

20111012A

**厚生労働科学研究費補助金**

**医療機器開発推進研究事業**

**Claudin binder修飾ナノリポソームを利用した上皮癌の早期診断・治療法の開発に  
関する研究**

**平成23年度 総括研究報告書**

**研究代表者 近藤 昌夫**

**平成24（2011）年 4月**

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

Claudin binder修飾ナノリポソームを利用した上皮癌の早期診断・治療法の開発に  
関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成24（2011）年 4月

## 目 次

I. 総括研究報告	
Claudin binder修飾ナノリポソームを利用した上皮癌の早期診断・治療法の開発 に関する研究	----- 1
近藤昌夫	
II. 分担研究報告	
1. Claudin binder修飾リポソームの創製に関する研究	----- 25
鈴木亮	
2. Claudin binderの創製に関する研究	----- 29
阿部康弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 36
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 40

代表研究者 近藤 昌夫 大阪大学薬学研究科 准教授

## 研究要旨

本研究は、世界屈指のナノリポソーム技術および claudin (CL) binder 技術を有効活用し、上皮細胞癌化の超早期イベント『分裂軸の回転』を認識する初めての癌の低侵襲性早期診断・治療用ナノリポソームを創出し、医薬基盤研究所、大阪大学が中核となる先端医療開発特区(スーパー特区)と密接に連携し、ナノメディシンとしての実用化を目指すものである。

周知のように、癌克服に向けた最重要戦略は、癌を早期に発見し、早期に治療することであり、腫瘍特異的抗原を利用した既存の癌診断検出感度( $10^9$  個以上の癌細胞)を凌駕する、新たな原理に基づく癌診断・治療法の開発が癌克服の成否を握っている。ナノリポソームは親水性・疎水性抗癌剤をデリバリーできること、リガンド分子を高密度表面修飾できることから、近未来における癌治療を担うナノメディシンとして期待されているものの、癌特異的リガンド分子開発および有効かつ簡便なイメージング法開発の遅延と相俟って、悪性腫瘍の 90 %を占める上皮癌に有効なナノメディシン開発は著しく遅れている。

現在までに当研究グループでは、独自の CL binder を用いて非侵襲性投与方法 (PCT/JP2008/61723)および CL 指向性抗癌剤を創製、機能性蛋白質創出技術を用いて新規 CL binder の作製を推進し、独自のリガンド修飾脂質技術(WO2006/028129)、超音波造影ガス封入ナノリポソーム技術(バブルナノリポソーム)(特開 2005-168312)を用いて癌ターゲティング、血栓部位の超音波造影に成功している。本課題は、これら独自の技術を融合し、『分裂軸の回転』に伴い細胞表面に露出する CL を標的とした低侵襲性早期診断・治療法の創出を試みるものである。

平成 21-22 年度の検討により、既存の CL-4 binder である C-CPE を用いて CL を利用した癌治療戦略の可能性を詳細解析、claudin 発現ががん細胞の増殖・転移能亢進に関与していることを見出した。C-CPE 修飾リポソームを作製したところ、CL-4 指向性が付与されていたものの、抗がん剤封入リポソームでは十分な *in vitro* 抗癌活性が観察されなかった。そこで本年度は、C-CPE に比して物性に優れた新規 CL binder の創製を試みた。

### A. 研究目的

本研究は、独自の claudin (CL) binder およびナノリポソーム技術を融合し、上皮細胞癌化超早期イベント『分裂軸の回転』に伴い局在性が変化する密着結合 (TJ)構成蛋白質 CL を利用した、初めての上皮癌早期診断・治療用ナノメディシンを開発することを目的とする。

依然として悪性腫瘍は人類の前に立ちはだかる大きな壁であり、本邦では年間 30 万人、世界では 700 万人の人が癌で命を落している。また、悪性腫瘍の 90 %以上は、肺癌、胃癌等に代表される上皮由来

の癌であり、上皮癌に対する治療は、外科的手術による病巣の切除や抗癌剤による化学療法・放射線治療が主に行われているが、末期や化学療法に耐性をもつ癌には有効な治療法が無く、また化学療法には脱毛・嘔吐・骨髄抑制等の副作用が伴う。近年、分子標的治療薬や癌細胞に対する DDS 等次世代の癌治療法の開発が進んでいるが、未だ癌の根治には至っていない。また、癌による死因の多くは転移によるものであることから、転移癌を含めた上皮由来の癌に対する有効かつ安全な治療法の開発が、癌克服の鍵を握っていると考えられる。さらに癌克服の

最重要基本戦略は癌を早期に発見し、早期に治療することにあり、癌細胞特異的抗原を利用した既存の癌診断の検出感度(10<sup>9</sup>個以上の癌細胞)を凌駕する、新たな癌診断・治療法の開発が急務となっている。

タイトジャンクション(TJ)は細胞間隙の物質透過を制御し、細胞の極性を維持する細胞間結合であり、組織・生体の恒常性の維持を担っている。近年、上皮の癌化の過程で、TJの機能崩壊に伴う細胞極性の消失、細胞の異常増殖の発生等が示唆されている。上皮細胞の極性が崩壊すると、細胞はコンタクトインヒビション等の正常な増殖制御から逸脱し、腫瘍塊を形成し始める。また、分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、細胞間隙面に局在するCLを細胞表面に露出した状態で増殖を開始することから、CLリガンドを利用すれば癌化早期イベント『分裂軸の回転』を利用した新規癌診断・治療法の開発に繋がると考えられる。

以上の背景を踏まえ、平成22年度までに、既存のCL-4 binder (C-CPE)と蛋白合成阻害因子(PSIF)との融合蛋白質を作製し、CLを標的とした癌治療戦略の可能性を検証した。さらに、claudin 発現ががん細胞の増殖・転移能亢進に関与していることを見出した。C-CPE修飾リポソームはCL-4指向性を有していたものの、抗がん剤封入リポソームでは十分なin vitro 抗癌活性が観察されなかった。そこで本年度は、引き続き、C-CPEに比して物性に優れた新規CL binderの創製を試みた。

## B. 研究方法

### B.1. C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体発現ベクターの作製

C-CPE 変異体遺伝子を pET-16b(Novagen Inc.)に組み込んだプラスミドを用いて、発現ベクターの作製を試みた。C-CPE194<sub>N309A</sub> の発現ベクター作製には従来型 C-CPE の N309A 変異体(C-CPE<sub>N309A</sub>)を、C-CPE194<sub>S313A</sub> の発現ベクター作製には従来型 C-CPE の S313A 変異体(C-CPE<sub>S313A</sub>)を用い、*NheI* および *EcoRI*(New England Biolabs)処理して得られたDNA断片(518 bp)を C-CPE194 発現ベクターの

同部位に挿入した。C-CPE194<sub>N309A/S313A</sub> の発現ベクター作製では C-CPE194<sub>S313A</sub> 発現ベクターを鋳型とし、forward primer として 5'-CTC GCT AGC AAA ATT GTT GAT TTT TAA-3' (the underline indicates *NheI* site)、reverse primer として 5'-GGA TCC TTA AAA TTT TTG AAA TAA TAT TGC ATA AGG GTA TGC TCT-3' (the underline indicates *BamHI* site)を用いてPCRを行った。また、C-CPE205<sub>N309A/S313A</sub> 発現ベクター作製では、C-CPE194<sub>N309A/S313A</sub> の発現ベクターを *NheI* および *EcoRI* 処理し得られたDNA断片(518 bp)を C-CPE205 発現ベクターの同部位に挿入した。発現プラスミドを大腸菌 DH5 $\alpha$  (TOYOBO Co. Ltd.) と氷上で15分間なじませた後、42°Cでヒートショックを行い、氷上で3分間静置した。予め温めておいたSOC培地を加え、37°Cで50分培養後、100  $\mu$ g/ml ampicilin (Sigma-Aldrich Corp.)を含むLB agar (Invitrogen Corp.) (LAプレート)に播種し、一晩37°Cで培養した。

翌日、任意のコロニーを100  $\mu$ g/ml ampicilinを含むLB培地(Invitrogen Corp.) (LA培地)3 mlにピックアップし一晩振盪培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。PrimerとしてT7 promoterを用い、ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)でサンプル調製後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)でDNAシーケンスを確認した。

### B.2. C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体の発現誘導

C-CPE 変異体発現プラスミド 1  $\mu$ l を BL21 (DE3) (Novagen Inc.) 10  $\mu$ l に加えてヒートショック法にてトランスフォーメーションし、LAプレートに播種して一晩培養した。任意のクローンをLA培地3 mlにピックアップし、37°Cで一晩振盪培養後、LA培地2 mlに前培養した大腸菌液50  $\mu$ l ずつ加え、37°Cで2時間振盪培養した。その後、isopropyl- $\beta$ -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG; Wako Pure Chemicals Industries)を終濃度0、0.1、0.25、0.5、0.8、1.0 mMとなるように添加し、37°Cで3時間振盪培養した。遠心



して大腸菌を回収し、200  $\mu$ l の 1×SDS buffer[62.5 mM Tris-HCl、5% 2-mercaptoethanol、2% sodium dodecyl sulfate ( SDS )、10% glycerol、0.001% bromophenol blue]に懸濁し、氷冷しながら超音波処理を行い大腸菌を破碎した。95°Cで5分間加熱処理後、14,000 rpm で15分間遠心し、上清をサンプルとした。15%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行い、milliQ 水で洗浄後、coomassie brilliant blue (CBB; Bio-Rad Laboratories)で染色した。MilliQ 水で洗浄した後、C-CPE 変異体が多く産生されている IPTG 濃度をタンパク質の誘導条件とした。

### B.3. C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体の可溶化

C-CPE 変異体発現プラスミド 1  $\mu$ l を BL21(DE3) 10  $\mu$ l に加えてヒートショック法にてトランスフォーメーションし、LA プレートに播種して一晚培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 100 ml にピックアップし、37°C で一晚振盪培養した。翌日、100  $\mu$ g/ml ampicillin 含有 Terrific Broth 培地 (Invitrogen Corp.) (TA 培地) 500 ml に大腸菌培養液を 50 ml 植え継ぎ、37°C で2時間振盪培養した。決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し、37°C で3時間振盪培養後、大腸菌を回収した。500 ml の大腸菌培養液のうち 100 ml を可溶化条件検討に用い、400 ml は精製条件検討に用いた。まず、100 ml 分の大腸菌に buffer A [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、400 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride、1 mM 2-mercaptoethanol、10% glycerol] 1 ml を加え、氷冷しながら超音波処理を行なった。14,000 rpm、15分間遠心した後、上清を回収し、ペレットに 2% Triton X-100 (MP Biomedicals) 含有 buffer A を 1 ml を加え超音波処理を行った。遠心後、ペレットに 8 M Urea (Nacalai Tesque, Inc.) 含有 buffer A を 1 ml 加え超音波処理をした。遠心後、上清を回収しペレットに buffer A を 1 ml 加え超音波処理により懸濁した。それぞれの溶液画分 20  $\mu$ l に 4×SDS buffer (250 mM

Tris-HCl、20% 2-mercaptoethanol、8% SDS、40% glycerol、0.004% bromophenol blue) を 6.7  $\mu$ l 加え、95°C、5分間加熱しサンプルを調製した。15%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、milliQ 水で洗浄後、CBB で染色した。MilliQ 水で洗浄し、C-CPE 変異体が多く可溶化していた画分の buffer を可溶化 buffer とした。

### B.4. C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体の精製

可溶化条件検討で集菌した 400 ml culture 分の大腸菌に、決定した可溶化 buffer を 4 ml を加え、氷冷しながら超音波処理を行なった。14,000 rpm、15分間遠心分離を行い、上清を回収した。あらかじめ 6 M guanidine/EDTA 5 ml、milliQ 水 10 ml、0.1 M NiSO<sub>4</sub> 500  $\mu$ l、buffer A 10 ml を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP column (GE Healthcare) に大腸菌溶解液を流し、C-CPE 変異体を吸着させた。Buffer A を 15 ml 流した後、100-1000 mM imidazole (Sigma-Aldrich Corp.) 溶液をグラジエントをかけて流し、溶出液を 1 ml ずつ分取した。それぞれの溶出液 20  $\mu$ l に 4×SDS buffer を 6.7  $\mu$ l 加え、95°C で5分間加熱しサンプルを調製した。15%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、milliQ 水で洗浄後、CBB で染色した。MilliQ 水で洗浄し、C-CPE 変異体の精製に最適な imidazole 濃度を決定した。

C-CPE 変異体が溶解している buffer を pH 7.4 の phosphate buffered saline (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>) に置換するため、PD-10 column (GE Healthcare) を用いた。予め、PD-10 column に PBS (pH 7.4) を 30 ml 流して平衡化しておき、HiTrap™ Chelating HP column の溶出液 1 ml を流した。PBS (pH 7.4) を 500  $\mu$ l ずつ流し、PD-10 column から溶出液を分取し、-80°C にて保存した。尚、BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific) を用いてタンパク質濃度を測定し、検量線

には BSA を用いた。

### B.5. Claudin-4 タンパク質の精製

C 末側に His-tag を付加したヒト claudin-4 遺伝子を挿入した pFastBac1 (アスピオファーマ株式会社内田博司博士より供与) を大腸菌 DH10Bac (Invitrogen Corp.) にヒートショック法によりトランスフォーメーションし、50  $\mu$ g/ml kanamycin (Nacalai Tesque, Inc.)、7  $\mu$ g/ml gentamicin (Sigma-Aldrich Corp.)、10  $\mu$ g/ml tetracycline (Nacalai Tesque, Inc.) を含み、2% X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside; Nacalai Tesque, Inc.) 100  $\mu$ l および 50 mM IPTG 100  $\mu$ l を塗布した LB agar 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、大腸菌から bacmid を精製した。

培養用 6 穴プレート (Becton, Dickinson and Company) に  $2 \times 10^6$  cells/well の濃度で Sf9 細胞 (Invitrogen Corp.) を播種し、室温で 1 時間静置した。静置中に tube A [cellfectin (Invitrogen Corp.) 6  $\mu$ l、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 (Invitrogen Corp.) 100  $\mu$ l] と tube B (bacmid 1  $\mu$ g、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100  $\mu$ l) を用意し、tube A と tube B とをゆっくりピペティングしてよく混和した後、室温で 30 分間放置した。プレートに接着した 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  $\mu$ l を加え、well に全量 (1 ml) 添加し、5 時間、27°C で培養した。その後、培地を除去し、10% Fetal Calf Serum (FCS; Tissue culture Biologicals) と Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Nacalai Tesque, Inc.) を含む 2 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen Corp.) に交換し、27°C で 3 日間培養した。3 日後、800  $\times g$  で 10 分間遠心し培養上清を回収した (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、800  $\times g$  で 10 分間遠心し培養上清を回収した (P2 ストックと称する)。P2 ストックを  $2 \times 10^6$  cells/ml の Sf9 細胞に加えて、52-56 時間培養し、遠心して細胞を回収した。細胞を PBS (pH 7.4) で洗浄し、10 mM HEPES (pH 7.4)、120 mM NaCl、protease inhibitor tablets (Complete Mini、EDTA-free; Roche Applied Science)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride および 20 units/ml DNase I を含む溶液に懸濁した。2% N-dodecyl- $\beta$ -maltoside (DDM; Dojindo Laboratories) を加えて細胞を破碎し、遠心して上清を回収した。Claudin-4 タンパク質の精製は、第一章、第一節の「C-CPE の N 末欠損体の精製」に準じて行い、HiTrap™ Chelating HP column を使用し、洗浄に 100 mM imidazole 溶液、溶出に 100-500 mM imidazole 溶液を用いた。さらに HiTrap™ Desalting column (GE Healthcare) を用いて、claudin-4 タンパク質の溶解 buffer を 0.2% DDM 含有 PBS (pH 7.4) に置換した。

### B.7. BIAcore を用いた C-CPE 変異体の SPR 解析

Claudin-4 タンパク質のセンサーチップ CM5 (GE Healthcare) への固定化には、アミンカップリングキット (GE Healthcare) を用いて行った。400 mM N-ethyl-N'-(3-dimethyl-amino-propyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC) と 100 mM N-hydroxysuccinimide (NHS) の等量混合液を 20  $\mu$ l (2 分間) インジェクションし、センサーチップ上の CM-デキストランのカルボキシル基を活性化した後、10 mM MES 緩衝液 (pH 6.5) で 2.5  $\mu$ g/ml に調製した claudin-4 タンパク質を 20  $\mu$ l (2 分間) インジェクションした。その後、1 M ethanolamine hydrochloride (pH 8.5) 溶液を 50  $\mu$ l (5 分間) 添加し、残存している活性エステルを不活性化した。

表面プラズモン解析は、Biacore T100 (GE Healthcare) を用いて行った。ランニング緩衝液には HBS-EP<sup>+</sup> [10 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、3

mM EDTA、0.05% Tween20; GE Healthcare]を用い、C-CPE 変異体を2倍希釈系列で5段階濃度(20、10、5、2.5、1.25 nM)となるよう HBS-EP<sup>+</sup>で希釈した。低濃度側から順次 60  $\mu$ l(2分間)インジェクションし、最大濃度である 20 mM を添加した後、解離を 10 分間観察した。このほかに、ベースラインドリフト補正用データを得る目的で、ランニング緩衝液のみを添加したデータ(ゼロ濃度)を併せて取得した。得られたセンサーグラムに対して、Biacore T100 Evaluation Software version 2.0 を用いて解析を実施し、1:1 binding モデルを適用して、非線形解析のグローバルフィッティング、シングルカインेटクス法により解析を行い、結合速度定数  $k_a$ (1/Ms)、解離速度定数  $k_d$ (1/s)、解離定数  $K_D$ (= $k_d/k_a$ )を算出した。

#### B.8. C-CPE 変異体の TJ バリア制御活性解析

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞 (Dainippon Pharmaceutical Corp.)の培養には 10% FCS、20 mM NaHCO<sub>3</sub>(Wako Pure Chemical Industries)、4 mM L-glutamine(Wako Pure Chemical Industries)、19.4 mM D-glucose (Sigma-Aldrich Corp.)、1 % Non-essential amino acid solution(Invitrogen Corp.)を含む DMEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL Corp.)を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。

Caco-2 細胞を  $8 \times 10^4$  cells/well で 6.5-mm Transwell®(0.33 cm<sup>2</sup>, Corning)に播種し、2 日に 1 回の頻度で培地を交換し、Millicell®-ERS (Millipore Corp.)を用いて transepithelial electric resistance (TEER)を測定することにより、Caco-2 細胞の TJ 形成をモニターした。8-10 日後に、TEER が安定したことを確認し、FCS およびフェノールレッド不含 EAGLE's MEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL Corp.) (20 mM NaHCO<sub>3</sub>、4 mM L-glutamine、19.4 mM D-glucose、1% Non-essential amino acid solution を含む)に交換し、24 時間培養した。その後、basal 側から 120  $\mu$ l ずつ培地を抜き取り C-CPE または

C-CPE 変異体を終濃度 20  $\mu$ g/well となるように添加した。薬液添加前および添加後 12、18 時間に TEER を測定した。その後、DMEM 培地を用いて洗浄し、24 時間培養後 TEER を測定した。尚、薬液添加前の TEER を基準として相対的な値を算出した。

#### B.9. C-CPE 変異体遺伝子ライブラリの構築

C-CPE の遺伝子を pET-16b に挿入した pET-H<sub>10</sub>PER を鋳型とし、C 末側 6 アミノ酸(S304、S305、S307、N309、S313、K318)を NNS 配列に置換した reverse primer 5' -TTT TCC TTT TGC GGC CGC AAA TTT SNN AAA SNN TAT TGA SNN AGG SNN ATT TCC ACT SNN TGA TGA ATT AGC TTT-3' (the underline indicates *Nco*I site) と forward primer 5' -CAT GCC ATG GCC GAT ATA GAA AAA GAA ATC CTT GAT TTA GCT GCT T-3' (the underline indicates *Nco*I site)を用いて、KOD-plus により PCR を行なった。PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit で精製し、*Nco*I (New England Biolabs) および *Nco*I (New England Biolabs) を用いて 37°C で 20 時間処理した。pY03' phagemid vector を *Nco*I、*Nco*I で 2 時間処理し、T4 DNA ligase を用いて 16°C にて一晩ライゲーション反応を行なった。ライゲーション産物を *Sac*I (New England Biolabs)、*Sph*I (New England Biolabs) を用いて 37°C で 2 時間処理し、QIAquick PCR Purification Kit で精製した。

予め滅菌精製水で洗浄しておいた 10%グリセロール含有大腸菌 TG1 株 (Stratagene Inc.) に遺伝子ライブラリを混合し、MicroPulser® (Bio-Rad Laboratories) を用いてエレクトロポレーションを行った。その後 2YTG 培地を添加し、1 時間、37°C で振盪培養した。エレクトロポレーション後のサンプルから 50  $\mu$ l を取り 2YTG 培地で 10 倍毎に段階希釈し、各段階のサンプル 450  $\mu$ l に対して 550  $\mu$ l の 2YTGA 培地を添加し、ペトリフィルムに播種、一晩培養し、得られたコロニー数からライブラリサイズを算出した。



ライブラリサイズの算出は、10 の n 乗希釈した段階のコロニー数 m から、ライブラリサイズ =  $m \times 1000/50 \times 500/450 \times 10^n/10$  (CFU/ml) として計算した。また、エレクトロポレーション後のサンプルの残りは、100  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin、2% D-glucose 含有 LB agar (LAG プレート) に播種し、一晚培養後、得られたコロニーを全て回収して、終濃度 10% となるようにグリセロールを加え、 $-80^\circ\text{C}$  にて保存した。

ライブラリサイズ算出に使用したペトリフィルムからコロニーをピックアップし、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、ライブラリの多様性を確認した。尚、primer には pY03-AS-1 (5' - GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG-3') を使用した。

#### B.10. C-CPE 変異体提示ファージライブラリの作製

凍結保存したライブラリのグリセロールストックを、予め温めておいた 25 ml の 2YTGA 培地に加え  $\text{OD}_{600}=0.09$  とし、 $37^\circ\text{C}$  で  $\text{OD}_{600}=0.4-0.6$  まで振盪培養した。次に M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen Corp.) を  $\text{OD}_{600} \times 8 \times 10^8$  (cells/ml)  $\times 25$  (ml)  $\div 10^{11}$  (CFU/ml) となるように添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間静置した。さらに  $37^\circ\text{C}$  で 30 分間振盪培養した後に、 $1,000 \times g$  で 10 分間遠心し、ペレットに対して 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin、50  $\mu\text{g/ml}$  kanamycin を添加した 2YT 培地 (2YTAK 培地) 50 ml を添加して、 $37^\circ\text{C}$  で 6 時間振盪培養することでファージを産生させた。次いで、ファージを含む TG1 培養液を  $4^\circ\text{C}$ 、 $1,000 \times g$  で 10 分間遠心し、上清を  $15,660 \times g$  で 15 分間遠心して上清を回収した。上清に対して 1/5 volume 量の PEG-NaCl 溶液 [ 20% PEG6000 ( Wako Pure Chemicals Industries)、2.5 M NaCl] を添加し、激しく混和して、1 時間以上静置した。次に  $15,660 \times g$  で 10 分間遠心し、ペレットを NTE buffer (0.1 M NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA-2Na) 1 ml に懸濁し、0.45  $\mu\text{m}$  フィルター (Millipore Corp.) を通して精製ファージ溶液とした。

2% D-glucose 含有 2YT 培地 (2YTG 培地) で  $\text{OD}_{600}$

=0.4-0.6 まで培養した TG1 300  $\mu\text{l}$  に対して、10 倍毎に段階希釈したファージ溶液 100  $\mu\text{l}$  を添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600  $\mu\text{l}$  を添加し、ペトリフィルム™ 培地 (3M Company) に播種して一晚  $37^\circ\text{C}$  で培養した。各希釈段階のコロニー数を計測することで、ファージタイターを算出した。

#### B.11. Claudin-1 発現 bacmid 作製用ベクターの作製

Claudin-1 の遺伝子を T-Easy vector に挿入した pGTCL-4 (神戸大学大学院医学研究科古瀬幹夫博士より供与) を鋳型として KOD-plus を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit を用い精製後、*Xba*I (New England Biolabs) および *Kpn*I (New England Biolabs) を用い、 $37^\circ\text{C}$  にて一晚制限酵素処理した。あらかじめ *Xba*I および *Kpn*I 処理した pFastBac1 (東京大学先端科学技術研究センター浜窪隆雄博士より供与) と T4 DNA ligase を用いて  $16^\circ\text{C}$  で一晚ライゲーション反応を行い、続いて *Xho*I を用いて  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間処理した。ライゲーション産物を大腸菌 DH5  $\alpha$  と氷上で 15 分間なじませた後、 $42^\circ\text{C}$  でヒートショックを行い、氷上で 3 分間静置した。予め温めておいた SOC 培地を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 50 分培養後、LA プレートに播種し、一晚  $37^\circ\text{C}$  で培養した。任意のコロニーをピックアップして、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、claudin-1 をコードしたプラスミド (pFastBac-CL1) を得た。

#### B.12. Claudin-1 発現 bacmid の作製

pFastBac-CL1 を大腸菌 DH10Bac (Invitrogen Corp.) 30  $\mu\text{l}$  と混和し、氷上で 30 分間なじませた後、 $42^\circ\text{C}$  でヒートショックを行い、氷上で 2 分間静置した。その後、SOC 培地を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間培養後、50  $\mu\text{g/ml}$  kanamycin、7  $\mu\text{g/ml}$  gentamicin、10  $\mu\text{g/ml}$  tetracycline を含み、2% X-gal 100  $\mu\text{l}$  および 50 mM IPTG 100  $\mu\text{l}$  を塗布した LB agar に播種し、 $37^\circ\text{C}$  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 (bacmid-CL1)を精製した。Bacmid に目的とする遺伝子が挿入されていることを PCR 法にて確認した。尚、forward primer として 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'を、reverse primer として 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'を用いた。また、wild-type BV の bacmid 作成には、遺伝子を導入していない pFasBac1 を用いた。

### B.13. Claudin-1 提示バキュロウイルス(CL1-BV)の作製

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、室温で 1 時間静置した。静置中に tube A (cellfectin 6  $\mu$ l、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100  $\mu$ l) と tube B (bacmid-CL1 1  $\mu$ g、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100  $\mu$ l) を用意し、tube A と tube B とをゆっくりピペティングしてよく混和した後、室温で 30 分間放置した。プレートに接着した 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  $\mu$ l を加え、well に全量 (1 ml) 添加し、5 時間、27°C で培養した。その後、培地を除去し、10% FCS と Penicillin-Streptomycin Mixed Solution を含む 2 ml の Grace's Insect 培地に交換し、27°C で 3 日間培養した。3 日後、800  $\times g$  で 10 分間遠心し培養上清を回収した (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、800  $\times g$  で 10 分間遠心し培養上清を回収した (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  $\mu$ l 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、培養上清を回収した。ペレット (細胞) を 1% protease inhibitor (Sigma-Aldrich

Corp.) および 1% Triton X-100 を含む PBS (pH 7.4) 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 法にて目的とするタンパク質の発現を確認した。すなわち、サンプルに 4  $\times$  SDS buffer を添加して 95°C で加熱後、サンプルを SDS-PAGE に供し、TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories) によりゲル中のタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に転写した。PVDF 膜を 5% スキムミルク (Becton, Dickinson and Company) および 0.05% Tween20 含有 Tris-buffered saline [TBS; 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 M NaCl] (TBS-T) に浸して室温で 2 時間浸透しブロッキングした。TBS-T で 5 回洗浄後、2,000 倍希釈した Anti-claudin-1 Ab (Zymed) を室温で 2 時間反応させ、TBS-T で洗浄後 5,000 倍希釈した Gt  $\times$  Ms IgG (H+L) HRP (Millipore Corp.) を室温で 1 時間反応させた。検出には ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用い露光した X 線フィルム (FUJIFILM) を現像した。

$4 \times 10^8$  cells の Sf9 細胞をスピナーフラスコに用意し、発現確認のできた P2 ストックを 50 ml 加え液量を 200 ml にし、27°C で 3 日間培養した。3 日後、800  $\times g$  で 10 分間遠心して培養上清を回収し、さらに 10,000  $\times g$  で 25 分間遠心して BV を沈殿させた。ペレットを PBS (pH 7.4) で懸濁後、800  $\times g$  で 10 分間遠心し、上清をさらに 10,000  $\times g$  で 25 分間遠心した。ペレットを 1% protease inhibitor を含む TBS 250  $\mu$ l で懸濁し、claudin-1 提示 BV (CL1-BV) を得た。尚、BCA™ Protein Assay Kit を用いてタンパク質濃度を測定し、検量線には BSA を用いた。

### B.14. CL1-BV を用いた C-CPE 変異体提示ファージライブラリのパンニング

イムノチューブに 0.5  $\mu$ g の CL1-BV を、4°C で一晩固相化した。翌日、PBS (pH 7.4) で 3 回洗浄し、4% プロ

ックエースを用いて室温で 2 時間ブロッキングした。また、ファージライブラリ溶液と 4%ブロックエースを等量混合し、4°Cで 1 時間静置した。PBS(pH 7.4)で 3 回洗浄し、ファージライブラリ溶液を 100  $\mu$ l 添加して室温で 2 時間静置した。その後、PBS-T で 15 回、PBS(pH 7.4)で 15 回洗浄し、100 mM HCl 100  $\mu$ l を添加して、4°C、10 分間作用させた。1 M Tris-HCl (pH 8.0) 50  $\mu$ l を加えて中和してファージ溶液を回収し、その 10  $\mu$ l を用いてタイターチェックを行った。残りのファージ溶液 100  $\mu$ l を TG1 (OD<sub>600</sub>=0.4-0.6 に調製) 300  $\mu$ l 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 プレートに播種し、一晚培養後、得られたコロニーを全て回収して、終濃度 10%となるようにグリセロールを加え、-80°Cにて保存した。さらに、上記方法でグリセロールストックから再度ファージを作製し、パンニング操作を繰り返すことで 2nd、3rd パンニングを行なった。

#### B.15. C-CPE 変異体提示ファージのモノクローン化

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 2YTGA 培地で希釈し、LAG プレートに播種して 37°Cで一晩培養した。翌日、2YTGA 培地 100  $\mu$ l を添加した 96 穴 plate (IWAKI) にコロニーをピックアップして、37°Cで一晩培養した。その際、C-CPE 提示ファージ感染 TG1 と scFv 提示ファージ感染 TG1 も同様に 96 穴 plate で培養した。翌日、2YTGA 培地を 500  $\mu$ l 添加したディープウェル (MASTERBLOCK 2 ml; Greiner) に前培養した大腸菌を 10  $\mu$ l ずつ植え継ぎ、OD<sub>600</sub> =0.4-0.6 まで 10,000 rpm、37°Cで培養後、M13KO7 ヘルパーファージを添加して 37°Cで 1 時間静置した。2,500 rpm で 15 分間遠心した後、上清を捨て 2YTAK 培地 1 ml を添加して 10,000 rpm、25°Cで一晩培養した。翌日、2,500 rpm で 15 分間遠心した後、上清を回収し、モノクローン化ファージ溶液とした。尚、前培養のため 96 穴 plate で培養した TG1 のうち、植え継ぎに使用しなかつた大腸菌は終濃度 10%のグリセロールを添加して -80°Cで保存した。

た大腸菌は終濃度 10%のグリセロールを添加して -80°Cで保存した。

#### B.16. C-CPE 変異体提示ファージと CL1-BV の相互作用解析

96 穴 ELISA plate に 0.5  $\mu$ g/well で、CL1-BV を 4°C、一晚固相化した。翌日、PBS (pH 7.4) で 3 回洗浄し、1.6%ブロックエースを用いて室温で 2 時間ブロッキングした。また、上記方法で作製したモノクローン化ファージを 100 倍希釈し、終濃度 0.4%ブロックエースを加えて 4°C、1 時間静置した。PBS (pH 7.4) で 3 回洗浄し、ファージ溶液を添加して室温で 2 時間作用させた。PBS-T で 3 回洗浄後、0.4%ブロックエースで 20,000 倍に希釈した anti M13-HRP mAb 溶液を添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で 5 回洗浄した後、TMB solution を添加し、2 M 硫酸を加えて反応を停止した。その後、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。尚、ファージ産生量を補正するため、anti FLAG antibody (Sigma-Aldrich Corp.) を carbonate buffer (pH 9.6) にて希釈し、0.125  $\mu$ g/well で 4°C、一晚固相化し、上記方法で同様の操作を行った。

Claudin-1 結合性ファージの TG1 グリセロールストックより大腸菌を増やし、インサートの確認およびシークエンス解析を行い、claudin-1 結合性分子の遺伝子配列を特定した。

#### B.17. リコンビナントタンパク質発現ベクターへの組換え

各候補クローンの遺伝子をコードした pY03' phagemid vector を鋳型とし、forward primer として 5' -GGA ATT CCA TAT GGA TAT AGA AAA AGA AAT CCT TGA TTT AGC TG-3' (the underline indicates *Nde*I site)、reverse primer として 5' -CGC GGA TCC TTA AAA CTT TTG AAA TAA TAT-3' (the underline indicates *Bam*HI site)、KOD-plus を用

いて PCR により C-CPE 変異体遺伝子を増幅した。PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN® II KIT (FUNAKOSHI Corp.)を用いて精製した。PCR 産物を *Bam*HI (New England Biolabs) および *Nde*I (New England Biolabs) で 37°C、20 時間処理した。pET-16b を *Nde*I および *Bam*HI で 37°C、2 時間処理し、T4 DNA ligase を用いて 16°C にて一晩ライゲーション反応を行なった。ライゲーション産物を *Xho*I を用いて 37°C、2 時間処理した。ライゲーション産物と DH5  $\alpha$  を氷上で 10 分間なじませた後、ヒートショック法にてトランスフォーメーションし、LA プレートに播種して一晩培養した。翌日、1 コロニーずつ LA 培地 3 ml にピックアップしインサートの確認およびシーケンス解析を行った。尚、primer には T7 terminator を用いた。

#### B.18. リコンビナントタンパク質の発現誘導

#### B.2. C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体の発現誘導

#### B.19. リコンビナントタンパク質の可溶性

#### B.3. C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体の可溶性に準じて行った。

#### B.20. リコンビナントタンパク質の精製

#### B.4. C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体の精製に準じて行った。

#### B.21. ELISA 法による C-CPE 変異体と claudin 提示 BV の相互作用解析

96 well ELISA plate に 0.5  $\mu$ g/50  $\mu$ l TBS/well で、wild-BV、claudin-1-BV 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。C-CPE 変異体溶液 100  $\mu$ l に対して 4% Block Ace を 50  $\mu$ l 添加し、4°C で 1

時間ブロッキングした。ブロッキングした BV を PBS で 3 回洗浄し、ブロッキングした C-CPE 変異体を 150  $\mu$ l/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 His-tag mAb を添加して常温で 2 時間作用させた。PBST で 3 回洗浄し、HRP 標識二次抗体を添加し、常温で 1 時間作用させ、その後 PBST で 5 回洗浄した。TMB 試薬 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 100  $\mu$ l を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100  $\mu$ l 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。

#### B.22. FACS 解析による C-CPE 変異体と claudin 発現細胞の相互作用解析

Claudin-1、-2、-4、-5 発現 L 細胞 (神戸大学大学院医学研究科古瀬幹夫博士より供与) を完全にばらばらになるまで分散し、細胞数を計数して  $5.0 \times 10^5$  cells/well となるように 96 穴 U 底 plate (Nalge Nunc International) に播種し、1,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。1% BSA、0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (pH 7.4) を用いて希釈した C-CPE 変異体を 1  $\mu$ g/well 添加し、氷上で 1 時間静置した。0.1% BSA、0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (pH 7.4) を 200  $\mu$ l 加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 2 回繰り返す、1% BSA、0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (pH 7.4) で 200 倍に希釈した Anti-6 $\times$ -His Epitope Tag Monoclonal Antibody (Thermo Scientific) を添加して氷上で 1 時間静置した。その後、0.2% BSA、0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (pH 7.4) を 200  $\mu$ l 加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 2 回繰り返す、1% BSA、0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (pH 7.4) で 1,500 倍希釈した Anti-MOUSE IgG (H+L) (GOAT) Antibody Fluorescein Conjugated (ROCKLAND) を添加し、氷上で 30 分間遮光して静置した。0.2% BSA、0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (pH 7.4) を 200  $\mu$ l 加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 3 回繰り返す

し、0.2% BSA、0.1%アジ化ナトリウム、5 µg/ml PI (Miltenyi Biotec) 含有 PBS(pH 7.4)を 500 µl 添加し、FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company)により解析した。

### B.23. C-CPE 変異体の TJ バリア制御活性解析

TJ バリア制御活性解析には、BD BioCoat™ INTESTINAL EPITHELIUM DIFFERENTIAL ENVIRONMENT (BD Biosciences)を用いた。Caco-2 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well を apical 側に、Seeding Basal Medium 1 ml を basal 側に添加し 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養した。培地を Supplemented Enterocyte Differentiation Medium に交換し、72 時間培養後、apical 側を無血清 Seeding Basal Medium 500 µl、basal 側を pH 7.4 の HEPES buffer (155 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES, 1% BSA, 10 mM D-glucose) 1 ml に置換した。24 時間後、basal 側から 100 µl ずつ buffer を抜き取り C-CPE または C-CPE 変異体を終濃度 25 µg/well となるように添加した。薬液添加前および添加後 12、18 時間に TEER を測定した。その後、Seeding Basal Medium を用いて洗浄し、24 時間培養後 TEER を測定した。尚 TEER 測定には Millicell®-ERS を用い、薬液添加前の TEER を基準として相対的な値を算出した。

## C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

## D. 考察

### D.1. C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体の作製

C-CPE の立体構造情報を基に創製した C-CPE の N 末欠損体 (C-CPE194、C-CPE205) は C-CPE と同等の claudin-4 結合力を保持しつつ、10 倍以上の溶解性を有していた。これまでの機能ドメイン解析により、C-CPE の C 末 16 アミノ酸 (S304~F319) を欠損させ

ると claudin-4 結合性が消失すること、16 アミノ酸のアラニンスキャンにより Y306、Y310、Y312 または L315 をアラニンに置換することで claudin-4 結合性が低下すること、S304、S305、S307、N309、S313 または K318 をアラニンに置換した変異体では C-CPE に比して claudin-4 結合性が亢進することを見出している (Table 1)。さらに、Y306 または L315 をアラニンに置換することで TJ バリア低下作用が減弱すること、N309、S313 または F319 をアラニンに置換した変異体では C-CPE に比して TJ バリア低下作用が増強することを明らかにしている (Table 2)。そこで、各種アラニン置換体の活性解析データを踏まえて、claudin-4 結合性の上昇および TJ バリア低下作用の増強が観察された N309A、S313A 変異に着目し、新規 claudin-4 binder の創製を試みた (Fig. 1)。

C-CPE の立体構造情報および機能ドメイン解析より、C-CPE194 および C-CPE205 をベースとして N309、S313 のアラニン置換体を作製した。C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体の遺伝子を pET-16b vector に組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) に導入することにより、各種 C-CPE 変異体を発現させた。タンパク質の発現誘導に用いた IPTG の濃度は、C-CPE194<sub>N309A</sub> は 0.01 mM、C-CPE194<sub>S313A</sub> は無添加、C-CPE194<sub>N309A/S313A</sub> は 1 mM、C-CPE205<sub>N309A/S313A</sub> は 0.25 mM であった。いずれの C-CPE 変異体も buffer A により可溶化し、HiTrap™ Chelating HP column を用いた精製では洗浄に 100 mM imidazole 溶液、溶出に 100-500 mM imidazole 溶液を用いた。

### D.2. C-CPE 変異体の claudin 結合性解析

そこで次に、C-CPE 変異体の claudin-4 結合性を解析した。

Wild type-BV および claudin-4 提示 BV を用いた ELISA により、C-CPE 変異体の claudin-4 結合性を定性的に解析したところ、C-CPE194<sub>N309A</sub>、C-CPE194<sub>S313A</sub>、C-CPE194<sub>N309A/S313A</sub> いずれの変異体も添加濃度依存的な claudin-4 結合性を有していた (Fig. 2)。尚、C-CPE205<sub>N309A/S313A</sub> も添加濃度依存的な claudin-4 結合性を示していた (data not shown)。

Biacore T100 Evaluation Software version 2.0 を用いて定量的解析を実施したところ、C-CPE194 ( $K_D$  値: 455 pM) に比して、C-CPE194<sub>N309A/S313A</sub> ( $K_D$  値: 46 pM (9.9 倍))、C-CPE205<sub>N309A/S313A</sub> ( $K_D$  値: 19 pM (23.9 倍)) は claudin-4 結合性が増加していた (Table 3)。また、いずれの変異体においても結合速度定数  $k_a$  は C-CPE194 と比較して相違は認められず、解離速度定数  $k_d$  が減少していたことから、C-CPE 変異体では claudin-4 との相互作用時間が延びることにより高い結合性を発揮しているものと推察された (Table 3)。

### D.3. C-CPE 変異体の TJ バリア制御活性解析

C-CPE194 および C-CPE205 の double mutant では claudin-4 に対する結合力の増大が認められていたことから、TJ バリア制御活性の増強が期待された。そこで、ヒト腸管モデルである Caco-2 細胞単層膜培養系を用い、膜電気抵抗値 (transepithelial electric resistance; TEER) を指標に各種変異体の TJ バリア制御活性を解析した。各種 C-CPE 変異体の添加 18 時間後に TEER 値を測定したところ、C-CPE194<sub>N309A/S313A</sub> では C-CPE194 と同様の TEER 低下作用が観察されたのに対し、C-CPE205<sub>N309A/S313A</sub> では C-CPE194 に比して顕著な TEER 低下作用が認められた (Fig. 3)。また、添加 18 時間後に C-CPE 変異体を除去することで TEER 値の回復が認められたことから、C-CPE 変異体処理による細胞傷害は起きていないものと推察される (data not shown)。

C-CPE 変異体は TJ に存在する claudin-4 と結合し、C-CPE 変異体・claudin-4 複合体がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、claudin の TJ シールが緩むことで TEER 低下作用が観察されることから、C-CPE 変異体は claudin-4 発現細胞内に薬物などを送達させるリガンド分子として利用できるものと考えられる。

尚、本 C-CPE 変異体を用いたリポソーム作製については、鈴木亮博士の分担報告書に記載。

### D.4. C-CPE 変異体提示ファージライブラリの作製

C-CPE のアラニンスキャンにおいて claudin-4 結合性の亢進が認められた 6 つのアミノ酸 (S304、S305、S307、N309、S313、K318) をランダムに他のアミノ酸へ網羅的に置換した C-CPE 変異体提示ファージライブラリを作製するため、配列中に 20 種のアミノ酸をコードするコドン配列 (NNS; N = A/T/G/C, S = G/C) を挿入した primer を用い、テンプレートには C-CPE194 の発現ベクターを用いて PCR を行った。形質転換した大腸菌のコロニー数から概算したライブラリサイズは  $1.4 \times 10^7$  種類であり、ライブラリから任意に 17 クローンをピックアップ、シーケンス解析したところ、全てのクローンにおいて異なるシーケンスが観察され、作製したライブラリは十分な多様性を有していた (data not shown)。

### D.5. ライブラリからの claudin-1 結合性ファージのスクリーニング

まず、claudin-1 提示 BV (CL1-BV) を作製、western blot 法により CL1-BV の作製を確認した。

ライブラリの TG1 グリセロールストックより、C-CPE 変異体提示ファージライブラリを産生させ、結合性に基づくセレクション (パンニング) によって、CL1-BV に結合性を有するファージを濃縮した。パンニング前後のファージタイター比からファージの濃縮率を算出したところ、3 回のパンニング操作により claudin-1 結合性ファージの濃縮が認められた。パンニングを 3 回繰り返した後に回収したファージをモノクローン化し、CL1-BV に対する結合性を解析したところ、claudin-1 に対して高い結合性を示すファージクロンを複数取得した。そこで、claudin-1 結合性ファージクロンの DNA シーケンスを解析したところ、プロリン、アルギニン、ヒスチジンといったアミノ酸を含む C-CPE 変異体提示ファージが多数濃縮されていた (Table 4)。



#### D.6. C-CPE 変異体の活性解析

上述した claudin-1 結合性ファージクローンの遺伝子を pET-16b vector に組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) を用いて C-CPE 変異体タンパク質を作製した。

C-CPE 変異体の claudin-1 結合性を解析したところ、C-CPE 変異体 (m19, m36, m86) が claudin-1 結合性を有していた (data not shown)。m19, m36, m86 変異体では S305P, S307R, S313H 変異が共通していた (Table 4)。

さらに、m19 の各種 claudin 発現細胞を用いて claudin 特異性を解析したところ、m19 は claudin-1 のみならず、claudin-2, claudin-4、および claudin-5 に対して結合性を有しており (Fig. 4)、m19 は広域 claudin binder であるものと推察される。

#### D.7. C-CPE 変異体の TJ バリア制御活性評価

ヒト腸管モデル系として汎用されている Caco-2 細胞は少なくとも claudin-1, -2, -4 を発現している。そこで、m19 の claudin 指向性分子としての機能を解析するために、Caco-2 細胞の単層膜培養系を用いて m19 の TJ バリア制御活性を解析した。

m19 は C-CPE194 に比して有意に強い TEER 低下活性を有していた (Fig. 5)。また、m19 処理 18 時間後に m19 を除去したところ TEER の回復が認められたことから、m19 は細胞障害性を伴うことなく claudin バリア制御作用を発揮しているものと推察される (data not shown)。

#### E. 結論

1. C-CPE の立体構造情報およびドメインマッピングデータを用いて C-CPE に比して 9.9 倍、23.9 倍 claudin-4 結合性に優れた新規 C-CPE 変異体の創製に成功した。

2. 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、少なくとも claudin-1, claudin-2, claudin-4, claudin-5 に対して結合性を示す、新規 C-CPE 変異体の創製に成功した。

現在、高親和性 claudin-4 binder および広域 claudin binder について立体構造解析を進めており、当該新規 claudin binder を用いて claudin 指向性リポソームの創製を図ると同時に、多種多様な結合域および親和性を有する claudin binder 創製への展開を図っていく予定である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### G-1 論文発表

Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Saito Y, Yamaura T, Sakihama T, Hamakubo T and Yagi K (2011) A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS One* 6(2):e16611.

Suzuki H, Kondoh M, Li X, Takahashi A, Matsuhisa K, Matsushita K, Kakamu Y, Yamane S, Kodaka M, Isoda K and Yagi K (2011) A toxicological evaluation of a claudin modulator, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, in mice. *Pharmazie* 66(7):543-546.

Takahashi A, Kondoh M, Uchida H, Kakamu Y, Hamakubo T and Yagi K (2011) Mutated C-terminal fragments of *Clostridium perfringens* enterotoxin have increased affinity to claudin-4 and reversibly modulate tight junctions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 410(3):466-470.

##### G-2 学会発表

高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、Dual specific claudin binder を利用した非侵襲性投与技術の開発、日本薬剤学会第 26 年

会、平成 23 年 5 月 29-31 日、東京

吉田 孟史、佐藤 芙美、渡利 彰浩、近藤 昌夫、水口 裕之、八木 清仁、RNA ポリメラーゼ I 発現系を利用した長鎖 RNA 発現ベクターの開発、第 27 回日本 DDS 学会、平成 23 年 6 月 9-10 日、東京

各務洋平、高橋梓、山浦利章、松久幸司、近藤昌夫、浜窪隆雄、八木清仁、Claudin 欠損マウスを利用した claudin binder 創製系の確立、第 27 回日本 DDS 学会、平成 23 年 6 月 9-10 日、東京

松久幸司、高橋梓、角谷秀樹、佐伯理恵、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、*Clostridium perfringens* enterotoxin を利用したドラッグデリバリーシステムの開発、第 58 回トキシシンポジウム、平成 23 年 7 月 6-7 日、東京

高橋梓、松下恭平、斉藤郁美子、嵩原綱吉、各務洋平、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、*Clostridium perfringens* enterotoxin 変異体 m19 の claudin 結合性解析、第 58 回トキシシンポジウム、平成 23 年 7 月 6-7 日、東京

近藤昌夫、八木清仁、上皮細胞バリアの分子基盤を標的とした創薬研究の新展開、アスピオファーマ株式会社社内セミナー、平成 23 年 8 月 22 日、神戸(招待講演)

高橋梓、斉藤郁美子、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 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 23 年 10 月 22 日、神戸

Azusa Takahashi, Yumiko Saito, Yohei Kakamu, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a novel claudin binder and its application into mucosal absorption, 日本薬物動態学会第 26 回年会、平成 23 年 11 月 16-18 日、広島

Akihito Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Identification of tight junction-modulating compounds by claudin expression monitoring system. 日本薬物動態学会台 26 回年会、平成 23 年 11 月 16-18 日、広島

Yohei Kakamu, Kyohei Matsushita, Yumiko Saito, Azusa Takahashi, Koji Matsuhisa, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Biochemical analysis of a novel dual claudin binder. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA

Kiyohito Yagi, Seiji Yamane, Hidehiko Suzuki, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Development of novel claudin-4 binder and its application in mucosal vaccine. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA

Miki Kodaka, Azusa Takahashi, Toshiaki Yamaura, Yohei Kakamu, Koji Matsuhisa, Kyohei Matsushita, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A simple screening system for claudin binders using an scFv library derived from claudin-immunized mice. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA

Masuo Kondoh, Yoshiaki Yamagishi, Takeshi Yoshida, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Development of RNA pol-driven adenovirus vector expressing hepatitis C virus replicon. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Fukasaka, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Targeting to claudin-4 is a novel strategy for the development of mucosal vaccine. The 7th Seoul-Kyoto-Osaka Joint

Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientist 6, Jun 2-4, 2011, Seoul National University, Korea

Azusa Takahashi, Yumiko Saito, Koji Matsuhisa, Yohei Kakamu, Miki Kodaka, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Preparation of a dual claudin binder using a fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA

Koji Matsuhisa, Azusa Takahashi, Yohei Kakamu, Miki Kodaka, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a novel claudin binder using baculoviral display for its application in mucosal absorption of drugs. 38th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 30-Aug 3, 2011, National Harbor, MA, USA.

Seiji Yamane, Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A novel strategy for mucosal vaccination using a claudin binder. 38th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 30-Aug 3, 2011, National Harbor, MA, USA.

Takeshi Yoshida, Fumi Satoh, Akihito Watari, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Kiyohito Yagi, Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. 18<sup>th</sup> International Symposium of hepatitis C virus and related viruses, Sep8-12, 2011, Seattle, WA, USA.

Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of claudin binders using baculoviral displaying system. Tight junction conference in Berlin, Sep 24, 2011, Berlin, Germany.(招待講演)

Akihito Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Establishment of a cell-based assay system to screen compounds modulating tight junction barrier. 51st annual meeting of the American society for cell biology, Dec 3-7, 2011, Denver, CO, USA.

Hidehiko Suzuki, Seiji Yamane, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Kiyohito Yagi, Preparation of claudin-4 binder using C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin and its application to mucosal vaccination. 51st annual meeting of the American society for cell biology, Dec 3-7, 2011, Denver, CO, USA.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H-1 特許取得

該当なし

### H-2 実用新案登録

該当なし

### H-3 その他

該当なし

## I. 研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科

松久幸司

鈴木英彦

**Table 1 Competitive inhibition of C-CPE-PSIF-induced lactate dehydrogenase release by mutant C-CPEs.**

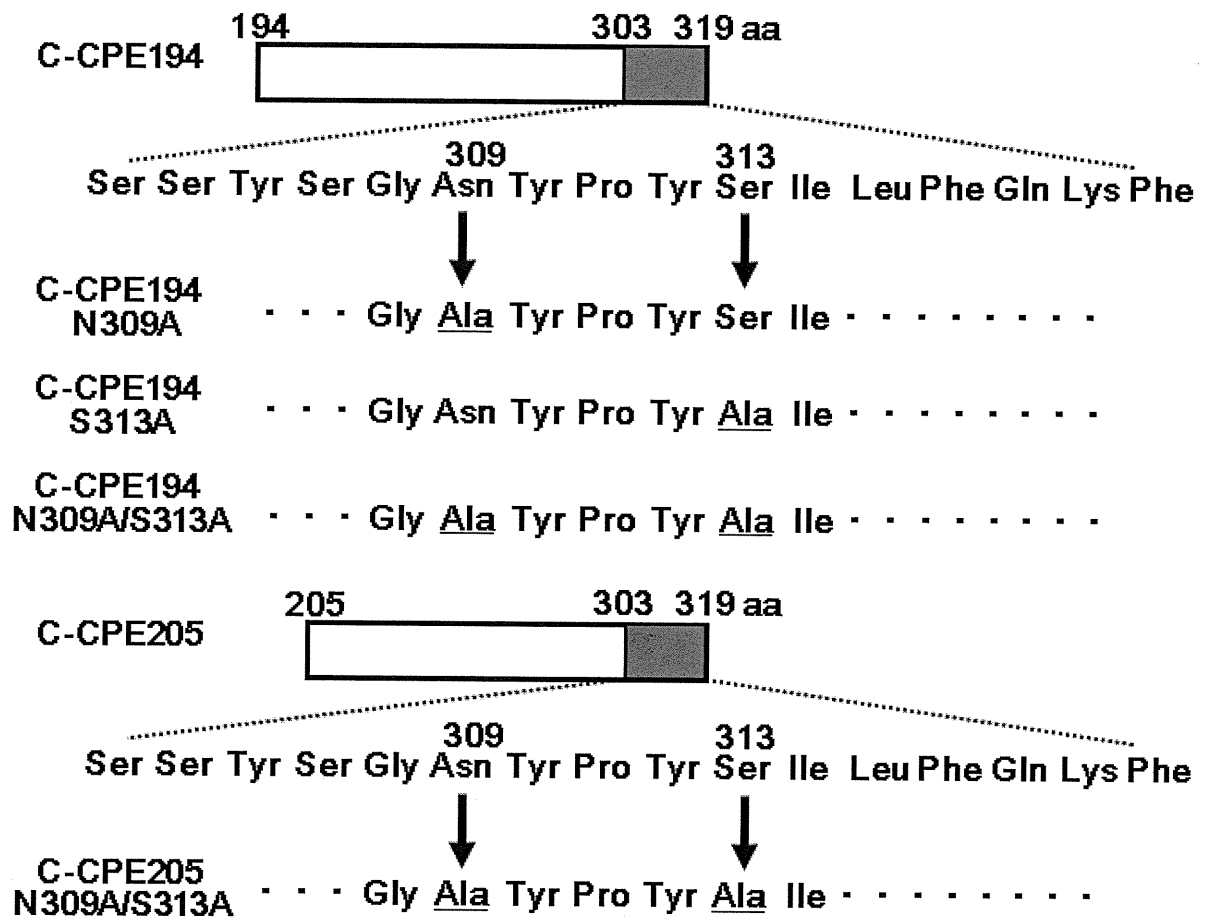
<b>C-CPE mutants</b>	<b>Inhibitory ratio (% of C-CPE)</b>
<b>C-CPE</b>	<b>100</b>
<b>S304A</b>	<b>125.6 ± 0.7</b>
<b>S305A</b>	<b>126.8 ± 0.2</b>
<b>Y306A</b>	<b>63.8 ± 0.4</b>
<b>S307A</b>	<b>123.6 ± 2.2</b>
<b>G308A</b>	<b>99.1 ± 2.7</b>
<b>N309A</b>	<b>125.6 ± 1.8</b>
<b>Y310A</b>	<b>72.2 ± 2.3</b>
<b>P311A</b>	<b>114.9 ± 0.5</b>
<b>Y312A</b>	<b>73.1 ± 2.4</b>
<b>S313A</b>	<b>132.9 ± 0.8</b>
<b>I314A</b>	<b>94.3 ± 3.1</b>
<b>L315A</b>	<b>69.1 ± 2.7</b>
<b>Q317A</b>	<b>96.8 ± 1.6</b>
<b>K318A</b>	<b>126.2 ± 2.1</b>
<b>F319A</b>	<b>111.5 ± 3.9</b>

After a 1 h treatment with C-CPE or C-CPE mutants at 5 µg/ml, claudin-4-expressing L cells were treated with C-CPE-PSIF as a claudin-4-directed toxin (0.2 µg/ml) for 36 h, and the release of lactate dehydrogenase (LDH) was determined. The results are shown as the percent of C-CPE-induced LDH release, and the values are the means ± SD (n=4).

**Table 2 Effects of mutant C-CPEs on TJ barrier in Caco-2 cells.**

<b>C-CPE mutants</b>	<b>Decreased ratio of TEER (% of C-CPE)</b>
<b>C-CPE</b>	<b>100</b>
<b>S304A</b>	<b>100.3 ± 0.5</b>
<b>S305A</b>	<b>100.1 ± 2.3</b>
<b>Y306A</b>	<b>64.1 ± 4.3</b>
<b>S307A</b>	<b>100.4 ± 1.8</b>
<b>G308A</b>	<b>98.1 ± 0.2</b>
<b>N309A</b>	<b>104.4 ± 1.3</b>
<b>Y310A</b>	<b>93.8 ± 1.2</b>
<b>P311A</b>	<b>101.4 ± 2.3</b>
<b>Y312A</b>	<b>100.1 ± 1.5</b>
<b>S313A</b>	<b>104.6 ± 0.8</b>
<b>I314A</b>	<b>98.3 ± 1.4</b>
<b>L315A</b>	<b>45.1 ± 5.3</b>
<b>Q317A</b>	<b>98.8 ± 1.3</b>
<b>K318A</b>	<b>99.3 ± 0.8</b>
<b>F319A</b>	<b>103.5 ± 0.9</b>

Caco-2 cells were seeded on a Transwell™. After development of the TJ barrier in Caco-2 cells, C-CPE or C-CPE mutants was added at 20 µg/ml, and transepithelial electric resistance (TEER) was calculated from the following equation:  $100 \times (\text{difference in TEER between 0 and 18 h after treatment of the cells with each mutant C-CPE}) / (\text{difference in TEER between 0 and 18 h after treatment with C-CPE})$ . The values are the means ± SD (n=4).



**Figure 1. Schematic illustration of C-CPE mutants**

The C-terminal 16 amino acid fragment contains claudin-4-binding domains. A site-directed mutagenesis analysis of the C-terminal domain revealed that alanine substitution with Asn at position 309 or Ser at position 313 increased its binding to claudin-4. C-CPE194 and C-CPE205 are the C-terminal fragments of CPE corresponding to amino acids 194-319 and 205-319, respectively.