

20111012B

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21-23年度 総合研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成24(2012)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21－23年度 総合研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成24（2012）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	----- 71
鈴木亮	
2. Claudin binderの創製に関する研究	----- 80
阿部康弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 92
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 99

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ことを目的とした。

これまでの検討により、①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否を検証、②claudin 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。③C-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、④C-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

の癌に対する有効且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(10⁹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、本研究では、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 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. pET-MCS-PSIF の作製

まず、His-tag 融合蛋白質作製用プラスミド pET-16b (Novagen Inc., W.I., U.S.A) に、マルチクローニングサイト (MCS) を組み込み、pET-MCS を作製した。PSIF 発現プラスミド pPBV-PE40 を鋳型として、PCR 法にて PSIF DNA 断片を増幅した。PCR には、forward primer (5' -GATGATCTGAGCGGCCGCAACCGAGGGCGGC

AG -3', NotI site is under lined)と reverse primer (5' -TCCAGATCTTTACAGTTCGTCTTTCTTCAGG TCCTC -3', BglIII site is under lined)を用いて、KOD-plus (TOYOBO CO., Osaka, Japan) を用いて増幅させた。得られた PCR 産物を PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて DNA 精製を行い、NotI, BglIII を用いて 37 °Cで一晩制限酵素処理し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。pET-MCS を NotI, BamHI 処理した pET-MCS と PCR 断片を T4 DNA ligase を用いて 16 °Cで一晩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大腸菌に形質転換し、プラスミドを精製し、インサートの確認を行った。インサートが確認されたサンプルについてシーケンスを確認し、pET-MCS-PSIF を得た。

B-2. C-CPE-PSIF 発現プラスミド (pET-C-CPE-PSIF) の作製

C-CPE の遺伝子を pET16b に組み込んだ pET-H₁₀PER (大阪大学微生物病研究所 堀口安彦博士より供与)を鋳型として、PCR 法にて C-CPE DNA 断片を増幅した。PCR には、forward primer (5' -GGAATTCATATGGATATAGAAAAGAAATCC TTGATTTAGCTGCT-3', SpeI site is under lined)と reverse primer (5' -GGACTAGTAAATTTTTGAAATAATATTGAATAAG GGTAATTTCCACTATATATG-3', Nde I site is under lined) を用い、KOD-plus (TOYOBO CO., Osaka, Japan) を用いて増幅させた。得られた PCR 産物を PCR purification Kit を用いて精製し、SpeI/NdeI を用いて 37 °Cで一晩制限酵素処理した後に、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。pET-MCS-PSIF も同様に SpeI/NdeI を用いて 37 °Cで 1.5 時間処理した後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。PCR 断片およびベクターを T4 DNA ligase を用いて 16 °Cで一晩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フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿した後に、NcoI を用いて 37 °Cで 2 時間処理し

た。

得られたプラスミドで大腸菌に形質転換し、大腸菌を回収した。QIA prep® Spin Mini prep Kit にて大腸菌よりプラスミドを精製し、NcoI 処理によりインサートの確認を行った。インサートが確認されたサンプルについてシーケンスを確認し、pET-C-CPE-PSIF を得た。

B-3. PSIF および C-CPE-PSIF の精製

pET-PSIF または pET-C-CPE-PSIF を大腸菌 BL21(DE3) (Novagen) に導入後、LA プレートに播き 37 °Cで一晩培養した。翌日コロニーを 20 個ピックアップし LA 培地 100 mL にて 37 °Cで一晩振とう培養した。翌日 LA 培地 1 L に培養液を移し、37 °Cで 3 時間振とう培養後、IPTG を終濃度 0.1 mM となるように添加し、さらに 3 時間振とう培養した。その後 4 °C、10,000 rpm で 2 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-80 °Cで凍結保存した。

凍結保存した大腸菌を氷上で溶解し、buffer A (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 400 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride, 1 mM 2-mercaptethanol, 10% glycerol) を 1 mL/100 mL culture の割合で加え、氷冷しながら超音波処理を 40 秒間、3 回行い大腸菌を破碎した。4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。あらかじめ 6 M guanidine/EDTA 10 mL, 0.1 M NiSO₄ 500 μL, MilliQ 5 mL, buffer A 10 mL を順に流し平衡化しておいた HiTrap Chelating HP (GE Healthcare Bio-Sciences AB, U.K.) に、分取した上清を流し PSIF および C-CPE-PSIF を吸着させた。Buffer A を 15 mL 流した後、100 mM imidazole 溶出液を 10 mL 流すことにより大腸菌由来のタンパク質の非特異的吸着を除いた後に、400 mM imidazole 溶出液 10 mL を流し溶出液を 1 mL ずつ分取した。溶出画分を 12% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離後、CBB 染色を行い、目的の蛋白質が多く溶出されている画分を確認した。次に、PSIF、C-CPE-PSIF が多く溶出されている画分のバッファーを PD-10 カラム(GE Healthcare Bio-Sciences AB,

U.K.) を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより PBS(-) (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) に置換した。あらかじめ PD-10 カラムに PBS を 30 mL 流して平衡化しておき、HiTrap Chelating HP より得られた溶出画分を 1 mL 流し、その後 PBS (-) を流して溶出液を 500 μL ずつ分取した。次にウシ血清アルブミンを標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Chemical Co., Rockford, IL., USA) を用いて、PSIF および C-CPE-PSIF の濃度を 570 nm における吸光度から算出した。

B-4. Western blotting

12% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE (30 mA/枚、約 1.5 時間) を行った後、TRANS-BLOTR SD SEMI-DRY TRANSEFR CELLによりゲル中のタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA で 20 分間転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク/TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸して、室温で 2 時間振とうし、ブロッキング操作を行った。TBS-T で 5 回洗浄後、1 次抗体 anti-His-Tag mAb (2,000 倍希釈、Novagen, EMD Bioscience, Germany) と 2 時間反応させた。TBS-T で洗浄後、2 次抗体 HRP 標識 goat anti-mouse IgG (2,000 倍希釈、CEMICON, CA) と 1 時間反応させた。検出には、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, UK) を用い露光した X 線フィルム (KONICA MINOLUTA MEDICAL & GRAPHIC INC., TOKYO, JAPAN) を現像した。

B-5. 細胞培養

マウス線維芽細胞 L 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS, JRH Bioscience Inc., Kansas, USA), 20 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine を含む EAGLE's MEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。さらに各種 mouse claudin を発現させた L 細胞 (claudin 発現 L 細胞、京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学 月田承一郎博士から供与) は、上

記の培地に G418 (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を終濃度 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した培地を用いて、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下で培養した。

ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞は 10% FBS, 20 mM NaHCO_3 , 2 mM L-glutamine を含む RPMI 1640 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下で培養した。また、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞および SK-HEP-1 細胞は 10% FBS, 20 mM NaHCO_3 , 2 mM L-glutamine を含む Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM (D-MEM) 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下で培養した。

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞は 10% FBS, 20 mM NaHCO_3 , 2 mM L-glutamine, 19.4 mM D-glucose, 1% Non-essential amino acid solution (Invitrogen, Co., Ltd) を含む D-MEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下で培養した。

マウス乳癌由来 4T1 細胞は 10%FBS, 20 mM NaHCO_3 , 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES を含む D-MEM 培地を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下で培養した。

マウスメラノーマ細胞 B16/BL6 細胞およびイヌ腎臓細胞株 MDCK (Madin-Darby canine kidney)細胞は 10 % Fetal Bovine Serum (FBS, JRH Bioscience Inc., Kansas, USA), 20 mM NaHCO_3 , 2 mM L-glutamine を含む DMEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 条件下で培養した。さらに各種 claudin を発現させた B16/BL6 細胞である B16/BL6-CL1 (claudin-1 発現 B16/BL6 細胞) および B16/BL6-CL4 (claudin-4 発現 B16/BL6 細胞) は、上記の培地に G418 (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を終濃度 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように添加した培地を用いて、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 条件下で培養した。

B-6. 細胞の claudin 発現確認

L 細胞および各種 claudin 発現 L 細胞を氷冷 PBS (-)

1 mL により培養ディッシュからセルスクレーパーによって剥がし、細胞を回収した。氷冷 PBS (-) 1 mL を加え細胞を懸濁させ、4 $^{\circ}\text{C}$ 、3,000 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。さらにこの操作を 3 回繰り返した。遠心分離後、上清を取り除き lysis buffer (1% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail 含有 PBS (-)) を加え、氷冷しながら超音波処理を 20 秒間、3 回行い、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を回収し細胞溶解液を作製した。細胞溶解液に 4 \times SDS buffer を加え 5 分間加熱し、泳動用サンプルとした。15% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE、Western blotting を行った。Claudin の検出には rabbit anti-claudin-1 pAb、rabbit anti-claudin-2 pAb、mouse anti-claudin-4 pAb、rabbit anti-claudin-5 pAb (一次抗体; 2,000 倍希釈、二次抗体: 5,000 倍希釈、invitrogen, South San Francisco, CA) を用い、PVDF 膜を Re-Blot Plus (CHEMICON international Inc., CA) でリブプローブした後、 β -actin (一次抗体: 5,000 倍希釈、二次抗体: 10,000 倍希釈, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を検出した。

Caco-2 細胞を 6-well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, USA) に 2×10^5 cells/well で播種後、1, 3, 5, 7, 9 日目に細胞を回収した。Lysis buffer II (10 mM Tris-HCl (pH7.4), 8.75 mg/mL NaCl, 2.5 mg/ml デオキシコール酸, 0.38 mg/mL EGTA, 2 mM SDS, 1% NP-40) を用いて膜蛋白質の可溶化を行い、上記に準じて western blotting を行った。

B-7. Claudin-4 発現 L 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性の検討

Claudin-4 発現 L 細胞を 96-well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A) に 1×10^4 cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μL に交換後、PBS(-)で段階希釈した PSIF もしくは C-CPE-PSIF を終濃度 0.5, 1, 10 および 20 ng/mL となるように 10 μL ずつ添加した。24 時間後に WST-8 法により細胞生存率を測定した。各 well に SF 試薬 (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を 10 μL ず

つ添加し、1.5 時間培養後、450 nm における吸光度を測定した。PBS (-) 添加群の吸光度を基準として各蛋白質濃度における吸光度の相対値を求め、生存率とした。

B-8. C-CPE を用いた競合阻害実験

Claudin-4 発現 L 細胞を 96-well plate に 1×10^4 cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 80 μ L に交換後、PBS (-) で段階希釈した BSA または C-CPE を終濃度 0, 0.1, 0.5, 1, 5 および 10 μ g/mL となるように 10 μ L ずつ添加し、2 時間処理した。さらに 100 ng/mL の C-CPE-PSIF を 10 μ L ずつ加えた (終濃度 10 ng/mL)。24 時間培養後、WST-8 法により細胞生存率を測定した。

B-9. L 細胞および各種 claudin 発現 L 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性試験

L 細胞および各種 claudin 発現 L 細胞を 96-well plate に 1×10^4 cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μ L に交換後、PBS (-) で段階希釈した C-CPE-PSIF 終濃度 0, 1, 10 ng/mL となるように 10 μ L ずつ添加し、24 時間培養後 WST-8 法により細胞生存率を測定した。

B-10. 癌細胞株に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性試験

MCF-7, HepG2, SK-HEP-1 細胞を 96-well plate に 1×10^4 cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μ L に交換後、PBS (-) で段階希釈した PSIF もしくは C-CPE-PSIF を 10 μ L ずつ添加し、48 時間後に WST-8 法により細胞生存率を測定した。

B-11. 細胞密度の異なる Caco-2 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性試験

プレコンフルエント Caco-2 (TJ-undeveloped) 細胞に対する傷害性試験は以下の通り行った。Caco-2 細胞を 96-well plate に 1×10^4 cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μ L に交換後、PBS (-) で段階希釈した C-CPE-PSIF を 10 μ L ずつ

添加し、48 時間培養した。

一方、コンフルエント Caco-2 (TJ-developed) 細胞に対する傷害性試験では、Caco-2 細胞を 96-well plate に播種後、2 日に 1 回の頻度で培地交換し、コンフルエントになるまで培養したものを用いた。新鮮な培地 90 μ L に交換後、PBS (-) で段階希釈した C-CPE-PSIF を 10 μ L ずつ添加し、48 時間培養し、WST-8 法により細胞障害性を評価した。

B-12. C-CPE-PSIF の細胞極性特異性の検討

・細胞培養, TER 測定

Caco-2 細胞 5×10^4 cells/mL、200 μ L/well を 6.5-mm Transwell (0.33 cm^3 , Corning, Inc., N.Y., U.S.A) に播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下で培養した。2 日に 1 回の頻度で培地を交換し、細胞の TJ 形成の度合いを Millicell®-ERS (Millipore Corp., Bedford, U.S.A) による TER の測定によって評価した。約 2 週間後、TER が安定した時点で MEM 培地に交換し、24 時間前培養した後、終濃度 10, 50, 200 ng/mL の C-CPE-PSIF を apical 側もしくは basal 側に添加した。添加 48 時間後に TER 値を測定し、添加前を 100%とした際の相対値を算出した。

・LDH 法による細胞傷害性の検討

C-CPE-PSIF の作用により、細胞が自然放出した乳酸脱水素酵素 (LDH) 量 (放出 LDH 量) を測定するため、各 well の apical 側の培養上清 75 μ L をエッペンチューブへ分取し、3,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した (放出 LDH 量測定用サンプル)。次に細胞が保持する最大の LDH 量 (総 LDH 量) を測定するため、plate を -80 $^{\circ}$ C で凍結した後 37 $^{\circ}$ C で融解した。上清をエッペンチューブに回収し、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した後に、上清を回収した (総 LDH 量測定用サンプル)。放出 LDH 量測定サンプルおよび総 LDH 量測定サンプルを D-MEM 培地を用いて適切に希釈した後、96-well plate (IWAKI Glass Co., Ltd, Tokyo, Japan) に 50 μ L ずつ移し、CytoTox96® Non-Radioactive cytotoxicity Assay (Promega corporation, W.I., U.S.A) に含まれる Substrate Mix

50 μ L を添加した。Plate を遮光下で室温、30 分間放置後、同キットに含まれる Stop Solution 50 μ L を添加し、490 nm における吸光度を測定した。総 LDH 量測定用サンプルの吸光度は培養液 100 μ L 中に放出されたものとして補正を加えた。LDH 放出率 (%) は、総 LDH 量に対する放出 LDH 量の割合で示した。

B-13. C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF 発現プラスミドの作製

pETH₁₀PER を鋳型とし、forward primer (5' -GGAATTCATATGGATATAGAAAAGAAATCCTTGATTTAGCTGCT-3', SpeI site is under lined) と reverse primer (5' -GGACTAGTAAATTTTTGCTATTGAATAAGGGTATTTCCACTATATATG-3', NdeI site is under lined) を用いて PCR 法にて C-CPE_{Y306A/L315A} DNA 断片を増幅し、pET-MCS-PSIF にクローニング断片を挿入し、pET-C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF プラスミドを作製した。

B-14. C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF の精製

C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF 蛋白質の精製は、3 に準じて行った。

B-15. 4T1 細胞の claudin-4 発現確認

•Western blotting

4T1 細胞における claudin-4 の発現確認は、B-6 に準じて行った。なお、膜蛋白質の可溶化は Lysis buffer II (10 mM Tris-HCl (pH7.4), 8.75 mg/mL NaCl, 2.5 mg/ml デオキシコール酸, 0.38 mg/mL EGTA, 2mM SDS, 1% NP-40) を用いて行った。

•RT-PCR

4T1 細胞 5×10^6 個を回収し、PBS (-) で洗浄後、High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いて、total RNA の抽出を行った。細胞のペレットに Lysis/binding buffer ①を加え、ボルテックスした後に、High pure フィルターチューブにアプライした。10,000 rpm で 15 秒間遠心分離した後に、DNase 反応液を加え、室温で 15 分放置した。Wash buffer I ④/Wash buffer II ⑤でカラムを洗浄し

た後に、Elution buffer 42.5 mL で total RNA を抽出した。さらに、染色体 DNA を完全に除くため、抽出した RNA を RNase-free DNase (BcaBEST™ RNA PCR kit (Takara Inc., Shiga, Japan)) で 37 °C、30 分間処理した。抽出した RNA 200 ng を Takara RNA PCR Kit (Takara Inc., Shiga, Japan) を用いて、逆転写し cDNA を得た。逆転写反応は、dT adaptor をプライマーとして用い、42 °C を 30 分間、95 °C を 5 分間、5 °C を 5 分間行った。

得られた cDNA を用いて、claudin-4 遺伝子および β -actin 遺伝子に対する PCR 反応を行った。PCR には Ex Taq DNA polymerase (Takara Inc., Shiga, Japan) を用い、熱変性処理を 94 °C 30 秒間、アニーリングを 60 °C 30 秒間、伸長反応を 72 °C に設定し、30 サイクル行った。プライマーは以下に示したものを、伸長反応は claudin-4 では 40 秒間、 β -actin は 30 秒間ずつ行った。PCR 産物を 2% アガロースゲルにて泳動し、claudin-4 は 600 bp 付近の、 β -actin は 400 bp 付近のバンドを確認した。また対照として、逆転写反応を行っていない RNA (Non-RT) を同様に PCR し、RNA 中にゲノム DNA の混入がないことを確認した。

<Primer>

Claudin-4 Forward primer : 5' - ATGGCGTCTATGGGACTACAGGTCC - 3'
Reverse primer : 5' - CCGAGTAGGGCTTGTGCTTGCTAC - 3'
 β -actin Forward primer : 5' - TAGATGGGCACAGTGTGTGGG - 3'
Reverse primer: 5' - GGCGTGATGGTGGGCATGG - 3'

B-16. 4T1 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性試験

4T1 細胞を 96-well plate に 5×10^3 cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μ L に交換後、PBS (-) で段階希釈した PSIF, C-CPE-PSIF もしくは C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF を 10 μ L ずつ添加し、48 時間後に WST-8 法により細胞生存率を測定した。

B-17. 4T1 細胞皮下移植マウスの作製

4T1 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 1 mL を加え細胞を懸濁させ、4 °C、1,500 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 2×10^6 cells/mL になるように PBS (-) で調整した。ジエチルエーテル (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) 麻酔下の BALB/c マウス (雌性、7-8 週令) の右腹部皮下に、調整した 4T1 細胞を 50 μ L ずつ、27G 注射針を用いて移植した (day0)。

B-18. C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

PBS (-) を用いて、PSIF は 1 μ g/mL、C-CPE_{Y306A/L315A}-PSIF 1 μ g/mL、C-CPE-PSIF は 0.4 または 1 μ g/mL となるように希釈した。4T1 細胞を移植した日から、週に 3 回、尾静脈より各蛋白質をマウスの体重 20 g 当り 100 μ L 投与した。なお、毎回投与直前に腫瘍径と体重を測定し、腫瘍体積を [腫瘍の長径 (mm)] \times [腫瘍の短径 (mm)]²/2 mm³ として算出した。

B-19. 肺への自然転移数の測定

4T1 細胞移植後 35 日目のマウスの気道より、India ink (ammonia 水 2 滴を含む 15% ink) を 22G 注射針を用いて 5 mL 前後注入して肺を染色した後、肺を摘出した。Fekete 溶液 (70% ethanol : 10% formaldehyde:glacial acetic acid = 100:10:5) に一晩浸漬し固定した後に、肉眼 ($\times 3.5$ ルーペ) で浸潤・転移の有無および転移結節数を観察した。

B-20. 統計学的評価

有意差検定は Dunnett 法を用いて行い、危険率が 5%未満 ($p < 0.05$) の場合有意差が認められるとした。また、各測定値は実験例数の平均値 \pm 標準誤差で表した。

B-21. C-CPE 変異体の作製

C-CPE の遺伝子を pET-16b (Novagen Inc., USA) に

挿入した pET-H₁₀PER を鋳型とし、各種プライマーを用いて PCR によって、C-CPE 変異体断片をクローニングし、本クローニング断片を pET16b に挿入し、C-CPE 変異体発現ベクターとして使用した。

C-CPE 変異体発現 plasmid 1 μ L を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) 10 μ L に加え、氷上で 30 分間静置し、42 °C で 40 秒間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 °C にて 40 分間培養した後、LA 培地プレートに播き一晚培養した。1 コロニーを LA 培地 3 mL で 37 °C、一晚振盪培養した。翌日 LA 培地を 2 mL を 6 本に分注し、50 μ L ずつ前培養した大腸菌液を加え 37 °C で 2 時間振盪培養した。その後、IPTG 刺激後大腸菌を回収し、buffer A に懸濁し、超音波処理などにより可溶化後、遠心した上清を HiTrap Chelating HP column にアプライした。カラムに吸着した C-CPE mutant を imidazole によって溶出し、PD-10 カラムを用いて溶媒を PBS に置換し、実験に使用した。

B-22. C-CPE の claudin-4 結合性評価

・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 μ g/ml kanamycin (Nacalai Tesque, Inc.)、7 μ g/ml gentamicin (Sigma-Aldrich Corp.)、10 μ g/ml tetracycline (Nacalai Tesque, Inc.) を含み、2% X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside ; Nacalai Tesque, Inc.) 100 μ L および 50 mM IPTG 100 μ 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 2×10^6 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 μ L、

血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 (Invitrogen Corp.) 100 μ l] と tube B (bacmid 1 μ g、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 μ 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 μ 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、 2×10^6 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 2×10^6 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 (Bomplete 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- β -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、B-21 項に準じて行い、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。

• 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 μ 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 μ g/ml に調製した claudin-4 タンパク質を 20 μ 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 μ 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+ [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+ で希釈した。低濃度側から順次 60 μ l (2 分間) インジェクションし、最大濃度である 20 nM 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取得する目的で、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イ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-23. Claudin 発現による増殖能への影響

B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を 24 well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A, 353047) に 1×10^4

cells/well で播種し、24、48、72、96 時間培養後、Trypsin-EDTA を用いて各細胞を回収し、計数した。

B-24. Claudin 発現による足場非依存的増殖能に対する影響

Bacto Agar (Becton Dickinson Company,214050)を MilliQ 水で7%に調製し、120 °C、20分オートクレーブした。これを10% FBS を含んだ DMEM 培地で0.7%に希釈し、2 ml を6 well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353046)にコートした後、4 °Cで30分静置した。同様に Bacto Agar を MilliQ で4%に調製し、120 °C、20分オートクレーブした。これを10% FBS を含む DMEM 培地でさらに希釈し、0.4%に調製した。B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、 1×10^4 cells/well となるように調製し、0.4% soft agar で懸濁した後、0.7% soft agar の上に2 ml 播種した。顕鏡により colony 形成が確認された後、MTT 法 (MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide] (NACALAI TESQUE, INC, KYOTO, JAPAN, 23547-76)を PBS(-) で1 mg/ml に調製し、500 μ l/well で添加し30分間インキュベートした後、colony 数を計測した。

B-25 Claudin 発現による移動能・浸潤能への影響

移動能を検討するため、24 well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353047)に8.0 μ m ポアインサート (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353097)をセットし、 1×10^5 cells/well となるよう調製した B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞をインサート上に播種した。Bottom well に HUMAN FIBRONECTIN (BD Biosciences, 354008) 10 μ g/ml を含む 0.5% FBS を含む DMEM 培地を600 μ l 加え、6時間培養した。Control 群は HUMAN FIBRONECTIN を加えなかった。培養後、Diff-Quik (sysmex,16920)により細胞を染色した。

浸潤能を検討するため、24 well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353047)に8.0 μ m

ポアインサート(FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A,353097)をセットした。BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Biosciences,356234)を氷上で DMEM 培地により希釈した。希釈した Matrigel をインサート上に50 μ l コートし、37 °C、30分インキュベートしてゲル化させた。 1×10^5 cells/well となるよう調製した B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を Matrigel 上に播種し、Bottom well には HUMAN FIBRONECTIN (BD Biosciences, 354008) 10 μ g/ml を含む 0.5% FBS を含む DMEM 培地を600 μ l 加え、24時間培養した。培養後、Diff-Quik (sysmex,16920)により細胞を染色した。

B-26. Claudin 発現による造腫瘍能への影響

B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 15 ml を加え細胞を懸濁させ、4 °C、1,200 rpm で10分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを2回繰り返した後、上清を除き、細胞を 1×10^6 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。C57BL/6 マウス(雌性、7週齢)に左背部皮下に、調整した各細胞を100 μ l ずつ、27 G 注射針を用いて移植した。皮下投与から2日毎に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を [腫瘍の長径 (mm)] \times [腫瘍の短径 (mm)]²/2 mm³ として算出した。

B-27. Claudin 発現による転移能への影響

B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 15 ml を加え細胞を懸濁させ、4 °C、1,200 rpm で10分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを2回繰り返した後、上清を除き、細胞を 2.5×10^6 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。調整した各細胞を100 μ l ずつ、C57BL/6 マウス(雌性、9週齢)に27 G 注射針を用いて尾静脈投与した。尾静脈投与から14日後、肺を摘出し、転移結節数を計数した。

B-28. Claudin 発現による転移関連因子の発現に対

する影響

B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を回収し、PBS (-) で洗浄後、High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いて、total RNA の抽出を行った。細胞のペレットに Lysis/binding buffer を加え、ボルテックスした後に、High pure フィルターチューブにアプライした。10,000 rpm で 15 秒間遠心分離した。Wash buffer I/Wash buffer II でカラムを洗浄した後に、Elution buffer 42.5 μ l で total RNA を抽出した。さらに、染色体 DNA を完全に除くため、抽出した RNA を RNase-free DNase (BcaBEST™ RNA PCR kit (Takara Inc., Shiga, Japan)) で 37 °C、30 分間処理した。抽出した RNA 200 ng を Takara RNA PCR Kit (Takara Inc., Shiga, Japan) を用いて、逆転写し cDNA を得た。逆転写反応は、Oligo dT adaptor をプライマーとして用い、42 °C を 50 分間、85 °C を 5 分間、4 °C を 5 分間行った。得られた cDNA を用いて、VEGF-A, TNF- α , TGF- β , angiopoietin-2, angiopoietin-4, MMP-2, MMP-9, angiostatin, thrombospondin-1, thrombospondin-2, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, GAPDH の遺伝子発現を PCR に、より解析した。PCR には Ex Taq DNA polymerase (Takara Inc., Shiga, Japan) を用いた。PCR に利用した primer は以下の通り。

GAPDH; Forward primer: 5' -GTGAGGCCGGTGCTG AGT- 3', Reverse primer: 5' -TTGCTGGGGTGGGT GGTC- 3', VEGF-A; Forward primer: 5' -CCCACGA CAGAAGGAGAGCAGAAGT- 3', Reverse primer: 5' -CATCAGCGGCACACAGGACGG- 3', TNF- α ; Forward primer: 5' -CCTGTAGCCCACGTCGTAGC - 3', Reverse primer: 5' -TTGACCTCAGCGCTGAG TTG - 3', TGF- β ; Forward primer: 5' -GGTGGACC GCAACAAC- 3', Reverse primer: 5' -GCACTGCTT CCCGAAT- 3', angiopoietin-2; Forward primer: 5' -GAGGGAGGACTGGTGACAGCCACGG- 3', Reverse primer: 5' -GAAATCTGCTGGCCGGATCA TCAT- 3', angiopoietin-4; Forward primer: 5' -GAAATCTGCTGGCCGGATCATCAT - 3', Reverse

primer: 5' -GAAATCTGCTGGCCGGATCATCAT- 3', MMP-2; Forward primer: 5' -TGCAGGAGACAAG TTCTGGA- 3', Reverse primer: 5' -GCTTCCAAA CTTACACGCTCT- 3', MMP-9; Forward primer: 5' -GTTTTTGTGCTATTGCTGAGATCCA- 3', Reverse primer: 5' -CCCACATTTGACGTCCAGAGA AGAA- 3', angiostatin; Forward primer: 5' -GTGACATCCCCCTGTGTGCATC- 3', Reverse primer: 5' -GACGACCGGCACCGAAAGTCC- 3', thrombospondin-1; Forward primer: 5' -GACAAAAA CGGGGAGGGCGATG- 3', Reverse primer: 5' -TTTGCCCTGATGGCCGACAACC- 3', thrombospondin-2; Forward primer: 5' -TCGGGGA ACGCTCCTGGTGTT- 3', Reverse primer: 5' -TCCACACCCTGGACCAGAGATCT- 3', TIMP-1; Forward primer: 5' -ATGATGGCCCCCTTTGCATC TCT- 3', Reverse primer: 5' -GAAGGCTGTCTGTG GGTGGGGT- 3', TIMP-2; Forward primer: 5' -GTTTATCTACACGGCCCCCTCTTCA- 3', Reverse primer: 5' -GCCTGGTGCCCATTTGATGCTC TT- 3', TIMP-3; Forward primer: 5' -CGTGATCCGG GCCAAAGTGG- 3', Reverse primer: 5' -CAATTGC AACCCAGGTGGTAGCGGT- 3'.

B-29. B16/BL6-CL4 細胞における claudin-4 発現の 確認

B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を氷冷 PBS (-) 1 ml により培養 ディッシュからセルスクレーパーによって剥がし、細胞を回収した。氷冷 PBS (-) 1 ml を加え細胞を懸濁させ、4 °C、3,000 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。さらにこの操作を 3 回繰り返した。遠心分離後、上清を取り除き lysis buffer (1 % Triton X-100, 1 % protease inhibitor cocktail 含有 PBS (-)) を加え、氷冷しながら超音波処理を 20 秒間、3 回繰り返し、4 °C、15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を回収し細胞溶解液を作製した。細胞溶解液に SDS sample buffer を加え 5 分間ボイルし、泳動用サンプルとした。15 % ポリアクリルアミドゲルを用いて

SDS-PAGE 電気泳動を行った (20 mA/枚、1.5 時間)。SDS-PAGE 後の Western blotting を行った。12 % ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE (30 mA/枚、約 1.5 時間) を行った後、TRANS-BLOTR SD SEMI-DRY TRANSEFR CELL によりゲル中のタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA で 20 分間転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク/TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 M NaCl, 0.05 % Tween 20) に浸して、室温で 2 時間振とうし、ブロッキング操作を行った。TBS-T で 5 回洗浄後、1 次抗体と 2 時間反応させた。TBS-T で洗浄後、2 次抗体 HRP 標識 goat anti-mouse or rabbit IgG (2,000 倍希釈、CEMICON, CA) と 1 時間反応させた。検出には、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, UK) を用い露光した X 線フィルム (KONICA MINOLUTA MEDICAL & GRAPHIC INC., TOKYO, JAPAN) を現像した。なお、claudin の検出には rabbit anti-claudin-1 pAb、mouse anti-claudin-4 pAb (一次抗体; 2,000 倍希釈、二次抗体: 5,000 倍希釈、invitrogen, South San Francisco, CA) を用い、PVDF 膜を Re-Blot Plus (CHEMICON international Inc., CA) でリプローブした後、 β -actin (一次抗体: 5,000 倍希釈、二次抗体: 10,000 倍希釈、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で補正を行った。

B-30. B16/BL6-CL4 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞障害性の検討

B16/BL6-CL4 細胞を 96 well plate (FALCON, Becton Dickinson, Franklin, U.S.A) に 1×10^4 cells/well で播種し、24 時間前培養した。新鮮な培地 90 μ l に交換後、PBS (-) で段階希釈した PSIF もしくは C-CPE-PSIF を終濃度 0.5, 1, 10 および 20 ng/ml となるように 10 μ l ずつ添加した。24 時間後に WST-8 法により細胞生存率を測定した。各 well に SF 試薬 (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を 10 μ l ずつ添加し、1.5 時間培養後、450 nm における吸光度を測定した。PBS (-) 添加群の吸光度を基準として各蛋白質濃度における吸光度の相対値を求め、生存率とした。

B-31. B16/BL6-CL4 細胞に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

皮下移植マウスとして、B16/BL6 および B16/BL6-CL4 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 1 ml を加え細胞を懸濁させ、4 $^{\circ}$ C、1,500 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1×10^6 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。BALB/c マウス (雌性、7-8 週令) の右腹部皮下に、調整した、B16/BL6 細胞および B16/claudin-4 細胞を 50 μ l ずつ、27 G 注射針を用いて移植した。

C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討として、PBS (-) を用いて PSIF は 1 μ g/ml、C-CPE-PSIF は 0.4 または 1 μ g/ml となるように希釈した。細胞を移植した日から、週に 3 回、尾静脈より各蛋白質をマウスの体重 20 g 当り 100 μ l 投与した。なお、毎回投与直前に腫瘍径と体重を測定し、腫瘍体積を [腫瘍の長径 (mm)] \times [腫瘍の短径 (mm)]²/2 mm³ として算出した。

B-32. B16/BL6-CL4 細胞の転移に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

B16/BL6 細胞および、B16/BL6-CL4 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 15 ml を加え細胞を懸濁させ、4 $^{\circ}$ C、1,200 rpm で 10 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1×10^6 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。調整した各細胞を 100 μ l ずつ、C57BL/6 マウス (雌性、9 週齢) に 27 G 注射針を用いて尾静脈投与した。その後、PBS (-) を用いて、PSIF は 1 μ g/ml、C-CPE-PSIF は 0.4 または 1 μ g/ml となるように希釈した。細胞を移植した日から、週に 3 回、尾静脈より各蛋白質をマウスの体重 20 g 当り 100 μ l 投与した。尾静脈投与から 14 日後、肺を摘出し、転移結節数を計数した。

B-33. 4T-1 細胞の転移に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

4T-1 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 15 ml を加え細胞を懸濁させ、4 °C、1,200 rpm で 10 間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1×10^5 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。調整した各細胞を 50 μ l ずつ、C57BL/6 マウス(雌性、9 週齢)に 27 G 注射針を用いて皮下移植した。その後、PBS (-) を用いて、C-CPE-PSIF は 2 または 5 μ g/kg の用量となるように調整した。細胞を移植した日から、週に 3 回、尾静脈より各蛋白質をマウスに投与した。皮下移植から 35 日後、肺を摘出し、転移結節数を計数した。

B-34. Adriamycin (ADR)による抗腫瘍効果の検討

皮下移植マウスとして、4T1 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 1 ml を加え細胞を懸濁させ、4 °C、1,500 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1×10^5 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。その後、BALB/c マウス (雌性、7-8 週令) の右腹部皮下に、調整した 4T1 細胞を 50 μ l ずつ、27 G 注射針を用いて移植した。

ADR の抗腫瘍効果の検討として、4T1 細胞を移植した日から、4 mg/kg の用量で週に 3 回、尾静脈より投与した。なお、毎回投与直前に腫瘍径と体重を測定し、腫瘍体積を [腫瘍の長径 (mm)] × [腫瘍の短径 (mm)]²/2 mm³ として算出した。

転移がんに対する抗腫瘍効果として、4T-1 細胞を Trypsin-EDTA を用いて回収し、PBS (-) 15 ml を加え細胞を懸濁させ、4 °C、1,200 rpm で 10 間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。これを 2 回繰り返した後に上清を除き、細胞を 1×10^5 cells/ml になるように PBS (-) で調整した。調整した各細胞を 50 μ l ずつ、C57BL/6 マウス(雌性、9 週齢)に 27 G 注射針を用いて皮下移植した。その後、ADRを 4 mg/kg の用量で、週に 3 回、尾静脈より投与した。皮下移植から 35 日後、肺を摘出し、転移結節数を計数した。

B-35. 3D 培養による極性崩壊組織モデルの作製

8 well chamber 上に Matrigel(BD, Growth factor

reduced Matrigel™ Matrix)をコートし、インキュベーター中で Matrigel を固まらせた。Trypsin-EDTA により single cell にした MDCK 細胞を 2000 cells/well になるように播種し、37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。4日ごとに 2 %のマトリゲルを含んだ DMEM 培地を交換した。培養を開始後 14 日間、形態を顕鏡により観察した。

B-36. 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_{N309A} の発現ベクター作製には従来型 C-CPE の N309A 変異体(C-CPE_{N309A})を、C-CPE194_{S313A} の発現ベクター作製には従来型 C-CPE の S313A 変異体(C-CPE_{S313A})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_{N309A/S313A} の発現ベクター作製では C-CPE194_{S313A} 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_{N309A/S313A} 発現ベクター作製では、C-CPE194_{N309A/S313A} 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 α (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 μ 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 μ 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 シークエンスを確認した。

B-37. 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 μ l を BL21(DE3) (Novagen Inc.) 10 μ 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。任意のクローンを LA 培地 3 ml にピックアップし、37°Cで一晚振盪培養後、LA 培地 2 ml に前培養した大腸菌液 50 μ l ずつ加え、37°Cで 2 時間振盪培養した。その後、isopropyl- β -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 μ l の 1 \times 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-38. 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 μ l を BL21(DE3) 10 μ 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 μ 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 MgCl₂、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 μ l に 4 \times SDS buffer (250 mM Tris-HCl、20% 2-mercaptoethanol、8% SDS、40% glycerol、0.004% bromophenol blue) を 6.7 μ 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-39. 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 NaHCO₃ (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% CO₂ の条件下で培養した。

Caco-2 細胞を 8×10^4 cells/well で 6.5-mm Transwell® (0.33 cm², 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、FGS およびフェノールレッド不含 EAGLE' s MEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL Corp.) (20 mM NaHCO₃、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 μl ずつ培地を抜き取り C-CPE または C-CPE 変異体を終濃度 20 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、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-41. 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-H₁₀PER 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 *NotI* 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 *NcoI* 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、*NotI* (New England Biolabs) および *NcoI* (New England Biolabs) を用いて 37°C で 20 時間処理した。pY03' phagemid vector を *NcoI*、*NotI* 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

SacI (New England Biolabs)、*SphI* (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 μl 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 μl に対して 550 μl 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 μg/ml ampicillin、2% D-glucose 含有 LB agar (LAG プレート) に播種し、一晩培養後、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。

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-42. 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 OD₆₀₀=0.09 とし、37°C で OD₆₀₀=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 $OD_{600} \times 8 \times 10^8$ (cells/ml) $\times 25$ (ml) $\div 10^{11}$ (CFU/ml) となるように添加し、37°C で 30 分間静置した。さらに 37°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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin を添加した 2YT 培地 (2YTAK 培地) 50 ml を添加して、37°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°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 μm 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 μl に対して、10 倍毎に段階希釈したファージ溶液 100 μl を添加し、37°C、1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600 μl を添加し、ペトリフィルム™ 培地 (3M Company) に播種して一晩 37°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-43. 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°C にて一晩制限酵素処理した。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°C で一晩ライゲーション反応を行い、続いて *Xho*I を用いて 37°C で 2 時間処理した。ライゲーション産物を大腸菌 DH5 α 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、LA プレートに播種し、一晩 37°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-44. Claudin-1 発現 bacmid の作製

pFastBac-CL1 を大腸菌 DH10Bac (Invitrogen Corp.) 30 μl と混和し、氷上で 30 分間なじませた後、42°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°C で 4 時間培養後、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin、7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetracycline を含み、2% X-gal 100 μl および 50 mM IPTG 100 μl 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、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-45. 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 2×10^6 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 μl 、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 μl) と tube B (bacmid-CL1 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 μ 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、 2×10^6 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 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10、100、1,000 μ 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 ECLTM 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。

4×10^8 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 μ l で懸濁し、claudin-1 提示 BV (CL1-BV)を得た。尚、BCATM 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-46. 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 μ 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%ブロッッキング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%ブロッッキング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 μ 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 μ l を添加して、4°C、10 分間作用させた。1 M Tris-HCl (pH 8.0) 50 μ l を加えて中和してファージ溶液を回収し、その 10 μ 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 μ l を TG1 (OD₆₀₀=0.4-0.6 に調製) 300 μ 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、一晩培養後、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-47. 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 で一晚培養した。翌日、2YTGA 培地 100 μ 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 で一晚培養した。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 μ 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 μ l ずつ植え継ぎ、OD₆₀₀ = 0.4-0.6 まで 10,000 rpm、37°C で培養後、M13K07 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 で一晚培養した。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った大腸菌は終濃度 10% のグリセロールを添加して -80°C で保存した。

B-48. 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 μ 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 μ 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ケンス解析を行い、claudin-1 結合性分子の遺伝子配列を特定した。

B-49. 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 にて一晚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 α 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晚培養した。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。