

Figure 13. Production of OVA specific IgE by OVA-C-CPE mutant C. Balb/c mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE mutant C or D (0.5, 1 or 5 µg of OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgE were determined by ELISA. (n=3-5) N.D., not detected.

E. 結論

1. NALT においても、既に報告されている GALT と同様に CL4 が高発現していることを見出した。
2. CL4 binder と OVA との融合蛋白質を経鼻投与することで血中抗 OVA IgG 価、鼻粘膜面のみならず遠隔粘膜面である膈粘膜、腸管粘膜における抗 OVA IgA 抗体価が上昇すること、CL4 結合ドメインを欠損した変異体ではいずれの抗体価上昇も消失していることを見出し、CL4 を利用した経鼻粘膜ワクチン開発の可能性を見出した。
3. CL4 指向性粘膜ワクチンは、Th1 系、Th2 系の免疫応答を活性化することを見出した。
4. 溶解度が低く実用化の点で課題のあった天然型 C-CPE の物性改善を試み、溶解性および CL4 結合性に優れた新規 CL4 binder の創出に成功した。
5. 新規 CL4 binder を用いることで C-CPE184

に比して約 10 倍以上の粘膜ワクチン活性の上昇に成功し、C-CPE 変異体投与に伴う IgE 産生誘導が生じないことから、C-CPE を prototype として用いた安全な粘膜ワクチン開発の可能性が示唆された。

これらの成果を踏まえ、今後は、ウイルス由来抗原を用いた粘膜ワクチン活性の解析を実施し、CL4 を標的としたエイズワクチンの可否の検証を試みる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

Matsuhisa K, Kondoh M, Takahashi A and Yagi

K (2009) Tight junction modulator and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 6:509-515.

Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y and Yagi K (2009) A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* 76:918-926.

近藤昌夫、高橋梓、佐伯理恵、八木清仁、生体バリアを利用した創薬研究、*Drug Delivery System*, 24, 532-537, 2009

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

Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki

- H, Hamakubo T and Yagi K (2010) Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials* 31:5463-5471.
- Saeki R, Kondoh M, Uchida H, Yagi K (2010) Potency of claudin-targeting as antitumor therapy. *Mol Cell Pharmacol* 2:47-51.
- Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H and Yagi K (2010) Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm* 75:213-217.
- Suzuki H, Kakutani H, Kondoh M, Watari A and Yagi K (2010) The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Pharmazie* 65(10):766-769.
- Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Matsuhisa K, Takahashi A, Suzuki H, Kakamu Y, Watari A and Yagi K (2010) A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis. *J Pharmacol Exp Ther* 334:576-582.
- Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Saito Y, Yamaura T, Sakihama T, Hamakubo T and Yagi K (2011) A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS One* 6(2):e16611.
- Takahashi A, Kondoh M, Suzuki H, Kodaka M, Yagi K (2011) Claudin as a target for drug development. *Curr Med Chem* 18:1861-1865.
- Suzuki H, Kondoh M, Yoshida T, Takahashi A, Matsuhisa K, Kakamu Y, Kodaka M, Isoda K, Yagi K. A toxicological evaluation of a claudin modulator, C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, in mice. *Pharmazie in press*.
- Takahashi A, Kondoh M, Kodaka M, Yagi K. Peptides as tight junction modulators. *Curr Pharm Design in press*.

G-2 学会発表

生体バリアを利用した薬物送達研究

近藤昌夫（阪大院薬）

日本薬剤学会第25年会、平成21年5月、静岡

生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究

近藤昌夫（阪大院薬）

第25回日本DDS学会学術集会、平成21年7月、東京

生体バリアの分子基盤を利用した経粘膜DDS

近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）

第25回日本DDS学会学術集会、平成21年7月、東京

Claudinを利用した創薬研究の可能性

近藤昌夫（阪大院薬）

彩都バイオサイエンスセミナー、平成21年10月、大阪

創薬ターゲットとしてのタイトジャンクショ

ンの可能性

近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）

創剤フォーラム 第 15 回シンポジウム「タイトジャンクションをめぐる最近の研究成果と創薬への応用」、平成 21 年 10 月、東京

A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator

Koji Matsuhisa, Ryota Okude, Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi

36th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July, 2009, Copenhagen, Denmark.

Claudin as a target molecule for mucosal absorption of peptide drug

Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec, 2009, San Diego, USA.

Development of a novel screening system for claudin binder using baculovirus display.

Toshiaki Yamaura, Azusa Takahashi, Hideki Kakutani, Masuo Kondoh, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec, 2009, San Diego, USA

Preparation of a controllable RNA polymerase I-dependent expression vector

Takeshi Yoshida, Manabu Ojima, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec, 2009, San Diego, USA

Claudin-4を介した新規粘膜ワクチンの創製

鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月、岡山

出芽バキュロウイルスを用いた claudin binder スクリーニング系の構築

松下恭平¹、角谷秀樹¹、高橋梓¹、山浦利章¹、浜窪隆雄²、近藤昌夫¹、八木清仁¹（¹阪大院薬、²東大先端研）、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

ウエルシュ菌エンテロトキシン断片をプロトタイプとした新規claudin-4 modulator

の創製

各務洋平¹、山浦利章¹、松下恭平¹、高橋梓¹、内田博司²、花田雄志²、松久幸司¹、渡利彰浩¹、近藤昌夫¹、八木清仁¹（¹阪大院薬、²アスピオファーマ）、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

Claudin発現の迅速かつ簡便なモニタリングシステムの開発

渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月、岡山

A novel screening system for claudin binder using baculoviral display.

Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA

Development of a novel nasal vaccine using a claudin-4 binder.

Hidehiko Suzuki, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA.

Preparation of a claudin-4-targeted anti-tumor molecule.

Masuo Kondoh, Rie Saeki, Hideki Kakutani, Yasuhiro Mochizuki, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA

A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of peptide.

Hiroshi Uchida, Masuo Kondoh, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA

A novel strategy for cancer-targeting using claudin-4 binder.

Hidehiko Suzuki, Rie Saeki, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, 37th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July, 2010, Portland, Oregon, USA.

Development of a Mucosal Vaccine Using a Claudin-4 Binder.

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, FIP

Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov, 2010, Louisiana, USA

Development of a non-invasive drug delivery system using a claudin modulator.

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov, 2010, Louisiana, USA

Development of an adenovirus vector-mediated assay system for Hepatitis C virus replication.

Takeshi Yoshida, Fumi Satoh, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, 50th annual meeting of the American society for cell biology, Dec, Philadelphia, USA

Development of mucosal vaccine using a claudin binder.

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, 50th annual meeting of the American society for cell biology, Dec, Philadelphia, USA

出芽バキュロウイルスを用いた claudin binder スクリーニング系の構築

松下恭平¹、角谷秀樹¹、高橋梓¹、山浦利章¹、浜窪隆雄²、近藤昌夫¹、八木清仁¹ (¹ 阪大院薬、² 東大先端研)、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月、岡山

Claudin-4 を標的とした癌ターゲティング法の開発

松久幸司、佐伯理恵、角谷秀樹、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日本薬剤学会第25年会、平成22年5月、徳島

Claudin-4 binder を利用した粘膜ワクチンの開発
鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、日本薬剤学会第25年会、平成22年5月、徳島。

Claudin を利用したペプチド医薬品の非侵襲性投与技術の開発、
各務洋平¹、内田博司²、花田雄志²、高橋梓¹、山浦利章¹、松久幸司¹、近藤昌夫¹、八木清仁¹（¹阪大院薬、²アスピオファーマ）、日本薬剤学会第25年会、平成22年5月、徳島

Claudin binder を利用した癌治療法の開発
鈴木英彦、佐伯理恵、角谷秀樹、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、第26回日本DDS学会、平成22年6月、大阪。

上皮細胞バリアに着目した食物アレルギーリスク評価
渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、第37回日本トキシコロジー学会、平成22年6月、沖縄

Claudin-4 modulator を利用したペプチド医薬品の粘膜吸収促進法の開発、
松久幸司¹、内田博司²、花田雄志²、高橋梓¹、各務洋平¹、近藤昌夫¹、八木清仁¹（¹阪大院薬、²アスピオファーマ）、第26回日本DDS学会学術集会、平成22年6月、大阪

RNA polymerase I 発現系を利用した HCV 複製評価系の開発

吉田孟史、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁（阪大院薬）、第17回肝細胞研究会、平成22年6月、秋田

Clostridium perfringens enterotoxin を利用した claudin-1 binder の創製

高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、第26回日本DDS学会、平成22年6月、大阪

Clostridium perfringens enterotoxin を利用した非侵襲性投与方法の開発

高橋梓¹、松久幸司¹、各務洋平¹、内田博司²、花田雄志²、近藤昌夫¹、八木清仁¹（¹阪大院薬、²アスピオファーマ）、第57回トキシシンポジウム、平成22年7月、滋賀

Claudin を標的とした非侵襲性投与技術の開発

高橋梓、松久幸司、各務洋平、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、第60回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成22年10月、大阪

高親和性 claudin binder の創製およびドラッグデリバリーシステムへの応用

各務洋平¹、内田博司²、花田雄志²、高橋梓¹、近藤昌夫¹、八木清仁¹（¹阪大院薬、²アスピオファーマ）、BIA symposium 2010、平成22年7月、東京

新規 claudin modulator の創製およびドラッグデ

リバリーシステムへの応用

各務洋平、高橋梓、松下恭平、松久幸司、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、第9回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォラム2010、平成22年10月、京都

Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発

松下恭平、高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、第9回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォラム2010、平成22年10月、京都

A claudin modulator as a mucosal absorption-enhancer of a peptide drug

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, 日本薬物動態学会第25回年会、平成22年10月、東京

Claudin-4 binder を標的とした新規粘膜ワクチンの創製

鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日本ワクチン学会第14年会、平成22年12月、東京

Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発

松下恭平、高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、第83回日本生化学会大会、平成22年12月、神戸

ファージ抗体ライブラリを用いた新規 claudin

binder スクリーニングシステムの構築

小高美樹、高橋梓、山浦利章、松久幸司、松下恭平、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日本薬学会第131年会、平成23年3月、静岡

新規 claudin binder C-CPEm19 の機能ドメイン解析

各務洋平、松下恭平、高橋梓、松久幸司、斉藤郁美子、青山浩、宇野公之、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日本薬学会第131年会、平成23年3月、静岡

新規 claudin binder の創製と粘膜ワクチンへの応用

山根誠司¹、鈴木英彦¹、角谷秀樹¹、高橋梓¹、松久幸司¹、内田博司²、渡利彰浩¹、近藤昌夫¹、八木清仁¹（¹阪大院薬、²アスピオファーマ）、日本薬学会第131年会、平成23年3月、静岡

感染受容体発現バキュロウイルスを用いた HCV 感染機構の解析

山岸喜彰、吉田孟史、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日本薬学会第131年会、平成23年3月、静岡

Claudin 発現モニタリングシステムを用いた Tight junction 調節物質の検索

渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日本薬学会第131年会、平成23年3月、静岡

Claudin binder を利用した創薬基盤研究

高橋梓、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日

本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

安彦

出願人：大阪大学

Claudin modulator を利用した粘膜吸収促進法の
現状と課題

H-2 実用新案登録

該当事項なし

近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日本薬学会
第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

H-3 その他

該当事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

出願番号:PCT/JP2009/71291

出願日：2009 年 12 月 22 日

発明の名称：粘膜ワクチン

発明者：八木清仁、近藤昌夫、磯田勝広、堀口

密着結合蛋白質を利用した経鼻エイズワクチン基盤技術の開発

所属 大阪大学大学院 薬学研究科

研究者 近藤 昌夫

研究要旨

周知のように、単回投与で病原体特異的かつ長期にわたる免疫反応を惹起可能であること、副作用がほとんどないことから、有効かつ安心・安全な次世代エイズ治療法としてワクチンが注目されている。とりわけ粘膜ワクチンは、①HIV の初発感染部位（粘膜面）における感染予防作用、②体内に侵入した HIV に対する体液性免疫誘導作用、③細胞障害性 T 細胞活性化による HIV 感染細胞排除活性を併せ持つことから、夢のエイズ治療薬として注目されているものの、粘膜免疫組織に効率的に抗原を送達する技術開発の遅延から、エイズ粘膜ワクチンの開発は遅々として進展していない。

本研究では、粘膜免疫組織に高発現している claudin-4 (CL4) に着目し、独自の CL4 binder を有効活用することでエイズワクチン開発に資する経鼻ワクチン基盤技術の確立を試みている。平成 21 年度の検討により、CL4 を標的とした粘膜ワクチンの proof of concept を確立し、さらに、CL4 結合特性に優れた新規 CL4 binder の創製に成功した。これらの成果を踏まえ、本年度は、モデル抗原を用いて新規 CL4 binder の粘膜ワクチン活性を解析し、さらに既存の CL4 binder の安全性情報の集積を図った。

A. 研究目的

本研究は、独自かつ世界唯一の claudin-4 (CL4) binder 技術を有効活用することにより初めての経鼻エイズワクチン基盤技術を創出し、大阪大学が中核となる先端医療開発特区（スーパー特区）と密接に連携し、本課題終了後可及的速やかに実用化研究へ展開することを目的とする。

周知のように、粘膜ワクチンはヒト免疫不全ウイルス (HIV) の侵入門戸である粘膜面での HIV 侵入防御網構築能、体内に侵入した HIV の排除機構の活性化能を併せ持つことから、夢の HIV 感染予防・治療薬として期待されているものの、粘膜免疫組織に効率良く抗原をデリバリするシステムの開発遅延と相俟って、有効かつ安全な粘膜ワクチンの創出は立ち遅れている。最近、粘膜免疫組織を覆う上皮細胞に密着結合構成蛋白質 CL4 が高発現していることが示され、CL4 を利用した粘膜免疫組織への抗原デリバリ法が提唱された。しかしながら、CL は抗原性が低く CL4 の細胞外領域に対する抗

体作製は著しく立ち遅れており、特許および論文を見ても分かるように CL4 を利用した粘膜ワクチン開発は皆無である。

これまでに当研究グループでは、CL4 binder (C-CPE、ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体結合ドメイン) とトキシンの融合蛋白質が CL4 発現細胞特異的に細胞障害性を発揮することを見出し、C-CPE が CL4 ターゲティング分子として利用できることを明らかにしてきた (J Pharmacol Exp Ther, 2006 他)。さらに、C-CPE を経鼻投与することでペプチド性医薬品の粘膜吸収が促進することを見出し、CL4 binder を利用した経鼻デリバリの可能性を見出している (Biochem. Pharmacol., 2010)。

これら独自の研究成果を踏まえ、本研究では 3 年計画で CL4 binder を利用した経鼻ワクチンを開発することを目的とし、これまでに①鼻粘膜免疫組織 (NALT) における CL4 発現を解析し、②卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として用いて CL4 を利用した経鼻粘膜ワクチ

ンの免疫賦活化特性を解析し、③C-CPE に比して優れた物性を有する新規 CL4 binder の創製に成功している。本年度は、モデル抗原として卵白アルブミンを用い、新規 CL4 binder の粘膜ワクチン活性を解析し、C-CPE 投与に伴う粘膜障害作用などの安全性情報の集積を試みた。

B. 研究方法

① 新規 CL-4 binder の粘膜ワクチン活性解析

1) OVA-C-CPE をコードしたプラスミドの作製

pCMV-Script/OVA プラスミドを鋳型とし、5' -gcgggtaccatgggctccatcggcgccagc-3' (Forward primer、 the underline indicates *KpnI* site)、5' -ccttaattaagggaacacatctgccaa-3' (Reverse primer、 the underline indicates *PacI* site) を用いて OVA を含む領域 KOD-plus-にて増幅させた。得られた PCR 産物を PCR Purification Kit を用いて精製し、*KpnI*、*PacI* を用いて 37 °C にて一晚制限酵素処理した。T4 DNA ligase を用いて 16 °C にてあらかじめ *KpnI*、*PacI* にて制限酵素処理した pET-MCS-C-CPE 変異体と一晚ライゲーション反応を行い、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、OVA-C-CPE 変異体をコードしたプラスミド (pET-OVA-C-CPE 変異体) を得た。

2) OVA-C-CPE 変異体の発現誘導条件の検討

OVA-C-CPE 変異体発現プラスミドをヒートショック法にて大腸菌 BL21 (DE3) (Novagen) にトランスフォーメーションし、LA プレートに播種し一晚培養した。翌日コロニーをピックアップし、LA 培地 3 ml にて 37 °C で一晚振盪培養した。LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes (IWAKI) に大腸菌培養液を 50 µl ずつ加え、37 °C で 3 時間振盪培養した。その後、isopropyl-β-D (-) thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 0、0.25、0.5、または 1.0 mM となるように添加し、さらに 37 °C で 3 時間振盪培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 µl の Laemmli's sample buffer (12.5% glycerol、 31.25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、 1% SDS、 0.02% bromophenol、 1.25% 2-mercaptoethanol) に懸濁

し、氷冷しながら 20 秒間超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。4 °C、14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 99 °C で 5 分間加熱し、これを泳動用サンプルとした。泳動用サンプルを SDS-PAGE に供し、coomassie brilliant blue (CBB、 Bio-Rad) 染色液で 1 時間染色後 MilliQ 水を用いて脱色洗浄し、OVA-C-CPE 変異体が多く産生されている IPTG 濃度を示適濃度に設定した。

3) OVA-C-CPE 変異体の可溶化条件の検討

OVA-C-CPE 変異体の発現誘導条件の検討に準じ、大腸菌を回収した。大腸菌を buffer A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、 400 mM NaCl、 5 mM MgCl₂、 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride、 1 mM 2-mercaptoethanol、 10% glycerol) 1 ml に懸濁し、氷冷しながら 40 秒間 3 回超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した後、沈殿に 2% TritonX-100 含有 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理を行った。遠心分離後、沈殿に 8 M urea 含有 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理をした。遠心分離後上清を回収し、適宜 4 × Laemmli's sample buffer を添加し、99 °C で加熱することで泳動用サンプルとした。泳動用サンプルを SDS-PAGE に供し、CBB 染色した後、OVA-C-CPE 変異体が多く可溶化していた画分の可溶化条件を基に精製条件を設定した。

4) OVA-C-CPE 変異体の精製

OVA-C-CPE 変異体蛋白質を発現誘導させた大腸菌 (500 ml culture 分) を 5 ml の可溶化 buffer に懸濁し、氷冷しながら 40 秒間超音波処理を 3 回を行い、4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA、MilliQ 水、0.1 M NiSO₄、buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Kit (GE Healthcare) を用いて AKTAprime plus (GE Healthcare) により精製した。すなわち、buffer A および 100 mM imidazole 10 ml ずつで洗浄後、10 ml で 100-500 mM imidazole のグラジエントとなる条件にて精製し、UV の値を元にフラクションを回収し

た。

OVA-C-CPE が溶解している buffer を PBS (137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.14 mM Na₂HPO₄、1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare) を用いた。あらかじめ PD-10 column に PBS を 30 ml 流して平衡化しておき、HiTrap™ Kit で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 μl ずつ流し PD-10 column から溶出液を分取した。BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE) を用い、560 nm における吸光度を測定することでタンパク質濃度を算出した。なお、検量線には標準タンパク質として BSA を用いた。

5) pFastBac-CL4 の作製

マウス CL4 の遺伝子を T-Easy vector に挿入した pGTCL4 (神戸大学大学院医学研究科 古瀬幹夫博士より供与) を鋳型とし、KOD-plus-を用いて PCR を行った。なお、Forward primer として 5'-gctctagaatggattacaaggatgacgacgataagatggcgtctatggactacaggtcctgggaatccttagca-3', the underline indicates *Xba*I site)、Reverse primer として 5'-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3', the underline indicates *Kpn*I site) を使用した。得られた PCR 産物を PCR Purification Kit を用い精製後、*Xba*I および *Kpn*I により、37 °C にて一晚制限酵素処理した。あらかじめ *Xba*I および *Kpn*I 処理した pFastBac1 と T4 DNA ligase を用いて 16 °C にて一晚ライゲーション反応を行い、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、マウス CL4 をコードしたプラスミド (pFastBac-CL4) を得た。

6) Bacmid の作製

pFastBac-CL4 をヒートショック法にて大腸菌 DH10Bac (Invitrogen) にトランスフォーメーションし、50 μg/ml kanamycin、7 μg/ml gentamicin、10 μg/ml tetracycline を含み、2% 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside (X-gal) 100 μl および 50 mM IPTG 100 μl を塗布した LB 培地プレートに播種し、37 °C で 24 時間培養した。任意の白コロニーをピックアップし、アルカリプレップにて大腸菌から bacmid を精製した。精製した bacmid に目的とする遺伝子が挿入さ

れていることを PCR 法にて確認した。なお、Forward primer として 5'-gtttccagtcacgac-3'を、Reverse primer として 5'-ggaacagctatgacatg-3', 5'-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3' を用いた。目的とする遺伝子断片の挿入が確認された bacmid をヒートショック法にて大腸菌 DH5α にトランスフォーメーションし、50 μg/ml kanamycin を含む LB 培地 (LK) プレートに播種し、37 °C で一晚培養し、コロニーをピックアップ後、LK 培地 100 ml でさらに一晚培養した。大腸菌を回収し、QIAfilter™ plasmid Midi kit (QIAGEN) を用いて bacmid-CL4 を精製した。

7) Budded baculovirus (BV) -CL4 の作製

培養用 6 穴プレートに 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞 (Invitrogen) を播種し、室温で 1 時間静置した。静置中に tube A (cellfectin (Invitrogen) 6 μl、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 (Invitrogen) 100 μl) と tube B (bacmid-CL4 1 μg、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 μl) を用意し、tube A と tube B とをよく混和し、泡立てないようにゆっくりピペティングした後、室温で 30 分間放置した。1 時間静置することで接着させた Sf9 細胞を血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地で洗浄後、培地を除去し、tube A と tube B との混合溶液に血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 800 μl を加え、ウェルに全量 (1 ml) 添加し、プレートをビニールテープで密封して 5 時間、27 °C で培養した。その後、培地を除去し、血清と抗生物質を含む 2 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) に交換し、27 °C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を 800 × g で 10 分間遠心することで回収した (P1 ストックと称する)。続いて、 2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞 200 ml に対して、P1 ストック 2 ml を加え、27 °C で 2 日間培養した。2 日後、培養上清を 800 × g で 10 分間遠心することで回収した (P2 ストックと称する)。

培養用 6 穴プレートに 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10、100、1000 μl ずつ加え、27 °C で 3 日間培養した (全量 2 ml)。3 日後、800 × g で 10 分間遠心し、

上清を回収した。Protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-Xを含むPBSで細胞ペレットを懸濁後、超音波処理で破碎し細胞可溶化液とした。培養上清および細胞可溶化液を用いて、Western blot 法にて目的とするタンパク質の発現を確認した。

2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに用意し、発現確認のできた P2 ストックを適量加え、 27°C で3日間培養した。3日後、培養上清を $800 \times g$ で10分間遠心することで回収した。回収した培養上清を $10,000 \times g$ で25分間さらに遠心した。得られた沈殿をPBSで懸濁後、 $800 \times g$ で10分間遠心し、上清をさらに $10,000 \times g$ で25分間遠心した。得られた沈殿を protease inhibitor を含む TBS 250 μl で懸濁し、BCA™ Protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

8) BV ELISA

96穴 ELISA plate (Greiner) に BV-CL4 (ネガティブコントロールとして BV-WT および BV-CL1) を $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$ 、 4°C 、over night で固相化した。1.6% ブロックエース (DS PHARMA BIOMEDICAL) を用いて、室温で2時間ブロッキングした。サンプルを $0.02 \mu\text{g}/\text{well}$ で添加し、室温で2時間反応させた。1.6% ブロックエースで3000倍に希釈した mouse anti His-tag mAb (Zymed) を加え、室温にて2時間反応させ、さらに 0.4% ブロックエースで2000倍に希釈した HRP 標識 goat anti-mouse IgG を添加し、室温にて1時間反応させた。TMB solution (Thermo Scientific) を加え、20分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。なお、プレートから各溶液を除去する際には、0.05% Tween 20-PBS (T-PBS) による洗浄操作を5回行った。

9) マウスへの免疫とサンプル回収

BALB/c マウスに週1回、計3回、OVA-C-CPEs を経鼻より投与した。なお、すべての群におい

て1匹、1回当たりの投与量は OVA として $5 \mu\text{g}$ とし (OVA-C-CPEs 投与群では融合蛋白 $6.89 \mu\text{g}$)、投与量が 10-15 μl となるように PBS に溶解した。最終投与より1週間後に、血清、鼻腔洗浄液、膣洗浄液、および糞便抽出液を回収した。

・血清

麻酔したマウスから眼底採血により血液を回収し、 $3000 \times g$ で10分間遠心し、上清をPBSにて10倍に希釈し、 -20°C で保存した。

・鼻腔洗浄液

安楽死させたマウスの気道から鼻腔にむけて 200 μl の PBS を流し込み、その洗浄液を回収し、 -20°C で保存した。

・膣洗浄液

マウスの膣口に 50 $\mu\text{l} \times 2$ の PBS を流し込み、10回ピペッティングを行い回収し、 -20°C で保存した。

・糞便抽出液

マウスの糞便を回収し、糞便 10 mg につき 100 μl の割合で PBS を加え、 4°C 、で10分間ボルテックスを行った。その後、 $3000 \times g$ 、10分間遠心し、上清を回収し、 -20°C で保存した。

10) ELISA 法による OVA 特異的抗体価の測定

OVA を炭酸緩衝液 (0.19 M Na_2CO_3 、1.67 M NaHCO_3 (pH 9.6)) に溶解し、96穴 NUNC Immuno plate に $100 \mu\text{g}/\text{well}$ となるように分注し、 4°C 、over night で固相化した。4% ブロックエースを用いて、室温にて2時間ブロッキングした。TBS-T にて10倍希釈したブロックエース (sample diluent) を用いて各種サンプルを適宜希釈し、50 $\mu\text{l}/\text{well}$ でプレートに添加し、室温にて2時間反応させた。その後、sample diluent にて HRP detection antibody (IgG, IgA, IgG1, IgG2a (BETHYL)) を 1/10,000 に希釈し、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ となるように加え、室温にて1時間反応させた。TMB solution を加え、室温で20分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定し、吸光度を log 10

の力価として表記した。なお、プレートから各溶液を除去する際には、T-TBS による洗浄操作を 5 回行った。

1 1) 脾臓細胞の回収

最終投与より 1 週間後に、BALB/c マウスを安楽死させ、消毒用アルコールで消毒し、無菌的に脾臓を回収した。5 ml の注射筒を用いて、70 μm のセルストレイナー (FALCON) 上で脾臓をホモジナイズし、50 ml チューブに回収した。2000 rpm で 5 分間遠心し、ペレットに氷冷した ACT 溶液 (15 M NH_4Cl 、1 mM KHCO_3 、1 mM EDTA) を加えよく懸濁し、氷中で 5 分間インキュベートした。その後、さらに 10% FBS を含む RPMI1640 (NISSUI) 5 ml を添加し、セルストレイナーを通して別の 50 ml チューブに移した。2000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去後、10% FBS を含む RPMI1640 で再懸濁した。懸濁した脾臓細胞を 96-well plate (FALCON) に 1×10^6 cells/well で播種し、1 mg/ml OVA 溶液存在下、37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養し、培養上清を回収し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

1 2) サイトカイン ELISA

回収した培養上清をサイトカインアッセイキット (R&D SYSTEMS) を用いて測定した。測定方法はキットのプロトコールに従った。

1 3) OVA-C-CPE 変異体の粘膜ワクチン活性解析

6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに週 1 回、計 3 回、OVA、OVA-C-CPEs を経鼻投与した。なお、マウス 1 匹、1 回当たりの投与量は OVA として 5 μg とし、投与量が 10-15 μl となるように PBS に溶解した。最終投与より 1 週間後に、背中に E.G7-OVA 細胞 (1×10^6 cells/mouse) を皮下移植した。その後、3 日毎に腫瘍径を測定し、腫瘍の大きさを算出した。なお、腫瘍の大きさは長径 \times 短径 \times 短径 / 2 により算出した。

② C-CPE の安全性解析

1) 粘膜障害性の解析

BALB/c マウスに週 1 回、計 3 回、PBS もしくは OVA-C-CPE 変異体 (OVA 量として 5 μg) を経鼻投与し、最終免疫の 1 週間後に鼻腔組織を回収した。回収した鼻腔組織を 4% パラホルムアルデヒドにて 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩固定した。翌日、PBS に置換し、アプライドメディカルリサーチにパラフィン切片の作製、H&E 染色、および組織所見を依頼した。組織所見は主に炎症生細胞の浸潤について、0; なし、1; 極軽度、2; 軽度、3; 中等度、4; 高度のグレードで表した。

2) 鼻粘膜面における IgE 産生の解析

週 1 回、計 3 回、各種サンプルを BALB/c マウスに経鼻投与し、最終投与一週間後に鼻粘膜洗浄液を回収し、-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

OVA を炭酸緩衝液 (pH 9.6, Na_2CO_3 0.19 M, NaHCO_3 1.67 M) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に固層化後、段階希釈した洗浄液を添加、室温にて 2 時間インキュベートした後、HRP detection antibody (IgE) (BETHYL Laboratories, Inc.) を添加し、TMB solution を基質として用いて、吸光度を測定した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

① 新規 CL4 binder の粘膜ワクチン活性解析

CL4 に対する結合性、大腸菌での産生性を考慮し、平成 21 年度に作製した変異体の中から変異体 C, D, F を選択し、OVA との融合蛋白質を作製したところ、変異体 C および D の融合蛋白質では CL4 結合性が保持されていたものの、変異体 F 融合蛋白質では結合性が消失していた (Fig. 1)。

そこで変異体 C および D 誘導蛋白質を経鼻投与し、血中、鼻粘膜、膈粘膜、腸管粘膜面における OVA 特異的 IgG 産生を解析したところ、変異体 D では C-CPE184 と同程度、変異体 C では約 10 倍以上の免疫賦活化活性が観察された

(Fig. 2A-8D、data not shown)。

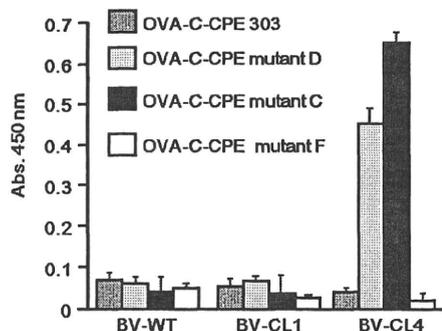


Figure 1. Interaction of OVA-C-CPE mutant with CL4. Binding of OVA-C-CPE mutant C and D to CL4 was investigated by ELISA with BV-WT, BV-CL1, or BV-CL4. Data are means \pm SD (n=4). The results are representative of three independent experiments.

れていた (Fig. 4)。尚、いずれの免疫応答も変

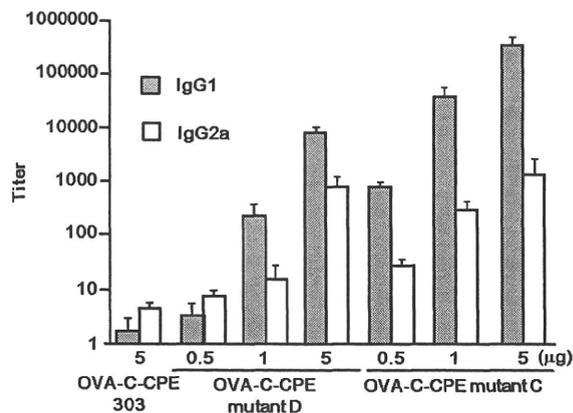


Figure 3. OVA specific IgG1 and IgG2a responses induced by OVA-C-CPEs. Balb/c mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE mutant C or D (0.5, 1 or 5 μ g of OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG1, and IgG2a were determined by ELISA. Data are means \pm SEM (n=3-5). The results are representative of three independent experiments.

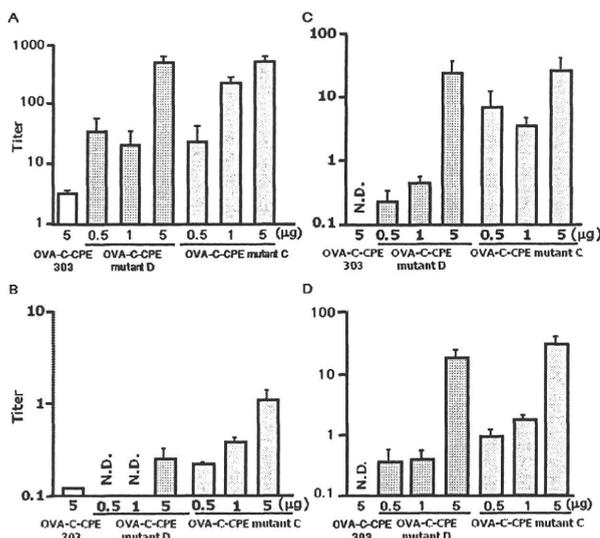


Figure 2. Production of OVA specific IgG and IgA by OVA-C-CPEs. BALB/c mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE mutant D, or OVA-C-CPE mutant C (0.5, 1 or 5 μ g of OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG (A), nasal IgA (B), vaginal IgA (C), and fecal IgA (D) were determined by ELISA. Data are means \pm SEM (n=3-5). The results are representative of three independent experiments. N.D., not detected.

異体 C 融合蛋白質では約 10 倍以上の免疫賦活化活性が観察され、変異体 F 融合蛋白質投与では抗原特異的免疫応答の活性化は観察されなかった (data not shown)。次に OVA 発現腫瘍細

両変異体融合蛋白質ともに IgG1、IgG2a の誘導が観察されており、Th1 系、Th2 系の免疫反応を惹起する可能性が示唆される (Fig. 3)。実際、脾臓細胞から IFN-gamma や IL-13 が産生さ

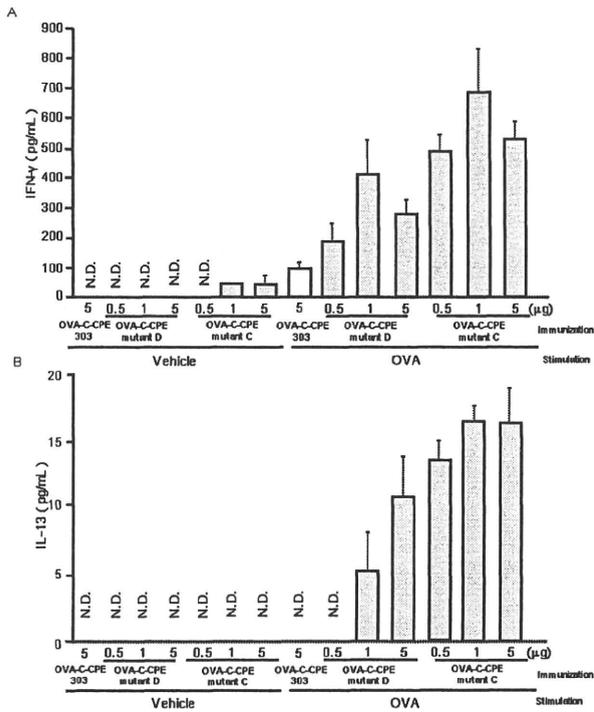


Figure 4. Th1 and Th2 responses induced by OVA-C-CPE mutant C. Balb/c mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE mutant C, or D (0.5, 1 or 5 μg of OVA) once a week for 3 weeks. The splenocytes isolated from the immunized Balb/c mice were stimulated with vehicle or OVA (1 mg/ml) for 24 h, and the cytokine (IFN-γ (A) and IL-13 (B)) in the conditioned medium were measured by ELISA. Data are means ± SEM (n=5). The results are representative of three independent experiments. N.D., not detected.

胞を用いた担癌マウスを用いて、当該融合蛋白質のワクチン活性の解析を試みたところ、変異体C融合蛋白質、変異体D融合蛋白質の経鼻免疫により、腫瘍増殖の抑制効果が観察され、CL4結合性に優れた変異体C誘導蛋白質は高い抗腫瘍活性を有していた (Fig. 5)。

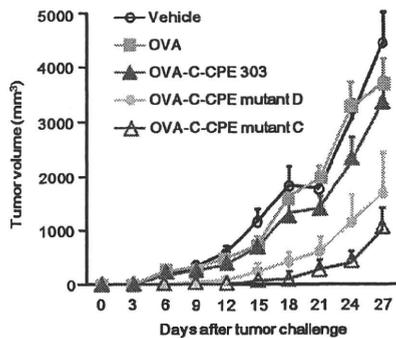


Figure 5. Anti-tumor activity of nasal immunization with OVA-C-CPEs. C57BL/6 mice were nasally immunized with vehicle, OVA, OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE mutant C or D (5 μg of OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the mice were injected s.c. on the right back with 1×10^6 E.G7-OVA cells. The tumor growth was monitored by measuring two diameters, and the tumor volumes was calculated as $a \times b \times b/2$, where a is the maximum diameter of the tumor and b is the minimum diameter of the tumor. Data are means ± SEM (n=5). The results are representative of three independent experiments.

⑤ C-CPE の安全性解析

変異体 D と OVA の融合蛋白質を経鼻投与し、鼻粘膜面における組織障害性を解析したところ、組織学的な異常は観察されなかった (Fig. 6A and 6B)。さらに、変異体 C 融合蛋白質、変

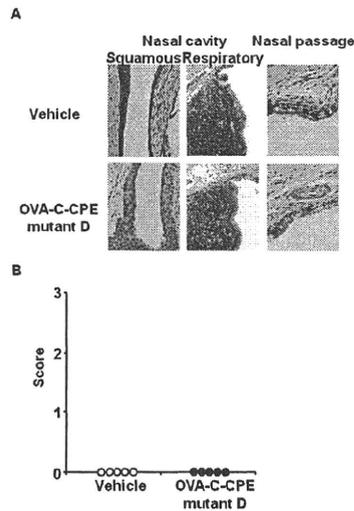


Figure 6. Histological injury caused by OVA-C-CPE mutant D. Balb/c mice were nasally immunized with vehicle or OVA-C-CPE mutant D (5 μg of OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, nasal tissue was collected and fixed with formalin. Thin tissue-sections were stained with H&E (A) and histological injury was scored with the following scale: 0, no damage; 1, slight damage; 2, moderate damage (B).

異体 D 融合蛋白質投与群では IgE 産生は観察されなかった (Fig. 7)。

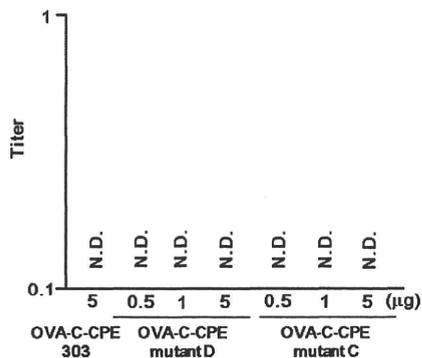


Figure 7. Production of OVA specific IgE by OVA-C-CPEs. Balb/c mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE mutant C or D (0.5, 1 or 5 μg of OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgE were determined by ELISA. (n=3~5) N.D., not detected.

E. 結論

1. 新規 CL4 binder と OVA との融合蛋白質を経鼻投与することで血中抗 OVA IgG 価、鼻粘膜面のみならず遠隔粘膜面である膣粘膜、腸管粘膜における抗 OVA IgA 抗体価が上昇していた。

2. 新規 CL4 指向性粘膜ワクチンは、Th1 系、Th2 系の免疫賦活化能を有していた。

3. OVA 発現癌細胞を用いた in vivo 担癌モデル系において新規 CL4 binder は C-CPE184 に比して優れたワクチン活性を有していた。

4. C-CPE 変異体投与に伴う粘膜免疫障害は観察されず、粘膜面における IgE 産生も認められなかった。

以上、本年度の解析により、昨年度確立した CL4 を標的とした粘膜ワクチン技術をシステムアップすることで、ワクチン特性に優れた粘膜ワクチン技術の創出に成功した。

今後は、これらの成果を踏まえ、ウイルス由来抗原を用いた粘膜ワクチン活性解析を実施し、CL4 を標的としたエイズワクチンの可否を検証する予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

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

Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki

H, Hamakubo T and Yagi K (2010) Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials* 31:5463-5471.

Saeki R, Kondoh M, Uchida H, Yagi K (2010) Potency of claudin-targeting as antitumor therapy. *Mol Cell Pharmacol* 2:47-51.

Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H and Yagi K (2010) Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm* 75:213-217.

Suzuki H, Kakutani H, Kondoh M, Watari A and Yagi K (2010) The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Pharmazie* 65(10):766-769.

Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Matsuhisa K, Takahashi A, Suzuki H, Kakamu Y, Watari A and Yagi K (2010) A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis. *J Pharmacol Exp Ther* 334:576-582.

Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Saito Y, Yamaura T, Sakihama T, Hamakubo T and Yagi K (2011) A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS One* 6(2):e16611.

Takahashi A, Kondoh M, Suzuki H, Kodaka M, Yagi K (2011) Claudin as a target for drug

development. *Curr Med Chem*

18:1861-1865.

Suzuki H, Kondoh M, Yoshida T, Takahashi A, Matsuhisa K, Kakamu Y, Kodaka M, Isoda K, Yagi K. A toxicological evaluation of a claudin modulator, C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, in mice. *Pharmazie in press*.

Takahashi A, Kondoh M, Kodaka M, Yagi K. Peptides as tight junction modulators. *Curr Pharm Design in press*.

G-2 学会発表

A novel screening system for claudin binder using baculoviral display.

Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA

Development of a novel nasal vaccine using a claudin-4 binder.

Hidehiko Suzuki, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA.

Preparation of a claudin-4-targeted anti-tumor molecule.

Masuo Kondoh, Rie Saeki, Hideki Kakutani, Yasuhiro Mochizuki, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA

A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of peptide.

Hiroshi Uchida, Masuo Kondoh, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA

A novel strategy for cancer-targeting using claudin-4 binder.

Hidehiko Suzuki, Rie Saeki, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, 37th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July, 2010, Portland, Oregon, USA.

Development of a Mucosal Vaccine Using a Claudin-4 Binder.

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov, 2010, Louisiana, USA

Development of a non-invasive drug delivery system using a claudin modulator.

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov, 2010, Louisiana, USA

Development of an adenovirus vector-mediated assay system for Hepatitis C virus replication.

Takeshi Yoshida, Fumi Satoh, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, 50th annual

meeting of the American society for cell biology,
Dec, Philadelphia, USA

Development of mucosal vaccine using a claudin
binder.

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Takeshi Yoshida,
Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, 50th annual
meeting of the American society for cell biology,
Dec, Philadelphia, USA

出芽バキュロウィルスを用いた claudin binder
スクリーニング系の構築

松下恭平¹、角谷秀樹¹、高橋梓¹、山浦利章¹、
浜窪隆雄²、近藤昌夫¹、八木清仁¹(¹ 阪大院薬、
² 東大先端研)、日本薬学会第 130 年会、平成
22 年 3 月、岡山

Claudin-4 を標的とした癌ターゲティング法の
開発

松久幸司、佐伯理恵、角谷秀樹、渡利彰浩、近
藤昌夫、八木清仁(阪大院薬)、日本薬剤学会
第 25 年会、平成 22 年 5 月、徳島

Claudin-4 binder を利用した粘膜ワクチンの開発
鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、渡利彰浩、近
藤昌夫、八木清仁、日本薬剤学会第 25 年会、
平成 22 年 5 月、徳島。

Claudin を利用したペプチド医薬品の非侵襲性
投与技術の開発、

各務洋平¹、内田博司²、花田雄志²、高橋梓¹、
山浦利章¹、松久幸司¹、近藤昌夫¹、八木清仁¹
¹(¹ 阪大院薬、² アスピオファーマ)、日本薬剤

学会第 25 年会、平成 22 年 5 月、徳島

Claudin binder を利用した癌治療法の開発

鈴木英彦、佐伯理恵、角谷秀樹、渡利彰浩、近
藤昌夫、八木清仁(阪大院薬)、第 26 回日本
DDS 学会、平成 22 年 6 月、大阪。

上皮細胞バリアに着目した食物アレルギーリス
ク評価

渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁(阪大院薬)、
第 37 回日本トキシコロジー学会、平成 22 年 6
月、沖縄

Claudin-4 modulator を利用したペプチド医薬品
の粘膜吸収促進法の開発、

松久幸司¹、内田博司²、花田雄志²、高橋梓¹、
各務洋平¹、近藤昌夫¹、八木清仁¹(¹ 阪大院薬、
² アスピオファーマ)、第 26 回日本 DDS 学会
学術集会、平成 22 年 6 月、大阪

RNA polymerase I 発現系を利用した HCV 複製
評価系の開発

吉田孟史、近藤昌夫、水口裕之、八木清仁(阪
大院薬)、第 17 回肝細胞研究会、平成 22 年 6
月、秋田

Clostridium perfringens enterotoxin を利用した
claudin-1 binder の創製

高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近
藤昌夫、八木清仁(阪大院薬)、第 26 回日本
DDS 学会、平成 22 年 6 月、大阪

Clostridium perfringens enterotoxin を利用した非

侵襲性投与法の開発

高橋梓¹、松久幸司¹、各務洋平¹、内田博司²、
花田雄志²、近藤昌夫¹、八木清仁¹ (¹ 阪大院薬、
² アスピオファーマ)、第 57 回トキシシンポジウム、平成 22 年 7 月、滋賀

Claudin を標的とした非侵襲性投与技術の開発
高橋梓、松久幸司、各務洋平、近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 22 年 10 月、大阪

高親和性 claudin binder の創製およびドラッグデリバリーシステムへの応用

各務洋平¹、内田博司²、花田雄志²、高橋梓¹、
近藤昌夫¹、八木清仁¹ (¹ 阪大院薬、² アスピオファーマ)、BIA symposium 2010、平成 22 年 7 月、東京

新規 claudin modulator の創製およびドラッグデリバリーシステムへの応用

各務洋平、高橋梓、松下恭平、松久幸司、近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)、第 9 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2010、平成 22 年 10 月、京都

Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発

松下恭平、高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)、第 9 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2010、平成 22 年 10 月、京都

A claudin modulator as a mucosal

absorption-enhancer of a peptide drug

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, 日本薬物動態学会第 25 回年会、平成 22 年 10 月、東京

Claudin-4 binder を標的とした新規粘膜ワクチンの創製

鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)、日本ワクチン学会第 14 年会、平成 22 年 12 月、東京

Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発

松下恭平、高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)、第 83 回日本生化学会大会、平成 22 年 12 月、神戸

ファージ抗体ライブラリを用いた新規 claudin binder スクリーニングシステムの構築

小高美樹、高橋梓、山浦利章、松久幸司、松下恭平、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

新規 claudin binder C-CPEm19 の機能ドメイン解析

各務洋平、松下恭平、高橋梓、松久幸司、斉藤郁美子、青山浩、宇野公之、近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

新規 claudin binder の創製と粘膜ワクチンへの

応用

山根誠司¹、鈴木英彦¹、角谷秀樹¹、高橋梓¹、
松久幸司¹、内田博司²、渡利彰浩¹、近藤昌夫¹、
八木清仁¹(¹ 阪大院薬、² アスビオファーマ)、
日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

感染受容体発現バキュロウイルスを用いた
HCV 感染機構の解析

山岸喜彰、吉田孟史、近藤昌夫、八木清仁（阪
大院薬）、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3
月、静岡

Claudin 発現モニタリングシステムを用いた
Tight junction 調節物質の検索

渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、
日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

Claudin binder を利用した創薬基盤研究

高橋梓、近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日
本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

Claudin modulator を利用した粘膜吸収促進法の
現状と課題

近藤昌夫、八木清仁（阪大院薬）、日本薬学会
第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当事項なし

H-2 実用新案登録

該当事項なし

H-3 その他

該当事項なし

新規多機能性キトサンによる遺伝子導入システムの 開発とDNAワクチンへの応用

所属 京都大学大学院薬学研究科

研究者 樋口 ゆり子

研究期間 平成 21 年 4 月～平成 23 年 3 月

研究要旨 DNA ワクチン療法の開発を目的に、生体親和性と免疫賦活作用を有するキトサンに対し、リジン-ヒスチジンデンドロンを修飾し、中性における溶解度の増大、エンドソームからの pDNA の脱出促進により遺伝子導入効率を増大させ、キトサンをベースとした新規遺伝子導入キャリアを開発した。

A. 研究目的

エイズ感染患者の増加に伴い予防・治療法の実現が必要とされている。未だ治療法の確立されていない現在、エイズの流行と甚大な被害を食い止める最も有効な長期的対策はエイズの予防ワクチンの開発である。中でも DNA ワクチン療法は、体性免疫のみならず全身系における細胞障害性 T 細胞による細胞性免疫の誘導が可能であり、従来のワクチンに比べ多様な抗原に速やかに対応できる点で高い治療効果が期待できる。

本研究の目的は、エイズ予防 DNA ワクチンのためのキトサンを用いた新規遺伝子導入キャリアの開発である。キトサンは、バイオマス資源キトサンから合成可能かつ生体分解性を有する安価で安全なキャリア素材であるだけでなく、キトサン自体の免疫賦活作用がワクチン効果を増強するため、DNA ワクチンへの応用において有効な素材である。しかしながら、既存のカチオン性リポソームやポリマーに比べ遺伝子導入効率が極めて低いことが問題となっている。その原因としては、中性領域の水溶液中において、キトサンは凝集またはゲル化により溶解度または分散性が低い点、細胞膜へ吸着したキトサン/プラスミド DNA (pDNA) の複合体がエンドサートーシスにより細胞内へ取り込まれた後、エンドソーム/リソソーム内へ長時間滞留することにより pDNA が分解されてしまう点、などが考えられる。そこで本研究では、生分解性や生体親和性の高さなど、

キトサンの有する特長を損なうことなく、遺伝子発現効率を増大させることを目的に、pH バッファリング能を有するアミノ酸であるヒスチジン修飾キトサンによる生体親和性を有する新規遺伝子導入キャリアの開発を行う。コアとなる分子を中心に、規則正しい分岐構造を有するデンドロンは、ほぼ単一分子量であり、一か所に多数の分子を修飾可能であるという特長を有する。特に、リジンなどの分岐構造を有するアミノ酸を用いて合成されたアミノ酸デンドロンは、近年、生体分解性を有する薬物やイメージング素子のキャリアとして期待されている。そこで、キトサンへのより高効率なヒスチジン修飾を目的に、リジンデンドロンの末端にヒスチジンを修飾したリジン-ヒスチジンデンドロン (KH デンドロン) を合成し、KH デンドロン修飾キトサンを作成し、DNA ワクチン療法を目指したキトサンをベースとした遺伝子導入キャリアを合成する。

B. 研究方法

Histidine-Cysteine(CH)修飾キトサンの合成 : Histidine-Cysteine-OMe は Boc-Cys(Acm)-OH、Boc-His(Boc)を用いて O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate によりカップリングを行い Boc-His(Boc)-Cys(Acm)-OMe を合成した。キトサンを 2-iminothiolane・HCl と反応させ thionylated chitosan を合成し、Dipeptide と