

平成 31 年 4 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19487

研究課題名(和文)脳疾患治療薬開発を劇的に加速させる新規血液脳関門制御技術の開発

研究課題名(英文)A novel technology for regulating blood brain barrier

研究代表者

岡田 欣晃(Okada, Yoshiaki)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50444500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管には異物侵入から脳を守る血液脳関門と呼ばれる機能がある。血液脳関門は本来脳を守る仕組みであるが、脳への薬の移行も妨げるため脳疾患治療薬の開発の妨げとなっている。本研究では、血液脳関門を一時的に緩め脳への薬の送達を促進する技術開発に取り組んだ。血液脳関門は、脳の血管内皮細胞の強い結合により生み出されるため、これを阻害するヒトClaudin-5に対する抗体の創製を行った。また、この抗体の血液脳関門制御活性を評価するためにヒト型のClaudin-5を持つマウスを作製し、抗体が血液脳関門を緩める活性を有する可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会の我が国ではアルツハイマー病など脳疾患の患者が増加の一途を辿っている。製薬企業の努力にもかかわらず、脳疾患治療薬の開発が難航する理由の一つに、薬の脳移行を妨げる血液脳関門の存在がある。本来、血液脳関門は、脳を異物侵入から守る生体防御機構であるが、脳疾患の薬の脳への移行も阻害してしまうため、優れた治療薬の候補分子が、脳に移行しないという理由で薬にならないという現状がある。我々の今回の研究は、血液脳関門を緩め、脳に効率よく薬を届ける技術の開発研究であり、今後の脳疾患治療薬開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The blood-brain barrier function of the cerebrovascular system protects the brain by preventing foreign matter from entering the brain. On the other hand, the blood-brain barrier also hinders the transfer of drugs to the brain, which hinders the development of drugs for treating brain diseases. In this study, we aimed to develop a technology to temporarily loosen the blood-brain barrier for the effective drug delivery to the brain. Since the blood-brain barrier is generated by tight junction of vascular endothelial cells, we generated anti-human Claudin-5 antibodies that inhibit the junction. In addition, in order to evaluate the blood-brain barrier control activity of these antibodies, we generated mice having human Claudin-5 and obtained data suggesting that the anti-Claudin-5 antibodies have the activity of loosening the blood-brain barrier.

研究分野：血管生物学

キーワード：血液脳関門 Claudin-5 抗体 血管内皮細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化、ストレス社会の我が国ではアルツハイマー病など中枢神経系疾患が増加の一途を辿っているが治療薬の開発は難航している。製薬企業の中枢神経系治療薬開発への注力にもかかわらず開発が難航する理由の一つに、脳内への薬物移行を阻む血液脳関門の存在がある。血液脳関門は、血管中から脳内への低分子(分子量約 1000 以下)の移行を阻害し、脳を異物侵入から守る重要な防御機構である。一方で、血液脳関門は脳への薬物の移行も阻害してしまため、優れた中枢神経系疾患治療効果を示す候補分子の開発が、脳へのデリバリー問題で中断している。そこで薬物の脳内移行性を高めるための「血液脳関門を制御する技術」の開発が望まれている。

2. 研究の目的

脳血管は、血管内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトの3種の細胞で構成されている。脳血管の強力なバリアである血液脳関門は、内皮細胞同士の密着結合により生み出されるが、この結合を主に担う分子が、内皮細胞に高発現する膜タンパク質 Claudin-5 である。我々はこの Claudin-5 の細胞外領域に強く結合する抗体を取得すれば、それを用いて一過的に血液脳関門を緩め、薬物の脳送達効率を高められるのではないかと考えた。そこで本研究では、Claudin-5 の細胞外ドメインに強く結合する抗体を創製し、それらの in vivo における血液脳関門制御活性を評価することを目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒト Claudin-5 の細胞外ドメインに強力に結合する抗体の創製を行う。ヒト Claudin-5 をマウスに免疫し、ハイブリドーマを樹立する。得られた複数のクローンから抗体を大量調製し、抗体の in vitro における血液脳関門制御活性を、カニクイザルの脳血管内皮細胞、アストロサイト、周皮細胞の共培養系を用いて評価する。

(2) 抗体の in vivo における血液脳関門制御活性を評価する系の構築を行う。ヒト Claudin-5 の細胞外領域に対する抗体はマウス Claudin-5 には結合しないため、マウスの Claudin-5 をヒト型に完全置換した「ヒト Claudin-5 マウス」を作製する。まず、マウス ES 細胞の Claudin-5 を相同組換えによりヒト型に置換する。次に、得られた ES 細胞をマウス受精卵にインジェクションしキメラマウスの作製を経てヒト Claudin-5 マウスを樹立する。最後に、得られたマウスに(1)で取得した抗体を投与し、血液脳関門を緩める活性があるかを、低分子蛍光トレーサーを用いて解析する。

4. 研究成果

(1) マウスに Claudin-5 を免疫し、脾臓から抗体産生細胞を取得、ハイブリドーマ作製を介し、複数のモノクローナル抗体を取得した。得られた抗体の種間交差性、他の Claudin ファミリー分子との交差性を FACS により解析した。その結果、これらの抗体はファミリー分子の中で Claudin-5 特異的に結合し、ヒト、サルの Claudin-5 の細胞外領域には結合するが、マウス、ラット型には結合しないことが明らかになった。また、これらの抗体の in vitro 血液脳関門制御活性の評価を、in vitro 血液脳関門モデル(脳血管内皮細胞、アストロサイト、周皮細胞の共培養系)を用いて評価したところ、抗体が血液脳関門のバリア機能を弱め、物質透過を促進する活性を有することが明らかになった(図1)。これらの結果から、Claudin-5 の細胞外領域に結合し、血液脳関門制御活性を有すると考えられる抗体を取得できたことが示された。

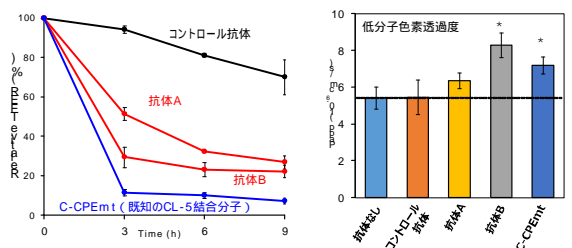


図1 取得した抗体の in vitro 血液脳関門制御活性の評価 (左:電気抵抗値測定、右:物質透過性評価)

(2) マウスの Claudin-5 をヒト型に置換したヒト Claudin-5 マウスの作製を行った。まず、マウス ES 細胞の Claudin-5 のコード配列を相同組換えにより、ヒト Claudin-5 に置換した。得られた ES 細胞が正常な核型を持つことを解析した後、マウス受精卵にインジェクションしキメラマウスを取得した。得られたキメラマウスを野生型マウスと交配しジャームライントランスミッションを確認した。得られたヘテロマウスを掛け合わせ、得られたマウスのジェノタイピングを行い、両アリルがヒト型に置換されたヒト

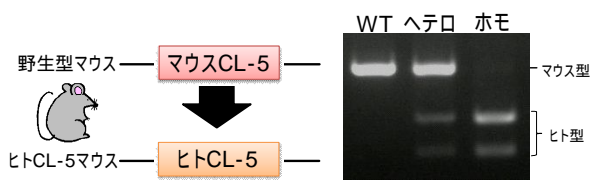


図2 ヒト Claudin-5 マウスのジェノタイピング結果

両アリルがヒト型に置換されたヒト

Claudin-5 マウスを樹立できたことを確認した(図2)。また、得られたヒト Claudin-5 マウスに低分子色素を投与したところ、脳血管からの漏出がみられなかったことから、ヒト Claudin-5 マウスにおいて正常な血液脳関門の活性が維持されていることを確認した。

(3) 構築したヒト Claudin-5 マウスを用いて抗体の in vivo 血液脳関門制御活性を評価した。(1)で取得した抗体をヒト Claudin-5 マウスに投与後、低分子蛍光色素を投与し、脳血管から脳側への色素漏出の度合いを、脳切片を作製して解析した。その結果、Claudin-5 抗体を高濃度で投与したマウスにおいて脳血管外への色素の漏出がみられ、Claudin-5 抗体が in vivo 血液脳関門制御活性を持つ可能性が示された。今後、抗体の血液脳関門制御活性の詳細を、抗体の作用時間や透過させられる分子サイズの観点から、さらに検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. Hashimoto Y, Okada Y, Shirakura K, Tachibana K, Sawada M, Yagi K, Doi T, Kondoh M. Anti-Claudin Antibodies as a Concept for Development of Claudin-Directed Drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019; 368(2):179-186. (査読有)
doi: 10.1124/jpet.118.252361.
2. Shirakura K, Ishiba R, Kashio T, Funatsu R, Tanaka T, Fukada SI, Ishimoto K, Hino N, Kondoh M, Ago Y, Fujio Y, Yano K, Doi T, Aird WC, Okada Y. The Robo4-TRAF7 complex suppresses endothelial hyperpermeability in inflammation. *J Cell Sci.* 2019; 132(1). pii: jcs220228. (査読有)
doi: 10.1242/jcs.220228.
3. Hashimoto Y, Zhou W, Hamauchi K, Shirakura K, Doi T, Yagi K, Sawasaki T, Okada Y, Kondoh M, Takeda H. Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5. *Sci Rep.* 2018; 8(1):8383. (査読有)
doi: 10.1038/s41598-018-26560-9.
4. Tanaka T, Izawa K, Maniwa Y, Okamura M, Okada A, Yamaguchi T, Shirakura K, Maekawa N, Matsui H, Ishimoto K, Hino N, Nakagawa O, Aird WC, Mizuguchi H, Kawabata K, Doi T, Okada Y. ETV2-TET1/TET2 Complexes Induce Endothelial Cell-Specific Robo4 Expression via Promoter Demethylation. *Sci Rep.* 2018; 8(1):5653. (査読有)
doi: 10.1038/s41598-018-23937-8.
5. Hashimoto Y, Hata T, Tada M, Iida M, Watari A, Okada Y, Doi T, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M. Safety evaluation of a human chimeric monoclonal antibody that recognizes the extracellular loop domain of claudin-2. *Eur J Pharm Sci.* 2018; 117:161-167. (査読有)
doi: 10.1016/j.ejps.2018.02.016.
6. Shirakura K, Ishiba R, Kashio T, Sakai M, Fukushima Y, Yamamoto N, Manabe S, Shigesada N, Tanaka T, Hino N, Aird WC, Doi T, Okada Y. Endothelial Robo4 regulates IL-6 production by endothelial cells and monocytes via a crosstalk mechanism in inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 495(1):801-806. (査読有)
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.067.
7. Takigawa M, Iida M, Nagase S, Suzuki H, Watari A, Tada M, Okada Y, Doi T, Fukasawa M, Yagi K, Kunisawa J, Kondoh M. Creation of a claudin-2 binder and its tight-junction-modulating activity in a human intestinal model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017; jpet.117.242214. (査読有)
doi: 10.1124/jpet.117.242214.
8. Hashimoto Y, Shirakura K, Okada Y, Takeda H, Endo K, Tamura M, Watari A, Sadamura Y, Sawasaki T, Doi T, Yagi K, Kondoh M. Claudin-5-Binders Enhance Permeation of Solutes across the Blood-Brain Barrier in a Mammalian Model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017; 363(2):275-283. (査読有)
doi: 10.1124/jpet.117.243014.
9. Krug SM, Hayaishi T, Iguchi D, Watari A, Takahashi A, Fromm M, Nagahama M, Takeda H, Okada Y, Sawasaki T, Doi T, Yagi K, Kondoh M. Angubindin-1, a novel paracellular absorption enhancer acting at the tricellular tight junction. *J. Control. Release.* 2017; 260:1-11. (査読有)
doi: 10.1016/j.jconrel.2017.05.024.

[学会発表](計 9 件)

1. Claudin-5 as a target for drug delivery to the brain by modulation blood-brain barrier. Yosuke Hashimoto, Keisuke Shirakura, Yoshiaki Okada, Hiroyuki Takeda,

- Kohki Endo, Maki Tamura, Akihiro Watari, Yoshifusa Sadamura, Tatsuya Sawasaki, Keisuke Tachibana, Takefumi Doi, Kiyohito Yagi, Masuo Kondoh
EXPERIMENTAL BIOLOGY 2019, 2019年4月7日, USA (ポスター発表)
2. 脳内に効率よく薬を運ぶための新しい血液脳関門制御技術. 岡田欣晃. 大阪大学 新技術説明会. 2019年2月5日, 東京 (口頭発表)
 3. 炎症時の血管透過性を制御するRobo4-TRAF7シグナルの解析. 小西博堯. 第5回血管生物若手研究会, 2019年3月8日, 石川県 (口頭発表)
 4. 血管内皮細胞特異的タンパク質 Robo4 による炎症血管の透過性制御, 岡田欣晃. 日本薬学会第139年会, 2019年3月22日, 千葉 (口頭発表、招待)
ETV2-TET1/2 Complexes Induce Endothelial Cell-Specific Robo4 Expression via Promoter Demethylation. Toru Tanaka, Kohei Izawa, Osamu Nakagawa, William C. Aird, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Takefumi Doi, Yoshiaki Okada
国際血管生物学会 (IVBM2018) 2018年6月5日, フィンランド (ポスター発表)
 5. Robo4 and its novel binding protein TRAF7 suppress vascular hyperpermeability in inflammation. Keisuke Shirakura, Ryosuke Ishiba, Taito Kashio, Risa Funatsu, William C. Aird, Takefumi Doi, Yoshiaki Okada. 国際血管生物学会 (IVBM2018) 2018年6月6日, フィンランド (ポスター発表)
 6. Development of claudin-5 modulators and evaluation of their in vitro permeation-activity of solutes across the blood-brain barrier in a mammalian model. Yosuke Hashimoto, Keisuke Shirakura, Yoshiaki Okada, Hiroyuki Takeda, Kohki Endo, Maki Tamura, Akihiro Watari, Yoshifusa Sadamura, Tatsuya Sawasaki, Keisuke Tachibana, Takefumi Doi, Kiyohito Yagi, Masuo Kondoh. 2018 CRS Annual Meetings & Exposition, 2018年7月22日, USA (ポスター発表)
 7. ETV2, an endothelial master transcription factor, induces endothelial cell-specific gene expression via promoter demethylation. Toru Tanaka, Kohei Izawa, Osamu Nakagawa, William C. Aird, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Takefumi Doi, Yoshiaki Okada
The 16th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, 2018年9月14日, 大阪 (ポスター発表)
 8. 人工デザイン膜タンパク質抗原を用いた Claudin-5 細胞外領域結合抗体の開発. 橋本洋佑, Zhou Wei, 浜内孝太郎, 白倉圭佑, 土井健史, 八木清仁, 澤崎達也, 岡田欣晃, 近藤昌夫, 竹田浩之. 第41回日本分子生物学会年会, 2018年11月29日, 神奈川 (ポスター発表)
 9. 血管内皮細胞特異的膜タンパク質 Robo4 の炎症における役割. 白倉圭佑, 櫻尾泰斗, 船津梨彩, William Aird, 土井健史, 岡田欣晃. CVMW2018 心血管代謝週間, 2018年12月7日, 東京 (口頭発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: Claudin 5 抗体、及びその抗体を含有する医薬

発明者: 岡田欣晃、近藤昌夫、橋本洋佑、白倉圭佑、土井健史、八木清仁、竹田浩之、澤崎達也

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2017/043497

出願年: 2017

国内外の別: 国外

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://seimeijohokaiseki.wixsite.com/tanpaku>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：樋野 展正
ローマ字氏名：Nobumasa Hino
所属研究機関名：大阪大学
部局名：薬学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：90469916

(2)研究協力者

研究協力者氏名：近藤 昌夫
ローマ字氏名：(KONDOH, masuo)

研究協力者氏名：竹田 浩之
ローマ字氏名：(TAKEDA, hiroyuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。