

氏名	いり え めぐみ 入江 めぐみ
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第582号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	数理工学的モデルを活用した小腸ペプチドトランスポータの機能特性に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 乾 賢一 教授 橋田 充 教授 高倉 喜信

### 論文内容の要旨

小腸上皮細胞の刷子縁膜には、 $H^+$  駆動型ペプチドトランスポータ1 (PEPT1, SLC15A1) が発現し、ジペプチド、トリペプチドやペプチド類似薬物の取り込みを媒介している。近年、PEPT1 はペプチド結合を持たない化合物をも輸送することが判明し、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の標的分子として注目されている。また、小腸上皮細胞の側底膜にも、PEPT1 とは異なるペプチドトランスポータが発現し、小分子ペプチドやペプチド類似薬物の輸送を媒介している。しかし、薬物の吸収は経上皮的な輸送過程であることから、側底膜型ペプチドトランスポータもまた非ペプチド性化合物を基質とするか否かについて説明することは、DDS の観点から極めて重要である。一方、両トランスポータの取り込み特性については多くの情報が集積しつつあるものの、排出方向における機能特性や詳細な輸送機序は未だ不明であり、これらの解明には取り込み実験だけでなく新たな手法を用いた解析が必要である。

そこで著者は、小腸のモデル細胞であるヒト培養腸上皮細胞 Caco-2 を用いて、ペプチドトランスポータによる非ペプチド性化合物の認識特性について精査し、DDS への応用性を評価した。さらに、速度論や分子機能の数理工学的モデリングを活用したトランスポータの機能評価法を構築し、PEPT1 及び側底膜型トランスポータの機能特性に関して以下の新見を得た。

#### I. PEPT1 及び側底膜型ペプチドトランスポータの基質認識特性

ペプチドトランスポータの典型的基質である glycylsarcosine (Gly-Sar) 取り込みに対する種々化合物の濃度依存的な阻害効果について検討し、PEPT1 とそのアイソフォームである PEPT2 の基質親和性を比較した。その結果、PEPT1 は種々の非ペプチド性化合物に対しても良好な認識性を保つことが分かった。また、側底膜型ペプチドトランスポータも  $\delta$ -aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA) などの非ペプチド性化合物を認識、輸送すること、またその親和性は PEPT1 よりも低いことが判明した。しかし、一部の非ペプチド性化合物は PEPT1 にのみ認識されたことから、両トランスポータの認識特性には若干の相違があることも分かった。さらに、 $\delta$ -ALA の経上皮輸送は吸収方向選択的であった。従って、PEPT1 及び側底膜型ペプチドトランスポータは一部の非ペプチド性化合物に対しても DDS の標的システムとなり得ることが示唆された。

#### II. 輸送方向によるペプチドトランスポータ機能の比較解析

ペプチドトランスポータの排出特性を明らかにするため、Gly-Sar の efflux 解析、並びに3-コンパートメントモデルに基づく経細胞輸送の速度論解析を行った。機能解析の中でも特に正確な基質の細胞内濃度が要求される親和性の解析については、両方法を用いて検討した。まず、Gly-Sar を用いた efflux 実験による検討から、側底膜型ペプチドトランスポータは輸送の方向によらず pH 非依存性であることが分かった。また、速度論解析の結果、基質認識特性に関しても輸送方向による相違は認められなかった。一方、基質親和性は輸送方向によって顕著に異なり、側底膜型ペプチドトランスポータは排出方向の方が取り込み方向よりも低親和性であることが判明した。さらに、両トランスポータの速度論パラメータ ( $K_m$ ,  $V_{max}$  値) を用いて、Caco-2 細胞における Gly-Sar 輸送のシミュレータを構築したところ、非定常状態における Gly-

Sar 輸送をよく再現できたことから、パラメータの妥当性が示された。

### Ⅲ. コンピュータシミュレーションを用いた PEPT1 輸送メカニズムの解明

PEPT1 は基質と  $H^+$  を共輸送することから、基質の輸送は電流を伴い、pH や膜電位に依存するが、その詳細な輸送機序は不明である。そこでまず、PEPT1 を介した Gly-Sar (中性) 及び ceftibuten (アニオン) 輸送の pH プロファイルが異なる原因を調べたところ、基質の荷電状態ではなく PEPT1 の輸送メカニズムに起因することが推察された。さらに、Gly-Sar の  $K_m$  値は pH によって変動し、pH5.5 付近に極小値をとる放物線型を示すのに対し、ceftibuten の  $K_m$  値は pH と共に低下した。これらの知見と機能特性に関する文献情報を併せると、 $H^+$  が  $H^+$  結合部位だけでなく基質認識部位にも結合すること、また、基質の荷電状態によって  $H^+$  との stoichiometry が異なる可能性が考えられた。しかし、これらの仮説を実験によって検証することは非常に困難である。そこで、推察したメカニズムに基づいて14状態からなる PEPT1 の輸送モデルを構築し、コンピュータ上で PEPT1 の輸送特性が再現できるか否かについて検証した。その結果、PEPT1 を介した Gly-Sar 輸送の pH 依存性、Gly-Sar 輸送に伴う内向き電流、膜電位依存性などの輸送特性が包括的に再現できた。さらに、荷電状態の異なる ceftibuten や種々ジペプチドの輸送特性についてもシミュレーションを行ったところ、実測値と対応した結果が得られたことから、考案した輸送メカニズムの妥当性が示唆された。

以上、著者は PEPT1 及び側底膜型ペプチドトランスポータの基質認識特性について精査し、DDS への応用の可能性を示した。また、数理学的モデルという新たな手法を活用することによって、従来の検討方法では解析が困難であった機能特性や輸送の分子機序を明らかにすることができた。これらの研究成果は、ペプチドトランスポータをターゲットとする医薬品の分子設計や小腸における吸収評価に関し新たな知見を提供するとともに、他のトランスポータにおける基質認識機構や輸送の分子機序解明に対し有用な手法を提唱するものとする。

### 論文審査の結果の要旨

小腸上皮細胞に発現する  $H^+$  駆動型ペプチドトランスポータ 1 (PEPT1) 及び側底膜型ペプチドトランスポータは、小分子ペプチドやペプチド類似薬物の輸送を媒介している。PEPT1 は非ペプチド性薬物をも輸送することから、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の標的分子として注目されているが、側底膜型ペプチドトランスポータが非ペプチド性薬物を輸送するか否かについては不明である。さらに、両トランスポータの排出方向における機能特性や輸送の分子機序に関する情報は乏しい。そこで申請者は、ヒト培養腸上皮細胞 Caco-2 を用いて、側底膜型ペプチドトランスポータの DDS への応用について検討するとともに、速度論や分子機能の数理学的モデリングを活用したトランスポータの新機能評価法を考案し、PEPT1 及び側底膜型トランスポータの機能特性について以下の新知見を得た。

側底膜型ペプチドトランスポータは、 $\delta$ -aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA) などの非ペプチド性化合物を輸送すること、またその親和性は PEPT1 よりも低いことを明らかにした。さらに、 $\delta$ -ALA は吸収方向選択的に経上皮輸送されること、PEPT1 と側底膜型ペプチドトランスポータが協調して  $\delta$ -ALA の経上皮輸送を媒介していることを見出した。従って、側底膜型ペプチドトランスポータは、PEPT1 と同様に非ペプチド性薬物に対して DDS の標的分子となり得ることが示唆された。

ペプチドトランスポータの典型的基質である glycylsarcosine (Gly-Sar) の efflux 解析、並びに 3-コンパートメントモデルに基づく速度論解析を行い、PEPT1 及び側底膜型ペプチドトランスポータの排出特性について解析した。その結果、pH 依存性や基質認識特性は輸送方向にかかわらず同一であるが、基質親和性は輸送方向によって顕著に異なることを明らかにした。さらに、両トランスポータの速度論パラメータ ( $K_m$ ,  $V_{max}$  値) を用いて、Caco-2 細胞における Gly-Sar 輸送を予測したところ、非定常状態における Gly-Sar 輸送をよく再現できたことから、速度論パラメータの妥当性が示された。

PEPT1 による基質の輸送は電流を伴い、pH や膜電位に依存することが知られているが、その詳細な分子機構は不明であった。そこで、PEPT1 を介した Gly-Sar (中性) 及び ceftibuten (アニオン) 輸送の pH 依存性の差異に着目し、 $H^+$  が基質認識部位にも結合するという仮説を立て、コンピュータシミュレーションによって考案した輸送モデルの検証を行った。その結果、Gly-Sar や荷電状態の異なる様々な基質の pH 依存性や膜電位依存性を包括的に再現できたことから、考案し

た輸送メカニズムが PEPT1 の輸送機構を反映していることが明らかになった。

以上の研究は、PEPT1 及び側底膜型ペプチドトランスポータの DDS 標的分子としての有用性を明らかにするとともに、輸送機構の数理的モデルという新たな手法を活用することによって、従来の検討方法では解析が困難であった機能特性を初めて解明したものである。これらの研究成果は、ペプチドトランスポータをターゲットとする医薬品分子設計や薬物の吸収評価法の構築に貢献すること大であり、薬物動態学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年3月7日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。