

201030043A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

膜蛋白質発現系を利用した  
C型肝炎ウイルス感染受容体の  
生化学的・疫学的解析及び感染阻害剤の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 康弘

平成 23 (2011) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

膜蛋白質発現系を利用した  
C型肝炎ウイルス感染受容体の  
生化学的・疫学的解析及び感染阻害剤の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 康弘

平成 23 (2011) 年 4 月

# 目次

## I. 総括研究報告書

|                                                              |             |
|--------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>膜蛋白質発現系を利用した C 型肝炎ウイルス感染受容体の<br/>生化学的・疫学的解析及び感染阻害剤の開発</b> | ..... 1     |
| 独立行政法人医薬基盤研究所                                                | 研究代表者 阿部 康弘 |

## II. 分担研究報告書

|                                               |             |
|-----------------------------------------------|-------------|
| <b>出芽バキュロウイルス膜蛋白質発現系を利用した<br/>ウイルス感染機構の解析</b> | ..... 18    |
| 大阪大学薬学研究科                                     | 研究分担者 近藤 昌夫 |

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 31

## IV. 研究成果の刊行物・別冊

..... 37

## 膜蛋白質発現系を利用した C 型肝炎ウイルス感染受容体の 生化学的・疫学的解析及び感染阻害剤の開発

研究代表者 阿部 康弘 独立行政法人医薬基盤研究所 基盤研究部 研究員

### 研究要旨

本研究は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染受容体群の生化学的解析を出発点に、独自かつ世界唯一のアンタゴニスト創出技術を有効活用することにより初めてのHCV感染阻害分子を創出し、可及的速やかに新規感染防止法の実用化を目指すものである。

周知のように、HCV感染受容体に対するアンタゴニストは、HCV変異に伴う耐性ウイルス発現の影響を受けにくいこと、高ウイルス量患者においても感染阻害効果を期待できることから、夢の感染阻害・治療薬として期待されているものの、膜蛋白質である感染受容体には蛋白質発現が困難なものが多く抗原性も低いことから、HCV感染機構の生化学的解析は遅々として進展しておらず、HCV感染阻害分子の創出は立ち遅れている。

当研究グループでは、出芽バキュロウイルス（BV）を利用した本邦発の膜蛋白質発現系を活用したHCV感染機構の生化学的解析を推進し、独自に改良したファージ表面提示法を用いた迅速かつ簡便なアンタゴニスト創出系を開発、ペプチド、抗体、蛋白質性アンタゴニストを数多く創出し、最近世界で初めて腫瘍壊死因子構造変異体アンタゴニストの創出に成功している（J Biol Chem, 2008他）。

そこで本研究では、これら独自の技術を有効活用して、HCV感染受容体を生化学的に解析、HCV感染受容体アンタゴニストを作製し、初めてのHCV感染阻害分子の創出を試みた。昨年度までに我々は、BVを利用したウイルス感染機構解析の可否を検証し、SR-BI、CD81、claudin-1、occludinのHCV感染受容体発現BVを作製した。本年度は、HCV感染受容体発現BVを用いた感染阻害分子創製のパイロットスタディとして、claudin-1発現BV、occludin発現BVを免疫原として利用したアンタゴニスト一本鎖抗体作製条件の確立を試みた。

### 研究分担者

・近藤 昌夫 大阪大学薬学研究科 准教授

### A. 研究目的

周知のように、C型肝炎治療の基本戦略の第一は肝細胞中の HCV を排除すること、第二は HCV の新規感染を阻害することにある。現在

までに、HCV 排除活性を有するインターフェロン療法が進歩により、C型肝炎の奏効率は50%まで改善されているものの、重篤な副作用も報告されており、耐性ウイルスの出現、高ウイルス量患者には効果が乏しいことから、HCV 感染阻害薬、感染受容体アンタゴニストの創出が急務となっている。しかしながら、

HCV 感染受容体を intact な状態で精製するのが困難なこと、抗原性が低く細胞外領域に対する抗体の作製に成功した例が少ないことから、HCV 感染機構の生化学的解析は遅々として進展していない。

そこで本研究は、1) 出芽バキュロウイルス (BV) 膜蛋白質発現系を利用した感染受容体の生化学的解析により C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染機構を詳細評価し、2) 独自のアンタゴニスト創出技術を活用し、HCV 感染受容体アンタゴニストを創出することを目的とする。

本研究では、平成21年度に感染受容体発現 BV を用いた感染受容体解析系の可否を検証し、HCV 感染受容体 (SR-BI, occludin, claudin-1, CD81) をウイルス表面に発現した BV を作製した。本年度は、本 HCV 感染受容体発現 BV を用いて、HCV 感染機構の生化学的解析を実施した (分担者近藤の報告書を参照)。さらに、HCV 感染受容体発現 BV を用いた HCV 感染受容体アンタゴニスト創製の予備検討として、claudin-1 発現 BV、occludin 発現 BV をマウスに免疫、抗体価の上昇を確認後、脾臓を回収し、一本鎖抗体 (scFv) 提示ファージライブラリの作製を試みた。

## B. 研究方法

### 1. Claudin-1-BV、occludin-BV の作製

#### 1.1. pFastBac-hCL1 および pFastBac-hOcc の作製

pEAK-Claudin-1 をテンプレートとして用いた PCR 法により claudin-1 cDNA フラグメントを増幅した。pEAK-Claudin-1 溶液 (0.1 mg/ml) 1  $\mu$ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5  $\mu$ l、2.5 mM MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M

primers 3  $\mu$ l、滅菌精製水 30  $\mu$ l、5 U/  $\mu$ l Takara kod plus 1  $\mu$ l を混合し PCR を行った。Claudin-1 クローニング用のプライマーは、forward primer (5- gctctagaatggattacaaggatgacgacgataa gatggccaacgcggggctgcagctg-3 )、reverse primer (5- cggggtacctcacacgtagtctttcccgcgtg gaaggtgcagg -3) を用いた。PCR の条件は、94  $^{\circ}$ C 2 min の後、94  $^{\circ}$ C 30 sec、64  $^{\circ}$ C 30 sec、68  $^{\circ}$ C 1 min を 32 サイクルとした。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、*XbaI* と *KpnI* により切断した。トランスファーベクター pFastBac1 を *XbaI*、*KpnI* で切断し、制限酵素処理した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物をコンピテントセル DH-5 $\alpha$  にトランスフォーメーションした。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析により pFastBac-hCL1 を得た。

phOc6 をテンプレートとして用いた PCR 法により occludin cDNA フラグメントを増幅した。phOc6 溶液 (0.1 mg/ml) 1  $\mu$ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5  $\mu$ l、2.5 mM MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 3  $\mu$ l、滅菌精製水 30  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l Takara kod plus 1  $\mu$ l を混合し PCR を行った。Occludin クローニング用のプライマー配列は、forward primer (5- gactagtagtgcacccaggcctcttgaagt-3)、reverse primer (5-cccaagcttctatgttttctgtctatcatagctccc-3) とした。PCR の条件は、94  $^{\circ}$ C 2 min の後、94  $^{\circ}$ C 30 sec、53  $^{\circ}$ C 30 sec、68  $^{\circ}$ C 2 min を 35 サイクルとした。PCR 後、PCR 産物を *SpeI* と *HindIII* により処理した。トランスファーベクター pFastBac1 を *SpeI*、*HindIII* で切断し、PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物をコンピテントセル DH-5 $\alpha$  にトランス

フォーメーション、大腸菌を培養、プラスミド DNA 抽出し、制限酵素解析およびシーケンス解析により pFastBac-hOcc を得た。

### 1.2. Bacmid の作製

作製したトランスファーベクターを大腸菌 DH10Bac (Invitrogen 社) にトランスフォーメーションし、IPTG, X-gal 含有 TGK プレート (50 µg/ml kanamycin, 7 µg/ml gentamicin, 10 µg/ml tetracycline) 上に播種し、37 °C で 24 時間培養した。任意の白コロニーをピックアップし、アルカリプレップにて大腸菌から bacmid を精製した。

PCR により目的遺伝子が挿入されていることを確認し、bacmid を精製した。本 bacmid 溶液 (0.1 mg/ml) 1 µl、10 x LA PCR buffer 2 µl、25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 µl、2.5 mM dNTP mix 3.2 µl、10 µM primers 1 µl、滅菌精製水 9.6 µl、5 U/µl Takara LA taq 0.2 µl を混合し PCR を行った。プライマーは forward primer (5-tgtaaacgacggccagt-3)、reverse primer (5-ggaaacagctatgaccatg-3) を用いた。PCR の条件は、94 °C 2 min の後、94 °C 30 sec, 55 °C 30 sec, 68 °C 4 min を 35 サイクルとした。PCR 後、PCR 産物を電気泳動し目的遺伝子の挿入を確認した。Bacmid DNA を DH5α にトランスフォーメーションし、IPTG, X-gal 含有 TGK plate で培養した。白色独立大腸菌クローンを培養し、bacmid DNA を精製した。なお、Wild type-BV (WT-BV) bacmid は青色独立大腸菌クローンから精製し、hCL1-bacmid、hOcc-bacmid と同じ条件で PCR を行い組換えが起きていないことを確認した。

### 1.3. BV の作製

培養用 6 穴プレートに  $1 \times 10^6$  cells/well の濃度で Sf9 細胞 (Invitrogen) を播種し、室温で 1 時間静置した。静置中に tube A (cellfectin (Invitrogen) 6 µl、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 (Invitrogen) 100 µl) と tube B (bacmid 1 µg、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 µl) を用意し、tube A と tube B とをよく混和し、泡立えないようにゆっくりピペティングした後、室温で 30 分間放置した。1 時間静置することで接着させた Sf9 細胞を血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地で洗浄後、培地を除去し、tube A と tube B との混合溶液に血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 800 µl を加え、ウェルに全量 (1 ml) 添加し、プレートをビニールテープで密封して 5 時間、27 °C で培養した。その後、培地を除去し、血清と抗生物質を含む 2 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) に交換し、27 °C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を  $800 \times g$  で 10 分間遠心することで回収した (P1 ストックと称する)。続いて、 $2 \times 10^6$  cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに 200 ml 用意し、そこに P1 ストック 2 ml を加え、27 °C で 2 日間培養した。2 日後、培養上清を  $800 \times g$  で 10 分間遠心することで回収した (P2 ストックと称する)。

培養用 6 穴プレートに  $2 \times 10^6$  cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10, 100, 1,000 µl ずつ加え、27 °C で 3 日間培養した (全量 2 ml)。3 日後、 $800 \times g$  で 10 分間遠心し、上清を回収した。沈殿物 (細胞) には protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-X を含む PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で懸濁後、超音波処理で破碎し細胞可

溶化液とした。培養上清および細胞可溶化液を用いて、western blot 法にて目的とする蛋白質の発現を確認した。

$4 \times 10^6$  cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに 100 ml 用意し、血清と抗生物質を含む 50 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) と、発現確認のできた P2 ストックを 50 ml 加え、27℃ で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を  $800 \times g$  で 10 分間遠心することで回収した。回収した培養上清を  $18,400 \times g$  で 25 分間さらに遠心した。得られた沈殿を PBS で懸濁後、 $800 \times g$  で 10 分間遠心し、上清をさらに  $18,400 \times g$  で 25 分間遠心した。得られた沈殿を protease inhibitor を含む TBS 200  $\mu$ l で懸濁し、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用いて蛋白質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

#### 1.4. BV の発現確認

BV (10  $\mu$ g) を SDS-PAGE 後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間ブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回 洗浄し、T-TBS により 1/2000 に希釈した一次抗体 (mouse anti claudin-1 (ZYMED)、mouse anti occludin (ZYMED)) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回 洗浄し、T-TBS により 1/3000 に希釈した二次抗体 (goat

anti-mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) ) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて目的蛋白質の検出を試みた。

## 2. scFv 提示ファージライブラリの作成

### 2.1. Claudin-1-BV の BXSb マウスへの免疫

6週齢雌性 BXSb マウスに claudin-1-BV 1 mg をアジュバンド (PERTUSSIS TOXIN A PROTMER) と共に背部皮下に投与した。2 週間後、claudin-1-BV 0.5 mg を四肢リンパ節に投与した。その後、1 週間ごとに claudin-1-BV 0.5 mg を 7 回腹腔内投与し、FACS により抗 claudin-1 抗体の産生を確認後、最終免疫として claudin-1-BV 0.25 mg を尾静脈に投与し、3 日後に脾臓を摘出し、mRNA を抽出した。

### 2.2. Claudin-1 免疫 DNA ライブラリの作製

抗 claudin-1 抗体の産生を確認したマウスをエーテル麻酔し、脾臓を摘出し、TRIzol reagent (Invitrogen) に溶解させ total RNA を得た。Total RNA から mRNA Purification kit (GE Health Care) を用いて mRNA を精製し、cDNA 合成に供した。mRNA 500 ng と SuperScript III First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用いた RT-PCR により cDNA を合成した。次に cDNA 1  $\mu$ l を鋳型として forward primer set 2  $\mu$ l、reverse primer set 2  $\mu$ l、PCR buffer 5  $\mu$ l、dNTP 5  $\mu$ l、MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、KOD-plus 1  $\mu$ l の割合で混合したものを

アニーリング温度 50 °C で 1 分間、伸長反応 68 °C で 1 分間に設定した 35 サイクルの PCR 反応に供し、それぞれ VH 鎖、VL 鎖の cDNA を得た。この PCR 産物を PCR purification kit で精製し、次の assembly PCR に供した。VH 鎖 cDNA を 25 ng、VL 鎖 cDNA を 25 ng、*Not I* サイトを有する Y15 primer (5-ggccagctttggagccttttttggagatttcaacgtgaaaaaattatttattcgcaattccttagttgttcttctatgcgcccagccggccatggcc-3)、*Nco I* サイトを有する Y16 primer (5-ttagtaaatgaatttctgtatgaggtttgctaaacaacttcaacagctctatgcggcacgcggttccacggatccggatacggcaccggcgcacctgcccgc-3)、PCR buffer 5 µl、dNTP 5 µl、MgSO<sub>4</sub> 2 µl、KOD-plus 1 µl の割合で混合したもののアニーリング温度 65 °C で 1 分間、伸長反応 68 °C で 1 分間に設定した 18 サイクルの条件に設定し assembly PCR を行った。PCR 産物を PCR purification kit を用いて精製し、scFv 遺伝子とした。scFv 遺伝子を *Nco I*、*Not I* で 37 °C、20 時間処理し、切り出し精製を行った。同様に *Nco I*、*Not I* で 2 h 処理し、切り出し精製した pY03'-atac を 0.1 µg、scFv 遺伝子を 0.08 µg 用いて T4 ligase (Promega, Corp., USA) を用いて 16 °C にて一晩ライゲーション反応を行なった。得られたライゲーション産物を PCR Purification Kit で精製し、さらにエタノール沈殿により濃縮した。ライゲーション産物を大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションすることにより形質導入した。その後、100 µg/ml ampicillin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) と終濃度 2% D-glucose (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地プレート(LAG plate)に播種した。一晩培養後大腸菌のコロニーをセルスクレーパー

により LAG 培地で回収した。この大腸菌溶液を終濃度 10% グリセロール (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) と混合し、-80 °C で保存し、claudin-1 免疫 scFv ライブラリとした。

### 2.3. Occludin-BV の BXSB マウスへの免疫

6 週齢雌性 BXSB マウスに occludin-BV 1 mg をアジュバンド (PERTUSSIS TOXIN A PROTMER) と共に背部皮下に投与した。2 週間後、occludin-BV 0.5 mg を四肢リンパ節に投与した。その後、1 週間ごとに claudin-1-BV 0.5 mg を 5 回腹腔内投与し、western blotting により抗 occludin 抗体の産生を確認後、最終免疫として occludin-BV 0.25 mg を尾静脈に投与し、3 日後に脾臓を摘出し、mRNA を抽出した。

### 2.4. Occludin 免疫 DNA ライブラリの作製

マウスをエーテル麻酔し、脾臓を摘出し、TRIzol reagent (Invitrogen) に溶解させ total RNA を得た。Total RNA から mRNA Purification kit (GE Health Care) を用いて mRNA を精製し、cDNA 合成に供した。mRNA 500 ng と SuperScript III First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用いた RT-PCR により cDNA を合成した。次に cDNA 4 µl を鋳型として forward primer set 2 µl、reverse primer set 2 µl、PCR buffer 5 µl、dNTP 5 µl、MgSO<sub>4</sub> 2 µl、KOD-plus 1 µl の割合で混合した溶液、cDNA 4 µl を鋳型として forward primer set 1 µl、reverse primer set 1 µl、PCR buffer 5 µl、dNTP 5 µl、MgSO<sub>4</sub> 2 µl、KOD-plus 1 µl の割合で混合した溶液をアニーリング温度 50 °C で 1 分間、伸長反応 68 °C で 1 分間に設定した 35 サイクルの PCR



反応に供し、それぞれ VH 鎖、VL 鎖の cDNA を得た。この PCR 産物を PCR purification kit で精製し、次の assembly PCR に供した。VH 鎖 cDNA を 100 ng、VL 鎖 cDNA を 100 ng、*Not I* サイトを有する Y15 primer (5-ggccagctttggagcctttttttggagattttcaacgt gaaaaattattattcgcaattccttagttgttccttctat gcggcccagccggccatggcc-3)、*Nco I* サイトを有する Y16 primer (5-ttagtaaatgaattttctgtat gaggttttgctaaacaactttcaacagtctatgcggcacg cggttccacggatccggatagcggcaccggcgcacctgcg gccgc-3)、PCR buffer 5  $\mu$ l、dNTP 5  $\mu$ l、MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、KOD-plus 1  $\mu$ l の割合で混合したもののアニーリング温度 65 °C で 1 分間、伸長反応 68 °C で 1 分間に設定した 18 サイクルの条件に設定し assembly PCR を行った。PCR 産物を PCR purification kit を用いて精製し、scFv 遺伝子とした。scFv 遺伝子を *Nco I*、*Not I* で 37 °C、20 時間処理し、切り出し精製を行った。同様に pY03'-scFv-49 (pY03 ベクターに scFv 遺伝子を組み込んだプラスミド。scFv 遺伝子中に *MfeI*、*EcoNI* cut site を有する) を *Nco I*、*Not I* で 37 °C、2 時間処理し、さらに self cut として *MfeI*、*EcoNI* で 37 °C、2 時間処理し、切り出し精製を行った。制限酵素処理した pY03'-scFv-49 を 1.0  $\mu$ g、scFv 遺伝子を 0.5  $\mu$ g 用いて T4 ligase (Promega, Corp., USA) を用いて 16 °C にて一晩ライゲーション反応を行なった。得られたライゲーション産物を PCR Purification Kit で精製し、さらにエタノール沈殿により濃縮した。ライゲーション産物を大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションすることにより形質導入した。その後、100  $\mu$ g/ml ampicilin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) と終濃度 2%

D-glucose (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LAG plate に播種した。一晩培養後大腸菌のコロニーをセルスクレーパーにより LAG 培地で回収した。この大腸菌溶液を終濃度 10%グリセロール (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) と混合し、-80 °C で保存し、occludin 免疫 scFv ライブラリとした。

## 2.5. エレクトロポレーション

TG1 をグリセロールストックから 2YT 培地 2 ml で一晩培養した。翌日、2YT 培地 200 ml に OD600 = 0.05-0.1 となるように植え継ぎ、37 °C で OD600 = 0.4-0.6 まで培養した。その後、4 °C 3000 rpm 10 分間遠心分離し、上清を捨て、milliQ を加え懸濁し、さらに 4 °C 3000 rpm 10 分間遠心分離し上清を捨てた。この洗浄作業を三回繰り返した後、TG1 を終濃度 10%グリセロールを含む SP 水 (Fuso, Co., Ltd, Osaka) で懸濁した。TG1 溶液 40  $\mu$ l とライゲーション産物 1  $\mu$ l (30 セット) を氷上で 15 分間なじませた後、混合液をキュベットに移し Gene pulser (Bio-Rad Laboratories, Inc., C.A., USA) を用いて電気パルスを与えた。その後、2YTG 培地 450  $\mu$ l に移し、37°C で 1 時間振とう培養した。Titer check 用として、この大腸菌溶液のうち 50  $\mu$ l を 100  $\mu$ g/ml ampicilin sodium を添加した 2YTG (2YTGA) 培地で 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> 倍希釈し、ペトリフィルムに播き、37°C で一晩培養後、コロニー数を計測することでライブラリのサイズを求めた。また、残り的大腸菌溶液を約 500  $\mu$ l /プレート一枚となるように LAG 培地プレート 34 枚に播種した。翌日 2 mL LAG 培地/プレート 1 枚でセルスクレーパーを用いて大腸菌を回収し、終濃度 10% グリセロールを添加し-80 °C で保存した。

## 2.6. scFv ライブラリの多様性確認

エレクトロポレーションの際に播種したペトリフィルムからコロニーをランダムにピックアップし、LA 培地 3 ml で一晚培養した。その後、QIAprep<sup>®</sup> Spin miniprep Kit (QIAGEN Science, USA) を用いて plasmid を精製した。sense primer として pY03'-S-1 (5-cagga aacagctatgac-3) 、anti-sense primer として pY03'-AS-1 (5-gtaaataaatttctgtatgagg-3) を用い、シーケンス解析を (株) ジーンデザインに依頼した。

## 3. Claudin-1 binder のスクリーニング

### 3.1. パンニング

Claudin-1-BV を 0.5 µg/100 µl in TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl) でイムノチューブに添加し、4 °C で一晚静置することで固相化した。翌日、PBS でイムノチューブを 3 回洗浄した後、4% Block Ace 500 µl 添加し、常温で 2 時間ブロッキングした。また、ファージライブラリ 50 µl と 4% Block Ace 50 µl を混合し、4 °C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後のイムノチューブを PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージライブラリ液を 100 µl 添加し、常温で 2 時間静置した。その後、PBST、PBS でそれぞれ各 15 回ずつ洗浄し、100 mM HCl を 100 µl 添加、4 °C、10 分間作用させることで claudin-1-BV に結合しているファージを解離させた。1 M Tris-HCl 50 µl を加えて HCl を中和し、ファージ溶液を回収した。ファージ溶液 100 µl を大腸菌 TG1 (OD<sub>600</sub> = 0.4-0.6 に調整) 300 µl と混合し、37 °C 1 時間静置することでファージを感染させた。その後、LAG 培地プレートに播種し一晚培養した。

翌日 LAG 培地プレートから TG1 を、セルスクレーパーを用いて 2YTGA 培地で回収し、終濃度 10% のグリセロールと混合した後、-80 °C に保存した。さらに、冷凍保存した TG1 からファージを作製し、上記の作業を繰り返すことで 2nd、3rd パンニングを行なった。

### 3.2. パンニングの ratio 計算

パンニングで回収したファージ溶液 (output phage) 10 µl を 10<sup>-2</sup>-10<sup>-6</sup> 倍に 2YT 培地を用いて希釈した。同様に、パンニング操作前のファージライブラリ溶液 (input phage) を 10<sup>-8</sup>-10<sup>-11</sup> 倍に希釈した。希釈ファージ 100 µl を TG1 (OD<sub>600</sub> = 0.4-0.6 に調整) 300 µl とそれぞれ混合後、37 °C 1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600 µl をさらに添加し、ペトリフィルムに播種し一晚 37 °C で培養した。翌日コロニー数を計測することで titer を算出し、パンニング ratio (output/input) を求めた。

### 3.3. scFv モノクローン化ファージの作製

パンニング後のファージを感染させた TG1 のグリセロールストックを希釈し、LAG 培地プレートに播種、37 °C で一晚培養した。播種した LAG 培地プレートからコロニーをピックアップし、96 well plate (IWAKIGLASS, Co., Ltd, Japan) 2YTGA 培地 100 µl で、37 °C 一晚培養した。その際、同時にコントロール scFv 提示ファージ感染 TG1 と C-CPE 提示ファージ感染 TG1、C-CPE m19 提示ファージ感染 TG1 のグリセロールストックも同様に 96 well plate で培養した。翌日、ディープウェル (Greiner Bio-One GmbH, Germany) 2YTGA 500 µl に前培養大腸菌 10 µl ずつ植え継ぎ、OD<sub>600</sub> = 0.3-0.6 まで 100 rpm 37 °C で培養後、M13K07 helper

phage を添加した。37 °C 1 時間静置した後、2500 rpm 15 分間遠心分離し、上清を除去、2YTAK 培地 1 ml/well を添加して 100 rpm 25°C で一晩培養した。翌日 2500 rpm 15 分間遠心分離した後、上清を回収し、これをモノクローン化ファージ溶液とした。

なお前培養のため 96 well plate で培養した大腸菌 TG1 のうち、植え継ぎに使用しなかった大腸菌は終濃度 10% でグリセロールを添加し、-80 °C で保存した。

#### 3.4. ファージを用いた BV ELISA

96 well ELISA plate に 0.5 µg/50 µl TBS/well で、WT-BV および claudin-1-BV、Anti-FLAG mAb (SIGMA) を 4 °C で一晩静置することで固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、4 % Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で常温 2 時間ブロッキングした。また、上記方法で作製したファージを、終濃度 1.6 % Block Ace で 4 °C 1 時間ブロッキングした。BV をブロッキング後、PBS で 3 回洗浄し、同じくブロッキングしたファージを 100 µl/well で添加し、常温で 2 時間作用させた。その後、PBST で 3 回洗浄し、anti M13-HRP mAb (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を 5000 倍希釈した溶液を 100 µl 添加して常温で 1 時間作用させた。PBST で 3 回洗浄した後、TMB 試薬 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 100 µl を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100 µl を加えて反応を停止した。その後マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。

### C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

### D. 考察

#### 1. Claudin-1-BV、occludin-BV の作製

Claudin-1 および occludin 免疫ライブラリの作製、及びスクリーニングに使用するため、claudin-1 発現 BV、occludin 発現 BV の作製を試みた。まず bacmid へのトランスファクターである pFastBac1 の polyhedrin プロモーターの下流に claudin-1、occludin の cDNA を挿入した。次に、相同組換えにより感染受容体蛋白質発現カセットの Bacmid への搭載を行い、Bacmid の搭載部位の両外側に位置する primer を用いて PCR を行い搭載されていることを確認した。作製した Bacmid を Sf9 細胞に導入し、増幅・精製を行い、精製 BV を用いて Western blotting 法により感染受容体蛋白質の発現を確認した。いずれの蛋白質もヒト細胞に発現している蛋白質と同じ分子量にバンドが確認された (Fig. 1)。

#### 2. Claudin-1、occludin 免疫マウスを用いた一本鎖抗体ライブラリの作製

Claudin-1-BV を免疫したマウスから血清を回収し、claudin-1 発現細胞を用いて FACS 解析したところ、抗体の産生が観察された (Fig. 2A)。

そこで、本マウスの脾臓を摘出し、total RNA を抽出後、mRNA を精製した。RT-PCR により mRNA を鋳型にして cDNA を合成し、さらに cDNA を鋳型に重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) を PCR で増幅した。VH, VL 鎖をリンカーで連結して得た scFv 断片を *Nco* I/*Not* I 処理し pY03' に組み込んだ。得られた cDNA ライブラリをエレクトロポレーション法により大腸菌 TG-1 に導入したものをライブラリとし、シーケンス解析を行った。

構築した hCL1 免疫 scFv ライブラリのライブラリサイズは  $8.46 \times 10^6$  CFU だった。ランダムに選出した 5 つのクローンの内、4 つは scFv を提示しており、その配列は異なっていたことから、ライブラリの多様性は保たれているものと考えられる (Table 1)。免疫ライブラリは往々にして  $10^5$ - $10^6$  CFU 程度のライブラリサイズを有し、非免疫ライブラリと比して多様性の面では劣るが、抗原への指向性の面では優れている。したがって作製したライブラリも多様性に問題はないと考えられる。また抗体遺伝子の配列の多様性は VH 鎖の CDR3 領域においてみられること、すなわち抗原との結合に重要な領域であることからこの領域に着目したところ、クローン間でアミノ酸配列、塩基長にかなりの多様性がみられた。そのため本ライブラリは有用なスクリーニングソースであると考えられる。

Occludin-BV を免疫したマウスから血清を回収し、western blot を行ったところ、本免疫マウスにおいても occludin に対する抗体産生が観察された (Figure 2 B)。そこで、claudin-1 免疫マウスと同様の手法で scFv ライブラリを作製したところ、ライブラリサイズは  $4.14 \times 10^5$  CFU を示していた。ランダムに選出した 5 つのクローンの内、3 つのクローンにおいて scFv を提示していることが確認でき、それぞれ異なるアミノ酸配列を有していた (Table 2)。

### 3. Claudin-1 結合性 scFv のスクリーニング

Claudin-1-BV をイムノチューブに固相化後、scFv ライブラリを添加、洗浄後、claudin-1-BV に結合したファージクローンを回収した。回収したファージを大腸菌 TG-1 に感染させ増幅・調製したファージを claudin-1-BV 固相化チュ

ーブに作用させ、再びパンニング操作を行った。パンニングサイクルを繰り返すことで、output phage/input phage 比の上昇が観察され、claudin-1-BV 結合性ファージクローンの濃縮傾向が観察された (Fig. 3A)。

パンニング後、ファージクローンをモノクローン化し、claudin-1-BV への結合性を ELISA により解析したところ、claudin-1-BV に結合性を示す、ファージクローンが複数同定された (Fig. 3B)。

### E. 結論

本研究は、本邦発の膜蛋白質発現系である BV システムを用いることで、未だ不明な点が多い HCV 感染機構の生化学的解析を進めると同時に、BV を抗原として用いることで本解析結果をシームレスに感染アンタゴニスト創製系にのせることができる点に特徴がある。

昨年度は、BV システムを用いたウイルス感染機構解析の可否を検証すると同時に、HCV 感染受容体発現 BV 作製条件の設定を試みた。これらの結果を踏まえ、本年度は、claudin-1 発現 BV、occludin 発現 BV を用いた感染アンタゴニスト創製条件の設定を図り、自己免疫疾患マウスに BVs を免疫することで claudin-1、occludin に対する抗体価が上昇することを見出した。そこで、免疫マウス脾臓の cDNA を用いて scFv ライブラリの作製を試み、十分な多様性を有する claudin-1 scFv ライブラリ、occludin scFv ライブラリの構築に成功した。さらに、claudin-1 scFv ライブラリを用いてスクリーニングを試みたところ、claudin-1 結合性クローンが濃縮していた。

以上、感染受容体 BV を自己免疫疾患マウスに免疫することで、感染受容体アンタゴニスト分

子を創製できる可能性を見出した。

平成23年度は引き続き既存のライブラリを用いてclaudin-1 binder、occludin binderを創製し、本binderのHCV感染阻害活性を解析する。さらに、HCV感染阻害作用を有するBVを用い、scFvライブラリの作製および結合分子のスクリーニング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

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. (2010) Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology, *Pharmazie*, **65**, 93-96.

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. (2010) Generation of mouse macrophages expressing membrane-bound TNF variants with selectivity for TNFR1- or TNFR2, *Cytokine*, **50**, 75-83.

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. (2011) Development of a novel antibody

proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins., *Biomaterials*, **32**, 162-169.

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.

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.

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.

Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T, Yagi K (2010) Mucosal Vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials*, **31**, 5463- 5471.

Yagi K, Kawase M, Isoda K, Kondoh M (2010) Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function. *YAKUGAKU ZASSHI*, **130**, 537-543.

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.

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.

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.

Saeki R, Kondoh M, Uchida H, Yagi K (2010) Potency of Claudin-targeting as Antitumor Therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*, **2**, 47-51.

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.

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.

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.

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.

Takahashi A, Kondoh M, Suzuki H, Kodaka M, Yagi K (2011) Claudin as a target for drug development. *Curr Med Chem*, **18**, 1861-1865.

Yoshida T, Kondoh M, Yagi K (2011) Promising targets for anti-hepatitis C virus agents. *Curr Med Chem*, **18**, 1239-1244.

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*.

Takahashi A, Kondoh M, Kodaka M, Yagi K (in press) Peptides as tight junction modulators. *Curr Pharm Design*.

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*.

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

Abe Y., Nomura T., Kayamuro H., Kawara T., Arita S., Furuya T., Nagano K., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi

Y., Anti-inflammatory effects of a TNFR1-selective mutant with antagonistic activity on established murine collagen-induced arthritis., 14th International Congress of Immunology., Kobe (Japan), 22-27 Aug, 2010

Arita S., Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Furuya T., Itoh N., Yoshikawa T., Nagano K., Tsutsumi Y., Tsunoda S., The potential of IL-1 family cytokines as mucosal adjuvants for nasal influenza vaccine, Joint Meeting of the International Cytokine Society (ICS) and the International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR), Chicago (USA), 3-7 October, 2010.

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質蛋白質創出システムの開発., 第26回日本DDS学会学術集会, 平成22年6月 大阪

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

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

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

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

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

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

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

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

高橋梓、斉藤郁美子、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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

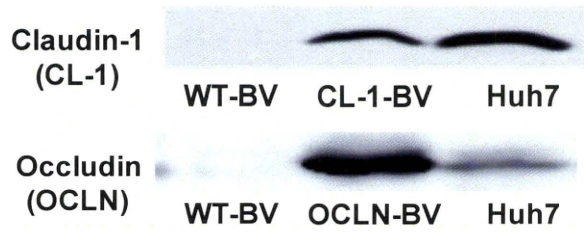
## **I. 研究協力者**

医薬基盤研究所

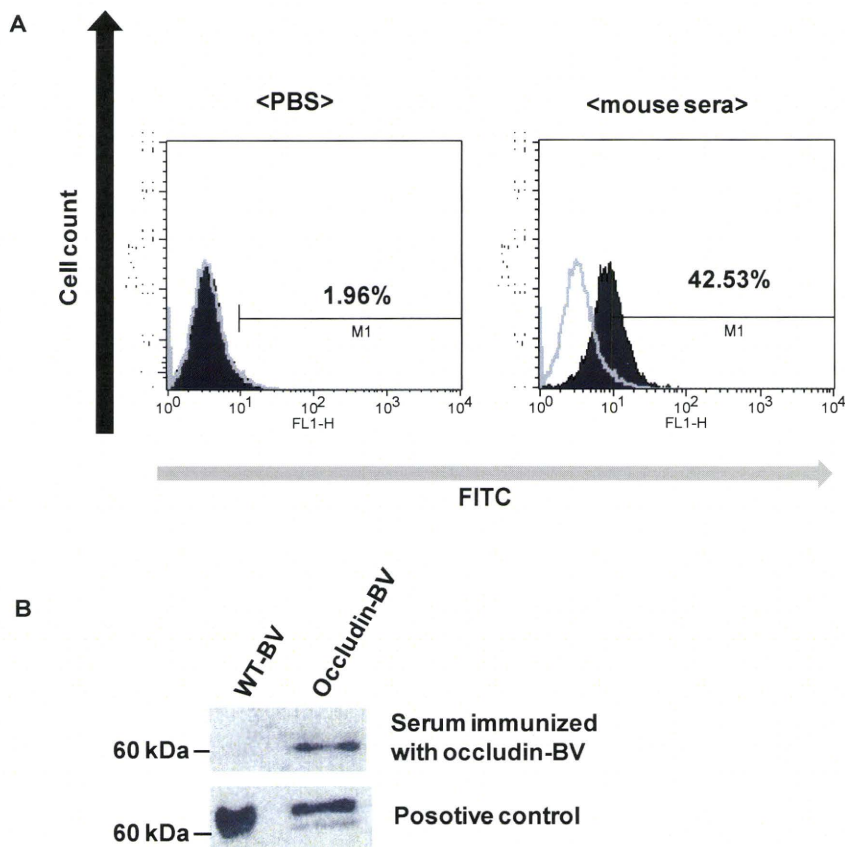
森久美子、井上雅己、趙秀麗、山下琢矢、有田修平、渡邊貴信、古屋剛、金崎聡一郎、前田祐香

大阪大学大学院薬学研究科

鈴木英彦

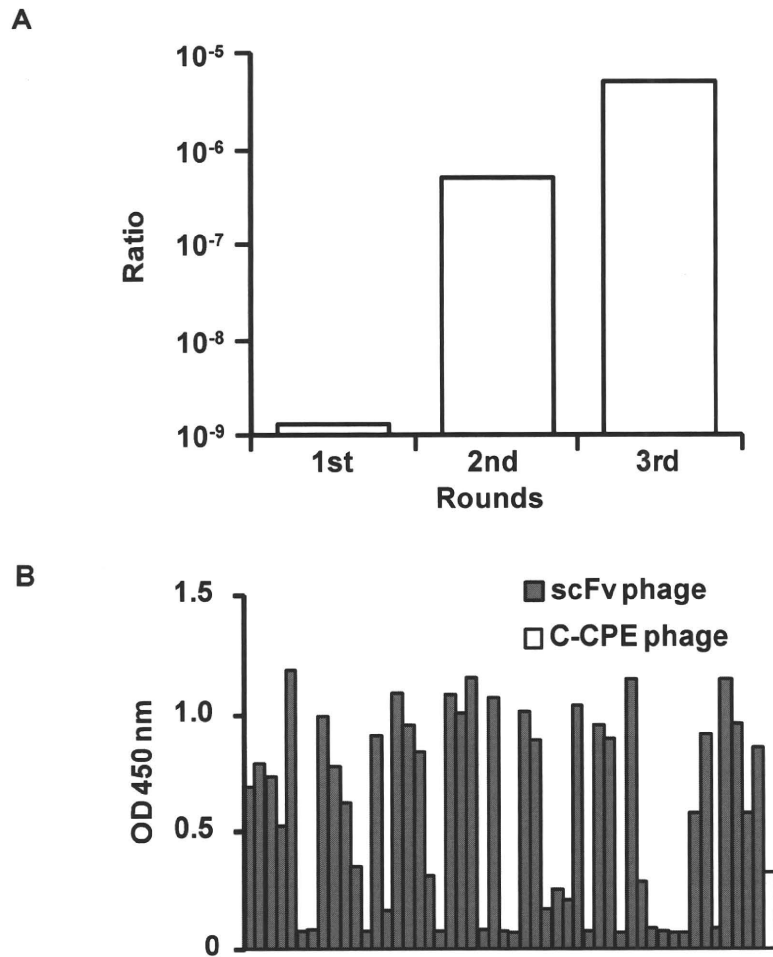


**Figure 1 HCV receptor –expressing BVs.**  
 BVs (0.1 mg/lane) were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting. BV and Huh7 cells were used as a negative and positive control, respectively.



**Figure 2 Induction of anti-claudin-1 or anti-occludin antibodies in mice immunized with claudin-1-BV or occludin-BV.**

A) HEK293/claudin-1 cells were incubated with the diluted mouse serum, followed by FACS analysis using FITC-labeled antibody. B) WT-BV or occludin-BV (0.5 mg/lane) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis with the mouse serum.



**Figure 3 Screening of claudin-1 bound scFv phages.**

A) Enrichment of phages with affinity to claudin-1-BV. Claudin-1-BV coated on immunotubes were incubated with the scFv phage library at  $3.32 \times 10^{12}$  CFU titer (1<sup>st</sup> input phage). The phages bound to claudin-1-BV were recovered (1<sup>st</sup> output phage). The claudin-1-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. B) Monoclonal analysis of scFv phages. Claudin-1-BV-bound phage clones were isolated from the 3<sup>rd</sup> output phages, and the interaction of the monoclonal phage with hCL1-BV was examined by ELISA with HRP-anti-M13 Ab.

**Table 1 Amino acid sequence of claudin-1 ScFv phage library**

| VL             | FR1                                 | CDR1                  | FR2                 | CDR2 | FR3                                   | CDR3   | FR4             | (G4S)3             |
|----------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------------|------|---------------------------------------|--------|-----------------|--------------------|
| <b>Clone 1</b> | DIVMTQSHKFKSTSL<br>GDRVSITC         | KASQDV<br>GITVA       | WYQQKPGQS<br>PKLLIY | XXXX | GVPDRFTGSGSGTDFTL<br>TISNVQSEDLADYFC  | XXXXXX | FGAGTKLEIKR     | GGGSGGGG<br>SGGGGS |
| <b>Clone 2</b> | DIVMTQSHKFMSTSL<br>GDRVITTC         | KASEDV<br>GSAVA       | WYQQKPG<br>QSPELLIY | XXX  | GVPDRFTGSGFRDFTL<br>TISNVQSEDLADYFC   | XXXXX  | FGAGTKLEIKR     | GGGSGGGG<br>SGGGGS |
| <b>Clone 3</b> | DIVMTQSHKFMSTSL<br>TSVGDVRTISC      | KASQDV<br>GSAVA       | WYQQKPG<br>QSPRLIY  | XXX  | GVPDRFTGSGGERTEFTL<br>TISNVQSEDLADYFC | XXXXX  | FGAGTKLEIKR     | GGGSGGGG<br>SGGGGS |
| <b>Clone 4</b> | DILMTQSPSSLTVTA<br>GEKVTVTC         | KSSQSLNLS<br>GNQKNYLT | WYQQKPGQP<br>PKLLIY | XXX  | GVPDRFTGSGSGTDFTL<br>TISNVQAEDLAVYYC  | XXXXXX | FGVGTKLELKR     | GGGSGGGG<br>SGGGGS |
| <b>Clone 5</b> | QVHLQQSGAELAEPPG<br>ASVKMSCKASGYTFT | SYRMT                 | WVKQRPG<br>QGLEWIG  | XXXX | KATLTADKSSSTAYMQL<br>SSLTFEDSAVYYCAR  | XXXXX  | WQQGTTLVSS      | GGGSGGGG<br>SGGGGS |
| VH             | FR1                                 | CDR1                  | FR2                 | CDR2 | FR3                                   | CDR3   | FR4             |                    |
| <b>Clone 1</b> | EVNLVESGGGSVQPG<br>GSLKLSCAASGFTFS  | DYGMH                 | WVRQAPEKG<br>LEWV   | XXXX | RFTISRDNKNTLFLQM<br>TSLRSEDAMYYCAR    | XXXX   | WQQGTTL<br>TVSS |                    |
| <b>Clone 2</b> | EVKLQPPGAELVKPGA<br>SVKLSCKASGYTFT  | SYWLH                 | WVKQRPG<br>QGLEWIG  | XXXX | KATLTVDKSSSTAYMQL<br>SSLTSEDSAVYYCAR  | XXXX   | WGTGTTV<br>TVSS |                    |
| <b>Clone 3</b> | EVKLVESGGGLVKPPG<br>SLKLSCAASGFTFS  | DYGMH                 | WVRQAPE<br>KGLEWVA  | XXXX | RFTISRDNKNTLFLQM<br>TSLRSEDAMYYCAR    | XXXX   | WQQGTSV<br>TVSS |                    |
| <b>Clone 4</b> | EVQLVESGGGLVQPPG<br>GSLKLSCAASGFTFT | DYYMT                 | WVRQPPG<br>MTLEWLG  | XXXX | RFTISRDNKNTLFLQM<br>NALRAEDSATYYCAR   | XXXX   | WQQGTTL<br>TVSS |                    |
| <b>Clone 5</b> | QIVLTQSPAIMASAPGE<br>KVTITC         | SASSS<br>ISYMH        | WFQKPGT<br>SPKLWI   | XXXX | GVPARFSGSGSGTSYSL<br>TISRMEAEDAATYYC  | XXXX   | FGSGPR<br>SPFP  |                    |

**Table 2 Amino acid sequence of occludin ScFv phage library**

| VL             | FR1                                  | CDR1              | FR2  | CDR2                  | FR3                                   | CDR3 | FR4             | (G4S)3             |
|----------------|--------------------------------------|-------------------|------|-----------------------|---------------------------------------|------|-----------------|--------------------|
| <b>Clone 1</b> | NNN                                  | NNN               | NNN  | NNN                   | NNN                                   | NNN  | NNN             | NNN                |
| <b>Clone 2</b> | DIQMTQSQKFMSTSL<br>VGDRVSVTC         | KASQNV<br>GTDVA   | XXXX | SASYRYS               | GVPDRFTGSGSGTDFTL<br>LTISNVQSEDLAEYFC | XXXX | FGAGTKLELKR     | GGGSGGGG<br>SGGGGS |
| <b>Clone 3</b> | DIVMTQSHKFMSTSL<br>VGDRVSITC         | KASQDV<br>STGVA   | XXXX | WASTRHRT              | GVPDRFTGSGSGTDYTL<br>LTISNVQAEDLALYYC | XXXX | FGGGTKLELKR     | GGGSGGGG<br>SGGGGS |
| <b>Clone 4</b> | DIVLNQSHKFMSTSL<br>GDRVSVTC          | KASQNV<br>ITNVA   | XXXX | SASYRYS               | GVPDRFTGSGSGTDFTL<br>LTISNVQSEDLADYFC | XXXX | FGGGTKLEIKR     | GGGSGGGG<br>SGGGGS |
| <b>Clone 5</b> | DIVMTQSQKFMSTSL<br>VGDRVSVTC         | RASQSV<br>GTNVA   | XXXX | SASYRYT               | GVPDRFTGSGSGTDFTL<br>FTISSVQAEDLAVYYC | XXXX | FGAGTKLEIKR     | GGGSGGGG<br>SGGGGS |
| VH             | FR1                                  | CDR1              | FR2  | CDR2                  | FR3                                   | CDR3 | FR4             |                    |
| <b>Clone 1</b> | EVKLMEGSGGLVKPPG<br>GSLKLSLSC        | AASGFTF<br>SDYGMH | XXXX | YISSGSSSTI<br>YYSDTVK | GRFTISRDNKNTLFLQ<br>MTSLKSEDAMYYCAR   | XXXX | LQSSSW<br>GQGTT |                    |
| <b>Clone 2</b> | QVQLQPPGTELVKPPG<br>ASVKMSCKASGYTFS  | SYWIT             | XXXX | NIYPGSGSI<br>NYNEKFKS | KATLTVDTASSTAYMQ<br>LSRLTSEDSAVYYCAR  | XXXX | WQQAPL<br>YSLP  |                    |
| <b>Clone 3</b> | QVQLQQSGAELARPPG<br>ASVKLSCKAAGYTFT  | TYGIS             | XXXX | EIYPRSGNT<br>YHNEKFKG | KASLTADKSSSTAYMEL<br>RSLTSEDSAVYYCAR  | XXXX | WGTGTTV<br>TVSS |                    |
| <b>Clone 4</b> | QVQLKQSGAEVVKPPG<br>ASVSIKCSKASGYAFS | SYWMN             | XXXX | QIYPGDGDS<br>NYTGKFKG | KATLTADKSSSTAYMQ<br>LSLSTSEDSAVYYCAR  | XXXX | WQQGTT<br>LQSSS |                    |
| <b>Clone 5</b> | EVKLVESGAELARPPG<br>SVKLSCKAS        | GYTFTTY<br>GIS    | XXXX | ENYPRSGN<br>TYNEKFKG  | KATLTADKSSSTAYMEL<br>RSLTSEDSAVYYCAR  | XXXX |                 |                    |