

# 各種有効成分の効率的な皮膚内送達方法の開発

大阪大学大学院薬学研究科

近 藤 昌 夫

Claudin, a 24-kDa integral membrane protein with four transmembrane domains, plays a pivotal role in barrier-function of epithelial cell sheets. There are more than 20 members of the claudin family with different tissue-specific expression and barrier-function. The epidermis consists of several cell layers of strata corneum, granulosum and spinosum. Recently, Tsukita's group found that claudin-1 is expressed in the strata granulosum and is responsible for epidermal barrier. This finding indicates that a claudin-1 modulator may be a promising candidate for trans-epidermal delivery of cosmetics, such as anti-aging compounds and radical scavengers. However, a method to modulate claudin-1-barrier has never been developed.

A C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) is the only claudin modulator, and C-CPE disrupts barrier-function of claudin-4 in epithelial cells. We previously showed that modulation of claudin-4 is a novel strategy for intestinal absorption of drugs using C-CPE as a claudin modulator, and we also found that deletion of the C-terminal 16 amino acids of C-CPE lost its ability to modulate claudin-4. Taken together, we started to develop a claudin-1 modulator using C-CPE as a prototype. Previously, substitution of Tyr310 with Cys reduced binding of *Clostridium perfringens* enterotoxin to its receptor. Until now, we investigated roles of the tyrosines (Tyr306, Tyr310, and Tyr312) of the C-terminal 16 amino acids of C-CPE in claudin-4 binding and modulation of epithelial barrier by site-directed mutagenesis. Single mutations of Tyr306, Tyr310 and Tyr312 to alanine resulted in partial reduction of claudin-4-binding. Double mutants Tyr306Ala/Tyr310Ala and Tyr306Ala/Tyr312Ala lost the ability to bind to claudin-4 and to modulate epithelial barrier. These data provide us useful information in the development of claudin-1 modulator based on C-CPE.

## 1. はじめに

最近、皮膚の生理学が進展し、しみやそばかすの要因や老化に伴うしわなどの生成メカニズムが明らかになりつつあり、色素沈着を阻害する物質、抗酸化活性物質、コラーゲン合成促進物質などが美白成分やアンチエイジング成分として注目されている。

これらの美白成分やアンチエイジング成分の作用部位は、皮下に存在するメラノサイト細胞や真皮領域などであり、単に皮膚表面にこれら成分を塗布しただけではメラノサイト細胞や真皮に到達する成分は極めて少なく各種有効成分の効果を期待することができない。皮膚内への物質透過は、角層ばかりでなく表皮下部に位置する重層上皮細胞層により制御されており通常外部からの物質の侵入は抑制されている。この重層上皮細胞層の物質透過抑制機構は長年不明であったが、2002年に京都大月田グループにより細胞と細胞の間隙に存在する claudin-1 蛋白質によって細胞間隙がシールされ重層上皮細胞層の物質の漏れ（移動）が阻害されていることが明らかにされた<sup>1)</sup>。この報告は、claudin-1 を制御することにより美白成分の重層上皮

細胞層透過を亢進できる可能性を示唆しているものの、まだ claudin を利用した皮膚内物質透過方法の開発研究は皆無である。

Claudin のバリア機能を阻害する分子としては、ウェルシュ菌が産生する *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) の C 末ペプチド断片 (C-CPE) が claudin-4 阻害分子として唯一知られていた<sup>2)</sup>。そこで当グループでは、claudin-4 阻害分子である C-CPE を用いて、claudin の薬物送達における標的分子としての有用性について解析を試み、C-CPE がラット腸管においてカプリン酸の 400 倍もの吸収促進作用を示すこと、この吸収促進作用には C-CPE と claudin-4 との相互作用が関与していることを見出し、claudin が薬物送達の標的分子として有用であることを見出した<sup>3)</sup>。さらに、C-CPE の C 末端側 16 アミノ酸領域を欠損させることにより、claudin-4 結合性および吸収促進作用が完全に消失していたことから、これら C 末 16 アミノ酸中に機能ドメインが存在するものと推察された<sup>3, 4)</sup>。また、過去の CPE 研究において、Tyr310 を Cys に置換することにより CPE の受容体結合活性が著しく低下するとの報告がなされていた<sup>5)</sup>。

これらの CPE 研究および当研究グループの研究成果を踏まえ、本研究では、C-CPE の機能解析を試み (Fig. 1)、ファージライブラリを作製し、claudin-1 binder のスクリーニングを試みた。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 変異型 C-CPE の作成

C-CPE 遺伝子 (大阪大学微生物病研究所 堀口安彦博



Development of a novel method for trans-epidermal delivery of cosmetics

Masuo Kondoh

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

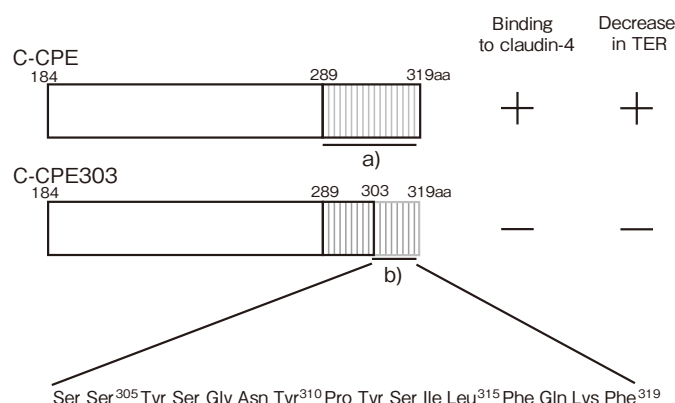


Figure 1 Diagram of C-CPE structure.

C-CPE is the C-terminal fragment of CPE. C-CPE binds to claudin-4 and decreases TJ barrier function as indicated by a decrease in TER (2). The C-terminal 30 amino acids of CPE and C-CPE mediate interaction with the CPE receptor and claudin, respectively <sup>a)</sup>(6). Further analysis shows that the C-terminal 16 amino acids are responsible for the interaction of C-CPE with claudin and for its ability to decrease the TJ barrier function <sup>b)</sup>(4).

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis.

The underline in forward primer and in reverse primer is NdeI site and BamHISite, respectively. The italic letters in the reverse primer indicated the site of mutation.

| Primers                              | Sequences (5' to 3')                                                                                                     |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Common forward primer                | ggaattc <u>cat atg</u> gaa aga tgt gtt tta aca gtt cca tct aca                                                           |
| Reverse primer for Y306A             | cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg gta att<br>tcc act <u>agc</u> tga tga att agc ttt cat tac               |
| Reverse primer for Y310A             | cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg <i>ggc</i> att<br>tcc act ata tga tga att agc ttt c                     |
| Reverse primer for Y312A             | cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga <u>agc</u> agg gta att<br>tcc act ata tga                                       |
| Reverse primer for Y306A/Y310A       | cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg <i>ggc</i><br>att tcc act <u>agc</u> tga tga att agc ttt cat tac        |
| Reverse primer for Y306A/Y312A       | cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga <u>agc</u> agg gta<br>att tcc act <u>agc</u> tga tga att agc ttt cat tac aag    |
| Reverse primer for Y310A/Y312A       | cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga <u>agc</u> agg <i>ggc</i><br>att tcc act ata tga tga att agc ttt cat tac        |
| Reverse primer for Y306A/Y310A/Y312A | cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga <u>agc</u> agg <i>ggc</i><br>att tcc act <u>agc</u> tga tga att agc ttt cat tac |

士より供与)を鋳型とし、Table 1に示した各種primerを用いてPCR法により目的のアミノ酸をアラニンに置換した変異型C-CPEをクローニングした。変異型C-CPE DNA断片をHisタグ融合タンパク質発現プラスミドpET-16bに挿入することにより変異型C-CPE発現プラスミドを作製した。大腸菌BL21 (DE3) (Novagen)を用いて各種タンパク質を発現・産生させた後、HisTrap<sup>TM</sup> Kit (GE Healthcare)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより各種変異型C-CPEを精製した。

## 2-2. 変異型C-CPEによるC-CPE-PSIF拮抗阻害作用

Claudin-4を強制発現させたマウス線維芽細胞 (claudin-4

発現細胞)を播種し、一昼夜培養した。変異型C-CPE添加1時間後にclaudin-4指向性のタンパク質合成阻害タンパク質C-CPE-PSIF (7) (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を加え、C-CPE-PSIF添加36時間後にCytoTox96<sup>®</sup> (Promega)を用いて培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 量を測定した。各種変異体の細胞傷害性抑制作用は、C-CPEによるLDH放出抑制率を100%とした各種変異体の阻害率 (%) として算出した。

## 2-3. 変異型C-CPEとclaudin-4との結合性評価 (pull down assay)

Caco-2細胞を回収し、lysis buffer (1% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail 含有PBS)を用いて細胞

を溶解させ、予め Ni-NTA Agarose (Invitrogen<sup>TM</sup>) に作用させることで非特異的な吸着物質を除去した。Caco-2 細胞溶解液と各種変異型 C-CPE を 37℃ で 30 分間反応させた後、Ni-NTA Agarose を加え 4℃、3 時間反応させた。遠心分離した沈澱画分を lysis buffer で洗浄した後、ウェスタンブロッティングにより claudin-4 および変異型 C-CPE を検出し、変異型 C-CPE の claudin-4 結合性を評価した。

## 2-4. 変異型 C-CPE の膜電気抵抗値に及ぼす影響

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を Transwell® (Corning) に播種し、Transwell 上に単層膜を形成させた。一定期間培養後、各種変異型 C-CPE を作用させ、TJ のバリア機能の指標である膜電気抵抗値 (TER) を測定した。添加 18 時間後の C-CPE の TER 低下作用を 100% として、各種変異体の TER 低下率 (%) を算出した。

## 2-5. 変異型 C-CPE の吸収促進作用

モデル薬物として FITC-dextran (FD-4, Mw:4000, Sigma) を用いて、吸収促進剤の評価法として汎用されているラット *in situ* loop assay により変異型 C-CPE の吸収促進作用を評価した。

変異型 C-CPE (0.2 mg/ml) および FD-4 (10 mg/ml) を空腸 (5 cm) に投与し、頸静脈より経時的に採血した。その後、血漿中 FD-4 濃度を蛍光光度計 (励起波長: 485 nm, 蛍光波長: 538 nm) を用いて測定し、投与後 4 時間目までの濃度-時間曲線下面積 (AUC<sub>0-4</sub>) を算出した。

## 2-6. C-CPE 誘導体ファージライブラリの作成および claudin-1 binder のスクリーニング

過去の報告に準じて pCantab5E を用いて C-CPE の claudin-4 結合残基をランダムなアミノ酸に置換した C-CPE 誘導体ファージライブラリを作成し<sup>7,8)</sup>、claudin-1 発現 L 細胞を用いて claudin-1 binder のスクリーニングを試みた。

# 3. 結果および考察

## 3-1. C-CPE-PSIF の細胞傷害性に及ぼす変異型 C-CPE の阻害作用

当研究室では、C-CPE にタンパク質合成阻害因子 PSIF を融合させた C-CPE-PSIF を作製し、C-CPE-PSIF が C-CPE を介して claudin-4 発現細胞に特異的に結合することにより細胞傷害作用を示すことを見出している<sup>7)</sup>。そこで、C-CPE-PSIF を用いた拮抗阻害実験により各種アラニン置換体と claudin-4 との結合性を評価したところ、Y306A, Y310A, Y312A いずれの変異体でも C-CPE と比較して claudin-4 結合性が顕著に低下していた (Fig. 2A)。

## 3-2. 変異型 C-CPE と claudin-4 との相互作用

C-CPE-PSIF 拮抗阻害実験において claudin-4 結合性の低下が観察された変異体について、Caco-2 細胞溶解液を用いた pull down assay により claudin-4 結合性を評価したところ、Y306A, Y310A の claudin-4 結合性は低下していたものの、Y312A では C-CPE と同程度の結合性が認められた (Fig. 2B)。

## 3-3. 変異型 C-CPE の膜電気抵抗値に及ぼす影響

次に、Caco-2 細胞の単層膜培養系を用いて各種アラニン置換体の TER 低下作用 (バリア機能低下作用) を検討した結果、Y306A でのみ TER 低下作用の有意な減弱が観察された (Fig. 3A)。

## 3-4. 変異型 C-CPE の吸収促進作用

ラット腸管 *in situ* loop assay により吸収促進活性を評価したところ、Fig. 3BC に示すように Y306A, Y312A では C-CPE と比較して吸収促進作用は著しく低下していた。C-CPE-PSIF および pull down assay の結果を考えると、Y306A では claudin-4 結合性の低下に伴い吸収促進作用が減弱したと考えられる。Y312A では C-CPE と同程度の claudin-4 結合性が認められているにも関わらず、吸収促進作用の低下が観察されていた。ラット小腸の上皮細胞層溶解液を用いた pull down assay を行ったところ、claudin-4 との結合が観察されたことから (data not shown)、Tyr312 は claudin-4 との結合には必須ではなく吸収促進活性に関与しているものと考えられる。

## 3-5. 2,3 アミノ酸変異型 C-CPE の吸収促進作用

Alanine scan によって C-CPE の各種活性に Tyr306, Tyr310, Tyr312 が関与している可能性が示された。そこで次に、これらアミノ酸残基の 2 アミノ酸アラニン置換体を作成し各種活性を評価した。Pull down assay および C-CPE-PSIF 拮抗阻害実験ではいずれの変異体においても相加的な結合性の低下が観察された (Fig. 4AB)。さらに *in situ* loop assay により吸収促進効果を評価したところ、Fig. 3BC に示してあるようにいずれの変異体においても著しい吸収促進作用の低下が観察された。さらに、Tyr306, Tyr310, Tyr312 をいずれもアラニンに置換した 3 置換体では、claudin-4 結合性、TER 低下作用、吸収促進作用が消失していた (Fig. 5A-E)。

## 3-6. Claudin-1 binder のスクリーニング

C-CPE の claudin-4 結合領域をランダムなアミノ酸に置換した C-CPE 誘導体ライブラリを作製し、claudin-1 発現 L 細胞を用いて claudin-1 binder のスクリーニングを試みたところ、得られたクローンはいずれも天然型 C-CPE

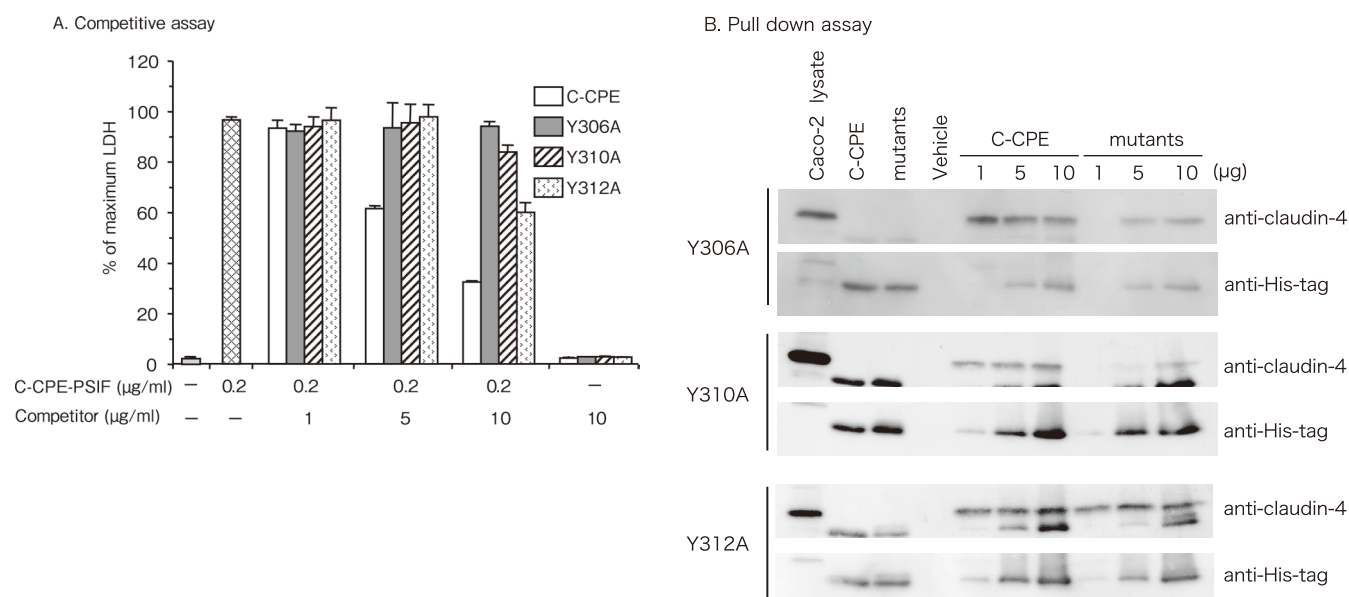


Figure 2 Effects of Tyr306, Tyr310 and Tyr312 on the interaction of C-CPE with claudin-4.

A) Competitive inhibition of C-CPE-PSIF-induced cytotoxicity by mutants of C-CPE. Claudin-4-expressing L (CL4/L) cells were pretreated with the indicated concentrations of C-CPE or C-CPE mutants for 1 h. The cells were then incubated with 0.2 μg/ml of C-CPE-PSIF. After 36 h, LDH release was assessed using a commercially available kit. The results are representative of three independent experiments, and the values are means ± SD (n=3).

B) Pull-down assay. Confluent Caco-2 cells were harvested and lysed in lysis buffer. The lysate (10 μg) was incubated with vehicle, C-CPE, or mutants of C-CPE for 30 min at 37°C. After addition of Ni-resin, the lysate was incubated for 3 h at 4°C. The resin was then precipitated, and the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using anti-claudin-4 or anti-His-tag antibodies. The lanes containing Caco-2 lysates (10 μg), C-CPE (1 μg), and mutants of C-CPE (1 μg) were positive controls for claudin-4, C-CPE, and mutants of C-CPE, respectively. The results are representative of three independent experiments.

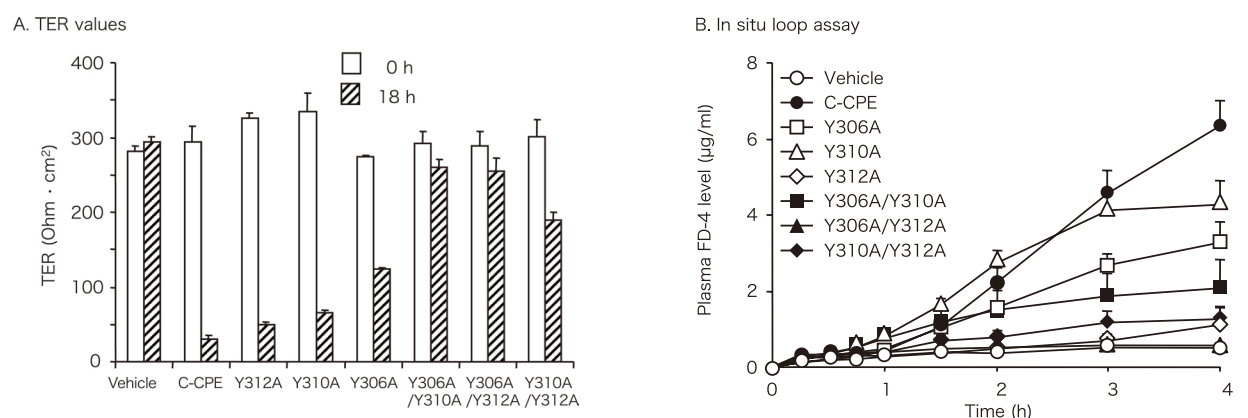


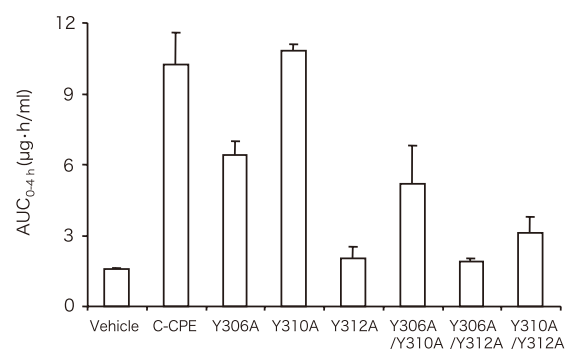
Figure 3 Effects of mutants of C-CPE on the TJ barrier function and jejunal absorption.

A) Effects of mutants on the TJ barrier function of Caco-2 monolayer cells. Confluent Caco-2 cells were cultured in Transwell chambers for 10-14 days. When TER values stabilized, C-CPEs were added to the basal side of the Transwell chamber at the indicated concentrations. TER values were measured after 0 and 18h. Values are means ± SD (n=4). The results are representative of three independent experiments.

B) Effects of mutants on jejunal absorption of FD-4 in rat. Rat jejunum was treated with FD-4 (10mg/ml) in the presence of vehicle, C-CPE (0.2 mg/ml), or mutant C-CPEs (0.2mg/ml). The FD-4 levels in plasma collected from the cervical vein were determined at the indicated times. Values are means ± SEM (n=4).

C) The AUC<sub>0-4h</sub> values were calculated from (B) and are means ± SEM (n=4). The results shown in (B) and (C) are representative of three independent experiments.

C. AUC values





であった (data not shown)。C-CPE は claudin-1 結合性を有していないことから、claudin-1 発現細胞は claudin-1 binder スクリーニング系として不適であると推察された。

#### 4. 考 察

以上、本研究により、C-CPE と claudin-4 との結合には Tyr306, Tyr310, 吸収促進作用には Tyr312 が関与していることが明らかにされ、機能ドメインをランダムなアミノ酸に置換した C-CPE 誘導体ライブラリを作製し、claudin-1 binder のスクリーニングを試みたものの、claudin-1 binder の取得には至らなかった。現在のところ、claudin のバリア機能を制御する分子は C-CPE 以外には報告されておらず、C-CPE を prototype として用いた claudin modulator 創製には新たな claudin binder スクリーニング系構築の必要性が示唆された。現在までに当グループでは、claudin 発現細胞に代わる新規 claudin binder スクリーニング系を作製し、本系が claudin binder 探索系として機能することを確認している。今後は、本検討で構築した C-CPE 誘導体ライブラリ、および新たに構築した claudin binder スクリーニングシステムを用いて、claudin-1 modulator 創製を図る予定である。

尚、当該研究成果は以下の論文に掲載された。

1) Ebihara, C., Kondoh, M., Harada, M., Fujii, M.,

Mizuguchi, H., Tsunoda, S., Horiguchi, Y., Yagi, K., and Watanabe, Y. Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem Pharmacol*, 73: 824-830, 2007.

2) Harada, M., Kondoh, M., Ebihara, C., Takahashi, A., Komiya, E., Fujii, M., Mizuguchi, H., Tsunoda, S., Horiguchi, Y., Yagi, K., and Watanabe, Y. Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochem Pharmacol*, 73: 206-214, 2007.

3) Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii, M., Horiguchi, Y., Mizuguchi, H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem Pharmacol*, 75: 1639-1648, 2008.

#### 謝 辞

当該研究テーマの実施に際して、グラントサポートを賜りました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝致します。

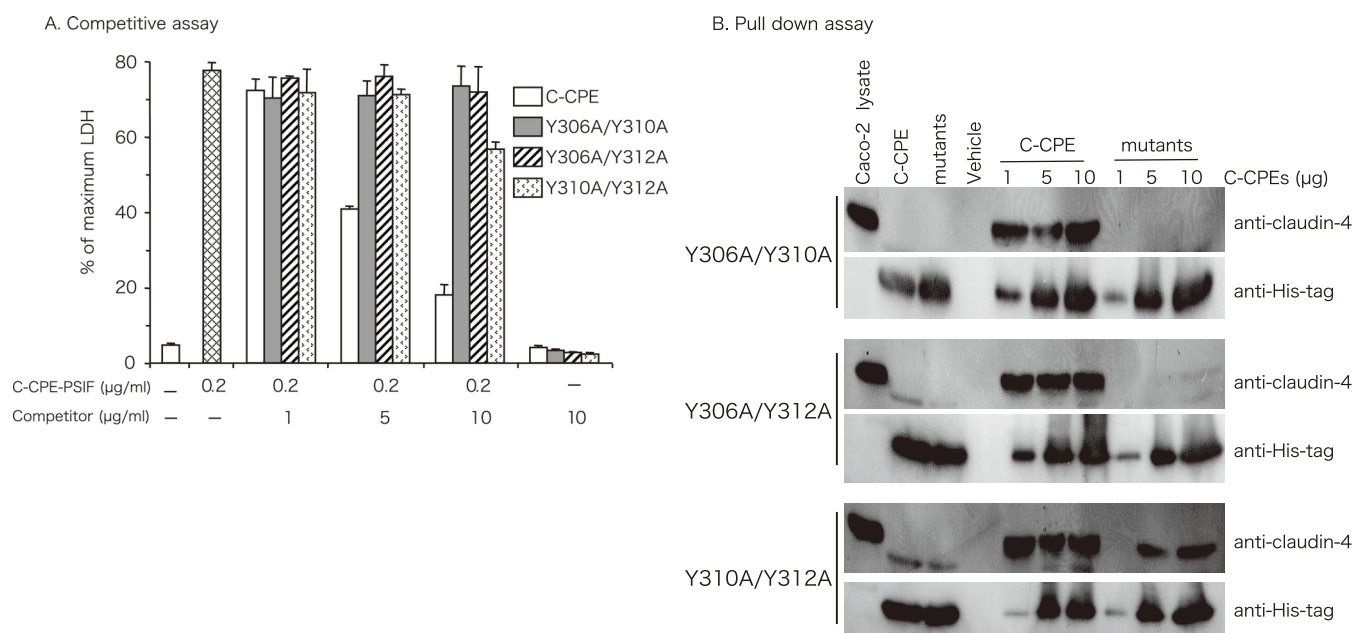


Figure 4 Interaction of double mutants at residues 306, 310, and 312 of C-CPE with claudin-4

A) Competition assay. CL4/L cells were incubated with double mutants at the indicated concentration for 1h and then mixed with C-CPE-PSIF (0.2 μg/ml). After 36h, LDH release was assessed using a commercially available kit. The results are representative of three independent experiments. Values are means ± SD (n=3).

B) Pull-down assay. Caco-2 lysates (10 μg) were incubated with double mutants (Y306A/Y310A, Y306A/Y312A, or Y310A/Y312A) for 30 min at 37 °C. Ni-resin was then added, and the lysate was incubated for 3h at 4 °C. Next, the resin was precipitated, and the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting.

(参考文献)

1) Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 156: 1099-1111, 2002.

2) Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol*, 147: 195-204, 1999.

3) Kondoh, M., Masuyama, A., Takahashi, A., et al. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol Pharmacol*, 67: 749-756, 2005.

4) Takahashi, A., Kondoh, M., Masuyama, A., et al. Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin in its interaction with claudin-4. *J Control Release*, 108: 56-62, 2005.

5) Kokai-Kun, J. F., Benton, K., Wieckowski, E. U., and McClane, B. A. Identification of a *Clostridium perfringens* enterotoxin region required for large complex formation and cytotoxicity by random mutagenesis. *Infect Immun*, 67: 5634-5641, 1999.

6) McClane, B. A., Chakrabarti, G. New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Anaerobe*, 10:107-114, 2004.

7) Ebihara, C., Kondoh, M., Hasuike, N., et al. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Pharmacol Exp Ther*, 316: 255-260, 2006.

8) Yamamoto, Y., Tsutsumi, Y., Yoshioka, Y., et al. Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat Biotechnol*, 21: 546-552, 2003.

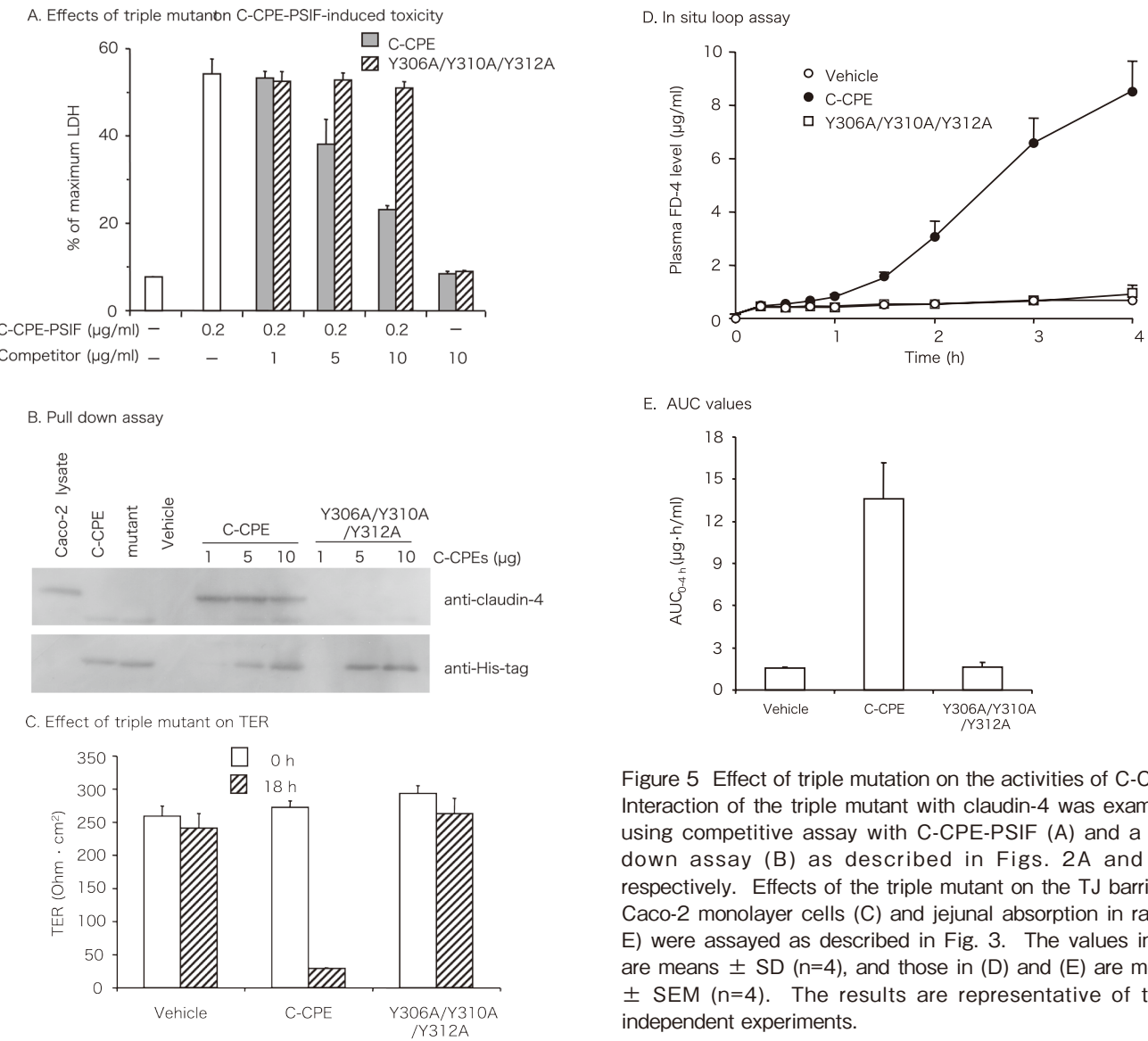


Figure 5 Effect of triple mutation on the activities of C-CPE. Interaction of the triple mutant with claudin-4 was examined using competitive assay with C-CPE-PSIF (A) and a pull-down assay (B) as described in Figs. 2A and 2B, respectively. Effects of the triple mutant on the TJ barrier in Caco-2 monolayer cells (C) and jejunal absorption in rat (D, E) were assayed as described in Fig. 3. The values in (C) are means  $\pm$  SD (n=4), and those in (D) and (E) are means  $\pm$  SEM (n=4). The results are representative of three independent experiments.