

201227026A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成 25 (2013) 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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成 25 (2013) 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	----- 19
角田 慎一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 26

「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3万5千人が肝癌により命を落としているなかで、肝移植は肝癌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、肝癌患者の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癌患者の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、肝癌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HCV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)の創製を試みる。

昨年度は、hCL提示バキュロウイルスを免疫したマウスをもとに、scFv提示ファージライブラリを作製し、hCL1binderのスクリーニングを行ったが、得られたbinderのほとんどがバキュロウイルスの膜蛋白質であるgp64にも結合するものであった。そこで本年度は、gp64に結合するbinderを排除するため、gp64に対し免疫寛容が成立しているgp64トランスジェニックマウスを利用することにより、再度scFv提示ファージライブラリを構築した。作製したライブラリからhCL1binderのスクリーニングを行ったところ、gp64には結合せず、hCL1に結合性を示すファージクローンを複数得ることに成功した。これらのクローンの中には、hCL1特異的に結合するもの、hCL1のみならずhCL2,4,5にも結合性を示すものなど多様なクローンが含まれていた。上記の成果を踏まえ、来年度は得られたクローンをもとにscFv蛋白質を精製し、HCV感染阻害活性を有するhCL1結合性scFvの取得を試みる。

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

と進行することが多い。現在、C型肝炎の治療法としては、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、その奏成功率は50%にとどまっているのが現状である。また、肝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

A. 研究目的

現在、本邦では約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患者において慢性化が認められ、その後、肝硬変、肝癌へ

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。さらに、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。

近年、claudin (CL)-1、CD81、Scavenger receptor class B type I (SR-BI)、occludinがHCV感染受容体として機能していることが明らかとなり、HCV感染受容体をターゲットとした新たなC型肝炎治療薬開発の可能性が話題となった。2010年に抗CL-1抗体がHCVの感染を阻害することが報告され、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のが極めて困難であること、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が見出した。BVを用いた方法では、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を利用することで、迅速かつ簡便にCL binderを創製するシステムを構築した。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'-gctctagaatggattacaaggatgacgacgataagatggccaacgcggggctgcagctg-3')、Reverse primer (5'-cgggggtacctcacacgtagtctttcccgctggaaggtgcagg-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'-ggactagatggcctctcttgacctcaac-3' を、Reverse primer として 5'-cgggggtacctcacacatacctgtcaggctgtag-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' -tggatgaactgcgtgggtg -3')、Reverse primer (5' -ggttgtagaagtcgcggtg -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。hcaludin-5 クローニング用のプライマーは、Forward primer (5' -ataagaatgcggccgcatcatcatcatcatcatcatg gggctccgcagcgttgagatcctg-3')、Reverse primer (5' -ccgctcgagtcagacgtagttcttctgtcgtagtcgcc -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' - ggaaacagctatgacccatg -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、泡立て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 Na_2HPO_4 , 1.15 mM KH_2PO_4) 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. 2 hCL1 発現細胞の作製

B. 2. 1 pcDNA3.1 (-) -hCL1 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 \times PCR buffer for KOD plus 2 μ l、2.5 mM MgSO_4 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' -ctagctagcatggccaacgcggggctgca-3')、Reverse primer (5' -aaacttaagtccacacgtagctcttcccgtgg-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。トランスフォーマクター 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。

B. 2. 2 hCL1 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 plasmid 2 ug をそれぞれ Opti-MEM1 (GIBCO) 100 ul と FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche) 4 ul 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 ug/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. 3 抗 hCL1 抗体産生マウスの作製

B. 3. 1 gp64 トランスジェニックマウスへの hCL1-BV 免疫

雌性 gp64 トランスジェニックマウスに用時調整した hCL1-BV を 2 回投与し、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 × 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 FACS 解析による血清中抗 hCL1 抗体産生確認

hCL1 発現 HT1080 細胞を 5.0×10^5 /sample となるように 96 well plate に播種し、1.0% BSA-PBS で 1,000 倍希釈したマウス血清を添加、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 mg/mL となるように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACS Calibur にて測定し、CellQuestPro

にて解析を行った。

B. 4 hCL1 免疫 scFv 提示ファージライブラリの作製

B. 4. 1 hCL1 免疫マウス脾臓からの mRNA の精製と cDNA の合成

hCL1-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 500 ng から SuperScript III First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用い 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 μl、10 x PCR buffer 2.5 μl、dNTP mix 2 μl、10 μM primers 1 μl、滅菌精製水 18.4 μl、5 U/ml Takara ExTaqTM 0.1 μl 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' -tcttcaccaccatggagaag-3', Reverse; 5' -accacctggtgctcagtga-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 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 パンニングおよび hCL2-BV, hCL4-BV, hCL5-BV によるサブトラクション

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 3.3 μg/well/100 μl TBS ずつ hCL2-BV, hCL4-BV, hCL5-BV (計 10 μg/well/100 μl 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 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 hCL1-BV によるパンニング

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 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 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 で五回洗浄し、20 mM glycine-HCl (pH 2.0) を 100 μl 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 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 = 0.3-0.6 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 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C で 1,000 rpm 培養後、M13K07 helper phage を添加した。37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 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 $^{\circ}$ 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 3 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 5 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. 7 hCL1 結合性 scFv のシークエンス解析

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 の挿入を確認した。

残りの培養液に 2YTGA 培地 12ml を加え、37 $^{\circ}$ 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 (300-600ng) とプライマー 6.4mol (forward primer: pY03s-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クエンス解析を委託した。

C. 研究結果

C. 1 hCL 発現 BV の作製

hCL1 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 hCL1 を発現させた BV (hCL1-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、hCL1-DNA を組み込んだ pFastBac-hCL1 を作製した。作製した pFastBac-hCL1 の hCL1 領域の配列は、シークエ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、hCL1-BV 作製用の bacmid DNA (hCL1-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 hCL1-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 hCL1-BV を供した Western Blot 法により、hCL1-BV における hCL1 の発現解析を行った結果、hCL1 の発現を確認した(Figure 1)。なお、ポジティブコントロールとして hCL1 発現 HT1080 細胞 (hCL1/HT1080) を用いた。

C. 2 gp64 トランスジェニックマウスへの hCL1-BV の免疫

雌性 gp64 トランスジェニックマウスに hCL1-BV を 2 回免疫した後、マウスより回収した血清を用いて抗体産生を確認した。FACS 解析から、hCL1 抗体の産生が確認された(Figure 2)。

C. 3 hCL1 免疫 scFv ライブラリ作製用 cDNA の合成

抗体産生確認後、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(Figure 3)。

C. 4 hCL1 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 × 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。また 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、非結合ファージを回収し、大腸菌 TG-1 に感染させ増幅した。その後再び調製したファージを hCL1-BV に作用させた。このサイクルを繰り返すことで hCL1-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 3 round 後には顕著な濃縮傾向が観察された (Figure 4)。

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 5)。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、2 つのクローンは hCL1 特異的に結合した。7 つのクローンはすべての CL-BV に結合性を示した。(Figure 6)。

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。そこで、9 クローンすべてのシーケンス解析を行った結果、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。その内、1 つの配列は hCL1-BV 特異性を示唆したクローンの配列である。(Table)

D. 考察

昨年度は、CL 提示 BV を免疫した CL 欠損マウスもとに scFv 提示ファージライブラリを構築し、本ライブラリから hCL1 binder のスクリーニングを行ったが、得られた binder は全て BV の膜蛋白質である gp64 にも結合するものであった。そこで本年度は、gp64 に対し免疫寛容が起こっている gp64 トランスジェニックマウスを利用することにより、gp64 に対する binder が除かれたライブラリの作製を試みた。基本的なストラテジーは昨年度と同様に、gp64 トランスジェニックマウスに hCL1-BV を免疫することで抗 hCL1 抗体の産生を誘導し、本マウスの脾臓をもとに scFv 提示ファージライブラリの構築を行った(角田班の報告を参照)。

構築したライブラリから gp64 に結合する binder を排除するため、WT-BV を用いたサブトラクションパンニングを行った。続いて、hCL1 binder を取得するため、hCL1-BV によるパンニング操作を 3

round 行い、hCL1 binder を濃縮した。3rd パンニング後のファージをモノクローン化し、CL への結合性を調べたところ、hCL1 への結合性を有するクローンが複数得られた。また、これらのクローンは WT には結合性を示さないものであった。従って、gp64トランスジェニックマウスを利用することにより gp64 には結合性を示さず、hCL1 に結合性を示す binder を取得することに成功した。続いて、得られた binder の CL 結合特異性を調べた結果、hCL1 のみならず hCL2,4,5 にも結合性を示すクローン、結合性は弱いものの hCL1 特異的に結合性を示すクローンが存在した。CL への結合性が異なるクローンは、それぞれ独自の VL, VH 領域を保持していた。以上、hCL1 結合性ファージクローンの取得に成功したことから、来年度は得られたファージをもとに CL-1 結合性 scFv を精製し、CL-1 への親和性および特異性などの結合特性解析を行う。また、*in vitro* HCV 感染モデルを利用した感染阻害効果の検証を行うことにより HCV 感染阻害活性を有する claudin-1 結合性 scFv の取得を試みる。

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hCL1 binderの創製を目的としている。

本年度は、(1) gp64トランスジェニック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、(2) hCL発現BVを用いたhCL1 binderのスクリーニングを試み、以下の成果を得た。

(1) gp64トランスジェニック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

バキュロウイルス膜蛋白質であるgp64に結合性を示すbinderを排除するため、gp64トランスジェニックマウスにhCL1提示BVを免疫し、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。

(2) hCL発現BVを用いたhCL1 binderのスクリーニング
gp64には結合せず、hCL1へのみ結合性を示す

scFvを得るため、(1)で作製したライブラリからWT-BVに結合するものを排除した後、hCL1-BVに結合するものをスクリーニングした結果、gp64には結合せずにhCL1に結合するクローンを複数取得することに成功した。これらのクローンの中には、様々なCLに結合性を示すもの、hCL1にのみ結合性を示すものが含まれていた。

上記の成果を踏まえ平成 25 年度は、得られたクローンをもとに scFv 蛋白質を精製し、HCV 感染阻害活性を有する hCL1 結合性 scFv の取得を試みる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watari A, Yagi K, Kondoh M. : A simple reporter assay for screening claudin-4 modulators., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 426(4):454-60, 2012.
2. Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K. : Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice. *Pharmazie*, 68(3):178-82, 2013.

2. 学会発表

1. Suzuki H., Takahashi A., Matsushita K., Li X., Tsujino H., Watari A., Kondoh M., Aoyama H., Uno T., Yagi K., Preparation of a broad-specific claudin binder by using *Clotridium perfringens* enterotoxin., *Experimental Biology* 2012, Apr 21-25, SanDiego, USA.
2. Yagi K., Yoshida T., Yamane S., Takayama K., Watari A., Kondoh K., Sakurai F., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., 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, Venice, ITALY.
3. Watari A., Hasegawa M., Kondoh M. Yagi K., Establishment of a cell-based screening system for chemical modulators of claudin expression., Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia, 2012, Nov 1-4, Merida, MEXICO.
 4. Doyama R., Suzuki H., Matsushita K., Li X., Takahashi A., Matsuhisa K., Tsujino H., Watari A., Kondoh M., Aoyama H., Uno T., Yagi K., Biochemical analysis of a claudin ligand that exhibits a broad binding specificity., Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia, 2012, Nov 1-4, Merida, MEXICO.
 5. 鈴木英彦、山根誠司、角谷英樹、高橋 梓、内田博司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、Claudinを標的とした動態制御技術の現状と課題、第28回DDS学会学術集会、平成24年7月4日、札幌市、北海道
 6. 土山 亮、長瀬翔太郎、鈴木英彦、李相儒、山根誠司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、Clostridium perfringens enterotoxin断片を利用した claudin指向性吸収促進技術の安全性評価、第59回トキシシンポジウム平成24年年8月30-31日、帯広市、北海道
 7. 山下真代、長瀬翔太郎、高橋梓、岩成宏子、近藤昌夫、渡利彰浩、浜窪隆雄、八木清、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第2報～免疫抗体ライブラリの最適化～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
 8. 長瀬翔太郎、山下真代、飯田愛未、渡利彰浩、近藤昌夫、深澤征義、八木清、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第2報～免疫抗体ライブラリの最適化～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
 9. 平垣有史、李相儒、清水芳実、渡利彰浩、近藤昌夫、深澤征義、八木清、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第4報～claudin-4特異的 binderの創製～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
 10. 長谷川真希、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第5報～低分子tight junction modulatorの創製～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
 11. 早石知浩、近藤昌夫、渡利彰浩、永浜政博、八木清、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第6報～ Tricellular junction modulatorの創製～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
 12. 李相儒、近藤昌夫、渡利彰浩、八木清仁、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第7報～ claudin-3/-4結合分子(C-GPE)の体内動態解析～、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
 13. 山岸喜彰、渡利彰浩、李相儒、吉岡靖雄、近藤昌夫、堤康央、八木清、ナノ・サブナノ白金の Maus 肝臓における毒性評価、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
 14. 山岸喜彰、渡利彰浩、李相儒、吉岡靖雄、近藤昌夫、堤康央、八木清、ナノ・サブナノ白金の Maus 腎臓における毒性評価、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
 15. 清水芳実、近藤昌夫、渡利彰浩、深澤征義、八木清仁、タイトジャンクションによる薬物代謝活性制御の可能性、日本薬学会 第133年会、平成25年3月27-30日、横浜、神奈川県
- 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

- ・ 近藤昌夫(准教授)
- ・ 長瀬翔太郎(大学院生)

3. その他

該当事項なし

1. 研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科:

- ・ 八木清仁(教授)

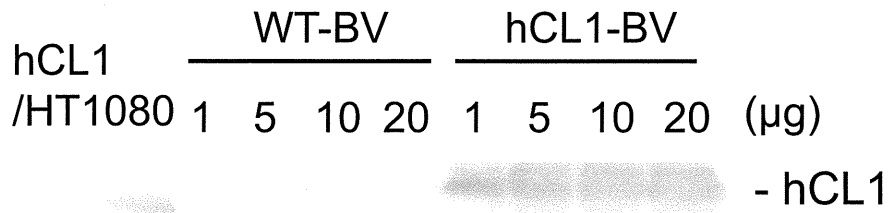


Figure 1 Preparation of CL1-expressing BVs.

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

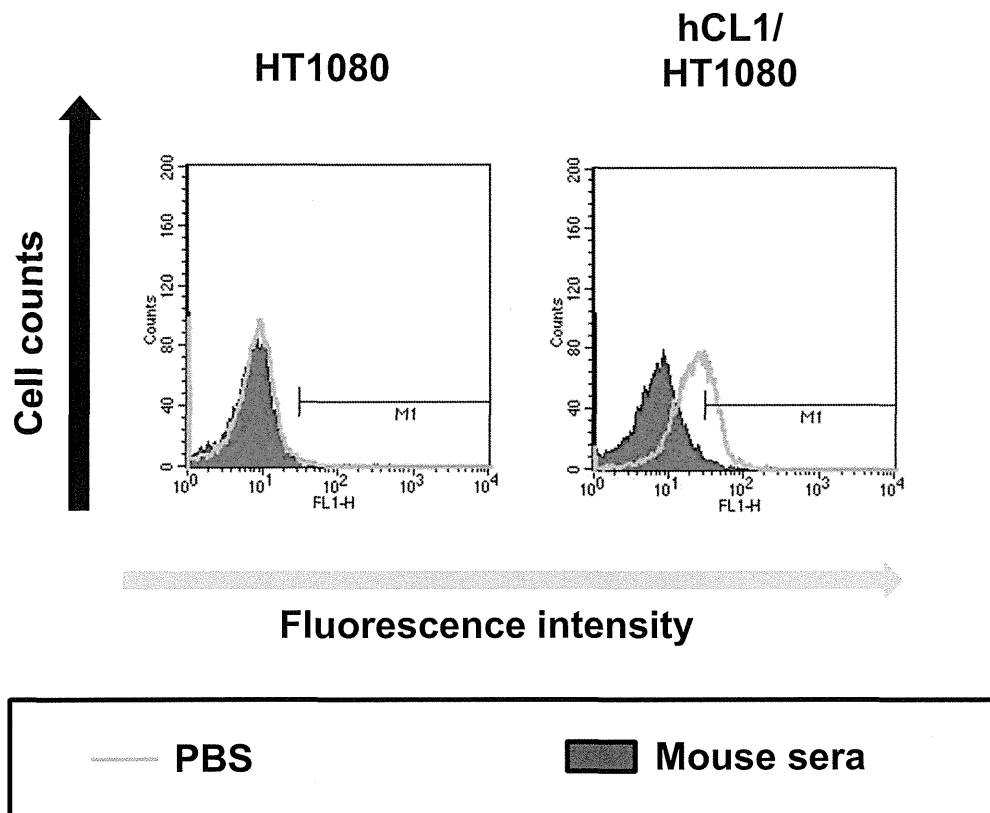


Figure 2 Detection of anti-hCL1 antibodies in the sera of gp64Tg mouse immunized with hCL1-dysplayed budded baculovirus.

hCL1/HT1080 cells were incubated with 1000-fold dilution of the sera of the sera of gp64Tg mouse immunized with hCL1-dysplayed budded baculovirus, and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). The antibodies-bound cells were detected using a flow cytometer. As a control, cells were incubated with phosphate buffered saline (PBS).

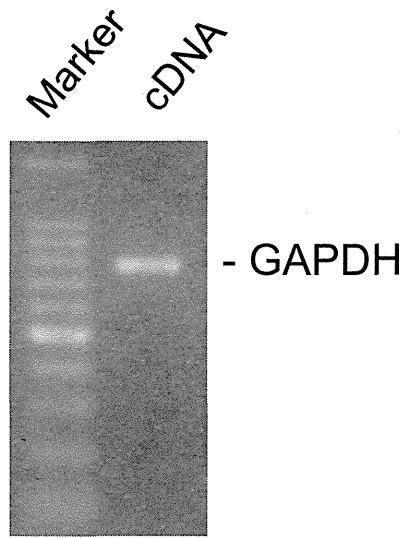


Figure 3 Preparation of cDNA for construction of scFv phage display library.

cDNA was made from mRNA purified from spleen in gp64Tg mice immunized with hCL1-BV. By using the cDNA, GAPDH expression was analysed by RT-PCR. The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis, followed by staining with ethidium bromide.

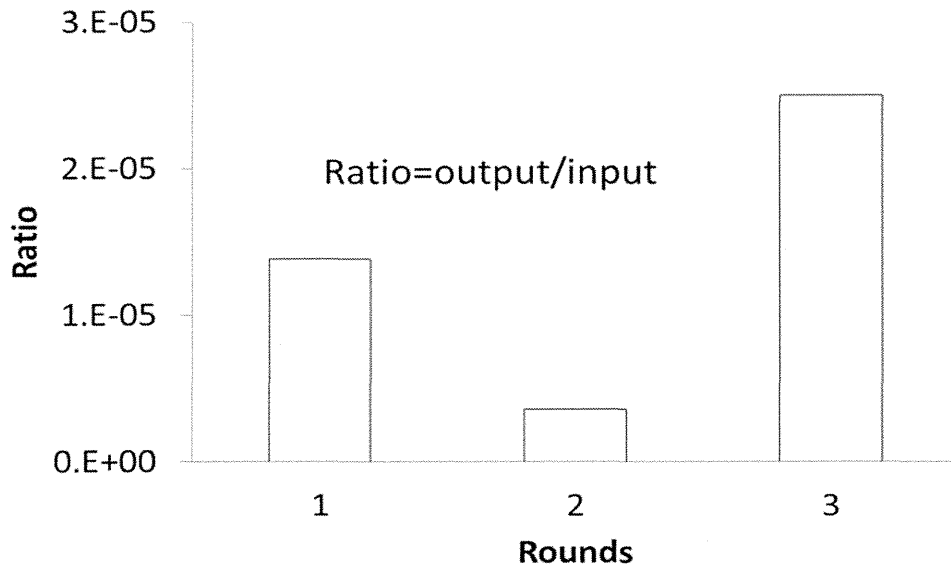


Figure 4 Panning of a hCL1 binder.

Enrichment of phages with affinity to hCL1-BV. Immunoplate coated with hCL1-BV were incubated with the scFv phage library at 1.1×10^{12} CFU titer (1st input phage). The phages bound to hCL1 - BV were recovered (1st output phage). The hCL1-BV-binding phages were subjected to another additional cycle of the incubation and wash step, resulting in 2nd, 3rd output phage. The ratio of output phage to input phage titers was calculated.

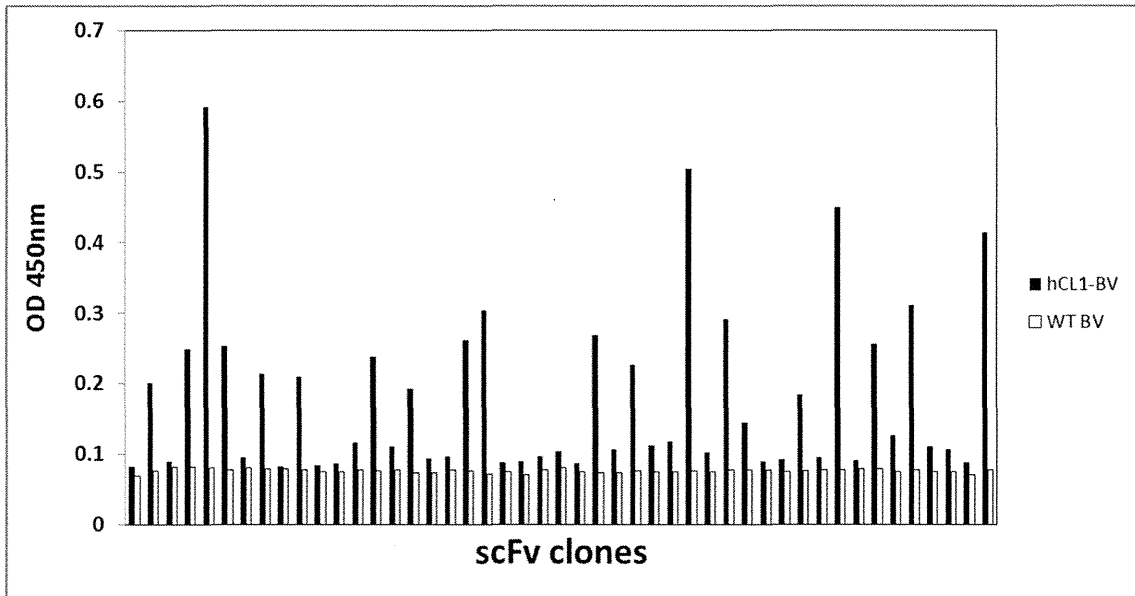


Figure 5 Screening of a hCL1 binder.

Monoclonal analysis of scFv phage. Phage clones after 3rd round panning with hCL1 -BV were adopted to the WT- or hCL1-BV-coated immunoplates. Phage clones bound to the CL-BV-coated immunoplates were detected by ELISA with an anti-M13 mAb.

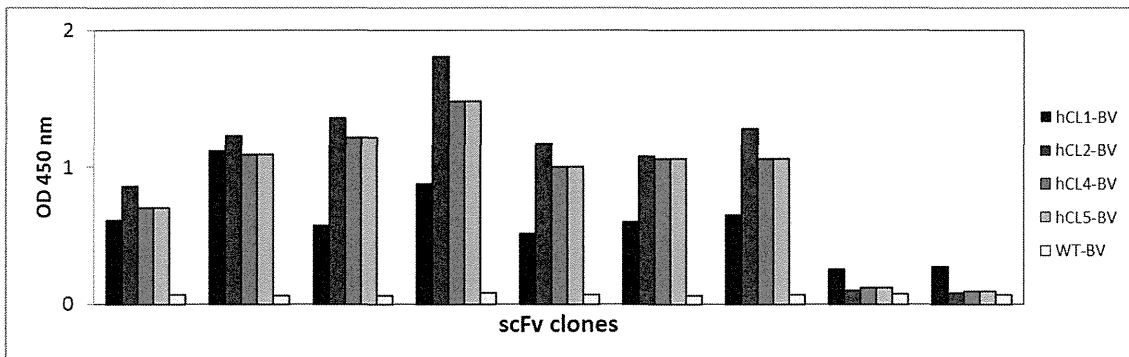


Figure 6 CL-binding characterization of the isolated hCL1 binders.

Monoclonal analysis of scFv phage. Phage clones after 3rd round panning with hCL1 -BV were adopted to the WT- or hCL1-,hCL2-,hCL4-,hCL5-BV- coated immunoplates. Phage clones bound to the CL-BV-coated immunoplates were detected by ELISA with an anti-M13 mAb.