

遺伝子を安定的に発現させた細胞株を複数単離し、claudin-4 の発現変化をモニター可能な細胞株の選別に成功した。

これらの細胞株が食物アレルギーリスク評価系として機能するかどうかを確認するため、現在既に利用されている食品添加物の中から 88 種類の食品添加物 (Fig. 1) を選び、これらの食品添加物の中から食物アレルギー誘発候補物質のスクリーニングを行った。

最初に各種食品添加物の毒性濃度の検討を行った。昨年度作成した claudin-4 レポーター遺伝子を安定的に発現させた細胞株である MPCP #35 に各種濃度の食品添加物を添加し、24 時間後の細胞毒性について検討することにより、MPCP #35 に対する各種食品添加物の毒性濃度を明らかにした (Fig. 2)。

D.11 Claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の選定

現在のところ、腸管粘膜上皮細胞層におけるバリア機能の評価系は、単層膜にヒト腸管上皮細胞 Caco-2 を播種し、膜電気抵抗値を測定する系しか存在しない。本系は、細胞を播種後、2 週間程度培養する必要があること、アッセイ系に使用できる培養プレートは 24 well しかないことから、利便性が低く、スループット性に乏しい評価系である。そこで本研究では、TJ の本体である claudin の発現に着目し、claudin レポーター遺伝子を利用することで、迅速かつ簡便な TJ バリア機能の評価系構築を試みた。

昨年度までに、claudin-4 の発現とよく関連した claudin-4 レポーター活性をもつ claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株を 4 株 (MPCP #1、MPCP #8、MPCP #35、MPCP #b-24) 単離することに成功している。これらの細胞株の中からスクリーニングに用いる細胞株を選別するために、スクリーニング用の食品添加物の中から 25 種類を用い、4 株すべてにおいてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、MPCP #1, 8, 35 は各食品添加物間で比較的同様な活性変化を示した。一方、MPCP #b-24 はあまり活性変化が観察されなかった (Fig. 3)。

昨年度の検討から、MPCP #b-24 は snail、HRasV12 といった claudin-4 の発現変化を誘導する遺伝子、

TGF- β 、EGF といった claudin-4 の発現調節を行うサイトカインが誘導する発現変化と関連したレポーター活性を示すことが明らかとなっているが、MPCP #b-24 は他の 3 株と比較して既にルシフェラーゼ活性の高い細胞株である。本結果と併せて考えると MPCP #b-24 はルシフェラーゼ活性を上昇させる物質など、claudin-4 の発現に影響する多様な物質のスクリーニングには適さないと想定された。

MPCP #1, 8, 35 は各食品添加物に対して同様なレポーター活性を示し、ルシフェラーゼ活性が MPCP #b-24 ほど高くないことから、ルシフェラーゼ活性を上昇させる物質および低下させる物質の両方の同定が可能であると考えられた。中でも MPCP #35 は比較的レポーター活性が高く、細胞増殖能が高かったので以降のスクリーニングに用いることにした。

D.12 Claudin-4 レポーター活性に影響を及ぼす食品添加物の同定

MPCP #35 を用い、88 種類の食品添加物の中からレポーター活性に影響を与える物質のスクリーニング (1st スクリーニング) を行った。その結果、各食品添加物において様々なレポーター活性の変動が観察された (Fig. 4)。中でも、ルシフェラーゼ活性を 1.5 倍以上に上昇させる食品添加物として、14. Sodium carbonate (炭酸ナトリウム)、21. Saccharin (サッカリン)、24. Ammonium persulfate (過硫酸アンモニウム)、29. Tartaric acid (酒石酸)、30. Sodium acetate (酢酸ナトリウム)、50. Potassium metabisulfite (メタ亜硫酸カリウム)、56. Sodium methyl p-hydroxybenzoate (パラオキシ安息香酸メチルナトリウム)、57. Tocopherol (vitamin E)、60. Isoeugenol (イソオイゲノール)、70. Thiabendazole (TBZ: チアベンダゾール)、72. γ -oryzanol (オリザノール)、77. Biphenyl (DP: ジフェニル)、84. Dibenzoyl thiamine (ジベンゾイルチアミン)、85. Carotene (カロチン)、88. Curcumin (クルクミン)、ルシフェラーゼ活性 0.7 倍以下に低下させる食品添加物として、3. Potassium carbonate (炭酸カリウム)、4. Sodium chlorous (亜塩素酸ナトリウム)、6. New Coccine (赤色 102 号)、10. Potassium hydroxide (水

酸化カリウム), 12. Sodium nitrite(亜硝酸ナトリウム), 61. Allyl isosulfocyanate(イソチオシアン酸アリル), 75. Chlorophyll(クロロフィル), 76. Sodium Chondroitin Sulfate(コンドロイチン硫酸ナトリウム)を同定した。

1st スクリーニングにおいてルシフェラーゼ活性の変動を誘導した食品添加物に関して、2nd スクリーニングを行った。2nd スクリーニングでは、新たに食品添加物を調製し直し、濃度を振ってルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、1st スクリーニングと同様なルシフェラーゼ活性を低下させる食品添加物として、3. Potassium carbonate(炭酸カリウム)、ルシフェラーゼ活性を上昇させる食品添加物として、21. Saccharin(サッカリン), 24. Ammonium persulfate(過硫酸アンモニウム), 50. Potassium metabisulfite(メタ重亜硫酸カリウム), 56. Sodium methyl p-hydroxybenzoate(パラオキシ安息香酸メチルナトリウム), 57. Tocopherol(vitamin E), 61. Allyl isosulfocyanate(イソチオシアン酸アリル), 70. Thiabendazole (TBZ: チアベンダゾール), 85. Carotene(カロテン), 88. Curcumin(クルクミン)を同定した(Fig. 5)。

続いて、食品添加物における時間依存的なルシフェラーゼ活性への影響を検討するため、88 種類の食品添加物を添加した培地で 12 時間および 48 時間培養した際のルシフェラーゼ活性を測定した。まず、12 時間培養ルシフェラーゼ活性に影響を与えた食品添加物として、19. Dibutylhydroxytoluene(ジブチルヒドロキシトルエン: BHT), 56. Sodium methyl p-hydroxybenzoate(パラオキシ安息香酸メチルナトリウム), 70. Thiabendazole(TBZ: チアベンダゾール), 84. Dibenzoyl thiamine(ジベンゾイルチアミン), 85. Carotene(カロテン)がルシフェラーゼ活性を 1.5 倍以上に上昇させた(Fig. 6)。一方、12 時間の培養においてルシフェラーゼ活性を 0.7 倍以下に低下させる食品添加物は、細胞死が確認された 22. L-Ascorbyl Palmitate(アスコルビン酸パルミチン酸エステル)のみであった。次に、48 時間の培養によりルシフェラーゼ活性に影響を与えた食品添加物として、20. Allyl isothiocyanate(アリルイソチオシアネ

ート), 24. Ammonium persulfate(過硫酸アンモニウム), 50. Potassium metabisulfite(メタ重亜硫酸カリウム), 61. Allyl isosulfocyanate(イソチオシアン酸アリル), 70. Thiabendazole(TBZ: チアベンダゾール), 84. Dibenzoyl thiamine(ジベンゾイルチアミン), 85. Carotene(カロテン), 88. Curcumin(クルクミン)がルシフェラーゼ活性を 1.5 倍以上に上昇させた(Fig. 7)。一方、12 時間の培養においてルシフェラーゼ活性を 0.7 倍以下に低下させる食品添加物は、細胞死が確認された 22. L-Ascorbyl Palmitate(アスコルビン酸パルミチン酸エステル)のみであった。

以上の結果、既存の食品添加物には claudin-4 の発現に影響を与えると想定されるものが複数存在することが分かった。これらの食品添加物は、時間に依存してルシフェラーゼ活性を変動させているが、中には 12 時間において既にルシフェラーゼ活性に影響を与え、24, 48 と持続して活性に影響を与えるもの(Thiabendazole, Carotene, Curcumin)もあった。時間依存的にルシフェラーゼ活性への影響が異なったことから、さらに早い段階での検討(6 時間後)など、時間を振って検討を行えば、さらなる安全性情報が得られると考えられる。

D.13 各種食品添加物による claudin-4 遺伝子発現への影響に関する検討

D.12 において同定した食品添加物が、実際の claudin-4 発現を調節しているかを確認するため、RT-PCR 法により claudin-4 への発現影響を検討した。各種食品添加物(5 mM Potassium carbonate, 1 mM Saccharin, 1 mM Ammonium persulfate, 1 mM Potassium metabisulfite, 1 mM Sodium methyl p-hydroxybenzoate, 0.01 % Tocopherol, 0.01 % Allyl isosulfocyanate, 0.05 mM Thiabendazole, 0.2 mM Carotene, 0.01 mM Curcumin)を作用させ、24 時間後の claudin-4 mRNA の発現を RT-PCR により調べた。その結果、potassium carbonate (5 mM)において luciferase 活性低下と関連した claudin-4 の発現低下傾向が観察された。また、thiabendazol (0.1mM)、carotene (0.2 mM)、curcumin (0.01 mM)においても

luciferase 活性と関連した claudin-4 の発現上昇が観察された (Fig. 8)。

以上の結果から、今回新たに作製した claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株を用いた claudin-4 発現モニタリングシステムは、実際の claudin-4 発現をモニター可能なシステムであることが明らかとなった。

D.14 各種食品添加物による claudin-4 タンパク質発現への影響に関する検討

Claudin-4 mRNA の発現に影響を与えた食品添加物等について、claudin-4 のタンパク質発現にも影響を与えるかどうか検討した。各種食品添加物 (5 mM Potassium carbonate, 1 mM Ammonium persulfate, 0.01 % Allyl isosulfocyanate, 0.001 % Allyl isosulfocyanate, 0.1 mM Thiabendazole, 0.01 mM Thiabendazole, 0.2 mM Carotene, 0.02 mM Carotene, 0.01 mM Curcumin, 5 mM Sodium butyrate, 1 mM Sodium butyrate) を作用させ、48 時間後の claudin-4 タンパク質の発現をウエスタンブロット法により調べた。Sodium butyrate は positive control として用いた。その結果、5 mM potassium carbonate においてルシフェラーゼ活性および mRNA 発現低下と関連した claudin-4 タンパク質の発現低下傾向が観察された。また、0.1 mM thiabendazol, 0.2 mM carotene, 0.01 mM curcumin においてもルシフェラーゼ活性と関連した claudin-4 タンパク質の発現上昇傾向が観察された (Fig. 9)。一方、1 mM Ammonium persulfate では claudin-4 mRNA の発現上昇は観察されなかったものの、タンパク質発現の上昇が観察された。以上の結果から、各種食品添加物が影響する claudin-4 遺伝子発現とほぼ関連した claudin-4 タンパク質発現の変動が観察された。

D.15 各種食品添加物による上皮バリア機能への影響に関する検討

Claudin-4 発現に影響を及ぼした食品添加物に関して、TJ バリア機能への関与を検討するため、TJ バリア機能の指標である膜電気抵抗値 (transcellular electrical resistance ; TER) を測定した。この方法は、

単層膜にヒト腸管上皮細胞 Caco-2 を播種し、Caco-2 が形成する TJ バリア機能を TER により評価するものである。これまでの検討により claudin-4 modulator として同定した potassium carbonate、thiabendazol、carotene、curcumin について、Caco-2 が形成する TJ バリア機能への影響を TER 測定により検討した。その結果、claudin-4 の発現減少を誘導する potassium carbonate (10 mM) を 48 時間作用させると、Caco-2 細胞の TJ バリア機能がコントロールと比較して 0.71 倍減少した (Fig. 10)。一方、claudin-4 の発現亢進を誘導する、thiabendazol (0.05 mM)、carotene (0.2 mM)、curcumin (0.01 mM) を 48 時間作用させると、TJ バリア機能がコントロールと比較してそれぞれ 1.5、1.24、1.34 倍増強した (Fig. 11)。以上の結果から、本スクリーニング系において同定した食品添加物は、TJ バリア機能を変化させる作用を示すことが明らかとなった。

本研究で作製した claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株を用いた迅速・簡便な claudin-4 発現モニタリングシステムは、実際の claudin-4 の発現をモニター可能であり、さらに本システムにより同定した食品添加物は、腸管上皮細胞の TJ バリア機能に影響を与えることが明らかとなった。以上の結果から、本 claudin-4 発現モニタリングシステムは食物アレルギーリスク評価系として有用なシステムと考えられる。

今回、TJ バリア機能を低下させる食品添加物として同定した potassium carbonate は、ラーメン製造時等にアルカリ剤として利用されている。従って、potassium carbonate は pH を上昇させることにより TJ バリア機能を低下させたのではないかと予想される。しかし、今回 TJ バリア低下が観察された濃度は 10 mM と高濃度時での現象のため、低濃度での利用では食物アレルギー誘発作用はないと考えられる。

また、今回 TJ バリア機能を上昇させる食品添加物として thiabendazol、carotene、curcumin を同定した。これらの食品添加物は食物アレルギーの誘発作用はなく、むしろ食物アレルギー抑制・予防作用があるのではないかと考えられる。今回使用した濃度はそれぞれ 0.05 mM、0.2 mM、0.01 mM であり、それぞれの LD50 が 2.4 g/kg、8 g/kg、2 g/kg であることから、安全

な濃度範囲で TJ バリア機能を増強できることが明らかとなった。従って、本食物アレルギーリスク評価系は食物アレルギー抑制物質の同定にも役立つのではないかと考えられる。

E. 結論

1. 食品添加物には腸管上皮細胞による TJ バリア機能に影響を与えるものが存在することを明らかにした。

2. 進化的に保存され、Snail、Smad などの転写調節領域を含んだ claudin-4 転写開始領域約 500bp をプロモーターとした、claudin-4 レポーター遺伝子を作製した。

3. Claudin-4 レポーター遺伝子は、様々な細胞株における異なった claudin-4 の発現量と相関したレポーター活性を示すことを明らかにした。

4. Claudin-4 レポーター遺伝子は、TGF- β や Snail が誘導する claudin-4 の発現低下と相関したレポーター活性を示すことを明らかにした。

5. ハイスループット性をもつ食物アレルギー評価系の構築のため、claudin-4 レポーター遺伝子を安定的に発現させた細胞株を作製し、ルシフェラーゼ活性を示す細胞株を複数単離した。

6. Claudin-4 の発現を抑制する TGF- β や Snail、亢進させる EGF や HRasV12 による claudin-4 の発現調節と相関したレポーター活性を持つ claudin-4 レポーター遺伝子安定発現細胞株を複数単離することに成功した。従って、claudin-4 の発現を迅速かつ簡便にモニターできる食物アレルギーリスク評価系のための細胞株の単離に成功した。

7. 複数ある claudin-4 レポーター遺伝子安定発現株の中から、claudin-4 発現モニタリングシステムとして有用な細胞株を決定した。

8. 作製した claudin-4 発現モニタリングシステムを用い、88 種類の食品添加物から claudin-4 の発現低下を誘導する食品添加物として potassium carbonate を同定した。

9. 作製した claudin-4 発現モニタリングシステムを用い、88 種類の食品添加物から claudin-4 の発現上昇を誘導する食品添加物として thiabendazol、carotene、curcumin を同定した。

10. Claudin-4 の発現低下を誘導する potassium carbonate は TJ バリア機能低下作用を示すことが明らかとなった。

11. Claudin-4 の発上昇を誘導する thiabendazol、carotene、curcumin は TJ バリア機能強化作用を示すことが明らかとなった。

12. 作製した claudin-4 発現モニタリングシステムにより claudin-4 の発現に影響を与えるものとして同定した食品添加物は、実際の TJ バリア機能に影響を及ぼす添加物であったことから、本モニタリングシステムは食品添加物を対象とした食物アレルギーリスク評価系と有用であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当なし

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(5):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(4):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.
- Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H and Yagi K (in press) Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm*.
- Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T and Yagi K (in press) Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials*.
- 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. *Journal of Controlled Release*, 142, 4331-4337.
- Saeki R, Kondoh M, Uchida H, Yagi K (2010) Potency of Claudin-targeting as Antitumor Therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 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 *薬剤学*, 70, 309-313.
- Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Saito Y, Yamaura T, Sakihama T, Hamakubo T, Yagi K (2011) A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS ONE*, 6, 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 (in press) A toxicological evaluation of a claudin modulator, C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, in mice. *Pharmazie*.

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

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

近藤昌夫; 生体バリアを利用した薬物送達研究 日本薬剤学会第 25 年会 平成 21 年 5 月 静岡

近藤昌夫; 生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究 第 25 回日本 DDS 学会学術集会 平成 21 年 7 月 東京

近藤昌夫、八木清仁; 生体バリアの分子基盤を利用した経粘膜 DDS 第 25 回日本 DDS 学会学術集会 平成 21 年 7 月 東京

近藤昌夫; Claudin を利用した創薬研究の可能性 彩都バイオサイエンスセミナー 平成 21 年 10 月 大阪

近藤昌夫、八木清仁; 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 創剤フォーラム 第 15 回シンポジウム 平成 21 年 10 月 東京

Koji Matsuhisa, Ryota Okude, Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi, A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator, 36rd annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 18-22, 2009, Copenhagen, Denmark.

Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada,

Kiyohito Yagi, Claudin as a target molecule for mucosal absorption of peptide drug, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA.

Toshiaki Yamaura, Azusa Takahashi, Hideki Kakutani, Masuo Kondoh, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, Development of a novel screening system for claudin binder using baculovirus display, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Takeshi Yoshida, Manabu Ojima, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, Preparation of a controllable RNA polymerase I-dependent expression vector, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、近藤昌夫、八木清仁; Claudin-4 を介した新規粘膜ワクチンの創製 日本薬学会第 130 年会 平成 22 年 3 月 岡山

松下恭平、角谷秀樹、高橋梓、山浦利章、浜窪隆雄、近藤昌夫、八木清仁; 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 日本薬学会第 130 年会 平成 22 年 3 月 岡山

各務洋平、山浦利章、松下恭平、高橋梓、内田博司、花田雄志、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; 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 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; 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 岡山 平成 22 年 3 月

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 回日本薬学会 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・バイオフィォーラム 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・バイオフィォーラム 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

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-CPEm19 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.

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.

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.

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.

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.

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

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

該当なし

I. 研究協力者

渡利 彰浩（薬学研究科 助教）

吉田猛史（薬学研究科 大学院生）

高橋梓（薬学研究科 大学院生）

松久幸司（薬学研究科 大学院生）

松下恭平（薬学研究科 大学院生）

山本芙美（薬学研究科 大学院生）

鈴木英彦（薬学研究科 大学院生）

李相儒（薬学研究科 大学院生）

物質名	毒性	使用用途
EDTA	胃腸障害、カルシウム不足症など	酸化防止剤: 缶詰、瓶詰食品など
硫酸銅	粘膜刺激、胃痛、下痢など	栄養強化剤: 粉ミルク
グルコン酸鉄	胃腸刺激・障害、肝臓障害など	着色補助剤・鉄強化剤: オリーブの実、粉ミルク
BHA(ブチルヒドロキシアニソール)	消化管出血、潰瘍形成など	酸化防止剤: パーム原料油
臭素酸カリウム	下痢、嘔吐など	小麦改良剤: パン、イーストなど
亜硫酸ナトリウム	胃腸刺激、嘔吐、下痢など	保存料・漂白剤: 天然果実、かんぴょう、水飴など
乳酸	小腸結膜炎、急性出血性胃炎など	酸味料・保存料: 酒、菓子、食肉、パンなど
シヨ糖脂肪酸エステル	胃腸障害など	乳化剤: 乳飲料、パン、マーガリン、アイスクリーム
ソルビトール	胃腸障害など	合成甘味料: カステラ、ケーキ、ハムなど

図1 アレルギー性、胃腸障害等が報告されている食品添加物

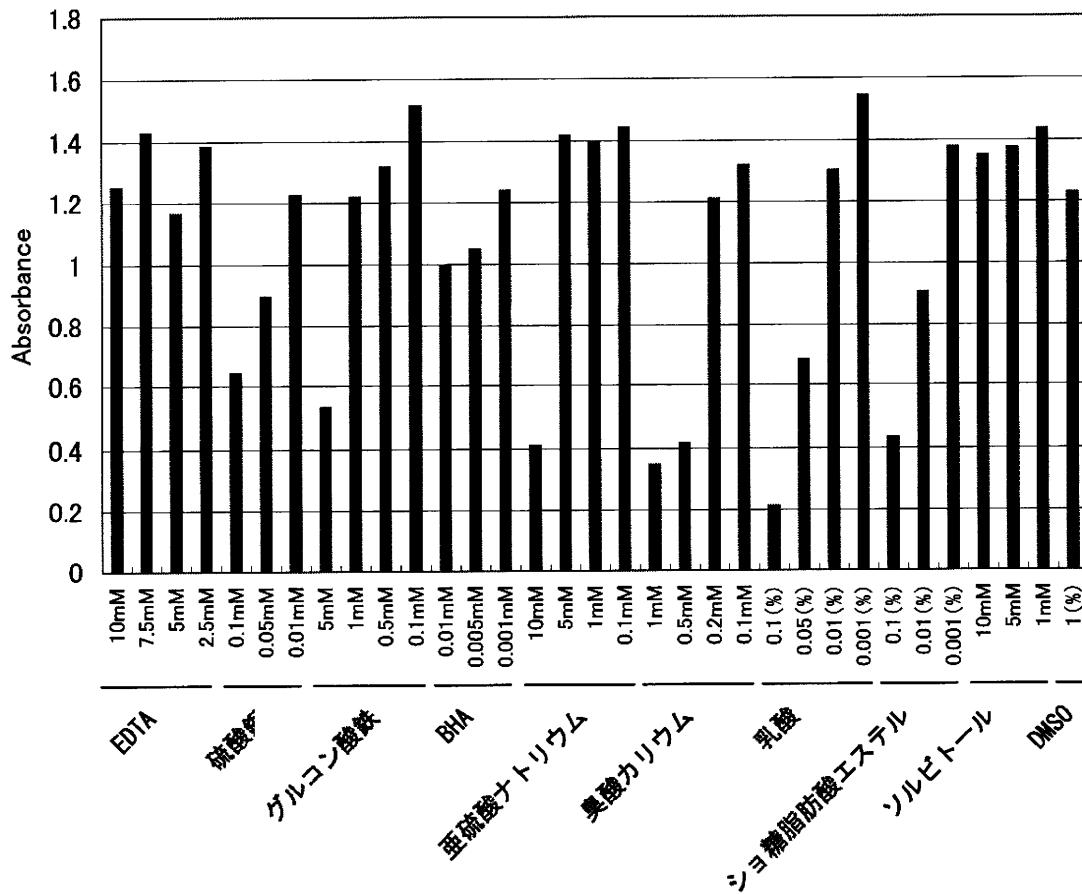


図2 各種食品添加物における細胞毒性濃度。

Caco-2細胞に各種食品添加物を加えた後、18時間培養した。培養後、WST-8を加え更に1時間培養した後、450nmの吸光度を測定した。

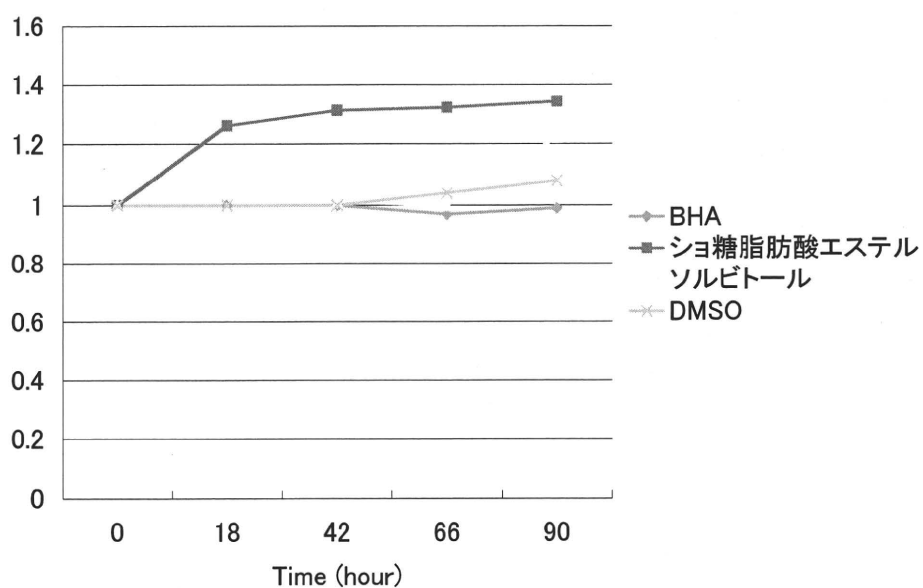
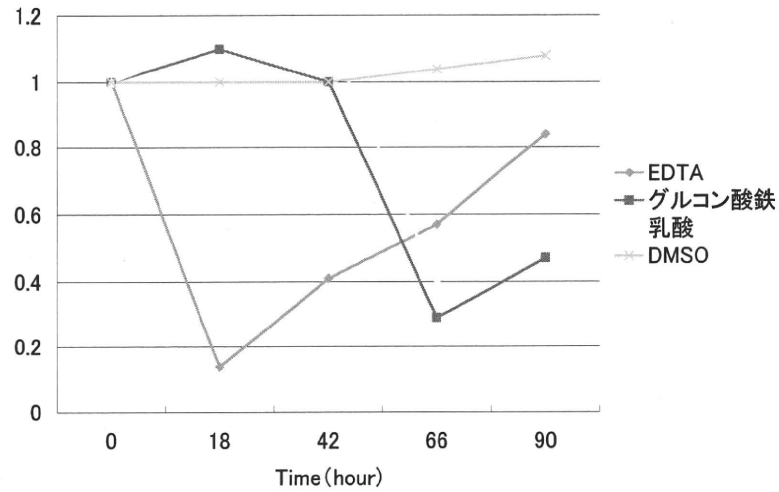


図3 BHA、シヨ糖脂肪酸エステル、ソルビトールによる TJ バリア機能への影響。
Caco-2細胞をTranswellに播種し、2週間培養した。培養後、BHA、シヨ糖脂肪酸エステル、ソルビトールを添加し、18、42、66、90時間後に 膜電気抵抗値(TER)を測定した。

A



B

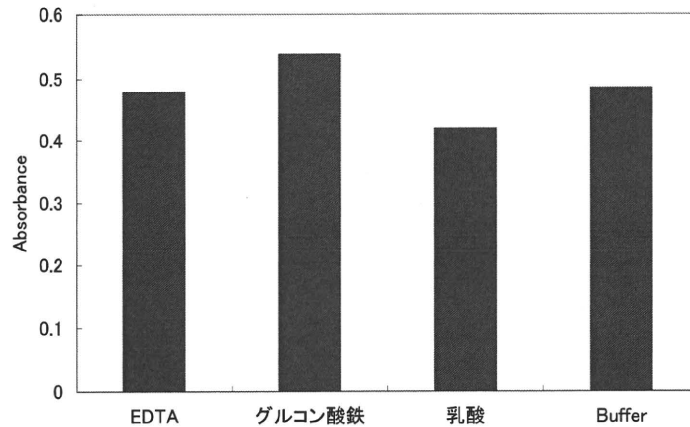


図4 EDTA、グルコン酸鉄、乳酸による TJ バリア機能への影響。

Caco-2細胞をTranswellに播種し、2週間培養した。培養後、EDTA、グルコン酸鉄、乳酸を添加し、EDTAは18時間後、グルコン酸鉄と乳酸は66時間後に洗浄、培地交換(食品添加物無し)を行い更に培養した。各食品添加物を加えた後、18、42、66、90時間後に膜電気抵抗値(TER)を測定した(A)。Caco-2細胞に食品添加物を加え、EDTAは18時間、グルコン酸鉄、乳酸は66時間培養した。培養後、WST-8を加え更に1時間培養した後、450nmの吸光度を測定した(B)。

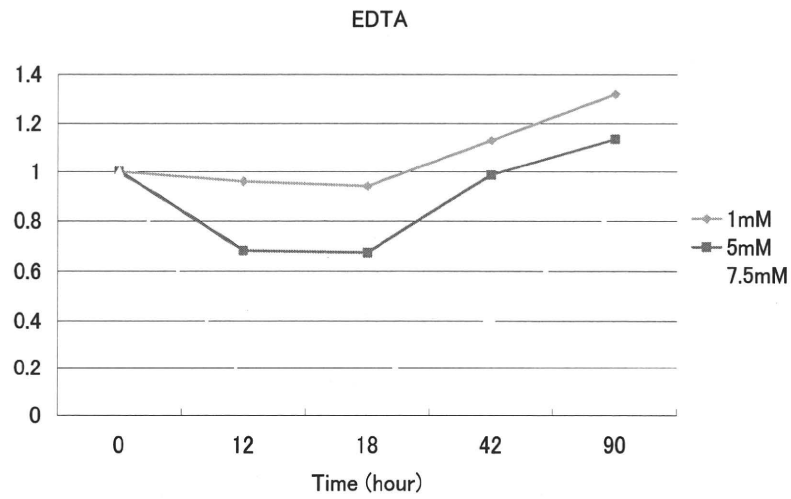
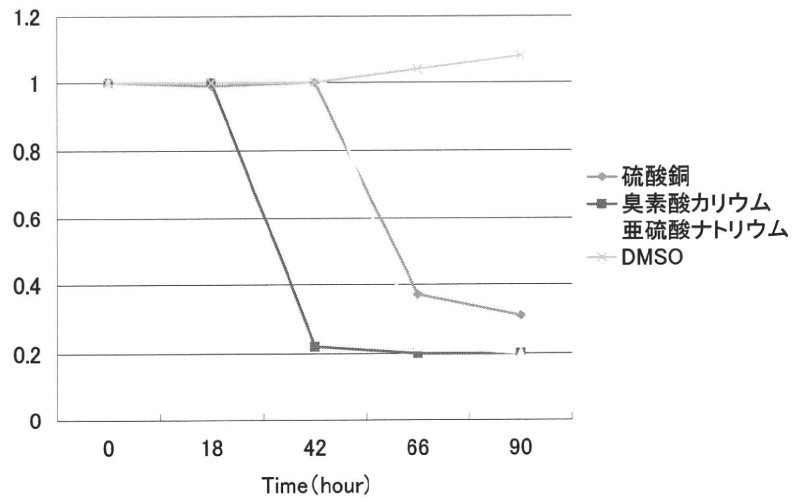


図5 EDTAの濃度依存的なTJ バリア機能への影響。

Caco-2細胞をTranswellに播種し、2週間培養した。培養後、EDTAを1、5、7.5mM添加し18時間培養した。培養後、洗浄、培地交換(EDTA無し)し更に培養した。EDTA添加後12、18、42、90時間後に膜電気抵抗値(TER)を測定した。

A



B

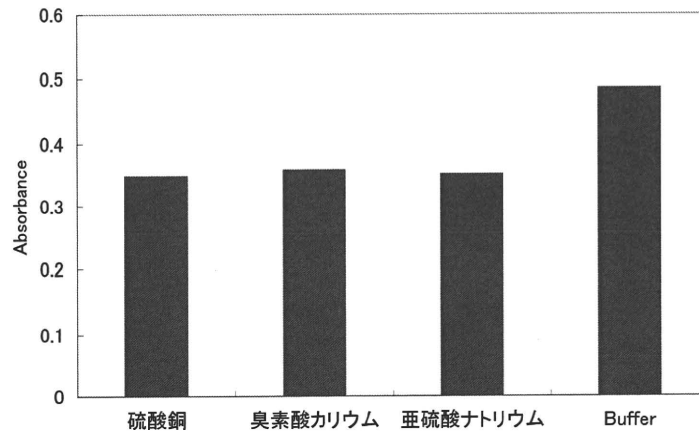


図6 硫酸銅、臭素酸カリウム、亜硫酸ナトリウムによる TJ バリア機能への影響。
 Caco-2細胞をTranswellに播種し、2週間培養した。培養後、硫酸銅、臭素酸カリウム、
 亜硫酸ナトリウムを添加し、臭素酸カリウムは42時間後、硫酸銅と亜硫酸ナトリウムは
 66時間後に洗浄、培地交換(食品添加物無し)を行い更に培養した。各食品添加物を加えた
 後、18、42、66、90時間後に膜電気抵抗値(TER)を測定した(A)。
 Caco-2細胞に食品添加物を加え、臭素酸カリウムは42時間、硫酸銅、亜硫酸ナトリウム
 は66時間培養した。培養後、WST-8を加え更に1時間培養した後、450nmの吸光度を
 測定した(B)。

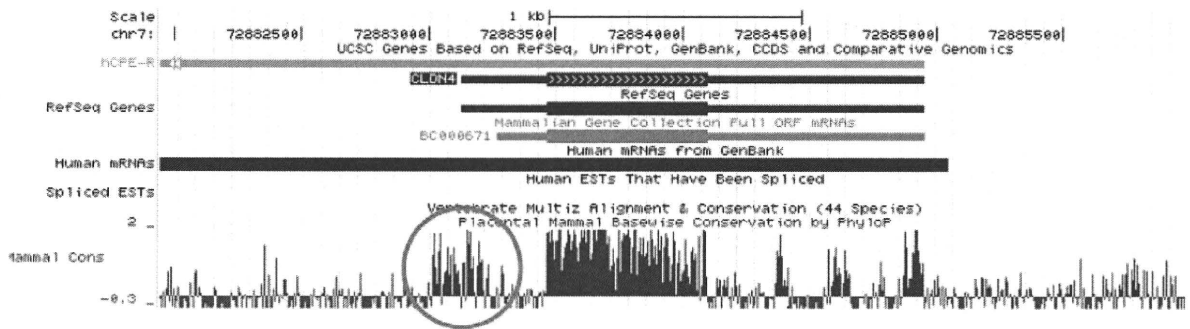


図7 UCSCプログラムによるclaudon-4ゲノム領域の解析。
赤いサークルで囲んだ場所が進化的に良く保存されたclaudin-4のプロモーター領域。

CTGGTTGCCCCCTGGCCTT AACCTGT GAACATC CAGCTG TCCCTGGGCTGTGATTCAAGTGTCT
 GTCT CCGGGT GACCTC AGCATGGGCTTTGAGGAAGGGGAGAGAGTAGTTTCTTCTGAGACT
 GGATAGTGACTCAGGGACCCGGGGCTGGGGCCTCAAAAGTGCCTTTGTTGGCCTGGGCTCA
 GGAATC CAGAG AAACTGGTC AGGAGGAGGCC CAGTGACAAAA ACCCTCCCTCTGCCCCG
 CCCCTCTGCCAGAGCCATATAACTGCTC AACCTGT CCCCAGAGAGAGAGTGCCCTGGC CAGCTG
 TCGGCTGGAAGGAACTGGTCTGCTCACACTTGCTGGCTTGCGCATCAGGACTGGCTTTATCTC
 CTGACTCACGGTGCAAAGGTGCACTCTGCGAACGTTAAGTCCGTCCCAGCGCTTGAATCC
 TACGGCCCCCACAGCCGGATCCCCTCAGCCTTCCAGGTCTCAACTCCCGTGGAC

図8 claudin-4転写調節領域におけるDNA結合モチーフ。

Claudin-4転写開始領域約500bpの塩基配列を示した。赤;E-box, 青;SEB, 緑;SP1, 紫;PPUR1

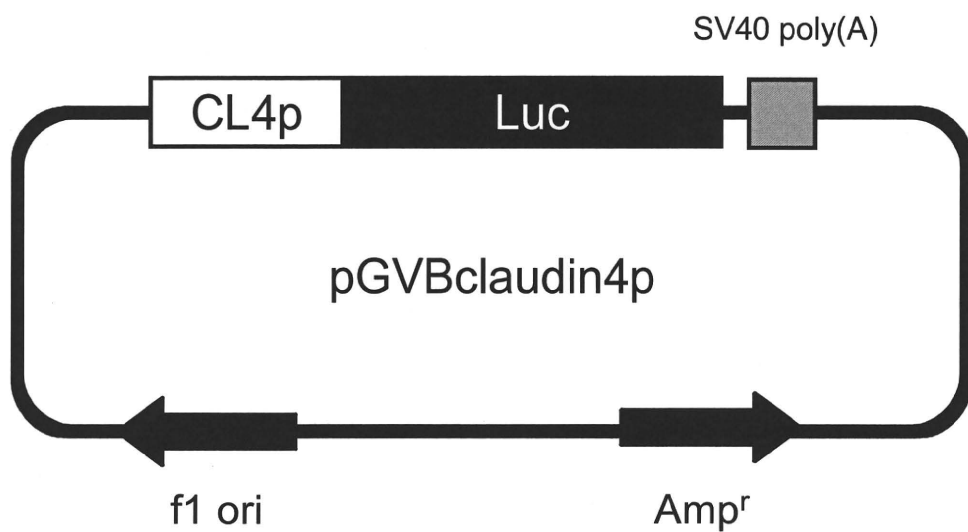
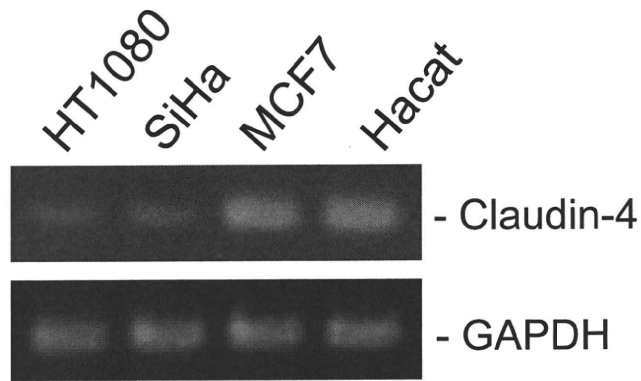


図9 Claudin-4レポーター遺伝子vector plasmidのコンストラクト。
 CL4p; claudin-4 promoter region, Luc; luciferase gene, SV40 poly(A); SV40 late poly(A) signal, f1 ori; f1 origin, Amp^r; ampicillin resistant gene

A



B

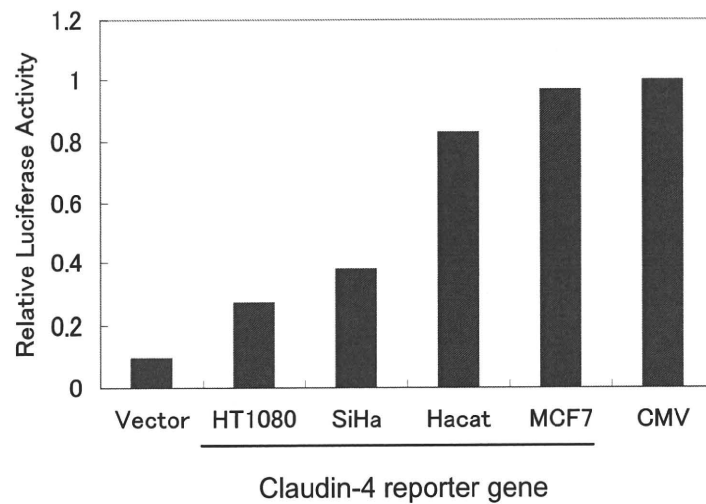
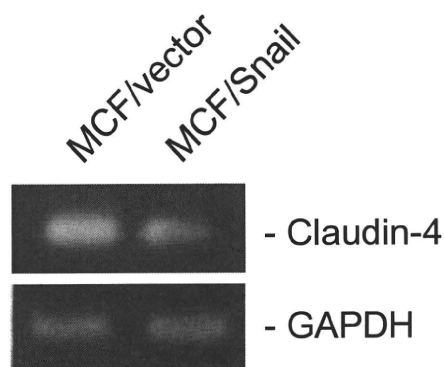


図10 Claudin-4の発現が異なる細胞株でのclaudin-4レポーター遺伝子の活性。様々な細胞株におけるclaudin-4 mRNAの発現をRT-PCRにより測定した(A)。様々な細胞株におけるclaudin-4レポーター遺伝子の活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した(B)。

A



B

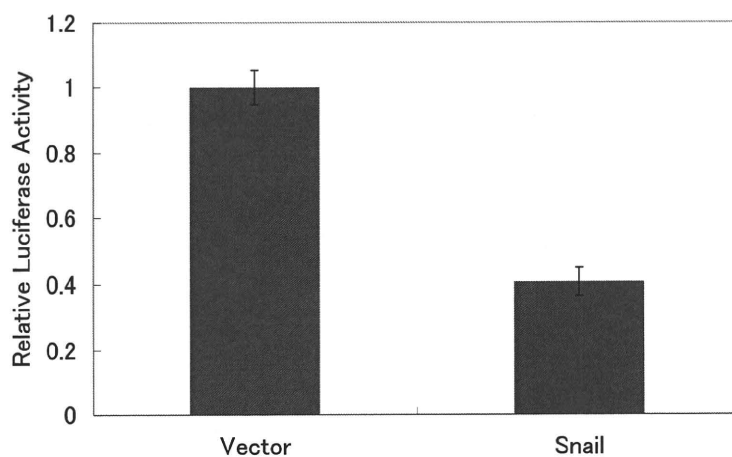


図11 Snailの発現によるclaudin-4レポーター遺伝子の活性変化。
Snailを安定的に発現させた細胞(MCF/Snail)におけるclaudin-4 mRNAの発現をRT-PCRにより測定した。内部コントロールとしてGAPDHの発現を測定した(A)。
Snailを安定的に発現させた細胞におけるclaudin-4レポーター遺伝子の活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した(B)。