

- Hirata, Yuichiro Taira, Kazuo Maruyama, Protection of cancer metastasis by dendritic cell-based cancer immunotherapy utilizing liposomal bubbles and ultrasound, International Symposium of Therapeutic Ultrasound 2010 (ISTU2010)、東京、2010年6月10-12日
14. Risa Koshima, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, A novel strategy for IL-12 cancer gene therapy using the combination of liposomal bubbles and therapeutic ultrasound exposure, Liposome Research Days 2010 (LRD2010)、Canada、2010年8月5-7日
15. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Risa Koshima, Keiichi Hirata, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Anti-tumor effect by the combination of liposomal bubbles and ultrasound, Liposome Research Days 2010 (LRD2010)、Canada、2010年8月5-7日
16. 小田雄介、鈴木 亮、平田圭一、野村鉄也、宇都口直樹、丸山一雄、バブルリポソームと超音波により抗原送達した樹状細胞を免疫することによるがん転移予防効果 第7回日本中性子捕捉療法学会、東京、2010年8月5-6日
17. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Development of novel antigen delivery system with liposomal bubbles (Bubble liposomes) and ultrasound in cancer immunotherapy, EUROSON2010、デンマーク、2010年8月23-25日
18. 鈴木 亮、丸山一雄「リポソーム製剤」リポソーム技術を基盤とした新たなDDS戦略、ナノメディシン研究会、東京、2010年9月4日、招待講演
19. 鈴木 亮、超音波感受性リポソームを利用した新たな薬物・遺伝子送達システムの開発に関する研究、第19回日本バイオイメージング学会、東京、2010年9月9-11日、奨励賞受賞講演
20. 光嶋里茶、鈴木 亮、小田雄介、宇都口直樹、丸山一雄、超音波がん温熱免疫療法における超音波照射強度の影響、日本薬学会関東支部大会、東京、2010年10月2日
21. Ryo Suzuki, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Anti-tumor effect by the combination of therapeutic ultrasound and dendritic cell-based immunotherapy, 日本癌学会、大阪2010年9月22-24日
22. 鈴木 亮、小田雄介、丸山一雄、リポソーム技術と超音波技術を基盤とした革新的がん治療システムの構築、シンポジウム「超音波を積極的に活用した最先端材料プロセッシング」、東京、2010年10月23日、招待講演
23. Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Cancer Immunotherapy Utilized Ultrasound Sensitive Liposomes (Bubble Liposomes), PSWC2010、米国、2010年11月14-18日、招待講演
24. 鈴木 亮、光嶋里茶、小田雄介、平田圭一、野村鉄也、宇都口直樹、丸山一雄、超音波感受性リポソーム(バブルリポソーム)と超音波照射の併用によるがん温熱治療における免疫系の関与、日本音響学会 アコースティックイメージング研究会、宮城、2010年12月10日
25. Ryo Suzuki, Risa Koshima, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Kazuo Maruyama, Novel cancer therapy combined with mild-hyperthermia using ultrasound sensitive liposome and immunotherapy, 第12回国際造影超音波シンポジウム、東京、2010年12月11-12日
26. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用した新規 Drug Delivery System (DDS) 開発に向けた基盤技術の構築、日本生体医工学会、東京、2009年4月23-25日
27. 鈴木 亮、丸山一雄、遺伝子デリバリーシステムへの超音波技術の応用、日本超音波医学会、東京、2009年5月22-24日
28. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用した新規 DDS 基盤技術の構築、日本DDS学会、東京、2009年7月3-4日
29. Ryo Suzuki, Eisuke Namai, Yusuke Oda, Norihito Nishiie, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Shinsaku

- | | |
|---|-------------------------|
| <p>Nakagawa, Kazuo Maruyama, Cancer gene immunotherapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure、WFUMB2009、シドニー(オーストラリア)、2009年8月29日-9月3日</p> | <p>3月6日</p> |
| | <p>H. 知的財産権の出願・登録状況</p> |
| | <p>H-1 特許取得</p> |
| | <p>なし</p> |
| <p>30. <u>鈴木 亮</u>、小田雄介、大竹将太、宇都口直樹、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用した樹状細胞への抗原送達特性の評価、日本バイオイメージング学会、岡山、2009年9月3-5日</p> | <p>H-2 実用新案登録</p> |
| | <p>なし</p> |
| <p>31. <u>Ryo Suzuki</u>, Yusuke Oda, Norihito Nishiie, Shota Otake, Risa Koshima, Naoki Utoguchi, Yoichi Negishi, Shinsaku Nakagawa, Kazuo Maruyama, Cancer gene therapy utilized ultrasound (US)-sensitive liposome as non-viral vector、WMIC2009、モントリオール(カナダ)、2009年9月23-28日</p> | <p>H-3 その他</p> |
| | <p>なし</p> |
| | <p>I. 研究協力者</p> |
| | <p>小田 雄介</p> |
| | <p>平田 圭一</p> |
| | <p>宇留賀 仁史</p> |
| <p>32. <u>鈴木 亮</u>、宇都口直樹、丸山一雄、超音波感受性リポソームを利用したがん温熱療法と免疫療法の併用によるがん治療、日本癌学会、横浜、2009年10月1-3日</p> | |
| <p>33. <u>Ryo Suzuki</u>, Norihito Nishiie, Yusuke Oda, Yuichiro Taira, Keiichi Hirata, Naoki Utoguchi, and Kazuo Maruyama, ACTIVATION OF EFFECTIVE ANTITUMOR IMMUNITY BY THE COMBINATION OF THERAPEUTIC ULTRASOUND AND DENDRITIC CELL BASED IMMUNOTHERAPY、AFPS2009、福岡、2009年10月15-18日</p> | |
| <p>34. <u>鈴木 亮</u>、丸山一雄、超音波がん温熱療法への応用に向けた超音波感受性ナノ微粒子の開発、NEDO 特別講座 DDS シンポジウム、東京、2009年12月12日</p> | |
| <p>35. <u>鈴木 亮</u>、西家功人、小田雄介、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免疫療法における遠隔転移部位に対する治療効果、国際癌増感シンポジウム、奈良、2010年2月13-14日</p> | |
| <p>36. <u>鈴木 亮</u>、小田雄介、宇都口直樹、丸山一雄、音波応答性リポソームの開発とがん治療への応用、超音波分子診断治療研究会、福岡、2010年</p> | |

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。本研究では、独自のファージ表面提示法を駆使することで、CL binder の探索シーズとなるナイーブファージ抗体ライブラリ、免疫抗体ライブラリの作製を通じて、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試みた。そのため、我々が独自に改良したファージ表面提示法を駆使することで、ナイーブファージ抗体ライブラリ、及び免疫抗体ライブラリの作製を通じて、抗体作製法の最適化を試みた。ファージ抗体ライブラリは、生体が有する抗体可変

領域遺伝子（VLおよびVH）レパートリーをPCR法で増幅し、リンカー配列で連結して一本鎖Fv型（scFv）とした上で、ファージ表面上に網羅的に発現させるものである。本研究では、ファージ抗体ライブラリの作製に最も重要なVLおよびVH遺伝子増幅のためのPCRプライマーセットを改善することで、多様性と品質の双方に優れたナイーブファージ抗体ライブラリの作製を試みた。第一の改善点として、過去の報告やKabat抗体データベースを参考に、増幅可能な抗体遺伝子の多様性を大幅に向上するプライマーセットを設計した（表1）。第二の改善点として、連結効率の低下やフレームシフトの低減を図るため、プライマーセットのVL遺伝子下流とVH遺伝子上流にあらかじめリンカー配列を組み込むことで、3 fragment assemblyのステップを省略した。本改良型プライマーセットを用いてナイーブファージ抗体ライブラリの構築を行った。

さらに、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）をモデル抗原として用いて、抗原との結合親和性に基づくセレクション（パンニング）条件の最適化を図った。

B. 研究方法

1. 骨髄および脾臓由来 cDNA の作製

3 系統 (C57BL/6, Balb/c, C3H: 日本 SLC) のマウス (雄性, 6 週齢) をペントバルビタールにより深麻酔し、骨髄細胞と脾細胞を回収した。得られた細胞から、TRIzol reagent (Invitrogen) により total RNA を得た。得られた各組織由来 total RNA から Superscript III First Strand cDNA Synthesis System (Invitrogen) を用いて以下のように cDNA を合成した。total RNA 5 µg 当たり、50 µM oligo(dT)₂₀ (Invitrogen) 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° C で 5 分間反応させた。そこに 10× RT buffer 2 µL、25 mM MgCl₂ 4 µL、0.1 M DTT 2 µL、RNaseOUT™ (Invitrogen) 1 µL、SuperScript™ III RT (Invitrogen) 1 µL を加えて、50° C で 50 分間、85° C で 5 分間反応させた。RNase H (Invitrogen) 1 µL を加え、37° C で 20 分間反応させ、骨髄および脾細胞由来 cDNA を得た。

2. 一本鎖化 Fv (scFv) 遺伝子の作製

上記 cDNA をテンプレートとし、アニーリング温度を 50° C で 1 分間、伸長反応を 68° C で 1 分間に設定し、Table 1 に示した VL primer sets あるいは VH primer sets (2 pmol) と KOD-plus-DNA Polymerase (TOYOBO) を用いて PCR を 35 サイクル行った。この PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 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° C で 1 分間、伸長反応を 68° 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'-GCCAGCTTTGGAGCCTTTTT TTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAATTATTATTCGC AATTCCTTTAGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCC GG CCATGGCC-3')、および Not I サイトを有するプライマー Y16 (5'-TTAGTAAATGAATTTTCTGTATGA GGTTTTGCTAAACAACCTTCAACAGTCTATGCGGCA CGCGTTCCAGGATCOGGATACGGCACCGGCGCA CCTGCGGCCGC-3') を用い、アニーリング温度を 65° C で 1 分間、伸長反応を 68° 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。

3. ナイーブファージ抗体ライブラリの作製

上記 scFv 遺伝子を制限酵素 Nco I および Not I で処理した。一方で、あらかじめ Nco I および Not I で処理したファージミドベクター pCANTAB5E と T4 ligase (Roche Diagnostics) 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 OD=0.3~0.6 まで培養した大腸菌 TG1 (Stratagene) を、MilliQ 水で 3 回洗浄操作を行い、10% glycerol で懸濁氷冷し、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) 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 (3M Microbiology) 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。

4. ファージの作製

scFv ライブラリ遺伝子で形質転換された大腸菌 TG1 株を 50 µg/mL Ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地で 250 rpm、37° C で OD₆₀₀ = 0.3-0.6 まで培養した。M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen Corp.) を添加し、110 rpm、37° C で 30 分間、250 rpm、37° C で 30 分間培養後、2,000 rpm で 10 分間遠心し、得られたペレットに対して 100 µg/mL Ampicillin、50 µg/mL Kanamycin 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養した。4° C、2,000 rpm で 10 分間、さらに 10,000 rpm で 15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-6000、2.5 M NaCl を 1 / 5 volume 加え、激しく混和して氷上で 1 時間静置した。15,000 rpm で 10 分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、0.45 µm の Millex-HV (Millipore) を用いてフィルターろ過し、ファージを回収した。さらに、2% glucose 含有 2YT 培地で OD₆₀₀ = 0.3~0.6 まで培養した TG1 に対して、10 倍希釈で段階希釈したファージ溶液を添加し、

37° C、1 時間培養した。培養液の一部に 50 µg/mL Ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地を添加し、Petrifilm に播種し一晩培養した。各希釈段階で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。

5. BIAcore を用いたパンニング

パンニングには BIAcore 3000 (GE Healthcare) を用いた。センサーチップ CM3 (GE Healthcare) 上に 50 µg/mL に調製した proCASP8 を 100 µL を用い、CM3 固相化プロトコルに基づいて固相化した。作製したファージライブラリを input として用い、HBS-EPT buffer [0.05% Tween-20 を含む HBS-EP (GE Healthcare)] で 10 回洗浄した。抗原に結合したファージを glycine-HCl (pH 2.0) と glycine-NaOH (pH 11.0) により溶出回収し、output とした。1 M Tris-HCl (pH 8.0) を 4 µL と 2% glucose 含有 2YT 培地を 250 µL 加え、その一部を用いて、次項に示す方法でタイターを測定した。残りのファージを大腸菌 TG1 株に感染させ、増殖させた後、上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度パンニング操作を行った。

6. 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 組みかえ蛋白質を等量の 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 µg/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。

7. 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 µg/mL に希釈し、

Maxisorb 96 well plate に 100 µL/well 添加し、一晩 4° 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° C、2 時間でブロックした。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 µL/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 µL/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。

8. 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 × g、4° 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 × g、4° C で 15 分間遠心した。上清を除き、70% ethanol で wash し、7500 × g、4° 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° C で 5 分間インキュベーションした。10 × 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° C で 50 分間、85° C で 5 分間反応させた。RNase H (Invitrogen Corp.) 1 µL を加え、37° C で 20 分間反応させ、脾細胞由来 cDNA を得た。

9. 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° C

で 1 分間、伸長反応を 68° 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° C で 1 分間、伸長反応を 68° 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 GGAGCCTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAA TTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCTCTTCTATG CGGCCAGCCGGCCATGGCC-3')、及び *Not*I サイトを有するプライマー Y16 (5'-TTAGTAAATGAATTTTCT GTATGAGTTTTGCTAAACAACCTTTCAACAGTCTAT GCGGCACGCGGTTCCACGGATCCGGATACGGCACG GGCGCACCTGCGGCCGC-3')を用い、アニーリング温度を 65° C で 1 分間、伸長反応を 68° 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。

10. 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 で懸濁氷冷し、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。

11. 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。

12. 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

1. ナイーブファージ抗体ライブラリの作製

過去に報告され、現在も汎用されているファージ抗体ライブラリ用のプライマーセットは、①プライマーの組み合わせが1440通りと多様性に乏しく、②scFv遺伝子を作製する際にVL遺伝子、リンカー配列、VH遺伝子の3 fragment assemblyを必要としているため、連結効率の低下やフレームシフトが起こり、高品質なライブラリを得ることができないという2つの大きな問題点を有している。これら問題点を克服するために、まず、多様な抗体遺伝子を均等に増幅できるように、過去の報告とKabat抗体データベースを参考に、約1000万種類以上もの組み合わせからなるプライマーセットを独自に設計した(Table 1)。そして、3 fragment assemblyを省くため、VL遺伝子下流とVH遺伝子上流にリンカー配列をあらかじめ組み込むことで、VL遺伝子、VH遺伝子を直接的に連結可能とした。このプライマーセットを用いて、抗原感作されていないマウスの骨髄・脾臓細胞由来mRNAからVL、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(Fig. 1)。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所 2.4×10^9 CFUであった。また、ライブラリから任意にピックアップしたクローンのDNAシーケンスを解析し、アミノ酸配列を確認した結果、フレームシフトやフレーム内の変異は認められなかった。更に、抗体のアミノ酸配列の中で最も多様であり、抗原に対する特異的結合に重要であると言われているVHのCDR3領域をシーケンス解析した結果、本ライブラリにおいても、CDR領域の長さ、配列共に十分な多様性を有していることが確認された。以上の結果から、本研究で構築したナイーブファージ抗体ライブラリは、

生体が有する抗体の多様性を模倣する優れたライブラリであることが示唆された。

2. パンニング条件の最適化

モデル抗原 proCASP8 蛋白質は、T7 プロモーター下に発現するベクターに組み込み、大腸菌を用いて発現誘導し、精製した。SDS-PAGE により純度を評価したところ、目的の 59 kDa に単一バンドを確認した。まず、ナイーブファージ抗体ライブラリから抗 proCASP8 抗体を得るために、抗原の固相化量や抗体クローンとの結合性を表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によってリアルタイムに測定でき、マイクロ流路系で送液等の一連の操作を自動化可能なシステムである BIAcore を使用した。条件検討の結果を参考に、最適化したセレクション・プロトコルに従い、proCASP8 に対するパンニング操作を2回繰り返した。パンニング後に回収したファージを大腸菌 TG1 株に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. 2)。その結果、パンニング前の input ファージの中には、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、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1クローン認められた。続いて、スクリーニングによって同定された proCASP8 に親和性を示唆するクローンについて DNA シーケンス解析を行ったところ、Table 2 に示すような配列をもつ抗体であることが確認され、クローン名 NC-1 と命名した。次に得られた NC-1 の特性評価の一環として、その抗原特異性をファージ ELISA により評価した (Fig. 3)。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、NC-1 は抗体量依存的に proCASP8 に対して結合性を示したのに対し、他の抗原蛋白質には結合性は確認できなかった。従って、本検討で単離・同定したクローン NC-1 は proCASP8 特異的なモノクローナル抗体であることが示唆された。

3. 免疫抗体ライブラリの作製

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、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. 4)。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って、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. 5)。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. 6)。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って、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 3)。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 4)。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、シークエ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ーマ法に比べても、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が示唆された。

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、本研究で構築したナイーブ抗体ファージライブラリ、及び免疫抗体ライブラリは、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. Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Taniai M, Ohta T, Tsunoda S and Tsutsumi Y. (2009) Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs. *Biochem Biophys Res Commun*, 388:667-71.
2. Abe Y. (2009) Development of novel DDS technologies for optimized protein therapy by creating functional mutant proteins with antagonistic activity. *Yakugaku Zasshi*, 129:933-939.
3. Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Minowa K, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Tsunoda S and Tsutsumi Y. (2010) Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by

phage display technology, *Pharmazie*, 65:93-96.

4. Imai S, Nagano K, Yoshida Y, Okamura T, Yamashita T, Abe Y, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Kamada H, Mukai Y, Nakagawa S, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Development of a novel antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins., *Biomaterials*, 32(1):162-169, 2011.
5. 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. 阿部康弘、角田慎一、堤 康央:創薬プロテオミクス研究を有効活用したバイオ創薬、Cphi Japan 2009、平成 21 年 4 月、東京(招待講演)
2. 阿部康弘、萱室裕之、吉岡靖雄、形山和史、野村鉄也、廣井隆親、角田慎一、堤 康央:生物学的 DDS による活性増強型 TNF 変異体の創出とその粘膜ワクチンアジュバントとしての有用性評価、第 25 回 DDS 学会、平成 21 年 7 月、東京
3. 阿部康弘、鎌田春彦、角田慎一、堤 康央:アンタゴニスト活性を有した TNFR1 指向性変異体の新規自己免疫疾患治療薬としての有用性評価、第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 21 年 10 月、大阪
4. Abe Y., Nomura T., Inoue M., Arita S., Furuya T., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S., Anti-inflammatory effects of a novel TNFR1-selective antagonistic TNF mutant in experimental autoimmune encephalomyelitis mice., Joint Meeting of the International Cytokine Society (ICS) and the International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR), Chicago (USA), 3-7 October, 2010.

5. 阿部康弘, 井上雅己, 野村鉄也, 有田修平, 古屋剛, 長野一也, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央:レセプター特異性に優れた機能性人工質蛋白質創出システムの開発., 第26回日本DDS学会学術集会, 大阪(大阪), 2010年6月.
6. 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.
7. 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

有田修平

古屋 剛

山下琢矢

金崎聡一郎

前田祐香

Table 1 Primers for PCR amplification of VL and VH.

VL Forward	<p>NcoI</p> <p>5'-cctttctatg^{cggcccagccgg}CCATGGcc-</p> <p>-GAYATTGTWCTC^{WCC}CARTC -3' -GAYRTTKTGATGACCCAVAC -3'</p> <p>-GAYATTSIGMTSACYCAGTC -3' -GAYATYCAGATGACACAGAC -3'</p> <p>-GAYATTGTGMTMACTCAGTC -3' -GAYATTGTGATGACACAACC -3'</p> <p>-GAYATTGTGHRWCACAGTC -3' -GAYATCCAGCTGACTCAGCC -3'</p> <p>-GAYATTGTRATGACMCAGTC -3' -GAYATTGTGATGACBCAGKC -3'</p> <p>-GAYATTMAGATRAMCCAGTC -3' -GAYATTGTGATAACYCAGGA -3'</p> <p>-GAYATTCAGATGAYDCAGTC -3' -GAYATTGTGATGACCCAGWT -3'</p> <p>-GAYATTTTGCTGACTCAGTC -3' -GAYGTGSTGMTSACYCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTGTTCTCAWCAGTC -3' -GAYGCTGTTGTAICTCAGGAATC -3'</p> <p>-GAYATTGWGCTSAACC^{CAATC} -3' -GAYATTGTDHTVWCHCAGTC -3'</p> <p>-GAYATTSTRATGACCCARTC -3'</p>	VH Forward	<p>5'-agcggcggcggcgctctggtggtggtgatcc-</p> <p>-GAKGTRMAGCTTCAGGAGYC -3' -SAGGTGCAGSKGGTGGAGTC -3'</p> <p>-GAGGTNCAGCTBCAGCAGTC -3' -GAKGTGCAMCTGGTGGAGTC -3'</p> <p>-CAGGTGCAGCTGAAGSASTC -3' -GAAGTCAVCTGGTGGAGTC -3'</p> <p>-CAGSTBCAGCTGCAGCAGTC -3' -GAGGTGAAGCTGATGGARTC -3'</p> <p>-GAGGTYCAGCTYCAGCAGTC -3' -GAGGTGCARCTTGTGAGTC -3'</p> <p>-GARGTCCARCTGCACARTC -3' -GARGTRAAGCTTCTCAGATC -3'</p> <p>-CAGGTYCAGCTBCAGCARTC -3' -GAAGTGAARSTTGAGGAGTC -3'</p> <p>-CAGGTYCARTKACAGCAGTC -3' -GAAGTGATGCTGGTGGAGTC -3'</p> <p>-CAGGTCCAGCTGAAGCAGTC -3' -CAGGTACTCTRAAAGWGTSTG -3'</p> <p>-GAGGTGAASSTGGTGGARTC -3' -CAGGTCCAAYTVCAGCARCC -3'</p> <p>-GAVGTGAWGYTGGTGGAGTC -3' -GATGTGAAC TTGGAAGTGC -3'</p> <p>-GAGGTGAAGGTATCGAGTC -3'</p>
	VL Reverse		<p>5'-accagagccgcccggcgtaccaccaccacc-</p> <p>-CCGTTTGATTTC^{CACTTKG} -3' -CCGTTYWATTTTCAACTTWG -3'</p> <p>-CCGTTTATTTCCAGCTTGG -3' -CCCTAGGACAGTCAGTTTGG -3'</p> <p>-CCGTTTSAGCTCCAGCTTGG -3'</p>

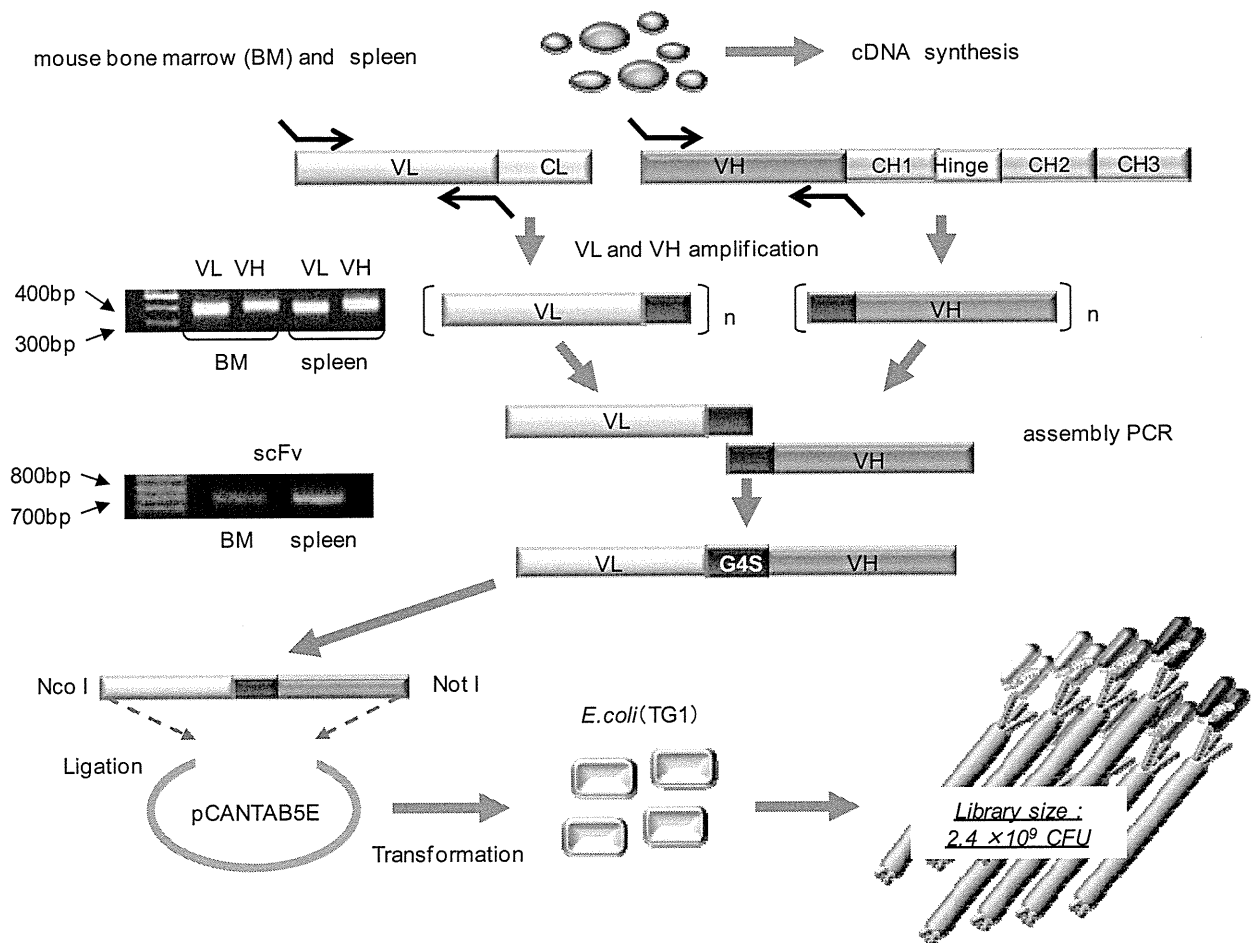


Fig. 1 Scheme of naive scFv phage library.

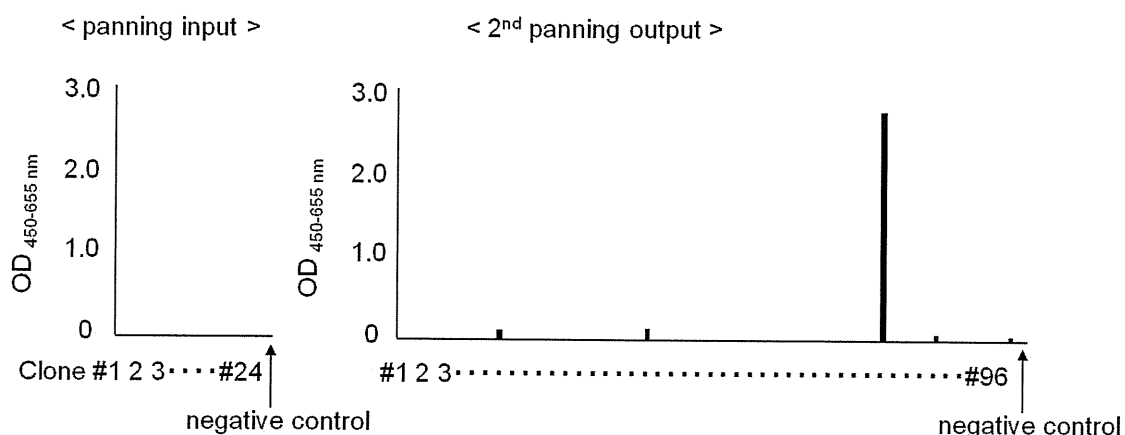


Fig. 2 Isolation of an antibody to proCASP8 from non-immune libraries by panning. After panning against proCASP8, the binding properties of selected clones were measured by ELISA. As negative control, phage displaying anti-KDR scFv was used.

Table 2 Amino acid sequence of anti-proCASP8 scFv (NC-1) antibody from non-immune libraries.

VL

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
DVVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC	KASQNVGTNVA	WYQQKPGQSPKALIV	SASYRYS	GVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFC	QQYSSYPLT	FGAGTKLELKR

VH

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
EVOLQQSGAELAKPGASVKLSCKASGYTF	TSYWMH	WYKQRPQGQLEWIG	YINPSSGYTKYNQKFKD	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTYEDSAVYYCLL	RLDY	WGQGTTLTVSS

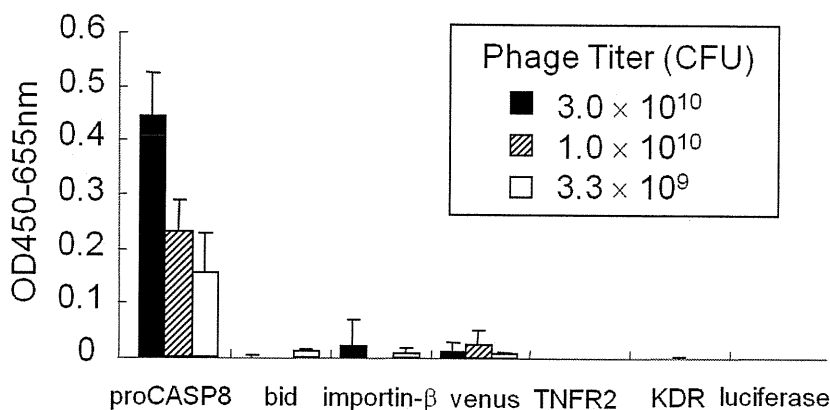


Fig. 3 Binding specificity of anti-proCASP8 scFv (NC-1) antibody. Human proCASP8 his-tag, human bid, importin- β his-tag, venus, human TNFR2 Fc chimera, human KDR Fc chimera, luciferase (50 ng each) were immobilized on the wells of Maxisorb 96 well plate and then the purified anti-CASP8 scFv (NC-1) antibody was reacted in the wells. Binding properties of NC-1 antibody was measured by ELISA.

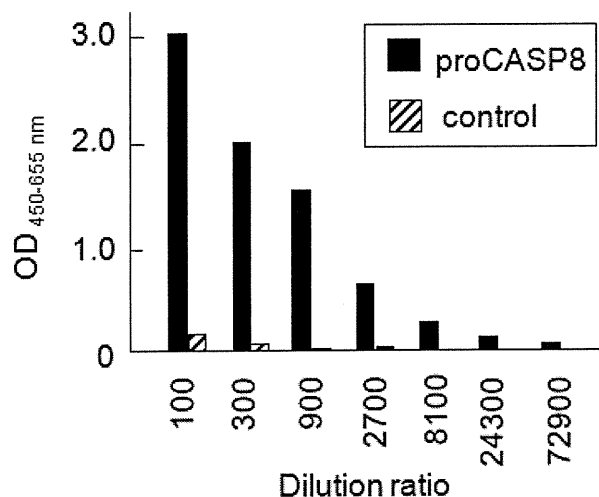


Fig. 4 Measurement of the antibody value for proCASP8 in the mouse serum.

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.

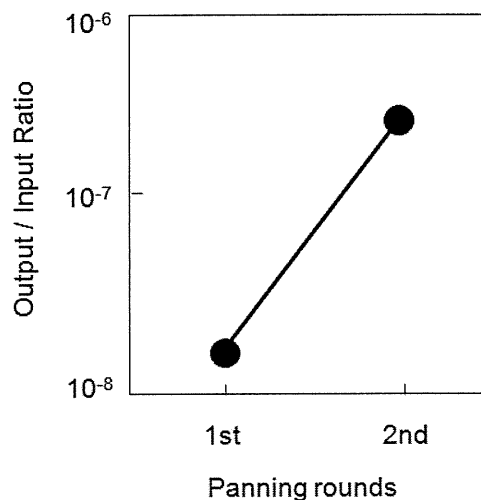


Fig. 5 Enrichment of antibodies to proCASP8 from immune libraries by panning

The panning ratio was calculated as follows ; (output phage titer) / (input phage titer).

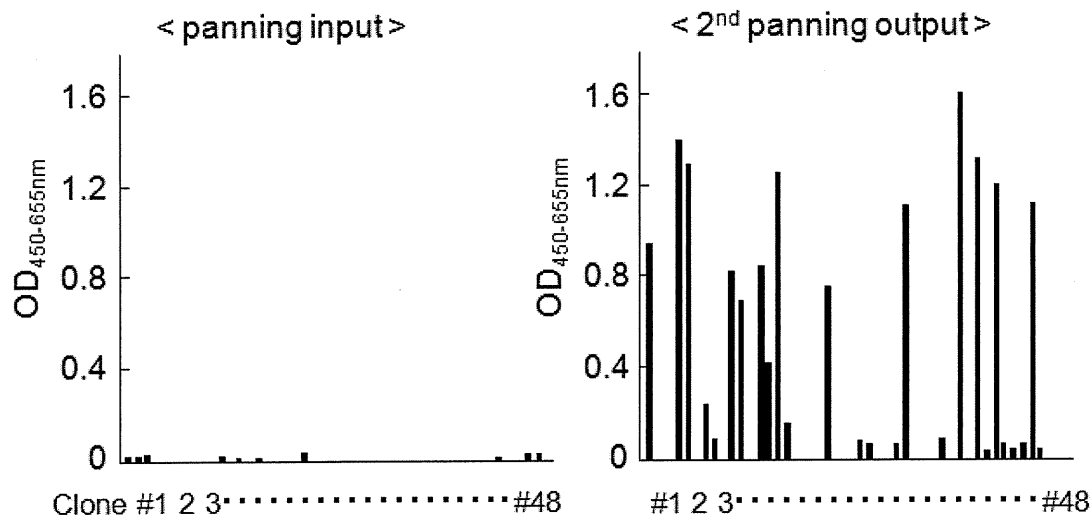


Fig. 6 Isolation of antibodies to proCASP8 from immune libraries by panning

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

VL

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IC-1	DIQMIGQKFMSTAVGDRVQVC	KASQNVGDNVA	WVQKAFQSSPVALIV	SASQNVF3	GVFDFRTGSGSGTDFLTI3AVWQ2EDLAEVFC	QQVW3NPLT	FGAGTLEIEK
IC-2	-----T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-3	---V-T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-4	---V-T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-5	---LLT---FTI-AA-P-EKITI---	S---SSIS2NPLH	---F---L---	NT-MLA-	---A---S---SIS---GTMEA---V-T-Y-	---GS---	-----L---
IC-6	---LLT---FTI-AA-P-EKITI---	S---SSIS2NPLH	---F---L---	NT-MLA-	---A---S---SIS---GTMEA---V-T-Y-	---GS---	-----L---
IC-7	---LLI---FTI-AA-P-EKITI---	S---SSIS2NPLH	---F---L---	NT-MLA-	---A---S---SIS---GTMEA---V-T-Y-	---GS---	-----

VH

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IC-1	EVALVE3GGELVRFGGGLSCAASGFAP3	SYDMS	WVNSIFERLESWA	TI3SGG2YTFPDSVHG	NFTI3KRDMAFNILVLM3SLR3EDTALVYCAR	HWVY	WGQSTILTIV33
IC-2	---Y-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-3	---K-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-4	---K-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
IC-5	---S-K-----T-N	---YA-N	---A-G-G---	R-R-K32WATVYAD3VFD	---D332M---M-KT---M---V---	HTVYMDV	---3V---
IC-6	---H---S-K-----T-N	---YA-N	---A-G-G---	R-R-K32WATVYAD3VFD	---D332M---M-KT---M-F-V---	HTVYMDV	---3V---
IC-7	---S-K-----T-N	---YA-N	---A-G-G---	R-R-K32WATVYAD3VFD	---D332M---M-KT---M---V---	HTVYMDV	---3V---

Table 4 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
Matsuhisa K Kondoh M Takahashi A Yagi K	Tight junction modulator and drug delivery	Expert Opin Drug Deliv	6	509-515	2009
Saeki R Kondoh M Kakutani H Tsunoda S Mochizuki Y Hamakubo T Tsutsumi Y Horiguchi Y Yagi K	A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule	Mol Pharmacol	76	918-926	2009
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
Uchida H Kondoh M Hanada T Takahashi A Hamakubo T Yagi K	A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide	Biochem Pharmacol	79	1437-1444	2010
Suzuki H Kakutani H Kondoh M Watari A Yagi K	The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin	Pharmazie	10	766-769	2010
Itoh A Isoda K Kondoh M Kawase M Watari A Kobayashi M Tamesada M Yagi K	Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl ₄ -induced liver injury	Biol Pharm Bull	33	983-987	2010

Kakutani H Kondoh M Fukasaka M Suzuki H Hamakubo T Yagi K	Mucosal vaccination using claudin-4 targeting	Biomaterials	31	5463-5471	2010
Yagi K Kawase M Isoda K Kondoh M	Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function	YAKUGAKU ZASSHI,	130	537-543	2010
Kakutani H Kondoh M Saeki R Fujii M Watanabe Y Mizuguchi H Yagi K	Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin	Eur J Pharm Biopharm	75	213-217	2010
Ushitora M Sakurai F Yamaguchi T Nakamura S Kondoh M Yagi K Kawabata K Mizuguchi H	Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vector	J Control Rel	142	4331-4337	2010
Saeki R Kondoh M Uchida H Yagi K	Potency of claudin-targeting as antitumor therapy	Mol Cell Pharmacol	2	47-51	2010
近藤昌夫	生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究	薬剤学	70	309-313	2010
Saeki R Kondoh M Kakutani H Matsuhisa K Takahashi A Suzuki H Kakamu Y Watari A Yagi K	A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis	J Pharmacol Exp Ther	334	576-582	2010
Kakutani H Takahashi A Kondoh M Saito Y Yamaura T Sakihama T Hamakubo T Yagi K	A novel screening system for claudin binder using baculoviral display	PLoS ONE	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 Clostridium perfringens enterotoxin, in mice	Pharmazie	66	543-546	2011
Takahashi A Kondoh M Uchida H Kakamu Y Hamakubo T Yagi K	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	466-470	2011
Ishikawa A Fujii M Morimoto K Koizumi N Kondoh M Watanabe Y	Oil-in-water emulsion lotion providing controlled release using 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine n-butyl methacrylate copolymer as emulsifier	Pharm Sci	2	16-22	2012
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	
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	
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	
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	

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
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
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
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	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.	J Control Release	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	Int J Pharm	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	J Drug Target	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	Cancer Biol Ther	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	Biomaterials	32	4659-4669	2011
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
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
Hagisawa 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
Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Maruyama K	Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles	J Control Release.	149	36-41	2011
Ikeda-Dantsuji Y, Feril LB Jr, Tachibana K, Ogawa K, Endo H, Harada Y, Suzuki R, Maruyama K.	Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against Chlamydia trachomatis-infected human epithelial cells in vitro.	Ultrason Sonochem	18	425-430	2011
鈴木 亮、小田雄介、宇都口直樹、丸山一雄	Development of ultrasonic cancer therapy using ultrasound sensitive liposome.	薬学雑誌	130	1665-1670	2010
根岸洋一、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、新槇幸彦	Development of gene delivery system into skeletal muscles by bubble liposomes and ultrasound	薬学雑誌	130	1489-1496	2010
Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M	Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy	Biomaterials	31	7813-7826	2010

Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, Koyanagi S, Ohdo S.	Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice	Cancer Res.	70	6238-6246	2010
山下琢也、宇都口直 樹、鈴木 亮、長野 一也、角田慎一、堤 康央、丸山一雄	Development of anti-tumor blood vessel antibodies by phage display method.	薬学雑誌.	130	479-485	2010
Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Tani M, Ohta T, Tsunoda S, Tsutsumi Y.	Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs	Biochem Biophys Res Commun	388	667-671	2009
Abe Y.	Development of novel DDS technologies for optimized protein therapy by creating functional mutant proteins with antagonistic activity	Yakugaku Zasshi	129	933-939	2009
Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Minowa K, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Tsunoda S and Tsutsumi Y	Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology	Pharmazie	65	93-96	2010
Imai S, Nagano K, Yoshida Y, Okamura T, Yamashita T, Abe Y, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Kamada H, Mukai Y, Nakagawa S, Tsutsumi Y, Tsunoda S.	Development of a novel antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins.	Biomaterials	32(1)	162-169	2011