

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860078

研究課題名(和文) 腸管上皮バリアの回復に焦点をあてた新規炎症性腸疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Development of inflammatory bowel disease treatment by restoration of intestinal epithelial barrier functions

研究代表者

渡利 彰浩 (Akihiro, Watari)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80452465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてtight junction (TJ)バリアを制御可能なclaudin (CLDN) modulatorとしてdaunorubicinとrebeccamycinを同定した。DaunorubicinとrebeccamycinはDNA damageのセンサー分子であるATM/ATR kinaseを活性化した後、下流分子であるChk1が活性化される。Chk1は何らかの作用によりバリア機能強化分子であるCLDN-5の発現を誘導し、CLDN-5がTJへ移行することでバリア機能を上昇させた。また、CLDN2レポーターシステムを構築して新規CLDN2 modulatorの取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified daunorubicin and rebeccamycin as novel claudin modulators, which can enhance tight junction (TJ) barrier function in intestinal cells. Daunorubicin and rebeccamycin stimulate ATM and ATR kinases in the nucleus, resulting in activation of the downstream molecule, Chk1. Activated Chk1 increases claudin-5 expression, and the product of claudin-5 transitions to TJ following enhanced TJ-barrier. Furthermore, we constituted claudin-2 reporter system, and identified novel claudin-2 modulators from chemical library. In the future, we will investigate therapeutic effect of multiple claudin modulators for an inflammatory bowel disease.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：上皮バリア機能制御 炎症性腸疾患治療法 クロロデン発現

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス、エイズウイルスなど感染性病原体の多くは粘膜面を介して生体内に侵入することから、感染症対策の最重要基本戦略の第一は粘膜面に免疫防御網を構築し生体内への侵入を阻止すること、第二は粘膜面の防御網をすり抜け体内に侵入した病原体および感染細胞を排除するために全身系の体液性・細胞性免疫機構を構築することにある。ワクチンは感染症対策の切り札として期待されているものの、現在汎用されている注射型ワクチンでは全身系体液性免疫の誘導に限局され、粘膜面における侵入防御網の構築活性を持たず感染予防効果を期待できない。一方、粘膜ワクチンは、粘膜系免疫と全身系体液性・細胞性免疫の活性化能を併せ持つことから、効果的な感染予防・治療法であるといえる。なかでも経口ワクチンは、粘膜系免疫と全身系体液性・細胞性免疫の活性化能をもち、抗原分子の脳内移行の危険性が拭いきれない経鼻ワクチンと異なり、安全性も高いことを考慮すると理想的なワクチンと考えられる。しかしながら、消化酵素による分解を回避しつつ腸管粘膜免疫誘導組織パイエル板に抗原を効率的に送達するシステムが開発されていないことから、経口ワクチンの開発は立ち遅れているのが現状である。

近年、粘膜免疫組織を覆う上皮組織に tight junction 構成タンパク質である claudin-4 (CL-4) が高発現していることから、CL-4 を標的とした粘膜ワクチン開発の可能性が示唆されている。そこで当研究グループはこれまでに CL-4 binder として知られるウエルシュ菌毒素 C 末断片である C-CPE を利用し、CL-4 を標的とした経鼻粘膜ワクチン開発を試みた。モデル抗原として卵白アルブミン OVA と C-CPE 融合タンパクを用いて検証した結果、CL-4 を標的とした粘膜ワクチンの proof of concept の実証に成功した。次に、腸管粘膜免疫誘導組織パイエル板を覆う上皮組織にも CL-4 が高発現していることから、腸管粘膜免疫組織を標的とした経口粘膜ワクチンの開発を試みたが、抗体価の上昇は観察されなかった。この原因として、(1) 経口ワクチンは経鼻ワクチンに比して 10 倍以上の抗原を粘膜免疫組織に送達するため抗原送達量が低かったこと、(2) 抗原が消化酵素分解により分解されることが考えられた。この解決法として、(1) 腸管粘膜免疫組織への抗原送達率を高めるため、既存の C-CPE よりも高い CL4 結合性を示す C-CPE 変異体の創出する、(2) 消化酵素耐性であるリポソームに抗原を封入することにより、抗原の分解を回避するという方法が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、腸管粘膜免疫組織パイエル板に CL-4 が高発現していることに着目し、CL-4

指向性分子を修飾したリポソームを有効活用することで、初めてのパイエル板指向性経口ワクチン開発の基盤研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) C-CPE 構造変異体ライブラリの作製

CL-4 への結合に重要な C-CPE の C 末側を改変した C-CPE 構造変異体ライブラリを作製し、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体のスクリーニングを行った。

(2) C-CPE 変異体による抗原送達能の検証

モデル抗原である卵白アルブミン (OVA) と C-CPE 変異体との融合タンパク質を作製し、経鼻投与後の免疫賦活化作用を検証した。また、担がんマウスを用いることにより抗腫瘍ワクチン効果を検証した。

(3) C-CPE 変異体修飾リポソームの検証

OVA を封入した C-CPE 変異体修飾リポソームをハイドレーション法および凍結乾燥復水法により作製した。CL-4 発現細胞への結合性を確認するため FACS analysis を行った。In vivo での動態を検討するため、マウス腸内に C-CPE 変異体修飾リポソームを導入し、パイエル板を回収した後、リポソームの局在を観察した。

4. 研究成果

当グループが独自に開発した CL-4 binder である C-CPE (ウエルシュ菌下痢毒素の受容体結合領域である C 末側 14 kDa のポリペプチド断片) を prototype とし、C-CPE の C 末断側に存在し CL-4 への結合性に重要なアミノ酸残基を改変した C-CPE 構造変異体ライブラリを作製した。当ライブラリから従来の C-CPE に比して CL-4 への結合性が約 10 倍以上も優れた、C-CPE 変異体の取得に成功した。次に、取得した変異体の抗原送達能を確認するため、C-CPE 変異体とモデル抗原である OVA との融合タンパク質を作製した。本タンパク質をマウスに経鼻投与した結果、OVA 融合 C-CPE 変異体は OVA-C-CPE に比して有意な全身免疫および粘膜免疫の誘導活性が認められた。また、細胞性免疫および液性免疫に関しても各種サイトカイン、IgG サブクラスの上昇が観察された。さらに、OVA 融合 C-CPE 変異体によるワクチン効果を担癌モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の観点から評価したところ、OVA-C-CPE 投与群に比して OVA 融合 C-CPE 変異体投与群では有意な腫瘍増殖抑制効果が観察された。これらの成果から C-CPE 変異体は C-CPE に比して粘膜免疫組織への抗原送達が効率よく行えるものと考えられる。

CL-4 高結合性 C-CPE 変異体の取得に成功したことから、C-CPE 変異体を修飾したリポソームの経口ワクチン開発に向けた基礎的な検討を行った (帝京大鈴木亮博士との共同研

究)。抗原封入のための凍結乾燥復水操作によるリポソームの粒子径への影響は少ないことが明らかとなった。また、樹状細胞やマクロファージに効率的に抗原をデリバリーするために、PEG を修飾していない粒子径約 600 nm の OVA 封入 C-CPE 変異体修飾リポソームを調製した。この C-CPE 変異体修飾リポソームは CL-4 発現細胞に特異的に結合することをフローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡による検討から明らかとした。また、本リポソームの *in vivo* における動態を評価した結果、パイエル板への移行性を確認した。さらに一部のリポソームが抗原の取り込みを担う M 細胞にも到達していることを確認した。以上の結果より、C-CPE 変異体修飾リポソームは経口ワクチンとしての可能性を有することを確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. Li X., Saeki R., Watari A., Yagi K., Kondoh M., Tissue distribution and safety evaluation of a claudin-targeting molecule, the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin., *Eur J Pharm Sci.*, 52, 132-7, 2014
2. Iida M., Yoshida T., Watari A., Yagi K., Hamakubo T., Kondoh M., A baculoviral display system to assay viral entry., *Biol Pharm Bull.*, 36(11), 1867-9, 2013
3. Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Yagi K., Acute and chronic nephrotoxicity of platinum nanoparticles in mice. *Nanoscale Res Lett.* 8(1), 395, 2013.
4. Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K., Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice., *Pharmazie*, 68(3), 178-82, 2013.
5. Li Y., Higashiyama S., Shimakage M., Kawahara K., Yutsudo M., Watari A., Involvement of NANOG upregulation in malignant progression of human cells., *DNA Cell Biol.*, 32(3), 104-10, 2013.
6. Watari A., Nature of cancer explored from the perspective of the functional evolution of proto-oncogenes., *Yakugaku Zasshi*, 132(10), 1165-70, 2012.
7. Watari A., Yagi K., Kondoh M., A simple reporter assay for screening claudin-4 modulators., *Biochem Biophys Res Commun.*, 426(4), 454-60, 2012.
8. Takahashi A., Kondoh M., Suzuki H., Watari A. and Yagi K., Pathological changes in tight junctions and potential applications into therapies., *Drug Discov. Today*, 17(13-14), 727-32, 2012.
9. Watari A., Li Y., Higashiyama S., Yutsudo M., A novel proapoptotic gene PANO encodes a post-translational modulator of the tumor suppressor p14ARF., *Exp Cell Res.* 18(3), 187-95, 2012.

[学会発表](計 15 件)

1. Watari A., Hasegawa M., Yagi K., Kondoh M., Identification of chemical compounds that modulate claudin-4 expression by cell-based screening., The American society for Cell Biology, 2013, Dec 14-18, New Orleans, U.S.A.
2. Li X., Watari A., Yagi K., Kondoh M., Tissue-distribution and safety evaluation of a claudin-3/4 binder in mice., The American society for Cell Biology, 2013, Dec 14-18, New Orleans, U.S.A.
3. Doyama R., Matsuhisa K., Takahashi A., Matsuhisa K., Watari A., Hamakubo T., Yagi K., Kondoh M., Creation of a broadly specific claudin binder and its absorption-enhancing activity., 2013 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2013, Nov 10-14, San Antonio, U.S.A.
4. 土山遼、鈴木英彦、角谷英樹、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、Claudin を標的とした粘膜ワクチン技術の開発、第 32 回分子病理研究会、2013 年 7 月、奈良県、吉野町
5. 李相儒、近藤昌夫、渡利彰浩、八木清仁、Claudin-3 and -4 binder の体内動態解析および安全性評価、第 32 回分子病理研究会、2013 年 7 月、奈良県、吉野町
6. Suzuki H., Kunisawa J., Watari A., Yamashita M., Yagi K., Kondoh M., An improved claudin-targeting mucosal vaccine using a double alanine-substituted Mutant of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin., 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society 2013, 2013, Jul 21-24, Honolulu, HI, U.S.A.
7. Li X., Kondoh M., Watari A. and Yagi K., Tissue-distribution of claudin-3/-4 binder, the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, in mice., Experimental Biology 2013, 2013, Apr 20-24, Boston, U.S.A.
8. 渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、タイトジャンクションを標的とした創薬基盤研

- 究, 第 19 回 ハインガットクラブジャパンシンポジウム (招待講演), 2013 年 12 月, 東京
9. Suzuki H., Takahashi A., Matsushita K., Li X., Tsujino H., Watari A., Kondoh M., Aoyama H., Uno T. and Yagi K., Preparation of a broad-specific claudin binder by using *Clostridium perfringens* enterotoxin., *Experimental Biology* 2012, 2012, Apr 21-25, SanDiego, U.S.A.
 10. 鈴木英彦、山根誠司、角谷英樹、高橋梓、内田博司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、高親和性 claudin-4 binder の創製と粘膜ワクチンへの応用, 第 28 回 DDS 学会学術集会, 2012 年 7 月, 札幌
 11. 土山亮、長瀬翔太郎、鈴木英彦、李相儒、山根誠司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁, *Clostridium perfringens* enterotoxin 断片を利用した claudin 指向性吸収促進技術の安全性評価, 第 59 回トキシシンポジウム 2012 年 8 月, 北海道, 帯広市
 12. Yagi K., Yoshida T., Yamane S., Takayama K., Watari A., Kondoh M., Sakurai F., Sakamoto N., Mtsuura Y., Mizuguchi H., Evaluation of HCV infection and replication using human iPS cell-derived hepatocytes, HCV2012 19th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses, 2012, Oct 5-9, Venice, ITALY
 13. 渡利彰浩、岡田雅人、八木清仁、原がん遺伝子の機能進化から探る新たながん化メカニズムの解析, 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2012 年 10 月, 西宮, 兵庫県
 14. Watari A., Hasegawa M., Kondoh M. and Yagi K., Establishment of a cell-based screening system for chemical modulators of claudin expression., *Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia*, 2012, Dec 1-4, Merida, MEXICO
 15. Doyama R., Suzuki H., Matsushita K., Li X, Takahashi A., Matsuhisa K., Tsujino H., Watari A., Kondoh M., Aoyama H., Uno T. and Yagi K., Biochemical analysis of a claudin ligand that exhibits a broad binding specificity., *Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia*, 2012, Dec 1-4, Merida, MEXICO

〔その他〕

<https://sites.google.com/site/yakugakus-eitaikinounbunshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡利 彰浩 (WATARI AKIHIRO)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80452465