

《若手研究者紹介》



生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究

近 藤 昌 夫* Masuo Kondoh

大阪大学大学院薬学研究科

1. はじめに

オーストラリアの動物学者ローレンツは、動物の生活史のある特定の時期に特定の物事がごく短時間で覚えこまれその記憶が長期間に渡り持続する学習現象「刷り込み」を見出している。小職の研究における刷り込みは、学部3回生の時に恩師の生物薬剤学の講義の中で聞いた「細胞製剤：細胞を敬え、細胞に学べ」という言葉である。本稿では、恩師による刷り込みを経て生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究に至るまでの経緯を振り返ってみたい。

入学後テニスに明け暮れていた小職は3回生に進学してから、少しずつ研究室配属を考え始めるようになっていた。小職なりに「未来の薬」について思案してみたものの、キックサーブやトップスピンドロブに関する知識では薬学に関するアイデアが思い浮かぶはずもなかった。小職なりに行き詰まりを感じていた矢先、恩師の生物薬剤学の講義の中で、「細胞製剤」という言葉を聞き、全身から鳥肌が立つような感動を覚えた。恩師は講義の中で、「自分の置かれた「場所」と「時間」に適合しつつ恒常性を維持している細胞が究極の剤形であること、この細胞から学ぶことにより必要な時に、必要な場所に、必要な量だけ薬を運ぶDDS技術の開発が可能になること」を熱く語られていた。大学院から恩師の研究室に入り、「細胞製剤：細胞を敬い、細胞に学ぶ」という学

問を徹底的に叩き込まれた。細胞生物学に立脚した薬剤学を志向する研究生活を送る中で、同じサイトカインの刺激であっても細胞によって細胞内シグナル伝達経路が異なり、その結果として刺激に対して相反する反応が惹起される場合もあることを知り、細胞によって顔ばかりでなく細胞内も異なることに非常に興味を惹かれた。その当時の私の知識では、当時の薬剤学は細胞表面の議論に終始しているように思え（後に単なる勉強不足であることが分かったが）、『1) 細胞内の物質輸送の様子を見る、2) 細胞の時間（細胞周期）を学ぶ、3) 細胞内でのシグナル伝達の様子を見る』という3点について基礎力を身に付けた上で最終的に『独自の細胞製剤を開発する』という戦略を立て、博士課程在学中に理化学研究所抗生物質研究室に国内留学し、細胞周期阻害剤に関する研究に従事した。その後、徳島文理大学薬学部において、重金属や酸化的ストレスに対する生体応答反応に関する研究に携わり分子・細胞・個体レベルでの研究実施方法に関する基礎を多くの研究者からご教示頂き、同年代の研究者と「研究のオリジナリティーとは？」というテーマを肴に酒席において口泡を飛ばす議論を繰り返した。このときの議論仲間は、医学部、農学部、理学部、工学部など研究文化の異なるモザイク集団であった。振り返ると、この議論が小職の研究哲学をある程度形づくっていたように思う。

そして2002年4月に昭和薬科大学薬剤学教室に移動になったのを機に、独自の創薬研究領域の立ち上げに着手することを決意した。

*平成10年徳島文理大学薬学部助手、平成14年昭和薬科大学講師、平成18年大阪大学大学院薬学研究科助教授を経て平成19年4月より同大学准教授。研究テーマ：生体バリアを利用した創薬研究。趣味：テニス、ジョギング、散歩。連絡先：〒565-0871 吹田市山田丘1-6 E-mail: masuo@phs.osaka-u.ac.jp

2. これまで

独自の創薬研究領域の立ち上げを決意した時に思い浮かんだ言葉が、「細胞を敬え、細胞を学べ」という恩師の教えであった。小職がこの世界に飛び込むきっかけとなったこの言葉を念頭に置き、まず「どの細胞から学ぶか？」ということ考え、①創薬研究において重要な細胞であること、②創薬研究領域において未開拓の分野が残されていること、③活用する細胞生物学的知見が国産であること、④温故知新という基本方針を設定した上で、細胞生物学の教科書を紐解き、上皮細胞に注目することにした。

周知のように上皮細胞は生体内外・組織内外を隔てるバリアとして機能していること、悪性腫瘍の90%が上皮由来であること、多くの病原性微生物の侵入門戸となっていることから、上皮細胞は薬物吸収、癌治療や感染症治療・予防における創薬ターゲットとして有用な性質を有している。上皮細胞を標的とした創薬研究としては、80年代より吸収促進剤が研究開発されているものの、実用化された吸収促進剤はカプリン酸ナトリウムのみであり、非特異的な物質の流入に起因する安全性確保が困難であることから paracellular route を介した薬物吸収促進法の限界が指摘されている部分もあった。上皮細胞生物学の分野では、既に60年代には tight junction (TJ) によって paracellular route がシールされていることが知られていたが、TJ分子基盤の解明は遅れており、ようやく98年になってTJシールが膜蛋白質によって構成されていることが証明された。このことは、従来の吸収促進剤の限界は paracellular route を利用した創薬研究の限界を示しているのではなく、上皮細胞生物学の遅延によりTJの分子基盤に立脚した創薬戦略が取られてこなかったことに起因していることを意味していた。そこで小職のグループでは、TJの分子基盤に立脚した創薬研究領域の開拓を広義の目標として設定し、TJシールの機能本体でありシール機能に組織特異性を有する分子という条件により標的分子の絞り込みを試み、京大月田グループにより同定されていた claudin に注目した。

Claudin は分子量~23 kDa の4回膜貫通蛋白質であり、24種類の分子からなるファミリーを形成している。興味深いことに発現およびバリア機能には

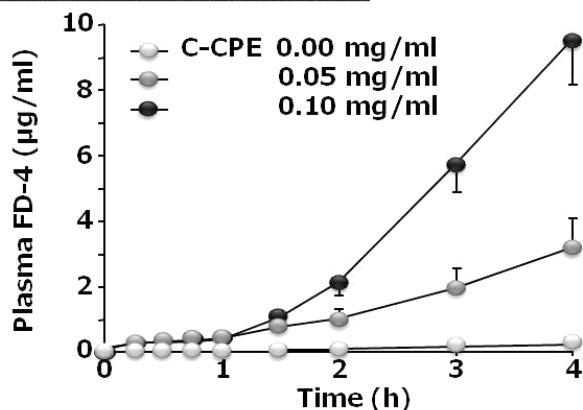
組織特異性が認められ、claudin-1は皮膚バリア、claudin-5は血液脳関門バリアを担っている。さらに、ヒトでは12種類の癌において発現異常が認められること、粘膜免疫組織に高発現していること、ウイルスの感染受容体としても機能していることから、claudinを標的とした薬物吸収促進法、癌ターゲティング法、粘膜ワクチン、抗ウイルス薬の開発など、新たな創薬研究領域創成の可能性が強く示唆された。しかしながら、claudinは抗原性が低い上に立体構造が解析されておらず、抗体を含めて claudin binder の創製は著しく立ち遅れており、claudinを利用した創薬研究は皆無に等しいのが現状であった。

ウエルシュ菌下痢毒素(CPE)はヒトの食中毒を引き起こすことから細菌学の分野で詳細な解析が進められており、97年にCPE受容体が同定されていたものの、本受容体の生理的役割についての解析は遅々として進展していなかった。99年月田グループにより、CPE受容体が claudin-4 であること、CPEの受容体結合領域断片(C-CPE)が細胞傷害性を伴うことなく claudin-4 に結合し claudin-4 バリア機能を阻害することが報告され、claudin が TJ バリア機能を担っていることが実験的に初めて証明されていた。小職は、徳島文理大在職中にウエルシュ菌研究の世界的権威である櫻井純先生から、細菌毒素の持つ特異性について薫陶を受けていたこともあり、この月田グループの報告を読んだ時にC-CPEを利用することで claudin を標的とした創薬研究を展開できると直感した。さらに、C-CPEはポリペプチドであり将来的な遺伝子工学的手法を用いた改変が容易(C-CPEを prototype として用いた新規 claudin binder の創製が可能)であることから、C-CPEを claudin binder のモデル分子として利用し、claudinを利用した創薬研究に着手することにした。

2002年7月に、C-CPEの遺伝子を持っている阪大微研堀口先生に手紙を差し上げ、C-CPE cDNA を譲渡して頂き、試行錯誤しながらC-CPE蛋白質を作製した。そして、当時修士1年生であった浅野長祥君にお願いし、モデル薬物として分子量4000のデキストラン(FD-4)を用いてラット腸管ループ法により粘膜吸収促進活性を解析してもらった。すると、わずか0.2 mg/mlの処理で劇的なFD-4の吸収促進活性が観察され、このとき粘膜傷害性は観察さ

れなかった。当時小職は天然物由来の生理活性物質の機能解析および胎盤における亜鉛代謝に関する研究を進めており、claudin を利用した研究はエフォートの10%程度を割いているに過ぎない状況であった。実際、生理活性物質の機能解析については論文1報がアクセプトされ、複数の論文を投稿準備中という状況であり、両研究とも順調に推移していた。そこで、主に下級生を中心にテーマの選択と集中に関して忌憚の無いディスカッションを行い、両研究テーマを切り上げ claudin を利用した創薬研究にチームを挙げて取り組むことを決意した。そして、C-CPE が唯一の claudin binder であることを踏まえ、① C-CPE を claudin binder のモデル分子として利用し、claudin を利用した創薬研究の可能性を検証すること、② C-CPE を prototype として用いた claudin binder 創製系を構築すること、③新たな claudin 制御分子の探索を試みることをメインテーマとして

A. 血漿中FD-4濃度の経時変化



B. AUC値

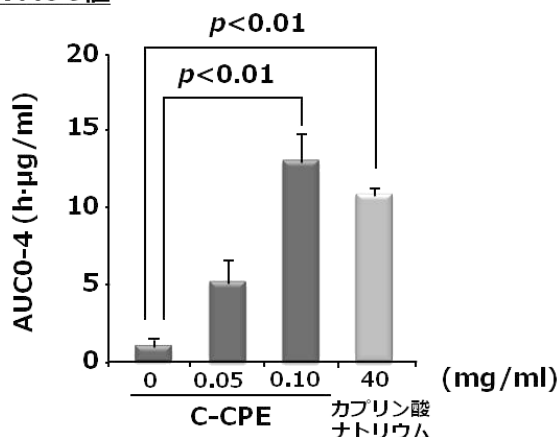


図1 C-CPE の腸管吸収促進活性

FITC ラベルした分子量 4000 のデキストラン (FD-4) をモデル薬物として用いて、ラット腸管ルーブ法により C-CPE の吸収促進活性を解析 (文献 1 を一部改変)。

設定し、claudin を利用した創薬研究に本格的にアタックすることにした。2002年12月のことである。

まず、C-CPE の粘膜吸収促進活性が claudin-4 を介して生じていることを確認するために、C-CPE の claudin-4 結合ドメインの同定を試み、C-CPE の claudin-4 結合領域欠損体を創出し、本欠損体を用いて claudin を利用した粘膜吸収促進法の有用性を明らかにした (図 1)¹⁾。さらに、C-CPE 変異体を用いて claudin を利用したペプチド医薬の経肺・経鼻吸収促進法を開発した²⁾。また、C-CPE と緑膿菌エキソトキシン由来の蛋白質合成阻害因子 (PSIF) との融合蛋白質 C-CPE-PSIF を作製し、claudin-4 発現癌細胞に対する抗腫瘍活性を解析し、C-CPE-PSIF が claudin-4 指向性分子であること、C-CPE-PSIF が *in vitro* および *in vivo* で抗腫瘍活性を有することを見出し、C-CPE を用いた癌ターゲティング法を確立した (図 2)^{3,4)}。さらに、2003 年に東大医科研の清野グループにより、粘膜免疫組織に claudin-4 が高発現していることが見出され、claudin-4 を標的とした粘膜免疫組織への抗原デリバリーの可能性が示唆されていた。そこで、C-CPE とモデル抗原の融合蛋白質を作製し、claudin-4 を標的とした粘膜ワクチン創製の可否を検証し、C-CPE とモデル抗原との混合液投与では抗原特異的な免疫応答が観察され

A. C-CPE-PSIF



B. Claudin (CL) 特異性

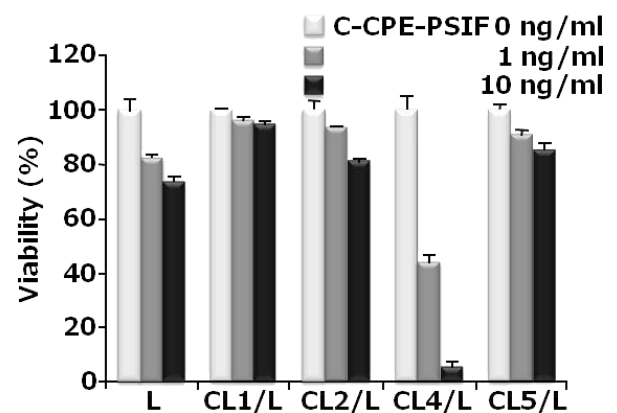


図2 Claudin-4 指向性分子

Pseudomonas aeruginosa exotoxin の蛋白質合成阻害ドメイン (PSIF) と C-CPE との融合体 (A) を作製し、各種 claudin 発現細胞に各濃度 24 時間処理後に WST アッセイにより細胞毒性を解析 (B)。

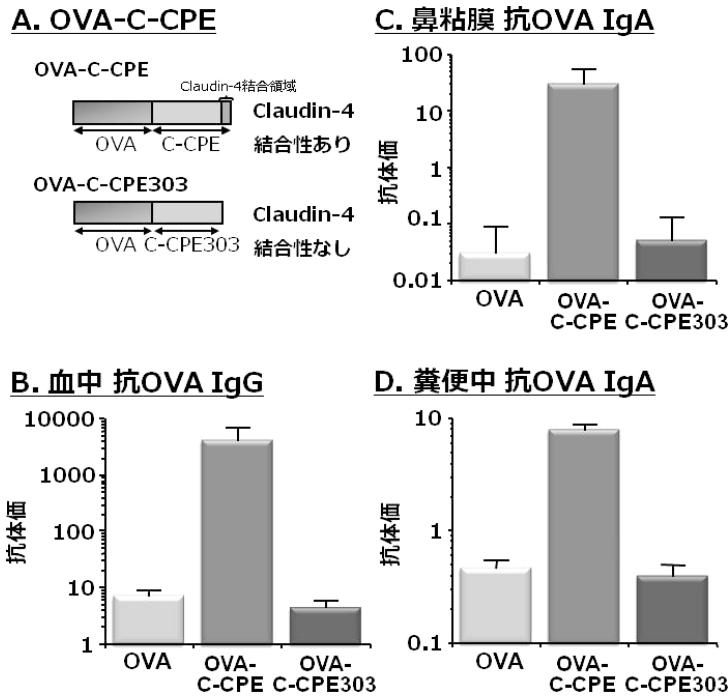


図3 Claudin binder を利用した粘膜ワクチン
 モデル抗原（卵白アルブミン：OVA）と C-CPE との融合体（A）を作製し，マウスに経鼻投与し，血中（B），鼻粘膜洗浄液（C），糞便抽出液（D）に含まれる OVA 特異的抗体価を解析。

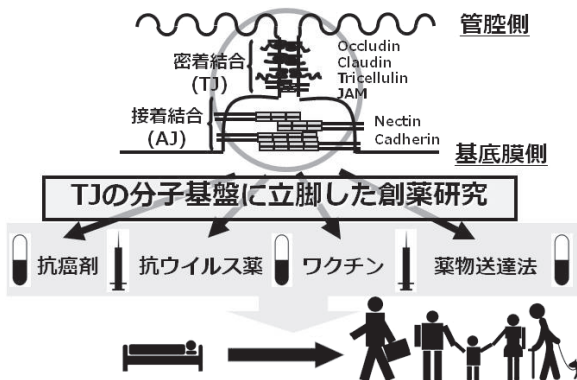


図4 生体バリアを利用した創薬研究

ないこと，融合蛋白質投与によって投与粘膜面のみならず遠隔粘膜面での抗原特異的 IgA 産生が起きること，claudin-4 結合性が消失した C-CPE 変異体との融合蛋白質では抗体価の上昇が観察されないことを見出し，claudin-4 を標的とした粘膜ワクチン技術を初めて確立した（図3）⁵⁾。さらに，C-CPE を prototype として用いた claudin binder 創製を図るために5年余りの歳月をかけて，C-CPE の claudin 結合残基を網羅的に解析，claudin binder のスクリーニングシステムを構築し，最近新規 claudin binder の取得に成功した（Unpublished data）。

以上，現在までの検討により，claudin を標的と

した粘膜吸収促進法，癌ターゲティング法，粘膜ワクチン技術を創製し，claudin を利用した創薬の可能性を先駆けて報告してきた。さらに，C-CPE に比して優れた粘膜バリア制御活性を有する新規 claudin binder の創製，および claudin binder 創製系の構築にも成功している。

3. これから

上述したように，現在までに claudin が創薬ターゲットとして多くの可能性を秘めていることを見出してきた。Claudin は24種類の分子が多様な組み合わせによって様々な性質を有する TJ シールを構成し，生体内の多種多様な内部環境を維持していることから，この内部環境維持機構を自由自在に制御することができれば，新たな drug delivery system (DDS) の開発に繋がる可能性がある。今後は，独自の claudin binder 創製技術を駆使して，多種多様な結合域を有する claudin binder を創製し，組織特異性および透過物質特異性を併せ持つ新規薬物吸収促進法の開発，新規癌ターゲティング法，ウイルス感染阻害剤の開発などの創薬研究を展開していきたい（図4）。

三つ子の魂百までというように，「細胞を敬え，細

胞に学べ」という刷り込みに支配され、上皮細胞および claudin の可能性に魅せられ、現在まで歩んできた。引き続き小職らのグループでは、本邦独自の細胞生物学研究土壌に育まれた本邦独自の創薬領域の開拓、およびその成果の実用化を目指し、激烈にチャレンジを続けていく予定である。

本稿を執筆する機会を与えて頂いた出口芳春先生を始めとした編集委員の先生方に深謝申し上げます。また、本稿でご紹介した研究成果は、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、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、アスピオファーマ株式会社内田博司先生をはじめとした多くの先生方のご指導ご鞭撻の所産であり、相互作用頂いた全ての方々に衷心よりお礼申し上げます。

また、実際の研究は多くの優秀な学生によって進められております。Claudin を利用した粘膜吸収促進に関する研究は増山茜さん、原田東樹君、高橋梓さん、古宮栄利子さんを中心としたグループ、claudin を利用したバイオ医薬の非侵襲性投与法の開発は山浦利章君、高橋梓さん、松久幸司君、松下恭平君、各務洋平君を中心とした研究グループ、claudin を利用した癌ターゲティング法の開発は海老原千晶さん、佐伯理恵さん、角谷秀樹君を中心とした研究グループ、claudin を利用した粘膜ワクチンの開発は角谷秀樹君、深坂昌弘君、鈴木英彦君を中心とした研究グループ、新規 claudin binder の創製は高橋梓さん、山浦利章君、斎藤郁美子さん、松下恭平君、各務洋平君を中心とした研究グループによって進め

られたものでございます。この場をお借りして相互作用頂いた学生の皆様に改めてお礼申し上げます。

当該研究成果の一部は、文部科学省科研費、文部科学省知的クラスター創成事業、厚生労働省科研費、武田科学振興財団からのサポートにより実施されたものでございます。 Grant サポートを賜りました関係者の皆様方に深謝申し上げます。

最後に、「細胞製剤」という学問を授けていただいた恩師眞弓忠範先生に衷心よりお礼を申し上げ、拙稿の結びとさせていただきます。

引用文献

- 1) M. Kondoh, A. Masuyama, A. Takahashi, N. Asano, H. Mizuguchi, N. Koizumi, M. Fujii, T. Hayakawa, Y. Horiguchi, A. Watanabe, A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator, *Mol. Pharmacol.*, **67**, 749–756 (2005).
- 2) H. Uchida, M. Kondoh, T. Hanada, A. Takahashi, T. Hamakubo, K. Yagi, A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide, *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1437–1444 (2010).
- 3) R. Saeki, M. Kondoh, H. Kakutani, S. Tsunoda, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, Y. Tsutsumi, Y. Horiguchi, K. Yagi, A novel tumor-targeting using a claudin-4-targeting molecule, *Mol. Pharmacol.*, **76**, 918–926 (2009).
- 4) R. Saeki, M. Kondoh, H. Kakutani, K. Matsuhisa, A. Takahashi, H. Suzuki, Y. Kakamu, A. Watari, K. Yagi, A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **334**, 576–582 (2010).
- 5) H. Kakutani, M. Kondoh, M. Fukasaka, H. Suzuki, T. Hamakubo, K. Yagi, Mucosal vaccination using claudin-4 targeting, *Biomaterials*, **31**, 5463–5471 (2010).