

200912042A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

Claudin binder 修飾ナノリポソームを利用した
上皮癌の早期診断・治療法の開発に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成22(2010)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

Claudin binder 修飾ナノリポソームを利用した
上皮癌の早期診断・治療法の開発に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成22(2010)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

Claudin binder修飾ナノリポソームを利用した上皮癌の早期診断・治療法の開発

に関する研究 ----- 1

近藤昌夫

II. 分担研究報告

1. Claudin binder修飾リポソームの創製に関する研究

----- 27

鈴木亮

2. Claudin binderの創製に関する研究

----- 31

阿部康弘

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 36

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 39

Claudin binder 修飾ナノリポソームを利用した上皮癌の早期診断・治療法の開発に関する研究

研究代表者 近藤 昌夫 大阪大学大学院 薬学研究科 准教授

研究要旨

本研究は、世界屈指のナノリポソーム技術およびclaudin (CL) binder技術を有効活用し、上皮細胞癌化の超早期イベント『分裂軸の回転』を認識する初めての癌の低侵襲性早期診断・治療用ナノリポソームを創出し、医薬基盤研究所、大阪大学が中核となる先端医療開発特区（スーパー特区）と密接に連携し、ナノメディシンとしての実用化を目指すものである。

周知のように、癌克服に向けた最重要戦略は、癌を早期に発見し、早期に治療することであり、腫瘍特異的抗原を利用した既存の癌診断検出感度（ 10^9 個以上の癌細胞）を凌駕する、新たな原理に基づく癌診断・治療法の開発が癌克服の成否を握っている。ナノリポソームは親水性・疎水性抗癌剤をデリバリーできること、リガンド分子を高密度表面修飾できることから、近未来における癌治療を担うナノメディシンとして期待されているものの、癌特異的リガンド分子開発および有効かつ簡便なイメージング法開発の遅延と相俟って、悪性腫瘍の90%を占める上皮癌に有効なナノメディシン開発は著しく遅れている。

現在までに当研究グループでは、独自の CL binder を用いて非侵襲性投与方法（PCT/JP2008/61723）および CL 指向性抗癌剤を創製、機能性蛋白質創出技術を用いて新規 CL binder の作製を推進し、独自のリガンド修飾脂質技術（WO2006/028129）、超音波造影ガス封入ナノリポソーム技術（バブルナノリポソーム）（特開2005-168312）を用いて癌ターゲティング、血栓部位の超音波造影に成功している。本課題は、これら独自の技術を融合し、『分裂軸の回転』に伴い細胞表面に露出する CL を標的とした低侵襲性早期診断・治療法の創出を試みるものであり、独創性・優位性を兼ね備えたテーマである。

平成 21 年度は、既存の CL-4 binder (C-CPE) を用いて CL を利用した癌治療戦略の可能性を詳細解析し、新規 CL-1, -4 binder の創製を試みた。さらに、C-CPE を用いて CL-4 指向性リポソーム作製条件を設定し、CL binder 探索シーズとなる各種ライブラリの作製を試みた。

A. 研究目的

本研究は、独自の Claudin (CL) binder およびナノリポソーム技術を融合し、上皮細胞癌化超早期イベント『分裂軸の回転』に伴い局在性が変化する密着結合 (TJ) 構成蛋白質 CL を利用した、初めての上皮癌早期診断・治療用ナノメディシンを開発することを目的とする。依然として死因の第1位は癌であり、悪性腫瘍の90%を占める上皮癌の克服

が国民の健康寿命延長の鍵を握っている。癌克服の最重要基本戦略は癌を早期に発見し、早期に治療することであり、癌細胞特異的抗原を利用した既存の癌診断の検出感度（ 10^9 個以上の癌細胞）を凌駕する、新たな癌診断・治療法の開発が急務となっている。上皮細胞が癌化すると、分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、細胞間隙面に局在する CL を表面に露出した状態で増殖を

開始することから、CLリガンドを利用すれば癌化早期イベント『分裂軸の回転』を利用した新規癌診断・治療法の開発に繋がると考えられる。

以上の背景を踏まえ、平成21年度は既存のCL-4 binder (C-CPE)と蛋白合成阻害因子(PSIF)との融合蛋白質を作製しCLを標的とした癌治療戦略の特性を詳細解析した。さらに、新規CL binderの創出を試みた。また、C-CPEをCL-4 binderのモデル分子として使用し、リポソーム修飾条件を設定し、CL binder探索用のライブラリを作製した。

B. 研究方法

B-1. pET-MCS-PSIF の作製

まず、His-tag 融合蛋白質作製用プラスミド pET-16b (Novagen Inc., W.I., U.S.A) に、マルチクローニングサイト (MCS) を組み込み、pET-MCS を作製した。PSIF 発現プラスミド pPBV-PE40 を鋳型として、PCR 法にて PSIF DNA 断片を増幅した。PCR には、forward primer (5'-GATGATCTGAGCGGCCGCAACCCGAGGGCGG CAG -3', NotI site is under lined)と reverse primer (5'-TCCAGATCTTACAGTTTCGTCTTTCTTCAG GTCCTC -3', BglII site is under lined)を用いて、KOD-plus (TOYOBO CO., Osaka, Japan) を用いて増幅させた。得られた PCR 産物を PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて DNA 精製を行い、NotI, BglII を用いて 37 °C で一晩制限酵素処理し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。pET-MCS を NotI, BamHI 処理した pET-MCS と PCR 断片を T4 DNA ligase を用いて 16 °C で一晩ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を大腸菌に形質転換し、プラスミドを精製し、インサートの確認を行った。インサートが確認されたサンプルについてシーケンスを確認し、pET-MCS-PSIF を得た。

B-2. C-CPE-PSIF 発現プラスミド (pET-C-CPE-PSIF) の作製

C-CPE の遺伝子を pET16b に組み込んだ

pET-H₁₀PER (大阪大学微生物病研究所 堀口安彦博士より供与)を鋳型として、PCR法にてC-CPE DNA断片を増幅した。PCRには、forward primer (5'-GGAATTCATATGATATAGAAAAGAAATC CTTGATTTAGCTGCT-3', SpeI site is under lined) と reverse primer (5'-GGACTAGTAAATTTTTGAAATAATATTGAATA AGGGTAATTTCCACTATATATG-3', NdeI site is under lined) を用い、KOD-plus (TOYOBO CO., Osaka, Japan) を用いて増幅させた。得られた PCR 産物を PCR purification Kit を用いて精製し、SpeI/NdeI を用いて 37 °C で一晩制限酵素処理した後に、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。pET-MCS-PSIF も同様に SpeI/NdeI を用いて 37 °C で 1.5 時間処理した後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。PCR 断片およびベクターを T4 DNA ligase を用いて 16 °C で一晩ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿した後に、NcoI を用いて 37 °C で 2 時間処理した。

得られたプラスミドで大腸菌に形質転換し、大腸菌を回収した。QIA prep® Spin Mini prep Kit にて大腸菌よりプラスミドを精製し、NcoI 処理によりインサートの確認を行った。インサートが確認されたサンプルについてシーケンスを確認し、pET-C-CPE-PSIF を得た。

B-3. PSIF および C-CPE-PSIF の精製

pET-PSIF または pET-C-CPE-PSIF を大腸菌 BL21(DE3) (Novagen) に導入後、LA プレートに播き 37 °C で一晩培養した。翌日コロニーを 20 個ピックアップし LA 培地 100 mL にて 37 °C で一晩振とう培養した。翌日 LA 培地 1 L に培養液を移し、37 °C で 3 時間振とう培養後、IPTG を終濃度 0.1 mM となるように添加し、さらに 3 時間振とう培養した。その後 4 °C、10,000 rpm で 2 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-80 °C で凍結保存した。

凍結保存した大腸菌を氷上で溶解し、buffer A (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 400 mM NaCl, 5 mM

MgCl₂, 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride, 1 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) を 1 mL/100 mL culture の割合で加え、氷冷しながら超音波処理を 40 秒間、3 回行い大腸菌を破碎した。4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。あらかじめ 6 M guanidine/EDTA 10 mL, 0.1 M NiSO₄ 500 μL, MilliQ 5 mL, buffer A 10 mL を順に流し平衡化しておいた HiTrap Chelating HP (GE Healthcare Bio-Sciences AB, U.K.) に、分取した上清を流し PSIF および C-CPE-PSIF を吸着させた。Buffer A を 15 mL 流した後、100 mM imidazole 溶出液を 10 mL 流すことにより大腸菌由来のタンパク質の非特異的吸着を除いた後に、400 mM imidazole 溶出液 10 mL を流し溶出液を 1 mL ずつ分取した。溶出画分を 12% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離後、CBB 染色を行い、目的の蛋白質が多く溶出されている画分を確認した。次に、PSIF, C-CPE-PSIF が多く溶出されている画分のバッファーを PD-10 カラム (GE Healthcare Bio-Sciences AB, U.K.) を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより PBS(-) (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) に置換した。あらかじめ PD-10 カラムに PBS を 30 mL 流して平衡化しておき、HiTrap Chelating HP より得られた溶出画分を 1 mL 流し、その後 PBS (-) を流して溶出液を 500 μL ずつ分取した。次にウシ血清アルブミンを標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Chemical Co., Rockford, IL., USA) を用いて、PSIF および C-CPE-PSIF の濃度を 570 nm における吸光度から算出した。

B-4. Western blotting

12% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE (30 mA/枚、約 1.5 時間) を行った後、TRANS-BLOTR SD SEMI-DRY TRANSEFR CELL によりゲル中のタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA で 20 分間転写した。転写後、PVDF 膜を 5% スキムミルク/TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween

20) に浸して、室温で 2 時間振とうし、ブロッキング操作を行った。TBS-T で 5 回洗浄後、1 次抗体 anti-His-Tag mAb (2,000 倍希釈、Novagen, EMD Bioscience, Germany) と 2 時間反応させた。TBS-T で洗浄後、2 次抗体 HRP 標識 goat anti-mouse IgG (2,000 倍希釈、CEMICON, CA) と 1 時間反応させた。検出には、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, UK) を用い露光した X 線フィルム (KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC INC., TOKYO, JAPAN) を現像した。

B-5. 細胞培養

マウス線維芽細胞 L 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS, JRH Bioscience Inc., Kansas, USA), 20 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine を含む EAGLE's MEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。さらに各種 mouse claudin を発現させた L 細胞 (claudin 発現 L 細胞、京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学 月田承一郎博士から供与) は、上記の培地に G418 (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を終濃度 500 μg/mL になるように添加した培地を用いて、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞は 10% FBS, 20 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine を含む RPMI 1640 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。また、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞および SK-HEP-1 細胞は 10% FBS, 20 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine を含む Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM (D-MEM) 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞は 10% FBS, 20 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine, 19.4 mM D-glucose, 1% Non-essential amino acid solution (Invitrogen, Co., Ltd) を含む D-MEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan) を用

いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

マウス乳癌由来 4T1 細胞は 10%FBS, 20 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES を含む D-MEM 培地を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

B-6. 細胞の claudin 発現確認

L 細胞および各種 claudin 発現 L 細胞を氷冷 PBS (-) 1 mL により培養ディッシュからセルスクレーパーによって剥がし、細胞を回収した。氷冷 PBS (-) 1 mL を加え細胞を懸濁させ、4 °C、3,000 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。さらにこの操作を 3 回繰り返した。遠心分離後、上清を取り除き lysis buffer (1% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail 含有 PBS (-)) を加え、氷冷しながら超音波処理を 20 秒間、3 回行い、4 °C、15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を回収し細胞溶解液を作製した。細胞溶解液に 4 × SDS buffer を加え 5 分間加熱し、泳動用サンプルとした。15% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE、Western blotting を行った。Claudin の検出には rabbit anti-claudin-1 pAb、rabbit anti-claudin-2 pAb、mouse anti-claudin-4 pAb、rabbit anti-claudin-5 pAb (一次抗体; 2,000 倍希釈、二次抗体: 5,000 倍希釈、invitrogen, South San Francisco, CA) を用い、PVDF 膜を Re-Blot Plus (CHEMICON international Inc., CA) でリブプローブした後、β-actin (一次抗体: 5,000 倍希釈、二次抗体: 10,000 倍希釈, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を検出した。

Caco-2 細胞を 6-well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, USA) に 2 × 10⁵ cells/well で播種後、1, 3, 5, 7, 9 日目に細胞を回収した。Lysis buffer II (10 mM Tris-HCl (pH7.4), 8.75 mg/mL NaCl, 2.5 mg/ml デオキシコール酸, 0.38 mg/mL EGTA, 2 mM SDS, 1% NP-40) を用いて膜蛋白質の可溶化を行い、上記に準じて western blotting を行った。

B-7. Claudin-4 発現 L 細胞に対する C-CPE-PSIF

の細胞傷害性の検討

Claudin-4 発現 L 細胞を 96-well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A) に 1 × 10⁴ cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μL に交換後、PBS(-) で段階希釈した PSIF もしくは C-CPE-PSIF を終濃度 0.5, 1, 10 および 20 ng/mL となるように 10 μL ずつ添加した。24 時間後に WST-8 法により細胞生存率を測定した。各 well に SF 試薬 (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を 10 μL ずつ添加し、1.5 時間培養後、450 nm における吸光度を測定した。PBS (-) 添加群の吸光度を基準として各蛋白質濃度における吸光度の相対値を求め、生存率とした。

B-8. C-CPE を用いた競合阻害実験

Claudin-4 発現 L 細胞を 96-well plate に 1 × 10⁴ cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 80 μL に交換後、PBS (-) で段階希釈した BSA または C-CPE を終濃度 0, 0.1, 0.5, 1, 5 および 10 μg/mL となるように 10 μL ずつ添加し、2 時間処理した。さらに 100 ng/mL の C-CPE-PSIF を 10 μL ずつ加えた (終濃度 10 ng/mL)。24 時間培養後、WST-8 法により細胞生存率を測定した。

B-9. L 細胞および各種 claudin 発現 L 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性試験

L 細胞および各種 claudin 発現 L 細胞を 96-well plate に 1 × 10⁴ cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μL に交換後、PBS (-) で段階希釈した C-CPE-PSIF 終濃度 0, 1, 10 ng/mL となるように 10 μL ずつ添加し、24 時間培養後 WST-8 法により細胞生存率を測定した。

B-10. 癌細胞株に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性試験

MCF-7、HepG2、SK-HEP-1 細胞を 96-well plate に 1 × 10⁴ cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μL に交換後、PBS (-) で段階希釈した PSIF もしくは C-CPE-PSIF を 10 μL ずつ添加し、48 時間後に WST-8 法により細胞生

存率を測定した。

B-11. 細胞密度の異なる Caco-2 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性試験

プレコンフルエント Caco-2 (TJ-undeveloped) 細胞に対する傷害性試験は以下の通り行った。Caco-2 細胞を 96-well plate に 1×10^4 cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μ L に交換後、PBS (-) で段階希釈した C-CPE-PSIF を 10 μ L ずつ添加し、48 時間培養した。

一方、コンフルエント Caco-2 (TJ-developed) 細胞に対する傷害性試験では、Caco-2 細胞を 96-well plate に播種後、2 日に 1 回の頻度で培地交換し、コンフルエントになるまで培養したものをを用いた。新鮮な培地 90 μ L に交換後、PBS (-) で段階希釈した C-CPE-PSIF を 10 μ L ずつ添加し、48 時間培養し、WST-8 法により細胞障害性を評価した。。

B-12. C-CPE-PSIF の細胞極性特異性の検討

・細胞培養, TER 測定

Caco-2 細胞 5×10^4 cells/mL、200 μ L/well を 6.5-mm Transwell (0.33 cm², Corning, Inc., N.Y., U.S.A) に播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下で培養した。2 日に 1 回の頻度で培地を交換し、細胞の TJ 形成の度合いを Millicell[®]-ERS (Millipore Corp., Bedford, U.S.A) による TER の測定によって評価した。約 2 週間後、TER が安定した時点で MEM 培地に交換し、24 時間前培養した後、終濃度 10, 50, 200 ng/mL の C-CPE-PSIF を apical 側もしくは basal 側に添加した。添加 48 時間後に TER 値を測定し、添加前を 100%とした際の相対値を算出した。

・LDH 法による細胞傷害性の検討

C-CPE-PSIF の作用により、細胞が自然放出した乳酸脱水素酵素(LDH)量 (放出 LDH 量) を測定するため、各 well の apical 側の培養上清 75 μ L をエッペンチューブへ分取し、3,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した (放出 LDH 量測定用サ

ンプル)。次に細胞が保持する最大の LDH 量 (総 LDH 量) を測定するため、plate を -80 $^{\circ}$ C で凍結した後 37 $^{\circ}$ C で融解した。上清をエッペンチューブに回収し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した後に、上清を回収した (総 LDH 量測定用サンプル)。放出 LDH 量測定サンプルおよび総 LDH 量測定サンプルを D-MEM 培地を用いて適切に希釈した後、96-well plate (IWAKI Glass Co., Ltd, Tokyo, Japan) に 50 μ L ずつ移し、CytoTox96[®] Non-Radioactive cytotoxicity Assay (Promega corporation, W.I., U.S.A) に含まれる Substrate Mix 50 μ L を添加した。Plate を遮光下で室温、30 分間放置後、同キットに含まれる Stop Solution 50 μ L を添加し、490 nm における吸光度を測定した。総 LDH 量測定用サンプルの吸光度は培養液 100 μ L 中に放出されたものとして補正を加えた。LDH 放出率 (%) は、総 LDH 量に対する放出 LDH 量の割合で示した。

B-13. C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF 発現プラスミドの作製

pETH₁₀PER を鋳型とし、forward primer (5' -GGAATTCATATGGATATAGAAAAGAAATCCTTGATTTAGCTGCT-3', SpeI site is under lined) と reverse primer (5' -GGACTAGTAAATTTTTGCTATTGAATAAGGGTAATTTCCACTATATATG-3', NdeI site is under lined) を用いて PCR 法にて C-CPE_{Y306A/L315A} DNA 断片を増幅し、pET-MCS-PSIF にクローニング断片を挿入し、pET-C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF プラスミドを作製した。

B-14. C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF の精製

C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF 蛋白質の精製は、3 に準じて行った。

B-15. 4T1 細胞の claudin-4 発現確認

・Western blotting

4T1 細胞における claudin-4 の発現確認は、6 に準じて行った。なお、膜蛋白質の可溶化は Lysis buffer II (10 mM Tris-HCl (pH7.4), 8.75 mg/mL NaCl, 2.5 mg/ml デオキシコール酸, 0.38 mg/mL

EGTA, 2mM SDS, 1% NP-40) を用いて行った。

・RT-PCR

4T1 細胞 5×10^6 個を回収し、PBS (-) で洗浄後、High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いて、total RNA の抽出を行った。細胞のペレットに Lysis/binding buffer ①を加え、ボルテックスした後に、High pure フィルターチューブにアプライした。10,000 rpm で 15 秒間遠心分離した後に、DNase 反応液を加え、室温で 15 分放置した。Wash buffer I ④/Wash buffer II ⑤でカラムを洗浄した後に、Elution buffer 42.5 mL で total RNA を抽出した。さらに、染色体 DNA を完全に除くため、抽出した RNA を RNase-free DNase (BcaBEST™ RNA PCR kit (Takara Inc., Shiga, Japan)) で 37 °C、30 分間処理した。抽出した RNA 200 ng を Takara RNA PCR Kit (Takara Inc., Shiga, Japan) を用いて、逆転写し cDNA を得た。逆転写反応は、dT adaptor をプライマーとして用い、42 °C を 30 分間、95 °C を 5 分間、5 °C を 5 分間行った。

得られた cDNA を用いて、claudin-4 遺伝子および β -actin 遺伝子に対する PCR 反応を行った。PCR には Ex Taq DNA polymerase (Takara Inc., Shiga, Japan) を用い、熱変性処理を 94 °C 30 秒間、アニーリングを 60 °C 30 秒間、伸長反応を 72 °C に設定し、30 サイクル行った。プライマーは以下に示したものをを用い、伸長反応は claudin-4 では 40 秒間、 β -actin は 30 秒間ずつ行った。PCR 産物を 2% アガロースゲルにて泳動し、claudin-4 は 600 bp 付近の、 β -actin は 400 bp 付近のバンドを確認した。また対照として、逆転写反応を行っていない RNA (Non-RT) を同様に PCR し、RNA 中にゲノム DNA の混入がないことを確認した。

<Primer>

Claudin-4 Forward primer : 5' -
ATGGCGTCTATGGGACTACAGGTCC - 3'

Reverse primer : 5' -
CCGAGTAGGGCTTGTGCTTGCTAC - 3'

β -actin Forward primer : 5' -

TAGATGGGCACAGTGTGTGGG - 3'

Reverse primer : 5' -
GGCGTGATGGTGGGCATGG - 3'

B-16. 4T1 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性試験

4T1 細胞を 96-well plate に 5×10^3 cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μ L に交換後、PBS (-) で段階希釈した PSIF、C-CPE-PSIF もしくは C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF を 10 μ L ずつ添加し、48 時間後に WST-8 法により細胞生存率を測定した。

B-17. 4T1 細胞皮下移植マウスの作製

4T1 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 1 mL を加え細胞を懸濁させ、4 °C、1,500 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 2×10^6 cells/mL になるように PBS (-) で調整した。ジエチルエーテル (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) 麻酔下の BALB/c マウス (雌性、7-8 週令) の右腹部皮下に、調整した 4T1 細胞を 50 μ L ずつ、27G 注射針を用いて移植した (day0)。

B-18. C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

PBS (-) を用いて、PSIF は 1 μ g/mL、C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF 1 μ g/mL、C-CPE-PSIF は 0.4 または 1 μ g/mL となるように希釈した。4T1 細胞を移植した日から、週に 3 回、尾静脈より各蛋白質をマウスの体重 20 g 当り 100 μ L 投与した。なお、毎回投与直前に腫瘍径と体重を測定し、腫瘍体積を [腫瘍の長径 (mm)] \times [腫瘍の短径 (mm)]²/2 mm³ として算出した。

B-19. 肺への自然転移数の測定

4T1 細胞移植後 35 日目のマウスの気道より、India ink (ammonia 水 2 滴を含む 15% ink) を 22G 注射針を用いて 5 mL 前後注入して肺を染色した後、肺を摘出した。Fekete 溶液 (70% ethanol:10% formaldehyde:glacial acetic acid = 100:10:5)

に一晩浸漬し固定した後に、肉眼（×3.5ルーペ）で浸潤・転移の有無および転移結節数を観察した。

B-20. 統計学的評価

有意差検定はDunnett法を用いて行い、危険率が5%未満（ $p < 0.05$ ）の場合有意差が認められるとした。また、各測定値は実験例数の平均値 ± 標準誤差で表した。

B-21. C-CPE 変異体の作製

C-CPE の遺伝子を pET-16b (Novagen Inc., USA) に挿入した pET-H₁₀PER を鋳型とし、各種プライマーを用いてPCRによって、C-CPE 変異体断片をクローニングし、本クローニング断片を pET16b に挿入し、C-CPE 変異体発現ベクターとして使用した。

C-CPE 変異体発現 plasmid 1 μ L を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) 10 μ L に加え、氷上で30分間静置し、42 $^{\circ}$ Cで40秒間ヒートショックを行い、氷上で2分間静置した。その後、SOC 培地を添加し 37 $^{\circ}$ Cにて40分間培養した後、LA 培地プレートに播き一晩培養した。1コロニーを LA 培地 3 mL で 37 $^{\circ}$ C、一晩振盪培養した。翌日 LA 培地を 2 mL を 6 本に分注し、50 μ L ずつ前培養した大腸菌液を加え 37 $^{\circ}$ Cで2時間振盪培養した。その後、IPTG 刺激後大腸菌を回収し、buffer A に懸濁し、超音波処理などにより可溶化後、遠心した上清を HiTrap Chelating HP column にアプライした。カラムに吸着した C-CPE mutant を imidazole によって溶出し、PD-10 カラムを用いて溶媒を PBS に置換し、実験に使用した。

B-22. C-CPE の claudin-4 結合性評価

Biacore を用いて C-CPE 変異体の claudin-4 結合性を解析した。尚、詳細は特許の関係上割愛した。

B-23. C-CPE 誘導体ライブラリの作製

C-CPE の遺伝子を pET-16b (Novagen Inc., USA) に挿入した pET-H₁₀PER を鋳型とし、claudin-4 結合に関与するアミノ酸を nns 配列に置換した reverse

primer と forward primer を用いて、KOD-plus (TOYOBO, Co., Ltd, Sience, USA) によりPCRを行なった。PCR産物を PCR Purification Kit (50) (QIAGEN Sience, ISA) で精製し、さらにエタノール沈殿により濃縮した。この PCR 産物を pY03-atac に挿入し、C-CPE mutant DNA ライブラリとした。

凍結保存した C-CPE mutant DNA ライブラリ (グリセロールストック) を氷上で溶解し、25 mL の 2YTGA 培地に加え OD₆₀₀ = 0.09 に調整した。37 $^{\circ}$ Cで OD₆₀₀ = 0.3-0.6 まで振盪培養し、M13K07 helper phage (Invitrogen, Co., Ltd) を添加後、37 $^{\circ}$ C 30分間静置し、さらに 37 $^{\circ}$ C 30分間振盪培養した。その後、3000xg 10分間遠心分離し、大腸菌を回収、100 μ g/ml ampicilin sodium, 50 μ g/mL kanamycin を添加した 2YT (2YTAK) 培地 50 mL で 37 $^{\circ}$ C振盪培養した。6時間後 1,000 x g、10分間遠心分離し、その上清を回収し、さらに 15,660 x g、15 min で遠心分離を行なった。上清 40 mL に対して PEG-NaCl (20% PEG6000, Wako Pure Chemicals Ind., Osaka, Japan, 2.5 M NaCl, NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) 溶液 10 mL を添加し、転倒混和後 4 $^{\circ}$ C 1時間静置した。次に再び 15,660 x g、10分間遠心分離し、沈殿したペレットを NTE buffer (0.1 M NaCl, 10mM Tris, 1 mM EDTA-2Na) 1 mL に溶解した後に 0.02 μ m フィルター (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) を用いて濾過し、この溶液を C-CPE mutant ファージライブラリ溶液とした。

B-24. Claudin-1 binder のスクリーニング

mCL1-BV を 0.5 μ g/100 μ L in TBS でイムノチューブ (Thermo Scientific, Rockford, IL) に添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置することで固相化した。

翌日、PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) でイムノチューブを3回洗浄した後、4% Block Ace 350 μ L 添加し、常温で2時間ブロッキングした。また、ファージライブラリ 50 μ L と 8% Block Ace 50 μ L を混合し、4 $^{\circ}$ Cで1時間ブロッキングした。ブロッキング後のイムノチューブを PBS で3回洗浄した後、ブロッキングしたファージライブラリ液を 100 μ L 添加し、常温で2時間静置した。

その後、0.05% Tween20 含有 PBS (PBST)、PBS でそれぞれ各 15 回ずつ洗浄し、100 mM HCl 100 μ L 添加、4 $^{\circ}$ C、10 分間作用させることで CL1-BV に結合しているファージを解離させた。1 M Tris-HCl 50 μ L を加えて HCl を中和し、ファージ溶液を回収した。ファージ溶液 100 μ L を大腸菌 TG1 ($OD_{600} = 0.4-0.6$ に調整) 300 μ L と混合し、37 $^{\circ}$ C 1 時間静置することでファージを感染させた。その後、LAG 培地プレート 2 枚に播種し一晩培養した。翌日 LAG 培地プレートから TG1 を、セルスクレーパーを用いて 2YTGA 培地で回収し、終濃度 10% のグリセロールと混合した後、-80 $^{\circ}$ C に保存した。さらに、冷凍保存した TG1 からファージを作製し、上記の作業を繰り返すことで 2nd、3rd パンニングを行なった。

パンニング後のファージを感染させた TG1 のグリセロールストックを希釈し、LAG 培地プレートに播種、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。播種した LAG 培地プレートからコロニーをピックアップし、96 well plate (IWAKIGLASS, Co., Ltd, Japan) 2YTGA 培地 100 μ L で、37 $^{\circ}$ C 一晩培養した。翌日、ディープウェル (Greiner Bio-One GmbH, Germany) 2YT-GA 500 μ L に前培養大腸菌 10 μ L ずつ植え継ぎ、 $OD_{600} = 0.3\sim 0.6$ まで 10000 rpm 37 $^{\circ}$ C で培養後、M13K07 helper phage を添加した。37 $^{\circ}$ C 1 時間静置した後、2500 rpm、15 分間遠心分離し、上清を除去、2YTAK 培地 1 mL/well を添加して 10000 rpm、25 $^{\circ}$ C で一晩培養した。翌日 2500 rpm、15 分間遠心分離した後、上清を回収し、これをモノクローン化ファージ溶液とした。

96 well ELISA plate (Greiner Bio-One GmbH, Germany) に 0.5 μ g/50 μ L TBS/well で、CL-BV を 4 $^{\circ}$ C で一晩静置することで固相化した。翌日、PBS で 3 回洗浄し、1.6% Block Ace で常温 2 時間ブロッキングした。また、上述した方法で作製したモノクローン化ファージを 1/100 倍希釈し、終濃度 0.32% Block Ace で 4 $^{\circ}$ C、1 時間ブロッキングした。BV をブロッキング後、PBS で 3 回洗浄し、同じくブロッキングしたモノクローンファージを 50 μ L/well で添加し、常温で 2 時間作用させた。その後、PBST で 3 回洗浄し、anti M13-HRP mAb (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA, 1/20000 希釈 in 0.04% Block Ace) 溶液を 100

μ L 添加して常温で 1 時間作用させた。PBST で 5 回洗浄した後、TMB 試薬 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 100 μ L を添加し、約 10 分間反応後、2M H_2SO_4 (Wako Pure Chemicals Ind., Osaka, Japan) 100 μ L を加えて反応を停止した。その後、450 nm で吸光度を測定した。

また、ファージの作製量補正のための FLAG ELISA に関しては、anti FLAG antibody を 96 well ELISA plate に 4 $^{\circ}$ C で一晩静置することで固相化し、上記と同様にファージ溶液を添加することで行なった。

B-25. Claudin-1 結合性評価

目的の C-CPE mutant 遺伝子がコードされている pY03-C-CPE mutant を鋳型とし、PCR により C-CPE mutant 遺伝子断片を増幅した。PCR 産物を pET-16b 挿入して C-CPE mutant 蛋白質発現ベクターとして用いた。

C-CPE mutant 発現 plasmid 1 μ L を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) 10 μ L に加え、氷上で 30 分間静置し、42 $^{\circ}$ C で 40 秒間ヒートショックを行い、氷上で 2 分間静置した。その後、SOC 培地を添加し 37 $^{\circ}$ C にて 40 分間培養した後、LA 培地プレートに播き一晩培養した。1 コロニーを LA 培地 3 mL で 37 $^{\circ}$ C、一晩振盪培養した。翌日 LA 培地を 2 mL を 6 本に分注し、50 μ L ずつ前培養した大腸菌液を加え 37 $^{\circ}$ C で 2 時間振盪培養した。その後、IPTG 刺激後大腸菌を回収し、buffer A に懸濁し、超音波処理などにより可溶化後、遠心した上清を HiTrap Chelating HP column にアプライした。カラムに吸着した C-CPE mutant を imidazole によって溶出し、PD-10 カラムを用いて溶媒を PBS に置換し、実験に使用した。

96 well ELISA plate に 0.5 μ g/50 μ L TBS/well で、WT, mCL1, mCL4/BV を 4 $^{\circ}$ C で一晩静置することで固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、1.6% Block Ace で常温 2 時間ブロッキングした。また、C-CPE mutant は氷上で溶解させ、0.2, 2.0, 20 μ g/mL にそれぞれ希釈した。希釈後 100 μ L C-CPE mutant 溶液に対して 4% Block Ace を 50 μ L 添加し、4 $^{\circ}$ C で 1 時間ブロッキングした。BV をブロッキング

後、PBS で 3 回洗浄し、同じくブロッキングした C-CPE mutant 溶液を 150 μ L/well で添加し、常温で 2 時間作用させた。その後、PBST で 3 回洗浄し、anti His-tag mAb を添加して常温で 2 時間作用させた。PBST で 3 回洗浄し、HRP 標識二次抗体を添加し、常温で 1 時間作用させ、その後 PBST で 5 回洗浄した。TMB 試薬 100 μ L を添加し、約 10 分間反応後、2M H₂SO₄ 100 μ L を加えて反応を停止した。その後、450 nm で吸光度を測定した。

B-26. C-CPE 修飾リポソームの調製方法

Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholine (POPC):
Cholesterol : Distearoylphosphatidylethanolamine
-polyethylenglycol (Mw: 2k) (DSPE-PEG(2k)) :
DSPE-PEG(2k)-N-hydroxysuccinimide (NHS) = 63 :
31:3:1 (モル比) の脂質 150 mg をエタノール 1 mL に溶解し、NBD で蛍光ラベルした Dipalmitoylphosphatidylethanolamine (NBD-PE) を上記脂質の 1% (モル比) となるように添加した。この脂質エタノール溶液を 40 mL のリン酸緩衝液 (pH7.4) にバス型ソニケーション下で注入した。その後、エクストルーダーにてサイジングを行った。このリポソームに DSPE-PEG(2k)-NHS:C-CPE = 1 : 400 となるように混合し、4°C で一晩反応させ C-CPE をリポソーム表面に修飾した。なお、未反応の C-CPE は超遠心操作により除去した。

B-27. CL 発現細胞への C-CPE 修飾リポソームの結合性評価方法

マウス線維芽細胞 (L 細胞) に CL1, CL4 または CL5 遺伝子を導入し各 CL を発現させた細胞に NBD で蛍光ラベルした C-CPE 未修飾または修飾リポソーム (1 mg/mL) を添加し、37°C で 6 時間作用させた。細胞を洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡により、細胞に結合または取り込まれた NBD ラベル C-CPE 修飾リポソームを観察した。また、C-CPE 修飾リポソームの細胞への結合特性を評価するため、競合阻害実験として遊離 C-CPE (0.5 μ M) またはコントロールとしてウシ血清アルブミン (BSA) (0.5 μ M) 存在下で C-CPE 修飾リポソームを CL4 発現細胞に作用させた時の細胞への結

合や取り込みについて評価した。

B-28. 骨髄および脾臓由来 cDNA の作製

3 系統 (C57BL/6, Balb/c, C3H: 日本 SLC) のマウス (雄性、6 週齢) をペントバルビタールにより深麻酔し、骨髄細胞と脾細胞を回収した。得られた細胞から、TRIzol reagent (Invitrogen) により total RNA を得た。得られた各組織由来 total RNA から Superscript III First Strand cDNA Synthesis System (Invitrogen) を用いて以下のように cDNA を合成した。total RNA 5 μ g 当たり、50 μ M oligo(dT)₂₀ (Invitrogen) 1 μ L、10 mM dNTP mix 1 μ L を混合し、DEPEC 処理水を加えて 10 μ L とし、65°C で 5 分間反応させた。そこに 10 \times RT buffer 2 μ L、25 mM MgCl₂ 4 μ L、0.1 M DTT 2 μ L、RNaseOUT™ (Invitrogen) 1 μ L、SuperScript™ III RT (Invitrogen) 1 μ L を加えて、50°C で 50 分間、85°C で 5 分間反応させた。RNase H (Invitrogen) 1 μ L を加え、37°C で 20 分間反応させ、骨髄および脾細胞由来 cDNA を得た。

B-29. 一本鎖化 Fv (scFv) 遺伝子の作製

上記 cDNA をテンプレートとし、アニーリング温度を 50°C で 1 分間、伸長反応を 68°C で 1 分間に設定し、Table 1 に示した VL primer sets あるいは VH primer sets (2 pmol) と KOD-plus-DNA Polymerase (TOYOBO) を用いて PCR を 35 サイクル行った。この PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製し、VL 断片と VH 断片とした。VL 断片と VH 断片をテンプレートとしてアニーリング温度 63°C で 1 分間、伸長反応を 68°C で 1 分間に設定し、KOD-plus-DNA Polymerase を用いて assembly PCR を 19 サイクル行った。この assembly PCR 産物と、Not I サイトを有するプライマー Y15 (5'-GCCAGCTTTGGAGCCTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAATTATTATTCGC AATTCCTTTAGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCC GG CCATGGCC-3')、および Nco I サイトを有するプライマー Y16 (5'-TTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGGTTTTGCTAAACAACCTTTCAACAGTCTATGCGGCA CGCGTTCCACGGATCCGGATACGGCACCGGCGCA CCTGCGGCCG-3') を用い、アニーリング温度を 65°C で 1 分間、伸長反応を 68°C で 1 分間に設定し、

KOD-plus-DNA Polymerase を用いて PCR を 35 サイクル行った。この PCR 産物を PCR purification kit で精製し、scFv 遺伝子を作製した。

B-30. ナイプファー抗体ライブラリの作製

上記 scFv 遺伝子を制限酵素 Nco I および Not I で処理した。一方で、あらかじめ Nco I および Not I で処理したファージミドベクター pCANTAB5E と T4 ligase (Roche Diagnostics) を用いて 16°C、16 時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を PCR purification kit で精製した。あらかじめ 2YT 培地で OD=0.3~0.6 まで培養した大腸菌 TG1 (Stratagene) を、MilliQ 水で 3 回洗浄操作を行い、10% glycerol で懸濁水冷却し、エレクトロポレーション用 TG1 とした。本 TG1 50 μ L に対して、精製後のライゲーション産物 1 μ L を添加し、GenePulser Xcell (Bio-Rad) を用い、1.8 kV、0.25 μ F、200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2% glucose 含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μ g/mL ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地で希釈し、Petri film (3M Microbiology) に播種し、37°C で一晩培養した。得られた形質転換コロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

B-31. ランダム 18mer 遺伝子断片の作製

プライマー、P-oligo1 (5'- GATTACGCCAAGCTTT GGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAA TTATTATTTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCTCTATG CGGCCAGCCGCCATGGCC-3') および P-oligo4 (5'-CGGCGCACCTGCGGCGCSNNSNNSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN NSNNGCCATGGCCGGCTGGGCCGCATAGAA-3') を 25 μ M に希釈したものをそれぞれ 2 μ L、10 \times Klenow Buffer (0.5 M Tris-HCl, 0.1M MgCl₂, 1mM DTT, 500 μ g/mL BSA) 4 μ L、D.W.を加えて総量 40 μ L にし、96°C 10 分間、70°C 5 分間、37°C 10 分間、16°C 10 分間を 0.01°C /sec で反応させ、オリゴのアニーリングを行った。この反応液に Klenow Fragment (東洋紡株式会社) 1 μ L、10 mM dNTP (Sigma-Aldrich, Inc) 1 μ L、10 \times Klenow Buffer 1 μ L、D.W. 7 μ L を添加し、37°C で 1 時間反応させた。

サンプルを QIAquick® PCR Purification Kit で精製した後、QIAquick® Gel Extraction Kit で目的の遺伝子を抽出した。抽出後のサンプル 0.5 μ L をテンプレートとし、pCANTAB HindIII (5'-GGAAACAGCTATGACCATGAT TAGGCCAAG-3') および Not I extension (5'-GTAA ATGAATTTTCTGTATGAGG-3') を用い、96°C 1 分間、65°C 1 分間、68°C 1 分間で 35 サイクルの PCR を KOD-plus-により行い、ランダムな 18 アミノ酸をコードする遺伝子ライブラリを作製した。作製したライブラリを Hind III (東洋紡株式会社)、Not I によって制限酵素処理し、pY03' FLAG にクローニングした。

B-32. ランダムペプチドライブラリの作製

二本鎖 cDNA 断片を、Hind III および Not I で制限酵素処理し、OD₂₆₀を測定することで、遺伝子量を求めた。予め制限酵素で処理した pY03' FLAG (MroI) と、インサート断片を 1:10 で混合し、T4 ligase (Roche Diagnostics 株式会社) を用いて 16°C で 16 時間ライゲーション反応を行った後、ライゲーション産物を PCR purification kit で精製した。予め TG1 (Stratagene®) を 2YT 培地 (Invitrogen™ Life Technologies) 30mL で測定波長 600 nm において OD=0.4 まで培養し、MilliQ で 3 回洗浄操作を行い、10% グリセロール (和光純薬工業株式会社) 溶液で 200 μ L に懸濁し水冷却した大腸菌 TG1 に対して、精製したライゲーション溶液を 10 μ L 添加し、Gene purser® II (Bio-Rad Laboratories, Co., Ltd.) を用い、2.5 kV、0.25 μ F、200 μ L でエレクトロポレーションを行った。その後、2% グルコース含有 2YT 培地を 790 μ L 添加し、1 時間培養した後、一部を取って 50 μ g/mL アンピシリン (Sigma-Aldrich, Inc.)、2% グルコース (Sigma-Aldrich, Inc.) 含有 LB-Agar 培地 (Invitrogen™ Life Technologies) に播種し、37°C で 12 時間培養した。得られた形質転換コロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

B-33. ライブラリのシーケンズ解析

上記コロニーから任意にピックアップしたクローンからプラスミドを QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて回収し、プライマー 156 (5'-CAACGTGAAAAAATTATT ATTGCG-3') とプライマー 158 (5'-GTAAATGAATTT

TCTGTATGAGG-3')、および BigDye Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。その後、PERFORMA Gel Filtration Cartridge (Edge Bio Systems) を用いて精製し、ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により DNA シーケンスを解析した。

C. 研究結果

C-1. PSIF、C-CPE-PSIF 蛋白質の作製

PSIF および C-CPE-PSIF 発現プラスミドで、蛋白質を発現させる際に汎用される大腸菌株 BL21 (DE3) を形質転換し、0.1 mM の isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導により、蛋白質を発現させた。大腸菌から、buffer A を用いて蛋白質を可溶化し、Ni とヒスチジンとの親和性を利用したアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。蛋白質が精製できていることを CBB 染色および抗 His-tag 抗体を用いた Western blot により確認したところ、42 kDa 付近に PSIF のバンドが、58 kDa 付近に C-CPE-PSIF のバンドが確認できた (Fig. 1)。

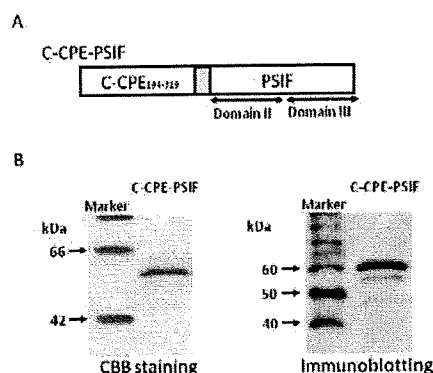


Figure 1. Preparation of C-CPE-PSIF

A) Schematic structure of C-CPE-PSIF. C-CPE-PSIF is a fusion protein of C-CPE and PSIF. C-CPE is the C-terminal fragment of CPE 194-319 aa. The dark area indicates the putative receptor-binding region of C-CPE located in its C-terminus. PSIF contains domain II and III of PE. Domain II is critical for the escape of the toxin from the endosome to the cytosol, and domain III is responsible for the inhibition of protein synthesis. B) Purification of PSIF and C-CPE-PSIF. C-CPE-PSIF was expressed in *E. coli* and isolated by Ni-affinity chromatography. The purification of proteins (5 mg) was confirmed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with antibody against the his-tag. The putative molecular weight of C-CPE-PSIF is about 60 kDa.

C-2. Claudin-4 発現 L 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性の検討

C-CPE-PSIF 融合蛋白質の機能評価を行うために、claudin-4 発現 L 細胞 (CL4/L) に対する細胞傷害性を検討した。CL4/L 細胞を PSIF または C-CPE-PSIF で 24 時間処理し、WST-8 法により生細胞数の測定を行った。その結果、PSIF 処理では 20 ng/mL 処理でも全く細胞障害性が観察され

ないのに対して、C-CPE-PSIF では濃度依存的な細胞障害性が観察され、10 ng/mL では 90%以上の細胞に傷害性が観察された (Fig. 2A)。

PSIF は単独では細胞傷害性を発揮せず、標的指向性分子などと結合し、細胞内へ侵入したときのみ傷害性を示す。Claudin-4 は、その細胞内領域にクラスリン被覆小胞へのシグナル配列に類似する配列を含んでいることが知られている。したがって、C-CPE-PSIF は claudin-4 に結合した後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、細胞毒性を発揮したと考えられる。

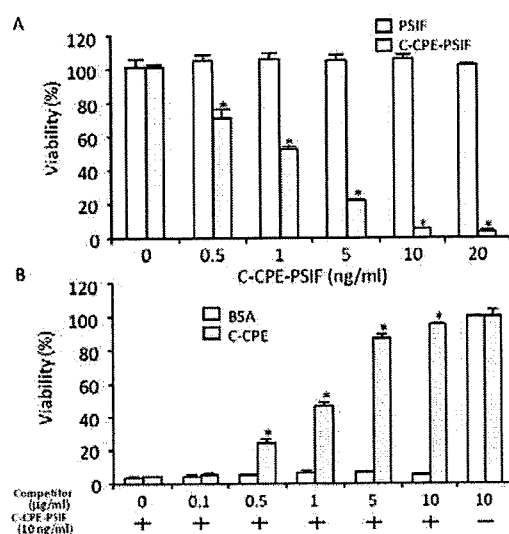


Figure 2. Characterization of C-CPE-PSIF

A) Cytotoxicity of C-CPE-PSIF in claudin-4/L (CL4/L) cells. After a 24 h-treatment of CL4/L cells with PSIF or C-CPE-PSIF at the indicated concentration, the cell viability was measured by WST-8 assay. Viability (%) was calculated as a percentage of the vehicle-treated cells. The data represent the mean \pm SD of three independent experiments. *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.01$). B) Competition assay using C-CPE. CL4/L cells were treated with C-CPE or BSA at the indicated concentration for 2 h, and then the cells were treated with C-CPE-PSIF (10 ng/ml) for 24 h. The cell viability was measured by WST-8 assay, as described above. The data represent the mean \pm SD of three independent experiments. *Significantly different between BSA and C-CPE-treated groups ($p < 0.01$).

C-3. C-CPE-PSIF の細胞傷害性における C-CPE 部位の関与

PSIF は単独では細胞傷害性を示さず、標的指向性物質などと結合させ細胞内へ侵入したときのみ細胞傷害性を示すことが報告されている。そこで、C-CPE-PSIF の claudin-4 発現 L 細胞への傷害性が C-CPE-PSIF の C-CPE 部位を介しているかを、C-CPE を阻害剤として用いた拮抗阻害実験により検討した。

CL4/L 細胞を C-CPE または牛血清アルブミン (BSA) で 2 時間前処理後、C-CPE-PSIF を添加し、

24 時間後に WST-8 法により生細胞数の測定を行った。その結果、阻害剤として C-CPE を添加した群では、C-CPE の濃度依存的に C-CPE-PSIF の細胞傷害性が抑制されたのに対し、阻害剤として BSA を添加した群では、BSA の濃度に関わらず細胞傷害性は抑制されなかった (Fig. 2B)。したがって、C-CPE-PSIF は C-CPE 部位と claudin-4 との結合を介して細胞傷害性を発揮していることが示唆された。

C-4. C-CPE-PSIF による細胞傷害性の claudin 特異性の検討

C-CPE-PSIF はその C-CPE 部位を介して claudin-4 発現細胞に細胞傷害性を示すものの、融合蛋白質に特異性が無ければ、効果の減弱や思わぬ副作用を生じる原因となりうる。そこで、C-CPE-PSIF の claudin 特異性について各種 claudin 発現細胞を用いた細胞傷害性試験を行った。

実験には L 細胞に claudin-1, -2, -4, -5 をそれぞれ恒常的に発現させた各種 claudin 発現 L 細胞

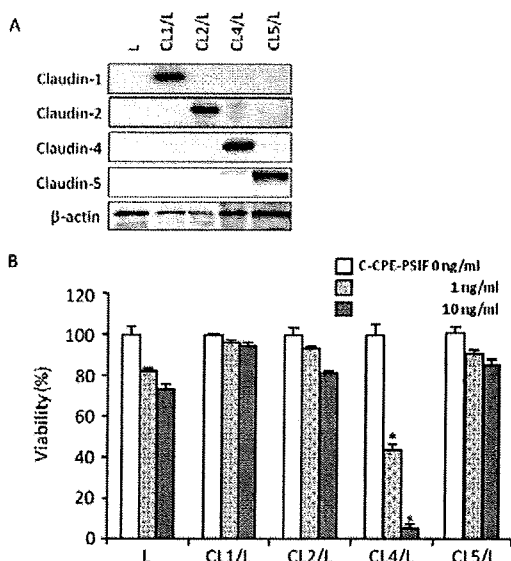


Figure 3. Claudin-specificity of C-CPE-PSIF-induced cytotoxicity
A) Immunoblot analysis. Lysates of L, CL1/L, CL2/L, CL4/L or CL5/L cells were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblotting with antibodies against the indicated CL. B) Specific cytotoxicity of C-CPE-PSIF. L, CL1/L, CL2/L, CL4/L and CL5/L cells were treated with C-CPE-PSIF for 24 h at the indicated concentration. The cell viability was assayed by WST-8 assay. The data represent the mean \pm SD of three independent experiments. *Significantly different from the L cells ($p < 0.01$).

(CL1/L, CL2/L, CL4/L および CL5/L 細胞)を用い

た (Fig. 3A)。C-CPE-PSIF の細胞傷害性を検討したところ、CL1/L, CL2/L および CL5/L 細胞に対し、C-CPE-PSIF は傷害性を示さなかったが、claudin-4 発現細胞にのみ著しい細胞傷害性を示したことから、C-CPE-PSIF は claudin-4 指向性を有していることが示唆された (Fig. 3B)。これらの結果は、C-CPE が claudin family の中でも CPE の受容体である claudin-4 へ最も高い結合性を示し、claudin-1, claudin-2 および claudin-5 に対しては全く結合性を示さないとの報告と一致しており、C-CPE-PSIF は C-CPE の claudin 特異性を保持しているものと推察される。

C-5. 癌細胞株に対する C-CPE-PSIF の傷害性における claudin-4 依存性

C-CPE-PSIF が癌細胞に対しても、claudin-4 依存的に細胞傷害性を示すかを検討するため、ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞 (claudin-4-positive) および SK-HEP-1 (claudin-4-negative) を用いた解析を行った (Fig. 4A)。各細胞に C-CPE-PSIF を添加し、48 時間後に WST-8 法により生細胞数を測定した。その際、ヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 細胞を positive control として用いた。その結果、claudin-4 発現細胞である、HepG2 細胞および MCF-7 細胞に著しい細胞傷害性が観察されたのに対し、claudin-4 非発現細胞である SK-HEP-1 に対する細胞傷害性は観察されなかった (Fig. 4B)。したがって、C-CPE-PSIF は claudin-4 発現癌細胞に対し特異的に細胞傷害性を示すことが示唆された。

C-6. 密度の異なる Caco-2 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞障害性

TJ 構造が発達した正常な上皮細胞において、ほとんどの claudin は TJ を形成し、細胞間隙に存在している。一方癌化に伴い TJ が崩壊し、claudin の局在が変化することが知られている。したがって、C-CPE-PSIF がこの claudin の局在変化を認識することができれば、正常細胞に対する副作用を軽減することができると考えられる。そこでヒト大

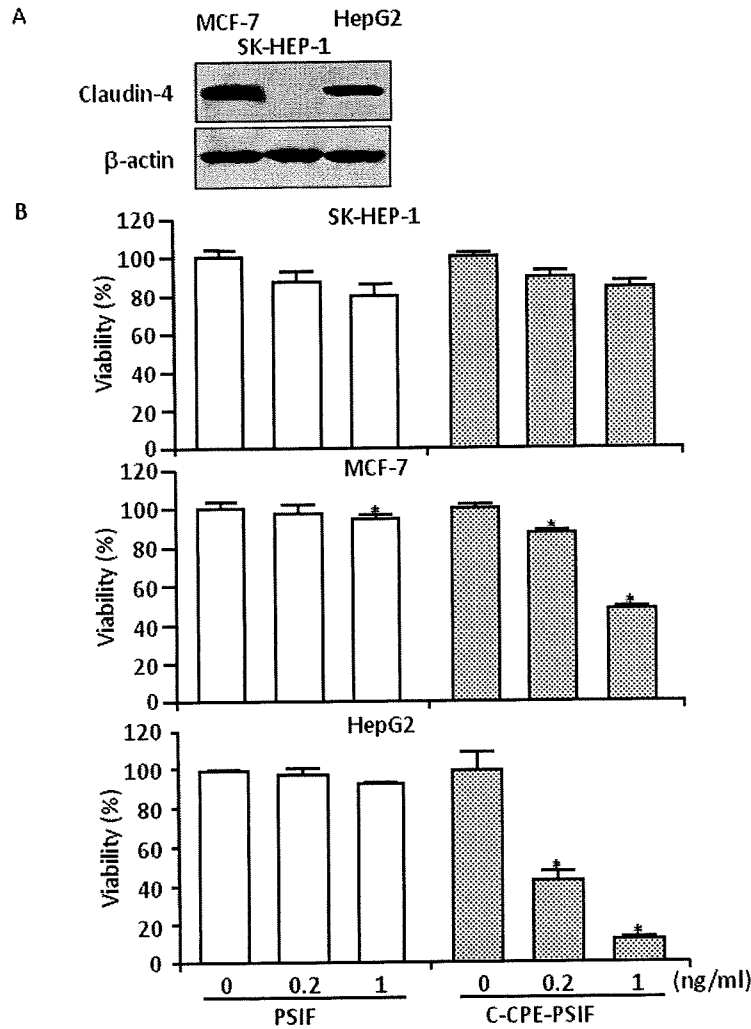


Figure 4. Cytotoxic specificity of C-CPE-PSIF
 A) Expression of claudin-4 in SK-HEP-1 and HepG2 cells. The cell lysates were subjected to SDS-PAGE, followed by western blotting with anti-claudin-4 Ab. MCF-7 cells were used as a positive control. B) Cytotoxicity of C-CPE-PSIF in SK-HEP-1 and HepG2 cells. Cells were treated with PSIF or C-CPE-PSIF for 48 h at the indicated concentration. The cell viability was measured by WST-8 assay. The data are representative of at least three independent experiments. Data are the mean \pm SD (n=3). *Significantly different from the vehicle-treated cells ($p < 0.01$).

腸癌由来 Caco-2 細胞を用いて C-CPE-PSIF の細胞障害性と claudin の局在との関連を解析した。

Caco-2 細胞はコンフルエントな状態で培養すると腸管上皮細胞様の極性を有する細胞形態に変化することが知られている。そこでプレコンフルエントの状態を claudin の局在が制御されていない癌細胞のモデル、コンフルエント状態を正常な上皮のモデルとし、C-CPE-PSIF 感受性の違いを検討した。

プレコンフルエント、コンフルエント細胞の claudin-4 発現量を Western blotting により解析したところ、プレコンフルエント細胞と比較して、コンフルエント細胞では claudin-4 発現量が顕著に上

昇していた (Fig. 5A)。

これらの細胞に C-CPE-PSIF を添加し、その 48 時間後に WST-8 法により生細胞数を測定した結果、コンフルエント細胞に比して、プレコンフルエント細胞において有意な細胞障害性が観察された (Fig. 5B)。プレコンフルエントの細胞では claudin-4 発現は低いにも関わらず、特に低濃度での C-CPE-PSIF による細胞障害が観察されたことから、C-CPE-PSIF は claudin-4 の局在性を認識して作用し、TJ 構造が崩壊した癌細胞に特異性が高いと推察される。

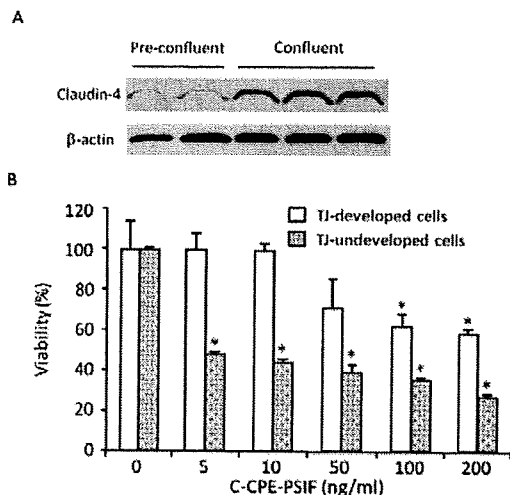


Figure 5. Cytotoxicity of C-CPE-PSIF in TJ-developed or -undevlopeded Caco-2 monolayer cells. TJ-developed cells were Caco-2 monolayer cells grown at confluency for 3 days. TJ-undevlopeded cells were Caco-2 cells seeded at 1×10^4 cells/well in 96-well plates. The cell lysates were subjected to SDS-PAGE, followed by western blotting with anti-claudin-4 Ab (A). The cells were treated with the indicated concentrations of C-CPE-PSIF for 48 h, and then the cell viability was measured. The data are representative of at least three independent experiments. Data are the mean \pm SD (n=3). *Significantly different from the vehicle-treated cells ($p < 0.05$).

C-7. 極性が発達した細胞への C-CPE-PSIF の作用の検討

正常な上皮細胞の特徴として、極性が発達しており、apical 側（頂端側）と basal 側（基底側）とで細胞小器官の分布や蛋白質の局在などが非対称であることが挙げられる。この細胞極性は生体の恒常性維持に必要不可欠であり、例えば腸管上皮の吸収細胞は apical 側と basal 側とで異なる輸送蛋白質を配置することで、apical 側では腸の内腔から分子を取り込み、basal 側からはその分子を下の組織に送り出すことができる。一方、上皮の癌化初期に細胞極性は消失することがよく知られているが、極性の崩壊は TJ 構造の崩壊とも相関する。そこで、正常細胞への C-CPE-PSIF の作用の基礎的検討として、極性が発達した細胞に対して C-CPE-PSIF がどのように作用するかを検討した。

Caco-2 細胞は、コンフルエントな状態で 2 週間ほど培養すると、極性が発達した上皮様の構造をとり apical 側に発達した TJ を形成することから、上皮のモデルとして頻用されている。そこで、Transwell chamber 上で培養した Caco-2 単層膜の

apical 側もしくは basal 側から C-CPE-PSIF を添加し、48 時間後に膜電気抵抗値 (TER) によって TJ のバリア機能を、放出された lactate dehydrogenase (LDH) 量から細胞傷害性をそれぞれ解析した。その結果、C-CPE-PSIF を basal 側から加えたときのみ濃度依存的な LDH の遊離および TER 値の低下が観察された (Fig. 6)。このことは、C-CPE-PSIF が極性の発達した正常上皮細胞に対して、細胞極性を認識して作用する可能性を示唆するものである。

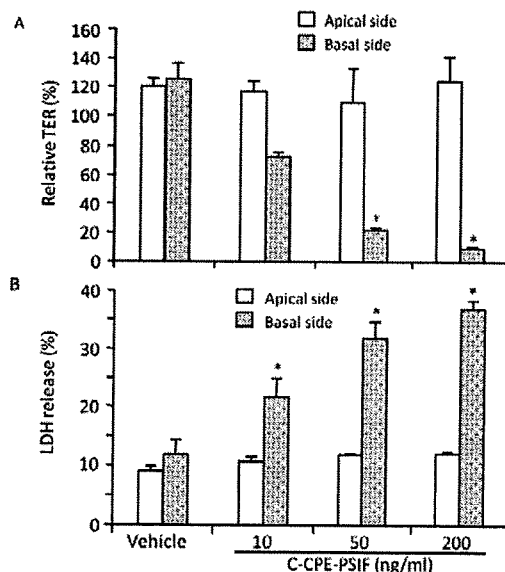


Figure 6. Effect of C-CPE-PSIF on TER and LDH release in Caco-2 monolayer cells. Caco-2 cells were grown on Transwell chambers to form tight junctions. When TER values were constant, C-CPE-PSIF was added to the apical or basolateral side in Transwell chambers at the indicated concentrations. After 0 and 48 h of incubation, TER values were measured (A), and the LDH release from the cell was determined (B). TER values and LDH release were calculated as the ratio of TER values at 0 h and of the total cellular LDH, respectively. Data are the mean \pm SD (n=3). *Significantly different from the vehicle-treated cells ($p < 0.05$).

C-8. C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF の作製

C-CPE と claudin との結合にはその C 末端側の 16 アミノ酸が関与することが明らかとなっている。さらにその 16 アミノ酸領域をアラニンに置換し、結合性を解析した結果、306 番目のチロシン (Y306) と 315 番目のロイシン (L315) をアラニンに置換した変異体 C-CPE_{Y306A/L315A} は claudin-4 との結合性および TJ 制御活性を消失することが示されている。そこで、癌細胞に対する C-CPE-PSIF の傷害性と、claudin-4 結合性との関連を解析するため、C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF を作製した (Fig. 7A)。

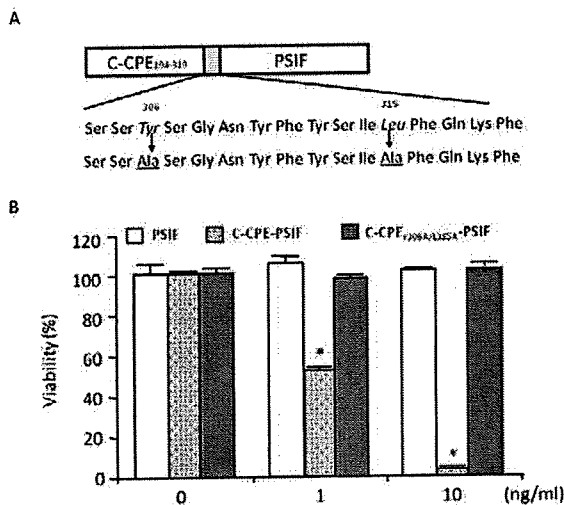


Figure 7. C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF. A) Schematic structure of C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF. The dark area indicates the putative receptor-binding region of C-CPE in its C-terminus. Among 16 amino acids, Y306 and L315 (indicated by italic letters) play a pivotal role in the binding of C-CPE with claudin-4. B) Cytotoxicity of C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF in CL4/L cells. After a 24 h-treatment of CL4/L cells with PSIF, C-CPE-PSIF or C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF at the indicated concentration, the cell viability was measured. The data represent the mean \pm SD of three independent experiments. *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.01$).

C-9. claudin-4 発現 L 細胞 に対する

C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF の細胞傷害性の検討

Claudin-4 発現 L 細胞に PSIF または C-CPE-PSIF、C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF を添加し、24 時間後に WST-8 法により生細胞数の測定を行った (Fig. 7B)。その結果、C-CPE-PSIF で観察された claudin-4 発現 L 細胞に対する細胞障害性が、C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF 添加では観察されなかった。このことから、C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF は claudin-4 指向性を消失していることが示唆された。

C-10. 4T1 細胞に対する細胞傷害性の検討

次に、C-CPE-PSIF の 4T1 細胞に対する細胞傷害性を検討した。4T1 細胞に、PSIF または C-CPE-PSIF、C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF を添加し、48 時間後に WST-8 法により生細胞数の測定を行ったところ、C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF は 500 ng/mL でもほとんど傷害性を示さなかったのに対し、C-CPE-PSIF は濃度依存的な細胞傷害性を示し、100 ng/mL で 63% の細胞に細胞傷害性が観察された (Fig. 8A)。このことから、C-CPE-PSIF は 4T1 細胞に対し、claudin-4 を介して傷害性を示している

ことが示唆された。

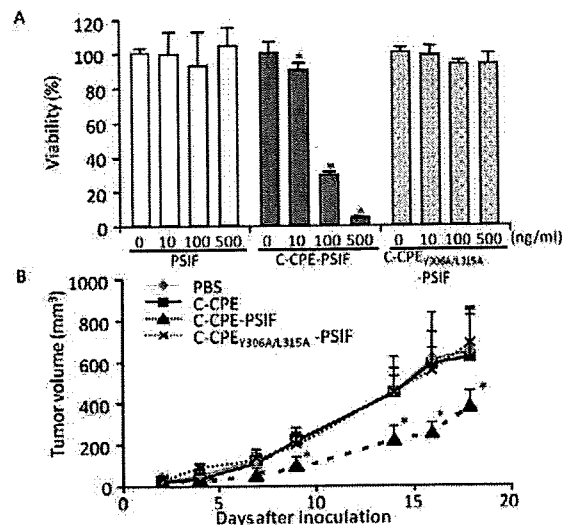


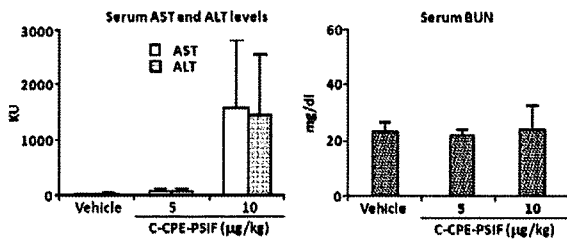
Figure 8. Anti-tumor activity of C-CPE-PSIF. A) Cytotoxicity of C-CPE-PSIFs in 4T1 cells. Cells were treated with PSIF, C-CPE-PSIF or C-PE_{Y306A/L315A}-PSIF for 48 h at the indicated concentration. The cell viability was measured as above. Data are mean \pm SD. *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.05$). B) In vivo anti-tumor activity of C-CPE-PSIF. 4T1 cells (2×10^6 cells) were intradermally inoculated into the right flank of mice on day 0, and each sample (5 mg/kg) was intratumorally injected on days 2, 4, 7, 9, 11 and 14. Tumor growth was monitored by calculating tumor volume. Each point is the mean \pm SD from five mice. *Significantly different from the vehicle (PBS)-treated group ($p < 0.05$).

C-11. C-CPE-PSIF の安全性評価

C-CPE-PSIF の転移癌治療への有効性を検討する際には、静脈内投与を行う必要がある。そこで、安全な投与量を決定する目的で、マウスに対する C-CPE-PSIF の毒性を評価した。Claudin-4 は腎臓・肺などに発現していることが報告されている。また、肝臓・腎臓は血液の流入が多いことから、薬物・毒物による傷害が現れやすい。そこで C-CPE-PSIF の毒性を肝傷害・腎傷害を指標に検討した。

BALB/c マウス (雌性、7-8 週齢) に C-CPE-PSIF を尾静脈投与し、72 時間後に回収した血清中の AST/ALT および BUN 値を測定した (Fig. 9A)。その結果 C-CPE-PSIF 10 μ g/kg では AST および ALT が上昇し肝毒性を示したのに対して、5 μ g/kg 投与では肝毒性・腎毒性を示さなかった。また、C-CPE-PSIF を週に 3 回、2 週間頻回投与した際にも、C-CPE-PSIF 5 μ g/kg 投与ではほとんど肝毒性・腎毒性は観察されなかった (Fig. 9B)。

A. Acute toxicity



B. Subchronic toxicity

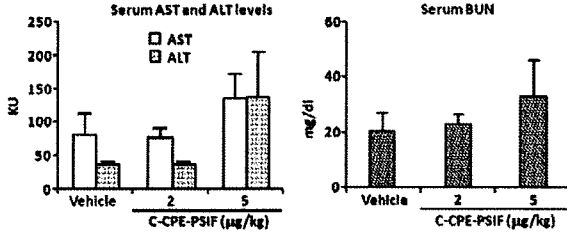


Figure 9. Toxicity of C-CPE-PSIF in liver and kidney. Female BALB/c mice (7 to 8 weeks old) were intravenously injected with C-CPE-PSIF at the indicated dose once (A) or three times per week for 2 weeks (B). Seventy-two hours after the last injection, the serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and blood urea nitrogen (BUN) were measured by using a Test-WAKO kit. Data are presented as the mean \pm SD (n=5). Data are representative of at least two independent experiments.

C-12. 4T1 細胞皮下移植モデルマウスに対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

BALB/c マウス (雌性、7 週齢) の右腹部皮下に、 1×10^5 個の 4T1 細胞を移植した (day 0)。Day 1 より、PSIF、C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF もしくは C-CPE-PSIF を週に 3 回、腫瘍内投与し、投与毎に腫瘍径および体重を測定したところ、PBS 群に比べて C-CPE-PSIF 5 µg/kg 投与群において顕著な抗腫瘍効果が観察された (Fig. 8B)。また、C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF 投与群では腫瘍の増殖抑制が観察されなかったことから、C-CPE-PSIF は claudin-4 との結合を介して、4T1 細胞に抗腫瘍効果を示したことが示唆された。

C-13. 新規 claudin-4 binder の作製

C-CPE の各種変異体を作製し、claudin-4 結合性を解析したところ、C-CPE に比して、3-20 倍の claudin-4 結合性を有する新規 claudin-4 binder の作製に成功した。尚、配列情報等の詳細は、特許申請の関係で割愛した。

C-14. 新規 claudin-1 binder 候補分子の取得

C-CPE の遺伝子を pET-16b に挿入した pET-H₁₀PER を鋳型とし、C 末端側 6 箇所 の claudin-4 結合に関与するアミノ酸をランダムなアミノ酸に置換したライブラリを作製した。ライブラリから任意の 17 クロウンをピックアップし、シーケンス解析したところ、全て異なるシーケンスが観察されたことから、作製したライブラリの多様性が保たれていることを確認した (data not shown)。

このファージライブラリ (input ファージ) を CL1-BV を固相化したイムノチューブに添加後、CL1-BV に結合していないファージを除去した。CL1-BV に結合しているファージ (output ファージ) を回収後、大腸菌に感染させ、再びファージを増幅し、同様に CL1-BV に対してパンニング操作を繰り返すことで、claudin-1 結合性ファージの濃縮を行なったところ、パンニング操作を繰り返すことによって ratio が上昇しており、claudin-1 結合性ファージの濃縮が示唆された (Fig. 10A)。

3 回のパンニングにより濃縮された C-CPE mutant

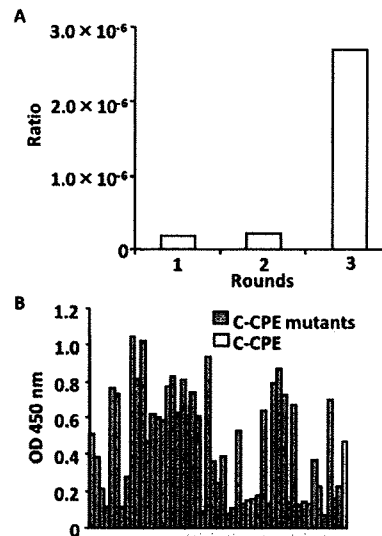


Figure 10. Screening of a CL1 binder. A) Enrichment of phages with affinity to CL1-BV. CL1-BV coated on immunotubes were incubated with the C-CPE-derivative phage library at 3.2×10^{12} CFU titer (1st input phage). The phages bound to CL1-BV were recovered (1st output phage). The CL1-BV-binding phages were subjected to two additional cycles of the incubation and wash step, resulting in 2nd, 3rd output phage. The ratio of output phage to input phage titers was calculated. B) Monoclonal analysis of C-CPE mutant phage. CL1-BV-bound phage clones were isolated from the 3rd output phages, and the interaction of the monoclonal phage with CL1-BV was examined by ELISA with HRP-anti-M13 Ab. The most right column indicates C-CPE-phage.

ファージの claudin-1 結合性を検討するため、モノクローン化ファージを作製し、CL1-BV に対して ELISA を行なった。その結果、C-CPE 提示ファージと比較して吸光度が高い C-CPE mutant ファージクローンが