

2019年10月29日

新技術説明会  
New Technology Presentation Meetings!

微小環境内への抗がん剤透過性を  
亢進させるクロロディン結合薬の開発



岐阜薬科大学  
生命薬学大講座 生化学研究室  
教授 五十里 彰

# がんの統計データ

## 日本におけるがんデータ

がんの罹患数	: 87.6万人 (2013年)
がんによる死亡者数	: 37.3万人 (2017年)
	部位別では肺がんが最も多い
がんの医療費	: 4兆2500億円 (2017年)
抗がん剤市場	: 1兆円 → 2025年には1兆4000億円

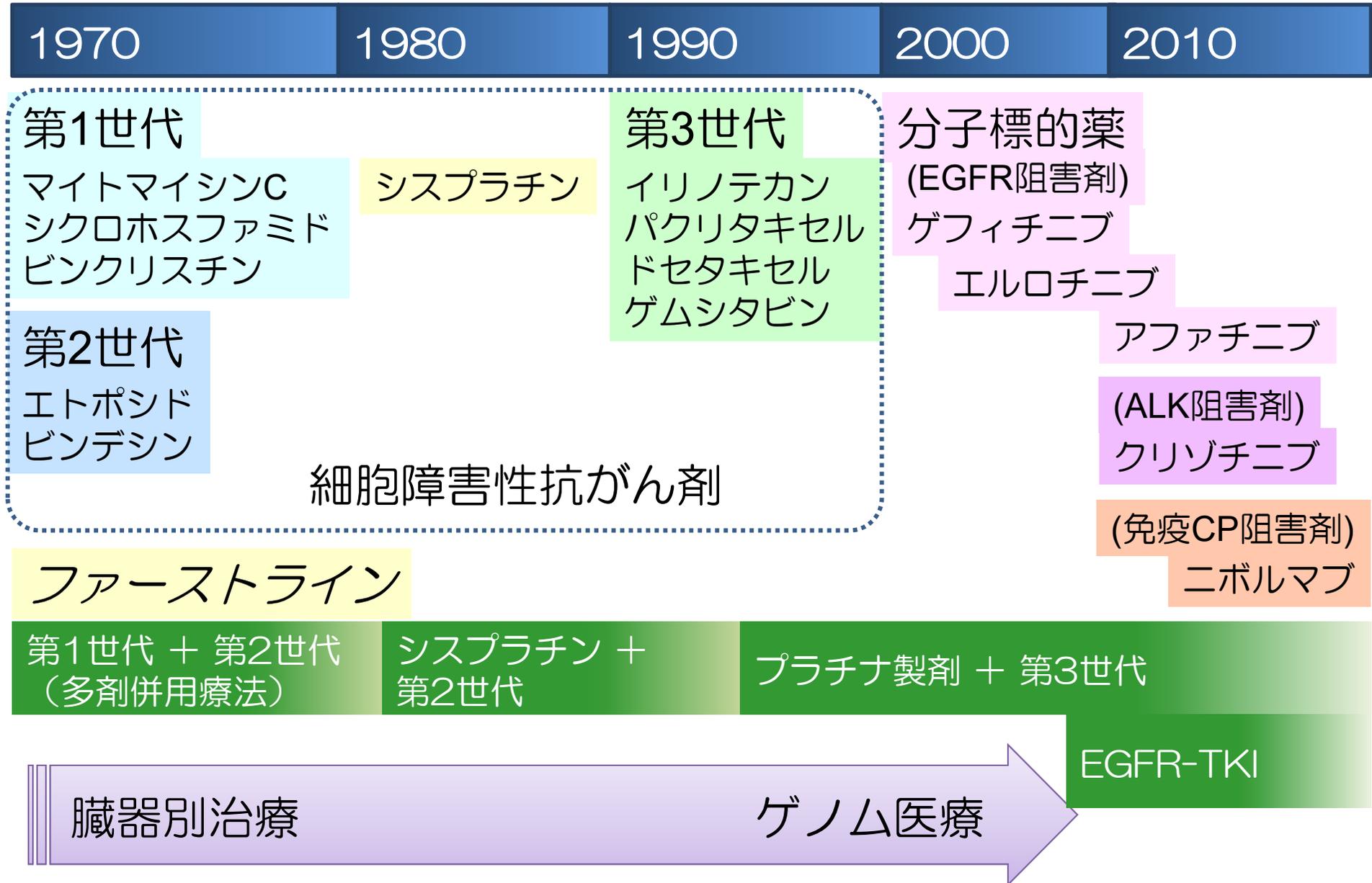
平成29年 厚生労働省 人口動態調査  
国立がんセンターがん対策情報センター  
富士経済

## 世界におけるがんデータ

がんの罹患数	: 1410万人 (2012年)
がんによる死亡者数	: 820万人 (2012年)
がんの医療費	: 227兆円

World Cancer Report 2014

# 非小細胞肺がんの薬物療法の変遷



1. 既存の抗がん剤に対して低感受性のがん（難治がん）が存在する。

プラチナ製剤の多剤併用療法の奏功率は約37%

Kubota K *et al.*, J Clin. Oncol. (2004)

EGFR-TKIの治療対象となる肺腺がん患者は約53%

Kohno T *et al.*, Nat. Med. (2012)

2. 抗がん剤耐性を改善する治療薬がない

P-糖タンパク質阻害剤：ゾスキダル

3. がんの再発を予防する薬がない

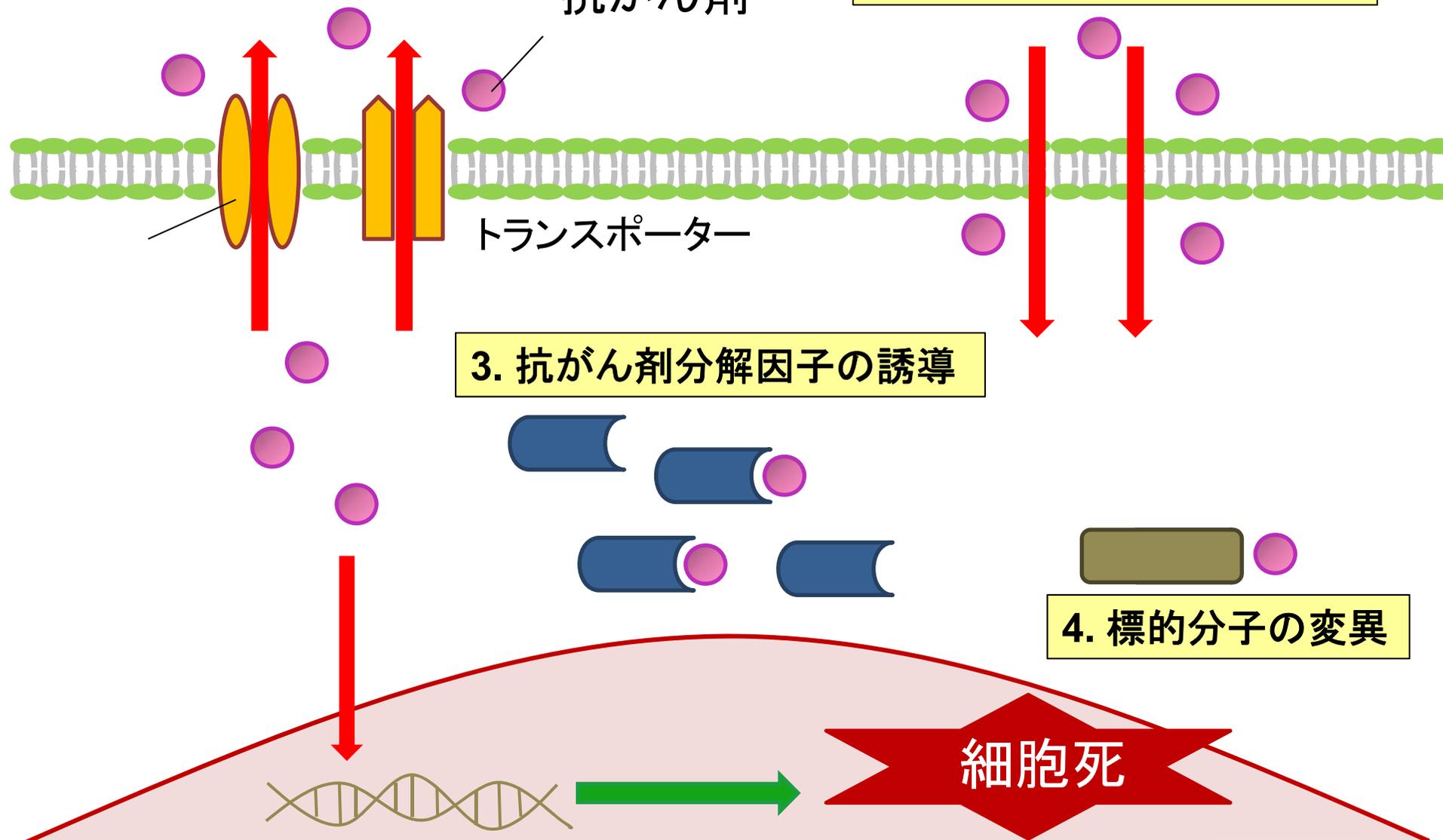
既存の抗がん剤の感受性を回復・亢進させる薬剤が  
治療奏功率を向上させ、医療費の高騰を防ぐ。

# 治療抵抗性の獲得機序

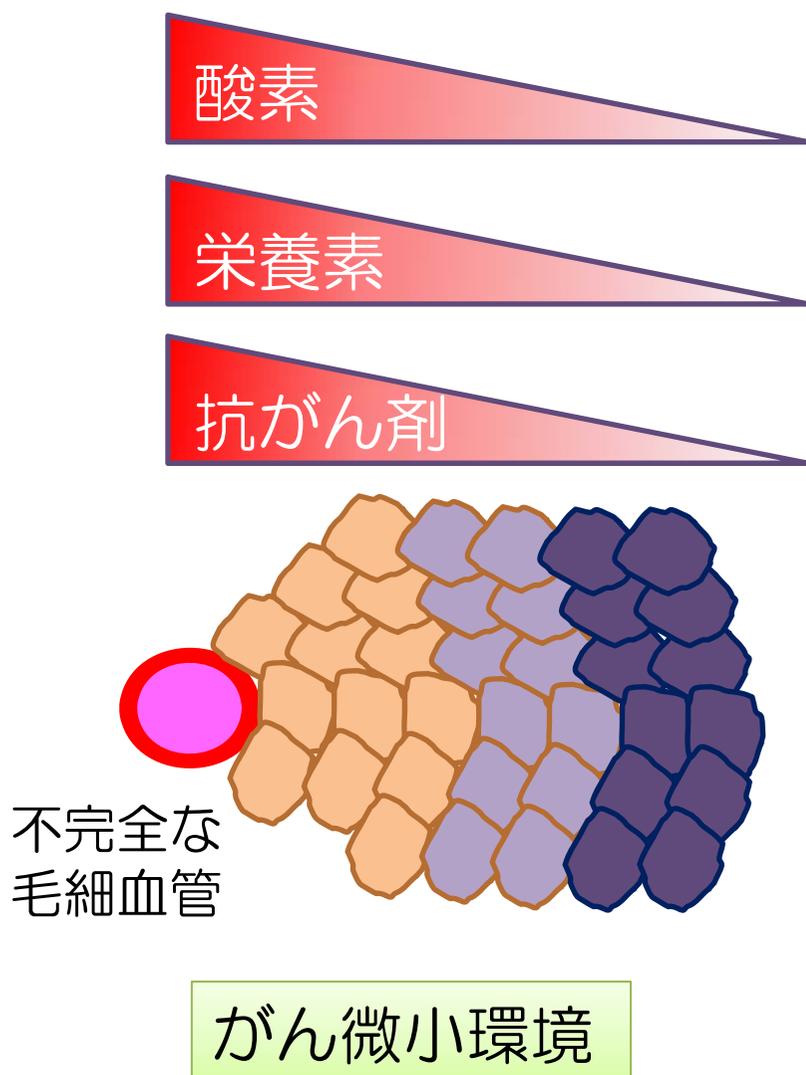
1. 抗がん剤排出の増加

抗がん剤

2. 抗がん剤取り込みの低下



# がん微小環境の形成による 治療抵抗性の獲得



低酸素度の亢進

低栄養度の亢進

抗がん剤濃度の低下



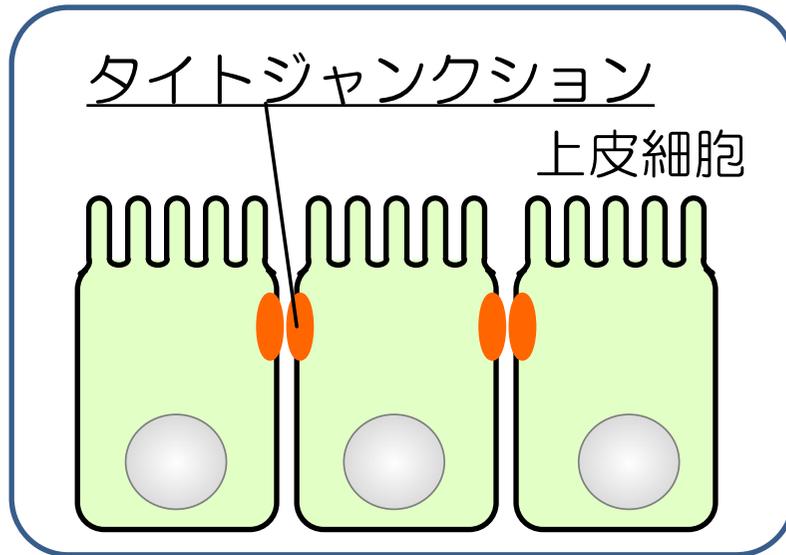
微小環境内部のがん細胞は

- ✓ ストレス環境により薬剤抵抗性が高い
- ✓ 親水性薬剤の透過性が低い
- ✓ 高分子量の薬剤の透過性が低い



新たな標的分子と薬剤の開発

# クローディン (CLDN) の特徴

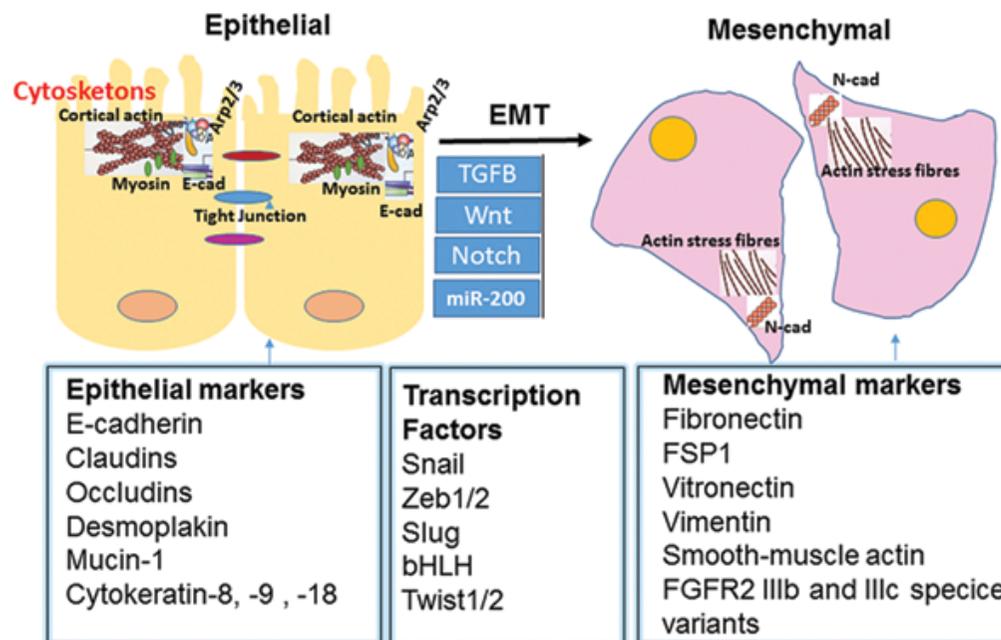


## タイトジャンクションの構成因子

- CLDN1~27
- オクルディン

## タイトジャンクションの役割

- 細胞増殖の制御
- 分化の制御
- 細胞間透過性の制御



細胞間接着構造の消失による上皮間葉転換 (EMT) が、増殖・浸潤・転移能の獲得に重要である。

Zhang X *et al.*, Cytoskeleton (2017)

CLDNの発現は低下するのか？

# がん組織におけるCLDNサブタイプの異常発現

## 多くの固形がん組織でCLDNsが高発現する

CLDNs	組織
CLDN1	大腸、胃、前立腺、 肝臓、膵臓
CLDN2	大腸、肝臓、食道
CLDN3	胃、肺、腎臓、 精巣、卵巣
CLDN4	腎臓、精巣、卵巣、肺、 胃、膵臓、甲状腺
CLDN5	肺、膵臓
CLDN6	胃

CLDNs	組織
CLDN7	胃、大腸、舌、卵巣 甲状腺、乳房、肝臓
CLDN9	胃
CLDN10	肝臓、肺
CLDN12	大腸
CLDN16	卵巣、乳房
CLDN18	肺、膵臓

Tabaries S *et al.*, Oncogene (2017)

Ding L *et al.*, Canc. Manag. Res. (2013)

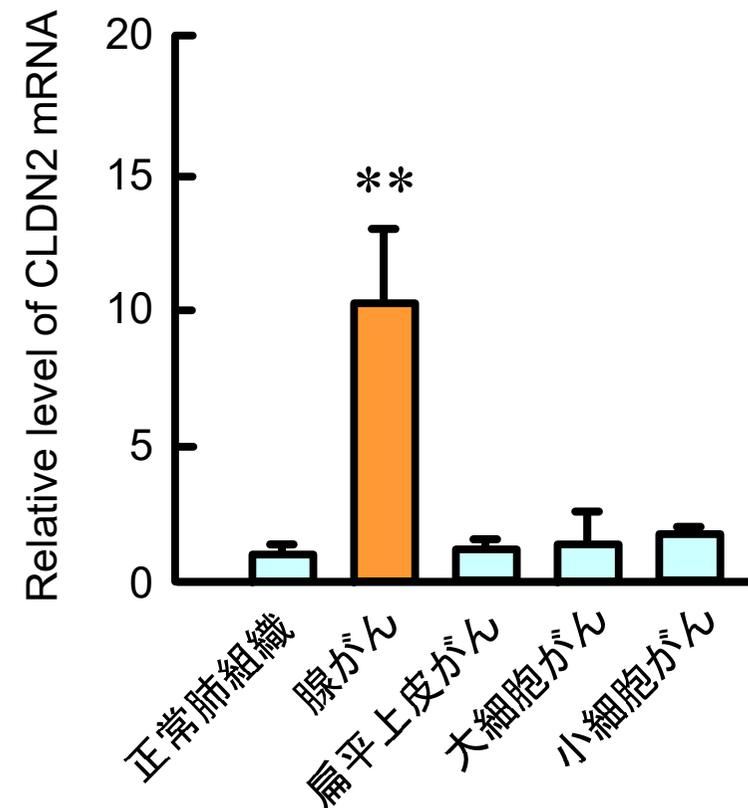
正常組織に未発現・低発現のCLDNサブタイプが高発現することにより、がん細胞のタイトジャンクションの機能を変化させる。

# 肺がん治療の新たな分子標的：CLDN2

Lung Cancer cDNA Array (OriGene 社)

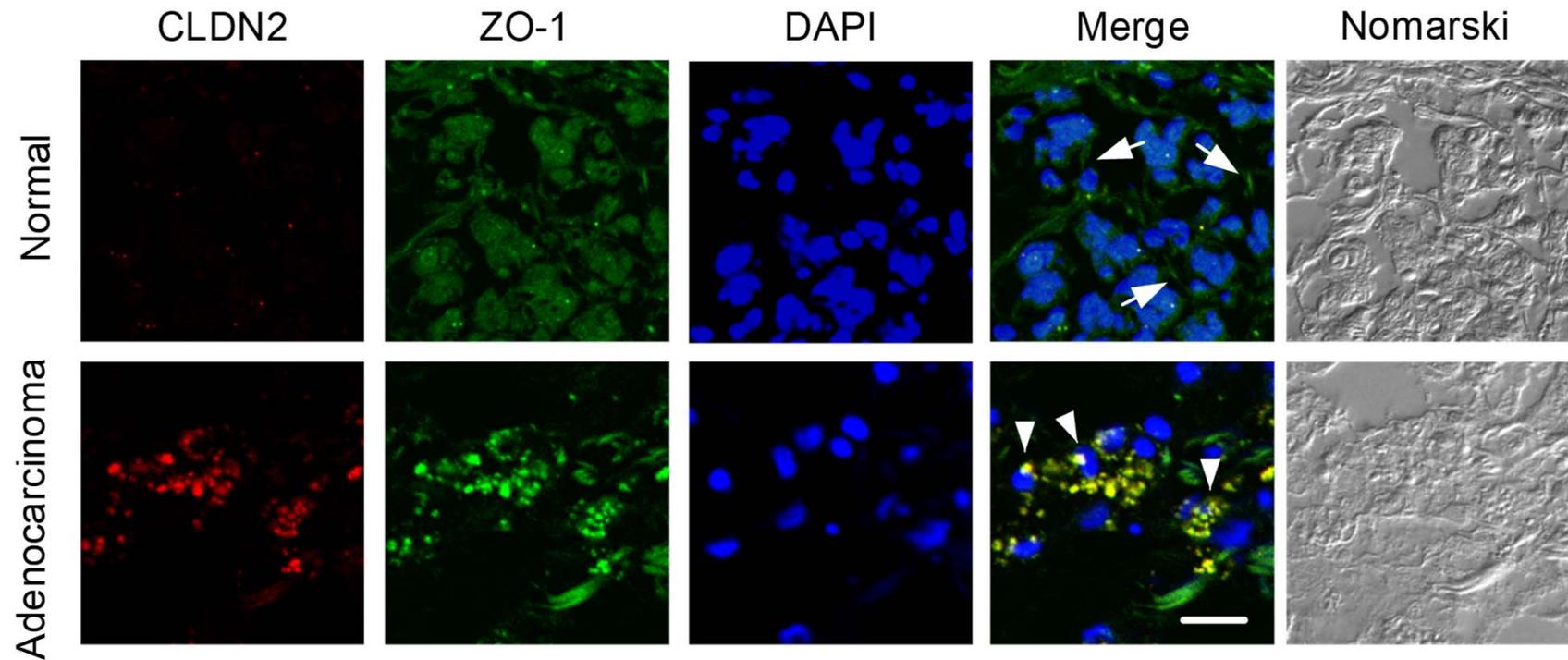
		患者数
男性		59
女性		31
正常		12
がん種	ステージ	
腺がん	I	21
	II	8
	III	12
	IV	4
扁平上皮がん	I	11
	II	10
	III	4
	IV	1
大細胞がん	I	2
	II	1
	III	1
小細胞がん	I	1
	III	2

## リアルタイムPCR解析



# 肺腺がん組織でのCLDN2 タンパク質の分布

## 蛍光免疫染色解析

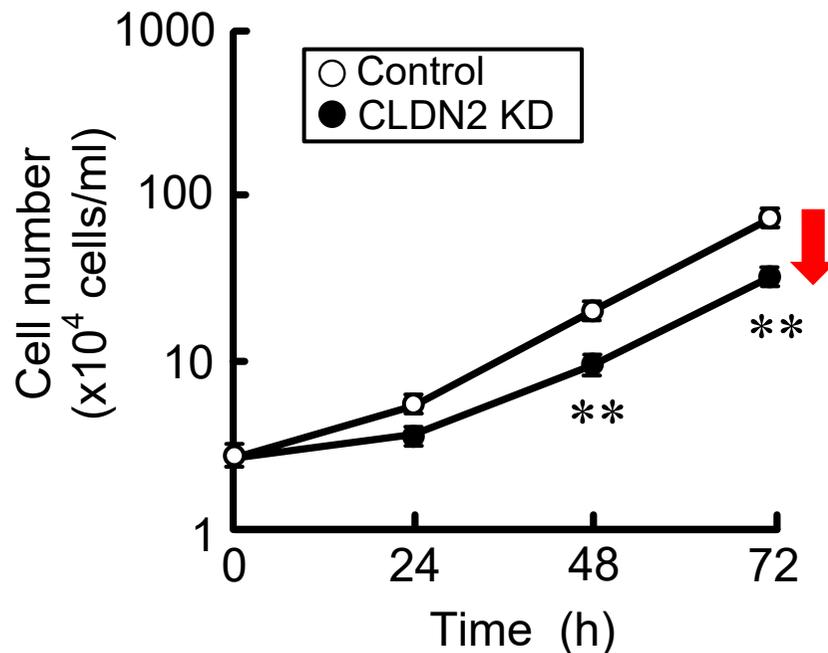


Ikari A *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* (2012)

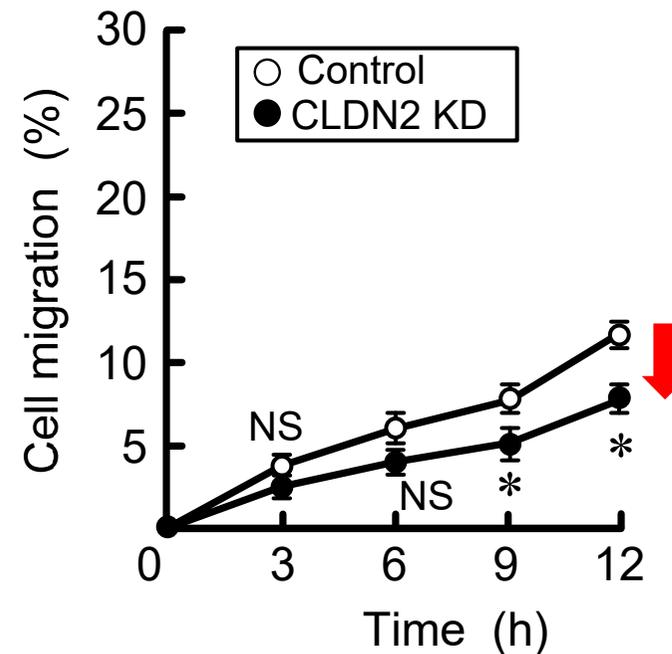
肺腺がん組織にCLDN2タンパク質が高発現する。

# CLDN2のノックダウンによる 細胞増殖の抑制

## 細胞増殖能解析

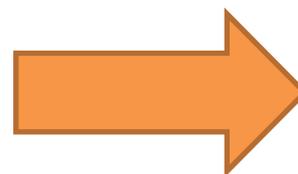


## 細胞浸潤能解析



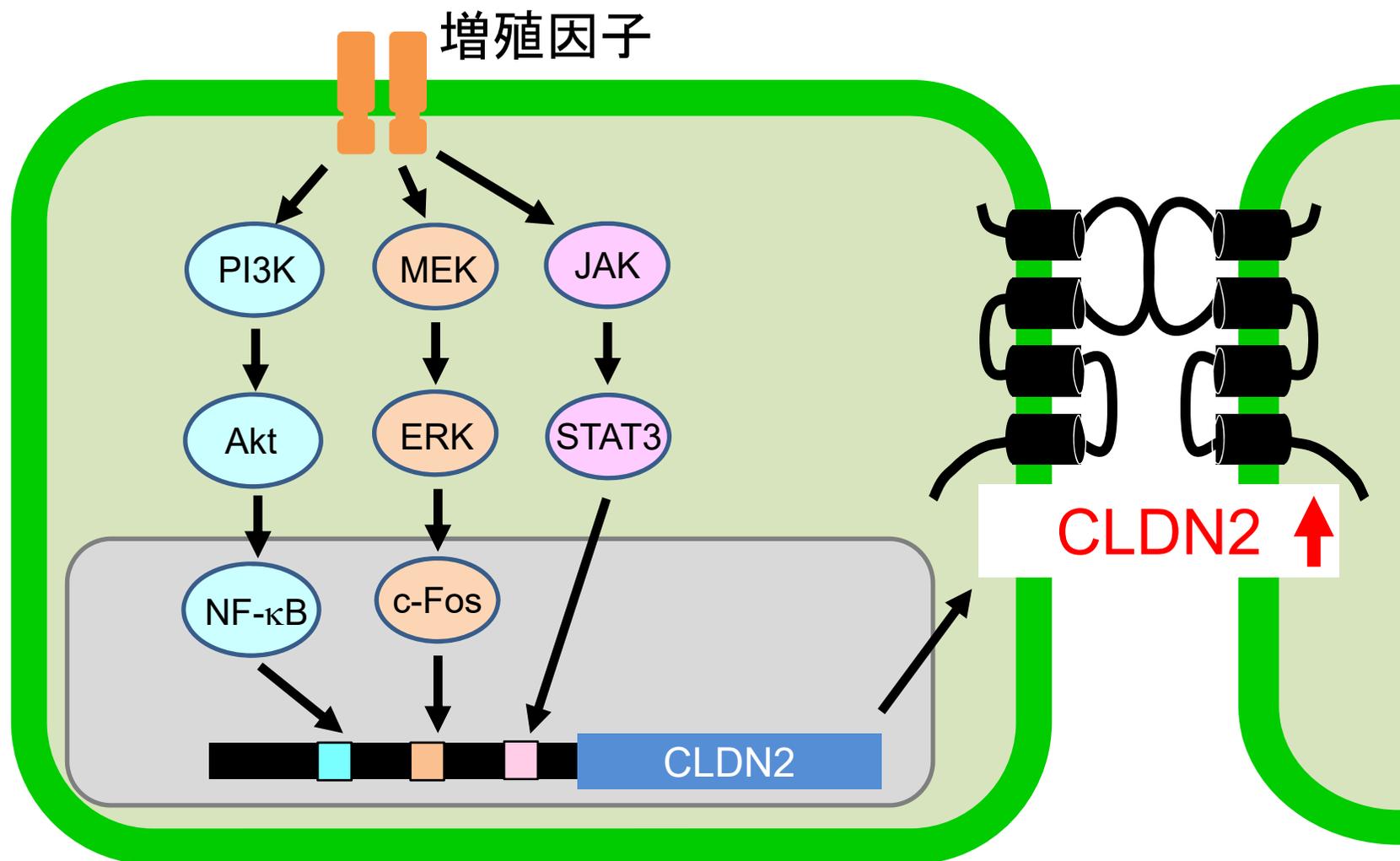
Ikari A *et al.*, Life Sci. (2010)

CLDN2発現の増加



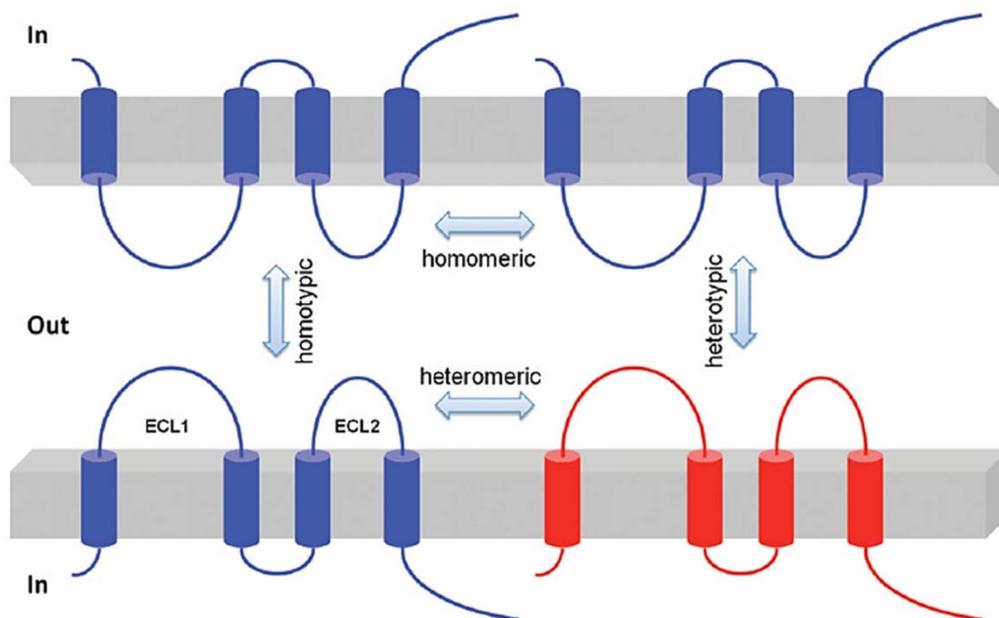
増殖能 ↑  
浸潤能 ↑

# CLDN2発現の増加機構



細胞内シグナルの阻害では特異性が低い。  
正常細胞の働きにも影響を及ぼす。

# CLDN結合性短鎖ペプチドの開発



## CLDNが形成するポア

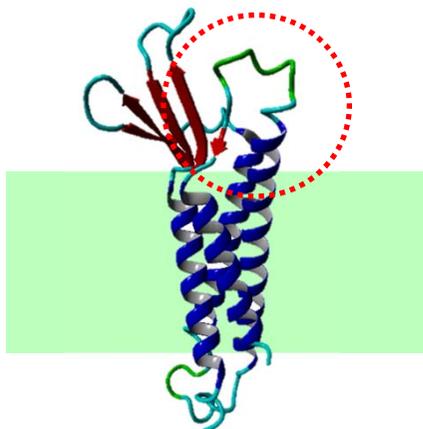
第1細胞外ループ：イオン選択性

第2細胞外ループ：サイズ選択性

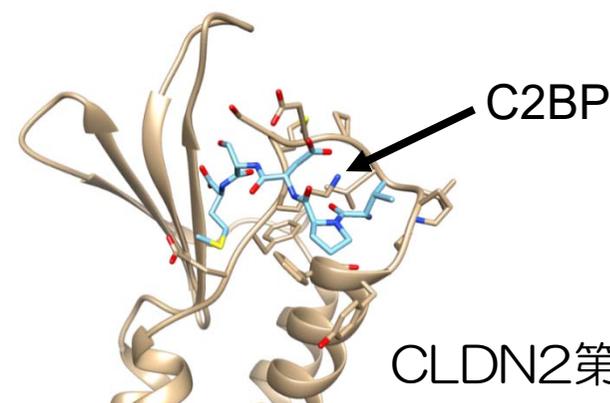
500 Da程度までの  
低分子は通過が可能

Hou J, Tissue Barriers (2015)

## CLDN2の推定立体構造



## Claudin-2 Binding Peptide (C2BP)



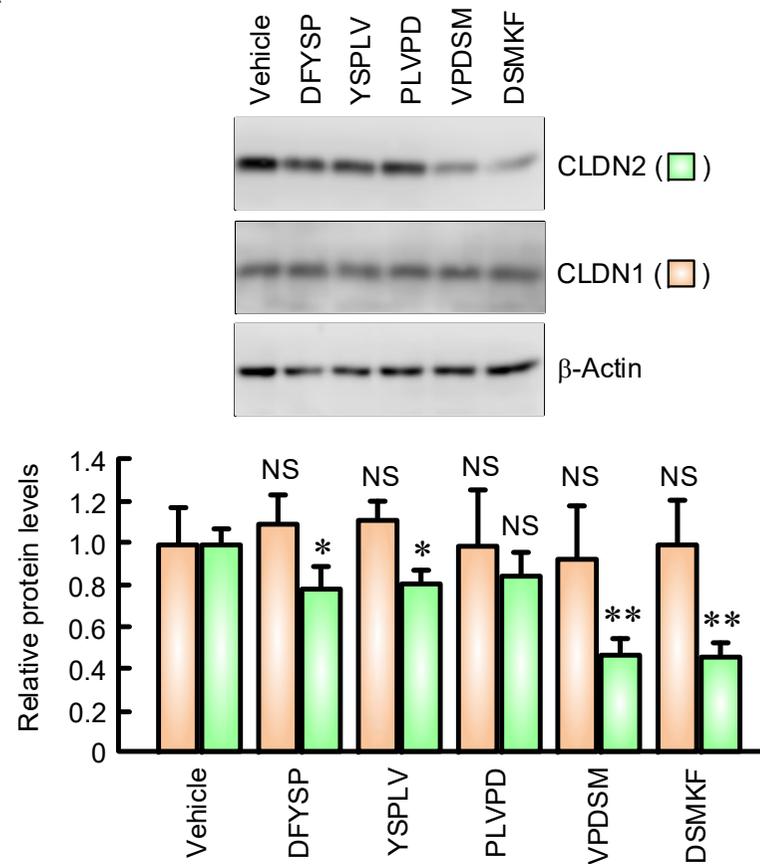
CLDN2第2細胞外ループ

# CLDN2の発現を低下させるC2BPの探索

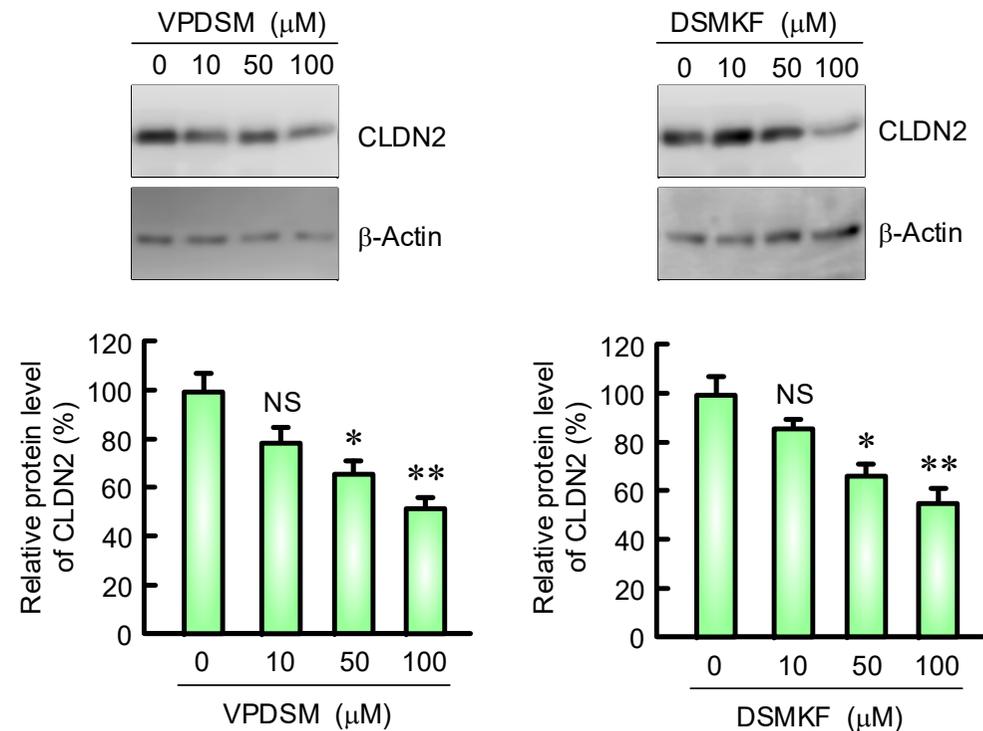
## ウェスタンブロット解析

CLDN2の第2細胞外ループ構造  
144 158  
--- RDFYSP LVPDSMKFE ---

A



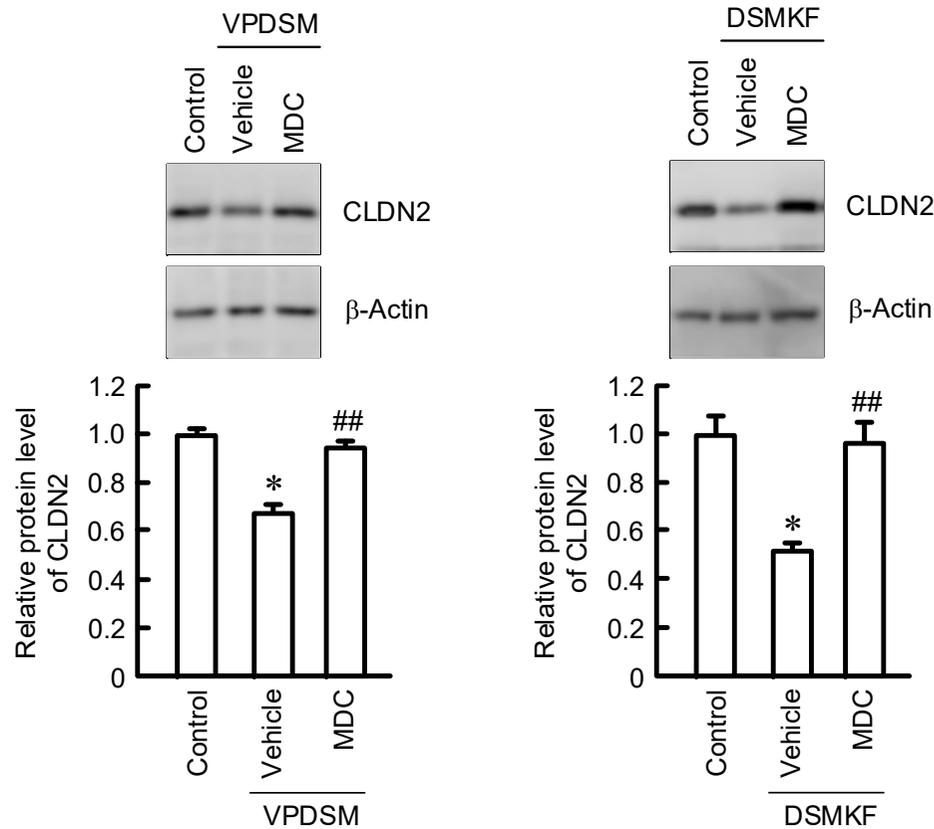
B



CLDN2発現を低下させる短鎖ペプチド  
(VPDSM、DSMKF)を同定

## ウェスタンブロット解析

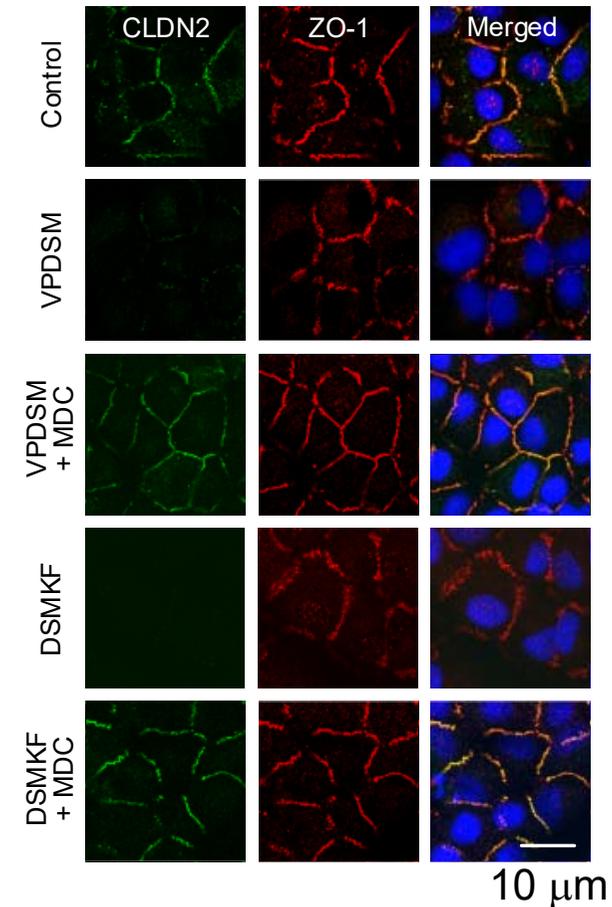
A



MDC : クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤

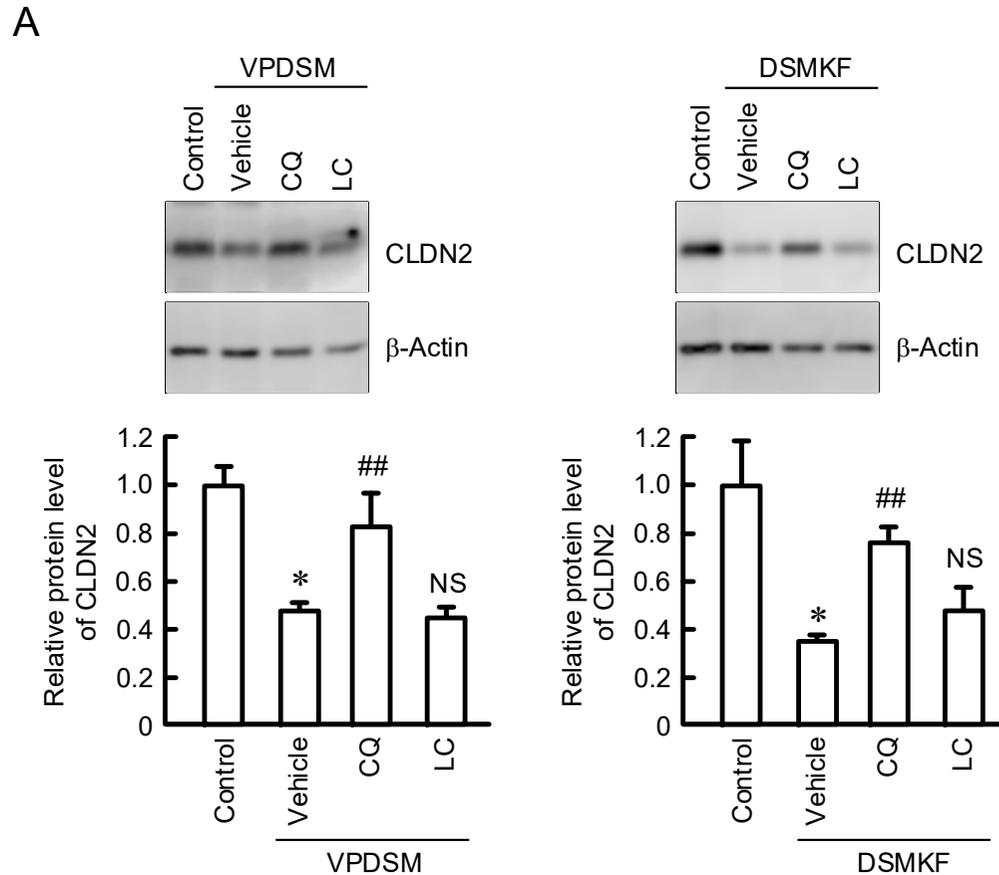
## 蛍光免疫染色解析

B



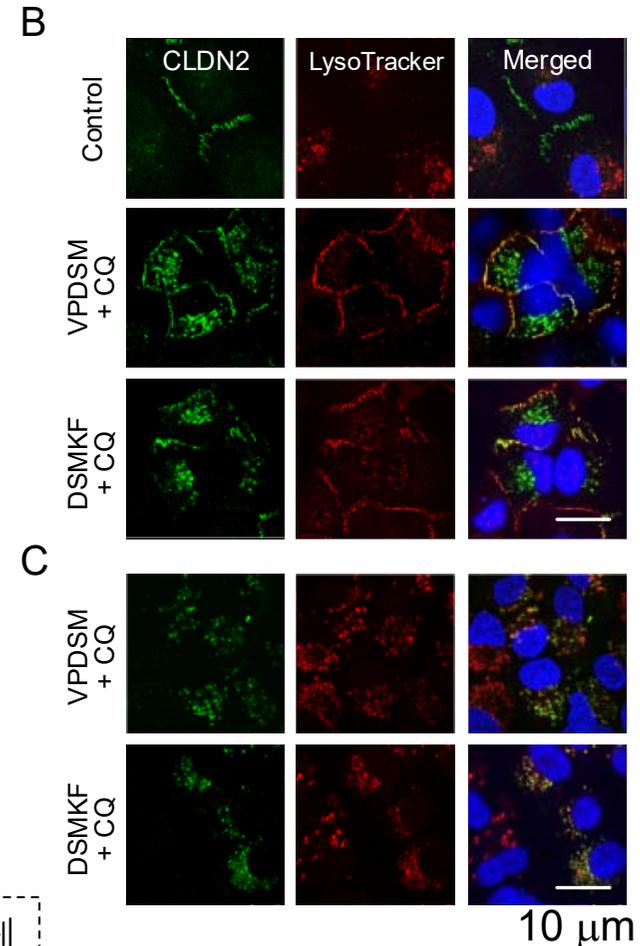
短鎖ペプチド (VPDSM、DSMKF) は、クラスリン依存性経路を介してCLDN2のエンドサイトーシスを促進する。

## ウェスタンブロット解析



CQ：リソソーム阻害剤、LC：プロテアソーム阻害剤

## 蛍光免疫染色解析

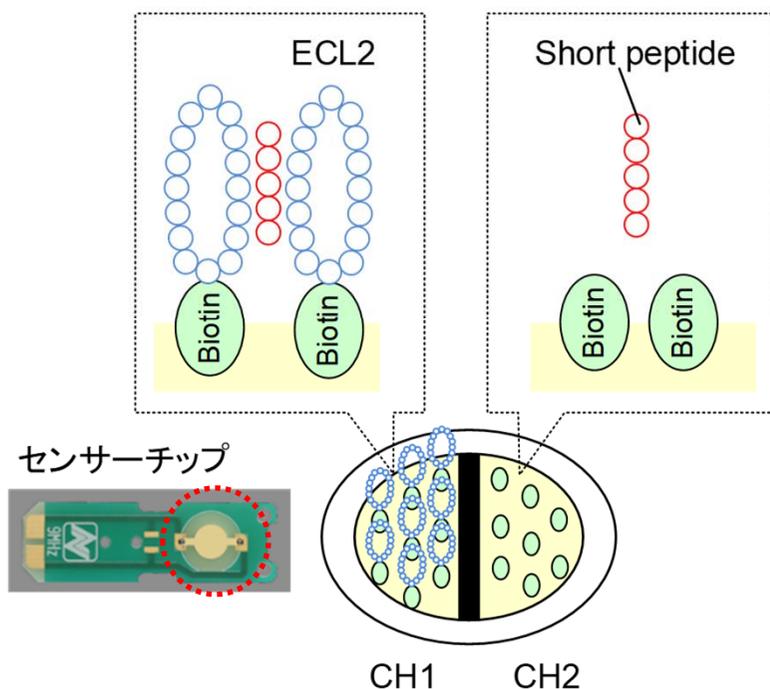


短鎖ペプチド（VPDSM、DSMKF）は、リソソームにおけるCLDN2の分解を促進する。

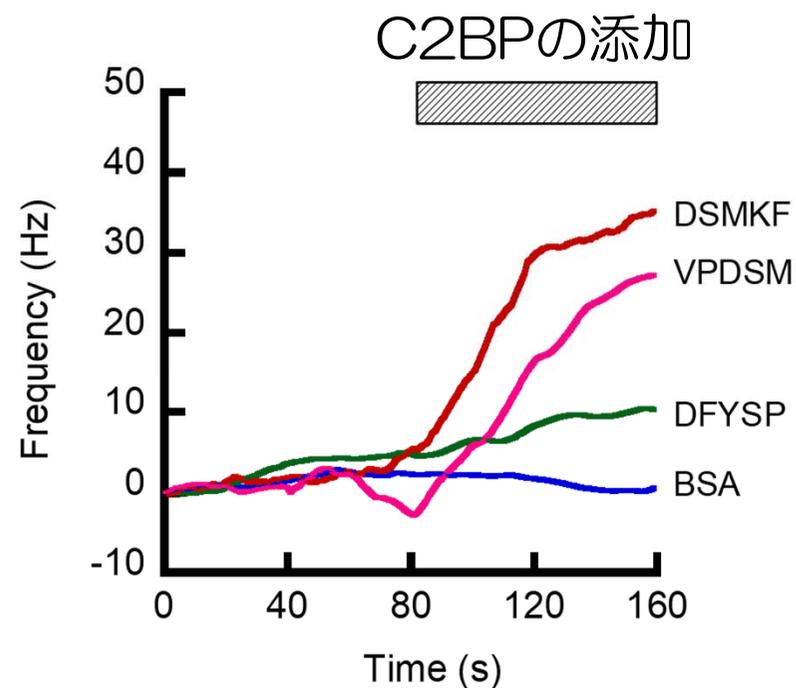
# CLDN2の細胞外ループとC2BPの相互作用

## QCM 解析

A



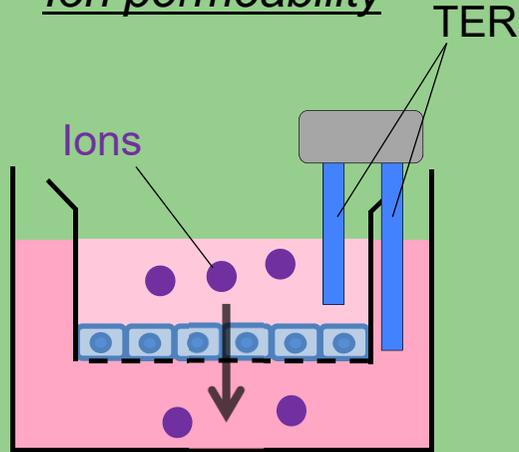
B



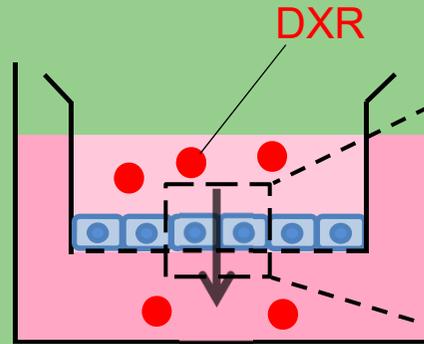
短鎖ペプチド (VPDSM、DSMKF) は、CLDN2の細胞外ループと直接相互作用をする。

# 細胞間透過性に対するC2BPの効果

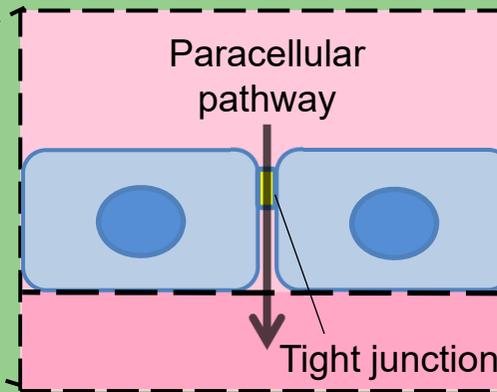
*Ion permeability*



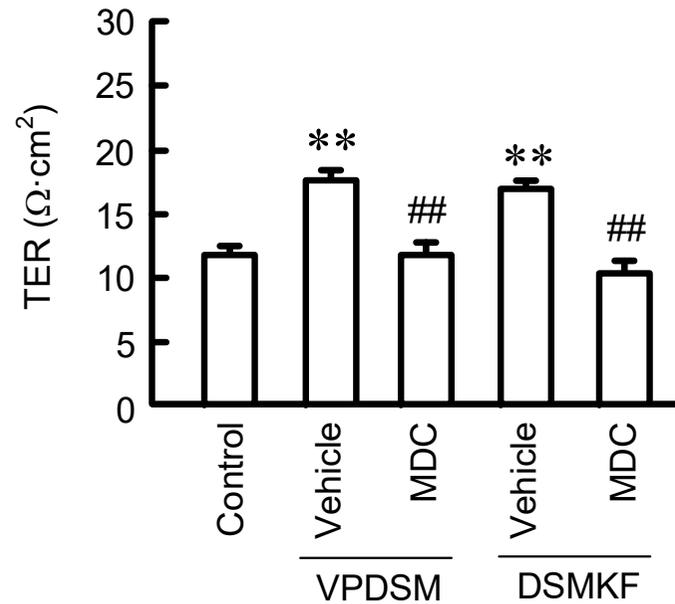
*DXR permeability*



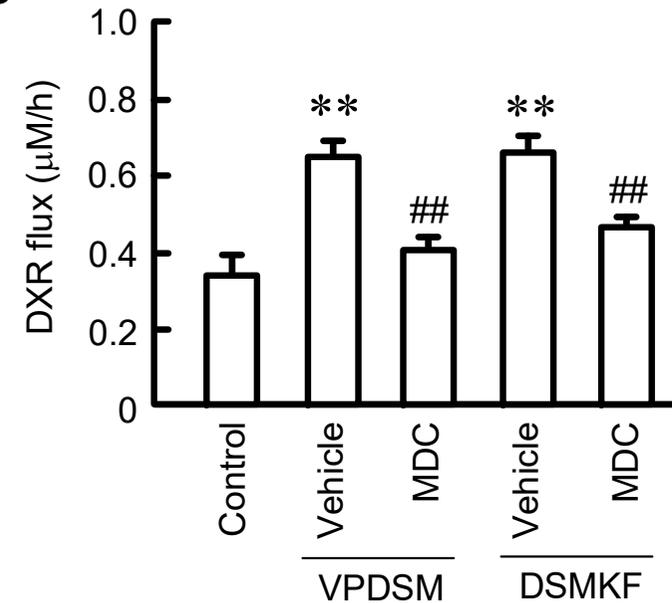
TER: 細胞間イオン透過性  
DXR: ドキソルビシン



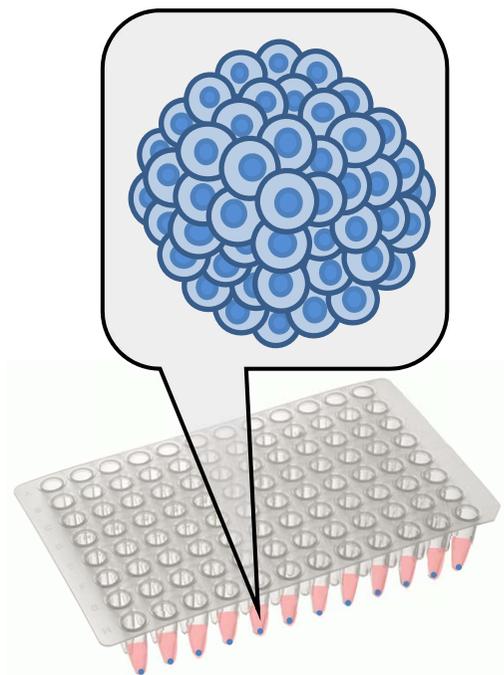
A



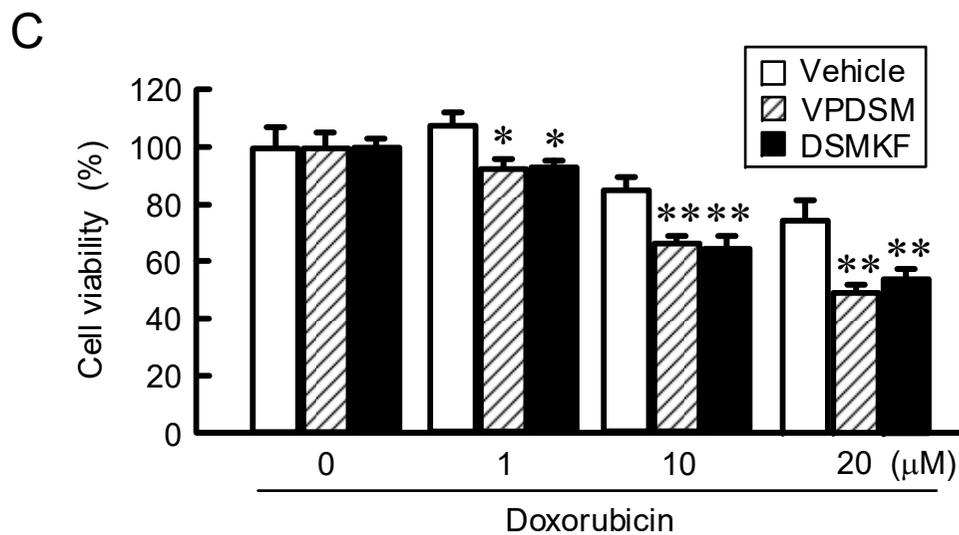
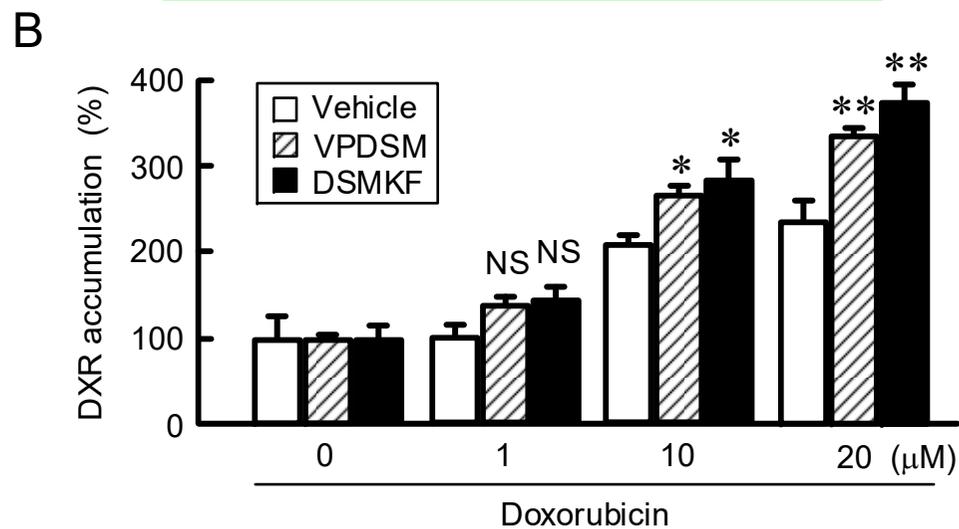
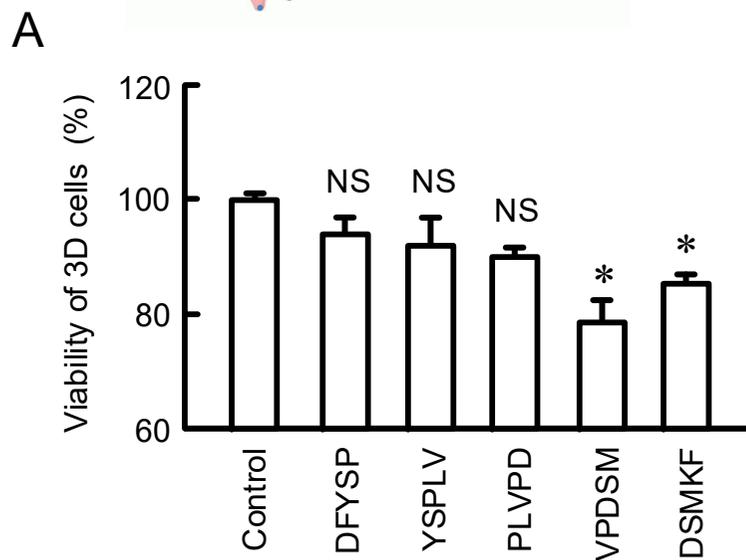
B



# 抗がん剤感受性に対するC2BPの効果①

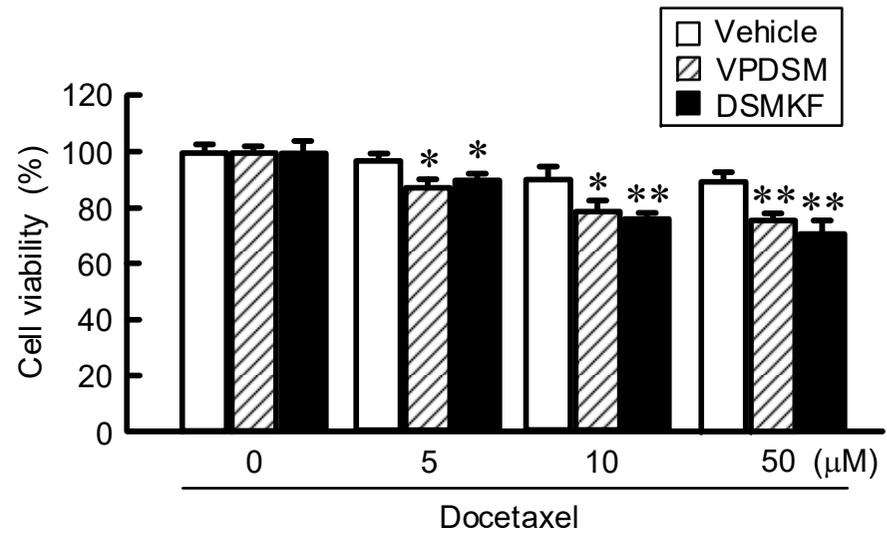
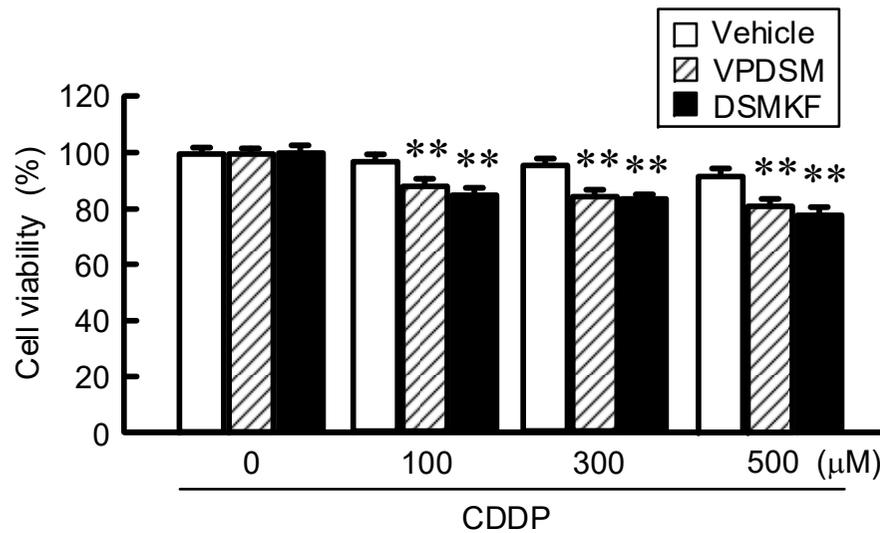
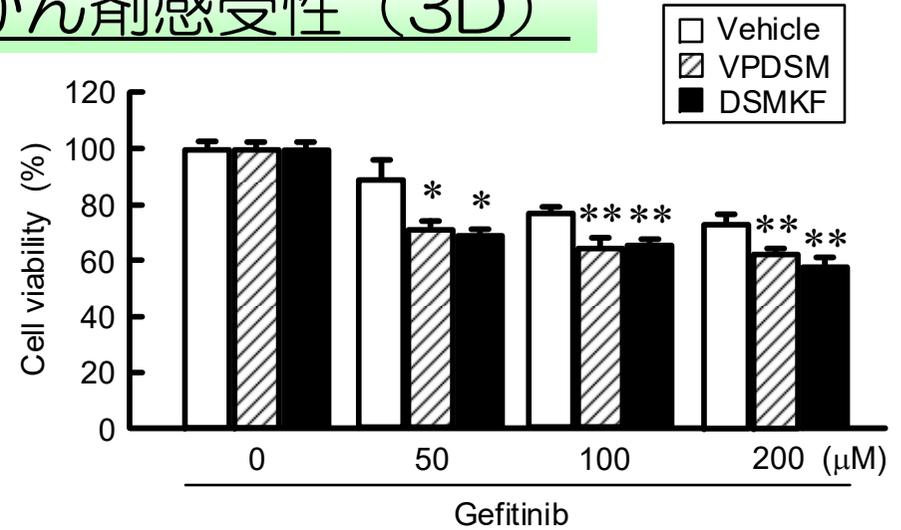
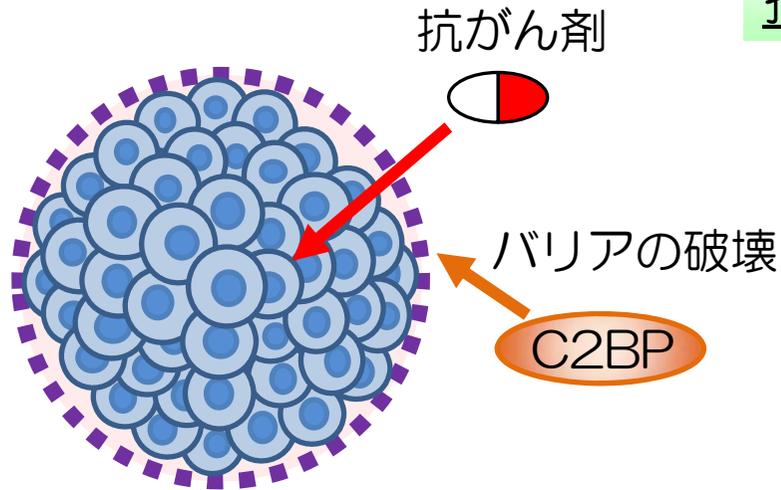


## 抗がん剤感受性 (3D)



# 抗がん剤感受性に対するC2BPの効果②

## 抗がん剤感受性 (3D)



期待される効果

- ✓ 肺腺がん細胞の増殖を抑制
- ✓ 肺腺がん細胞の浸潤を抑制
- ✓ 肺腺がん細胞の生存率を低下
- ✓ 抗がん剤感受性を亢進

抗体と比較して

- ✓ 化学合成が可能である
- ✓ 製造コストが安い
- ✓ 高い品質が保証される
- ✓ 免疫原性が少ない
- ✓ 細胞間を通過しやすい

## CLDN2の高発現が原因となる疾患の治療薬としての利用

### 他臓器がんへの利用

大腸、肝臓、食道がん組織にCLDN2が高発現する。

Li J *et al.*, *Oncotarget* 8, 96249-96262 (2017)

Ding L *et al.*, *Cancer Man. Res.* 5, 367-375 (2013)

### がん再発予防薬としての利用

CLDN2は大腸がん幹葉細胞の自己複製能を促進する。

Paquet-Fifield S *et al.*, *Cancer Res.*, 78, 2925-2938 (2018)

### 炎症性腸疾患への利用

潰瘍性大腸炎やクローン病患者の腸管にCLDN2が高発現する。

Luettig J *et al.*, *Tissue Barriers* 3, e977176 (2015)

## 他のCLDNサブタイプに結合するペプチドの開発

### 薬や機能性食品成分の経皮吸収を促進

皮膚の表皮角化細胞の細胞間バリアは、CLDN1やCLDN4などで形成される。

Furuse M *et al.*, J. Cell Biol. 156, 1099-1111 (2002)



難吸収性薬剤の吸収改善、経口投与が難しい患者への投与

### 薬や機能性食品成分の腸管吸収を促進

ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体結合領域は腸管のCLDN4に結合し、薬剤の腸管吸収を促進する。

Kondoh M *et al.*, Mol. Pharmacol. 67, 749-756 (2005)



難吸収性薬剤の吸収改善、機能性食品成分の吸収促進

発明の名称：抗がん剤抵抗性改善作用を有する

クローディン-2結合性短鎖ペプチドの開発

出願番号：特願2019-49154

出願人：岐阜市

発明者：五十里彰、松永俊之、遠藤智史

岐阜薬科大学

★ 生命薬学大講座 生化学研究室 いかり  
五十里 彰

TEL & FAX: 058-230-8124

E-mail: [ikari@gifu-pu.ac.jp](mailto:ikari@gifu-pu.ac.jp)

★ 事務局庶務会計課 坂元 辰乃介

TEL: 058-230-8100

FAX: 058-230-8200

E-mail: [syomuk@gifu-pu.ac.jp](mailto:syomuk@gifu-pu.ac.jp)