

現量が MKN 細胞、LoVo 細胞では高く、Mia Paca-2 細胞では低いことが確認された。CL-2 の発現量は各細胞間において差が確認されなかった。また、いずれの細胞においても CL-3 の発現は観察されなかった(Figure 27)。本研究で用いた癌細胞では、Mia Paca-2 細胞が hCL-4 低発現細胞であること、MKN74 および LoVo 細胞が hCL-4 高発現細胞であることが確認された。

次に、Mia Paca-2、MKN74、LoVo 細胞に対する 5A5 および蛍光標識した CF750-5A5 の結合性を解析した。FCM 解析により結合性を評価したところ、5A5 は Mia Paca-2、MKN74、LoVo 細胞に結合性を示した(Figure 28)。また、CF750-5A5 は hCL-4 発現 HT1080 細胞に対する結合性を示したことから、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 29)。

続いて、蛍光標識した 5A5 を担癌マウスの腹腔内投与した後、イメージング装置を用いて体内分布を観察した。胃癌細胞 MKN74 移植マウスにおける腫瘍蓄積性を検討した結果、CF750-IgG はいずれの時点でも腫瘍へ明確な蓄積が認められなかった。一方、CF750-5A5 を投与して 6 時間後では腫瘍への蓄積は観察できなかったものの、投与 24 時間から腫瘍への顕著な蓄積が観察され、その蓄積は 96 時間まで持続していた(Figure 30A)。さらに、マウスから、肺、肝臓、腎臓、甲状腺、腫瘍を回収し、抗体分布を定量した。その結果、腫瘍以外の組織では、IgG、5A5 共にほとんど蓄積性が観察されなかったが、腫瘍へは投与 24 時間後から顕著に増加していた(Figure 30B)。また、抗体投与 72 時間後の解析結果からも、5A5 投与群では、腫瘍に明確な蓄積が観察された(Figure 30C)。この結果から、胃癌細胞 MKN74 移植マウスにおいて、hCL-4 抗体 5A5 は移植腫瘍に蓄積することを確認した。同様に、5A5 の膵臓癌細胞 Mia Paca-2 および大腸癌細胞 LoVo 移植マウスへの蓄積性を検討した。その結果、両マウスとも MKN74 移植マウスと同様な結果が得られ、IgG と比べて、腫瘍への蓄積性が明確に認められ

た(Figure 31, Figure 32)。以上の結果から、今回取得した hCL-4 抗体 5A5 は hCL-4 発現癌への移行性を示すことが明らかとなった。

また、腫瘍移植時間依存的な蓄積性も検討した。マウスに LoVo 細胞を移植した 1 週間後、投与した 5A5 がすでに腫瘍に蓄積したことが観察された。また、移植 1 週間から 4 週間まで、5A5 の腫瘍での蓄積量が減少してきた傾向が見られた(Figure 33)。

C. 8 ラット抗体 5A5 の抗腫瘍活性

最初に各 CL-4 抗体の CDC 活性を測定した。MKN74、LoVo または Mia Paca-2 細胞を用いて検討した結果、いずれの細胞においても CL-4 抗体添加による細胞死は観察されず、抗体による CDC 活性は認められなかった(Figure 34)。次に、Fc γ R 発現細胞を用いた ADCC 活性評価を行った。その結果、すべての CL-4 抗体でも、抗体添加濃度依存的な Fc γ 受容体の活性化が観察され、ADCC 活性を有することが示唆された(Figure 35)。

続いて、担癌マウスにおける 5A5 の抗腫瘍効果を検証した。まず、抗体投与による副作用の指標として、マウスの体重を測定した。その結果、5A5 の投与による体重減少は見られなかった(Figure 36A and 36B)。次に腫瘍のサイズ変化を測定した。MKN74 細胞移植マウスにおいて、ラット IgG 投与による腫瘍サイズの縮小は見られなかったのに対し、5A5 では投与量依存的な腫瘍サイズの縮小が見られた(Figure 36C)。また、LoVo 細胞移植マウスでも同様に、5A5 投与による腫瘍サイズの縮小が見られた(Figure 36D)。しかしながら、いずれの結果においても腫瘍の増殖が抑制されたが、その効果は低いものであった。そこで、5A5 を活性向上が望まれるヒトキメラ化抗体に改変し、その効果を検討してみた。

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

Goat-anti rat IgG-FITC を添加し、共焦点顕微鏡により蛍光を観察することで、ラット 5A5 の細胞内取り込み能を検討した。ラット 5A5 を MKN74 細胞に添加した 1 h 後、細胞内で蛍光が観察されはじめ、添加 6 h 後には、さらに細胞内の蛍光が増加していることが観察された (Figure 37)。この結果から、5A5 は細胞内に取り込まれることがわかった。

近年、副作用の低減を目的としたプレターゲティング技術の開発が盛んに行われている。本研究では、CL-4 発現腫瘍を標的としたプレターゲティング技術を利用し検討した。その原理として、5A5 が CL-4 との結合により細胞内に取り込まれることを利用し、毒素 saporin 融合 anti-rat IgG (rat-ZAP) を用い細胞内に取り込まれ、リボソームを不活性化することにより、細胞傷害性を与えるとの原理を利用することにした。

まず CL-4 抗体のプレターゲティング技術への応用の可能性について *in vitro* で検討した。Rat-ZAP を単独投与による細胞傷害性を検討したところ、いずれの濃度でも、細胞死は見られなかった (Figure 38)。次に、rat-ZAP 単独では細胞死を誘導しないことを確認した。さらに 5A5 を前処理した MKN74、LoVo 及び Mia Paca-2 細胞において、rat-ZAP を添加したところ、5A5 添加濃度依存的な細胞死が見られた (Figure 39)。Rat-ZAP が 5A5 の CL-4 への結合を介して細胞内に取り込まれ、細胞傷害性を示したことが考えられる。それで *in vivo* での検討を行ったところ、5A5 および rat-ZAP 投与群と rat-ZAP 非投与群の間に腫瘍サイズの違いは見られなかった。このとき両群ともマウスの体重減少は認められなかった (Figure 40)。

C. 10 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

hCL-4 抗体 4D3 および 3B11 を用いてバリア制御活性を評価し、既存の CL binder である C-CPE と比較した。hCL-4 抗体はバリア活性を低下させることが 2 クローンとも確認できた。また、クローン

間における活性の有意な差は見られず、同濃度の C-CPE との活性を比較したところ、いずれの濃度においても hCL-4 抗体に比べ C-CPE のほうが高い活性を有することが確認された。また、抗体を除去しても、バリア機能の回復が見られなかった (Figure 41)。

C. 11 ラット抗体 9g7 のエピトープ同定

まず、9g7 の可変部領域配列を同定した (Table 6)。9g7 は hCL-4 の一次構造を認識することを確認後 (Figure 42)、hCL-4、hCL-3、mCL-4、mCL-3 の全長配列を元にしたペプチドアレイを用いた検討を行った。その結果、hCL-4、hCL-3、mCL-4、mCL-3 の全長配列を元にしたペプチドアレイを用いた検討では、hCL-4 のスポット D10~D13 (Figure 43A)、hCL-3 のスポット G10~J13 (Figure 43B)、mCL-4 のスポット J10~G13 (Figure 43C) で有意なシグナルが検出された。mCL-3 に対しては、強い反応性は認められなかった (Figure 43D)。以上の結果より、9g7 は hCL-4 の 37-42 アミノ酸 (GSNIVT) を認識すると推察される。また、hCL-3、mCL-4 にも共通するアミノ酸である S38、N39、I40、T42 が結合性に重要である可能性が示唆された。

さらに、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。その結果、S38、I40、V41 が結合性に関与していると考えられる。認識配列が 4 アミノ酸にまたがっており、3 アミノ酸のスポット (F19-G2) ではシグナルが検出されなかったことも相関している (Figure 44)。

そこで、遊離ペプチド断片を添加した FACS 解析による competition assay を行い、エピトープ情報の補強を行った。用いたペプチド断片は、hCL-4 の 37-42aa (GSNIVT)、およびその逆配列 (TVINSG) である。その結果、いずれの抗体濃度、ペプチド濃度においても、hCL-4 の 37-42aa (GSNIVT) ではシグナルの減弱が見られた。一方、その逆配列 (TVINSG) ではシグナルの減弱は認められなかった。以上の結果より、9g7 は hCL-4 の

37-42aa (GSNIVT)を認識していると考えられる (Figure 45)。

C. 12 hCL5 結合性 scFv の精製

C. 12. 1 MBP-tag scFv の精製

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。構築した一本鎖抗体遺伝子にMBP-tagを付加し、精製を行ったところ、0.124 mg/mlの精製蛋白質1.8 mlが得られた。その後SDS-PAGEにてタンパク質の発現を確認した(Figure 46)。

C. 12. 2 MBP-tag scFv の活性確認

hCL1、hCL2、hCL3、hCL4、hCL5-BV を 96 well ELISA plate に固相化して MBP-tag scFv を添加した後、結合性を ELISA 法により解析した。その結果、hCL5-BV に対する結合性が観察された (Figure 47)。しかしながら、hCL1、hCL2、hCL3、hCL4、hCL5 発現 HT1080 細胞に対し、MBP-tag scFv を添加し、FACSCalibur にて結合力を測定した。CellQuestPro にて解析を行ったところ、いずれも結合性を示さなかった。

C. 13 scFv の完全抗体化

C. 13. 1 scFv 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 の完全抗体化を図り、pFUSEss-CLIg-hk-scFv-VL および pFUSEss-CHlg-hG 1-scFv-VH を作製した。(Figure 48)

C. 13. 2 CL に対する scFv 由来抗体の結合性解析

hCL1、hCL2、hCL3、hCL4、hCL5 発現 HT1080 細胞に対し、5R2-081 抗体上清、5R2-149 抗体上清、5R3-063 抗体上清を添加し、FACSCalibur にて結合力を測定した。CellQuestPro にて解析を行ったところ、いずれも結合性を示さなかった (Figure 49)。

C. 14 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

C. 14 1 cDNA の合成

hCL5 の DNA 免疫を行ったマウスの脾臓細胞の mRNA から cDNA を合成し、GAPDH のバンドを認めることで cDNA を確認した (Figure 50)。VH, VL 鎖領域の DNA 断片を得るため PCR 反応を亢進する primer の設計を行っている。

D. 考察

D.1 CL-1 を標的とした創薬研究について

本研究は、抗体を含めた CL-1 結合分子を創製し、CL-1 を標的とした創薬の可能性、および CL-1 結合分子の創薬シーズとしての可能性を検証することを目的としている。本年度は、これまでに創製した抗 CL-1 抗体のエピトープおよび種間交叉性の解析を行うと共に、CL-1 を標的とした C 型肝炎治療、がん治療、吸収促進の可能性を検証した。

CL-1 を標的とした創薬の可能性はウイルス感染阻害、がん治療、吸収促進など多岐にわたっており、それぞれの創薬展開に適したエピトープが存在すると予想される。よって、CL-1 を標的とした創薬の可能性を検証する上では、多様なエピトープを認識する複数の結合分子を創製することが望ましい。また、マウスやラットモデルを用いた毒性、安全性解析を行うためには、種間交叉性を有する必要がある。しかしながら、先行研究 (Fofana I et al., *Gastroenterology*, 139, 953-964 (2010)) で作製されたラット抗 CL-1 抗体は、いずれも同様のエピトープを有し、かつ、げっ歯類の CL-1 には結合しないことが報告されている。一方、本研究で創製した抗 CL-1 抗体は多様なエピトープを有しており、また rCL-1 に結合することが明らかになった。これは、先行研究ではヒトと相同性の高いウイスターラットを免疫動物として用いているのに対し、本研究ではより相同性の低いマウスを選択したことにより起因していると考えられる。

先行研究 (Fofana I et al., *Gastroenterology*, 139, 953-964 (2010)) では、in vitro 実験系において HCV 感染を阻害する抗 CL-1 抗体を報告している。

しかしながら、未だ *in vivo* 実験系において HCV 感染阻害活性を有する CL-1 binder は報告されていなかった。本研究で創製した抗 CL-1 抗体は、ヒト肝キメラマウスを用いた *in vivo* HCV 感染実験系において有意な HCV 感染阻害効果が認められた。この時、一般状態の変化、AST、ALT の増加などの副作用は認められなかったことから、CL-1 を標的とした HCV 感染阻害法の有効性および安全性が示唆された。

更に、pegasys との併用実験において、当試験条件における clone 3A2 と pegasys の併用による有意な HCV 治療相乗効果は認められなかったものの、clone 3A2 投与群において HCV の増殖抑制傾向が観察され、試験条件を検討することでインターフェロンとの併用療法への応用の可能性が示唆されたことから、HCV 感染阻害薬開発に向けた創薬シーズとして非常に有用である。

D.2 CL-4 を標的とした創薬研究について

昨年で hCL-4 発現 DNA をラットに免疫することにより、hCL-4 結合性を有するモノクローンを 9 個取得した。今年度では、この 9 クローンのハイブリドーマから CL-4 抗体を精製し、その性質を検討し、さらにその抗腫瘍効果を検討してみた。

CL-4 抗体の CL 結合特異性を検討した結果、5 クローンは hCL-3 への結合性、3 クローンは mCL-4 への結合性も示した。mCL-4 と hCL-4 の間および hCL-3 と hCL-4 の間の相同性が高いため、9 クローンの中に、CL-4 結合特異的なクローンのみならず、ヒトマウス交差性を有するクローンも取得した。また、各 CL-4 抗体の結合定数を解析した結果、4F10 以外のいずれのクローンにおいても、結合速度定数 K_a はほぼ同程度であったことから、解離速度定数 K_d の違いが結合強度の差となったと考えられる。すなわち、5D12 および 5A5 は hCL-4 との相互作用時間が長く持続している可能性が示唆された。

当研究室では、CL-4 を標的とした癌治療法の POC を確立した。しかしながら、CL-4 は TJ 構成タンパク質として、肝臓、腎臓、甲状腺、腸などの正

常組織にも発現していることが報告されていることから、CL-4 binder の体内動態を検討した。評価する CL-4 binder として、C-CPE および mCL-4 に結合性を有することが報告されているラット抗体 HKH189.J9 を実験に供した。また、hCL-4 を発現している膵臓癌細胞 Mia Paca-2、胃癌細胞 MKN74 および大腸癌細胞 LoVo を皮下移植したマウスを用い、5A5 を使用し、腫瘍集積性を解析した。CL-4 binder の体内動態を検討した結果、C-CPE および HKH189.J9 はともにそれぞれのネガティブコントロールと比べ一時的な肝臓への蓄積性が観察された。また、C-CPE は甲状腺および腸において、きわめて低い蓄積性しか観察されず、HKH189.J9 は一時的に脾臓および腎臓への蓄積が観察された。体内分布の観察結果から、CL-4 binder を体内に投与した際、CL-4 結合性による生体への影響はきわめて低いと考えられた。ここで、C-CPE および HKH189.J9 の組織蓄積性が異なる原因は以下の二点が考えられる。第一の原因として、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 の体内分布には CL-3 への結合性が影響すると考えられる。第二の原因として、C-CPE の分子量 (14 kDa) と抗体 HKH189.J9 の分子量 (150 kDa) は約 10 倍もの差があることから、組織浸透性の違いが原因になると考えられる。また、今回の体内動態検討では、蛍光で評価したため、抗体の真の動態を評価しているとは限らない。したがって、蛍光物質標識抗体の安定性を今後検討する必要があると考えている。また、ヒト癌細胞移植マウスを作製し、5A5 の腫瘍蓄積性を検討した結果、Mia Paca-2 (CL-4 低発現) 移植マウスおよび MKN74 および LoVo (CL-4 高発現) 移植マウスのどちらにおいても、5A5 は顕著な腫瘍蓄積性を示すことが観察された。この結果から、CL-4 が癌細胞表面に露出することが CL-4 へのターゲティングに重要であると考えられる。以上の結果から、CL-4 抗体は癌ターゲット分子として有用であることが明らかとなった。さらに 5A5 の腫瘍移植時間依存的な蓄積性検討では、腫瘍の増殖により、5A5 の蓄積量が減少してきた傾向が見られた。

移植後時間を経つと、腫瘍サイズが大きくなってきた。蛍光強度を計算する際に、腫瘍の重量を割るため、重いほど、相対的な蓄積量が減少すると考えている。この結果から、投与したラット抗体 5A5 が腫瘍内部に浸潤できなく、腫瘍表面だけに蓄積していたことが推測できた。

以上の結果を踏まえ、続いて 5A5 の抗腫瘍活性を検討した。In vitro での検討では、抗体による抗腫瘍効果の検証として一般的に行われている CDC 活性および ADCC 活性の評価を行った。本研究では、ADCC アッセイとして、Fc γ 受容体発現細胞を用いた ADCC 活性評価系を利用して検討した。CDC アッセイの結果では、いずれの CL-4 抗体も hCL-4 発現癌細胞に傷害性を示さなかったが、これは CL-4 抗体が血清中の補体に対する親和性が低いこと、または癌細胞内発現する CD59 が抗体の CDC 活性を阻害したことが想定された。Fc γ 受容体活性を測定した結果、各 CL-4 抗体添加濃度依存的な Fc γ 受容体活性化が観察されたことから、ADCC 活性は示すことが示唆された。また、hCL-4 発現癌細胞をヌードマウスの皮下に移植した担癌モデルマウスを用い、5A5 の抗腫瘍効果を検討した結果、5A5 の腹腔内投与により、皮下移植腫瘍の増殖は PBS 群に比べ抑制されていたが、十分な抑制効果には至らなかった。そこで現在、ヒトキメラ抗体の作製を進めているところである。

近年、抗体を用いる抗腫瘍研究では、プレターゲティングの開発が盛んに進められている。そこで、抗腫瘍効果を示す 5A5 を用い、プレターゲティング技術に応用可能か検討を行った。プレターゲティング治療は、標的分子選択的に抗癌剤あるいは毒物を正常細胞への薬物送達を最小限にとどめ、副作用の低減に貢献すると考えられる。本研究では、5A5 および毒素 saporin 融合 anti-rat IgG (rat-ZAP) を利用し検討を行った。In vitro での検討では、5A5 と rat-ZAP との共同作用による細胞傷害性が見られたが、In vivo での検討では、十分な抗腫瘍増殖効果が見られなかった。その原因として、rat-ZAP の投与量が不十分であった可能性が考えられ、今後投与量に関する検討を行う必要

があると考ええる。

また、当研究室ではこれまでに、CL-4 binder である C-CPE が TJ バリア制御活性を有することを報告してきた。そこで今回取得した CL-4 抗体が同様に TJ バリアを制御できるか検討を行った。その結果、CL-4 抗体はバリア機能を減弱させたが、抗体を除去しても、バリア機能の回復は確認できなかった。また、CL-4 抗体のバリア制御活性は C-CPE より弱いものであり、これは、hCL-4 と C-CPE の分子量、CL-4 結合領域、結合力などの違いによるものである可能性が考えられる。今後 hCL-4 抗体の解析を進めることで、より高いバリア制御活性を有する CL binder 創製が期待できる。

なお、今回取得した 9 クローンの中に、9g7 のみを変性した CL-4 に反応性を有することがわかった。よって、CL のペプチドアレイを用い、9g7 のエピトープ解析を行った。検討した結果、9g7 は hCL-4 の 37-42aa (GSNIVT) を認識していることがわかった。今後、他のサブタイプとのキメラ CL または CL mutant 発現細胞を作製し、9g7 の CL-4 結合エピトープを確認するとともに、ほかの CL-4 抗体についてもエピトープ解析を行う予定である。

D. 3 CL-5 を標的とした創薬研究について

現在までに CL5 binder の創製は遅々として進展しておらず、CL5 を標的とした脳内薬物送達の POC は確立されていない。前年度までに本研究では、hCL5 binder の創製を目的に、抗原として hCL5-BV を用い、免疫動物として gp64 トランスジェニックマウスの脾臓をもとに 3.86×10^5 CFU の多様性を有するファージライブラリと hCL5 結合性 scFv 提示ファージを得た。

本年度はその scFv 提示ファージを用いて MBP-tag 付き scFv の精製と、scFv の VL, VH 遺伝子を用いた完全抗体の作製を行い、解析した。

scFv については、hCL5 提示 BV に結合性を示したが、hCL5 発現 HT1080 細胞には結合性を示さなかった。考えられる理由のひとつに、BV は昆虫細胞由来、HT1080 はヒト由来であるため、その糖鎖の違いがこの様な結果をもたらした可能性が挙げ

られる。また他の可能性として hCL5-BV と hCL5 発現 HT1080 において立体構造が異なる可能性、または MBP-tag が scFv の構造を変化させている可能性などが挙げられる。そのためそれぞれのタンパク発現系の立体構造解析、scFv 提示ファージと同じ構造を保つ様な tag の模索、又は scFv のみの精製法の究明が求められる。

また scFv 由来抗体に関して、完全抗体化が成功したという scFv の報告もなされていることから、ある一定条件を満たす scFv のみが、完全抗体化しても活性を失わないのではないかと考えられる。

E. 結論

本年度は、昨年度までに創製した抗体について、①抗 CL-1 抗体のエピトープ解析および結合性解析、②抗 CL-1 抗体の C 型肝炎感染阻害活性解析、③抗 CL-4 抗体の結合性および動態解析、④抗癌活性解析などを実施し、⑤CL-5 binder の創製を試み、以下の成果を得た。

①抗 CL-1 抗体のエピトープ解析および結合性解析

いずれのクローンも、hCL-1 の第二細胞外領域を認識しており、かつクローン間で異なるエピトープを有することが明らかになった。先行研究 (Fofana I et al., Gastroenterology, 139, 953-964 (2010)) で報告された抗 CL-1 抗体は、hCL-1 の第一細胞外領域を認識することが示唆されており、これらの抗体とは異なるエピトープを認識すると考えられる。本年度得られたエピトープ情報は、今後、ウイルス感染阻害、抗がん活性、TJ バリア制御活性などを評価する際に有益な情報になると考えている。

CL-1 は様々な創薬標的として注目されているものの、binder 創製の難しさに伴い、動物モデルを用いた CL-1 binder の安全性解析は立ち遅れている。本年度行った解析により、本研究で創製した抗 CL-1 抗体は、rCL-1 にも結合性を示すことが明らかになった。本年度の知見を活かし、今後、ラ

ットなどの動物モデルを用いた CL-1 binder の安全性解析を行いたいと考えている。

②抗 CL-1 抗体の C 型肝炎感染阻害活性解析

本年度は、抗 CL-1 抗体の in vivo HCV 感染阻害活性試験を行った。本年度の in vivo HCV 感染実験は、エピトープおよび in vitro での感染阻害活性の異なる clone 3A2、7A5 の 2 クローンに絞って行った。どちらのクローンにおいても、血清中 HCV RNA 量増加が優位に抑制されており、clone 3A2 では 4 匹中 3 匹、clone 7A5 では 4 匹中 1 匹において HCV 感染を完全に阻害したと考えられる。また、血中ヒトアルブミン値や肝毒性マーカーである AST、ALT の目立った変化は観察されなかったことから、ヒト肝臓に対する毒性が低いことが示唆された。また、抗 CL-1 抗体のインターフェロン併用療法応用への可能性も示唆された。In vivo において HCV 感染阻害活性を示す抗 CL-1 抗体は、当該クローンが世界初であり、C 型肝炎治療法開発における有効性、安全性を兼ね備えた創薬シーズとして非常に有用であることが示された。

③抗 CL-4 抗体の結合性および動態解析

本年度は昨年度作製した CL-4 モノクローナル抗体 8 クローンの CL 結合特異性および結合力を詳細解析し、ヒト CL-4 特異的抗体、ヒト CL-3/-4 認識抗体、ヒト・マウス CL-4 交叉性抗体が含まれていることを見出した。さらに、蛍光標識抗体作製し、ヒト癌皮下移植マウスを用いて in vivo 腫瘍集積性を確認し、検討した 2 クローンで優れた腫瘍集積性が観察された。また、安全性情報の収集を図るために、CL-3/-4 binder である C-CPE、マウス CL-4 抗体を用いて、マウスの正常組織への集積性を解析し、安全性評価の際に注目すべき臓器を同定した。

④抗 CL-4 抗体の抗癌活性解析

まず、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC 活性) の指標の 1 つである Fc γ 受容体活性化能を解析し、いずれのクローンも Fc γ 受容体活性化能を有して

いた。そこで腫瘍集積性を確認したクローンの *in vivo* 抗腫瘍活性を解析したところ、弱いながらも腫瘍増殖抑制傾向が観察された。

また、抗体を処理した細胞において Rat-ZAP の取込みが認められていたことから、腫瘍へのプレターゲットング治療に資する可能性が示唆された。

⑤CL-5 binder の創製

まず、昨年度取得したhCL5結合性scFv提示ファージを用いてscFv精製を試み、MBP-tag付きscFvを精製し、結合性を解析したところ、hCL5-BVに結合性を示したが、hCL5発現HT1080には結合性を示さなかった。さらに、本VH, VL配列をヒトIgG1のVH, VL領域と入れ換えたキメラ抗体を作製し、結合性を解析したものの、本抗体もCL5結合性を保持していなかった。

以上、本年度の研究成果を踏まえ、来年度は①ラットモデルを用いた CL-1 binder の安全性解析、②*in vivo* における抗 CL-1 抗体の抗がん活性解析、③CL-1 binder の皮膚バリア制御機構の解析、④低分子 CL-1 binder 創製に向けた基礎検討、⑤抗 CL-4 抗体のヒトキメラ化による抗腫瘍活性の増強などを行いたいと考えている。また、⑥新たに作製した抗 CL 抗体の特許化、⑦CL-5 binder 創製に向けた新技術導入を進めていく予定である。

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*, 2013, 133, 305-311.
2. Yamagishi, Y.; Watari, A.; Hayata, Y.; Li, X.; Kondoh, M.; Tsutsumi, Y.; Yagi, K. Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice. *Pharmazie*, 2013, 68,

178-182.

3. Iida, M.; Yoshida, T.; Watari, A.; Yagi, K.; Hamakubo, T.; Kondoh, M. A baculoviral display system to assay viral entry. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36, 1867-1869.
4. Li, X.; Saeki, R.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Tissue distribution and safety evaluation of a claudin-targeting molecule, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 52, 1532-1537.
5. Iida, M.; Yagi, K.; Kondoh, M. The cutting edge of claudin-targeted drug development. *Membrane*, 2013, 38, 174-180.
6. Nagase, S.; Doyama, R.; Yagi, K.; Kondoh, M. Recent advances in claudin-targeting technology. *Bio Pharm Bull*, 2013, 36, 708-714.
7. Sakurai, F.; Kondoh, M. New approaches to drug discovery research and medical treatment using viruses—Viruses are valuable materials—, *Yakugaku Zasshi*, 2013, 133, 289.
8. Yamagishi, Y.; Watari, A.; Hayata, T.; Li, X.; Kondoh, M.; Yoshioka, Y.; Tsutsumi, Y.; Yagi, K. Acute and chronic nephrotoxicity of platinum nanoparticles in mice. *Nano Res Lett*, 2013, 8, 395

2. 学会発表

1. Shimizu, Y.; Kondoh, M.; Watari, A.; Fukasawa, M.; Yagi, K. Effect of claudin on cytochrome P450 activity. Experimental Biology 2013, Apr 20-24, 2013, Boston, MA, USA
2. Yamashita, M.; Nagase, S.; Takahashi, A.; Iwanari, H.; Kondoh, M.; Watari, A.; Hamakubo, T.; Yagi, K. Characterization of scFv libraries derived from mice differently immunized with claudin. Experimental Biology 2013, Apr 20-24, 2013, Boston, MA, USA

3. Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Watari, A.; Kondoh, M.; Fukasawa, M.; Yagi, K.
Development of anti-claudin-1 ligand.
Experimental Biology 2013, Apr 20–24, 2013, Boston, MA, USA
4. Iida, M.; Kondoh, M.; Watari, A.; Yagi, K. A toxicological evaluation of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin as a claudin-3/-4 binder.
Experimental Biology 2013, Apr 20–24, 2013, Boston, MA, USA
5. Li, X.; Kondoh, M.; Watari, A.; Yagi, K.
Tissue-distribution of claudin-3/-4 binder, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, in mice. Experimental Biology 2013, Apr 20–24, 2013, Boston, MA, USA.
6. Kondoh, M.; Yagi, K. Bicellular or tricellular tight junction binders and their pharmaceutical activities. Gordon research seminar, June 1–2, 2013, Lucca, Italy.
7. Kondoh, M.; Yagi, K. Bicellular or tricellular tight junction binders and their pharmaceutical activities. Gordon research conference, June 3–6, 2013, Lucca, Italy.
8. Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Claudin-1-specific monoclonal antibodies and their inhibition of hepatitis C virus infection. 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 21–24, 2013, Honolulu, Hawaii, USA.
9. Suzuki, H.; Kuniawa, J.; Yamashita, M.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. An improved claudin-targeting mucosal vaccine using a double alanine-substituted mutant of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 21–24, 2013, Honolulu, Hawaii, USA.
10. Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Shirasago, Y.; Fukasawa, M.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Claudin-1-specific monoclonal antibodies and their inhibition of hepatitis C virus infection
ILCA 2013: International Liver Cancer Association Seventh Annual Conference, Sep 13–15, 2013, Washington, D.C. USA
11. Fukasawa, M.; Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Shirasago, Y.; Watari, A.; Suzuki, T.; Wakita, T.; Yagi, K.; Kondoh, M. Inhibition of hepatitis C virus infection by mouse anti-claudin 1 monoclonal antibodies., HCV2013
20th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses 2013, Oct 6–10, 2013, Melbourne, Australia.
12. Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Fukasawa, M.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M.
Development of monoclonal antibodies to the extracellular loop regions of claudin-1 and their application to HCV therapy, 2013 AAPS Annual Meeting and Exposition, Nov 10–14, 2012, San Antonio, TX, USA.
13. Doyama, R.; Matsushita, K.; Takahashi, A.; Matsuhisa, K.; Watari, A.; Hamakubo, T.; Yagi, K.; Kondoh, M. Creation of a broadly specific claudin binder and its absorption-enhancing activity, 2013 AAPS Annual Meeting and Exposition, Nov 10–14, 2012, San Antonio, TX, USA.
14. Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Shirasago, Y.; Fukasawa, M.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Claudin-1-specific monoclonal antibodies and their inhibitory activity against hepatitis C virus infection. Antibody Engineering & Therapeutics 2013, Dec 8–12, Huntington Beach, CA, USA.
15. Iida, M.; Li, X.; Kuniyasu, H.; Fukasawa, M.; Tada, M.; Ishii, A.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. Development of claudin-4-specific monoclonal antibodies and their anti-tumor activities. Antibody Engineering & Therapeutics 2013, Dec

- 8-12, Huntington Beach, CA, USA.
16. Li, X.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M.
Tissue-distribution and safety evaluation of a claudin-3/-4 binder in mice. 53rd Annual meeting of the American society for cell biology, Dec 14-18, 2013, New Orleans, LO, USA.
 17. Fukasawa, M.; Nagase, S.; Yamashita, M.; Iida, M.; Shirasago, Y.; Hanada, K.; Watari, A.; Yagi, K.; Kondoh, M. *In vitro* and *in vivo* inhibition of hepatitis C virus infection by mouse anti-human claudin 1 monoclonal antibodies. 53rd Annual meeting of the American society for cell biology, Dec 14-18, 2013, New Orleans, LO, USA.
 18. Watari, A.; Hasegawa, M.; Yagi, K.; Kondoh, M. Identification of chemical compounds that modulate claudin-4 expression by cell-based screening. 53rd Annual meeting of the American society for cell biology, Dec 14-18, 2013, New Orleans, LO, USA.
 19. 近藤昌夫、八木清仁、上皮バリアを標的とした創薬研究の新展開、日本膜学会第 35 年会、平成 25 年 5 月 20-21 日、東京
 20. 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、多田稔、石井明子、八木清仁、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第 1 報 ~claudin-1 特異性抗体の創製~、第 29 回日本 DDS 学会、平成 25 年 7 月 4-5 日、京都
 21. 飯田愛未、長瀬翔太郎、山下真代、近藤昌夫、八木清仁、國安弘基、深澤征義、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第 2 報 ~claudin-1 抗体の C 型肝炎治療への応用~、第 29 回日本 DDS 学会、平成 25 年 7 月 4-5 日、京都
 22. 清水芳実、李相儒、渡利彰浩、近藤昌夫、深澤征義、多田稔、石井明子、國安弘基、八木清仁、上皮細胞を標的とした創薬基盤研究第 3 報 ~claudin-4 特異性抗体の創製~、第 29 回日本 DDS 学会、平成 25 年 7 月 4-5 日、京都
 23. 早石知浩、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、ウエルシュ菌イオタ毒素を用いた tricellular tight junction 制御法の開発、第 60 回トキシシンポジウム、平成 25 年 7 月 17-19 日、兵庫
 24. 飯田愛未、鈴木英彦、李相儒、近藤昌夫、渡利彰浩、八木清仁、Claudin を標的とした粘膜吸収促進法の開発、第 32 回分子病理研究会、平成 25 年 7 月 20-21 日、奈良
 25. 李相儒、近藤昌夫、渡利彰浩、八木清仁、Claudin-3 and -4 binder の体内動態解析および安全性評価、第 32 回分子病理研究会、平成 25 年 7 月 20-21 日、奈良
 26. 土山遼、鈴木英彦、角谷英樹、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、Claudin を標的とした粘膜ワクチン技術の開発、第 32 回分子病理研究会、平成 25 年 7 月 20-21 日、奈良
 27. 李相儒、近藤昌夫、渡利彰浩、八木清仁、Claudin-3/-4 結合分子(C-CPE)を利用する体内動態および安全性解析、日本薬物動態学会 第 28 年会、平成 25 年 10 月 9-11 日、東京
 28. 山下真代、長瀬翔太郎、飯田愛未、白砂圭崇、深澤征義、近藤昌夫、多田 稔、石井明子、渡利彰浩、八木清仁、抗 Claudin-1 抗体の創製と評価、日本薬物動態学会 第 28 年会、平成 25 年 10 月 9-11 日、東京
 29. 近藤昌夫、八木清仁、上皮を標的とした創薬研究の新展開、第 66 回 日本細菌学会中国・四国支部総会、平成 25 年 10 月 12~13 日、広島
 30. 川東祐美、李相儒、國安弘基、多田稔、石井明子、深澤征義、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、上皮を標的とした創薬基盤研究~ Claudin-4 抗体の作製および抗腫瘍活性解析~、日本薬学会第 134 年会、平成 26 年 3 月 27-30 日、熊本
 31. 竹澤知明、小俣大樹、鈴木亮、小田雄介、宇留賀仁史、近藤昌夫、丸山一雄、Claudin binder 修飾リポソームによる Claudin-4 発現細

- 胞への選択的結合能の評価、日本薬学会第134年会、平成26年3月27-30日、熊本
32. 畑智幸、長瀬翔太郎、白砂圭崇、深澤征義、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、上皮を標的とした創薬基盤研究～抗 claudin-1 抗体のエピトープ・交叉性解析～、日本薬学会第134年会、平成26年3月27-30日、熊本
33. 木村友香、李相儒、飯田愛未、多田稔、石井明子、國安弘基、深澤征義、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、上皮を標的とした創薬基盤研究～Dual specific claudin-3/-4 抗体の動態特性および抗癌活性解析～、日本薬学会第134年会、平成26年3月27-30日、熊本
34. 井口大輔、早石知浩、Susanne M. Krug、Michael Fromm、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、上皮を標的とした創薬基盤研究～Tricellular tight junction 制御法の開発～、日本薬学会第134年会、平成26年3月27-30日、熊本

35. 中嶋美咲、山下真代、渡利彰浩、深澤征義、近藤昌夫、八木清仁、上皮を標的とした創薬基盤研究～Claudin-1 を標的とした表皮バリア制御の可能性～、日本薬学会第134年会、平成26年3月27-30日、熊本

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

- 1)(発明者)近藤昌夫、深澤征義、石井明子、多田稔、八木清仁、渡利彰浩「抗体、フラグメント、分子及び抗 HCV 治療剤」
(PCT/JP2013/006602)出願中

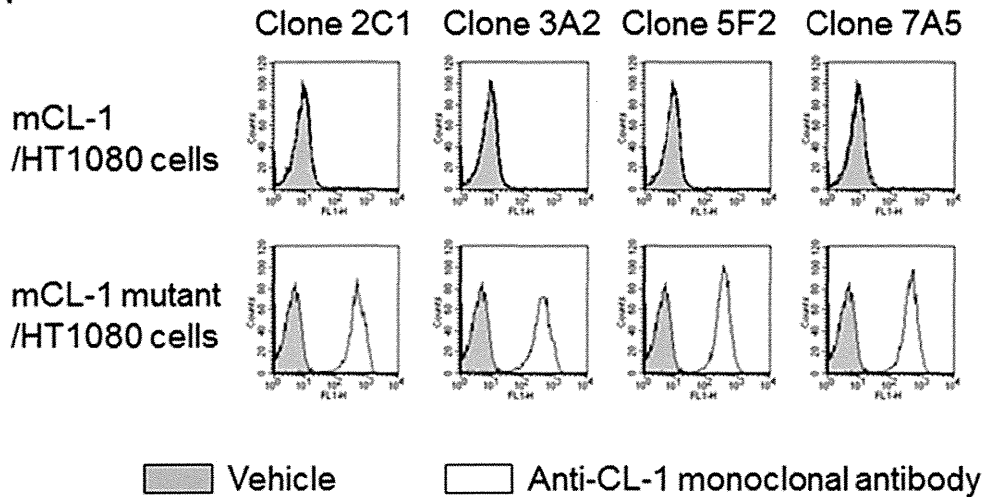
2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

A



B

CL-1 1st loop

hCL-1 QWR I YSYAGDN I VTAQAMY EGLWMSCV SQSTGQ IQCKV FDSL LNLSSTLQATR

mCL-1 --K-----I-----N-----

mCL-1 mutant -----

↑
31

↑
46

↑
74

CL-1 2nd loop

152 155
↓ ↓
hCL-1 QEFYDPMPVNARYE

mCL-1 -----L--I-----

mCL-1 mutant -----

Figure 1 Flow cytometry analysis of anti-CL-1 monoclonal antibodies against mCL-1 and mCL-1 mutants.

A) HT1080 cells transfected mCL-1 or mCL-1 mutant expressing vector were incubated with 5 μ g/mL of anti-CL-1 monoclonal antibodies (white histogram) or PBS as vehicle (gray histogram), and binding was detected by FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). B) Amino acid sequences of extracellular loops of hCL-1, mCL-1 and mCL-1 mutants. Conserved residues are indicated by a dash.

Table 1 Amino acid sequence of peptide spot array.

Spot number	Position of human claudin-1	Sequence
A1	1-15	MANAGLQLLGFILAF
A2	4-18	AGLQLLGFILAFLGW
A3	7-21	QLLGFILAFLGWIGA
A4	10-24	GFILAFLGWIGAIVS
A5	13-27	LAFLGWIGAIVSTAL
A6	16-30	LGWIGAIVSTALPQW
A7	19-33	IGAIVSTALPQWRIY
A8	22-36	IVSTALPQWRIYSYA
A9	25-39	TALPQWRIYSYAGDN
A10	28-42	PQWRIYSYAGDNIVT
A11	31-45	RIYSYAGDNIVTAQA
A12	34-48	SYAGDNIVTAQAMYE
A13	37-51	GDNIVTAQAMY EGLW
A14	40-54	IVTAQAMY EGLW MSC
A15	43-57	AQAMY EGLW MSCV SQ
A16	46-60	MYEGLW MSCV SQ STG
A17	49-63	GLW MSCV SQ STG QIQ
A18	52-66	MSCV SQ STG QIQ CKV
A19	55-69	VSQ STG QIQ CKV FDS
A20	58-72	STG QIQ CKV FDS LLN
A21	61-75	QIQ CKV FDS LLN LSS
A22	64-78	CKV FDS LLN LSS TLQ
A23	67-81	FDS LLN LSS TLQ ATR
A24	70-84	LLN LSS TLQ ATR ALM

Table 1
To be continued

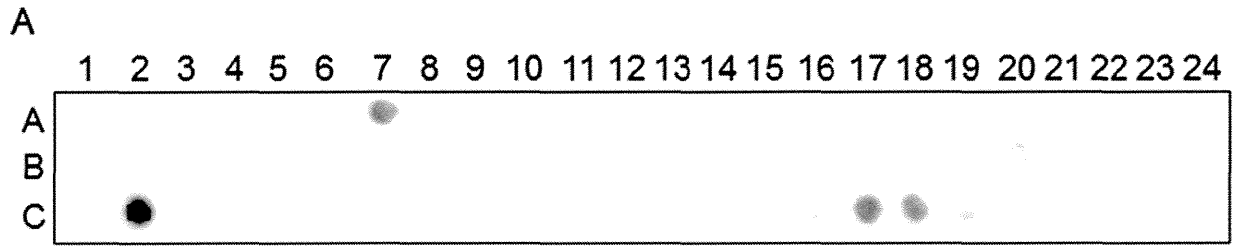
Table 1 Amino acid sequence of peptide spot array.

Spot number	Position of human claudin-1	Sequence
B1	73-87	LSSTLQATRALMVVG
B2	76-90	TLQATRALMVVGILL
B3	79-93	ATRALMVVGILLGVI
B4	82-96	ALMVVGILLGVIAIF
B5	85-99	VVGILLGVIAIFVAT
B6	88-102	ILLGVIAIFVATVGM
B7	91-105	GVIAIFVATVGMKCM
B8	94-108	AIFVATVGMKCMKCL
B9	97-111	VATVGMKCMKCLEDD
B10	100-114	VGMKCMKCLEDDDEVQ
B11	103-117	KCMKCLEDDDEVQKMR
B12	106-120	KCLEDDDEVQKMRMAV
B13	109-123	EDDEVQKMRMAVIGG
B14	112-126	EVQKMRMAVIGGAIF
B15	115-129	KMRMAVIGGAIFLLA
B16	118-132	MAVIGGAIFLLAGLA
B17	121-135	IGGAIFLLAGLAILV
B18	124-138	AIFLLAGLAILVATA
B19	127-141	LLAGLAILVATAWYG
B20	130-144	GLAILVATAWYGNRI
B21	133-147	ILVATAWYGNRIVQE
B22	136-150	ATAWYGNRIVQEFYD
B23	139-153	WYGNRIVQEFYDPMT
B24	142-156	NRIVQEFYDPMTPVN

Table 1
To be continued

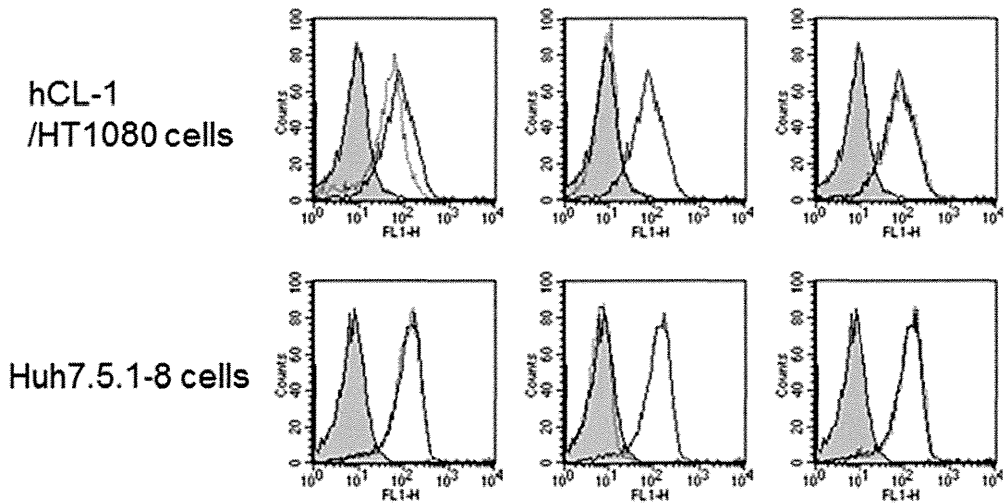
Table 1 Amino acid sequence of peptide spot array.

Spot number	Position of human claudin-1	Sequence
C1	145-159	VQEFYDPMTPVNARY
C2	148-162	FYDPMTPVNARYEFG
C3	151-165	PMTPVNARYEFGQAL
C4	154-168	PVNARYEFGQALFTG
C5	157-171	ARYEFGQALFTGWAA
C6	160-174	EFGQALFTGWAAASL
C7	163-177	QALFTGWAAASLCLL
C8	166-180	FTGWAAASLCLLGGGA
C9	169-183	WAAASLCLLGGALLC
C10	172-186	ASLCLLGGALLCCSC
C11	175-189	CLLGGALLCCSCPRK
C12	178-192	GGALLCCSCPRKTTTS
C13	181-195	LLCCSCPRKTTTSYPT
C14	184-198	CSCPRKTTTSYPTPRP
C15	187-201	PRKTTTSYPTPRPYPK
C16	190-204	TTSYPTPRPYPKPAP
C17	193-207	YPTPRPYPKPAPSSG
C18	196-210	PRPYPKPAPSSGKDY
C19	197-211	RPYPKPAPSSGKDYV



B

Peptide sequence	IGAIVSTALP QWRIY	FYDPMTPVN ARYEFG	PRPYPKPAP SSG
Position of hCL-1	19-33aa	148-162aa	196-207aa



Vehicle
 Clone 7A5 0.5 µg/mL
 Clone 7A5 0.5 µg/mL + Peptide 1.0 mg/mL

Figure 2 Epitope analysis of clone 7A5 using peptide based on hCL-1.

A) Peptide spot array was incubated with 0.5 µg/mL of clone 7A5 and binding was detected by HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). Peptide sequences were shown in table 1. B) Competition assay using peptide. hCL-1/HT1080 cells (upper panel) or Huh7.5.1-8 cells (lower panel) were incubated with PBS as vehicle (gray histogram), clone 7A5 (white histogram) or mixtures of clone 7A5 and each peptide (dotted histogram), respectively. The binding of clone 7A5 was detected by FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L).

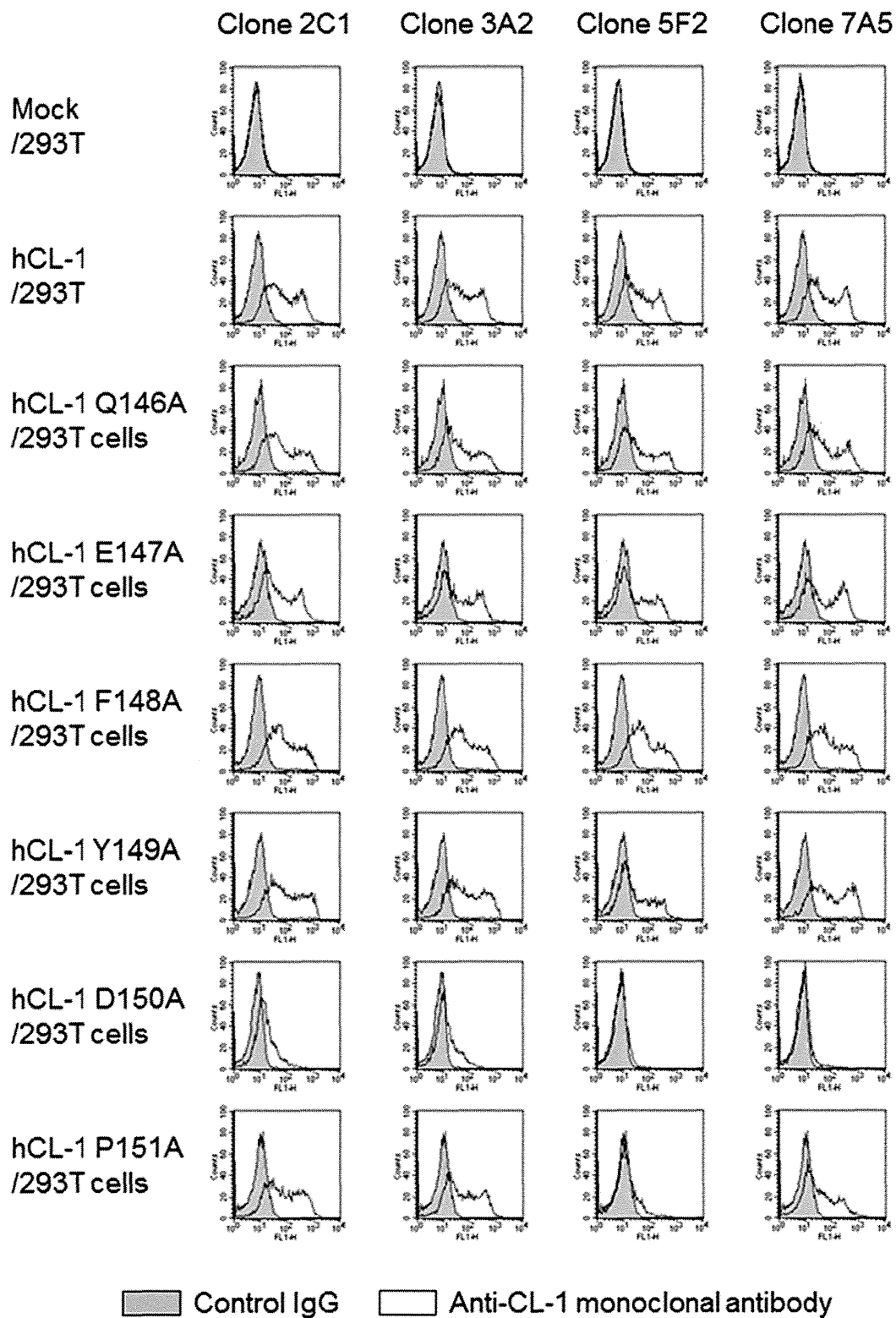


Figure 3
To be continued

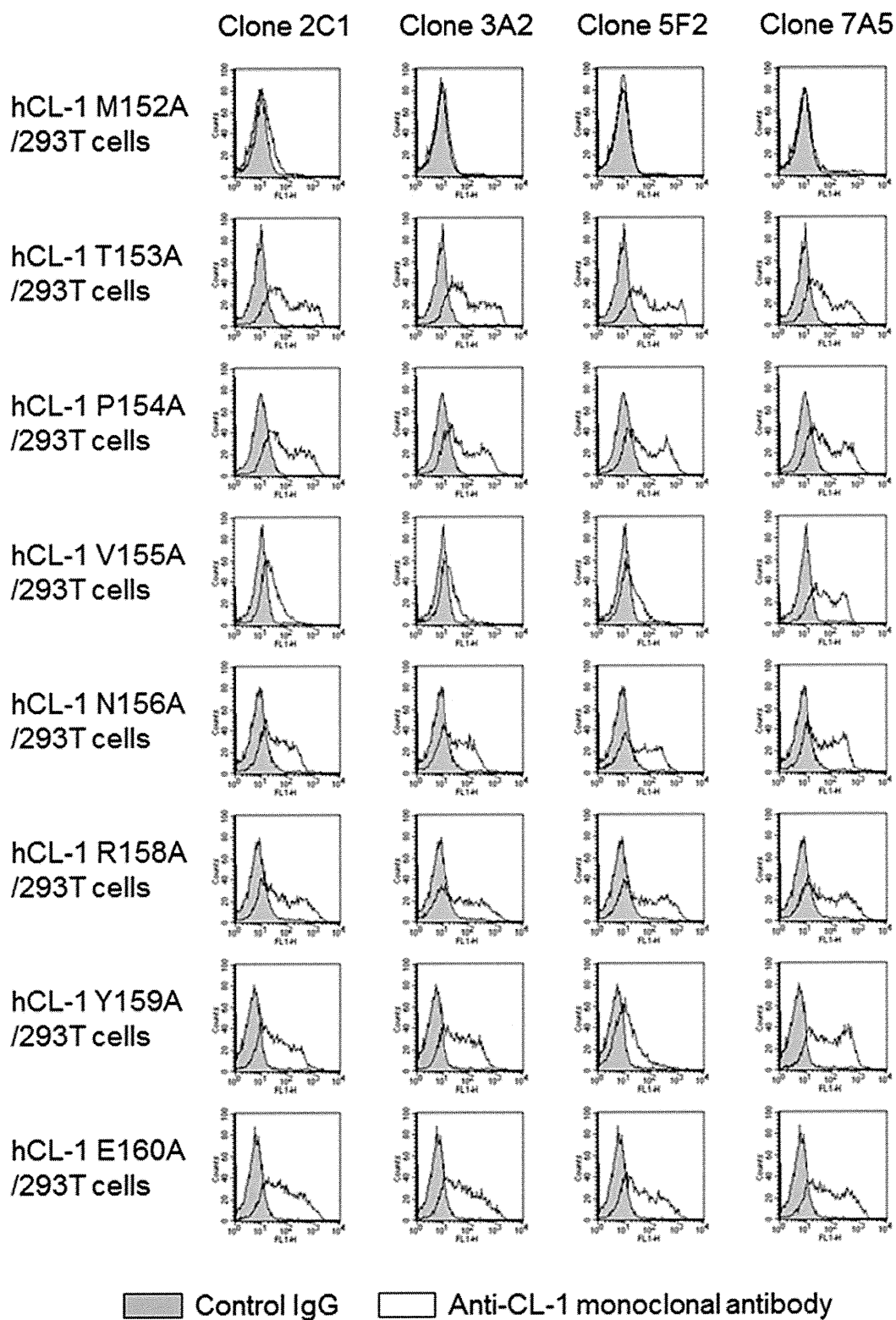


Figure 3 Flow cytometry analysis of anti-CL-1 monoclonal antibodies against series of hCL-1 alanine mutants.

Each cells were incubated with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-CL-1 monoclonal antibodies (white histogram) or control IgG (gray histogram), and binding was detected by FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L).

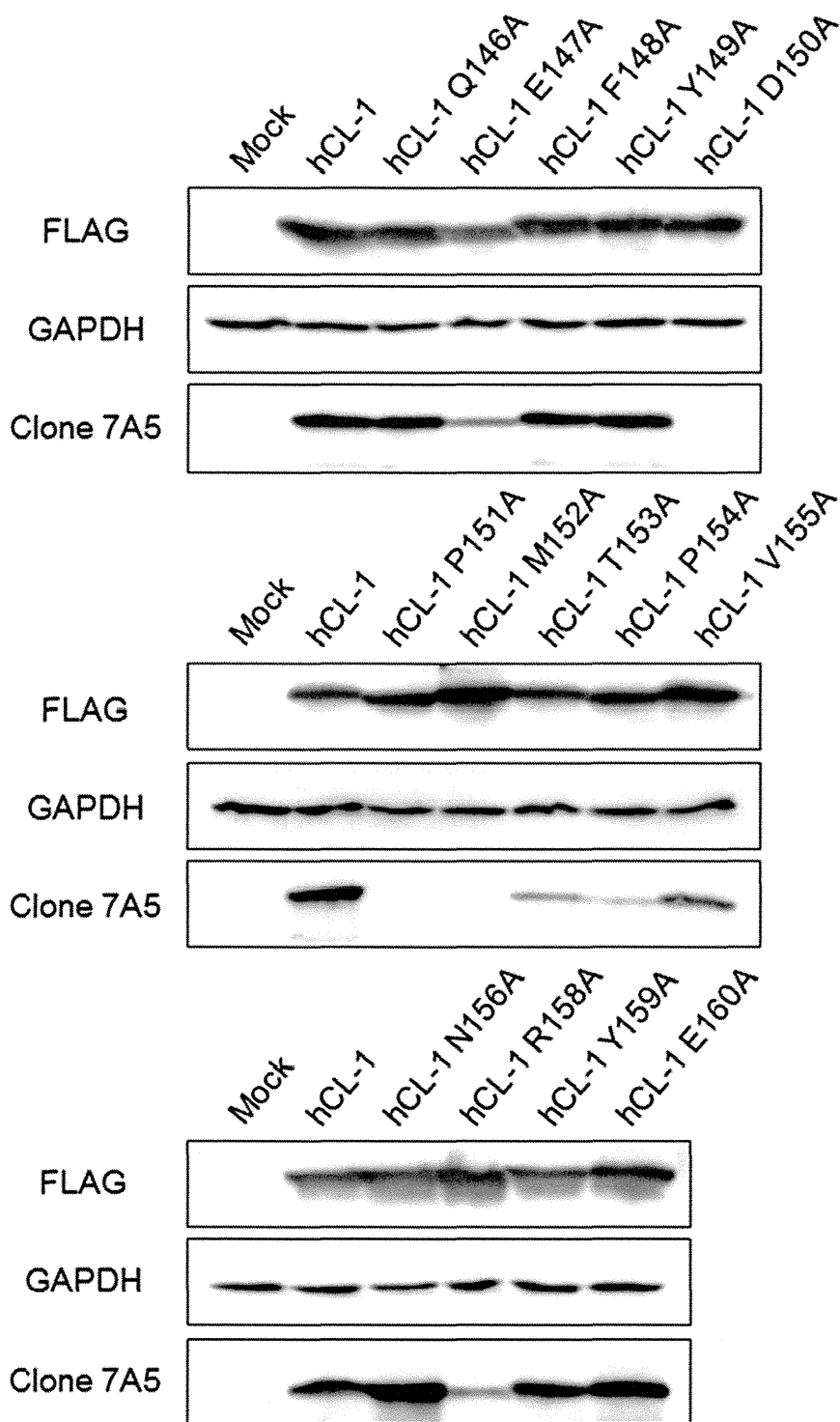


Figure 4 Western blot analysis of series of hCL-1 alanine mutants.

Cell lysates derived from 293T transfected hCL-1, hCL-1 mutants or control vector were separated with SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Each hCL-1 was fused FLAG-tag at N-terminus, and expressions of hCL-1s or GAPDH were detected by anti-FLAG antibody (upper lane) or anti-GAPDH antibody (middle lane), respectively. Lower lane shows clone 7A5 reactions to hCL-1s.

A

CL-1 1st loop

hCL-1 QWR I YS YAGDN I VTAQAMY EGLWMSCV SQS TGG I QCKV FDSL LNL SSTLQATR
 mCL-1 --K-----I-----N-----
 rCL-1 --K-----I-----N-----
 ↑ 31 46 74

CL-1 2nd loop

152 155
 ↓ ↓
 hCL-1 QEFYDP MTPV NARYE
 mCL-1 -----L--I-----
 rCL-1 -----

B

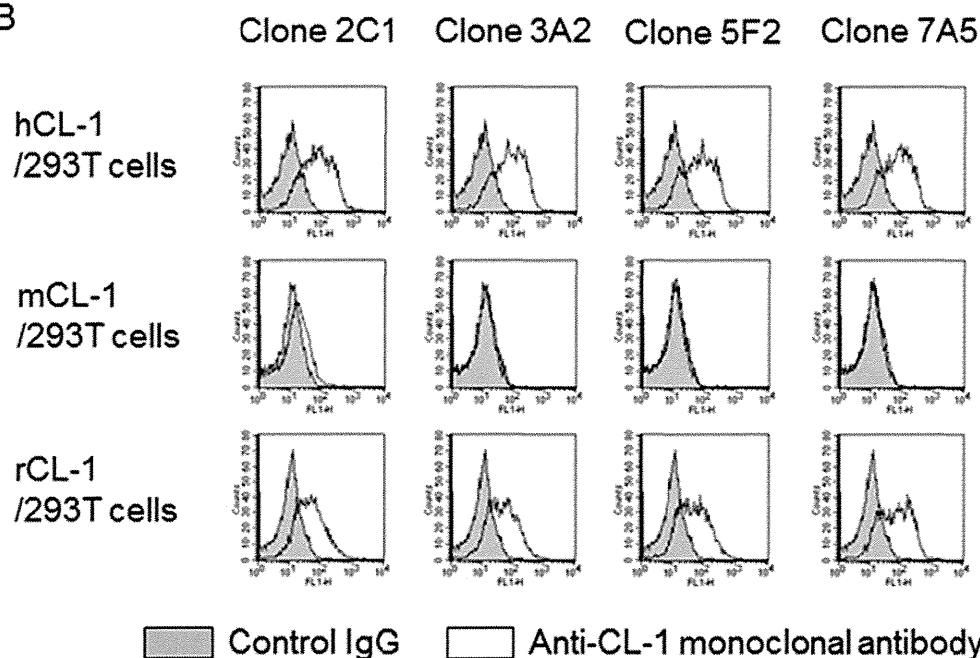


Figure 5 Anti-CL-1 monoclonal antibodies bind wister rat CL-1 (rCL-1)-expressing cells.

A) Amino acid sequences of extracellular loops of hCL-1, mCL-1 or rCL-1. Conserved residues are indicated by a dash. B) 293T cells transfected hCL-1, mCL-1 or rCL-1 expressing vector were incubated with 2 µg/mL of anti-CL-1 monoclonal antibodies (white histogram) or control IgG (gray histogram), and binding was detected by FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L).

	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35	Day 42
Treatment	HCV RNA (copies/mL)						
Control IgG	-	-	+	2.7E+05	4.8E+06	6.4E+06	Not tested
	-	+	1.6E+07	1.9E+07	3.3E+07	5.2E+07	Not tested
	-	6.8E+04	1.0E+07	2.7E+07	3.3E+07	4.8E+07	Not tested
	-	+	1.3E+06	1.5E+07	1.7E+07	2.7E+07	Not tested
Clone 3A2	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	+	1.4E+07	1.3E+07	2.3E+07	2.2E+07
Clone 7A5	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	+	4.2E+06	3.4E+07
	-	-	1.9E+05	2.0E+07	1.2E+07	1.8E+07	3.8E+07
	-	-	-	+	3.1E+05	9.3E+06	3.1E+07

-: Undetectable

+: Detected at unquantifiable levels

Table 2 Measurement of HCV RNA in uPA-SCID mice administered HCV genotype 1b and anti-CL-1 antibodies.