

タイトジャンクション構成蛋白質 Claudin を利用した新規薬物送達方法の構築

近藤 昌夫

Claudin as a Novel Target for Drug Delivery System

Masuo KONDOH

Department of Bio-Functional Molecular Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,
1-6 Yamadaoka, Suita City 565-0871, Japan

(Received June 1, 2006)

Recent remarkable progress in genomic novel drug discovery enables us to prepare drug candidates with tremendous diversity in a high-throughput-manner. In clinical use of these candidates, they should be effectively delivered to a target-tissue in body. But delivery systems suitable for the high-throughput discovery of drugs have never been established. Tight junctions (TJs) play a pivotal role in compartmentation of each tissues and maintenance of their intra-circumstances. Claudin, a membrane protein with four trans-membrane domains, have recently found to be responsible for the barrier-function of TJs. Claudin is constituted of 24 family members, and expression profiles and barrier-function of claudin differ interestingly among the family members. These findings indicate that a modulator of the unique barrier-function of claudin may be used for drug delivery. In this respect, we have investigated whether a claudin is a target for drug delivery. A claudin modulator (C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, C-CPE) had 400-fold jejunal absorption-enhancing activity to a clinically used absorption-enhancer, and interaction between C-CPE and claudin was essential for the enhancing activity. We have already prepared a screening system for claudin-targeting molecule. Now we are performing functional domain mapping of C-CPE, and we will attempt to prepare a various type of claudin modulator in a future. In the current review, I introduce our recent works on development of a novel strategy for drug delivery system using claudin modulator, and I discuss also possibility of claudin modulator in drug delivery system.

Key words—claudin; tight junction; *Clostridium perfringens* enterotoxin; paracellular route

1. はじめに

近年のゲノム創薬研究の進展により、抗体、ペプチド及び低分子有機合成化合物などの医薬品候補化合物創製のハイスループット化が進み、短期間に効率的に標的分子に対する阻害剤分子等が産み出され得る土壌が造成されつつある。しかしながら、例えば、脳疾患に有効とされる化合物の90%は血液脳関門を透過することができないために臨床応用が断念されており、ハイスループット化した創薬研究に適した薬物送達方法の確立はいまだ立ち遅れているのが現状である。

いかなる医薬品においても、標的部位への薬物移行の第1ステップは、表皮や粘膜層の透過過程及び

大阪大学大学院薬学研究所生体機能分子化学分野
(〒565-0871 吹田市山田丘1-6)

e-mail: masuo@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成18年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

血管から標的組織への移行過程であることから、薬物の上皮細胞層及び内皮細胞層の透過制御が薬物治療の成否を握っていることになる。これらの各種細胞層における物質透過経路は、トランスポーターや受容体を介した細胞内経路と細胞と細胞の間隙を介する細胞間隙経路に大別され、両経路を利用した薬物送達方法の構築が現在までに多方面より研究されてきている (Fig. 1).¹⁻⁴⁾ 1980年代に細胞間隙経路を介した薬物送達方法の開発研究が進展し、1990年代に入ると細胞内経路を介した薬物送達方法の研究が勃興し現在に至っている。細胞内経路を介した薬物送達システムの有用性は論を待たないものの、2000年以降台頭しつつあるハイスループット化したゲノム創薬研究に meet した方法論として考えた場合にはいまだ多くの課題が残っている。

このような背景を踏まえ、われわれのグループでは、汎用性の点で優れていると考えられる細胞間隙

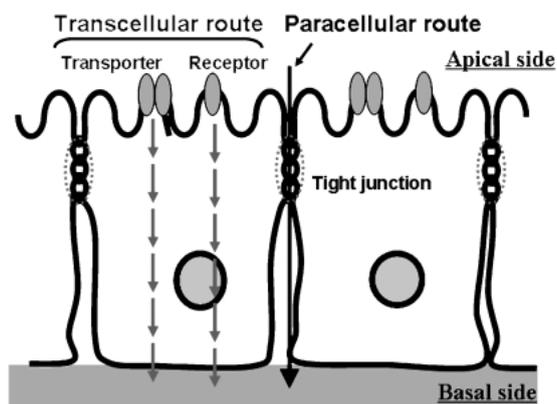


Fig. 1. Schematic Scheme of Transport Route in Epithelia

経路に着目し、ハイスループット化した創薬研究に meet した新たな薬物送達方法の確立を模索してきた。その結果、tight junction 構成蛋白質の1つである claudin が細胞間隙経路を介した新規薬物送達方法の構築における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。⁵⁾

本総説では、claudin, occludin, catenin, nectin など日本の研究土壌に芽生えた細胞間隙研究の太く逞しい樹木の添え木を薬学の土壌に移し育ててきたわれわれの story を紙面の許す限り紹介させて頂く。

2. 細胞間隙経路を利用した薬物送達の有用性

Combinatorial chemistry による化合物合成の効率化、ハイスループットスクリーニングによる薬理活性評価の迅速化により、*in vitro* において切れ味鋭い活性を有する化合物の創製は効率化の一途を辿っている。しかしながら、これらの成果の反面、薬物動態特性の悪さにより医薬品開発が中止となるケースがいまだに多く見受けられ、開発研究の初期の効率化がかならずしも医薬品開発の効率化に結実していない。このような現状の中、薬物動態特性を加味した開発研究が始まっている。この戦略の基本となるのは、標的部位に高発現し、それ以外の臓器には発現が低い(ない)トランスポーター等を利用して標的臓器に特異的に薬物を送達するというものである。⁶⁾ この戦略では、薬物送達がトランスポーターの発現及びその特異性に規定されることになる。さらに、トランスポーターなどの基質となる化合物をデザインすることが不可欠であり、医薬品毎に薬効に対する構造活性相関データを踏まえた修飾を施した上で薬効を消失していないことを確認しなくてはならない。また、トランスポーターは細胞内

の取り込み過程を制御しているに過ぎず、細胞内取り込み後の化合物の移行過程及び基底膜側からの排出過程をも考慮しなければならない。これらのことを踏まえると、トランスポーターを利用した薬物動態特性制御というアプローチは理想的な方法論ではあるものの、本アプローチがハイスループット化した創薬研究に meet した方法論として確立されるには今しばらくの時間が必要になると考えられる。

細胞間隙には tight junction (TJ) と呼ばれる密着結合が存在し、TJ によって上皮細胞層における物質透過が著しく制限されており、細胞間隙を介した薬物送達では TJ の制御が不可避となっている。1980 年代に注目された細胞間隙経路を介した薬物送達研究は、薬物吸収促進という概念を提示した点で白眉であったが、現在臨床応用されているのはカプリン酸のみである。⁷⁾ これは、1) 吸収促進活性に組織特異性が乏しいこと、2) 組織傷害性を伴う方法論が多いことに加え、3) 薬物吸収促進作用は TJ の開口に起因するがゆえに薬物以外の物質の吸収を引き起こしてしまい得るということが懸念されていることに拠る。これらの課題があるものの、TJ を開口させて薬物を透過させる方法は1つの方法論により理論的にすべての医薬品化合物に対して適用可能であることから、汎用性という点に限って言えば細胞内経路よりも細胞間隙経路の方が優れていると言える。そこでまず、既存の細胞間隙経路を利用した薬物送達方法の上記の課題について考察し、1) 及び 2) の課題はともに既存の吸収促進剤の作用機構に起因していると結論付けた。例えば、EDTA はカルシウムイオンのキレート作用、⁸⁾ オレイン酸は細胞膜の流動性の亢進、⁹⁾ カプリン酸ナトリウムはホスホリパーゼ C 活性化作用¹⁰⁾ による TJ 開口機構が提唱されている。これらの既存の吸収促進剤の標的分子は、生体内の至るところに存在している分子であることから、この標的分子の設定に 1) 及び 2) の課題を解決するヒントが含まれていると考えられた。これらの薬物送達方法は 1980 年代の細胞生物学の知見に基づいており、細胞間隙の細胞生物学 (Barriology) の理解が深まっていない時期に考案された strategy であること、Barriology は 2000 年前後から飛躍的に知見が集積してきた分野であることを踏まえ、最新の Barriology の知見の中から組織特異性を付与し得る標的分子を設定することから

研究に着手した。

3. Claudin の薬物送達の標的分子としての特性

細胞間隙に存在する TJ は、上皮細胞層における物質透過制御を担うと同時に、ある種のイオンの選択的な透過に関与している。^{11,12)} 生体内は上皮細胞層や内皮細胞層によりいくつもの区画に分類されており、腎臓の尿細管、血管、内耳の蝸牛管などのように、それぞれの区画内で固有の内部環境が維持されている。上皮細胞層や内皮細胞層における物質透過経路は細胞内経路と細胞間隙経路に大別されており、これら細胞層による組織内部環境制御は両経路に依存するところが大きい。例えば、細胞内経路ではトランスポーターなどを利用した特異的な物質透過が恒常的に行われている。細胞間隙には TJ が存在していることから、細胞間隙は物質の透過を抑制するフェンスとしての役割を担っていると考えられていたが、Barriology の進展に伴い TJ は物質透過抑制ばかりでなく、ある種のイオンのチャンネルとして機能することが明らかとなり、TJ が組織固有の内部環境維持に積極的に関与していることが解明されつつある。^{11,13)} このことは、TJ の有する組織固有の内部環境維持機構を自在に制御することができれば、細胞間隙経路を介した組織特異的な薬物送達が可能になることを示唆しており、筆者らは TJ の機能を組織特異的に制御することによる新規薬物送達方法の確立を志向することにした。そこでまず、TJ における物質透過障壁機能の本体を担う分子の中で、組織特異性を発揮し得る分子という条件から薬物送達における標的分子を検索し、着目した分子が claudin である。

TJ は occludin, ZO-1 などの多種多様な蛋白質の複合体から構成され、バリアー機能を発揮している (Fig. 2)。この複合体の中から、京都大学月田博士のグループの一連の検討により、TJ における物質透過障壁機能の本体を担う分子として同定された分子が、分子量約 23 kDa の 4 回膜貫通蛋白質 claudin である。^{14,15)} Claudin 非発現細胞であるマウス繊維芽細胞 L cell に claudin を発現させると TJ が構築されること、さらに遺伝子改変マウスを用いた解析から claudin は TJ のバリアー機能を担う分子であることが証明されている。¹⁵⁾ Claudin には、現在までのところ 24 種類のファミリーが報告されており、興味深いことに claudin の発現及びバリアー機

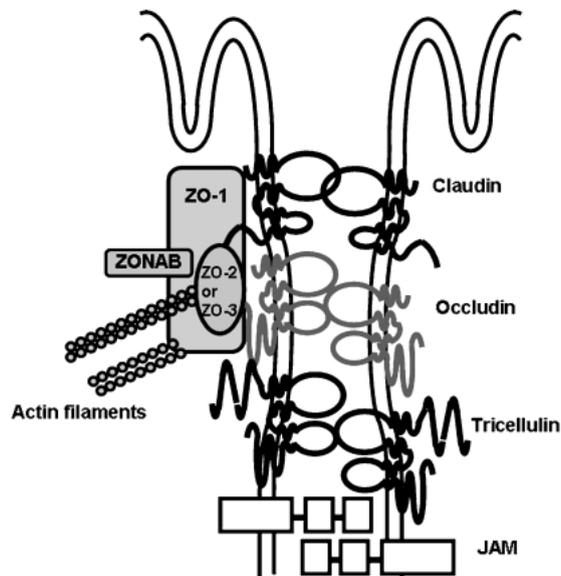


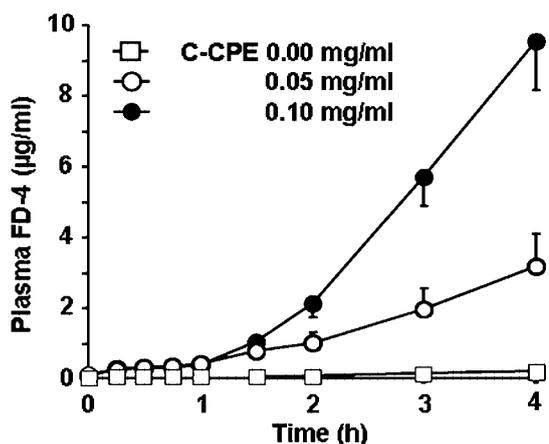
Fig. 2. A Model of Protein Interactions at Tight Junction

能には組織特異性が認められ、claudin-1 欠損マウスでは表皮のバリアー機能、¹⁶⁾ claudin-5 欠損マウスでは血液脳関門のバリアー機能が低下している。¹⁷⁾ このことは、claudin をファミリー特異的に制御することができれば、TJ を介した組織特異的な薬物送達が可能になることを示唆している。Claudin modulator は、*Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) の C 末断片 (C-CPE) が claudin-4 のバリアー機能を阻害する分子として唯一知られていた。¹⁸⁾ そこで、C-CPE を claudin modulator のモデル分子として使用し、claudin の薬物送達における標的分子としての有用性を評価することから研究を立ち上げることに決め、阪大微研堀口安彦先生にお手紙を差し上げ、C-CPE の発現プラスミドを譲渡して頂いた。

4. Claudin を利用した薬物送達システムの開発の可能性

まず最初に、当時修士 1 年生であった浅野長祥君と一緒に C-CPE の吸収促進効果をラット腸管ループ法により fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (Mw 4000; FD-4) の吸収を指標に評価した。その結果、C-CPE (0.1 mg/ml) 処理により現在唯一臨床的に用いられている吸収促進剤であるカプリン酸ナトリウム (C10) (40 mg/ml) と同程度の吸収促進効果が認められ、C-CPE は C10 の 400 倍もの吸収促進効果を有していることを見出した (Fig.

A. Plasma FD-4 level



B. AUC value

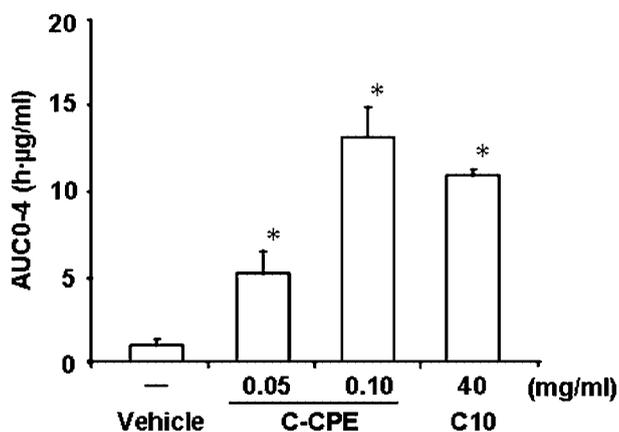
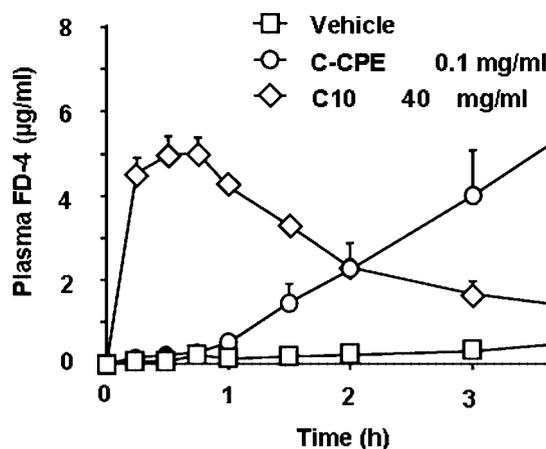


Fig. 3. Effect of C-CPE on Jejunal Absorption in Rats

Rat jejunum was treated with FD-4 (10 mg/ml) in the presence of vehicle, C-CPE or C10. The FD-4 levels in plasma collected from the juglar vein were determined at the indicated points (A) and the AUC_{0-4h} was calculated (B). Data are means \pm S.E. ($n=4$). *Significant difference from the vehicle-treated group ($p<0.05$).

3).⁵⁾興味深いことに、C10 処理ではラット空腸及び大腸いずれにおいても吸収促進効果が観察されたのに対して、C-CPE 処理ではラット空腸においてのみ吸収促進効果が認められ、C-CPE は C10 とは異なり組織特異的な吸収促進効果を有していた (Fig. 4)。また、C-CPE の粘膜傷害性を粘膜からの LDH の遊離及び組織学的観察により評価したところ、C10 処理ではいずれの系においても有意な粘膜傷害が観察されていたのに対して、C-CPE 処理による腸管粘膜傷害は観察されなかった。⁵⁾ C-CPE 処理により分子量 10000 までの dextran (FD-10) において顕著な吸収促進効果が観察されており、FD-4 及び FD-10 の分子サイズが 1.4 nm, 2.3 nm で

Rat jejunum



Rat colon

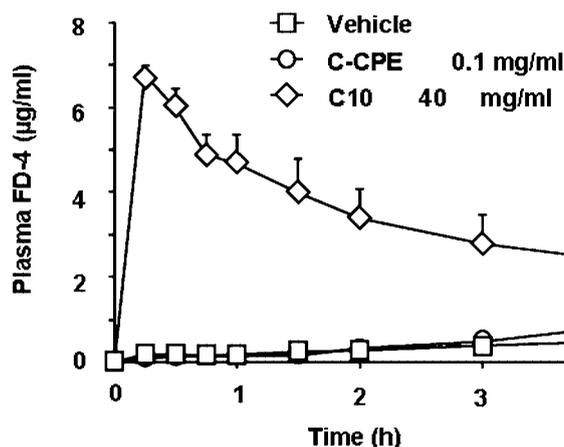


Fig. 4. Comparison of Absorption-enhancing Effects of C-CPE in Rat Jejunum and Colon

The rat jejunum or colon was treated with FD-4 (10 mg/ml) in the presence of C10 (40 mg/ml) or C-CPE (0.1 mg/ml). FD-4 levels in plasma collected from the juglar vein were determined at the indicated points. Data are means \pm S.E. ($n=4$). The results are representative of at least three independent experiments.

あること、細胞系において C10 処理により細胞間隙が 1.5 nm まで開口するとの報告があることから、^{19,20)} C-CPE 処理に伴い TJ が開口することにより吸収促進効果が発揮されたものと推察される。実際、マウスの腸管において FD-4 の取り込みを蛍光観察により確認したところ、腸管上皮細胞層の細胞間隙から FD-4 が浸透していく様子が認められた (our unpublished data)。

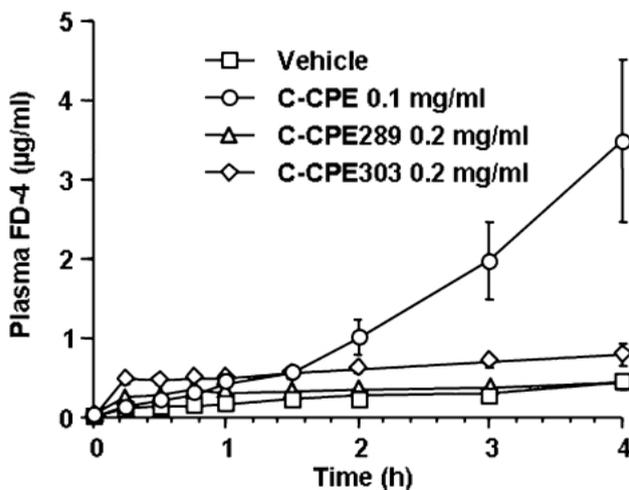
次に、C-CPE の吸収促進活性における claudin の関与について評価を加えた。CPE は下痢毒素としての機能解析が進んでおり、CPE の C 末 30 ア

ミノ酸を欠損させると CPE の受容体結合性が消失し下痢活性が消失するとの報告がなされていた。²¹⁾ そこでこの報告を踏まえ、C-CPE の C 末 30 アミノ酸を欠損させた C-CPE289 及びその一部 (16 アミノ酸) を欠損させた C-CPE303 を作成し、これら変異体の各種活性を評価した。その結果、ラット空腸を用いた腸管ループアッセイ法において、C-CPE289 及び C-CPE303 の吸収促進活性は C-CPE と比較して有意に低下しており、このとき claudin-4 との結合性も消失していた (Fig. 5)。Caco-2 細胞単層膜培養系を用いた TJ バリアー機能評価系においても同様の傾向が認められ、C-CPE289 及び

C-CPE303 の TJ バリアー機能低下作用及び claudin-4 結合性はともに C-CPE と比較して顕著に低下していた。²²⁾

これらの結果より、C-CPE は claudin-4 と相互作用することにより claudin-4 のバリアー機能を低下させ TJ を介した吸収促進効果を発揮しているものと推察された。興味深いことに、C-CPE の吸収促進効果には C10 にはみられない組織特異性が認められており、既存の細胞間隙経路を介した薬物送達方法では不可能とされていた細胞間隙経路を利用した組織特異的薬物送達方法を構築する上で、claudin は有効な標的分子になり得ることが示唆された。

A. Absorption-enhancing effect of mutated C-CPE in rat jejunum



B. Interaction of mutated C-CPE with claudin-4

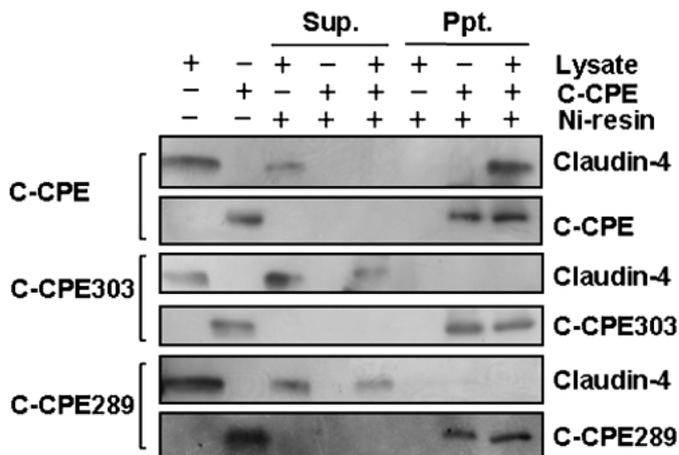


Fig. 5. Involvement of Claudin-4 in C-CPE-induced Jejunal Absorption in Rats

A) Effect of C-CPE, C-CPE289, and C-CPE303 on absorption. Rat jejunum was treated with FD-4 (10 mg/ml) in the presence of C-CPE, C-CPE289, or C-CPE303 (0.1 or 0.2 mg/ml). FD-4 levels in plasma collected from the carotid artery were determined at the indicated points. Data are means ± S.E. (n=4). B) Interaction of C-CPE, C-CPE289, or C-CPE303 with claudin-4. Jejunal mucosa was removed by a scraper, and lysed in lysis buffer. The lysate was incubated with C-CPE, C-CPE289, or C-CPE303 and then mixed with Ni-resin. After a 2-h incubation at 37°C, the resulting complex bound to the Ni-resin (ppt) and the free fraction (sup) were subjected to SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with antibodies against claudin-4 and His-tag.

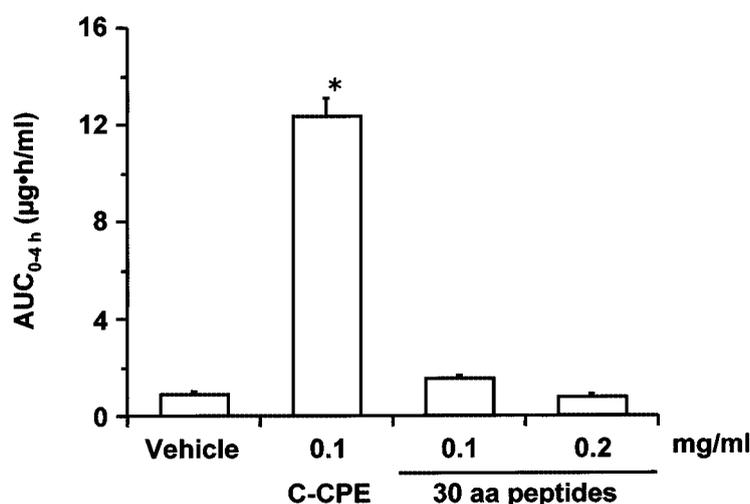
5. C-CPE の機能ドメイン解析

CPE は claudin-3, -4, -6, -7, -8, -14 と結合性を有しているが, 親和性は claudin family 間で異なっている (claudin-4>6>7>3>14>8). また, CPE は claudin-1, -2, -5, -10 とは結合しない.²³⁾ C-CPE は, CPE の受容体結合領域として同定された CPE の C 末断片であり, CPE の受容体結合領域を有していることから²⁴⁾ C-CPE の claudin 指向性は CPE と同じであると推察され, C-CPE は親和性のある特定

の claudin に対してのみバリアー機能低下活性を発揮すると考えられる.

前述したように, C-CPE を用いた検討から, claudin の薬物送達における標的分子としての有用性が示唆された. Claudin は 24 種類のメンバーからなる family の組合せに応じて多様なバリアーを形成すると言われており, 薬物送達の実現に際しては, 組織固有の claudin family の組合せに対応した阻害域を有する claudin modulator を創製する必要

A. AUC values



B. Effect of 30 aa peptides on TJ-barrier in Caco-2 cells

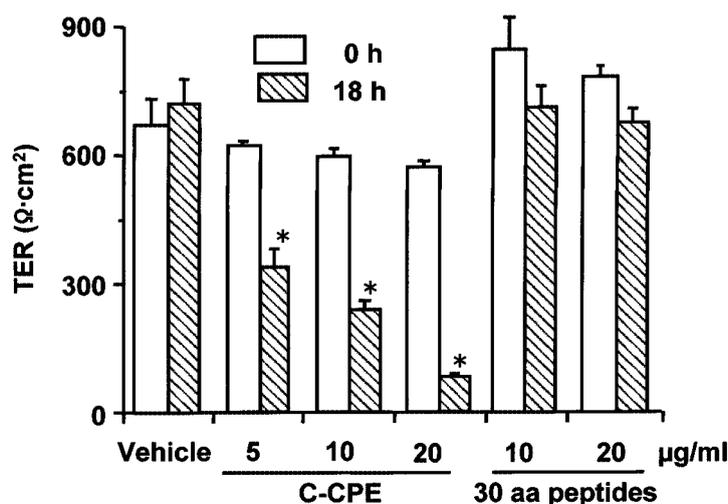


Fig. 6. Effect of Receptor-binding Domain of CPE on Jejunal Absorption

A) Rat jejunum was treated with vehicle or 30 aa peptide. At the indicated point, blood was collected from the jugular vein, and the FD-4 levels in the plasma were measured with a fluorometer. The AUC between 0 and 4 h after the treatment was calculated. Data are means \pm S.E. ($n=4$). *Significant difference from the vehicle-treated group ($p<0.05$). B) Effect of 30 aa peptides on tight-junction permeability in Caco-2 monolayers. Caco-2 cells were seeded onto Transwell. When the transepithelial resistance was stable, we added vehicle, C-CPE or 30 aa peptides to the basal side at the indicated concentration. TER values were monitored at 0 h and 18 h after addition of C-CPE by an electrode. Data are representative of three independent experiments. *Significantly different from the value at 0 h ($p<0.05$). Data are means \pm S.E. ($n=4$).

がある。そこで、C-CPE を prototype として用いた各種 claudin modulator の創製を図るために、C-CPE の機能ドメインの解析を試みた。まず、CPE と受容体との結合領域と言われている C 末 30 アミノ酸ペプチド (30 aa peptide) を合成し、本ペプチドの吸収促進作用を評価したところ、ラット腸管ループモデル及び Caco-2 細胞単層膜培養系いずれの系においても吸収促進効果及びバリアー機能低下作用は観察されなかった (Fig. 6).²⁵⁾ このことは、C-CPE の薬物送達活性は claudin への結合領域のみでは生じないことを意味している。そこで、C-CPE の TJ バリアー機能制御領域の解析を進めるために、C 末及び N 末欠損体を作製した。その結果、C-CPE の C 末 16 アミノ酸を欠損させると claudin-4 結合性及び TJ バリアー機能低下活性がともに消失していた。²²⁾ また、C-CPE の N 末 36 アミノ酸を欠損させたところ、CPE の受容体結合領域である C 末 30 アミノ酸領域が保存されているにも係わらず claudin-4 への結合性が低下していたことから、²⁵⁾ C-CPE と claudin との結合には C 末及び N 末領域の双方とも関与している可能性が示唆された。N 末欠損体でも C-CPE の吸収促進活性及び TJ バリアー機能阻害活性がともに消失していたことから、C-CPE の TJ バリアー機能低下活性には claudin との結合が必須であることは間違いない。Claudin との結合性に及ぼす C 末及び N 末領域の寄与については、site-directed mutagenesis による解析を鋭意進めており、現在までに C-CPE の C 末領域のいくつかのアミノ酸残基が C-CPE と claudin との結合に関与していることを見出している (our unpublished data)。現在、N 末領域について site-directed mutagenesis での解析を進めており、喫緊に C-CPE の機能ドメインの全容は明らかになってくるであろう。

6. Claudin Modulator スクリーニング系の構築

現在までの検討から、C-CPE の claudin 結合サイトに関する知見が集積しつつある。C-CPE を添加すると TJ に存在する claudin が蛋白質レベルで消失することから、C-CPE と結合した claudin が細胞内に取り込まれ分解を受けると考えられる。¹⁸⁾ 実際、claudin の細胞内ドメインにはクラスリン結合ドメインが存在していること、筆者らのデータにおいても C-CPE と結合した claudin が細胞内に取

り込まれていることを示唆するデータがあることから、C-CPE の TJ バリアー機能阻害活性には C-CPE と claudin との結合が必須であると推察される。^{26,27)} CPE は claudin の細胞外 2nd ループ構造と結合することから、C-CPE の claudin-4 結合領域を中心に改変を加えることにより、C-CPE が親和性を持たない claudin-1, -2, -5 などの各種 claudin に対する modulator の創製が可能になると期待される。そこで、C-CPE を prototype として用いた各種 claudin modulator の創製を図るために claudin modulator 探索系の構築を行った。

探索系には、医薬基盤研の堤 康央博士が考案された protein synthesis inhibitory factor (PSIF) をレポーター蛋白質として用いた phage display library の系を導入させて頂いている。本システムでは、claudin 結合ドメインをランダムなアミノ酸配列に置換した C-CPE を PSIF との融合蛋白質として phage 表面上に提示した C-CPE library を作製することができ、目的とする claudin 蛋白質を用いた 1 次スクリーニングを迅速に行うことが可能である。さらに、PSIF 自体は受容体との結合活性を欠損しており、PSIF と細胞との結合が PSIF に結合しているリガンド分子に依存することから、標的受容体を発現している細胞に対する細胞傷害性を指標とした 2 次スクリーニングを行い、細胞膜上の claudin に対する親和性を評価することができる。また、発現ベクターにはペリプラズム移行シグナルが付加されており、PSIF との融合蛋白質は大腸菌の培養上清中に分泌されることから、非常に簡便なスクリーニング系となっている。

まず、本システムの妥当性を評価するために PSIF との融合蛋白質 (C-CPE-PSIF) を作成し、各種細胞に対する傷害性を評価した。C-CPE-PSIF 処理に伴う claudin 非発現細胞 (L 細胞) に対する毒性は観察されず、claudin-4 発現細胞である MCF-7 細胞に対して顕著な細胞毒性が観察された。²⁸⁾ CPE の受容体結合領域である C 末 30 アミノ酸を欠損させた C-CPE289 との融合蛋白質 (C-CPE289-PSIF) では MCF-7 細胞に対する毒性は消失しており、C-CPE の添加に伴い C-CPE-PSIF の細胞傷害性は抑制された。²⁸⁾ 以上の結果より、C-CPE-PSIF は C-CPE を介して細胞と結合していることが示唆された。次に、C-CPE-PSIF の claudin

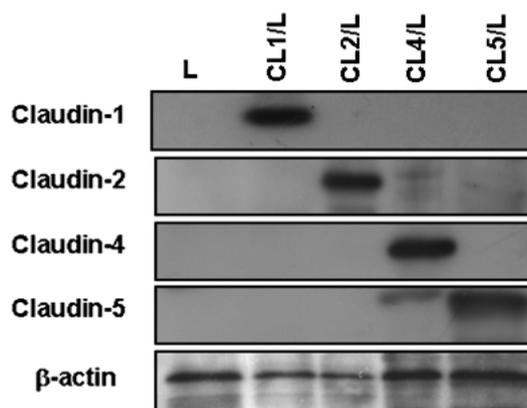
特異性を各種 claudin 発現 L 細胞を用いて評価したところ、C-CPE-PSIF は claudin-1, -2, -5 発現細胞に対しては毒性を示さなかったのに対して、claudin-4 発現細胞に対しては顕著な細胞傷害性が認められた (Fig. 7). この C-CPE-PSIF は phagemid vector を骨格に持っており、C-CPE-PSIF をファージ表面上に提示した形でライブラリーを構築することが可能となっており、このファージ表面上に提示した C-CPE-PSIF が claudin-4 と結合することも既に確認している (our unpublished data). C-CPE の機能ドメイン解析のデータを基にした C-CPE-PSIF phage library の構築は終了しており、現在、

この library システムを用いて新規 claudin modulator のスクリーニングを進めているところである.

7. おわりに

Claudin はホモ及びヘテロな strand を細胞膜上で構成しており、TJ では向かい合う strand 同士が対合している.²⁹⁾ Claudin は 24 種類存在することから、これらの複雑な組合せにより多種多様な TJ strand を作成することが可能となる。これらの組合せ毎に TJ のバリアー機能が異なることが知られており、claudin は生体の多様な組織固有の内部環境維持機構の中核を担う分子機構であると目されている.¹⁵⁾ 例えば、MDCK II 細胞に claudin-11, -15 を

A. Immunoblot assay



B. Cytotoxicity of C-CPE-PSIF in claudin-expressing L cells

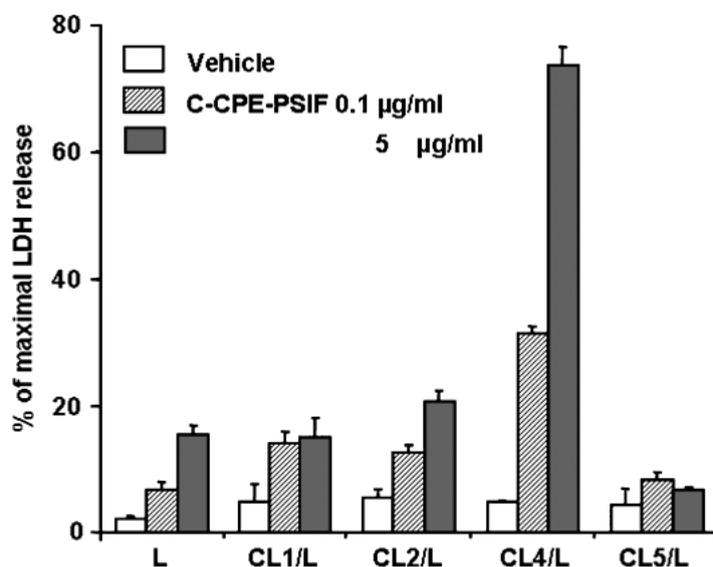


Fig. 7. Involvement of Claudin-4 in the Cytotoxicity of C-CPE-PSIF

A) Immunoblot analysis of claudin-expressing L cells. The expression profiles for claudin family members were determined by immunoblotting. B) Cytotoxicity of C-CPE-PSIF in claudin-expressing L cells. L cells expressing claudins were treated for 36 h with the indicated concentrations of C-CPE-PSIF, after which LDH release was assessed. Results represent the means \pm S.D. ($n=3$).

強制発現すると TJ のバリアー機能が亢進するのに対して、LLC-PK1 細胞ではバリアー機能は低下する。^{13,30} また、claudin-3 は claudin-1, -2 との strand を形成できるものの、claudin-1 と -2 の組合せでは strand は構築されない。³¹ さらに、claudin-5 は多くの臓器で発現が観察されるが、TJ の物質透過障壁機能は血液脳関門においてのみ観察されている。¹⁷ このように claudin は 24 種類からなるファミリーの特徴を駆使して生体内の多種多様な内部環境維持に積極的に関与しており、claudin が TJ の構成因子として重要な役割を担っていることが実証されてきている。しかしながら、TJ のバリアー機能についてはようやく構成要因が表舞台に登場してきた段階にあり、これらの構成要因の制御系についてはほとんど解明されていない。今後これらの TJ 構成蛋白質のバリアー機能制御系の知見が集積されれば、C-CPE とは作用点の異なる claudin modulator の創製への展開が期待できる。

TJ を介した薬物送達における最大の課題は、TJ の開口に伴う薬物以外の物質の非特異的な流入である。これは、既存の吸収促進剤の課題として挙げられてきており、paracellular route が臨床応用に適していない方法論であることの根拠となっている。当然のことながら、claudin を介した薬物送達においても同様の課題が懸念される。また、C-CPE の吸収促進効果及び TJ バリアー低下活性は時間依存的であることから、現状の作用のままでは臨床応用するのは困難であり、C-CPE の機能解析データに基づく最適化や間接的な claudin バリアー機能阻害剤の開発などが臨床応用に向けて重要になってくる。Claudin 欠損マウスを用いた検討では、透過可能な分子サイズが制限されていることから、claudin を標的とした薬物透過促進では透過分子のサイズを制御することが可能になると予想される。さらに、claudin modulator を用いたアプローチでは、作用部位に特異性を具備できること、少なくとも C-CPE の TJ 開口作用は可逆的であることを考慮すると、従来の吸収促進剤において課題とされていた副作用についてはある程度制御可能になると期待される。また、claudin modulator のみで十分な薬物送達能を発揮することが困難な場合では、今後解明される claudin のバリアー機能の分子基盤の結果を踏まえ、間接的な claudin 制御方法の確立も有効な方

策になるであろう。

Claudin 以外の TJ 蛋白質を利用した薬物送達方法については、occludin peptide を利用した方法が 1997 年、2002 年に報告されている。^{32,33} しかしながら、この系では細胞レベルの解析しかなされておらず、occludin から claudin への研究の変遷を踏まえると、少なくとも occludin 単独でのアプローチは多くの課題を内包しているように思える。最近の Barriology のトピックスとして、2005 年 12 月に新規 TJ 構成蛋白質として tricellulin が見出されたことが挙げられる。³⁴ Claudin 及び occludin はともに隣接する 2 つの細胞の間隙に存在する bicellular junction における物質透過を制御しているが、上皮細胞層では 3 つの細胞が接する tricellular junction も存在しており、上皮細胞層における物質透過制御では bicellular junction ばかりでなく、tricellular junction の制御も重要になってくる。この tricellular junction における透過障壁機能を担う分子として見出されたのが tricellulin である。³⁴ Tricellulin をロックダウンすると TJ のバリアー機能の低下及び物質の透過の促進が生じており、tricellulin modulator を利用した薬物送達方法構築の可能性が示唆されている。³⁴ 今後は、従来までの bicellular junction ばかりでなく tricellular junction をも考慮した TJ modulator の創製が必要とようになってくるであろう。

Claudin は TJ において組織特異的な物質透過制御能を持っていることから、薬物送達における標的分子として有用であると言える。既存の TJ modulator (吸収促進剤) は Barriology の分子基盤に基づき確立された方法論ではなく、筆者らのグループは世界に先駆けて claudin を標的とした分子標的型の TJ modulator の有用性を見出した。この TJ を開口するという薬物送達戦略は 1 つの方法論で多種多様な医薬品候補化合物に適用可能であり、現在上皮細胞層や血管内皮細胞層を透過することができずに臨床応用が断念されている領域において福音になると言える。生体に元来備わっている物質透過システムであるトランスポーターを利用した transcellular pathway が、最も理に適っている薬物送達方法であることは論を待たない。しかしながら、短期、中期的に俯瞰したときには、paracellular route を利用した臨床応用可能な薬物送達方法の確立に挑むこ

とは重要なことであろう。今後は、occludin, tricellulin 及び claudin のバリア機能を空間特異的かつ時間特異的に制御可能な modulator の創製を図り、薬物送達学において paracellular route を介した新たな DDS 戦略の提示に挑んでいく。

謝辞 本研究を遂行するに当たり、ご指導ご鞭撻を賜りました昭和薬科大学薬剤学研究室渡邊善照先生、藤井まき子先生に心から厚くお礼申し上げます。また、本稿で紹介した成果は、増山 茜さん、海老原千晶さん、原田東樹君、高橋 梓さん、古宮栄利子さんを始めとした昭和薬科大学薬剤学研究室の学生諸氏の激的な努力及び相互作用を頂いたすべての研究者のご厚情の所産であり、皆様方に衷心よりお礼申し上げます。最後になりましたが、本研究は文部科学省科学研究費、武田科学振興財団、資生堂サイエンス研究グラントのご援助を賜りました。ここにお礼申し上げます。

REFERENCES

- Majumdar S., Duvvuri S., Mitra A. K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 1437-1452 (2004).
- Mizuno N., Niwa T., Yotsumoto Y., Sugiyama Y., *Pharmacol. Rev.*, **55**, 425-461 (2003).
- Gonzalez-Mariscal L., Nava P., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 811-814 (2005).
- Tiwari S. B., Amiji M. M., *Curr. Drug Deliv.*, **3**, 219-232 (2006).
- Kondoh M., Masuyama A., Takahashi A., Asano N., Mizuguchi H., Koizumi N., Fujii M., Hayakawa T., Horiguchi Y., Watanabe Y., *Mol. Pharmacol.*, **67**, 749-756 (2005).
- Sugiyama Y., Suzuki H., Itoh K., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **47**, 97-109 (1999).
- Yamamoto A., *Drug Deliv. Syst.*, **20**, 404-415 (2005).
- Lee V. H. L., Yamamoto A., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **4**, 171-207 (1990).
- Lee V. H. L., Yamamoto A., Kompella U. B., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **8**, 91-192, (1991).
- Tomita M., Hayashi M., Awazu S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 739-743 (1995).
- Anderson J. M., *News Physiol. Sci.*, **16**, 126-130 (2001).
- Anderson J. M., Van Itallie C. M., *Am. J. Physiol.*, **269**, G467-G475 (1995).
- Van Itallie C. M., Anderson J. M., *Annu. Rev. Physiol.*, **68**, 403-429 (2006).
- Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **141**, 1539-1550 (1998).
- Furuse M., Tsukita S., *Trends Cell Biol.*, **16**, 181-188 (2006).
- Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **156**, 1099-1111 (2002).
- Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **161**, 653-660 (2003).
- Sonoda N., Furuse M., Sasaki H., Yonemura S., Katahira J., Horiguchi Y., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **147**, 195-204 (1999).
- Knipp G. T., Ho N. F. H., Barsuhn C. L., Borchardt R. T., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1105-1110 (1997).
- Watson C. J., Rowland M., Warhurst G., *Am. J. Physiol.*, **281**, C388-C397 (2001).
- Hanna P. C., Mietzner T. A., Schoolnik G. K., McClane B. A., *J. Biol. Chem.*, **266**, 11037-11043 (1991).
- Takahashi A., Kondoh M., Masuyama A., Fujii M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., Watanabe Y., *J. Control. Release*, **108**, 56-62 (2005).
- Fujita K., Katahira J., Horiguchi Y., Sonoda N., Furuse M., Tsukita S., *FEBS Lett.*, **476**, 258-261 (2000).
- Katahira J., Inoue N., Horiguchi Y., Matsuda M., Sugimoto N., *J. Cell Biol.*, **136**, 1239-1247 (1997).
- Masuyama A., Kondoh M., Seguchi H., Takahashi A., Harada M., Fujii M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., Watanabe Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, 789-795 (2005).
- Ivanov A. I., Nusrat A., Parkos C. A., *Mol. Biol. Cell*, **15**, 176-188 (2004).
- Matsuda M., Kubo A., Furuse M., Tsukita S., *J. Cell Sci.*, **117**, 1247-1257 (2004).
- Ebihara C., Kondoh M., Hasuie N., Harada M., Mizuguchi H., Horiguchi Y., Fujii M., Watanabe Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **316**, 255-260 (2006).
- Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S.,

- J. Cell Biol.*, **153**, 263–272 (2001).
- 30) Van Itallie C. M., Fanning A. S., Anderson J. M., *Am. J. Physiol.*, **285**, F1078–F1084 (2003).
- 31) Furuse M., Sasaki H., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **147**, 891–903 (1999).
- 32) Wong V., Gumbiner B. M., *J. Cell Biol.*, **136**, 399–409 (1997).
- 33) Tavelin S., Hashimoto K., Malkinson J., Lazorova L., Toth I., Artursson P., *Mol. Pharmacol.*, **64**, 1530–1540 (2003).
- 34) Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita Sa., Tsukita Sh., *J. Cell Biol.*, **171**, 939–945 (2005).