

201307020A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成26(2014)年 3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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成26（2014）年 3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	88
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	95
深澤征義	
3. Claudin binderの創製および活性解析	106
石井明子	
4. 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	118
國澤純	
5. DNAメチル化による血管内皮細胞特異的遺伝子発現制御	127
岡田欣晃	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	131
IV. 研究成果の刊行物・別刷	139

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、昨年度までに作製した scFv ライブラリを用いた CL binder の創製、および昨年度取得した各種抗体の活性解析を試みた。

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、癌ターゲットング法、粘膜ワクチン技術、C型肝炎ウイルス感

B. 研究方法

B. 1 抗 CL-1 抗体の結合性解析

B. 1. 1 マウス CL-1(mCL-1)変異体を用いた抗 CL-1 抗体のエピトープ解析

mCL-1 または mCL-1 変異体(K31R、I46M、N74S、L152M、I155V)発現 HT1080 細胞をトリプシン処理により回収した。5.0 × 10⁵ cells/sample に対し、各抗体 5 µg/mL を 100 µL 添加し、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 1 回洗浄後、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B. 1. 2 ペプチドスポットアレイを用いた抗 CL-1 抗体(clone 7A5)のエピトープ解析

hCL-1 の全長アミノ酸配列を元に、長さ 15 アミノ酸、3 アミノ酸ずらしになるようにペプチド断片を設計した(table 1)。Fmoc 固相合成法によりセルロースメンブレンに各種ペプチド断片をスポットし、ペプチドスポットアレイを作製した。

上記ペプチドスポットアレイに対し、一次抗体として 0.5 µg/mL に調製した clone 7A5 を 2 時間、二次抗体として 5,000 倍希釈した Goat anti-mouse IgG HRP conjugated(Millipore)を 1 時間、常温で順に作用させ、ECL prime Western blotting detection system(GE Healthcare Bio-Sciences Corp)を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp)により検出を行った。なお、各抗体の希釈には 2% skim milk-T-TBS

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した。

平成 25 年度は、①抗 CL-1 抗体の創薬シーズとしての可能性の検証、②抗 CL-4 抗体の創薬シーズとしての可能性の検証、③抗 CL-2 抗体の創製、④抗 CL-5 抗体創製へ向けた基盤研究を行った。

を用いた。

B. 1. 3 遊離ペプチド断片を用いた抗 CL-1 抗体(clone 7A5)のエピトープ解析

clone 7A5 が 0.5 µg/mL、各ペプチド断片が 1.0 mg/mL になるように、1% BSA-PBS 中に調整し、4°Cで一晩、incubate した。hCL-1/HT1080 細胞もしくは Huh7.5.1-8 細胞 5 × 10⁵ cells/sample に対し、上記希釈液を 100 µL 添加し、B. 1. 1 と同様の操作で FACS 解析を行った。

B. 1. 4 hCL-1 変異体を用いた抗 CL-1 抗体のエピトープ解析

hCL-1 または各種 hCL-1 変異体一過性発現 293T 細胞を PBS 中でピペッティングすることにより回収した。5.0 × 10⁵ cells/sample に対し、各抗体 2 µg/mL を 100 µL 添加し、B. 1. 1 と同様の操作で FACS 解析を行った。

また、回収した各発現細胞から作製した細胞可溶化液を用いて、Western blot 解析を行った。なお、細胞可溶化液は、細胞を protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-X を含む PBS で懸濁後、超音波処理で破碎し調製した。細胞可溶化液および polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories) により 240 mA、20 分間処理することで、polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に転写した。転写後、PVDF 膜を 5% skim milk-T-TBS に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキングを行った。T-TBS で洗浄し、一次抗体: Mouse 抗 FLAG 抗体(wako)、clone 7A5 また

は Mouse 抗 GAPDH 抗体 (abcam) と 2 時間、二次抗体 : Goat anti-mouse IgG HRP conjugated (Millipore) と 1 時間反応させた。なお、抗体液の調整には 2% skim milk-T-TBS を用いた。T-TBS で洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp) または ECL plus Western blotting detection system (GE hCL-1、mCL-1 および rCL-1 発現 293T 細胞を PBS 中でピペティングすることにより回収した。5.0 × 10⁵ cells/sample に対し、各抗体 2 μg/mL を 100 μL 添加し、B. 1. 1 と同様の操作で FACS 解析を行った。

B. 2. CL-1 を標的とした C 型肝炎治療法開発へ向けた基礎検討

B. 2. 1 マウス抗 CL-1 抗体の in vivo HCV 感染阻害試験

ヒト肝臓キメラマウス (uPA-SCID マウス) は株式会社フェニックスバイオより入手した。雄性、12~16 週齢、体重 15 g 以上、血中ヒトアルブミン 7.0 mg/mL 以上の個体を選択した。群編成では、体重の相加平均値および血中ヒトアルブミン濃度の相乗平均値を考慮してマウスを 3 群に振り分けた。

コントロールマウス抗体、clone 3A2 または clone 7A5 を、マウスに腹腔内投与した。初回投与日を day 0 とし、抗体投与量は day 0 に 30 mg/kg、day 3 に 20 mg/kg、day 7 に 10 mg/kg、day 10 に 10 mg/kg とした。抗体投与液の希釈には PBS を用いた。

初回抗体投与の 8 時間後にマウスにイソフルラン麻酔を施し、生理食塩水で 1.0 × 10⁵ copies/mL に調製した HCV (genotype 1b) 100 μL を眼窩静脈叢に静脈内接種した。

Day -7、day -3、day -1、day 0、day 3、day 7、day 10、day 14、day 21、day 28、day 35、day 42 に、マウスの一般状態を観察し、体重を計測した。なお、day 0、day 3、day 7、day 10 は抗体投与前に行った。

Day 0、day 3、day 7、day 10、day 14、day 21、

Healthcare Bio-Sciences Corp) を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp) により検出を行った。

B. 1. 5 抗 CL-1 抗体のウイスターラット CL-1 (rCL-1) に対する結合性解析

day 28、day 35、day 42 に採血を行った。なお、day 0、day 3、day 7、day 10 は抗体投与前に行った。採血では、マウスにイソフルラン麻酔を施し、眼窩静脈叢より採血した。

Day 0、day 7、day 14、day 21、day 28、day 35、day 42 の採血液を用いて血清中 HCV RNA 量を測定した。採取した血清 5 μL から SepaGene RV-R (エーディア株式会社、東京) を用いて RNA 抽出を行い、RNA を 1 mM DTT (プロメガ株式会社、東京) と 0.4 U/μL ribonuclease inhibitor (タカラバイオ株式会社、滋賀) を含む 10 μL の Nuclease-free water (Life Technologies Corporation、CA、USA) に溶解した。PCR 反応液は、溶解した RNA 原液もしくは希釈した RNA を 2.5 μL と TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents (Life Technologies Corporation) を用いて調製した。PCR 反応と解析には ABI Prism 7500 (Life Technologies Corporation) を用いた。RT-PCR 反応は、50°C 2 分→60°C 30 分→95°C 5 分→(95°C 20 秒→62°C 1 分) × 50 サイクルで行った。

Day 0、day 7、day 14、day 21、day 28、day 35、day 42 の採血液を用いて血中ヒトアルブミン濃度を測定した。血液 2 μL を緩衝液 (LX 試薬 栄研シリーズ 共用緩衝液、栄研化学株式会社、東京) と混合し、370 g、3 分間の遠心分離を行った後、ラテックス凝集免疫比濁法 (LX 試薬' 栄研' Alb-II、栄研化学株式会社、東京) を用いて、吸光マイクロプレートリーダー (Vmax、日本モレキュラーデバイス株式会社、東京) で測定した。

Day 0、day 7、day 14、day 21、day 28、day 35、day 42 の採血液を用いて血清中 ALT および AST 活性を測定した。採取した血清 10 μL を生理食塩液で希釈し、POP・POD・ロイコ色素法 (ピルビン酸

オキシダーゼにより発生する過酸化水素とペルオキシダーゼによりジアリールイミダゾールロイコ色素を青色に発色)により、ドライケム 3500(富士フィルム、東京)を用いて測定した。

また day 42 以降、HCV 感染成立が確認されたコントロールマウス抗体投与群を用いて、Peginterferon Alfa-2a (pegasys)(中外製薬株式会社、東京)と clone3A2 の併用による抗 HCV 治療相乗効果を検討した。コントロールマウス抗体投与群を、pegasys とコントロール抗体の併用投与群、pegasys と clone 3A2 の併用投与群の 2 群に振り分けた。Day 42、day 45、day 49、day 52 に pegasys を単回皮下投与した。Pegasys 投与量は 0.03 mg/kg とした。Pegasys 投与液の希釈には生理食塩液を用いた。その後、day 52、day 56、day 59 にコントロールマウス抗体または clone 3A2 を単回腹腔内投与した。抗体投与量は 30 mg/kg とし、抗体投与液の希釈には PBS を用いた。

Day 42、day 45、day 49、day 52、day 56、day 59、day 63、day 66、day 70 に、マウスの一般状態の観察、体重計測、および採血を行った。採血では、マウスにイソフルラン麻酔を施し、眼窩静脈叢より採血した。

Day 42、day 45、day 49、day 52、day 56、day 59、day 63、day 66、day 70 の採血液を用いて血清中 HCV RNA 量、血中ヒトアルブミン濃度、血清中 ALT および AST 活性を上記と同様の方法で測定した。

B. 2. 2 抗 CL-1 低分子抗体(Fab)の作製及び HCV 感染阻害活性解析

B. 2. 2. 1 抗 CL-1 低分子抗体(Fab)の作製、精製

Fab preparation kit(Thermo)を用い、マウス抗体から抗 CL-1 低分子抗体(Fab)を作製した。抗体サンプルの脱塩処理を行うため、Zeba Spin Desalting Column を Digestion buffer で平衡化し、Column に 1.2 g/500 μ L の clone 2C1 または clone 3A2 を添加し 1,000 g で 2 分遠心を行い、抗体を含む素通り画分を回収した。0.8 mL spin column に 125 μ L の papain を添加し、5,000 g で 1 分遠心し、

digestion buffer にて 1 回洗浄を行った後、上記素通り画分を添加した。37°C で 4 時間、転倒混和し各マウス抗体をパパインで処理し、5,000 g で 1 分遠心し、IgG パパイン消化物を含む素通り画分を回収後、column に 500 μ L の PBS を添加し、再び遠心を行い、回収した素通り画分と混合した。Protein A column を PBS で平衡化し、サンプルを添加後、室温で 10 分転倒混和することで Fc 領域をトラップし、1,000 g で 1 分遠心、素通り画分を精製 Fab 溶液として回収した。さらに Fab の精製を確認するため、Protein A column に Elution buffer 添加し、1,000 g で 1 分遠心することで Fc 領域を回収した。

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. 2. 2. 2 各種 CL に対する結合性解析

hCL-1、hCL-2、hCL-3、hCL-4、hCL-6、hCL-7 もしくは hCL-9 発現 HT1080 細胞または mCL-1 発現 L 細胞をトリプシン処理により回収した。5.0 \times 10⁵ cells/sample に対し、各 Fab 5 μ g/mL を 100 μ L 添加し、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(Fab specific)-FITC 抗体(SIGMA-ALDRICH)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. 2. 2. 3 Huh7.5.1-8 細胞に対する結合性評価

Huh7.5.1-8 細胞をトリプシン処理により回収した。5.0 \times 10⁵ cells/sample に対し、各 Fab 5 μ g/mL を 100 μ L 添加し、B. 2. 2. 2 と同様の操作で FACS 解析を行った。

B. 2. 2. 4 Cell cultured HCV(HCVcc、genotype 2a)を用いた感染阻害活性評価

Huh7.5.1-8 細胞を 5×10^4 cells/well/500 μ L で 48 well plate に播種し、一晚培養した。マウス IgG、マウス Fab を培地で各濃度に調製し、前培養していた細胞の培地を除いて 200 μ L/well の抗体を加え、室温で 30 分静置した。

HCVcc (genotype 2a) を 50 倍希釈したものをそれぞれ 200 μ L/well 添加し、室温で 2 時間培養した。培地 500 μ L/well で 3 回洗浄し、前処理の 1/2 の濃度にした抗体液 400 μ L を加え、37°C で 4 日間培養した。

培養上清を回収後、PBS 500 μ L/well で 3 回洗浄し、FARB Buffer (1% β -ME) を 350 μ L/well 加え、エッペンに回収し RNA 精製を行い、滅菌水 50 μ L で溶出した。Nano Drop で RNA 濃度を測定し、-80°C で保存した。

精製した RNA を用いて下表の通り調製し、Light Cycler (Roche) にて逆転写定量 PCR を行った。

組成	Volume(μ L)
Distilled Water	2.4
RNA direct realtime PCR master mix	10
50mM Mn(AcO) ₂	1
Sense Primer 10uM	0.6
Antisense Primer 10uM	0.6
Taqman Probe 10uM	0.4
RNA sample	5

B. 2. 2. 5 HCV pseudoparticles (HCVpp、genotype 1b または 2a) を用いた感染阻害活性評価

Huh7.5.1-8 細胞を 5×10^4 cells/well/500 μ L で 48 well plate に播種し、一晚培養した。マウス IgG、マウス Fab を培地で各濃度に調製し、前培養していた細胞の培地を除いて 200 μ L/well の抗体を加え、室温で 30 分静置した。

HCVpp (genotype 1b または 2a) をそれぞれ 200 μ L/well 添加し、37°C で 6 時間培養した。培地 500 μ L/well で 3 回洗浄し、前処理の 1/2 の濃度にした抗体液 400 μ L を加え、37°C で 3 日間培養した。

培地を除去後、Lysis Buffer を 100 μ L/well 加え、

エッペンに回収し、10,000 rpm、1 分間遠心し、氷上に置いた。サンプル上清 10 μ L と発光基質(ピツカジーン) 50 μ L を混ぜ、Luminescencer-PSN でルシフェラーゼ活性を測定した。

B. 2. 3 ヒト IgG1 キメラ化抗 CL-1 抗体の作製及び HCV 感染阻害活性解析

B. 2. 3. 1 発現ベクター作製

マウス抗 CL-1 抗体 (clone 2C1, clone 3A2, clone 5F2, clone 7A5) の可変部領域である VL、VH 遺伝子を PCR 法により増幅した。なお、VL 遺伝子の上流に Age I サイト、下流に BsiW I サイト、VH 遺伝子の上流に EcoR I サイト、下流に Nhe I サイトを付加した。PCR 産物を電気泳動により分離・精製した。

増幅した VL 遺伝子およびヒト IgG kappa 鎖定常領域をもつクローニングベクターである pFUSE2-CLIg-hk (invivogen) を Age I および BsiW I で処理後、ライゲーションした。また、増幅した VH 遺伝子およびヒト IgG1 重鎖定常領域をもつクローニングベクターである pFUSE-CH1g-hG1 (invivogen) を EcoR I および Nhe I で処理後、ライゲーションした。各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、回収したプラスミド DNA のシーケンス解析を行い、pFUSE2-CLIg-hk-anti-CL-1 および pFUSE-CH1g-hG1-anti-CL-1 を得た。

B. 2. 3. 2 ヒト IgG1 キメラ化抗 CL-1 抗体の作製、精製

フラスコに 5×10^5 cells/mL に調製した CHO-S 細胞を 150 mL 入れ、37°C、8% CO₂ 環境下で一晩培養した。pFUSE2-CLIg-hk-anti-CL-1 および pFUSE-CH1g-hG1-anti-CL-1 各 93.75 μ g を混合し、OptiPRO SFM を加え 3 mL に調製し攪拌した。別のエッペンに FreeStyle™ MAX Reagent (invitrogen™) 187.5 μ L と OptiPRO SFM 2812.5 μ L を加え転倒混和し、発現ベクターの溶液に加え混和し、10 分間常温静置した。CHO-S 細胞の入った

フラスコに、上記の混合液全量加えた。その後 6 日間、37°C、8% CO₂ 環境下で培養し、上清を回収した。

回収した上清を 100 g、5 分間遠心にかけて、0.45 μm filter を通した。HiTrap Protein G HP (GE Healthcare) を MilliQ 水 5 mL で洗浄後、0.02M リン酸バッファー 10 mL でカラムの平衡化を行った。サンプルをカラムに通した後、0.02M リン酸バッファー 20 mL で洗浄、5 mL の 0.1M Glycine-HCl で溶出した。溶出の際は、あらかじめエッペンに 37.5 μL の 1M Tris-HCl を入れておいたものに 0.5 mL ずつ回収した。溶出後のサンプルは PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いて PBS にバッファー置換した。

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. 2. 3. 3 各種 CL 発現細胞に対する結合性解析

hCL-1、hCL-2、hCL-3、hCL-4、hCL-6、hCL-7 もしくは hCL-9 発現 HT1080 細胞または mCL-1 発現 L 細胞をトリプシン処理により回収した。5.0 × 10⁵ cells/sample に対し、各抗体 5 μg/mL を 100 μL 添加し、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-human IgG (H+L)-FITC 抗体 (Jackson Immuno Research) 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 μg/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. 2. 3. 4 Huh7.5.1-8 細胞に対する結合性評価

Huh7.5.1-8 細胞をトリプシン処理により回収した。5.0 × 10⁵ cells/sample に対し、各抗体 5 μg/mL を 100 μL 添加し、B. 2. 3. 3 と同様の操作で FACS 解析を行った。

B. 2. 3. 5 Cell cultured HCV (HCVcc, genotype

2a) を用いた感染阻害活性評価

Huh7.5.1-8 細胞を 5 × 10⁴ cells/well/500 μL で 48 well plate に播種し、一晚培養した。マウス抗 CL-1 抗体、ヒト IgG1 キメラ化抗 CL-1 抗体、コントロール抗体を培地で各濃度に調製し、前培養していた細胞の培地を除いて 200 μL/well の抗体を加え、室温で 30 分静置した。

HCVcc (genotype 2a) を 50 倍希釈したものをそれぞれ 200 μL/well 添加し、室温で 2 時間培養した。培地 500 μL/well で 3 回洗浄し、前処理の 1/2 の濃度にした抗体液 400 μL を加え、37°C で 4 日間培養した。

培養上清を回収後、PBS 500 μL/well で 3 回洗浄し、FARB Buffer (1% β-ME) を 350 μL/well 加え、エッペンに回収し RNA 精製を行い、滅菌水 50 μL で溶出した。Nano Drop で RNA 濃度を測定し、-80°C で保存した。また、回収した培養上清 150 μL ずつから Viral Nucleic Acid Extraction Kit を用いて RNA を精製し、-80°C で保存した。

精製した RNA を用いて下表の通り調製し、Light Cycler (Roche) にて逆転写定量 PCR を行った。

組成	Volume (μL)
Distilled Water	2.4
RNA direct realtime PCR master mix	10
50mM Mn(AcO) ₂	1
Sense Primer 10uM	0.6
Antisense Primer 10uM	0.6
Taqman Probe 10uM	0.4
RNA sample	5

B. 2. 3. 6 HCV pseudoparticles (HCVpp, genotype 1b または 2a) を用いた感染阻害活性評価

Huh7.5.1-8 細胞を 5 × 10⁴ cells/well/500 μL で 48 well plate に播種し、一晚培養した。マウス抗 CL-1 抗体、ヒト IgG1 キメラ化抗 CL-1 抗体、コントロール抗体を培地で各濃度に調製し、前培養していた細胞の培地を除いて 200 μL/well の抗体を加え、室温で 30 分静置した。

HCVpp (genotype 1b または 2a) をそれぞれ 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、 37°C で 6 時間培養した。培地 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 3 回洗浄し、前処理の 1/2 の濃度にした抗体液 400 μL を加え、 37°C で 3 日間培養した。

培地を除去後、Lysis Buffer を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、エッペンに回収し、10,000 rpm、1 分間遠心し、氷上に置いた。サンプル上清 10 μL と発光基質(ピツカジーン) 50 μL を混ぜ、Luminescencer-PSN でルシフェラーゼ活性を測定した。

B. 3 抗 claudin-4 (CL-4) ラット抗体の各種 CL に対する結合性解析

ヒト CL-1 (hCL-1)、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-9 発現 HT1080 細胞またはマウス CL-4 (mCL-4) 発現 L 細胞 5.0×10^5 cells/sample に対し、各抗 CL-4 ラット抗体 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を 100 μL 添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて 500 倍希釈した Goat anti-rat IgG(H+L)-FITC 抗体 (KPL) を添加、攪拌し氷上で遮光し 30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 3 回洗浄後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSCalibur (日本 BD) にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B. 4 抗 CL-4 ラット抗体の hCL-4 に対する結合性強度解析

各 CL-4 ラット抗体の hCL-4 精製タンパク質に対する結合強度を Biacore T200 (GE Healthcare) にて解析した。CM5 センサーチップ表面の carboxylic groups を活性化するため、NHS/EDC 混合液を流し、その後、amine coupling 方法で、anti-rat Ab (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 4.5) を 5000RU 固定化した。センサーチップ表面に残った固定化されていない部分を ethanolamine でブロックした。さらに各ラット抗体を結合させた後、single cycle で、10、100、200、300、500 nM の hCL-4 精製タンパク質 (溶媒: HBS-EP+) を流し、各抗体に対する結合速度 (K_a)、解離速度 (K_d) および解離定数 (K_D) を計算した。コントロール実験として、センサーチップの

もうひとつの flow path に anti-rat Ab を固定化し、各ラット抗体を結合せずに hCL-4 精製タンパク質を流し、得られた RU 値をバックグラウンドとして差し引いた。次のラット抗体を固定する前に、センサーチップを Glycine-HCL (10 mM, pH 1.7) で再生し、操作を繰り返した。

B. 5 C-CPE の体内動態解析

B. 5. 1 C-CPE の蛍光標識体の作製および活性確認

XenoLight CFTM 蛍光標識キット (Caliper) のプロトコールに準じて、C-CPE または C-CPE mutant のリジン残基を CF750 で化学修飾することで蛍光標識体を作製した。1 mg の C-CPE または C-CPE mutant に対し 900 μL の PBS を加え調製し、1 M Sodium bicarbonate (pH 8.3) を加えた。DMSO で溶解した 0.05 μmole の CF750 12 μL と混合し、常温で 1 h 遮光反応させた。混合物を 10kD MWCO ultrafiltration vial に添加し、14,500 rpm、 4°C で遠心を行い、CF750 標識 C-CPE を vial のフィルターにトラップすることで分子量の小さい非標識 CF750 を除去した。チューブに 600 μL の PBS を添加し、遠心により CF750 標識 C-CPE を三回 wash した。1 mL の PBS をチューブに添加・ピペッティングし、CF750 標識 C-CPE を回収した。さらに 0.22 μm のフィルターで濾過し、無菌にした。最後に吸光度法により OD 280 nm および OD 755 nm の吸光度を測定し、プロトコールにある公式に準じてタンパク質濃度を計算した。得られた CF750-C-CPE または CF750-C-CPE mutant を用い、実験 B1 に準じて、二次抗体 mouse anti 6 \times His Epitope Tag antibody (Thermo) および三次抗体 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (ROCKLAND) を添加・反応し、mCL-1、-2、-3、-4、-5 発現 L 細胞に対する結合性を測定した。

B. 5. 2 正常マウスにおける C-CPE の体内分布

BALB/c マウス (雌性、8 週齢) に CF750-C-CPE または CF750-C-CPE mutant を 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ となるように調製し、尾静脈内投与した。投与 10 min、

30 min、1 h、3 h、6 h、24 h、48 h、72 h、96 h 後、体重を測定し、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、甲状腺、胃、腸、脳、精巣を単離した。また、血液を心採血により 100 μ L 収集した。イメージング装置 (Maestro™ EX) にて蛍光強度を測定し、ソフトウェア Maestro 2.10.0 にて解析した。各臓器の蛍光強度は %ID (%Injected dose) の標記で求めた。血液に関して、マウス体重の 8% に相当する量で計算した。

B. 6 ラット抗体 HKH189.J9 の体内動態解析

B. 6. 1 ラット抗体 HKH189.J9 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、pUC118HincIII 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。

B. 6. 2 ラット抗体 HKH189.J9 の各種 CL に対する結合性解析

実験 B1 に準じて、mCL-1、-2、-3、-4、-5 発現 L 細胞または hCL-1、hCL-2、hCL-3、hCL-4 発現 HT1080 細胞に対する結合性を測定した。

B. 6. 3 ラット抗体 HKH189.J9 の蛍光標識体の作製および活性確認

実験 B3.1 に準じて、ラット抗体 HKH189.J9 また

はネガティブコントロールとしたラット IgG の定常領域のリジン残基を CF750 で化学修飾することで蛍光標識体を作製した。得られた CF750-HKH189.J9 または CF750-rat IgG を用い、実験 B1 に準じて、mCL-4 発現 L 細胞に対する結合性を FACSCalibur にて測定した。

B. 6. 4 正常マウスにおけるラット抗体 HKH189.J9 の体内分布

BalB/c マウス (雌性、8 週齢) に CF750 - HKH189.J9 または CF750 - rat IgG を 20 μ g/mouse となるように調製し尾静脈内投与した。投与 10 min、30 min、1 h、3 h、6 h、24 h、48 h、72 h、96 h 後、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、甲状腺、胃、腸、脳、精巣、血液を単離し、イメージング装置 (Maestro™ EX) にて蛍光強度を測定し、ソフトウェア Maestro 2.10.0 にて解析した。各臓器の蛍光強度は %ID/g (%Injected dose per gram) の標記で求めた。血液に関して、マウス体重の 8% に相当する量で計算した。

B. 6. 5 ラット抗体 5D12 のマウスにおける肝傷害および腎傷害検討

BalB/c マウス (雌性、7-8 週齢) に PBS もしくは 5D12 を 1、3 mg/kg body weight となるように調製し尾静脈内に投与した。5D12 は氷冷 PBS (-) を用いて希釈し、vehicle 群には PBS (-) のみを等量投与した。投与 48 時間後に心採血により血液サンプルを回収し、60 分間室温で放置後、4°C、6,000 rpm で 20 分間遠心分離を行い、上清を血清として回収した。

肝傷害のマーカーとした AST/ALT 活性の測定にはトランスアミナーゼ C II - テストワコー (和光純薬) を用いた。血清を注射用水を用いて適宜希釈し、キットに記載のプロトコルに従い測定を行った。腎傷害の指標として用いられる BUN の測定には尿素窒素 B-テストワコー (和光純薬) を用い、キット記載のプロトコルに従い行った。

B. 7 ラット抗体 5A5 の腫瘍蓄積性

B. 7. 1 ヒト癌細胞における各 CL 発現確認

ヒト膵臓癌細胞 Mia Paca-2、ヒト胃癌細胞 MKN74 またはヒト大腸癌細胞 LoVo を氷冷 PBS (-) 1 mL により培養ディッシュからセルスクレーパーによって剥がし、細胞を回収した。氷冷 PBS (-) 1 mL を加え細胞を懸濁させ、4°C、3,000 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。さらにこの操作を 3 回繰り返した。遠心分離後、上清を取り除き lysis buffer (1% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail 含有 PBS (-)) を加え、氷冷しながら超音波処理を 20 秒間、3 回行い、4°C、15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を回収し細胞溶解液を作製した。細胞溶解液に 4 × SDS buffer を加え 5 分間加熱し、泳動用サンプルとした。15% ポリアクリルアミドゲルを用いて、10 µg/lane で SDS-PAGE 電気泳動を行った (0.03 A/枚、1 時間)。TRANS-BLOTR SD SEMI-DRY TRANSEFR CELL によりゲル中のタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 0.24 A で 20 分間転写した。転写後、PVDF 膜を 5 %スキムミルク/TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸して、室温で 2 時間振とうし、ブロッキング操作を行った。TBS-T で 5 回洗浄後、一次抗体 anti-CL1 Ab (2,000 倍希釈、invitrogen)、anti-CL2 Ab (2,000 倍希釈、invitrogen)、anti-CL3 Ab (2,000 倍希釈、invitrogen)、anti-CL4 Ab (2,000 倍希釈、invitrogen)、anti-CL5 Ab (2,000 倍希釈、invitrogen) または anti-β-actin Ab (500 倍希釈、invitrogen) と 2 時間反応させた。TBS-T で洗浄後、二次抗体 HRP 標識 goat anti-mouse IgG (2,000 倍希釈、MILLIPORE) または HRP 標識 goat anti-rabbit IgG (5,000 倍希釈、MILLIPORE) と 1 時間反応させた。検出には、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用い LAS4010 にて現像した。

B. 7. 2 ラット抗体 5A5 の Mia Paca-2、MKN74 および LoVo 細胞に対する結合性解析

実験 B5 に準じて、Mia Paca-2、MKN74 および LoVo 細胞に対する結合性を測定した。

B. 7. 3 ラット抗体 5A5 の蛍光標識体の作製および活性確認

実験 B3.1 に準じて、ラット抗体 5A5 またはネガティブコントロールとしたラット IgG の定常領域のリン残基を CF750 で化学修飾することで蛍光標識体を作製した。得られた CF750-5A5 または CF750-IgG を用い、実験 B1 に準じて、hCL-4 発現 HT1080 細胞に対する結合性を FACSCalibur にて測定した。

B. 7. 4 担癌マウスにおけるラット抗体 5A5 の腫瘍蓄積性

B. 7. 4. 1 MKN74 細胞移植マウスにおける抗体の腫瘍蓄積性

BALB/c Slc-nu/nu マウス (雌性、7 週齢) に MKN74 細胞を 1×10^7 cells/mouse となるように調製し皮下移植し、腫瘍が十分大きくなるまで 5 週間飼育した。その後、CF750-5A5 または CF750-rat IgG を 20 µg/mouse 腹腔内投与した。投与 6 h、24 h、48 h、72 h、96 h 後、マウスの全体像をイメージング装置 (Maestro™ EX) にて観察した。その後、肺、肝臓、腎臓、甲状腺、腫瘍を単離し、重量を測定した後、Maestro™ EX にて蛍光強度を測定し、ソフトウェア Maestro 2.10.0 にて解析した。各臓器の蛍光強度は %ID/g (%Injected dose per gram of tissue) で求めた。

B. 7. 4. 2 Mia Paca-2 細胞移植マウスにおける抗体の腫瘍蓄積性

BalB/c Slc-nu/nu マウス (雌性、7 週齢) に Mia Paca-2 細胞を 1×10^7 cells/mouse となるように調製し皮下移植し、腫瘍が十分大きくなるまで 5 週間飼育した。その後、CF750-5A5 または CF750-rat IgG を 20 µg/mouse 腹腔内投与した。投与 24 h、48 h、72 h 後、マウスの全体像をイメージング装置 (Maestro™ EX) にて観察した。その後、肺、肝臓、腎臓、甲状腺、腫瘍を単離し、重量を測定した後、Maestro™ EX にて蛍光強度を測定し、ソフトウェア Maestro 2.10.0 にて解析した。各臓器

の蛍光強度は%ID/g(%Injected dose per gram)の標記で求めた。

B. 7. 4. 3 LoVo 細胞移植マウスにおける抗体の腫瘍蓄積性

BalB/c Slc-nu/nu マウス(雌性、7 週齢)に LoVo 細胞を 1×10^7 cells/mouse となるように調製し皮下移植し、腫瘍が十分大きくなるまで 5 週間飼育した。その後、CF750-5A5 または CF750-rat IgG を 20 μ g/mouse 腹腔内投与した。投与 72 h 後、マウスの全体像をイメージング装置(Maestro™ EX)にて蛍光強度を撮影した。その後、肺、肝臓、腎臓、甲状腺、腫瘍を単離し、Maestro™ EX にて蛍光強度を測定し、ソフトウェア Maestro 2.10.0 にて解析した。各臓器の蛍光強度は%ID/g(%Injected dose per gram)の標記で求めた。

B. 7. 4. 4 ラット抗体 5A5 の腫瘍移植時間依存的な蓄積性

BalB/c Slc-nu/nu マウス(雌性、7 週齢)に Mia Paca-2 細胞を 1×10^7 cells/mouse となるように調製し皮下移植した。1、2、3、4 週間後、CF750-5A5 を 20 μ g/mouse 腹腔内投与した。投与 72 h 後、肺、肝臓、腎臓、甲状腺、腫瘍を単離し、イメージング装置(Maestro™ EX)にて蛍光強度を測定し、ソフトウェア Maestro 2.10.0 にて解析した。各臓器の蛍光強度は%ID/g(%Injected dose per gram)の標記で求めた。

B. 8 ラット抗体 5A5 の抗腫瘍活性

B. 8.1 5A5 の補体依存性細胞傷害(CDC)活性評価

MKN74、LoVo または Mia Paca-2 細胞を 96-well plate (FALCON) に 5×10^4 cells/well/45 μ l で播種し、PBS (-) で段階希釈した各ラット抗体を終濃度 10 μ g/ml となるように 45 μ l ずつ添加し 37°C で 1 h 前培養した。ヒト血清を 10% 濃度となるように 10 μ l 添加し、さらに 37°C で 3 h 培養した。その後、WST-8 法により細胞生存率を測定した。各 well に生細胞数測定試薬 SF(ナカライテスク) を 10 μ l

ずつ添加し、30 min - 4 h 培養後、450 nm における吸光度を測定した。0 μ g/ml すなわち PBS (-) 添加群の吸光度を基準として各蛋白質濃度における吸光度の相対値を求め、生存率とした。

B. 8. 2 5A5 の Fc γ 受容体レポーターアッセイ

hCL-4 発現 HT1080 細胞を 96-well plate に 1×10^4 cells/well で播種し、37°C で 24 h 前培養した。培地を除き、無血清の Opti-MEM I で調製した Jurkat/Fc γ RIIIa/NFAT-Luc 細胞 1×10^5 cells/well および 0.0015、0.005、0.015、0.05、0.15、0.5、1.5 μ g/ml の抗 CL-4 抗体を添加し、37°C で 5 h 培養した。その後、ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega) および EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) にて、ルシフェラーゼ活性を測定した。

B. 8. 3 担癌マウスにおけるラット抗体 5A5 の抗腫瘍効果

BALB/c Slc-nu/nu マウス(雌性、7 週齢)に MKN74 または LoVo 細胞を 1×10^7 cells/mouse となるように調製し皮下投与した。移植当日から、PBS、rat IgG (1 mg/kg body weight) または 5A5 (LoVo 細胞移植群に対して 1 mg/kg body weight、MKN 細胞移植群に対して 0.1 と 1 mg/kg body weight) を週二回、計四週間または五週間腹腔内投与した。毎回投与する前に、マウスの体重及び腫瘍のサイズを測定した。腫瘍サイズは下記のように計算した。

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = \text{length} \times \text{width}^2 / 2$$

B. 9 ラット CL-4 抗体および毒素 saporin 融合 anti-rat IgG (rat-ZAP) を用いる癌細胞プレタゲティング法開発へ向いた基礎研究

B. 10. 1 ラット抗体 5A5 の細胞内取り込み能の検討

12-well plate (FALCON) にカバーガラスをのせて、50 μ g/ml の collagen Type I (BD Biosciences、溶媒: 0.02M CH₃COOH) を 1ml/well 添加した。室温で 1 h coating した後、PBS で 2 回 wash し、

MKN74 細胞を 1×10^5 cells/well で播種し、24 h 前培養した。その後、ラット抗体 5A5 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 500 μL 添加し、それぞれ 1 h、3 h、6 h 後、PBS で 2 回 wash を行い、4%パラホルムアルデヒド(PFA、ナカライテスク)を 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、室温で 15 min 固定化を行った。その後、PBS で 2 回 wash し、0.1%(v/v) Triton-X/PBS を 500 μL 添加した。10 分間静置し、PBS で 2 回 wash を行った。その後、細胞核を染める DAPI (SIGMA、1/500 in 1%BSA-PBS) と二次抗体 Goat-anti-rat IgG-FITC (KPL、1/500 in 1%BSA-PBS) を混和した溶液を 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加した。室温で 1 h 遮光静置した後、PBS で 3 回 wash し、それぞれのカバーガラスを anti-fade を 1 滴添加したスライドガラスにのせて、封入を行った。共焦点顕微鏡 Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) にて蛍光を観察した。

B. 10. 2 rat-ZAP 単独添加による細胞傷害性の検討

MKN74 または LoVo 細胞を 96-well plate に 5×10^3 cells/well で播種し、24 h 前培養した。新鮮な培地 90 μL に交換後、PBS (-) で段階希釈した rat-ZAP を終濃度 0、0.5、1、2、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、37°C で三日間培養した。その後、実験 B6.1 に準じて、WST-8 法により細胞生存率を測定した。

B. 10. 3 ラット抗体 5A5 前処理したヒト癌細胞における rat-ZAP による細胞傷害性

MKN74、LoVo または Mia Paca-2 細胞を 96-well plate に 1×10^3 cells/well で播種し、24 h 前培養した。新鮮な培地 90 μL に交換後、PBS (-) で段階希釈したラット抗体 5A5 を終濃度 0.5、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 10 μL ずつ添加し 37°C で二日間培養した。さらに新鮮な培地 90 μL に交換後、rat-ZAP を終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、37°C で三日間培養した。その後、実験 B6.1 に準じて、WST-8 法により細胞生存率を測定した。

B. 10. 4 ラット抗体 5A5 前投与した MKN74 移植マ

ウスにおける rat-ZAP による抗腫瘍活性

BALB/c Slc-nu/nu マウス(雌性、7 週齢)に MKN74 細胞を 1×10^7 cells/mouse となるように調製し皮下移植した。移植当日から、ラット抗体 5A5 (1 mg/kg body weight) を腹腔内投与した。二日後、PBS または rat-ZAP (3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) を腹腔内投与した。これを 1 セットとして、三日後、さらに 7 セット投与を行った。毎回 5A5 を投与する直前に、マウスの体重及び腫瘍のサイズを測定した。腫瘍サイズは下記の式のように計算した。

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = \text{length} \times \text{width}^2 / 2$$

B. 11 CL-4 を標的とした粘膜吸収促進法開発へ向いた基礎研究

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を 8×10^4 cells/mL、200 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 6.5-mm Transwell (0.3 cm^2 , Corning, incorporated) に播種し、MEM 培地 (19 mM NaHCO_3 , 19.4 mM D-glucose, 4 mM L-glutamine, 1% Non-essential amino acid solution) にて 37°C、5% CO_2 下で培養した。24 h に一度培地を交換し、バリア機能を Millicell®-ERS (Millipore) による TEER (経上皮電気抵抗値) の測定によって評価した。TEER が一定となった後、作製した hCL-4 抗体 (3B11、4D3) または C-CPE を終濃度 2、10、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように basal 側かた添加し、6 h おきに TEER を測定した (n=3)。24 h 後 MEM 培地で交換し、交換 12 h、24 h 後に TEER を測定した。

B. 12 ラット抗体 9g7 のエピトープ同定

B. 12. 1 9g7 の可変部領域配列の解析

実験 B. 8. 1 に準じて、ラット抗体 9g7 の可変部領域配列を解析した。

B. 12. 2 9g7 の CL 一次構造認識

MOCK-, hCL-4、hCL-3 発現 HT1080 細胞または MOCK-, mCL-4、mCL-3 発現 L 細胞を氷冷 PBS (-) 1 mL により培養ディッシュからセルスクレーパーによって剥がし、細胞を回収した。氷冷 PBS (-) 1 mL を加え細胞を懸濁させ、4°C、3,000 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。さ

らにこの操作を3回繰り返した。遠心分離後、上清を取り除き lysis buffer (1% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail 含有 PBS (-))を加え、氷冷しながら超音波処理を 20 秒間、3 回行い、4°C、15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を回収し細胞溶解液を作製した。細胞溶解液に 4 × SDS buffer を加え 5 分間加熱し、泳動用サンプルとした。15% ポリアクリルアミドゲルを用いて、10 µg/lane で SDS-PAGE 電気泳動を行った (0.03 A/枚、1 時間)。TRANS-BLOTR SD SEMI-DRY TRANSEFR CELL によりゲル中のタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 0.24 A で 20 分間転写した。転写後、PVDF 膜を 5 %スキムミルク/TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20)に浸して、室温で 2 時間振とうし、ブロッキング操作を行った。TBS-Tで5回洗浄後、clone 9g7 0.5 µg/mL、Mouse 抗 CL-4 抗体(500 倍希釈、invitrogen)、Rabbit 抗 CL-3 抗体(500 倍希釈、invitrogen)または Mouse 抗 GAPDH 抗体 (20,000 倍希釈、abcam)と 2 h、二次抗体:Goat anti-mouse IgG HRP conjugated(5,000 倍希釈、MILLIPORE)、Goat anti-Rat IgG HRP(1,000 倍希釈、RD systems)、Goat anti-rabbit IgG HRP conjugated(5,000 倍希釈、MILLIPORE)と 1 h 反応させた。検出には、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare)を用い LAS4010 にて現像した。

B. 12. 3 hCL-4、hCL-3、mCL-4、mCL-3 全長配列を元にしたペプチドアレイを用いたエピトープ解析

hCL-4の全長アミノ酸配列を元に、長さ15アミノ酸、3アミノ酸ずらしになるようにペプチド断片を設計した(Table 2)。Fmoc 固相合成法によりセルロースメンブレンに各種ペプチド断片をスポットし、ペプチドスポットアレイを作製した。

上記ペプチドスポットアレイに対し、一次抗体として 0.5 µg/mL に調製した 9g7 を 2 時間、二次抗体として Goat anti-rat IgG HRP conjugated(5,000 倍

希釈、RD systems)を 1 時間、室温で順に作用させ、検出には、ECL™ Western Blotting Detection Reagents を用い LAS4010 にて現像した。なお、各抗体の希釈には 2% skim milk-T-TBS を用いた。

B. 12. 4 エピトープ候補配列を元にしたペプチドアレイを用いたエピトープ解析

実験 B10.2 に準じて、9g7 のエピトープ候補配列 + α (hCL-4 の 37-46 アミノ酸) (GSNIVTSQTY) を元に作製したペプチドアレイを用い、9g7 のエピトープの同定を行った。

B. 12. 5 遊離ペプチド断片を用いた competition assay

B10.3 により得られた候補ペプチド断片 hCL-4 の 37-42aa (GSNIVT)、およびその逆配列 (TVINSG) をペプチド断片として用いた。1%BSA-PBS で希釈した 9g7 (0.125、0.25、0.5、1 µg/mL) とペプチド断片 (1 mg/mL) を混合し、2 h、室温で incubate した。hCL-4/HT1080 5×10^5 cells/sample に対し、上記希釈液を 100 µL 添加し、30 min、4°C で incubate した。0.2%BSA-PBS で wash 後、FITC 標識抗ラット IgG 抗体 (KPL) 500 倍希釈液を 100 µL 添加し、30 min、4°C で incubate した。0.2%BSA-PBS で wash 後、FACSCalibur にて解析を行った。

B. 13 hCL5 結合性 scFv の精製

B. 13. 1 MBP-tag scFv の精製

得られたファージクローンの中で最も結合力の高かったプラスミド pY03'-5R2-149 の MBP-tag 付き精製を (株式会社アドバンスに委託) した。プラスミドより抗体遺伝子の VH、VL 領域を増幅し、一本鎖抗体遺伝子を構築した。その後 pMal-c2E ベクターへ EcoRI site および HindIII site で挿入し、形質転換体を取得した。DNA シークエンス確認したところ、一致していた。その後 scFv/pMal-C2E/JM109 を 10 mL スケールで発現培養した。全量を集菌後、超音波破碎により可溶性タンパク質画分を得て、可溶性タンパク質画分をアミロースレジンカラム

(1ml vol)で精製した。

B. 13. 2 MBP-tag scFv の活性確認

96 well ELISA plate に 1.0 ·g/50 ·L TBS/well で、WT-Bacovirus (BV)、hCL1-BV、hCL2-BV、hCL3-BV、hCL4-BV および hCL5-BV 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 MBP-tag 付き scFv(5R2-149)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 MBP-tag 付き scFv(5R2-149)を 100 ·L/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 2000 倍希釈した溶液を 100 ·L 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 ·L を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100 ·L 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。

また hCL1、hCL2、hCL3、hCL4、hCL5 発現 HT1080 細胞をトリプシン処理により回収した。5.0 × 10⁵ cells/sample に対し、MBP-tag scFv を 100 μL 添加し、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-human IgG (H+L)-FITC 抗体 (Jackson Immuno Research)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 μg/mL となるように希釈した PIを加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B. 14 hCL5 結合性 scFv ファージの完全抗体化

B. 14. 1 hCL5 結合性 scFv ファージの抗体化遺伝子組み替え

得られたファージクローンの中で結合力の高かった 5R2-081、5R2-149、5R3-063 の完全抗体化を図

った。抗体可変部領域の VL、VH 遺伝子を PCR 法により増幅した。なお、VL 遺伝子上流に EcoR I サイト、下流に BsiW I サイト、VH 遺伝子上流に EcoR I サイト、下流に Nhe I サイトを付加した。PCR 産物を電気泳動により分離・精製した。

増幅した VL 遺伝子およびヒト IgG kappa 鎖定常領域をもつクローニングベクターである pFUSEss-CLIg-hk (invivogen)を EcoR I および BsiW I で処理後、ライゲーションした。増幅した VH 遺伝子およびヒト IgG1 重鎖定常領域をもつクローニングベクターである pFUSEss-CHlg-hG1 (invivogen)を EcoR I および Nhe I で処理後、ライゲーションした。各ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5α 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、シーケンス解析により pFUSEss-CLIg-hk-scFv-VL および pFUSEss-CHlg-hG1-scFv-VH を得た。

B. 14. 2 hCL5 結合性 scFv ヒト化抗体の作製

フラスコに 5 × 10⁵ cells/mL に調製した CHO-S 細胞を 150 mL 入れ、37、8% CO₂ 環境下で一晩培養した。作製した発現ベクター 187.5 μg (VL:VH=1:1) に OptiPRO SFM を加え 3 mL に調製し攪拌した。別のエッペンに FreeStyle™MAX Reagent (invitrogen™) 187.5 μL と OptiPRO SFM 2812.5 μL を加え転倒混和し、発現ベクターの溶液に加え混和し、10 分間常温静置した。CHO-S 細胞の入ったフラスコに、上記の混合液全量加えた。その後 6 日間、37、8% CO₂ 環境下で培養し、上清を回収した。回収した上清を 100 g、5 分間遠心にかけて、0.45 μm filter を通した。

得られた目的タンパク質溶液は、非還元条件下の 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. 14. 3 CL に対する hCL5 結合性 scFv 抗体の結合性解析

hCL1、hCL2、hCL3、hCL4、hCL5 発現 HT1080 細胞をトリプシン処理により回収した。5.0 × 10⁵

cells/sample に対し、5R2-081 抗体上清、5R2-149 抗体上清、5R3-063 抗体上清 を 100 μ L 添加し、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-human IgG(H+L)-FITC 抗体(Jacson Immuno Research)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 を加え、FACSCaliburにて測定し、CellQuestProにて解析を行った。

B. 15 hCL5 の DNA 免疫マウス脾臓からのファージ抗体ライブラリの作製

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 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 4 \cdot L (VL 領域)、8 \cdot L (VH 領域)を鋳型として forward, reverse primer set(後に遺伝子配列を記述)各 2 \cdot L、PCR buffer 5 \cdot L、dNTP 5 \cdot L、MgSO₄ 2 \cdot L、KOD-plus 1 \cdot L の割合で混合したものをアニリング温度 50 で1分間、伸長反応 68 で1分間に設定した 35 サイクルの PCR 反応に供した。

C. 研究結果

C. 1 抗 CL-1 抗体の結合性解析

既に平成 24 年度までの報告で、当該抗 CL-1 抗体は、hCL-2、-4、-5、-6、-7、-9 発現細胞には結合性を示さず、hCL-1 特異的に作用することが分かっている。抗 CL-1 抗体の種間交叉性を検証したところ、mCL-1 発現細胞には結合性を示さなかった(Figure 1A, upper panel)。hCL-1 と mCL-1 は非常に相同性が高く、第一細胞外領域 51 アミノ酸のうち 3 アミノ酸残基、第二細胞外領域 15 アミノ酸のうち 2 アミノ酸残基が異なっている(Figure 1B)。よって、ヒトとマウス間で異なるアミノ酸残基(R31、M46、S74、M152 および V155)が抗 CL-1 抗

体の認識に重要である可能性が示唆された。そこで、hCL-1 の細胞外領域配列を持つ mCL-1 変異体を作製し、FACS 解析を行ったところ、いずれの抗 CL-1 抗体も mCL-1 変異体に結合性を示した(Figure 1A, lower panel)。以上のことから、抗 CL-1 抗体の結合性には、hCL-1 の R31、M46、S74、M152 および V155 が重要であることが示唆された。

昨年度までの報告で、clone 7A5 は hCL-1 の一次構造を認識することが分かっている。そこで次に、hCL-1 のペプチド断片を固相化したペプチドスポットアレイを用いて、clone 7A5 の認識配列の同定を試みた。hCL-1 の全長配列を参考に、C 末端から N 末端までの 211 アミノ酸を 3 アミノ酸ずつずらした各 15 アミノ酸のペプチド断片を作製した(table 1)。作製したアレイに対する clone 7A5 の反応性を検証したところ、スポット A7、C2、C17、C18 で clone 7A5 処理によるシグナルが検出された(Figure 2A)。hCL-1 第二細胞外領域に相当するスポット C2 で最も強いシグナルが検出されたが、ペプチドスポットアレイでは各ペプチドのアミノ酸配列に依存して合成量が異なるため、定量性に乏しい。そこで次に、シグナルの検出されたエピート候補配列を元に遊離ペプチド断片を作製し、FACS 解析による competition assay を行うことで、エピートの絞り込みを行った(Figure 2B)。その結果、hCL-1 148-162aa のペプチド断片添加により、clone 7A5 の hCL-1 発現細胞に対する結合性が顕著に低下していた。以上の結果より、clone 7A5 は hCL-1 の 148-162aa の一次構造を認識することが明らかになった。

これまでの検討により、いずれの抗 CL-1 抗体も hCL-1 の第二細胞外領域を認識することが示唆されている。そこで次に、hCL-1 第 2 細胞外領域の 15 アミノ酸(QEFYDPMPVNPVARYE)のうち、抗 CL-1 抗体の結合性に重要なアミノ酸残基を同定するために、hCL-1 第 2 細胞外領域のアラニン置換体との相互作用を FACS 解析および Western blot 解析により検証した。Clone 2C1 および clone 3A2 を用いた FACS 解析では、hCL-1 の D150、

M152 または V155 のアラニン置換により、シフトの減弱が認められた (Figure 3)。以上の結果より、clone 2C1 および clone 3A2 の結合性には、hCL-1 の D150、M152 および V155 が重要であることが示唆された。Clone 5F2 を用いた FACS 解析では、hCL-1 の D150、P151、M152、V155 または Y159 のアラニン置換により、シフトの減弱が認められた (Figure 3)。以上の結果より、clone 5F2 の結合性には、hCL-1 の D150、P151、M152、V155 および Y159 が重要であることが示唆された。Clone 7A5 を用いた FACS 解析では、hCL-1 の D150 または M152 のアラニン置換により、シフトの減弱が認められた (Figure 3)。また、clone 7A5 を用いた Western blot 解析では、hCL-1 の D150、P151 または M152 のアラニン置換により、シグナルの消失が認められ、hCL-1 の E147、T153、P154、V155 または R158 のアラニン置換により、シグナルの減弱が認められた (Figure 4)。以上の結果より、clone 7A5 の結合性には、hCL-1 の D150、P151 および M152 が重要であり、hCL-1 の E147、T153、P154、V155 または R158 とともに相互作用する可能性が示唆された。

さて、前述したように、hCL-1 と mCL-1 では第一細胞外領域に 3 アミノ酸、第二細胞外領域に 2 アミノ酸の違いを有している。一方、hCL-1 とウイスターラット CL-1 (rCL-1) では第一細胞外領域で 3 アミノ酸異なるが、第二細胞外領域は相同の配列を有している (Figure 5A)。抗 CL-1 抗体はいずれも hCL-1 の第二細胞外領域を認識することから、相同配列を有する rCL-1 にも結合する可能性が考えられた。そこで続いて、抗 CL-1 抗体の rCL-1 に対する結合性を検証した。なお、ラット CL-1 には複数の variant が存在することが報告されており (Haid S et al., J Virol, 84, 964-975 (2010))、本研究ではウイスターラットの肝臓からクローニングした配列を用いた。hCL-1、mCL-1 および rCL-1 を一過性発現させた 293T 細胞を用いて FACS 解析を行ったところ、いずれの抗 CL-1 抗体も rCL-1 発現 293T 細胞に対して結合性を示した (Figure 5B)。以上のことから、抗 CL-1 抗体は hCL-1 だけでは

なく rCL-1 にも作用することが明らかになった。

C. 2 CL-1 を標的とした C 型肝炎治療法開発へ向けた基礎検討

昨年度までの検討で、*in vitro* 実験系における抗 CL-1 抗体の HCV 感染阻害活性を評価した。本年度は、*in vivo* における HCV 感染阻害効果を評価するとともに、抗 CL-1 抗体の低分子化および抗 CL-1 抗体のヒトキメラ化を行い、抗 CL-1 抗体の druggability 向上を図った。

まず、抗 CL-1 抗体の *in vivo* HCV 感染阻害活性を評価した。なお、*in vivo* HCV 感染実験では、*in vitro* での HCV 感染阻害活性およびエピトープが異なる clone 3A2、7A5 の 2 クローンを選択した。コントロール抗体投与群では、day 28 時点には全ての個体で血清中 HCV 量が約 10^7 copies/mL のプラトーに達していた。一方、clone 3A2 投与群では day 42 時点で 4 匹中 3 匹、clone 7A5 投与群では 4 匹中 1 匹で HCV RNA が検出されず、抗 CL1 抗体投与による HCV 感染阻害効果が認められた (Table 2)。*In vivo* での感染阻害活性のクローン間の違いは、*in vitro* での HCV 感染阻害活性の違いと相関していた。

また、抗 CL-1 抗体投与による一般状態の変化、体重減少、血中ヒトアルブミン濃度減少、AST、ALT の増加などの有害事象は認められなかった (Figure 6A-D)。Clone 3A2 投与群において、day 7 で 1 匹、他の個体より高い AST 値を示した個体が存在したが、その後の day 14、day 21 では低い値を示していたこと、uPA-SCID マウスはもともと肝機能障害を示すマウスであることから、抗 CL-1 抗体投与による影響ではないと考えられる。

更に、*in vivo* において抗 CL-1 抗体と Peginterferon Alfa-2a (pegasys) の併用による抗 HCV 治療相乗効果を検討した。血清中 HCV 量は day 42 の pegasys 投与開始後速やかに減少し、コントロール抗体投与群では day 56 に最小値 7.7×10^4 copies/mL を示した後、day 70 には 1.4×10^7 copies/mL まで回復した。一方、clone 3A2 投与群では day 56 に最小値 4.0×10^4 copies/mL を示した

後、day70 には 2.7×10^7 copies/mL まで回復した (Figure 7)。また、抗 CL-1 抗体投与による一般状態の変化、体重減少、AST、ALT の増加は認められなかったが、血中ヒトアルブミン濃度の減少が認められた (Figure 8)。Clone 3A2 投与群の血中ヒトアルブミン濃度の減少はコントロール抗体投与群と比較して同等であったことから、pegasys 投与による影響と考えられる。

次に、抗 CL-1 抗体の HCV 感染阻害薬としての druggability 向上を試みた。マウス抗体をヒトに投与する際、多くの場合は異物として認識されるため、半減期が短く、また頻回投与によりアナフィラキシーショックを惹起する可能性があることが知られている。そこでまずは、現在抗体医薬として汎用されているヒト IgG1 キメラ化抗体に着目し、マウス抗 CL-1 抗体の定常領域をヒト IgG1 に組み替えたヒト IgG1 キメラ化抗 CL-1 抗体を作製した (Figure 9)。

また、IgG などの抗体分子は約 150 kDa と分子量が大きく、一般的に組織浸透性が低いことが知られている。そこで、マウス抗 CL-1 抗体を元に、分子量約 50 kDa の Fab を作製し、HCV 感染阻害活性を評価した。なお、Fab 作製には、in vitro での HCV 感染阻害活性が高かった clone 2C1、3A2 の 2 クローンを選択した。分子量約 150 kDa であるマウス IgG をタンパク質分解酵素パパイニンで処理することにより、分子量約 50 kDa の Fab を作製した (Figure 10)。

作製したヒト IgG1 キメラ化抗体及び Fab の結合活性を FACS 解析により検証したところ、いずれの抗体、Fab も、hCL-2、hCL-3、hCL-4、hCL-6、hCL-7、hCL-9 および mCL-1 発現細胞には結合性を示さず、hCL-1 発現細胞特異的に作用していた。よって、マウス抗 CL-1 抗体と同様に、hCL-1 結合特異性の高い抗体クローンであることが示唆された (Figure 11、13)。また、FACS 解析により、いずれのヒト IgG1 キメラ化抗体及び Fab も Huh7.5.1-8 細胞に結合することを確認した (Figure 12、14)。

続いて、作製したヒト IgG1 キメラ抗体及び Fab

の HCV 感染阻害活性解析を行った。ヒト IgG1 キメラ化抗 CL-1 抗体を処理することで、HCVcc 感染による細胞内および培養上清中の HCV RNA 量が抗体濃度依存的に低下しており、ヒト IgG1 キメラ化抗 CL-1 抗体は CL1 結合性マウス抗体と同等の HCV 感染阻害活性を有することを確認した (Figure 15)。一方、抗 CL-1 Fab を処理することでは、HCVcc 感染による細胞内の HCV RNA 量の低下は見られるものの、マウス抗 CL-1 抗体と比べて HCV 感染阻害活性が低下していることが分かった (Figure 16)。

また、同様に Genotype 1b および 2a の HCVpp 感染においても、ヒト IgG1 キメラ化抗 CL-1 抗体の感染阻害能は抗体濃度依存的でありマウス抗 CL-1 抗体と同等の感染阻害活性を有するが、抗 CL-1 Fab では感染阻害活性が低下していることを確認した (Figure 17、18)。

C. 3 ラット抗体の各種 CL に対する結合性解析

すべてのラット抗体が hCL-4 発現細胞に結合性を有することを確認した。また、5A5、3B11、4F4、4F10、9g7 は hCL-3 発現細胞に、4b8、5D12、9g7 は mCL-4 発現細胞に結合性を示した以外、いずれの抗体も hCL-1、-2、-5、-6、-7、-9 発現細胞には結合性を示さなかった。以上の結果から、ヒト-マウス交差性を有するものを含め、hCL-4 への結合特異性が高いクローンを多数取得することに成功した (Figure 19)。

C. 4 ラット抗体の hCL-4 に対する結合性強度解析

いずれのラット抗体は hCL-4 に対する結合強度が異なり、5D12 および 5A5 の KD 値がそれぞれ 1.41 nM と 4.35 nM と高く、他のラット抗体より約 10 倍強い結合性を示した (Figure 20, Table 4)。

C. 5 C-CPE の体内動態解析

まず、蛍光物質 CF750 標識 C-CPE (CF750-C-CPE) の各種 mCL 発現 L 細胞に対する結合性を調べた。その結果、CF750-IgG はいずれ

れの mCL 発現細胞にも結合性を示さないのに対し、CF750-C-CPE は mCL-3 および mCL-4 のみに対し結合性を示した。この結果から、蛍光物質 CF750 によるリジン残基の修飾は、CL 結合性に影響を及ぼさないことを確認した (Figure 21)。

次に、蛍光標識 C-CPE の正常マウスにおける体内分布を検討した。BALB/c マウスに尾静脈投与したところ、10 分後には C-CPE のほとんどが代謝関連組織である肝臓および腎臓に蓄積することが観察された。C-CPE mutant の分布と比べ、C-CPE は一時的に肝臓への蓄積が観察されたが、30 分後から徐々に排出され、すみやかに C-CPE mutant と同様なレベルとなった。また、腎臓においては C-CPE および C-CPE mutant とともに同様な蓄積パターンが観察されたことから、CL への結合性とは無関係な非特異的な集積であると考えられた (Figure 22A)。他の組織への分布に関して、C-CPE は甲状腺、腸へ蓄積することが観察されたが、蓄積量は肝臓および腎臓と比べ低かった (Figure 22B)。さらに、C-CPE 投与 6 時間後から 96 時間まで観察した結果、全身から徐々に排出されることが観察された。C-CPE は CL-4 だけではなく、CL-3 にも結合性を示すことから、C-CPE の体内分布の結果には CL-3 への結合性による影響も考慮する必要がある。そのため、CL-4 のみに結合する binder を用いた検討が必要と考えられる。

C. 6 ラット抗体 HKH189.J9 の体内動態解析

まず、HKH189.J9 の可変部領域配列を同定し (Table 5)、蛍光標識した CF750-HKH189.J9 の CL 結合性を解析した。mCL-1、-2、-3、-4、-5 発現 L 細胞および hCL-1、-2、-3、-4 発現 HT1080 細胞を用い、FCM 解析により、CL 結合特異性を評価したところ、HKH189.J9 は mCL-1、-2、-3、-5 発現 L 細胞または hCL-1、-2、-3、-4 発現 HT1080 細胞には結合性を示さず、mCL-4 発現 L 細胞のみに結合性を示し、mCL-4 への結合特異性が高いクローンであることを確認した (Figure 23)。次に、CF750-HKH189.J9 の mCL-4 発現 L 細胞に対する

結合性を調べた。その結果、CF750-HKH189.J9 は mCL-4 に対して、HKH189.J9 と同様な結合性を示した。この結果から、蛍光物質 CF750 によるリジン残基修飾は CL 結合性には影響を及ぼさないことを確認した (Figure 24)。

続いて、蛍光標識抗体の正常マウスにおける体内分布を検討した。はじめに、ネガティブコントロールである CF750-IgG を投与した。その結果、投与 10 分後では、腎臓への分布が一番多いことを確認した。その後 96 時間まで観察した結果、全身から徐々に排出されることが観察された (Figure 25A)。一方、mCL-4 に結合する CF750-HKH189.J9 を投与したところ、CF750-IgG と比べ、投与 10 分後から肝臓、脾臓および腎臓への分布が高い傾向が観察されたが、6 時間後からは排出されはじめ、最終的に CF750-IgG と同様なレベルになった (Figure 25B)。ほかの臓器への分布に関しては、CF750-IgG と比べ、特に差は見られなかった。以上の結果から、mCL-4 抗体は肝臓、脾臓および腎臓に一時的に蓄積するものの、他臓器への蓄積はラット IgG と同程度であることが分かった。

また、mCL-4 結合性を有する 5D12 を用い、抗体の投与による肝傷害および腎傷害を検討した。ALT (Alanine aminotransferase) 及び AST (Aspartate aminotransferase) は肝細胞実質中に含まれる酵素であり、細胞が傷害されると放出される。そのためその血中での活性は、肝傷害のマーカーとして一般的に用いられている。また、血清中の BUN (尿素窒素) 量を測定することで、腎傷害を観察した。尿素は腎臓でアンモニアに分解され、排出されることから、腎傷害の指標として用いられる。5D12 をマウスに投与したところ、いずれの投与濃度においても、ALT、AST および BUN の値の上昇が見られず、肝傷害および腎傷害は起こっていないことが示された (Figure 26)。

C. 7 ラット抗体 5A5 の腫瘍蓄積性

まず、各癌細胞の CL 発現量を比較した。Western blotting を行った結果、CL-1、-4、-5 の発