

**Barriology を基盤とした難吸収性薬物の透過促進戦略**近藤昌夫,<sup>\*,a</sup> 藤井まき子,<sup>b</sup> 八木清仁,<sup>a</sup> 渡辺善照<sup>b</sup>**Barriology-based Strategy for Drug Absorption**Masuo KONDOH,<sup>\*,a</sup> Makiko FUJII,<sup>b</sup> Kiyohito YAGI,<sup>a</sup> and Yoshiteru WATANABE<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Bio-Functional Molecular Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan, and <sup>b</sup>Department of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Showa Pharmaceutical University, 3-3165 Higashi Tamagawagakuen, Machida City 194-8543, Japan

(Received August 31, 2006)

Passing of drugs across epithelial cell sheets and endothelial cell sheets is an obligatory step in the absorption of a drug. The passing routes of drugs are classified into transcellular and paracellular pathways. The transcellular route has been widely investigated and is used in clinical therapy. In contrast, drug delivery using the paracellular route has never been fully developed. Sodium caprate is the only absorption-enhancer of drugs that uses the paracellular route. Tight junctions (TJs) exist between adjacent cells in epithelial and endothelial cell sheets, and they play a role in sealing the cell sheets. Therefore, we must modulate the TJ barrier for drug delivery using paracellular route. In this review, we describe barriology, including very recent topics, and overview absorption-enhancers from the perspective of barriology.

**Key words**—barriology; tight junction; drug delivery

**1. はじめに**

今世紀初頭のヒトゲノム解読完了に端を発した創薬研究のパラダイムシフトにより、ゲノム情報に基づく創薬研究が誕生し、ゲノム創薬研究は構造生物学、薬理ゲノミクス及び生物情報科学などをも融合しつつ急速な発展を遂げている。ゲノム創薬科学の急速な進展に伴い医薬品標的分子選定は効率化し、さらにコンビナトリアルケミストリーやハイスループトスクリーニングにより医薬品候補化合物の絞り込みも迅速化の一途を辿っている。また、ペプチドや抗体医薬品の開発研究も加速しており、低分子有機合成化合物ばかりでなく、ペプチドや蛋白質などの高分子医薬品も医薬品候補化合物として創製されている。これらの化合物が薬効を発揮するためには、皮膚の上皮細胞層や各種粘膜の上皮細胞層を効率的に透過し体内に吸収される必要があり、これら細胞層の透過促進方法が多方面より研究開発されて

きている。しかしながら、多様化及び迅速化の一途を辿る医薬品候補化合物創製と比較すると、薬物吸収促進戦略の構築は立ち遅れているのが現状である。

本総説では、細胞間隙の細胞生物学 (Barriology) の視点から俯瞰した薬物吸収促進方法の可能性について、Barriology の現状を踏まえた上で考察したい。

**2. Barriology の現状**

多細胞生物は文字通り多くの細胞からなる生物であり、単細胞生物とは異なり細胞間基質や接着分子を介して細胞が集合することにより、組織、器官が構築され個体の恒常性が維持されている。多細胞生物では肝臓、腎臓、血管、内耳等の組織は固有の内部環境を有しており、この組織固有の内部環境は組織を覆う上皮細胞からなる細胞層における物質透過の制御によって維持されている。上皮細胞層における物質透過経路は transcellular route と paracellular route に大別される。Transcellular route ではトランスポーターなどの能動輸送系による物質輸送が行われ、本 route は組織固有の内部環境維持に積極的に関与しており、分子基盤に関する知見も多方面から集積している。一方、paracellular route は、物質輸送のような積極的な役割ではなく、物質移行を抑

<sup>a</sup>大阪大学大学院薬学研究科生体機能分子化学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6), <sup>b</sup>昭和薬科大学薬剤学研究室 (〒194-8543 町田市東玉川学園 3-3165)

\*e-mail: masuo@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S36 で発表したものを中心に記述したものである。

制するバリアーとして機能することにより組織内部環境のコンパートメント化という静的な役割を担っていると考えられていた。しかしながら、Barriologyの進展に伴い分子基盤に関する知見が徐々に蓄積し、paracellular routeは動的な分子機構を駆逐することにより積極的に物質の透過制御を行っていることが明らかになりつつある。そこでまず本項では、Barriologyの現状について概説する。

上皮細胞間には、adherence junction (AJ) や tight junction (TJ) と呼ばれる接着装置が存在している (Fig. 1)。AJ では cadherin が細胞間接着の主要分子として機能しており、cadherin は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な接着機構により隣接する細胞を接着させている。Cadherin は 80 種類以上の super family を形成しておりその発現には組織特異性が観察され、E-cadherin は上皮細胞、N-cadherin はニューロン、P-cadherin は胎盤などで発現している。<sup>1-3)</sup> しかしながら、AJ における細胞間の距離は 15—20 nm に保たれており、cadherin を発現させても細胞間隙におけるアミノ酸、蛋白質の移動を抑制することができない。一方、TJ では隣接する細胞間の距離がゼロに近づき物質の漏れが著しく抑制されており、上皮細胞層に発達している TJ が組織固有の内部環境を外部環境から隔離する障壁として機能していることが知られている。この TJ のバリアー機能を担う分子基盤の同定は 1990 年代に入りようやく進展する兆しがみえた。長年不明であった TJ 構成蛋白質の最初の発見は、1993 年に月田承一郎博士のグループによ

りなされ、分子量 65 kDa の 4 回膜貫通蛋白質 occludin が見出された。<sup>4)</sup> しかしながら、occludin 遺伝子をノックアウトしても TJ は維持されており、TJ 形成に関与する蛋白質は occludin 以外に存在していることが示唆されていた。<sup>5)</sup> また、この occludin 遺伝子ノックアウトの報告と相前後するように、TJ 構成蛋白質として新たな蛋白質 claudin が同定された。<sup>6)</sup>

Claudin は 23 kDa の 4 回膜貫通蛋白質で、TJ を持たないマウス繊維芽細胞 (L 細胞) に発現させると TJ が形成されたことから、TJ 構成における key molecule であることが証明された。Claudin は細胞膜上で線状に会合してストランドを形成し、隣接する細胞間で向かい合う 2 本のストランドが対合することにより TJ が形成されると考えられている。<sup>7)</sup> Claudin には 24 種類の family が報告されており、claudin ストランドの対合の際には family 間でホモ及びヘテロな結合を生じることが実験的に示されている。例えば、claudin-1 発現 L 細胞と claudin-3 発現 L 細胞間、claudin-2 発現 L 細胞と claudin-3 発現 L 細胞間には TJ が形成されるのに対して、claudin-1 発現 L 細胞と claudin-2 発現 L 細胞間には TJ ストランドが形成されない。<sup>8)</sup> また、MDCK II 細胞に claudin-11, -15 を発現させるとバリアー機能の上昇が観察されるのに対して、LLC-PK1 細胞ではバリアー機能は低下することから、claudin family は family の多様性を駆使して様々な性質を有する TJ バリアーを構築している可能性が示唆されている。<sup>9)</sup> さらに、個々の claudin family の機能についても知見が集積しつつある。Claudin の局在には組織特異性が認められ、claudin-1, -5 などでは広範な組織で発現が認められるのに対して、claudin-2 は肝臓や腎臓において高発現している。<sup>10)</sup> 興味深いことに、claudin のバリアー機能にも組織特異性が認められ、claudin-1 欠損マウスでは表皮のバリアー機能、claudin-5 欠損マウスでは血液脳関門のバリアー機能、claudin-11 欠損マウスでは血液精巣関門のバリアー機能がそれぞれ低下していた。<sup>11-13)</sup> 生体には多種多様な組織固有の内部環境が存在していることを考慮すると、claudin が 24 種類の family を構成していることの生理的意義は多様なコンパートメント形成にあるようにみえる。

さて、claudin 発見以前の上皮細胞層の物質透過

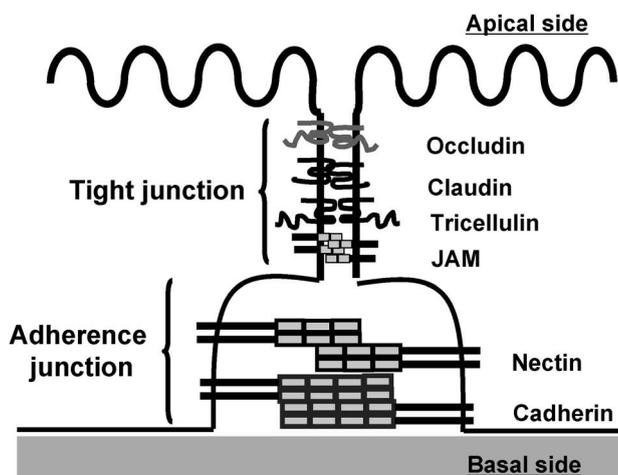


Fig. 1. Composition of Tight Junction and Adherence Junction

制御機構の解析は、隣り合う細胞間に存在する *bicellular junction* に関するものであった。上皮細胞層の構造を考えると、細胞間には隣接する2細胞間の他に3細胞の交点である *tricellular junction* が存在しており、この *tricellular junction* における物質透過制御は上皮細胞層による組織のコンパートメント化に必須である。2005年12月、この *tricellular junction* において物質の漏れを防ぐバリアー機能を担う分子として *tricellulin* が同定された。<sup>14)</sup> *Tricellulin* は、分子量約64 kDaの4回膜貫通蛋白質で、発現は *tricellular junction* に局在している。*Tricellulin* をRNA干渉によりノックダウンすると上皮細胞層のバリアー機能が低下したことから、*tricellulin* は *tricellular junction* における物質透過制御を通じて組織の内部環境維持に関与しているものと推察される。

この項で述べたように、*occludin*, *claudin*, *tricellulin* といった TJ を構成する蛋白質の同定が進み主要な役者は出揃った感がある。現在、*Barriology* の領域では、これらの TJ 構成因子の相互作用や機能調節機構の解明に研究がシフトしており、今後の進展が期待される。

### 3. 吸収促進剤と *Barriology*

いかなる投与経路においても、医薬品は表皮や各種粘膜の上皮細胞層（表皮細胞層）を透過することにより体循環に移行し、血管内皮細胞層を透過することにより標的部分に移行する。上皮細胞層及び内皮細胞層における物質透過は *transcellular route* と *paracellular route* に大別され、両経路を利用した薬物透過促進方法が多方面より研究されてきた (Fig. 2)。そこで本項では、*Barriology* の視点を踏まえて既存の薬物透過促進研究を概説する。

*Transcellular route* では、受容体やトランスポーターを利用したアプローチがなされてきている。この戦略では、標的部位（疾病部位）特異的に存在しそれ以外の部位には発現していない（若しくは発現量が極めて低い）受容体やトランスポーターを利用することにより、副作用の主原因となる薬物動態の制御が可能になることから、臨床的に理想的な方法論であると言える。<sup>15)</sup> しかしながら、受容体やトランスポーターを利用するためには薬物がこれらの担体に認識される必要があり、適当な化学構造を有していなければ化学修飾を施す必要が生じる。当然の

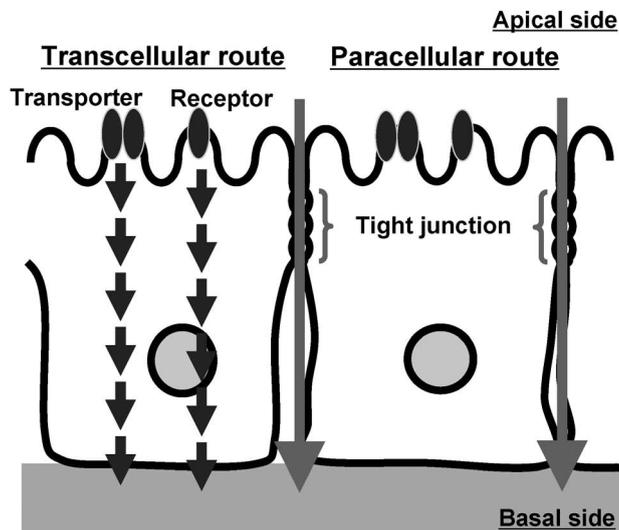


Fig. 2. Scheme of Transport Route within Epithelia

ことながら、この修飾は薬理活性に影響がないことが必須であり、医薬品毎に構造活性相関を考慮しつつ対応しなければならない。また、*transcellular route* では細胞内取り込み後の細胞内移行過程や細胞からの放出過程をも視野に入れた対応が望まれることから、ハイスループット化した医薬品候補化合物創製に対応した方法論として本 route を活用するには、バイオインフォーマティクスに基づく *in silico* スクリーニングの確立を待たなくてはならないであろう。このように、*transcellular route* を利用した薬物送達方法は、副作用及び特異性の点で理想的な戦略であると言えるが、その実用化には今しばらくの時間が必要とされている。

一方、*paracellular route* を介した薬物送達方法の歴史は古く、界面活性剤やキレート剤等を利用した吸収促進剤の研究にその萌芽をみて取れる。<sup>16,17)</sup> 1980年代には、製剤添加剤の利用によって薬物の腸管吸収を改善するアプローチとして、天然物や合成化合物などの多様な吸収促進剤の開発が急速に進展し、サリチル酸系化合物、脂肪酸類、胆汁酸類、Azone 類などが吸収促進剤として見出された。<sup>18-27)</sup> これらの吸収促進剤の作用機構を解析する中で、カプリン酸、デカノイルカルニチン、酒石酸は細胞間隙に存在する TJ を開口することにより吸収促進性を発揮することが示唆された。<sup>28-31)</sup> また、生理活性分子である一酸化窒素やエピネフリンなども *paracellular route* の透過マーカであるデキストランの腸管吸収を促進していたことから、これらの吸

収促進剤も TJ の開口を介して吸収促進効果を発揮しているものと推測されている。<sup>32,33)</sup> これらの TJ 開口作用が示唆されている吸収促進剤の作用点についてはいまだ不明な点も多いものの、少なくともカプリン酸は phospholipase C の活性化、酒石酸は細胞内アシドーシスが引き金となって細胞骨格の再編成が生じることにより最終的に TJ が開口すると考えられている (Table 1)。また、一酸化窒素は細胞内のグアニル酸環化酵素を活性化することが知られており、cGMP の産生に起因する細胞内シグナル伝達により TJ の開口が起きていると推測される。<sup>34,35)</sup> エピネフリンの吸収促進作用は  $\alpha$  アドレナリン受容体の活性化により生じることが示されており、本受容体活性化に起因する細胞内イベントが TJ の開口につながると目されている。<sup>33)</sup> このように長年に渡り、paracellular route を利用した薬物送達方法の研究は続けられてきたが、実用化に至ったものは坐剤におけるカプリン酸のみに過ぎない。吸収促進作用が TJ の開口を伴うために目的とする薬物と一緒に近傍に存在する種々の物質も吸収されてしまうことによる副作用が危惧されること、作用点に特異性が乏しく薬効を発揮するためには吸収促進剤を標的部分に送達する必要があることなどがこの要因として挙げられる。TJ を開口する方法論は、1つの方法論で多種多様な医薬品に適用可能であることから、ハイスループット化した創薬研究に適した方法であると言える。逆説的に考えると、既存の吸収促進剤の有する課題 (透過する物質の制御、作用の特異性) を克服することさえできれば、ゲノム創薬研究に適した薬物送達方法の開発が可能になると考えられる。

#### 4. Barriology を基盤とした薬物送達方法の確立

さて、2, 3 項で解説したことを時系列でまとめると Table 2 のようになる。Barriology における本質的な発見は 1998 年に行われ、1999 年に claudin がバリアー機能の本体であることが証明された。一方、既存の吸収促進剤は 1980 年代に開発されているものが大半を占めている。この表から導かれる結論は、「いまだ Barriology の分子基盤に立脚した吸収促進戦略の構築が十分になされていない」ということであろう。したがって、既存の吸収促進剤の有する課題は paracellular route を介した薬物送達方法の限界を意味しているのではなく、Barriology の

Table 1. Absorption-enhancers

Absorption-enhancer	Target molecule
EDTA	Ca <sup>2+</sup> (1980)
Oleic acid	Cell membrane (1980—)
NO	Unknown (1998)
Sodium caprate	Phospholipase C (1980—)

Table 2. Progress in Barriology

Years	Events
1993	Identification of occludin
1998	Identification of claudin
1999—	Clarification of TJ-barrier function of claudin
2005	Identification of tricellulin

知見が蓄積していなかったことに起因していると言える。この項では、いまだ萌芽的な研究である Barriology を基盤とした薬物送達研究について筆者らのデータを中心に概説する。

前述したように、生体内には多種多様な組織が存在しており、それぞれ固有の内部環境が維持されている。したがって、この内部環境維持機構を自在に制御することができれば、組織特異的な薬物送達が可能になると考えられる。TJ における物質透過障壁機能の本体を担う分子として唯一証明されている claudin は非常に魅力的な標的分子である。例えば、claudin には 24 種類の family が見出されており、発現及びバリアー機能に組織特異性が認められる。このことは、claudin のバリアー機能を family 特異的に制御するシステムを構築することができれば、組織特異的な薬物送達方法の構築へとつながることを示唆している。Claudin のバリアー機能を阻害する分子としては、*Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) の C 末断片 (C-CPE) が claudin-4 のバリアー機能を阻害する分子として唯一報告されていた (Fig. 3)。<sup>36)</sup> CPE は 35 kDa のポリペプチドであり、下痢活性に関与する N 末領域と受容体との結合に関与する C 末領域から構成されている。<sup>37)</sup> CPE の受容体は 1997 年にクローニングされており、1999 年に claudin-4 と同一分子であることが明らかになった。<sup>36,38)</sup> C-CPE をイヌ腎上皮細胞に作用させると TJ のバリアー機能が低下し、C-CPE を除去することにより TJ のバリアー能は回復することから、C-CPE は可逆的に claudin-4 に作用し TJ バリ

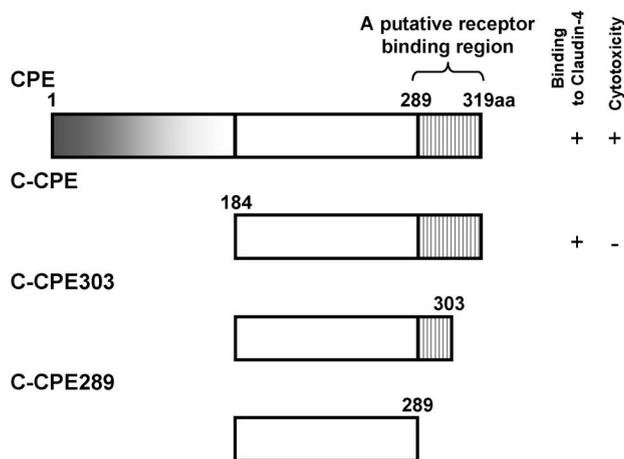
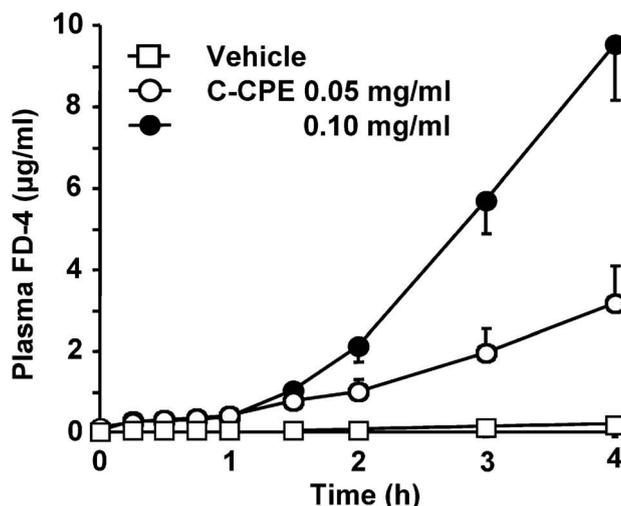


Fig. 3. Diagram of C-CPE and C-CPE Mutants Structure  
C-CPE is the C-terminal fragment of CPE.<sup>38)</sup> C-CPE binds to claudin-4 and decreases TJ barrier function as indicated by a decrease in TER.<sup>36)</sup> The C-terminal 30 and 16 amino acids of C-CPE-deleted mutants are C-CPE289 and C-CPE303, respectively.

アー機能を低下させると推察された。C-CPE はポリペプチドであることから遺伝子工学的手法を用いた改変も容易になると考え、筆者らのグループはC-CPE を claudin modulator のモデル分子として用いることにより claudin の薬物送達における標的分子としての有用性を評価した。

まず、C-CPE の吸収促進効果を FITC ラベルされた dextran (MW 4000) (FD-4) をモデル薬物として用いて、ラット空腸における *in situ* loop assay により評価した。<sup>39)</sup> C-CPE を添加すると濃度依存的な血漿中 FD-4 濃度の上昇が観察され、C-CPE 0.1 mg/ml 処理で臨床応用されている吸収促進剤であるカプリン酸ナトリウム (C10) 40 mg/ml と同程度の吸収促進効果が観察され、C-CPE は C10 の約 400 倍の吸収促進作用を有していた (Fig. 4)。また、C-CPE の粘膜傷害を生化学的及び組織学的に評価したところ、C-CPE 処理に伴う傷害性は観察されなかった (data not shown)。さらに、ラット大腸における吸収促進効果を評価したところ、C10 処理では、ラット空腸と同様の吸収促進活性が観察されたのに対して、C-CPE では大腸における吸収促進作用は認められなかった (Fig. 5)。このように C-CPE の吸収促進活性には C10 ではみられない組織特異性があり、claudin を標的とした薬物送達方法の有用性が示唆された。また、C-CPE は分子量 10000 までの dextran の吸収を顕著に促進していた (Fig. 6)。このように C-CPE は組織特異的かつ分

### A. Plasma FD-4 level



### B. AUC value

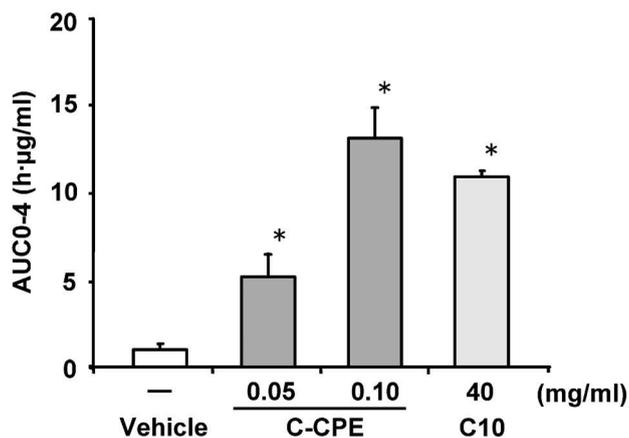
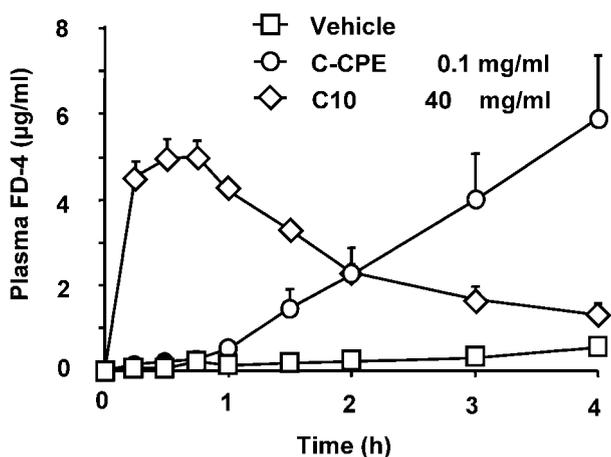


Fig. 4. Effect of C-CPE on Jejunal Absorption in Rats

Rat jejunum was treated with FD-4 (10 mg/ml) in the presence of vehicle C-CPE or C10. The FD-4 levels in plasma collected from the jugular vein were determined, and the AUC<sub>0-4h</sub> was calculated. Data are means ± S.E. ( $n = 4$ ). \*Significant difference from the vehicle-treated group ( $p < 0.05$ ).

子量依存的な吸収促進活性を有していた。次に、ラット空腸の溶解液と C-CPE を反応させ C-CPE に付加されている His-tag を利用して pull down assay を行ったところ、沈降画分に C-CPE と claudin-4 がともに検出されたことから C-CPE と claudin-4 が相互作用することが確認された (Fig. 7)。また、過去の報告から、CPE は C 末 30 アミノ酸を介して受容体と結合することが示唆されていた。<sup>40)</sup> そこで、CPE と C-CPE の受容体結合領域は同一であることから、C-CPE の C 末 30 アミノ酸若しくはその一部 (16 アミノ酸) を欠損させた C-CPE289、C-CPE303 を作製しこれらの変異体の各種活性を評価

## Rat jejunum



## Rat colon

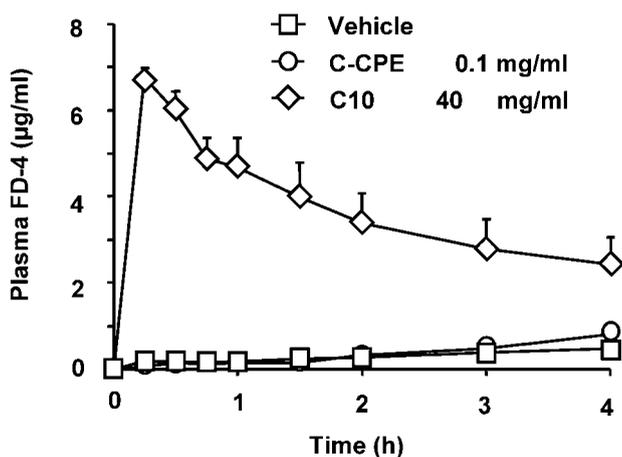


Fig. 5. Comparison of Absorption-enhancing Effects of C-CPE in Rat Jejunum and Colon

The rat jejunum or colon was treated with FD-4 (10 mg/ml) in the presence of C10 (40 mg/ml) or C-CPE (0.1 mg/ml). FD-4 levels in plasma collected from the jugular vein were determined at the indicated points. Data are means  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). The results are representative of at least three independent experiments.

した (Fig. 3). その結果, C-CPE289, C-CPE303 いずれの変異体も claudin-4 との結合性及び吸収促進活性が消失していたことから, C-CPE の吸収促進作用には claudin-4 との相互作用が必須であると推測される (Fig. 7).<sup>41)</sup>

以上の結果より, claudin の薬物送達における標的分子としての有用性が示された. 現在, C-CPE を prototype として用いた claudin modulator の創製を図り, C-CPE の機能ドメインの解析及びスクリーニング系の構築を鋭意進めているところである.<sup>41-43)</sup>

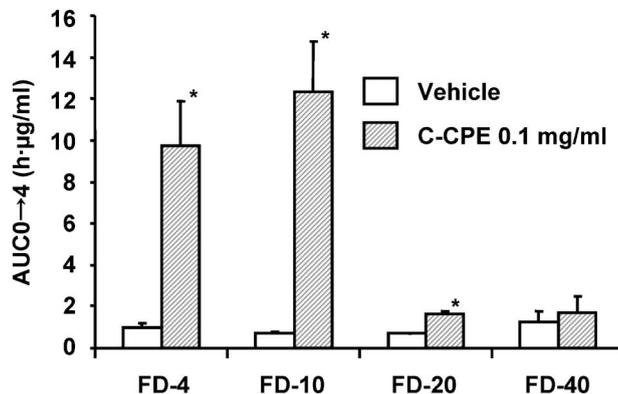
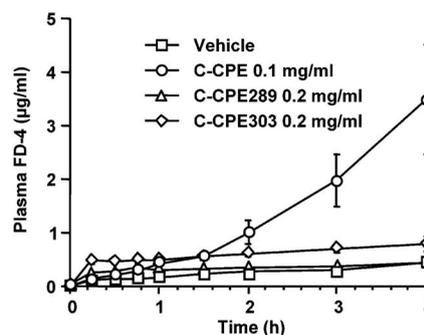


Fig. 6. Dependence of the Enhancement of Absorption by C-CPE on the Molecular Mass of Dextran

Rat jejunum was treated with FD-4, -10, -20 or -40 (10 mg/ml) in the presence of vehicle or C-CPE (0.1 mg/ml). FD levels in plasma collected from the jugular vein were determined, and the  $AUC_{0-4h}$  was calculated. Data are means  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). \*Significant difference from the vehicle-treated group ( $p<0.05$ ).

## A. Absorption-enhancing effect of mutated C-CPE in rat jejunum



## B. Interaction of mutated C-CPE with claudin-4

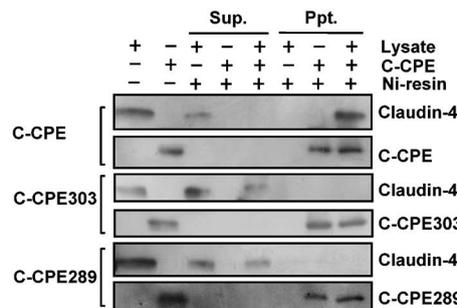


Fig. 7. Involvement of Claudin-4 in C-CPE-induced Jejunal Absorption in Rats

A) Effect of C-CPE, C-CPE289, and C-CPE303 on absorption. Rat jejunum was treated with FD-4 (10 mg/ml) in the presence of C-CPE, C-CPE289, or C-CPE303 (0.1 or 0.2 mg/ml). FD-4 levels in plasma collected from the jugular vein were determined at the indicated points. Data are means  $\pm$  S.E. ( $n=4$ ). B) Interaction of C-CPE, C-CPE289, or C-CPE303 with claudin-4. Jejunal mucosa was removed by a scraper, and lysed in lysis buffer. The lysate was incubated with C-CPE, C-CPE289, or C-CPE303 and then mixed with Ni-resin. After a 2-h incubation at 37°C, the resulting complex bound to the Ni-resin (ppt) and the free fraction (sup) were subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with antibodies against claudin-4 and His-tag.

## 5. 今後の展望

前述したように、Barriology についてはようやく TJ バリアーの構成要因が単離されつつあるのが現状であり、Barriology を基盤とした薬物送達方法の開発研究に至っては緒についたばかりである。実際、動物実験において標的分子としての有用性が評価されているのは claudin のみに過ぎない。また、TJ 構成蛋白質の中でバリアー機能への関与が証明されている分子は、occludin, claudin, tricellulin のみである。そこで最後に、paracellular 経路を介した薬物送達における claudin 以外の標的分子の有用性を考察すると同時に、Barriology の視点から既存の吸収促進剤の課題の克服の可能性について論じた。

Barriology を基盤とした薬物送達方法の萌芽は 1997 年 Wong and Gumbiner の報告に遡る。<sup>44)</sup> Occludin は 4 回膜貫通構造を有しており 2 つの細胞外領域を有している。Wong and Gumbiner は occludin の細胞外領域のペプチドを合成し C 末側の細胞外ペプチド処理により TJ バリアー機能が低下すること、分子量 40 kDa までのデキストランの透過が亢進することを見出している。Occludin peptide 処理に伴い、細胞間隙における occludin レベルが低下すると同時に細胞内の occludin レベルが低下していたことから、occludin peptide 処理により peptide と結合した occludin が細胞内に取り込まれ分解されたと推察している。この報告では、*Xenopus* kidney epithelial cell が使用されており、薬物送達研究における一般的な細胞系ではなかった。2003 年、Artursson らのグループは Caco-2 細胞を用いて occludin peptide 配列の最適化を試みている。Wong and Gumbiner の報告では、184—227aa 領域のペプチド配列を使用していたが Artursson らの実験ではこの領域に相当するペプチド配列では TJ バリアー機能低下活性は観察されず、Wong and Gumbiner らの報告では活性はないとされていた N 末側の細胞外領域に相当するペプチド配列においてバリアー機能の低下活性が見出されている。<sup>45)</sup> 両グループの実験系は使用している細胞が異なることから、実験結果の矛盾は細胞系の相違に伴う TJ バリアー機構の相違に起因していると考えられる。当研究室にある Caco-2 細胞を用いて Artursson と同様の実験を行ってみたものの再現性は得られなかった (our

unpublished data)。Caco-2 細胞には種々の亜株が存在することが知られており、細胞間での TJ の分子基盤の相違が occludin peptide の活性に影響を与えていると推察される。Artursson らのグループのデータでは、occludin peptide 処理後 120 min で速やかな TJ バリアー能低下活性が観察されていたことから、occludin peptide を利用したアプローチには C-CPE にはない速効性があり、臨床応用に向けては occludin も標的として考える必要があるかもしれない。

上皮細胞層の物質透過障壁としては bicellular junction のほかに tricellular junction が関与していることが知られており、tricellular junction におけるバリアー機能を担う tricellulin は paracellular route を介した薬物送達システム構築に際しては標的になり得る。実際、RNA 干渉により tricellulin の発現をノックダウンすると TJ バリアー機能の低下及び分子量 4 kDa のデキストランの透過が亢進することから、<sup>14)</sup> tricellulin を標的とした TJ modulator の創製は薬物送達において有効であろう。Tricellulin のノックダウンにより、bicellular junction 形成も影響を受けたことから tricellulin modulator は claudin や occludin のバリアー機能をも制御できる可能性がある。Tricellulin については発見から 8 ヶ月あまりしか経っておらず機能解析などの研究の進展が待望される。また、細胞間接着の構築においては、Nectin-Afadin 系による AJ の形成に続いて TJ が構築されることが知られており、AJ 構成蛋白質を制御することにより TJ のバリアー機能を制御できる可能性も示唆される。<sup>46)</sup> Conditional knockout により表皮の E-cadherin をノックダウンすると表皮のバリアー機能が低下する。<sup>47)</sup> Claudin-1 は表皮のバリアー機能を担う分子として知られているが、E-cadherin の消失により claudin-1 も表皮から消失していたことから claudin のバリアー機能維持に cadherin が関与している可能性が示唆され、cadherin modulator を利用した薬物送達方法の確立も可能になるかもしれない。このように Barriology の分子基盤から俯瞰すると、claudin のほかに occludin, tricellulin, cadherin も薬物送達方法構築の際には標的分子になる可能性がある。

さて、カプリン酸ナトリウムに代表される吸収促進剤の課題として、薬物以外の物質の非特異的な流

入が挙げられているが、当然のことながらこの課題は claudin, occludin, tricellulin, cadherin などの TJ modulator を用いた薬物送達方法においても該当する。Claudin-1, -5 欠損マウスでは分子量 1000 未満の分子の移動が観察されており, occludin peptide による物質移動, tricellulin のノックダウンによる物質移動に分子量依存性が観察されたことから, TJ modulator による薬物透過は分子量依存性を付与することができると考えられる。また, claudin は, 24 種類の family を形成しており, ホモ及びヘテロなストランドを形成することにより細胞膜上に多種多様な TJ ストランドを構築し組織固有の内部環境維持に積極的に関与していると考えられている。このことは, claudin family の組み合わせ特異的な modulator を創製することができれば部位特異的な薬物送達が可能になることを示唆している。このように, TJ 構成蛋白質を用いた薬物送達は, 分子量依存的及び組織特異的であることから, 従来の吸収促進剤に比して副作用は大幅に軽減されると推察される。現時点では, 特異性及び副作用の観点からみれば, トランスポーターなどの transcellular route の利用が理想的な方法論であると言える。しかしながら, 細胞内取り込み, 細胞内での代謝, 細胞外への排出過程をも考慮しなくてはならないために, transcellular route を利用した薬物送達方法の実現にはしばらく時間を要すると考えられる。実際, 現在 200 万人あまりの患者を有する脳疾患においては, 有効とされる化合物の 90% は血液脳関門を通過することができないために臨床応用が見送られており, 医薬品シーズを十分に活用するには至っていない。本稿で紹介した Barriology を基盤とした DDS 研究は汎用性の点では transcellular route を凌駕する方法論であり, 少なくとも近未来における薬物治療においては福音をもたらす戦略であると言える。

以上, 本総説では Barriology の観点から薬物送達方法を振り返ってきた。Barriology は生まれて 10 年足らずの若い学問であり現在はその勃興期に過ぎない。今後, Barriology の成熟期を迎える頃には, 本日紹介した萌芽が育ち薬物治療に貢献していることを期待している。

## REFERENCES

- 1) Gumbiner B. M., *Cell*, **84**, 345–357 (1996).
- 2) Koch A. W., Bozic D., Pertz O., Engel J., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 275–281 (1999).
- 3) Yagi T., Takeichi M., *Genes Dev.*, **14**, 1169–1180 (2000).
- 4) Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita Sa., Tsukita Sh., *J. Cell Biol.*, **123**, 1777–1788 (1993).
- 5) Saitou M., Fujimoto K., Doi Y., Itoh M., Fujimoto T., Furuse M., Takano H., Noda T., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **141**, 397–408 (1998).
- 6) Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **141**, 1539–1550 (1998).
- 7) Furuse M., Tsukita S., *Trends Cell Biol.*, **16**, 181–188 (2006).
- 8) Furuse M., Sasaki H., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **147**, 891–903 (1999).
- 9) Van Itallie C. M., Fanning A. S., Anderson J. M., *Am. J. Physiol.*, **285**, F1078–F1084 (2003).
- 10) Tsukita S., Furuse M., Itoh M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 285–293 (2001).
- 11) Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **156**, 1099–1111 (2002).
- 12) Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **161**, 653–660 (2003).
- 13) Gow A., Southwood C. M., Li J. S., Pariali M., Riordan G. P., Brodie S. E., Danias J., Bronstein J. M., Kachar B., Lazzarini R. A., *Cell*, **99**, 649–659 (1999).
- 14) Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita Sa., Tsukita Sh., *J. Cell Biol.*, **171**, 939–945 (2005).
- 15) Mizuno N., Niwa T., Yotsumoto Y., Sugiyama Y., *Pharmacol. Rev.*, **55**, 425–461 (2003).
- 16) Engel R. H., Riggi S. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **130**, 879–884 (1969).
- 17) Tidball C. S., Lipman R. I., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 713–715 (1962).
- 18) Nishihata T., Rytting J. H., Higuchi T., Caldwell L., *J. Pharm. Pharmacol.*, **33**, 334–335

- (1981).
- 19) Nishihata T., Rytting J. H., Kamada A., Higuchi T., *Diabetes*, **30**, 1065–1067 (1981).
  - 20) Nishimura K., Nozaki Y., Yoshimi A., Nakamura S., Kitagawa M., Kakeya N., Kitano K., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 282–291 (1985).
  - 21) Sekine M., Sasahara K., Kojima T., Hasegawa K., Okada R., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4189–4192 (1984).
  - 22) Murakami T., Tamauchi H., Yamazaki M., Kubo K., Kamada A., Yata N., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1986–1997 (1981).
  - 23) Fix J. A., Engle K., Porter P. A., Leppert P. S., Selk S. J., Gardner C. R., Alexander J., *Am. J. Physiol.*, **251**, G332–G340 (1986).
  - 24) Ziv E., Kidron M., Berry E. M., Bar-On H., *Life Sci.*, **29**, 803–809 (1981).
  - 25) Van Hoogdalem E. J., Heijligers-Feijen C. D., Mathot R. A. A., Wackwitz A. T. E., van Bree J. B. M. M., Verhoef J. C., de Boer A. G., Breimer D. D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**, 741–744 (1989).
  - 26) Murakami M., Takada K., Muranishi S., *Int. J. Pharm.*, **31**, 231–238 (1986).
  - 27) Fukui H., Murakami M., Takada K., Muranishi S., *Int. J. Pharm.*, **31**, 239–246 (1986).
  - 28) Tomita M., Hayashi M., Awazu S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 739–743 (1995).
  - 29) Lindmark T., Nikkila T., Artursson P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 958–964 (1995).
  - 30) Tomita M., Hayashi M., Awazu S., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 608–611 (1996).
  - 31) Hayashi M., Sakai T., Hasegawa Y., Nishikawahara T., Tomioka H., Iida A., Shimizu N., Tomita M., Awazu S., *J. Control. Release*, **62**, 141–148 (1999).
  - 32) Utoguchi N., Watanabe Y., Shida T., Matsumoto M., *Pharm. Res.*, **15**, 870–876 (1998).
  - 33) Kamio Y., Saito Y., Utoguchi N., Kondoh M., Koizumi N., Fujii M., Watanabe Y., *J. Control. Release*, **102**, 563–568 (2005).
  - 34) Lee N. P. Y., Mruk D. D., Wong C. H., Cheng C. Y., *Biol. Reprod.*, **73**, 458–471 (2005).
  - 35) Sarkar O., Xia W., Mruk D. D., *J. Cell. Physiol.*, **208**, 175–187 (2006).
  - 36) Sonoda N., Furuse M., Sasaki H., Yonemura S., Katahira J., Horiguchi Y., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **147**, 195–204 (1999).
  - 37) McClane B. A., Chakrabarti G., *Anaerobe*, **10**, 107–114 (2004).
  - 38) Katahira J., Inoue N., Horiguchi Y., Matsuda M., Sugimoto N., *J. Cell Biol.*, **136**, 1239–1247 (1997).
  - 39) Kondoh M., Masuyama A., Takahashi A., Asano N., Mizuguchi H., Koizumi N., Fujii M., Hayakawa T., Horiguchi Y., Watanabe Y., *Mol. Pharmacol.*, **67**, 749–756 (2005).
  - 40) Hanna P. C., Mietzner T. A., Schoolnik G. K., McClane B. A., *J. Biol. Chem.*, **266**, 11037–11043 (1991).
  - 41) Takahashi A., Kondoh M., Masuyama A., Fujii M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., Watanabe Y., *J. Control. Release*, **108**, 56–62 (2005).
  - 42) Masuyama A., Kondoh M., Seguchi H., Takahashi A., Harada M., Fujii M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., Watanabe Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, 789–795 (2005).
  - 43) Ebihara C., Kondoh M., Hasuie N., Harada M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., Fujii M., Watanabe Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **316**, 255–260 (2006).
  - 44) Wong V., Gumbiner B. M., *J. Cell Biol.*, **136**, 399–409 (1997).
  - 45) Tavelin S., Hashimoto K., Malkinson J., Lazorova L., Toth I., Artursson P., *Mol. Pharmacol.*, **64**, 1530–1540 (2003).
  - 46) Miyoshi J., Takai Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 815–855 (2005).
  - 47) Tunggal J. A., Helfrich I., Schmitz A., Schwarz H., Gunzel D., Fromm M., Kemler R., Krieg T., Niessen C. M., *EMBO J.*, **24**, 1146–1156 (2005).