

Claudin を標的とした非侵襲性投与技術の開発

高橋 梓,* 近藤昌夫, 八木清仁

A Non-invasive Drug Delivery System Using Claudin Binder

Azusa TAKAHASHI,* Masuo KONDOH, and Kiyohito YAGI

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

(Received July 26, 2011)

The intercellular spaces between adjacent epithelial cells are sealed by tight junctions (TJs). Modulation of TJ-seal is a potent strategy for drug absorption. Claudin is a key structural and functional component of TJ-seal. Claudin comprises a tetra-transmembrane protein family consisting of more than 20 members, whose expression profiles and barrier-function differ among tissues. For instance, claudin-1 plays roles in the epidermal and mucosal barriers, and claudin-4 regulates the mucosal barrier. Claudin forms homo- and hetero-type TJ strands. Properties of TJ-seal are determined by combination of the claudin family members. Some claudin strands work as size-selective or charge-selective paracellular routes for solutes. Thus, claudin modulators will make it possible to deliver drugs in a solute- and tissue-specific manner. The C-terminal fragment of the *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) is the most characterized claudin modulator. In this review, we describe potency of claudin-targeting mucosal absorption, and we mentioned development of a novel claudin modulator using C-CPE as a prototype.

Key words—tight junction; claudin; *Clostridium perfringens* enterotoxin; drug delivery

1. はじめに

昨今のゲノム・プロテオーム創薬の進展に伴い、ペプチド・タンパク質・核酸などのバイオ医薬が次世代医薬品として台頭しつつあり、2010年代末までに、世界の新薬の約30%がバイオ医薬品で占められると言われている。一般的に、バイオ医薬は消化酵素等によって分解を受け易いこと、生体膜透過性に乏しいことから、臨床応用に際しては多くのバイオ医薬が侵襲性の注射による投与を余儀なくされているのが現状である。投与の利便性及び患者の生活の質(QOL)を考慮すると、経口・経鼻・経皮投与などの非侵襲性投与が理想的な投与方法であるものの、元来粘膜や皮膚は生体内外を隔てるバリア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。粘膜を介した吸収促進法は30年余りに渡り吸収促進剤として研究開発されてきている

が、吸収促進活性の特異性に乏しく粘膜傷害性も観察されるなどの理由から実用化されているのはカプリン酸ナトリウムなどに過ぎない。既存の吸収促進剤は1980年代に開発されたものが大半を占めており、当時、上皮細胞バリアの分子基盤は未解明であった。

皮膚及び粘膜面には上皮細胞層が存在し、隣接する細胞間隙に存在するtight junction (TJ)によって細胞間隙はシールされており物質透過が抑制されていることから、TJバリア制御が非侵襲性投与方法開発の基本戦略の1つとなっている。TJの発見から約40年の歳月を経て、1998年に京都大学月田博士のグループによりTJシールの本体としてclaudinが同定された。¹⁾ Claudinは分子量23 kDaの4回膜貫通タンパク質であり、現在までに27種類の分子が同定されている。²⁾ 興味深いことにclaudinの発現及びバリア機能には組織特異性が観察され、claudin-1は粘膜や皮膚バリア、claudin-4は粘膜バリアを担っていることが明らかになっている。さらにclaudinはTJにおいてホモ及びヘテロストランドを形成していること、27種類存在する分子の組

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

*e-mail: azusa@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成22年度日本薬学会近畿支部奨励賞(医療系薬学)の受賞を記念して記述したものである。

み合わせによって多種多様な生体バリアを形成していること、claudin が分子量依存的・荷電選択的な物質透過経路として機能していること、claudin ストランドのダイナミックな再構成により物質輸送がなされていることが明らかになっている。³⁾ このことは、claudin を自由自在に制御することができれば、従来の吸収促進剤にはない組織特異性及び透過物質特異性を兼ね備えた、細胞間隙経路を介した新たな薬物送達法の開発が可能になることを示唆している。⁴⁾

以上の背景を踏まえ、筆者らは、claudin-4 binder であるポリペプチド (C-CPE) を用い、claudin を利用した非侵襲性投与の proof of concept (POC) を確立してきた。本総説では、claudin を標的とした粘膜吸収促進法の開発、及び C-CPE を prototype として用いた新規 claudin binder の創製について紹介させて頂く。

2. Claudin を利用した吸収促進法の開発

Claudin の発見から 10 年もの月日が経過したが、いまだ claudin binder の開発はほとんど進展していない。Claudin のバリア機能を阻害する分子としては、*Clostridium perfringens* enterotoxin の C 末断片 (C-CPE) が claudin-4 のバリア機能を阻害する分子として唯一報告されていた。¹⁾ そこで、筆者らは C-CPE を claudin modulator のモデル分子として用い、claudin を標的とした粘膜吸収促進法の可否について検証を試みた。

まず、モデル薬物として分子量 4000 のデキストラン (FD-4) を用い、*in situ* loop assay によりラット空腸における粘膜吸収促進効果を解析した。C-CPE 処理により血漿中 FD-4 濃度の上昇が観察され、臨床応用さ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を C-CPE はわずか 0.1 mg/ml で示していた。⁵⁾ 過去の報告により、CPE は C 末 30 アミノ酸を介して受容体と相互作用することが知られていた。⁶⁾ そこで、C-CPE の C 末 30 アミノ酸、16 アミノ酸を欠損させた C-CPE289、C-CPE303 を作製したところ、いずれの欠損体も claudin-4 結合性を消失していた。⁵⁾ C-CPE289、C-CPE303 では吸収促進活性が観察されなかったことから、C-CPE は claudin-4 に作用することで吸収促進活性を発揮しているものと推察される (Fig. 1).⁵⁾

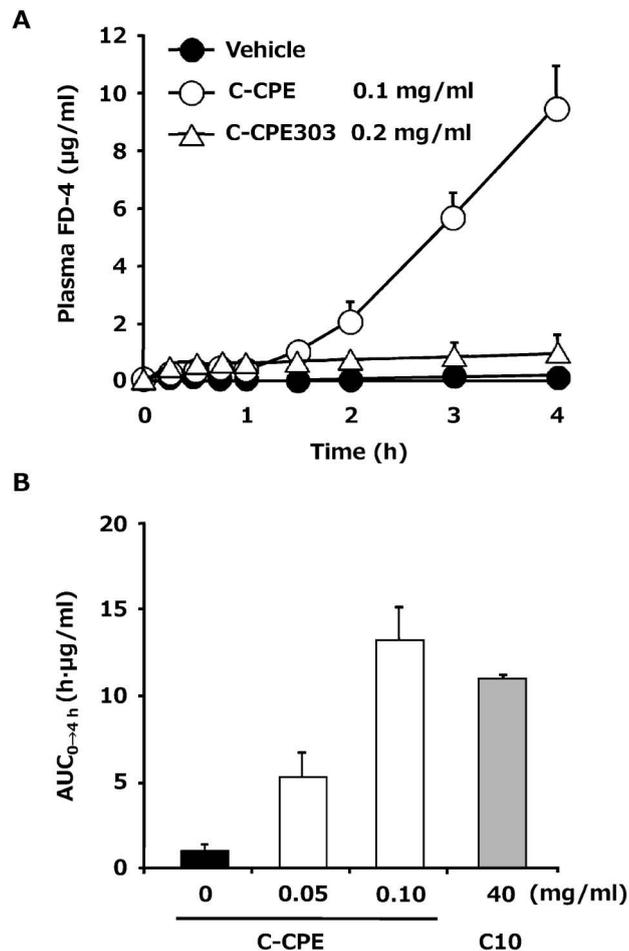


Fig. 1. Effect of C-CPE on Jejunal Absorption in Rats

Rat jejunum was treated with FD-4 (2 mg) in the presence of C-CPE, C-CPE303 or C10. The FD-4 levels in plasma collected from the jugular vein were determined (A), and the AUC_{0-4h} was calculated (B). Data are means \pm S.E. ($n=4$).

次に、モデル薬物として現在骨粗鬆症治療薬として使用されているヒト副甲状腺ホルモン hPTH を用いて、腸管・経鼻・経肺吸収促進効果を解析した。C-CPE 処理により、鼻粘膜からの hPTH 吸収が観察されたが、腸管及び肺胞粘膜からの吸収は観察されなかった。C-CPE を前投与することで、hPTH の吸収が観察されていたことから、腸管及び肺胞粘膜では、C-CPE が claudin-4 バリアを阻害する前に hPTH の分解が生じている可能性が考えられた。

そこで次に、claudin を標的としたバイオ医薬の非侵襲性投与法を開発するために、物性に優れた新たな claudin-4 modulator の創製を試みた。2008 年、Anderson のグループは C-CPE の N 末 10 アミノ酸欠損体を作製し立体構造の解明に成功していた。⁷⁾ そこで、C-CPE の立体構造情報を基に N 末欠損体

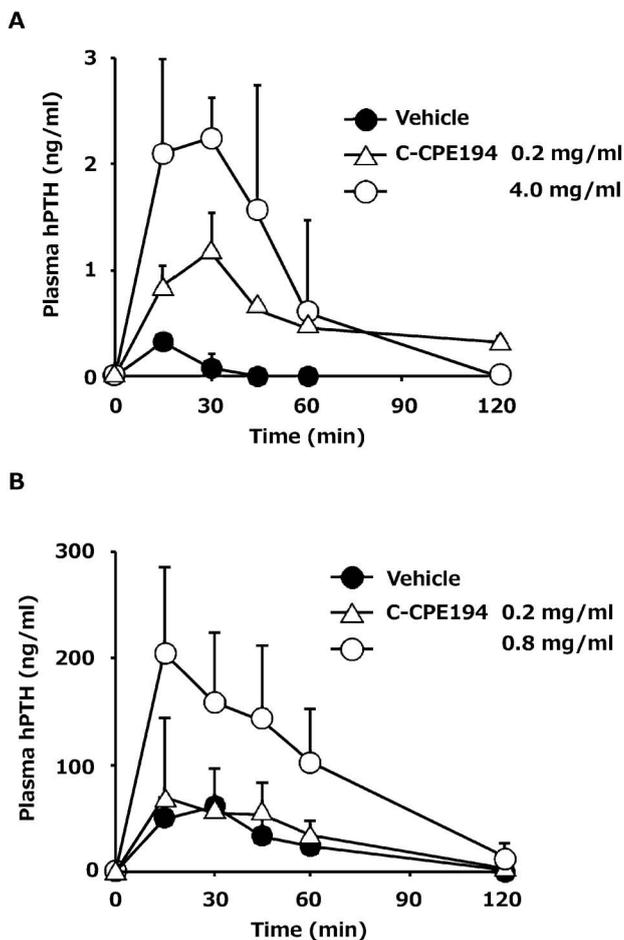


Fig. 2. Mucosal Absorption of hPTH by C-CPE194

(A) Jejunal absorption of hPTH. Rat jejunum was treated with hPTH (100 µg) in the presence of C-CPE194 at the indicated doses. Time course changes of plasma hPTH were assayed. (B) Pulmonary absorption of hPTH. hPTH (150 µg) and C-CPE194 at the indicated doses were pulmonaryly administered. Time course change of plasma hPTH were analyzed. Data are means ± S.E. (n=4).

を作製し、claudin-4 結合性及び溶解性を解析したところ、C-CPE の N 末を 10 又は 21 アミノ酸欠損させることで、claudin-4 結合性を保持したまま溶解性が 10 倍以上向上することを見出した。⁸⁾ N 末 10 アミノ酸欠損体 (C-CPE194) の溶解性が最も高かったことから、C-CPE194 を用いて hPTH の吸収促進効果を解析したところ、高濃度処理することにより腸管及び肺胞粘膜において hPTH の顕著な吸収促進効果が観察され (Fig. 2),⁸⁾ claudin-4 modulator を利用したバイオ医薬の非侵襲性投与の POC を初めて確立した。

3. C-CPE 変異体ライブラリの作製

前述したように、粘膜及び皮膚バリア制御が非侵襲性投与方法開発の基本戦略の 1 つとなっている。これまでの上皮細胞バリア研究の進展により、clau-

din-1 が粘膜や皮膚、claudin-4 が粘膜バリアを担っていることが明らかになっていることから、claudin-1 及び claudin-4 の制御が非侵襲性投与の鍵を握っていると考えられる。C-CPE を用いた検討から claudin binder がバリア制御能を有していることが明らかになっているものの、claudin は抗原性が低い上にタンパク質精製が困難であり、抗体を含め claudin binder の開発は立ち遅れているのが現状である。そこで筆者らは、claudin-4 binder である C-CPE を prototype として用い、claudin-1 及び claudin-4 に結合性を有する分子の創製を試みた。

まず、ファージ表面提示法を用いて C-CPE 変異体ライブラリを作製するために、C-CPE の機能ドメインの解析を試みた。C-CPE の C 末 16 アミノ酸を欠損させると claudin-4 結合性を消失していたことから、C 末 16 アミノ酸中に claudin-4 結合ドメインが存在していると考えられる。そこで、C 末 16 アミノ酸をアラニンスキャンにより解析したところ、Y306, Y310, Y312, L315 をアラニンに置換することで claudin-4 結合性が低下していた (Table 1)。一方、興味深いことに、S304, S305, S307, N309, S313, K318 をアラニンに置換した変異体では C-CPE に比して claudin-4 結合性の亢進が認められた (Table 1)。⁹⁻¹¹⁾ そこで、アラニン置換により claudin-4 結合性が亢進していたアミノ酸をランダムなアミノ酸に置換した 1.38×10^7 種類の C-CPE 変異体提示ファージライブラリを作製した。

4. Claudin-1 and -4 binder の創製

さて、claudin binder のスクリーニングには claudin タンパク質が不可欠であるものの、claudin は膜貫通領域が多くタンパク質の精製に成功した例は依然として claudin-4 のみである。そこで、claudin の細胞外領域のペプチドや claudin 発現細胞を用いたスクリーニングを試みたものの、非特異的な結合が多く claudin binder の取得には成功しなかった。浜窪博士 (東京大学先端研) は、発芽バキュロウイルス (BV) 膜上に膜タンパク質が intact な状態で提示されることを見出し、BV を利用した膜タンパク質発現系を開発している。¹²⁾ そこで、claudin 提示 BV を利用した claudin binder スクリーニング系の構築を試みた。Claudin-4 提示 BV は claudin-4 binder とのみ特異的に結合すること、ネガティブコントロールファージと C-CPE 提示ファージの混

Table 1. Competitive Inhibition of C-CPE-PSIF-induced Lactate Dehydrogenase Release by Mutant C-CPEs

C-CPE mutants	Inhibitory ratio (% of C-CPE)
C-CPE	100
S304A	125.6±0.7
S305A	126.8±0.2
Y306A	63.8±0.4
S307A	123.6±2.2
G308A	99.1±2.7
N309A	125.6±1.8
Y310A	72.2±2.3
P311A	114.9±0.5
Y312A	73.1±2.4
S313A	132.9±0.8
I314A	94.3±3.1
L315A	69.1±2.7
Q317A	96.8±1.6
K318A	126.2±2.1
F319A	111.5±3.9

After a 1 h treatment with C-CPE or mutant C-CPEs at 5 µg/ml, claudin-4-expressing L cells were treated with C-CPE-PSIF as a claudin-4-directed toxin (0.2 µg/ml) for 36 h, and the release of lactate dehydrogenase (LDH) was determined. The results are shown as the inhibitory ratio of C-CPE, and the values are the means±S.D. (n=4).

合液から効率的に C-CPE 提示ファージが濃縮されたことから、claudin 提示 BV を用いることで claudin binder のスクリーニングが可能になるものと推察された (Fig. 3).¹³⁾

そこで、claudin-1 提示 BV を用いて C-CPE 変異体ライブラリの中から claudin-1 結合性ファージのスクリーニングを試みたところ、claudin-1 に対して高い結合性を示すファージクローンが複数認められた。高い claudin-1 結合性を示したファージクローンのシーケンス情報を基にタンパク質を作製し、claudin 結合性を解析したところ、C-CPE 変異体 (m19) は claudin-1 結合性を有していた (投稿準備中)。m19 は、claudin-4 結合性を保持していたことから、m19 は claudin-1/-4 binder であるものと推察された (投稿準備中)。Caco-2 細胞の単層膜培養系を用いて膜電気抵抗値 TEER を指標に、m19 の TJ バリア制御活性を解析し、m19 は優れた TJ バリア制御活性を有することを見出した (投稿準備中)。さらに、モデル薬物として FD-4 を用いて吸収促進効果を解析したところ、m19 は C-CPE に比して優れた粘膜吸収促進活性を有していた。今後は本 binder を druggable claudin modulator の lead として用い、非侵襲性投与技術の顕在化

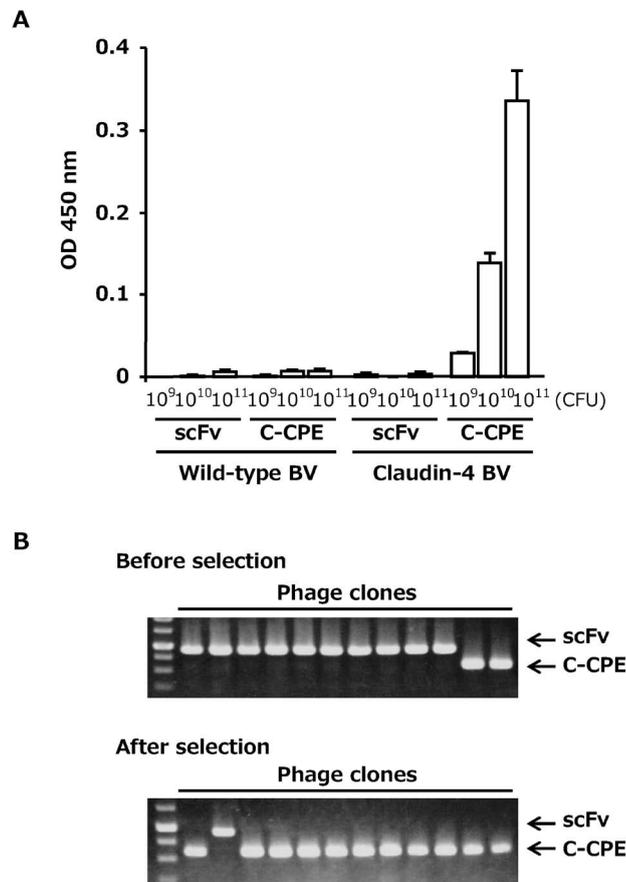


Fig. 3. Selection of C-CPE-displaying Phage by Using the Claudin-4-displaying Baculovirus System

(A) Interaction of C-CPE-displaying phage with claudin-4-displaying baculovirus (BV). Wild-type BV or claudin-4 BV was coated on an immunoplate, and then scFv-displaying phage or C-CPE-displaying phage was added to the BV-coated immunoplate at indicated concentrations. The BV-bound phages were detected by ELISA with anti-M13 antibody. Data are means±S.D. (n=3). (B) Enrichment of C-CPE-phage by the BV system. A mixture of scFv-phage and C-CPE-phage (mixing ratio of scFv-phage to C-CPE-phage=2 : 10) was incubated with a claudin-4 BV-coated immunotube, and the bound phages were recovered. Each phage clone was identified by PCR amplification, followed by agarose gel electrophoresis.

を試みていきたい。

5. おわりに

以上、これまで、TJ シールの分子基盤 claudin を標的としたバイオ医薬の粘膜吸収促進技術を世界に先駆けて開発し、優れた粘膜吸収促進活性を有する dual specific claudin binder の創製に成功した。Claudin modulator の実用化に際しては、claudin バリア制御活性を有する低分子化合物の開発、及び薬物吸収後に可及的速やかに claudin シールを回復させる方法論の確立も必要であり、今後は claudin バリアを自由自在に制御する技術を創出することで、患者に優しい非侵襲性投与の実現に貢献していきたい。

謝辞 本研究は、大阪大学大学院薬学研究科生体機能分子化学分野八木清仁先生、近藤昌夫先生を始めとする研究室のメンバー諸氏の多大な協力を得てなされたものであり、この場をお借りしてお礼申し上げます。また本研究の遂行にあたり、ご指導ご助言を賜りました昭和薬科大学薬剤学研究室渡邊善照先生、藤井まき子先生に感謝の意を表します。なお本研究は、文部科学省科学研究費補助金(21689006)、日本学術振興会特別研究員奨励費(222792)、厚生労働省科学研究費補助金、文部科学省地域イノベーションクラスタープログラムからのサポートにより実施されたものです。

REFERENCES

- 1) Sonoda N., Furuse M., Sasaki H., Yonemura S., Katahira J., Horiguchi Y., Tsukita S., *J. Cell Biol.*, **147**, 195–204 (1999).
- 2) Mineta K., Yamamoto Y., Yamazaki Y., Tanaka H., Tada Y., Saito K., Tamura A., Igarashi M., Endo T., Takeuchi K., Tsukita S., *FEBS Lett.*, **585**, 606–612 (2011).
- 3) Furuse M., Tsukita S., *Trends Cell Biol.*, **16**, 181–188 (2006).
- 4) Takahashi A., Kondoh M., Suzuki H., Yagi K., *Curr. Med. Chem.*, **18**, 1861–1865 (2011).
- 5) Kondoh M., Masuyama A., Takahashi A., Asano N., Mizuguchi H., Fujii M., Hayakawa T., Horiguchi Y., Watanabe Y., *Mol. Pharmacol.*, **67**, 749–756 (2005).
- 6) Hanna P. C., Mietzner T. A., Schoolnik G. K., McClane B. A., *J. Biol. Chem.*, **266**, 11037–11043 (1991).
- 7) Van Itallie C. M., Betts L., Smedley J. G. 3rd., McClane B. A., Anderson J. M., *J. Biol. Chem.*, **283**, 268–274 (2007).
- 8) Uchida H., Kondoh M., Hanada T., Takahashi A., Hamakubo T., Yagi K., *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1437–1444 (2010).
- 9) Takahashi A., Kondoh M., Masuyama A., Fujii M., Mizuguchi Y., Horiguchi Y., Watanabe Y., *J. Control. Release*, **108**, 56–62 (2005).
- 10) Harada M., Kondoh M., Ebihara C., Takahashi A., Komiya E., Mizuguchi H., Tsunoda S., Horiguchi Y., Yagi K., Watanabe Y., *Biochem. Pharmacol.*, **73**, 206–214 (2007).
- 11) Takahashi A., Komiya E., Kakutani H., Yoshida T., Fujii M., Horiguchi Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Tsunoda S., Koizumi N., Isoda K., Yagi K., Watanabe Y., Kondoh M., *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 1639–1648 (2008).
- 12) Urano Y., Yamaguchi M., Fukuda R., Masuda K., Takahashi K., Uchiyama Y., Iwanari H., Jiang S. Y., Naito M., Kodama T., Hamakubo T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 191–196 (2003).
- 13) Kakutani H., Takahashi A., Kondoh M., Saito Y., Yamaura T., Sakihama T., Hamakubo T., Yagi K., *PLoS One*, **6**, e16611 (2011).