

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：24390042
研究課題名(和文) Claudinを標的とした経皮吸収促進技術の開発

研究課題名(英文) Claudin-1 as a target for modulation of epidermal barriers

研究代表者

近藤 昌夫 (Kondoh, Masuo)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50309697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ペプチド・蛋白質・核酸医薬品等の画期的バイオ医薬シーズが創製されつつあるものの、バイオ医薬は生体膜透過性に乏しい上に消化酵素によって分解されやすく、多くのバイオ医薬が注射による投与を余儀なくされている。

経皮投与は理想的な投与方法として注目されているものの、皮膚は外部環境から生体内部環境を保護するバリアとして機能しており、ここに経皮投与薬創製の難しさがある。本研究では、独自の生体バリア制御研究基盤を有効活用することで、皮膚の重層上皮バリア機能を担うClaudin-1 (CL-1) に着目し、CL-1 binderを用いてCL-1を標的とした経皮吸収促進戦略を検証した。

研究成果の概要(英文)：Epithelium plays pivotal roles in barriers that separate the inside of the body from the outside environment. Passage across epithelial barriers is the first step in drug absorption. Epidermal absorption is an ideal route for drug administration because it is non-invasive and easily controlled. Claudin-1 (CLDN1) seals tight junctions in the stratum granulosum, but whether modulation of CLDN1 enhances epidermal permeability is unclear. We developed anti-CLDN1 antibody, and we investigated the effect of an anti-CLDN1 antibody on the epidermal epithelial barrier by using human epidermal keratinocytes (NHEK), a popular in vitro model of human epithelial cell sheets. Treatment of NHEK monolayers with anti-CLDN1 antibody decreased the integrity of tight junctions between adjacent cells and enhanced the permeation of solutes across the cell sheets. These findings suggest that CLDN1 may be a target for specific modulation of epidermal barrier.

研究分野：薬物送達学

キーワード：タイトジャンクション 非侵襲性投与 Claudin

1. 研究開始当初の背景

皮膚の構造は、表面から順に角層、重層上皮細胞層、および真皮層によって構成されており、真皮層中に毛細血管が存在している。従来の経皮投与研究では、皮膚表面に存在する角層バリアの透過制御に焦点が当てられてきたものの、トログリチン等、皮膚透過性に優れた薬物について実用化されているに過ぎない。

1998年以降、京大月田グループにより、タイトジャンクション構成蛋白質claudin (CL) が皮膚や粘膜などの生体バリア能を担っていることが見出された。CLには27種類の亜分子が存在し、発現およびバリア能には組織特異性がある。2002年、角層の下部に存在する重層上皮細胞層にCL-1が存在し、CL-1によって重層上皮細胞層における物質透過が抑制されていることが証明され、従来の「皮膚バリア=角層」という概念から、「皮膚バリア=角層+重層上皮細胞層」という新たな概念が提唱され、CL-1バリア制御法が経皮投与薬創製の基盤技術となることが示唆された(J. Cell Biol., 156, 1099, 2002)。しかしながら、CLは抗原性が低い上に蛋白質精製も難しく、CL-1 modulatorの創製は皆無であり、依然として角層バリア制御に基づいた経皮投与研究しか進展していない。

まず、申請者は、平成 15-16 年度科研費萌芽研究 (課題名:タイトジャンクション構成分子 claudin を標的とした新規吸収促進戦略) において、リリシ菌下痢毒素断片 (C-CPE) が臨床応用されている吸収促進剤であるカプリン酸に比して 400 倍の薬物吸収促進活性を有すること、この吸収促進活性には C-CPE と CL-4 との相互作用が必須であることを見出し、世界に先駆けて CL modulator を利用した薬物送達法の有用性を証明した(Mol. Pharmacol., 67, 749, 2005 他)。さらに、平成 18-19 年度科研費若手研究 B (課題名: Claudin modulator を利用した新規薬物送達方法の構築) において、C-CPE をプロトタイプとして用いた新規 CL modulator 創製を図るために、C-CPE の機能ドメインを同定した (Biochem. Pharmacol., 75, 1639, 2008 他)。次に、機能ドメインをランダムなアミノ酸に置換した C-CPE 変異体提示ファージライブラリ (ライブラリサイズ: 5.6×10^7 種類) を作製し、各種 CL 発現細胞や CL 細胞外領域の合成ペプチドを用いて CL modulator のスクリーニングを試みたものの、C-CPE 変異体提示ファージが非特異的に吸着してしまい、これらのシステムはスクリーニング系として機能しなかった。

東大先端研浜窪隆雄博士は、膜蛋白質がバキユロウイルス (BV) 上に intact な状態で高密度提示されることを見出し、膜蛋白質提示 BV を利用

したリガンドスクリーニングを実施していた。そこで、平成 21-23 年度科研費若手研究 A (課題名: Claudin modulator を利用した非侵襲性投与技術の開発) において、CL 提示 BV を用いた CL modulator スクリーニング系を構築し、C-CPE に比して 20 倍以上の CL-4 結合性を有する C-CPE 変異体、CL-1、-2、-4、-5 に結合性を示す broad-specific CL binder を創製した。これらの binder は優れた CL バリア制御活性を有しており、CL 提示 BV が CL modulator 創製系として機能することを見出している (PLoS One, 6, e16611, 2011; Biochem. Biophys. Res. Commun., 410, 466, 2011 他)。また、CL 提示 BV を免疫した CL 欠損マウスの脾臓を用いて一本鎖抗体 (scFv) ライブラリを作製し、CL 結合性 scFv の創出にも成功している (FASEB J., 25, 620.12, 2011)。

以上、これまでに、C-CPE 変異体ライブラリ、scFv ライブラリ、および CL 提示 BV などを用いた CL modulator 創製システムを構築してきた。

2. 研究の目的

上述した独自の CL modulator 研究の成果をシステムアップすることで、当該申請課題では、CL-1 binder を創製、本 binder の皮膚バリア制御活性を解析し、CL-1 を標的とした経皮吸収促進戦略の可否について検証を試みた。

3. 研究の方法

(1) CL-1 抗体の作製

CL-1 発現プラスミドを自己免疫疾患マウス皮下に免疫、抗体価の上昇が観察されたマウスの皮下リンパ組織から B 細胞を採取し、常法に従いハイブリドマを作製した。CL-1 発現細胞を用いた FCM 解析により、CL-1 抗体産生クローンのスクリーニングを行った。

(2) CL-1 抗体の結合特異性解析

各 CL 発現細胞を用いた FCM 解析により、CL-1 抗体の CL 結合特異性を詳細解析した。

(3) CL-1 抗体のバリア制御活性

ヒト皮膚モデルとして汎用されている正常ヒト新生児包皮表皮角化細胞 (NHEK 細胞) の重層培養系を用いて、皮膚バリア制御活性を評価した。

NHEK 細胞を trans well に播種し、実験前培養を行った。抗 CL-1 抗体を添加し、その後経時的にバリア機能の指標である経上皮電気抵抗値 (TEER 値) を測定した。

さらに、抗体添加 48 時間後に、分子量 4,000

のトレーサーを用いて経皮吸収促進活性を評価した。

4. 研究成果

CL-1 発現マウスを免疫した BXS B マウス 20 匹のうち 3 匹で、血清中に CL-1 抗体の産生が認められた。抗体価の上昇が認められたマウスの皮下リンパ組織より B 細胞を採取し、常法に従いハイブリドーマを作製した。その後、内在性の CL-1 発現細胞および CL-1 欠損株を用いた FCM 解析により、CL-1 抗体産生細胞をスクリーニングし、CL-1 抗体産生ハイブリドーマを 4 株樹立した。IgA タイプを解析したところ、IgG2b が 2 クローン、IgG2a が 1 クローン、IgG1 が 1 クローン含まれていた。

いずれの抗体クローンも CL-2、CL-4、CL-5、CL-6、CL-7 および CL-9 発現細胞には結合せず、CL-1 発現細胞特異的な結合性を有していた。

次に、ヒト皮膚モデルとして汎用されている NHEK 細胞の重層培養系を用いてバリア制御活性等を検討した。4 クローンいずれも TEER 値の上昇(バリア機能)を抑制した。このうち 1 クローンについて詳細解析したところ、分子量 4 千のデキストランの透過性を亢進していた。CL-1 抗体はヒト腸管モデル細胞系ではバリア阻害活性を有していなかったことから、CL-1 を標的とすることで皮膚バリアを特異的に制御できるものと推察される。

現在、CL-1 抗体の北極性の詳細解析を進めおり、立体構造解析等も視野に入れつつ druggable CL-1 binder の開発を進めていく予定である。

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 15 件)

1. Iida, M.; Yoshida, T.; Watari, A.; Yagi, K.; Hamakubo, T.; Kondoh, M. A baculoviral display system to assay viral entry. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36, 1867-1869.
2. 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*, 2014, 52, 1532-1537.
3. Iida, M.; Yagi, K.; Kondoh, M. The cutting edge of claudin-targeted drug development. *Membrane*, 2013, 38, 174-180.
4. Nagase, S.; Doyama, R.; Yagi, K.; Kondoh, M. Recent advances in claudin-targeting technology. *Bio Pharm Bull*, 2013, 36, 708-714.
5. Shimizu, Y.; Nagase, S.; Yagi, K.; Kondoh, M. The new era of epithelium-targeted drug development. *Yakugaku Zasshi*. 2014, 134, 641-645.
6. Kondoh, M.; Kunisawa, J. The cutting edge of epithelium-targeted drug development. *Yakugaku Zasshi*. 2014, 134, 613.
7. Suzuki, H.; Kondoh, M.; Yagi, K.; Kiyono, H.; Kunisawa, J. The development of mucosal vaccine using bacterial function for targeting mucosal tissues. *Yakugaku Zasshi*. 2014, 134, 629-634.
8. Sung, P.S.; Murayama, A.; Kang, W.; Kim, M.S.; Yoon, S.K.; Fukasawa, M.; Kondoh, M.; Kim, J.S.; Kim, H.; Kato, T.; Shin, E.C. Hepatitis C virus entry is impaired by claudin-1 downregulation in diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT1)-deficient cells. *J Virol*, 2014, 88, 9233-9244.
9. Li, X.; Iida, M.; Tada, M.; Watari, A.; Kawahigashi, Y.; Kimura, Y.; Yamashita, T.; Ishii-Watabe, A.; Uno, T.; Fukasawa, M.; Kuniyasu, H.; Yagi, K.; Kondoh, M. Development of an anti-claudin-3 and -4 bispecific monoclonal antibody for cancer diagnosis and therapy. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 351, 206-213.
10. 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*, 2014, 52, 132-137.
11. Watari, A.; Hasegawa, M.; Yagi, K.; Kondoh, M. Homoharringtonine increases intestinal epithelial permeability by modulating specific claudin isoforms in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 89, 232-238.

12. Yamashita, M.; Iida, M.; Tada, M.; Shirasago, Y.; Fukasawa, M.; Nagase, S.; Watari, A.; Ishii-Watabe, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Discovery of anti-claudin-1 antibodies as candidate therapeutics against hepatitis C virus. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 353, 112-118.
 13. Fukasawa, M.; Nagase, S.; Shirasago, Y.; Iida, M.; Yamashita, M.; Endo, K.; Yagi, K.; Suzuki, T.; Wakita, T.; Hanada, K.; Kuniyasu, H.; Kondoh, M. Monoclonal antibodies against extracellular domains of claudin-1 block hepatitis C virus infection in a mouse model. *J Virol*, 2015, 89, 4866-4879.
 14. Watari, A.; Hashegawa, M.; Muangman, T.; Yagi, K.; Kondoh, M. Use of cell-based screening to identify small-molecule compounds that modulate claudin-4 expression. *Biotechnol Lett*, 2015, 37, 1177-1185.
 15. Suzuki, H.; Watari, A.; Hashimoto, E.; Yonemitsu, M.; Kiyono, H.; Yagi, K.; Kondoh, M.; Kunisawa, J. C-terminal *Clostridium perfringens* enterotoxin is an efficient nasal vaccine delivery system for pneumococcal vaccine. *PLoS One*, 10, e0126352, 2015.
- [学会発表](計 31 件)
1. Shimizu, Y.; Kondoh, M.; Watari, A.; Fukasawa, M.; Yagi, K. Effect of claudin on cytochrome P450 activity. Experimental Biology 2013, Apr 20-24, 2013, Boston, MA, USA
 2. Yamashita, M.; Nagase, S.; Takahashi, A.; Iwanari, H.; Kondoh, M.; Watari, A.; Hamakubo, T.; Yagi, K. Characterization of scFv libraries derived from mice differently immunized with claudin. Experimental Biology 2013, Apr 20-24, 2013, Boston, MA, USA
 3. Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Watari, A.; Kondoh, M.; Fukasawa, M.; Yagi, K. Development of anti-claudin-1 ligand. Experimental Biology 2013, Apr 20-24, 2013, Boston, MA, USA
 4. Iida, M.; Kondoh, M.; Watari, A.; Yagi, K. A toxicological evaluation of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin as a claudin-3/-4 binder. Experimental Biology 2013, Apr 20-24, 2013, Boston, MA, USA
 5. Li, X.; Kondoh, M.; Watari, A.; Yagi, K. Tissue-distribution of claudin-3/-4 binder, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, in mice. Experimental Biology 2013, Apr 20-24, 2013, Boston, MA, USA.
 6. Kondoh, M.; Yagi, K. Bicellular or tricellular tight junction binders and their pharmaceutical activities. Gordon research seminar, June 1-2, 2013, Lucca, Italy.
 7. Kondoh, M.; Yagi, K. Bicellular or tricellular tight junction binders and their pharmaceutical activities. Gordon research conference, June 3-6, 2013, Lucca, Italy.
 8. Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Claudin-1-specific monoclonal antibodies and their inhibition of hepatitis C virus infection. 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 21-24, 2013, Honolulu, Hawaii, USA.
 9. Suzuki, H.; Kuniawa, J.; Yamashita, M.; Watari, A.; 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, July 21-24, 2013, Honolulu, Hawaii, USA.
 10. Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Shirasago, Y.; Fukasawa, M.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Claudin-1-specific monoclonal antibodies and their inhibition of hepatitis C virus infection ILCA 2013: International Liver Cancer Association Seventh Annual Conference,

- Sep13-15, 2013, Washington, D.C. USA
11. Fukasawa, M.; Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Shirasago, Y.; Watari, A.; Suzuki, T.; Wakita, T.; Yagi, K.; Kondoh, M. Inhibition of hepatitis C virus infection by mouse anti-claudin 1 monoclonal antibodies., HCV201320th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses 2013, Oct 6-10, 2013, Melbourne, Australia.
 12. Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Fukasawa, M.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Development of monoclonal antibodies to the extracellular loop regions of claudin-1 and their application to HCV therapy, 2013 AAPS Annual Meeting and Exposition, Nov 10-14, 2012, San Antonio, TX, USA.
 13. Doyama, R.; Matsushita, 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, Nov 10-14, 2012, San Antonio, TX, USA.
 14. Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Shirasago, Y.; Fukasawa, M.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Claudin-1-specific monoclonal antibodies and their inhibitory activity against hepatitis C virus infection. Antibody Engineering & Therapeutics 2013, Dec 8-12, Huntington Beach, CA, USA.
 15. Iida, M.; Li, X.; Kuniyasu, H.; Fukasawa, M.; Tada, M.; Ishii, A.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Development of claudin-4-specific monoclonal antibodies and their anti-tumor activities. Antibody Engineering & Therapeutics 2013, Dec 26-12, Huntington Beach, CA, USA.
 16. Li, X.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Tissue-distribution and safety evaluation of a claudin-3/-4 binder in mice. 53rd Annual meeting of the American society for cell biology, Dec 14-18, 2013, New Orleans, LO, USA.
 17. Fukasawa, M.; Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Shirasago, Y.; Hanada, K.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. In vitro and in vivo inhibition of hepatitis C virus infection by mouse anti-human claudin 1 monoclonal antibodies. 53rd Annual meeting of the American society for cell biology, Dec 14-18, 2013, New Orleans, LO, USA.
 18. Watari, A.; Hasegawa, M.; Yagi, K.; Kondoh, M. Identification of chemical compounds that modulate claudin-4 expression by cell-based screening. 53rd Annual meeting of the American society for cell biology, Dec 14-18, 2013, New Orleans, LO, USA.
 19. Iida M, Nagase S, Yamashita M, Shirasago Y, Fukasawa M, Tada M, Ishii-Watabe A, Watari A, Yagi K and Kondoh M. In vivo inhibition of hepatitis C virus infection by anti-Claudin-1 monoclonal antibodies. Experimental Biology 2014, 2014年4月26日~30日 (San Diego, USA)
 20. Iguchi D, Hayaishi T, Krug SM, Watari A, Fromm M, Yagi K and Kondoh M. Modulation of the epithelial barrier by a fragment of *Clostridium perfringens* iota-toxin. Experimental Biology 2014, 2014年4月26日~30日 (San Diego, USA)
 21. Kawahigashi Y, Li X, Kuniyasu H, Fukasawa M, Tada M, Ishii-Watabe A, Watari A, Yagi K and Kondoh M. Development and anti-tumor activities of claudin-4-specific monoclonal antibodies. Experimental Biology 2014, 2014年4月26日~30日 (San Diego, USA)
 22. Kimura Y, Li X, Iida M, Tada M, Ishii-Watabe A, Watari A, Fukasawa M, Yagi K and Kondoh M. Tumor-targeting and anti-tumor activity of anti-claudin-3/-4 antibody. Experimental Biology 2014, 2014年4月26日~30日 (San Diego, USA)
 23. Nakajima M, Yamashita M, Watari A, Yagi K, Fukasawa M and Kondoh M. Claudin-1 as a target for modulation of epidermal barriers. Experimental Biology 2014, 2014年4月26日~30日 (San Diego, USA)
 24. Li X, Kimura Y, Iida M, Kuniyasu H, Fukasawa M, Tada M, Ishii-Watabe A, Watari A, Yagi K and Kondoh M.

- Anti-tumor activity of a novel monoclonal antibody recognizing claudin-3 and -4. 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. 2014年7月5日～8日 (Munich, Germany)
25. Iida M, Nagase S, Yamashita M, Shirasago Y, Fukasawa M, Tada M, Ishii-Watabe A, Watari A, Yagi K and Kondoh M. In vivo inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 monoclonal antibodies. The 41st Annual Meeting & Exposition of the controlled Release Society. 2014年7月13日～16日 (Chicago, USA)
26. Kimura Y, Li X, Iida M, Tada M, Ishii-Watabe A, Fukasawa M, Kawahigashi Y, Watari A, Yagi K and Kondoh M. Development and anti-tumor activity of a novel anti-human claudin-3/-4 dual-specific antibody. The 41st Annual Meeting & Exposition of the controlled Release Society. 2014年7月13日～16日 (Chicago, USA)
27. Iida M, Yamashita M, Nagase S, Tada M, Sahirasago Y, Fukasawa M, Watari A, Ishii-Watabe A, Yagi K and Kondoh, M. Anti-human claudin-1 antibodies inhibit a Hepatitis C Virus infection in vivo. 21st International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses (HCV2014) 2014年9月7日～11日 (Banff, Canada)
28. Kohdoh M and Yagi K. Paracellular or Transcellular Transport? Two Promising Approaches for the Oral Delivery Of Macromolecules. 2014 AAPS Annual Meeting and Exposition. 2014年11月2日～6日 (San Diego, USA)
29. Iida M, Yamashita M, Nagase S, Tada M, Shirasago Y, Fukasawa M, Watari A, Ishii-Watabe A, Yagi K and Kondoh M. Anti-human claudin-1 monoclonal antibodies as anti-Hepatitis C Virus agents. Antibody Engineering & Therapeutics 2014. 2014年12月7日～11日 (Huntington Beach, USA)
30. Hata T, Nagase S, Shirasago Y, Fukasawa M, Watari A, Yagi K and Kondoh M. Epitope mapping of an anti-claudin-1 monoclonal antibody and its

- application to preclinical drug discovery. Antibody Engineering & Therapeutics 2014. 2014年12月7日～11日 (Huntington Beach, USA)
31. Kimura Y, Li X, Iida M, Tada M, Watabe-Ishii A, Fukasawa M, Kawahigashi Y, Watari A, Yagi K and Kondoh M. Development of a Novel Bispecific Anti-Claudin Antibody and its Anti-Tumor Activity. Antibody Engineering & Therapeutics 2014. 2014年12月7日～11日 (Huntington Beach, USA)

〔産業財産権〕

出願状況 (計2件)

名称: 抗体、フラグメント及び抗 HCV 治療剤

発明者: 近藤昌夫、深澤征義、石井明子、多田稔、八木清仁、渡利彰浩

権利者: ヒューマンサイエンス振興財団、大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2013—038059

PCT/JP2013/006602

出願年月日: 平成 25 年 2 月 28 日、平成 25 年 11 月 8 日

国内外の別: 国内外

名称: 抗体、フラグメント、医薬組成物、分子及び腫瘍マーカー

発明者: 近藤昌夫、國安弘基、深澤征義、石井明子、多田稔、八木清仁

権利者: ヒューマンサイエンス振興財団、奈良県立医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2013—40211

PCT/JP2014/001039

出願年月日: 平成 25 年 3 月 1 日、平成 25 年 2 月 27 日

国内外の別: 国内外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤昌夫 (Kondoh Masuo)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 50309697