

# がん治療におけるクローデイン-4の標的化

奈良県立医科大学分子病理学講座

谷 里 奈, 國 安 弘 基

## Targeting Claudin-4 in Cancer Therapy

Rina Fujiwara-Tani and Hiroki Kuniyasu

Department of Molecular Pathology Nara Medical University School of Medicine

Received May 25, 2023

### Abstract

The overexpression of claudin-4 (CLDN4) in many cancers has drawn attention to this protein as a new molecular target. There have been a number of attempts to target CLDN4 for cancer therapy. Targeting of CLDN4 is expected to provide multi-layered effects by enabling direct attacks on CLDN4-overexpressing cancer cells, disrupting the intratumoral microenvironment, and facilitating drug delivery by impairing tight junctions. This article describes anti-CLDN4 antibodies, CLDN4 gene knockdown, CPE and C-CPE, and CLDN4 binding peptides and their potential for cancer therapy.

Key words : claudin-4, molecular targeting, CPE

## 1. 抗 CLDN4 抗体

CLDN4 をその特異的な抗体を用いて標的化するためには、CLDN4 の細胞外ドメインに対する抗体を作製することが必須であるが、CLDN ファミリーメンバー間の相同性が高いため、単一の CLDN 特異的抗体を作製することは困難である<sup>1)</sup>。これまでに樹立が報告されている抗体には、CLDN3 と CLDN4 の両方の細胞外ループを認識するモノクローナル抗体があり、*in vitro* および *in vivo* で抗腫瘍効果が確認されている<sup>2,3)</sup>。鈴木らは、CLDN4 細胞外ループ 2 を認識するモノクローナル抗体 (KM3900) を作製し、*in vitro* で抗体依存性細胞傷害 (ADCC) と補体依存性細胞傷害 (CDC) を誘導し、*in vivo* で SCID マウスの膀胱癌と卵巣癌の増殖を抑制した<sup>4)</sup>。桑田らは DNA 免疫法を用いて、CLDN4 細胞外ループ 1 お

よび 2 を認識するモノクローナル抗体 (4D3) を作製し、ヌードマウスモデルで抗腫瘍効果を確認した<sup>5)</sup>。この 4D3 抗体は ADCC や CDC を誘導するが、特に、タイトジャンクション損傷による腫瘍微小環境への抗がん剤送達を促進することで、抗がん剤に対する増感効果を発揮することが特長である<sup>5)</sup>。その結果、4D3 と CDDP, 5-FU, paclitaxel, folfirinnox などの抗がん剤との併用による抗腫瘍効果が、膀胱癌、大腸癌、胃癌、膵癌、乳癌の動物モデルで証明されている<sup>5,6,7,8,9)</sup>。さらに、4D3 抗体は cetuximab, tamoxifen, および bisphosphonates に対しても増感作用を示した<sup>6,9)</sup>。また、4D3 によるタイトジャンクションの障害は、腫瘍微小環境内に高レベルに蓄積された EGF などの増殖因子や乳酸を減少させ、抗腫瘍効果を促進する<sup>5,9)</sup>。

CLDN4 は様々な上皮組織に発現しているため、CLDN4 を標的とする抗体のヒトへの安全性を確保す

ることが不可欠である<sup>10)</sup>。マウス抗 CLDN4 抗体を用いた研究では、担癌マウスにおいて、抗 CLDN4 抗体は非特異的 IgG と比較して体内分布に著しい変化を示さず、腫瘍内に高い集積性を示した。さらに、特異的な臓器障害は観察されなかった<sup>11)</sup>。

現在のところ、抗 CLDN4 抗体を試験する臨床試験は未施行であるが、CLDN6 や CLDN18 に対する抗体医薬の臨床試験は始まっている<sup>12, 13)</sup>。抗 CLDN4 抗体の臨床応用に向けた臨床治験が期待される。

## 2. CLDN4 遺伝子ノックダウン

胃癌や膀胱癌で CLDN4 をノックダウンすると、タイトジャンクション機能の指標である経上皮電気抵抗 (TER) が軽度低下する<sup>7, 14)</sup>。このため、CLDN4 ノックダウンでは、タイトジャンクションの障害による微小環境の破壊や抗がん剤透過性の促進は限定的なものにとどまる。この理由として考えられるのは、1つの CLDN をノックダウンすると、他の CLDN がタイトジャンクションの機能を代替し維持するようになることである。しかし、CLDN4 のノックダウンは非タイトジャンクションの CLDN4 を減少させるため、幹細胞化を抑制することが期待される<sup>14)</sup>。

## 3. CPE および C-terminus domain of CPE (C-CPE)

CPE は CLDN4 と CLDN3 の第 1 および第 2 細胞外ループの特定の amino 酸配列を認識し、C 末端のドメインのポケットを介してドッキングし、タイトジャンクションを破壊する。さらに、粘膜上皮の細胞膜を穿孔し、細胞内へのカルシウムの流入により細胞死を引き起こす<sup>15, 16)</sup>。したがって、CPE は CLDN4 を発現しているがん細胞に対して細胞毒性を示す。CPE の抗腫瘍効果は、実験によって前立腺癌<sup>17, 18)</sup>、非小細胞肺癌<sup>19)</sup>、膀胱癌<sup>20)</sup>、胃癌<sup>21)</sup>、卵巣癌<sup>22, 23)</sup>などで実証されている。

C-CPE は CPE の C 末端フラグメントである。CPE と同様に CLDN4 と CLDN3 に結合し、タイトジャンクションを障害するが、CPE と異なり細胞膜を穿孔しない<sup>24)</sup>。C-CPE によるタイトジャンクションの障害は、腫瘍微小環境のバリアを破壊し、ドラッグデリ

バリーを容易にする<sup>25)</sup>。このため、抗がん剤感受性の促進<sup>26)</sup>や転移の抑制<sup>27)</sup>をもたらすことが報告されている。さらに、C-CPE に毒素や抗がん剤を結合させることで、CLDN4 を発現するがん細胞にこれらを送達するキャリアとなる<sup>28)</sup>。例えば、緑膿菌のエキソトキシン A<sup>29, 30)</sup>、ジフテリア毒素フラグメント A<sup>31)</sup>、ドキソルピシン負荷ポリシアル酸ナノ粒子<sup>32)</sup>、<sup>111</sup>In<sup>33)</sup>、TNF<sup>34)</sup> に C-CPE を結合させることで CLDN4 を発現する癌細胞に細胞死を誘導することが可能である。しかし、CPE が有する免疫原性と潜在的な毒性は、その臨床応用を制限する可能性がある<sup>35)</sup>。*Clostridium perfringens* が食中毒を引き起こすように、CPE は粘膜上皮を損傷し、著しいサイトカイン反応を起こし、胃腸障害や急性循環障害を引き起こすことがある<sup>36, 37)</sup>。また、C-CPE は CPE と同様に CLDN4 の細胞質移行や細胞膜上での単離をもたらす可能性があり、それに伴う YAP 活性化<sup>38, 39)</sup>やインテグリン<sup>7, 14)</sup>を介した癌細胞の幹細胞性の亢進を惹起する可能性があり、その影響を充分解析する必要がある。

## 4. CLDN4 結合ペプチド

また、CLDN 結合剤として特定のペプチドを作製する試みも行われている。Hicks らは、CLDN4 の第 2 細胞外ループの DFYNP 配列を模倣した小さなペプチドが CLDN4 を障害し、アポトーシス誘導と腫瘍増殖抑制につながることを示した<sup>40)</sup>。これらの有望なデータを踏まえ、CLDN4 を標的としたペプチド創薬のさらなる進展が期待される。

## 結 語

CLDN4 は、細胞間のタイトジャンクションの形成に重要な役割を果たすタンパク質で、組織の健全性やバリア機能の維持に重要な役割を果たしている。近年、CLDN4 が様々な種類のがんに関与していることから、がん治療の標的として注目されている。がん治療において CLDN4 を標的とすることは有望であるが、これらのアプローチを検証するためには、さらなる研究と臨床試験が必要であることに留意することが重要である。腫瘍の不均一性、薬剤耐性、潜在的な副作用などの要因を注意深く考慮し、対処する必要がある。

る。さらに、CLDN4 標的化の有効性は、がんの種類やステージによって異なる可能性があり、個別化された治療戦略が必要となる。これらのことを考慮しても、CLDN4 の標的化は魅力的な対がん戦略ということが可能である。

### 利益相反

論文内容に関連し、開示すべき COI 関係にある企業などはない。

### 文 献

- 1) Hashimoto, Y., Okada, Y., Shirakura, K., Tachibana, K., Sawada, M., Yagi, K., Doi, T. and Kondoh, M.: Anti-Claudin Antibodies as a Concept for Development of Claudin-Directed Drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **368**: 179-186, 2019.
- 2) Kato-Nakano, M., Suzuki, M., Kawamoto, S., Furuya, A., Ohta, S., Nakamura, K. and Ando, H.: Characterization and evaluation of the antitumour activity of a dual-targeting monoclonal antibody against claudin-3 and claudin-4. *Anticancer Res* **30**: 4555-4562, 2010.
- 3) Li, X., Iida, M., Tada, M., Watari, A., Kawahigashi, Y., Kimura, Y., Yamashita, T., Ishii-Watabe, A., Uno, T., Fukasawa, M., Kuniyasu, H., Yagi, K. and Kondoh, M.: Development of an anti-claudin-3 and -4 bispecific monoclonal antibody for cancer diagnosis and therapy. *J Pharmacol Exp Ther* **351**: 206-213, 2014.
- 4) Suzuki, M., Kato-Nakano, M., Kawamoto, S., Furuya, A., Abe, Y., Misaka, H., Kimoto, N., Nakamura, K., Ohta, S. and Ando, H.: Therapeutic antitumor efficacy of monoclonal antibody against Claudin-4 for pancreatic and ovarian cancers. *Cancer Sci* **100**: 1623-1630, 2009.
- 5) Kuwada, M., Chihara, Y., Luo, Y., Li, X., Nishiguchi, Y., Fujiwara, R., Sasaki, T., Fujii, K., Ohmori, H., Fujimoto, K., Kondoh, M. and Kuniyasu, H.: Pro-chemotherapeutic effects of antibody against extracellular domain of claudin-4 in bladder cancer. *Cancer Lett* **369**: 212-221, 2015.
- 6) Fujiwara-Tani, R., Sasaki, T., Luo, Y., Goto, K., Kawahara, I., Nishiguchi, Y., Kishi, S., Mori, S., Ohmori, H., Kondoh, M. and Kuniyasu, H.: Anti-claudin-4 extracellular domain antibody enhances the antitumoral effects of chemotherapeutic and antibody drugs in colorectal cancer. *Oncotarget* **9**: 37367-37378, 2018.
- 7) Nishiguchi, Y., Fujiwara-Tani, R., Sasaki, T., Luo, Y., Ohmori, H., Kishi, S., Mori, S., Goto, K., Yasui, W., Sho, M. and Kuniyasu, H.: Targeting claudin-4 enhances CDDP-chemosensitivity in gastric cancer. *Oncotarget* **10**: 2189-2202, 2019.
- 8) Sasaki, T., Fujiwara-Tani, R., Kishi, S., Mori, S., Luo, Y., Ohmori, H., Kawahara, I., Goto, K., Nishiguchi, Y., Mori, T., Sho, M., Kondo, M. and Kuniyasu, H.: Targeting claudin-4 enhances chemosensitivity of pancreatic ductal carcinomas. *Cancer Med* **8**: 6700-6708, 2019.
- 9) Luo, Y., Kishi, S., Sasaki, T., Ohmori, H., Fujiwara-Tani, R., Mori, S., Goto, K., Nishiguchi, Y., Mori, T., Kawahara, I., Kondoh, M. and Kuniyasu, H.: Targeting claudin-4 enhances chemosensitivity in breast cancer. *Cancer Sci* **111**: 1840-1850, 2020.
- 10) Hashimoto, Y., Fukasawa, M., Kuniyasu, H., Yagi, K. and Kondoh, M.: Claudin-targeted drug development using anti-claudin monoclonal antibodies to treat hepatitis and cancer. *Ann N Y Acad Sci* **1397**: 5-16, 2017.
- 11) Hashimoto, Y., Kawahigashi, Y., Hata, T., Li, X., Watari, A., Tada, M., Ishii-Watabe, A., Okada, Y., Doi, T., Fukasawa, M., Kuniyasu, H., Yagi, K. and Kondoh, M.: Efficacy and safety evaluation of claudin-4-targeted antitumor therapy using a human and mouse cross-reactive monoclonal antibody. *Pharmacol Res Perspect* **4**: e00266, 2016.
- 12) Hassan, R., Blumenschein, G. R., Jr., Moore, K. N., Santin, A. D., Kindler, H. L., Nemunaitis, J. J., Seward, S. M., Thomas, A., Kim, S. K.,

- Rajagopalan, P., Walter, A. O., Laurent, D., Childs, B. H., Sarapa, N., Elbi, C. and Bendell, J. C.: First-in-Human, Multicenter, Phase I Dose-Escalation and Expansion Study of Anti-Mesothelin Antibody-Drug Conjugate Anetumab Ravtansine in Advanced or Metastatic Solid Tumors. *J Clin Oncol* **38**: 1824-1835, 2020.
- 13) Zhang, J., Dong, R. and Shen, L.: Evaluation and reflection on claudin 18.2 targeting therapy in advanced gastric cancer. *Chin J Cancer Res* **32**: 263-270, 2020.
- 14) Maesaka, F., Kuwada, M., Horii, S., Kishi, S., Fujiwara-Tani, R., Mori, S., Fujii, K., Mori, T., Ohmori, H., Owari, T., Miyake, M., Nakai, Y., Tanaka, N., Bhawal, U. K., Luo, Y., Kondoh, M., Fujimoto, K. and Kuniyasu, H.: Hypomethylation of CLDN4 Gene Promoter Is Associated with Malignant Phenotype in Urinary Bladder Cancer. *Int J Mol Sci* **23**: 6516, 2022.
- 15) Mitchell, L. A. and Koval, M.: Specificity of interaction between clostridium perfringens enterotoxin and claudin-family tight junction proteins. *Toxins (Basel)* **2**: 1595-1611, 2010.
- 16) Shrestha, A., Uzal, F. A. and McClane, B. A.: The interaction of Clostridium perfringens enterotoxin with receptor claudins. *Anaerobe* **41**: 18-26, 2016.
- 17) Romanov, V., Whyard, T. C., Waltzer, W. C. and Gabig, T. G.: A claudin 3 and claudin 4-targeted Clostridium perfringens protoxin is selectively cytotoxic to PSA-producing prostate cancer cells. *Cancer Lett* **351**: 260-264, 2014.
- 18) Landers, K. A., Samaratinga, H., Teng, L., Buck, M., Burger, M. J., Scells, B., Lavin, M. F. and Gardiner, R. A.: Identification of claudin-4 as a marker highly overexpressed in both primary and metastatic prostate cancer. *Br J Cancer* **99**: 491-501, 2008.
- 19) Piontek, A., Eichner, M., Zwanziger, D., Beier, L. S., Protze, J., Walther, W., Theurer, S., Schmid, K. W., Führer-Sakel, D., Piontek, J. and Krause, G.: Targeting claudin-overexpressing thyroid and lung cancer by modified Clostridium perfringens enterotoxin. *Molecular oncology* **14**: 261-276, 2020.
- 20) Michl, P., Buchholz, M., Rolke, M., Kunsch, S., Lohr, M., McClane, B., Tsukita, S., Leder, G., Adler, G. and Gress, T. M.: Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. *Gastroenterology* **121**: 678-684, 2001.
- 21) Liang, Z. Y., Kang, X., Chen, H., Wang, M. and Guan, W. X.: Effect of Clostridium perfringens enterotoxin on gastric cancer cells SGC7901 which highly expressed claudin-4 protein. *World journal of gastrointestinal oncology* **9**: 153-159, 2017.
- 22) Tanaka, S., Aoyama, T., Ogawa, M., Takasawa, A., Murata, M., Osanai, M., Saito, T. and Sawada, N.: Cytotoxicity of Clostridium perfringens enterotoxin depends on the conditions of claudin-4 in ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res* **371**: 278-286, 2018.
- 23) English, D. P. and Santin, A. D.: Claudins overexpression in ovarian cancer: potential targets for Clostridium Perfringens Enterotoxin (CPE) based diagnosis and therapy. *Int J Mol Sci* **14**: 10412-10437, 2013.
- 24) Ogbu, C. P., Roy, S. and Vecchio, A. J.: Disruption of Claudin-Made Tight Junction Barriers by Clostridium perfringens Enterotoxin: Insights from Structural Biology. *Cells* **11**: 903, 2022.
- 25) Kondoh, M., Takahashi, A., Fujii, M., Yagi, K. and Watanabe, Y.: A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator. *Biol Pharm Bull* **29**: 1783-1789, 2006.
- 26) Gao, Z., Xu, X., McClane, B., Zeng, Q., Litkouhi, B., Welch, W. R., Berkowitz, R. S., Mok, S. C. and Garner, E. I.: C terminus of Clostridium perfringens enterotoxin downregulates CLDN4 and sensitizes ovarian cancer cells to Taxol and Carboplatin. *Clin Cancer Res* **17**: 1065-1074, 2011.
- 27) Banga, A. R., Odiase, P., Rachakonda, K., Garg, A. P., Adunyah, S. E. and Rachakonda,

- G.: Application of C-Terminal Clostridium Perfringens Enterotoxin in Treatment of Brain Metastasis from Breast Cancer. *Cancers (Basel)* **14**: 4309, 2022.
- 28) Kojima, T., Kyuno, D. and Sawada, N.: Targeting claudin-4 in human pancreatic cancer. *Expert Opin Ther Targets* **16**: 881-887, 2012.
- 29) Saeki, R., Kondoh, M., Kakutani, H., Tsunoda, S., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Tsutsumi, Y., Horiguchi, Y. and Yagi, K.: A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* **76**: 918-926, 2009.
- 30) Hashimi, S. M., Yu, S., Alqurashi, N., Ipe, D. S. and Wei, M. Q.: Immunotoxin-mediated targeting of claudin-4 inhibits the proliferation of cancer cells. *Int J Oncol* **42**: 1911-1918, 2013.
- 31) Kakutani, H., Kondoh, M., Saeki, R., Fujii, M., Watanabe, Y., Mizuguchi, H. and Yagi, K.: Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **75**: 213-217, 2010.
- 32) Shim, M. K., Na, J., Cho, I. K., Jang, E. H., Park, J., Lee, S. and Kim, J. H.: Targeting of claudin-4 by Clostridium perfringens enterotoxin-conjugated polysialic acid nanoparticles for pancreatic cancer therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **331**: 434-442, 2021.
- 33) Torres, J. B., Mosley, M., Koustoulidou, S., Hopkins, S., Knapp, S., Chaikwad, A., Kondoh, M., Tachibana, K., Kersemans, V. and Cornelissen, B.: Radiolabeled cCPE Peptides for SPECT Imaging of Claudin-4 Overexpression in Pancreatic Cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **61**: 1756-1763, 2020.
- 34) Yuan, X., Lin, X., Manorek, G., Kanatani, I., Cheung, L. H., Rosenblum, M. G. and Howell, S. B.: Recombinant CPE fused to tumor necrosis factor targets human ovarian cancer cells expressing the claudin-3 and claudin-4 receptors. *Mol Cancer Ther* **8**: 1906-1915, 2009.
- 35) Gao, Z. and McClane, B. A.: Use of Clostridium perfringens Enterotoxin and the Enterotoxin Receptor-Binding Domain (C-CPE) for Cancer Treatment: Opportunities and Challenges. *J Toxicol* **2012**: 981626, 2012.
- 36) Shrestha, A. and McClane, B. A.: Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of Clostridium perfringens enterotoxin. *mBio* **4**: e00594-00512, 2013.
- 37) Wallace, F. M., Mach, A. S., Keller, A. M. and Lindsay, J. A.: Evidence for Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) inducing a mitogenic and cytokine response in vitro and a cytokine response in vivo. *Curr Microbiol* **38**: 96-100, 1999.
- 38) Fujiwara-Tani, R., Fujii, K., Mori, S., Kishi, S., Sasaki, T., Ohmori, H., Nakashima, C., Kawahara, I., Nishiguchi, Y., Mori, T., Sho, M., Kondoh, M., Luo, Y. and Kuniyasu, H.: Role of Clostridium perfringens Enterotoxin on YAP Activation in Colonic Sessile Serrated Adenoma/ Polyps with Dysplasia. *Int J Mol Sci* **21**: 3840, 2020.
- 39) Nakashima, C., Yamamoto, K., Kishi, S., Sasaki, T., Ohmori, H., Fujiwara-Tani, R., Mori, S., Kawahara, I., Nishiguchi, Y., Mori, T., Kondoh, M., Luo, Y., Kirita, T. and Kuniyasu, H.: Clostridium perfringens enterotoxin induces claudin-4 to activate YAP in oral squamous cell carcinomas. *Oncotarget* **11**: 309-321, 2020.
- 40) Hicks, D. A., Galimanis, C. E., Webb, P. G., Spillman, M. A., Behbakht, K., Neville, M. C. and Baumgartner, H. K.: Claudin-4 activity in ovarian tumor cell apoptosis resistance and migration. *BMC Cancer* **16**: 788, 2016.