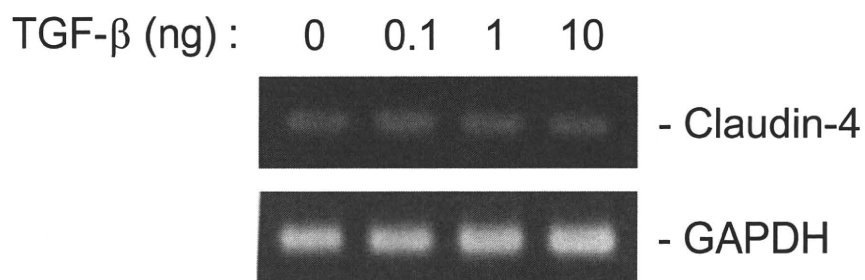


A



B

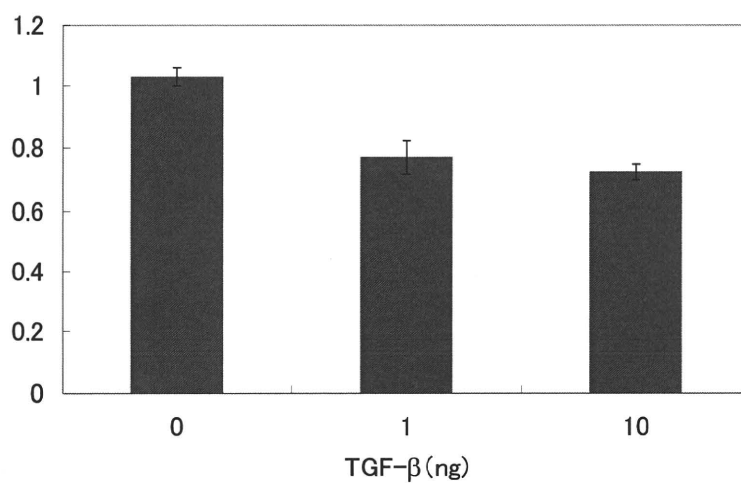
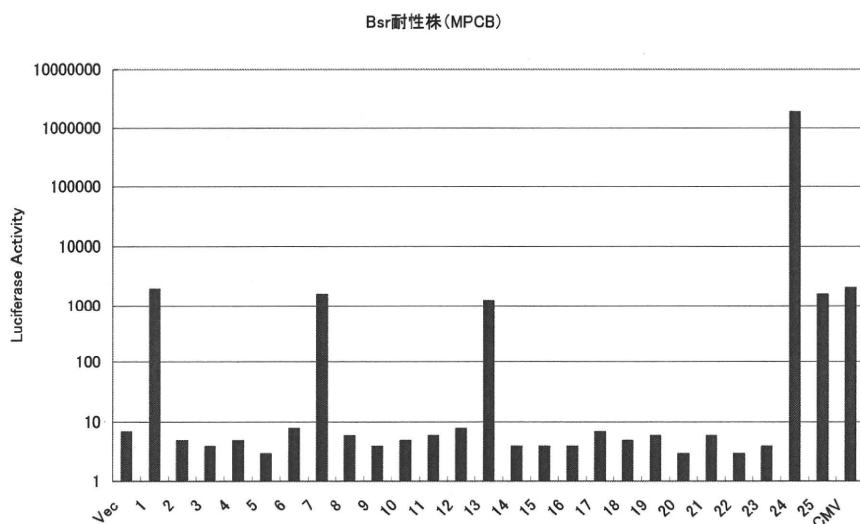


図12 TGF- $\beta$ によるclaudin-4レポーター遺伝子の活性変化。  
TGF- $\beta$ を添加し、2日後のclaudin-4 mRNAの発現をRT-PCRにより測定した(A)。  
TGF- $\beta$ を添加し、2日後のclaudin-4レポーター遺伝子の活性をルシフェラーゼ  
アッセイにより測定した(B)。

A



B

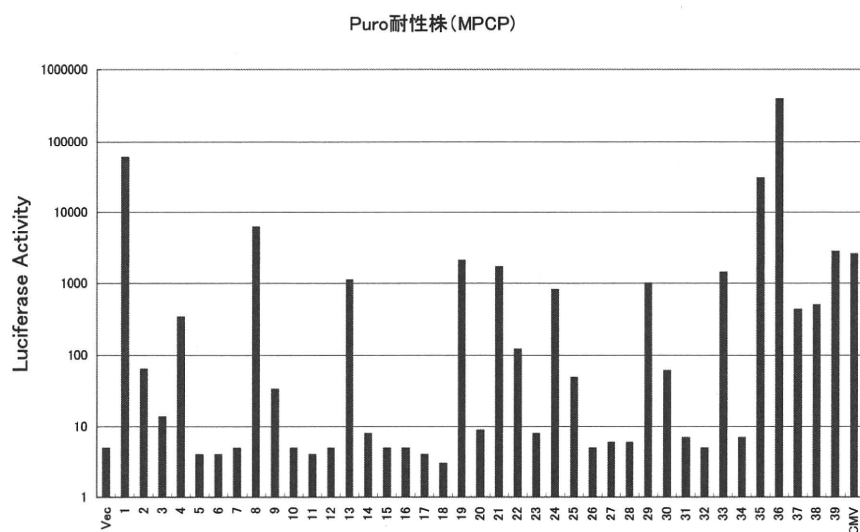


図13 Claudin-4レポーター遺伝子安定発現株におけるルシフェラーゼ活性。  
MCF7細胞にclaudin-4レポーター遺伝子とBlasticidin耐性遺伝子(A)もしくはpuromycin耐性遺伝子(B)を導入し、安定的に発現させた細胞株においてルシフェラーゼの活性を測定した。

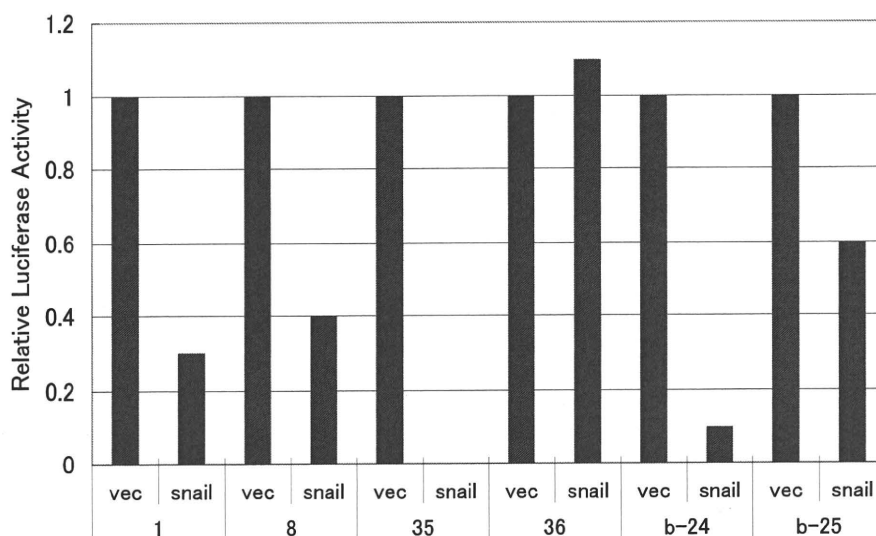
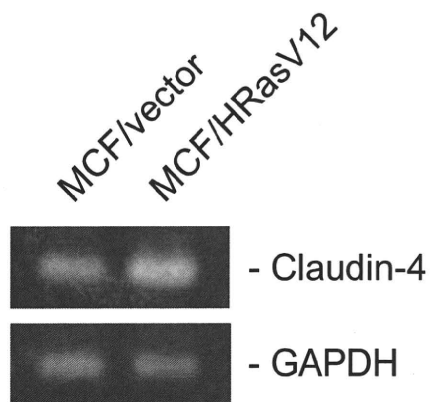


図14 Claudin-4レポーター遺伝子安定発現株でのSnail遺伝子発現によるレポーター活性の変化。Claudin-4レポーター遺伝子安定発現株にSnailを安定的に発現させた細胞株においてルシフェラーゼの活性を測定した。

A



B

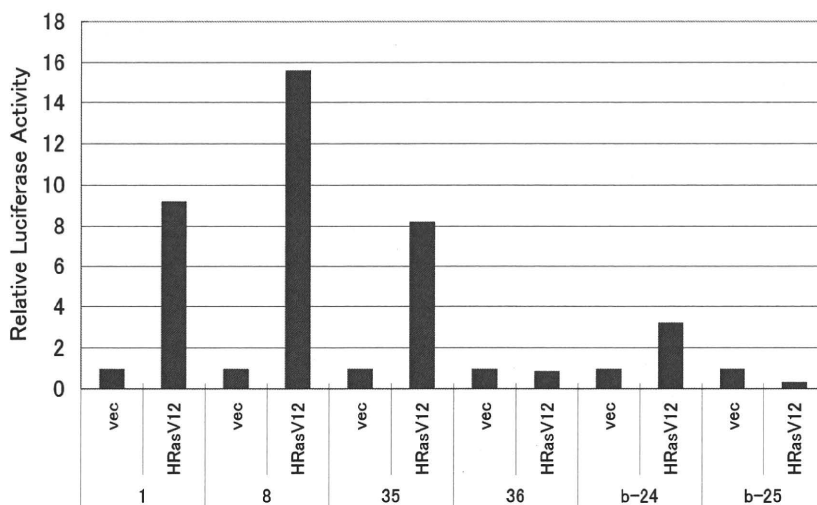


図15 Claudin-4レポーター遺伝子安定発現株でのHRasV12遺伝子発現によるレポーター活性の変化。HRasV12を安定的に発現させたMCF7細胞(MCF/HRasV12)における claudin-4 mRNAの発現をRT-PCRにより測定した。内部コントロールとしてGAPDHの発現を測定した(A)。Claudin-4レポーター遺伝子安定発現株にHRasV12を安定的に発現させた細胞株においてルシフェラーゼの活性を測定した(B)。

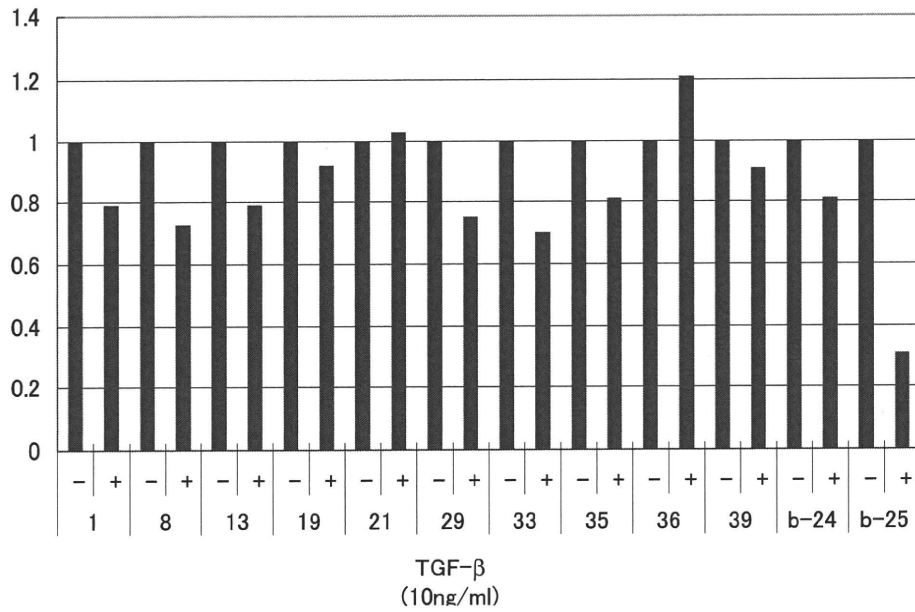


図16 Claudin-4レポーター遺伝子安定発現株でのTGF-βによるレポーター活性の変化。  
 Claudin-4レポーター遺伝子安定発現株にTGF-βを添加し、2日後のルシフェラーゼ活性を測定した。

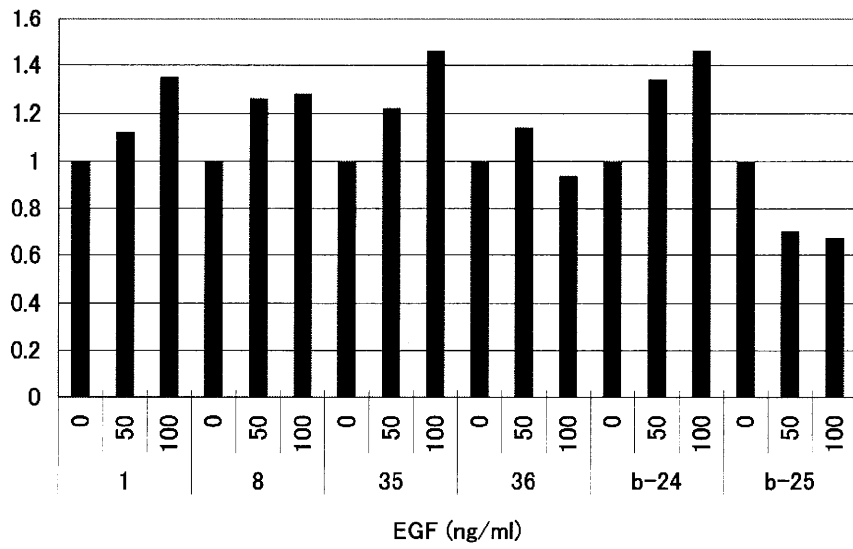
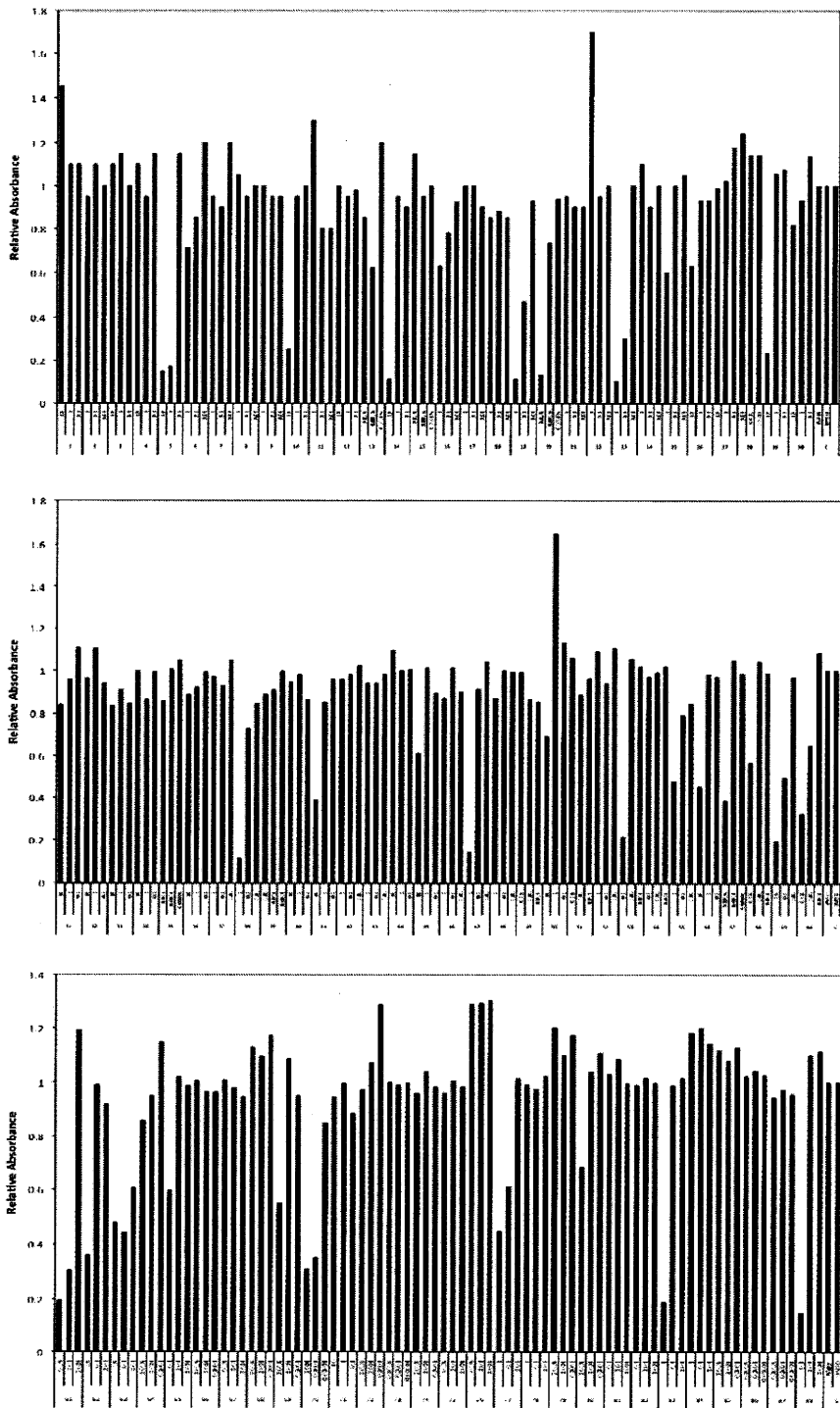


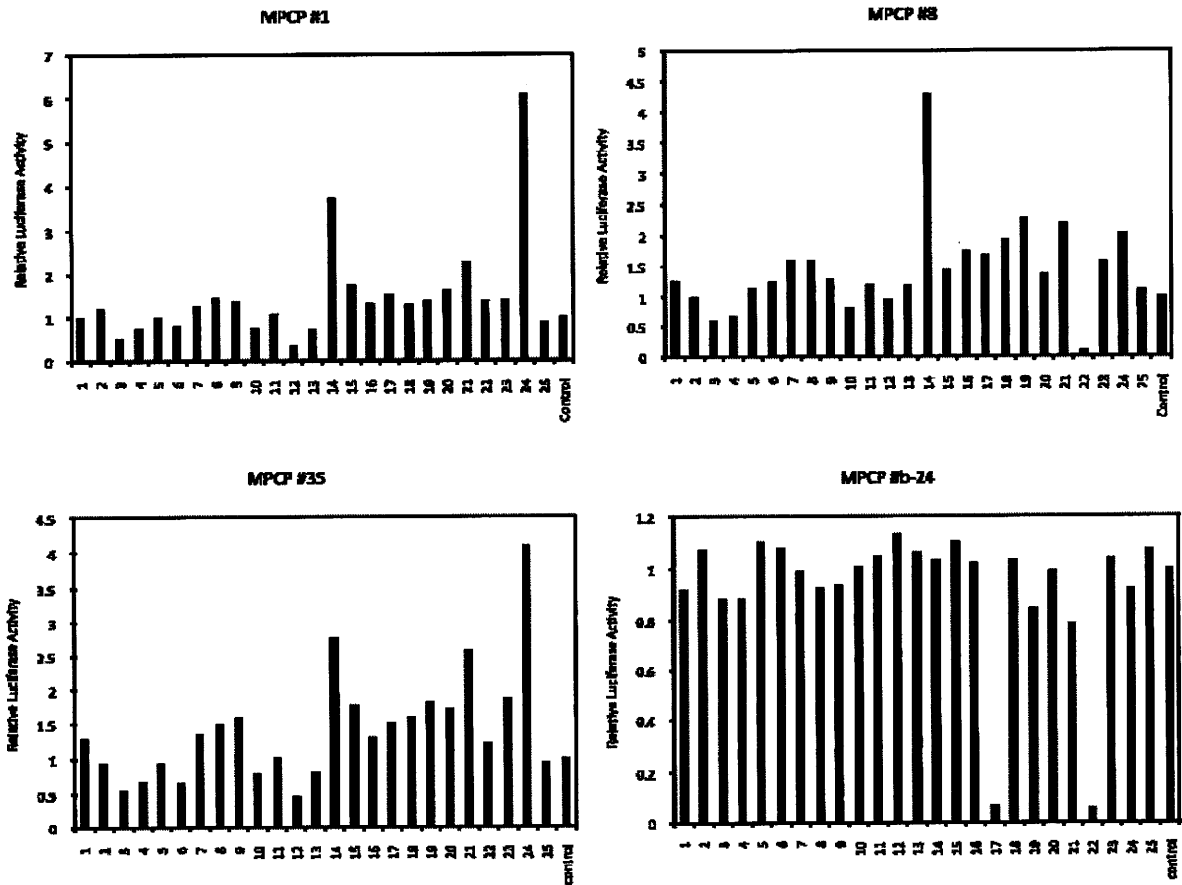
図17 Claudin-4レポーター遺伝子安定発現株でのEGFによるレポーター活性の変化。Claudin-4レポーター遺伝子安定発現株にEGFを添加し、6時間後のルシフェラーゼの活性を測定した。

サンプル番号	食品添加物名	用途	サンプル番号	食品添加物名	用途
1	Tartrazine (黄色4号)	合成着色料	51	Cochineal extract (コチニール)	合成着色料
2	Potassium nitrate (硝酸カリウム)	発色剤・発酵調整剤	52	Calcium Dihydrogen Pyrophosphate (酸性ピロリン酸カルシウム)	膨張剤・強化剤
3	Potassium carbonate (炭酸カリウム)	ラーメン製造用アルカリ剤	53	Calcium citrate (クエン酸カルシウム)	強化剤
4	Sodium chlorate (亜塩素酸ナトリウム)	漂白剤・小麦改良剤	54	Polyvinyl acetate (ポリ酢酸ビニル)	ガム基剤、皮膜剤
5	Zinc sulfate (硫酸亜鉛)	栄養強化剤	55	Fumaric Acid (フマル酸)	酸味料
6	New Coccine (赤色102号)	合成着色料	56	パライオキシ安息香酸メチルナトリウム	保存料
7	Amaranth (Bordeaux S) (赤色2号)	合成着色料	57	Tocopherol (vitamin E)	酸化防止剤
8	Allura Red AC (赤色40号)	合成着色料	58	Rennet (レンネット)	酵素剤
9	Sunset Yellow FCF (黄色6号)	合成着色料	59	Ionone (イオノン)	香料
10	potassium hydroxide (水酸化カリウム)	増粘剤	60	Isoeugenol (イソイゲノール)	香料
11	L-ascorbic acid (アスコルビン酸/ビタミンC)	栄養強化剤	61	Allyl isothiocyanate (アリルイソチオシアネート)	防腐剤
12	Sodium nitrite (亜硝酸ナトリウム)	発色剤・防腐剤	62	Propylene glycol (プロピレングリコール)	品質改良剤
13	Propionic acid (プロピオン酸)	合成保存料・防カビ剤	63	Ethyl isovalerate (イソ吉草酸エチル)	香料
14	Sodium carbonate (炭酸ナトリウム)	凝固剤・結着剤	64	Pectin (ペクチン)	増粘安定剤
15	Zinc gluconate (グルコン酸亜鉛)	栄養強化剤	65	Cysteine (システイン)	小麦品質改良剤
16	Benzoic acid (安息香酸)	保存料	66	Tragacanth gum (トラガントガム)	増粘安定剤
17	Sorbic acid (ソルビン酸)	保存料	67	Thiamin (チアミン)	乳化剤
18	Aspartame (アスパルテム)	合成甘味料	68	Gum arabic (アラビアガム)	増粘安定剤
19	Dibutylhydroxytoluene (ジブチルヒドロキシルトール)	酸化防止剤	69	Cellulose (セルロース)	増粘安定剤
20	Allyl isothiocyanate (アリルイソチオシアネート)	防腐剤	70	Thiabendazole (TBZチアベンダゾール)	防カビ剤
21	Saccharin (サッカリン)	栄養強化剤	71	Isopropyl Citrate (クエン酸イソプロピル)	酸化防止剤
22	L-Ascorbyl Palmitate (アスコルビン酸パルミチン酸エステル)	栄養強化剤	72	γ-oryzanol (オリザノール)	酸化防止剤
23	Hydroxy biphenyl	防カビ剤	73	Calcium carbonate (炭酸カルシウム)	栄養強化剤
24	Ammonium persulfate (過硫酸アンモニウム)	小麦改良剤	74	Propylene Glycol Alginate (アルギン酸プロピレングリコールエステル)	酸化防止剤・乳化安定剤
25	ミョウバン	膨張剤	75	Chlorophyll (クロロフィル)	着色料
26	L-Lysine (L-リジン)	栄養強化剤	76	Sodium Chondroitin Sulfate (コンドロイチン硫酸ナトリウム)	凝固剤
27	Calcium pantothenate (パント酸カルシウム)	栄養強化剤	77	Biphenyl (DP-ジフェニル)	防カビ剤
28	Carrageenin (カラギーナン)	増粘安定剤	78	Sodium cytidylic acid (シチジル酸ナトリウム)	調味料
29	Tartaric acid (酒石酸)	酸味料	79	Stevia rebaudiana (ステビア)	天然系糖質・乳化安定剤
30	Sodium acetate (酢酸ナトリウム)	酸味料・調味料・保存料	80	Calcium Stearoyl Lactylate (ステアリアル乳酸カルシウム)	乳化剤・凝固剤
31	Glycine (グリシン)	調味料・保存料等	81	Ferrous sulfate (硫酸第一鉄)	栄養強化剤
32	Sodium Alginate (アルギン酸ナトリウム)	結着剤・安定剤	82	Calcium sulfate (硫酸カルシウム)	凝固剤・栄養強化剤
33	Ammonium chloride (塩化アンモニウム)	膨張剤	83	Benzoyl peroxide (過酸化ベンゾイル)	小麦改良剤
34	Magnesium sulfate (硫酸マグネシウム)	凝固剤	84	Dibenzoyl thiamine (ジベンゾイルチアミン)	栄養強化剤
35	5-ribose nucleotide (リボヌクレオチドナトリウム)	核酸系科学調味料	85	Carotene (カロチン)	着色料・栄養強化剤
36	Calcium chloride (塩化カルシウム)	凝固剤	86	Guar Gum (グアーガム)	増粘安定剤
37	Valine (バリン)	香料	87	Xanthan gum (キサンタンガム)	増粘安定剤
38	Erythrosine (赤色3号)	合成着色料	88	Curcumin (クルクミン)	着色料
39	Annatto (アナー)	合成着色料	86	Guar Gum (グアーガム)	増粘安定剤
40	Maltitol (マルチトール)	合成甘味料	87	Xanthan gum (キサンタンガム)	増粘安定剤
41	Sodium Dehydroacetate (デヒドロ酢酸ナトリウム)	保存料	88	Curcumin (クルクミン)	着色料
42	Nicotinic acid (ニコチン酸)	強化剤			
43	Isoleucine (イソロイシン)	栄養強化剤			
44	Mannitol (マンニトール)	合成甘味料			
45	Vitamin C (ascorbic acid)	栄養強化剤			
46	Phenylalanine (フェニルアラニン)	合成甘味料			
47	Gallic acid (没食子酸)	酸化防止剤			
48	Erythorbic acid (エリソルビン酸)	酸化防止剤			
49	Magnesium chloride (塩化マグネシウム)	凝固剤			
50	Potassium metabisulfite (メタ亜亜硫酸カリウム)	漂白剤			

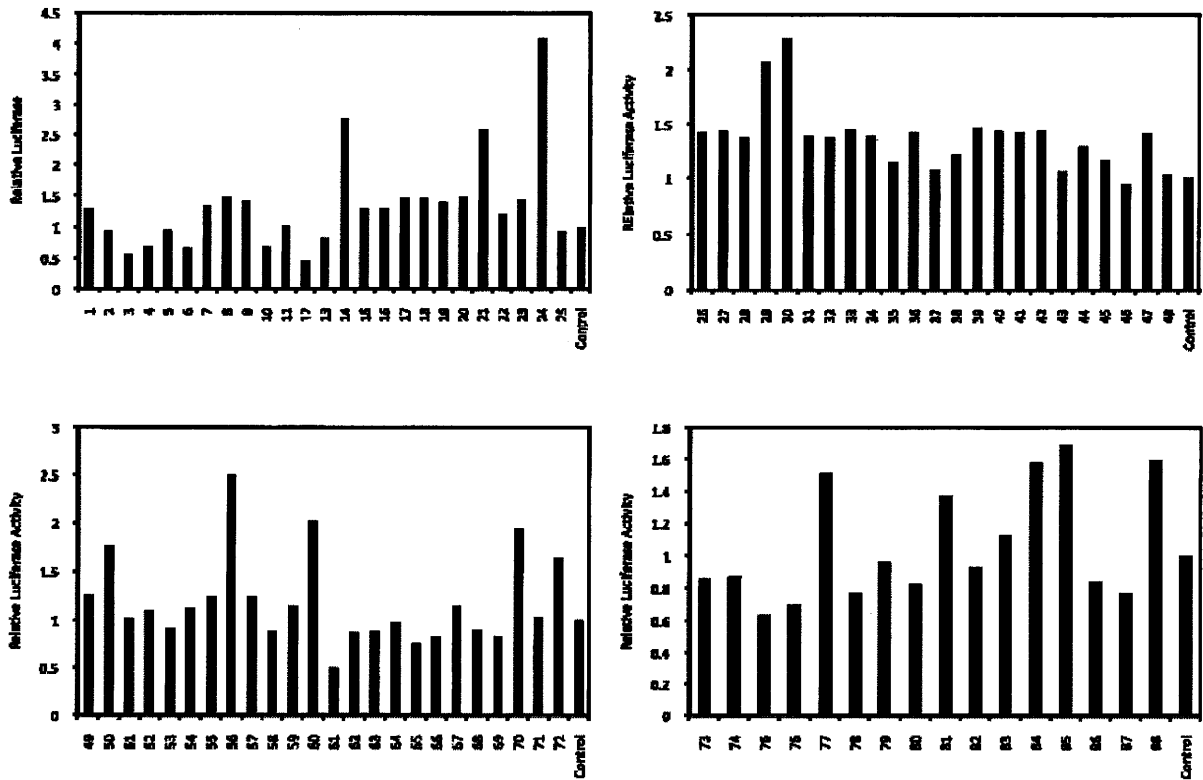
Fig. 1 List of food additives used in this experiment.







**Fig. 3** Luciferase activity of various claudin-4 reporter cells treated with 24 food additives. Claudin-4 reporter gene-expressing MCF7 cells, MPCP #1, MPCP #8, MPCP #35 and MPCP #b-24 treated with 24 food additives for 24 hour were lysed and the luciferase activity was measured.



**Fig. 4** Luciferase activity of claudin-4 reporter cells treated with 88 food additives.

Claudin-4 reporter gene-expressing MCF7 cells (MPCP #35) treated with 88 food additives for 24 hour were lysed and the luciferase activity was measured.

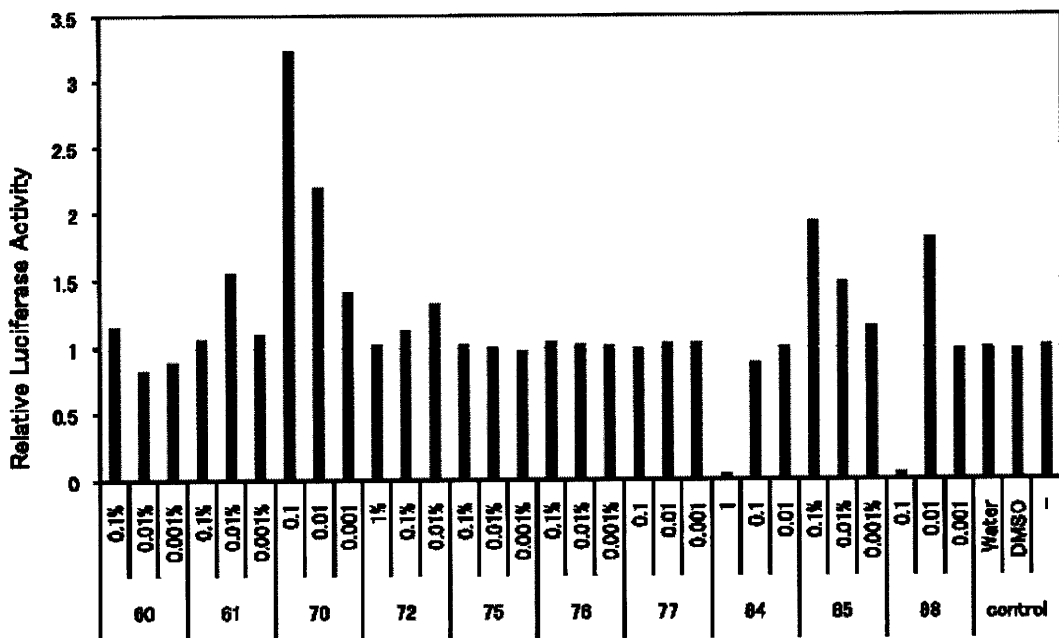
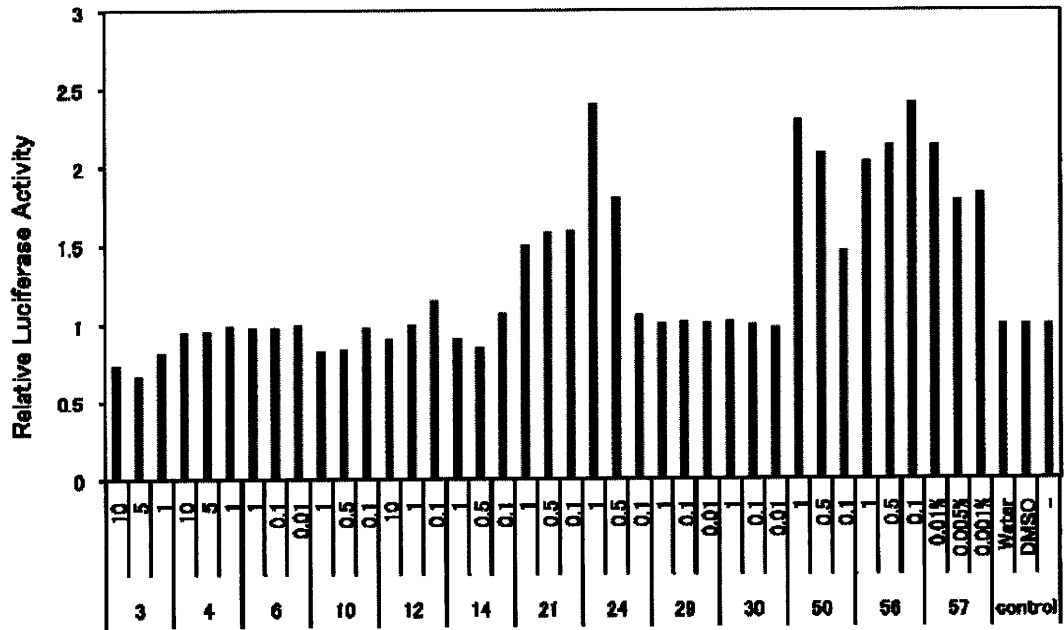


Fig. 5 Luciferase activity of claudin-4 reporter cells treated with 23 food additives .

Claudin-4 reporter gene-expressing MCF7 cells (MPCP #35) treated with different dose of 23 food additives for 24 hour were lysed and the luciferase activity was measured.

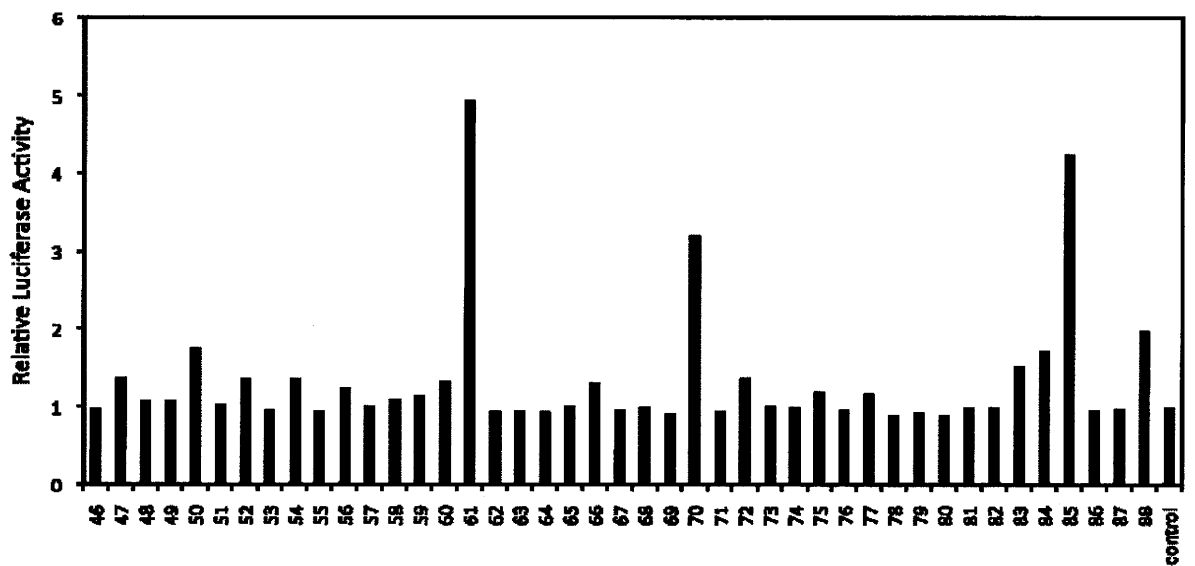
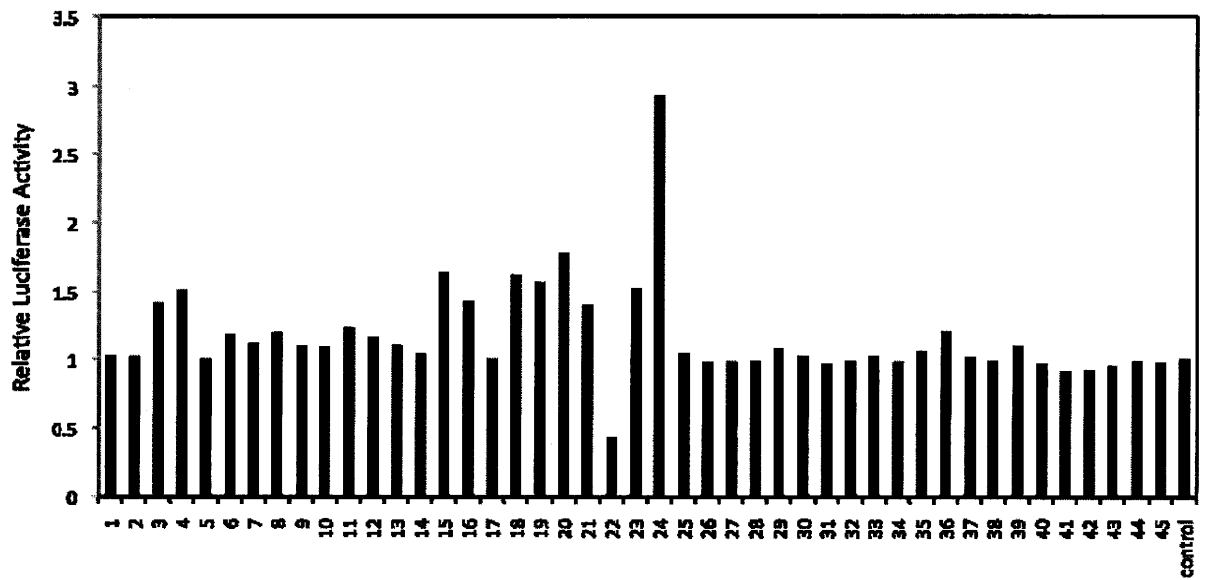


Fig. 6 Luciferase activity of claudin-4 reporter cells treated with 88 food additives for 12 hour. Claudin-4 reporter gene-expressing MCF7 cells (MPCP #35) treated with 88 food additives for 12 hour were lysed and the luciferase activity was measured.

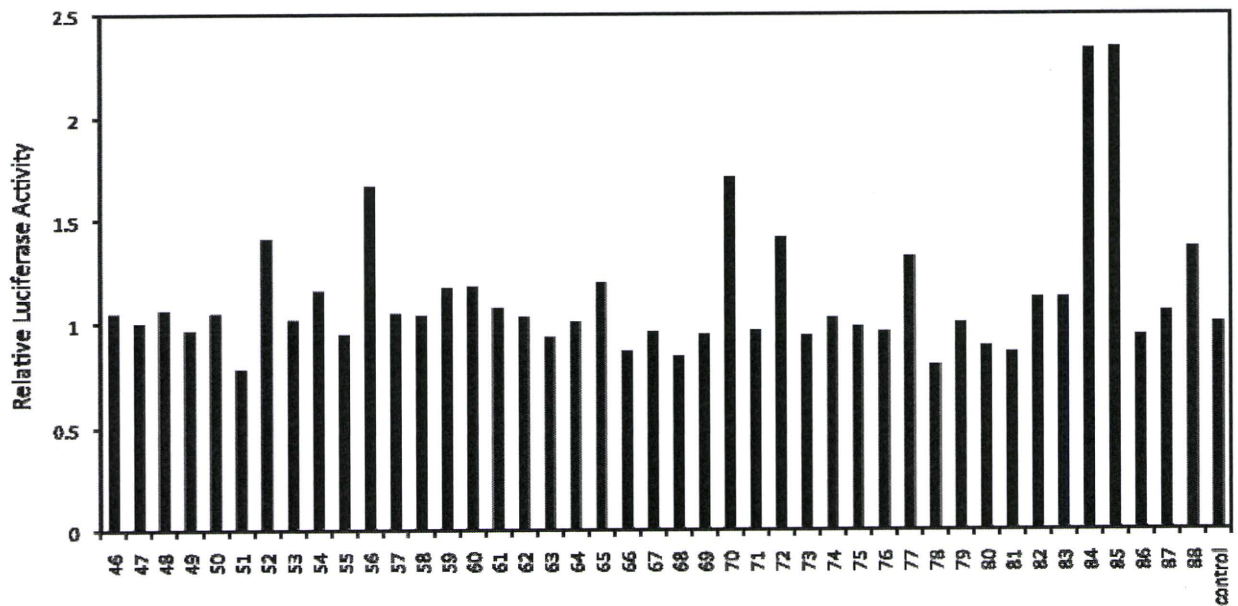
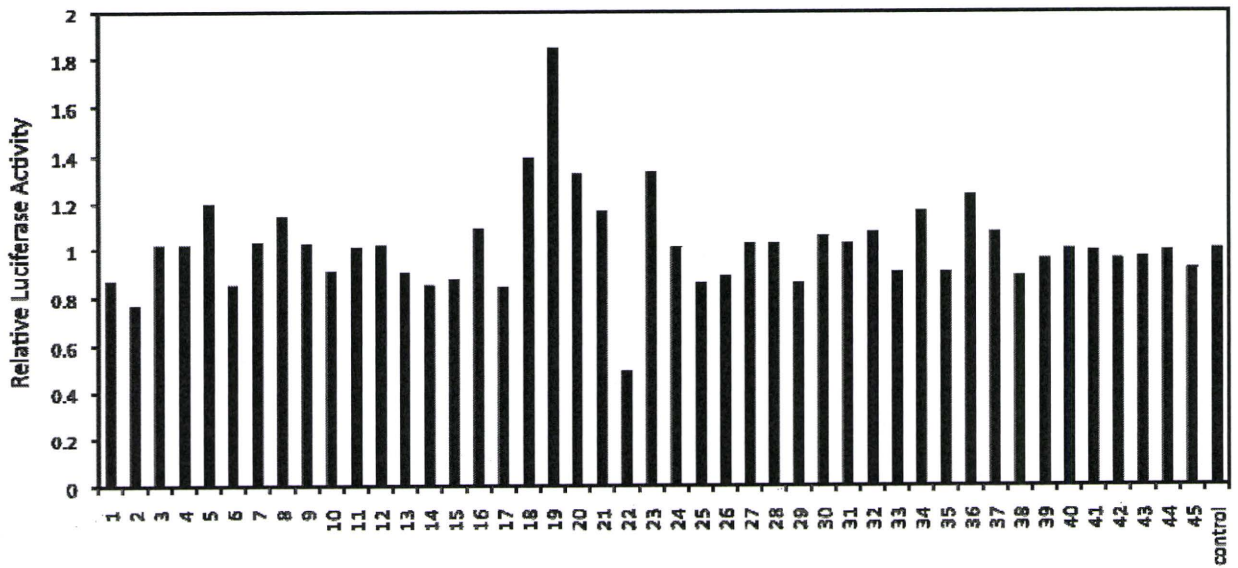


Fig. 7 Luciferase activity of claudin-4 reporter cells treated with 88 food additives for 48 hour. Claudin-4 reporter gene-expressing MCF7 cells (MPCP #35) treated with 88 food additives for 48 hour were lysed and the luciferase activity was measured.

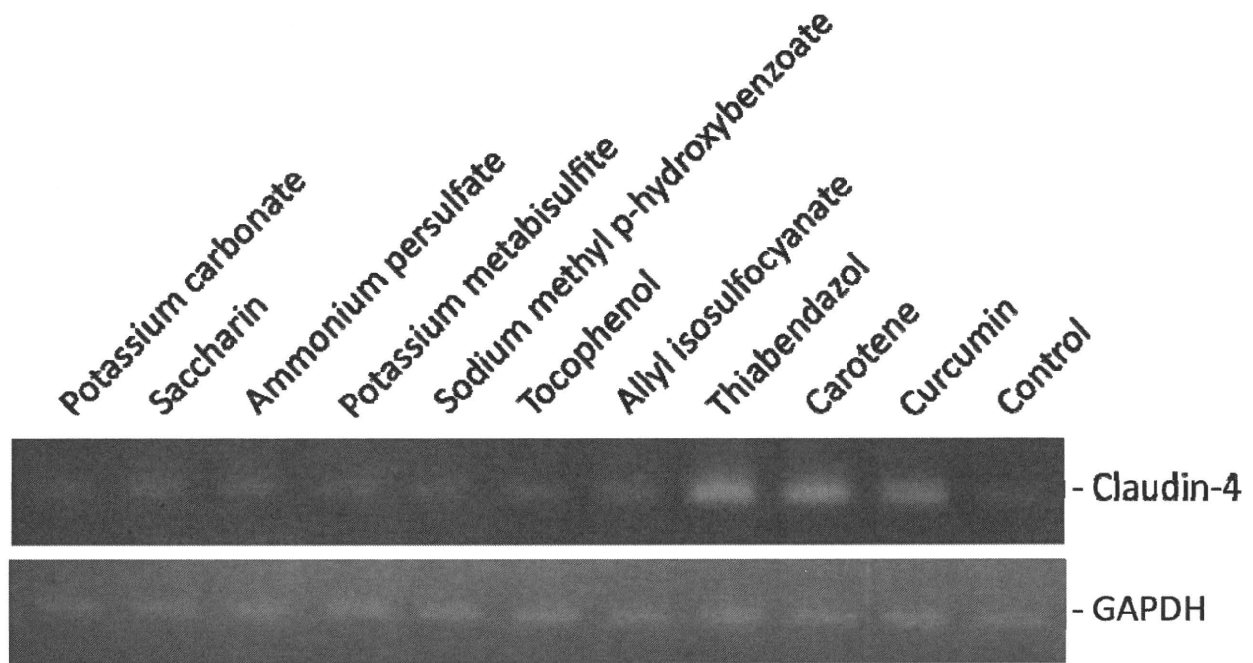


Fig. 8 Expression of claudin-4 mRNA in MPCP #35 cells treated with food additives modulating claudin-4 reporter activity.

Claudin-4 mRNA in claudin-4 reporter cells treated with potassium carbonate, saccharin, ammonium persulfate, potassium metabisulfite, sodium methyl p-hydroxybenzoate, tocopherol, allyl isosulfocyanate, thiabendazole, carotene and curcumin for 24 hour were analyzed by RT-PCR. GAPDH was used as a loading control.

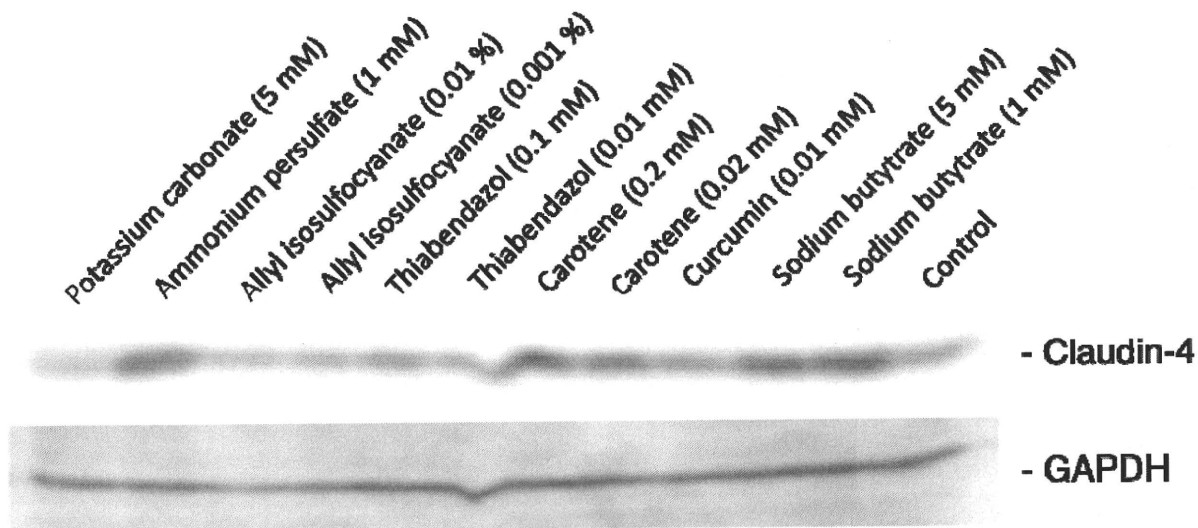
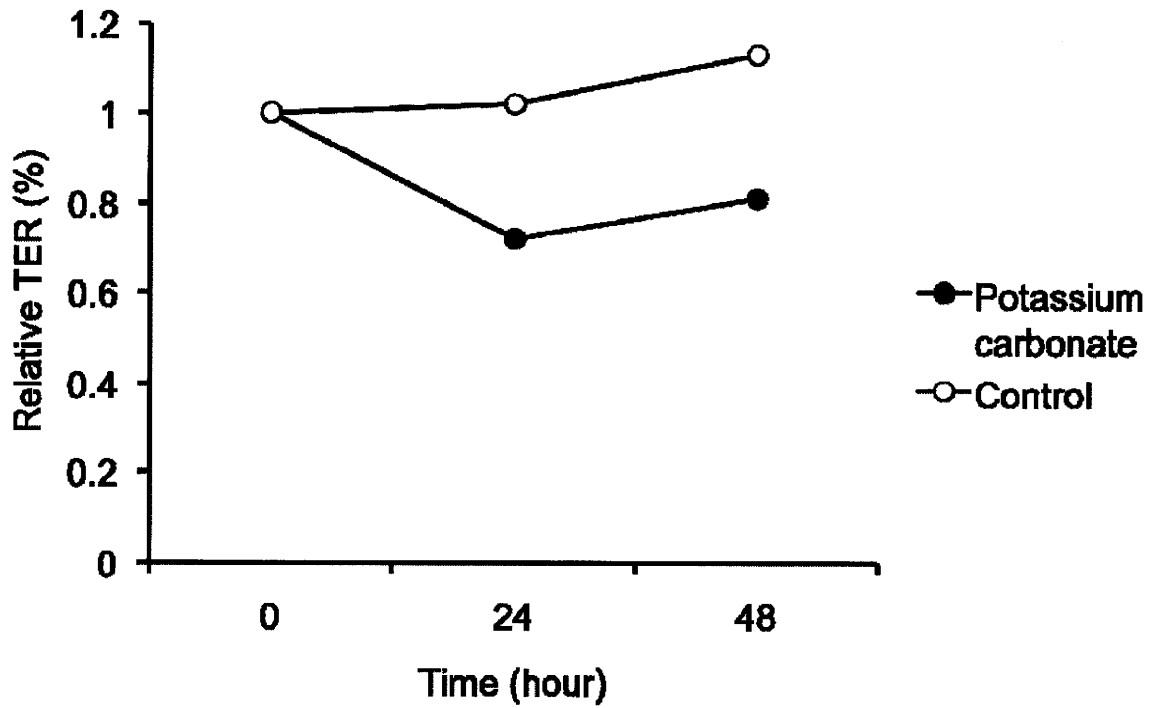


Fig. 9 Expression of claudin-4 protein in MPCP #35 cells treated with food additives modulating claudin-4 reporter activity and mRNA expression. Claudin-4 protein in claudin-4 reporter cells treated with potassium carbonate, ammonium persulfate, allyl isosulfocyanate, thiabendazole, carotene, curcumin and sodium butyrate for 48 hour were analyzed by western blotting. GAPDH was used as a loading control.



**Fig. 10** Effect of potassium carbonate on TJ barrier in Caco-2 cells. Caco-2 cells were cultured on transwell chambers. When TER values reach plateau, the cells were treated with potassium carbonate (10mM). After culture for 24 and 48 hours, TER values were measured.



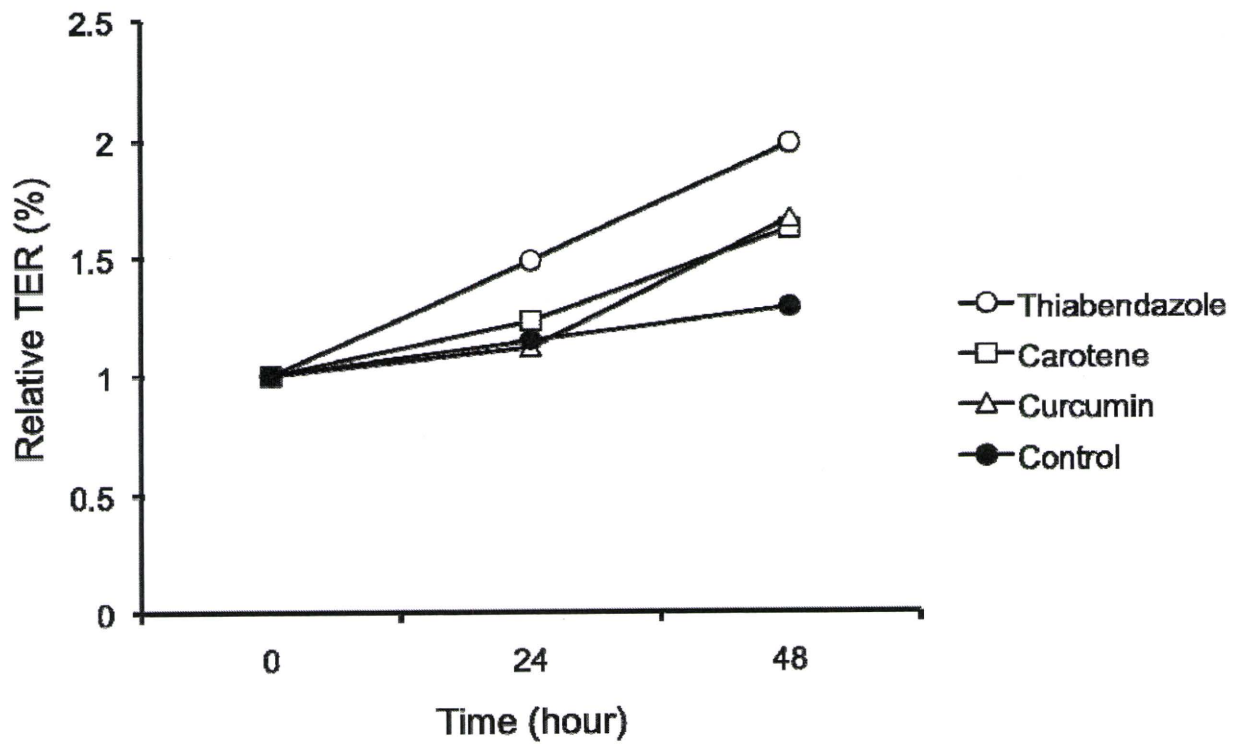


Fig. 11 Effect of food additives increased claudin-4 reporter activity on TJ barrier in Caco-2 cells.

Caco-2 cells were cultured on transwell chambers. After 7 days culture, the cells were treated with thiabendazol (0.05 mM), carotene (0.2 mM), curcumin (10 $\mu$ M). After culture for 24 and 48 hours, TER values were measured.

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当事項なし						

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsuhisa K Kondoh M Takahashi A Yagi K	Tight junction modulator and drug delivery	<i>Expert Opin Drug Deliv</i>	6	509-515	2009
Saeki R Kondoh M Kakutani H Tsunoda S Mochizuki Y Hamakubo T Tsutsumi Y Horiguchi Y Yagi K	A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule	<i>Mol Pharmacol</i>	76	918-926	2009
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	<i>Drug Delivery System</i>	24	532-537	2009
Suzuki H Kakutani H Kondoh M Watari A Yagi K	The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin	<i>Pharmazie</i>	10	766-769	2010
Itoh A Isoda K Kondoh M Kawase M Watari A Kobayashi M Tamesada M Yagi K	Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl <sub>4</sub> -induced liver injury	<i>Biol Pharm Bull</i>	33	983-987	2010
Kakutani H Kondoh M Fukasaka M Suzuki H Hamakubo T Yagi K	Mucosal vaccination using claudin-4 targeting	<i>Biomaterials</i>	31	5463-5471	2010

Yagi K Kawase M Isoda K Kondoh M	Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function	<i>YAKUGAKU ZASSHI,</i>	130	537-543	2010
Kakutani H Kondoh M Saeki R Fujii M Watanabe Y Mizuguchi H Yagi K	Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin	<i>Eur J Pharm Biopharm</i>	75	213-217	2010
Uchida H Kondoh M Hanada T Takahashi A Hamakubo T Yagi K	A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide	<i>Biochem Pharmacol</i>	79	1437-1444	2010
Ushitora M Sakurai F Yamaguchi T Nakamura S Kondoh M Yagi K Kawabata K Mizuguchi H	Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vector	<i>J Control Rel</i>	142	4331-4337	2010
Saeki R Kondoh M Uchida H Yagi K	Potency of claudin-targeting as antitumor therapy	<i>Mol Cell Pharmacol</i>	2	47-51	2010
近藤昌夫	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	2010
Saeki R Kondoh M Kakutani H Matsuhisa K Takahashi A Suzuki H Kakamu Y Watari A Yagi K	A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis	<i>J Pharmacol Exp Ther</i>	334	576-582	2010
Kakutani H Takahashi A Kondoh M Saito Y Yamaura T Sakihama T Hamakubo T Yagi K	A novel screening system for claudin binder using baculoviral display	<i>PLoS ONE</i>	6	e16611	2011
Takahashi A Kondoh M Suzuki H Kodaka M Yagi K	Claudin as a target for drug development	<i>Curr Med Chem</i>	18	1861-1865	2011

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	<i>Pharmazie</i>			accepted
Takahashi A Kondoh M Kodaka M Yagi K	Peptides as tight junction modulators	<i>Curr Pharm Design</i>			accepted