

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21689006

研究課題名（和文） Claudin modulator を利用した非侵襲性投与技術の開発

研究課題名（英文） Development of non-invasive drug delivery system using claudin modulator

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

研究成果の概要（和文）：

投与の利便性や患者の QOL を考慮すると、経鼻・経肺・経口などの非侵襲性投与が理想的な投与方法であるものの、元来粘膜面は生体内外を隔てる障壁として機能しており、ここに非侵襲性投与方法開発の難しさがある。本研究では、粘膜バリアの分子基盤である claudin に着目し、独自の claudin binder を有効活用することでバイオ医薬の非侵襲性投与に資する新規 claudin modulator の創製を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Claudins (CL) are a family of tetra-transmembrane proteins that are the structural and functional components of tight junctions (TJ). CLs are promising targets for drug development because of their role in mucosal drug absorption and carcinogenesis. However, CL-targeted drug development has been delayed because CLs have low antigenicity and preparing CL proteins is difficult. We developed a novel CL binder by using the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) and a baculoviral display system. After screening CL binders from a C-CPE mutant-displaying library by using CL-displaying budded baculovirus (BV) we isolated a C-CPE mutant called m19, which bound to CL1, CL2, CL4 and CL5. A 3-dimensional analysis showed that m19 has a structural backbone similar to C-CPE. The charge density of the CL-binding domains of m19 and C-CPE differed, suggesting that electrostatic interactions may occur between m19 and CLs. Treatment of epithelial cells with m19 decreased the paracellular but not transcellular integrity, and m19 enhanced jejunal absorption. This is the first report of the isolation of a CL binder with broad specificity. These findings will contribute to future preparation of CL binders for CL-targeted drug development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000

2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：Claudin、非侵襲性投与、細胞間隙

1. 研究開始当初の背景

少子高齢社会を迎え、投与の利便性および患者のQOL向上に資する経皮・経鼻・経肺・経口などの非侵襲性投与が理想的な投与方法として注目されている。しかしながら、元来粘膜面および皮膚は生体内外を隔てる障壁として機能しており、ここに非侵襲性投与方法開発の難しさがある。

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 が皮膚、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。Claudin には 24 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認められており、claudin-1 は皮膚・粘膜、claudin-4 は粘膜バリア、claudin-5 は血液脳関門を担っている。このことは、claudin を制御することで経皮・経粘膜などの非侵襲性投与方法開発に繋がることを示しているものの、claudin modulator は抗体を含めて皆無であり、依然として claudin を標的とした投与方法の開発は立ち遅れている。

2. 研究の目的

当該申請課題では、後述する独自の claudin-4 modulator の成果を基に、新規 claudin modulator の創出を図り、非侵襲性投与方法開発に資する基盤技術の創出を試みた。

3. 研究の方法

各種 scFv ライブラリ、各種 C-CPE ライブラリ、各種ペプチドライブラリ等を作製し、スクリーニングソースとして実験に供した。さらに、バキュロウイルス発現系を用いて作製した claudin binder スクリーニング系を利用することで、ライブラリの中から claudin binder の探索を試みた。得られた claudin binder について、常法に従いバリア制御活性解析・X線構造解析などを実施した。

4. 研究成果

C-CPE を prototype として用い新規 claudin binder 創製を図るために、C-CPE の機能ドメインを同定し、機能残基をランダムなアミノ酸に置換した C-CPE 構造変異体ライブラリを作製した。

また、claudin 提示バキュロウイルスが claudin を膜上に高密度インタクトな状態で提示していることを見出し、claudin binder スクリーニング系を確立した。

次に、C-CPE 構造変異体ライブラリを claudin-1 提示バキュロウイルスを固層化したチューブに添加することで、claudin-1 binder のスクリーニングを行い、claudin-1 結合性 C-CPE 構造変異体を取得した。興味深いことに、本分子は claudin-2, -3, -4, -5 に対しても結合性を有しており、はじめての広域 claudin binder であった。

本分子は、C-CPE に比して優れた粘膜バリア制御活性を有していたことから、非侵襲性投与技術のリードとしての応用が期待された。

そこで本分子の立体構造を解析し、claudin 結合性と C-CPE の立体構造に関する情報を収集した。

これらの成果は、claudin を標的とした非侵襲性投与法開発に向けた有用な情報となる。

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 18 件)

①

Takahashi, A.; Saito, Y.; Kondoh, M.; Matsushita, K.; Krug, S. M.; Suzuki, H.; Tsujino, H.; Li, X.; Aoyama, H.; Matsuhisa, K.; Uno, T.; Fromm, M.; Tamakubo, T.; Yagi, K. Creation and biochemical analysis of a broad-specific claudin binder. *Biomaterials*, 2012, 33, 3464-3474.

②

Kondoh, M.; Takahashi, A.; Yagi, K. Spiral progression in the development of absorption enhancers based on the biology of tight junctions. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64, 515-522.

③

Suzuki, H.; Kondoh, M.; Kakutani, H.; Yamane, S.; Uchida, H.; Hamakubo, T.; Yagi, K. The application of an alanine-substituted mutant of the C-terminal fragment of *Clostridium*

perfringens enterotoxin as a mucosal vaccine in mice. *Biomaterials*, 2012, 33, 317-324.

④

Takahashi, A.; Kondoh, M.; Suzuki, H.; Watari, A.; Yagi, K. Pathological changes in tight junctions and potential application into therapies. *Drug Discov Today*, 2012, 17, 727-732.

⑤

Takahashi, A.; Kondoh, M.; Uchida, H.; Kakamu, Y.; Hamakubo, T.; Yagi, K. Mutated C-terminal fragments of *Clostridium perfringens* enterotoxin have increased affinity to claudin-4 and reversibly modulate tight junctions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410, 466-470.

⑥

Kakutani, H.; Takahashi, A.; Kondoh, M.; Saito, Y.; Yamaura, T.; Sakihama, T.; Hamakubo, T.; Yagi, K. A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS One*, 2011, 6, e16611.

⑦

Takahashi, A.; Kondoh, M.; Yagi, K. Claudin as a target for drug development. *Curr Med Chem*, 2011, 18, 1861-1865.

⑧

Saeki, R.; Kondoh, M.; Kakutani, H.; Matsuhisa, K.; Takahashi, A.; Suzuki, H.; Kakamu, Y.; Watari, A.; Yagi, K. A claudin-targeting molecule as an

inhibitor of tumor metastasis. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334, 576-582.

⑨

Uchida, H.; Kondoh, M.; Hanada, T.; Takahashi, A.; Hamakubo, T.; Yagi, K. A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79, 1437-1444.

⑩

Kakutani, H.; Kondoh, M.; Fukasaka, M.; Suzuki, H.; Hamakubo, T.; Yagi, K. Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials*, 2010, 31, 5463-5471.

[学会発表] (計 51 件)

①

Yohei Kakamu, Kyohei Matsushita, Yumiko Saito, Azusa Takahashi, Koji Matsuhisa, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Biochemical analysis of a novel dual claudin binder. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, 2011, Washington, DC, USA

②

Miki Kodaka, Azusa Takahashi, Toshiaki Yamaura, Yohei Kakamu, Koji Matsuhisa, Kyohei Matsushita, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A simple screening system for claudin binders using an scFv library derived from claudin-immunized mice. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, 2011, Washington, DC, USA

③

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro

Fukasaka, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Targeting to claudin-4 is a novel strategy for the development of mucosal vaccine. The 7th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientist 6, Jun 2-4, 2011, Seoul National University, Korea

④

Azusa Takahashi, Yumiko Saito, Koji Matsuhisa, Yohei Kakamu, Miki Kodaka, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Preparation of a dual claudin binder using a fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, 2011, Washington, DC, USA

⑤

Koji Matsuhisa, Azusa Takahashi, Yohei Kakamu, Miki Kodaka, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a novel claudin binder using baculoviral display for its application in mucosal absorption of drugs. 38th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 30-Aug 3, 2011, National Harbor, MA, USA.

⑥

Seiji Yamane, Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A novel strategy for mucosal vaccination using a claudin binder. 38th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 30-Aug 3, 2011, National Harbor, MA, USA.

⑦

Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of claudin binders using baculoviral displaying system. Tight junction conference in Berlin, Sep 24, 2011, Berlin, Germany.

⑧

Akihito Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Establishment of a cell-based assay system to screen compounds modulating tight junction barrier. 51st annual meeting of the American society for cell biology, Dec 3-7, 2011, Denver, CO, USA.

⑨

Hidehiko Suzuki, Seiji Yamane, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Kiyohito Yagi, Preparation of claudin-4 binder using C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin and its application to mucosal vaccination. 51st annual meeting of the American society for cell biology, Dec 3-7, 2011, Denver, CO, USA.

⑩

Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. Experimental Biology 2010, Apr 24-28, 2010, Anaheim, CA, USA

⑪

Hidehiko Suzuki, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Takao Hamakubo, Akihiro Watari,

Kiyohito Yagi, Development of a novel nasal vaccine using a claudin-4 binder, Experimental Biology 2010, Apr 24-28, 2010, Anaheim, CA, USA.

⑫

Masuo Kondoh, Rie Saeki, Hideki Kakutani, Yasuhiro Mochizuki, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Preparation of a claudin-4-targeted anti-tumor molecule. Experimental Biology 2010, Apr 24-28, 2010, Anaheim, CA, USA

⑬

Hiroshi Uchida, Masuo Kondoh, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of peptide. Experimental Biology 2010, Apr 24-28, 2010, Anaheim, CA, USA

⑭

Hidehiko Suzuki, Rie Saeki, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A novel strategy for cancer-targeting using claudin-4 binder. 37th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 10-14, 2010, Portland, OR, USA.

⑮

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a Mucosal Vaccine Using a Claudin-4 Binder. FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov 14-18, 2010, New Orleans, LA, USA

⑯

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a non-invasive drug delivery system using a claudin modulator. FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov 14-18, 2010, New Orleans, LA, USA

⑰

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of mucosal vaccine using a claudin binder. 50th annual meeting of the American society for cell biology, Dec 11-15, Philadelphia, PA, USA

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

①

名称：新規クローデイン結合分子およびその利用

発明者：八木清仁、近藤昌夫

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特願 2010-25259

出願年月日：2010年2月8日

国内外の別：国内

②

名称：粘膜ワクチン

発明者：八木清仁、近藤昌夫、磯田勝広、堀口安彦

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：PCT/JP2009/71291

出願年月日：2009年12月22日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 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