

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 講師

研究要旨

Claudin-4 (CL-4) 結合ペプチド (C-CPE) の改変で CL-4 への親和性が高められた新規ペプチド(C-CPE22)をリポソームに修飾し、CL-4 発現細胞へのリポソームの結合性を評価した。その結果、本リポソームの CL-4 発現細胞への結合性は前年度の C-CPE04 修飾リポソームと同等であった。

C. 研究目的

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-CPE04) を見出した。この C-CPE04 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。昨年度の検討では、その C-CPE04 修飾ナノリポソーム(図1)が CL-4 細胞に特異的に結合することを報告した。また、当該研究代表者の近藤および分担者の阿部が、ファージディスプレイ技術を駆使して CL-4 への結合性が C-CPE04 より約 20 倍高くなった新規ポリペプチド(C-CPE22)を見出した。そこで本研究では、C-CPE22 修飾ナノリポソームを調製し、CL-4 発現細胞への結合性について評価した。

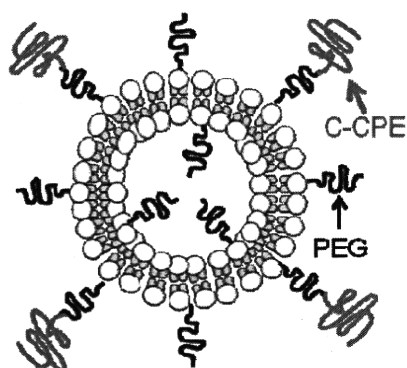


図1 C-CPE 修飾リポソームの模式図

D. 研究方法

1. C-CPE について

本実験ではアミノ酸配列の異なる 3 種類の C-CPE を使用した。なお、C-CPE14 は CL-4 に結合性を示さないコントロールペプチドである。また、C-CPE04 および C-CPE22 は、CL-4 に特異的に結合するペプチドで、C-CPE22 は C-CPE04 に比べ約 20 倍高い CL-4 親和性を有するペプチドである。

2. 各種 C-CPE 修飾リポソームの調製方法

Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholine (POPC):
Cholesterol : Distearoylphosphatidylethanolamine
-polyethyleneglycol (Mw: 2,000) (DSPE-PEG(2k)) :
DSPE-PEG(2k)-N-hydroxysuccinimide (NHS) =
63:31:3:3(モル比) の脂質 76.2 mg をエタノール
0.8 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 8 mL のリン酸緩衝液
(pH7.4) にポルテックスミキサーによる攪拌下で注
入リポソームを作製した。このリポソームに
C-CPE : DSPE-PEG(2k)-NHS = 1 : 200, 400 また
は 800 となるように混合し、4°Cで一晩反応させ
C-CPE04、14、22 をリポソーム表面に修飾した。
なお、未反応のポリペプチドは超遠心操作により除

去した。

3. CL-4 発現細胞への C-CPE 修飾リポソームの結合性評価方法

CL-4 遺伝子を導入し CL-4 を発現させたマウス線維芽細胞 (L 細胞) に NBD で蛍光ラベルした各種 C-CPE 修飾リポソームを添加し、37 °C で 1 時間作用させた。細胞を洗浄後、細胞へのリポソームの取り込み効率をフローサイトメトリーにて評価した。また、C-CPE22 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 22 (20 µg/mL) 存在下で C-CPE22 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も評価した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考 察

1. 各種 C-CPE 修飾リポソームの調製

C-CPE04, 14, 22 修飾リポソームの調製を行い、それぞれ平均粒子径 176 nm、149nm および 170 nm のリポソームを得た。

2. CL-4 発現細胞への各種 C-CPE 修飾リポソームの結合性評価

NBD ラベルした各種 C-CPE 修飾リポソームを CL-4 発現細胞に作用させリポソームの細胞への結合や取り込みを検討した(図2)。その結果、CL-4 に親和性を示さない C-CPE14 を修飾したリポソームの CL-4 発現細胞への結合・取り込みはほとんど認められなかった。一方、CL-4 に対し親和性を有する

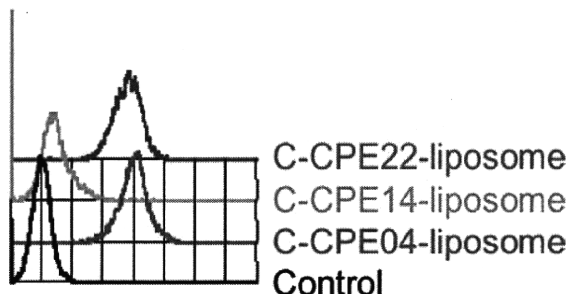


図2 各種 C-CPE 修飾リポソームの CL4 発現細胞への結合・取り込み評価

C-CPE04 や C-CPE22 を修飾したリポソームを CL-4

発現細胞に作用させたところ、いずれのリポソームも同程度細胞に結合・取り込まれることが明らかとなった。C-CPE22 修飾リポソームの細胞への結合・取り込みが CL-4 を介したものであることを確認するため、遊離 C-CPE 22 を用いた結合・取り込みに対する競合阻害実験を行った(図3)。その結果、遊離 C-CPE 22 添加により、細胞への結合・取り込みが阻害された。このことから、C-CPE 22 修飾リポソームは確かに

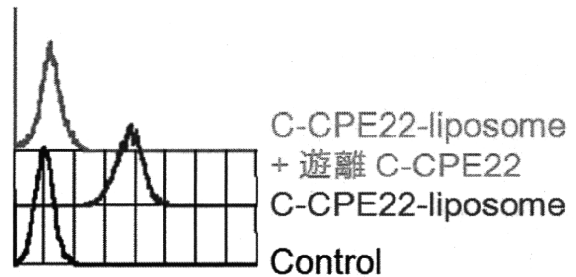


図3 C-CPE22 修飾リポソームの CL4 発現細胞への結合・取り込みにおよぼす遊離 C-CPE22 添加の影響(競合阻害実験)

CL-4 を介して細胞に結合・取り込まれていることが示唆された。

さて、C-CPE22 はペプチド単独において C-CPE04 より CL-4 に対し親和性の高いことが明らかとなっている。しかし、リポソーム表面に C-CPE22 を修飾した場合、C-CPE04 とほぼ同等の細胞への結合活性しか示さなかった。これはリポソーム表面に細胞への結合に必要な十分量のペプチドが修飾されていたため、細胞への結合・取り込み量が両者のペプチドで同等になったのではないかと考えられた。そこで次に、リポソームへのペプチド修飾量を変えて細胞への結合・取り込み活性について検討した。

今回の検討では、リポソームへのペプチドを修飾する際にペプチドの仕込み量を C-CPE/DSPE-PEG-NHS= 1/200, 1/400, 1/800 とし、リポソーム調製した。これらリポソームを用い細胞への結合・取り込みを検討したところ、ペプチドの仕込み量の減少に伴い、リポソームの細胞への結合・取り込み量も低下した(図3)。しかし、残念ながら C-CPE04 と C-CPE22 を修飾したリポソーム間で細胞への結合・取り込み量は同等であり、C-CPE22 修飾による細胞への結合・取り込み活性に違いは認められなかった。

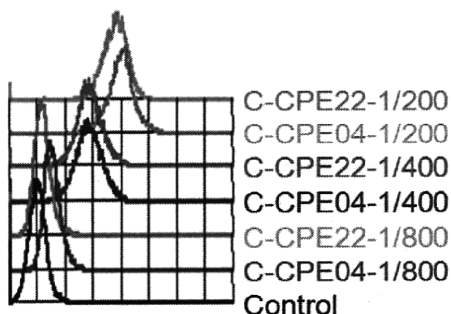


図3 C-CPE04, 22 修飾リポソームの CL4 発現細胞への結合・取り込みに対するペプチド修飾量の影響

ペプチド単独とリポソームへの修飾による結合活性の違いに関して理由はよくわからないが、リポソーム表面のような固相に C-CPE22 を修飾すると遊離の分子のときより細胞への結合活性が低下してしまったためではないかと考えられた。

E. 結論

CL-4 に対し親和性の高い新規ペプチド C-CPE22 を修飾したリポソームを調製した。このリポソームは、CL-4 特異的に CL-4 発現細胞に結合することが明らかとなった。しかし残念なことに、その結合活性は前年度までに検討してきた C-CPE04 修飾リポソームとほぼ同等であった。今後は、リポソームへの修飾方法などについて最適化を行う必要があると考えられた。

いずれにしても、C-CPE22 修飾リポソームが CL-4 特異的に細胞に結合・取り込まれることが明らかとなった。このことから、本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アクティブターゲティング型薬物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

1. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Suppression of Melanoma Growth and Metastasis by DNA

Vaccination Using an Ultrasound-Responsive and Mannose-Modified Gene Carrier. *Mol Pharm.*(In press)

2. Negishi Y, Matsuo K, Endo-Takahashi Y, Suzuki K, Matsuki Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y. Delivery of an Angiogenic Gene into Ischemic Muscle by Novel Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure. *Pharm Res.* (In press)
3. Hagiwara K, Nishioka T, Suzuki R, Takizawa T, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Ohsuzu F, Kikuchi M. Enhancement of ultrasonic thrombus imaging using novel liposomal bubbles targeting activated platelet glycoprotein IIb/IIIa complex—in vitro and in vivo study. *Int J Cardiol.* (In press)
4. Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Maruyama K. Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles. *J Control Release.* 149:36-41 (2011)
5. Ikeda-Dantsuji Y, Feril LB Jr, Tachibana K, Ogawa K, Endo H, Harada Y, Suzuki R, Maruyama K. Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against *Chlamydia trachomatis*-infected human epithelial cells in vitro. *Ultrason Sonochem.* 18:425-430 (2011)
6. 鈴木 亮, 小田雄介, 宇都口直樹, 丸山一雄. Development of ultrasonic cancer therapy using ultrasound sensitive liposome. *薬学雑誌*, 130:1665-1670(2010)
7. 根岸洋一, 高橋葉子, 鈴木 亮, 丸山一雄, 新槇幸彦, Development of gene delivery system into skeletal muscles by bubble liposomes and ultrasound. *薬学雑誌*. 130:1489-1496 (2010)
8. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy. *Biomaterials.* 31:7813-7826 (2010)

9. Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice. *Cancer Res.* 70:6238-6246 (2010)
10. 山下琢也、宇都口直樹、鈴木 亮、長野一也、角田慎一、堤 康央、丸山一雄、Development of anti-tumor blood vessel antibodies by phage display method. *薬学雑誌.* 130:479-485 (2010)

G-2 学会発表

1. 平田圭一、澤村香織、鈴木 亮、小田雄介、大城英明、宇都口直樹、丸山一雄、超音波応答性リポソームを利用した経皮送達システムの開発、日本薬剤学会、徳島、2010年5月12-14日
2. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Analysis of anti-tumor mechanism by the combination of therapeutic ultrasound and immunotherapy、International Symposium of Therapeutic Ultrasound (ISTU2010)、東京、2010年6月10-12日
3. 小田雄介、鈴木 亮、平田圭一、光嶋里茶、宇都口直樹、岡田直貴、丸山一雄、樹状細胞免疫療法におけるバブルリポソームと超音波を利用した抗原送達法の特性評価日本 DDS 学会、大阪、2010年6月16-18日
4. Risa Koshima, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Development of liver specific gene delivery by the combination of liposomal bubbles and ultrasound exposure、International Symposium of Therapeutic Ultrasound 2010 (ISTU2010)、東京、2010年6月10-12日
5. Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Naoki Utoguchi, Keiichi Hirata, Yuichiro Taira, Kazuo Maruyama、Protection of cancer metastasis by dendritic cell-based cancer immunotherapy utilized liposomal bubbles and ultrasound、International Symposium of Therapeutic Ultrasound 2010 (ISTU2010)、東京、2010年6月10-12日
6. Risa Koshima, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、A novel strategy for IL-12 cancer gene therapy using the combination of liposomal bubbles and therapeutic ultrasound exposure、Liposome Research Days 2010 (LRD2010)、Canada、2010年8月5-7日
7. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Risa Koshima, Keiichi Hirata, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Anti-tumor effect by the combination of liposomal bubbles and ultrasound、Liposome Research Days 2010 (LRD2010)、Canada、2010年8月5-7日
8. 小田雄介、鈴木 亮、平田圭一、野村鉄也、宇都口直樹、丸山一雄、バブルリポソームと超音波により抗原送達した樹状細胞を免疫することによるがん転移予防効果 第7回日本中性子捕捉療法学会、東京、2010年8月5-6日
9. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Development of novel antigen delivery system with liposomal bubbles (Bubble liposomes) and ultrasound in cancer immunotherapy、EUROSON2010、デンマーク、2010年8月23-25日
10. 鈴木 亮、丸山一雄「リポソーム製剤」リポソーム技術を基盤とした新たなDDS戦略、ナノメディシン研究会、東京、2010年9月4日、招待講演
11. 鈴木 亮、超音波感受性リポソームを利用した新たな薬物・遺伝子送達システムの開発に関する研究、第19回日本バイオイメージング学会、東京、2010年9月9-11日、奨励賞受賞講演
12. 光嶋里茶、鈴木 亮、小田雄介、宇都口直樹、丸山一雄、超音波がん温熱免疫療法における超音波照射強度の影響、日本薬学会関東支部大会、東京、2010年10月2日
13. Ryo Suzuki, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Anti-tumor effect by the combination of therapeutic ultrasound and dendritic cell-based

- immunotherapy、日本癌学会、大阪 2010 年 9 月 22-24 日
14. 鈴木 亮、小田雄介、丸山一雄、リポソーム技術と超音波技術を基盤とした革新的がん治療システムの構築、シンポジウム「超音波を積極的に活用した最先端材料プロセッシング」、東京、2010 年 10 月 23 日、招待講演
15. Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Cancer Immunotherapy Utilized Ultrasound Sensitive Liposomes (Bubble Liposomes), PSWC2010、米国、2010 年 11 月 14-18 日、招待講演
16. 鈴木 亮、光嶋里茶、小田雄介、平田圭一、野村鉄也、宇都口直樹、丸山一雄、超音波感受性リポソーム(バブルリポソーム)と超音波照射の併用による がん温熱治療における免疫系の関与、日本音響学会 アコースティックイメージング研究会、宮城、2010 年 12 月 10 日
17. Ryo Suzuki, Risa Koshima, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Kazuo Maruyama、Novel cancer therapy combined with

mild-hyperthermia using ultrasound sensitive liposome and immunotherapy、第 12 回国際造影超音波シンポジウム、東京、2010 年 12 月 11-12 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

I. 研究協力者

小田 雄介

平田 圭一

宇留賀 仁史

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 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、昨年度までに構築したナイーブファージ抗体ライブラリの質の評価を行うとともに、結合力に基づくセレクションであるパンニング条件の検討を試みた。

E. 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、昨年度は、独自のファージ表面提示法を利用することでナイーブファージ抗体ライブラリ作製を試みた。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-

ジ表面上に網羅的に発現させるものである。我々は昨年度までに、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イーブファージ抗体ライブラリの作製を構築することに成功している。そこで本年度は、この24億もの抗体レパートリーを有するナイーブファージ抗体ライブラリを用いて、抗原との結合親和性に基づくセレクション(パンニング)条件の最適化を図った。そのため、アポトーシスの誘導に関わる蛋白質として広く知られるヒトprocaspase-8 (proCASP8)をモデル抗原として、マイクロ流路系で送液等の一連の操作を自動化可能なシステムであるBIAcoreを用いて抗体の単離を試みた。

F. 研究方法

1. リコンビナント proCASP8 の作製

大腸菌を用いてリコンビナント蛋白質を作製するため、proCASP8 遺伝子を T7 プロモーター制御下で蛋白質を発現誘導するベクターである pTriEx3 (Novagen) に挿入した。構築したプラスミドをヒートショック法で大腸菌 BL21-STAR DE3 株 (Invitrogen Corp.) に形質転換し、

2-YT 培地で 1 時間培養後、100 µg/mL Ampicillin 含有 LB 寒天培地 (Invitrogen Corp.) に播種し、37° C で一晩培養した。プレートからコロニーを回収し、100 µg/mL Ampicillin 含有 Terrific Broth 培地 (Invitrogen Corp.) 1 L に加え、37° C で振とう培養した。OD₆₀₀ = 1.0 になった時点で終濃度 0.1 mM の IPTG を加え、25° C で 4 時間培養することで、組み換え蛋白質を inclusion body として大量誘導した。培養した大腸菌を 3,000 rpm、10 分間遠心を行うことにより回収し、TES buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、40 mM EDTA、250 mM NaCl) で懸濁し、終濃度 0.23 mg/mL となるように Lysozyme (Roche Diagnostic Corp.) を加え、室温で 1 時間振とう培養した。その後、終濃度 0.5 M 及び 2.5% となるように NaCl 及び Triton X-100 (Sigma-Aldrich) を添加し、室温で 1 時間振とう培養した後、4° C、10,000 rpm、40 分間遠心した。得られた沈殿を sonication により再度 TES buffer に懸濁し、同様の操作を 3 回行った後、TES buffer で 3 回洗浄操作を行い、4° C、10,000 rpm、40 分間遠心し、得られた沈殿を inclusion body として回収した。得られた inclusion body を秤量し、湿重量 1.8 g あたり 10 mL の GTI buffer (6 M guanidine、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM imidazole) に懸濁し、2 時間室温にて静置した。その後、4° C、12,000 rpm、40 分遠心し、不溶物を除去した。可溶化された 46 mg の蛋白質を含む 10 mL の GTI buffer に 40 mL の Binding buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 M NaCl、5 mM imidazole、6 M guanidine、1 mM 2-メルカプトエタノール] を加え、Membrane Filters (cellulose acetate, 0.45 µm : ADVANTEC) を用いてろ過した。これを Wash buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 M NaCl、20 mM imidazole、6 M urea、1 mM 2-メルカプトエタノール) で予め平衡化した HisTrapFF 5 mL (GE Healthcare) に吸着させた。Wash buffer で洗浄した後、Wash buffer から Refolding buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 M NaCl、20 mM imidazole] にリニアグラジエントで一晩かけて置換し、変性している蛋白質をカラム内で再生した。これを Elution buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 M NaCl、500 mM imidazole] で溶出させることにより、蛋白質を His-tag アフィニティー精製した。ピークを分取した溶液を、さらに PBS で平衡化した HiPrep 26/10 Desalting column

(GE Healthcare) によって脱塩を行い、ピークを分取した。なお、この 2 段階の精製には AKTA Crystal (GE Healthcare) を用いた。

2. ファージの作製

scFv ライブラリ遺伝子で形質転換された大腸菌 TG1 株を 50 µg/mL Ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地で 250 rpm、37° C で OD₆₀₀ = 0.3-0.6 まで培養した。M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen Corp.) を添加し、110 rpm、37° C で 30 分間、250 rpm、37° C で 30 分間培養後、2,000 rpm で 10 分間遠心し、得られたペレットに対して 100 µg/mL Ampicillin、50 µg/mL Kanamycin 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養した。4° C、2,000 rpm で 10 分間、さらに 10,000 rpm で 15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-6000、2.5 M NaCl を 1 / 5 volume 加え、激しく混和して氷上で 1 時間静置した。15,000 rpm で 10 分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、0.45 µm の Millex-HV (Millipore) を用いてフィルターろ過し、ファージを回収した。さらに、2% glucose 含有 2YT 培地で OD₆₀₀ = 0.3~0.6 まで培養した TG1 に対して、10 倍希釈で段階希釈したファージ溶液を添加し、37° C、1 時間培養した。培養液の一部に 50 µg/mL Ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地を添加し、PetriFilm に播種し一晩培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測することで、ファージタイターを算出した。

3. BIAcore を用いたパンニング

パンニングには BIAcore 3000 (GE Healthcare) を用いた。センサーチップ CM3 (GE Healthcare) 上に 50 µg/mL に調製した proCASP8 を 100 µL を用い、CM3 固相化プロトコルに基づいて固相化した。作製したファージライブラリを input として用い、HBS-EPT buffer [0.05% Tween-20 を含む HBS-EP (GE Healthcare)] で 10 回洗浄した。抗原に結合したファージを glycine-HCl (pH 2.0) と glycine-NaOH (pH 11.0) により溶出回収し、output とした。1 M Tris-HCl (pH 8.0) を 4 µL と 2% glucose 含有 2YT 培地を 250 µL 加え、その一部を用いて、次項に示す方法でタイターを測定した。残りのファージを大腸菌 TG1 株に感染させ、増殖させた後、上記

のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度パンニング操作を行った。

4. 培養上清中のファージを用いた ELISA によるスクリーニング

パンニング後に回収したファージを TG1 に感染させ、生じたコロニーを Microwell 96U (Nalge Nunc) にピックアップした。各 well が $OD_{600} = 0.3 \sim 0.6$ に達するまで培養した後、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地で 10 倍希釈した M13KO7 ヘルパーファージ溶液を 20 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加した。37° C で 1 時間静置培養した後、2,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin 含有 2YT 培地を 200 μL 加えて 37° C で一晩培養し、2,000 rpm で 10 分間遠心し、回収された上清を以下のスクリーニング実験に用いた。

6 \times His monoclonal antibody (Becton Dickinson) を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように B buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6); Sigma-Aldrich) で希釈し、Maxisorb 96 well plate (Nalge Nunc) の各 well に 100 μL ずつ添加して 4° C で 8 時間静置することで 6X His monoclonal antibody を固相化した。液を廃棄し、PBS で 1 回洗浄し、0.4% Block Ace (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) で希釈した proCASP8 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、一晩 4° C で静置して固相化した。固相化後に well 内の液を捨て、4% Block Ace を 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加してブロッキングした。PBS で 1 回洗浄後、ファージサンプル 80 μL 及び 4% Block Ace 20 μL を各ウェルに添加し、緩やかに振とうさせながら室温で 2 時間反応させた。尚、negative control には当研究室がこれまでに単離した anti-KDR scFv 提示ファージを用いた。PBST (0.05% Tween-20 を含む PBS) で 3 回洗浄後、0.4% Block Ace で 3,000 倍希釈した HRP/anti-M13 monoclonal antibody (GE Healthcare) を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、TMB 溶液 (Nakarai Tesque Inc.) を加えて発色を行い、2 N 硫酸を添加することで反応を停止させた。吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 655 nm) はマイクロプレートリーダーで測定した。

5. シークエンス解析

上記でモノクローン化されたプラスミドを QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN) を用いて回収し、プライマー-156 (5'-CAA CGT GAA AAA ATT ATT ATT CGC-3') とプライマー-158 (5'-GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG-3')、及び BigDye Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシークエンス反応を行った。その後、PERFORMA Gel Filtration Cartridge を用いて精製し、ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により DNA シークエンスを解析した。

6. 各種抗原蛋白質を用いた抗 proCASP8 scFv の特異性評価 (ファージ ELISA)

固相化する抗原として、human proCASP8-his-tag、human bid (Sigma-Aldrich)、human TNFR2 Fc chimera (R & D Systems, Inc.)、human KDR Fc chimera (Genzyme/Techne)、human importin- β (Merck KGaA)、Venus (YFP mutant 理化学研究所 宮脇敦史博士より供与いただいた)、Luciferase (Promega Biosciences, Inc.) を用い、各抗原蛋白質を 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように固相化した。ファージの作製、タイターチェックは上記各項に準じて行い、ファージ量として 3.0×10^9 、 1.0×10^9 、 3.3×10^8 CFU を各抗原に添加した。以降は上記「培養上清中のファージを用いた ELISA によるスクリーニング」に準じて行なった。

7. ライブラリのシークエンス解析

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'-CAA CGT GAA AAA ATT ATT ATT CGC-3') とプライマー-158 (5'-GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG-3')、および BigDye Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシークエンス反応を行った。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 シークエンスを解析した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載する。

D. 考 察

モデル抗原 proCASP8 蛋白質は、T7プロモーター下に発現するベクターに組み込み、大腸菌を用いて発現誘導し、精製した。SDS-PAGE により純度を評価したところ、目的の 59 kDa に単一バンドを確認した(Fig. 1)。まず、ナイーブファージ抗体ライブラリから抗 proCASP8 抗体を得るために、抗原の固相化量や抗体クローンとの結合性を表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によってリアルタイムに測定でき、マイクロ流路系で送液等の一連の操作を自動化可能なシステムである BIAcore を使用した。条件検討の結果を参考に、最適化したセレクション・プロトコルに従い、proCASP8 に対するパンニング操作を 2 回くり返した。パンニング後に回収したファージを大腸菌 TG1 株に感染させることでモノクローン化し、大腸菌培養上清中に産生されたファージを用いて、proCASP8 に対するファージ ELISA により結合性を評価した (Fig. 2)。その結果、パンニング前の input ファージの中には、proCASP8 に結合性を示すクローンは認められなかったのに対し、2nd パンニング後の output ファージでは proCASP8 に結合性を示すクローンが 1 クローン認められた。続いて、スクリーニングによって同定された proCASP8 に親和性を示唆するクローンについて DNA シークエンス解析を行ったところ、Table 1 に示すような配列をもつ抗体であることが確認され、クローン名 NC-1 と命名した。次に得られた NC-1 の特性評価の一環として、その抗原特異性をファージ ELISA により評価した (Fig. 3)。固定化された human proCASP8、human bid、human TNFR2、human KDR、human importin- β 、luciferase、Venus に対する結合性を検討した結果、NC-1 は抗体量依存的に proCASP8 に対して結合性を示したのに対し、他の抗原蛋白質には結合性は確認できなかった。従って、本検討で単離・同定したクローン NC-1 は proCASP8 特異的なモノクローナル抗体であることが示唆された。

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。昨年度までに構築したナイーブファージ抗体ライブラリを用いて、最適条件下でパンニングを行うことで、モデル抗原 proCASP8 に結合するファージクローンを単離・同定することに成功した。以上の結果より、本研究で構築したライブラリは、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。今後は、ファージ表面提示法に基づく機能性人工蛋白質の創出基盤の最適化を通じて、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. Imai S, Nagano K, Yoshida Y, Okamura T, Yamashita T, Abe Y, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Kamada H, Mukai Y, Nakagawa S, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Development of a novel antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins., *Biomaterials*, 32(1):162-169, 2011.

G-2 学会発表

1. Abe Y, Nomura T., Inoue M., Arita S., Furuya T., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S., Anti-inflammatory effects of a novel TNFR1-selective antagonistic TNF mutant in experimental autoimmune encephalomyelitis mice., Joint Meeting of the International Cytokine Society (ICS) and the International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR), Chicago (USA), 3-7 October, 2010. (ISICR Milstein Travel Award 受賞)
2. 阿部康弘, 井上雅己, 野村鉄也, 有田修平, 古屋剛, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央:レセプター特異性に優れた機能性人工蛋白質創

出システムの開発., 第 26 回日本 DDS 学会学術集
会, 大阪(大阪), 2010 年 6 月.

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

古屋 剛

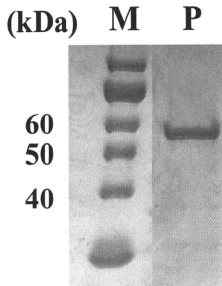


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified proCASP8 his-tag.
 SDS-PAGE analysis was performed under reducing condition.
 Lane M; molecular weight standard,
 Lane P; purified protein (59 kDa).

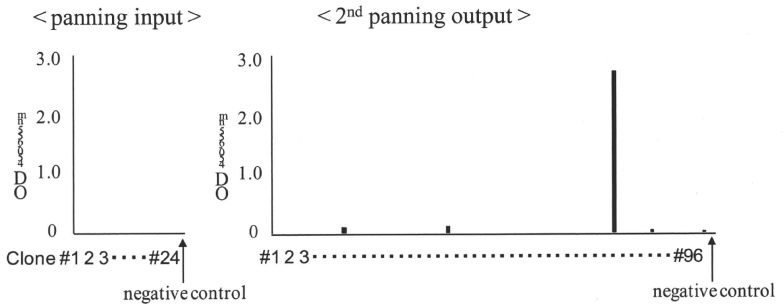


Fig. 2 Isolation of an antibody to proCASP8 from non-immune libraries by panning.
 After panning against proCASP8, the binding properties of selected clones were measured by ELISA. As negative control, phage displaying anti-KDR scFv was used.

Table 1 Amino acid sequence of anti-proCASP8 scFv (NC-1) antibody from non-immune libraries.

VL

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
LDVMTDQGRKEMSTVSGRVSVC	KASQNVGINVA	WYQKPGQSPKALTY	SASVRYG	GVPRFTGSGGTDFTLTISNVSDELADYFC	QQYSSYPLT	FGAGTKLELAR

VH

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
EVQLQSGAEIARPGASVKLSCKASGYTF	TSYIMH	WYKORPGGLEWIG	YINPSSGYTKYNQKFD	KATLTADRSSSTAYMQLSLLTYEDSAVYVYLU	RLDY	WGQGTLTIVSS

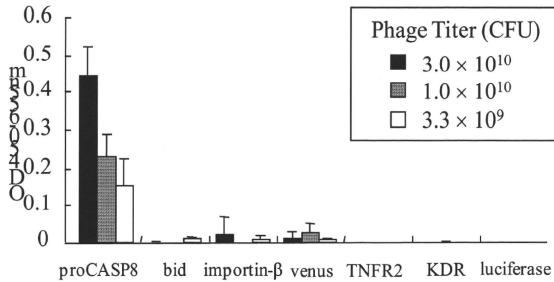


Fig. 3 Binding specificity of anti-proCASP8 scFv (NC-1) antibody. Human proCASP8 his-tag, human bid, importin-β his-tag, venus, human TNFR2 Fc chimera, human KDR Fc chimera, luciferase (50 ng each) were immobilized on the wells of Maxisorb 96 well plate and then the purified anti-CASP8 scFv (NC-1) antibody was reacted in the wells. Binding properties of NC-1 antibody was measured by ELISA.

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

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
Suzuki H Kakutani H Kondoh M Watari A Yagi K	The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin	Pharmazie	10	766-769	2010
Itoh A Isoda K Kondoh M Kawase M Watari A Kobayashi M Tamesada M Yagi K	Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl ₄ -induced liver injury	Biol Pharm Bull	33	983-987	2010
Kakutani H Kondoh M Fukasaka M Suzuki H Hamakubo T Yagi K	Mucosal vaccination using claudin-4 targeting	Biomaterials	31	5463-5471	2010
Yagi K Kawase M Isoda K Kondoh M	Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function	YAKUGAKU ZASSHI,	130	537-543	2010
Kakutani H Kondoh M Saeki R Fujii M Watanabe Y Mizuguchi H Yagi K	Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin	Eur J Pharm Biopharm	75	213-217	2010
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

Ushitora M Sakurai F Yamaguchi T Nakamura S Kondoh M Yagi K Kawabata K Mizuguchi H	Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vector	J Control Rel	142	4331-4337	2010
Saeki R Kondoh M Uchida H Yagi K	Potency of claudin-targeting as antitumor therapy	Mol Cell Pharmacol	2	47-51	2010
近藤昌夫	生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究	薬剤学	70	309-313	2010
Saeki R Kondoh M Kakutani H Matsuhisa K Takahashi A Suzuki H Kakamu Y Watari A Yagi K	A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis	J Pharmacol Exp Ther	334	576-582	2010
Kakutani H Takahashi A Kondoh M Saito Y Yamaura T Sakihama T Hamakubo T Yagi K	A novel screening system for claudin binder using baculoviral display	PLoS ONE	6	e16611	2011
Takahashi A Kondoh M Suzuki H Kodaka M Yagi K	Claudin as a target for drug development	Curr Med Chem	18	1861-1865	2011
Suzuki H Kondoh M Yoshida T Takahashi A Matsuhisa K Kakamu Y Kodaka M Isoda K Yagi K	A toxicological evaluation of a claudin modulator, C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, in mice	Pharmazie			accepted
Takahashi A Kondoh M Kodaka M Yagi K	Peptides as tight junction modulators	Curr Pharm Design			accepted

Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.	Suppression of Melanoma Growth and Metastasis by DNA Vaccination Using an Ultrasound-Responsive and Mannose-Modified Gene Carrier	Mol Pharm		In press	
Negishi Y, Matsuo K, Endo-Takahashi Y, Suzuki K, Matsuki Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y.	Delivery of an Angiogenic Gene into Ischemic Muscle by Novel Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure	Pharm Res		In press	
Hagisawa K, Nishioka T, Suzuki R, Takizawa T, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Ohsuzu F, Kikuchi M.	Enhancement of ultrasonic thrombus imaging using novel liposomal bubbles targeting activated platelet glycoprotein IIb/IIIa complex-in vitro and in vivo study	Int J Cardiol		In press	
Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Maruyama K	Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles	J Control Release.	149	36-41	2011
Ikeda-Dantsuji Y, Feril LB Jr, Tachibana K, Ogawa K, Endo H, Harada Y, Suzuki R, Maruyama K.	Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against Chlamydia trachomatis-infected human epithelial cells in vitro.	Ultrason Sonochem	18	425-430	2011
鈴木 亮、小田雄介宇都口直樹、丸山一雄	Development of ultrasonic cancer therapy using ultrasound sensitive liposome.	薬学雑誌	130	1665-1670	2010
根岸洋一、高橋葉子 鈴木 亮、丸山一雄、 新楨幸彦	Development of gene delivery system into skeletal muscles by bubble liposomes and ultrasound	薬学雑誌	130	1489-1496	2010
Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M	Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy	Biomaterials	31	7813-7826	2010

Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, Koyanagi S, Ohdo S.	Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice	Cancer Res.	70	6238-6246	2010
山下琢也、宇都口直樹、鈴木 亮、長野一也、角田慎一、堤康央、丸山一雄	Development of anti-tumor blood vessel antibodies by phage display method.	薬学雑誌.	130	479-485	2010
Imai S, Nagano K, Yoshida Y, Okamura T, Yamashita T, Abe Y, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Kamada H, Mukai Y, Nakagawa S, Tsutsumi Y, Tsunoda S.	Development of a novel antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins.	Biomaterials	32(1)	162-169	2011

Laboratory of Bio-Functional Molecular Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin

H. SUZUKI*, H. KAKUTANI*, M. KONDOH, A. WATARI, K. YAGI

Received April 3, 2010, accepted April 25, 2010

Drs. Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi, Laboratory of Bio-Functional Molecular Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan
masuo@phs.osaka-u.ac.jp and yagi@phs.osaka-u.ac.jp

*H.S. and H.K. equally contributed to this study.

Pharmazie 65: 766–769 (2010)

doi: 10.1691/ph.2010.0097

The C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) is a claudin-4 binder. Very recently, we found that nasal immunization of mice with C-CPE-fused antigen activated antigen-specific humoral and mucosal immune responses and that the deletion of the claudin-4-binding domain attenuated the immune responses. C-CPE-fusion strategy may be useful for mucosal vaccination. C-CPE is a fragment of enterotoxin, and the safety of C-CPE-fused protein is very important for its future application. In the present study, we investigated whether C-CPE-fused antigen induces immune responses without mucosal injury by using ovalbumin (OVA) as a model antigen. Immunohistochemical analysis showed that claudin-4 was expressed in epithelial cell sheets bordering the nasal cavity. Nasal immunization with C-CPE-fused OVA dose-dependently elevated the OVA-specific serum IgG titer, which was 1000-fold greater than the titer achieved by immunization with OVA or a mixture of OVA and C-CPE at 5 µg of OVA. Nasal immunization with C-CPE-fused OVA (5 µg of OVA) activated Th1 and Th2 responses. Histological analysis showed no mucosal injury in the nasal cavity or nasal passage. C-CPE-fused OVA exhibited mucosal vaccination without mucosal injury. These findings indicate that claudin-4-targeting using C-CPE can be a potent strategy for mucosal vaccination.

1. Introduction

Vaccination is the most potent therapeutic method to overcome infectious diseases. Vaccines are classified as parenteral or mucosal. Parenteral immunizations activate systemic immune responses, while mucosal immunizations activate both systemic and mucosal immune responses. Parenteral vaccination can activate immune responses against the invaded pathogenic microorganisms and infected cells; in contrast, mucosal vaccination prevents entry of the pathogenic microorganisms and activates immune responses against the infected cells (Kunisawa et al. 2008; Neutra and Kozlowski 2006). Although mucosal immunization is promising, an immune response is not activated by the mucosal administration of antigen alone. Efficient antigen delivery into mucosal associated lymphoid tissue (MALT) is the key technology needed for the development of mucosal vaccines (Kunisawa et al. 2008; Neutra and Kozlowski 2006). The mucosa is covered by epithelial cell sheets, which separate the outside of the body from the inside of the body. Tight junctions (TJs) are located between adjacent epithelial cells and seal intercellular junctions, preventing the free movement of solutes across epithelial cell sheets (Schneeberger and Lynch 1992). Claudin, a tetra-transmembrane protein family consisting of 24 members, plays a pivotal role in the mucosal TJ barrier (Furuse and Tsukita 2006; Tsukita et al. 2001). In 2003, Tamagawa et al. reported that claudin-4 is expressed in the epithelium of intestinal MALT. These findings indicate that claudin-4-targeting may be a novel strategy for the development of mucosal vaccines; however, the claudin-4-targeting vaccine had never been devel-

oped because of a delay in the preparation of claudin-4 binder. *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) causes food poisoning in humans (McClane and Chakrabarti 2004). The CPE receptor is claudin-4, and a 14-kDa polypeptide, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE), is a claudin-4 binder (Katahira et al. 1997; Sonoda et al. 1999). We previously found that C-CPE enhanced jejunal, nasal and pulmonary absorption of drugs through its interaction with claudin-4 (Kondoh et al. 2005; Uchida et al. 2010). C-CPE is used as a claudin-4 ligand molecule for proteins (Ebihara et al. 2006; Saeki et al. 2009). These findings strongly indicate that C-CPE may be a potent ligand for MALT. Very recently, we have found that intranasal administration of C-CPE-fused ovalbumin (OVA) increased OVA-specific immune-responses in serum, nasal, vaginal and intestinal mucosa (Kakutani et al. 2010). However, C-CPE is a fragment of enterotoxin, and the safety of C-CPE-fused vaccine has never been investigated. In the present study, we investigated whether nasal immunization with C-CPE-fused OVA activated immune responses without mucosal injury, and we found that mucosal vaccine using C-CPE activated Th1 and Th2 immune responses without nasal mucosa injury.

2. Investigations and results

C-CPE is a binder of claudin-4, and we recently found that claudin-4-targeting using C-CPE might be a potent strategy for mucosal vaccine (Kakutani et al. 2010). C-CPE is a fragment

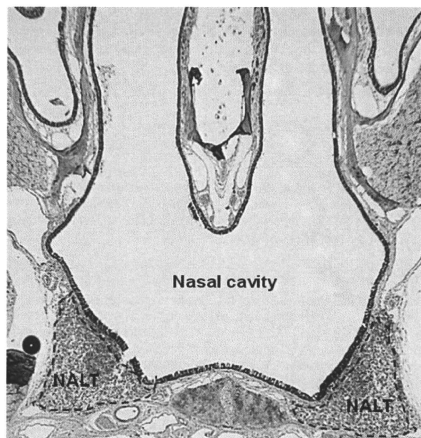


Fig. 1: Immunohistochemical analysis of claudin-4 in NALT. Specimens were cryosectioned ($4\ \mu\text{m}$) and stained with anti-claudin-4 Ab, followed by horseradish peroxidase-labeled secondary Ab. The immunoreactive regions were stained with a commercially available staining kit. The regions surrounded by dotted lines are NALT.

of CPE (Katahira et al. 1997). CPE is a 35-kDa single polypeptide toxin produced by *Clostridium perfringens*. Experimental and epidemiologic evidence indicates that CPE causes foodborne disease and non-foodborne diarrheal illnesses (McClane 2001; McClane et al. 2000). CPE forms a CPE-containing complex in the plasma membrane that creates massive alterations in plasma membrane permeability that lead to cell death and histological damage to the intestine (McClane and Chakrabarti 2004). The safety of C-CPE is a critical issue for pharmaceutical applications of C-CPE. First, we investigated the expression of claudin-4 in nasal mucosa. Immunohistochemical analysis reveals that claudin-4 is expressed in the epithelium bordering the nasal cavity (Fig. 1). The epithelium that covers nasal MALT, nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT), is rich in claudin-4. These data correspond to our previous data on the expression of claudin-4 mRNA and protein in NALT (Kakutani et al. 2010).

To investigate the dose dependency of OVA-C-CPE in mucosal vaccination, mice were nasally immunized with OVA-C-CPE at 0.5, 1.0 or 5.0 μg of OVA. As shown in Fig. 2A, OVA-specific serum IgG levels were elevated in a dose-dependent manner and reached a level that was 1000-fold greater than the OVA values at 5 μg of OVA, which is the maximal dose of OVA-C-CPE due to its solubility. A mixture of OVA and C-CPE did not increase OVA-specific serum IgG levels (Fig. 2B), and OVA-C-CPE (5.0 μg of OVA) immunization activated IgG2a (a Th1 immune response) and IgG1 (a Th2 immune response) responses (Fig. 2C). We performed a histopathological analysis of mice immunized with OVA-C-CPE at 5.0 μg of OVA. Hematoxylin and eosin (HE) staining revealed no apparent mucosal injury in the nasal squamous cavity, the respiratory cavity, and the nasal passage (Fig. 3A). There was also no inflammatory cell infiltration in the nasal mucosa (Fig. 3B). These findings indicate that nasal immunization with OVA-C-CPE activated immune responses without histological injury in nasal mucosa.

3. Discussion

Only a mucosal vaccine can prevent the entry of pathological viruses into the mucosal membrane; however, injectable vaccines are currently used in both developing and industrialized countries. Very recently, we found that claudin-4-targeting using C-CPE can be a novel strategy for mucosal vaccination (Kakutani et al. 2010). In the present study, we showed that nasal immunization with C-CPE-fused antigen activated Th1 and Th2 immune responses without histological injury in nasal mucosa. The efficient delivery of C-CPE-fused antigen to immunocompetent cells is critical for mucosal vaccination. A mixture of OVA and C-CPE did not activate immune responses, and therefore OVA may be delivered to the immunocompetent cells as the C-CPE-fused protein. The uptake of nasally administered antigens is achieved through a unique set of antigen-sampling cells, the M cells, located in follicle-associated epithelium. After the uptake of antigens by M cells, the antigens are immediately processed and presented to the underlying dendritic cells (Neutra and Kozlowski 2006). A recent report indicates that claudin-4 is expressed in M cells (Rajapaksa et al. 2010). Claudin-4 contains sorting signal sequences to endosomes, an ALGVLL motif at amino acids 92 to 97 and a YVGW motif at amino acids 165 to 168 (Ivanov et al. 2004). These findings suggest that OVA-C-CPE may be taken up by clathrin-mediated endocytosis in

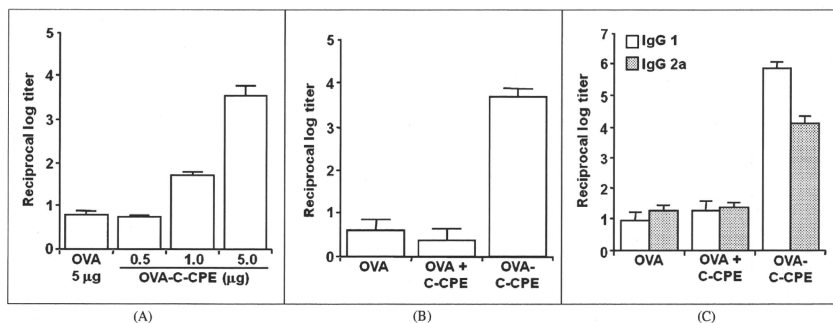


Fig. 2: Production of OVA-specific serum IgG by nasal immunization with OVA-C-CPE. Mice were nasally immunized with OVA (5 μg), a mixture of OVA (5 μg) with C-CPE or OVA-C-CPE at the indicated dose of OVA once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the serum IgG level was determined by ELISA (A). Mice were nasally immunized with OVA, a mixture of OVA with C-CPE or OVA-C-CPE at 5 μg of OVA once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, the serum IgG (B), IgG1 and IgG2a (C) levels were determined by ELISA. Data are means \pm SEM ($n=4$).

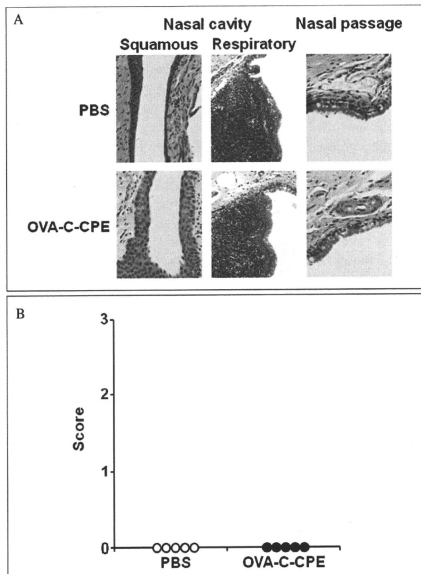


Fig. 3: A lack of histological injury caused by OVA-C-CPE. Mice were nasally immunized with PBS or OVA-C-CPE (5 μ g OVA) once a week for 3 weeks. Seven days after the last immunization, NALT was collected and fixed with formalin. Thin tissue-sections were stained with hematoxylin (A), and inflammation was scored according to the severity of the inflammatory cell infiltration (B): 0, none; 1, weak; 2, moderate; 3, severe. Scoring was performed blindly to avoid bias.

M cells. The underlying mechanism for immunopotentiality by OVA-C-CPE must be clarified.

Nasal mucosa is adjacent to the central nervous system, and intranasal drug delivery to the brain has been developed (Dhuria et al. 2010). An influx of a vaccine protein into the central nervous system can be a risk factor in its clinical application. C-CPE is a modulator of the epithelial barrier. Treatment of nasal mucosa with C-CPE increased the nasal absorption of a peptide drug. OVA-C-CPE also modulated the epithelial barrier *in vitro* (data not shown). Claudin-deficient mice showed a size-dependent leak of solutes smaller than 1,000 Da in the epithelium and endothelium (Furuse et al. 2002; Nitta et al. 2003). C-CPE enhanced the mucosal absorption of dextran with a molecular mass of ~20 kDa (Kondoh et al. 2005). Because OVA-C-CPE has a molecular mass of 65 kDa, and the infiltration of inflammatory lymphocytes was not observed in nasal mucosa (Fig. 3B), OVA-C-CPE might not cause an influx of solutes across the nasal epithelium. The claudin family comprises at least 24 members. Interestingly, the barrier-function and expression profiles of claudin family members differ among tissues. Claudin is believed to form homophilic and heterophilic adhesions in TJ strands, and various combinations of the 24 family members are thought to create diversity in the structure and functions of TJ barriers (Furuse and Tsukita 2006; Morita et al. 1999; Tsukita et al. 2001). Targeting the type of claudin specifically expressed in NALT may reduce the risk of delivering solutes to the central nervous system.

In summary, we showed that nasal immunization with C-CPE-fused antigen activated Th1 and Th2 immune responses without

mucosal injury. This is the first report to indicate the safety of a claudin-4-targeting mucosal vaccine using C-CPE. Future improvement of the claudin specificity may lead to clinical applications of this type of vaccine.

4. Experimental

4.1. Animals

Female BALB/c mice were purchased from SLC, Inc. (Shizuoka, Japan). The mice were housed at 23 \pm 1.5 $^{\circ}$ C with a 12-h light/dark cycle and had free access to standard rodent chow and water. The protocol of this study was approved by the Animal Care and Use Committee for Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University.

4.2. Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical staining for claudin-4 was performed with an autostainer (Dako, Glostrup, Denmark). Slide-mounted, fixed cryosections (4- μ m thick) of nasal MALT were incubated in Dako target retrieval solution (pH 9) at 125 $^{\circ}$ C for 30 min and then 90 $^{\circ}$ C for 10 min. The slides were blocked with peroxidase-blocking reagent (Dako) for 5 min and then with 10% bovine serum albumin for 30 min. The slides were further incubated with anti-claudin-4 antibody followed by horseradish peroxidase-labeled secondary antibody. The immunoreactive proteins were stained with DAB substrate (Dako). The slides were also stained with hematoxylin solution. Tissue sections were observed under a microscope.

4.3. Preparation of C-CPE-fused OVA

C-CPE-fused OVA (OVA-C-CPE) was prepared as described previously (Kakutani et al. 2010). Briefly, the plasmid pET-OVA-C-CPE was transduced into *Escherichia coli* BL21 (DE3), and the production of OVA-C-CPE was stimulated with isopropyl-D-thiogalactopyranoside. The harvested cells were lysed in buffer A (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 400 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM 2-mercaptoethanol, and 10% glycerol). The lysates were applied to HiTrapTM Chelating HP (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK), and OVA-C-CPEs were eluted with buffer A containing 100–400 mM imidazole. The buffer was exchanged with phosphate-buffered saline (PBS) by using a PD-10 column (GE Healthcare UK Ltd.), and the purified protein was stored at -80 $^{\circ}$ C before use. Purification of the OVA-C-CPEs was confirmed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, followed by staining with Coomassie Brilliant Blue. Protein was quantified by using a BCA protein assay kit (Pierce Chemical, Rockford, IL) with BSA as a standard.

4.4. Nasal immunization and sample collection

Mice were nasally immunized once a week for 3 weeks at the indicated dose of OVA. For instance, a dose of 5 μ g OVA is equal to a mixture of OVA (5 μ g) and C-CPE (1.89 μ g) or OVA-C-CPE (6.89 μ g). Plasma was collected 7 days after the last nasal immunization.

4.5. OVA-specific IgG production

The titers of OVA-specific antibody in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, an immunoplate was coated with OVA (100 μ g/well in a 96-well plate). Ten-fold serial dilutions of these samples were added to the immunoplate followed by the addition of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, IgG1 or IgG2a (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX). The OVA-specific antibodies were detected by using a TMB peroxidase substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). End-point titers were expressed as the reciprocal log of the last dilution ratio, which was 0.1 greater than the control values obtained for the serum of naïve mice at an absorbance of 450 nm.

4.6. Histological analysis of nasal mucosa in mice immunized with OVA-C-CPE

Mice from either the non-immunized group or the immunized group (6.89 μ g of OVA-C-CPE) were sacrificed 7 days after immunization for histopathological analysis. Tissues were fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (4 μ m) were prepared for hematoxylin and eosin staining. Histopathological examinations were performed at the Applied Medical Research Laboratory (Osaka, Japan). Inflammation was scored according to the severity of the inflammatory cell infiltration: 0, none; 1, weak; 2, moderate; and 3, severe. Scoring was performed blindly to avoid bias.

Acknowledgements: We thank Drs S. Tsunoda and K. Nagano (National Institute of Biomedical Innovation), Y. Horiguchi and S. Nakagawa (Osaka University) for their instructing immunohistochemical analysis, providing C-CPE cDNA and OVA cDNA, respectively. We also thank the all members of our laboratory for their useful comments and discussion. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (21689006), by a Health and Labor Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, by Takeda Science Foundation, by a grant from Kansai Biomedical Cluster project in Saito, which is promoted by the Knowledge Cluster Initiative of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, by a Research Grant for Promoting Technological Seeds from Japan Science and Technology Agency and the Japan Health Sciences Foundation. H.K. is supported by Research Fellowships of the Japan Society for the Promotion of Science for Young Scientists.

References

- Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH (2010) Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci* 99: 1654–1673.
- Ebihara C, Kondoh M, Hasuike N, Harada M, Mizuguchi H, Horiguchi Y, Fujii M, Watanabe Y (2006) Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 255–260.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156: 1099–1111.
- Furuse M, Tsukita S (2006) Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 16: 181–188.
- Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA (2004) Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Biol Cell* 15: 176–188.
- Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T, Yagi K (2010) Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials* 20: 5463–5471.
- Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N (1997) Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Cell Biol* 136: 1239–1247.
- Kondoh M, Masuyama A, Takahashi A, Asano N, Mizuguchi H, Koizumi N, Fujii M, Hayakawa T, Horiguchi Y, Watanabe Y (2005) A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol Pharmacol* 67: 749–756.
- Kunisawa J, Nochi T, Kiyono H (2008) Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. *Trends Immunol* 29: 505–513.
- McClane BA (2001) *Clostridium perfringens*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editors. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, DC: ASM Press: 352–372.
- McClane BA, Chakrabarti G (2004) New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Anaerobe* 10: 107–114.
- McClane BA, Lyster DM, Moncrief JS, Wilkins TD (2000) Enterotoxic clostridia: *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium difficile*. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JJ, editors. *Gram-positive pathogens*. Washington, DC: ASM Press: 551–562.
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 511–516.
- Neutra MR, Kozlovsk PA (2006) Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 6: 148–158.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161: 653–660.
- Rajapaksa TE, Stover-Hamer M, Fernandez X, Eckelhoefer HA, Lo DD (2010) Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. *J Control Release* 142: 196–205.
- Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y, Yagi K (2009) A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* 76: 918–926.
- Scheneberger EE, Lynch RD (1992) Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 262: L647–L661.
- Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S (1999) *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 147: 195–204.
- Tamagawa H, Takahashi I, Furuse M, Yoshitake-Kitano Y, Tsukita S, Ito T, Matsuda H, Kiyono H (2003) Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches: preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region. *Lab Invest* 83: 1045–1053.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 285–293.
- Uchida H, Kondoh M, Hanada T, Takahashi A, Hamakubo T, Yagi K (2010) A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem Pharmacol* 79: 1437–1444.