

親水性低分子に対する MA026 の上皮細胞層透過促進活性

須賀 敬海（筑波大学生物学類）

指導教員：臼井 健郎（筑波大学生命環境系）

背景・目的

上皮細胞にはタイトジャンクション (TJ) と呼ばれる細胞間接着構造が存在する。この構造は上皮を介した分子の移動を制限することで生体の恒常性維持を担っている一方で、親水性薬剤の吸収を妨げる原因ともなっている。そのため、TJ を開口させることで親水性薬剤の上皮を介した非侵襲的投与が可能になると考えられるが、生体にとって TJ は重要なバリア構造でもあるため、安全な薬剤投与のためには、「薬剤を透過させるときのみ TJ を開口させ、その後すみやかに閉じる」という可逆性が重要である。

MA026 (図 1) は微生物由来の環状デブシペプチドであり、TJ のバリア機能に最も重要な構成タンパク質である claudin-1 と結合することが示唆されている[1]。当研究室では、イヌ腎臓上皮細胞 MDCK II 細胞単層が形成する TJ に対して、MA026 が可逆的開口を誘導し、親水性高分子モデル物質である FD4 (4 kDa Dextran) の細胞層透過を促進することを明らかにしてきた[2]。このことから、バイオ医薬品を代表とする注射・点滴等の針を用いた投与法に頼らざるを得ない親水性高分子薬剤を、MA026 は非侵襲的（経口、経皮、経肺）で投与することを可能にすると考えられる。一方で、MA026 が低分子化合物（分子量 500 Da 以下）に対して透過促進活性を示すかどうかは検討されていなかった。そこで本研究では、親水性、及び疎水性の低分子化合物を用いて MA026 による低分子物質透過促進活性を検討することを目的に行った。

または MA026 を添加して、0.5, 1, 2, 5 時間後に Transwell 下層の HBSS を回収した。

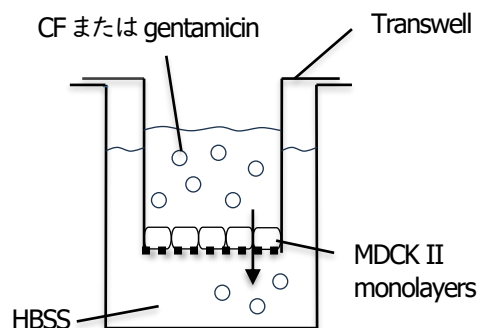


図2：Transwell を用いたアッセイの模式図

2. 透過物質量の定量

下層への透過した CF 量は、蛍光マルチプレートリーダー (Tecan, Spark) を用いて測定した蛍光強度 (Ex 490 nm, Em 520 nm) から定量した。Gentamicin の定量は、LC-MS (Shimadzu, 8045) を用いて以下のように行った。下層の溶液をフィルターでろ過した後、逆相カラム (Nacalai Tesque, Cosmosil 5C18-AR-II, 4.6 mm I.D. x 250 mm, Flow rate 1.0 mL/min) で分離し、分子量が 446.7, 463.6, 449.5 のピーク面積から、予め同様な方法で得た検量線を用いて算出した。

結果

詳細は発表会にて発表する。

参考文献

- [1] Shimura S., *et al.*, Total synthesis and anti-hepatitis C virus activity of MA026. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 18949-18956 (2013).
- [2] Kanda Y., *et al.*, MA026, an anti-hepatitis C virus compound, opens tight junction of the epithelial cell membrane. *J. Antibiot.*, **70**, 691-694 (2017).

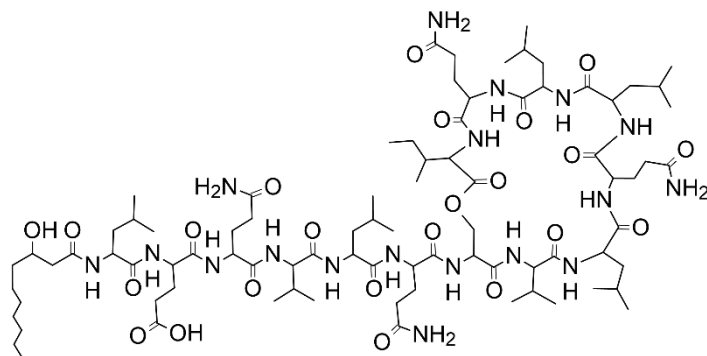


図1：MA026 の構造

材料

低分子化合物として、疎水性化合物の 5(6)-carboxyfluorescein (CF、分子量 376.3) と、親水性化合物の gentamicin C1、C2、C1a の混合物（それぞれ分子量 446.7, 463.6, 449.5）を用いた。

方法

1. Transwell を用いた物質透過アッセイ

上皮細胞層透過促進活性は、Transwell (Corning Cat# 3413) を用いて測定した (図 2)。MDCKII 細胞を Transwell に播種し、毎日培地交換を行った。7 日目に Hank's 平衡塩溶 (HBSS Nacalai Tesque Cat# 09735-75) に置換して 1 時間おいた後、CF、または gentamicin を含む HBSS 溶液に置換した。続いて、細胞層に DMSO