

受賞者

近藤 昌夫

大阪大学大学院薬学研究科生体機能分子化学分野

研究テーマ

Claudin modulatorを用いた次世代薬物送達方法の開発

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

昨今のゲノム・プロテオーム研究とケミカルライブラリ研究の急速な進展に伴い、メタボリック症候群を含めた我が国五大疾患等に対する画期的な薬物治療戦略が提唱されるようになってきた。しかし一方で、ケミカルライブラリ等から創出された医薬品シーズ化合物の多くは難吸収性のものが多く、注射による投与を余儀なくされている。経皮投与経路はQOLの高い投与方法であるものの、元来皮膚は生体内外を隔てるバリアとして機能しており、ここに経皮投与方法確立の難しさがある。2002年に京都大月田グループにより細胞と細胞の間隙に存在するclaudin-1蛋白質によって細胞間隙がシールされ皮膚における物質の漏れ（移動）が阻害されていることが明らかにされ¹⁾、claudin-1制御技術が経皮投与技術になることが強く示唆されたものの、未だclaudinを利用した皮膚内物質透過方法の開発研究は皆無である。

Claudinのバリア機能を阻害する分子としては、ウェルシュ菌が産生する*Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) のC末ペプチド断片 (C-CPE) がclaudin-4阻害分子として唯一知られていた²⁾。そこで当グループでは、claudin-4阻害分子であるC-CPEを用いて、claudinの薬物送達における標的分子としての有用性について解析を試み、C-CPEがラット腸管においてカプリン酸の400倍もの吸収促進作用を示すこと、この吸収促進作用にはC-CPEとclaudin-4との相互作用が関与していることを見出し、claudinが薬物送達の標的分子として有用であることを実証した³⁾。

上述した当研究グループの研究成果を踏まえ、本研究では、C-CPEの機能ドメイン解析を行い、解析データを基にC-CPE誘導体フェージライブラリを作成し、claudin-1 binderのスクリーニングを試みた。

2. 方法

各種C-CPE変異体はHisタグ融合蛋白質として作製した。Claudin-4結合性はclaudin-4指向性蛋白質合成阻害分子 (C-CPE-PSIF) のclaudin-4発現L細胞に対する細胞障害性を指標に、各種C-CPE変異体の拮抗阻害実験により解析した。Claudin-4バリア制御活性はヒト腸管モデルとして汎用されているCaco-2細胞の単層膜培養系を用いて膜電気抵抗値を指標に解析した。

3. 結果 研究成果

過去の検討から、C-CPEのC末16アミノ酸中に機能ドメインが存在している可能性が示唆されていた⁴⁾。そこでまず、16アミノ酸を各々アラニンに置換したアラニン変異体を作製し、C-CPE-PSIFを用いた拮抗阻害実験によりclaudin-4結合性を解析したところ、Y306A、Y310A、Y312A、L315A変異体でclaudin-4結合性の著しい低下が観察された。次に、Caco-2細胞の単層膜培養系を用いてclaudin-4バリア制御活性を解析したところ、Y306A、Y312A、L315A変異体でclaudin-4バリア制御活性の低下が観察された (Table 1)。これら機能残基を複数アラニンに置換した変異体ではclaudin-4結合性およ

びclaudin-4バリア制御活性が共に消失していたことから (Table 2)、Y306、Y310、Y312、L315がC-CPEのclaudin-4 modulator機能に重要な役割を担っていることが示唆された。この結果を踏まえ、これら機能アミノ酸を中心に計5アミノ酸をランダムなアミノ酸に置換したC-CPE誘導体ファージライブラリを作製し、claudin-1発現細胞を用いてclaudin-1 binderのスクリーニングを試みた。しかしながら、本スクリーニング系では、天然型のC-CPEしか単離されず、天然型C-CPEはclaudin-1結合活性を持っていなかったことから、claudin-1発現細胞を用いたスクリーニング系は機能していない可能性が示唆された。そこで予備的にclaudin-4発現細胞を用いてC-CPE提示ファージの結合性を確認したところ、細胞に対するファージの非特異的吸着が認められ、claudin-4特異的な結合は観察されなかった。このことから、claudin発現細胞はclaudin-1 binderスクリーニング系として機能していないものと考えられた。

Table 1 Competitive inhibition of C-CPE-PSIF-induced LDH release by mutant C-CPEs

Wild-type or mutant C-CPE	Inhibitory ratio (% of C-CPE)
C-CPE	100
Ser304Ala	125.6 ± 0.7
Ser305Ala	126.8 ± 0.2
Tyr306Ala	63.8 ± 0.4
Ser307Ala	123.6 ± 2.2
Gly308Ala	99.1 ± 2.7
Asn309Ala	125.6 ± 1.8
Tyr310Ala	72.2 ± 2.3
Phe311Ala	114.9 ± 0.5
Tyr312Ala	73.1 ± 2.4
Ser313Ala	132.9 ± 0.8
Ile314Ala	94.3 ± 3.1
Leu315Ala	69.1 ± 2.7
Gln317Ala	96.8 ± 1.6
Lys318Ala	126.2 ± 2.1
Phe319Ala	111.5 ± 3.9

After a 1-h of treatment with C-CPE or mutant C-CPEs at 5 µg/ml, claudin-4-expressing L cells were treated with C-CPE-PSIF (0.2 µg/ml) for 36 h, and the release of LDH was determined. The results are shown as the percent of C-CPE-induced LDH release, and the values are the means ± SD (n=4).

Table 2 Effects of mutant C-CPEs on TJ barrier in Caco-2 cells

Wild-type or mutant C-CPE	Decreased ratio of TEER (% of C-CPE)
C-CPE	100
Ser304Ala	100.3 ± 0.5
Ser305Ala	100.1 ± 2.3
Tyr306Ala	64.1 ± 4.3
Ser307Ala	100.4 ± 1.8
Gly308Ala	98.1 ± 0.2
Asn309Ala	104.4 ± 1.3
Tyr310Ala	93.8 ± 1.2
Pro311Ala	101.4 ± 2.3
Tyr312Ala	100.1 ± 1.5
Ser313Ala	104.6 ± 0.8
Ile314Ala	98.3 ± 1.4
Leu315Ala	45.1 ± 5.3
Gln317Ala	98.8 ± 1.3
Lys318Ala	99.3 ± 0.8
Phe319Ala	103.5 ± 0.9

Caco-2 cells were seeded on a Transwell™. After development of the TJ barrier in Caco-2 cells, C-CPE or mutant C-CPEs was added at 20 µg/ml, and TEER was measured. The decrease in the ratio of TEER vs. C-CPE was calculated from the following equation: $100 \times (\text{difference in TEER between 0 and 18 h after treatment of the cells with each mutant C-CPE} \div \text{difference in TEER between 0 and 18 h after treatment with C-CPE})$. The values are means ± SD (n=4).

4. 考察 まとめ

本研究では、C-CPE誘導体ライブラリの作製には成功したものの、claudin binderスクリーニング系の問題から、claudin-1 binderの取得には至らなかった。当該研究期間終盤から新たなclaudin binderスクリーニング系の開発を進め、現時点で目的とするclaudinに対する特異的結合分子を選択しうるアッセイ系の確立に成功している。今後は、新規claudin binder探索系、および当該課題で作製したC-CPE誘導体ライブラリを有効活用し、claudin-1 modulator創出研究を進めていく予定である。

当該研究課題を推進するにあたりグラントサポートを賜りました財団法人病態代謝研究会に衷心よりお礼申し上げます。

5. 発表論文、参考文献

発表論文

1. Ebihara, C., Kondoh, M., Harada, M., et al. Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem Pharmacol*, *73*: 824-830, 2007.
2. Harada, M., Kondoh, M., Ebihara, C., et al. Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochem Pharmacol*, *73*: 206-214, 2007.
3. Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., et al. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem Pharmacol*, *75*: 1639-1648, 2008.

参考論文

1. Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, *156*: 1099-1111, 2002.
2. Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol*, *147*: 195-204, 1999.
3. Kondoh, M., Masuyama, A., Takahashi, A., et al. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol Pharmacol*, *67*: 749-756, 2005.
4. Takahashi, A., Kondoh, M., Masuyama, A., et al. Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin in its interaction with claudin-4. *J Control Release*, *108*: 56-62, 2005.