

201209008A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

Claudinを標的とした創薬基盤技術の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成25（2013）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

Claudinを標的とした創薬基盤技術の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成25（2013）年 4月

目 次

I. 総括・分担研究報告	
Claudinを標的とした創薬基盤技術の開発	1
近藤昌夫・八木清仁	
II. 分担研究報告	
1. Claudin-1およびClaudin-4のヒトがんにおける役割	35
國安弘基	
2. Claudin-1 binderの性状解析とC型肝炎ウイルス感染阻害活性解析	41
深澤征義	
3. Claudin標的型粘膜ワクチンの開発に向けた粘膜免疫応答システムの解析	51
國澤純	
4. DNAメチル化による血管内皮細胞特異的遺伝子発現制御	60
岡田欣晃	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	63
IV. 研究成果の刊行物・別刷	70

Claudin を標的とした創薬基盤技術の開発

研究代表者 近藤 昌夫 大阪大学大学院 薬学研究科 准教授

研究分担者 八木 清仁 大阪大学大学院 薬学研究科 教授

研究要旨

昨今の上皮細胞生物学の進展により、タイトジャンクションシール機能を担う分子として、4回膜貫通蛋白質 claudin (CL) が同定された。現在までにCLには27種類の分子が見出されており、CLを標的とした、非侵襲性投与方法、上皮がんターゲティング法、粘膜ワクチン、C型肝炎ウイルス(HCV)感染阻害法、薬物の血液脳関門透過法開発の可能性が示唆されている。しかしながら、CLは抗原性が低い上に立体構造が解析されておらず、CL binderの創製は著しく立ち遅れており、CLを標的とした創薬研究は遅々として進展していない。

現在までに申請者は、知的クラスター創成事業および文科省科研費の支援を受けて、CLを標的とした創薬研究を推進し、CL-4 binderを用いたバイオ医薬の経粘膜吸収促進技術、癌ターゲティング法、粘膜ワクチン技術を世界に先駆けて確立してきた(PCT/JP2008/61723、特願2010-25259他)。さらに、CLを標的とした創薬基盤として、出芽バキュロウイルス(BV)を利用したCL蛋白質発現系を確立し、CL発現BVをCL欠損マウス等に免疫して作製した一本鎖抗体(scFv)ライブラリを用いた新規CL binderスクリーニング系を構築した。

上述した背景を踏まえ本研究では、創薬上の重要度が高いCL-1、-4、-5に焦点を絞り、癌ターゲティングおよびHCV感染阻害に資するCL-1 binder、粘膜免疫組織・各種癌ターゲティングに資するCL-4 binder、血液脳関門制御に資するCL-5 binderを開発することを目的とする。

本年度は、自己免疫疾患マウスなどを用いて scFv ライブラリの作製、抗体作製などに着手した。

A. 研究目的

上皮細胞は、生体内外・組織内外を隔てるバリアとして機能していること、悪性腫瘍の90%は上皮由来であること、上皮細胞層は多くの病原性微生物の侵入門戸となっていることから、創薬ターゲットとして高い可能性を秘めている。しかしながら、上皮細胞生物学の遅延から上皮細胞を標的とした創薬研究は立ち遅れている。

98年に上皮細胞のタイトジャンクションシール機能を担う分子として、4回膜貫通蛋白質 claudin (CL) が同定された。現在までに、CLには27種類のメンバーが見出されており、①皮膚バリアは角

層バリアと重層上皮細胞バリアから構成されており、CL-1が重層上皮細胞バリアを担うこと、②CL-5欠損マウスでは血液脳関門特異的に低分子(分子量1000未満)の透過性が上昇すること、③CL-4が粘膜バリアを担っていること、④CLがヒトでは12種類余りの癌で高発現していること、⑤CL-1がC型肝炎ウイルスの感染受容体であること、⑥CL-4が粘膜免疫組織で高発現していることなどが見出されている(Trends Cell Biol, 16, 181, 2006; Drug Discov Today, 13, 180, 2008)。これらの報告は、CLが優れた創薬ターゲットになりうることを強く示唆している。

さて、CLを標的とした創薬ではCLに対するリガンド分子の創製が必須であるものの、CLは抗原性が低い上に蛋白質精製も難しく、抗体を含めてCL binderの創製は著しく立ち遅れており、CLを標的とした創薬研究は遅々として進展していない。

本申請課題では、CL提示バキュロウイルスを利用したCL binder探索系などのCLを標的とした創薬研究基盤を有効活用することで、癌ターゲット

B. 研究方法

B. 1 hCL1 抗体産生ハイブリドーマの樹立

B. 1. 1 免疫

hCL1 発現プラスミドを自己免疫疾患モデルマウスであるBXSb マウス皮下に免疫した。フローサイトメーター(FCM)解析により、免疫マウス血清中の抗体価を測定した。抗体価上昇が観察された個体に対し、最終免疫(ブースティング)を行った。

B. 1. 2 細胞融合

最終免疫後、免疫マウスからリンパ細胞を回収し、マウスミエローマ細胞(P3U1)と細胞融合を行った。融合後の細胞を96well plate 10枚に播種し、培養培地1*にて13日間、37°C、5% CO₂ 下で培養した。

*培養培地1: D-MEM (wako, 044-29765) + 10% FCS (Hyclone, Lot.FQF24009), 10% BM condimed H1 Hybridoma cloning supplement (Roche, 1088947), 1 × HAT supplement (Invitrogen, 21060017), 50 μg/mL Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, 15140122), 4mM L-Glutamine (Invitrogen, 25030081)

B. 1. 3 hCL1 抗体産生ハイブリドーマの樹立

培養後、全てのプレートウェルから培養上清を回収した。Huh7.5.1細胞およびS7d6細胞を用い、上記で回収した培養上清およびPE標識抗マウスIgG抗体で染色、フローサイトメーター(FCM)解析を行った。S7d6細胞は、Huh7.5.1細胞を用いて樹立されたC型肝炎ウイルス耐性細胞であり、CL-1が

イング法、粘膜ワクチン技術、C型肝炎ウイルス感染阻害法、血液脳関門制御法開発に資するCL-1、CL-4、CL-5 binderを創出することを目的とする。

平成24年度は、昨年度に引き続きscFvライブラリの作製およびスクリーニング、抗体作製を実施した。

特異的に欠損している。

フローサイトメーター解析にて、陽性を示すシフトが確認されたウェルから、それぞれハイブリドーマ細胞を回収し、各クローンに関し1.2 cells/wellで96-well plate1枚に撒き、培養培地1*にて11日間、37°C、5% CO₂ 下で培養した。培養後、顕微鏡下でシングルコロニー形成の認められるウェルをプレートあたり20~30選択し、そのハイブリドーマ培養上清を回収した。Huh7.5.1細胞およびS7d6細胞を用い、回収した培養上清、及びPE標識抗マウスIgG抗体で染色し、FCM解析を行い、ハイブリドーマ4クローンを樹立した。

B. 1. 4 hCL1 結合性マウス抗体の抗体可変部領域配列の解析

TRIzol(invitrogen)およびmRNA purification Kit (GE healthcare)を用い、ハイブリドーマからmRNAを回収、精製した。回収したmRNAを鋳型に、Super Script III First-Strand Synthesis Suoer Mix(invitorgen)を用いて、cDNAを合成した。なお、cDNA合成にはprimerとしてMouse Ig-primer Set (Novagen)のIgG 3'-primerを用いた。

合成したcDNAを鋳型に、Mouse Ig-primer Set (Novagen)およびKOD-plus-(TOYOBO)を用いてPCRを行い、VHおよびVL遺伝子を増幅した。PCR後、PCR産物を電気泳動により分離・精製し、AccepTor Vector Kit (Novagen)を用いて、pST Blue-1にライゲーションした。ライゲーション産物をコンピテントセルDH-5αをトランスフォーメーションし、形成した独立大腸菌クローンを回収した。なお、大腸菌クローンの選別に際して、LAプレートにX-galおよびIPTGを塗布することでBlue-White

selection を行い、PCR 産物が挿入されているクローンを効率よく選別した。回収した大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、シーケンス解析により目的の遺伝子配列を解析した。

B. 1. 5 hCL1 結合性マウス抗体の Ig サブクラス解析

ハイブリドーマ培養上清および Mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit を用いて、培養上清中に含まれる抗体のサブクラスを解析した。

B. 2 hCL1 結合性マウス抗体の大量作製および精製

ヌードマウス腹腔内にハイブリドーマを $3\sim 9.5 \times 10^6$ cells/匹で移植した。なお腹水形成を促進させるために、ハイブリドーマ移植の 1~3 週間前にプリスタン 500 μ L/匹を投与した。ハイブリドーマ移植後 10 日目から 21 日目までに単回、もしくは複数回にわたり腹水を採取した。回収した腹水を遠心分離し、回収した上清を冷凍保存した。

腹水上清を等量のリン酸バッファー (10 mM Na phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4) で希釈し、およそ 2 倍量の飽和硫酸アンモニウムを滴下した。スターラーで攪拌後、4°C、2 時間静置した。静置後、8,000 rpm、4°C、15 分間遠心分離し、得られた沈殿物をリン酸バッファーで再溶解および透析し、精製前サンプルとした。

予めリン酸バッファーで前処理した protein G Sepharose カラムに、精製前サンプルを付加した。その後、リン酸バッファーにてカラムを洗浄し、溶出バッファー (0.1 M Glycine-HCl, pH 2.7) で目的タンパク質を溶出した。溶出後の溶液には、直ちに少量の 1M Tris-HCl (pH 9.0) にて中和した。更に中和後の溶液をリン酸バッファーにて透析し、バッファーを置換した。

得られた目的タンパク質溶液は、還元条件下の SDS-PAGE により分子量を確認した。また、吸光度法によりタンパク質濃度を測定した。

B. 3 hCL1 結合性マウス抗体の結合特異性解析

hCL1、hCL2、hCL4、hCL5、hCL6、hCL7、hCL9 発現 HT1080 細胞を 5.0×10^5 /sample となるように 96 well plate に播種し、マウス抗体を添加、攪拌し氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 1 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Goat anti-mouse IgG(H+L)-FITC 抗体 (ROCKLAND) を添加、攪拌し氷上で遮光し 30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 μ g/mL となるように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B. 4 scFv 提示ファージライブラリの作製

B. 4. 1 hCL1-BV の gp64Tg マウスへの免疫

雌性 gp64Tg マウスに hCL1-BV を 2 回投与した。投与後 hCL1 発現 HT1080 細胞および mock/HT1080 細胞を用いた flow cytometry 法により抗 hCL1 抗体の産生を確認した。抗体価の上昇が確認できたマウスの脾臓を摘出し、TRIzol reagent (Invitrogen) により total RNA を抽出した。

B. 4. 2 hCL1 発現プラスミドの BXSb マウスへの免疫

B. 1. 1 および B. 5. 1 で免疫を行い抗体価の上昇が確認できた BXSb マウス、gp64Tg マウスよりリンパ細胞を回収し、TRIzol reagent (Invitrogen) により total RNA を抽出した。

B. 4. 3 hCL1 免疫ファージ抗体ライブラリの作製

各免疫マウスより抽出した 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 500 ng から SuperScript III First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用い cDNA を合成した。VH, VL 鎖領域の DNA 断片を得るため、cDNA を鋳型として、forward, reverse primer set (医薬基盤研究所角田慎一先生、長野一也先生より供与)、および KOD-Plus-(TOYOBO) を用いて PCR 反応を行った。この PCR 産物を PCR purification kit (Qiagen) で精製し、次の assembly PCR に供した。VH 鎖 DNA 断

片および VL 鎖 DNA 断片を、Not I サイトを有する
Y15 primer

(5'-ggccagctttggagcctttttttggagattttcaacgtgaaaa
aattatttttcgcaattccttagttgttcctttctatgcgcccgccagc
cgcccatggcc-3')、Nco I サイトを有する Y16
primer

(5'-ttagtaaatgaattttctgtatgaggtttgctaacaactttca
acagtctatgcgccacgcggttccacggatccggatccggcaccg
gcgcacctgcccgc-3')と混合し、KOD -Plus-
(TOYOBO)を用いて assembly PCR を行った。
PCR 産物を PCR purification kit (Qiagen)を用いて
精製し、scFv 遺伝子とした。scFv 遺伝子を Nco I、
Not I それぞれで 37°C、2 時間処理し、切り出し精
製を行った。同様に Nco I、Not I それぞれで 2 時間
処理し、切り出し精製した pY03' を 1 µg、scFv 遺伝
子を 0.08 µg 用いて T4 ligase (Promega, Corp.,
USA) を用いて 16°C にて一晩ライゲーション反応
を行なった。得られたライゲーション産物を PCR
Purification Kit で精製した。精製後のライゲーション
産物を大腸菌 TG1 に電圧ポレーションする
ことにより導入した。その後、100 µg/mL
ampicillin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd)
と終濃度 2% D-glucose (SIGMA aldrich Japan Co.,
Ltd) を添加した LB 培地プレート(LAG plate)に
播種した。一晩培養後大腸菌のコロニーをセルス
クレーパーにより LAG 培地で回収した。この大腸
菌溶液を終濃度 10%グリセロール (NACALAI
TESQUE, Inc., Kyoto) と混合し、-80°Cで保存し、
hCL1-DNA 免疫 BXSライブラリ、hCL1-BV 免疫
gp64Tg ライブラリとした。

B. 4. 4 エレクトロポレーション

TG1 をグリセロールストックから 2YT 培地 2 mL
に植え継ぎ、一晩培養した。翌日、2YT 培地 200
mL に OD600 = 0.05-0.1 となるように植え継ぎ、
37°Cで OD600 = 0.4-0.6 まで培養した。その後、
4°C 3000 rpm 10 分間遠心分離し、上清を捨て、
milliQ を加え懸濁し、さらに 4°C 3000 rpm 10 分間
遠心分離し上清を捨てた。この洗浄作業を 3 回繰
り返した後、TG1 を終濃度 10%グリセロールを含む

SP 水 (Fuso, Co., Ltd, Osaka) で懸濁した。TG1 溶
液 40 µL とライゲーション産物 1 µL (30 セット) を
氷上で 15 分間なじませた後、混合液をキュベット
に移し Gene pulser[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc.,
C.A., USA) を用いて電気パルスを与えた (Ec1)。
その後、2YTG 培地 450 µLに移し、37°Cで 1 時間
振盪培養した。Titer check 用として、この大腸菌
溶液のうち 50 µL を 100 µg/ml ampicillin sodium を
添加した 2YTG (2YTGA) 培地で 10³-10⁶ 倍希釈し、
ペトリフィルムに播き、37°Cで一晩培養後、コロニ
ー数を計測することでライブラリのサイズを求めた。
また、残り的大腸菌溶液を約 500 µL /プレートとな
るように LAG 培地プレート 34 枚に播種した。翌日
2 mL LAG 培地/プレートでセルスクレーパーを用
いて大腸菌を回収し、終濃度 10%グリセロールを
添加し-80°Cで保存した。

B. 5 hCL1 結合性 scFv 提示ファージのスクリー 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 OD600 = 0.09-0.1 となるよ
うに添加し、37 °C で OD600 = 0.3-0.6 となるまで培養し
た。次に M13K07 helper phage (Invitrogen) を OD600 ×
8 × 10⁸ (cells/mL) × 25 (mL) ÷ 10¹¹ (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 × g で
10 分間遠心し、ペレットを回収した。100 µg/mL
ampicillin sodium, 50 µg/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 × g で 10 分
間遠心分離し、その上清を回収した後、さらに 15660
× 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

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 μ L を添加した。さらに NTE buffer 500 μ L を添加し、1000 \times 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 μ L および 2% Block Ace 50 μ L 混合液を添加し、常温で 1 時間転倒混和した。0.1% T-PBS 500 μ L を添加し、1000 \times 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 \times FLAG peptide (SIGMA) 100 μ L を添加し、常温で 40 分間転倒混和した。10,000 rpm、30 秒間の遠心分離を行い、上清をファージ溶液として回収した。

B. 5. 3 hCL2-BV, hCL4-BV, hCL5-BV サブトラクションパンニング

96 well ELISA plate (greiner bio-one) に 3.3 μ g/well/100 μ L TBS ずつ hCL2-BV, hCL4-BV, hCL5-BV (計 10 μ g/well/100 μ L の 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 μ L 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 μ L と 4% Block Ace 50 μ L 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 μ L 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 μ L を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.4-0.6 に調整) 300 μ L と混合し、37°C 1 時間静置することでファージを感染させた。その後、LAG 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. 4 scFv ファージライブラリの hCL1-BV に対するパ

ンニング

0.5 μ L/well/100 μ L TBS の hCL1-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 300 μ L を添加し、常温で 2 時間静置し、ブロッキングした。また、B. 6. 2 で回収したファージ溶液、もしくは B. 6. 3 において冷凍保存した TG1 グリセロールストックから作製したファージ溶液 100 μ L と 4% Block Ace 25 μ L 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 μ L 添加し、常温で 250 rpm、2 時間振盪培養した。その後、0.1% T-PBS で五回洗浄し、20 mM glycine-HCl (pH 2.0) を 100 μ L 添加し、4°C、10 分間作用させることで hCL1-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 μ L 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 μ L 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 μ L を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.3-0.6 に調整) 200 μ L と混合し、37°C、1 時間静置することでファージを感染させた。その後、LAG 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. 5 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 μ L を 10^2 - 10^7 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 10^9 - 10^{11} 倍に希釈した。希釈ファージ 100 μ L を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.3-0.6 に調整) 300 μ L とそれぞれ混合後、37°C、1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600 μ L 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. 6 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. 7 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 hCL1-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。

B. 5. 8 hCL1 結合性 scFv のシーケンス解析

hCL1 結合性を示したクローンの TG1 グリセロールストックを 2YTGA 培地 3mL ずつに入れ、37°Cで一晩培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用いて精製し、30 μ L の SP 水で溶出した。エッペンに、プラスミド 10 μ L、Nco

I, Not I 各 4 μ L、10 \times NEB3、10 \times BSA 各 3 μ L、SP 水 6 μ L を混合し、37°Cで 2 時間静置した。その後、1%アガロースゲル、TAE 電気泳動 (100V、25 分) により、scFv 遺伝子の挿入を確認した。

残りの培養液に 2YTGA 培地 12ml を加え、37°Cで一晩培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用いて精製し、合計 60 μ L の SP 水で溶出した。精製した phagemid 3 μ L (300-600 ng) とプライマー 6.4mol (forward primer:pY03 s-1, reverse primer:pY03AS-1 の合計) を混合し、SP 水で合計 14 μ L になるよう希釈し、株式会社ファスマックにシーケンス解析を委託した。

B. 6 hCL4 抗体産生ハイブリドーマの樹立

B. 6. 1 免疫

hCL4 発現プラスミドを Wistar 系ラット皮下に免疫した。フローサイトメーター (FCM) 解析により、免疫マウス血清中の抗体価を測定した。抗体価上昇が観察された個体に対し、最終免疫 (ブースティング) を行った。

B. 6. 2 細胞融合

最終免疫後、免疫ラットからリンパ細胞を回収し、マウスミエローマ細胞 (P3U1) と細胞融合を行った。融合後の細胞を 96well plate 10 枚に播種し、培養培地 1*にて 13 日間、37°C、5% CO₂ 下で培養した。

*培養培地 1 : D-MEM (wako, 044-29765) + 10% FCS (Hyclone, Lot.FQF24009), 10% BM conditioned H1 Hybridoma cloning supplement (Roche, 1088947), 1 \times HAT supplement (Invitrogen, 21060017), 50 μ g/mL Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, 15140122), 4mM L-Glutamine (Invitrogen, 25030081)

B. 6. 3 hCL4 抗体産生ハイブリドーマの樹立

培養後、全てのプレートウェルから培養上清を回収した。CHO 細胞に pBOMB0/hCL4 プラスミドをトランスフェクションし作製した hCL4 強制発現 CHO 細胞を用い、上記で回収した培養上清、及び PE

標識抗マウス IgG 抗体で染色し、フローサイトメーター(FCM)解析を行った。

フローサイトメーター解析にて、陽性を示すシフトが確認されたウェルから、それぞれハイブリドーマ細胞を回収し、各クローンに関し 1.2 cells/well で 96-well plate 1 枚に撒き、培養培地 1*にて 11 日間、37°C、5% CO₂ 下で培養した。培養後、顕微鏡下でシングルコロニー形成の認められるウェルをプレートあたり 3 ウェル選択し、そのハイブリドーマ培養上清を回収した。293T 細胞に pBOMB0/hCL4 プラスミドをトランスフェクションし作製した hCL4 強制発現 293T 細胞を用い、回収した培養上清、及び PE 標識抗ラット IgG 抗体で染色し、FCM 解析を行った。

FCM 陽性の確認された 11 クローン分のプレートから、シフト強度が強く、且つ細胞数の多いウェルを各クローン 3 ウェルずつ選択し、24well plate に 37°C、5% CO₂ 下で拡大し培養培地 1*にて培養を行った。3 日間培養後、全てのウェルを 6-well plate に拡大し培養培地 2*にて培養を行った。3 日間培養後、培養上清を回収した。hCL4 強制発現 293T 細胞を用い、回収した培養上清、及び PE 標識抗ラット IgG 抗体で染色し、FCM 解析を行った。

この結果、全てのウェルにおいて、陽性を示すシフトが確認された。シフト強度が強く、且つ細胞数の多いウェルを各クローン 1 ウェルずつ選択し、75cm² フラスコに 37°C、5% CO₂ 下で拡大し培養培地 2*にて培養を行った。3~5 日間培養後、150cm² ディッシュに拡大し培養培地 2*にて培養を行った。5日間培養後、培養上清(25mL、オーバーグロース)を回収した。hCL4 強制発現 293T 細胞を用い、回収した培養上清の一部、及び PE 標識抗ラット IgG 抗体で染色し、FCM 解析を行った。

B. 6. 4 hCL1 結合性マウス抗体の Ig サブクラス解析

ハイブリドーマ培養上清および Rat immunoglobulin isotyping ELISA kit(BD)を用いて、培養上清中に含まれている抗体の Ig サブクラス解析を行った。結果を表 1 に示す。

B. 6. 5 hCL4 結合性マウス抗体の抗体可変部領域配列の解析

TRIzol(Invitrogen)を用い、ハイブリドーマから mRNA を回収、精製した。回収した mRNA を鋳型に SMARTer RACE cDNA Amplification kit(Clontech)を使用し、cDNA を作製した。作製した cDNA を Advantage2 PCR kit を利用し、H 鎖及び L 鎖の可変部領域遺伝子を増幅した。増幅した各遺伝子を Mighty cloning kit を使用し、pUC118Hinc III にライゲーションした。ライゲーション産物をコンピテントセル DH-5 α にトランスフォーメーションし、形成した独立大腸菌クローンを回収した。なお、大腸菌クローンの選別に際して、LA プレートに X-gal および IPTG を塗布することで Blue-White selection を行い、PCR 産物が挿入されているクローンを効率よく選別した。回収した大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、シーケンス解析により目的の遺伝子配列を解析した。解析の結果を table に示す。

B. 7 hCL4 結合性マウス抗体の大量作製および精製

ヌードマウス腹腔内にハイブリドーマを 3×10^6 cells/匹で移植した。なお腹水形成を促進させるために、ハイブリドーマ移植の 1 週間前にプリスタン 200 μ L/匹を投与した。ハイブリドーマ移植後 10 日目から 21 日目までに腹水を採取した。回収した腹水を遠心分離し、回収した上清を冷凍保存した。

腹水上清を等量のリン酸バッファー(10 mM Na phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4)で希釈し、およそ 2 倍量の飽和硫酸アンモニウムを滴下した。スターラーで攪拌後、4°C、2 時間静置した。静置後、8,000 rpm、4°C、15 分間遠心分離し、得られた沈殿物をリン酸バッファーで再溶解および透析し、精製前サンプルとした。

予めリン酸バッファーで前処理した protein G Sepharose カラムに、精製前サンプルを付加した。その後、リン酸バッファーにてカラムを洗浄し、溶

出バッファー(0.1 M Glycine-HCl, pH2.7)で目的タンパク質を溶出した。溶出後の溶液には、直ちに少量の 1M Tris-HCl(pH9.0)にて中和した。更に中和後の溶液をリン酸バッファーにて透析し、バッファーを置換した。

得られた目的タンパク質溶液は、還元条件下の SDS-PAGE により分子量を確認した。また、吸光度法によりタンパク質濃度を測定した。

B. 8 hCL4 結合性マウス抗体の結合特異性解析

hCL1、hCL2、hCL4、hCL5、hCL6、hCL7、hCL9 発現 HT1080 細胞を 5.0×10^5 /sample となるように 96 well plate に播種し、マウス抗体を添加、攪拌し氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 1 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Goat anti-rat IgG(H+L)-FITC 抗体(ROCKLAND)を添加、攪拌し氷上で遮光し 30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 μ g/mL となるように希釈した PI (Miltenyi Biotec)を加え、FACSCaliburにて測定し、CellQuestProにて解析を行った。

B. 9 scFv 提示ファージライブラリの作製

B. 9.1 hCL4-BV の gp64Tg マウスへの免疫

6 週齢雌性 gp64Tg マウスに hCL4-BV をアジュバンドと共に投与した。1 週間ごとに hCL4-BV を計 2 回投与し、投与後 hCL4 発現 HT1080 細胞を用いた FCM 法により抗 hCL4 抗体の産生を確認した。抗体産生を確認した後、最終免疫として hCL4-BV を投与し、3 日後に脾臓を摘出し、mRNA を抽出した。

B. 9.2 hCL4 免疫ファージ抗体ライブラリの作製

最終免疫を行ったマウスの脾臓を摘出し、TRIzol reagent (Invitrogen) に溶解させ total RNA を得た。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 500 ng から SuperScript III First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用い cDNA を合成した。VH、VL 鎖領域の DNA 断片を得るため、cDNA 各 4 μ L を鋳型として forward、reverse primer set (医薬基盤

研究所角田慎一先生、長野一也先生より供与) 1 μ L (VL 領域)、2 μ L (VH 領域)、10 x PCR buffer 5 μ L、dNTP 5 μ L、MgSO₄ 2 μ L、DMSO 1 μ L、KOD-plus 1 μ L の割合で混合したものをアニーリング温度 50°C で 30 秒間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 40 サイクルの PCR 反応に供した。この PCR 産物を PCR purification kit で精製し、次の assembly PCR に供した。

VH 鎖 DNA 断片を 100 ng、VL 鎖 DNA 断片を 100 ng、10 x PCR buffer 5 μ L、dNTP 5 μ L、MgSO₄ 2 μ L、DMSO 1 μ L、KOD-plus 1 μ L の割合で混合したものをアニーリング温度 65°C で 1 分間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 18 サイクルの条件に設定し、assembly PCR を行った。PCR 産物を PCR purification kit を用いて精製して scFv 遺伝子とし、次の増幅操作に用いた。

scFv 遺伝子 DNA 断片を 25 ng、*Not I* サイトを有する Y15 primer (5'-ggccagccttggagccttttttggagattttcaacgtgaaaaattatttattcgcaattccttttagttgttcctttctatgcgggccagccggccatgcc -3')、*Nco I* サイトを有する Y16 primer (5'-ttagtaaatgaattttctgtatgaggttttgctaaacaactttcaacagtc tatgcggcacgcggttccacggatccggatacggcaccggcgccacctgcccgcgc -3')、10 x PCR buffer 5 μ L、dNTP 5 μ L、MgSO₄ 2 μ L、DMSO 1 μ L、KOD-plus 1 μ L の割合で混合したものをアニーリング温度 65°C で 1 分間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 40 サイクルの条件の PCR 反応に給し、scFv 遺伝子を増幅した。

増幅した scFv 遺伝子を *Nco I*、*Not I* それぞれで 37°C、2 時間処理し、切り出し精製を行った。同様に *Nco I*、*Not I* それぞれで 2 時間処理し、切り出し精製した pY03' を 1 μ g、scFv 遺伝子を 0.8 μ g 用いて T4 ligase (Promega, Corp., USA) を用いて 16°C にて一晩ライゲーション反応を行なった。得られたライゲーション産物を PCR Purification Kit で精製した。ライゲーション産物を大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションすることにより導入した。その後、終濃度 100 μ g/ml ampicilin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) と終濃度 2% D-glucose (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地プレート (LAG plate) に

播種した。一晩培養後大腸菌のコロニーをセルスクレーパーにより LAG 培地で回収した。この大腸菌溶液を終濃度 10%グリセロール (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) と混合し、 -80°C で保存し、hCL4 免疫ファージ抗体ライブラリとした。

B. 9. 4 エレクトロポレーション

TG1 Electrocompetent Cells (Lucigen) $25\ \mu\text{L}$ とライゲーション産物 $1\ \mu\text{L}$ (25 セット) を氷上で 15 分間なじませた後、混合液をキュベットに移し Gene pulser[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc., C.A., USA) を用いて電気パルスを与えた (Ec1)。その後、recover medium $975\ \mu\text{L}$ に移し、 37°C で 1 時間振盪培養した。Titer check 用として、この大腸菌溶液のうち $50\ \mu\text{L}$ を $100\ \mu\text{g/ml}$ ampicillin sodium を添加した 2YTG (2YTGA) 培地で 10^3 - 10^6 倍希釈し、ペトリフィルムに播き、 37°C で一晩培養後、コロニー数を計測することでライブラリのサイズを求めた。また、残り的大腸菌溶液を約 $400\ \mu\text{L}$ /プレートとなるように LAG 培地プレート 62 枚に播種した。翌日 2 mL LAG 培地/プレートでセルスクレーパーを用いて大腸菌を回収し、終濃度 10% グリセロールを添加し -80°C で保存した。

B. 10 hCL4 結合性 scFv 提示ファージのスクリーニング

B. 10. 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 $\text{OD}_{600} = 0.09$ - 0.1 となるように添加し、 37°C で $\text{OD}_{600} = 0.3$ - 0.6 となるまで培養した。次に M13K07 helper phage (Invitrogen) を $\text{OD}_{600} \times 8 \times 10^8$ (cells/ml) $\times 25$ (ml) $\div 10^{11}$ (CFU/ml) となるように添加し、 37°C で 30 分間静置した。さらに、 37°C 、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 $15660 \times g$ 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、 $0.45\ \mu\text{m}$ フィルター (Millipore) を用いて濾過し、ファージ溶液を得た。

B. 10. 2 scFv ファージライブラリの FLAG resin パニングおよび 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) $100\ \mu\text{l}$ を添加した。さらに NTE buffer $500\ \mu\text{l}$ を添加し、 $1000 \times g$ 、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 $50\ \mu\text{l}$ および 2% Block Ace $50\ \mu\text{l}$ 混合液を添加し、常温で 1 時間転倒混和した。 0.1% T-PBS $500\ \mu\text{l}$ を添加し、 $1000 \times g$ 、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、 $1\ \text{mg/ml}$ $3 \times \text{FLAG peptide}$ (SIGMA) $100\ \mu\text{l}$ を添加し、常温で 40 分間転倒混和した。 $10,000\ \text{rpm}$ 、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 WT-BV $0.5\ \mu\text{g/well}/100\ \mu\text{l}$ 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 $300\ \mu\text{l}$ 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 $100\ \mu\text{l}$ と 4% Block Ace $25\ \mu\text{l}$ 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 $100\ \mu\text{l}$ 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、残りの方ージ溶液 $100\ \mu\text{l}$ を大腸菌 TG1 ($\text{OD}_{600} = 0.4$ - 0.6 に調整) $300\ \mu\text{l}$ と混合し、 37°C 1 時間静置することでファージを感染させた。

その後、LAG 培地プレート 1 枚に播種し、一晚培養した。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

B. 11. hCL5 binder のスクリーニング

B. 11. 1 パンニング

4% Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL)を 4 °C で一晚静置することで固相化したエッペンに anti-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA) 100 μ L を添加した。さらに NTE buffer 500 μ L を添加し、1000 \times g、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を 3 回繰り返した後、ファージ溶液 50 μ L および 2% BSA 50 μ L 混合液を添加し、常温で 1 時間転倒混合した。0.1% T-PBS 500 μ L を添加し、1000 \times g、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を 5 回繰り返した後、1 mg/ml 3 \times FLAG peptide (SIGMA) 100 μ L を添加し、常温で 40 分間転倒混合した。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。

hCL5-BV を 0.5 μ g/100 μ L in TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl) でイムノチューブに添加し、4°C で一晚静置することで固相化した。翌日、PBS でイムノチューブを 3 回洗浄した後、4% Block Ace 200 μ L 添加し、常温で 2 時間ブロッキングした。また、ファージライブラリ 100 μ L と 4% Block Ace 20 μ L を混合し、4°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後のイムノチューブを PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージライブラリ液を 100 μ L 添加し、常温で 3 時間振盪した。その後、PBST で 5 回洗浄し、20 mM glycine-HCl (pH 2.0) を 100 μ L 添加し、4°C、10 分間作用させることで hCL5-BV に結合しているファージを解離させた。1 M Tris-HCl (pH 8.0) 50 μ L を加えて HCl を中和し、ファージ溶液を回収した。その後、20 μ L glycine-NaOH (pH 11.0) を 100 μ L 添加し、4°C、10 分間作用させることで hCL5 に結合しているファージを解離させた。ファージ溶液 200 μ L を大腸菌 TG1 ($OD_{600} = 0.4-0.6$ に調整) 200 μ L と混合し、37°C 1 時間静置することでファージを感染させた。その後、LAG 培地プレートに播種し一晚培養した。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

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。

回収し、終濃度 10%の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. 11. 2 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) 10 μ L を 10^{-2} - 10^{-7} 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 10^{-7} - 10^{-11} 倍に希釈した。希釈ファージ 100 μ L を TG1 ($OD_{600} = 0.3-0.6$ に調整) 300 μ L とそれぞれ混合後、37°C 1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600 μ L をさらに添加し、ペトリフィルムに播種し一晚 37°C で培養した。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. 11. 3 scFv モノクローン化ファージの作製

パンニング後のファージを感染させた TG1 のグリセロールストックを希釈し、LAG 培地プレートに播種、37°C で一晚培養した。播種した LAG 培地プレートからコロニーをピックアップし、96 well plate (IWAKIGLASS, Co., Ltd, Japan) 2YTGA 培地 100 μ L で、37°C 4-6 時間培養した。その際、同時に atac 提示ファージ感染 TG1 と C-CPE m19 提示ファージ感染 TG1 のグリセロールストックも同様に 96 well plate で培養した。翌日、ディープウェル (Greiner Bio-One GmbH, Germany) 2YTGA 500 μ L に前培養大腸菌 10 μ L ずつ植え継ぎ、 $OD_{600} = 0.3-0.6$ まで 100 rpm 37°C で培養後、M13K07 helper phage (Invitrogen) 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、2YTAK 培地 1 mL/well を添加して 50 rpm 37°C で一晚培養した。翌日 2000 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. 11. 4 モノクローン化ファージを用いた BV ELISA

96 well ELISA plate に 1.0 µg/50 µL TBS/well で、WT-BV および hCL5-BV、Anti-FLAG mAb (SIGMA) を 4°Cで一晩静置することで固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、4 % Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で常温 2 時間ブロッキングした。また、上記方法で作製したファージを、終濃度 1.6 % Block Ace で 4°C 1 時間ブロッキングした。BV をブロッキング後、PBS で 3 回洗浄し、同じくブロッキングしたファージを 100 µL/well で添加し、常温で 2 時間振盪させた。その後、PBST で 3 回洗浄し、anti M13-HRP mAb (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を 3000 倍希釈した溶液を 100 µL 添加して常温で 1 時間作用させた。PBST で 3 回洗浄した後、TMB 試薬 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 50 µL を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100 µL を加えて反応を停止した。その後マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。

C. 研究結果

C. 1 hCL1 抗体産生ハイブリドーマの樹立

hCL1 発現プラスミドを免疫した BXSb マウス 20 匹のうち 3 匹で、血清中に hCL1 抗体の産生が認められた (Figure 1)。抗体価の上昇が認められたマウスからハイブリドーマを作製し、Huh7.5.1 細胞 (hCL1 陽性) および S7d6 細胞 (hCL1 陰性) を用いた flow cytometry 法によるスクリーニングを行ったところ、hCL1 抗体産生ハイブリドーマ 4 クローンの樹立に成功した (Figure 2)。Mouse Ig-primer Set を用いて抗体可変部領域の配列を同定したところ、いずれのクローンも異なるアミノ酸配列を有していた (date not shown)。また、Mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit を用いて各クローンの Ig アイソ

タイプを同定した (Table 1)。

C. 2 hCL1 結合性マウス抗体の大量作製および精製

ヌードマウスの腹腔内に各ハイブリドーマを投与し、腹水形成を確認後、腹水を回収した。腹水中のマウス抗体を Protein G カラムで精製後、バッファ置換を行った。精製サンプルの一部を用いて還元条件下で SDS-PAGE を行い、重鎖 (約 50 kDa) と軽鎖 (約 25 kDa) のバンドを確認した (Figure 3)。

C. 3 hCL1 結合性マウス抗体の結合特異性解析

hCL1 抗体の結合特異性を検証するために、各種 CL 発現細胞に対する結合性を flow cytometry 法にて解析した。いずれの抗体クローンにおいても hCL2、hCL4、hCL5、hCL6、hCL7 および hCL9 発現 HT1080 細胞には結合性を示さず、hCL1 発現細胞特異的に作用していた (Figure 4)。

C. 4 hCL1 結合性マウス-ヒトキメラ抗体の作製

医薬品応用を目的として、hCL1 結合性マウス抗体のヒトキメラ化を行った。CHO 細胞に hCL1 結合性マウス-ヒトキメラ抗体の発現ベクターである VL:pFUSE2ss-CLIg-hk-anti-hCL1 or pFUSE2-CLIg-hk-anti-hCL1 ; VH:pFUSEss-CHIg-hG1-anti-hCL1 or pFUSE-CHIg-hG1-anti-hCL1 を導入し、上清を回収した。回収した上清を用いて、FACS 解析を行ったところ、いずれのクローンも hCL1 結合性を有していた (Figure 5)。

C. 5 scFv 提示ファージライブラリの作製

hCL1 発現プラスミドを BXSb マウスに、hCL1 提示 BV を gp64Tg マウスに免疫し、血清中の hCL1 抗体量を flow cytometry 法に測定した (Figure 1, Figure 6)。

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。RT-PCR により mRNA を鋳型にして cDNA を合成し、さらに cDNA を鋳型に重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域

(VL) の遺伝子を PCR で増幅した。VH、VL 遺伝子をリンカーで連結して得た scFv 遺伝子を Nco I / Not I 処理しファージディスプレイ用ベクターである pY03' に組み込んだ。得られた scFv 遺伝子ライブラリをエレクトロポレーション法により大腸菌 TG-1 に導入したものをライブラリとした。構築した hCL1-DNA 免疫 BXSb マウス scFv ライブラリ、hCL1-BV 免疫 gp64Tg マウス scFv ライブラリのライブラリサイズは、それぞれ 1.1×10^6 CFU、 2.6×10^5 CFU だった。

C. 6 hCL1 結合性 scFv 提示ファージのスクリーニング

C. 6. 1 hCL1-DNA 免疫 BXSb マウス scFv ライブラリを用いたスクリーニング

scFv 提示ファージライブラリ中の 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、 $3 \times$ 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。次に hCL1-BV に対する結合性ファージの濃縮を行うために、ファージ溶液を hCL1-BV に作用させ、hCL1-BV に結合したファージを回収し、大腸菌 TG-1 に感染させ増幅させる操作を繰り返した (パンニング)。パンニングの濃縮率の推移を観察すると、hCL1-DNA 免疫 BXSb マウス scFv ライブラリでは 3 round 目のパンニング操作前のファージライブラリ溶液 (input phage) の titer が大きすぎて測定出来なかった。少なくとも 3 round 後のパンニング ratio (output/input) は 10^{-8} オーダー以下となる。したがって、このライブラリにおいては ratio での濃縮は確認出来なかった (Figure 7)。

3 round の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 hCL1 結合性を確認した結果、hCL1-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 8A)。hCL1 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、hCL2-BV、hCL4-BV、hCL5-BV に対する結合性を検討した。その結果、17

つのクローンはすべての CL-BV に対する結合性が見られた (Figure 8B)。

また hCL1 への結合性が見られた 17 クローンに関して、酵素処理を行い、電気泳動による scFv 挿入の確認を行った結果、すべてのクローンで scFv と思われる 750bp 付近のバンドが観察された。これら 17 クローンのシーケンス解析を行ったところ、これらのクローンはすべて同一の配列を有していた (Table 2)。

C. 6. 2 hCL1-BV 免疫 gp64Tg マウス scFv ライブラリを用いたスクリーニング

C. 6. 1 と同様に、scFv 提示ファージライブラリ中の 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。また hCL1-BV 免疫 gp64Tg マウス scFv ライブラリでは hCL1 特異的な結合性ファージを取得するため、回収したファージを hCL2、hCL4、hCL5-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。次に hCL1-BV に対する結合性ファージの濃縮を行うために、hCL1-BV を用いてパンニングを行った。パンニングの濃縮率の推移を観察すると hCL1-BV 免疫 gp64Tg マウス scFv ライブラリでは 3 round 後には顕著な濃縮傾向が観察された (Figure 9)。

3 round の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 hCL1 結合性を確認した結果、hCL1-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 10A)。hCL1 への結合性が見られた 9 クローンに関して CL 結合特異性を確認するため、hCL2-BV、hCL4-BV、hCL5-BV に対する結合性を検討した。その結果、7 つのクローンはすべての CL-BV に対する結合性が見られたが、2 つのクローンは hCL-1 に対する特異性に優れた結合性ファージであった (Figure 10B)。

また hCL1 への結合性が見られた 9 クローンに関して、酵素処理を行い、電気泳動による scFv 挿入の確認を行った結果、すべてのクローンで scFv と思われる 750bp 付近のバンドが観察された。こらら 9 クロ

ーンのシーケンス解析を行ったところ、1クローンは VH 領域に変異があり配列を特定することは出来なかったが、残り 8 クローンから 6 つのユニークな配列を同定することが出来た (Table 3)。

C. 7 hCL4 抗体産生ハイブリドーマの樹立

hCL4 発現プラスミドを免疫した Wistar 系ラットの中で、血清中に hCL4 抗体の産生が認められた。抗体価の上昇が認められたラットからハイブリドーマを作製し、hCL4 強制発現細胞を用いた flow cytometry 法によるスクリーニングを行ったところ、hCL4 抗体産生ハイブリドーマ 11 クローンの樹立に成功した (Figure 11)。5' RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 法を用いて抗体可変部領域の配列を同定したところ、いずれのクローンも異なるアミノ酸配列を有していた。また、Rat immunoglobulin isotyping ELISA kit を用いて各クローンの Ig アイソタイプを同定した (Table 4)。

C. 8 hCL4 結合性ラット抗体の大量作製および精製

ヌードマウスの腹腔内に各ハイブリドーマを投与し、腹水形成を確認後、腹水を回収した。腹水中のマウス抗体を Protein G カラムで精製後、バッファ置換を行った。精製サンプルの一部を用いて還元条件下で SDS-PAGE を行い、重鎖 (約 50 kDa) と軽鎖 (約 25 kDa) のバンドを確認した。

C. 9 hCL4 結合性ラット抗体の結合特異性解析

hCL4 抗体の結合特異性を検証するために、各種 CL 発現細胞に対する結合性を flow cytometry 法にて解析した。いずれの抗体クローンにおいても hCL1、hCL2、hCL5、hCL6、hCL7 および hCL9 発現 HT1080 細胞には結合性を示さず、hCL4 発現細胞特異的に作用していた (Figure 12, Figure 13)。

C. 10 scFv 提示ファージライブラリの作製

hCL4 提示 BV を gp64Tg マウスに免疫し、血清中の hCL4 抗体量を flow cytometry 法に測定した。

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。RT-PCR により mRNA を鋳型にして cDNA を合成し、さらに cDNA を鋳型に重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) の遺伝子を PCR で増幅した。VH、VL 遺伝子をリンカーで連結して得た scFv 遺伝子を Nco I / Not I 処理しファージディスプレイ用ベクターである pY03' に組み込んだ。得られた scFv 遺伝子ライブラリをエレクトロポレーション法により大腸菌 TG-1 に導入したものをライブラリとした。構築した hCL4-BV 免疫 gp64Tg マウス scFv ライブラリのライブラリサイズは、 3.0×10^5 CFU だった。

C. 11 hCL5 binder のスクリーニング

hCL5-BV をイムノチューブに固相化して scFv ライブラリを添加した後、結合したファージクローンを回収した。回収したファージを大腸菌 TG-1 に感染させ増幅した。再び調製したファージを CL5-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。

パンニングの濃縮率の推移を観察すると CL5 への結合性を有するファージの濃縮が観察された (Figure 14A)。2nd、3rd パンニング後のファージを個々に評価するため、plate に 1 クローンずつコロニーを培養することでファージクローンを作製し、各クローンの hCL5-BV への結合性を ELISA 法により解析した。その結果、hCL5-BV に結合性を有するクローンが複数得られた (Figure 14B)。

D. 考察

D. 1 CL-1

本研究は、抗体、scFv など hCL1 結合性分子の取得を目的としている。そのため、hCL1 を免疫したマウスを利用し、ハイブリドーマおよび免疫ファージ抗体ライブラリの作製を試みた。

hCL1 結合性分子の取得にあたり、hCL1 抗体を産生するマウスを作製する必要がある。しかしながら hCL1 抗体産生マウスの作製には、ヒトとげっ歯類間のホモロジーが 90% 以上と極めて高いため、hCL1 の抗原性が低いこと、抗原として用いるため

の組み換えタンパク質精製が困難であること(CL4のみ精製系が確立)などの課題が存在していた。そこで本研究においては、昨年度、自己免疫疾患モデルである BXSB マウスを免疫動物として、CL1 提示バキュロウイルスを免疫原として選択し、hCL1 免疫 scFv ライブラリを作製し、hCL1-BV を用いたスクリーニングにより hCL1 結合性 scFv クローンの取得を試みてきた。スクリーニングの結果、hCL1-BV に結合性を示す scFv クローンの取得に成功したが、いずれのクローンも WT-BV に対する結合性も示していた。BV にはウイルス由来タンパク質である gp64 が発現しており、hCL1-BV 免疫 BXSB マウスでは gp64 に対する抗体が多く産生されてしまった可能性が考えられた。そこで本年度は、gp64 に対する抗体産生を回避するために、hCL1 発現ベクターを BXSB マウスに、hCL1-BV を gp64Tg マウスにそれぞれ免疫することにした。hCL1 発現ベクターは、免疫動物体内で抗原タンパク質を発現させることで、native な立体構造に対する抗体分子の作製に優れているという利点がある。また、gp64Tg マウスでは gp64 に対する免疫寛容が起こっているため、CL-BV を免疫しても gp64 に対する抗体産生が起こらず、CL 特異的な抗体産生が見込めると考えられる。これらの免疫マウスからハイブリドーマおよび scFv ライブラリを作製し、hCL1 結合性分子の取得を試みた。

hCL1 発現ベクターを免疫した BXSB マウスにおいて、hCL1 抗体の産生が認められた。余談であるが、20 匹の免疫マウスのうち、抗体価の上昇が認められたマウスは 3 匹と決して多くなく、このことから CL 抗体作製の難しさがうかがえる。

抗体価の上昇が認められた hCL1-DNA 免疫 BXSB マウスを元にハイブリドーマを作製し、hCL1 抗体 4 クローンの作製に成功した。これらの抗体クローンはいずれも異なる抗体可変部領域配列を有しており、多様なクローンが取得できたと考えている。国立感染研深澤先生が行った HCV 感染阻害実験において、クローン間の HCV 感染阻害活性の違いが認められていることから、抗体の抗原認識部位が異なっている可能性が高い。これら

多様な結合分子を活用することで、基礎研究での新たな知見の集積にも役立つと考えている。

また、hCL1-DNA 免疫 BXSB マウスおよび hCL1-BV 免疫 gp64Tg マウスから作製した hCL1 免疫ファージ抗体ライブラリは、ライブラリサイズがそれぞれそれぞれ 1.1×10^6 CFU、 2.6×10^5 CFU であった。標準的な免疫抗体ライブラリは 10^5 - 10^6 CFU 程度のサイズであることから、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サイズを有していると考えられる。

上記の2つのライブラリをスクリーニングソースとして供し、hCL1 結合性ファージをスクリーニングしたところ、それぞれ特有のアミノ酸配列を持つ hCL1 結合性 scFv ファージクローンを 7 クローン取得した。各種 CL-BV を用いた結合性解析から、いずれの CL にも強い結合性を示すクローンや、hCL1 特異的な結合性を示すクローンなど、これらのクローンが多様な特性を有していることが明らかになった。

D. 2 CL-4

本研究は、抗体、scFv など hCL4 結合性分子の取得を目的としている。そのため、hCL4 を免疫したラットを利用し、ハイブリドーマおよび免疫ファージ抗体ライブラリの作製を試みた。

hCL4 結合性分子の取得にあたり、hCL4 抗体を産生するラットを作製する必要がある。しかしながら hCL4 抗体産生マウスの作製には、ヒトとげっ歯類間のホモロジーが 90%以上と極めて高いため、hCL4 の抗原性が低いこと、抗原として用いるための組み換えタンパク質精製が困難であること(CL4のみ精製系が確立)などの課題が存在していた。そこで本研究においては、昨年度、自己免疫疾患モデルである BXSB マウスを免疫動物として、CL4 提示バキュロウイルスを免疫原として選択し、hCL4 免疫 scFv ライブラリを作製し、hCL4-BV を用いたスクリーニングにより hCL4 結合性 scFv クローンの取得を試みてきた。スクリーニングの結果、hCL4-BV に結合性を示す scFv クローンの取得に成功したが、いずれのクローンも WT-BV に対

する結合性も示していた。BV にはウイルス由来タンパク質である gp64 が発現しており、hCL4-BV 免疫 BXSB マウスでは gp64 に対する抗体が多く産生されてしまった可能性が考えられた。そこで本年度は、gp64 に対する抗体産生を回避するために、hCL4 発現ベクターを BXSB マウスに、hCL4-BV を gp64Tg マウスにそれぞれ免疫することにした。hCL1 発現ベクターは、免疫動物体内で抗原タンパク質を発現させることで、native な立体構造に対する抗体分子の作製に優れているという利点がある。また、gp64Tg マウスでは gp64 に対する免疫寛容が起こっているため、CL-BV を免疫しても gp64 に対する抗体産生が起こらず、CL 特異的な抗体産生が見込めると考えられる。これらの免疫マウスからハイブリドーマおよび scFv ライブラリを作製し、hCL4 結合性分子の取得を試みた。

hCL4 発現ベクターを免疫した Wistar 系ラットにおいて、hCL4 抗体の産生が認められた。抗体価の上昇が認められた hCL4-DNA 免疫 Wistar 系ラットを元にハイブリドーマを作製し、hCL4 抗体 11 クローンの作製に成功した。これらの抗体クローンはいずれも異なる抗体可変部領域配列を有しており、多様なクローンが取得できたと考えている。

また、hCL4-BV 免疫 gp64Tg マウスから作製した hCL4 免疫ファージ抗体ライブラリは、ライブラリサイズが 3.0×10^5 CFU であった。標準的な免疫抗体ライブラリは 10^5 – 10^6 CFU 程度のサイズであることから、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サイズを有していると考えられる。

D. 3 CL-5

本研究は、抗体、scFv など hCL5 結合性分子の取得を目的としている。そのため、hCL5 提示 BV を免疫した gp64-Tg マウスを用いて作製した免疫ファージ抗体ライブラリの中から、CL-5 結合性クローンの取得を試み、mock-BV には結合せず、CL-5 提示 BV に結合性を示すファージクローンを複数取得することに成功した。

E. 結論

E. 1 CL-1

本研究は、独自の CL binder 研究を有効活用することで、HCV 感染阻害剤、抗がん剤、経皮吸収促進剤の基盤分子となる hCL1 binder の創製を目的としている。

本年度は、① hCL1 抗体産生マウスの作製、② hCL1 抗体産生ハイブリドーマの樹立、③ hCL1 免疫ファージ抗体ライブラリの構築、④ 独自の CL binder スクリーニング系を用いた hCL1 結合性 scFv の取得を試み、以下の成果を得た。

① hCL1 抗体産生マウスの作製

hCL1 の細胞外領域に特異的に結合する抗体および scFv を取得するため、hCL1 発現ベクターを自己免疫疾患モデルである BXSB マウスに、また膜表面に hCL1 を提示した BV を gp64Tg マウスに免疫した。どちらの免疫方法においても hCL1 抗体の産生が認められたことから、これらの免疫方法は CL binder 創製に適していると考えられる。

② hCL1 抗体産生ハイブリドーマの樹立

hCL1-DNA 免疫 BXSB マウスを元にハイブリドーマを作製し、スクリーニングを行ったところ、hCL1 抗体産生ハイブリドーマ 4 クローンの樹立に成功した。これらの抗体クローンはいずれも hCL1 特異的な結合を示しており、有用なリード分子であると考えられる。

③ hCL1 免疫ファージライブラリの構築

hCL1-DNA 免疫 BXSB マウスおよび hCL1-BV 免疫 gp64Tg マウスより、scFv 提示ファージライブラリを作製した。これらのライブラリは、十分なライブラリサイズを有しており、スクリーニングソースとして有望であると考えられる。

④ hCL1 結合性 scFv の取得

上記のライブラリから、hCL1-BV を用いたスクリーニングによって、hCL1 結合性 scFv を 6 クローン取得した。

上記の成果を踏まえ平成 25 年度は、hCL1 抗体の HCV 感染阻害剤、抗がん剤、吸収促進剤への応用の可能性を検証する予定である。

E. 2 CL-4

本研究は、独自のCL binder研究を有効活用することで、抗がん剤、粘膜ワクチン技術、薬物吸収促進剤の基盤分子となるhCL4 binderの創製を目的としている。

本年度は、① hCL4抗体産生ラットの作製、② hCL4抗体産生ハイブリドーマの樹立、③ hCL4免疫ファージ抗体ライブラリの構築、④ 独自のCL binderスクリーニング系を用いたhCL4結合性scFvの取得を試み、以下の成果を得た。

① hCL4抗体産生マウス及びラットの作製

hCL4の細胞外領域に特異的に結合する抗体およびscFvを取得するため、hCL4発現ベクターをWistar系ラットに、また膜表面にhCL4を提示したBVをgp64Tgマウスに免疫した。どちらの免疫方法においてもhCL4抗体の産生が認められたことから、これらの免疫方法はCL binder創製に適していると考えられる。

② hCL4抗体産生ハイブリドーマの樹立

hCL4-DNA免疫Wistar系ラットを元にハイブリドーマを作製し、スクリーニングを行ったところ、hCL4抗体産生ハイブリドーマ11クローンの樹立に成功した。これらの抗体クローンはいずれもhCL4特異的な結合を示しており、有用なリード分子であると考えられる。

③ hCL4免疫ファージライブラリの構築

hCL4-BV免疫gp64Tgマウスより、scFv提示ファージライブラリを作製した。これらのライブラリは、十分なライブラリサイズを有しており、スクリーニングソースとして有望であると考えられる。

上記の成果を踏まえ平成25年度は、hCL4抗体の抗がん剤、薬物吸収促進剤への応用の可能性を検証する予定である。

E. 3 CL-5

本研究は、独自のCL binder研究を有効活用し、BBBのバリア機能を担うhCL5を標的とした脳内薬物送達技術、外傷性脳損傷治療薬の基盤分子となるhCL5 binderの創製を目的としている。

本年度は、昨年度作製したscFvライブラリとCL-5提示BVシステムを用いて、CL-5結合性ファージクローンの取得を試み、CL-5結合性を示すクローンを複数同定した。

上記の成果を踏まえ、平成25年度は、scFvタンパク質を作製、CL-5結合性を解析する。また、バックアップ実験として、CL-5抗体もしくはCL-5 binder創製法についても追究する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida, T.; Kondoh, M.; Mizuguchi H.; Yagi, K. Development of an adenovirus vector containing a hepatitis C virus expression cassette and its application. *Yakugaku Zasshi*, in press.
2. Yamagishi, Y.; Watari, A.; Hayata, Y.; Li, X.; Kondoh, M.; Tsutsumi, Y.; Yagi, K. Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice. *Pharmazie*, in press.
3. Watari, A.; Kondoh, M.; Yagi, K. A simple reporter assay for screening claudin-4 modulators. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 426, 454-460.
4. Matsuhisa, K.; Kondoh, M.; Suzuki, H.; Yagi, K. Comparison of mucosal absorption-enhancing activity between a claudin-3/-4 binder and a broadly specific claudin binder. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423, 229-233.
5. Suzuki, H.; Kondoh, M.; Takahashi, A.; Yagi, K. Proof of concept for claudin-targeted drug development. *Ann NY Acad Sci*, 2012, 1258, 65-70.
6. Takahashi, A.; Saito, Y.; Kondoh, M.; Matsushita, K.; Krug, S. M.; Suzuki, H.; Tsujino, H.; Li, X.; Aoyama, H.; Matsuhisa, K.; Uno, T.; Fromm, M.; Tamakubo, T.; Yagi, K. Creation and biochemical analysis of a broad-specific

claudin binder. *Biomaterials*, 2012, 33, 3464–3474.

2012, 33, 317–324.

7. 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. *Virus Res*, 2012, 165, 214–218.
8. 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*, 2012, 2, 16–22.
9. Kondoh, M.; Takahashi, A.; Yagi, K. Spiral progression in the development of absorption enhancers based on the biology of tight junctions. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64, 515–522.
10. Takahashi, A.; Kondoh, M.; Suzuki, H.; Watari, A.; Yagi, K. Pathological changes in tight junctions and potential application into therapies. *Drug Discov Today*, 2012, 17, 727–732.
11. ○近藤昌夫、八木清仁、Claudin modulatorを用いた難吸収性薬物の消化管・経粘膜デリバリー、シーエムシー出版「難吸収性薬物の吸収性改善と新規投与製剤の開発」、2012, 68–74.
12. 近藤昌夫、八木清仁、Claudinを標的とした非侵襲性投与法の開発、シーエムシー出版「ペプチド医薬の最前線」、2012, 127–135.
13. Suzuki, H.; Kondoh, M.; Kakutani, H.; Yamane, S.; Uchida, H.; Hamakubo, T.; Yagi, K. The application of an alanine-substituted mutant of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin as a mucosal vaccine in mice. *Biomaterials*,

2.学会発表

1. Yoshida, T.; Kondoh, M.; Mizuguchi H.; Hidehiko Suzuki, Azusa Takahashi, Kohei Matsushita, Xangru Li, Hrofumi Tsujino, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Hiroshi Aoyama, Tadayoshi Uno, Kiyohito Yagi, Preparation of a broad-specific claudin binder by using *Clostridium perfringens* enterotoxin. Experimental Biology 2012, Apr 21–25, 2012, San Diego, CA, USA
2. Seiji Yamane, Takeshi Yoshida, Kazuo Takayama, Masuo Kondoh, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, Human iPS-derived hepatocyte-like cells as a model for hepatitis C virus infection. Experimental Biology 2012, Apr 21–25, 2012, San Diego, CA, USA
3. Masuo Kondoh, Proof of concept for claudin-targeted drug development using *Clostridium perfringens* enterotoxin, Invited seminar in Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), July 10, 2012, Berlin, Germany (招待講演)
4. Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Spiral progression in epithelial cell-targeted drug development, International Symposium on Epithelial Barrier and Transporter 2012, Sep 15–16, 2012, Shiga, Japan
5. Kiyohito Yagi, Takeshi Yoshida, Seiji Yamane, Kazuo Takayama, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Fuminori Sakurai, Naoya Sakamoto, Yoshiharu Matsuura, Hiroyuki Mizuguchi, Evaluation of HCV infection and replication using human iPS cell-derived hepatocytes., HCV2012 19th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses 2012, Oct 5–9, 2012, Venice, Italy.
6. Akihiro Watari, Maki Hasegawa, Masuo Kondoh,