEPT1-EYFP の発現を RT-PCR 及びウエスタンブロットにより検討したところ、いずれの検出方法によっても肝臓においてウイルス投与量に依存した顕著な PEPT1-EYFP 発現が確認された。さらに AdhPEPT1-EYFP に感染したマウスの肝臓より凍結切片を作成し、PEPT1-EYFP タンパク質の細胞内局在性を EYFP 蛍光により検討したところ、その大部分が細胞膜上に発現することが確認され、細胞当りの発現量が多い一部の細胞では細胞内にも PEPT1-EYFP の発現が認められた。肝実質細胞の胆管側膜に局在する P-糖タンパク質に対する抗体を用いて 2 重染色を行ったところ、PEPT1-EYFP と局在が一致していたのは一部分のみであることから PEPT1 の大部分は類洞側細胞膜に発現していると考えられ、発現した PEPT1-EYFP は、薬物の血中から肝組織への移行に働き得ることが期待された。そこで、マウスに $[^3\text{H}]$ カルノシンを静脈内投与し、30 分後の各組織への移行性を評価した (Fig. 4)。AdGFP 感染マウス及び非感染マウスの $[^3\text{H}]$ カルノシンの組織中対血中濃度比 Kp 値は、肝臓では約 1 であるのに対して腎臓では 10 以上と高く、腎臓に内因的に発現する PEPT2 によるものであると考えられた。ところが、AdhPEPT1-EYFP 感染マウスの肝臓における Kp 値は約 7 と著しく増大した。このとき腎臓の Kp 値に変化は見られなかった。一方いずれのマウスでも細胞間液マーカーの $[^{14}\text{C}]$ イヌリンの組織移行性にはほとんど変化はなく、ウイルス感染によるダメージは無視できると考えられた。以上の結果から PEPT1 を発現するアデノウイルスベクターを静脈内投与すること

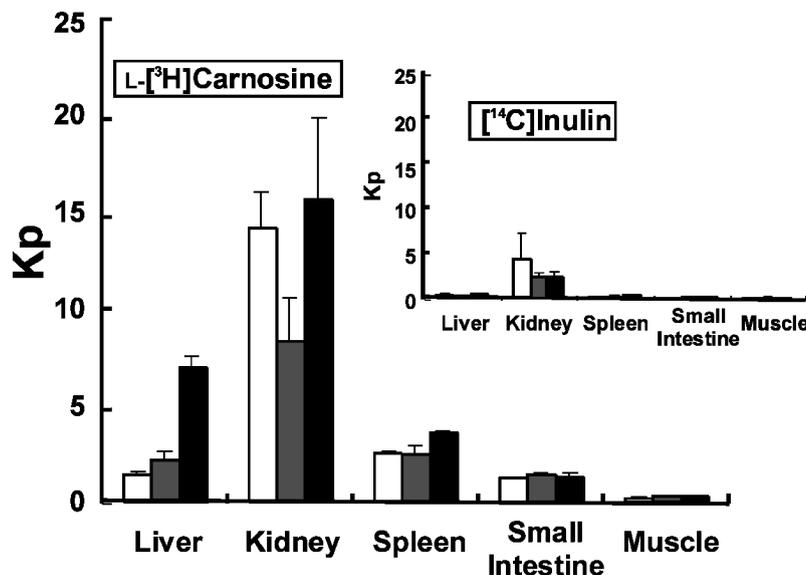


Fig. 4. Kp Values of L- ^3H Carnosine and ^{14}C Inulin in Various Organs of Mice

Mice were transduced without (open column) or with AdhPEPT1-EYFP (closed column) and AdGFP (gray column). Kp values were obtained 30 min after intravenous administration of these compounds in mice. Each value represents mean \pm SEM of three mice.

により肝臓にペプチド性薬物を効率よく送達できることが *in vivo* で示された。²⁰⁾

ペプチドは中枢において多用な薬理活性を示し、様々な中枢性疾患に対する治療薬としての可能性を有している。しかし、ペプチド性薬物の脳移行性は血液脳関門により制限されている。これは血液脳関門は物質の移行を制限し排出すると共に必要な栄養物を積極的に取り込むダイナミックインターフェースとして働いているが、ペプチド性化合物に対する透過性は極めて低く制限しているためである。そこで著者らは、血液脳関門を形成する毛細血管内皮細胞に PEPT1 を外来遺伝子として発現させることによって、ペプチド性薬物の脳移行性を改善することを試みた。²¹⁾ まず血液脳関門の *in vitro* モデルとして、著者らが樹立したラット脳毛細血管内皮株化細胞 (RBEC1) を用いて AdhPEPT1-EYFP の感染を確認した。その結果、RT-PCR による mRNA 発現は確認できたものの、タンパク質レベルでの発現が極めて低いことから、*in vivo* での十分な機能発現には更なる発現レベルの向上が必要と考えられた。そこで、感染補助剤として種々カチオン性高分子やシクロデキストリンなどを検討した結果、Poly-L-lysine をアデノウイルス粒子当り 1000—3000 分子の割合で添加した際に最も高い PEPT1 の発現が見られた。そこで *in vivo* 実験を Takasato らの方法²²⁾

に従い、ラットの頸動脈カニューレーションにより AdhPEPT1-EYFP ウイルスの感染を行った。その結果、 3.2×10^9 PFU のウイルスを投与したラット脳において、RT-PCR 及び凍結切片の蛍光顕微鏡観察により PEPT1-EYFP の発現が確認された。実際に薬物の脳移行性が改善するかを検討する目的で、血中や脳組織中での代謝がほとんどなく PEPT1 の良好な基質となるセファドロキシルをモデル化合物として静脈内投与 30 分後の Kp を測定した (Fig. 5)。その結果、血管容積を示す ^{14}C イヌリンの Kp 値には変化が見られなかったのに対し、セファドロキシルの脳における Kp 値は AdhPEPT1-EYFP を感染したラットでは非感染及び AdGFP を感染したラットと比較して約 2 倍に上昇した。このことから、血液脳関門への PEPT1 遺伝子の導入が、PEPT1 の基質となる薬物の脳送達に応用できる可能性が示された。²¹⁾

抗 HIV 薬として開発が進められていたアデフォビル (9-(2-phosphonomethoxyethyl) adenine) は腎近位尿細管上皮細胞の側底膜に発現する有機アニオントランスポーター OAT1 の基質となることから腎毒性が問題となり開発が断念された。一方でアデフォビルは *in vitro* で B 型肝炎ウイルスに対してより強力な活性を持つことから、アジアロ糖タンパク質受容体に親和性を有する物質をキャリアーとして

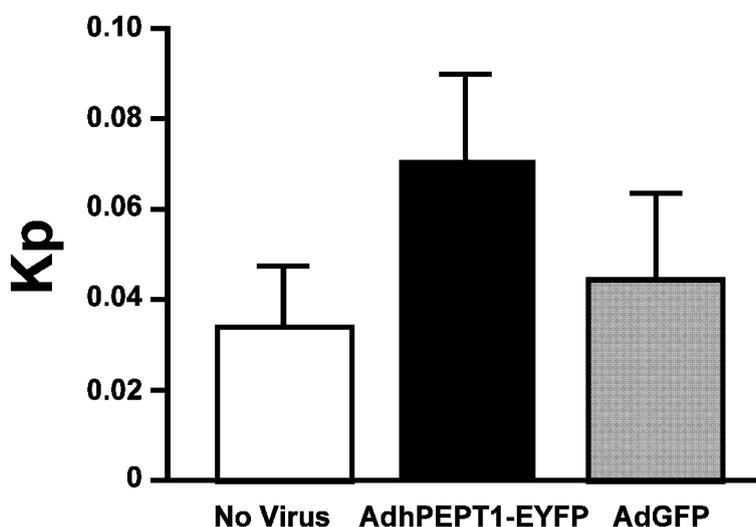


Fig. 5. Kp Values of Cefadroxil in Rat Brain

Rats were transduced without (open column) or with AdhPEPT1-EYFP (closed column) and AdGFP (gray column). Kp values were obtained 30 min after intravenous administration of cefadroxil in rats. Each value represents mean ± SEM of 3–5 rats.

レセプター介在エンドサイトーシスを利用した肝ターゲティングが試みられている。²³⁾しかし細胞膜上に発現するトランスポーターを利用すれば、従来法における問題すなわち主薬のキャリアーからの放出さらにエンドソームから細胞質への放出などの問題が解決できる。そこで著者らは腎臓に局限して発現する OAT1 を肝臓にも発現させることによりアデフォビルを効率よく肝臓に送達できるかを検討した。OAT1 を発現するアデノウイルスベクター Ad-OAT1 を作成し、HepG2 細胞を用いてまず *in vitro* で [³H] アデフォビルの輸送活性を確認した。次にマウスに AdOAT1 を静脈内投与し、OAT1 の肝臓への発現を C 末端ペプチドをウサギに免疫して得た抗 OAT1 抗体を用いたウエスタンブロット及び免疫組織染色により確認した。 [³H] アデフォビルを静脈内投与し、1 時間後の Kp 値により肝臓への分布を検討したところ、正常及び AdGFP 感染マウスと比べ、 [³H] アデフォビルの Kp 値は肝臓で約 13 倍増加した (投稿準備中)。

これらの結果から、肝臓や血液脳関門など薬物の標的臓器に PEPT1 や OAT1 などの様々な薬物輸送性のトランスポーターを外来遺伝子として発現させることにより、標的臓器に対して能動的な薬物送達が可能であることを、動物実験レベルで実証することができた (Fig. 6)。今後はより安全性の高いベクターを用いても同様の効果が得られるのか、発現

レベルや発現期間をいかに制御していくかなどの更なる検討が必要である。

8. おわりに

1990 年代に入ってその分子の実態の解明が急速に進められたトランスポーターは、今や約 500 分子種からなる遺伝子ファミリーとして整理されるに至った。これら多様なトランスポーター群は生体の各組織・細胞レベルで活発に行われている取り込み及び排出輸送の分子メカニズムとしての機能を持つ一方で、本稿では紙面の都合上紹介できなかったが解毒やエネルギー代謝、さらには細胞内情報伝達の分子スイッチへと物質を受け渡すゲートウェイとしての働きをも担っていることが次第に明らかにされつつある。これまで cDNA クローンの *in vitro* 発現系を用いた機能解析が活発に行われることによって、その基質認識特性の詳細が明らかになり、薬物の分子設計に重要な知見を与えてきた。今後は、これらトランスポーターを薬物体内動態の制御因子としてのみならず、新たな薬物療法のための分子標的として様々な角度から研究を展開していく必要がある。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、辻彰教授はじめ創剤科学研究室員及び卒業生、修了生の皆様の御助言・御助力を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。また、研究費の一部は文部科学省科学研

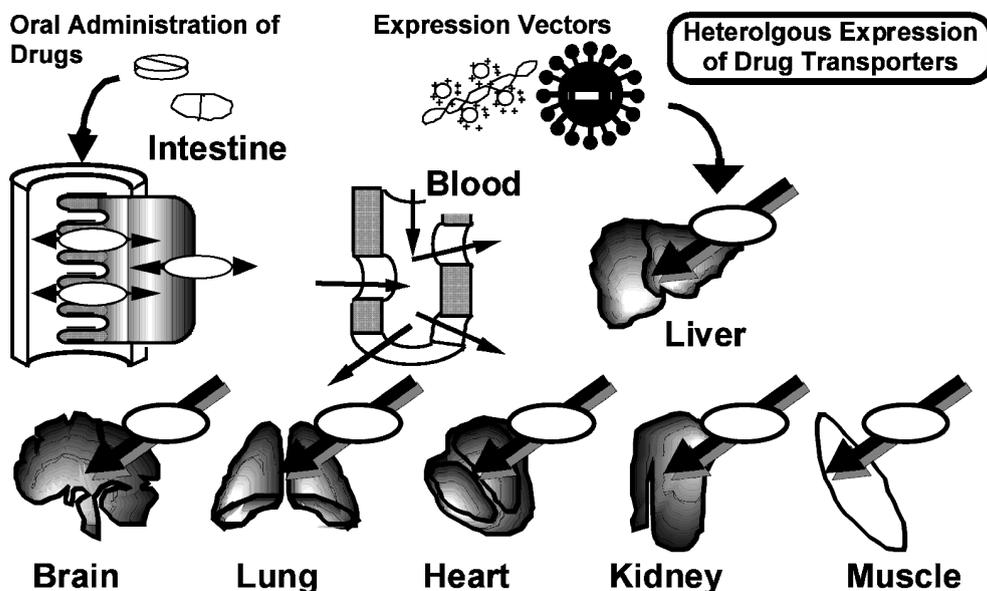


Fig. 6. Active Delivery of Drugs by Heterologous Expression of Membrane Transporters in Various Organs

究費補助金と上原記念生命科学財団研究奨励金，武田科学振興財団薬学系研究奨励金，金沢大学重点化経費若手教官の萌芽的研究によるものであり，ここに謝意を表します。

REFERENCES

- 1) Tsuji A., *Yakugaku Zasshi*, **122**, 1037–1058 (2002).
- 2) Fei Y. J., Kanai Y., Nussberger S., Ganapathy V., Leibach F. H., Romero M. F., Singh S. K., Boron W. F., Hediger M. A., *Nature*, **368**, 563–566 (1994).
- 3) Miyamoto K., Shiraga T., Morita K., Yamamoto H., Haga H., Taketani Y., Tamai I., Sai Y., Tsuji A., Takeda E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1305**, 34–38 (1996).
- 4) Hayashi K., Sai Y., Tamai I., Higashida H., Shiraga T., Miyamoto K., Takeda E., Tsuji A., *Drug Delivery System*, **11**, 205–213 (1996).
- 5) Tamai I., Nakanishi T., Hayashi K., Terao T., Sai Y., Shiraga T., Miyamoto K., Takeda E., Higashida H., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 796–801 (1997).
- 6) Sai Y., Tamai I., Sumikawa H., Hayashi K., Nakanishi T., Amano O., Numata M., Iseki S., Tsuji A., *FEBS Lett.*, **392**, 25–29 (1996).
- 7) Balimane P. V., Tamai I., Guo A., Nakanishi T., Kitada H., Leibach F. H., Tsuji A., Sinko P. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**, 246–251 (1998).
- 8) Temple C. S., Stewart A. K., Meredith D., Lister N. A., Morgan K. M., Collier I. D., Vaughan-Jones R. D., Boyd C. A., Bailey P. D., Bronk J. R., *J. Biol. Chem.*, **273**, 20–22 (1998).
- 9) Doring F., Walter J., Will J., Focking M., Boll M., Amasheh S., Clauss W., Daniel H., *J. Clin. Invest.*, **101**, 2761–2767 (1998).
- 10) Doring F., Will J., Amasheh S., Clauss W., Ahlbrecht H., Daniel H., *J. Biol. Chem.*, **273**, 23211–23218 (1998).
- 11) Tamai I., Nakanishi T., Nakahara H., Sai Y., Ganapathy V., Leibach F. H., Tsuji A., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1542–1546 (1998).
- 12) Nakanishi T., Tamai I., Sai Y., Sasaki T., Tsuji A., *Cancer Res.*, **57**, 4118–4122 (1997).
- 13) Nakanishi T., Tamai I., Takaki A., Tsuji A., *Int. J. Cancer*, **88**, 274–280 (2000).
- 14) Naruhashi K., Sai Y., Tamai I., Suzuki N., Tsuji A., *Pharm. Res.*, **19**, 1417–1423 (2002).
- 15) Greiner B., Eichelbaum M., Fritz P., Kreichgauer H. P., von Richter O., Zundler J., Kroemer H. K., *J. Clin. Invest.*, **104**, 147–153 (1999).
- 16) Fromm M. F., Kauffmann H. M., Fritz P., Burk O., Kroemer H. K., Warzok R. W.,

- Eichelbaum M., Siegmund W., Schrenk D.,
Am. J. Pathol., **157**, 1575–1580 (2000).
- 17) Shiraga T., Miyamoto K., Tanaka H.,
Yamamoto H., Taketani Y., Morita K.,
Tamai I., Tsuji A., Takeda E., *Gastroenterol-*
ogy, **116**, 354–362 (1999).
- 18) Li Q., Sai Y., Kato Y., Tamai I., Tsuji A.,
Pharm. Res., **20**, (2003).
- 19) Sai Y., *Drug Delivery System*, **17**, 436–437
(2002).
- 20) Toyobuku H., Sai Y., Tamai I., Tsuji A., *J.*
Pharmacol. Exp. Ther., **301**, 812–819 (2002).
- 21) Toyobuku H., Sai Y., Kagami T., Tamai I.,
Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 40–
47 (2003).
- 22) Takasato Y., Rapoport S. I., Smith Q. R.,
Am. J. Physiol., **247**, H484–493 (1984).
- 23) Bijsterbosch M. K., Ying C., de Vrueh R. L.,
de Clercq E., Biessen E. A., Neyts J., van Ber-
kel T. J., *Mol. Pharmacol.*, **60**, 521–527
(2001).