

論文内容要旨

報告 番号	甲 創 第 87 号	氏 名	網藤 惇
学位論文題目	中分子環状ペプチドおよび低分子ペプチド型プロドラッグの体内動態を規定する細胞膜輸送・代謝の分子機構解明		
<p>【目的】 ペプチドは、優れた標的選択性を示す創薬モダリティとして注目され、ペプチド医薬品の市場規模は年々拡大している。一方ペプチド創薬では、細胞膜透過性や代謝安定性の制御、及び脳関門や胎盤関門などの生体関門の突破が課題となっている。そこで、より高活性のペプチド医薬をデザインするためには、標的選択性だけでなく、細胞膜輸送システムを介したペプチドの細胞内への取り込みと細胞外への排出及び、細胞内における代謝の各過程を明らかにし、ペプチドの体内動態を制御する方法論を確立することが重要である。そこで本研究では、多様な薬理活性を有する環状ヘキサデブシペプチド Destruxin E (天然型) と低活性の立体異性体 (<i>ent</i> 体及び <i>epi</i> 体)、及び脳クレアチン欠乏症治療薬を指向して設計した低分子ペプチド型クレアチンプロドラッグ (CrP) をモデル化合物として、細胞膜輸送及び代謝動態を規定する分子機構を解明することを目的とした。</p> <p>【方法】 Destruxin E 及びその立体異性体の細胞内への取り込み、細胞外への排出及び代謝の各過程は、Destruxin E とヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) 及びヒト脳微小血管内皮細胞 (hCMEC/D3 細胞) とインキュベート後の細胞内の未変化体及び代謝物 (ジオール体) を定量することで評価した。CrP の細胞膜輸送は、<i>in vitro</i> 胎盤関門モデルとしてヒト胎盤栄養膜細胞 (BeWo 細胞) を用い、細胞内への未変化体の取り込み活性を評価した。Destruxin E とその代謝物、及び CrP の細胞内量は、液体クロマトグラフィーを連結した質量分析計を用い、絶対検量線法で定量した。</p> <p>【結果・考察】 HeLa 細胞及び hCMEC/D3 細胞と、Destruxin E 及びその立体異性体をそれぞれインキュベートした後の未変化体の細胞内蓄積量には有意差がなかった。一方ジオール体の細胞内蓄積量は、HeLa 細胞では Destruxin E と比較してその立体異性体をインキュベートした時に有意に高く、hCMEC/D3 細胞では、すべて定量限界以下であった。排出型トランスポーター P-glycoprotein/ABCB1 及び Breast cancer resistant protein/ABCG2 の阻害剤である elacridar の共存下で、HeLa 細胞と Destruxin E をインキュベートすると、未変化体には変化がない一方でジオール体の増加が示された。エポキシド代謝酵素 EPHX2 の阻害剤共存下において、HeLa 細胞と Destruxin E をインキュベートしたとき、未変化体蓄積量は有意に増加した。以上の結果から、Destruxin E の細胞膜輸送及び代謝の各過程には、排出輸送担体及びエポキシド代謝酵素がそれぞれに関与すること、代謝活性は立体異性体間で異なることが示唆された。BeWo 細胞における CrP の取り込みは、濃度依存性 (K_m 値: 294 μM) 及び、細胞内外の Na^+ と Cl^- の濃度勾配に依存しなかった。さらに CrP 取り込みに対して、クレアチンは阻害効果を示さなかった一方で、L-ロイシンは最も高い阻害活性を示し、次いで L-トリプトファン、L-アルギニン、L-グルタミン、及び L-シトルリンが中程度の阻害活性を示した。以上の結果から、ヒト胎盤関門における CrP の細胞膜輸送はクレアチン輸送担体に依存せず、L-トリプトファンに高感受性の取り込み型アミノ酸トランスポーターが担うことが示唆された。</p> <p>【結論】 環状ペプチド Destruxin E 及び低分子ペプチド型クレアチンプロドラッグの体内動態を規定する細胞膜輸送・代謝の分子機構として、排出型トランスポーターやエポキシド代謝酵素、及び取込み型トランスポーターの関与が、それぞれ明らかとなった。</p>			