

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659077

研究課題名（和文）薬物輸送学と腸管免疫学の融合に基づいた炎症性腸疾患の新規薬物治療戦略

研究課題名（英文）Novel strategy of drug therapy for inflammatory bowel diseases based on the combination of drug transport and intestinal immunology.

研究代表者

寺田 智祐（TERADA TOMOHIRO）

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：10324641

研究成果の概要（和文）：

炎症性腸疾患（IBD）患者の大腸に発現するペプチドトランスポータ PEPT1 の発現は、炎症部位で特異的に誘導され、小腸特異的な転写因子 CDX2 により惹起された。文献情報や分子デザイン法を活用して、PEPT1 の基質になりうる 5-アミノサリチル酸のアミノ酸誘導体を設計し、8 種類のアミノ酸誘導体の合成に成功した。今後、これらアミノ酸誘導体と PEPT1 の相互作用について、*in vitro* 及び *in vivo* の観点から検討を加えていく。

研究成果の概要（英文）：

Expression of peptide transporter PEPT1 in the large intestine of inflammatory bowel disease (IBD) patients was specifically induced in the inflammatory region. Furthermore, this expression was suggested to be stimulated by intestine-specific transcription factor CDX2. Based on the literature and molecular design methods, eight kinds of amino acid derivatives of 5-aminosalicylic acid were synthesized, which can become the substrates for PEPT1. The interaction of PEPT1 with these amino acid derivatives of 5-aminosalicylic acid will be evaluated from the view points of *in vitro* and *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬学、薬剤反応性、薬理学、薬物トランスポータ、炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease: IBD）は、疾患関連遺伝子の異常と食事や腸内細菌などの環境因子が相まって引き起こされる難治性の疾患である。現在、IBD の薬物療法の第一選択薬と使用されている薬物は、安価で副作用の少ない 5-アミノサリチル酸であり、また、大腸に特異的に送達するた

めの製剤学的工夫が凝らされてきた。しかし、いずれの製剤も大腸管腔内に大量の 5-アミノサリチル酸を放出させるものであり、薬効発現部位である大腸上皮細胞内への送達を保証しているものではない。一方、IBD の病因として、通常小腸にのみ発現するペプチドトランスポータ PEPT1 が大腸にも発現し、大腸菌由来の炎症性小分子ペプチドを輸送することによって、消化管の炎症に関与するこ

とが示唆されている。申請者はこれまで、小腸 PEPT1 の薬物トランスポーターとしての役割を様々な観点から明らかにし、特に薬物送達への応用について新知見を報告してきた。従って、IBD の病因として考えられている大腸 PEPT1 を、逆に薬物輸送の標的分子として利用することによって、新たな IBD の薬物療法が開発可能になると考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

IBD 患者における大腸組織での PEPT1 発現誘導のメカニズムを明らかにする。さらに、IBD の基礎的治療薬として繁用されている 5-アミノサリチル酸をアミノ酸修飾することによって PEPT1 の基質とし、大腸上皮細胞内に特異的に送達されるための分子設計を行う。

3. 研究の方法

(1) IBD 患者の大腸における免疫組織染色

IBD 患者の大腸切片を用いて、PEPT1 とその転写因子 CDX2 の免疫組織染色を行った。また、陽性対象として、空腸 PEPT1 の発現についても調べた。

(2) 5-アミノサリチル酸のアミノ酸誘導体のデザインと合成

文献情報を基に、5-アミノサリチル酸をアミノ酸修飾することによって、PEPT1 に対して高い親和性を示すことが予想される構造を分子デザインし、有機合成を行った。合成物の確認は、核磁気共鳴 (NMR)、赤外分光法 (IR)、並びに高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) の手法を用いて確認した。

(3) Pept1 遺伝子欠損マウスによる解析

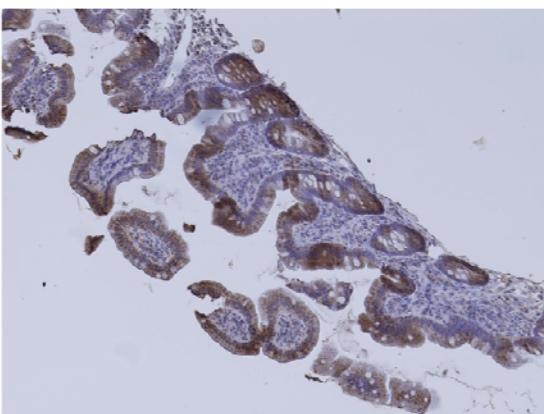
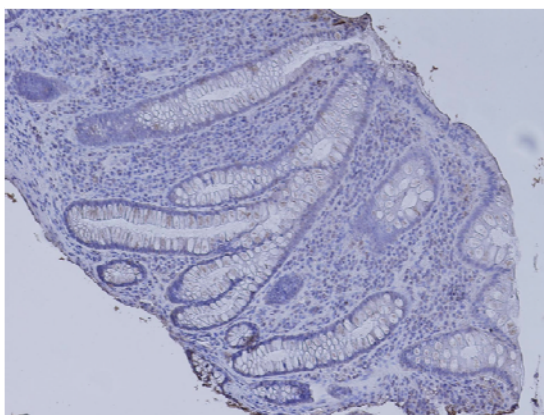
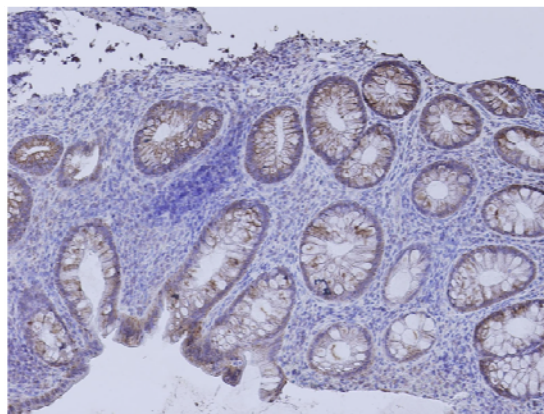
Pept1 と IBD の関連性を精査するため、Pept1 遺伝子欠損マウスを導入し、その生理的・病態生理的特徴を解析した。

4. 研究成果

(1) IBD 患者の大腸における免疫組織染色

潰瘍性大腸炎患者の大腸組織切片を用いて、PEPT1 の発現の有無を調べた。その結果、炎症部位では PEPT1 の発現が、空腸と同様に認められたのに対して、非炎症部位では発現は認められなかった (図 1)。この時、PEPT1 の小腸特異的な発現を制御している転写因子 Cdx2 の発現も、炎症部位では認められたのに対して、非炎症部位では認められなかった。この現象は、クローン病患者の大腸組織でも同様に認められた。

従って、IBD 患者の大腸組織の炎症部位では、小腸特異的な転写因子 CDX2 が何らかのシグナルによって発現が誘導され、その下流にある PEPT1 の発現が上昇することが推察



された。

図 1. 潰瘍性大腸炎患者の大腸及び空腸における PEPT1 の発現。上図: 大腸炎症部位、中図: 大腸非炎症部位、下図: 空腸。

(2) 5-アミノサリチル酸のアミノ酸誘導体のデザインと合成

文献情報や申請者の以前の報告 (J. Pharmacol. Exp. Ther., 318, 455-460, 2006) に基づいて、5-アミノサリチル酸を修飾するアミノ酸として、グリシン (Gly)、バリン (Val)、

チロシン (Tyr)、グルタミン酸 (Glu) を選択した。5-アミノサリチル酸のカルボキシル基とアミノ酸のアミノ基、あるいは5-アミノサリチル酸のアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基をペプチド結合させた化合物は、PEPT1 に対して比較的高い親和性を示すと予想される (図 2)。

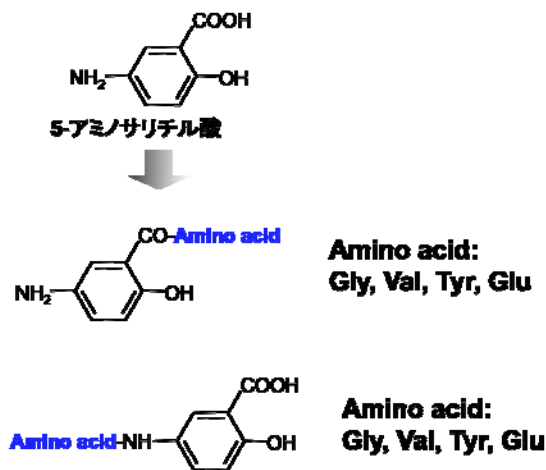


図 2. 5-アミノサリチル酸のアミノ酸修飾体

そこでこれらのアミノ酸誘導体を化学合成し、それらの物性並びに構造決定を、NMR、IR 並びに HPLC により分析したところ、いずれも 99.9%以上の純度で合成できていることが確認できた。また、PEPT1 の構造生物学的特徴を文献的に解析し、これらアミノ酸誘導体の PEPT1 による認識メカニズムを精査した (論文 6)。その結果、PEPT1 には central cavity と呼ばれる、荷電した側鎖が内向きに配向された領域が存在し、基質となる化合物のペプチド結合や、遊離のアミノ基やカルボキシル基など電荷に富んだ領域を認識していることが推察された。一方、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン等の脂溶性の高い側鎖を有するアミノ酸も、central cavity に配向していることから、今回合成した誘導体の中では、脂溶性の高い側鎖を有する Val 誘導体が比較的亲和性が高いことが示唆された。今後、合成した 5-アミノサリチル酸のアミノ酸誘導体と PEPT1 との相互作用について、*in vitro* 輸送系を用いて解析していく予定である。

(3) Pept1 遺伝子欠損マウスによる解析

合成した 5-アミノサリチル酸のアミノ酸誘導体の、*in vivo* における効果を確かめるためには、PEPT1 の発現の有無による吸収特性の解析が必要である。そこで、Pept1 遺伝子欠損マウスを導入し、生理的・病態生理学的特徴を精査した。その結果、Pept1 遺伝子欠損マウスは、正常に発育・出産することが判

明した。今後、野生型マウスと Pept1 遺伝子欠損マウスによる、5-アミノサリチル酸のアミノ酸誘導体の吸収特性を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Morita, S., Tsuda, T., Horikami, M., Teraoka, R., Kitagawa, S. and Terada, T.: Bile salt-stimulated phospholipid efflux mediated by ABCB4 localized in nonraft membranes. : Bile salt-stimulated phospholipid efflux mediated by ABCB4 localized in nonraft membranes. J. Lipid Res., 54(5), 1221-1230, 2013、査読有、doi: 10.1194/jlr.M032425
2. Aomatsu, T., Imaeda, H., Takahashi, K., Fujimoto, T., Kasumi, E., Ban, H., Bamba, S., Yoden, A., Tamai, H., Fujiyama, Y. and Andoh, A.: Neutralization of complement component C5 ameliorates the development of dextran sulfate sodium (DSS)-colitis in mice. J. Clin. Biochem. Nutr., 52(1), 72-75, 2013、査読有、doi: 10.3164/jcbrn.12-63
3. Kajiwarra, M., Masuda, S., Watanabe, S., Terada, T., Katsura, T. and Inui, K.: Renal tubular secretion of varenicline by multidrug and toxin extrusion (MATE) transporters. Drug Metab. Pharmacokinet., 27(6), 563-569, 2012、査読有、https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmpk/27/6/27_DMPK-11-RG-156/_pdf
4. Morita, S., Soda, K., Teraoka, R., Kitagawa, S. and Terada, T.: Specific and sensitive enzymatic measurement of sphingomyelin in cultured cells. Chem. Phys. Lipids., 165(5), 571-576, 2012、査読有、doi: 10.1016/j.chemphyslip.2012.06.003
5. Morita, S., Shirakawa, S., Kobayashi, Y., Nakamura, K., Teraoka, R., Kitagawa, S. and Terada, T.: Enzymatic measurement of phosphatidylserine in cultured cells. J. Lipid Res., 53(2), 325-330, 2012、査読有、doi: 10.1194/jlr.D021808
6. Terada, T. and Inui, K.: Recent advances in structural biology of peptide transporters. Curr. Top. Membr., 70, 257-274, 2012、査読有、doi: 10.1016/B978-0-12-394316-3.00008-9
7. Bamba, S., Andoh, A., Ban, H., Imaeda, H., Aomatsu, T., Kobori, A., Mochizuki,

- Y., Shioya, M., Nishimura, T., Inatomi, O., Sasaki, M., Saitoh, Y., Tsujikawa, T., Araki, Y. and Fujiyama, Y.: The severity of dextran sodium sulfate-induced colitis can differ between dextran sodium sulfate preparations of the same molecular weight range. *Dig. Dis. Sci.*, 57(2), 327-334, 2012、査読有、doi: 10.1007/s10620-011-1881-x
8. Morita, S., Ikeda, N., Horikami, M., Soda, K., Ishihara, K., Teraoka, R., Terada, T. and Kitagawa, S.: Effects of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase on phospholipid composition, microvillus formation and bile salt resistance in LLC-PK1 cells. *FEBS J.*, 278(24), 4768-4781, 2011、査読有、doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08377.x
9. Iwayanagi, Y., Takada, T., Tomura, F., Yamanashi, Y., Terada, T., Inui, K. and Suzuki, H.: Human NPC1L1 expression is positively regulated by PPAR α . *Pharm. Res.*, 28(2), 405-412, 2011、査読有、doi: 10.1007/s11095-010-0294-4
10. Imaeda, H., Andoh, A., Aomatsu, T., Uchiyama, K., Bamba, S., Tsujikawa, T., Naito, Y. and Fujiyama, Y.: Interleukin-33 suppresses Notch ligand expression and prevents goblet cell depletion in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Int. J. Mol. Med.*, 28(4), 573-578, 2011、査読有、doi: 10.3892/ijmm.2011.718.

〔学会発表〕（計 8 件）

1. Terada, T., Mizuno, T., Fukudo, M., Inui, K. and Katsura, T.: PK/PD approaches for optimal molecular targeted cancer therapy、日本薬物動態学会第 27 回年会、2012.11.22-24、東京
2. 寺田智祐：薬物動態研究の臨床応用、第 32 回日本眼薬理学会、2012.9.15-16、滋賀
3. 寺田智祐：ファーマコゲノミクス検査に基づく個別化、医療薬学フォーラム 2012、2012.7.14-15、福岡
4. 寺田智祐、森井博朗：がん領域におけるチーム医療と薬剤師の役割、第 32 回日本臨床薬理学会年会、2011.12.1-3、浜松
5. Terada, T.: PK/PD and optimal usage of anticancer drugs: Viewpoints from the pharmacists、日本薬物動態学会第 26 回年会、2011.11.16-18、広島
6. 寺田智祐：がんを専門とする薬剤師のキャリアパス—臨床薬学研究者の立場から—、第 70 回日本癌学会学術総会、

2011.10.3-5、名古屋

7. Terada, T.: Role of pharmacists in the frontline of pharmacotherapy、第 21 回日本医療薬学会、2011.10.1-2、神戸
8. 寺田智祐：新規経口マルチキナーゼ阻害剤の体内動態と pharmacogenomics、第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2011.7.21-23、横浜

〔図書〕（計 1 件）

1. 寺田智祐：ペプチドトランスポーターの発現・機能ならびに消化管における薬物輸送の制御。難吸収性薬物の吸収性改善と新規投与剤の開発、山本昌監修、104-109、シーエムシー出版、2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 智祐 (TERADA TOMOHIRO)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：10324641

(2) 研究分担者

安藤 朗 (ANDOH AKIRA)
滋賀医科大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90252395

(3) 連携研究者

なし