

Isoda K, Hasezaki T, Kondoh M, Tsutsumi Y and Yagi K (2011) Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury. *Pharmazie* **66**(4):278-281.

Hasezaki T, Isoda K, Kondoh M, Tsutsumi Y and Yagi K (2011) Hepatotoxicity of silica nanoparticles with a diameter of 100 nm. *Pharmazie* **66**(9):698-703.

Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, Sakamoto N and Yagi K (2011) Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication. *Nucleic Acids Res* **39**(10):e64.

Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, Sakamoto N, Matsuura Y, Mizuguchi H and Yagi K (2011) Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* **416**(1-2):119-124.

Li X, Kondoh M, Watari A, Hasezaki T, Isoda K, Tsutsumi Y and Yagi K (2011) Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice. *Pharmazie* **66**(4):282-286.

Takahashi A, Kondoh M, Kodaka M and Yagi K (2011) Peptides as tight junction modulators. *Curr Pharm Des* **17**(25):2699-2703.

Yoshida T, Kondoh M and Yagi K (2011) Promising targets for anti-hepatitis C virus agents. *Curr Med Chem* **18**(8):1239-1244.

Kondoh M, Takahashi A and Yagi K (2012)

Spiral progression in the development of absorption enhancers based on the biology of tight junctions. *Adv Drug Deliv Rev* **64**:515-522.

Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, Sakamoto N, Katayama K and Mizuguchi H (2012) Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Res* **165**:214-218.

G-2 学会発表

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.

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

Abe Y, Nomura T, Kayamuro H, Yoshioka Y, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y : Creation and X-ray structural analysis of TNFR1-selective mutant TNF with antagonistic activity. HUPO 8th Annual World Congress, Toronto 2009, 26-30 September, 2009, Tronto Canada.

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

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21-23日、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3、4日、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3、4日、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15日、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23日、東京

Koji Matsuhisa, Ryota Okude, Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi: A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator, 36rd 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., 49th 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., 49th 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., 49th 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

Abe Y., Nomura T., Kayamuro H., Kawara T., Arita S., Furuya T., Nagano K., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Anti-inflammatory effects of a TNFR1-selective mutant with antagonistic activity on established murine collagen-induced arthritis., 14th International Congress of Immunology., Kobe (Japan), 22-27 Aug, 2010

Arita S., Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Furuya T., Itoh N., Yoshikawa T., Nagano K., Tsutsumi Y., Tsunoda S., The potential of IL-1 family cytokines as mucosal adjuvants for nasal influenza vaccine, Joint Meeting of the International Cytokine Society (ICS) and the International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR), Chicago (USA), 3-7 October, 2010.

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, 平成 22 年 6 月 大阪

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; 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 回日本薬学会 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, 齊藤郁美子, 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方法の開発 第 57 回トキシシンポジウム 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

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 ; ファ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

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.

Abe Y., Inoue M., Furuya T., Mukai Y., Nakamura T., Yamagata Y., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S : 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、齊藤郁美子、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

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,

Biological and structural characterization of human TNFR2-selective TNF mutants., 9th Joint Meeting of ICS-ISICR (Cytokines2011), Florence (Italy), 9-12 October, 2011.

Furuya T., Abe Y., Inoue M., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S : Creation of mouse TNFR2-selective TNF mutant using phage display system., 9th Joint Meeting of ICS-ISICR (Cytokines2011), Florence (Italy), 9-12 October, 2011.

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

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 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

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.

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.

18th International Symposium of hepatitis C virus and related viruses, Sep8-12, 2011, Seattle, WA, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得

該当事項なし

H-2 実用新案登録

該当事項なし

H-3 その他

該当事項なし

I. 研究協力者

医薬基盤研究所

長野一也、鍋師裕美、野村鉄也、萱室裕之、岡村賢孝、渡邊貴信、有田修平、趙秀麗、山下琢矢、古屋剛、森久美子、井上雅己、金崎聡一郎、前田祐香

大阪大学大学院薬学研究科

八木清仁、渡利彰浩、吉田孟史、山本芙美、鈴木英彦



Figure 1 Preparation of CAR-BV.

Sf9 cells were infected with CAR-BV or wild type BV(WT-BV). After 72h, BVs in the supernatants were purified and detected by Western blotting with anti-CXADR Ab.

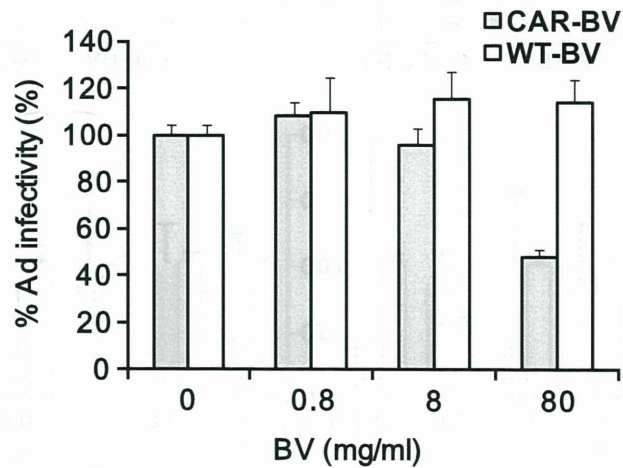


Figure 2 Enrichment of phages with affinity to claudin-1-BV.

Claudin-1-BV coated on immunotubes were incubated with the scFv phage library at 2.5×10^5 CFU (1st input). The phages bound to claudin-1-BV were recovered (1st output). The claudin-1-BV binding phages were subjected to two additional cycles of the incubation and wash step, resulting in 2nd, 3rd output phages. The ratio of output phages to input phages titer was calculated.

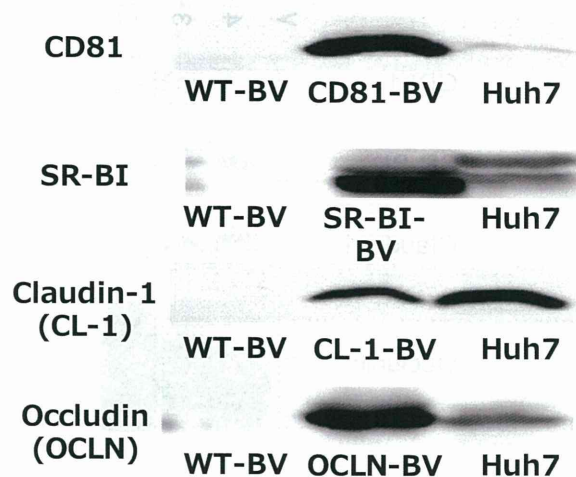


Figure 3 HCV receptor –expressing BVs.

BVs were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting. BV and Huh7 cells were used as a negative and positive control, respectively.

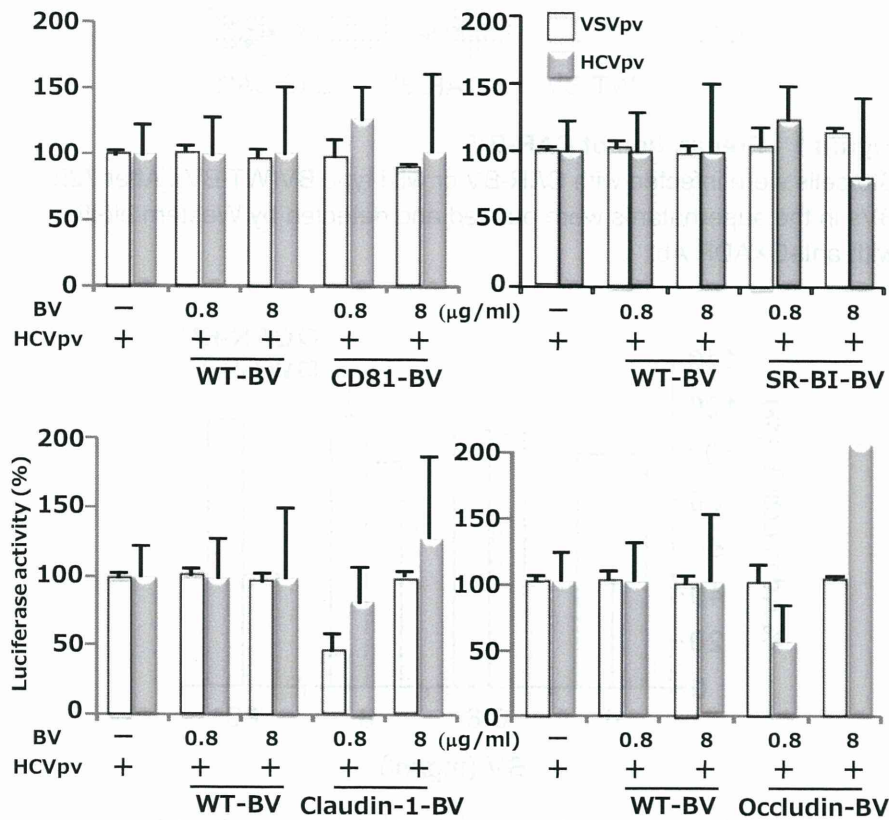


Figure 4 Effect of HCV receptors-expressing BVs on infection of HCVpv to Huh7 cells.

After 2 h of incubation of BVs and HCVpv, Huh7 cells were treated with the mixture of BVs and HCVpv for 24 h. The cells were lysed, and the luciferase activity was measured. Data are means \pm SD (n=3).

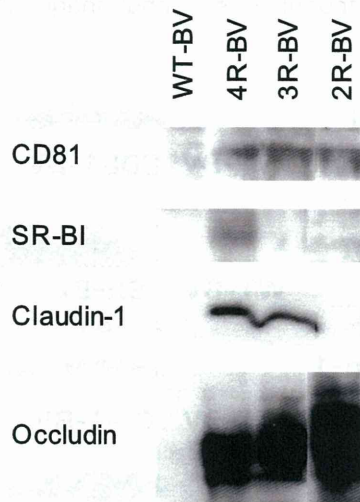


Figure 5 HCV receptor –expressing BVs.

BVs were subjected to SDS-PAGE followed by western blotting. WT-BV, wild type-BV; 4R-BV, CD81, SR-BI, claudin-1 and occludin-expressing BV; 3R-BV, CD81, claudin-1 and occludin-expressing BV; 2R-BV, CD81 and occludin-expressing BV.

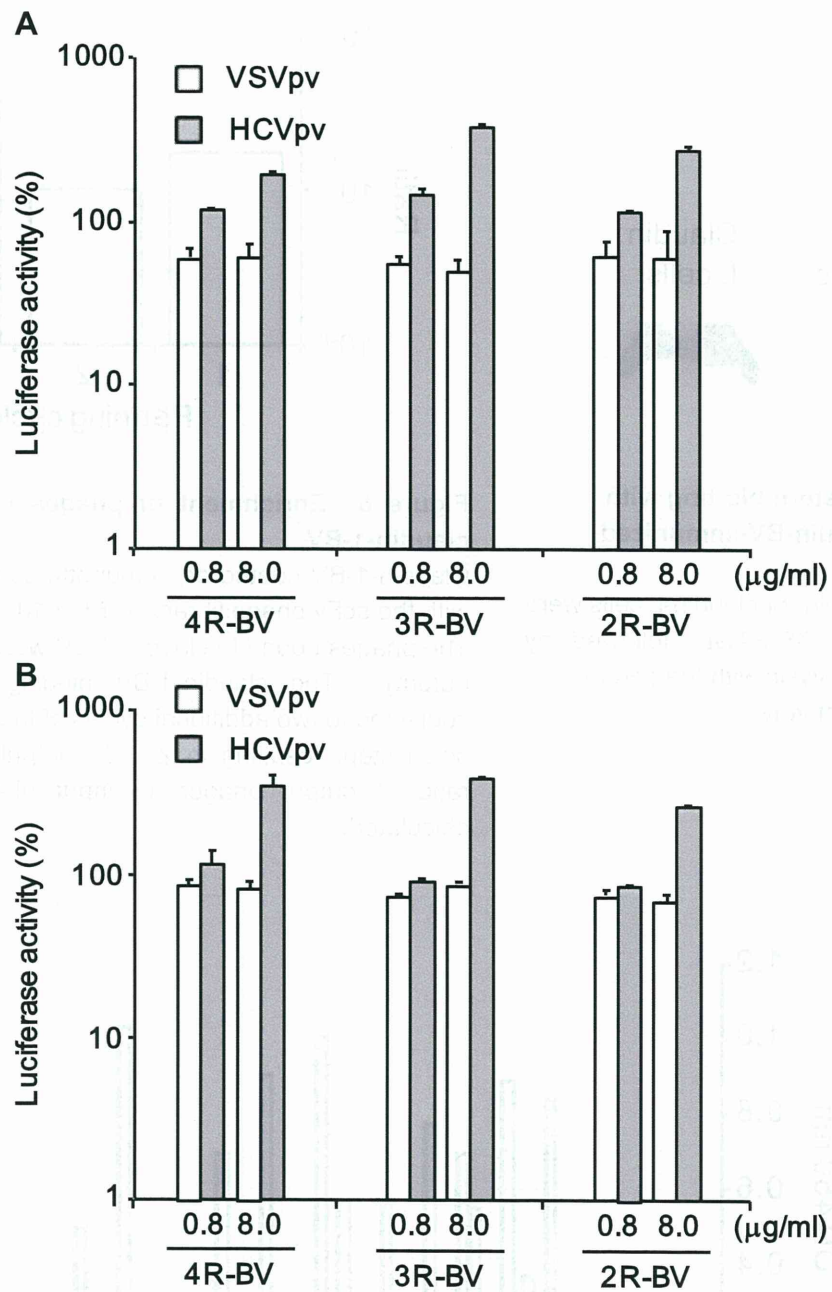


Figure 6 Effects of HCV receptors-expressing BVs on infection of HCVpv to Huh7 cells. After 30 min incubation of BVs with VSVpv or HCVpv at 37 °C (A) and 4°C (B), Huh7 cells were treated with the mixture of BVs and HCVpv for 24 h. The cells were lysed, and the luciferase activity was measured. Data are means \pm SD (n = 3).

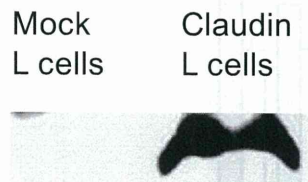


Figure 7 Western blotting with serum of claudin-BV-immunized mice .

The lysate of wild- or claudin-L cells were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis with the serum control, respectively.

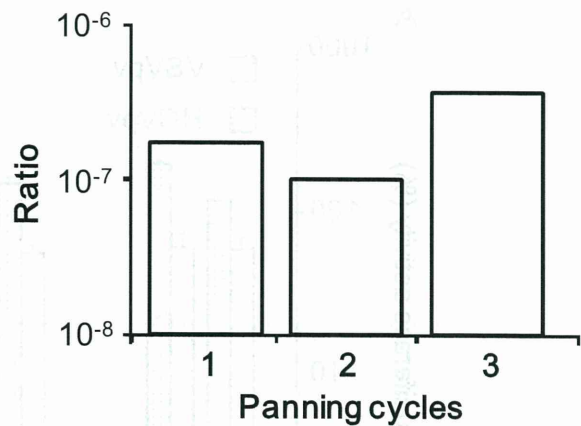


Figure 8 Enrichment of phages with affinity to claudin-1-BV.

Claudin-1-BV coated on immunotubes were incubated with the scFv phage library at 2.5×10^5 CFU (1st input). The phages bound to claudin-1-BV were recovered (1st output). The claudin-1-BV binding phages were subjected to two additional cycles of the incubation and wash step, resulting in 2nd, 3rd output phages. The ratio of output phages to input phages titer was calculated.

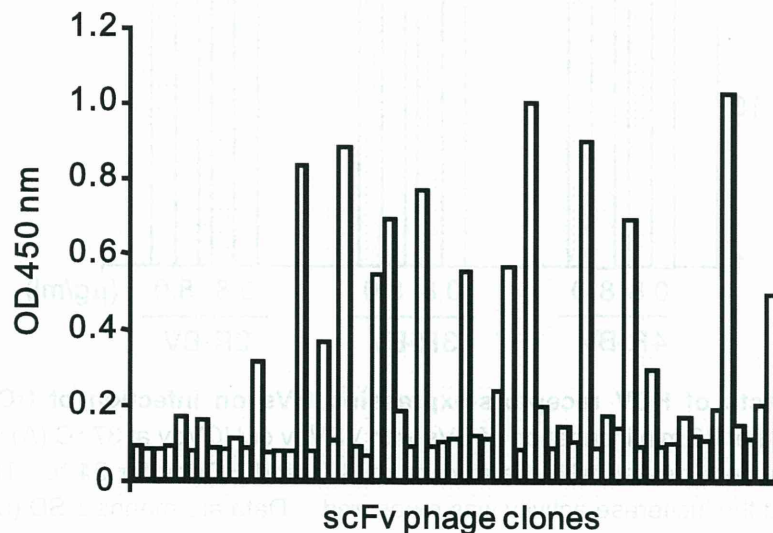


Figure 9 Monoclonal analysis of scFv phages.

Claudin-1-BV-bound phage clones were isolated from the 1st output phages, and the interaction of the monoclonal phage with CL1-BV was examined by ELISA with HRP-anti-M13 Ab.

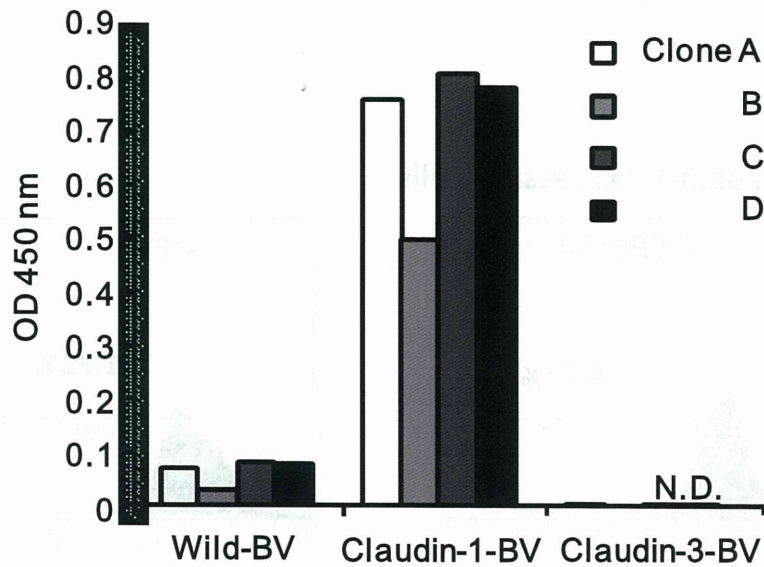


Figure 10 Interaction of scFv-phage clones with BV.

Immunoplates were coated with the wild-BV, claudin-1-BV or claudin-3-BV, and each phage clones were added to the BV-coated immunoplates. Clones bound

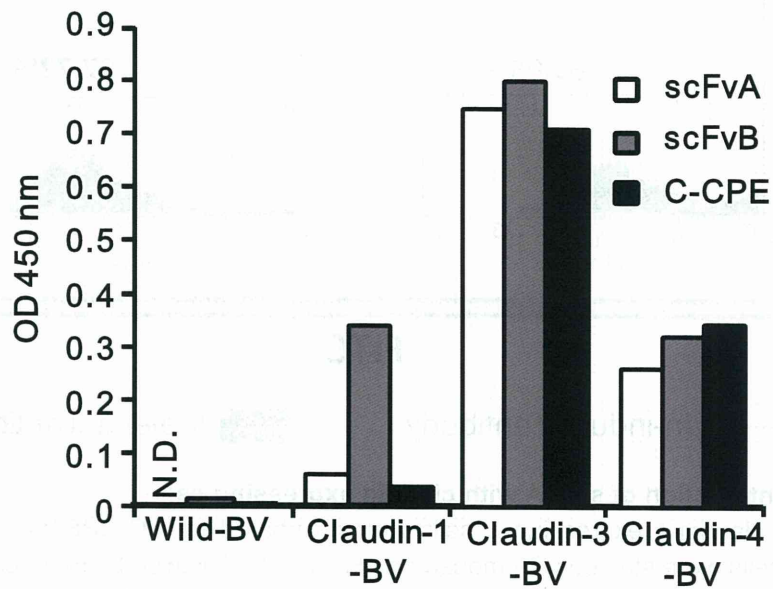


Figure 11 Interaction of scFvA and B with CLs-BV.

Immunoplates were coated with the wild-BV, claudin-1-BV, claudin-3-BV or claudin-4-BV, and scFvs or C-CPE were added to the BV-coated immunoplates. ScFv bound to CLs-BV was detected by HRP-labeled secondary Ab. N.D.: not detected. C-CPE is a binder to claudin-3 and -4.

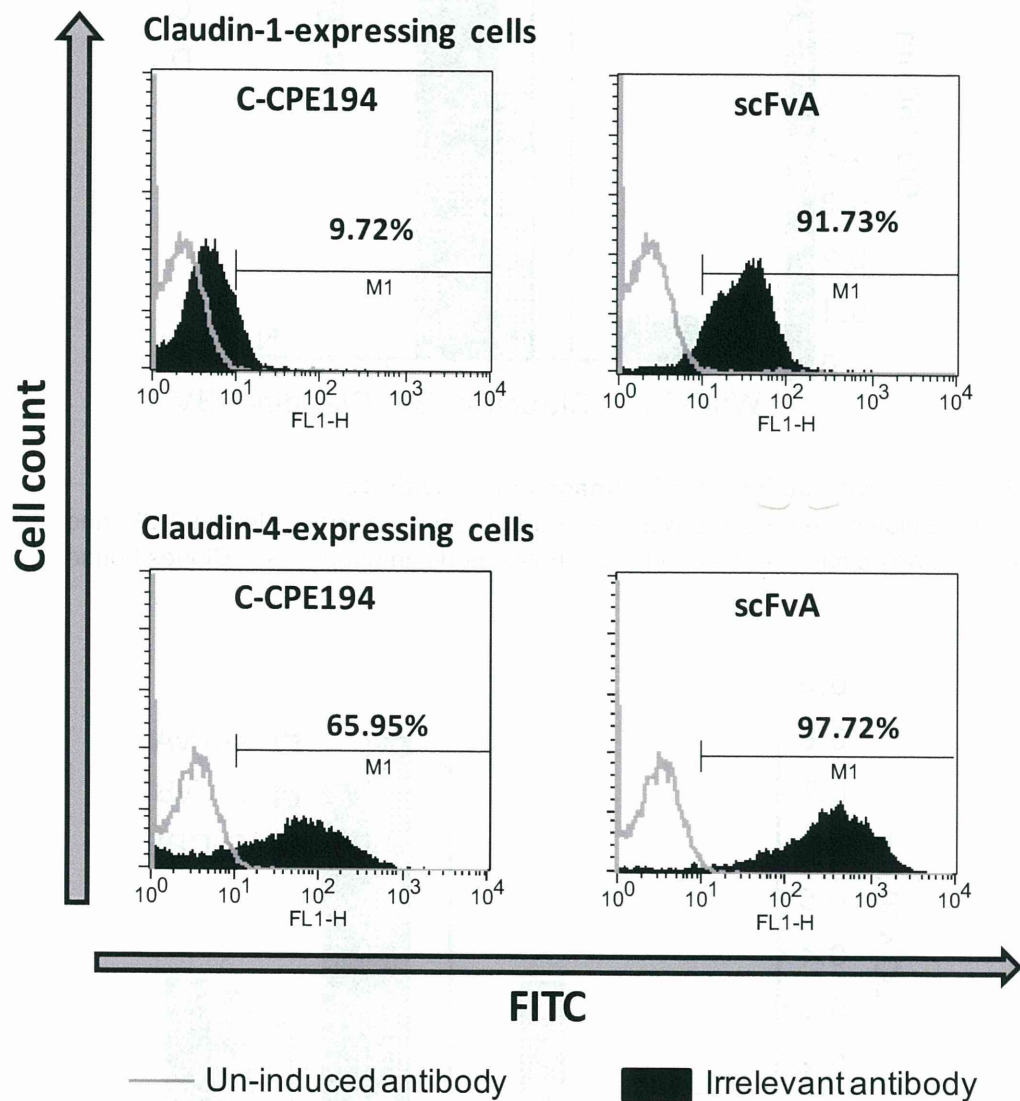


Figure 12 Interaction of scFvA with claudin expressing cells. Claudin-1 or claudin-4 expressing L cells were incubated with C-CPE194 or scFvA. The treated cells were stained with mouse anti-His-tag Ab followed by FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). The treated cells were subjected to FACS analysis.

Table 1 Sequence of scFv clones randomly picked up from the library

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	(G4S)3
Clone 1	DIQMTQSQKFMS TSVGDRVSVTC	xxxxxxxxxxxxx	WYQKPKG QSPKTVIY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFTL TISNVQSEDLADYFC	xxxxxxx	FGAGTKLELKR	GGGSGGGG SGGGGS
Clone 2	DVLTQSPASLA VSLGQRATIAC	xxxxxxxxxxxxx xxxxxx	WYQKPKG QPPKLLIY	xxxxxxx	GVPARFSGSGSRTDFTL TIDPVEADDAATYYC	xxxxxxx	FGAGTKLEIKR	GGGSGGGG SGGGGS
Clone 3	DIVMTQSHKFMS TSVGDRVRITC	xxxxxxxxxxxxx	WYHQKPKG QSPKLLIY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFTF TISVQAEDLAVYYC	xxxxxxx	FGAGTKLELKR	GGGSGGGG SGGGGS
Clone 4	DIVLSQSHKFMST SVGDRVSVTC	xxxxxxxxxxxxx	WYQKPKGQ SPKALVY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFTL TISNVQSEDLAEYFC	xxxxxxx	FGAGTKLELKR	GGGSGGGG SGGGGS
Clone 5	DIVMTQSQKFMS TSVGDRVSITC	xxxxxxxxxxxxx	WYQKPKG QSPKALIY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFTL TISNVQSEDLADYFC	xxxxxxx	FGAGTKLEIKR	GGGSGGGG SGGGGS

VH

Clone 1	QVQLQSGAELVKPG ASVKMSCKASGYTFT	xxxxx	WVKQRPQ QGLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	KATLTVDTSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCAR	xxxxxxxxxxx	WGQGTTLVSS
Clone 2	QVHVKGSGPELVKPG ASVKLSCKASGYTFR	xxxxx	WVKQRTG QGLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	KATLTADKSSSTAYMEL RSLTSEDSAVYYCAR	xxxxxxxxxxx	WGTGTTLVSS
Clone 3	EVQLQSGPELVKPG ASVKMSGRASGYTFT	xxxxx	WVKQRPQ QGLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	KATLTVDTSSSTAYMEL HRLTSEDSAVYFCGG	xxxxx	WQGQTT LQSSS
Clone 4	DVHRMESAELVKPG ASVKISCKASGYAFS	xxxxx	WVKQRPQ KGLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	KATLTADKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCAR	xxxxxx xxxxxx	WQGQTS VTVSS
Clone 5	QVQLQESGPELVKPG ASVKISCKASGYAFS	xxxxx	WVKQRPQK LEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	KATLTADKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCAR	xxxxxx xxxxxx	WQGQTS VTVSA

Table 2 Sequence of scFv clones bound to claudin-1-BV

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	(G4S)3
Clone A C D	DIQMTQSQKFMS TSVGDRVSVTC	xxxxx xxxx	WYQKPKG QSPKALIY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDF TLTISNVQSEDLAEYFC	xxxxxxx	FGAGTKLELKR	GGGSGGGG SGGGGS
Clone B	DIVITQSHKFMST SVGDRVSITC	KASQDV GTAVA	WYQKPKG QSPKLLIY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDF LTISNVQSEDLADYFC	xxxxxxxxxxx	FGAGTKLEVKR	GGGSGGGG SGGGGS

VH

Clone A C D	QVQLQQPGTELKPG ASVKMSCKASGYTFS	xxxxx	WVKQRPQ QGLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxx	KATLTVDTASSTAYMQ LSRLTSEDSAVYYCAR	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	WGQGTTLQSSS
Clone B	DVQLVESGAELAKPG ASVKLSCKASGYTFT	xxxxx	WVKQRPQ QGLEWIG	xxxxxxx xxxxxxx	KATLTVDTSSNTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCAR	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	WGQGTTLQSSS

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
	該当事項なし						

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
Abe Y	Development of novel DDS technologies for optimized protein therapy by creating functional mutant proteins with antagonistic activity.	Yakugaku Zasshi	129(8)	933-9	2009
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 Tsutsumi Y	Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs.	Biochem Biophys Res Commun	388(4)	667-71	2009
Kayamuro H Abe Y Yoshioka Y Katayama K Yoshida T Yamashita K Yoshikawa T Hiroi T Itoh N Kawai Y Kamada H Nagano K Tsunoda S Tsutsumi Y	The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses	Biomaterials	30(29)	5869-76	2009

Matsuhisa K Kondoh M Takahashi A Yagi K	Tight junction modulator and drug delivery.	Expert Opin Drug Deliv	6(5)	509-15	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(4)	918-26	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	532-7	2009
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 <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin.	Eur J Pharm Biopharm	75(2)	213-7	2010
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 Tsutsumi Y	Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology	Pharmazie	65	93-96	2010
Shibata H Abe Y Yoshioka Y Nomura T Sato M Kayamuro H Kawara T Arita S Furuya T Nagano K Yoshikawa T Kamada H Tsunoda S Tsutsumi Y	Generation of mouse macrophages expressing membrane-bound TNF variants with selectivity for TNFR1- or TNFR2	Cytokine	50	75-83	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	<i>Biomaterials</i>	32	62-169	2011
Suzuki H Kakutani H Kondoh M Watari A Yagi K	The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin	<i>Pharmazie</i>	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	<i>Biol Pharm Bull</i>	33	983-987	2010
Kakutani H Kondoh M Fukasaka M Suzuki H Hamakubo T Yagi K	Mucosal vaccination using claudin-4 targeting	<i>Biomaterials</i>	31	5463-547 1	2010
Yagi K Kawase M Isoda K Kondoh M	Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function	<i>YAKUGAKU ZASSHI,</i>	130	537-543	2010
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	<i>Biochem Pharmacol</i>	79	1437-144 4	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	<i>J Control Rel</i>	142	431-437	2010
Saeki R Kondoh M Uchida H Yagi K	Potency of claudin-targeting as antitumor therapy	<i>Mol Cell Pharmacol</i>	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	<i>J Pharmacol Exp Ther</i>	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	<i>PLoS ONE</i>	6	e16611	2011
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	<i>Biomaterials</i>	32	5498- 5504	2011
Isoda K Hasezaki T Kondoh M Tsutsumi Y Yagi K	Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury	<i>Pharmazie</i>	66	278-281	2011
Hasezaki T Isoda K Kondoh M Tsutsumi Y Yagi K	Hepatotoxicity of silica nanoparticles with a diameter of 100 nm	<i>Pharmazie</i>	66	698-703	2011

Yoshida T Kondoh M Ojima M Mizuguchi H Yamagishi Y Sakamoto N Yagi K	Adenovirus vector-mediated assay system for Hepatitis C virus replication	<i>Nucleic Acid Res</i>	39	E64	2011
Yoshida T Takayama K Kondoh M Sakurai F Tani H Sakamoto N Matsuura Y Mizuguchi H Yagi K	Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	416	119-124	2011
Li X Kondoh M Watari A Hasezaki T Isoda K Tsutsumi Y Yagi K	Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice.	<i>Pharmazie</i>	66	282-286	2011
Takahashi A Kondoh M Suzuki H Yagi K	Claudin as a target for drug development	<i>Curr Med Chem</i>	18	1861- 1865	2011
Yoshida T Kondoh M Yagi K	Promising targets for anti-hepatitis C virus agents	<i>Curr Med Chem</i>	18	1239- 1244	2011
Kondoh M Takahashi A Yagi K	Spiral progression in the development of absorption enhancers based on the biology of tight junctions	<i>Adv Drug Deliv Rev</i>	64	515-522	2012
Sakurai F Furukawa N Higuchi M Okamoto S Ono K Yoshida T Kondoh M Yagi K Sakamoto N Katayama K Mizuguchi H	Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a	<i>Virus Res</i>	165	214-218	2012

タンパク療法の最適化に向けた新規タンパク性アンタゴニストの創製と DDS への展開

阿部 康弘

Development of Novel DDS Technologies for Optimized Protein Therapy
by Creating Functional Mutant Proteins with Antagonistic Activity

Yasuhiro ABE

Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation,
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

(Received April 8, 2009)

In the post-genomic era, cytokine or antibody therapy has received attention for advanced drug therapies. Indeed, attempts are being made to develop a wide variety of therapeutic proteins for diseases including cancer, hepatitis and autoimmune conditions. Unfortunately, however, the utilization of bioactive proteins in clinical practice is often limited because of their inherent instability and pleiotropic actions *in vivo*. Our laboratory aims to overcome two major problems, details of which will be addressed in separate sections to follow. (i) Development of a powerful system to rapidly create functional mutant proteins (muteins) with enhanced receptor affinity and receptor specificity using a phage display technique (biological DDS). (ii) Establishment of a novel polymer-conjugation system to dramatically improve *in vivo* stability and selectivity of bioactive proteins (polymeric DDS). We are currently attempting to combine both approaches to create a protein-drug innovation system to further promote pharmaco-proteomic-based drug development. In this review, we will describe DDS-based technology for creating functional mutants for advanced medical applications, using tumor necrosis factor-alpha (TNF) as an example.

Key words—phage display system; tumor necrosis factor-alpha; bioconjugation

1. はじめに

近年の疾患プロテオミクスの進展に伴う国内外の研究から、様々な疾患の発症や悪化に関与するタンパク質（創薬ターゲット）や、逆に病態の治癒に係わるタンパク質（医薬品シーズ）が同定され、¹⁾ これらを医薬品開発へ有効活用しようとするタンパク療法の確立が待望されている。しかし、過去の事例からも明らかのように、タンパク質は一般に、体内安定性に極めて乏しいため、臨床応用の際には大量頻回投与を余儀なくされ、往々にして重篤な副作用を招いてしまう。なかでもサイトカインなどは、多彩な細胞上の複数種類のレセプターを介して、多様な *in vivo* 生理活性を示すため、目的とする治療作用のみならず副作用の原因となる他の作用までも

同時に発揮してしまう。²⁻⁴⁾ そのため、タンパク質の臨床応用は著しく制限されており、医薬品化に成功した例は極めて少ない。したがって、疾患プロテオミクス情報などを有効活用したプロテオーム創薬を推進し、有効かつ安全なタンパク療法を確立していくためには、これらタンパク質固有の問題点を克服しうる創薬テクノロジー、すなわちタンパク療法の最適化を目指した Drug Delivery System (DDS) の確立が、依然として必須となっている。本観点から筆者らは、1) レセプター親和性・特異性等が高く医薬価値に優れた機能性人工タンパク質を迅速創製できるタンパク質分子進化戦略（生物学的 DDS）の構築、2) タンパク質の生体内安定性を向上させ、かつ目的治療作用の選択的発現能を付与できる高分子バイオコンジュゲーション法（高分子化学的 DDS）の確立に関する研究を推進している。本稿では、上述した 1)、2) を融合させた DDS 基盤テクノロジーについて、自己免疫疾患治療薬の創薬ターゲットとして注目されている腫瘍壊死因子

御医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト
(〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8)
e-mail: yasuhiro@nibio.go.jp

本総説は、平成 20 年度日本薬学会近畿支部奨励賞（医療系薬学）の受賞を記念して記述したものである。

(Tumor necrosis factor- α ; TNF) に対する分子標的タンパク医薬の創出を 1 例に概説する。

2. 抗 TNF 阻害薬の問題点

慢性関節リウマチや多発性硬化症等の自己免疫疾患は、いまだ克服すべき難病の 1 つとして広く認識されている。そのため、自己免疫疾患を標的とした創薬プロテオミクス研究が盛んに行われており、広範な炎症の惹起・悪化における Key molecule の 1 つとして、TNF が創薬ターゲットとなっている。⁵⁻⁷⁾ 一方で TNF は、発がんや種々感染症に対する生体防御活性の中心を担っていることも明らかとなっているが、病態（炎症）の発症・悪化と生体防御活性の発揮とのバランスや 2 種類の異なるレセプター（TNFR1 及び TNFR2）を介した機能の相違等は十分に理解されていない。

現在、慢性関節リウマチに対する特効薬として、TNF に対する中和抗体や可溶性 TNF レセプターが臨床に供されるようになり、患者の QOL を格段に向上させる等、切れ味鋭い治療成績を発揮している。^{8,9)} しかし上述のように、TNF は本来、宿主の生体防御機構に重要な役割を担っているため、これら TNF 阻害薬の使用は、結核等の感染症や発がんに対する宿主の抵抗性を減弱させてしまうため、臨床現場における大きな懸念事項となっている。^{10,11)} また自己免疫疾患の中でも、多発性硬化症では、逆に病態悪化が認められたことから、¹²⁾ TNF 阻害薬の使用は禁忌となっており、これら問題点を克服し得る新たな抗 TNF 治療戦略の確立が求められている。

一方で動物モデルを使った検討から、可溶性 TNF の TNFR1 を介した過剰な活性発現が炎症反応の惹起・悪化に、可溶性/膜結合型 TNF の TNFR2 を介した活性発現がウイルス感染防御や多発性硬化症の抑制に関与していることが明らかとなりつつある。¹³⁻¹⁵⁾ これは、可溶性 TNF の TNFR1 を介した活性発現を選択的に阻害することができれば、慢性関節リウマチのみならず、既存の TNF 阻害薬では適用外であった多発性硬化症等の自己免疫疾患にも安全かつ有効な新規治療戦略を提示できるものと期待される。

以上の観点から、近年、抗体医薬品の進展に伴い、特定分子をターゲットにする治療戦略として、TNF レセプター中和抗体が、炎症性疾患に対する

有効な治療薬に成り得るものとして、その作製が試みられてきた。しかし、各 TNF レセプター中和抗体が TNF のような作用、すなわちアゴニスト作用を発現する可能性があることが報告され、¹⁶⁾ 上記の疾患モデルにおいて効果のある中和抗体の作製については報告されていない。したがって、TNFR1 に選択的な抗体とは機能的・性状的に異なるタンパク性アンタゴニストが作製できたなら、上述した副作用を克服できる可能性があるだけでなく、これまで TNF 阻害剤を適応できなかった疾患の治療へ適応可能であり、様々な炎症性疾患に対する画期的な治療戦略を確立できるものと期待される。そこで次項では、後述するファージ表面提示法を駆使することで、TNFR1 指向性を有したタンパク性アンタゴニスト（機能性人工 TNF）の探索・創出を試みた。

3. ファージ表面提示法を用いた生物学的 DDS

タンパク療法の最適化に向け、従来から産官学の多くのバイオ研究機関が、特定レセプターへの親和性や選択性に優れた機能性人工タンパク質などを創製するため、Kunkel 法といった点突然変異法を用いた構造変異タンパク質（アミノ酸置換体）の作製を精力的に試みている。¹⁷⁻¹⁹⁾ しかし点突然変異法では、まず構造変異タンパク質の立体構造や機能をシミュレーションし、トライ・アンド・エラーで生理活性タンパク質の構成アミノ酸を 1 つずつ別の特定アミノ酸に改変することにより、個々の構造変異タンパク質を作製せねばならない。そのうえで目的とする機能性人工タンパク質を探索・同定するため、作製した構造変異タンパク質の諸機能を個別に評価する必要がある。そのため従来法では、時間ばかりが消費され、かつ作製し得る構造変異タンパク質の多様性（種類）にも限界があるなど、期待通りの成果は得られていない。

この点、筆者らはファージ表面提示法を独自に改良することにより 10^8 (1 億) 種類以上もの多様性を有した構造変異タンパク質（アミノ酸置換体）を一挙に Combinatorial Biosynthesis し、この構造変異体ライブラリの中から、レセプター親和性（選択性/特異性）や体内安定性、生物活性などを向上あるいは任意に制御した「医薬価値に優れた機能性人工タンパク質」を迅速（2 週間以内）かつ効率よく同定できる基盤テクノロジーを確立してきた（Fig. 1）。これまでに筆者らは、この独自のテクノロジー