

に初めて成功した。

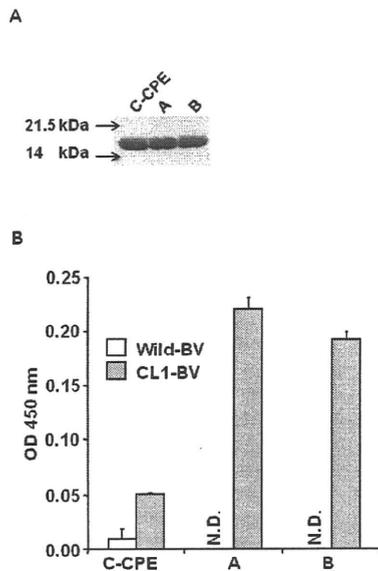


Figure 4 Interaction of C-CPE mutants with CL1-BV. A) Purification of A and B. C-CPE mutants were expressed in *E. coli* and isolated by nickel-affinity chromatography. The purification of proteins was confirmed by SDS-PAGE. The putative molecular mass of C-CPEs is approximately 15 kDa. B) Interaction of the C-CPE mutants with CL1. C-CPE mutants (2.0  $\mu$ 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).

本分担研究では、膜蛋白質を機能及び立体構造を保持した状態でウイルス表面に提示することが近年報告された BV 膜蛋白質発現系を利用して CL binder スクリーニング系構築を試みた。CL4 binder である C-CPE と CL4-BV の相互作用を ELISA 法により解析したところ、C-CPE は WT-BV、CL1-BV には結合せず、濃度依存的に、特異的に CL4-BV に結合したことから、BV 上で GL は少なくとも C-CPE と結合性を有する立体構造を保持した状態で発現していることが示唆された。そこで次に、CL4 binder (C-CPE) を提示した C-CPE ファージと CL4-BV との相互作用を解析したところ、negative control ファージでは CL4-BV に結合せず、C-CPE ファージは添加濃度依存的な結合性を示していた。このとき、C-CPE ファージは WT-BV に結合していなかった。以上結果から、CL-BV が CL binder スクリーニング系として応用可能である可能性が示唆された。

そこで研究終盤において、C-CPE の機能ドメインをランダムなアミノ酸に置換した C-CPE 変異体ライブラリを用いて CL1 binder のスクリーニングを行い、CL1 に結合性を示す C-CPE 変異体の取得

#### D-5. C-CPEm19 の HCV 感染阻害活性

昨年度の検討で、C-CPE 構造変異体ライブラリの中から、CL1 に対して結合性を示す、C-CPE 変異体 C-CPEm19 を取得している。そこでまず、HCVpv の Huh7 細胞に対する感染を指標に、本分子の HCV 感染阻害活性を解析した。文献的に感染阻害効果が報告されている抗 CD81 抗体処理では、negative control の VSVpv の感染は全く阻害されていないのに対して、HCVpv の感染は濃度依存的に顕著な感染阻害が観察された (Fig. 5A)。一方、C-CPEm19 処理では 10  $\mu$ g/ml 処理で弱冠の感染阻害効果が認められていたものの、濃度依存性は認められなかった (Fig. 5B)。

CL1 抗体は、HCV 感染阻害分子として期待されているが、抗原性が低い上に CL1 蛋白質精製系が確立されておらず、CL1 抗体の作製は著しく立ち遅れている。そこで、CL 欠損マウスおよび BV を用いた膜蛋白質発現系を用いて、CL1 抗体作製系の構築を試みた。

#### C-6. CL-BV の免疫

CL-BV の免疫条件を種々検討したところ、CL 欠損マウスに CL-BV を免疫することで、血清中の抗 CL 抗体の抗体価が上昇することを見出した (Fig. 2)。CL 欠損マウスに CL-BV 1mg をアジュバント pertussis toxin B と共に皮下投与することで免疫した。免疫マウスの血清を用いた western blot により、CL-1 抗体の産生を確認した (Fig. 6)。当該マウスから脾臓を回収し、分担者角田の scFv ライブラリ作製に供した。

#### C-7. CL binder のスクリーニング

分担者角田が作製した scFv ライブラリを CL-1-BV 固相化したイムノチューブによってパンニングしたところ、3 回のスクリーニングによって若干の ratio の上昇が認められた (Fig. 7)。そこで、ファージクローンをモノクローン化し、CL-1 結合性を解析したところ、CL-1 結合性ファージクローンが

複数認められた (Fig. 8)。そこで次に、CL-1-BV および CL-3-BV を用いた 2nd スクリーニングを行い、CL-1 特異的に結合性を示す、ファージクローンを 4 つ同定した (Fig. 9)。シーケンス解析したところ、このうち 3 は同じアミノ酸配列を有していた (Table 1)。

#### C-8. scFv 蛋白質の精製

そこで、CL1 結合性 scFv のリコンビナント蛋白質を作製するために、scFv 遺伝子断片を pET-16b に挿入し、ヒスタグ融合 scFv 蛋白質発現ベクターを構築し、大腸菌発現条件、精製条件を設定し、CL-1 binder 候補分子、scFv47、scFv53 の作製に成功した。尚、これらの蛋白質は、代表者磯田が実施する CL1 結合性解析に供した。

#### E. 結論

本研究は、独自の CL binder 研究を有効活用し、近年新たに HCV 受容体として同定された CL-1 を標的とした初めての HCV 感染阻害薬を創出することを目的としている。

平成 21 年度は、① CL1 binder スクリーニング系の構築を行い、② 本スクリーニング系を用いて CL1 binder の取得を試み、以下の成果を得た。

##### ① CL1 binder のスクリーニング系の構築

C-CPE 構造変異体ライブラリの中から CL1 binder をスクリーニングするために、CL1、2、3、4、5 発現細胞、CL をウイルス膜上に提示した出芽バキュロウイルス (BV) を作製した。C-CPE は CL4 発現細胞および CL4-BV に特異的に結合すること、CL4-BV により C-CPE 提示ファージが特異的に濃縮することを見出し、CL-BV を利用した CL binder スクリーニング系を構築した。尚、CL 発現細胞を用いたスクリーニングでは非特異的な結合が多く CL binder 探索系としての利用は困難であった。

##### ② CL1 binder の取得

CL1-BV をパンニングソースとして用いて CL1

binder のスクリーニングを試みたところ、CL1 結合性を示す C-CPE 誘導体提示ファージが単離された。本ファージのシーケンスデータを基に C-CPE 誘導体蛋白質を作製し、CL1 結合性を解析したところ、本 C-CPE 変異体は CL1 結合性を有していた。

平成 22 年度は、C-CPEm19 の HCV 感染阻害性を解析したところ、感染阻害傾向が認められたもののその活性は弱いものであった。

2007 年の Nature に明記されているように、CL1 は抗原性が低い上に蛋白質精製法が確立されておらず、細胞外領域に対する抗体の作製は立ち遅れている。そこで、CL 欠損マウスおよび膜蛋白質発現系として注目されている BV システムを用いた CL1 抗体創製に向けたパイロットスタディに着手した。種々免疫条件を変えることで、CL 発現 BV を CL 欠損マウスに免疫することで、CL に対する抗体価が上昇すること、本免疫マウスの脾臓を用いて作製した scFv ライブラリ中に CL1 binder が存在していることを見出した (詳細は、代表者磯田、分担者角田の報告内容を参照)。

今後は、本 scFv ライブラリ創製法をシステムアップすることで、druggable CL1 binder の創製を進めていく予定である。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### G-1 論文発表

1. Matsuhisa K, Kondoh M, Takahashi A and Yagi K (2009) Tight junction modulator and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 6(5):509-515.
2. 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.
3. 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.
  4. Suzuki H, Kakutani H, Kondoh M, Yagi K (2010) The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Pharmazie*, 65, 766-769.
  5. Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K (2010) Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl<sub>4</sub>-Induced Liver Injury. *Biol Pharm Bull*, 33, 983-987.
  6. Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Matsuhisa K, Takahashi A, Kakamu Y, Watari A, Yagi K (2010) A claudin-targeting molecule as a inhibitor of tumor metastasis. *J Pharmacol Exp Ther*, 334, 576-582.
  7. Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T, Yagi K (2010) Mucosal Vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials*, 31, 5463- 5471.
  8. Yagi K, Kawase M, Isoda K, Kondoh M (2010) Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function. *YAKUGAKU ZASSHI*, 130, 537-543.
  9. Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H, Yagi K (2010) Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm*, 75, 213-217.
  10. 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.
  11. Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H (2010) Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vector. *J Control Rel*, 142, 4331-4337.
  12. Saeki R, Kondoh M, Uchida H, Yagi K (2010) Potency of Claudin-targeting as Antitumor Therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 2, 47-51.
  13. Kondoh M, Saeki R, Kakutani H, Hamakubo T, Watari A, and Yagi K (2010) Preparation of a claudin-4-targeted anti-tumor molecule. *FASEB J*, 24, 964.3.
  14. Suzuki H, Kondoh M, Kakutani H, Hamakubo T, Watari A, and Yagi, K (2010) Development of a novel nasal vaccine using a claudin-4 binder. *FASEB J*, 24, 773.4.
  15. 近藤 昌夫 (2010) 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.
  16. Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Saito Y, Yamaura T, Sakihama T, Hamakubo T, Yagi K (2011) A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS ONE*, 6, e16611.
  17. Takahashi A, Kondoh M, Suzuki H, Kodaka M, Yagi K (2011) Claudin as a target for drug

development. *Curr Med Chem*, 18, 1861-1865.

18. Yoshida T, Kondoh M, Yagi K (2011) Promising targets for anti-hepatitis C virus agents. *Curr Med Chem*, 18, 1239-1244.
19. Suzuki H, Kondoh M, Yoshida T, Takahashi A, Matsuhisa K, Kakamu Y, Kodaka M, Isoda K, Yagi K (in press) A toxicological evaluation of a claudin modulator, C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, in mice. *Pharmazie*.
20. Takahashi A, Kondoh M, Kodaka M, Yagi K (in press) Peptides as tight junction modulators. *Curr Pharm Design*.
21. Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, Sakamoto N, Yagi K (in press) Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication. *Nucleic Acid Res*.
22. Suzuki T, Sasaki T, Yano K, Sakurai F, Kawabata K, Kondoh M, Yagi K, Mizuguchi H (in press) Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome. *Virus Res*.

## G-2 学会発表

1. 生体バリアを利用した薬物送達研究  
近藤昌夫(阪大院薬)  
日本薬剤学会第 25 年会、平成 21 年 5 月 21-23 日、静岡
2. 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
3. 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

4. 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
5. 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
6. A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator  
Koji Matsuhisa, Ryota Okude, Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi  
36<sup>rd</sup> annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 18-22, 2009, Copenhagen, Denmark.
7. Claudin as a target molecule for mucosal absorption of peptide drug  
Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Kiyohito Yagi, 49<sup>th</sup> annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA.
8. 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, 49<sup>th</sup> annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA
9. Preparation of a controllable RNA polymerase I-dependent expression vector

- Takeshi Yoshida, Manabu Ojima, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, 49<sup>th</sup> annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA
10. 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
  11. 出芽バキュロウィルスを用いた claudin binder スクリーニング系の構築  
松下 恭平<sup>1</sup>、角谷 秀樹<sup>1</sup>、高橋 梓<sup>1</sup>、山浦 利章<sup>1</sup>、浜窪 隆雄<sup>2</sup>、近藤 昌夫<sup>1</sup>、八木 清仁<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>阪大院薬、<sup>2</sup>東大先端研)、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山
  12. 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<sup>1</sup>、山浦 利章<sup>1</sup>、松下 恭平<sup>1</sup>、高橋 梓<sup>1</sup>、内田 博司<sup>2</sup>、花田 雄志<sup>2</sup>、松久 幸司<sup>1</sup>、渡利 彰浩<sup>1</sup>、近藤 昌夫<sup>1</sup>、八木 清仁<sup>1</sup>(<sup>1</sup>阪大院薬、<sup>2</sup>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
  13. 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
  14. 渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁: Claudin 発現の迅速かつ簡便なモニタリングシステムの開発 日本薬学会 第130年会 岡山 平成 22年3月
  15. 渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁;上皮細胞バリアに着目した食物アレルギーリスク評価 第37回日本トキシコロジー学会 平成22年6月 沖縄
  16. 渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁; Claudin 発現モニタリングシステムを用いた Tight junction 調節物質の検索 第131回日本薬学会 平成23年3月 静岡
  17. 松久幸司、佐伯理恵、角谷秀樹、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin-4 を標的とした癌ターゲティング法の開発 日本薬剤学会第25年会 平成22年5月 徳島
  18. 鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin-4 binder を利用した粘膜ワクチンの開発 日本薬剤学会第25年会 平成22年5月 徳島
  19. 各務洋平、内田博司、花田雄志、高橋梓、山浦利章、松久幸司、近藤昌夫、八木清仁; Claudin を利用したペプチド医薬品の非侵襲性<sup>21</sup>投与技術の開発 日本薬剤学会第25年会 平成22年5月 徳島
  20. 鈴木英彦、佐伯理恵、角谷秀樹、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin binder を利用した癌治療法の開発 第26回日本 DDS 学会 平成22年6月 大阪
  21. 松久幸司、内田博司、花田雄志、高橋梓、各務洋平、近藤昌夫、八木清仁; Claudin-4 modulator を利用したペプチド医薬品の粘膜吸収促進法の開発 第26回日本 DDS 学会学術集会 平成22年6月 大阪
  22. 高橋梓、齊藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Clostridium perfringens enterotoxin を利用した claudin-1 binder の創製 第26回日本 DDS 学会 平成22年6月 大阪
  23. 高橋梓、松久幸司、各務洋平、内田博司、花田雄志、近藤昌夫、八木清仁; Clostridium

- perfringens enterotoxin を利用した非侵襲性投与法の開発 第 57 回トキシシンポジウム 平成 22 年 7 月 滋賀
24. 高橋梓、松久幸司、各務洋平、近藤昌夫、八木清仁; Claudin を標的とした非侵襲性投与技術の開発 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会 平成 22 年 10 月 大阪
25. 各務洋平、内田博司、花田雄志、高橋梓、近藤昌夫、八木清仁; 高親和性 claudin binder の創製およびドラッグデリバリーシステムへの応用 BIA symposium 2010 平成 22 年 7 月 東京
26. 各務洋平、高橋梓、松下恭平、松久幸司、近藤昌夫、八木清仁; 新規 claudin modulator の創製およびドラッグデリバリーシステムへの応用 第 9 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2010 平成 22 年 10 月 京都
27. 松下恭平、高橋梓、齊藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発 第 9 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2010 平成 22 年 10 月 京都
28. Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A claudin modulator as a mucosal absorption-enhancer of a peptide drug 日本薬物動態学会第 25 回年会 平成 22 年 10 月 東京
29. 鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin-4 binder を標的とした新規粘膜ワクチンの創製 日本ワクチン学会第 14 年会 平成 22 年 12 月 東京
30. 松下恭平、高橋梓、齊藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発 第 83 回日本生化学会大会 平成 22 年 12 月 神戸
31. 小高美樹、高橋梓、山浦利章、松久幸司、松下恭平、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; ファージ抗体ライブラリを用いた新規 claudin binder スクリーニングシステムの構築 日本薬学会第 131 年会 平成 23 年 3 月 静岡
32. 各務洋平、松下恭平、高橋梓、松久幸司、齊藤郁美子、青山浩、宇野公之、近藤昌夫、八木清仁; 新規 claudin binder C-CPEm19 の機能ドメイン解析 日本薬学会第 131 年会 平成 23 年 3 月 静岡
33. 山根誠司、鈴木英彦、角谷秀樹、高橋梓、松久幸司、内田博司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; 新規 claudin binder の創製と粘膜ワクチンへの応用 日本薬学会第 131 年会 平成 23 年 3 月 静岡
34. 高橋梓、近藤昌夫、八木清仁; Claudin binder を利用した創薬基盤研究 日本薬学会第 131 年会 平成 23 年 3 月 静岡
35. 近藤昌夫、八木清仁; Claudin modulator を利用した粘膜吸収促進法の現状と課題; 日本薬学会第 131 年会 平成 23 年 3 月 静岡
36. Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *Experimental Biology* 2010, Apr 24-28, Anaheim, CA, USA.
37. Hidehiko Suzuki, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Development of a novel nasal

vaccine using a claudin-4 binder, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA.

38. Masuo Kondoh, Rie Saeki, Hideki Kakutani, Yasuhiro Mochizuki, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Preparation of a claudin-4-targeted anti-tumor molecule. Experimental Biology 2010, Apr 24-28, 2010, Anaheim, CA, USA.

39. Hiroshi Uchida, Masuo Kondoh, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of peptide. Experimental Biology 2010, Apr 24-28, 2010, Anaheim, CA, USA.

40. Hidehiko Suzuki, Rie Saeki, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A novel strategy for cancer-targeting using claudin-4 binder. 37th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 10-14, 2010, Portland, OR, USA.

41. Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a Mucosal Vaccine Using a Claudin-4 Binder. FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov 14-18, 2010, Louisiana, USA.

42. Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a non-invasive drug delivery system using a claudin modulator. FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov 14-18, 2010, Louisiana, USA.

43. Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Takeshi

Yoshida, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of mucosal vaccine using a claudin binder. 50th annual meeting of the American society for cell biology, Dec 11-15, Philadelphia, USA.

## 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

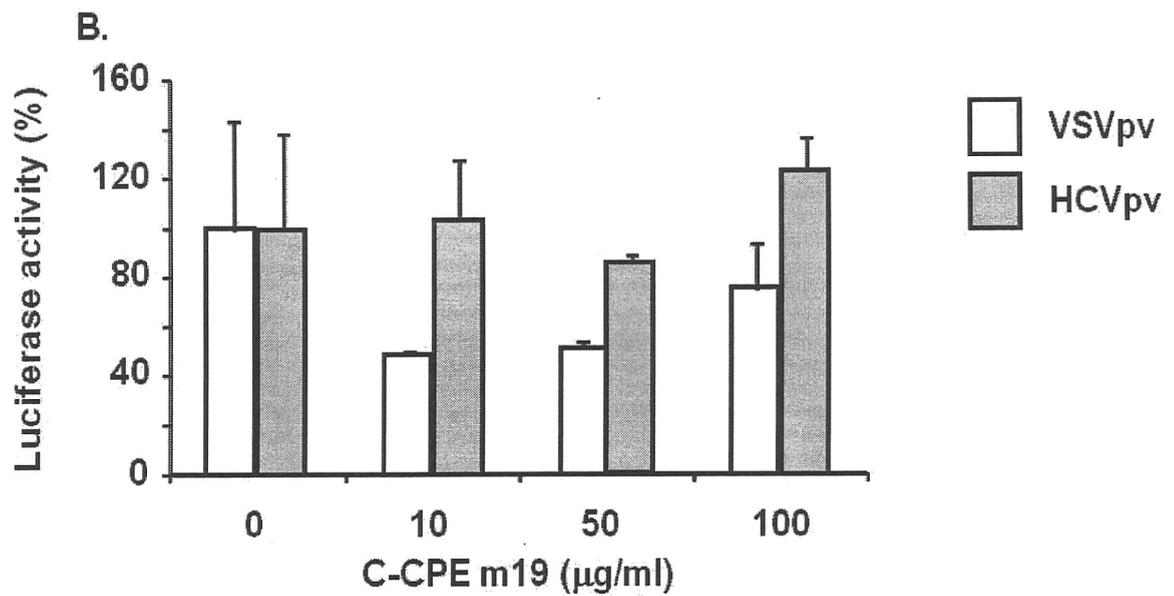
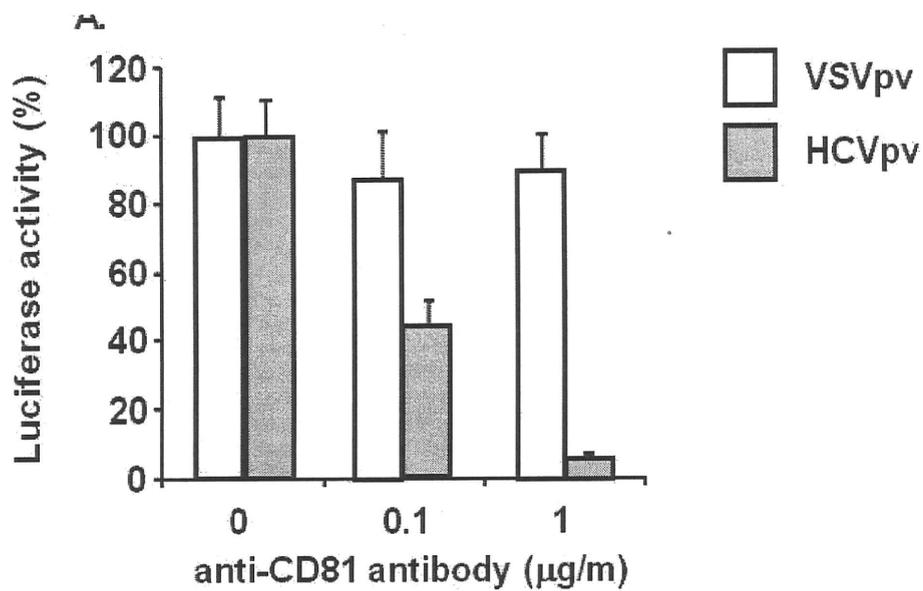
## I. 研究協力者

八木清仁(薬学研究科 教授)

渡利彰浩(薬学研究科 助教)

吉田孟史(薬学研究科 大学院生)

山本芙美(薬学研究科 大学院生)

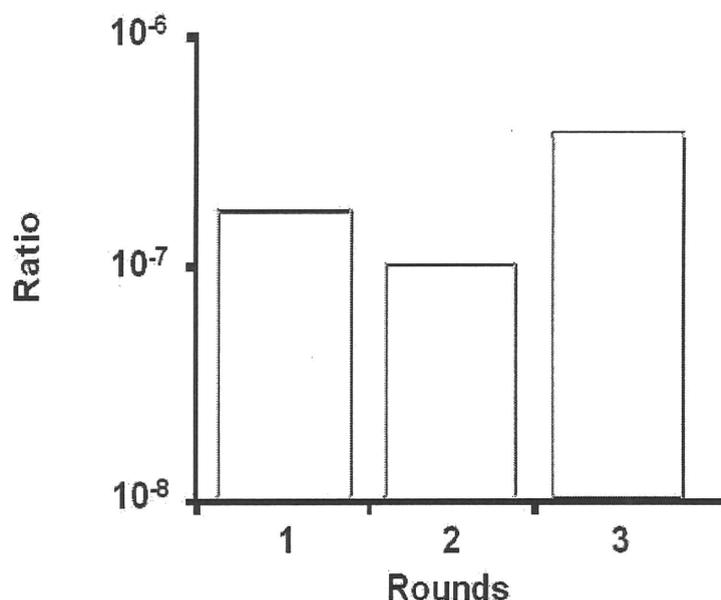


**Figure 5 Effect of C-CPEs on infection of Huh7 cells with HCVpv**

After 2 h of incubation of anti-CD81 antibody (A) or C-CPEm19 (B) at the indicated concentration, Huh7 cells were treated with the mixture for 24 h. Then, the cells were lysed, and the luciferase activity was measured. Data are means  $\pm$  SD (n=3).

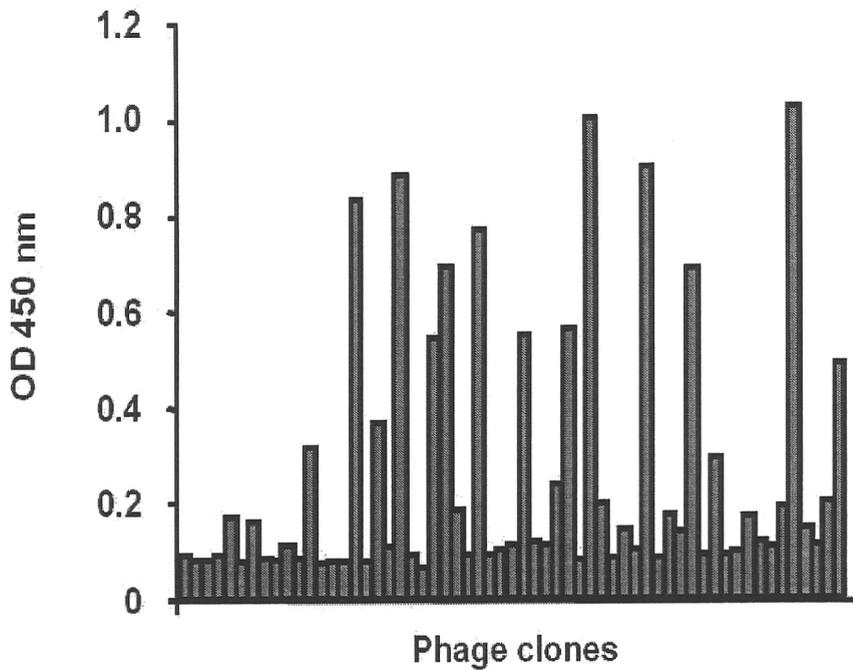


**Figure 6** Induction of anti-CL antibody in mice immunized with CL-BV. WT-BV or CL-BV (0.5 mg/lane) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis with the mouse serum.



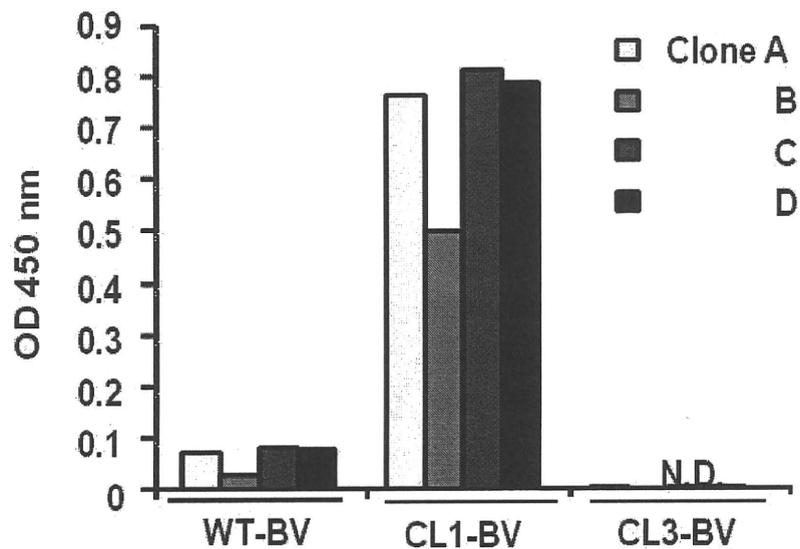
**Figure 7** Enrichment of phages with affinity to CL1-BV.

CL1-BV coated on immunotubes were incubated with the scFv phage library. The phages bound to CL1-BV were recovered (1<sup>st</sup> output phage). The CL1-BV-binding phages were subjected to two additional panning cycles, resulting in 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> output phage. The ratio of output phage to input phage titers was calculated



**Figure 8 Monoclonal analysis of scFv phages.**

CL1-BV-bound phage clones were isolated, and the interaction of the monoclonal phage with CL1-BV was examined by ELISA with HRP-anti-M13 Ab.



**Figure 9 Interaction of scFv-phage clones with CL-B**

Each phage clones were added onto BV-coated immunoplate, and BV-bound phages were detected by ELISA with HRP-anti-M13 mAb.

**Table 1 Amino acid sequence of CL-BV-bound scFv clones**

<b>VL</b>	<b>FR1</b>	<b>CDR1</b>	<b>FR2</b>	<b>CDR2</b>	<b>FR3</b>	<b>CDR3</b>	<b>FR4</b>	<b>(G4S)3</b>	
<b>Clone A</b>	DIQMTQSQKFMS	xxxxxx	WYQKPG	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDF	xxxxxxxx	FGAGTKLELKR	GGGGSGGGG	
	TSVGDRVSVTC	xxxx	QSPKALIY		TLTISNVQSEDLAEYFC				SGGGGS
<b>Clone B</b>	DVITQSHKFMST	KASQDV	WYQKPG	xxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFT	xxxxxxxxxx	FGAGTKLEVKR	GGGGSGGGG	
	SVGDRVSITC	GTAVA	QSPKLLIY		LTISNVQSEDLADYFC				SGGGGS
<b>VH</b>	<b>FR1</b>	<b>CDR1</b>	<b>FR2</b>	<b>CDR2</b>	<b>FR3</b>	<b>CDR3</b>	<b>FR4</b>		
<b>Clone A</b>	QVQLQQPGTELVKPG	xxxxx	WVKQRP	xxxxxxxxxx	KATLTVDASSTAYMQ	xxxxxxxxxx	WGQGTTLQSSS		
	ASVKMSCKASGYTFS		QGLEWIG		LSRLTSEDSAVYYCAR				xxxxxxx
<b>Clone B</b>	DVQLVESGAELAKPG	xxxxx	WVKQRP	xxxxxxxxxx	KATLTVDTSNTAYMQ	xxxxxxxxxx	WGQGTTLQSSS		
	ASVKLSCKASGFTFT		QGLEWIG		LSSLTSEDSAVYYCAR				xxxxxxx

## 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
	該当事項なし						

### 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
Isoda K Kagaya, N Akamatsu S Hayashi S Tamesada M Watanabe A Kobayashi M Tagawa Y Kondoh M Kawase M Yagi K	Hepatoprotective effect of vitamin B12 on dimethylnitrosamine -induced liver injury	<i>Bio. Pharm. Bull</i>	31	309-311	2008
Shibata H Yoshioka Y Yamagata Y Tsunoda S Kamada H Tsutsumi Y Et al.	Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist.	<i>J. Biol. Chem.</i>	283	998-1007	2008
Sugita T Yoshikawa T Mukai Y Yamanada N Imai S Nagano K Yoshida Y Shibata H Yoshioka Y Nakagawa S Kamada H Tsunoda S Tsutsumi Y	Comparative study of the protein transduction domains-mediated molecular transduction.	<i>Br. J. Pharmacol</i>	153	1143-1152	2008

Yoshikawa T Sugita T Mukai Y Yamanada N Nagano K Nabeshi H Yoshioka Y Nakagawa S Abe Y Kamada H Tsunoda S Tsutsumi Y	Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus	<i>J. Mol. Biol</i>	380	777-782	2008
Itoh A Isoda K Kondoh M Kawase M Kobayashi M Tamesada M Yagi K	Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury	<i>Biol. Pharm. Bull</i>	32	1215-1219	2009
Nishimori H Kondoh M Isoda K Tsunoda S Tsutsumi Y Yagi K	Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice	<i>Eur. J. Pharm. Biopharm.</i>	72	626-629	2009
Nishimori H Kondoh M Isoda K Tsunoda S Tsutsumi Y Yagi K	Silica nanoparticles as hepatotoxicants	<i>Eur. J. Pharm. Biopharm.</i>	72	496-501	2009
Nagano K Imai S Mukai Y Nakagawa S Abe Y Kamada H Tsunoda S Tsutsumi Y	Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library	<i>Pharmazie</i>	64	238-241	2009
Mukai Y Nakamura T Yoshioka Y Tsunoda S Kamada H Nakagawa S Yamagata Y Tsutsumi Y	Crystallization and preliminary X-ray analysis of TNF-TNFR2 complex	<i>Acta. Crystallogr</i>	65	295-298	2009

Mukai Y Nakamura T Yoshioka Y Shibata H Abe Y Nomura T Taniai M Ohta T Nakagawa S Tsunoda S Kamada H Yamagata Y Tsutsumi Y	Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists	<i>J. Biochem.</i>	146	167-172	2009
omura 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 Tsutsumi Y	Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun</i>	388	667-671	2009
Shibata H Yoshioka Y Abe Y Ohkawa A Nomura T Minowa K Mukai Y Nakagawa S Taniai M Ohta T Tsunoda S Tsutsumi Y	The treatment of established murine collagen-induced arthritis with a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF.	<i>Biomaterials</i>	30	6638-6647	2009

Nomura T Abe Y Kamada H Inoue M Kawara T Arita S Furuya T Minowa K Yoshioka Y Shibata H Kayamuro H Yamashita T. Mukai Y Nakagawa S Tsunoda S Tsutsumi Y	Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology	<i>Pharmazie</i>	65	93-96	2010
Matsuhisa K Kondoh M Takahashi A Yagi K	Tight junction modulator and drug delivery	<i>Expert Opin Drug Deliv</i>	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	<i>Mol Pharmacol</i>	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	<i>Drug Delivery System</i>	24	532-537	2009
Yagi K Kawase M Isoda K Kondoh M	Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function.	<i>Yakugaku Zasshi.</i>	130	537-543	2010
Nagano Yoshioka Y Watanabe H Morishige T Yao X Ikemizu S Nagao C Ahmad S Mizuguchi K Tsunoda S Tsutsumi Y Mukai Y Okada N Nakagawa S	Creation of lysine-deficient mutant lymphotoxin-alpha with receptor selectivity by using a phage display system.	Biomaterials	31	1935-1943	2010

Yamashita T Utoguchi N Suzuki R Nagano K Tsunoda S Tsutsumi Y Maruyama K.	Development of anti-tumor blood vessel antibodies by phage display method	Yakugaku Zasshi	130	479-485	2010
Shibata H Abe Y Yoshioka Y Nomura T Sato M Kayamuro H Kawara T Arita S Furuya T Nagano K Yoshikawa T Kamada H Tsunoda S Tsutsumi Y	Generation of mouse macrophages expressing membrane-bound TNF variants with selectivity for TNFR1 or TNFR2	Cytokine	50	75-83	2010
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 Tsutsumi Y	Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology.	Pharmazie	65	93-96	2010
Nagano K Imai S Nakagawa S Tsunoda S Tsutsumi Y	From disease proteomics to biomarker development-establishment of antibody proteomics technology and exploration of cancer-related biomarkers	Yakugaku Zasshi	130	487-492	2010
Mukai Y Nakamura T Yoshikawa M Yoshioka Y Tsunoda S Nakagawa S Yamagata Y Tsutsumi Y	Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex.	Science Signal.	3	ra83	2010

Morishige T Yoshioka Y Tanabe A Yao X Mizuguchi H Tsunoda S Tsutsumi Y Mukai Y Okada N Nakagawa S	Comparison of the anti-tumor activity of native, secreted, and membrane-bound LIGHT in mouse tumor models.	Int. Immunopharmacol.	10	26-33	2010
Morishige T Yoshioka Y Inakura H Tanabe A Yao X Tsunoda S Tsutsumi Y Mukai Y Okada N Nakagawa S	Creation of a LIGHT mutant with the capacity to evade the decoy receptor for cancer therapy.	Biomaterials	31	3357-3363	2010
Morishige T Yoshioka Y Inakura H Tanabe A Yao X Tsunoda S Tsutsumi Y Mukai Y Okada N Nakagawa S.	Creation of a lysine-deficient LIGHT mutant with the capacity for site-specific PEGylation and low affinity for a decoy receptor.	Biochem Biophys Res Commun.	393	888-893	2010
Kayamuro H Abe Y Yoshioka Y Katayama K Yoshida T Yamashita K Yoshikawa T Kawai Y Mayumi T Hiroi T Itoh N Nagano K Kamada H Tsunoda S Tsutsumi Y	TNF-alpha, mTNF-K90R, is a novel candidate adjuvant for a mucosal vaccine against HIV.	Pharmazie	65	254-256	2010
Suzuki H Kakutani H Kondoh M Watari A Yagi K	The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> 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 <sub>4</sub> -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	<i>Biomaterials</i>	31	5463-5471	2010
Yagi K Kawase M Isoda K Kondoh M	Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function	<i>YAKUGAKU ZASSHI,</i>	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 <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin	<i>Eur J Pharm Biopharm</i>	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	<i>Biochem Pharmacol</i>	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	<i>J Control Rel</i>	142	4331-4337	2010
Saeki R Kondoh M Uchida H Yagi K	Potency of claudin-targeting as antitumor therapy	<i>Mol Cell Pharmacol</i>	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	<i>薬剤学</i>	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	<i>J Pharmacol Exp Ther</i>	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	<i>PLoS ONE</i>	6	e16611	2011

Takahashi A Kondoh M Suzuki H Kodaka M Yagi K	Claudin as a target for drug development	<i>Curr Med Chem</i>	18	1861-1865	2011
Yoshida T Kondoh M Yagi K	Promising targets for anti-hepatitis C virus agents	<i>Curr Med Chem</i>	18	1239-1244	2011
Suzuki T Sasaki T, Yano K, Sakurai F Kawabata K Kondoh M Yagi K Mizuguchi H	Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome	<i>Virus Res</i>			accepted
Yoshida T Kondoh M Ojima M Mizuguchi H Yamagishi Y Sakamoto N Yagi K	Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication	<i>Nucleic Acid Res</i>			accepted
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	<i>Pharmazie</i>			accepted
Takahashi A Kondoh M Kodaka M Yagi K	Peptides as tight junction 3 modulators	<i>Curr Pharm Design</i>			accepted

## Hepatoprotective Effect of Vitamin B<sub>12</sub> on Dimethylnitrosamine-Induced Liver Injury

Katsuhiro ISODA,<sup>a</sup> Noritaka KAGAYA,<sup>a</sup> Soichiro AKAMATSU,<sup>a</sup> Shinji HAYASHI,<sup>a</sup> Makoto TAMESADA,<sup>b</sup> Aiko WATANABE,<sup>b</sup> Masakazu KOBAYASHI,<sup>b</sup> Yoh-ichi TAGAWA,<sup>c</sup> Masuo KONDOH,<sup>a</sup> Masaya KAWASE,<sup>d</sup> and Kiyohito YAGI\*<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University; 1-6 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan:

<sup>b</sup> Research and Development Center, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd.; 1-30-3 Toyokawa, Ibaraki, Osaka 567-0057,

Japan: <sup>c</sup> Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology; 4259 Nagatsuta-cho, Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan: and <sup>d</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka-Ohtani University; 3-11-1 Nishikiori-kita, Tondabayashi, Osaka 584-8540, Japan.

Received August 21, 2007; accepted November 9, 2007; published online November 19, 2007

**Vitamin B<sub>12</sub> contains a cobalt complex and accumulates at high levels in the liver. Vitamin B<sub>12</sub> was examined for its hepatoprotective effect on dimethylnitrosamine-induced liver injury in mice. Vitamin B<sub>12</sub> decreased the blood levels of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, and clearly inhibited the overaccumulation of collagen fibrils. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of the liver showed that the gene expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin and heat-shock protein 47, which are markers of fibrosis, were suppressed by vitamin B<sub>12</sub> administration. Our findings indicate that vitamin B<sub>12</sub> could be an effective hepatoprotective agent.**

**Key words** hepatoprotection; vitamin B<sub>12</sub>; liver fibrosis; metal complex

The incidence of hepatoma related to hepatitis C and B continues to increase in developed countries. Chronic liver injury, including that caused by virus infection, cause persistent inflammation and fibrosis, followed by the development of liver cirrhosis and hepatoma. The use of interferon (IFN) has become the first-line treatment for viral hepatitis, but it is not effective in patients with a high viral load. Recently, investigators have begun to seek hepatoprotective agents that might facilitate the treatment of liver failure.

Vitamin B<sub>12</sub> contains a cobalt complex and is therefore also known as cobalamin.<sup>1)</sup> Its molecular weight is the largest of all the vitamins, and it is known to accumulate at high levels in the liver. Therefore, the concentration of vitamin B<sub>12</sub> in the blood rises in the presence of acute or chronic liver disease.<sup>2,3)</sup> Also, vitamin B<sub>12</sub> associates with many enzymes, such as adenosylcobalamin-dependent isomerases, methylcobalamin-dependent methyltransferases, and dehalogenases.<sup>4)</sup> Chronic feeding of a methyl-donor, vitamin B<sub>12</sub>-deficient diet causes the spontaneous development of hepatocellular carcinoma.<sup>5)</sup> Therefore, when the liver is injured, stored vitamin B<sub>12</sub> leaks out into the blood, which causes a severe B<sub>12</sub>-deficit in the liver, probably resulting in metabolic dysfunction. So far, it has been reported that vitamin B<sub>12</sub> was effective for the liver protection against the acute liver injury.<sup>6)</sup> However, there is no findings of the effect on chronic liver fibrosis. Therefore, we examined the effect of vitamin B<sub>12</sub> on the fibrogenesis using chronically liver-injured mice.

Dimethylnitrosamine (DMN) is a potent hepatotoxin, carcinogen and mutagen. DMN induces liver fibrosis in a highly reproducible manner, first inducing a central hemorrhagic necrosis followed by the formation of septa and establishing micronodular cirrhosis after 3 weeks of treatment.<sup>7)</sup> DMN-induced liver fibrosis in animals is a good and reproducible animal model for studying pathophysiological alterations associated with the development of liver fibrosis and cirrhosis in humans.<sup>8,9)</sup> In this study, we found that the treatment of a

chronic liver-injury model with vitamin B<sub>12</sub> suppressed both liver inflammation and fibrosis.

### MATERIALS AND METHODS

**Animals** BALB/c mice were purchased from SLC (Shimizu, Japan). The animals were housed in an air-conditioned room at 22 °C before the experiment. Hepatic injury in mice aged 6 weeks was elicited by the intraperitoneal administration of dimethylnitrosamine (DMN; Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) at 5 mg/kg body weight for the first 3 consecutive days of the week for 4 weeks. Vitamin B<sub>12</sub> (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) was administered intraperitoneally at 10 mg/kg body weight at the same time as DMN. After 4 weeks of treatment, the mice were anesthetized, and blood samples were taken from the orbital sinus. The animal experiments were conducted according to the ethical guidelines of the Osaka University Graduate School of Pharmaceutical Sciences.

**Histological Analysis** Liver specimens were fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. Sections were cut from the tissue blocks, mounted on slides, and stained with Elastica van Gieson (EG).

**Assays** Serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels were measured using an assay kit (Iatrozyme TA-Lq; Mitsubishi Kagaku Iatron Inc., Tokyo, Japan).

**Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)** The liver was excised and homogenized after removing the blood with phosphate-buffered saline. The total RNA was extracted from the liver homogenates using Sepasol-RNA I (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). The gene expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) was analyzed by RT-PCR using the following primers: forward 5'-CAGGG-AGTAATGGTTGGAAT-3' and reverse 5'-CGTCGTATTC-CTGTTTGTCTGA-3'. Heat-shock protein 47 (HSP47) gene

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: yagi@phs.osaka-u.ac.jp.