

animals dosed intraperitoneally with snPt1 or snPt8, the kidney and liver were removed at 24 h (for single administration) or 72 h (for multiple administration) post-injection and fixed with 4% paraformaldehyde. Thin tissue sections were stained with hematoxylin and eosin for histological observation.

#### Biochemical assay

Serum blood urea nitrogen (BUN) was measured using a commercially available colorimetric assay kit (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) according to the manufacturer's protocol. In brief, collected serum (10  $\mu$ l) was combined with 1 ml color A reagent (including urease) and incubated at 37°C for 15 min. Following the addition of 1 ml Color B reagent, the samples were incubated at 37°C for 10 min. Absorbance of samples was measured at a wavelength of 570 nm.

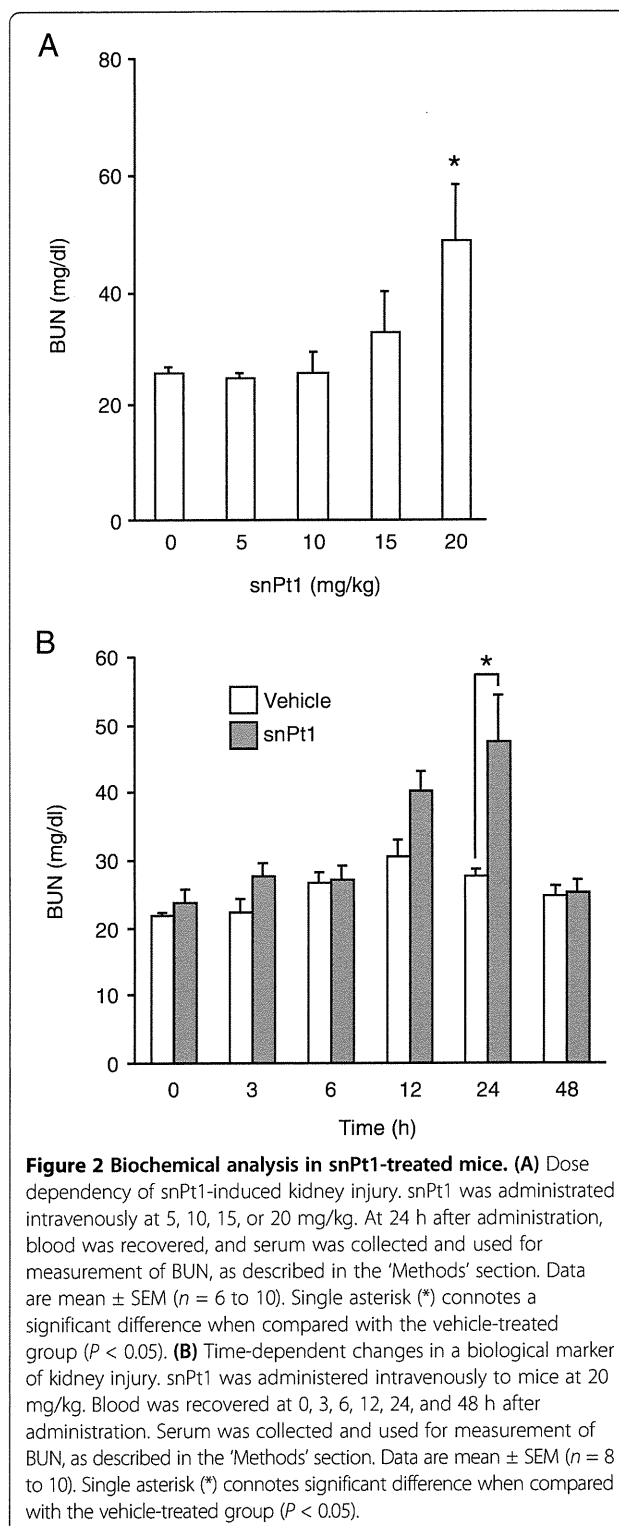
#### Statistical analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by Student's *t* test. *P* < 0.05 was considered significant.

#### Results and discussion

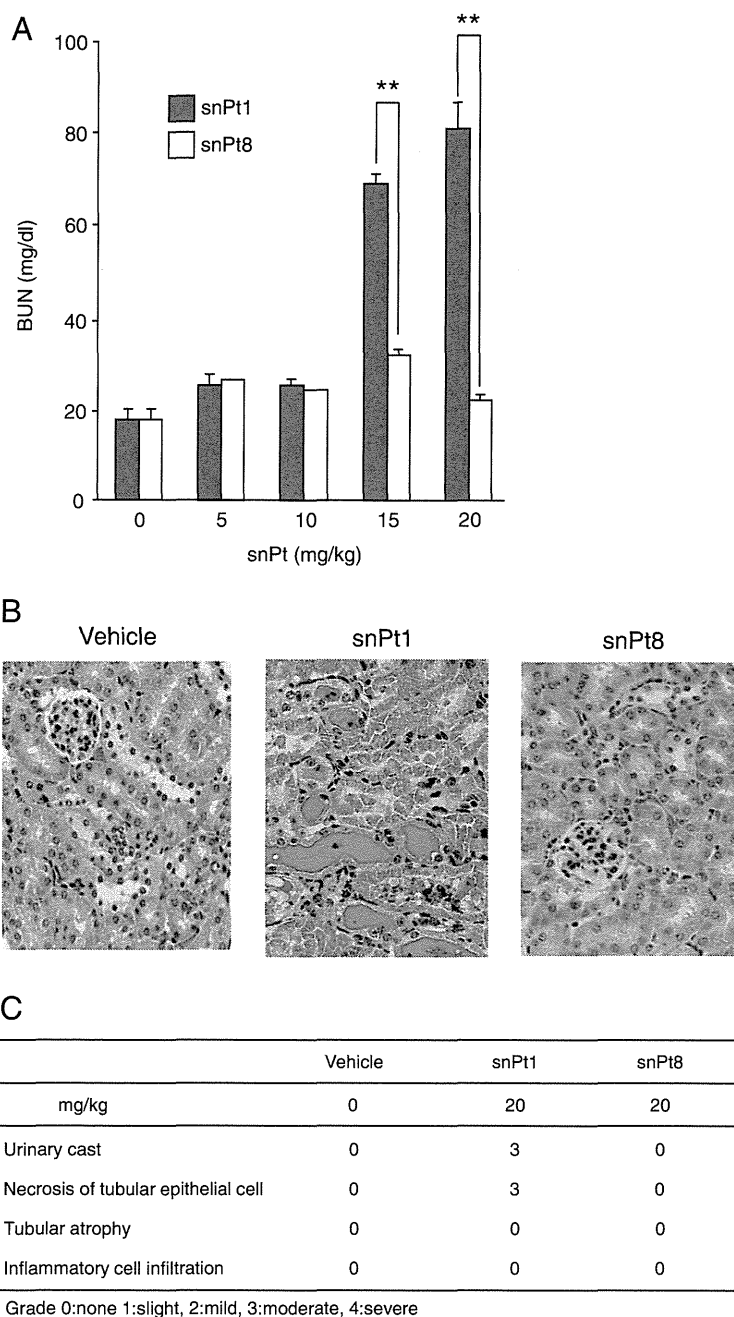
To investigate acute biological effects of snPt1, we administered 15 mg/kg of snPt1 to BALB/c mice by intravenous injection and performed histological analysis in the kidney, lung, heart, liver, and spleen at 24 h post-injection. As shown in Figure 1, necrosis of tubular epithelial cells and urinary casts were observed in the kidney by hematoxylin-eosin staining, whereas no apparent tissue abnormality was observed in the lung, heart, and spleen. Consistent with previous results [24], the liver showed vacuole degeneration after the administration of snPt1 (data not shown). These observations indicate that snPt1 induced acute tissue injury in the kidney and liver following intravenous administration. Next, we examined a serum biochemical marker of kidney function, BUN, to confirm the kidney tissue toxicity. Consistent with the histological analysis, intravenous dosing with snPt1 elevated serum BUN level at doses over 15 mg/kg (Figure 2A). The serum BUN level increased 24 h later and returned to normal level after 48 h (Figure 2B). When we directly added snPt1 at concentrations of 10, 20, 40, and 60  $\mu$ g/ml to *in vitro* cultures of Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, severe cytotoxicity was observed in a dose-dependent manner (Additional file 1: Figure S1). These results indicate that snPt1 (at doses of greater than or equal to 15 mg/kg) induced toxicity in both the kidney and liver, but not in the lung, heart, or spleen, after a single intravenous administration.

Previously, we and other groups reported that the biological effects of nanoparticles differed with material size [10,11,25,26]. Therefore, we examined whether platinum



**Figure 2 Biochemical analysis in snPt1-treated mice. (A)** Dose dependency of snPt1-induced kidney injury. snPt1 was administered intravenously at 5, 10, 15, or 20 mg/kg. At 24 h after administration, blood was recovered, and serum was collected and used for measurement of BUN, as described in the 'Methods' section. Data are mean  $\pm$  SEM (*n* = 6 to 10). Single asterisk (\*) denotes a significant difference when compared with the vehicle-treated group (*P* < 0.05). **(B)** Time-dependent changes in a biological marker of kidney injury. snPt1 was administered intravenously to mice at 20 mg/kg. Blood was recovered at 0, 3, 6, 12, 24, and 48 h after administration. Serum was collected and used for measurement of BUN, as described in the 'Methods' section. Data are mean  $\pm$  SEM (*n* = 8 to 10). Single asterisk (\*) denotes significant difference when compared with the vehicle-treated group (*P* < 0.05).

particles with a diameter of 8 nm (snPt8) and snPt1 produce different effects in kidney. As shown in Figure 3A, snPt1 administration resulted in dose-dependent increases in serum BUN levels, whereas snPt8 (at the same



**Figure 3 Effect of particle size of platinum on kidney injury.** (A) snPt1 or snPt8 was injected intravenously into mice at the indicated doses. Blood was recovered at 24 h after injection. Serum BUN levels were measured. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Double asterisk (\*\*) connotes significant difference between the snPt1- and snPt8-treated groups ( $P < 0.01$ ). (B) Histological analysis of kidney tissues in acute snPt1- or snPt8-treated mice. Vehicle or test article (snPt1 or snPt8 at 20 mg/kg) was administered intravenously to mice as a single dose. At 24 h after administration, the kidneys were collected and fixed with 4% paraformaldehyde. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and observed under a microscope. (C) Acute kidney injury score in mice treated with vehicle, snPt1, or snPt8. Grade 0: none, 1: slight, 2: mild, 3: moderate, 4: severe.

dose levels) did not. Histological analysis showed that intravenous administration (at 20 mg/kg) of snPt1, but not that of snPt8, induced renal injury (Figure 3B,C). These tissue injuries also were observed following the

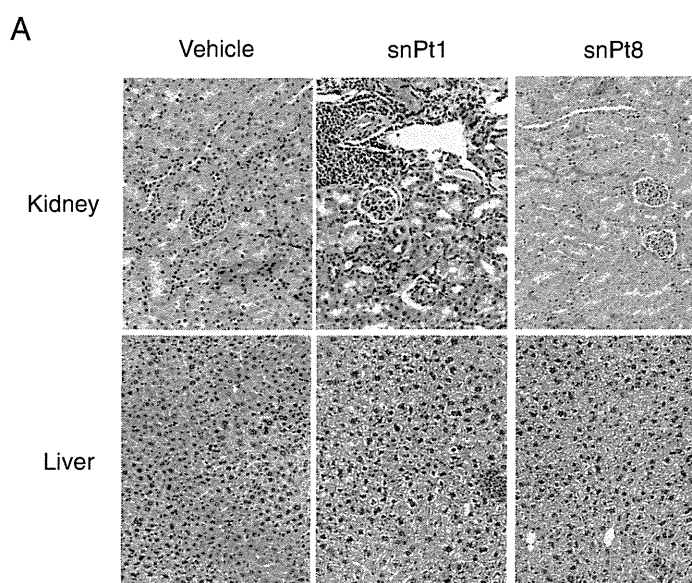
injection in C57BL/6 mice (data not shown), demonstrating that the toxicity was not mouse strain-specific. Furthermore, renal cytotoxicity was not observed in snPt8-treated MDCK cells (Additional file 1: Figure S1),

confirming the size dependence of the nanoparticle renal cytotoxicity. The hepatotoxicity of the platinum particles also was reduced by altering particle size [24]. These findings indicate that the snPt1-induced nephrotoxicity is not observed following treatment with the same dose level of snPt8.

Finally, we used histological analysis to investigate the effects on C57BL/6 mice of chronic exposure to snPt1 and snPt8. snPt1 and snPt8 (both at 10 mg/kg) were injected intraperitoneally into mice twice per week for 4 weeks; repeat administration via the tail vein was precluded due to tissue necrosis of the mouse tail upon multiple intravenous administrations. In the multiple intraperitoneal administrations, necrosis at the injection site was not observed. Single intraperitoneal administration of 10 mg/kg snPt1 (but not that of snPt8) induced necrosis of tubular epithelial cells and urinary casts in the kidney, similar to the results seen with intravenous

administration (Additional file 2: Figure S2A,B). Chronic intraperitoneal administration of snPt1 at 10 mg/kg induced urinary casts, tubular atrophy, and inflammatory cell accumulation in the kidney, whereas the liver did not show tissue injury (Figure 4A,B). On the other hand, chronic exposure to snPt8 (at the same dose level) did not show apparent histological effects in the kidney (Figure 4A,B). These findings suggest that chronic exposure to 10 mg/kg snPt1, but not to snPt8, induced severe kidney injury. Notably, this chronic exposure to snPt1 induced additional (cumulative) kidney injury beyond that seen with acute exposure.

Following exposure, nanoparticles are transported into the blood and reach the systemic circulation, from which the nanoparticles distribute and accumulate in several organs such as the lung, liver, spleen, kidneys, brain, and heart [27-30]. Because the kidney is able to remove molecules from the circulation, renal excretion is an expected



**B**

	Vehicle	snPt1	snPt8
mg/kg	0	10	10
Urinary cast	0	3	0
Necrosis of tubular epithelial cell	1	1	1
Tubular atrophy	0	3	0
Inflammatory cell infiltration	0	3	0

Grade 0:none 1:slight, 2:mild, 3:moderate, 4:severe

**Figure 4 Histological analysis of kidney tissues in multi-dose snPt1- or snPt8-treated mice. (A)** Vehicle or test article (snPt1 or snPt8 at 10 mg/kg) was administered intraperitoneally to mice as twice-weekly doses for 4 weeks. At 72 h after last administration, the kidney and liver were collected and fixed with 4% paraformaldehyde. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and observed under a microscope. **(B)** Chronic kidney injury scores in mice treated with vehicle, snPt1, or snPt8. Grade 0: none, 1: slight, 2: mild, 3: moderate, 4: severe.

route for elimination of nanoparticles. In fact, functionalized single-wall carbon nanotubes (SWCNT), following injection into mice, are rapidly excreted by the kidney [31]. The hepatobiliary system also is an important route for the elimination of foreign substances and particles [32]. Because these organs play pivotal roles in eliminating foreign substances, various nanomaterials are accumulated there and lead to tissue injury. As one example, our previous work showed that snPt1-treated mice exhibited acute hepatotoxicity [24]. In the present study, we investigated the biological effects of snPt1 after intravenous or intraperitoneal administration in mice and demonstrated that snPt1 induced nephrotoxicity and impaired renal function, as evidenced by BUN levels. In contrast, we could not find apparent toxic effects on the heart, lung, or spleen after the single intravenous administration of snPt1, although the disposition of these nanoparticles will need to be assessed further.

The underlying mechanism of snPt1-induced tissue injury still remains unclear. Cisplatin, which is a platinating agent used as part of the anti-cancer regimen for various types of cancers [33,34], exerts its antitumor activity by binding preferentially to the nucleophilic positions on guanine and adenine of DNA, resulting in the formation of intra- and inter-strand crosslinks. Eventually, the crosslinks lead to DNA-strand breaks and killing of cancer cells [35]. However, cisplatin usage is limited due to nephrotoxicity, leading to lesions in the epithelial tubules [36,37]. Cisplatin also causes toxicity in the liver and blood [38]. These observations suggest that the toxic effects of cisplatin resemble those of snPt1. A previous study reported that platinum nanoparticles entered human lung fibroblasts (cell line IMR-90) and human glioblastoma cells (U251) and induced cytotoxicity thorough intracellular reactive oxygen species (ROS) production and DNA damage following p53 activation and upregulation of p21, which leads to growth arrest and apoptosis [39]. Our observation of snPt1-induced cytotoxicity in cell culture suggests that snPt1 may be internalized by renal cells, with concomitant induction of ROS production or DNA damage. However, alternative toxic effects (such as cytotoxicity of inflammatory cytokines on renal cells by accumulation of inflammatory cells in the kidney) might emerge during chronic exposure to snPt1.

At equivalent dose levels, platinum particles of 8 nm in size did not induce apparent toxic effects in renal tissues by acute or chronic administration. This result suggests that selection of specific size ranges for the platinum particles might overcome the undesirable side effects. Current studies have shown that organic cation transporter 2 (OCT2) is highly expressed in kidney and plays an important role in the nephrotoxicity of cisplatin [40,41]. Identification of the snPt1 transporter may help to clarify the mechanism of snPt1-induced nephrotoxicity.

## Conclusions

In the present study, we investigated the biological safety of platinum nanoparticles in mice and found that platinum particles of less than 1 nm induced kidney injury, although the injurious effects were reduced by increasing the nanoparticle size. For future nanoparticle applications, it will be critical to further understand the bioactivity and kinetics of materials less than 1 nm in size. Accumulation of toxicity profiles will aid in the creation of the safe and efficacious nanomaterials and contribute to the advancement of the field.

## Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Cytotoxicity of snPt1 in renal cells. MDCK cells were treated with vehicle, snPt1, or snPt8 at 0, 10, 20, 40, or 60 µg/ml. After 24 h exposure, morphology of the cells was photographed. Higher magnification images are shown in the insets.

**Additional file 2: Figure S2.** (A) Histological analysis of kidney tissues in intraperitoneally administered mice. Vehicle or test article (snPt1 or snPt8 at 10 mg/kg) was administered intraperitoneally to mice as a single dose. At 24 h after administration, kidneys were collected and fixed with 4% paraformaldehyde. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and observed under a microscope. (B) Acute kidney injury score in mice treated intraperitoneally with vehicle, snPt1, or snPt8. Grade 0: none, 1: slight, 2: mild, 3: moderate, 4: severe.

## Abbreviations

snPt1: platinum particles less than 1 nm in size; snPt8: platinum particles of 8 nm in size; BUN: blood urea nitrogen; MDCK: Madin-Darby canine kidney; ROS: reactive oxygen species.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

AW, MK, and KY designed this study. YY (Yoshioka) and YT prepared samples. YY (Yamagishi), YH, and XL performed the experiments. AW and KY wrote this manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

The authors thank all members of our laboratory for useful comments. This study was partly supported by a grant from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.

## Author details

<sup>1</sup>Laboratories of Bio-Functional Molecular Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

<sup>2</sup>Laboratories of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

Received: 30 May 2013 Accepted: 1 September 2013

Published: 23 September 2013

## References

1. Ariga K, Hu X, Mandal S, Hill JP: By what means should nanoscaled materials be constructed: molecule, medium, or human? *Nanoscale* 2010, **2**:198–214.
2. Service RF: U.S. nanotechnology. Health and safety research slated for sizable gains. *Science* 2007, **315**:926.
3. Patra CR, Bhattacharya R, Mukhopadhyay D, Mukherjee P: Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2010, **62**:346–361.
4. Aiso S, Yamazaki K, Umeda Y, Asakura M, Kasai T, Takaya M, Toya T, Koda S, Nagano K, Arito H, Fukushima S: Pulmonary toxicity of intratracheally

- instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats. *Ind Health* 2010, **48**:783–795.
5. Murray AR, Kisin E, Leonard SS, Young SH, Kommineni C, Kagan VE, Castranova V, Shvedova AA: **Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes.** *Toxicology* 2009, **257**:161–171.
  6. Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Morishita Y, Yoshida T, Fujimura M, Kayamuro H, Nabeshi H, Yamashita T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Kawai Y, Mayumi T, Yoshikawa T, Itoh N, Tsunoda S, Tsutsumi Y: **Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape.** *Inflammation* 2010, **33**:276–280.
  7. Warheit DB, Reed KL, Sayes CM: **A role for nanoparticle surface reactivity in facilitating pulmonary toxicity and development of a base set of hazard assays as a component of nanoparticle risk management.** *Inhal Toxicol* 2009, **21**(Suppl 1):61–67.
  8. Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G: **In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection.** *J Appl Toxicol: JAT* 2009, **29**:330–337.
  9. Geys J, Nemmar A, Verbeken E, Smolders E, Ratoi M, Hoylaerts MF, Nemery B, Hoet PH: **Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge.** *Environ Health Perspect* 2008, **116**:1607–1613.
  10. Nishimori H, Kondoh M, Isoda K, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Yagi K: **Silica nanoparticles as hepatotoxicants.** *Eur J Pharm Biopharm: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2009, **72**:496–501.
  11. Nishimori H, Kondoh M, Isoda K, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Yagi K: **Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice.** *Eur J Pharm Biopharm: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2009, **72**:626–629.
  12. Park EJ, Kim H, Kim Y, Yi J, Choi K, Park K: **Carbon fullerenes (C60s) can induce inflammatory responses in the lung of mice.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2010, **244**:226–233.
  13. Nabeshi H, Yoshikawa T, Arimori A, Yoshida T, Tochigi S, Hirai T, Akase T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, Yoshioka Y, Tsutsumi Y: **Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages.** *Nanoscale Research Letters* 2011, **6**:93.
  14. Hauck TS, Ghazani AA, Chan WC: **Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells.** *Small* 2008, **4**:153–159.
  15. Mayer A, Vadon M, Rinner B, Novak A, Wintersteiger R, Frohlich E: **The role of nanoparticle size in hemocompatibility.** *Toxicology* 2009, **258**:139–147.
  16. Nafee N, Schneider M, Schaefer UF, Lehr CM: **Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile.** *Int J Pharm* 2009, **381**:130–139.
  17. Horie M, Kato H, Endoh S, Fujita K, Nishio K, Komaba LK, Fukui H, Nakamura A, Miyauchi A, Nakazato T, Kinugasa S, Yoshida Y, Hagihara Y, Morimoto Y, Iwahashi H: **Evaluation of cellular influences of platinum nanoparticles by stable medium dispersion.** *Metallomics: Integrated Biometal Science* 2011, **3**:1244–1252.
  18. Gehrke H, Pelka J, Hartinger CG, Blank H, Bleimund F, Schneider R, Gerthsen D, Brase S, Crone M, Turk M, Marko D: **Platinum nanoparticles and their cellular uptake and DNA platination at non-cytotoxic concentrations.** *Arch Toxicol* 2011, **85**:799–812.
  19. Park EJ, Kim H, Kim Y, Park K: **Intratracheal instillation of platinum nanoparticles may induce inflammatory responses in mice.** *Arch Pharm Res* 2010, **33**:727–735.
  20. Pelka J, Gehrke H, Esselen M, Turk M, Crone M, Brase S, Muller T, Blank H, Send W, Zibat V, Brenner P, Schneider R, Gerthsen D, Marko D: **Cellular uptake of platinum nanoparticles in human colon carcinoma cells and their impact on cellular redox systems and DNA integrity.** *Chem Res Toxicol* 2009, **22**:649–659.
  21. Onizawa S, Aoshiba K, Kajita M, Miyamoto Y, Nagai A: **Platinum nanoparticle antioxidants inhibit pulmonary inflammation in mice exposed to cigarette smoke.** *Pulm Pharmacol Therapeut* 2009, **22**:340–349.
  22. Watanabe A, Kajita M, Kim J, Kanayama A, Takahashi K, Mashino T, Miyamoto Y: **In vitro free radical scavenging activity of platinum nanoparticles.** *Nanotechnology* 2009, **20**:455105.
  23. Kajita M, Hikosaka K, Iitsuka M, Kanayama A, Tushima N, Miyamoto Y: **Platinum nanoparticle is a useful scavenger of superoxide anion and hydrogen peroxide.** *Free Radic Res* 2007, **41**:615–626.
  24. Yamagishi Y, Watari A, Hayata Y, Li X, Kondoh M, Tsutsumi Y, Yagi K: **Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice.** *Pharmazie* 2013, **68**:178–182.
  25. Oberdorster G: **Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology.** *J Intern Med* 2010, **267**:89–105.
  26. Jiang J, Oberdorster G, Elder A, Gelein R, Mercer P, Biswas P: **Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase?** *Nanotoxicology* 2008, **2**:33–42.
  27. Zhu MT, Feng WY, Wang B, Wang TC, Gu YQ, Wang M, Wang Y, Ouyang H, Zhao YL, Chai ZF: **Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats.** *Toxicology* 2008, **247**:102–111.
  28. Furuyama A, Kanno S, Kobayashi T, Hirano S: **Extrapulmonary translocation of intratracheally instilled fine and ultrafine particles via direct and alveolar macrophage-associated routes.** *Arch Toxicol* 2009, **83**:429–437.
  29. Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C: **Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain.** *Inhal Toxicol* 2004, **16**:437–445.
  30. Ai J, Biazar E, Jafarpour M, Montazeri M, Majdi A, Aminifard S, Zafari M, Akbari HR, Rad HG: **Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs.** *Int J Nanomedicine* 2011, **6**:1117–1127.
  31. Ruggiero A, Villa CH, Holland JP, Sprinkle SR, May C, Lewis JS, Scheinberg DA, McDevitt MR: **Imaging and treating tumor vasculature with targeted radiolabeled carbon nanotubes.** *Int J Nanomedicine* 2010, **5**:783–802.
  32. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H: **Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats.** *Nanomedicine (Lond)* 2008, **3**:703–717.
  33. Daugaard G: **Cisplatin nephrotoxicity: experimental and clinical studies.** *Dan Med Bull* 1990, **37**:1–12.
  34. Brabec V, Kasparikova J: **Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs.** *Drug Resist Updat* 2005, **8**:131–146.
  35. Wang D, Lippard SJ: **Cellular processing of platinum anticancer drugs.** *Nat Rev Drug Discov* 2005, **4**:307–320.
  36. Dobyant DC, Levi J, Jacobs C, Kosek J, Weiner MW: **Mechanism of cisplatin nephrotoxicity: II. Morphologic observations.** *J Pharmacol Exp Therapeut* 1980, **213**:551–556.
  37. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB: **Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity.** *Toxins* 2010, **2**:2490–2518.
  38. Litterst CL, Gram TE, Dedrick RL, Leroy AF, Guarino AM: **Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum(II) (NSC 119875) to dogs.** *Cancer Res* 1976, **36**:2340–2344.
  39. Asharani PV, Xinyi N, Hande MP, Valiyaveetil S: **DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles.** *Nanomedicine (Lond)* 2010, **5**:51–64.
  40. Tanihara Y, Masuda S, Katsura T, Inui K: **Protective effect of concomitant administration of imatinib on cisplatin-induced nephrotoxicity focusing on renal organic cation transporter OCT2.** *Biochem Pharmacol* 2009, **78**:1263–1271.
  41. Yonezawa A, Inui K: **Organic cation transporter OCT/SLC22A and H (+)/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents.** *Biochem Pharmacol* 2011, **81**:563–568.

doi:10.1186/1556-276X-8-395

Cite this article as: Yamagishi et al.: Acute and chronic nephrotoxicity of platinum nanoparticles in mice. *Nanoscale Research Letters* 2013 **8**:395.

## アデノウイルスベクターを利用した C 型肝炎研究の新展開

吉田孟史,<sup>a</sup> 近藤昌夫,<sup>\*a</sup> 水口裕之,<sup>b</sup> 八木清仁<sup>a</sup>

## Development of an Adenovirus Vector Containing a Hepatitis C Virus Expression Cassette and Its Application

Takeshi Yoshida,<sup>a</sup> Masuo Kondoh,<sup>\*a</sup> Hiroyuki Mizuguchi,<sup>b</sup> and Kiyohito Yagi<sup>a</sup>  
<sup>a</sup>Laboratory of Bio-Functional Molecular Chemistry; and <sup>b</sup>Laboratory of Biochemistry and  
Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University;  
1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

(Received July 31, 2012)

Hepatitis C virus (HCV) is a hepatotropic member of the *Flaviviridae* family and contains a 9.6 kb positive-sense RNA genome. Approximately 170-million people are infected with HCV worldwide. These people face increased risks of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma compared with the general population. Transduction of the HCV genome into hepatocytes is essential for understanding the mode of action of HCV infection, and for preparing HCV, evaluating HCV replication, and screening anti-HCV drugs. Although electroporation of *in vitro*-synthesized HCV genome and transduction of plasmid vectors containing the HCV genome are widely used in HCV research, a more convenient system with higher transduction efficiency is needed. Among viral transduction systems, adenovirus (Ad) vector is one of the most efficient and convenient systems; Ad vector has been widely used in clinical gene therapies. Therefore, Ad vector is a promising system for the delivery of the HCV genome; however, an Ad vector expressing the HCV genome has never been developed. We here describe the preparation of an Ad vector expressing the HCV genome, and outline future directions of HCV research using this vector system.

**Key words**—hepatitis C virus; adenovirus; RNA polymerase I-expression cassette

## 1. はじめに

現在世界では 1 億 7 千万人余の人々が C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) に感染し、感染者数は毎年 200–300 万人ずつ増加している。HCV に感染すると高率に慢性化し、30 年余りの歳月を経て肝硬変、肝がんへと進行し、患者の命を奪っていく (現在、世界で毎年 35 万人が HCV により命を落としている)。わが国では新規感染者は皆無に等しい状況であるものの、アジア及びアフリカ地域では増加しており、C 型肝炎の克服は世界保健衛生上の重要課題の 1 つとなっている。

1989 年に、それまで A 型肝炎及び B 型肝炎とは異なる肝炎として診断されていた非 A 非 B 肝炎の

80%が C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染によって引き起こされていることが見いだされた。<sup>1)</sup> HCV はフラビウイルス科に属する直径 55–65 nm の球状 RNA ウイルスであり、約 9.6 kb のプラス鎖 RNA ゲノムを有し、1 つの open reading frame から 3000 アミノ酸からなるポリプロテインが翻訳されその後プロセッシングにより構造タンパク質 (Core, E1, E2) 及び非構造タンパク質 (NS2, 3, 4A, 4B, 5A, 5B) が産生される。Core はヌクレオカプシド、E1, E2 はウイルスエンベロープ、NS3/4A はセリンプロテアーゼ・ヘリカーゼ、NS5B は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能することが明らかとなっているが、依然として HCV 粒子作製法の開発は立ち遅れており、いまだ HCV の生活環の全容は解明されていない。

C 型肝炎治療は、インターフェロン (interferon; IFN) 療法がゴールドスタンダードとなっており、IFN 単剤療法、リバビリンとの併用療法、ペグ化 IFN の開発へと進化を遂げ、最近 NS3/4A プロテ

The authors declare no conflict of interest.

<sup>a</sup>大阪大学大学院薬学研究科生体機能分子化学分野、  
<sup>b</sup>同分子生物学分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

\*e-mail: masuo@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 132 年会シンポジウム S41 で発表したものを中心に記述したものである。

アーゼ阻害剤を用いた3剤併用療法も実用化され、70-80%の患者に対して有効性が認められている。しかしながら、genotype 1b型ウイルス感染者に対する奏効率は50-70%にすぎないこと、うつ病や血小板減少などの副作用が生じ治療の中断を余儀なくされるケースがあること、薬剤耐性ウイルスが出現すること、肝移植患者に対する有効性に乏しいこと、高ウイルス量患者及び高齢患者に対する効果に乏しいことから、IFNフリーの新たな治療法や耐性ウイルス出現を回避可能な新たな治療戦略の開発が焦眉の急となっている。

拙稿では、現在のC型肝炎研究の現状及び課題を概説した後に当研究グループで進めているアデノウイルスベクターを利用したC型肝炎研究についてご紹介したい。

## 2. C型肝炎研究の現状及び課題

エイズウイルス感染者が約3000万人であることを踏まえると、HCV（約1億7千万人の感染者）は非常に高いpublic impactを持っていると言える。しかしながら、1989年のHCV同定以降、HCV培養法の確立は困難を極め、「なぜ、HCVがヒトやチンパンジーの肝細胞に特異的に感染するのか？」といったbig questionを始めとしてHCVの生活環の理解は遅々として進まず、HCV治療法の開発も立ち遅れていた。

1999年に、ウイルスゲノム上の構造領域遺伝子を取り除き、その部分に薬剤耐性遺伝子を挿入したサブジェノミックレプリコンを用いることで、HCV RNAゲノムの複製を培養細胞で解析する*in vitro* HCV複製評価系が確立された。<sup>2)</sup> さらに、2005年に劇症肝炎患者から分離したウイルス株（genotype 2a）を用いた*in vitro* HCV培養法が開発され、<sup>3)</sup> HCVの生活環に関する理解が急速に進んだ。

HCVは主として肝細胞に感染し、細胞表面に吸着したHCVは受容体を介して細胞内に侵入し、脱殻後ウイルスRNAが翻訳されることで複製が開始する。HCVと受容体との相互作用解析系としてHCVエンベロープを被覆したシュードウイルスが確立され、HCV感染受容体の同定は多方面から進められ、これまでにCD81, scavenger receptor B1, claudin-1, occludinがHCV受容体であること、受容体に対する抗体などを使用することで感染阻害作

用が観察されることなどが報告されている。<sup>4,5)</sup>

一方、HCV RNAゲノム複製機構については、cyclophilinやmicroRNA(miR122)がHCV複製に関与する宿主因子として同定され、両分子を標的にしたC型肝炎治療法の開発が進められているものの、HCVゲノムを*in vitro*及び*in vivo*において高効率に導入するシステムは開発されておらず、依然としてHCV複製に関与する宿主因子の全容解明には至っていない。<sup>6-8)</sup>

哺乳類細胞におけるRNA発現系は、rRNAを発現するRNA polymerase (pol) I発現系、mRNAを発現するRNA pol II発現系、tRNAなどの短鎖RNAを発現するRNA pol III発現系に大別され、遺伝子発現ではRNA pol II発現系、siRNAなどの発現ではRNA pol III発現系が利用されており、pol II系及びpol III系の発現ベクターは非ウイルスベクター、ウイルスベクターを問わず、多種多様なベクターが開発され、基礎研究及び臨床研究において広く用いられている。一方、pol I発現系は13 kb以上のpre-rRNA (18S, 5.8S, 28S rRNAの前駆体)の発現に関与し、転写されたRNAには5'-Cap構造や3'-polyAテールが付加されないためRNAウイルスのゲノム発現系として適しているものの、応用範囲が限定されるためにpol I発現ベクターの開発は遅々として進展していない。<sup>9-12)</sup>

アデノウイルス (adenovirus; Ad) ベクターは、肝臓に対して高い集積性を有すること、基礎研究のみならず臨床的にも広く用いられていること、様々な感染域を有するベクターが開発されていることから、C型肝炎研究にふさわしい特徴を具備している。しかしながら、Adベクターを利用したHCVゲノム発現ベクターの開発は皆無に等しい。

以上の背景を踏まえ、当研究グループでは、Adベクターを利用したHCVゲノム発現システムの開発を試みた。

## 3. C型肝炎ウイルスゲノム発現ベクターの開発

前述したように、RNA pol I発現系はHCVゲノム発現系に適しているものの、pol I系ベクターの開発は立ち遅れている。そこでまず、RNA pol I発現カセットを有するルシフェラーゼ発現Adベクターを作製し、肝炎研究で汎用されているHuh7細胞に感染させたところ、ルシフェラーゼ発現が観察され、AdベクターにおいてRNA pol I発現カセッ

トが機能していた。

さて、HCV ゲノムには 5'末端から順に Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B がコードされている。Core-NS2 の領域はウイルスゲノムの複製に関与しないことから、この領域をレポーター遺伝子や薬剤耐性遺伝子に置換することで HCV 複製を迅速かつ簡便にモニターするシステム (HCV サブゲノムレプリコン) が開発され、C 型肝炎研究では広く用いられている。そこで、ルシフェラーゼ遺伝子を有する HCV レプリコン発現ベクターの創製を試みることにした。

まず、HCV レプリコンを RNA pol I カセットに挿入したプラスミドベクターを作製し、レポーター遺伝子の発現を検討したところ、ルシフェラーゼの発現が観察され、インターフェロン (IFN) 添加濃度依存的にルシフェラーゼ活性が低下しており、本レプリコン発現プラスミドが HCV 複製評価系として機能することを確認した (Fig. 1)。そこで次に、本プラスミドベクターを用いて HCV レプリコン発現 Ad ベクターの作製を試みたものの、Ad ベクター粒子は産生されなかった。RNA pol I 発現カセットでドライブされたルシフェラーゼを搭載した Ad ベクター粒子は 293 細胞を用いた従来の方法で作製できたことから、HCV レプリコンから産生される因子が Ad パッケージング細胞 (293 細胞) 中での Ad ベクター増幅を阻害している可能性が示唆された。そこで NS3/4A プロテアーゼの認識配列を調べたところ、本プロテアーゼの認識配列 (D/E) XXXX (C/T) (A/S) が複数の Ad ベクター構成タンパク質 (E1A, pIIIa, pol, V) に存在していた。<sup>13-16</sup> このことは、293 細胞中で Ad ベクターが増幅する際にリードスルーした NS3/4A プロテアーゼによってベクター粒子作製が阻害されている可能性を示唆している。そこで、HCV ゲノム発現 Ad ベクター作製の基本戦略は、293 細胞中で Ad ベクター増幅中に HCV ゲノム発現を抑制することにあると考え、転写制御型 RNA pol I 発現系の開発を試みた。

転写制御システムとして、RNA pol II 発現系及び RNA pol III 発現系に広く使用されているテトラサイクリン (tetracycline; tet) 制御系を用い、tet 応答性の RNA pol I プロモーターの作製を試みた。RNA polymerase I プロモーター (412 bp) には、

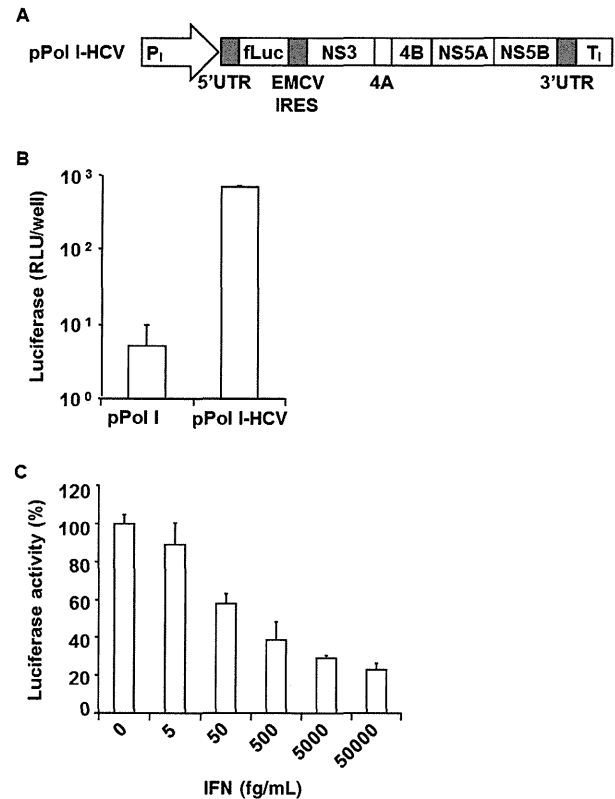


Fig. 1. Preparation of Plasmid Expressing Subgenomic HCV RNA Driven by RNA Pol I Promoter

A) Schematic construct of sub-genomic HCV genome-expression cassette. The HCV sub-genome gene was driven by the RNA pol I promoter ( $P_1$ ) and terminator ( $T_1$ ). B) Transgene expression in Huh7 cells. Cells were transfected with pPol I-HCV. After 24 h of transfection, the luciferase activities were measured. Data are mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). C) Effect of IFN on HCV replication in RNA pol I vector-transfected cells. Huh7 cells were transfected with pPol I-HCV. After 2.5 h of transfection, the cells were treated with IFN at the indicated concentration. After an additional 72 h of incubation, the luciferase activity was measured. The luciferase activity (%) was calculated as a percentage of that in the vehicle-treated cells. Data are mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

コアプロモーター配列 (-1~-40 bp), upstream control element (UCE) 結合配列 (-130~-235 bp) が含まれている。そこで、UCE の上流に tet 応答配列 (tet responsive element; TRE) を挿入したハイブリッドプロモーター  $P_{1235}$ ,  $P_{1311}$ ,  $P_{1412}$  を作製し、ルシフェラーゼ発現を指標にプロモーター活性を解析した [Fig. 2(A)]. まず、tet 制御性 transactivator (tTA) 非存在下での発現を解析したところ、 $P_{1235}$  プロモーターが最も低い値を示していた。さらに、tTA 発現プラスミドを用いて tet 応答性を確認したところ、いずれのハイブリッドプロモーターも tet 添加濃度依存的に転写抑制が観察された [Fig. 2(B)]. 以上の結果を踏まえ、293 細胞で Ad ベクター作製時にリードスルーが少なく、tet



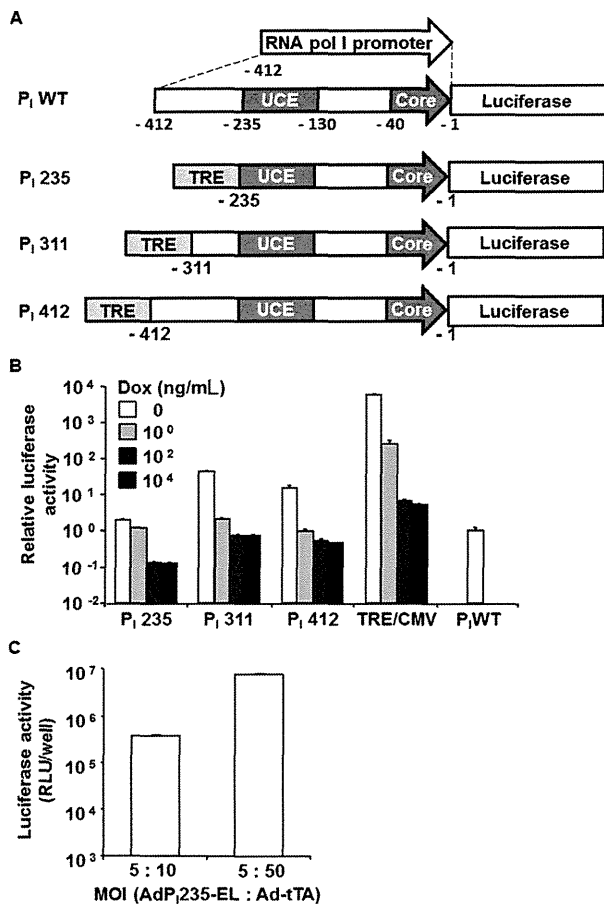


Fig. 2. Development of Tet-controllable RNA Pol I Promoter

A) Construct of the chimeric RNA pol I promoter. The 412-bp human RNA pol I promoter contains Core (-40 to -1), the binding site of the transcription factor, and UCE (-235 to -130). TRE is connected to the full or partial RNA pol I promoter at the indicated sites, resulting in P<sub>1</sub>235, P<sub>1</sub>311 and P<sub>1</sub>412. B) Promoter activities of the chimeric promoter in Huh7 cells. Huh7 cells were co-transfected with the chimeric RNA pol I plasmid coding EGFPLuc,  $\beta$ -galactosidase, and transactivator plasmid (tTA). After 2.5 h of transfection, the cells were treated with Dox at the indicated dose. After an additional 48 h of incubation, the luciferase activities and  $\beta$ -galactosidase activities were measured. The luciferase activity was normalized by the  $\beta$ -galactosidase activity and expressed relative to that of pP<sub>1</sub>WT-EL-transfected cells. Data are mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). C) Transgene activity of Ad vector coding the chimeric promoter construct. Huh7 cells were co-infected with AdP<sub>1</sub>235-EL and Ad-tTA. The MOI ratio of AdP<sub>1</sub>235-EL to Ad-tTA was 5 : 10 or 5 : 50. After an additional 48 h of incubation, the luciferase activity was measured. Data are the mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

応答性を有した P<sub>1</sub>235 を用いて Ad ベクターを作製、P<sub>1</sub>235 が Ad ベクター上でも機能することを確認し、tet 制御性 RNA pol I 発現 Ad ベクターの開発に成功した [Fig. 2(C)].

次に、当該ハイブリッドベクターを用いて、HCV レプリコン発現 Ad ベクターの作製を試みたところ、通常の 293 細胞を用いた作製法によりベクター粒子が産生された。本ベクターを感染させた Huh7 細胞において、HCV レプリコン由来の NS5A の発

現が認められ、ルシフェラーゼも発現していた [Figs. 3(A)-(C)]. 本発現における HCV 由来 RNA polymerase NS5B の関与を検証するために、複製能欠損体  $\Delta$ GDD タイプの NS5B をコードする HCV レプリコンを作製した。 $\Delta$ GDD ベクター感染細胞ではルシフェラーゼ活性及び NS3 発現が観察されなかったことから、本ベクターシステムによって HCV ゲノム複製がモニターできるものと推察された [Figs. 3(D) and (E)].

#### 4. C 型肝炎ウイルスゲノム発現ベクターの応用

現在 HCV 治療薬として、NS5A や NS5B polymerase の阻害剤が臨床試験されているものの、いずれも HCV 因子を標的としていることから臨床応用では耐性ウイルスの出現が危惧されている。<sup>7)</sup> HCV 複製に寄与する宿主因子の同定は耐性ウイルスの出現を回避した治療法開発の鍵を握るものの HCV ゲノム導入法の開発遅延により研究は遅れていた。

ヒト iPS 細胞は、HCV 感受性や治療効果などが異なる患者の細胞から作製可能であることから、iPS 由来肝細胞が C 型肝炎研究に新たなブレークスルーを引き起こすものと期待されている。<sup>17,18)</sup> そこで、HCV レプリコン発現 Ad ベクターを用いて iPS 由来肝細胞における HCV 複製能解析を試みた。

未分化 iPS 細胞ではルシフェラーゼ発現が観察されていなかったが、iPS 由来肝細胞では Huh7 細胞と同程度の発現が認められた [Fig. 4(A)]. HCV RNA ゲノムの発現解析でも同様の傾向を示し、未分化 iPS 細胞では HCV RNA ゲノムは発現せず、iPS 由来肝細胞でのみ複製が観察された [Fig. 4(B)]. また、NS5B 不活性型ベクターでは、ルシフェラーゼ及び HCV ゲノムがいずれも発現していなかったことから、iPS 由来肝細胞は HCV 複製評価系として機能するものと推察される。

HCV は未分化 iPS 細胞では複製せず、iPS 由来肝細胞でのみ複製していたことから、未分化 iPS 細胞から肝細胞への各分化段階の細胞を sequential に解析することで HCV 複製に寄与する新たな宿主因子の同定につながる可能性がある。また、C 型肝炎感染患者間で IFN 療法の感受性が違うことが知られており、治療背景の異なる患者由来の iPS 細胞を用いた解析を行うことで C 型肝炎治療法の最適化に資する情報を集積できると期待される。

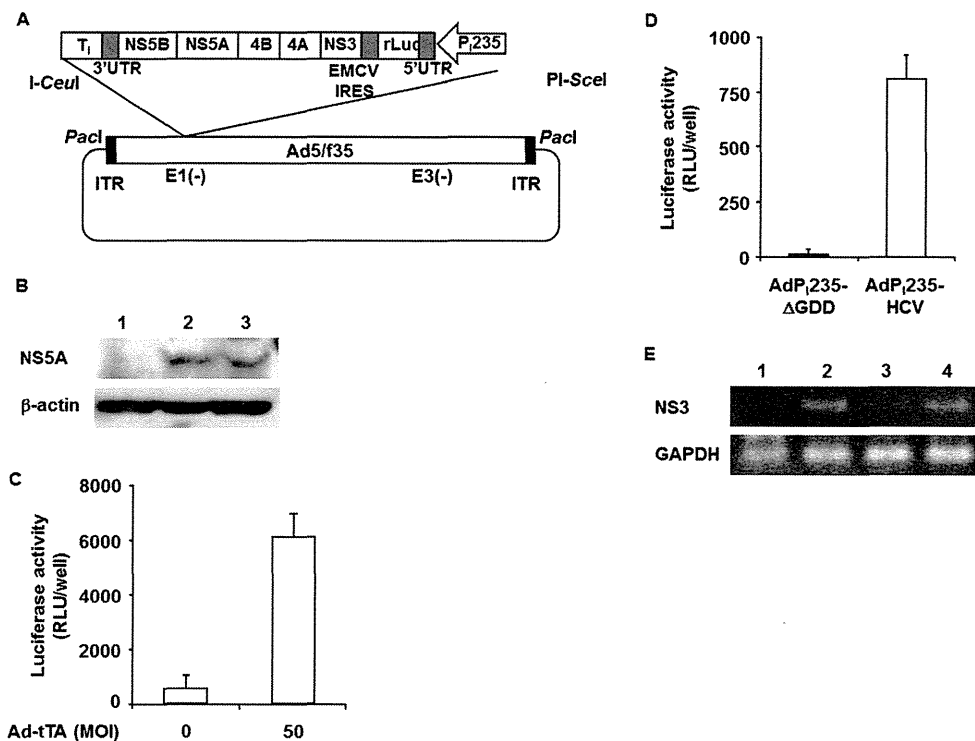


Fig. 3. Preparation of Ad Vector to Monitor HCV Replication

A) Construct of Ad vector. The Ad vector contained the chimeric RNA pol I promoter ( $P_{235}$ ) and the HCV replicon to monitor HCV replication as the luciferase expression. B) Expression of HCV NS5A protein in Huh7 cells transfected with AdP<sub>235</sub>-HCV. The cells were transfected with AdP<sub>235</sub>-HCV (10 MOI) and Ad-tTA (50 MOI). After 72 h of incubation, the cells were harvested, and the lysates (30  $\mu$ g) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibody against NS5A. Huh7 cells and Huh7.5.1 1bFeo cells were used as the negative and positive controls, respectively. Lane 1, Huh7 cells; lane 2, Huh7 cells infected with AdP<sub>235</sub>-HCV; lane 3, Huh7.5.1 1b Feo cells. C) Expression of luciferase in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were co-infected with Ad-P<sub>235</sub>-HCV (10 MOI) and 0 or 50 MOI of Ad-tTA. After an additional 48 h of incubation, the luciferase activity was measured. Data represent the mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). D) Involvement of NS5B in expression of luciferase in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were infected with AdP<sub>235</sub>-HCV or AdP<sub>235</sub>- $\Delta$ GDD (3 MOI) and Ad-tTA (15 MOI). After 24 h, the cells were treated with 10  $\mu$ g/mL of Dox for 48 h. Then, the luciferase activity was measured. Data represent the mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). E) Expression of minus-stranded HCV RNA in the Ad vector-transfected cells. Huh7 cells were co-infected with AdP<sub>235</sub>-HCV or AdP<sub>235</sub>- $\Delta$ GDD at 3 MOI and Ad-tTA at 15 MOI. After 24 h, the cells were treated with 10  $\mu$ g/mL of Dox for 48 h. Then RT-PCR analysis was performed for detection of minus-stranded HCV NS3 and GAPDH. The PCR products were separated on 2% agarose gel. Huh7 cells and Huh7.5.1 1b Feo cells were used as the negative and positive controls, respectively. Lane 1, Huh7 cells; lane 2, Huh7.5.1 1b Feo cells; lane 3, Huh7 cells infected with AdP<sub>235</sub>- $\Delta$ GDD; lane 4, Huh7 cells infected with AdP<sub>235</sub>-HCV.

## 5. おわりに

ようやく最近、わが国でも NS3/4A プロテアーゼ阻害剤が認可され、C 型肝炎治療の奏効率が向上しつつある。しかしながら、HCV が同定されて 20 年以上経つものの、依然として患者血清中の HCV を増幅する方法は確立されておらず、感染モデル動物の開発も立ち遅れており、HCV の変異に対応した治療戦略の構築は皆無に等しい。世界では 1 億 7 千万人の感染者がおり、その数は増加傾向にあることから、感染予防ワクチンが待望されているが、いまだワクチンは開発されていない。

本稿で紹介した HCV ゲノム発現系は、既存の多種多様な Ad ベクター技術を用いることで、迅速かつ簡便に HCV ゲノム発現ベクターを作製可能であること、多種多様な感染域を持つベクターが開発で

きること、複製能欠損 HCV 粒子産生ベクターをワクチンとして応用できることから、基礎・臨床両面において C 型肝炎研究を推進する強力なツールになると期待される。

**謝辞** HCV レプリコンシステムの開発では坂本直哉先生（東京医科歯科大（現北大医））、HCV 感染阻害実験では松浦善治先生（阪大微研）及び谷英樹先生（阪大微研（現感染研））との共同研究による成果です。当ラボ室員及びご高配を頂戴した研究者の方々に衷心よりお礼申し上げます。なお、本稿で紹介したデータの一部は、文部科学省科学研究費補助金（課題番号：23659039）、厚生労働科学研究費補助金のサポートにより実施されたものである。

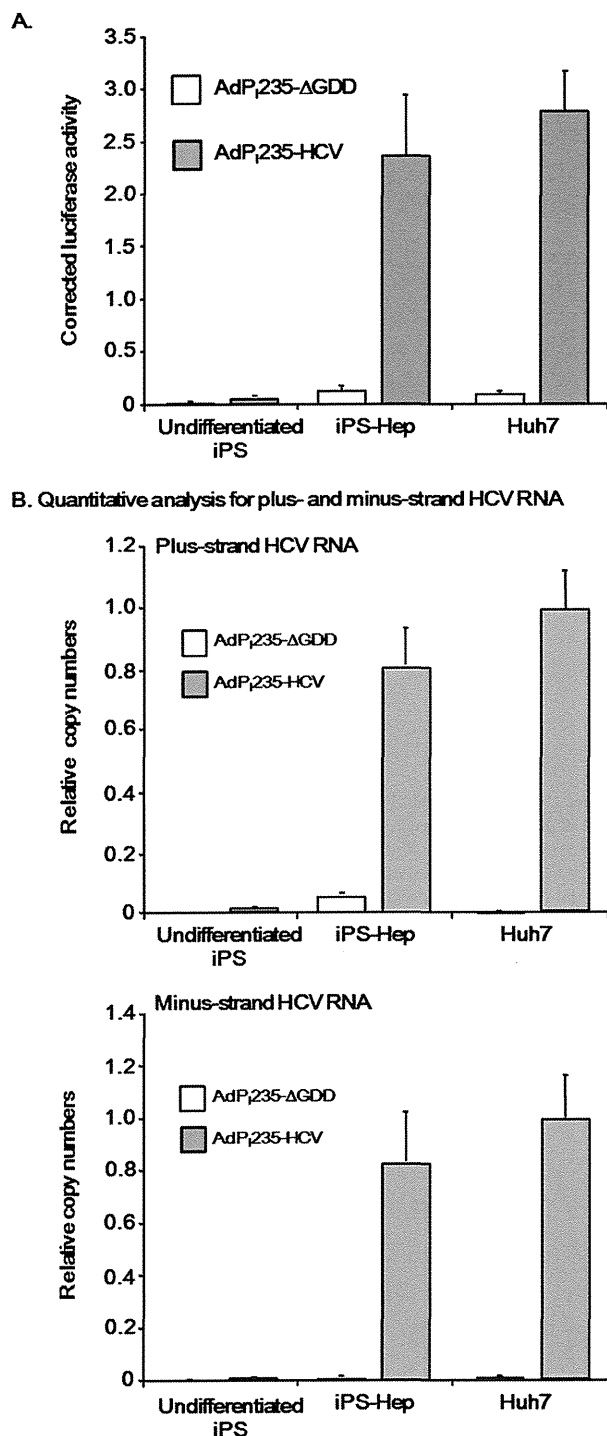


Fig. 4. HCV Replication Assay in iPS-Hep Cells

A) Comparison of replication of HCV subgenomic replicons, AdP<sub>235</sub>-HCV (gray column) and AdP<sub>235</sub>-ΔGDD (open column), in undifferentiated iPS, iPS-Hep and Huh7 cells. The cells were infected with replicons, treated with Dox, and *Renilla* luciferase activity was measured. To normalize for infectivity of Ad vector, cells were co-infected with AdP<sub>235</sub>-fluc and Ad-tTA. After 72 h, firefly luciferase activity was measured. Corrected luciferase activity was calculated as the ratio of *Renilla* luciferase activity to firefly luciferase activity. B) Real-time PCR analysis of HCV plus- and minus-strand RNA in iPS-Hep cells. iPS-Hep cells were infected with replicons, and total RNA was subjected to real-time PCR analysis. The copy numbers were shown as ratio of those of Huh7. Data are presented as means ± S.D. ( $n=3$ ).

## REFERENCES

- 1) Choo Q. L., Kuo G., Weiner A. J., Overby L. R., Bradley D. W., Houghton M., *Science*, **244**, 359–362 (1989).
- 2) Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R., *Science*, **285**, 110–113 (1999).
- 3) Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H. G., Mizokami M., Bartenschlager R., Liang T. J., *Nat. Med.*, **11**, 791–796 (2005).
- 4) Meredith L. W., Wilson G. K., Fletcher N. F., McKeating J. A., *Rev. Med. Virol.*, **22**, 182–193 (2012).
- 5) Sabahi A., *Virol. J.*, **6**, 117 (2009).
- 6) Jopling C. L., Yi M., Lancaster A. M., Lemon S. M., Sarnow P., *Science*, **309**, 1577–1581 (2005).
- 7) Schlutter J., *Nature*, **474**, S5–S7 (2011).
- 8) Watashi K., Ishii N., Hijikata M., Inoue D., Murata T., Miyanari Y., Shimotohno K., *Mol. Cell*, **19**, 111–122 (2005).
- 9) Flatz L., Bergthaler A., de la Torre J. C., Pinschewer D. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4663–4668 (2006).
- 10) Flick R., Pettersson R. F., *J. Virol.*, **75**, 1643–1655 (2001).
- 11) Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6108–6113 (2000).
- 12) Neumann G., Watanabe T., Ito H., Watanabe S., Goto H., Gao P., Hughes M., Perez D. R., Donis R., Hoffmann E., Hobom G., Kawaoka Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9345–9350 (1999).
- 13) Clarke B., *J. Gen. Virol.*, **78**, 2397–2410 (1997).
- 14) Kolykhalov A. A., Agapov E. V., Rice C. M., *J. Virol.*, **68**, 7525–7533 (1994).
- 15) Komoda Y., Hijikata M., Sato S., Asabe S., Kimura K., Shimotohno K., *J. Virol.*, **68**, 7351–7357 (1994).
- 16) Urbani A., Bianchi E., Narjes F., Tramontano A., De Francesco R., Steinkuhler C., Pessi A., *J. Biol. Chem.*, **272**, 9204–9209 (1997).
- 17) Moriguchi H., Chung R. T., Sato C., *Hepatol-*

- 
- ogy, **51**, 344–345 (2010).
- 18) Schwartz R. E., Trehan K., Andrus L., Sheahan T. P., Ploss A., Duncan S. A., Rice C. M., Bhatia S. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 2544–2548 (2012).

# 応用が広がる DDS

人体環境から農業・家電まで

第1編 人体環境における DDS 医薬の学問的基礎と応用展開

第1章 医学・薬学を中心とした学問的基礎

第3節 吸収障壁の克服

**4** タイトジャンクションを標的とした薬物吸収促進技術

大阪大学 土山 遼

大阪大学 長瀬 翔太郎

大阪大学 八木 清仁

大阪大学 近藤 昌夫

## 4 タイトジャンクションを標的とした薬物吸収促進技術

## 1. はじめに

ドイツの哲学者ヘーゲルは、「事物のらせん的發展の法則」を提唱している。これは、物事はまっすぐに伸びた階段を上るように発展していくのではなく、らせん状の階段を上るように発展するという法則である。らせん階段を上る人を上から眺めると、一定間隔で同じ位置に戻ってくるように見えることから、古く懐かしいものが新しい価値観を伴って再び現れてくるといわれている。

粘膜吸収促進研究の歴史を紐解くと、すでに1961年には粘膜バリア制御による薬物吸収促進の proof of concept (POC) が確立されており、この報告が tight junction (TJ) を標的とした吸収促進法のらせん的發展の端緒となっている<sup>1)</sup>。30年余りにわたり粘膜バリア制御による薬物吸収促進法の開発が進められてきたものの、TJバリア阻害に伴い薬物以外の物質が流入する危険性を拭い切れないこと、吸収促進効果に組織特異性が乏しいこと、粘膜障害性を伴う方法論が多いことから、TJ制御による薬物吸収促進の実用性に疑問符が打たれ、90年代に入ると、粘膜吸収促進研究はトランスポーターや受容体を利用したアプローチにシフトしてきた。

さて、90年代の京都大学月田グループによる TJ 分子基盤解析研究の進展には目を見張るものがあり、TJシールの分子基盤が詳らかにされ、TJを標的とした粘膜吸収法の新たな可能性が提唱されつつある。

以上の背景を踏まえ、本稿では、日本発の上皮細胞バリアの生物学<sup>2)</sup>に立脚した吸収促進研究のらせん的發展について、claudin (CL) に焦点を絞り概説したい。

2. 上皮細胞バリアの生物学<sup>2)</sup>と粘膜吸収促進

進化の過程において、多細胞生物は生体内外・組織内外を隔てる障壁として上皮細胞を発達させており、半世紀以上前から上皮バリア制御による薬物吸収促進が研究されてきた。すでに1961年には、WindsorとCronheimによりEDTA処理に伴うヘパリンの腸管吸収促進が報告されており、粘膜バリア制御による薬物吸収促進のPOCが確立されている<sup>1)</sup>。当時は、「粘膜バリア=上皮バリア」と考えられており、EDTAの吸収促進機構は不明なままであった。1963年に、隣接する上皮細胞の間隙にTJが存在し、TJによって細胞間隙がシールされることで物質透過が阻害されていることが示され、「粘膜バリア=TJシール」との概念が提唱された(図1)<sup>3)</sup>。時をおかずして、EDTAの粘膜吸収促進活性がTJシール機能阻害に起因することが報告され、粘膜吸収促進の基本戦略がTJシール制御となり、粘膜吸収促進研究が本格的に始動した<sup>4)</sup>。

当然のことながら、粘膜吸収促進剤の開発にはTJシール分子基盤の解明が不可欠であることから、多方面から分子基盤の解明が進められた(表1)。1982年にはTJシールが脂質ミセルで構成されている説が提唱され、脂肪酸や界面活性剤などに焦点を当てた吸収促進剤の探索へとシフトしていった<sup>5)~7)</sup>。しかしながら、これらの吸収促進剤は、粘膜障害性などを発揮するものが多いことに加えTJ開口に伴う非特異的な物質流入が不可避であることから、90年代に入ると経上皮薬物吸収は、細胞間隙経路を介したアプローチから、トランスポーターや受容体を介した細胞内経路輸送法開発へとパラダイムシフトが生じている<sup>8),9)</sup>。

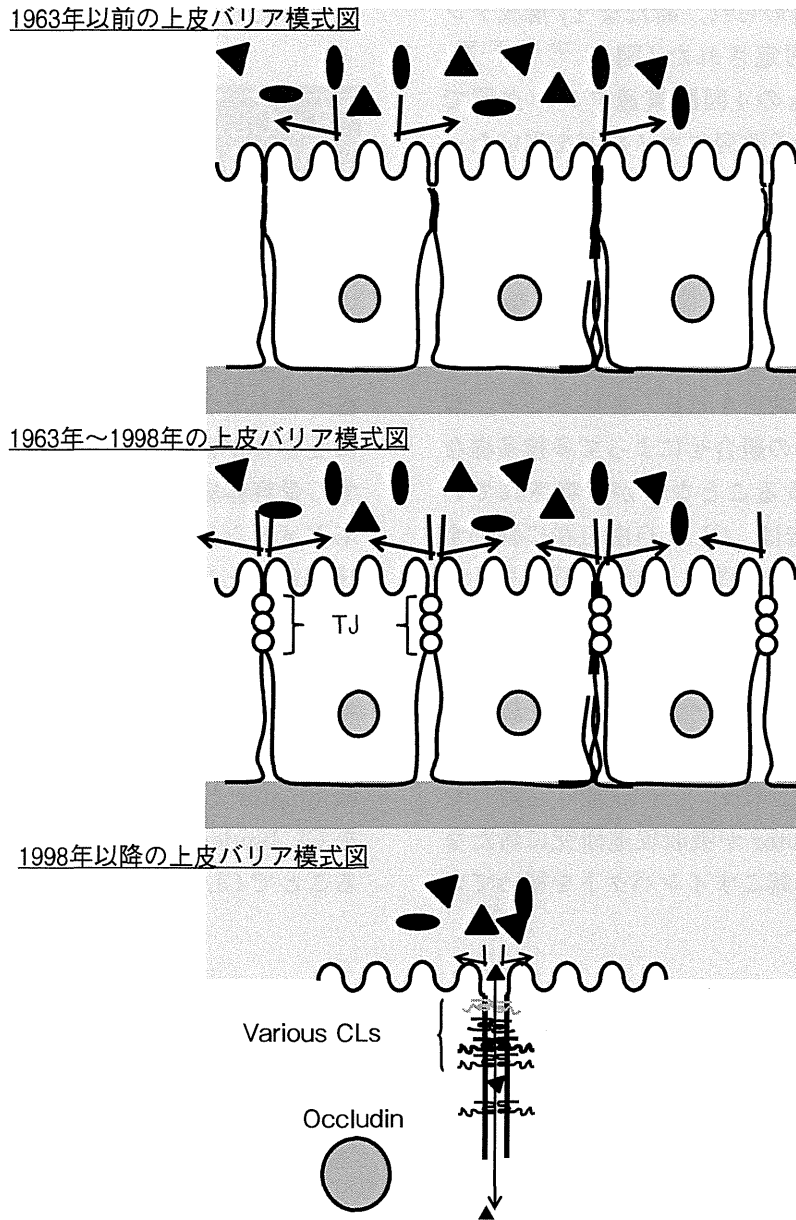


図1 上皮バリア

1963年以前は上皮バリア=上皮細胞層、1963～1998年は上皮バリア=TJシールと考えられていた。その後、TJ構成タンパク質の発見により、上皮バリア=occludin, CLsと考えられている。

表1 上皮細胞バリアの生物学の進展

年代	上皮細胞バリアに関する発見
1963	TJの発見
1973	TJストランドの発見
1982	TJの脂質ミセル説が提唱
1993	Occludinの発見
1998	CLの発見
1999～	CLのTJバリア機能が証明
2005	Tricellulinの発見
2011	細胞間隙経路および細胞内経路の共役物質輸送にCLが関与

さて、1993年にTJに4回膜貫通タンパク質であるoccludinが含まれていることが見出され、TJシールが膜タンパク質によって形成されている可能性が示唆された<sup>10)</sup>。Occludinの細胞外領域ペプチドがTJのバリア機能を低下させること、マンニトールなどの透過性を亢進できることなどが見出され、TJシールの分子基盤を標的とした吸収促進法が提唱された<sup>11)</sup>。しかしながら、occludinを欠損させても構造および機能両面において正常なTJシールが形成されていたことから、TJシール機能

を担う分子の探索が進められ、新たな TJ 構成タンパク質として CL が同定された (図 2)<sup>12), 13), 15), 34)</sup>。CL は分子量約 23 kDa の 4 回膜貫通タンパク質であり、毒素断片や遺伝子改変マウスなどを用いた一連の解析から、CL が TJ シールの機能本体であることが証明されている<sup>14)~16)</sup>。

これまでに、CL の発現およびバリア機能には組織特異性があること、分子量・荷電選択的な物質透過経路として機能すること、ラテラル面においてホモおよびヘテロストランドを形成していること、27 種類存在するメンバーの組合せによって多種多様なストランドを構築しうることなどが示唆されている<sup>15), 17)</sup>。これらの報告は、CL を自由自在に制御することができれば、組織特異性・透過物質選択性を兼ね備えた新たな吸収促進法の確立につながることを示している。

以上の背景を踏まえ、TJ 分子基盤の同定以前の吸収促進剤は第一世代の TJ modulator と定義され、occludin や CL などの TJ 分子基盤に立脚した第二世代の TJ modulator が吸収促進研究に新たなブレイクスルーを引き起こすインパクトを秘めている

と考えられている<sup>18)</sup>。

### 3. CL を標的とした粘膜吸収促進の POC

さて、CL を標的とした粘膜吸収促進は、毒素の断片を用いるというユニークな方法で検証されている。*Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) は食中毒を引き起こす毒素であり、細菌学の領域では古くから毒性発現機構の解析が進められ、1997 年に受容体が同定されている<sup>19)</sup>。CPE は C 末に存在する受容体結合ドメインを介して細胞に結合し、N 末ドメインによって下痢活性を発揮する<sup>20), 21)</sup>。興味深いことに、1999 年に CPE 受容体が CL-4 と同一分子であることが報告され、CPE の受容体結合領域 (C-CPE) を上皮細胞に添加することで、細胞毒性を伴うことなく TJ シールを減弱すること、このとき CL-4 レベルが減少すること、C-CPE が CL modulator として機能することが見出され、C-CPE を CL binder/modulator のモデル分子として用いることで CL を標的とした粘膜吸収促進研究が進め

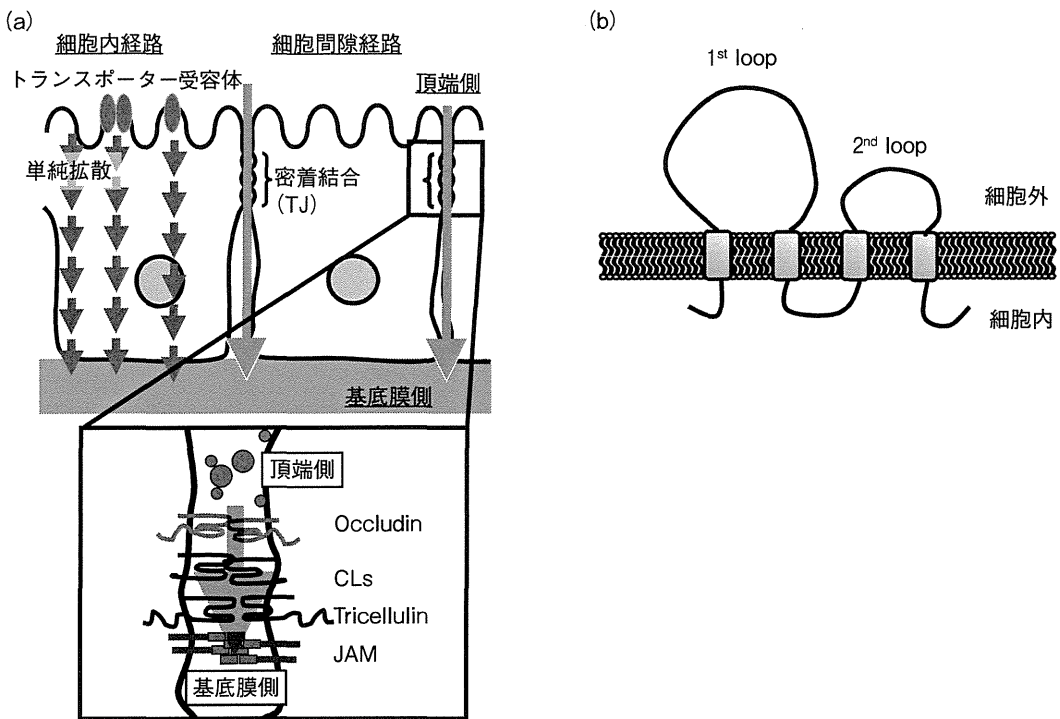


図 2 上皮における物質透過

(a) 上皮細胞層における物質透過経路 上皮細胞層における物質透過経路は、トランスポーター、受容体、受動拡散などを介する細胞内経路と TJ を介する細胞間隙経路に大別される<sup>34)</sup>。(b) Claudin 98 年に京大古瀬らによって見出された TJ 構成タンパク質。これまでに 27 種類の分子が見出されており、発現およびバリア機能に組織特異性が認められている<sup>15)</sup>。



られた<sup>16)</sup>。

ラット空腸を用いた *in situ* loop 法による解析では、C-CPE 添加に伴いデキストラン (分子量 4 kDa) の粘膜吸収が促進されること、C-CPE の CL 結合ドメイン欠損体では血中デキストラン濃度の上昇が観察されなかったことから、C-CPE は CL-4 との相互作用を介して粘膜吸収促進効果を発揮していることが示された。C-CPE は臨床応用されているカプリン酸ナトリウムに比して 400 倍もの吸収促進活性を有しており、C-CPE 処理による粘膜障害性が観察されなかったことから、CL を標的とした粘膜吸収促進戦略の有用性が示唆されている (図 3 (a), (b))<sup>22)</sup>。興味深いことに、C-CPE は分子量 10 kDa までのデキストランの吸収を促進し (図 3 (c))、結腸では吸収促進効果を示さないことから、CL を標的とすることで透過物質選択的・組

織特異的な吸収促進が可能になるものと考えられている<sup>22)</sup>。また、現在、骨粗鬆症治療の注射剤として臨床応用されているペプチド医薬 (hPTH) の粘膜吸収促進効果を解析したところ、CL-4 binder 添加に伴い hPTH の経鼻・腸管・経肺吸収が促進されていたことから、CL binder を利用したバイオ医薬の非侵襲性投与の POC も確立されている (図 4)<sup>23)</sup>。

以上、これまでに C-CPE を CL binder のモデル分子として用いることで、TJ シールの分子基盤である CL を標的とした粘膜吸収促進戦略が提唱されており、CL binder の吸収促進特性の詳細解析 (透過物質選択性、組織特異性)、および CL binder 処理に伴う安全性情報の集積が待望される。

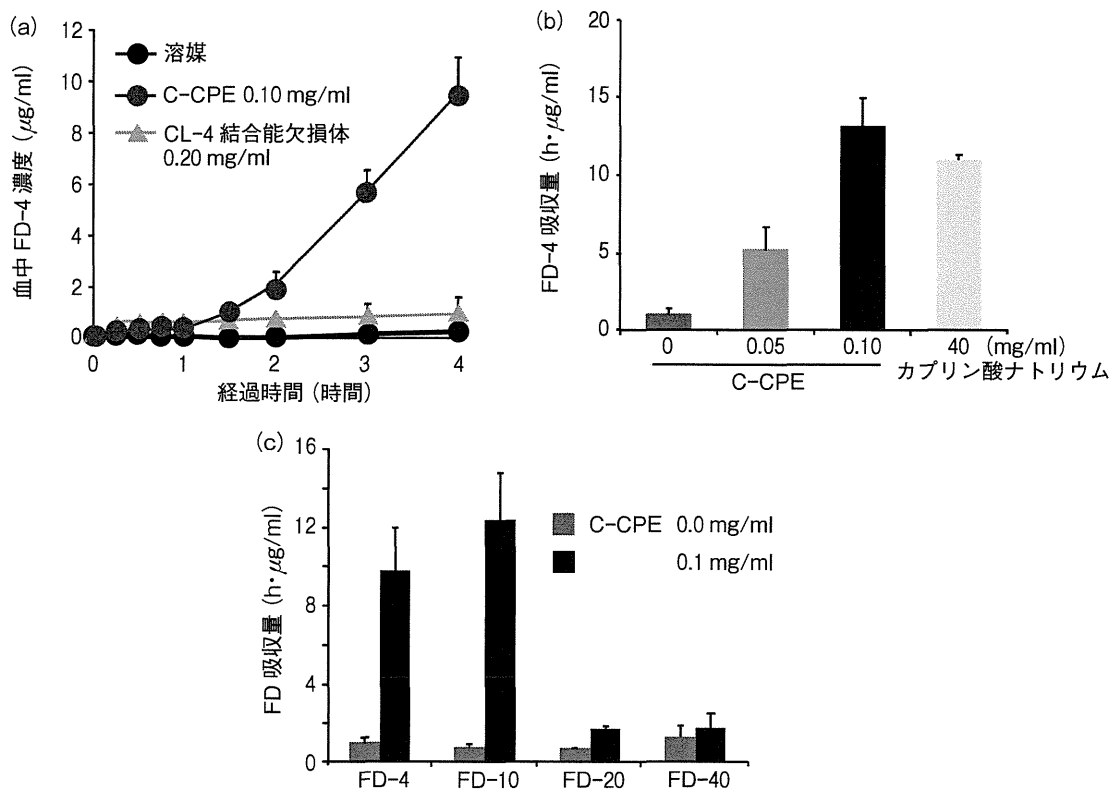


図 3 CL を標的とした粘膜吸収の POC<sup>22)</sup>

(a) C-CPE の粘膜吸収促進活性 蛍光標識した分子量 4 kDa のデキストラン (FD-4) と C-CPE もしくは CL 結合ドメイン欠損体を腸管内に添加し、経時的に血液を回収し、血中の FD-4 濃度を測定した。(b) CL を標的とした粘膜吸収促進法の活性比較 臨床応用されている吸収促進剤であるカプリン酸ナトリウムと FD-4 の吸収促進効果を比較した。経時的に血液を回収し、6 時間目までの FD-4 吸収量を血中濃度下面積により算出した。(c) CL を標的とした吸収促進効果の分子量依存性 蛍光標識したデキストラン (分子量 4 kDa (FD-4)、分子量 10 kDa (FD-10)、分子量 20 kDa (FD-20)、分子量 40 kDa (FD-40)) と C-CPE を腸管内に添加し、経時的に血液を回収し、6 時間目までの FDs 吸収量を血中濃度下面積により算出した。

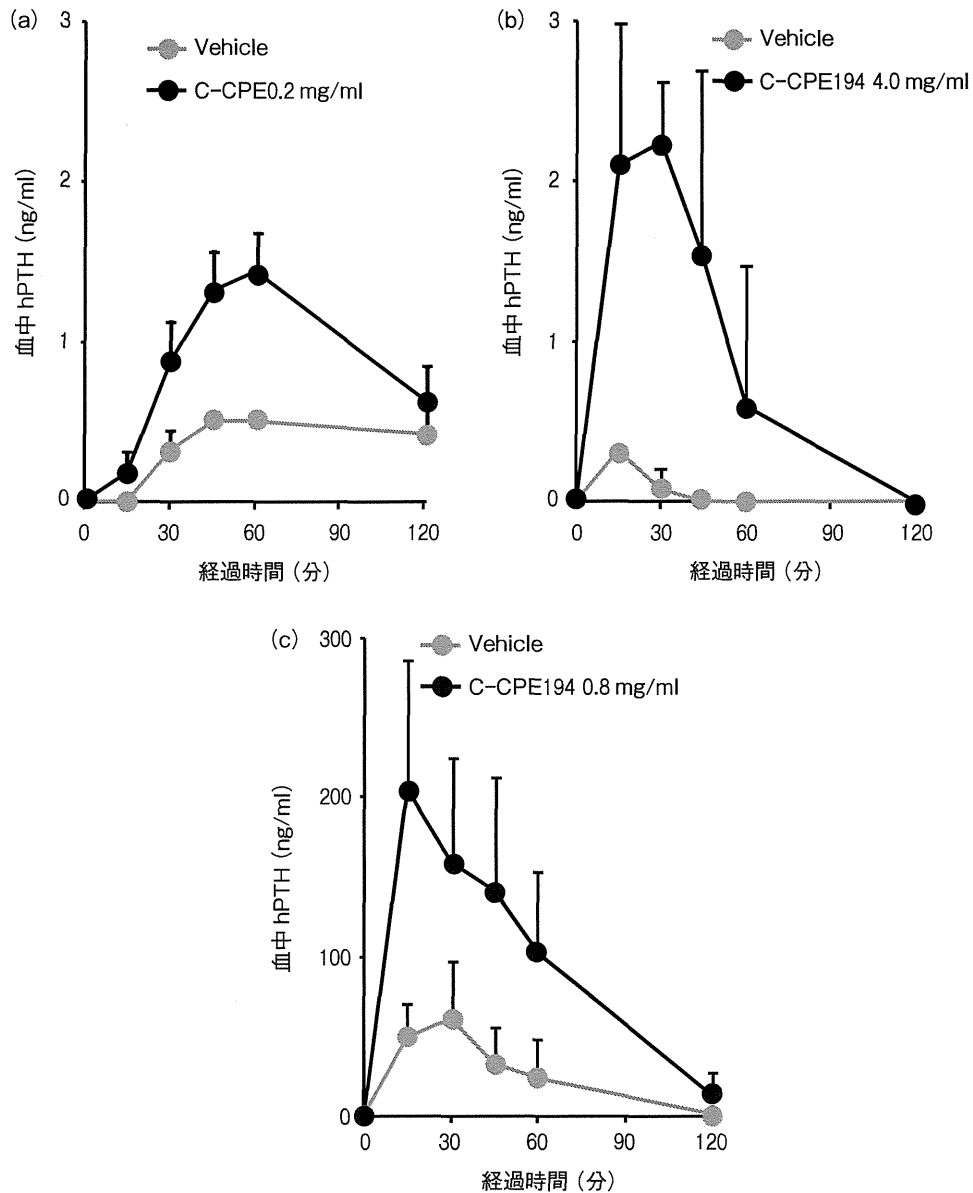


図4 CL binder によるバイオ医薬の粘膜吸収促進<sup>23)</sup>

ペプチド医薬として副甲状腺ホルモン (hPTH) と C-CPE, C-CPE194 (C-CPE に比して 10 倍以上の溶解性を示す C-CPE 変異体) を (a) 経鼻投与, (b) 腸管内投与, (c) 経肺投与し, 経時的に血中 hPTH 濃度を測定した。

## 4. 新規 CL の創製

前述したように, C-CPE を用いることで CL を標的とした粘膜吸収促進の POC が確立されている。CL には 27 種類の分子が存在し, 発現およびバリア機能には組織特異性が観察されることから, CL バリアを分子種特異的に制御することができれば, 「組織特異的および透過物質選択的吸収促進」という次世代の吸収促進技術の開発につながると期

待される。しかしながら, CL は抗原性が低いうえに細胞外領域が非常に小さい (1st loop が約 50 アミノ酸, 2nd loop が約 15 アミノ酸) ことから, 抗体を含めた CL binder の創製は立ち遅れており, CL を標的とした吸収促進研究は遅々として進展していない。

これまでに CL binder 創製については, C-CPE, 抗体, CL 細胞外領域ペプチド, 免疫抗体ライブラリなどを用いた試みがなされてきたが, 粘膜吸収促進活性が報告されているのは C-CPE を用いたアプ

ローチのみである。そこで次に、C-CPE を prototype として用いた新規 CL binder 創製について紹介したい。

C-CPE を prototype として用いて新規 CL binder の創製を図るために、各種欠損体が作製され、C 末の 16 アミノ酸中に機能ドメインが存在することが示唆された<sup>24)</sup>。その後、アラニンスキャンにより、CL 結合性に関与するアミノ酸が同定され、機能残基をランダムなアミノ酸に置換した C-CPE 変異体提示ファージライブラリが創製された<sup>25), 26)</sup>。

さて、当然のことながら binder の創製にはパンニングソースが必要となる。しかしながら、CL は疎水性領域の多い 4 回膜貫通タンパク質であり、CL binder のスクリーニング系に資するリコンビナントタンパク質の精製に成功しているのは CL-4 のみである。そのため CL binder スクリーニング法の開発は遅々として進展しておらず、ここにも CL binder 創製の難しさがある。東大先端研の浜窪博士らは、発芽バキュロウイルス (BV) の膜上に膜タンパク質が intact な状態で高密度提示されることを明らかにしていた<sup>27)</sup>。CL 提示 BV を作製したところ、CL が正常な topology を持って BV 膜上に提示されること、CL 提示 BV を用いることで CL 結合性ファージがスクリーニングできることが見出され、膜タンパク質提示 BV を利用した CL binder スクリーニング系が構築されている (図 5)<sup>26)</sup>。

これまでに、パイロットスタディとして CL-1 binder の探索が進められており、CL-1 提示 BV を用いたスクリーニングにより、C-CPE 変異体ライブラリの中から CL-1 に対して結合性を示す C-CPE 変異体 (m19) が得られている<sup>27)</sup>。興味深いことに、m19 は CL-1 のみならず CL-2, -4, -5 に対しても結合性を示しており、はじめての広域 CL binder であった (図 6)<sup>28)</sup>。すでに m19 の X 線構造が詳らかにされており、m19 は C-CPE と同じ基本骨格を有していること、C-CPE に比して CL 結合領域が正電荷を帯びていることが明らかになっている。CL 上の C-CPE 結合ドメインの等電点 (CL-4, pI = 9.70 ; CL-1, pI = 4.18 ; CL-2, pI = 4.18 ; CL-5, pI = 4.18) を考慮すると、C-CPE の CL 結合ドメインの電荷を制御することで CL 結合特性を改変できる可能性があり、C-CPE や m19 などの立体構造情報をもとにした druggable CL binder の創製が期待される<sup>28)</sup>。

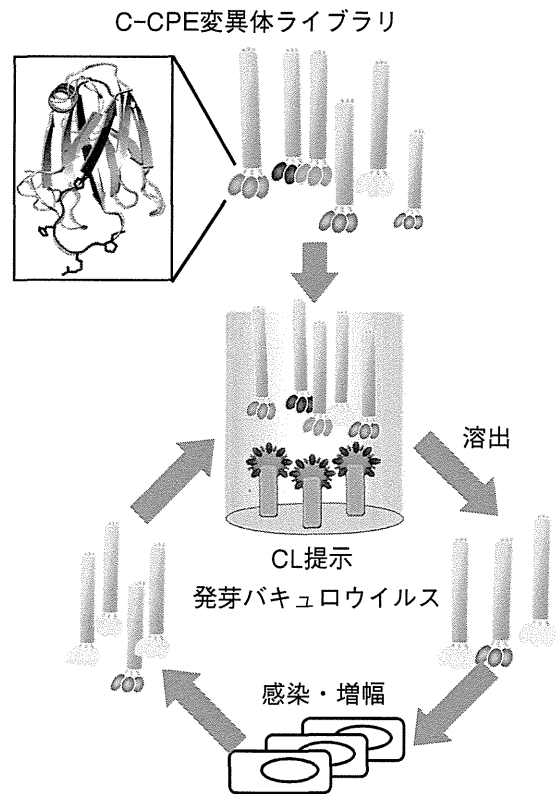


図 5 CL binder スクリーニング系<sup>26)</sup>

C-CPE の CL 結合ドメインをランダムなアミノ酸に置換した C-CPE 変異体提示ファージライブラリを作製し、CL 提示発芽バキュロウイルス (BV) を用いて、C-CPE 変異体ライブラリの中から CL 結合性ファージをスクリーニングした。

## 5. おわりに——今後の課題および方向性

上皮細胞層は、細胞間隙を TJ でシールすることで恒常性を維持し、2つの細胞の間隙に存在する TJ (bTJ, bicellular TJ) に加え、3細胞間に存在する TJ (tTJ, tricellular TJ) によりシールすることで生体内外を隔てる障壁としての機能を発揮する。

本稿で述べてきたように、bTJ 構成タンパク質についての理解は進み、bTJ を標的とした粘膜吸収促進の POC も確立されているものの、tTJ を標的としたアプローチはほとんど進展していなかった。つい最近、カプリン酸ナトリウム処理の初期段階で tTJ 構成タンパク質である tricellulin の局在変化が報告され、従来 bTJ 制御が作用点として考えられてきたカプリン酸ナトリウムの吸収促進メカニズムに新たな可能性が提起された<sup>29)</sup>。また、trichel-

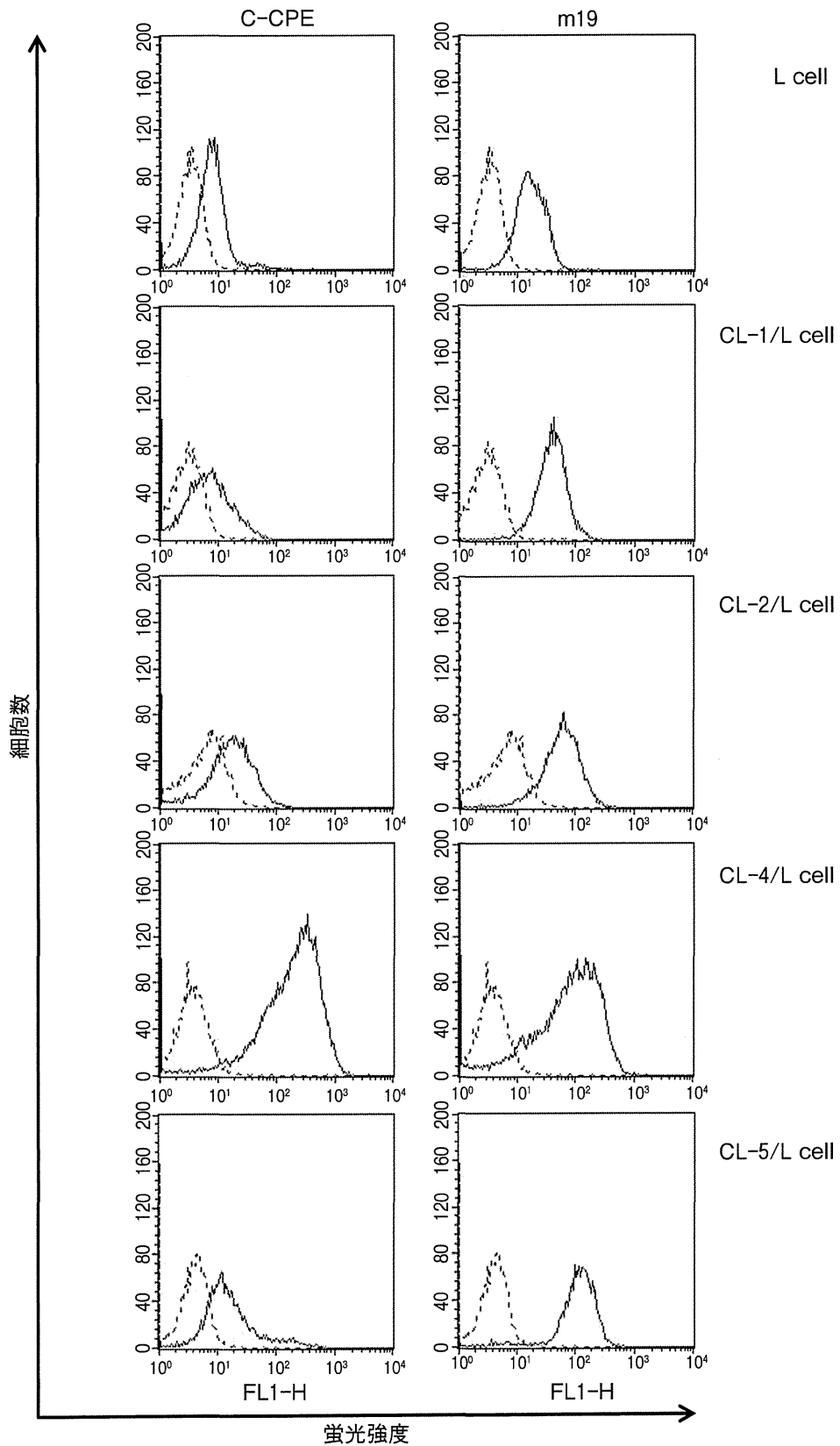


図6 m19のCL結合特性解析<sup>28)</sup>

CL非発現細胞に各種CLを導入した細胞を用いてCL binderの結合性をFACSにより解析した。なお、検出には、CL binderに付加してあるhisタグを利用した。破線はm19未添加、実線はm19添加。