

複数取得できた (Fig. 10B)。

C-15. 新規 claudin-1 binder の作製

C-14の結果を踏まえ、claudin-1 結合性ファージクローンの配列データを基に、蛋白質作製を試みたところ、C-CPE mutant 19, 36, 86 が claudin-1 結合性を有することを見出した (Fig. 11)。

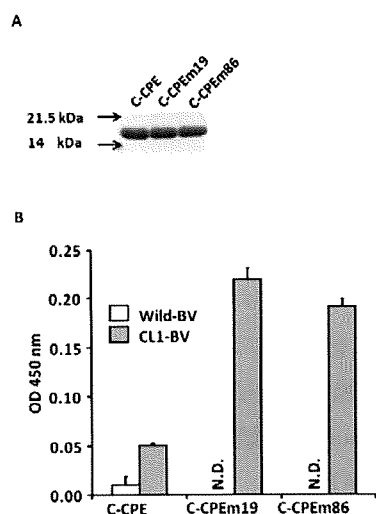


Figure 11. Interaction of C-CPE mutants with CL1-BV
A) Purification of C-CPEm19 and 86. C-CPE mutants were expressed in *E. coli* and isolated by nickel-affinity chromatography. The purification of proteins was confirmed by SDS-PAGE. The putative molecular mass of C-CPEs is approximately 15 kDa. B) Interaction of the C-CPE mutants with CL1. C-CPE mutants (2.0 μ g) were added to Wild-BV- or CL1-BV-coated immunoplates, followed by detection of C-CPE mutants bound to each BVs. Data are means \pm SD (n=3).

C-16. C-CPE 修飾リポソームの調製

C-CPE 修飾および未修飾リポソームの調製を行い、それぞれ平均粒子径 151 nm および 152 nm のリポソームを得た。

C-17. CL発現細胞への C-CPE 修飾リポソームの結合性評価

NBDラベルしたC-CPE未修飾リポソームをL細胞、CL1、CL4またはCL5発現L細胞に作用させてもリポソームの細胞への結合や取り込みは認められなかった。一方、C-CPE修飾リポソームを細胞に作用させたところCL4発現細胞のみリポソームの結合および取り込みが認められた (Fig. 12)。そこで、遊離のC-CPEを用いた競合阻害実験を行ったところ、C-CPE添加によりCL4発現細胞へのC-CPE修飾リポソームの結合や

取り込みが阻害された (Fig. 13)。なお、コントロールとしてBSA存在下ではC-CPE修飾リポソームのCL4発現細胞への結合や取り込みは阻害されなかった。以上の結果より、C-CPEを表面修飾したリポソームは、CL4特異的に細胞に結合し、取り込まれることが明らかとなった。

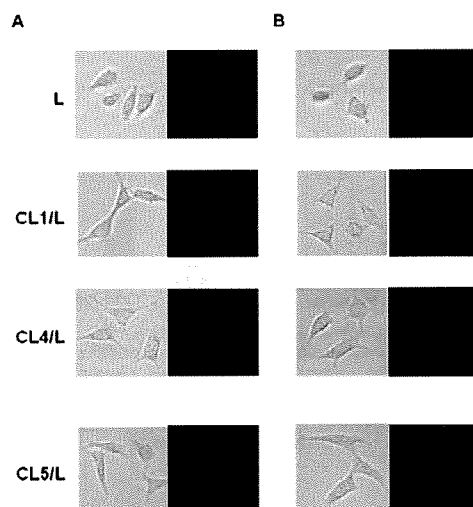


Figure 12. Binding of C-CPE-modified liposome to CL4-expressing cells. CL/L cells were incubated with unmodified-liposome (A) or C-CPE-modified liposome (B) for 6 h. Interaction of the liposome with the cells were examined with a fluorescence microscopy.

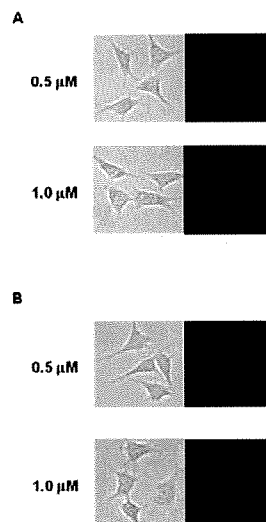


Figure 13. Competition analysis using C-CPE. CL4/L cells were treated with BSA (A) or C-CPE (B) at the indicated concentration for 2 h, and then the cells were treated with C-CPE-modified liposome for 6 h. Interaction of cells with liposome were examined with a fluorescence microscopy.

C-18. ナイーブファージ抗体ライブラリの作製

過去に報告され、現在も汎用されているファージ抗体ライブラリ用のプライマーセットは、①プライマーの組み合わせが1440通りと多様性に乏しく、②scFv遺伝子を作製する際に VL 遺伝子、リンカー配列、VH 遺伝子の 3 fragment assembly を必要としているため、連結効

率の低下やフレームシフトが起こり、高品質なライブラリを得ることができないという 2 つの大きな問題点を有している。これら問題点を克服するために、まず、多様な抗体遺伝子を均等に増幅できるように、過去の報告と Kabat 抗体データベースを参考に、約 1000 万種類以

Table 1 Primers for PCR amplification of VL and VH

VL Forward	NcoI 5'-ccttctcagcggccgccggcc4TGcc-		VH Forward	S G G G G S G G G G S 5'-ggcggcgccggccgcctctggctggcgccatcc-	
	-GAVATTGTACTCCCAATC-3'	-GAVRTTGTGATGACCCAAAC-3'		-GAKBTHAGCTTCAGGAGTC-3'	-GAGGTGCAGSAGGTGGAGTC-3'
	-GAVATTSTGATGACACAGTC-3'	-GAVATVCAGATGACACAGAC-3'		-GAGGTTCAGCTBCAGCAGTC-3'	-GAGGTGCACCTGGTGAGATC-3'
	-GAVATTGTGTACTCAAGTC-3'	-GAVATTGTGATGACACAGCC-3'		-CAGGTGCAGCTGAGGSAATC-3'	-GAGGTGCACCTGGTGAGATC-3'
	-GAVATTGTGHTTTCACAGTC-3'	-GAVATCCAGCTGACACACCC-3'		-CAGSTBCAGCTGCAGCAGTC-3'	-GAGGTGAGCTGATGGAGATC-3'
	-GAVATTGTATGATGACACAGTC-3'	-GAVATTGTGATGACACAGCC-3'		-GAGGTTCAGCTGCAGCAGTC-3'	-GAGGTGCACCTGGTGAGATC-3'
	-GAVATTGTGATGACACAGTC-3'	-GAVATTGTGATGACACAGCC-3'		-GAGGTTCAGCTGCAGCAGTC-3'	-GAGGTGCACCTGGTGAGATC-3'
	-GAVATTGTGATGACACAGTC-3'	-GAVATTGTGATGACACAGCC-3'		-GAGGTTCAGCTGCAGCAGTC-3'	-GAGGTGCACCTGGTGAGATC-3'
	-GAVATTGTGATGACACAGTC-3'	-GAVATTGTGATGACACAGCC-3'		-GAGGTTCAGCTGCAGCAGTC-3'	-GAGGTGCACCTGGTGAGATC-3'
	-GAVATTGTGATGACACAGTC-3'	-GAVATTGTGATGACACAGCC-3'		-GAGGTTCAGCTGCAGCAGTC-3'	-GAGGTGCACCTGGTGAGATC-3'
	-GAVATTGTGATGACACAGTC-3'	-GAVATTGTGATGACACAGCC-3'		-GAGGTTCAGCTGCAGCAGTC-3'	-GAGGTGCACCTGGTGAGATC-3'
	-GAVATTGTGATGACACAGTC-3'	-GAVATTGTGATGACACAGCC-3'		-GAGGTTCAGCTGCAGCAGTC-3'	-GAGGTGCACCTGGTGAGATC-3'
VL Reverse	G G G G S G G G G S G 5'-accagagccggccggccgctaccaccaccacc-		VH Reverse	NotI 5'-ggcgcggcggcggccgcctctggctggcgccatcc-	
-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-YAGGAAACGGTGAACCGTGGT-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'		
-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'		
-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'		
-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'		
-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'		
-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'		
-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'		
-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'		
-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-CCGTTTGAATTTCCAGCTTGG-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'	-YAGGAAAGACTGTAGAGTGGT-3'		

S=G/C, R=G/A, K=G/T, M=A/C, Y=C/T, W=A/T, H=A/C/T, B=C/G/T, V=A/C/G, D=A/G/T, N=A/T/G/C

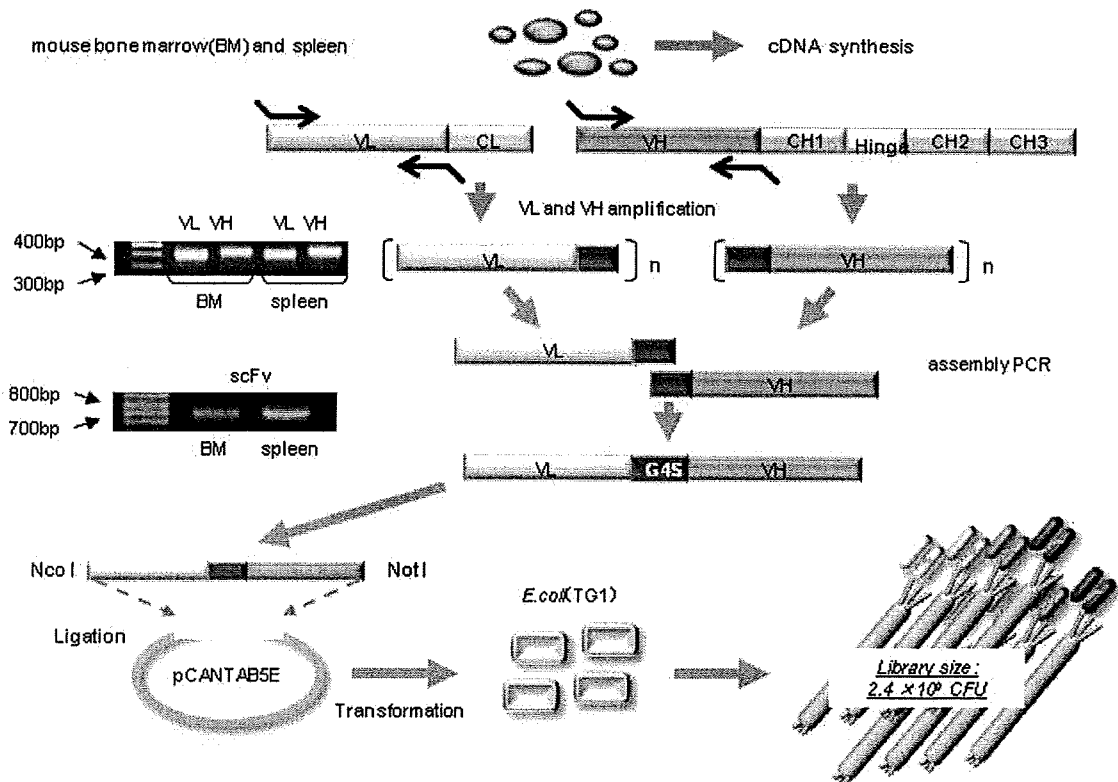


Figure 14. Scheme of naive scFv phage library

First-strand cDNA was synthesized from spleen cells and femoral bone marrow cells prepared from non-immunized 6-week-old male C57BL/6, Balb/c, and C3H mice. In the first-step PCR, variable regions of the heavy and light chain genes (VH and VL) were amplified. In the second PCR, equal amounts of the previously amplified VL and VH DNA were mixed and constructed scFv gene library. The PCR amplified scFv genes and pCANTAB5E phagemid vector were digested with Nco I and Not I. The resultant scFv fragments were inserted into the pCANTAB5E vector to generate a scFv-gene III fusion library, using T4 ligase. The ligated product, *E. coli*/TG1 was transformed by electroporation.

上目の組み合わせからなるプライマーセットを独自に設計した (Table 1)。そして、3 fragment assembly を省くため、VL 遺伝子下流と VH 遺伝子上流にリンカー配列をあらかじめ組み込むことで、VL 遺伝子、VH 遺伝子を直接的に連結可能とした。このプライマーセットを用いて、抗原感作されていないマウスの骨髄・脾臓細胞由来 mRNA から VL、VH 遺伝子断片をそれぞれ増幅した。その結果、作製された PCR 産物は、約 380 bp と約 400 bp

付近に位置し、目的の VL、VH 遺伝子断片が増幅されていることを確認した。この両遺伝子を assembly PCR により連結した。そして、この産物をテンプレートとして Y15、Y16 プライマーを用い PCR によって scFv 遺伝子を増幅し、酵素処理後、電気泳動により約 720 bp 付近に遺伝子断片が増幅されていることを確認した (Fig. 14)。この得られた scFv 遺伝子断片をファージミドベクター pCANTAB5E に組み込み、大腸菌 TG1 にエレクトロ

Table 2 Amino acid sequences of naive scFv phage library

VL

	FP1	CD1	FP2	CD2	FP3	CD3	FP4	Linker
1	EIIATQSHFVSTGDAV SITC	LAGQVSTARR	IQQKROGSPALLTY	SDSRYZ	GVPDAFVGSSTGDFLTIRINQAEDELAVYIC	QQHISVPT	PSGFTLLEIRF	GGGSGGSGGGGSGG
2PSS-VL-L-E-TTDISELSF---T---	RHILVD	---S---Q---Y---SL EY---G I---	LLSTVSS-
3TFLTL-VTI-QPS--S-	---S---SLIDEGITVH	---LL---R---	LVKLD-	---S---F---F---E---G---	IGQHP-R-
4	---Q---GASQVYFV-ES--S-	---S---KLMHEDITLY	---FL---C---	RS-ILG-R---R---F---E---V---	A-HLE-L-
5Q.....H-G-H-S---E---F---
6	---L---Q.....H-G-H-Y---S---E---L---	---HY-T-L-	---Q---L---
7	---E---Q.....H-G-H-S---E---F---
8	II---Q.....H-G-H-	YT-RLN-S---E---F---
9PAI---F-SI-TT-	---S---DVIH	---S-T---R---	DT-LL-	---S---S---E---R---E---S---T---	---HSH-R-
10L---	II---THTS---E---F---
11L---	II---THTS---E---F---	---HY-T---
12L---	II---THTY---S---E---L---	---HY-T---

VH

	FP1	CD1	FP2	CD2	FP3	CD3	FP4
1	EVLVESGGELVPSGSLKLC AASGPTFE	SHVLS	INVTPEVLEINVA	YISSSTTYFDQVIG	FTIPEVIANITLVGASSLIEPTAVYCAR	GSIVFDY	HSSTTLVDS
2	Q---CQ---E.....A-V-I-E---V---	---H---	---C-R-G---IG	Q---P---G---H---E---F---	EA-LTA-ESSS-A-VGL---T---S-V-F---G	GTVYDY
3	E---H.....	---H---	GR-
4	---H.....	---H---	LTVYDY
5	---H.....	---H---	---D---E---L---	T-HVIGS	DRHLLAY	---LV---
6	---H.....	---H---	PSVNDVGVYV	---V---
7Q.....	---H---	GTVDYDY
8	---E---Q.....	---H---	---D---E---T---	EEVYDY
9	---E---E---Q---S---A---T---	---Y---A---	---D---E---T---	DLYYDY
10	---E---E---Q---S---A---T---	---Y---A---	---H---S---L---L---S	---I---Y---S---L---L---S	HSSSISFAY
11	---E---E---Q---S---A---T---	---Y---A---	---H---S---L---L---S	---I---Y---S---L---L---S	RSSTYDY
12	Q---CQ---E.....A-V-I-E---V---	SSVH-	---C-R-G---IG	E-V-P---G---H---E---F---	EA-LTA-ESSS-A-VGL---T---S-V-F---G	GG

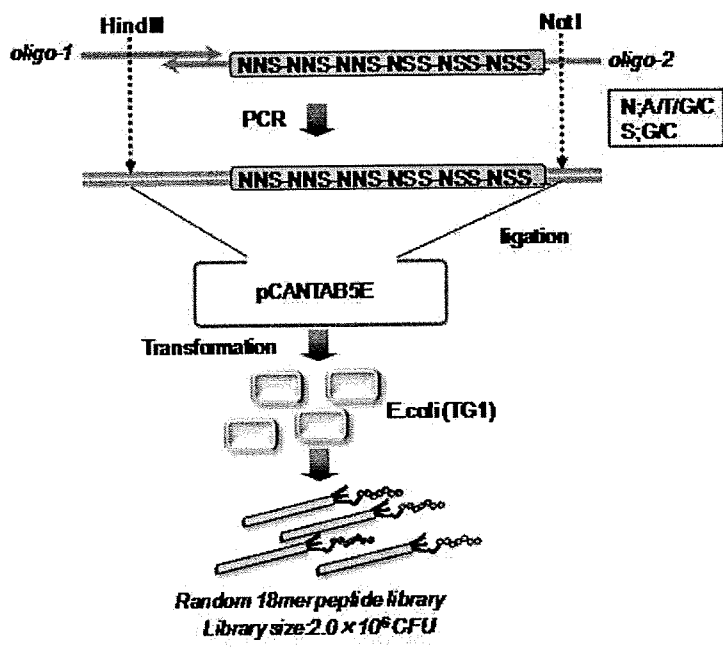


Figure 15. Construction of random 18 mer peptide library.

ポレーションにより形質転換した。得られたファージ抗体ライブラリのライブラリサイズは、大腸菌への形質転換効率から計算した所 2.4×10^9 CFU であった。また、ライブラリから任意にピックアップしたクローンの DNA シーケンスを解析し、アミノ酸配列を確認した結果 (Table 2)、フレームシフトやフレーム内の変異は認められなかった。更に、抗体のアミノ酸配列の中で最も多様であり、抗原に対する特異的結合に重要であると言われている VH の CDR3 領域をシーケンス解析した結果、本ライブラリにおいても、CDR 領域の長さ、配列共に十分な多様性を有していることが確認された。以上の結果から、本研究で構築したナীবファージ抗体ライブラリは、生体が有する抗体の多様性を模倣する優れたライブラリであることが示唆された。

C-19. ランダムペプチドライブラリの作製

本研究では、Claudin binder のスクリーニングシステムの構築にあたり、第一ステップとして、最も汎用されているランダムペプチドライブラリを選択した。Fig. 15 に示す方法で、ランダムな 18 アミノ酸で構成されるペプチドライブラリを構築した。全てのアミノ酸をコードし得る NNS 配列 (N=A/T/G/C, S=G/C) を 18 個含む P-oligo4 と、P-oligo4 に一部相補的な配列をもつ P-oligo1 を用いて PCR を行い、ランダムな 18 アミノ酸をコードする cDNA を作製した。この cDNA 断片を pCANTAB にクローニングし、TG1 に形質転換することで、ランダム 18mer ペプチドライブラリを作製した。生じたコロニー数より、ライブラリのサイズを評価したところ、 2.0×10^9 CFU のライブラリを構築したことが判明した。ライブラリの中からランダムにクローンをピックアップし、遺伝子配列をシーケンス解析により調べた結果、全てのクローンが全く異なる 18 アミノ酸を有していたことから、作製したライブラリが独立した異なるクローンで構成されることが示唆された (Table 3)。

Table 3 Amino acid sequences of random 18 mer peptide library.

Clone	Sequence
1	Y A Q Y K I T T A S P G D V K T S H
2	T Y A W Q Y C Q R T G R A L P H T K
3	R K H D A M D S T R R C W P H A P C
4	H H Q R H V K H W P D G F Q R H W S
5	K E Q K H P Q K Q F S S R G P A P H
6	Y P R Y K L Q D T V Q D R L R H R H
7	P K D A Q A S Y T P H H F H L S T T
8	M R Q P K P D T S H Y K D R V K S S
9	M F K G A F T Q Y H S T H E S T E H

D. 考察

タイトジャンクションにおけるバリア機能の本体を担う分子として同定された claudin は 23 kDa の 4 回膜貫通型構造を持ち、現在までに 24 種類以上の分子種が同定され、その発現には組織特異性があることが知られている。近年、種々の癌細胞で claudin の過剰発現が報告されていることから claudin をターゲットとした薬物送達法が上皮癌の治療において有効であると考えられる。しかしながら、claudin は非常に免疫原性が低く、その細胞外領域に結合する抗体などの claudin ligand の創製は立ち遅れており、claudin を利用した癌治療法の開発は遅々として進展していない。そこで本研究では、ウェルシュ菌エンテロトキシン (CPE) の C 末側断片 C-CPE を claudin binder のモデル分子として用い、claudin を標的とした癌治療の可能性を検討した。

癌ミサイル療法で汎用されている *Pseudomonas* exotoxin A (PE) の受容体結合領域欠損フラグメントである PSIF を抗癌活性分子として用いて、C-CPE との融合蛋白質 (C-CPE-PSIF) を作製したところ、C-CPE-PSIF は claudin-4 発現細胞に特異的に作用するのみならず、claudin-4 の局におよび細胞極性を認識して細胞障害性を発揮していた。さらに、claudin-4 発現細胞であるマウス乳癌細胞株 4T1 細胞を移植した担癌モデルマウスの腫瘍内に C-CPE-PSIF を投与したところ、抗腫瘍効果が観察された。興味深いことに、C-CPE-PSIF 投与による肝毒性、腎毒性は観察されず、C-CPE の claudin-4 結合領域を欠損させた変異体融合蛋白質では *in vitro* および *in vivo* における抗腫瘍活性は完全に消失していた。以上の結果から、claudin を標的とした癌治療法の安全性および有用性が示唆された。

さらに、本研究では、C-CPE を prototype として用いて新規 claudin-4 binder および初めての claudin-1 binder の取得に成功した。今後は、claudin-1 以外の claudin に対する結合分子の作製も鋭意進めていく予定である。

正常な上皮組織の細胞は水平方向の細胞分裂

を行いコンタクトインヒビションにより細胞増殖は厳密に制御されているが、上皮細胞が癌化すると細胞の分裂軸が回転して垂直方向への分裂が始まり、腫瘍組織を形成していくと考えられている。さらに癌化早期の分裂軸の回転に伴い、通常は細胞間隙に存在している claudin が apical 面に露出すると考えられており、この claudin の露出を認識する癌治療戦略を構築することができれば、癌の早期診断・早期治療法の開発に繋がると考えられる。

次年度以降は、引き続き新規ライブラリなどを有効活用し、新たな claudin binder の作製を進めると同時に、新たに取得した claudin binder を用いて本年度検討したリポソーム修飾条件を基に claudin 指向性リポソームの作製を行い、新規癌治療法の開発につなげていく予定である。

E. 結論

本研究は、独自の CL (claudin) 創薬研究を有効活用し、上皮細胞の癌化超早期イベント『分裂軸の回転』に着目した初めての癌診断・治療用ナノメディシンを創出することを目的としている。

平成21年度は、①C-CPEをCL binderのモデル分子として使用したCL指向性癌治療戦略の可否について検証し、②新規CL binderを作製し、以下の成果を得た。

① CLを利用した癌治療法の検証

CL-4 binderと緑膿菌エキソトキシン由来蛋白合成阻害因子(PSIF)との融合蛋白質C-CPE-PSIFを作製した。C-CPE-PSIFはCL-4指向性を有しており、細胞極性依存的な細胞障害性を示していた。さらに、マウス乳癌細胞に対して *in vitro* および *in vivo* において抗腫瘍効果を有していた。C-CPEの claudin-4 結合性を消失させたところ融合蛋白質の抗腫瘍活性が消失していたこと、claudin-4 高発現臓器である肝臓や腎臓における障害性、体重減少といった副作用は観察されなかったことから、claudin を標的とした癌治療戦略の有用性が示唆され

た。

- ② 新規claudin binderの創製
C-CPE誘導体ライブラリ等の中からclaudin-1、-4 binderのスクリーニングを試みたところ、claudin-1結合分子、およびC-CPEに比して4~20倍のclaudin-4結合性および6~20倍の溶解性を示すC-CPE誘導体を取得した。
- ③ C-CPE のリポソーム修飾条件の設定
PEG 修飾リポソームに対する C-CPE 反応条件の検討を行い、CL-4 指向性リポソームの作製に成功した。
- ④ 新規ライブラリの作製
新規 CL binder の探索に資するライブラリの作製を試み、ナイーブ抗体ライブラリやペプチドライブラリの作製に成功した。

平成 22 年度以降は、上記の成果を踏まえ、引き続き新規 claudin binder の作製を進めると同時に、claudin 指向性リポソームを用いた癌治療法の可否について検証を進める予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

Matsuhisa K, Kondoh M, Takahashi A and Yagi K (2009) Tight junction modulator and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 6(5):509-515.

Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y and Yagi K (2009) A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* 76(4):918-926.

近藤昌夫、高橋梓、佐伯理恵、八木清仁、生体バ

リアを利用した創薬研究、*Drug Delivery System*, 24, 532-537, 2009.

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. *Eur J Pharm Biopharm.*, in press.

Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T and Yagi K. Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials.*, in press.

Kodama T, Tomita N, Horie S, Sax N, Iwasaki H, Suzuki R, Maruyama K, Mori S, Manabu F. Morphological study of acoustic liposomes using transmission electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)* in press.

Negishi Y, Omata D, Iijima H, Takabayashi Y, Suzuki K, Endo Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y. Enhanced laminin-derived peptide AG73-mediated liposomal gene transfer by bubble liposomes and ultrasound. *Mol Pharm.* 7(1): 217-226 (2010)

Suzuki R, Namai E, Oda Y, Nishiie N, Otake S, Koshima R, Hirata K, Taira Y, Utoguchi N, Negishi Y, Nakagawa S, Maruyama K. Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *J Control Release.* 142(2): 245-250 (2010)

Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Enhanced transfection efficiency into macrophages and dendritic cells by a combination method using mannosylated lipoplexes and bubble liposomes with ultrasound exposure. *Hum Gene Ther.*; 21(1): 65-74. (2010)

Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H,

Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Taniai M, Ohta T, Tsunoda S and Tsutsumi Y. (2009) Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs. *Biochem Biophys Res Commun*, 388:667-71.

Abe Y. (2009) Development of novel DDS technologies for optimized protein therapy by creating functional mutant proteins with antagonistic activity. *Yakugaku Zasshi*, 129:933-939.

Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Minowa K, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Tsunoda S and Tsutsumi Y. (2010) Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology. *Pharmazie*, 65:93-96.

G-2 学会発表

生体バリアを利用した薬物送達研究

近藤昌夫(阪大院薬)

日本薬学会第 25 年会、平成 21 年 5 月 21-23 日、静岡

生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究

近藤昌夫(阪大院薬)

第 25 回日本 DDS 学会学術集会、平成 21 年 7 月 3、4 日、東京

生体バリアの分子基盤を利用した経粘膜 DDS

近藤昌夫、八木清仁(阪大院薬)

第 25 回日本 DDS 学会学術集会、平成 21 年 7 月 3、4 日、東京

Claudin を利用した創薬研究の可能性

近藤昌夫(阪大院薬)

彩都バイオサイエンスセミナー、平成 21 年 10 月 15 日、大阪

創薬ターゲットとしてのタイトジャンクションの可能性

近藤昌夫、八木清仁(阪大院薬)

創剤フォーラム 第 15 回シンポジウム「タイトジャンクションをめぐる最近の研究成果と創薬への応用」、平成 21 年 10 月 23 日、東京

A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator

Koji Matsuhisa, Ryota Okude, Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi

36th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 18-22, 2009, Copenhagen, Denmark.

Claudin as a target molecule for mucosal absorption of peptide drug

Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA.

Development of a novel screening system for claudin binder using baculovirus display.

Toshiaki Yamaura, Azusa Takahashi, Hideki Kakutani, Masuo Kondoh, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Preparation of a controllable RNA polymerase I-dependent expression vector

Takeshi Yoshida, Manabu Ojima, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Claudin-4を介した新規粘膜ワクチンの創製

鈴木 英彦、角谷 秀樹、深坂 昌弘、近藤 昌夫、八木 清仁(阪大院薬)、日本薬学会第 130 年会、

平成 22 年 3 月、岡山

出芽バキュロウイルスを用いた claudin binder スクリーニング系の構築

松下 恭平¹、角谷 秀樹¹、高橋 梓¹、山浦 利章¹、
浜窪 隆雄²、近藤 昌夫¹、八木 清仁¹(¹阪大院
薬、²東大先端研)、日本薬学会第130年会、平成
22年3月、岡山

ウエルシュ菌エンテロトキシン断片をプロトタイプと
した新規claudin-4 modulator
の創製

各務 洋平¹、山浦 利章¹、松下 恭平¹、高橋 梓¹、
内田 博司²、花田 雄志²、松久 幸司¹、渡利 彰
浩¹、近藤 昌夫¹、八木 清仁¹(¹阪大院薬、²アス
ピオファーマ)、日本薬学会第130年会、平成22年
3月、岡山

Claudin発現の迅速かつ簡便なモニタリングシステ
ムの開発

渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁(阪大院薬)、
日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月、岡山

鈴木 亮、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用
した新規 Drug Delivery System (DDS) 開発に向けた
基盤技術の構築、日本生体医工学会、東京、2009 年 4
月 23-25 日

鈴木 亮、丸山一雄、遺伝子デリバリーシステムへの
超音波技術の応用、日本超音波医学会、東京、2009
年 5 月 22-24 日

鈴木 亮、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用
した新規 DDS 基盤技術の構築、日本DDS学会、東
京、2009 年 7 月 3-4 日

Ryo Suzuki, Eisuke Namai, Yusuke Oda, Norihito Nishiie,
Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Shinsaku Nakagawa,
Kazuo Maruyama, Cancer gene immunotherapy by
IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral

ultrasound exposure, WFUMB2009, シドニー(オースト
ラリア)、2009 年 8 月 29 日-9 月 3 日

鈴木 亮、小田雄介、大竹将太、宇都口直樹、丸山一
雄、超音波感受性リポソームを利用した樹状細胞への
抗原送達特性の評価、日本バイオイメージング学会、
岡山、2009 年 9 月 3-5 日

Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Norihito Nishiie, Shota Otake,
Risa Koshima, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Shinsaku
Nakagawa, Kazuo Maruyama, Cancer gene therapy
utilized ultrasound (US)-sensitive liposome as non-viral
vector, WMIC2009, モントリオール(カナダ)、2009 年 9
月 23-28 日

鈴木 亮、宇都口直樹、丸山一雄、超音波感受性リポ
ソームを利用したがん温熱療法と免疫療法の併用によ
るがん治療、日本癌学会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日

Ryo Suzuki, Norihito Nishiie, Yusuke Oda, Yuichiro Taira,
Keiichi Hirata, Naoki Utoguchi, and Kazuo Maruyama,
ACTIVATION OF EFFECTIVE ANTITUMOR IMMUNITY
BY THE COMBINATION OF THERAPEUTIC
ULTRASOUND AND DENDRITIC CELL BASED
IMMUNOTHERAPY, AFPS2009, 福岡、2009 年 10 月
15-18 日

鈴木 亮、丸山一雄、超音波がん温熱療法への応用に
向けた超音波感受性ナノ微粒子の開発、NEDO 特別講
座 DDS シンポジウム、東京、2009 年 12 月 12 日

鈴木 亮、西家功人、小田雄介、宇都口直樹、丸山一
雄、リポソーム型微小気泡を利用した超音波がん温熱
免疫療法における遠隔転移部位に対する治療効果、
国際癌増感シンポジウム、奈良、2010 年 2 月 13-14
日

鈴木 亮、小田雄介、宇都口直樹、丸山一雄、音波応
答性リポソームの開発とがん治療への応用、超音波分
子診断治療研究会、福岡、2010 年 3 月 6 日

阿部康弘、角田慎一、堤 康央：創薬プロテオミクス研究を有効活用したバイオ創薬、CphI Japan 2009、平成21年4月、東京(招待講演)

阿部康弘、萱室裕之、吉岡靖雄、形山和史、野村鉄也、廣井隆親、角田慎一、堤 康央：生物学的 DDS による活性増強型 TNF 変異体の創出とその粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性評価、第 25 回 DDS 学会、平成 21 年 7 月、東京(ベストポスター賞受賞)

阿部康弘、鎌田春彦、角田慎一、堤 康央：アンタゴニスト活性を有した TNFR1 指向性変異体の新規自己免疫疾患治療薬としての有用性評価、第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 21 年 10 月、大阪(日本薬学会近畿支部奨励賞 受賞講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当事項なし

H-2 実用新案登録

該当事項なし

H-3 その他

該当事項なし

I. 研究協力者

大阪大学 近藤班

八木清仁(薬学研究科 教授)

渡利彰浩(薬学研究科 助教)

角谷秀樹(薬学研究科 大学院生)

鈴木英彦(薬学研究科 大学院生)

帝京大学 鈴木班

鈴木 亮 (帝京大学 薬学部 助教)

小田雄介 (帝京大学 薬学部)

平田圭一 (帝京大学 薬学部)

医薬基盤研究所 阿部班

阿部康弘 (基盤的研究部 研究員)

井上雅己 (基盤的研究部)

有田修平 (基盤的研究部)

古屋 剛 (基盤的研究部)

Claudin binder 修飾リポソームの創製に関する研究

分担研究者 鈴木 亮 帝京大学薬学部 助教

研究要旨

Claudin-4 (CL-4) に対する親和性を有するペプチド (C-CPE) を修飾したリポソームを創製した。このリポソームは、CL-4 発現細胞に特異的に結合することが明らかとなった。

A. 研究目的

正常上皮細胞は水平方向に細胞分裂し、一定の細胞密度に達すると密着結合 (TJ) により接触阻害機構が作動し、細胞分裂を停止する。一方、上皮細胞の癌化超早期では、分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、TJ による接触阻害機構が利かなくなり、無秩序な細胞増殖を繰り返すようになる。このように、癌化した上皮細胞は分裂軸の回転に伴い、claudin (CL) が細胞表面に露出した状態となる。そのため、この露出した CL を標的とすることで上皮癌の早期診断・治療が可能になると考えられる。

これまでに、当該研究代表者の近藤は、膵臓癌、卵巣癌、大腸癌、膀胱癌、舌癌に高発現している CL-4 に対し特異的に結合するポリペプチド (C-CPE) を見出した。この C-CPE と薬物キャリアとして期待されているリポソームを組み合わせることで、上記の上皮癌に対する早期診断・治療薬の開発につながると期待される。そこで本研究では、C-CPE 修飾ナノリポソーム

(図1)を調製し、CL-4 発現細胞への結合性について評価した。

B. 研究方法

1. 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) = 6
3:31:3:1(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
のりポソームに 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。

2. 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

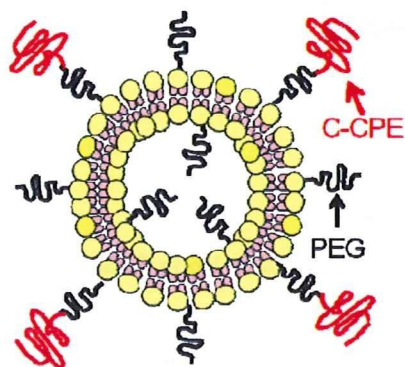


図1 C-CPE 修飾リポソームの模式図

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。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

1. C-CPE 修飾リポソームの調製

C-CPE 修飾および未修飾リポソームの調製を行い、それぞれ平均粒子径 151 nm および 152 nm のリポソームを得た。

2. CL発現細胞への C-CPE 修飾リポソームの結合性評価

NBD ラベルした C-CPE 未修飾リポソームを L 細胞、CL1、CL4 または CL5 発現 L 細胞に作用させてもリポソームの細胞への結合や取り込みは認められなかった。一方、C-CPE 修飾リポソームを細胞に作用させたところ CL4 発現細胞のみリポソームの結合および取り込みが認められた(図2)。

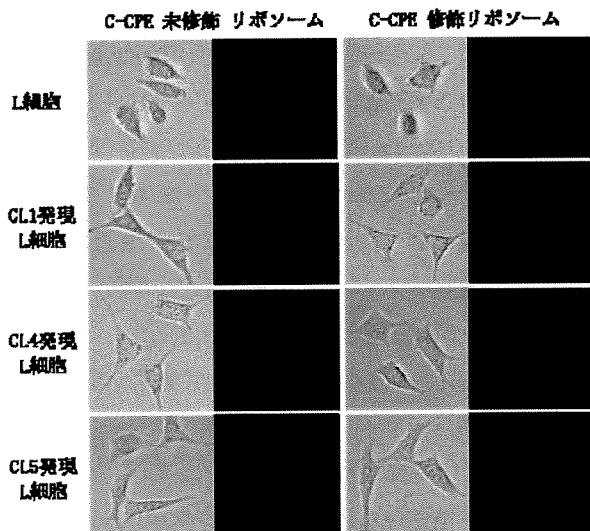


図2 C-CPE 修飾リポソームの CL4 発現細胞への結合・取り込み評価

そこで、遊離の C-CPE を用いた競合阻害実験を行

ったところ、C-CPE 添加により CL4 発現細胞への C-CPE 修飾リポソームの結合や取り込みが阻害された(図3)。なお、コントロールとして BSA 存在下

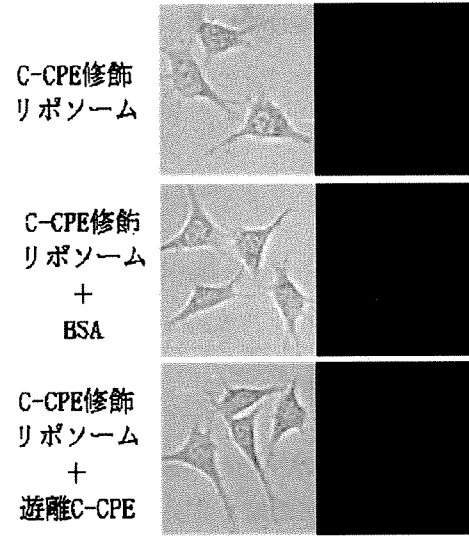


図3 C-CPE 修飾リポソームの CL4 発現細胞への結合・取り込みにおよぼす遊離 C-CPE の影響

では C-CPE 修飾リポソームの CL4 発現細胞への結合や取り込みは阻害されなかった。以上の結果より、C-CPE を表面修飾したリポソームは、CL4 特異的に細胞に結合し、取り込まれることが明らかとなった。

E. 結論

C-CPE 修飾リポソームが CL4 特異的に CL4 発現細胞に結合することが明らかとなった。このことより、C-CPE 修飾リポソームが上皮癌細胞を標的とした薬物デリバリーのための有望なキャリアとして利用可能になるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

- Kodama T, Tomita N, Horie S, Sax N, Iwasaki H, Suzuki R, Maruyama K, Mori S, Manabu F. Morphological study of acoustic liposomes using transmission electron microscopy. J Electron

Microsc (Tokyo). (In press)

2. Negishi Y, Omata D, Iijima H, Takabayashi Y, Suzuki K, Endo Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y. Enhanced laminin-derived peptide AG73-mediated liposomal gene transfer by bubble liposomes and ultrasound. *Mol Pharm*. 7(1): 217-226 (2010)
3. Suzuki R, Namai E, Oda Y, Nishiie N, Otake S, Koshima R, Hirata K, Taira Y, Utoguchi N, Negishi Y, Nakagawa S, Maruyama K. Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *J Control Release*. 142(2): 245-250 (2010)
4. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Enhanced transfection efficiency into macrophages and dendritic cells by a combination method using mannosylated lipoplexes and bubble liposomes with ultrasound exposure. *Hum Gene Ther*.; 21(1): 65-74. (2010)

G-2 学会発表

1. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用した新規 Drug Delivery System (DDS) 開発に向けた基盤技術の構築、日本生体医工学会、東京、2009年4月23-25日
2. 鈴木 亮、丸山一雄、遺伝子デリバリーシステムへの超音波技術の応用、日本超音波医学会、東京、2009年5月22-24日
3. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用した新規 DDS 基盤技術の構築、日本DDS学会、東京、2009年7月3-4日
4. Ryo Suzuki, Eisuke Namai, Yusuke Oda, Norihito Nishiie, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Shinsaku Nakagawa, Kazuo Maruyama, Cancer gene immunotherapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure, WFUMB2009、シドニー(オーストラリア)、2009年8月29日-9月3日
5. 鈴木 亮、小田雄介、大竹将太、宇都口直樹、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用した

樹状細胞への抗原送達特性の評価、日本バイオイメージング学会、岡山、2009年9月3-5日

6. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Norihito Nishiie, Shota Otake, Risa Koshima, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Shinsaku Nakagawa, Kazuo Maruyama, Cancer gene therapy utilized ultrasound (US)-sensitive liposome as non-viral vector, WMIC2009、モントリオール(カナダ)、2009年9月23-28日
7. 鈴木 亮、宇都口直樹、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用したがん温熱療法と免疫療法の併用によるがん治療、日本癌学会、横浜、2009年10月1-3日
8. Ryo Suzuki, Norihito Nishiie, Yusuke Oda, Yuichiro Taira, Keiichi Hirata, Naoki Utoguchi, and Kazuo Maruyama, ACTIVATION OF EFFECTIVE ANTITUMOR IMMUNITY BY THE COMBINATION OF THERAPEUTIC ULTRASOUND AND DENDRITIC CELL BASED IMMUNOTHERAPY, AFPS2009、福岡、2009年10月15-18日
9. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波がん温熱療法への応用に向けた超音波感受性ナノ微粒子の開発、NEDO特別講座 DDSシンポジウム、東京、2009年12月12日
10. 鈴木 亮、西家功人、小田雄介、宇都口直樹、丸山一雄、リポソーム型微小気泡を利用した超音波がん温熱免疫療法における遠隔転移部位に対する治療効果、国際癌増感シンポジウム、奈良、2010年2月13-14日
11. 鈴木 亮、小田雄介、宇都口直樹、丸山一雄、音波応答性リポソームの開発とがん治療への応用、超音波分子診断治療研究会、福岡、2010年3月6日

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

なし

H-2 実用新案登録

なし

H-3 その他

なし

1. 研究協力者

小田 雄介

平田 圭一

Claudin binder の創製に関する研究

分担研究者 阿部 康弘 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクト研究員

研究要旨

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。中でも、悪性腫瘍の 90%を占める上皮癌超早期では、分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、密着結合(TJ)による接触阻害機構が利かなくなり、無秩序な細胞増殖繰り返すようになる。以上の事実は、この『分裂軸の回転』を利用すれば癌の早期診断・治療が可能になることを示唆している。

そこで本研究では、上皮細胞癌化の超早期イベント『分裂軸の回転』に伴い表面に露出する TJ 構成蛋白質 Claudin (CL)に着目し、CL をターゲットとした癌診断・治療用ナノメディシンの開発に向けたパイロットスタディを実施した。本年度は、独自のファージ表面提示法を駆使することで、CL binder の探索シーズとなるナীবファージ抗体ライブラリ、およびランダムペプチドライブラリの作製を試みた。

A. 研究目的

高齢化社会の進行に伴い、癌による死者の数は増加傾向にあり、本邦では年間30万人余り、世界では年間700万人余りの人が癌により命を失っている。とりわけ、上皮癌は悪性腫瘍の90%を占めており、上皮癌の克服が健康寿命延長に向けた最重要課題の1つとなっている。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、新規CL binderの創出を目指し、独自のファージ表面提示法を利用することでナীবファージ抗体ライブラリおよびランダムペプチドライブラリの作製を試みた。ファージ抗体ライブラリは、生体が有する抗体可変領域遺伝子(VLおよびVH)レパートリーを

PCR法で増幅し、リンカー配列で連結して一本鎖Fv型(scFv)とした上で、ファージ表面上に網羅的に発現させるものである。本研究では、ファージ抗体ライブラリの作製に最も重要なVLおよびVH遺伝子増幅のためのPCRプライマーセットを改善することで、多様性と品質の双方に優れたナীবファージ抗体ライブラリの作製を試みた。第一の改善点として、過去の報告やKabat抗体データベースを参考に、増幅可能な抗体遺伝子の多様性を大幅に向上しうるプライマーセットを設計した(表1)。第二の改善点として、連結効率の低下やフレームシフトの低減を図るため、プライマーセットのVL遺伝子下流とVH遺伝子上流にあらかじめリンカー配列を組み込むことで、3 fragment assemblyのステップを省略した。本改良型プライマーセットを用いてナীবファージ抗体ライブラリの構築を行った。

B. 研究方法

1. 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 µg 当たり、50 µM oligo(dT)₂₀ (Invitrogen) 1 µL、10 mM dNTP mix 1 µL を混合し、DEPEC 処理水を加えて 10 µL とし、65° C で 5 分間反応させた。そこに 10×RT buffer 2 µL、25 mM MgCl₂ 4 µl、0.1 M DTT 2 µL、RNaseOUT™ (Invitrogen) 1 µL、SuperScript™ III RT (Invitrogen) 1 µL 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 µL 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。

2. 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'-GCCAGCTTTGGAGCCTTTTT TTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGC AATTCCTTTAGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCC GG CCATGGCC-3')、および Nco I サイトを有するプライマー Y16 (5'-TTAGTAAATGAATTTTCTGTATGA GGTTTTGCTAAACAACCTTTCAACAGTCTATGCGGCA CGCGGTTCCACGGATCCGGATACGGCACCGGCGCA CCTGCGGCCGC-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。

3. ナイーブファージ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 で懸濁氷冷し、エレクトロポレーション用 TG1 とした。本 TG1 50 µL に対して、精製後のライゲーション産物 1 µL を添加し、GenePulser Xcell (Bio-Rad)を用い、1.8 kV、0.25 µF、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 µg/mL ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地で希釈し、Petrifilm (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。

4. ランダム 18mer 遺伝子断片の作製

プライマー、P-oligo1 (5'- GATTACGCCAAGCTTT GGAGCCTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAA TTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCTTTCTATG CGGCCAGCCGGCCATGGCC-3') および P-oligo4 (5'-CGGCGCACCTGCGGCCGOSNNSNNSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN NSNNGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCATAGAA-3') を 25 µM に希釈したものをそれぞれ 2 µL、10 × Klenow Buffer (0.5 M Tris-HCl, 0.1M MgCl₂, 1mM DTT, 500µg/mL BSA) 4µL、D.W.を加えて総量 40µL 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 µL、10 mM dNTP (Sigma-Aldrich, Inc) 1µL、10 × Klenow Buffer 1 µL、D.W. 7 µL 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 で目的の遺伝子を出した。抽出後のサンプル 0.5 µL をテンプレートとし、pCANTAB HindIII (5'-GGAAACAGCTATGACCATGAT TACGCCAAG-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。

5. 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、ミリ Q 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 μL に懸濁し氷冷した大腸菌 TG1 に対して、精製したライゲーション溶液を 10 μL 添加し、Gene purser[®] II(Bio-Rad Laboratories, Co., Ltd.)を用い、2.5 kV、0.25 μF、200 μL で電圧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 μL 添加し、1 時間培養した後、一部を取って 50 μg/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。

6. ライブラリのシーケンス解析

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'-CAACGTGAAAAATTATT ATTCGC-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

結果は D 項にまとめて記載する。

D. 考察

1. ナイーブファージ抗体ライブラリの作製

過去に報告され、現在も汎用されているファージ抗体ライブラリ用のプライマーセットは、①プライマーの組み合わせが 1440 通りと多様性に乏しく、②scFv 遺伝子を作製する際に VL 遺伝子、リンカー配列、VH 遺伝子の 3 fragment assembly を必要としているため、連結効率の低下やフレームシフトが起こり、高品質なライブラリを得ることができないという 2 つの大きな問題点を有している。これら問題点を克服するために、まず、多様な抗体遺伝子を均等に増幅できるように、過去の報告と Kabat 抗体データベースを参考に、約 1000 万種類以上もの組み合わせからなるプライマーセットを独自に設計した(表 1)。そして、3 fragment assembly を省くため、VL 遺伝子下流と VH 遺伝子上流にリンカー配列をあらかじめ組み込むことで、VL 遺伝子、VH 遺伝子を直接的に連結可能とした。このプライマーセットを用いて、抗原感作されていないマウスの骨髄・脾臓細胞由来 mRNA から VL、VH 遺伝子断片をそれぞれ増幅した。その結果、作製された PCR 産物は、約 380 bp と約 400 bp 付近に位置し、目的の VL、VH 遺伝子断片が増幅されていることを確認した。この両遺伝子を assembly PCR により連結した。そして、この産物をテンプレートとして Y15、Y16 プライマーを用い PCR によって scFv 遺伝子を増幅し、酵素処理後、電気泳動により約 720 bp 付近に遺伝子断片が増幅されていることを確認した(図 1)。この得られた scFv 遺伝子断片をファージミドベクター pCANTAB5E に組み込み、大腸菌 TG1 に電圧ポレーションにより形質転換した。得られたファージ抗体ライブラリのライブラリサイズは、大腸菌への形質転換効率から計算した所 2.4×10^9 CFU であった。また、ライブラリから任意にピックアップしたクローンの DNA シーケンスを解析し、アミノ酸配列を確認した結果(表 2)、フレームシフトやフレーム内の変異は認められなかった。更に、抗体のアミノ酸配列の中で最も多様であり、抗原に対する特異的結合に重要であると言われている VH の CDR3 領

域をシーケンス解析した結果、本ライブラリにおいても、CDR 領域の長さ、配列共に十分な多様性を有していることが確認された。以上の結果から、本研究で構築したナイーブファージ抗体ライブラリは、生体が有する抗体の多様性を模倣する優れたライブラリであることが示唆された。

2. ランダムペプチドライブラリの作製

本研究では、Claudin binder のスクリーニングシステムの構築にあたり、第一ステップとして、最も汎用されているランダムペプチドライブラリを選択した。図2に示す方法で、ランダムな 18 アミノ酸で構成されるペプチドライブラリを構築した。全てのアミノ酸をコードし得る NNS 配列(N=A/T/G/C, S=G/C)を 18 個含む P-oligo4 と、P-oligo4 に一部相補的な配列をもつ P-oligo1 を用いて PCR を行い、ランダムな 18 アミノ酸をコードする cDNA を作製した。この cDNA 断片を pCANTAB にクローニングし、TG1 に形質転換することで、ランダム 18mer ペプチドライブラリを作製した。生じたコロニー数より、ライブラリのサイズを評価したところ、 2.0×10^6 CFU のライブラリを構築したことが判明した。ライブラリの中からランダムにクローンをピックアップし、遺伝子配列をシーケンス解析により調べた結果、全てのクローンが全く異なる 18 アミノ酸を有していたことから、作製したライブラリが独立した異なるクローンで構成されることが示唆された(表3)。

E. 結論

本研究では、上皮細胞癌化の超早期イベント『分裂軸の回転』に伴い表面に露出する TJ 構成蛋白質 Claudin (CL)に着目し、CL をターゲットとした癌診断・治療用ナノメディシンの開発に向けたパイロットスタディを実施した。新規 CL binder の創出に向けて、独自のファージ表面提示法を駆使することで作製したナイーブ抗体ファージライブラリおよびランダムペプチドライブラリは、質・サイズともに優れたライブラリであることが判明した。これらライブラリを用いて、CL に対する結合力に基づいたセレクション(パンニング)を行うことで、目的とする CL binder を効率良く同定・単離できることが期待される。今後はパンニング条件の最適化を行うとともに、CL

binder の創出に向けたスクリーニングシステムの開発を進める予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Taniai M, Ohta T, Tsunoda S and Tsutsumi Y. (2009) Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs. *Biochem Biophys Res Commun*, 388:667-71.
2. Abe Y. (2009) Development of novel DDS technologies for optimized protein therapy by creating functional mutant proteins with antagonistic activity. *Yakugaku Zasshi*, 129:933-939.
3. Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Minowa K, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Tsunoda S and Tsutsumi Y. (2010) Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology, *Pharmazie*, 65:93-96.

G-2 学会発表

1. 阿部康弘、角田慎一、堤 康央:創薬プロテオミクス研究を有効活用したバイオ創薬、Cphi Japan 2009、平成 21 年 4 月、東京(招待講演)
2. 阿部康弘、萱室裕之、吉岡靖雄、形山和史、野村鉄也、廣井隆親、角田慎一、堤 康央:生物学的 DDS による活性増強型 TNF 変異体の創出とその粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性評価、第 25 回 DDS 学会、平成 21 年 7 月、東京(ベストポスター受賞)
3. 阿部康弘、鎌田春彦、角田慎一、堤 康央:アンタ

ゴニスト活性を有した TNFR1 指向性変異体の新規
自己免疫疾患治療薬としての有用性評価、第 59
回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 21 年 10
月、大阪(日本薬学会近畿支部奨励賞 受賞講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

I. 研究協力者

井上 雅己

有田 修平

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Suzuki R. Maruyama K.	Effective In Vitro and In Vivo Gene Delivery by the Combination of Liposomal Bubbles (Bubble liposomes) and Ultrasound Exposure	John M. Walker	Methods Mol Biol.	Humana Press	London	2009	p.473-486

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsuhisa K Kondoh M Takahashi A Yagi K	Tight junction modulator and drug delivery	Expert Opin Drug Deliv	6	509-515	2009
Saeki R Kondoh M Kakutani H Tsunoda S Mochizuki Y Hamakubo T Tsutsumi Y Horiguchi Y Yagi K	A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule	Mol Pharmacol	76	918-926	2009
近藤昌夫 高橋梓 佐伯理恵 八木清仁	生体バリアを利用した創薬研究	Drug Delivery System	24	532-537	2009
Uchida H Kondoh M Hanada T Takahashi A Hamakubo T Yagi K	A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide	Biochem Pharmacol	79	1437-1444	2010
Kakutani H Kondoh M Fukasaka M Suzuki H Hamakubo T Yagi K	Mucosal vaccination using claudin-4-targeting	Biomaterials			In press

Kodama T Tomita N Horie S Sax N Iwasaki H Suzuki R Maruyama K Mori S Manabu F	Morphological study of acoustic liposomes using transmission electron microscopy.	J Electron Microsc (Tokyo).			In press
Negishi Y Omata D Iijima H Takabayashi Y Suzuki K Endo Y Suzuki R Maruyama K Nomizu M, Aramaki Y	Enhanced laminin-derived peptide AG73-mediated liposomal gene transfer by bubble liposomes and ultrasound.	Mol Pharm.	7	217-226	2010
Suzuki R Namai E Oda Y Nishiie N Otake S Koshima R Hirata K Taira Y Utoguchi N Negishi Y Nakagawa S Maruyama K	Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure.	J Control Release.	142	245-250	2010
Un K Kawakami S Suzuki R Maruyama K Yamashita F Hashida M	Enhanced transfection efficiency into macrophages and dendritic cells by a combination method using mannosylated lipoplexes and bubble liposomes with ultrasound exposure	Hum Gene Ther	21	65-74	2010
鈴木 亮 小田雄介 丸山一雄	バブルリポソームの開発と遺伝子・ドラッグデリバリーシステムへの応用	PHARM TECH JAPAN	25	2151-2156	2009