

Figure 2. Interaction of C-CPE mutants with claudin-4

Vehicle or C-CPE mutants were added to the wells of immunoplates coated with wild-type BV (WT-BV) or claudin-4-displaying BV (CL4-BV). After 2 h of incubation, anti-tag antibody, which recognized C-CPE mutants, was added to the wells, and then the C-CPE mutant-bound BV was detected by the addition of the horseradish peroxidase-labeled antibody. The data are means \pm SD (n=4).

Table 3. Binding kinetics of C-CPE mutants to claudin-4

Derivatives	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D
C-CPE194	7.13 × 10⁶	3.24 × 10⁻⁴	455 pM
C-CPE194 N309A	6.50 × 10⁶	2.93 × 10⁻⁴	451 pM
C-CPE194 S313A	5.59 × 10⁶	6.53 × 10⁻⁵	117 pM
C-CPE194 N309A/S313A	6.67 × 10⁶	3.05 × 10⁻⁵	46 pM
C-CPE205 N309A/S313A	7.55 × 10⁶	1.45 × 10⁻⁵	19 pM

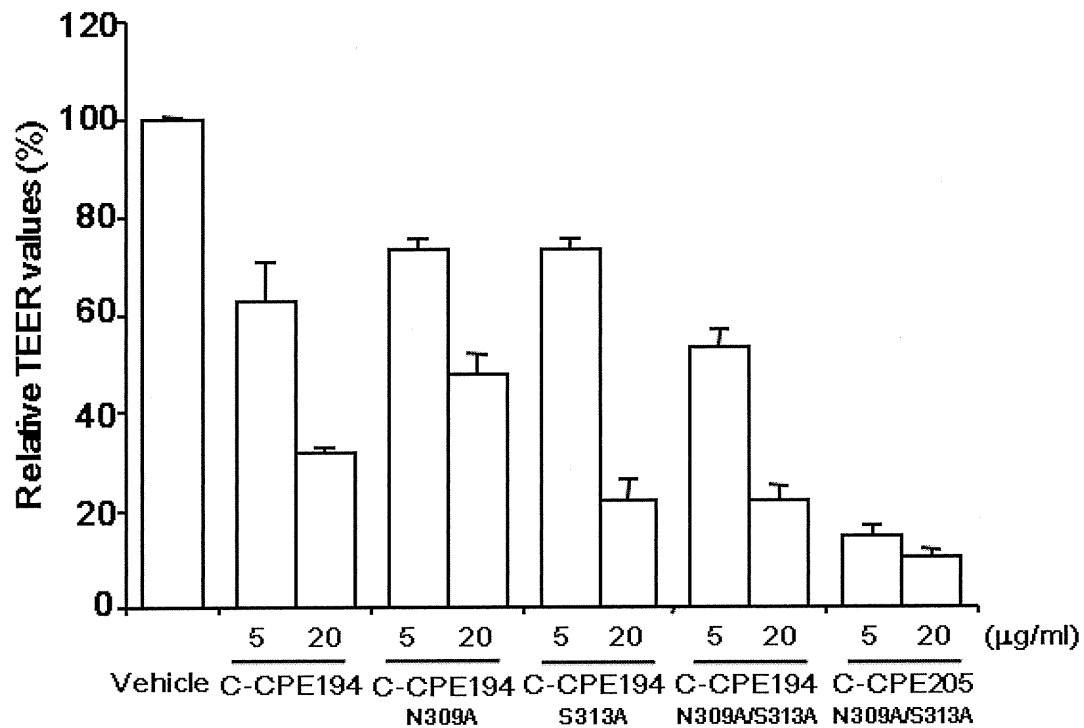


Figure 3. Effect of C-CPE mutants on TJ-integrity

Caco-2 cells were cultured on Transwell™ inserts. When TEER values reached a plateau, the cells were treated with C-CPE or C-CPE mutants at 0, 5 or 20 µg/ml. After 18 h of C-CPE mutant treatment, the TEER values were monitored. The results were calculated as the percent of the TEER values to that of the vehicle-treated group. The data are means ± SD (n=4).

Table 4 Claudin-1-binding phages.

C-CPE	304	305	307	309	313	318
	S	S	S	N	S	K
m 5	R	A	P	R	H	N
m 9	R	R	R	R	R	K
m 10	R	S	A	R	K	K
m 11	R	V	R	R	R	K
m 17	L	P	R	R	K	Q
m 19	A	P	R	H	H	K
m 21	A	P	R	D	R	K
m 24	R	R	Q	Q	R	K
m 36	R	P	R	R	H	K
m 37	R	P	R	F	H	Q
m 86	Y	P	R	R	H	K
m 89	A	P	R	A	R	T

The sequences of C-CPE mutant in the claudin-1-binding phages were analyzed.

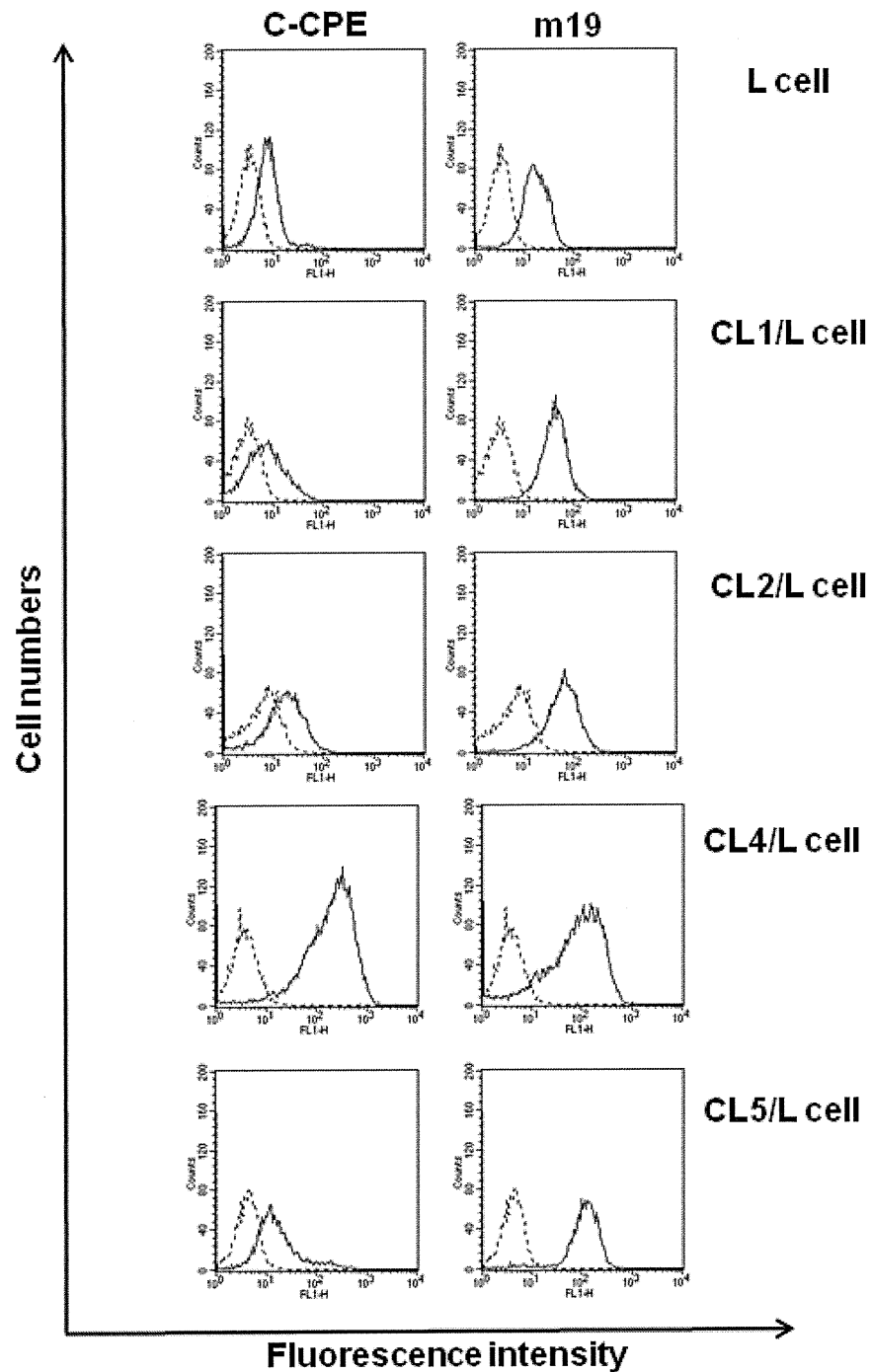


Figure 4. FACS analysis of the interaction between m19 and CLs-cells

CLs-L cells were treated with C-CPE or m19. The bound C-CPE or m19 was detected by labeled secondary antibodies. Lined histograms indicate the level of reactivity of C-CPE or m19; dotted lined histograms indicate background binding level of anti-his tag and FITC-labeled antibodies without C-CPE or m19. The binding cells were detected by FACS.

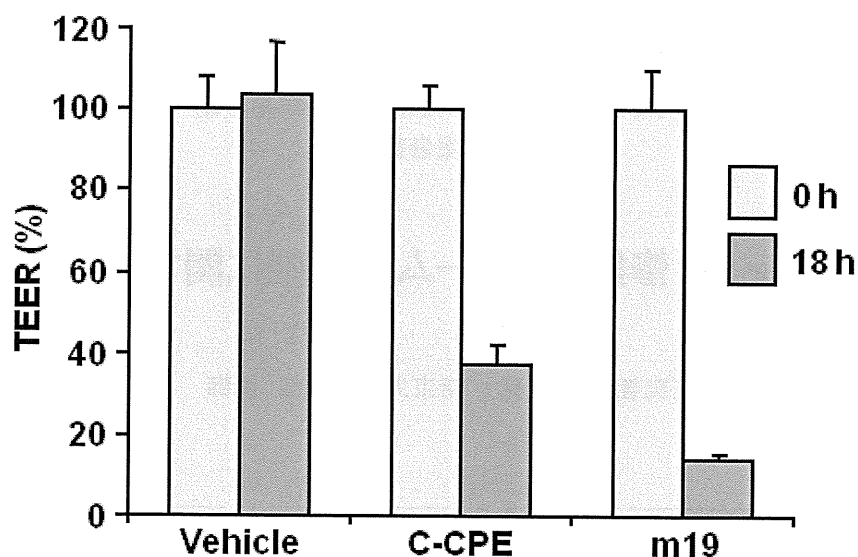


Figure 5. Effect of m19 on TJ-integrity in Caco-2 monolayer cell sheets

Caco-2 cells were seeded in BD BioCoat™ Fibrillar Collagen Cell Culture Inserts (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) at a subconfluent density. The TEER of the Caco-2 monolayer cell sheets on the chamber was monitored with a Millicell-ERS epithelial volt-ohmmeter (Millipore, Billerica, MA). The Caco-2 monolayers were cultured for 5 days, and then treated with C-CPE or m19 on the basal side of the insert. The cells were exposed to the C-CPEs for 18 h. Changes in TEER values were monitored during the C-CPE treatment. Relative TEER values were calculated as the ratio of TEER values at 0 h. The TEER values were normalized by the area of the Caco-2 monolayer, and the TEER value of a blank Transwell™ chamber (background) was subtracted. Data are presented as means ± SD (n=3).

Claudin binder 修飾リポソームの創製に関する研究

分担研究者 鈴木 亮 帝京大学薬学部 講師

研究要旨

Claudin-4 (CL-4) に対する親和性を有するペプチド (C-CPE) を修飾したリポソームを創製した。このリポソームに抗がん剤を封入して CL-4 発現細胞に対する細胞傷害性を評価した。その結果、本リポソームは、コントロールペプチド修飾リポソームより細胞傷害性が高い傾向にあることが示された。

C. 研究目的

正常上皮細胞は水平方向に細胞分裂し、一定の細胞密度に達すると密着結合 (TJ) により接触阻害機構が作動し、細胞分裂を停止する。一方、上皮細胞の癌化超早期では、分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、TJ による接触阻害機構が利かなくなり、無秩序な細胞増殖を繰り返すようになる。このように、癌化した上皮細胞は分裂軸の回転に伴い、claudin (CL) が細胞表面に露出した状態となる。そのため、この露出した CL を標的とすることで上皮癌の早期診断・治療が可能になると考えられる。

これまでに、当該研究代表者の近藤は、膵臓癌、卵巣癌、大腸癌、膀胱癌、舌癌に高発現している CL-4 に対し特異的に結合するポリペプチド (C-CPE) を見出した。また、本研究にて Claudin-4 (CL-4) 結合ペプチド (C-CPE) の改変で CL-4 への親和性が高められた新規ペプチド (C-CPE22) が見出された。そこで本研究では、C-CPE22 修飾抗がん剤封入りリポソームを調製し、CL-4 発現がん細胞に対する傷害性を評価した。

D. 研究方法

1. C-CPE について

本実験ではアミノ酸配列の異なる2種類の C-CPE を使用した。なお、C-CPE14 は CL-4 に結合性を示さないコントロールペプチドである。また、C-CPE22 は、CL-4 に特異的に結合するペプチド

である。

2. C-CPE 修飾抗がん剤封入りリポソームの調製方法

Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) : cholesterol : DSPE-PEG(2k) = 33.9 mg: 17.0 mg: 2.8 mg をエタノール (0.7mL) に溶解し、50°C に加温した抗がん剤水溶液 (4 mL) (5-フルオロウラシル (5-FU)(10mg/mL) またはメトトレキサート (25 mg/mL) に注入した。その後、エクストルーダーでサイジングを行い、抗がん剤封入りリポソームを調製した。

DSPE-PEG(2k)-NHS14.9mg をガラスチューブ内でクロロホルムに溶解し、エバポレーターにてクロロホルムを除去し、ガラス表面に DSPE-PEG(2k)-NHS の薄層を作製した。DSPE-PEG(2k)-NHS: C-CPE14 または 22 = 200 : 1 となるように C-CPE 溶液を添加し、薄層を剥離した。その後、4 °C で 1 晩放置し、DSPE-PEG(2k)-NHS と C-CPE を反応させ DSPE-PEG(2k)-C-CPE とした。この DSPE-PEG(2k)-C-CPE 懸濁液を先に調製したリポソーム懸濁液に添加し、37°C で 1 時間攪拌し、リポソーム表面に DSPE-PEG(2k)-C-CPE を挿入した。最後に未封入の抗がん剤を超遠心により除去し、C-CPE 修飾抗がん剤封入りリポソームとした。

3. 細胞傷害性の評価方法

マウス乳がん細胞 (4T1 細胞) を 2.5×10^4 cells/well となるように 96 well プレートに播種した。24 時間培養後、培地を交換し、各種抗がん剤封入 C-CPE 修飾リポソームを添加した。48 時間培養後、MTT アッセイにより細胞傷害性を評価した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

C-CPE22 修飾リポソームに抗がん剤を封入し、がん細胞に対する抗がん剤デリバリーについて検討した。今回の検討では、CL-4 の発現が確認されているマウス乳がん細胞を用い検討を行った。5-FU またはメトトレキサート封入リポソームを用い検討したところ、C-CPE22 修飾リポソームの方が C-CPE14 リポソームより若干高い細胞傷害性を示す傾向が認められた。これは、CL-4 を特異的に認識する C-CPE22 修飾リポソームが 4T1 細胞表面上の CL-4 を積極的に認識することで C-CPE14 修飾リポソームより効率よく細胞に取り込まれたためではないかと考えられた。

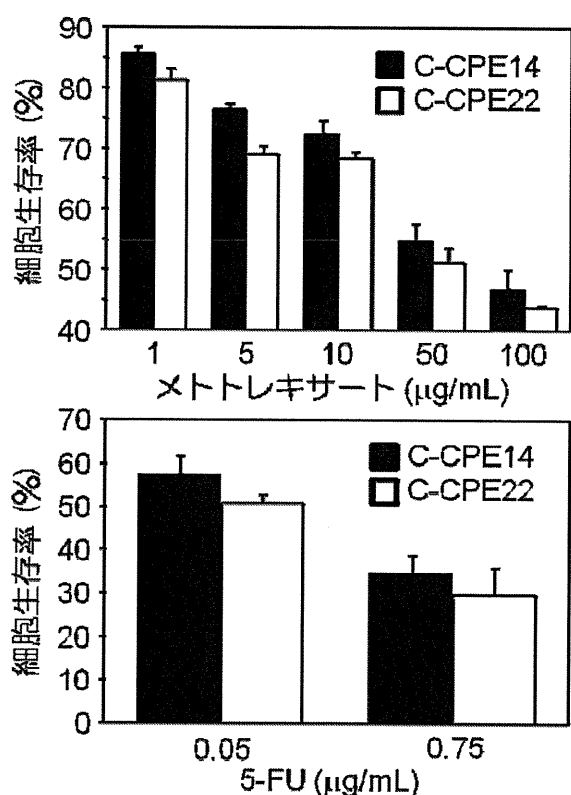


図7 C-CPE 修飾抗がん剤封入リポソームによる細胞傷害性評価

E. 結論

CL-4 に対し親和性を有するペプチド C-CPE22 を修飾抗がん剤封入リポソームを調製した。このリポソームは、C-CPE14 修飾リポソームより CL-4 発現がん細胞に対して若干高い細胞傷害性を示した。今後、さらなる抗腫瘍効果向上に向け C-CPE22 修飾方法や修飾量、抗がん剤の選択などリポソームの最適化が必要になると考えられる。様々な課題は残されているが、CL-4 をターゲティング可能な C-CPE 修飾リポソームは上皮癌細胞を標的とした薬物デリバリーのためのアクティブターゲティング型薬物キャリアとして利用可能になるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Omata D, Negishi Y, Yamamura S, Hagiwara S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y, Involvement of Ca^{2+} and ATP in Enhanced Gene Delivery by Bubble Liposomes and Ultrasound Exposure, Mol. Pharm. (In press)
2. Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y., Enhanced gene delivery using Bubble liposomes and ultrasound for folate-PEG liposomes., J. Drug Target. (In press)
3. Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M., Efficient suppression of murine ICAM-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation., Hepatology (In press)
4. Oda Y, Suzuki R, Otake S, Nishiie N, Hirata K, Koshima R, Nomura T, Utoguchi N, Kudo N, Tachibana K, Maruyama K, Prophylactic

- immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis. *J Control Release* (In press)
5. Negishi Y, Tsunoda Y, Endo-Takahashi Y, Oda Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamamoto M, Aramaki Y. Local gene delivery system by bubble liposomes and ultrasound exposure into joint synovium. *J Drug Deliv* (In press)
 6. Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Kato Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y.: Efficient siRNA delivery using novel siRNA-loaded Bubble liposomes and ultrasound. *Int J Pharm.*, 422: 504–509 (2012)
 7. Sugano M, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamamoto M, Aramaki Y.: Gene delivery system involving Bubble liposomes and ultrasound for the efficient in vivo delivery of genes into mouse tongue tissue. *Int J Pharm.*422: 332–337 (2012)
 8. Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Bubble Liposomes and Ultrasound Promoted Endosomal Escape of TAT-PEG Liposomes as Gene Delivery Carriers. *Mol Pharm.*, 8: 2416–2423 (2011)
 9. Un K, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.: Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure. *J Control Release* 156: 355–363 (2011)
 10. Shiraishi K, Endoh R, Furuhashi H, Nishihara M, Suzuki R, Maruyama K, Oda Y, Jo J, Tabata Y, Yamamoto J, Yokoyama M.: A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors. *Int J Pharm*, 421: 379–387 (2011)
 11. Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Ishii K, Suzuki R, Oguri Y, Murakami T, Maruyama K, Aramaki Y.: Development of novel nucleic acid-loaded Bubble liposomes using cholesterol-conjugated siRNA. *J Drug Target*, 19: 830–836 (2011)
 12. Ueno Y, Sonoda S, Suzuki R, Yokouchi M, Kawasoe Y, Tachibana K, Maruyama K, Sakamoto T, Komiya S.: Combination of ultrasound and bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth, *Cancer Biol Ther*, 12: 270–277 (2011)
 13. Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.: The elucidation of gene transferring mechanism by ultrasound-responsive unmodified and mannose-modified lipoplexes, *Biomaterials*, 32: 4659–4669 (2011)
 14. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Suppression of Melanoma Growth and Metastasis by DNA Vaccination Using an Ultrasound-Responsive and Mannose-Modified Gene Carrier. *Mol Pharm.* 8: 543–554 (2011)
 15. Negishi Y, Matsuo K, Endo-Takahashi Y, Suzuki K, Matsuki Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y. Delivery of an Angiogenic Gene into Ischemic Muscle by Novel Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure. *Pharm Res.* 28: 712–719 (2011)
 16. Hagsawa K, Nishioka T, Suzuki R, Takizawa T, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Ohsuzu F, Kikuchi M. Enhancement of ultrasonic thrombus imaging using novel liposomal bubbles targeting activated platelet glycoprotein IIb/IIIa complex—in vitro and in vivo study. *Int J Cardiol.*, 152: 202–206 (2011)

G-2 学会発表

1. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Risa Koshima, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、The Combination Therapy of Therapeutic Ultrasound and Dendritic

Cell-Based Immunotherapy, WFUMB2011、オーストリア、2011年8月26-30日

2. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波造影・治療技術の新展開、日本バイオイメージング学会、北海道、2011年9月1-2日
3. 佐藤紗也佳、真柴拓哉、本田亜紀、Citterio Daniel、小田雄介、鈴木 亮、丸山一雄、鈴木孝治、静岡DDSカンファランス、静岡、2011年9月16日
4. Ryo Suzuki, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Induction of anti-tumor immunity in the combination of therapeutic ultrasound and dendritic cell-based immunotherapy、日本癌学会、名古屋、2011年10月3-5日
5. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Development of an effective gene delivery system with sonoporation in cancer gene therapy、AAPS2011、米国、2011年10月22-27日
6. 鈴木 亮、小田雄介、平田圭一、野村鉄也、宇都口直樹、丸山一雄、リポソーム型微小気泡を利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用によるがん治療効果の増強に関する研究、東京、2011年11月26日

る研究、東京、2011年11月26日

7. 鈴木 亮、小田雄介、丸山一雄、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入特性の評価、マイクバブルと超音波の相互作用に関するシンポジウム、名古屋、2012年1月20日
8. 鈴木 亮、根岸洋一、必ずうまくいくソノポレーション法:実験の実際とコツ、第4回超音波分子診断治療研究会、福岡、2012年3月3日、招待講演

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

なし

H-2 実用新案登録

なし

H-3 その他

なし

I. 研究協力者

小田 雄介

平田 圭一

宇留賀 仁史

Claudin binder の創製に関する研究

分担研究者 阿部 康弘 独立行政法人医薬基盤研究所 研究員

研究要旨

周知のように、癌克服に向けた最重要戦略は、癌を早期に発見し、早期に治療することであり、腫瘍特異的抗原を利用した既存の癌診断検出感度(10^9 個以上の癌細胞)を凌駕する、新たな原理に基づく癌診断・治療法の開発が癌克服の成否を握っている。中でも、悪性腫瘍の 90%を占める上皮癌超早期では、分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、密着結合(TJ)による接触阻害機構が利かなくなり、無秩序な細胞増殖繰り返すようになる。以上の事実は、この『分裂軸の回転』を利用すれば癌の早期診断・治療が可能になることを示唆している。

そこで本研究では、上皮細胞癌化の超早期イベント『分裂軸の回転』に伴い表面に露出する TJ 構成蛋白質 Claudin(CL)に着目し、CL binder 創製に向けた創薬基盤技術の開発を推進している。本年度は、ハイスループットに結合親和性に優れたファージクローンをスクリーニングするため、「免疫ファージ抗体ライブラリ」を用いた抗体作製法の最適化を試みた。

A. 研究目的

高齢化社会の進行に伴い、癌による死者の数は増加傾向にあり、本邦では年間30万人余り、世界では年間700万人余りの人が癌により命を失っている。とりわけ、上皮癌は悪性腫瘍の90%を占めており、上皮癌の克服が健康寿命延長に向けた最重要課題の1つとなっている。癌克服の最重要基本戦略は癌を早期に発見し、早期に治療することであり、癌細胞特異的抗原を利用した既存の癌診断の検出感度(10^9 個以上の癌細胞)を凌駕する、新たな癌診断・治療法の開発が急務となっている。上皮細胞が癌化すると、分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、細胞間隙面に局在するCLを表面に露出した状態で増殖を開始することから、CLリガンドを利用すれば癌化早期イベント『分裂軸の回転』を利用した新規癌診断・治療法の開発に繋がると考えられる。

以上の背景を踏まえ、本研究では、新規CL binder創製に向けた創薬基盤技術の開発を推進してきた。昨年度までに、ナイーブファージ抗体ライブラリを構築し、抗原との結合親和性に基づくセレクション(パンニング)条件の最適化を行ってきた。さらに、モデル抗原として、ア

ポトーシスの誘導に関わる蛋白質として広く知られるヒトprocaspase-8(proCASP8)に対するパンニングを行うことで、proCASP8特異的なファージクローン(NG-1)を単離・同定することに成功している。

そこで、本年度は、ファージ表面提示法を用いた創薬基盤技術の更なるシステムアップを目的に、免疫ファージ抗体ライブラリからのモノクローナル抗体作製に着手した。免疫ファージ抗体ライブラリとは、標的抗原を予め感作させたマウスの脾臓由来B細胞を抗体遺伝子ソースとしてファージ抗体ライブラリを作製するものである。従って、免疫原としてproCASP8蛋白質を用いて抗体産生を誘導したマウス由来の免疫抗体ライブラリからは、結合親和性に優れた、数多くの抗proCASP8抗体を迅速かつ簡便に単離できるものと考えられる。そこで、昨年度までに作製したモデル抗原ヒトproCASP8組みかえ蛋白質をマウスに免疫し、抗proCASP8抗体が誘導されたマウスB細胞を遺伝子ソースに、免疫抗体ライブラリの構築を試みた。ライブラリ構築における抗体遺伝子V_L、V_Hの増幅には、ナイーブファージ抗体ライブラリに適応した独自のプライマーセットを本ライブラリにも応用展

関することで、その質的向上をはかった。

B. 研究方法

1. マウスに対する proCASP8 蛋白質の免疫

マウスは BALB/c マウス (メス、6-7 週齢、日本 SLC) を用いた。proCASP8 組み換え蛋白質を等量の Titer Max Gold (Sigma-Aldrich Corporation, USA) と混合し、エマルジョンとした。これを抗原蛋白質量として 50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ となるように、マウス頸部皮内、左脚筋肉内に数箇所に分けて投与した (1 次免疫 day 0)。2 週間後 (day 14) に同様の方法でエマルジョンを作製し、追加免疫を行なった (2 次免疫)。その 1 週間後 (day 21) に眼底採血を行い後述する方法で血清中の proCASP8 に対する抗体価を測定した。

2. 抗 proCASP8 抗体価の測定

採取した血清中に含まれる抗 proCASP8 抗体は ELISA 法によって測定した。免疫に用いた proCASP8 蛋白質を B buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6); Sigma-Aldrich) で 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、Maxisorb 96 well plate に 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、一晚 4 $^{\circ}\text{C}$ で静置して固相した。PBS で洗浄後、4% Block Ace 300 μL を各 well に添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間でブロッキングした。PBS で洗浄後、0.4% Block Ace で段階希釈された血清それぞれを 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、室温で 2 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、HRP 標識 anti-mouse IgG 抗体を 0.4% Block Ace で 50,000 倍希釈したものを 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、1 時間室温で反応させた。その後再び PBST で 3 回洗浄後、基質溶液 (TMBZ) を加えて発色を行い、2 N 硫酸を添加することで反応を停止させた。吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 655 nm) はマイクロプレートリーダーで測定した。

3. cDNA の作製

抗原特異的な抗体価の上昇が認められたマウスをペントバルビタールにより深麻酔し、脾細胞を回収した。50~100 mg の組織に対して 1 mL の TRIzol reagent (Invitrogen Corp.) を加え、ホモジネートした。室温で 5 分間インキュベーションし、TRIzol reagent 1 mL に対して 200 μL の chloroform を加え、15 秒間攪拌した。室温で 3 分間インキュベーションし、12,000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 15

分間遠心した。上清を新しいマイクロチューブに移し、等量の isopropylalcohol と 1 / 10 容量の 3 M sodium acetate を加えた。室温で 10 分間インキュベーションし、12,000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間遠心した。上清を除き、70% ethanol で wash し、7500 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間遠心した。上清を除き、pellet を RNA free 水で溶解し、total RNA を得た。この total RNA 5 μg 当たり、50 μM oligo(dT)₂₀ (Invitrogen Corp.) 1 μL 、10 mM dNTP mix 1 μL を混合し、DEPEC 処理水を加えて 10 μL とし、65 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間インキュベーションした。10 \times RT buffer 2 μL 、25 mM MgCl₂ 4 μL 、0.1 M DTT 2 μL 、RNaseOUT (Invitrogen Corp.) 1 μL 、SuperScript III RT (Invitrogen Corp.) 1 μL を加えて、50 $^{\circ}\text{C}$ で 50 分間、85 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間反応させた。RNase H (Invitrogen Corp.) 1 μL を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間反応させ、脾細胞由来 cDNA を得た。

4. scFv 遺伝子の作製

cDNA をテンプレートとし、アニーリング温度を 50 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間、伸長反応を 68 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間に設定し、Table 1 に示した primer sets (2 pmol) と KOD-plus-DNA Polymerase (Toyobo, Co., Ltd.) を用いて PCR を 35 サイクル行った。この PCR 産物を PCR purification kit で精製し、VL 断片と VH 断片とした。VL 断片と VH 断片をテンプレートとしてアニーリング温度 63 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間、伸長反応を 68 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間に設定し、KOD-plus-DNA Polymerase を用いて assembly PCR を 19 サイクル行った。この assembly PCR 産物と、*Nco*I サイトを有するプライマー Y15 (5'-GC CAAGCTTT GGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAA TTATTATTTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCCCTTTCTATG CGGCCAGCCGGCCATGGCC-3')、及び *Not*I サイトを有するプライマー Y16 (5'-TTAGTAAATGAATTTTCT GTATGAGGTTTTGCTAAACAACCTTTCAACAGTCTAT GCGGCACGCGGTTCCACGGATCCGGATACGGCACC GGCGCACCTGCGGCCGC-3') を用い、アニーリング温度を 65 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間、伸長反応を 68 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間に設定し、KOD-plus-DNA Polymerase を用いて PCR を 35 サイクル行った。この PCR 産物を PCR purification kit で精製し、scFv 遺伝子を作製した。

5. 免疫マウス scFv ファージ抗体ライブラリの作製

scFv 遺伝子を制限酵素 *Nco* I 及び *Not* I で処理し、あらかじめ *Nco* I 及び *Not* I で処理したファージミッドベクター pCANTAB5E と T4 ligase (Roche Diagnostic Corp.) を用いて 16° C、16 時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を PCR purification kit で精製した。あらかじめ 2YT 培地で OD₆₀₀ = 0.3~0.6 まで培養した大腸菌 TG1 を、MilliQ 水で 3 回洗浄操作を行い、10% glycerol で懸濁水冷し、エレクトロポレーション用 TG1 とした。本 TG1 50 µL に対して、精製後のライゲーション産物 1 µL を添加し、GenePulser Xcell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用い、1.8 kV、0.25 µF、200 Ω でエレクトロポレーションを行った。その後、2% glucose 含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 µg/mL Ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地で希釈し、Petrifilm に播種し、37° C で一晩培養した。得られた形質転換コロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

6. アフィニティーパンニング

Anti-FLAG M2 Agarose (Sigma-Aldrich Corp.) 100 µL に、精製した scFv 提示ファージライブラリを 4% Block Ace と等量混合した input 溶液を 100 µL 添加した。4° C で 1 時間、転倒混和させた。続いて 0.1% Tween-20-PBS で 5 回洗浄後、1 mg/mL に調整した 3XFLAG Peptide (Sigma-Aldrich Corp.) を 100 µL 添加し、40 分間、4° C で転倒混和することで結合ファージを溶出した。一方で、抗原を炭酸緩衝液で 10 µg/mL に希釈し、イムノプレートに 4° C で一晩固相化させた。4% Block Ace を添加し、37° C で 2 時間ブロッキングした。これに上記 3XFLAG Peptide で溶出したファージを 100 µL 添加し、4° C で 1 時間、インキュベートした。PBST で洗浄後、10 mM glycine-HCl (pH 2.0) と glycine-NaOH (pH 11.0) をそれぞれ 100 µL 添加し、結合ファージを溶出した。回収したファージ溶液は直ちに 50 µL の Tris-HCl buffer (pH 8.0) で中和し、output 溶液とした。output ファージは大腸菌 TG1 に感染させてモノクローン化した。各抗原蛋白質について、本パンニング操作を 2 回繰り返した。

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

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

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載する。

D. 考察

proCASP8 に対して結合親和性に優れ、数多くの抗体が簡便に作製可能な免疫ファージ抗体ライブラリを構築するために、まず proCASP8-his-tag 蛋白質をマウスに免疫し、抗原特異的な抗体産生の誘導を試みた。初回免疫から 2 週間後に追加免疫を行い、3 週間後に採血した。回収した血液中に proCASP8 特異的な抗体が生成しているかを明らかにする目的で、血清の抗体価を ELISA により評価した (Fig. 1)。その結果、抗血清は、コントロール蛋白質として用いた his-tag-p53 を固相した群に対し、proCASP8-his-tag を固相した群で有意な結合性を示した。従って、この血清中には proCASP8 特異的な抗体が生成していることが明らかとなった。そこで、これらのマウスの脾臓を回収し mRNA を抽出した。この mRNA から、我々が独自に設計したプライマーセットを本ライブラリにも用い、VL 及び VH 遺伝子断片をそれぞれ増幅した。その結果、作製された PCR 産物は、約 380 bp と約 400 bp 付近に位置し、目的の VL、VH 遺伝子断片が増幅されていることを確認した。この両遺伝子を assembly PCR により連結した。そして、この産物をテンプレートとして Y15、Y16 プライマー

を用いPCRによって scFv 遺伝子を増幅し、酵素処理後、電気泳動により約 720 bp 付近に遺伝子断片が増幅されていることを確認した。この得られた scFv 遺伝子断片をファージミドベクター pCANTAB5E に組み込み、大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションにより形質転換した。得られた一本鎖ファージ抗体ライブラリのライブラリサイズは、大腸菌への形質転換効率から計算したところ 3.0×10^6 CFU であった。前節で作製した免疫ファージ抗体ライブラリから抗 proCASP8 抗体を得るために、まずパンニング操作を2回くり返し、proCASP8 に結合するファージクローンの濃縮を試みた。その結果、パンニング前のファージ抗体ライブラリ (input ファージ) と、パンニングにより回収されたファージ (output ファージ) の比率を検討したところ、2回のパンニングを繰り返すことにより、proCASP8 に結合するファージの比率は 50 倍以上も上昇しており、抗 proCASP8 抗体を提示したファージが濃縮されていることが示唆された (Fig. 2)。そこで次に、パンニングによる濃縮後のライブラリから目的クローンをスクリーニングするため、各パンニングラウンドで回収されたファージを大腸菌 TG1 に再感染させることでモノクローン化し、大腸菌培養上清中に産生されたファージを用いて、proCASP8 に対するファージ ELISA により結合性を評価した (Fig. 3)。その結果、input ファージでは、proCASP8 に結合性を示すクローンは認められなかったのに対し、パンニングを繰り返すことにより、抗原結合性のクローンが増加し、2nd パンニング後の output ファージでは proCASP8 に結合性を示すクローンが多数認められた。次に、このスクリーニングで、これまで当研究室で単離してきた anti-KDR 抗体提示ファージを作用させた negative control よりも、吸光度が有意に高かった $OD_{450-655nm}$ が 0.1 以上のクローンを proCASP8 に結合性を有すると考え、これら 17 クローンについて DNA シークエンス解析を行ったところ、異なる 7 種類の配列 (IC-1~7) をもつ抗体であることが確認された (Table 1)。次にこれらの抗体の特異性を、第一節と同様に、ファージ ELISA 法にて評価した。固定化された human proCASP8、human bid、human TNFR2、human KDR、human importin- β 、luciferase、Venus に対する結合性を検討した結果、単離されたどの抗 proCASP8 抗体も、proCASP8 に対してはファージ表面

上に提示された抗体量依存的に結合性を示したのに対し、他の抗原蛋白質には結合性は認められなかった (Table 2)。この結果、免疫ファージ抗体ライブラリから単離した 7 種類の抗体は proCASP8 特異的な抗体であることが示唆された。

本検討では、スクリーニングにパンニング後の約 50 クローンのファージを試験し、シーケンス解析と抗原特異性の評価を行った。従って、さらにスクリーニングするクローン数を増やすことにより、より多種類の抗原特異的な抗体を単離・同定できるものと考えられる。また proCASP8 蛋白質をマウスに免疫してからモノクローナル抗体を単離するまでに要した期間はわずか 2 ヶ月であった。これは本方法が、同様に抗原蛋白質の免疫を必要し、一般に半年もの期間を要するハイブリドマ法に比べても、迅速に高親和性の抗体を単離しえるシステムであることが考えられた。以上の結果より、本研究で構築した免疫ファージ抗体ライブラリは、数多くの抗原特異的なモノクローナル抗体を迅速に、かつ効率よく単離できる優れた抗体作製システムになりうることを示唆された。

E. 結論

本研究では、上皮細胞癌化の超早期イベント『分裂軸の回転』に伴い表面に露出する TJ 構成蛋白質 Claudin (CL) に着目し、CL をターゲットとした癌診断・治療用ナノメディシンの開発に向けたパイロットスタディを実施した。本年度は、免疫ファージ抗体ライブラリを新たに構築し、最適条件下でパンニングを行うことで、モデル抗原 proCASP8 に結合するファージクローンを 7 種類単離・同定することに成功した。以上の結果より、本研究で構築したライブラリは、質・サイズともに優れたライブラリであることが判明した。今後は、ファージ表面提示法に基づく機能性人工蛋白質の創出基盤の最適化を通じて、CL binder の創出に向けたスクリーニングシステムの開発を進める予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Abe Y., Yoshikawa T., Inoue M., Nomura T., Furuya T., Yamashita T., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive panning., *Biomaterials.*, 32(23):5498-504, 2011.

G-2 学会発表

1. Abe Y., Nomura T., Inoue M., Furuya T., Arita S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S., Selective inhibition of TNFR1 by mutant TNF with antagonistic activity is effective in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis., 13th International TNF Conference, Awaji (Japan), 15-18 May, 2011.
2. Kanasaki S., Nagano K., Yamashita T., Maeda Y., Inoue M., Zhao X., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y.,

Tsunoda S. : Possibility of Ephrin receptor A10 as a drug target in triple negative breast cancer., The 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress (2011 Stockholm Cancer Congress), Stockholm (Sweden), 23-27 September, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当なし

H-2 実用新案登録

該当なし

H-3 その他

I. 研究協力者

井上 雅己
古屋 剛
山下琢矢
金崎聡一郎
前田祐香

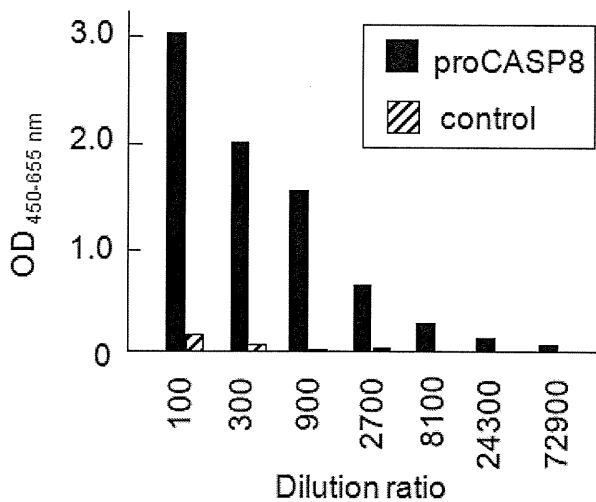


Fig. 1 Measurement of the antibody value for proCASP8 in the mouse serum. The diluted serum was reacted on the each well immobilized proCASP8-his-tag and control protein, his-tag-p53. The induction of anti-proCASP8 antibodies in mouse serum was determined by ELISA.

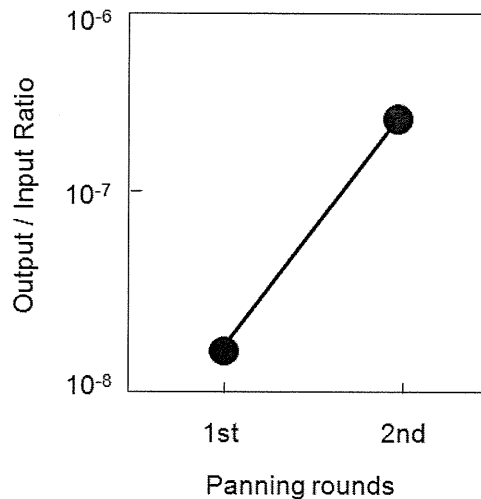


Fig. 2 Enrichment of antibodies to proCASP8 from immune libraries by panning. The panning ratio was calculated as follows ; (output phage titer) / (input phage titer).

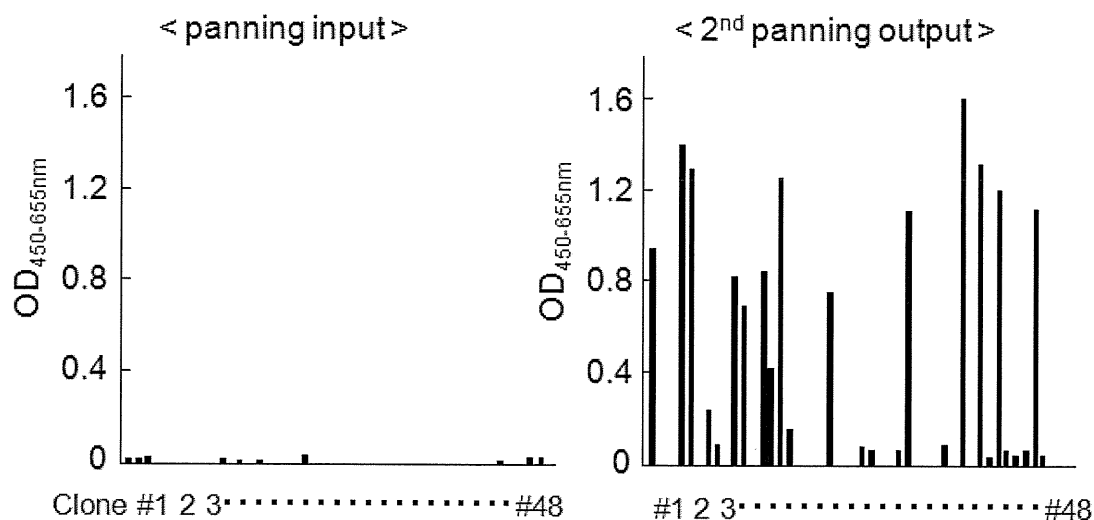


Fig. 3 Isolation of antibodies to proCASP8 from immune libraries by panning. After panning on proCASP8, the binding properties of selected clones were measured by ELISA. As negative control, phage displaying anti-KDR scFv was used.

Table 1 Amino acid sequences of anti-proCASP8 scFv(IC-1~7) antibodies from immune libraries

VL

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IC-1	DIGMIDQSRFUEISVGDNRVSTC	KASQWVGRVA	WYQQRFGQSPFALIV	SAKRVYD	GVFDRFVIGSGSGTDFILTIQWVQSEDLAEVFC	QSYNSRFLT	FGAGTLEIKR
IC-2	-----T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-3	---Y-T-----	-----	-----	-----	-----D-----	---S---	---G---
IC-4	---Y-T-----	-----	-----	-----	-----	-----	---G---
IC-5	---LT---FIT-AA-P-EKITI---	S---SSISWVLIH	---F---L---	RT-SLA-	---A---S---SVS---GTMEA---V-T-Y-	---GS---	-----L---
IC-6	---LT---FIT-AA-P-EKITI---	S---SSISWVLIH	---F---L---	RT-SLA-	---A---S---SVS---GTMEA---V-T-Y-	---GS---	-----L---
IC-7	---LI---FIT-AA-P-EKITI---	S---SSISWVLIH	---F---L---	RT-SLA-	---A---S---SVS---GTMEA---V-T-Y-	---GS---	-----

VH

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IC-1	EVELVEGGGLVHPGGSLHSCAASGFAPD	SSEMS	WVRSIFERLEWA	TISSGGSTTFVPSVHG	RFTISRDMAKNTLFLQMISLRSEDALVPCAR	HWYV	WGQSTLIVSS
IC-2	---M-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-3	---E-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-4	---E-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-5	-----C-K-----T-N	-YA-N	---A-G-G---	R-R-KSRVATVYADSRKD	-----DQSM	---M-KT---M---V-	HWYMDV
IC-6	---R-----C-K-----T-N	-YA-N	---A-G-G---	R-R-KSRVATVYADSRKD	-----DQSM	---M-KT---M---V-	HWYMDV
IC-7	-----C-K-----T-N	-YA-N	---A-G-G---	R-R-KSRVATVYADSRKD	-----DQSM	---M-KT---M---V-	HWYMDV

Table 2 Amino acid sequences of anti-proCASP8 scFv (IC-1~7) antibodies from immune libraries

	proCASP8	Bid	Importin-β	Venus	TNFR2	KDR	Luciferase
IC-1	+	-	-	-	-	-	-
IC-2	+	-	-	-	-	-	-
IC-3	+	-	-	-	-	-	-
IC-4	+	-	-	-	-	-	-
IC-5	+	-	-	-	-	-	-
IC-6	+	-	-	-	-	-	-
IC-7	+	-	-	-	-	-	-

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kakutani H Takahashi A Kondoh M Saito Y Yamaura T Sakihama T Hamakubo T Yagi K	A novel screening system for claudin binder display using baculoviral display	<i>PLoS One</i>	6	e16611	2011
Suzuki H Kondoh M Li X Takahashi A Matsuhisa K Matsushita K Kakamu Y Yamane S Kodaka M Isoda K Yagi K	A toxicological evaluation of a claudin modulator, C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin, in mice	<i>Pharmazie</i>	66	543-546	2011
Takahashi A Kondoh M Uchida H Kakamu Y Hamakubo T Yagi K	Mutated C-terminal fragments of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin have increased affinity to claudin-4 and reversibly modulate tight junctions in vitro	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	410	466-470	2011
Omata D, Negishi Y, Yamamura S, Hagiwara S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y	Involvement of Ca ²⁺ and ATP in Enhanced Gene Delivery by Bubble Liposomes and Ultrasound Exposure	<i>Mol. Pharm.</i>		In press	

Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y.	Enhanced gene delivery using Bubble liposomes and ultrasound for folate-PEG liposomes.	<i>J. Drug Target.</i>		In press	
Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.	Efficient suppression of murine ICAM-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation.	<i>Hepatology</i>		In press	
Oda Y, Suzuki R, Otake S, Nishiie N, Hirata K, Koshima R, Nomura T, Utoguchi N, Kudo N, Tachibana K, Maruyama K	Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis	<i>J Control Release</i>		In press	
Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Kato Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y	Efficient siRNA delivery using novel siRNA-loaded Bubble liposomes and ultrasound	<i>Int J Pharm</i>	422	504-509	2012
Sugano M, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamamoto M, Aramaki Y	Gene delivery system involving Bubble liposomes and ultrasound for the efficient in vivo delivery of genes into mouse tongue tissue.	<i>Int J Pharm.</i>	422	332-337	2012
Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y	Bubble Liposomes and Ultrasound Promoted Endosomal Escape of TAT-PEG Liposomes as Gene Delivery Carriers	<i>Mol Pharm</i>	8	2416-2423	2011

Negishi Y, Tsunoda Y, Endo-Takahashi Y, Oda Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamamoto M, Aramaki Y	Local gene delivery system by bubble liposomes and ultrasound exposure into joint synovium.	<i>J Drug Deliv</i>	8	2416-2423	2011
Un K, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M	Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure.	<i>J Control Release</i>	156	355-363	2011
Shiraishi K, Endoh R, Furuhashi H, Nishihara M, Suzuki R, Maruyama K, Oda Y, Jo J, Tabata Y, Yamamoto J, Yokoyama M	A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors	<i>Int J Pharm</i>	421	379-387	2011
Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Ishii K, Suzuki R, Oguri Y, Murakami T, Maruyama K, Aramaki Y	Development of novel nucleic acid-loaded Bubble liposomes using cholesterol-conjugated siRNA	<i>J Drug Target</i>	19	830-836	2011
Ueno Y, Sonoda S, Suzuki R, Yokouchi M, Kawasoe Y, Tachibana K, Maruyama K, Sakamoto T, Komiya S	Combination of ultrasound and bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth	<i>Cancer Biol Ther</i>	12	270-277	2011
Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M	The elucidation of gene transferring mechanism by ultrasound-responsive unmodified and mannose-modified lipoplexes	<i>Biomaterials</i>	32	4659-4669	2011