

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19400

研究課題名（和文）血液脳関門シールド制御による脳内薬物送達技術の開発への挑戦

研究課題名（英文）Development of tight junction modulators for drug delivery to the brain

研究代表者

近藤 昌夫（Kondoh, Masuo）

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号：50309697

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：脳血管に存在する血液脳関門が脳内への薬物透過のバリアとして機能していることが知られている。血液脳関門では隣接する細胞間隙が密着結合（TJ）によってシールドされており、TJシールドを一時的に解除することが脳内薬物送達の基本戦略となる。

本研究では、当グループが独自に開発していたTJシールド制御技術を用いて、細胞や動物を用いた各種解析を進め、有効性と安全性を兼ね備えたTJシールド制御技術の創出にはじめて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周知のように、高齢社会の到来に伴い、認知症などの中枢性神経（CNS）疾患が指数関数的に増加しているものの、脳血管に存在する血液脳関門が脳内への薬物透過のバリアとして機能しているため、単に薬を投与しても脳内には送達されず、ここにCNS薬開発の難しさがある。

本研究で開発したTJシールド制御技術は、サルにおいて副作用を伴うことなく脳内薬物送達活性を示していたことから、将来的にアルツハイマー病や血管性認知症等のCNS薬開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A current bottleneck in the development of central nervous system (CNS) drugs is the lack of drug delivery systems targeting the CNS. The intercellular space between endothelial cells of the blood-brain barrier (BBB) is sealed by tight junctions (TJs). The TJ seal prevents the paracellular diffusion of drugs into the CNS.

In the present study, we firstly generated TJ modulators, and secondly examined the effects of the TJ modulators on the BBB in vitro and in vivo. We finally found that one of the TJ modulators may be a potential lead for the development of novel drug delivery system targeting the CNS.

研究分野：規制科学

キーワード：タイトジャンクション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界規模で高齢化が進展し、2050年には高齢者人口が16% (14億人)を超えると予想されており、「成人病の時代」から「老人病の時代」へ疾病のパラダイムシフトが生じている。高齢化に伴い中枢神経系疾患 (CNS) の発症率が指数関数的に増加することから、国内外を問わず製薬企業はCNS薬開発に鎧を削っている。しかしながら、病態解明の立ち遅れ、CNSにおける副作用発現、および脳内移行性の低さがボトルネックとなり、CNS薬の臨床試験成功率は改善していない。このうち病態解明や副作用軽減については、iPS技術等を活用したモデル細胞開発による対応が進んでおり、脳内薬物移行が残された課題となっている。

血液脳関門では細胞と細胞の隙間が密着結合 (タイトジャンクション, TJ) によってシールされており、この血液脳関門の TJ シールドを構成する分子として Claudin-5、occludin 等が同定されてきた。これまでの各種解析から、Claudin-5 のシールド機能を阻害することで有効かつ安全な脳内薬物送達が可能になることを示唆する知見が集積しつつある。

一方、脳は機能および構造の種差が大きく、げっ歯類のデータをヒトに外挿することは困難を極めている。さらに、Claudin-5 を標的とした血液脳関門の TJ シールド制御分子の開発も進んでおらず、Claudin-5 を標的とした脳内薬物送達技術の有効性および安全性については不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

血液脳関門制御では、脳内への非特異的薬物の流入は禁忌であり、TJ 構成タンパク質を標的とした脳内薬物吸収促進の成否は、『TJ の破壊・開口』ではなく『TJ シールド制御』が鍵を握る。そこで、カニクイザルを用い、Claudin-5 抗体の脳内物質透過促進活性を予備的に検証した。モデル薬物としてフルオレセインナトリウム (分子量 376 Da)、『TJ の破壊・開口』の指標として本来血中に存在しているアルブミンの脳脊髄液中濃度を解析したところ、フルオレセインナトリウムのみ脳内に移行し、アルブミンの移行は観察されなかった。この時、Claudin-5 抗体投与によるカニクイザルの行動異常は認められていない。このことは、Claudin-5 等の血液脳関門 TJ 構成タンパク質を阻害することで、『TJ シールド制御による脳内薬物送達』が可能であることを示唆している。

これまでに当グループでは、Claudin-5 抗体 (15 クローン) に加え、血液脳関門の TJ 構成タンパク質である occludin に対する抗体 (5 クローン)、angulin に対する binder (angubindin-1) の開発にも世界に先駆けて成功している (特願 2017-92658; 特願 2016-237370; PCT/JP2016/001125; J Control Release, 260, 1, 2017)。本研究では、これら独自かつ随一の TJ binder を用いて、有効性および安全性を兼ね備えた血液脳関門シールド制御技術の開発を試みる。

3. 研究の方法

1) In vitro 血液脳関門シールド制御活性の解析

解析には、claudin-5, occludin, angulin family 発現細胞、in vitro 三次元血液脳関門モデル系 (in vitro 血液脳関門透過解析系として汎用されている市販のモデル) を使用し、血液脳関門バリア制御活性は膜電気抵抗値、薬物透過活性はフルオレセインナトリウムをモデル薬物として用いて解析した。さらに、各種 binder 処理の安全性を評価するため、MTT アッセイ等を

実施した。

2) In vivo血液脳関門シールド制御活性の解析

In vitro血液脳関門シールド制御活性解析の結果を基に絞り込んだTJ binder (Claudin-5抗体、クローンR9) について、in vivo 脳内物質透過活性及び安全性を解析した。

まず、In vitro血液脳関門シールド制御活性に優れていたR9の大量調製を行った。R9を産生するハイブリドーマを無血清培地にて培養・増殖後、予めプリスタンで処理したヌードマウスに、ハイブリドーマを腹腔内投与により移入した。投与1~2週間後に腹水を採取し、プロテインGカラムを用いて目的とする抗体を精製した。得られた抗体の純度はCBB染色、Claudin-5への結合活性はclaudin-5発現MDCK細胞を用いたFACS解析、in vitroにおけるR9のバリア制御活性は同細胞を用いた膜電気抵抗値解析により確認した。活性が確認されたロットのR9をin vivo解析に供した。

脳は種差が大きい臓器であるため、将来的な臨床応用を考えた場合、非ヒト霊長類を用いた精緻・高度解析が不可欠となる。そこで、カニクイザルを用いて当該TJシールド制御分子の脳内薬物送達活性を解析することとした。具体的には、カニクイザル(雄)に、フルオレセインナトリウムを20 mg/kgで単回静脈内投与し、トレーサー投与0、10、30、60、および120分後に採血および脳脊髄液(CSF)を採取した。初回トレーサー投与1週間後に、R9を0.3、1、3 mg/kgまたは陰性対照としてRat IgGを3 mg/kgの用量で静脈内投与した。抗体投与24時間後にトレーサーを20 mg/kgで単回静脈内投与し、トレーサー投与0、10、30、60、および120分後に採血およびCSFを採取した。薬効の評価項目として、CSF中のトレーサー濃度を解析した。また、安全性の評価項目として、試験期間中のカニクイザルの一般状態の観察、血漿中サイトカイン(TNF-alphaおよびIL-6)およびCSF中アルブミン量の測定、血液生化学的検査(ALT、AST、BUN、CPK、AMYL、ALB、ALP、LDH、TCHO、TBIL、GLU、CRP)を行った。

4. 研究成果

1) In vitro血液脳関門シールド制御活性の解析

既存のClaudin-5抗体、occludin抗体、angulin binderについて、各種TJ構成タンパク質発現細胞を用いた解析を実施し、バリア制御活性、薬物透過促進活性および安全性に優れたClaudin-5抗体クローンを複数選択した。次に、これらのクローンについて、ヒト血液脳関門細胞培養モデル系として汎用されているin vitro 三次元血液脳関門培養系を用いて、バリア制御活性および薬物透過促進活性を解析し、最終的にClaudin-5抗体クローン(R9)を選別し、in vivo 解析に供することとした。

2) In vivo血液脳関門シールド制御活性の解析

CSF中のフルオレセインナトリウム濃度は、R9を3 mg/kgの用量で投与した時に、抗体投与前と比較して投与後のトレーサー投与10~60分後にかけてCSF中フルオレセインナトリウム濃度が上昇する傾向が認められた。この時、一般状態および血液生化学的検査(ALT、AST、BUN、CPK、AMYL、ALB、ALP、LDH、TCHO、TBIL、GLU、CRP)において、抗体投与前後に大きな変化は認められなかった。さらに、TNF-alphaおよびIL-6量は抗体投与前後で大きな変化は認められず、抗体投与による炎症も観察されなかった。また、抗体投与に伴うカニクイザルの行動異常は観察されなかった。

以上の結果より、Claudin-5を標的とした脳内薬物送達の安全性および有効性を非ヒト霊長類

で初めて明らかにした。今後は、マウス等を用いて脳内薬物送達活性の詳細解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kondoh Masuo	4. 巻 34
2. 論文標題 [FOREWORD] Interpenetration of innovation and regulation for drug development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 333 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2745/dd.34.333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 橋 敬祐、近藤 昌夫	4. 巻 55
2. 論文標題 上皮を標的とした創薬イノベーションとレギュラトリーサイエンス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 522 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.55.6_522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tachibana Keisuke、Kondoh Masuo	4. 巻 2109
2. 論文標題 A Method to Prepare Claudin-Modulating Recombinant Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 251 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2019_258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Yosuke、Tachibana Keisuke、Krug Susanne M.、Kunisawa Jun、Fromm Michael、Kondoh Masuo	4. 巻 20
2. 論文標題 Potential for Tight Junction Protein-Directed Drug Development Using Claudin Binders and Angubindin-1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4016 ~ 4016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20164016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hashimoto Yosuke, Okada Yoshiaki, Shirakura Keisuke, Tachibana Keisuke, Sawada Makoto, Yagi Kiyohito, Doi Takefumi, Kondoh Masuo	4. 巻 368
2. 論文標題 Anti-Claudin Antibodies as a Concept for Development of Claudin-Directed Drugs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 179 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.118.252361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondoh Masuo	4. 巻 34
2. 論文標題 [FOREWORD]Interpenetration of innovation and regulation for drug development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 333 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2745/dds.34.333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Yosuke, Kondoh Masuo, Takeda Hiroyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 Development of drug delivery system for treatment of central nervous system diseases targeting tight junctions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 374 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2745/dds.34.374	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto, Y.; Okada, Y.; Shirakura, K.; Tachibana, K.; Sawada, M.; Yagi, K.; Doi, T.; Kondoh, M.	4. 巻 368
2. 論文標題 Anti-claudin antibodies as a concept for development of claudin-directed drugs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Exp Ther	6. 最初と最後の頁 179-186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.118.252361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tachibana Keisuke, Iwashita Yumi, Wakayama Erika, Nishino Itsuki, Nishikaji Taiki, Kondoh Masuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Tight Junction Modulating Bioprobes for Drug Delivery System to the Brain: A Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1236 ~ 1236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics12121236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Yosuke, Tachibana Keisuke, Kondoh Masuo	4. 巻 25
2. 論文標題 Tight junction modulators for drug delivery to the central nervous system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Discovery Today	6. 最初と最後の頁 1477 ~ 1486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.drudis.2020.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Yosuke Hashimoto, Tomoyuki Hata, Minoru Tada, Manami Iida, Akihiro Watari, Yoshiaki Okada, Takefumi Doi, Hiroki Kuniyasu, Kiyohito Yagi, Keisuke Tachibana, Masuo Kondoh
2. 発表標題 Proof of concept for Claudin-2-directed cancer therapy by using a monoclonal antibody that recognizes the extracellular loop domain of Claudin-2
3. 学会等名 CRS Annual meeting & Exposition 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Hashimoto, Keisuke Shirakura, Yoshiaki Okada, Hiroyuki Takeda, Akihiro Watari, Tatsuya Sawasaki, Keisuke Tachibana, Takefumi Doi, Kiyohito Yagi, Masuo Kondoh
2. 発表標題 Claudin-5 binder is a promising candidate for drug delivery to the brain by modulation of blood-brain barrier
3. 学会等名 AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Claudin-5 as a target for drug delivery to the brain by modulation blood-brain barrier
3. 学会等名 Experimental Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Hashimoto, Tomoyuki Hata, Minoru Tada, Manami Iida, Akihiro Watari, Yoshiaki Okada, Takefumi Doi, Hiroki Kuniyasu, Kiyohito Yagi, Keisuke Tachibana, Masuo Kondoh
2. 発表標題 Efficacy and safety evaluation of claudin-2 as a target for cancer therapy by using anti-claudin-2 monoclonal antibodies
3. 学会等名 2019 Antibody Engineering & Therapeutics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 上皮バリアを標的とした 吸収促進技術の螺旋的發展
3. 学会等名 日本薬学会第140年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 上皮バリアの生物学に立脚した創薬基盤技術の開発
3. 学会等名 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業2019年度BINDS公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 上皮バリアの生物学を基盤としたDDS研究
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 イノベーション・レギュレーション・コミュニケーション
3. 学会等名 第56回薬剤学懇談会研究討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Development of anti-claudin-5 monoclonal antibodies and evaluation of their permeation-activity of solutes across the blood-brain barrier in a mammalian model
3. 学会等名 Antibody Engineering & Therapeutics 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 Development of claudin-5 modulators and evaluation of their in vitro permeation-activity of solutes across the blood-brain barrier in a mammalian model
3. 学会等名 2018 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橘敬祐、近藤昌夫
2. 発表標題 中枢神経系疾患における創薬のレギュラトリーサイエンス ～血液脳関門制御技術開発～
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橘敬祐、近藤昌夫
2. 発表標題 Central nervous system (CNS) 創薬のレギュラトリーサイエンス ～血液脳関門制御技術の開発～
3. 学会等名 第4回 次世代を担う若手のための レギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 上皮バリアを標的とした吸収促進技術の螺旋的発展
3. 学会等名 創剤研究コンソーシアム 2018年度 第2回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤昌夫
2. 発表標題 上皮を標的とした創薬研究の螺旋的発展
3. 学会等名 愛媛大学PROSセミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西鍛冶大樹、若山英里香、橘敬祐、近藤昌夫
2. 発表標題 リバースレギュラトリーサイエンス研究～認知症治療薬の現状及び臨床開発上の課題～
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西野樹、岩下有美、橘敬祐、近藤昌夫
2. 発表標題 リバースレギュラトリーサイエンス研究～中枢神経系作用薬の創薬基盤技術開発に向けた承認事例等の論点整理～
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------