

出芽バキュロウイルス膜蛋白質発現系を利用したウイルス感染機構の解析

分担研究者 近藤 昌夫 大阪大学薬学研究科 准教授

研究要旨

現在、C型肝炎ウイルス（HCV）感染者は全世界で2億人、本邦では200万人と推定され、その数は毎年300～400万人ずつ増加している。現在のところ、C型肝炎に対する主な治療法としてウイルスの複製を阻害するペグインターフェロン・リバビリンの併用療法があり、その奏効率は50%であるにもかかわらず、副作用、高ウイルス量患者への効果の低さ、耐性ウイルスの出現などの問題が山積している。このような現状の中、HCV感染受容体に対するアンタゴニストは、低い副作用、高ウイルス患者への効果、耐性ウイルス出現の回避が期待されることから、C型肝炎治療・予防薬としての開発が望まれている。しかし、膜蛋白質である感染受容体は精製が困難であり、抗原性も低いことからHCV感染機構の生化学的な解明はほとんど進展しておらず、HCV感染受容体に対するアンタゴニストの創製は著しく立ち遅れている。

HCVの感染受容体はこれまでにCD81、Scavenger receptor class B type I（SR-BI）、claudin-1が知られており、最近、新規感染受容体としてoccludinが同定されたことから、HCV感染機構が明らかになりつつある。しかしHCVの感染機構は、感染受容体が複数存在することや感染受容体の生化学的な解析の遅れから、詳細な作用機序の解明が難航している。

そこで本研究は、出芽バキュロウイルス（BV）の膜蛋白質発現系を応用した感染受容体の生化学的な解析によりHCV感染機構の解明を行い、その結果を元にしてHCV感染受容体に対するアンタゴニストを創製することを目的とした。

平成21年度は、HCV感染受容体発現BVを用いたHCV感染機構解析の第一歩として、CD81、SR-BI、claudin-1、occludin発現BVの作製法を確立してきた。本年度は、本HCV受容体発現BVを用いたHCV感染阻害実験を行うとともに、二種類のHCV感染受容体を発現したBV作製条件を検討した。さらに、HCV受容体発現BVを用いた感染阻害分子創製に向けたパイロットスタディとして、claudin-1発現BV、occludin発現BV免疫条件を設定した。

C. 研究目的

本研究は、後述する本邦独自の膜蛋白質発現系

を有効活用することで、C型肝炎ウイルス（HCV）の感染機構を生化学的に解析し、本成果を基に

HCV 感染受容体アンタゴニストを作製することを目的としている。

現在までに、HCV の宿主細胞への侵入に関して、CD81、Scavenger receptor class B type I (SR-BI)、claudin-1 が感染受容体として機能していることが報告されている。最近、新たな HCV 感染受容体として occludin が同定され、宿主細胞への感染機構が明らかになりつつある。しかしながら、これら感染受容体の膜蛋白質は精製が難しく、また抗原性が低いことから、HCV 感染におけるこれら受容体の機能解析や受容体間の相互作用などの解明は遅々として進展していないのが現状である。

近年、出芽バキュロウイルス (BV) が目的膜蛋白質をウイルス膜上に立体構造・機能を保持したまま高効率に提示可能であることを東大先端研の浜窪隆雄博士らが見出した。出芽型 BV を用いた本方法では、精製が困難である膜蛋白質の機能解析が可能となり、更に複合体を形成する一連の膜蛋白質の機能解析にも応用できることが分かっている。これらの利点から、出芽型 BV 発現系は複数の受容体を介して感染する HCV の受容体機能解析において非常に適した解析ツールであるといえる。

以上を踏まえ、HCV 感染において主要な役割を担っている 4 受容体の単独、もしくは複合体での生化学的解析を行うため、出芽 BV 発現系を利用した解析法を発想した。平成 20 年度は、HCV 感染機構の解析に先立って、ウイルス感染機構が明らかとなっている 5 型アデノウイルス感染機構をモデル系として利用し、感染受容体発現 BV がウイルス感染機構の解析に応用可能であることを確認し CD81 発現 BV、SR-BI 発現 BV、claudin-1 発現 BV および occludin 発現 BV の作製に成功した。これらの成果を踏

まえ、本年度は、各種 HCV 受容体発現 BV の HCV 感染阻害活性を解析し、複数の HCV 受容体を発現した BV 作製条件の確立を試みた。さらに、HCV 受容体発現 BV を用いた一本鎖抗体 (scFv) 作製のパイロットスタディとして、claudin-1 発現 BV、occludin 発現 BV 免疫マウスから脾臓を回収した。尚、本脾臓を用いた代表者阿部が scFv ライブラリの作製を試みている (詳細は総括研究報告部分を参照)。

D. 研究方法

1. HCV 感染受容体発現 BV の作製

1.1. pFastBac-CD81, SR-BI, claudin-1, occludin の作製

HCV 感染受容体(CD81、SR-BI、claudin-1、occludin)発現 BV の作製は以下の要領でおこなった。

CD81 cDNA フラグメントは pCR4-CD81 をテンプレートとして用いた PCR 法より増幅した。pCR4-CD81 溶液(0.1 mg/ml) 1 µl、10 x PCR buffer for KOD plus 5 µl、2.5 mM MgSO₄ 2 µl、2.5 mM dNTP mix 5 µl、10 µM primers 3 µl、滅菌精製水 30 µl、5 U/µl Takara kod plus 1 µl を混合し PCR を行った。CD81 クローニング用のプライマー配列は、forward;5-aaggaaaaaagcggccgcatgggagtg gagggctgca-3, reverse;5-ccgctcgagtcagtgatggtgatggtgatggtacacggagctgttccg-3 とした。PCR の条件は、94 °C 2 min の後、94 °C 30 sec、59 °C 30 sec、68 °C 30 sec を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である XhoI と NotI により切断した。トランスファーベクター pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある XhoI、NotI サイトを用いて PCR 産物とラ

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-5α にトランスフォーメーションし、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析、シーケンス解析を行い、pFastBac-CD81 を作製した。

SR-BI cDNA フラグメントは pcDNA3.1-SR-BI から SpeI、HindIII サイトを用いて切り出し、SpeI、HindIII サイトを用いて pFastBac1 に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-5α にトランスフォーメーションし、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析、シーケンス解析を行い、pFastBac-SR-BI を得た。

Claudin-1 cDNA フラグメントは pEAK-Claudin-1 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。p EAK-Claudin-1 溶液(0.1 mg/ml) 1 μl、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μl、2.5 mM MgSO₄ 2 μl、2.5 mM dNTP mix 5 μl、10 μM primers 3 μl、滅菌精製水 30 μl、5 U/μl Takara kod plus 1 μl を混合し PCR を行った。Claudin-1 クローニング用のプライマー配列は、forward;5-gctctagaatggattacaaggatgacgacgataagatggccaacgcggggctgcagctg-3, reverse;5-cggggtacctcacacgtagtcttccccgctggaaggtgcagg-3 とした。PCR の条件は、94 °C 2 min の後、94 °C 30 sec、64 °C 30 sec、68 °C 1 min を 32 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である XbaI と KpnI により切断した。トランスファーベクター pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある XbaI、KpnI サイトを用いて 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-5α にトランスフォーメーションし、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析、シーケン

ス解析を行い、pFastBac-claudin-1 を得た。

Occludin cDNA フラグメントは phOc6 をテンプレートとして用いた PCR により増幅した。phOc6 溶液(0.1 mg/ml) 1 μl、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μl、2.5 mM MgSO₄ 2 μl、2.5 mM dNTP mix 5 μl、10 μM primers 3 μl、滅菌精製水 30 μl、5 U/μl Takara kod plus 1 μl 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;5-gactatgtcatccaggcctcttgaagt-3, reverse;5-cccaagcttctatgttttctgtctatcatagtctcc-3 とした。PCR の条件は、94 °C 2 min の後、94 °C 30 sec、53 °C 30 sec、68 °C 2 min を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、SpeI、HindIII サイトを用いて、pFastBac1 に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-5α にトランスフォーメーションし、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析、シーケンス解析を行い、pFastBac-occludin を得た。

1.2. Bacmid の作製

作製したトランスファーベクター大腸菌 DH10Bac (Invitrogen 社) にトランスフォーメーションし、50 μg/ml kanamycin, 7 μg/ml gentamicin, 10 μg/ml tetracycline を含み、2% X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside) 100 μl および 50 mM IPTG 100 μl を塗布した LB 培地プレート (IPTG, X-gal 含有 TGK plate) 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 法により目的遺伝子が挿入されていることを確認した。精製した bacmid 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μl、10 x LA PCR buffer 2 μl、25 mM

MgCl₂ 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'-tgtaa aacgacggccagt-3)、Reverse primer (5'-ggaaa cagctatgaccatg-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。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 DH5a 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取得した。

1.3. BV の作製

培養用 6 穴プレートに 1×10^6 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、泡立て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、 2×10^6 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 2×10^6 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 Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) 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。

4×10^6 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°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。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 μl 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。

尚、2 種類の P2 ストックを感染させることで、ダブル HCV 受容体発現 BV の作製を行った。

1.4. BV の発現確認

蛋白質量として 10 µg を供し 15 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5% スキムミルク含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッ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 に希釈した抗 claudin-1 抗体 (ZYMED)、抗 occludin 抗体 (ZYMED)、抗 SRB1 抗体 (Novus Biologicals)、もしくは抗 CD81 抗体 (BD Biosciences Pharmingen 社) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回洗浄し、HRP 標識した 2 次抗体と 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) を用いて発光させ、暗室にて露光した X 線フィルム (KONICA MINOLTA MEDICAL&GRAPHIC, INC., Japan) を現像し、各種蛋白質の検出を行った。

1.5. 感染阻害実験

Huh 7 細胞を 96 well plate (Becton, Dickinson and Company, USA) 2×10^4 cells /well で播種し、37 °C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。試験管内で BV、HCV pseudovirus (HCVpv) および抗 gp64 抗体 (Santa cruz biotechnology 社)、BV の哺乳類細胞への侵入を阻害する抗体) を室温で 2 時間インキュベートし、感染受容体蛋白質と HCVpv を相互作用させた。培養液を除去し、BV、HCVpv 混合液を細胞に 50 µl/well で添加し、37 °C、5% CO₂ の条件下で 30 分間培養し、HCVpv を細胞に感染させた。その後、ウイルスを含む培地を除去し、新しい DMEM 培地を 100 µl/well で添加後、37 °C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。その後、新しい DMEM 培地に交換し 24 時間培養した。Luciferase assay system LT2.0 (ピッカジー、東洋インキ社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、HCVpv の感染効率を評価した。

1.6. 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 hCL1-BV 0.25 mg を尾静脈に投与し、3 日後に脾臓を摘出した。

1.7. 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た。

C. 結果

研究結果はD項にまとめて記載した。

D. 考察

1. HCV 感染受容体発現 BV を用いた HCV 感染受容体の解析

昨年度、アデノウイルスベクターの感染受容体発現 BV がアデノウイルスベクターの感染を阻害することを見出し、BV システムがウイルスの感染受容体解析ツールとして有用である可能性を見出し、さらに HCV 感染受容体 (CD81、SR-BI、claudin-1、occludin) を発現した BV の創製に成功した (Fig. 1)。

そこでまず本年度は、各種 HCV 感染受容体発現 BV を用いて、HCV 感染阻害活性を解析した。HCVpv の Huh7 細胞への感染を指標に検討したところ、HCV 感染受容体発現 BV を処理しても HCVpv 感染に伴うルシフェラーゼ活性の低下は全く観察されなかった (Fig. 2)。ポジティブコントロールの抗 CD81 抗体処理では HCVpv の感染阻害が観察されていたことから、少なくとも本系では単独の HCV 感染受容体では HCVpv 感染を阻害できない可能性が考えられる。

2. 受容体発現 BV の作製

前項の結果を踏まえ、2 受容体発現 BV の調整条件の設定を試みた。CD81 発現 BV、SR-BI 発現 BV、claudin-1 発現 BV、occludin 発現 BV の P2 ストックをある一定の濃度で感染させることで、CD81/SR-BI 発現 BV、CD81/claudin-1 発現 BV、CD81/occludin 発現 BV、SR-BI/claudin-1 発現 BV、SR-BI/occludin 発現 BV を調整できることを見出した (Fig. 3)。

3. Claudin-1 発現 BV、occludin 発現 BV の免疫

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 の免疫条件の検討を試み、自己免疫疾患マウスを用いることで claudin-1、occludin に対する抗体価が上昇することを確認した。

E. 結論

CD81 発現 BV、SR-BI 発現 BV、claudin-1 発現 BV、occludin 発現 BV を用いて HCVpv の Huh7 細胞に対する感染を解析したところ、いずれの BV 処理でも HCVpv の感染阻害は観察されなかった。昨年度の検討では、アデノウイルス感染受容体発現 BV 処理によってアデノウイルスベクターの感染が阻害されていたことから、HCV 感染には複数の感染受容体が関与しているものと推察される。これまでの報告から、HCV の感染には複数の受容体が関与している可能性が示唆されていることから、BV 発現系を用いた解析系が HCV 感染評価系として応用

できるものと推察された。

BV システムの特徴は、複数の膜蛋白質を膜表面上に提示できる点にある。そこでまず、2種類の HCV 感染受容体を発現している BV を調整条件の設定を試みた。今後は、ダブル受容体発現 BV での HCV 感染機構の解析を進めると同時に、トリプル、クアドラ受容体発現 BV の調整条件を設定していく予定である。

また、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 の免疫条件を設定した。最終年度は、HCV 感染受容体発現 BV での感染解析結果を可及的速やかにフィードバックすることで最適な感染受容体アンタゴニスト創製系の構築を図る。尚、本条件を用いて、代表者阿部が採取した免疫マウス脾臓から一本鎖抗体ライブラリを作製している。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

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 CCl₄Induced 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**, 431-437.

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

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、斉藤郁美子、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、斉藤郁美子、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；ファーシ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、斉藤郁美子、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

鈴木英彦

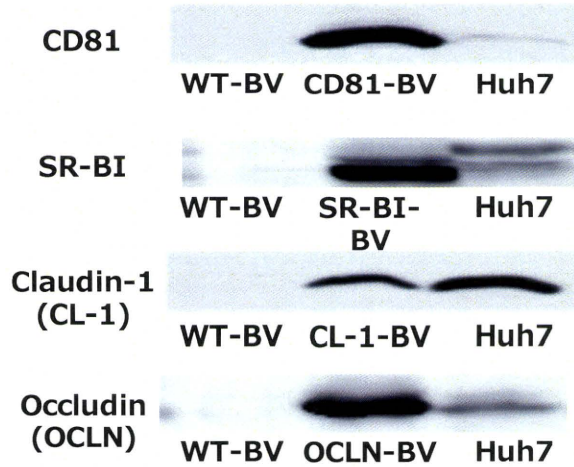


Figure 1 HCV receptor –expressing BVs.

BVs were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting. BV and Huh7 cells were used as a negative and positive control, respectively.

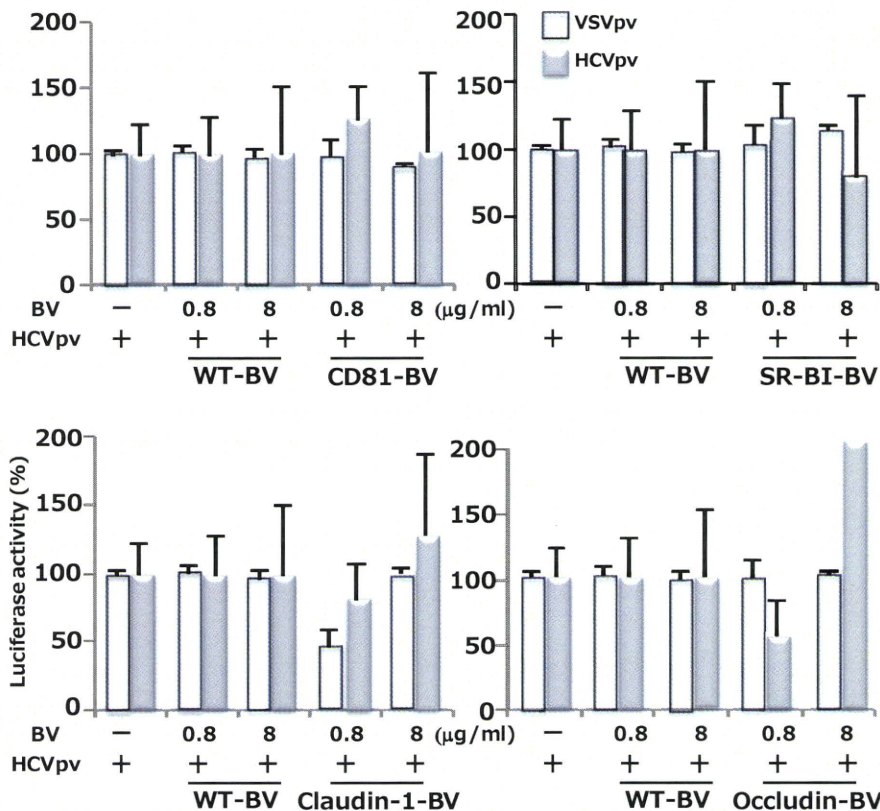


Figure 2 Effect of HCV receptors-expressing BVs on infection of HCVpv to Huh7 cells.

After 2 h of incubation of BVs and HCVpv, Huh7 cells were treated with the mixture of BVs and HCVpv for 24 h. The cells were lysed, and the luciferase activity was measured. Data are means \pm SD (n=3).

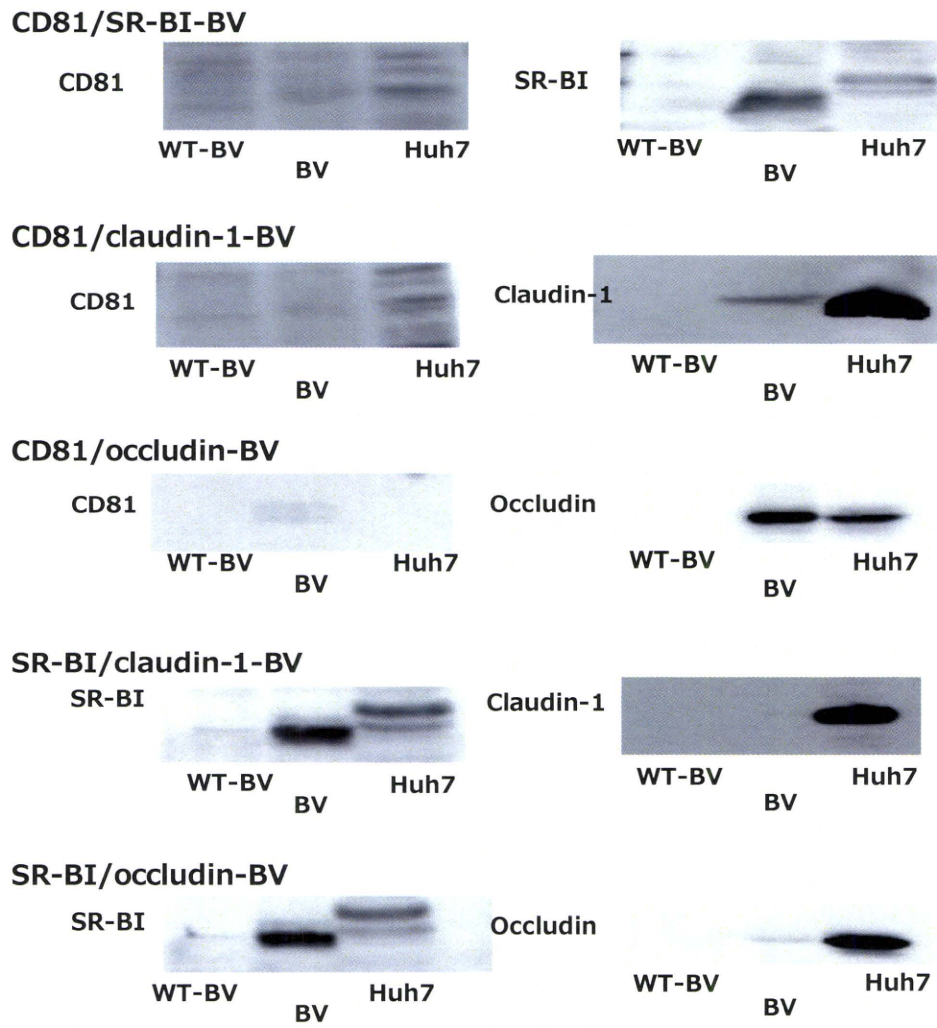


Figure 3 Preparation of double HCV receptors-expressing BVs. BVs were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting. BV and Huh7 cells were used as a negative and positive control, respectively.

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
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	<i>Pharmazie</i>	65	93-96	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	<i>Cytokine</i>	50	75-83	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	<i>Biomaterials</i>	32	62-169	2011
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	<i>Pharmazie</i>	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	<i>Biol Pharm Bull</i>	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	431-437	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	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	<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 modulators	<i>Curr Pharm Design</i>			accepted

National Institute of Biomedical Innovation (NiBio)¹; Graduate School of Pharmaceutical Sciences², Osaka University; The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics³, Osaka University, Osaka, Japan

Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology

T. NOMURA^{1,2*}, Y. ABE^{1*}, H. KAMADA^{1,3}, M. INOUE¹, T. KAWARA^{1,2}, S. ARITA^{1,2}, T. FURUYA^{1,2}, K. MINOWA¹, Y. YOSHIOKA^{2,3}, H. SHIBATA¹, H. KAYAMURO^{1,2}, T. YAMASHITA^{1,2}, K. NAGANO¹, T. YOSHIKAWA^{1,2}, Y. MUKAI², S. NAKAGAWA^{2,3}, S. TSUNODA^{1,2,3}, Y. TSUTSUMI^{1,2,3}

Received August 7, 2009, accepted August 14, 2009

Shin-ichi Tsunoda, Ph.D., Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan
tsunoda@nibio.go.jp

*These authors contributed equally to the work.

Pharmazie 65: 93–96 (2010)

doi: 10.1691/ph.2010.9265

Tumor necrosis factor- α (TNF), which binds two types of TNF receptors (TNFR1 and TNFR2), regulates the onset and exacerbation of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease. In particular, TNFR1-mediated signals are predominantly related to the induction of inflammatory responses. We have previously generated a TNFR1-selective antagonistic TNF-mutant (mutTNF) and shown that mutTNF efficiently inhibits TNFR1-mediated bioactivity *in vitro* and attenuates inflammatory conditions *in vivo*. In this study, we aimed to improve the TNFR1-selectivity of mutTNF. This was achieved by constructing a phage library displaying mutTNF-based variants, in which the amino acid residues at the predicted receptor binding sites were substituted to other amino acids. From this mutant TNF library, 20 candidate TNFR1-selective antagonists were isolated. Like mutTNF, all 20 candidates were found to have an inhibitory effect on TNFR1-mediated bioactivity. However, one of the mutants, N7, displayed significantly more than 40-fold greater TNFR1-selectivity than mutTNF. Therefore, N7 could be a promising anti-autoimmune agent that does not interfere with TNFR2-mediated signaling pathways.

1. Introduction

The severity and progression of inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease and ulcerative colitis, can be correlated with the serum level of tumor necrosis factor- α (TNF). Thus, TNF blockades such as anti-TNF antibodies and soluble TNFRs, which neutralize the activity of TNF, have been used to treat various autoimmune diseases in clinical practice. However, TNF blockades inhibit both TNFR1 and TNFR2 signaling. Thus, treatment with these drugs can lead to an increased risk of infection (Gomez-Reino et al. 2003; Lubel et al. 2007) and lymphoma development (Brown et al. 2002). TNF has been reported to induce inflammatory response predominantly through TNFR1 (Mori et al. 1996), whereas activation of the immune response is initiated *via* TNFR2 (Kim et al. 2006; Kim and Teh 2001; Grell et al. 1998). Therefore, blocking TNFR1-signaling, but not TNFR2-signaling, is a promising strategy for the safe and effective treatment of inflammatory diseases, which overcomes the risk of infection associated with the use of non-specific TNF blockades (Kollias and Kontoyiannis 2002). In our previous studies, we used the phage display technique (Imai et al. 2008; Nagano et al. 2009; Nomura et al. 2007) to generate a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF (mutTNF) that blocks TNFR1-mediated signals but not those of TNFR2 (Shibata et al. 2008b). Moreover, mutTNF showed superior therapeutic effects using an inflammatory disease mouse model (Shibata et al. 2008a). Thus, a drug for autoimmune diseases that selectively targets TNFR1 is anticipated to display

higher efficacy and safety compared to existing treatments. In this study, we have attempted to isolate TNFR1-selective antagonists with higher TNFR1-selectivity than previous mutTNF by constructing a modified phage library displaying mutTNF-based variants.

2. Investigations, results and discussion

Here, we attempted to improve the TNFR1-selectivity of mutTNF using a phage display technique. Firstly, we constructed a phage library of TNF mutant using mutTNF as template. We designed a randomized library of mutTNF to replace the six amino acid residues (aa 29, 31, 32, 145–147) in the predicted receptor binding site. As a result of the 2-step PCR, we confirmed that the mutTNF mutant library consisted of 4×10^7 independent recombinant clones (*data not shown*). To enrich for TNFR1-selective antagonists, the phage library was subjected to two rounds of panning against TNFR1 on a Biacore biosensor chip. After the second panning, supernatants of single clone of *E. coli* TG1 including phagemid were randomly collected and subjected to screening by bioassay and ELISA to evaluate their bioactivity and affinity against each TNF receptor, respectively (*data not shown*). Consequently, twenty candidates of TNFR1-selective mutants with antagonistic activity were isolated (Table).

Next, we determined the detailed biological properties of each candidate. Positive clones were engineered for expression in

Table: Amino acid sequences and biological properties of TNFR1-selective antagonist candidates

TNF	Amino acid sequence						Relative affinity (% K_d) ^{a)}			Bioactivity via TNFR1	
	29	31	32	145	146	147	TNFR1	TNFR2	TNFR1 ^{b)} /TNCR2	Agonistic ^{c)} activity	Antagonist ^{d)} activity
mutTNF	L	R	R	A	E	S	100.0	100.0	1.0	-	+
N1	S	-	W	R	-	-	550.0	21.6	25.5	+	-
N2	S	-	W	-	-	-	200.0	N.D.	N.D.	+	-
N3	S	-	W	R	D	-	550.0	44.8	12.3	-	±
N4	S	-	W	-	D	-	183.3	19.1	9.6	±	-
N5	S	-	W	-	S	E	275.0	25.8	10.7	±	-
N6	A	D	T	-	-	-	200.0	21.6	9.3	±	-
N7	S	N	D	D	A	-	104.7	2.5	41.9	-	+
N8	R	I	A	D	-	-	169.2	26.7	6.3	+	-
N9	H	H	-	-	N	G	169.2	33.0	5.1	+	-
N10	T	N	N	-	-	-	314.3	28.6	11.0	±	-
N11	T	N	N	S	-	-	275.0	18.3	15.0	±	-
N12	F	S	T	-	-	-	440.0	58.0	7.6	+	-
N13	F	S	T	-	S	E	440.0	73.9	6.0	+	-
N14	R	W	Y	T	N	T	314.3	19.2	16.4	+	-
N15	F	K	T	N	A	T	275.0	24.1	11.4	±	-
N16	M	L	T	N	S	T	367.0	7.7	47.7	+	-
N17	Y	L	A	T	H	T	137.5	1.6	86.0	±	-
N18	Y	L	A	T	H	-	110.0	4.7	23.4	±	-
N19	V	Q	Y	N	N	-	367.0	N.D.	N.D.	±	-
N20	F	S	T	P	Q	R	244.4	N.D.	N.D.	±	-

Conserved residues compared with mutTNF are indicated by an em dash (-). The affinity values are shown as relative values (% mutTNF). N.D.: not detected

^{a)} Affinity for immobilized TNFR1 and TNFR2 was assessed by SPR using BIACore3000. The dissociation constant (K_d) of TNF mutants were calculated from their sensorgrams by BIAEVALUATION 4.0 software

^{b)} TNFR1-selectivity was defined as relative affinity [TNFR1]/relative affinity [TNFR2] for mutTNF

^{c)} TNFR1-mediated agonistic activity was measured, using a HEP-2 cell cytotoxicity assay. The intensity in agonistic activity was evaluated as the following. Cell viability at 10^4 ng/ml each mutant, 0–25% (of non treatment); (+), 25–50%; (±), 50–100%; (-)

^{d)} TNFR1-mediated antagonistic activity of mutant TNFs on wtTNF induced cytotoxicity in HEP-2 cells was measured. The intensity in antagonistic activity was evaluated as the following. Cell viability at 10^5 ng/ml each mutant in present of 5 ng/ml wtTNF, 0–25% (of non treatment); (-), 25–50%; (±), 50–100%; (+)

E. coli BL21ADE3 and each recombinant protein was purified as described previously (Yamamoto 2003). As anticipated, gel electrophoresis confirmed the mutant TNF proteins to have a molecular weight of 17 kDa. Moreover, gel filtration chromatography established that each mutant forms a homotrimeric complex in solution, as is the case for wild-type TNF (wtTNF) (data not shown). To analyze the binding properties of these TNFR1-selective TNF candidates, their dissociation constants (K_d) for TNFR1 and TNFR2 were measured using a surface

plasmon resonance (SPR) analyzer. Our previous SPR analysis showed that although mutTNF has an almost identical affinity to TNFR1 as to wtTNF, it displays more than 17,000-fold greater selectivity for TNFR1. As shown in the Table, all the candidates exhibited higher affinity for TNFR1 than mutTNF. Furthermore, clones N1, N7, N16, N17 and N18 showed more than 20-fold higher TNFR1-binding selectivity compared to mutTNF. To examine the bioactivity of all candidates *via* TNFR1, we subsequently performed a cytotoxicity assay using

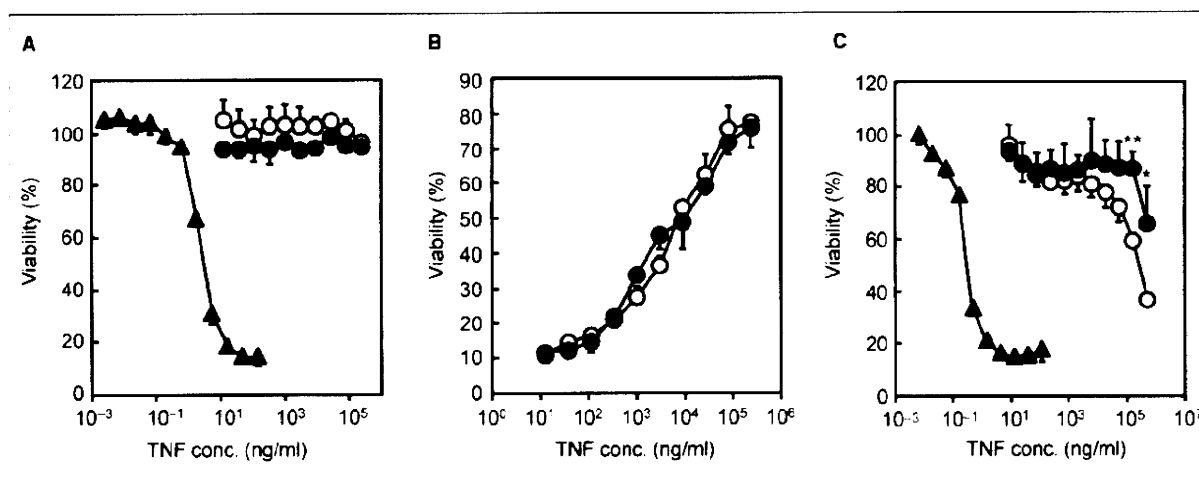


Fig. 3: Bioactivities and antagonistic activities of N7. (A) To determine the TNFR1-mediated bioactivities, several dilutions of wtTNF (closed triangle), mutTNF (open circle) and N7 (closed circle) were added to L-M cells and incubated for 4 h at 37 °C. (B) Indicated dilutions of mutTNF (open circle) and N7 (closed circle) and constant of wtTNF (5 ng/ml) were mixed and added to L-M cells and incubated for 4 h at 37 °C. TNFR1-mediated antagonistic activity was assessed as described in the Experimental section. (C) To determine the TNFR2-mediated bioactivities, diluted wtTNF (closed triangle), mutTNF (open circle) and N7 (closed circle) were added to hTNFR2/mFas-preadipocyte cells and incubated for 48 h at 37 °C. After incubation, cell viability was measured using the methylene blue assay. Data represent the mean ± S.D. and were analyzed by Student's t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs mutTNF)