

201125044A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

移植肝へのC型肝炎ウイルス再感染阻害法の確立
に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成24（2012）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

移植肝への C 型肝炎ウイルス再感染阻害法の確立
に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
移植肝への C 型肝炎ウイルス再感染阻害法の確立 に関する研究	----- 1
渡利 彰浩	
II. 分担研究報告	
scFv 提示ファージライブラリの構築 に関する研究	----- 29
角田 慎一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 34
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 36

「移植肝へのC型肝炎ウイルス再感染阻害法の確立」

研究代表者 渡利 彰浩 大阪大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨

我が国において年間3万5千人が肝臓により命を落としているなかで、肝移植は肝臓患者に対して臨床的意義が極めて大きな治療法となっている。しかしながら、肝臓患者の80~90%はC型肝炎ウイルス(HCV)陽性であり、肝移植治療を受けた肝臓患者の99%で移植片に対するHCVの再感染が観察されている。従って、移植片に対するHCV再感染制御法の開発は、肝臓治療における最重要課題の一つとなっている。最近、claudin(CL)-1がHCVの感染受容体であること、CL-1を標的としたHCVの感染阻害が報告されたことを期に、CL-1を標的としたHCV感染阻害戦略が提唱された。

これらの背景を踏まえ、本研究は、独自のclaudin(CL)binder創製技術を有効活用し、現在HCV感染阻害効果が実証されているCL-1binderを創製することで、移植片に対するC型肝炎ウイルスの感染阻害法の開発を目的とする。そのため、当研究グループが有する出芽バキュロウイルス(BV)を用いたCL蛋白質発現技術とCL欠損マウスを融合したCLbinder創製システムを有効活用し、組織浸透性に優れ、製造コストの低いCL-1結合性一本鎖抗体(scFv)の創製を試みた。

CL-1結合性scFvを創製するため、本年度は、(1)scFvライブラリの作製およびCL-1binderスクリーニングの際に用いるhCL提示バキュロウイルス(hCL-1, 2, 4, 5-BV)を作製した。また、CL-1binderのCL結合特異性を確認する際に用いる4種のCL発現細胞(HT1080/hCL1, 2, 4, 5)を作製した。(2)CL遺伝子欠損マウスを利用することにより、抗原性が低いCLに対する抗体産生誘導に成功した。(3)(2)において抗体産生誘導を行ったマウスから回収した脾臓をもとに、ファージディスプレイscFvライブラリを構築した。(4)CL-1結合性scFv取得のためのスクリーニング条件の検討を行った。本年度の成果を踏まえ、CL-1binderのスクリーニング条件をもとに、作製したscFvライブラリからCL-1結合性scFvの取得を目指す予定である。

研究分担者

角田慎一 独立行政法人医薬基盤研究所
プロジェクトリーダー

A. 研究目的

現在、本邦では200万人、世界においては約2億人ものC型肝炎ウイルス(HCV)感染者が存在し、世界規模で見ると年間200~300万人ずつ感染者が増加している。C型肝炎を発症したほとんどの感染者において慢性化が認められ、その後、肝硬変、肝臓癌へと進行することが多い。現在までにC型肝炎治療薬と

して、PEG化インターフェロンとリバビリンの併用療法が最も効果の期待できるものとして行われているが、その奏効率は50%にとどまっているのが現状である。また、肝臓癌まで進行した患者に対する根本的な治療は困難であり、肝移植が残された臨床的意義のある治療法となっている。しかしながら、C型肝炎患者では移植肝に対するHCVの再感染が不可避であり、再感染後に高い確率で慢性肝炎に移行し、5年以内に10~30%の患者で肝硬変が認められている。さらに、肝硬変発症後1年以内に40%の患者で非代償性肝硬変へと進展している。また、肝移植患者では、

ウイルス量が多く、ステロイドや免疫抑制剤を使用していることから、インターフェロン療法の奏効率が低下していることも問題となっている。このような現状から、移植肝に対するHCVの再感染阻害法の開発が、C型肝炎治療における重要課題の一つとなっているものの、HCV感染阻害法の開発は立ち遅れているのが現状である。

HCVの感染宿主細胞への侵入には、claudin (CL)-1、CD81、Scavenger receptor class B type I (SR-BI)、occludinが感染受容体として機能していることが報告され、宿主細胞への感染機構が明らかになりつつある。最近、抗CL-1抗体によるHCVの感染阻害効果が報告され、CL-1を標的としたHCV感染阻害戦略が提唱された。この報告から、CL-1アンタゴニストを利用したHCV感染阻害法の確立が期待されている。しかしながら、CLは疎水性の強い膜蛋白質であるため、リコンビナント蛋白質を精製することが極めて困難であり、また抗原性が低いことから機能的なCL-1アンタゴニストの創製は遅々として進展していない。

近年、出芽バキュロウイルス(BV)が目的膜蛋白質をウイルス膜上に立体構造・機能を保持したまま高効率に提示可能であることを東大先端研の浜窪隆雄博士らが見出した。BVを用いた本方法では、精製が困難である膜蛋白質の発現が可能であり、実際に一部のCLファミリーを発現させたBVの作製に成功している。そこで当研究グループは、CL-1アンタゴニスト創製における問題点を克服するため、BVを用いた膜蛋白質発現技術と、CLの抵抗抗原性を回避できるCL欠損マウスの利用とを融合することで、迅速かつ簡便にCL binderを創製するシステムを構築した。これまで、CL-3遺伝子欠損マウスにCL-3提示BVを免疫することで、CL-3 binderの取得に成功している。さらに興味深いことに、CL-3免疫マウスの脾臓回収時期を工夫することで、抗原として用いたCL-3以外のCLメンバーに対するbinderが取得できることも確認している。そこで、本研究は当研究グループが独自に開発したCL binder創製システムを有効活用することで、HCV感染阻害活性を有するdruggable

claudin-1 binderの創製を目的とする。今回、創製を目指すCL1 binderとして、組織浸透性やコストパフォーマンス等に優れた、CL-1結合性一本鎖抗体の開発を試みる。本阻害法の開発は、肝移植患者等の健康寿命の延伸といった社会的側面のみならず、医療費の抑制、バイオ製薬メーカーの育成などの厚生労働行政の課題解決に資するものである。

B. 研究方法

B. 1 hCL1, 2, 4, 5-BV の作製

B. 1. 1 pFastBac-hCL1, 2, 4, 5 の作製

Human claudin-1 (hCL1) cDNA フラグメントは、pEAK-hclaudin-1 をテンプレートとしてPCR法により増幅した。pEAK-hclaudin-1 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μ l、2.5 mM MgSO₄ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 5 μ l、10 μ M primers 3 μ l、滅菌精製水 30 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 1 μ l を混合しPCRを行った。Caludin-1 クローニング用のプライマーは、Forward primer (5'-gctctagaatggattacaaggatgacgacgataaatggccaacgcggggctgcagctg-3')、Reverse primer (5'-cggggtagctcacacgtagctttcccgtggaaggtgcagg-3')を用いた。PCRの条件は、94°C 2 min の後、94°C 30 sec、64°C 30 sec、68°C 1 min を 32 サイクル。PCR後、PCR産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素であるXbaIとKpnIにより切断した。トランスファーベクターpFastBac1のマルチクローニングサイト上にあるXbaI、KpnIサイトを制限酵素XbaI、KpnIで切断し、制限酵素で切断したPCR産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミドDNAを回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析によりpFastBac-hCL1を得た。

Human claudin-2 cDNA フラグメントは、pDNR-LIB-claudin-2 (ATCC) をテンプレートとしてKOD-plus-を用いたPCR法により増幅した。pDNR-LIB-Claudin-2 溶液 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μ l、2.5 mM MgSO₄ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 5 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 34 μ l、5 U/ μ l Takara KOD plus 1 μ l を混合しPCRを行った。

なお、Forward primer として 5'-ggactagtagtgccctctcttg gcctccaac-3' を、Reverse primer として 5'-cggggtagct cacacataccctgtcaggctgtag-3' を用いた。PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 30 sec, 55°C 30 sec、68°C 1 min を 35 サイクル。得られた PCR 産物を Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用い精製後、Spe I および Kpn I を用い、37°C で一晩制限酵素処理した。あらかじめ Spe I および Kpn I 処理した pFastBac1 と T4 DNA ligase (NEB) を用いて 16°C で一晩ライゲーション反応を行い、続いて Not I を用いて制限酵素処理を行った。ライゲーション産物から QIAprep [®] Spin miniprep Kit (QIAGEN) を用い、プラスミドを精製した。ライゲーション産物により大腸菌 DH5 α をトランスフォーメーションさせ、100 μ g/ml ampicillin を含む LB 培地 (LA) 培地プレートに播種し、37°C で一晩培養した。培養後、コロニーをピックアップし、LA 培地によりスモールスケールで培養し、プラスミドを精製した。インサートの確認およびシーケンス解析により pFastBac-hCL2 を得た。

Human claudin-4 (hCL4) cDNA フラグメントは pOBT-hclaudin-4 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pOBT-Claudin-4 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μ l、2.5 mM MgSO₄ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 5 μ l、10 μ M primers 3 μ l、滅菌精製水 30 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 1 μ l を混合し PCR を行った。Caludin-4 クローニング用のプライマーは、Forward primer (5'-tggatgaactgcgtggtg -3')、Reverse primer (5'-ggttgtagaagtgcgggatg -3') を用いた。PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 30 sec、64°C 30 sec、68°C 1 min を 32 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である XhoI と NotI により切断した。トランスファーベクター pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある XhoI、NotI サイトを制限酵素 XhoI、NotI で切断し、制限酵素で切断した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析により pFastBac-hCL4 を得た。

Human claudin-5 (hCL5) cDNA フラグメントは

pEAK-hClaudin-5 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pEAK-hclaudin-5 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μ l、2.5 mM MgSO₄ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 5 μ l、10 μ M primers 3 μ l、滅菌精製水 30 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 1 μ l を混合し PCR を行った。hclaudin-5 クローニング用のプライマーは、Forward primer (5'-ataagaatgcggccgatgcatcatcatcatcatcatatg gggctccgcagcgttgagatcctg-3')、Reverse primer (5'-ccgctcagtcagacgtagttcttcttctgtcgtagtcgcc -3') を用いた。PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 30 sec、64°C 30 sec、68°C 1 min を 32 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である NotI と XhoI により切断した。トランスファーベクター pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある NotI、XhoI サイトを制限酵素 NotI、XhoI で切断し、制限酵素で切断した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析により pFastBac-hCL5 を得た。

B. 1. 2 hCL1, 2, 4, 5 発現用 bacmid DNA の作製

作製した pFastBac-hCL1, 2, 4, 5 により大腸菌 DH10Bac (Invitrogen 社) をトランスフォーメーションさせ、50 μ g/ml kanamycin, 7 μ g/ml gentamicin, 10 μ g/ml tetracycline を含み、2% X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside) 100 μ l および 50 mM IPTG 100 μ l を塗布した LB 培地プレート (IPTG, X-gal 含有 TGK plate) に播種し、37°C で 24 時間培養した。任意の白コロニーをピックアップし、アルカリプレップにて大腸菌から hCL1, 2, 4, 5 発現カセットが組み込まれた bacmid DNA (hCL1, 2, 4, 5-bacmid) を精製した。

PCR 法により目的遺伝子が挿入されていることを確認した。精製した bacmid DNA 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x LA PCR buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 3.2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 9.6 μ l、5 U/ μ l Takara LA taq 0.2 μ l を混合し PCR を行った。プライマーは Forward primer (5'-tgtaaacgacggccagt -3')、Reverse primer (5'-ggaacagctatgaccatg -3')

を用いた。PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 68°C 4 min を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動し目的遺伝子の挿入を確認した。Bacmid DNA により DH5 α をトランスフォーメーションさせ、IPTG, X-gal 含有 TGK plate で培養した。白色独立大腸菌クローンを培養し、QIAfilter™ plasmid Midi kit (QIAGEN) を用いて bacmid DNA を精製した。なお、野生型 BV (WT-BV) bacmid は青色独立大腸菌クローンから精製し、hCL1, 2, 4, 5-bacmid と同じ条件で PCR を行い組換えが起きていないことを確認した。

B. 1.3 hCL1, 2, 4, 5 発現 Budded baculovirus (hCL1, 2, 4, 5-BV) の作製

培養用 6 穴プレートに 1×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞 (Invitrogen) を播種し、室温で 1 時間静置した。静置中に tube A 液 (cellfectin (Invitrogen) 6 μ l、血清・抗生物質を含まない Sf-900 培地 (Invitrogen) 100 μ l) と tube B 液 (各種 hCL-bacmid DNA 1 μ g、血清・抗生物質を含まない Sf-900 培地 100 μ l) を用意し、tube A 液と tube B 液とをよく混和し、泡立えないようにゆっくりピペティング後、室温で 30 分間放置した。1 時間静置することで接着させた Sf9 細胞を Sf-900 培地 (血清、抗生物質なし) で洗浄後、培地を除去し、tube A 液と tube B 液との混合溶液に Sf-900 培地 (血清、抗生物質なし) 800 μ l を加え、ウェルに全量 1 ml 添加し、プレートをビニールテープで密封して 5 時間、27°C で培養した。その後、培地を除去し、血清と抗生物質を含んだ 2 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) に交換し、27°C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を 800 \times g で 10 分間遠心することで回収した (P1 ストック)。続いて、 2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに 200 ml 用意し、そこに P1 ストック 2 ml を加え、27°C で 2 日間培養した。2 日後、培養上清を 800 \times g で 10 分間遠心することで回収した (P2 ストック)。

培養用 6 穴プレートに 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10, 100, 1,000 μ l ずつ加え、27°C で 3 日間培養した (全量 2 ml)。3 日後、800 \times g で 10 分間遠心し、上清を回収した。沈

殿物 (細胞) には protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-X を含む PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) で懸濁後、超音波処理で破碎し細胞可溶化液とした。培養上清および細胞可溶化液を用いて、Western blot 法にて目的とする蛋白質の発現を確認した。

4×10^6 cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに 100 ml 用意し、血清と抗生物質を含む 50 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) と、発現確認のできた P2 ストックを 50 ml 加え、27°C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を 800 \times g で 10 分間遠心することで回収した。回収した培養上清を 18,400 \times g で 25 分間さらに遠心した。得られた沈殿を PBS で懸濁後、800 \times g で 10 分間遠心し、上清をさらに 18,400 \times g で 25 分間遠心した。得られた沈殿を protease inhibitor を含む TBS 200 μ l で懸濁し、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用いて蛋白質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

B. 1.4 各種 hCL 発現 BV における hCL 発現確認

各種 hCL 発現 BV のウイルス溶解液を作製し、hCL 発現確認のためのウエスタンブロット法を行うため、蛋白質量として 10 μ g を供し 15% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5% スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回 洗浄し、T-TBS により 1/2000 に希釈した一次抗体: Rabbit anti claudin-1 (ZYMED)、rabbit anti claudin-2 (ZYMED)、mouse anti claudin-4 (ZYMED)、もしくは rabbit anti claudin-5 (ZYMED) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回 洗浄し、T-TBS により 1/3000 に希釈した二次抗体:

Goat anti-rabbit IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) もしくは Goat anti-rabbit IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA)を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA)により、それぞれ claudin-1, 2, 4, 5 蛋白質の検出を行った。

B. 2 hCL1, 2, 4, 5 発現細胞の作製

B. 2. 1 pcDNA3.1 (-) -hCL1, 2, 4, 5 の作製

pcDNA3.1 (-) -hCL1 を作製するにあたり、hCL1 の cDNA フラグメントとして pFastBac-hCL1 を用い、pFastBac-hCL1 をテンプレートとして PCR 法により hCL1 領域を増幅した。pFastBac-hCL1 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 2 μ l、2.5 mM MgSO₄ 1 μ l、2.5 mM dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1.6 μ l、滅菌精製水 9.9 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 0.4 μ l を混合し PCR を行った。hCaludin-1 クローニング用のプライマーは、Forward primer (5' -ctagtagcatggccaacgcgggctgca-3')、Reverse primer (5' -aaacttaagtcacacgtagtctttcccgtgg-3') を用いた。PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 15 sec、61°C 30 sec、68°C 1 min を 32 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である Nhe I と Afl II により切断した。トランスファーベクター-pcDNA3.1 (-) のマルチクローニングサイト上にある Nhe I と Afl II サイトを制限酵素 Nhe I、Afl II で切断し、制限酵素で切断した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析により pcDNA3.1 (-) -hCL1 を得た。

pcDNA3.1 (-) -hCL2 を作製するにあたり、hCL2

の cDNA フラグメントとして pFastBac-hCL2 を用い、pFastBac-hCL2 をテンプレートとして PCR 法により hCL2 領域を増幅した。hCL2 cDNA フラグメントは pFastBac-hCL1 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pFastBac-hCL1 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 2 μ l、2.5 mM MgSO₄ 1 μ l、2.5 mM dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1.6 μ l、滅菌精製水 9.9 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 0.4 μ l を混合し PCR を行った。hCaludin-2 クローニング用のプライマーは、Forward primer (5' -ataagaattcggcgcgcaatggcctctcttggcctcca-3')、Reverse primer (5' -ggaattctcacacaccctgtcaggc -3') を用いた。PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 15 sec、61°C 30 sec、68°C 1 min を 32 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である Not I と EcoR I により切断した。トランスファーベクター-pcDNA3.1 (-) のマルチクローニングサイト上にある Not I、EcoR I サイトを制限酵素 Not I、EcoR I で切断し、制限酵素で切断した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析により pcDNA3.1 (-) -hCL2 を得た。

pcDNA3.1 (-) -hCL4 を作製するにあたり、hCL4 の cDNA フラグメントとして pFastBac-hCL4 を用い、pFastBac-hCL4 をテンプレートとして PCR 法により hCL4 領域を増幅した。pFastBac-hCL4 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 2 μ l、2.5 mM MgSO₄ 1 μ l、2.5 mM dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1.6 μ l、滅菌精製水 9.9 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 0.4 μ l を混合し PCR を行った。hCaludin-4 クローニング用のプライマーは、Forward primer 5' -gctagcatcatggcctccatgggctaca-3)、Reverse primer (5' -cccaagcttttacacgtagttgctggcag-3') を用いた。PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 15 sec、61°C 30 sec、68°C 1 min を 32 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である Nhe I と Hind III により切断した。トランスファー

ベクター-pcDNA3.1 (-) のマルチクローニングサイト上にある Nhe I と HindIII サイトを制限酵素 Nhe I、HindIII で切断し、制限酵素で切断した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析により pcDNA3.1 (-) -hCL4 を得た。

pcDNA3.1 (-) -hCL5 を作製するにあたり、hCL5 の cDNA フラグメントとして pFastBac-hCL5 を用い、pFastBac-hCL5 をテンプレートとして PCR 法により hCL5 領域を増幅した。pFastBac1-hCL5 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 2 μ l、2.5 mM MgSO₄ 1 μ l、2.5 mM dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1.6 μ l、滅菌精製水 9.9 μ l、5 U/ μ l Takara KOD-plus 0.4 μ l を混合し PCR を行った。hCL5 クローニング用のプライマーは、Forward primer (5' - ggaattcgaatggggtcgcagcgtt -3')、Reverse primer (5' - ggggtacctcagacgtattcttt -3') を用いた。PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 15 sec、61°C 30 sec、68°C 1 min を 32 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である EcoRI と Kpn I により切断した。トランスファーベクター-pcDNA3.1 (-) のマルチクローニングサイト上にある EcoRI、Kpn I サイトを制限酵素 EcoRI、Kpn I で切断し、制限酵素で切断した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、sense primer として T7 promoter primer (5' -caggaacacagctatgac-3')、anti-sense primer として T7 terminator primer (5' - gtaaatgaattttotgtatgag g-3') を用い、シーケンス解析を (株) ジーンデザインに依頼した。シーケンスマッチングしたクローンを pcDNA3.1 (-) -hCL5 として得た。

B. 2. 2 hCL1, 2, 4, 5 発現 HT1080 細胞の作製

培養用 6 穴プレートに 8×10^5 cells/well の濃度でヒト繊維芽細胞株 HT1080 細胞を播種し、37°C

5% CO₂ 環境下で 12 時間培養した。作製した pcDNA3.1 (-) -hCL1, 2, 4, 5 plasmid 2 μ g をそれぞれ Opti-MEM1 (GIBCO) 100 μ l と FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche) 4 μ l と混合し、15 min 常温静置した。HT1080 細胞の培地を交換し、上記の混合液をウェルに全量加えた。その後 100 ϕ dish に希釈し播種した。翌日に G418 二硫酸塩溶液 (nacalai tesque) が 600 μ g/ml となるように加え、5 日間、37°C 5% CO₂ 環境下で培養した。培地交換した後シングルコロニーをピックアップし、培養用 24 穴プレートに播種した。

B. 2. 3 hCL1, 2, 4, 5 発現細胞における各種 hCL 発現確認

細胞を protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-X を含む PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) で懸濁後、超音波処理で破碎し細胞可溶化液とした。培養上清および細胞可溶化液を用いて、Western blot 法にて目的とする蛋白質の発現を確認した。

蛋白質量として 20 μ g を供し 15% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5% スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回 洗浄し、T-TBS により 1/2000 に希釈した一次抗体: Rabbit anti claudin-1 (ZYMED)、rabbit anti claudin-2 (ZYMED)、mouse anti claudin-4 (ZYMED)、もしくは rabbit anti claudin-5 (ZYMED) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回 洗浄し、T-TBS により 1/5000 に希釈した二次抗体: Goat anti-rabbit IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) もしくは Goat anti-rabbit IgG HRP conjugated (Millipore,

Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA)を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA)により claudin-1, 2, 4, 5 蛋白質の検出を行った。

B. 3 抗 hCL2 抗体産生マウスの作製

B. 3.1 マウスへの hCL2-BV 免疫

hCL2-BV とアジュバントである TiterMax Gold(フナコシ)とを等量で混合し、エマルジョンを調製した。7 週齢の雄性 CL2 ノックアウトマウス(神戸大学医学系研究科古瀬幹夫博士より供与)に 2 週間 1 回、計 3 回用時調整した hCL2-BV 0.6 mg を皮下および筋肉投与し、最終免疫から 1 週間後に血液を眼底採血により回収し、 $3000 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を血清として採取し、 -80°C で保存した。

B. 3.2 ELISA 法による血清中抗 hCL2 抗体産生確認

96 well ELISA plate に $0.5 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ TBS/well の WT および hCL2-BV を 4°C で一晩静置することで固相化した。翌日、ELISA plate を PBS で 3 回洗浄し、4% Block Ace で常温 2 時間ブロッキングした。PBS で 3 回洗浄し、解凍した血清を 300, 600, 1200, 2400, 4800, 9600, 19200, 38400 倍まで 0.4% Block Ace で段階希釈し、常温 2 時間培養した。その後、T-PBS で三回洗浄し、40,000 倍希釈した HRP/anti-mouse IgG monoclonal antibody (Sigma) を $100 \mu\text{l}$ 添加し常温 1 時間培養した。T-PBS で五回洗浄した後、TMB 試薬 $100 \mu\text{l}$ を添加し、約 2 分間反応後、 $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ $100 \mu\text{l}$ を加えて反応を停止した。その後、 450 nm で吸光度を測定した。

B. 4 hCL2 免疫 scFv 提示ファージライブラリ作製用 cDNA の合成

B. 4.1 hCL2-BV 免疫マウス脾臓からの mRNA の精

製と cDNA の合成

hCL2-BV 免疫マウスをイソフルランにより麻酔し、頸椎脱臼後、脾臓を摘出した。摘出した脾臓を TRIzol reagent (Invitrogen) に溶解させ、total RNA を回収した。回収した total RNA から mRNA Purification kit (GE Health Care) を用いて mRNA を精製した。精製した mRNA $47.2 \mu\text{l}$ を利用し、SuperScript III First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用いることで cDNA を合成した。

B. 4.2 合成 cDNA における GAPDH の発現確認

B. 4.1 で合成した cDNA を用い、GPDH の発現確認を行った。cDNA 溶液 $1 \mu\text{l}$ 、 $10 \times$ PCR buffer $2.5 \mu\text{l}$ 、dNTP mix $2 \mu\text{l}$ 、 $10 \mu\text{M}$ primers $1 \mu\text{l}$ 、滅菌精製水 $18.4 \mu\text{l}$ 、 5 U/ml Takara ExTaq™ $0.1 \mu\text{l}$ を混合して RT-PCR を行った。GAPDH の発現確認用プライマー配列は、Forward; $5' \text{-tcttcaccaccatggagaag-3'}$ 、Reverse; $5' \text{-accacctggtgctcagtgtga-3'}$ とした。PCR の条件は、 94°C 5 min の後、 94°C 30 sec、 55°C 15 sec、 72°C 1 min を 20 サイクル。PCR の後、1%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を分離し、エチジウムブロマイドで DNA を染色した。

B. 5 hCL binder のスクリーニング

B. 5.1 scFv ライブラリ提示ファージの作製

scFv をコードした cDNA を組み込んだ pY03' ファージミドベクターで形質転換した TG1 のグリセロールストックを、2YTGA 培地 25 ml に $\text{OD}_{600} = 0.05\text{-}0.1$ となるように添加し、 37°C で $\text{OD}_{600} = 0.4\text{-}0.6$ となるまで培養した。次に M13K07 helper phage (Invitrogen) を $\text{OD} = 8 \times 10^8$ (cells/ml) $\times 25$ (ml) $\div 10^{11}$ (CFU/ml) となるように添加し、 37°C で 30 分間静置した。さらに、 37°C 、30 分間 250 rpm で振盪培養した後に、 $1000 \times g$ で 10 分間遠心し、ペレットを回収した。 $100 \mu\text{g/ml}$ ampicillin sodium, $50 \mu\text{g/ml}$ kanamycin を添加した 2YT (2YTAK) 培地 50 ml にペレットを懸濁し、 37°C 、250 rpm で振盪培養した。6 時間後、 $1000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、その上清を回収した後、さらに $15660 \times g$ 、15 分間の遠心分離を行なった。上清 40 ml に対

して PEG-NaCl (20% PEG6000, Wako Pure Chemicals、2.5 M NaCl) 溶液 10 ml を添加し、転倒混和後 4°C、2 時間～一晩まで静置した。次に、再び 15660 × g で 10 分間遠心分離し、沈殿したペレットを NTE buffer (0.3 M NaCl, 10mM Tris, SIGMA, 1 mM EDTA-2Na, NACALAI TESQUE) 1 ml に溶解した後、0.45 μm フィルター (Millipore) を用いて濾過し、ファージ溶液を得た。

B. 5.2 scFv ファージライブラリの FLAG resin パンニングおよび WT-BV サブトラクション

4% Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL) を 4°C で一晩作用させ固相化したエッペンに anti-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA) 100 μl を添加した。さらに NTE buffer 500 μl を添加し、1000 × g、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を三回繰り返した後、ファージ溶液 50 μl および 2% Block Ace 50 μl 混合液を添加し、常温で 1 時間転倒混和した。0.1% T-PBS 500 μl を添加し、1000 × g、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を五回繰り返した後、1 mg/ml 3 × FLAG peptide (SIGMA) 100 μl を添加し、常温で 40 分間転倒混和した。10,000 rpm、30 sec 遠心分離を行い、上清をファージ溶液として回収した。さらに 96 well ELISA plate (greiner bio-one) に 0.5 μg/well/100 μl TBS の WT-BV を 4°C で一晩静置することで固相化した。翌日、PBS で 3 回洗浄した後、4% Block Ace 200 μl を添加し、常温で 2 時間静置しブロッキングした。また、scFv ファージライブラリ 100 μl と 4% Block Ace 50 μl を混合し、4°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後の ELISA plate を PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージ溶液を 100 μl 添加し、常温で 250 rpm、2 時間振盪培養した。上清をファージ溶液として回収した。また、残りのファージ溶液 100 μl を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.4-0.6 に調整) 300 μl と混合し、37°C 1 時間静置することでファージを感染させた。その後、LAG 培地プレート 1 枚に播種し、一晩培養した。翌日 LAG 培地プレートから TG1 を、セルスクレーパーを用いて 2YTGA 培地で回収し、終濃度 10% となるようにグリセロールと混合した後、-80°C にて保存

した。

B. 5.3 scFv ファージライブラリの hCL-BV に対するパンニング

B. 5.2 において冷凍保存した TG1 グリセロールストックから、ファージ溶液を作製した。0.5 μg/well/100 μl TBS の hCL1-BV または hCL2-BV を 96 well ELISA plate に添加し、4°C で一晩静置することで固相化した。翌日、PBS で well を 3 回洗浄した後、4% Block Ace 200 μl を添加し、常温で 2 時間静置し、ブロッキングした。また、scFv ファージライブラリ 100 μl と 4% Block Ace 25 μl を混合し、4°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後の ELISA plate を PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージ溶液を 100 μl 添加し、常温で 250 rpm、2 時間振盪培養した。その後、0.1% T-PBS で 5 回洗浄し、20 mM glycine-HCl (pH 2.0) を 100 μl 添加、4°C、10 分間作用させることで hCL1-BV または hCL2-BV に結合しているファージを解離させ、上清を 1 M Tris-HCl 50 μl を加えたエッペンに回収した。さらに ELISA plate に 20 mM glycine-NaOH (pH 11.0) を 100 μl 添加し、4 °C、10 分間作用させ、上清を同じエッペンに回収し、ファージ溶液となった。ファージ溶液 200 μl を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.4-0.6 に調整) 200 μl と混合し、37°C、1 時間静置することでファージを感染させた。その後、LAG 培地プレート 2 枚に播種し一晩培養した。翌日 LAG 培地プレートから TG1 を、セルスクレーパーを用いて 2YTGA 培地で回収し、終濃度 10% となるようにグリセロールと混合した後、-80°C に保存した。さらに、冷凍保存した TG1 からファージを作製し、上記の作業を繰り返すことで 2nd、3rd パンニングを行なった。

B. 5.4 パンニングの ratio 計算

パンニングで回収したファージ溶液 (output phage) 5 μl を 10²-10⁷ 倍に 2YT 培地を用いて希釈した。同様に、パンニング操作前のファージライブラリ溶液 (input phage) を 10⁸-10¹¹ 倍に希釈した。希釈ファージ 100 μl を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.4-0.6 に調整) 300 μl とそれぞれ混合後、37 °C、1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600 μl をさらに添加し、ペトリフィルムに播種し、

37°Cで一晩培養した。翌日コロニー数を計測することで titer を算出し、パンニング ratio (output/input) を求めた。

B. 5. 5 モノクローン化 scFv ファージの作製

パンニング後のファージを感染させた TG1 グリセロールストックを希釈し、LAG 培地プレートに播種し、37°Cで一晩培養した。播種した LAG 培地プレートからコロニーを 2YTGA 培地 100 μ l を添加した 96 well plate (IWAKIGLASS) にピックアップし、37°Cで 1,000 rpm、4 時間振盪培養した。2YTGA 500 μ l を添加したディープウェル (Greiner Bio-One) に前培養した大腸菌を 10 μ l ずつ植え継ぎ、OD600 = 0.3-0.6 まで 37°Cで 1,000 rpm 培養後、M13K07 helper phage を添加した。37°C、1 時間静置した後、2000 rpm、15 分間遠心分離し、上清を除去した後、2YTAK 培地 1 ml を添加し、37°C、500 rpm で一晩振盪培養した。翌日 2,000 rpm、15 分間遠心分離した後、上清を回収し、これをモノクローン化ファージ溶液とした。なお、前培養のため 96 well plate で培養した大腸菌 TG1 のうち、植え継ぎに使用しなかった大腸菌は、終濃度 10% でグリセロールを添加し、-80°C で保存した。

B. 5. 6 scFv ファージを用いた BV ELISA

96 well ELISA plate に 0.5 μ g/50 μ l TBS/well の WT または hCL2-BV および 0.125 μ g/50 μ l 炭酸 buffer (pH9.6)/well の FLAG tag 抗体 (SIGMA) を 4°C で一晩静置することで固相化した。翌日、ELISA plate を PBS で 3 回洗浄し、4% Block Ace で常温 2 時間ブロッキングした。PBS で 3 回洗浄し、4% Block Ace を 20 μ l/well、さらに作製したモノクローン化ファージを 100 μ l/well 添加し、常温で 250 rpm、2 時間振盪培養した。その後、0.05% T-PBS で三回洗浄し、3,000 倍希釈した anti M13-HRP mAb (Invitrogen) 溶液を 100 μ l 添加し、常温で 250 rpm、1 時間振盪培養した。0.05% T-PBS で五回洗浄した後、TMB 試薬 100 μ l を添加し、約 5 分間反応後、2M H₂SO₄ 100 μ l を加えて反応を停止した。その後、450 nm で吸光度を測定した。

C. 研究結果

C. 1 各種 hCL 発現 BV の作製

hCL2 免疫ライブラリの作製、および hCL1 binder の結合特異性を確認するため、BV 膜上に hCL2 を発現させた BV (hCL2-BV) の作製を行った。まず、bacmid DNA へのトランスファーベクターである pFastBac1 の polyhedrin プロモーターの下流に、hCL2 DNA を組み込んだ pFastBac-hCL2 を作製した。作製した pFastBac-hCL2 の hCL2 領域の配列は、シーケンス解析により確認した。pFastBac を DH10Bac に導入し、相同組換えを起こさせることで、hCL2-BV 作製の bacmid DNA (hCL2-bacmid) を得た。

培養用 6 ウェルプレートに Sf9 細胞を播種し、cellfectin を用いて hCL2-Bacmid をトランスフェクションした。2 日間培養した後、培養上清に含まれる BV を回収し、回収した BV を再度 Sf9 細胞に感染させることにより、高力価の BV を得た。WT-BV と hCL2-BV を供した Western Blot 法により、hCL2-BV における hCL2 の発現解析を行った結果、hCL2 の発現が確認できた (Figure 1)。なお、ポジティブコントロールとして mCL2 発現 L (mCL2/L) 細胞を用いた。

続いて、hCL1 binder のスクリーニングのため、hCL1 発現 BV (hCL1-BV) の作製を行った。さらに、hCL1 binder の CL 結合特異性を確認するため、hCL4、hCL5 発現 BV (hCL4-BV、hCL5-BV) の作製を行った。hCL2-BV の作製と同様に、各種 hCL を組み込んだ bacmid DNA を作製し、Sf9 細胞に bacmid DNA をトランスフェクションすることにより、hCL1、4、5 発現 BV (hCL1-BV、hCL4-BV、hCL5-BV) を得た。各種 hCL 発現 BV の CL 発現確認のため Western Blot 法を行った結果、それぞれの BV において CL の発現が確認された (Figure 2, 3 and 4)。

C. 2 各種 hCL 発現 HT1080 細胞の作製

細胞膜表面上に発現している hCL1 に対する binder を取得するため、膜表面上に hCL1 を安定的に発現させた細胞株の作製を行った。まず、pcDNA3.1(-) の T7 promoter の下流に hCL1 の DNA

の挿入を行った。次に、得られた pcDNA3.1(-)-hCL1 plasmid をヒト線維芽細胞株 HT1080 にトランスフェクションし、G418 二硫酸塩溶液 (nacalai tesque) により hCL1 発現細胞のセレクションを行った。クローニングした hCL1 発現 HT1080 細胞 (HT1080/hCL1) の hCL1 発現は、Western Blot 法により確認できた (Figure 5)。

続いて、hCL1 binder のスクリーニングにおいて、CL 結合特異性を確認するために使用する、hCL2, hCL4, hCL5 発現 HT1080 (HT1080/hCL2, HT1080/hCL4, HT1080/hCL5) の作製を行った。HT1080/hCL1 の作製と同様に、pcDNA3.1(-) の T7 promoter の下流に hCL2, 4, 5 の DNA をそれぞれ挿入した。次に、得られた pcDNA3.1(-)-hCL2, 4, 5 plasmid をヒト線維芽細胞株 HT1080 にトランスフェクションし、G418 二硫酸塩溶液 (nacalai tesque) により hCL2, 4, 5 発現細胞のセレクションを行った。クローニングした各種 CL 発現 HT1080 における CL の発現を Western Blot 法により確認したところ、それぞれの CL において発現が確認された (Figure 6, 7, 8)。

C.3 CL2 KO マウスへの hCL2-BV の免疫

7 週齢の雄性 CL2 ノックアウトマウスに hCL2-BV 0.6 mg とアジュバント TiterMax Gold と等量混合し調製したエマルジョンを免疫スケジュールに従い、皮下および筋肉投与した (Figure 9A)。3 回免疫を行った後、マウスより血清を回収し、それを用いて抗体産生を確認した。ELISA による解析から、hCL2 抗体の産生が確認された (Figure 9B)。

C.4 hCL2 免疫 scFv ライブラリ作製用 cDNA の合成

抗体産生確認後のマウスの脾臓を摘出し、total RNA を抽出後、mRNA を精製した。精製した mRNA を鋳型にして cDNA を合成した。cDNA の合成を確認するため、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の発現を確認した結果、GAPDH の発現が確認できたことから、cDNA の合成に成功した。

C.5 hCL binder のスクリーニング

作製した scFv 提示ファージライブラリに hCL binder が含まれているかを確認するため、予備実験として hCL2 binder のスクリーニングを行った。作製した scFv 提示ファージライブラリの多様性を調べたところ、FLAG を提示しないファージが確認された。そこで、FLAG 未提示のファージを除去するため、1st スクリーニングを行う前に FLAG resin によるパンニングを行った。Anti-FLAG M2 Affinity Gel をエッペンに固相化して scFv ファージライブラリを添加した後、3× FLAG peptide の添加による結合競争により解離したファージを回収した。回収したファージを hCL2-BV を固相化した ELISA plate に添加した後、結合したファージを回収し、大腸菌 TG-1 に感染させ増幅した。再び調製したファージを hCL2-BV に作用させた。このサイクルを繰り返すことで各種 CL-BV に対する結合性ファージの濃縮を試みた。しかしながら、パンニングの濃縮率の推移を観察すると顕著な濃縮傾向が観察されなかった (Figure 11A)。パンニングを繰り返すことで hCL2-BV 結合性ファージが濃縮されることが期待されるが、パンニングを過剰に繰り返すことで非特異的な吸着が増加することが報告されているため、今回の検討ではこれ以上のパンニングを繰り返さないことにした。

パンニング操作を行った scFv ライブラリから、個々のファージクローンにおける hCL2 結合性を確認した結果、hCL2-BV に対して結合性を有するクローンが複数観察された (Figure 11B)。hCL2 への結合性が見られた 17 クローンに関して CL 結合特異性を確認するため、hCL1-BV、hCL4-BV、hCL5-BV に対する結合性を検討した。その結果、すべてのクローンに対して、結合性が見られた (Figure 12)。今回の CL 結合性検討において、WT-BV における結合性も高く見られたことから、得られた hCL2 binder は、BV 由来の膜蛋白質 gp64 を認識する可能性が高いと予想された。

この問題点を解決するため、FLAG resin パンニングの後、さらに WT-BV 結合性ファージを除くためのサブトラクションパンニングを行った。その後、

hCL2-BV によるパンニング操作を行った。その結果、パンニングにより濃縮率が向上した(Figure 13)。従って、hCL1 binderをスクリーニングする際にも、WT-BV でのサブトラクションのパンニングが必要であると考えられる。

上記の検討から、作製した scFv 提示ファージライブラリに hCL binder が含まれていることが確認できたため、hCL1 binder のスクリーニングを行うことにした。ライブラリ中に WT-BV に結合性を示すものが多く存在することが判明したため、hCL1 binder のスクリーニングに際し、WT-BV によるサブトラクションパンニングを行った。その後、hCL1-BV によるパンニング操作を行ったところ、濃縮率の向上が確認された(Figure 14)。

D. 考察

本研究の目的は、hCL1 へ結合性を示す scFv の取得である。そのため、CL を免疫したマウスを利用して scFv ライブラリの構築を試みるが、CL は疎水性の高い膜蛋白質であることから、抗原として利用する蛋白質の精製が困難なこと、膜蛋白質であり、ヒトとマウスにおいて相同性が高く抗原性が低いことから、CL に対する免疫誘導を行うことが困難であった。そこで、本研究では CL 抗原として、BV における膜蛋白質発現系を利用した CL 提示 BV を用い、抵抗抗原性に対しては、CL 欠損マウスを利用することにした。

BV における膜蛋白質発現系は、BV 膜表面上に外来膜蛋白質の発現が可能であること、BV 膜上に提示された膜蛋白質は本来の蛋白質構造を保っていると予想されることから、CL 抗原を作製する方法として最適であると判断した。CL 欠損マウスは CL に対する免疫寛容が起こっていないため、CL 抵抗抗原性が回避できると考えられる。そこで、これらの方法を融合することで、scFv ライブラリ構築のための CL 免疫を試みた。今回、CL の低抗原性を回避する目的で用いる CL 遺伝子欠損マウスは、CL-1 遺伝子欠損マウスが生後すぐに死亡して利用できないため、CL-2 遺伝子欠損マウスを用

いることにした。当研究グループの検討から、CL3-BV を免疫した CL3 遺伝子欠損マウスの脾臓回収時期を工夫することで、抗原として用いた CL-3 以外の CL メンバーに結合性を示す scFv が取得できることを確認している。従って、CL-2 を抗原に用いても CL-1 結合性 scFv の取得は可能であると考えられる。

上記の知見をもとに、CL-2 欠損マウスに CL2-BV の免疫を行った結果、CL-2 に対する抗体産生の誘導に成功した。続いて、CL 抗体産生マウスの脾臓を利用し、scFv ライブラリの構築を行った(角田班の報告を参照)。

CL-1 binder の取得を目指し構築した scFv ライブラリに、CL 結合性 binder が含まれているかを確認するため、まず、免疫抗原として用いた hCL-2 への binder が存在するかを確認した。そのため、まず hCL2-BV を用いて hCL-2 binder を濃縮するためのパンニングを行ったところ、結合性ファージの濃縮はあまり観察されなかった。3rd パンニング後のファージをモノクローン化し、hCL2 への結合性を調べたところ、結合性を有するクローンが複数得られた。しかし、hCL2 に結合性を示したクローンは、WT-BV にも結合性を示していることが分かった。さらに、hCL1, 4, 5 に対する結合性を検討した結果、hCL2 特異的ではなく、各 CL にも結合していることが分かった。この結果から、BV 由来の膜蛋白質である gp64 に結合しているのではないかと予想された。そこで、WT-BV へ結合性を示すクローンを排除するため、サブトラクションパンニングを行い、gp64 に結合するクローンを排除することにした。その結果、パンニングを繰り返すことにより hCL-2 binder の濃縮が観察された。サブトラクションパンニングの結果、hCL-2 binder の濃縮が観察されたことから、hCL-1 binder のスクリーニングにおいても、サブトラクションパンニングを行った。その結果、パンニングの 3rd ラウンドにおいて CL-1 binder の濃縮が見られた。今後は、3rd パンニング後のファージをモノクローン化し、hCL1

への結合性を個別に調べる予定である。

E. 結論

本研究は、独自のCL binder創製技術を有効活用することで、HCV感染阻害剤の基盤分子となるhCL-1 binderの創製を目的としている。

本年度は、(1) CL-1結合性scFv取得のための基盤材料の整備、(2) hCL2遺伝子欠損マウスを用いたファージディスプレイscFvライブラリの構築、(3) 独自のCL binderスクリーニング系を用いたCL1 binderスクリーニング条件の検討を試み、以下の成果を得た。

(1) CL-1結合性scFv取得のための基盤材料の整備
scFvライブラリの作製やCL-1 binderのスクリーニングに用いるhCL 提示バキュロウイルス(hCL-1, 2, 4, 5-BV)を作製した。また、CL-1 binderのCL結合特異性を調べるために用いる4種のCL発現細胞(HT1080/hCL1, 2, 4, 5)を作製した。

(2) hCL2遺伝子欠損マウスを用いたファージディスプレイscFvライブラリの構築

hCL1の細胞外領域に特異的に結合するscFvを取得するため、膜表面にhCL2を提示したBVをCL-2欠損マウスに免疫し、本マウスの脾臓から得たRNAをもとに、scFv提示ファージ抗体ライブラリを作製した。作製したライブラリは、スクリーニングソースとして十分な多様性を有していた。

(3) 独自のCL binderスクリーニング系を用いたCL1 binderスクリーニング条件の検討

hCL1への結合能を有するscFvを得るため、まず(2)で作製したライブラリからCL結合性ファージが存在するかをhCL-2 binderのスクリーニングにより検討した結果、hCL2に結合性を示すファージクローンを取得するはWT-BVへ結合性を示すクローンを排除するサブトラクションパンニングが必要であることが明らかとなった。

上記の成果を踏まえ平成 24 年度は、WT-BV へ結合性を示すファージクローンを排除するために、サブトラクションパンニングを行ったファージプールから、

hCL1 への結合性を示すクローンを単離し、個別にCL 結合特異性等を調べ、得られた hCL-1 binderを用い HCV 感染阻害実験を行う予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. *Pharmazie*, 66(4), 282-6, 2011.
2. Takahashi A, Kondoh M, Suzuki H, Watari A, Yagi K. Pathological changes in tight junctions and potential applications into therapies. *Drug Discov Today*. 2012.
3. Yoshikawa M., Mukai Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Okada N., Nakagawa S. : Modifying the antigen-immunization schedule improves the variety of monoclonal antibodies obtained from immune-phage antibody libraries against HIV-1 Nef and Vif., *J. Biosci. Bioeng.*, 111(5):597-599, 2011.
4. 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.
5. Narimatsu S., Yoshioka Y., Watanabe H., Masano T., Morishige T., Yao X., Tanabe A., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Lysine-deficient lymphotoxin- α mutant for site-specific PEGylation., *Cytokine.*, 56(2):

489-493, 2011.

6. Narimatsu S., Yoshioka Y., Morishige T., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Nishimura MI., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Structure-activity relationship of T-cell receptors based on alanine scanning., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 415(4): 558-562, 2011.
7. Yamashita T., Okamura T., Nagano K., Imai S., Abe Y., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer., *Pharmazie*, 67: 253-255, 2011.
8. Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of a novel DDS for site-specific PEGylated proteins., *Chem. Cent. J.*, 5(25):1-6, 2011.

2. 学会発表

1. Yohei Kakamu, Kyohei Matsushita, Yumiko Saito, Azusa Takahashi, Koji Matsuhisa, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, *Biochemical analysis of a novel dual claudin binder. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA*
2. 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*
3. 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.

4. 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
5. 高橋梓、松下恭平、斉藤郁美子、髙原綱吉、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 回トキシシンポジウム、平成 23 年 7 月 6-7 日、東京
6. 角田慎一：抗体プロテオミクス技術による創薬ターゲットタンパク質の効率的探索、生物化学的測定研究会第 16 回学術集会、大阪、2011 年 6 月.
7. 角田慎一：TNF 構造変異体の創製と機能解析、疾患治療への応用、回折構造生物第 169 委員会第 35 回研究会、東京、2011 年 6 月.
8. 角田慎一：機能性 TNF- α 変異体の創製と難治性疾患治療への応用、CPhI Japan 2011、大阪、2011 年 7 月.
9. 角田慎一、機能性 TNF- α 変異体の創製と難治性疾患治療への応用、第 7 回理研ものづくりシンポジウム、埼玉、2012 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

I. 研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科：

- ・ 八木清仁(教授)

- 近藤昌夫(准教授)
- 吉田猛史(大学院生)

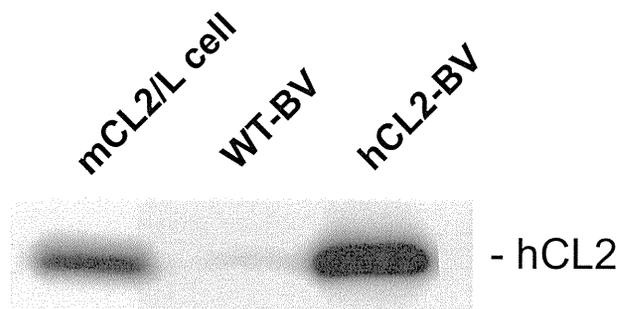


Figure 1 Preparation of hCL2-BV.

WT-BV and hCL2-BV (0.1 μ g/lane) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of mCL2/L cell was used as a positive control.

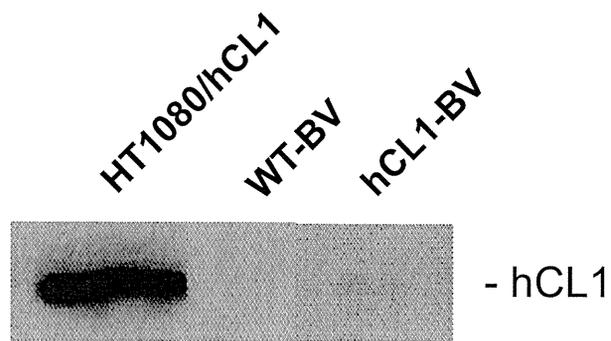


Figure 2 Preparation of hCL1-expressing BVs.

WT-BV and hCL1-BV were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of HT1080/hCL1 cells was used as a positive control.

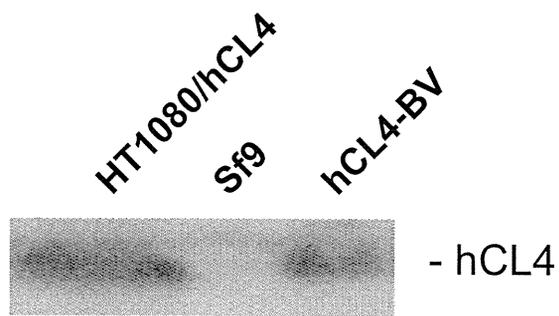


Figure 3 Preparation of hCL4-expressing BV.

Lysate of hCL4-expressing HT1080 (HT1080/hCL4), Sf9 and hCL4-BV were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysates of HT1080/hCL4 and Sf9 cells were used as a positive and negative control.