

Title	Claudinを標的とした薬物送達法開発に向けた基礎的研究
Author(s)	高橋, 梓
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59405
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【3】

氏名	高橋 梓 ^{たか ほん あずさ}
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 25162 号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	Claudin を標的とした薬物送達法開発に向けた基礎的研究
論文審査委員	(主査) 教授 八木 清仁 (副査) 教授 松田 敏夫 教授 中川 晋作 教授 橋本 均

論文内容の要旨

多細胞生物は、上皮細胞層を用いて生体内外を隔てることで生体内部環境をつくりあげるとともに、上皮細胞層および内皮細胞層を用いて消化管、腎臓、血管系をはじめとしたコンパートメント構造を生み出すことで単細胞生物に比して高度な生命現象を営んでいる。

隣接する上皮細胞の間隙にはtight junction (TJ) と呼ばれる細胞間接着装置が存在しており、TJによって細胞間隙の距離がゼロとなるkissing pointを構築することで細胞間隙からの物質の漏れを抑制している。TJバリア制御が薬物吸収の最重要基本戦略であり、TJを標的とした薬物送達法の開発が多方面より進められてきたものの、特異性が乏しいこと、粘膜傷害性を伴うこと、薬物以外の物質の非特異的な流入が生じる可能性があることから、TJシール制御による薬物送達法の実用性が疑問視されてきている。

1963年にFarquharらによりTJが発見され長らくTJの分子基盤は未解明であったが、1998年に京都大学月田承一郎博士のグループにより初めてTJのバリア機能を担う分子としてclaudin (CL)

が同定された。CLは分子量約23 kDaの四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おり、発現およびバリア機能には組織特異性があること（CL-1は皮膚バリア、CL-1と-4は粘膜バリア、CL-5は血脳関門バリア）、CL制御による物質透過には分子量依存性および荷電選択性が存在することから、CL制御による組織特異性および透過物質特異性を兼ね備えた新たな薬物送達法開発の可能性が示唆されている。しかしながら、CLは抗原性が低いことに加え疎水性が高くリコンビナントタンパク質の作製は難しく、CLを標的とした薬物送達法の開発は遅々として進展していない。

CLのバリア機能を阻害する分子として*Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) のC末断片 (C-CPE) が知られており、C-CPEを上皮細胞に添加することでCL-4レベルの低下を伴いつつTJバリア機能が低下する。さらに、C-CPEと分子量4,000のデキストランの混合液をラット腸管に添加することで吸収促進活性が観察されること、C-CPEのCL-4結合領域を欠損させることで吸収促進効果が消失することから、CLを標的とした粘膜吸収促進法のproof of concept (POC) が確立されている。

以上の背景を踏まえ、まず本研究では、ヒト副甲状腺ホルモンhPTH (1-34) を用いCLを標的としたバイオ医薬の粘膜吸収促進の可否を検証した。その結果、C-CPEとの同時投与により経鼻吸収は観察されたが、腸管・経肺吸収は認められなかった。C-CPEを前処理することで腸管・肺粘膜吸収が観察されたことから、CL-4バリア制御によるバイオ医薬の非侵襲性投与方法の開発に際しては活性に優れたCL-4 modulatorの創製が必要であると考えられた。そこで、C-CPEの立体構造情報および機能ドメイン解析データを基にC-CPEの機能改変を試み、C-CPEに比して溶解性に優れたC-CPE変異体 (C-CPE194、N末10アミノ酸欠損体；C-CPE205、N末21アミノ酸欠損体) の創製に成功し、C-CPE194を用いることで腸管および肺粘膜におけるhPTH (1-34) の顕著な吸収が認められ、CL-4を標的としたバイオ医薬の粘膜吸収促進のPOCを確立した。さらに、N309A、S313Aの変異と組み合わせることで、CL-4結合性およびTJバリア制御活性に優れた高親和性CL-4 binderの創製にも成功した。

前述したようにCLの発現やバリア機能には組織特異性が存在し、CL-1が粘膜および皮膚バリア、CL-4が粘膜バリアを担っていることから、CLを標的とした組織特異的な薬物送達法の開発にはCL分子種の阻害範囲を改変することが重要となる。そこで、C-CPEをプロトタイプとして用い、C-CPEの機能ドメインをランダムなアミノ酸に置換したC-CPE変異体提示ファージライブラリを作製し、CL-1 and -4 binderの創製を試みた。まず、CLタンパク質、CLペプチド、CL発現細胞を利用したCL binderスクリーニング系の構築を試みたものの、いずれの系も非特異的結合が多くCL binderスクリーニング系として機能しなかった。そこで、膜タンパク質をintactな状態で高密度発現可能な発芽型バキュロウイルス (BV) を用い、CL binderスクリーニング系の構築を試みた。CL提示BVはCLをintactな状態で提示していること、ファージの非特異的な吸着も認められなかったことから、本システムがCL binderスクリーニング系として利用可能であると推察された。そこで次に、C-CPEの機能ドメイン解析データを基にファージ表面提示法を利用してC-CPE変異体ライブラリを作製し、CL-1提示BVによるスクリーニングを試みたところ、CL-1結合性を示すファージが複数取得された。CL-1結合性ファージのシーケンス情報を基に作製したリコンビナントタンパク質 (m19) はCL-1やCL-4等に結合性を示し、C-CPE194に比して優れたTJバリア制御活性および粘膜吸収促進活性を有していた。以上の結果から、CLバリアの阻害範囲を改変することで薬物送達活性を制御できる可能性が示された。

上述したスクリーニング系により、m19を含め3種類のCL-1結合性分子が取得された。これら

のCL-1結合性分子にはS305P、S307R、S313Hの共通するアミノ酸置換が観察されたことから、当該3アミノ酸に着目し機能ドメインの同定を試み、S307R、S313Hの2アミノ酸置換がCL-1結合性に重要な役割を担っていることを見出した。C-CPEとCL-4との結合には静電的相互作用の関与が示唆されていること、m19では塩基性アミノ酸への変異が認められたことから、m19とCL-1の結合に静電的相互作用が関与している可能性が示唆された。そこで、m19の立体構造解析を試みたところ、C-CPE194とm19の基本骨格には違いは認められず、C-CPE194に比してm19ではCL結合領域と推定されるC末側cleft spaceの表面電荷が正に帯電しており、m19のCL-1結合性にはcleft spaceへの正電荷の付与が関与している可能性が示された。今後、m19/CL、C-CPE/CL複合体の立体構造解析情報の集積を図ることで、druggable CL binderの創出および創薬への展開が可能になるものと期待される。

以上、本研究ではC-CPEをプロトタイプとして用いた新規CL binderを創製し、バイオ医薬の非侵襲性投与のPOCの確立、CLバリア阻害範囲の改変による吸収促進活性制御の可能性を見出した。本研究成果を基にCL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および脳内薬物送達法の実現に貢献できるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

当該論文はタイトジャンクション構成タンパクであるclaudin (CL) に親和性を有し、CLの機能を制御する分子の創製を目的とした研究をまとめたものである。CL-4 binderとして知られているタンパク性毒素のC末側断片 (C-CPE) をモデルとして用い、CLを標的としたバイオ医薬の吸収促進、CL binderの新規スクリーニング法の開発、種々のCLに親和性を有する広域CL binderの創製に成功しており、学位論文としてふさわしい内容を含んでいると判断した。