

#### B-50. リコンビナントタンパク質の発現誘導

#### B-37. C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体の発現誘導

#### B-51. リコンビナントタンパク質の可溶化

#### B-38. C-CPE194 および C-CPE205 のアラニン置換体の可溶化に準じて行った。

#### B-52. リコンビナントタンパク質の精製

#### B-39. 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-53. 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  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$  TBS/well で、wild-BV、claudin-1-BV を 4  $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  に対して 4% Block Ace を 50  $\mu\text{l}$  添加し、4  $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{l}/\text{well}$  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  $\mu\text{l}$  を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100  $\mu\text{l}$  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-54. 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  $\mu\text{g}/\text{well}$  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  $\mu\text{l}$  加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 2 回繰り返すし、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  $\mu\text{l}$  加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 2 回繰り返すし、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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI (Miltenyi Biotec) 含有 PBS (pH 7.4) を 500  $\mu\text{l}$  添加し、FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company) により解析した。

#### B-55. 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 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  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  $\mu$ l、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  $\mu$ l ずつ buffer を抜き取り C-CPE または C-CPE 変異体を終濃度 25  $\mu$ 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、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<sup>®</sup>-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. PSIF、C-CPE-PSIF 蛋白質の作製

PSIF および C-CPE-PSIF 発現プラスミドで、蛋白質を発現させる際に汎用される大腸菌株 BL21 (DE3) を形質転換し、0.1 mM の isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 誘導により、蛋白質を発現させた。大腸菌から、buffer A を用いて蛋白質を可溶化し、Ni とヒスチジンとの親和性を利用したアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。蛋白質が精製できていることを CBB 染色および抗 His-tag 抗体を用いた Western blot により確認したところ、42 kDa 付近に PSIF のバンドが、58 kDa 付近に C-CPE-PSIF のバンドが確認できた (Fig. 1)。

### D-2. Claudin-4 発現 L 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞傷害性の検討

C-CPE-PSIF 融合蛋白質の機能評価を行うために、claudin-4 発現 L 細胞 (CL4/L) に対する細胞傷害性を検討した。CL4/L 細胞を PSIF または C-CPE-PSIF で 24 時間処理し、WST-8 法により生細胞数の測定を行った。その結果、PSIF 処理では 20 ng/mL 処理でも全く細胞障害性が観察されないのに対して、

C-CPE-PSIF では濃度依存的な細胞障害性が観察され、10 ng/mL では 90%以上の細胞に傷害性が観察された (Fig. 2A)。

PSIF は単独では細胞傷害性を発揮せず、標的指向性分子などと結合し、細胞内へ侵入したときのみ傷害性を示す。Claudin-4 は、その細胞内領域にクラスリン被覆小胞へのシグナル配列に類似する配列を含んでいることが知られている。したがって、C-CPE-PSIF は claudin-4 に結合した後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、細胞毒性を発揮したと考えられる。

### D-3. C-CPE-PSIF の細胞傷害性における C-CPE 部位の関与

PSIF は単独では細胞傷害性を示さず、標的指向性物質などと結合させ細胞内へ侵入したときのみ細胞傷害性を示すことが報告されている。そこで、C-CPE-PSIF の claudin-4 発現 L 細胞への傷害性が C-CPE-PSIF の C-CPE 部位を介しているかを、C-CPE を阻害剤として用いた拮抗阻害実験により検討した。

CL4/L 細胞を C-CPE または牛血清アルブミン (BSA) で 2 時間前処理後、C-CPE-PSIF を添加し、24 時間後に WST-8 法により生細胞数の測定を行った。その結果、阻害剤として C-CPE を添加した群では、C-CPE の濃度依存的に C-CPE-PSIF の細胞傷害性が抑制されたのに対し、阻害剤として BSA を添加した群では、BSA の濃度に関わらず細胞傷害性は抑制されなかった (Fig. 2B)。したがって、C-CPE-PSIF は C-CPE 部位と claudin-4 との結合を介して細胞傷害性を発揮していることが示唆された。

### D-4. C-CPE-PSIF による細胞傷害性の claudin 特異性の検討

C-CPE-PSIF はその C-CPE 部位を介して claudin-4 発現細胞に細胞傷害性を示すものの、融合蛋白質に特異性が無ければ、効果の減弱や思わぬ副作用を生じる原因となりうる。そこで、C-CPE-PSIF の claudin 特異性について各種 claudin 発現細胞を用い

た細胞傷害性試験を行った。

実験には L 細胞に claudin-1, -2, -4, -5 をそれぞれ恒常的に発現させた各種 claudin 発現 L 細胞 (CL1/L, CL2/L, CL4/L および CL5/L 細胞)を用いた (Fig. 3A)。C-CPE-PSIF の細胞傷害性を検討したところ、CL1/L, CL2/L および CL5/L 細胞に対し、C-CPE-PSIF は傷害性を示さなかったが、claudin-4 発現細胞にのみ著しい細胞傷害性を示したことから、C-CPE-PSIF は claudin-4 指向性を有していることが示唆された (Fig. 3B)。これらの結果は、C-CPE が claudin family の中でも CPE の受容体である claudin-4 へ最も高い結合性を示し、claudin-1、claudin-2 および claudin-5 に対しては全く結合性を示さないとの報告と一致しており、C-CPE-PSIF は C-CPE の claudin 特異性を保持しているものと推察される。

#### D-5. 癌細胞株に対する C-CPE-PSIF の傷害性における claudin-4 依存性

C-CPE-PSIF が癌細胞に対しても、claudin-4 依存的に細胞傷害性を示すかを検討するため、ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞 (claudin-4-positive) および SK-HEP-1 (claudin-4-negative) を用いた解析を行った (Fig. 4A)。各細胞に C-CPE-PSIF を添加し、48 時間後に WST-8 法により生細胞数を測定した。その際、ヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 細胞を positive control として用いた。その結果、claudin-4 発現細胞である、HepG2 細胞および MCF-7 細胞に著しい細胞傷害性が観察されたのに対し、claudin-4 非発現細胞である SK-HEP-1 に対する細胞傷害性は観察されなかった (Fig. 4B)。したがって、C-CPE-PSIF は claudin-4 発現癌細胞に対し特異的に細胞傷害性を示すことが示唆された。

#### D-6. 密度の異なる Caco-2 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞障害性

TJ 構造が発達した正常な上皮細胞において、ほとんどの claudin は TJ を形成し、細胞間隙に存在している。一方癌化に伴い TJ が崩壊し、claudin の局在

が変化することが知られている。したがって、C-CPE-PSIF がこの claudin の局在変化を認識することができれば、正常細胞に対する副作用を軽減することができると考えられる。そこでヒト大腸癌由来 Caco-2 細胞を用いて C-CPE-PSIF の細胞障害性と claudin の局在との関連を解析した。

Caco-2 細胞はコンフルエントな状態で培養すると腸管上皮細胞様の極性を有する細胞形態に変化することが知られている。そこでプレコンフルエントの状態を claudin の局在が制御されていない癌細胞のモデル、コンフルエント状態を正常な上皮のモデルとし、C-CPE-PSIF 感受性の違いを検討した。

プレコンフルエント、コンフルエント細胞の claudin-4 発現量を Western blotting により解析したところ、プレコンフルエント細胞と比較して、コンフルエント細胞では claudin-4 発現量が顕著に上昇していた (Fig. 5A)。

これらの細胞に C-CPE-PSIF を添加し、その 48 時間後に WST-8 法により生細胞数を測定した結果、コンフルエント細胞に比して、プレコンフルエント細胞において有意な細胞障害性が観察された (Fig. 5B)。プレコンフルエントの細胞では claudin-4 発現は低いにも関わらず、特に低濃度での C-CPE-PSIF による細胞障害が観察されたことから、C-CPE-PSIF は claudin-4 の局在性を認識して作用し、TJ 構造が崩壊した癌細胞に特異性が高いと推察される。

#### D-7. 極性が発達した細胞への C-CPE-PSIF の作用の検討

正常な上皮細胞の特徴として、極性が発達しており、apical 側 (頂端側) と basal 側 (基底側) とで細胞小器官の分布や蛋白質の局在などが非対称であることが挙げられる。この細胞極性は生体の恒常性維持に必要不可欠であり、例えば腸管上皮の吸収細胞は apical 側と basal 側とで異なる輸送蛋白質を配置することで、apical 側では腸の内腔から分子を取り込み、basal 側からはその分子を下組織に送り出すことができる。一方、上皮の癌化初期に細胞極性は消失することがよく知られているが、極性の崩壊は

TJ 構造の崩壊とも相関する。そこで、正常細胞への C-CPE-PSIF の作用の基礎的検討として、極性が発達した細胞に対して C-CPE-PSIF がどのように作用するかを検討した。

Caco-2 細胞は、コンフルエントな状態で 2 週間ほど培養すると、極性が発達した上皮様の構造をとり apical 側に発達した TJ を形成することから、上皮のモデルとして頻用されている。そこで、Transwell chamber 上で培養した Caco-2 単層膜の apical 側もしくは basal 側から C-CPE-PSIF を添加し、48 時間後に膜電気抵抗値 (TER) によって TJ のバリア機能を、放出された lactate dehydrogenase (LDH) 量から細胞傷害性をそれぞれ解析した。その結果、C-CPE-PSIF を basal 側から加えたときのみ濃度依存的な LDH の遊離および TER 値の低下が観察された (Fig. 6)。このことは、C-CPE-PSIF が極性の発達した正常上皮細胞に対して、細胞極性を認識して作用する可能性を示唆するものである。

#### D-8. C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub>-PSIF の作製

C-CPE と claudin との結合にはその C 末端側の 16 アミノ酸が関与することが明らかとなっている。さらにその 16 アミノ酸領域をアラニンに置換し、結合性を解析した結果、306 番目のチロシン (Y306) と 315 番目のロイシン (L315) をアラニンに置換した変異体 C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub> は claudin-4 との結合性および TJ 制御活性を消失することが示されている。そこで、癌細胞に対する C-CPE-PSIF の傷害性と、claudin-4 結合性との関連を解析するため、C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub>-PSIF を作製した (Fig. 7A)。

#### D-9. claudin-4 発現 L 細胞に対する C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub>-PSIF の細胞傷害性の検討

Claudin-4 発現 L 細胞に PSIF または C-CPE-PSIF、C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub>-PSIF を添加し、24 時間後に WST-8 法により生細胞数の測定を行った (Fig. 7B)。その結果、C-CPE-PSIF で観察された claudin-4 発現 L 細胞に対する細胞障害性が、C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub>-PSIF 添加では観察されなかった。このことから、

C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub>-PSIF は claudin-4 指向性を消失していることが示唆された。

#### D-10. 4T1 細胞に対する細胞傷害性の検討

次に、C-CPE-PSIF の 4T1 細胞に対する細胞傷害性を検討した。4T1 細胞に、PSIF または C-CPE-PSIF、C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub>-PSIF を添加し、48 時間後に WST-8 法により生細胞数の測定を行ったところ、C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub>-PSIF は 500 ng/mL でもほとんど傷害性を示さなかったのに対し、C-CPE-PSIF は濃度依存的な細胞傷害性を示し、100 ng/mL で 63% の細胞に細胞傷害性が観察された (Fig. 8A)。このことから、C-CPE-PSIF は 4T1 細胞に対し、claudin-4 を介して傷害性を示していることが示唆された。

#### D-11. C-CPE-PSIF の安全性評価

C-CPE-PSIF の転移癌治療への有効性を検討する際には、静脈内投与を行う必要がある。そこで、安全な投与量を決定する目的で、マウスに対する C-CPE-PSIF の毒性を評価した。Claudin-4 は腎臓・肺などに発現していることが報告されている。また、肝臓・腎臓は血液の流入が多いことから、薬物・毒物による傷害が現れやすい。そこで C-CPE-PSIF の毒性を肝傷害・腎傷害を指標に検討した。

BALB/c マウス (雌性、7-8 週齢) に C-CPE-PSIF を尾静脈投与し、72 時間後に回収した血清中の AST/ALT および BUN 値を測定した (Fig. 9A)。その結果 C-CPE-PSIF 10 µg/kg では AST および ALT が上昇し肝毒性を示したのに対して、5 µg/kg 投与では肝毒性・腎毒性を示さなかった。また、C-CPE-PSIF を週に 3 回、2 週間頻回投与した際にも、C-CPE-PSIF 5 µg/kg 投与ではほとんど肝毒性・腎毒性は観察されなかった (Fig. 9B)。

#### D-12. 4T1 細胞皮下移植モデルマウスに対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

BALB/c マウス (雌性、7 週齢) の右腹部皮下に、 $1 \times 10^5$  個の 4T1 細胞を移植した (day 0)。Day 1 より、PSIF、C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub>-PSIF もしくは

C-CPE-PSIF を週に 3 回、腫瘍内投与し、投与毎に腫瘍径および体重を測定したところ、PBS 群に比べて C-CPE-PSIF 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群において顕著な抗腫瘍効果が観察された (Fig. 8B)。また、C-CPE<sub>Y306A/L315A</sub>-PSIF 投与群では腫瘍の増殖抑制が観察されなかったことから、C-CPE-PSIF は claudin-4 との結合を介して、4T1 細胞に抗腫瘍効果を示したことが示唆された。

#### D-13. Claudin 発現による増殖能への影響

生体内における細胞の恒常性は、細胞の分化、増殖および生存に関わる分子により厳密に制御されている。このような制御には、細胞内における様々なシグナル伝達経路の調整が重要であると同時に、外部からの増殖因子、サイトカイン、細胞外基質などの制御因子も同様に重要な働きを担っている。しかし、何らかの原因により細胞の増殖制御に関わる遺伝子に変異が起こると、それらの遺伝子産物は異常をきたし、制御された増殖過程を逸脱した無制限かつ無秩序な増殖を引き起こされると考えられている。

上皮組織においてバリア機能を担うタイトジャンクションは、物質透過や細胞極性などの制御を担い、細胞増殖制御に関与することが知られている。タイトジャンクションの機能本体である細胞膜タンパク質 claudin は、様々ながんにおいて発現変化が観察されていることから、がんへの関与が示唆されている。

そこで本研究では、claudin ががん形質に与える影響を、特に様々ながんで発現亢進が確認されている claudin-1 と claudin-4 に着目し、マウスメラノーマ B16/BL6 細胞に claudin-1 および claudin-4 を発現させた細胞を用いることで検討した。

まず、細胞増殖能に与える影響を検討するため B16/BL6 細胞、B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を各  $1 \times 10^5$  cells/ml となるよう播種し、培養 24、48、72、96 時間後の細胞数を計数した。その結果、各細胞間において細胞数に有意差が無く、claudin-1 および claudin-4 の発現は B16/BL6 の細胞増殖能に影響を及ぼさないと考えられる (Fig. 10)。

#### D-14. Claudin 発現による足場非依存的増殖能に対する影響

正常細胞は増殖因子、サイトカイン、細胞外基質など細胞外部からの影響を大きく受けており、これらの因子は細胞の分化や生死などを制御し、細胞の恒常性維持に大きく関与している。一方、細胞ががん化すると、細胞はこれらの制御から逸脱してしまい、抑制制御を受けない状況で増殖し続ける状態となる。

D.13 での検討により、各 claudin の発現は B16/BL6 細胞の細胞増殖能には影響を及ぼさないことが分かった。そこで次に、細胞増殖に対して抑制制御が生じる環境下における、claudin 発現のがん細胞増殖能への影響を検討した。

正常細胞は、細胞外マトリックスなどの足場が存在しない環境では増殖抑制制御がかかり、増殖停止およびアノキスを起こすことが知られている。一方、がん細胞は足場のない環境下においても増殖する能力を有している。そこで、増殖抑制制御がかかる環境として、足場のない環境が再現できる軟寒天 (soft agar) を用い、claudin 発現によるがん細胞の足場非依存的な増殖能への影響に関して検討を行った。

本実験では 0.7 % soft agar を bottom agar とし、0.4 % soft agar に各細胞を懸濁させた top agar を bottom agar 上に播種した。経時的に colony 形成過程を顕鏡し colony 形成を確認後、MTT 法により colony を染色し、colony 数を計測したところ、wild type B16/BL6 細胞と比較し、各 claudin 発現細胞では colony 数が増加していた。また、colony の大きさも wild type と比較し増大していたことから、claudin-1 および claudin-4 の発現はがん細胞に特徴的な増殖能である足場非依存的増殖能を促進させる可能性が示唆された (Fig. 11)。

#### D-15. Claudin 発現による造腫瘍能への影響

D.14 での検討から、B16/BL6 細胞は claudin-1 および claudin-4 を発現させることで足場非依存的増殖

能が増進することが明らかとなった。これらの結果を受け、次に実際の生体内での増殖能を比較するため、各 claudin を発現させた B16/BL6 細胞をそれぞれマウス皮下に移植し、腫瘍形成能を比較した。

C57BL/6 マウス(雌性、7 週齢)に B16/BL6-CL1、cB16/BL6-CL4 および B16/BL6 細胞を背部皮下移植し、経時的に腫瘍径を測定し、腫瘍体積を算出した結果、各細胞間で造腫瘍形成能に有意差は生じなかった(Fig. 12)。従って、claudin 発現は皮下における腫瘍形成能に影響を及ぼさないものと推察される。D.2 での検討では、増殖に対して抑制制御がかかる環境下において、claudin 発現細胞は増殖能の亢進が観察されたのにもかかわらず、皮下での腫瘍形成能に関してはその亢進作用が見られなかった。この原因に関して、皮下以外の環境下、例えば転移の際にみられる血中や転移先の組織である肺などでの増殖・生存能において影響が現れる可能性が考えられる。

#### D-16. Claudin 発現による移動能・浸潤能への影響

がん転移とは、がん細胞が発生した母組織から血管やリンパ管などを経て原発巣とは異なる組織に移行し、その組織で増殖進展することである。具体的な段階として、周囲間質組織の破壊と運動性の亢進を伴う原発巣からの解離、脈管内への侵入、脈管内における足場非依存的生存および輸送、そして脈管外遊出から転移組織への浸潤生着および増殖などの段階が知られている。以上のように、がんの転移は多段階によるステップを経て完了するが、転移において基本となる性質としてがん細胞の移動能および浸潤能の亢進がある。そのため、がん細胞の移動能・浸潤能に関する検討は転移を考察する上で基本的課題となっている。そこで、本項では claudin 発現によるがん細胞の移動能および浸潤能に対する影響を検討した。

まず細胞の移動能に対する claudin 発現の影響を検討した。各細胞を 8.0  $\mu\text{m}$  ポアインサート上に播種し、bottom well に細胞誘引物質(fibronectin)を含む培地を加え、6 時間培養した。6 時間後、細胞を染色

し、誘引物質に従いインサート下面に移動した細胞のみを計数し、各細胞の移動能を比較した。その結果、claudin-1 を発現させた細胞で著しく移動能が増進していたが、claudin-4 発現細胞では wild type B16/BL6 細胞と比較し移動能に有意差はなかったことから、claudin-1 発現ががん細胞の移動能を増進させる可能性が示唆された(Fig.13)。

続いて、claudin 発現によるがん細胞の浸潤能に対する影響の検討を行った。本実験では細胞外マトリックスを調整した可溶性基底膜、マトリゲルを用いて細胞外マトリックスを再現した。本法はがん細胞の基底膜浸潤実験系として汎用されており、転移性がん細胞の生物学的特性としての浸潤能を定量化できるという特長を持つ。8.0  $\mu\text{m}$  ポアインサート上にマトリゲルをコートし、さらにマトリゲル上に細胞懸濁液を播種し、bottom well には細胞誘引物質(fibronectin)を含む培地を加え 24 時間培養した。マトリゲル上に播種された細胞が浸潤能を示す場合、誘引物質の作用によりマトリゲル、およびポアインサートのフィルターを通過しフィルターの下面に細胞が移動する。培養後、細胞を染色し、フィルター下面に移動した細胞のみを計数し各細胞の浸潤能として比較した。その結果、B16/BL6-CL1 細胞では浸潤能が増進していたが、B16/BL6-CL4 細胞では wild type B16/BL6 細胞と比較し浸潤能に有意差はなかった(Fig. 14)。以上、claudin-1 発現はがん細胞の浸潤能を増進させることが明らかとなった。これは claudin-1 が誘導するがん細胞移動能の亢進と相関しており、claudin-1 の発現はがんの転移能に関与することが推察された。

#### D-17. Claudin 発現における転移能への影響

がんの転移は、がん細胞の周辺組織への浸潤による原発巣からの離脱に始まって、遠隔部位での増殖による転移巣の形成に至るまで様々な分子機構が複雑に絡み合い成り立っている。転移早期の段階である原発巣における変化や転移機構を細分化した際のがん細胞の挙動には *in vitro* によるモデル実験が行われるが、転移後期の臓器への親和性などを

検証するモデルは *in vivo* による検証が利用されている。

これまでの検討から、B16/BL6 細胞に claudin-1 を発現させることで移動能や浸潤能が促進されるが、claudin-4 を発現させてもこれらの形質に変化は生じないことが示された。移動能や浸潤能は転移における基本的かつ重要な性質であり、claudin-1 の発現によりこれらのがん形質が促進されたことから、生体内での転移能も促進されることが推察された。よって本項において claudin 発現による転移能への影響を検討した。

本研究に用いているマウスメラノーマ細胞の B16/BL6 細胞は、C57BL/6 マウス(雌性、7 週齢)に尾静脈投与することで肺へ転移することが知られている。そこで、claudin の発現が転移能に与える影響を検討するため、各細胞をマウスに尾静脈投与し、14 日後に肺転移結節数を計数し転移能を比較した。その結果、B16/BL6-CL1 細胞では wild type B16/BL6 細胞に比べ肺転移能が亢進し、また B16/BL6-CL4 細胞では抑制されることが明らかとなった(Fig. 15)。Claudin-1 発現細胞は、D. 4 において観察されたように移動能・浸潤能が向上していたことから、この移動能亢進により転移能が促進されたのではないかと推察された。一方、claudin-4 発現細胞は、D-17 の検討では wild type B16/BL6 細胞と同等な移動能および浸潤能だったが、実際の転移能は低下していることから、claudin-4 発現細胞では単純に移動能が転移能と相関しないことが分かった。以上の結果から、claudin 発現はがん細胞の移動能や浸潤能への影響の他に、生体内においてがん転移に関与する因子に影響を及ぼすことが推測された。

#### D-18 Claudin 発現における転移関連因子の発現に対する影響

D-17 での転移実験の結果から、claudin は細胞の移動能や浸潤能を亢進させる作用とは違った、転移を促進・抑制する作用があることが推察された。

生体において転移に関わる因子の1つとして tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )が知られている。がん

細胞から分泌される TNF- $\alpha$  は、転移巣での微小環境形成に関与していること、がん細胞でみられる EMT における主な誘導因子である transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )を促進させること、さらに血管透過性亢進や浸潤にも関与していることが知られている。TGF- $\beta$  は、運動・浸潤を誘導し、また周囲の間質に対しては血管新生作用を示すことで、転移を促進させている。生体での運動・浸潤に関しては、細胞外マトリックス分解酵素である Matrix metalloproteinase (MMP)が重要な役割を担っている。MMP にはファミリーが存在し、特に MMP-2, 9 に関してがんでの浸潤機構に深く関わっていることが知られている。MMP は、がんの浸潤のみならず、血管新生および増殖も関与しており、MMP-9 に関しては細胞外マトリックスに結合した血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF)を遊離させることで、がんにおける血管新生のスイッチ機能を果たしているとも言われている。ほとんどの腫瘍は何年もの間、血管新生の能力をもたず休眠している。この際、血管新生阻害作用を示す angiostatin や thrombospondin、内在性 MMP 阻害物質 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs)などの阻害因子が分泌され、腫瘍は増殖や血管新生を起こせない状態となる。しかし、ひとたび血管新生能を示し始めると、強力な血管新生因子である VEGF 等により急速な腫瘍血管形成が起こり、その結果増殖や転移が促進される。がんにおいて腫瘍血管新生を誘導する因子は VEGF の他に angiopoietin-2, -4 が知られている。これらは血管形成に対し促進的に働く因子として知られており、特に angiopoietin-4 は、原発巣内に存在する間質細胞から分泌される TGF- $\beta$  によって誘導され、乳がん細胞の肺転移を促進させる重要な因子であることが報告されている。以上の背景を受け、本項では B16/BL6-CL1、cB16/BL6-CL4 および B16/BL6 細胞における TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、MMP-2、MMP-9、VEGF-A、angiostatin、thrombospondin-1、thrombospondin-2、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、angiopoietin-2、angiopoietin-4 の RNA 発現量を比較し、claudin 発現による転移能の違いに関与する因子

の探索を試みた。

各細胞から RNA を抽出し、細胞が産生するサイトカインの発現量を RT-PCR により比較した。その結果、TNF- $\alpha$  と MMP-2 では、B16/BL6-CL1 細胞で発現量の亢進、B16/BL6-CL4 細胞で発現量の抑制が確認されたことから、これらの発現変化は転移能と相関していることが明らかとなった。一方、TGF- $\beta$  と VEGF-A は B16/BL6-CL1 細胞および B16/BL6-CL4 細胞の両細胞において発現量の増加が確認されたことから、移動・浸潤能と相関していることが明らかとなった。また、thrombospondin-1、thrombospondin-2、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、angiopoietin-2 の発現は確認されたが、その発現量の差に転移形質との相関は認められなかった。なお、MMP-9、angiopoietin-4、および angiostatin では各細胞とも、検出されなかった (Fig. 16)。

これらの結果から、TNF- $\alpha$ 、MMP-2、TGF- $\beta$ 、VEGF-A の 4 つの因子が claudin 発現による転移能の差異に関与していることが示唆された。

以上 claudin は、がんの増殖能および転移能に影響を及ぼし、そのがん形質を促進させることから、臨床において観察される claudin の過剰発現は、がんの悪性化と密接に関与していることが明らかとなった。従って claudin は、がん細胞膜表面に現れた治療のためのターゲット分子としての役割のみならず、発現亢進そのものががん悪性化の原因となるため、claudin をターゲットとしたがん治療法はより有意義ながん治療戦略であることが明らかとなった。

#### D-19. Claudin-4 発現 B16 細胞に対する C-CPE-PSIF の細胞障害性の検討

これまでの検討から claudin は B16/BL6 のがん形質を促進させることが明らかとなった。また、claudin 指向性 C-CPE-PSIF を利用したがん治療法の有効性に関して 4T-1 乳がん細胞株を用いて明らかになっている。そこで、C-CPE-PSIF を利用したがん治療法が claudin-4 発現メラノーマ細胞株である B16/BL6-CL4 細胞に対しても有効であるかを検証した。

まず、B16/BL6-CL4 細胞の claudin-4 の発現を Western blotting により確認したところ、高い claudin-4 発現を確認した (Fig. 17)。そこで、C-CPE-PSIF の B16/BL6-CL4 細胞に対する細胞傷害性を検討した。B16/BL6 細胞と B16/BL6-CL4 細胞を PSIF または C-CPE-PSIF で 24 時間処理し、WST-8 法により生細胞数の測定を行った。その結果、claudin の発現量が低い B16/BL6 細胞では PSIF および C-CPE-PSIF 処理による細胞障害性は観察されなかった。一方、B16/BL6-CL4 細胞では PSIF のみの処理ではほとんど細胞障害性が観察されないのに対して、C-CPE-PSIF では濃度依存的な細胞障害性が観察された (Fig. 18)。従って、C-CPE-PSIF は claudin-4 発現 B16/BL6 細胞に対し、claudin-4 特異的に細胞傷害性を示すことが示唆された。

#### D-20. Claudin-4 発現 B16 細胞に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

B16/BL6-CL4 細胞担がんマウスを用いて C-CPE-PSIF の皮下移植腫瘍に対する抗腫瘍効果を検証した。BALB/c マウス (雌性、7 週齢) の右腹部皮下に、 $1 \times 10^5$  個の B16/BL6-CL4 細胞を移植した。移植後、C-CPE-PSIF を 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  もしくは 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量で週に 3 回、尾静脈内投与し、投与毎に腫瘍径を測定した。その結果、B16/BL6 細胞担癌マウスでは観察されなかったものの、B16/BL6-CL4 細胞担癌マウスにおいて C-CPE-PSIF 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群では顕著な抗腫瘍効果が観察された (Fig. 19)。従って、C-CPE-PSIF はメラノーマ細胞株である B16/BL6-CL1 が形成する腫瘍に対しても抗腫瘍効果を示すことが確認された。前述した乳がん細胞株 4T1 に対する抗腫瘍効果と併せて考えると、C-CPE-PSIF は様々な腫瘍に対し抗腫瘍効果を発揮するものと推察される。

#### D-21. Claudin-4 発現 B16 細胞の転移に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

B16/BL6-CL4 細胞の実験転移モデルマウスを用いて C-CPE-PSIF の転移がんに対する抗腫瘍効果を



検証した。BALB/c マウス（雌性、7 週齢）の尾静脈に、 $1 \times 10^6$  個の B16/BL6 細胞および B16/BL6-CL4 細胞を移植した。移植後、C-CPE-PSIF を  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  もしくは  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  の用量で週 3 回、尾静脈内投与した。細胞移植後 14 日目に肺への転移結節数を測定した。その結果、B16/BL6 細胞移植マウスでは観察されなかったものの、B16/BL6-CL4 細胞移植マウスでは C-CPE-PSIF  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  投与群で顕著な抗腫瘍効果が観察された (Fig. 20)。従って C-CPE-PSIF は、メラノーマ細胞による転移がんに対しても有効な抗腫瘍活性を有していることが明らかとなった。

#### D-22. 4T1 細胞の転移に対する C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の検討

前述したように、乳がん細胞株である 4T1 細胞による皮下担癌モデルにおいて C-CPE-PSIF が抗腫瘍効果を有していた。そこで、4T1 細胞における自然転移に対して C-CPE-PSIF が抗腫瘍効果を示すかを検討した。BALB/c マウス（雌性、7 週齢）に、 $1 \times 10^5$  個の 4T-1 細胞を皮下移植した。移植後、C-CPE-PSIF を  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  もしくは  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  の用量で週に 3 回、尾静脈内投与した。細胞移植後 35 日目に肺への転移結節数を測定した。その結果、C-CPE-PSIF  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  および  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  投与によりほぼ完全に抑制された (Fig. 21)。従って、C-CPE-PSIF は自然転移を起こすがん細胞に対しても抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。前年度の検討により C-CPE-PSIF  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  投与では原発巣の縮小はほとんど見られていないことから、C-CPE-PSIF の肺転移の抑制は原発巣の縮小によるものだけではなく、転移した細胞に対し作用した結果であると推察される。転移癌に対して、皮下移植腫瘍と比べてより低濃度で効果を示したことは、一般的に抗癌剤は癌が小さいほど効果を示しやすいことを反映していると考えられる。実際、C-CPE-PSIF が血中に移行した細胞に作用したのか、転移した微小な癌に作用したのかは今後の検討課題であるが、投与は 1 日おきに行ったこと、また C-CPE を尾静脈

投与した際は約 24 時間で体内から消失すること (our unpublished data)、などを考慮すると、肺に転移した微小な癌に対し、C-CPE-PSIF が作用したと推察される。

#### D-22. Adriamycin による抗腫瘍効果の検討

C-CPE-PSIF の抗腫瘍効果の程度を確かめるため、既存の抗がん剤である adriamycin (ADR) との効果と比較した。

抗がん剤として一般的に用いられている ADR は、がん細胞の DNA の塩基対間に挿入し、DNA ポリメラーゼ、RNA ポリメラーゼ、トポイソメラーゼ II 反応を阻害して、DNA、RNA 双方の生合成を抑制することにより抗腫瘍効果を示すことが知られている。一方、心筋障害、骨髄抑制、頻脈、食欲不振、悪心・嘔吐、脱毛、発熱などの副作用も知られている。

BALB/c マウス（雌性、7 週齢）に、 $1 \times 10^5$  個の 4T-1 細胞を皮下移植した。移植後、ADR を  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  の用量で週に 3 回、尾静脈内投与し、投与毎に腫瘍径および体重を測定した。その結果、予想と一致して ADR は抗腫瘍効果を示した (Fig. 22A)。さらに、4T-1 細胞の肺転移も抑制した (Fig. 22B)。ADR  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  投与群による抗腫瘍効果は C-CPE-PSIF  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  投与群と同等であったものの、ADR 投与群のマウスでは約 26% の体重減少が確認された (Fig. 23)。一方、C-CPE-PSIF  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  投与群のマウスでは体重減少が観察されなかった (Fig. 24)。従って、C-CPE-PSIF は低い副作用で既存の抗がん剤である ADR と同等の抗腫瘍活性を有している可能性が示唆された。

#### D-23. 3D 培養による極性崩壊組織モデルの作製

上皮組織では、がん化に伴い組織の極性が崩壊することで分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、細胞間隙に局在していた CL が局在を変え、細胞間隙以外の表面に露出することが予想される。そのため、CL リガンドを利用した新規癌診断および治療法の開発が望まれるものの、未だ CL をターゲットとした抗がん剤の開発は皆無である。そこで、CL をター

ゲットとした癌治療戦略の有用性を検討するため、上皮細胞の3次元(3D)培養法により形成した極性崩壊上皮組織に対し、本ストラテジーが有効であるかどうかを検討する。そのために、まずイヌ腎臓上皮細胞である MDCK 細胞の 3D 培養による *in vitro* 組織形成モデル系を構築した。

組織極性を崩壊させるがん遺伝子として、活性型の Pak 遺伝子を2種類(MoPak, hPak1L107F)及び活性型 Ras 遺伝子2種類(KRasV12, HRasV12)を MDCK 細胞に導入した。続いて、遺伝子が導入された細胞を薬剤により選別し、安定的に各遺伝子が発現した細胞を作成した。その後、マトリゲル上にこれら4種類の MDCK 細胞(MDCK/MoPak, MDCK/hPakL107F, MDCK/KRasV12, MDCK/HRasV12)を播種し、14日間培養した後に形態を観察した(Fig. 25)。その結果、コントロールの MDCK/vector 細胞では MDCK が形成する上皮組織様の形態が観察された。一方、MDCK/MoPak 細胞では極性が崩壊した組織構造を示した。また、MDCK/hPakL107F 細胞は一部極性が崩壊した構造を示したものの、正常組織と同様な組織構造を示した。MDCK/KRasV12 細胞ではコントロールの MDCK/vector 細胞が示す球状の構造を示さずに、シート上に増殖した。また、MDCK/HRasV12 も同様に、球状の構造を示さない程、組織構造が崩壊していた(Data not shown)。

以上、極性が崩壊した MDCK 細胞を比較した結果、MDCK/MoPak 細胞が実際のがん組織で観察される極性崩壊像に近いことから、極性崩壊モデル細胞として利用することにした。

#### D-24. 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. 26)。

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-25. 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. 27)。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> では ( $K_D$  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で高い結合性を発揮しているものと推察された (Table 3)。

#### D-26. 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. 28)。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-27. 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しうるコドン配列 (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-28. 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、結合力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ーンを複数取得した。そこで、claudin-1 結合性ファージクローンの 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-29. 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. 29)、m19 は広域 claudin binder であるものと推察される。

#### D-30. 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. 30)。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 CL を利用した癌治療法の検証

CL-4 binder と緑膿菌エキソトキシン由来蛋白合成

阻害因子 (PSIF) との融合蛋白質 C-CPE-PSIF を作製した。C-CPE-PSIF は CL-4 指向性を有しており、細胞極性依存的な細胞障害性を示していた。さらに、マウス乳癌細胞に対して *in vitro* および *in vivo* において抗腫瘍効果を有していた。C-CPE の claudin-4 結合性を消失させたところ融合蛋白質の抗腫瘍活性が消失していたこと、claudin-4 高発現臓器である肝臓や腎臓における障害性、体重減少といった副作用は観察されなかったことから、claudin を標的とした癌治療戦略の有用性が示唆された。

#### ② Claudin によるがん細胞増殖制御

Claudin-4 の発現によりマウスメラノーマ細胞である B16/BL6 細胞の足場非依存的増殖能が亢進し、claudin-1 の発現によりマウスメラノーマ細胞である B16/BL6 細胞の足場非依存的増殖能、移動能、浸潤能、転移能が亢進しており、がん転移には TNF- $\alpha$ 、MMP-2、TGF- $\beta$ 、VEGF-A の発現変動が関与している可能性がある。

#### ③ Claudin を標的とした癌転移療法

CL 指向性 C-CPE-PSIF はマウスメラノーマ細胞である B16/CL-4 細胞が形成する腫瘍形成を抑制したことから、前年度の結果を踏まえて C-CPE-PSIF は様々ながん細胞に対し抗腫瘍効果を発揮できるものと推察される。

C-CPE-PSIF は B16/CL-4 および 4T1 細胞によるがん転移を抑制していたこと、C-CPE-PSIF は既存の抗がん剤である adriamycin と同等の抗腫瘍効果を有している上に、副作用が少ないことから、claudin を標的としたがん治療法の有用性が示唆された。

#### ④ 新規 claudin binder の創製

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。

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

Matsuhisa K, Kondoh M, Takahashi A and Yagi K (2009) Tight junction modulator and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 6(5):509-515.

Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y and Yagi K (2009) A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* 76(4):918-926.

近藤昌夫、高橋梓、佐伯理恵、八木清仁、生体バリアを利用した創薬研究、*Drug Delivery System*, 24, 532-537, 2009.

Suzuki H, Kakutani H, Kondoh M, Yagi K (2010) The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Pharmazie*, 65, 766-769.

Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K (2010) Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl<sub>4</sub>-Induced Liver Injury. *Biol Pharm Bull*, 33, 983-987.

Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Matsuhisa K, Takahashi A, Kakamu Y, Watari A, Yagi K (2010) A claudin-targeting molecule as a inhibitor of tumor metastasis. *J Pharmacol Exp Ther*, 334, 576-582.

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

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

Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H, Yagi K (2010) Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm*, 75, 213-217.

Uchida H, Kondoh M, Hanada T, Takahashi A, Hamakubo T, Yagi K (2010) A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem Pharmacol*, 79, 1437-1444.

Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H (2010) Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vector. *J Control Rel*, 142, 4331-4337.

Saeki R, Kondoh M, Uchida H, Yagi K (2010) Potency of Claudin-targeting as Antitumor Therapy. *Mol Cell Pharmacol*, 2, 47-51.

近藤 昌夫 (2010) 生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究 *薬剤学*, 70, 309-313.

Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Saito Y, Yamaura T, Sakihama T, Hamakubo T 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

近藤昌夫:生体バリアを利用した薬物送達研究 日本薬剤学会第25年会、平成21年5月、静岡

近藤昌夫:生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究 第25回日本DDS学会学術集会、平成21年7月、東京

近藤昌夫、八木清仁:生体バリアの分子基盤を利用した経粘膜DDS 第25回日本DDS学会学術集会、平成21年7月、東京

近藤昌夫: Claudinを利用した創薬研究の可能性 彩都バイオサイエンスセミナー、平成21年10月、大阪

近藤昌夫、八木清仁:創薬ターゲットとしてのタイトジャンクションの可能性 創剤フォーラム 第15回シンポジウム「タイトジャンクションをめぐる最近の研究成果と創薬への応用」、平成21年10月、東京

Koji Matsuhisa, Ryota Okude, Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi, A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator, 36<sup>rd</sup> annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 18-22, 2009, Copenhagen, Denmark.

Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Kiyohito Yagi, Claudin as a target molecule for mucosal absorption of peptide drug, 49<sup>th</sup> annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA.

Toshiaki Yamaura, Azusa Takahashi, Hideki Kakutani, Masuo Kondoh, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, Development of a novel screening system for claudin binder using baculovirus display, 49<sup>th</sup> annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Takeshi Yoshida, Manabu Ojima, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, Preparation of a controllable RNA polymerase I-dependent expression vector, 49<sup>th</sup> annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、近藤昌夫、八木清仁: Claudin-4を介した新規粘膜ワクチンの創製 日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

松下恭平、角谷秀樹、高橋梓、山浦利章、浜窪隆雄、近藤昌夫、八木清仁: 出芽バキュロウィルスを用いた claudin binder スクリーニング系の構築 日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

各務洋平、山浦利章、松下恭平、高橋梓、内田博司、花田雄志、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁: ウエルシュ菌エンテロトキシン断片をプロトタイプ

とした新規claudin-4 modulatorの創製 日本薬学会  
第130年会、平成22年3月、岡山

渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁: Claudin発現の迅速  
かつ簡便なモニタリングシステムの開発  
日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁: Claudin 発現の迅速  
かつ簡便なモニタリングシステムの開発 日本薬  
学会 第130年会 岡山 平成22年3月

渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁: Claudin 発現の迅速  
かつ簡便なモニタリングシステムの開発 日本薬  
学会 第130年会、平成22年3月、岡山

渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁; 上皮細胞バリア  
に着目した食物アレルギーリスク評価 第37回日  
本トキシコロジー学会、平成22年6月、沖縄

渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁; Claudin 発現モ  
ニタリングシステムを用いた Tight junction 調節物質  
の検索 第131年会 日本薬学会、平成23年3月、  
静岡

松久幸司、佐伯理恵、角谷秀樹、渡利彰浩、近藤昌  
夫、八木清仁; Claudin-4 を標的とした癌ターゲッ  
ティング法の開発 日本薬剤学会第25年会、平成22年  
5月、徳島

鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、渡利彰浩、近藤昌  
夫、八木清仁; Claudin-4 binder を利用した粘膜ワ  
クチンの開発 日本薬剤学会第25年会、平成22年5  
月、徳島

各務洋平、内田博司、花田雄志、高橋梓、山浦利章、  
松久幸司、近藤昌夫、八木清仁; Claudin を利用した  
ペプチド医薬品の非侵襲性投与技術の開発 日本  
薬剤学会第25年会、平成22年5月、徳島

鈴木英彦、佐伯理恵、角谷秀樹、渡利彰浩、近藤昌  
夫、八木清仁; Claudin binder を利用した癌治療法の  
開発 第26回日本 DDS 学会、平成22年6月、大阪

松久幸司、内田博司、花田雄志、高橋梓、各務洋平、  
近藤昌夫、八木清仁; Claudin-4 modulator を利用し  
たペプチド医薬品の粘膜吸収促進法の開発 第26  
回日本 DDS 学会学術集会、平成22年6月、大阪

高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌  
夫、八木清仁; Clostridium perfringens enterotoxin を  
利用した claudin-1 binder の創製 第26回日本 DDS  
学会、平成22年6月、大阪

高橋梓、松久幸司、各務洋平、内田博司、花田雄志、  
近藤昌夫、八木清仁; Clostridium perfringens  
enterotoxin を利用した非侵襲性投与法の開発 第  
57回トキシンシンポジウム、平成22年7月、滋賀

高橋梓、松久幸司、各務洋平、近藤昌夫、八木清  
仁; Claudin を標的とした非侵襲性投与技術の開発  
第60回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成22年  
10月、大阪

各務洋平、内田博司、花田雄志、高橋梓、近藤昌夫、  
八木清仁; 高親和性 claudin binder の創製およびドラ  
ッグデリバリーシステムへの応用 BIA symposium  
2010、平成22年7月、東京

各務洋平、高橋梓、松下恭平、松久幸司、近藤昌夫、  
八木清仁; 新規 claudin modulator の創製およびドラ  
ッグデリバリーシステムへの応用 第9回次世代を担  
う若手ファーマ・バイオフィォーラム2010、平成22年10  
月、京都

松下恭平、高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰  
浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin modulator を利用  
した非侵襲的投与技術の開発 第9回次世代を担  
う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2010、平成22年10

月、京都

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A claudin modulator as a mucosal absorption-enhancer of a peptide drug 日本薬物動態学会第 25 回年会、平成 22 年 10 月、東京

Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. Experimental Biology 2010, Apr 24–28, Anaheim, CA, USA.

Hidehiko Suzuki, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Development of a novel nasal vaccine using a claudin-4 binder, Experimental Biology 2010, Apr, 2010, Anaheim, California, USA.

Masuo Kondoh, Rie Saeki, Hideki Kakutani, Yasuhiro Mochizuki, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Preparation of a claudin-4-targeted anti-tumor molecule. Experimental Biology 2010, Apr 24–28, 2010, Anaheim, CA, USA.

Hiroshi Uchida, Masuo Kondoh, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of peptide. Experimental Biology 2010, Apr 24–28, 2010, Anaheim, CA, USA.

Hidehiko Suzuki, Rie Saeki, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A novel strategy for cancer-targeting using claudin-4 binder. 37th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 10–14, 2010, Portland, OR, USA.

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari,

Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a Mucosal Vaccine Using a Claudin-4 Binder. FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov 14–18, 2010, Louisiana, USA.

Yohei Kakamu, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a non-invasive drug delivery system using a claudin modulator. FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, Nov 14–18, 2010, Louisiana, USA.

Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of mucosal vaccine using a claudin binder. 50th annual meeting of the American society for cell biology, Dec 11–15, Philadelphia, USA.

鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin-4 binder を標的とした新規粘膜ワクチンの創製 日本ワクチン学会第 14 年会、平成 22 年 12 月、東京

松下恭平、高橋梓、斉藤郁美子、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; Claudin modulator を利用した非侵襲的投与技術の開発 第 83 回日本生化学会大会、平成 22 年 12 月、神戸

小高美樹、高橋梓、山浦利章、松久幸司、松下恭平、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁; フェージ抗体ライブラリを用いた新規 claudin binder スクリーニングシステムの構築 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

各務洋平、松下恭平、高橋梓、松久幸司、斉藤郁美子、青山浩、宇野公之、近藤昌夫、八木清仁; 新規 claudin binder C-CPEm19 の機能ドメイン解析 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡



山根誠司、鈴木英彦、角谷秀樹、高橋梓、松久幸司、内田博司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁;新規 claudin binder の創製と粘膜ワクチンへの応用 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

高橋梓、近藤昌夫、八木清仁;Claudin binder を利用した創薬基盤研究 日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

近藤昌夫、八木清仁;Claudin modulator を利用した粘膜吸収促進法の現状と課題;日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月、静岡

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 回トキシンシンポジウム、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 回トキシンシンポジウム、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. 日本薬物動態学会第 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

平田圭一  
宇留賀仁史

I. 研究協力者

医薬基盤研究所 阿部班

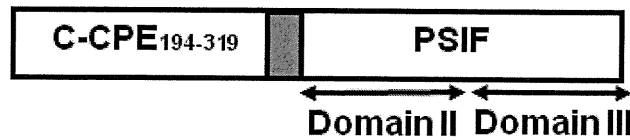
大阪大学 近藤班  
八木清仁  
渡利彰浩  
角谷秀樹  
松久幸司  
鈴木英彦

井上雅己  
有田修平  
古屋剛

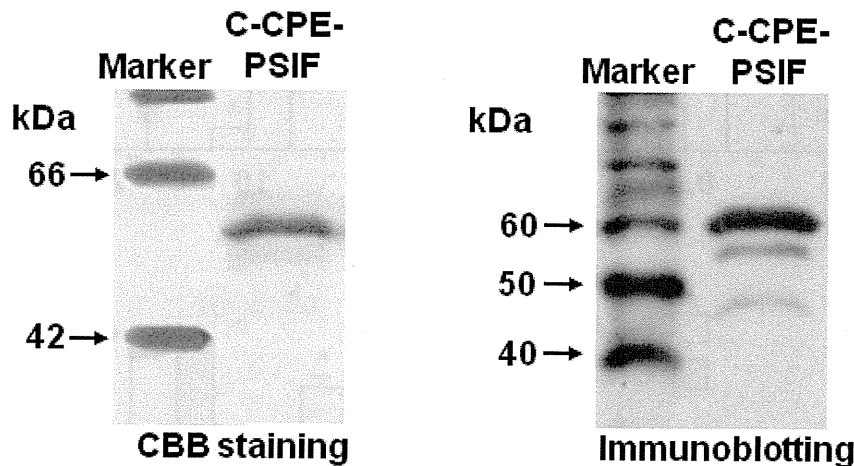
帝京大学 鈴木班  
小田雄介

A

C-CPE-PSIF



B



**Figure 1. Preparation of C-CPE-PSIF**

A) Schematic structure of C-CPE-PSIF. C-CPE-PSIF is a fusion protein of C-CPE and PSIF. C-CPE is the C-terminal fragment of CPE 194-319 aa. The dark area indicates the putative receptor-binding region of C-CPE located in its C-terminus. PSIF contains domain II and III of PE. Domain II is critical for the escape of the toxin from the endosome to the cytosol, and domain III is responsible for the inhibition of protein synthesis. B) Purification of PSIF and C-CPE-PSIF. C-CPE-PSIF was expressed in *E. coli* and isolated by Ni-affinity chromatography. The purification of proteins (5 mg) was confirmed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with antibody against the his-tag. The putative molecular weight of C-CPE-PSIF is about 60 kDa.