

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460222

研究課題名(和文)分子制御機構に基づく次世代医薬品の生体膜透過制御戦略

研究課題名(英文)Strategic approach based on molecular mechanism for modulation of barrier function of tight junction to enhance delivery of new biopharmaceuticals

研究代表者

渡辺 善照(WATANABE, Yoshiteru)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70175131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、次世代バイオ医薬品の上皮細胞透過促進を図るために分子制御機構に基づき細胞間密着結合(TJ)のバリアー機能を調節する方法を検討した。MDCK及びCaco-2細胞層において、ウェルシュ菌内毒素の毒素活性を除去したC末断片及びカプリン酸ナトリウム(C10)を用いて、細胞層の電気伝導度()の時間的変化、TJ作用物質のターゲット分子、遺伝子導入効率を高める方法を調べた結果、 の時間的変化からパーコレーション現象がとTJ変化に関与すること、Sec61 分子がTJ構成タンパク質のクローディンと共存してTJ開閉速度を調節すること、C10の併用で遺伝子導入効率が増加することが示された。

研究成果の概要(英文)：Aim of the present study was to investigate the method for modulation of barrier function of tight junction (TJ) in epithelial cells to enhance delivery of new biopharmaceuticals. We studied the time course of electrical conductivity () in MDCK and Caco-2 cells upon treatment with modulators, the C-terminus fragments of clostridium perfringens enterotoxin and sodium caprate (C10). Percolation is the operative mechanism for increase in through TJ modulation. Sec61 overexpression increased TJ modulation rates, in conjunction with enhanced delivery of claudin-4 from and to plasma membranes. Sec61 may be a novel TJ modulation target, including modulation rates for drug delivery system. For gene transfer into cells, the binding ability of adenovirus (Ad) vectors with the receptor (CAR) was found to be important. A novel gene transfer method using transduction with Ad vectors in the presence of C10 led more efficiently to gene expression in Caco-2 cells than Ad vector alone.

研究分野：薬剤学、薬物送達法(DDS)

キーワード：生体膜透過制御機構 生体膜透過バリアー機能 高分子薬物透過促進 タイトジャンクション バイオ医薬品DDSの基礎研究 吸収促進法

1. 研究開始当初の背景

近年、従来の有機化合物を中心とした医薬品に代わり、タンパク質やペプチド構造を有するいわゆるバイオ医薬品が創製され、新しい薬物療法が展開されつつある。さらに、抗体医薬品なども実現し、これらのバイオ医薬品（高分子薬物）が次世代の治療薬の中心になることは間違いない。次世代の高分子薬物の療法において適正な治療効果を得るためには、これらを適用部位から作用（標的）部位に到達させるまでの過程において生体膜が有するバリアー機能の調節が、従来の低分子薬物に増して不可欠である。すなわち、高分子薬物の上皮細胞層および内皮細胞層の薬物透過制御が薬物治療の成否を握っている。特に、吸収過程においては高分子薬物透過の障壁として多くの問題が残されており、より安全で有効な治療法に繋げるために生体膜透過性の向上あるいは制御法を科学的に構築することは極めて重要である。生体膜透過調節により、有効な高分子薬物療法へつながることが可能となれば、医療の進歩に少なからずインパクトを与えることになる。今後多数創製されてくる次世代バイオ医薬品並びに既知のバイオ医薬品の作用性の向上を図るために、創薬及び育薬研究として不可欠の課題と考えられる。しかし、これまでこの命題に対する解決法を求めするために研究が数多く行われてきているが、明確な解答は得られていない。

近年、細胞層のタイトジャンクション(TJ)を構成するタンパクの一つとしてクローディン(CLDN)が同定され、物質透過制御機能を有する分子として報告された。我々は、CLDN が細胞間隙経路を介した薬物送達方法の構築に際し標的分子として有用であることを世界に先駆けて見出した (*Mol. Pharmacol.*, 2005, ほか)。また、CLDN を標的分子として透過促進作用をもたらす物質としてウェルシュ菌エンテロトキシン(CPE)の毒性活性を無くした C 未断片(C-CPE)に着目し、活性部位を明らかにしてきた (*Biochem. Pharmacol.*, 2007, ほか)。

さらに、我々は高分子薬物の生体膜透過あるいは細胞内取り込みに関して、エンドサイトーシス、ピノサイトーシスに着目してきた。別途検討を進めてきたアデノウイルス(Ad)感染機構と遺伝子導入効率のよいファイバー改変型 Ad ベクターの開発 (*Biol. Pharm. Bull.*, 2006, *Placenta*, 2006, ほか)の研究実績から、Ad のカプシドタンパク質が高分子薬物の細胞内への送達を高めるなど新たなこの機能性物質(生体膜透過促進ペプチド)として働く可能性を見出した。

これまで明らかにされた現象論レベルから生体膜透過性調節に機能する分子を標的とした実証的機能解析を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的の一つは、特に上皮細胞のバリアー機能に關与する分子を解明するとともに、高分子薬物透過調節に関わる新たなターゲット分子を同定することにある。また、我々が明らかにしたエンドサイトーシス促進作用物質の標的分子を探索するとともに、発現・機能が確認された標的分子やトランスポーターについて、高分子薬物透過促進の構築を図る。ヒトでは個体的レベルでのノックアウト、ノックダウンなどの遺伝子の改変は不可能であることから、個別遺伝子の実証的解析技術としては遺伝子導入技術の利用が現段階では最も有効な方法論になりうる。特に、個別遺伝子の実証的解析方法として最適な手法の一つと考えられる RNA 干渉技術、及び既存の方法の中で最も遺伝子導入効率が高いとされている Ad ベクターを用いるほか、多面的な実験方法により生体膜透過調節の分子制御機構を解明し、次世代医薬品(高分子薬物)の作用性向上の基盤を新構築することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) TJ 開口過程の解明-物理モデルの構築と実験的検証(パーコレーション解析) -

TJ 開閉の時間変化を説明するための物理モデルを構築し、実験的に検証するとともに、TJ 開閉の時間変化を制御する因子を解明することを目的とした。消化管上皮細胞の薬物透過モデルとして用いられるヒト結腸癌由来細胞(Caco-2)と、イヌ腎尿管由来細胞(MDCK)細胞を用い、吸収促進剤として唯一臨床で使用実績のあるカプリン酸ナトリウム(C10)及び研究段階ではあるが CLDN-3、CLDN-4 などと特異的に結合し TJ を開口する C-CPE を使用し TJ 開口の時間変化について検討した。まず、TJ バリアー状態の指標として経上皮細胞膜電気抵抗(TER)の逆数である電気伝導度(Σ_{TJ})の経時変化を計測することによって、TJ 開口物質(C10またはC-CPE)をCaco-2細胞またはMDCK細胞の単層膜に作用させた際の、TJ 開閉の時間変化を詳細に検討した。次いで、得られた TJ 開閉状態を表す Σ_{TJ} の時間変化を説明する物理モデル(ランダム抵抗網)を構築し、 Σ_{TJ} の時間変化を記述する方程式をパーコレーション理論に基づき解析することによって、モデルの妥当性を検証した。

(2) MDCK 細胞における Sec61 β 遺伝子の TJ バリアー機能に及ぼす影響

TJ スtrandの本体である CLDN の合成速度の亢進、CLDN の輸送速度の亢進等によって TJ 開閉速度を向上できると考えられるため、CLDN の輸送速度を亢進することで、TJ スtrandの解離・形成速度の亢進を通じて、TJ 開閉速度を向上させる方策について検討した。このため、タンパク質の細胞内輸送促進作用があるという報告がなされている Sec61 β に着目した。Sec61 β の過剰発現が TJ

バリアー状態や TJ 開口・再形成速度に及ぼす影響を明らかにするために、Sec61 β 発現プラスミドを導入した MDCK 細胞 (MDCK(Sec))、及びコントロールプラスミドを導入した MDCK 細胞 (MDCK(Cont)) を作製し、C-CPE を添加・除去した時の、TJ バリアー状態、TJ 開閉速度、CLDN の発現量や分布の変化に加え、Sec61 β と CLDN の結合性について評価した。

(3) Caco-2 細胞における C10 使用時の効率的 Ad 遺伝子導入方法

Ad ベクターは遺伝子治療や *in vitro/in vivo* 実験での遺伝子導入技術に広く使用されているが、上皮細胞における Ad ベクター遺伝子導入効率が低い。遺伝子導入過程の初期段階で TJ に存在するコクサッキー - ウイルス・アデノウイルス受容体 (CAR) と Ad ファイバーとの結合能を高める方法を構築するために、C10 の有無の条件下で TER 測定とルシフェラーゼ発現を指標に比較検討した。

4. 研究成果

(1) TJ 開口過程の解明-物理モデルの構築と実験的検証 (パーコレーション解析) -

TJ 開閉の時間変化を説明する物理モデルの構築と実験的検証を行った。細胞単層膜の電気伝導度 (Σ_{TJ}) を用いて TJ 開口挙動を検討した結果、 Σ_{TJ} は、ある時間 (閾値) までほぼ一定であるが、閾値を越えるとべき乗則に従い急激に上昇した。パーコレーション理論に基づき、その挙動を表すための物理モデルを構築した。この物理モデルによって、実験で得られた Σ_{TJ} の時間変化を説明すること可能となり、物質透過性の制御、すなわち TJ 開閉状態の制御には、TJ ストランドの形成状態 (解離・形成) の制御が重要であることが示された。

(2) MDCK 細胞における Sec61 β 遺伝子の TJ バリアー機能に及ぼす影響

迅速な TJ 開口・再形成を実現するために、細胞内タンパク質輸送促進作用を有する Sec61 β を MDCK 細胞に過剰発現させて、CLDN-4 の TJ への輸送を亢進することによって、TJ 開閉速度を向上させることを目的とした。

TER が、C-CPE 添加前の 1/2 になるまでの時間である $T_{1/2}$ を TJ 開口・再形成速度の指標とし、MDCK 細胞に Sec61 β を過剰発現 (約 1.5 倍) させると、TJ 開口時、再形成時ともに $T_{1/2}$ が有意に小さくなることが明らかとなり、Sec61 β の過剰発現によって、TJ 開口、及び再形成の速度が向上した。C-CPE 添加・除去による CLDN の発現量の変動を検討した結果、CLDN-4 の発現量の変動と TER の変動に強く対応した。また、C-CPE 添加・除去による、CLDN-4 と Sec61 β の分布状態の変化、及び CLDN-4 と Sec61 β の共存状態を観察したところ、TJ 再形成過程では、CLDN-4 の細胞膜への局在化に Sec61 β との共存が強く関

与することが示され、CLDN-4 と Sec61 β は複合体を形成する可能性がある。

(3) Caco-2 細胞における C10 使用時の効率的 Ad 遺伝子導入方法

Caco-2 細胞への効率的遺伝子導入のためには、TJ に存在する CAR への Ad vector の結合能が重要である。TJ 作用 (開口) 物質の中鎖脂肪酸 C10 の存在が、培養 Caco-2 細胞中でのルシフェラーゼ発現を増加させたことから、C10 は Ad ベクターによる遺伝子導入効率を高める方法として有用なことが示された。

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 3 件)

(1) Koizumi N., Yamagishi Y., Fujii M., Mizuguchi H., and Watanabe Y.: Efficient adenovirus gene transfer methods in human colonic Caco-2 epithelial cells using capric acid. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, **38**, 1240-1244 (2015).

(<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb/>)

(2) Washiyama M., Koizumi N., Fujii M., and Watanabe Y.: Sec61 regulates barrier function of tight junction through expression of claudin-4 in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, **37**, 979-986 (2014).

(<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb/>)

(3) Washiyama M., Koizumi N., Fujii M., Kondoh M., Yagi K., and Watanabe Y.: Percolation analysis in electrical conductivity of Madin-Darby Canine Kidney and Caco-2 cells by permeation-enhancing agents. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, **36**, 384-389 (2013).

(<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb/>)

[学会発表] (計 10 件)

(1) 大久保莉奈、小泉直也、畠山紗也、藤井まき子、角田慎一、渡辺善照：上皮細胞の Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) を標的としたタンパク送達システムの検討、第 59 回日本薬学会関東支部大会、2015 年 9 月 12 日、「日本大学薬学部、(千葉県、船橋市)」

(2) 蛭間仁美、小泉直也、鈴木結衣、渡邊愛音、藤井まき子、渡辺善照：DDS キャリアとしてのアデノウイルス knob タンパク質の安定性評価、第 59 回日本薬学会関東支部大会、2015 年 9 月 12 日、「日本大学薬学部、(千葉県、船橋市)」

(3) 井上祥一、小泉直也、平井孝昌、水口裕之、藤井まき子、渡辺善照：5 型アデノウイルスベクターの遺伝子導入における HSP90 の影響、第 59 回日本薬学会関東支部大会、2015 年 9 月 12 日、「日本大学薬学部、(千葉県、船橋市)」

(4) 平井孝昌、小泉直也、北村健太、平間奈苗、藤井まき子、水口裕之、渡辺善照：外部環境が及ぼすアデノウイルス由来膜透過ペプチドの細胞膜結合能への影響、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 26 ~ 28 日、「神戸サンポールホール、(兵庫県、神戸市)」

(5) Watanabe Y., Matsumoto M., Koizumi N., and Fujii M.: Effect of claudin-4 expression on the barrier function of tight junction in epithelial cells treated with TNF- α , 74th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2014, 2014 年 8 月 30 日 ~ 9 月 4 日、「Bangkok, (Thailand)」

(6) 北村健太、小泉直也、野中美和、志田健太、平間奈苗、藤井まき子、水口裕之、渡辺善照：細胞膜透過促進能を持つアデノウイルス shaft タンパク質の結合要因の解析、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014 年 7 月 30 ~ 31 日、「慶應義塾大学薬学部、(東京都、港区)」

(7) Watanabe Y., Washiyama M., Koizumi N., and Fujii M.: Sec61 regulates barrier function of tight junction via the expression of claudin-4 in epithelial cells. 5th FIP Pharmaceutical Science World Congress, 2014 年 4 月 13 ~ 16 日、「Melbourne, (Australia)」

(8) 鷲山真紀子、小泉直也、藤井まき子、渡辺善照：Sec61 によるタイトジャンクション開講・形成速度亢進のメカニズム、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 ~ 30 日、「熊本市総合体育館、(熊本県、熊本市)」

(9) Watanabe Y., Washiyama M., Koizumi N., and Fujii M.: Role of Sec61 gene, a subunit of translocon, on barrier function of tight junction in epithelial cells. Asian Federation for Pharmaceutical Science 2013, 2013 年 11 月 20 ~ 22 日、「Jeju, (Korea)」

(10) Washiyama M., Koizumi N., Fujii M., and Watanabe Y.: Effect of Sec61 gene on the tight junction barrier function in MDCK cells. 40th Controlled Release Society Annual Meeting, 2013 年 7 月 21 ~ 24 日、「Honolulu, HI, (USA)」

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 善照 (WATANABE, Yoshiteru)
昭和薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70175131

(2)研究分担者

藤井 まき子 (FUJII, Makiko)
日本大学・薬学部・教授
研究者番号：50199296

小泉 直也 (KOIZUMI, Naoya)
昭和薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：80433845

(3)連携研究者

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