

201011029A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

**Claudin binder修飾ナノリポソームを利用した上皮癌の早期診断・治療法の開発に
関する研究**

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成23（2011）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

**Claudin binder修飾ナノリポソームを利用した上皮癌の早期診断・治療法の開発に
関する研究**

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成23（2011）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

Claudin binder修飾ナノリポソームを利用した上皮癌の早期診断・治療法の開発 に関する研究	1
近藤昌夫	

II. 分担研究報告

1. Claudin binder修飾リポソームの創製に関する研究	18
鈴木亮	
2. Claudin binderの創製に関する研究	23
阿部康弘	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	34
-----------------	----

代表研究者 近藤 昌夫 大阪大学薬学研究科 准教授

研究要旨

本研究は、世界屈指のナノリポソーム技術および claudin (CL) binder 技術を有効活用し、上皮細胞癌化の超早期イベント『分裂軸の回転』を認識する初めての癌の低侵襲性早期診断・治療用ナノリポソームを創出し、医薬基盤研究所、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、ナノメディシンとしての実用化を目指すものである。

周知のように、癌克服に向けた最重要戦略は、癌を早期に発見し、早期に治療することであり、腫瘍特異的抗原を利用した既存の癌診断検出感度(10⁹ 個以上の癌細胞)を凌駕する、新たな原理に基づく癌診断・治療法の開発が癌克服の成否を握っている。ナノリポソームは親水性・疎水性抗癌剤をデリバリーできること、リガンド分子を高密度表面修飾できることから、近未来における癌治療を担うナノメディシンとして期待されているものの、癌特異的リガンド分子開発および有効かつ簡便なイメージング法開発の遅延と相俟って、悪性腫瘍の 90 %を占める上皮癌に有効なナノメディシン開発は著しく遅れている。

現在までに当研究グループでは、独自の CL binder を用いて非侵襲性投与方法 (PCT/JP2008/61723)および CL 指向性抗癌剤を創製、機能性蛋白質創出技術を用いて新規 CL binder の作製を推進し、独自のリガンド修飾脂質技術(WO2006/028129)、超音波造影ガス封入ナノリポソーム技術(バブルナノリポソーム)(特開 2005-168312)を用いて癌ターゲティング、血栓部位の超音波造影に成功している。本課題は、これら独自の技術を融合し、『分裂軸の回転』に伴い細胞表面に露出する CL を標的とした低侵襲性早期診断・治療法の創出を試みるものである。

前年度は、既存の CL-4 binder である C-CPE を用いて CL を利用した癌治療戦略の可能性を詳細に解析し、新規 CL-1, -4 binder の創製を試みた。本年度は、claudin 発現によるがん形質への影響を検討し、claudin 発現ががん細胞の増殖・転移能亢進に関与していることを明らかにした。また、C-CPE とタンパク合成阻害因子 (PSIF) の融合タンパクである C-CPE-PSIF が、多様ながん細胞への抗腫瘍効果および転移がんに対する抗腫瘍効果を示すことを見出し、新規 CL binder のリポソーム修飾条件を設定した。

A. 研究目的

本研究は、独自の Claudin (CL) binder およびナノリポソーム技術を融合し、上皮細胞癌化超早期イベント『分裂軸の回転』に伴い局在性が変化する密着結合(TJ)構成蛋白質 CL を利用した、初めての上皮癌早期診断・治療用ナノメディシンを開発することを目的とする。

依然として悪性腫瘍は人類の前に立ちはだかる大きな壁であり、本邦では年間 30 万人、世界では 700 万人もの人が癌で命を落している。また、悪性腫瘍の 90 %以上は、肺癌、胃癌等に代表される上皮由来の癌であ

り、上皮癌に対する治療は、外科的手術による病巣の切除や抗癌剤による化学療法・放射線治療が主に行われているが、末期や化学療法に耐性をもつ癌には有効な治療法が無く、また化学療法には脱毛・嘔吐・骨髄抑制等の副作用が伴う。近年、分子標的治療薬や癌細胞に対する DDS 等次世代の癌治療法の開発が進んでいるが、未だ癌の根治には至っていない。また、癌による死因の多くは転移によるものであることから、転移癌を含めた上皮由来の癌に対する有効かつ安全な治療法の開発が、癌克服の鍵を握っていると考えられる。

さらに癌克服の最重要基本戦略は癌を早期に発見し、早期に治療することであり、癌細胞特異的抗原を利用した既存の癌診断の検出感度(10^9 個以上の癌細胞)を凌駕する、新たな癌診断・治療法の開発が急務となっている。

タイトジャンクション(TJ)は細胞間隙の物質透過を制御し、細胞の極性を維持する細胞間結合であり、組織・生体の恒常性の維持を担っている。近年、上皮の癌化の過程で、TJ の機能崩壊に伴う細胞極性の消失、細胞の異常増殖の発生等が示唆されている。上皮細胞の極性が崩壊すると、細胞はコンタクトインヒビション等の正常な増殖制御から逸脱し、腫瘍塊を形成し始める。また、分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、細胞間隙面に局在する CL を細胞表面に露出した状態で増殖を開始することから、CL リガンドを利用すれば癌化早期イベント『分裂軸の回転』を利用した新規癌診断・治療法の開発に繋がると考えられる。

以上の背景を踏まえ、平成 21 年度は既存の CL-4 binder (C-CPE)と蛋白合成阻害因子(PSIF)との融合蛋白質を作製し、CL を標的とした癌治療戦略の可能性を検証した。本年度は、CL 発現によるがん形質への影響を検討することで、CL 発現がん細胞ががん治療ターゲットとして最適であることを確認し、さらに CL への指向性をもつ C-CPE-PSIF による、多様ながん細胞への抗腫瘍効果および転移がんに対する抗腫瘍効果を検討した。本研究の成否は、CL binder の質が握っていることから、引き続き新規 CL binder の創製を試みた。

B. 研究方法

B.1 細胞

マウスメラノーマ細胞 B16/BL6 細胞およびイヌ腎臓細胞株 MDCK (Madin-Darby canine kidney)細胞は 10 % Fetal Bovine Serum (FBS, JRH Bioscience Inc., Kansas, USA), 20 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine を含む DMEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて 37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。さらに各種 claudin を発現させた B16/BL6 細胞である B16/BL6-CL1 (claudin-1 発現 B16/BL6 細胞)および B16/BL6-CL4 (claudin-4 発

現 B16/BL6 細胞)は、上記の培地に G418 (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を終濃度 500 μ g/ml になるように添加した培地を用いて、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

マウス乳癌由来 4T1 細胞 (富山大学和漢薬総合研究所 小泉桂一博士より供与) は 10 % FBS, 20 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES を含む DMEM 培地を用いて 37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

B.2 Claudin 発現による増殖能への影響

B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を 24 well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353047)に 1×10^4 cells/well で播種し、24、48、72、96 時間培養後、Trypsin-EDTA を用いて各細胞を回収し、計数した。

B.3 Claudin 発現による足場非依存的増殖能に対する影響

Bacto Agar (Becton Dickinson Company,214050)を MilliQ 水で 7 % に調製し、120 °C、20 分オートクレーブした。これを 10 % FBS を含んだ DMEM 培地で 0.7 % に希釈し、2 ml を 6 well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353046)にコートした後、4 °C で 30 分静置した。同様に Bacto Agar を MilliQ で 4 % に調製し、120 °C、20 分オートクレーブした。これを 10 % FBS を含む DMEM 培地でさらに希釈し、0.4 % に調製した。B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、 1×10^4 cells/well となるように調製し、0.4 % soft agar で懸濁した後、0.7 % soft agar の上に 2 ml 播種した。顕鏡により colony 形成が確認された後、MTT 法 (MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide] (NACALAI TESQUE, INC, KYOTO, JAPAN, 23547-76)を PBS(-)で 1 mg/ml に調製し、500 μ l/well で添加し 30 分間インキュベートした後、colony 数を計測した。

B.4 Claudin 発現による移動能・浸潤能への影響

移動能を検討するため、24 well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353047)に 8.0 μ m ポアインサート (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353097)をセットし、 1×10^5 cells/well となるよう調製した B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞をインサート上に播種した。Bottom well に HUMAN FIBRONECTIN (BD Biosciences, 354008) 10 μ g/ml を含む 0.5% FBS を含む DMEM 培地を 600 μ l 加え、6 時間培養した。Control 群は HUMAN FIBRONECTIN を加えなかった。培養後、Diff-Quik (sysmex,16920)により細胞を染色した。

浸潤能を検討するため、24 well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353047)に 8.0 μ m ポアインサート(FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353097)をセットした。BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Biosciences,356234)を氷上で DMEM 培地により希釈した。希釈した Matrigel をインサート上に 50 μ l コートし、37 °C、30 分インキュベートしてゲル化させた。 1×10^5 cells/well となるよう調製した B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を Matrigel 上に播種し、Bottom well には HUMAN FIBRONECTIN (BD Biosciences, 354008) 10 μ g/ml を含む 0.5% FBS を含む DMEM 培地を 600 μ l 加え、24 時間培養した。培養後、Diff-Quik (sysmex,16920)により細胞を染色した。

B. 5 Claudin 発現による造腫瘍能への影響

B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 15 ml を加え細胞を懸濁させ、4 °C、1,200 rpm で 10 間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1×10^6 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。C57BL/6 マウス(雌性、7 週齢)に左背部皮下に、調整した各細胞を 100 μ l ずつ、27 G 注射針を用いて移植した。皮下投与から 2 日毎に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を [腫瘍の長径 (mm)] \times [腫瘍の短径 (mm)]²/2 mm³ として算出した。

B. 6 Claudin 発現による転移能への影響

B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 15 ml を加え細胞を懸濁させ、4 °C、1,200 rpm で 10 間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 2.5×10^6 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。調整した各細胞を 100 μ l ずつ、C57BL/6 マウス(雌性、9 週齢)に 27 G 注射針を用いて尾静脈投与した。尾静脈投与から 14 日後、肺を摘出し、転移結節数を計数した。

B. 7 Claudin 発現による転移関連因子の発現に対する影響

B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を回収し、PBS (-) で洗浄後、High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いて、total RNA の抽出を行った。細胞のペレットに Lysis/binding buffer を加え、ボルテックスした後に、High pure フィルターチューブにアプライした。10,000 rpm で 15 秒間遠心分離した。Wash buffer I/Wash buffer II でカラムを洗浄した後に、Elution buffer 42.5 μ l で total RNA を抽出した。さらに、染色体 DNA を完全に除くため、抽出した RNA を RNase-free DNase (BcaBEST™ RNA PCR kit (Takara Inc., Shiga, Japan)) で 37 °C、30 分間処理した。抽出した RNA 200 ng を Takara RNA PCR Kit (Takara Inc., Shiga, Japan) を用いて、逆転写し cDNA を得た。逆転写反応は、Oligo dT adaptor をプライマーとして用い、42 °C を 50 分間、85 °C を 5 分間、4 °C を 5 分間行った。得られた cDNA を用いて、VEGF-A, TNF- α , TGF- β , angiopoietin-2, angiopoietin-4, MMP-2, MMP-9, angiostatin, thrombospondin-1, thrombospondin-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, GAPDH の遺伝子発現を PCR に、より解析した。PCR には Ex Taq DNA polymerase (Takara Inc., Shiga, Japan) を用いた。PCR に利用した primer は以下の通り。

GAPDH; Forward primer: 5'-GTGAGGCCGGTGCTG AGT- 3', Reverse primer: 5'-TTGCTGGGGTGGGT GGTC- 3', VEGF-A; Forward primer: 5'-CCCACGA CAGAAGGAGAGCAGAAGT- 3', Reverse primer: 5'-CATCAGCGGCACACAGGACGG- 3', TNF- α ; Forward primer: 5'-CCTGTAGCCCACGTCTGTAGC - 3', Reverse primer: 5'-TTGACCTCAGCGCTGAG TTG- 3', TGF- β ; Forward primer: 5'-GGTGGACC GCAACAAC- 3', Reverse primer: 5'-GCACTGCTT CCCGAAT- 3', angiopoietin-2; Forward primer: 5'-GAGGGAGGACTGGTGACAGCCACGG- 3', Reverse primer: 5'-GAAATCTGCTGGCCGGATCA TCAT- 3', angiopoietin-4; Forward primer: 5'-GAAATCTGCTGGCCGGATCATCAT- 3', Reverse primer: 5'-GAAATCTGCTGGCCGGATCATCAT- 3', MMP-2; Forward primer: 5'-TGCAGGAGACAAG TTCTGGA- 3', Reverse primer: 5'-GCTTCCAAA CTTCACGCTCT- 3', MMP-9; Forward primer: 5'-GTTTTTGATGCTATTGCTGAGATCCA- 3', Reverse primer: 5'-CCCACATTTGACGTCCAGAGA AGAA- 3', angiostatin; Forward primer: 5'-GTGACATCCCCCTGTGTGCATC- 3', Reverse primer: 5'-GACGACCGGCACCGAAAGTCC- 3', thrombospondin-1; Forward primer: 5'-GACAAAAA CGGGGAGGGCGATG- 3', Reverse primer: 5'-TTTGCCCTGATGGCGGACAACC- 3', thrombospondin-2; Forward primer: 5'-TCGGGGA ACGCTCCTGGTGTT- 3', Reverse primer: 5'-TCCACACCCTGGACCACGAGATCT- 3', TIMP-1; Forward primer: 5'-ATGATGGCCCCCTTTGCATC TCT- 3', Reverse primer: 5'-GAAGGCTGTCTGTG GGTGGGGT- 3', TIMP-2; Forward primer: 5'-GTTTATCTACACGGCCCCCTCTTCA- 3', Reverse primer: 5'-GCCTGGTGCCCATTGATGCTC TT- 3', TIMP-3; Forward primer: 5'-CGTGATCCGG GCCAAAGTGG- 3', Reverse primer: 5'-CAATTGC AACCCAGGTGGTAGCGGT- 3'.

B.8 B16/BL6-CL4 細胞における claudin-4 発現の

確認

B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を氷冷 PBS (-) 1 ml により培養 ディッシュからセルスクレーパーによって剥がし、細胞を回収した。氷冷 PBS (-) 1 ml を加え細胞を懸濁させ、4 °C、3,000 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。さらにこの操作を 3 回繰り返した。遠心分離後、上清を取り除き lysis buffer (1 % Triton X-100, 1 % protease inhibitor cocktail 含有 PBS (-)) を加え、氷冷しながら超音波処理を 20 秒間、3 回行い、4 °C、15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を回収し細胞溶解液を作製した。細胞溶解液に SDS sample buffer を加え 5 分間ポイルし、泳動用サンプルとした。15 % ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE 電気泳動を行った (20 mA/枚、1.5 時間)。SDS-PAGE 後の Western blotting を行った。12 % ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE (30 mA/枚、約 1.5 時間) を行った後、TRANS-BLOTR SD SEMI-DRY TRANSEFR CELL によりゲル中のタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA で 20 分間転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク/TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 M NaCl, 0.05 % Tween 20) に浸して、室温で 2 時間振とうし、ブロッキング操作を行った。TBS-T で 5 回洗浄後、1 次抗体と 2 時間反応させた。TBS-T で洗浄後、2 次抗体 HRP 標識 goat anti-mouse or rabbit IgG (2,000 倍希釈、CEMICON, CA) と 1 時間反応させた。検出には、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, UK) を用い露光した X 線フィルム (KONICA MINOLUTA MEDICAL & GRAPHIC INC., TOKYO, JAPAN) を現像した。なお、claudin の検出には rabbit anti-claudin-1 pAb、mouse anti-claudin-4 pAb (一次抗体; 2,000 倍希釈、二次抗体: 5,000 倍希釈、invitrogen, South San Francisco, CA) を用い、PVDF 膜を Re-Blot Plus (CHEMICON international Inc., CA) でリプローブした後、 β -actin (一次抗体: 5,000 倍希釈、二次抗体: 10,000 倍希釈、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で補正を行った。

B. 9 B16/BL6-CL4 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞障害性の検討

B16/BL6-CL4 細胞を 96 well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A) に 1×10^4 cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μ l に交換後、PBS (-) で段階希釈した PSIF もしくは C-CPE-PSIF を終濃度 0.5, 1, 10 および 20 ng/ml となるように 10 μ l ずつ添加した。24 時間後に WST-8 法により細胞生存率を測定した。各 well に SF 試薬 (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を 10 μ l ずつ添加し、1.5 時間培養後、450 nm における吸光度を測定した。PBS (-) 添加群の吸光度を基準として各蛋白質濃度における吸光度の相対値を求め、生存率とした。

B. 10 B16/BL6-CL4 細胞に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

皮下移植マウスとして、B16/BL6 および B16/BL6-CL4 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 1 ml を加え細胞を懸濁させ、4 $^{\circ}$ C、1,500 rpm で3分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1×10^5 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。BALB/c マウス (雌性、7-8 週令) の右腹部皮下に、調整した、B16/BL6 細胞および B16/claudin-4 細胞を 50 μ l ずつ、27 G 注射針を用いて移植した。

C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討として、PBS (-) を用いて PSIF は 1 μ g/ml、C-CPE-PSIF は 0.4 または 1 μ g/ml となるように希釈した。細胞を移植した日から、週に 3 回、尾静脈より各蛋白質をマウスの体重 20 g 当り 100 μ l 投与した。なお、毎回投与直前に腫瘍径と体重を測定し、腫瘍体積を [腫瘍の長径 (mm)] \times [腫瘍の短径 (mm)]²/2 mm³ として算出した。

B. 11 B16/BL6-CL4 細胞の転移に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

B16/BL6 細胞および、B16/BL6-CL4 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 15 ml を加え

細胞を懸濁させ、4 $^{\circ}$ C、1,200 rpm で 10 間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1×10^6 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。調整した各細胞を 100 μ l ずつ、C57BL/6 マウス (雌性、9 週齢) に 27 G 注射針を用いて尾静脈投与した。その後、PBS (-) を用いて、PSIF は 1 μ g/ml、C-CPE-PSIF は 0.4 または 1 μ g/ml となるように希釈した。細胞を移植した日から、週に 3 回、尾静脈より各蛋白質をマウスの体重 20 g 当り 100 μ l 投与した。尾静脈投与から 14 日後、肺を摘出し、転移結節数を計数した。

B. 12 4T-1 細胞の転移に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

4T-1 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 15 ml を加え細胞を懸濁させ、4 $^{\circ}$ C、1,200 rpm で 10 間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1×10^5 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。調整した各細胞を 50 μ l ずつ、C57BL/6 マウス (雌性、9 週齢) に 27 G 注射針を用いて皮下移植した。その後、PBS (-) を用いて、C-CPE-PSIF は 2 または 5 μ g/kg の用量となるように調整した。細胞を移植した日から、週に 3 回、尾静脈より各蛋白質をマウスに投与した。皮下移植から 35 日後、肺を摘出し、転移結節数を計数した。

B. 13 Adriamycin (ADR) による抗腫瘍効果の検討

皮下移植マウスとして、4T1 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 1 ml を加え細胞を懸濁させ、4 $^{\circ}$ C、1,500 rpm で3分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1×10^5 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。その後、BALB/c マウス (雌性、7-8 週令) の右腹部皮下に、調整した 4T1 細胞を 50 μ l ずつ、27 G 注射針を用いて移植した。

ADR の抗腫瘍効果の検討として、4T1 細胞を移植した日から、4 mg/kg の用量で週に 3 回、尾静脈より投与した。なお、毎回投与直前に腫瘍径と体重を測

定し、腫瘍体積を [腫瘍の長径 (mm)] × [腫瘍の短径 (mm)]²/2 mm³ として算出した。

転移がんに対する抗腫瘍効果として、4T-1 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 15 ml を加え細胞を懸濁させ、4 °C、1,200 rpm で 10 分遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1 × 10⁵ cells/ml になるように PBS (-) で調整した。調整した各細胞を 50 μl ずつ、C57BL/6 マウス(雌性、9 週齢)に 27 G 注射針を用いて皮下移植した。その後、ADR を 4 mg/kg の用量で、週に 3 回、尾静脈より投与した。皮下移植から 35 日後、肺を摘出し、転移結節数を計数した。

B. 14 3D 培養による極性崩壊組織モデルの作製

8 well chamber 上に Matrigel (BD, Growth factor reduced Matrigel™ Matrix) をコートし、インキュベーター中で Matrigel を固まらせた。Trypsin-EDTA により single cell にした MDCK 細胞を 2000 cells/well になるように播種し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。4 日ごとに 2 % のマトリゲルを含んだ DMEM 培地を交換した。培養を開始後 14 日間、形態を顕鏡により観察した。

B. 15 新規 CL binder の創製

特許出願の可能性があるため、作製法の詳細は割愛した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

D. 1 Claudin 発現による増殖能への影響

生体内における細胞の恒常性は、細胞の分化、増殖および生存に関わる分子により厳密に制御されている。このような制御には、細胞内における様々なシグナル伝達経路の調整が重要であると同時に、外部からの増殖因子、サイトカイン、細胞外基質などの制御因子も同様に重要な働きを担っている。しかし、何らかの原因により細胞の増殖制御に関わる遺伝子に変異が起こると、

それらの遺伝子産物は異常をきたし、制御された増殖過程を逸脱した無制限かつ無秩序な増殖が引き起こされると考えられている。

上皮組織においてバリア機能を担うタイトジャンクションは、物質透過や細胞極性などの制御を担い、細胞増殖制御に関与することが知られている。タイトジャンクションの機能本体である細胞膜タンパク質 claudin は、様々ながんにおいて発現変化が観察されていることから、がんへの関与が示唆されている。

そこで本研究では、claudin ががん形質に与える影響を、特に様々ながんで発現亢進が確認されている claudin-1 と claudin-4 に着目し、マウスメラノーマ細胞 B16/BL6 細胞に claudin-1 および claudin-4 を発現させた細胞を用いることで検討した。

まず、細胞増殖能に与える影響を検討するため B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を各 1 × 10⁵ cells/ml となるよう播種し、培養 24、48、72、96 時間後の細胞数を計数した。その結果、各細胞間において細胞数に有意差が無く、claudin-1 および claudin-4 の発現は B16/BL6 の細胞増殖能に影響を及ぼさないと考えられる (Fig. 1)。

D. 2 Claudin 発現による足場非依存的増殖能に対する影響

正常細胞は増殖因子、サイトカイン、細胞外基質など細胞外部からの影響を大きく受けており、これらの因子は細胞の分化や生死などを制御し、細胞の恒常性維持に大きく関与している。一方、細胞ががん化すると、細胞はこれらの制御から逸脱してしまい、抑制制御を受けない状態で増殖し続ける状態となる。

D. 1 での検討により、各 claudin の発現は B16/BL6 細胞の細胞増殖能には影響を及ぼさないことが分かった。そこで次に、細胞増殖に対して抑制制御が生じる環境下における、claudin 発現のがん細胞増殖能への影響を検討した。

正常細胞は、細胞外マトリックスなどの足場が存在しない環境では増殖抑制制御がかかり、増殖停止およびアノイクスを起こすことが知られている。一方、がん細胞は足場のない環境下においても増殖する能力を有し

ている。そこで、増殖抑制制御がかかる環境として、足場のない環境が再現できる軟寒天 (soft agar) を用い、claudin 発現によるがん細胞の足場非依存的な増殖能への影響に関して検討を行った。

本実験では 0.7 % soft agar を bottom agar とし、0.4 % soft agar に各細胞を懸濁させた top agar を bottom agar 上に播種した。経時的に colony 形成過程を顕鏡し colony 形成を確認後、MTT 法により colony を染色し、colony 数を計測したところ、wild type B16/BL6 細胞と比較し、各 claudin 発現細胞では colony 数が増加していた。また、colony の大きさも wild type と比較し増大していたことから、claudin-1 および claudin-4 の発現はがん細胞に特徴的な増殖能である足場非依存的増殖能を促進させる可能性が示唆された (Fig. 2)。

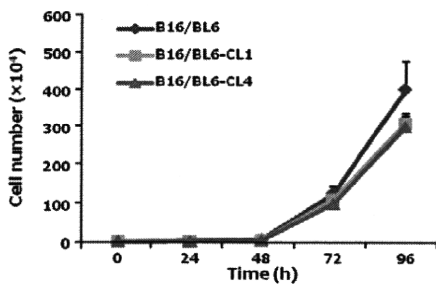


Figure 1 Effect on B16/BL6 cell growth by claudin expression. Claudin-1-expressing B16/BL6 (B16/BL6-CL1) cells, claudin-4-expressing B16/BL6 (B16/BL6-CL4) cells and B16/BL6 cells were seeded at 1×10^4 cells/well in 24-well plate. Cell growth was monitored by counting cells at after 24, 48, 72 and 96 h of incubation. The data represented the means \pm SD (n=3).

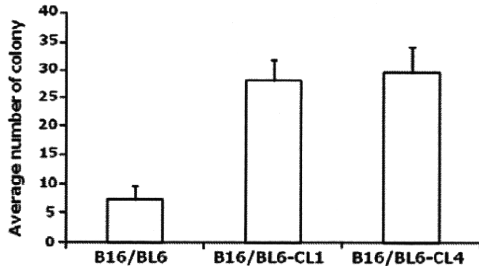


Figure 2 Effect on anchorage-independent growth of B16/BL6 by claudin expression. Claudin-1-expressing B16/BL6 (B16/BL6-CL1) cells, claudin-4-expressing B16/BL6 (B16/BL6-CL4) cells and B16/BL6 cells were seeded at 1×10^4 cells/well in 0.4 % soft agar. After 9 days of incubation, the number of colonies were counted by MTT assay. The data represented the means \pm SD (n=3).

D. 3 Claudin 発現による造腫瘍能への影響

D.2 での検討から、B16/BL6 細胞は claudin-1 および claudin-4 を発現させることで足場非依存的増殖能が亢進することが明らかとなった。これらの結果を受け、次に実際の生体内での増殖能を比較するため、各 claudin を発現させた B16/BL6 細胞をそれぞれマウス

皮下に移植し、腫瘍形成能を比較した。

C57BL/6 マウス (雌性、7 週齢) に B16/BL6-CL1、cB16/BL6-CL4 および B16/BL6 細胞を背部皮下移植し、経時的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を算出した結果、各細胞間で造腫瘍形成能に有意差は生じなかった (Fig. 3)。従って、claudin 発現は皮下における腫瘍形成能に影響を及ぼさないものと推察される。D.2 での検討では、増殖に対して抑制制御がかかる環境下において、claudin 発現細胞は増殖能の亢進が観察されたのにもかかわらず、皮下での腫瘍形成能に関してはその亢進作用が見られなかった。この原因に関して、皮下以外の環境下、例えば転移の際にみられる血中や転移先の組織である肺などでの増殖・生存能において影響が現れる可能性が考えられる。

D. 4 Claudin 発現による移動能・浸潤能への影響

がん転移とは、がん細胞が発生した母組織から血管やリンパ管などを経て原発巣とは異なる組織に移行し、その組織で増殖進展することである。具体的な段階として、周囲間質組織の破壊と運動性の亢進を伴う原発巣からの解離、脈管内への侵入、脈管内における足場非依存的生存および輸送、そして脈管外遊出から転移組織への浸潤生着および増殖などの段階が知られている。以上のように、がんの転移は多段階によるステップを経て完了するが、転移において基本となる性質としてがん細胞の移動能および浸潤能の亢進がある。そのため、がん細胞の移動能・浸潤能に関する検討は転移を考察する上で基本的課題となっている。そこで、本項では claudin 発現によるがん細胞の移動能および浸潤能に対する影響を検討した。

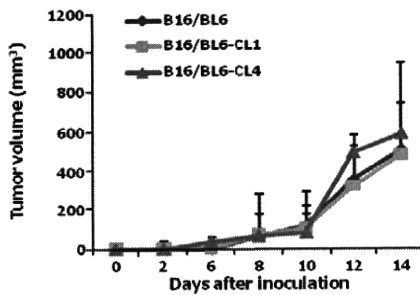


Figure 3 Effect on tumorigenicity of B16/BL6 by claudin expression. Claudin-1-expressing B16/BL6(B16/BL6-CL1) cells, claudin-4-expressing B16/BL6(B16/BL6-CL4) cells and B16/BL6 cells (1×10^5 cells) were subcutaneously inoculated into the left flank of mice. Tumor growth was monitored by calculating tumor volume. The data are representative of two independent experiments. Data are shown as means \pm SD (n=5).

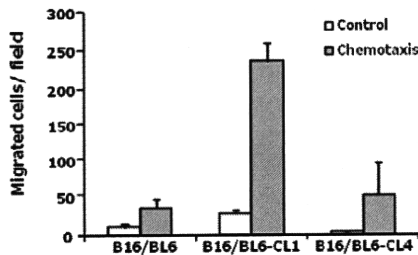


Figure 4 Effect on migration of B16/BL6 by claudin expression. Claudin-1-expressing B16/BL6(B16/BL6-CL1) cells, claudin-4-expressing B16/BL6(B16/BL6-CL4) cells and B16/BL6 cells were seeded at 1×10^5 cells/well in pore insert. Chemotaxis added 10 mg/ml fibronectin to 0.5% DMEM in bottom well, and control added only 0.5% DMEM. After 6 h of incubation, cells were stained by Diff-Quik and were counted the number of migrated cells. The data represented the means \pm SD (n=3).

まず細胞の移動能に対する claudin 発現の影響を検討した。各細胞を $8.0 \mu\text{m}$ ポアインサート上に播種し、bottom well に細胞誘引物質(fibronectin)を含む培地を加え、6 時間培養した。6 時間後、細胞を染色し、誘引物質に従いインサート下面に移動した細胞のみを計数し、各細胞の移動能を比較した。その結果、claudin-1 を発現させた細胞で著しく移動能が亢進していたが、claudin-4 発現細胞では wild type B16/BL6 細胞と比較し移動能に有意差はなかったことから、claudin-1 発現ががん細胞の移動能を亢進させる可能性が示唆された(Fig. 4)。

続いて、claudin 発現によるがん細胞の浸潤能に対する影響の検討を行った。本実験では細胞外マトリックスを調整した可溶性基底膜、マトリゲルを用いて細胞外マトリックスを再現した。本法はがん細胞の基底膜浸潤実験系として汎用されており、転移性がん細胞の生物学的特性としての浸潤能を定量化できるという特長を持つ。 $8.0 \mu\text{m}$ ポアインサート上にマトリゲルをコートし、さらにマトリゲル上に細胞懸濁液を播種し、bottom well には細胞誘引物質(fibronectin)を含む培地を加え 24 時間培養した。マトリゲル上に播種された細胞が浸潤能

を示す場合、誘引物質の作用によりマトリゲル、およびポアインサートのフィルターを通過しフィルターの下面に細胞が移動する。培養後、細胞を染色し、フィルター下面に移動した細胞のみを計数し各細胞の浸潤能として比較した。その結果、B16/BL6-CL1 細胞では浸潤能が亢進していたが、B16/BL6-CL4 細胞では wild type B16/BL6 細胞と比較し浸潤能に有意差はなかった(Fig. 5)。以上、claudin-1 発現はがん細胞の浸潤能を亢進させることが明らかとなった。これは claudin-1 が誘導するがん細胞移動能の亢進と関連しており、claudin-1 の発現はがんの転移能に関与することが推察された。

D. 5 Claudin 発現における転移能への影響

がんの転移は、がん細胞の周辺組織への浸潤による原発巣からの離脱に始まって、遠隔部位での増殖による転移巣の形成に至るまで様々な分子機構が複雑に絡み合い成り立っている。転移早期の段階である原発巣における変化や転移機構を細分化した際のがん細胞の挙動には *in vitro* によるモデル実験が行われるが、転移後期の臓器への親和性などを検証するモデルは *in vivo* による検証が利用されている。

これまでの検討から、B16/BL6 細胞に claudin-1 を発現させることで移動能や浸潤能が促進されるが、claudin-4 を発現させてもこれらの形質に変化は生じないことが示された。移動能や浸潤能は転移における基本的かつ重要な性質であり、claudin-1 の発現によりこれらのがん形質が促進されたことから、生体内での転移能も促進されることが推察された。よって本項において claudin 発現による転移能への影響を検討した。

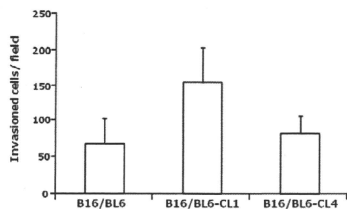


Figure 5 Effect on invasion of B16/BL6 by claudin expression. Claudin-1-expressing B16/BL6(B16/BL6-CL1) cells, claudin-4-expressing B16/BL6(B16/BL6-CL4) cells and B16/BL6 cells were seeded at 1×10^5 cells/well on matrigel in pore insert. Chemotaxis added 10 µg/ml fibronectin to 0.5 % DMEM in bottom well, and control added only 0.5 % DMEM. After 6 h of incubation, cells were stained by Diff-Quik and were counted the number of migrated cells. The data represented the means \pm SD (n=3).

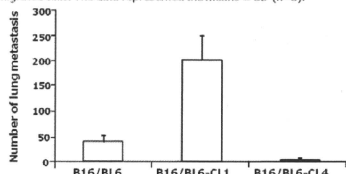


Figure 6 Effect on metastasis of B16/BL6 by claudin expression. Claudin-1-expressing B16/BL6(B16/BL6-CL1) cells, claudin-4-expressing B16/BL6(B16/BL6-CL4) cells and B16/BL6 cells (1×10^5 cells) were intravenously injected. After day 14, the mice were sacrificed, their lungs were counted number of metastatic foci. The data are representative of two independent experiments. Data are shown as means \pm SD (n=5).

本研究に用いているマウスメラノーマ細胞の B16/BL6 細胞は、C57BL/6 マウス(雌性、7 週齢)に尾静脈投与することで肺へ転移することが知られている。そこで、claudin の発現が転移能に与える影響を検討するため、各細胞をマウスに尾静脈投与し、14 日後に肺転移結節数を計数し転移能を比較した。その結果、B16/BL6-CL1 細胞では wild type B16/BL6 細胞に比べ肺転移能が亢進し、また B16/BL6-CL4 細胞では抑制されることが明らかとなった(Fig. 6)。Claudin-1 発現細胞は、D. 4 において観察されたように移動能・浸潤能が向上していたことから、この移動能亢進により転移能が促進されたのではないかと推察された。一方、claudin-4 発現細胞は、D. 4 の検討では wild type B16/BL6 細胞と同等な移動能および浸潤能だったが、実際の転移能は低下していることから、claudin-4 発現細胞では単純に移動能が転移能と相関しないことが分かった。以上の結果から、claudin 発現はがん細胞の移動能や浸潤能への影響の他に、生体内においてがん転移に関与する因子に影響を及ぼすことが推測された。

D. 6 Claudin 発現における転移関連因子の発現に対

する影響

D. 5 での転移実験の結果から、claudin は細胞の移動能や浸潤能を亢進させる作用とは違った、転移を促進・抑制する作用があることが推察された。

生体において転移に関わる因子の1つとして tumor necrosis factor- α (TNF- α)が知られている。がん細胞から分泌される TNF- α は、転移巣での微小環境形成に関与していること、がん細胞でみられる EMT における主な誘導因子である transforming growth factor- β (TGF- β) を促進させること、さらに血管透過性亢進や浸潤にも関与していることが知られている。TGF- β は、運動・浸潤を誘導し、また周囲の間質に対しては血管新生作用を示すことで、転移を促進させている。生体での運動・浸潤に関しては、細胞外マトリックス分解酵素である Matrix metalloproteinase (MMP)が重要な役割を担っている。MMP にはファミリーが存在し、特に MMP-2, 9 に関してがんでの浸潤機構に深く関わっていることが知られている。MMP は、がんの浸潤のみならず、血管新生および増殖も関与しており、MMP-9 に関しては細胞外マトリックス結合した血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF)を遊離させることで、がんにおける血管新生のスイッチ機能を果たしているとも言われている。ほとんどの腫瘍は何年もの間、血管新生の能力をもたず休眠している。この際、血管新生阻害作用を示す angiostatin や thrombospondin、内在性 MMP 阻害物質 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs)などの阻害因子が分泌され、腫瘍は増殖や血管新生を起こせない状態となる。しかし、ひとたび血管新生能を示し始めると、強力な血管新生因子である VEGF 等により急速な腫瘍血管形成が起こり、その結果増殖や転移が促進される。がんにおいて腫瘍血管新生を誘導する因子は VEGF の他に angiopoietin-2, -4 が知られている。これらは血管形成に対し促進的に働く因子として知られており、特に angiopoietin-4 は、原発巣内に存在する間質細胞から分泌される TGF- β によって誘導され、乳がん細胞の肺転移を促進させる重要な因子であることが報告されている。以上の背景を受け、本項では B16/BL6-CL1、cB16/BL6-CL4 および B16/BL6 細胞における TNF- α 、

TGF- β 、MMP-2、MMP-9、VEGF-A、angiostatin、thrombospondin-1、thrombospondin-2、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、angiopoietin-2、angiopoietin-4 の RNA 発現量を比較し、claudin 発現による転移能の違いに 関 与 す る 因 子 の 探 索 を 試 み た。

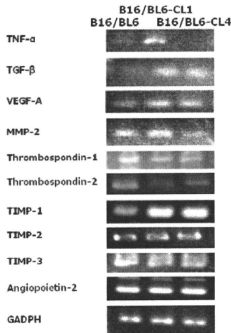


Figure 7 Effect on expression of MMPs and cytokines of B16/BL6 by claudin expression.

Total RNA was extracted from claudin-1-expressing B16/BL6(B16/BL6-CL1) cells, claudin-4-expressing B16/BL6(B16/BL6-CL4) cells and B16/BL6 cells, followed by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis.

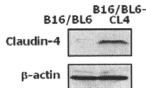


Figure 8 Expression of claudin-4 in B16/BL6-CL4 cell.

Cell lysates from B16/BL6 and B16/BL6-CL4 cells were subjected to SDS-PAGE, followed by western blotting with claudin-4 and β -actin.

各細胞から RNA を抽出し、細胞が産生するサイトカインの発現量を RT-PCR により比較した。その結果、TNF- α と MMP-2 では、B16/BL6-CL1 細胞で発現量の亢進、B16/BL6-CL4 細胞で発現量の抑制が確認されたことから、これらの発現変化は転移能と相関していることが明らかとなった。一方、TGF- β と VEGF-A は B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞の両細胞において発現量の増加が確認されたことから、移動・浸潤能と相関していることが明らかとなった。また、thrombospondin-1、thrombospondin-2、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、angiopoietin-2 の発現は確認されたが、その発現量の差に転移形質との相関は認められなかった。なお、MMP-9、angiopoietin-4、および angiostatin では各細胞とも、検出されなかった (Fig. 7)。

これらの結果から、TNF- α 、MMP-2、TGF- β 、

VEGF-A の 4 つの因子が claudin 発現による転移能の差異に 関 与 し て い る こ と が 示 唆 さ れ た。

以上 claudin は、がんの増殖能および転移能に影響を及ぼし、そのがん形質を促進させることから、臨床において観察される claudin の過剰発現は、がんの悪性化と密接に 関 与 し て い る こ と が 明 ら か と な っ た。従って claudin は、がん細胞膜表面に現れた治療のためのターゲット分子としての役割のみならず、発現亢進そのものががん悪性化の原因となるため、claudin をターゲットとしたがん治療法はより有意義ながん治療戦略であることが明らかとなった。

D.7 Claudin-4 発現 B16 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞障害性の検討

これまでの検討から claudin は B16/BL6 のがん形質を促進させることが明らかとなった。また、前年度までの検討から claudin 指向性 C-CPE-PSIF を利用したががん治療法の有効性に関して 4T-1 乳がん細胞株を用いて明らかにしている。そこで、今年度は C-CPE-PSIF を利用したがん治療法が claudin-4 発現メラノーマ細胞株である B16/BL6-CL4 細胞に対しても有効であるかを検証した。

まず、B16/BL6-CL4 細胞の claudin-4 の発現を Western blotting により確認したところ、高い claudin-4 発現を確認した (Fig. 8)。そこで、C-CPE-PSIF の B16/BL6-CL4 細胞に対する細胞傷害性を検討した。B16/BL6 細胞と B16/BL6-CL4 細胞を PSIF または C-CPE-PSIF で 24 時間処理し、WST-8 法により生細胞数の測定を行った。その結果、claudin の発現量が低い B16/BL6 細胞では PSIF および C-CPE-PSIF 処理による細胞障害性は観察されなかった。一方、B16/BL6-CL4 細胞では PSIF のみの処理ではほとんど細胞障害性が観察されないのに対して、C-CPE-PSIF では濃度依存的な細胞障害性が観察された (Fig. 9)。従って、C-CPE-PSIF は claudin-4 発現 B16/BL6 細胞に対し、claudin-4 特異的に細胞傷害性を示すことが示唆された。

D.8 Claudin-4 発現 B16 細胞に対する C-CPE-PSIF の

抗腫瘍効果の検討

B16/BL6-CL4 細胞担がんマウスを用いて C-CPE-PSIF の皮下移植腫瘍に対する抗腫瘍効果を検証した。BALB/c マウス (雌性, 7 週齢) の右腹部皮下に、 1×10^6 個の B16/BL6-CL4 細胞を移植した。移植後、C-CPE-PSIF を $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ もしくは $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で週に 3 回、尾静脈内投与し、投与毎に腫瘍径を測定した。その結果、B16/BL6 細胞担がんマウスでは観察されなかったものの、B16/BL6-CL4 細胞担癌マウスにおいて C-CPE-PSIF $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では顕著な抗腫瘍効果が観察された (Fig. 10)。従って、C-CPE-PSIF はメラノマ細胞株である B16/BL6-CL1 が形成する腫瘍に対しても抗腫瘍効果を示すことが確認された。前年度の乳がん細胞株 4T1 に対する抗腫瘍効果と併せて考えると、C-CPE-PSIF は様々な腫瘍に対し抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。

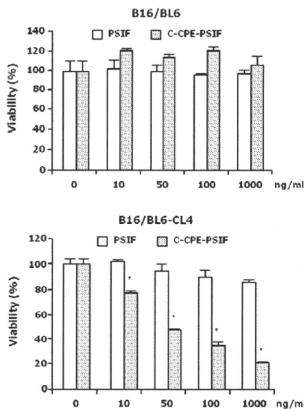


Figure 9 Cytotoxicity of C-CPE-PSIF in B16/BL6-CL4 cells. B16/BL6 cells (upper panel) and B16/BL6-CL4 cells (lower panel) were treated with PSIF or C-CPE-PSIF at the indicated concentration for 48 h. The cell viability (%) was measured by WST-8 assay. Data represent the mean \pm SD (n=3). *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.05$).

D. 9 Claudin-4 発現 B16 細胞の転移に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

B16/BL6-CL4 細胞の実験転移モデルマウスを用いて C-CPE-PSIF の転移がんに対する抗腫瘍効果を検証した。BALB/c マウス (雌性, 7 週齢) の尾静脈に、

1×10^6 個の B16/BL6 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を移植した。移植後、C-CPE-PSIF を $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ もしくは $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で週 3 回、尾静脈内投与した。細胞移植後 14 日目に肺への転移結節数を測定した。その結果、B16/BL6 細胞移植マウスでは観察されなかったものの、B16/BL6-CL4 細胞移植マウスでは C-CPE-PSIF $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で顕著な抗腫瘍効果が観察された (Fig. 11)。従って C-CPE-PSIF は、メラノマ細胞による転移がんに対しても有効な抗腫瘍活性を有していることが明らかとなった。

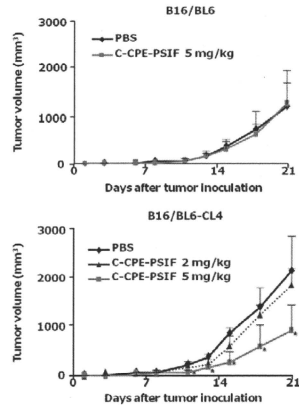


Figure 10 Anti-tumor activity of C-CPE-PSIF on B16/BL6-CL4 subcutaneously inoculated allograft. B16/BL6 (upper panel) or B16/BL6-CL4 (lower panel) cells (1×10^6 cells) were intradermally inoculated into the right flank of mice, and PBS or C-CPE-PSIF (2 or $5 \mu\text{g}/\text{kg}$) was intravenously injected three times a week. After inoculation, the tumor volume was monitored. Each point is the mean \pm SD (n=5). *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.05$).

D. 10 4T1 細胞の転移に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

前年度の検証により乳がん細胞株である 4T1 細胞による皮下担癌モデルにおいて C-CPE-PSIF が抗腫瘍効果を発揮することを明らかにしている。そこで、4T1 細胞における自然転移に対して C-CPE-PSIF が抗腫瘍効果を示すかを検討した。BALB/c マウス (雌性, 7 週齢) に、 1×10^6 個の 4T1-1 細胞を皮下移植した。移植後、C-CPE-PSIF を $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ もしくは $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で週に 3 回、尾静脈内投与した。細胞移植後 35 日目に肺への転移結節数を測定した。その結果、

C-CPE-PSIF 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与によりほぼ完全に抑制された (Fig. 12)。従って、C-CPE-PSIF は自然転移を起こすがん細胞に対しても抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。前年度の検討により C-CPE-PSIF 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与では原発巣の縮小はほとんど見られていないことから、C-CPE-PSIF の肺転移の抑制は原発巣の縮小によるものだけではなく、転移した細胞に対し作用した結果であると推察される。転移癌に対して、皮下移植腫瘍と比べてより低濃度で効果を示したことは、一般的に抗癌剤は癌が小さいほど効果を示しやすいことを反映していると考えられる。実際、C-CPE-PSIF が血中に移行した細胞に作用したのか、転移した微小な癌に作用したのかは今後の検討課題であるが、投与は 1 日おきに行ったこと、また C-CPE を尾静脈投与した際は約 24 時間で体内から消失すること (our unpublished data)、などを考慮すると、肺に転移した微小な癌に対し、C-CPE-PSIF が作用したと推察される。

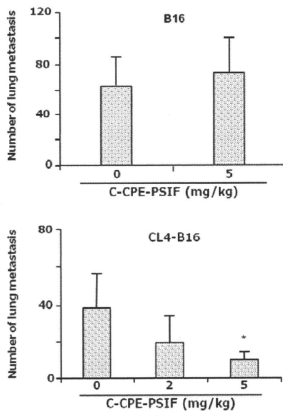


Figure 11 Anti-metastatic activity of C-CPE-PSIF on lung metastasis of B16/BL6 or B16/BL6-CL4 cells. 1×10^6 cells were injected into the tail veins of mice, and vehicle or C-CPE-PSIF (2 or 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was intravenously injected on days 0, 2, 4, 7, 9, 11, and 13. On day 14, the mice were sacrificed, their lungs were fixed, and the colonies on the lung surface were counted. Data are shown as means \pm SD (n=5). *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.05$).

D. 11 Adriamycin による抗腫瘍効果の検討

C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の程度を確かめるため、既存の抗がん剤である adriamycin (ADR) との効果をも

比較した。

抗がん剤として一般的に用いられている ADR は、がん細胞の DNA の塩基対間へ挿入し、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ、トポイソメラーゼ II 反応を阻害して、DNA、RNA 双方の生合成を抑制することにより抗腫瘍効果を示すことが知られている。一方、心筋障害、骨髄抑制、頻脈、食欲不振、悪心・嘔吐、脱毛、発熱などの副作用も知られている。

BALB/c マウス (雌性、7 週齢) に、 1×10^5 個の 4T-1 細胞を皮下移植した。移植後、ADR を 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で週に 3 回、尾静脈内投与し、投与毎に腫瘍径および体重を測定した。その結果、予想と一致して ADR は抗腫瘍効果を示した (Fig. 13A)。さらに、4T-1 細胞の肺転移も抑制した (Fig. 13B)。ADR 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群による抗腫瘍効果は C-CPE-PSIF 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群と同等であったものの、ADR 投与群のマウスでは約 26% の体重減少が確認された (Fig. 14)。一方、C-CPE-PSIF 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群のマウスでは体重減少が観察されなかった (Fig. 15)。従って、C-CPE-PSIF は低い副作用で既存の抗がん剤である ADR と同等の抗腫瘍活性を有している可能性が示唆された。

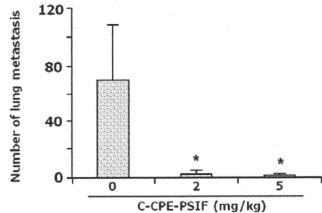


Figure 12 Anti-metastatic activity of C-CPE-PSIF on lung metastasis 4T1 cells. 1×10^5 cells were intradermally inoculated into the right flanks of mice, and C-CPE-PSIF was intravenously injected three times or two times a week at the indicated dose, respectively. On day 35, the mice were sacrificed, their lungs were stained with india ink, and the number of spontaneous metastases were determined. Data are shown as means \pm SD (n=5). *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.01$).

D. 12 3D 培養による極性崩壊組織モデルの作製

上皮組織では、がん化に伴い組織の極性が崩壊することで分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、細胞間隙に局在していた CL が局在を変え、細胞間隙以外の表面に露出することが予想される。そのため、CL リガンドを利用した新規瘍診断および治療法の開発が望まれるものの、未だ CL をターゲットとした抗がん剤の開発は皆無である。そこで、CL をターゲットとした癌治療戦略の有用性を検討するため、上皮細胞の 3 次元(3D)培養法により形成した極性崩壊上皮組織に対し、本ストラテジーが有効であるかどうかを検討する。そのために、まずイヌ腎臓上皮細胞である MDCK 細胞の 3D 培養による *in vitro* 組織形成モデル系を構築した。

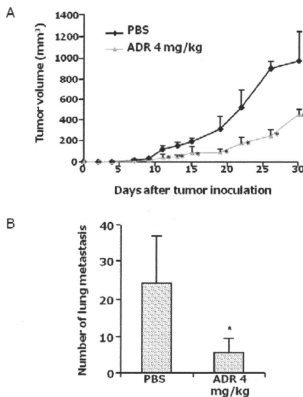


Figure 13 Anti-tumor activity and anti-metastatic activity of ADR on 4T1 cells.
4T1 cells (1×10^6 cells) were intradermally inoculated into the right flanks of mice, and ADR was intravenously injected three times or two times a week at the indicated dose, respectively. Tumor volume (A) were monitored. On day 35, the mice were sacrificed, their lungs were stained with India ink, and the number of spontaneous metastases were determined (B). Data are shown as means \pm SD (n=5). *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.01$).

組織極性を崩壊させるがん遺伝子として、活性型の Pak 遺伝子を2種類(MoPak, hPak1L107F)及び活性型 Ras 遺伝子2種類(KRasV12, HRasV12)を MDCK 細胞に導入した。続いて、遺伝子が導入された細胞を薬剤により選別し、安定的に各遺伝子が発現した細胞を作成した。その後、マトリゲル上にこれら4種類の MDCK 細胞 (MDCK/MoPak, MDCK/hPakL107F, MDCK/KRasV12, MDCK/HRasV12)を播種し、14日間培養し

た後に形態を観察した(Fig. 16)。その結果、コントロールの MDCK/vector 細胞では MDCK が形成する上皮組織様の形態が観察された。一方、MDCK/MoPak 細胞では極性が崩壊した組織構造を示した。また、MDCK/hPakL107F 細胞は一部極性が崩壊した構造を示したものの、正常組織と同様な組織構造を示した。MDCK/KRasV12 細胞ではコントロールの MDCK/vector 細胞が示す球状の構造を示さず、シート上に増殖した。また、MDCK/HRasV12 も同様に、球状の構造を示さない程、組織構造が崩壊していた(Data not shown)。

以上、極性が崩壊した MDCK 細胞を比較した結果、MDCK/MoPak 細胞が実際のがん組織で観察される極性崩壊像に近いことから、極性崩壊モデル細胞として利用することにした。

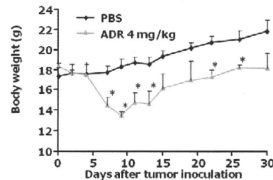


Figure 14 Monitoring of side effect of ADR on mice inoculated with 4T1 cells.
4T1 cells (1×10^6 cells) were intradermally inoculated into the right flanks of mice, and ADR was intravenously injected three times or two times a week at the indicated dose, respectively. Body weight were monitored. Data are shown as means \pm SD (n=5). *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.01$).

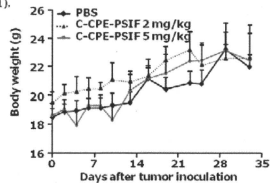


Figure 15 Monitoring of side effect of C-CPE-PSIF on mice inoculated with 4T1 cells.
4T1 cells (1×10^6 cells) were intradermally inoculated into the right flanks of mice, and C-CPE-PSIF was intravenously injected three times or two times a week at the indicated dose, respectively. Body weight were monitored. Data are shown as means \pm SD (n=5). *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.01$).

D. 13 新規 CL binder の創製

C-CPE を prototype として用いることで、C-CPE に比して 20 倍以上の CL-4 結合性を有する CPE22、CL-1 および CL-4 に結合性を有する m19 などの創製に成功した。尚、特許出願の可能性があるので、データの詳細は割愛した。

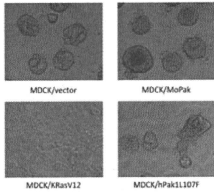


Figure 16 *In vitro* tissue structures of MDCK cells expressed various oncogenes in 3D culture. MoPak, hPak1107F and KrasV12 were transfected in MDCK cells, and the effects on the morphogenesis of the cells in matrigel were observed under microscopy after 14 days in 3D culture.

E. 結論

1. CL-4 の発現によりマウスメラノーマ細胞である B16/BL6 細胞の足場非依存的増殖能が亢進した。
2. CL-1 の発現によりマウスメラノーマ細胞である B16/BL6 細胞の足場非依存的増殖能、移動能、浸潤能、転移能が亢進した。
3. CL 発現が関与するがん転移には TNF- α 、MMP-2、TGF- β 、VEGF-A の発現変動が関与している可能性が明らかとなった。
4. CL 指向性 C-CPE-PSIF はマウスメラノーマ細胞である B16/CL-4 細胞が形成する腫瘍形成を抑制したことから、前年度の結果を踏まえて C-CPE-PSIF は様々ながん細胞に対し抗腫瘍効果を発揮できることが明らかとなった。
5. C-CPE-PSIF は B16/CL-4 および 4T1 細胞によるがん転移を抑制したことから、転移がんににおいても有用な抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。
6. C-CPE-PSIF は既存の抗がん剤である adriamycin と

同等の抗腫瘍効果を有している上に、副作用が少ない可能性が示唆された。

7. MDCK 細胞を用いた 3D 培養による極性崩壊モデルの作製に成功した。

8. C-CPE に比して優れた CL 結合性を有する C-CPE 変異体を複数取得した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

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

Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K (2010) Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl₄-Induced Liver Injury. *Biol Pharm Bull*, **33**, 983-987.

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

Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T, Yagi K (2010) Mucosal Vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials*, **31**, 5463-5471.

Yagi K, Kawase M, Isoda K, Kondoh M (2010) Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function. *YAKUGAKU ZASSHI*, **130**,

537-543.

Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H, 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.

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

Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H (2010) Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vector. *J Control Rel*, 142, 4331-4337.

Saeki R, Kondoh M, Uchida H, Yagi K (2010) Potency of Claudin-targeting as Antitumor Therapy. *Mol Cell Pharmacol*, 2, 47-51.

Kondoh M, Saeki R, Kakutani H, Hamakubo T, Watari A, and Yagi K (2010) Preparation of a claudin-4-targeted anti-tumor molecule. *FASEB J*, 24, 964.3.

Suzuki H, Kondoh M, Kakutani H, Hamakubo T, Watari A, and Yagi, K (2010) Development of a novel nasal vaccine using a claudin-4 binder. *FASEB J*, 24, 773.4.

近藤 昌夫 (2010) 生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究 *薬剂学*, 70, 309-313.

G-2 学会発表

渡利彰浩, 近藤昌夫, 八木清仁: Claudin 発現の迅速かつ簡便なモニタリングシステムの開発 日本薬学会

第130年会、平成 22 年 3 月、岡山

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

渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁; 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 第 131 年会 日本薬学会、平成 23 年 3 月、静岡

松久幸司、佐伯理恵、角谷秀樹、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin-4 を標的とした癌ターゲティング法の開発 日本薬剤学会第 25 年会、平成 22 年 5 月、徳島

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

各務洋平、内田博司、花田雄志、高橋梓、山浦利章、松久幸司、近藤昌夫、八木清仁; 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 日本薬剤学会第 25 年会、平成 22 年 5 月、徳島

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

松久幸司、内田博司、花田雄志、高橋梓、各務洋平、近藤昌夫、八木清仁; 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 第 26 回日本 DDS 学会学術集会、平成 22 年 6 月、大阪

高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Clostridium perfringens enterotoxin を利用した claudin-1 binder の創製 第 26 回日本 DDS 学会、平成 22 年 6 月、大阪

高橋梓、松久幸司、各務洋平、内田博司、花田雄志、

近藤昌夫、八木清仁; Clostridium perfringens enterotoxin を利用した非侵襲性投与方法の開発 第 57 回トキシシンポジウム、平成 22 年 7 月、滋賀

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

各務洋平、内田博司、花田雄志、高橋梓、近藤昌夫、八木清仁; 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 BIA symposium 2010、平成 22 年 7 月、東京

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

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; Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発 第 9 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム 2010、平成 22 年 10 月、京都

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A claudin modulator as a mucosal absorption-enhancer of a peptide drug 日本薬物動態学会第 25 回年会、平成 22 年 10 月、東京

鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin-4 binder を標的とした新規粘膜ワクチンの創製 日本ワクチン学会第 14 年会、平成 22 年 12 月、東京

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; Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発 第 83 回日本生化学会大会、平成 22 年 12 月、神戸

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; 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 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

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; 新規 claudin binder C-GPEm19 の機能ドメイン解析 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

山根誠司、鈴木英彦、角谷秀樹、高橋梓、松久幸司、内田博司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; 新規 claudin binder の創製と粘膜ワクチンへの応用 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

高橋梓、近藤昌夫、八木清仁; Claudin binder を利用した創薬基盤研究 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

近藤昌夫、八木清仁; Claudin modulator を利用した粘膜吸収促進法の現状と課題; 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. Experimental Biology 2010, Apr 24-28, Anaheim, CA, USA.

Hidehiko Suzuki, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Development of a novel nasal vaccine using a claudin-4 binder, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA.

Masuo Kondoh, Rie Saeki, Hideki Kakutani, Yasuhiro Mochizuki, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Preparation of a claudin-4-targeted anti-tumor

molecule. Experimental Biology 2010, Apr 24–28, 2010, Anaheim, CA, USA.

該当なし

Hiroshi Uchida, Masuo Kondoh, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of peptide. Experimental Biology 2010, Apr 24–28, 2010, Anaheim, CA, USA.

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

Hidehiko Suzuki, Rie Saeki, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A novel strategy for cancer-targeting using claudin-4 binder. 37th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 10–14, 2010, Portland, OR, USA.

I. 研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科

渡利 彰浩

松久幸司

鈴木英彦

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a Mucosal Vaccine Using a Claudin-4 Binder. FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov 14–18, 2010, Louisiana, USA.

帝京大学薬学部

平田圭一

小田雄介

宇留賀仁史

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a non-invasive drug delivery system using a claudin modulator. FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov 14–18, 2010, Louisiana, USA.

医薬基盤研究所

井上雅己

有田修平

古屋剛

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of mucosal vaccine using a claudin binder. 50th annual meeting of the American society for cell biology, Dec 11–15, Philadelphia, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得