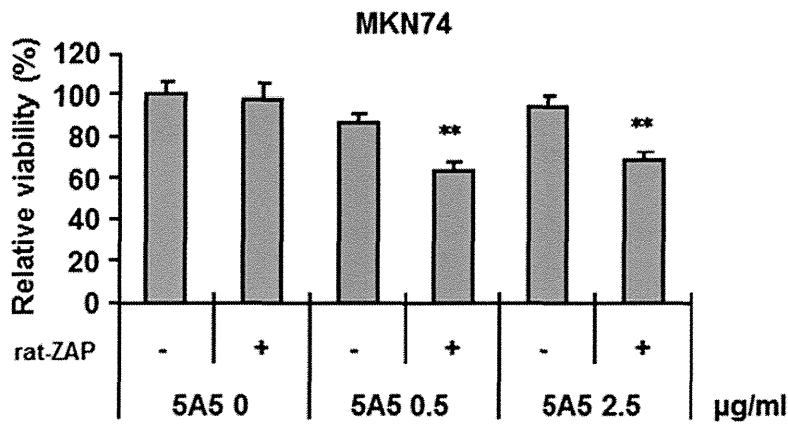
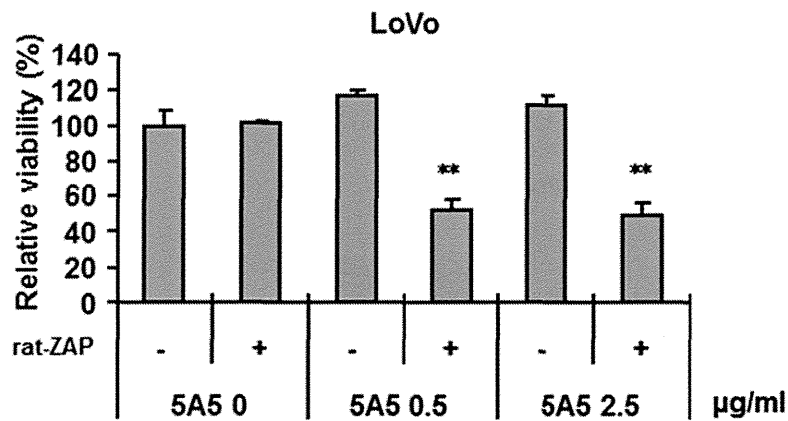


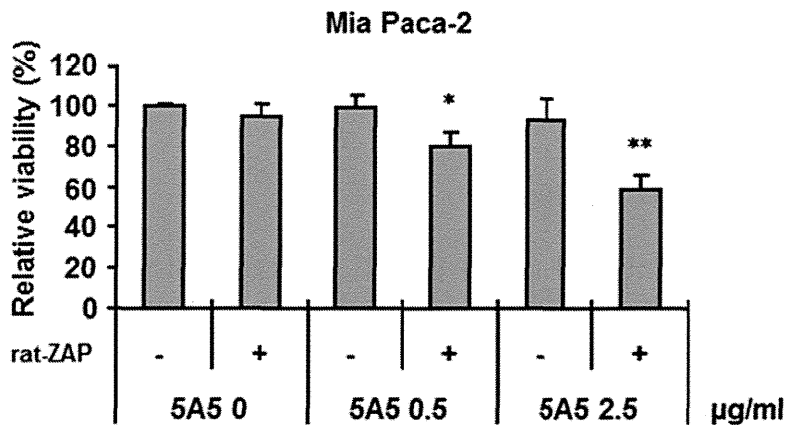
A



B



C



* $P < 0.05$ vs. 5A5 0 +; ** $P < 0.01$ vs. 5A5 0 +

Figure 39 Cytotoxicity of 5A5 and rat-ZAP in hCL-4 expressing cancer cells. Cytotoxicity of 5A5 and rat-ZAP in MKN74 (A), LoVo (B) and Mia Paca-2 (C) cells. Cells were treated with 5A5 at the indicated concentration for 48 h, and then rat-ZAP for 72 h. The cell viability was measured by WST-8 assay. The data represented the means \pm SD (n=3). *: $p < 0.05$ vs. 5A5 0+, **: $p < 0.01$ vs. 5A5 0+.

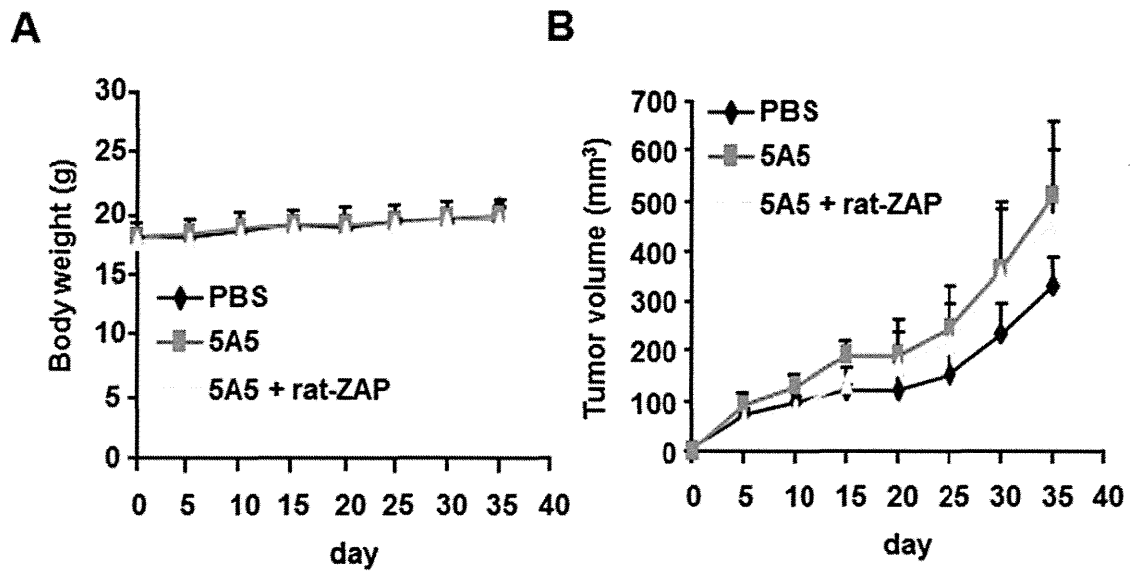


Figure 40 The body weight and anti-tumor effect of 5A5 and rat-ZAP in LoVo cells bearing mice.

LoVo cells were transplanted s.c. into BALB/c Slc-nu/nu mice. 5A5 was intraperitoneally injected at 1 mg/kg body weight. After 2 days, PBS or rat-ZAP at 3 μ g/mouse was intraperitoneally injected. After 3 days, 5A5 and rat-ZAP combining administration was repeated for 7 times. The body weight (A) and tumor size (B) were measured before each 5A5 administration. Data are means \pm SEM (n = 5).

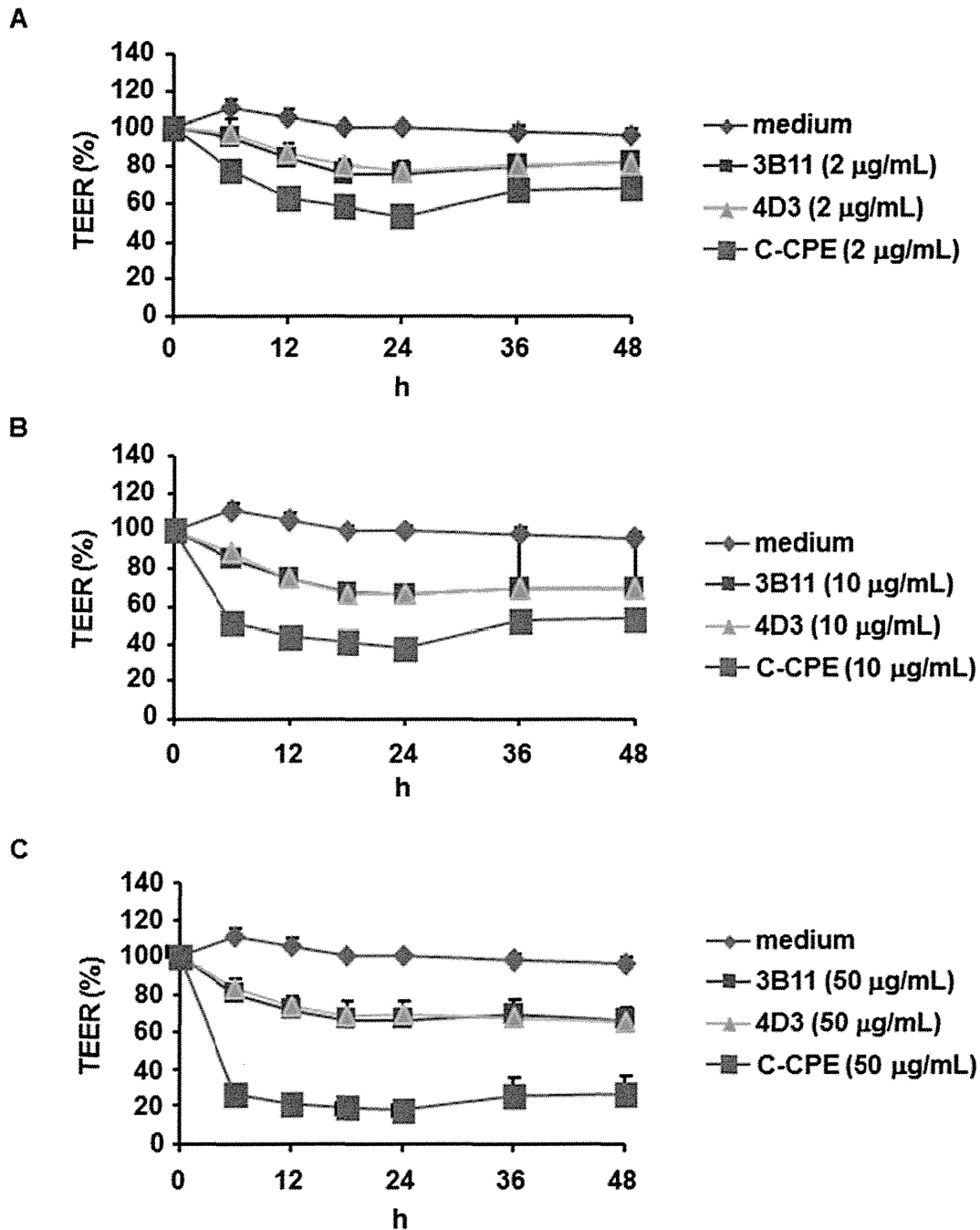


Figure 41 Effect of CL-4 antibodies on the barrier-function of TJ in Caco-2 cells.

Caco-2 cells were plated at 8×10^4 cells/well on 6.5-mm filters. Cells were treated with CL-4 antibodies or C-CPE from basal side at 2 µg/ml (A) or 10 µg/ml (B) or 50 µg/ml (C). TER was measured at 0, 12, 24 h, 36 h and 48 h after CL-4 binder treatment (n=3).

Table 6 The amino acid sequences of L chain and H chain of 9g7.

	Signal peptide	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
VL	METDTLL LWVLLL WVPAST G	DIVLTQSPVL VVSPGRRAT ISC						
VH	MLVLKL VFIIVLF QGLHC	EVQLVESGG GLVQPRGSL KLSCAASGF DFN						

未公表データにつき、一部データを削除

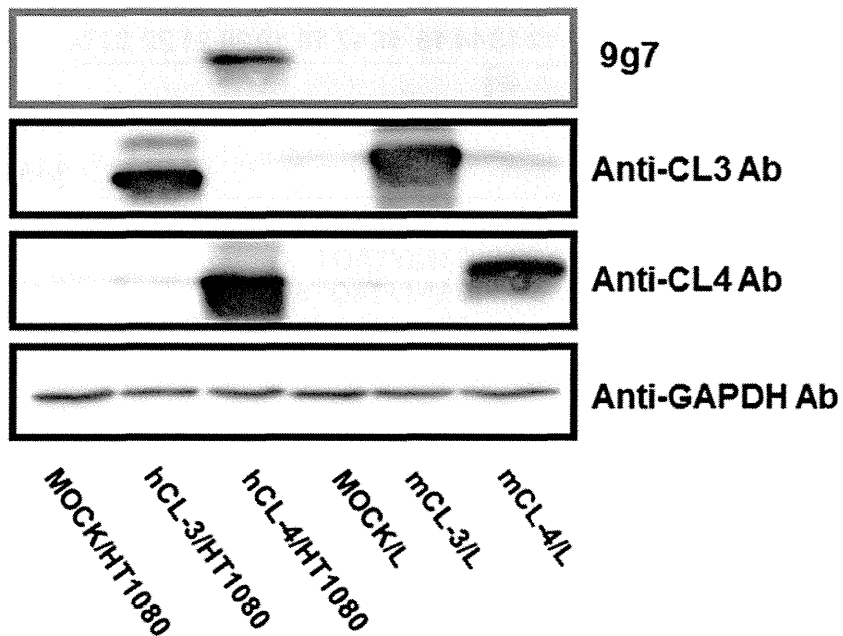


Figure 42 CL primary structure recognition of 9g7.

CLs expressing cell lysates were subjected to SDS-PAGE, followed by Western blotting. 9g7, anti-CL3 antibody or anti-CL4 antibody are as the primary antibody. GAPDH is an endogenous control.

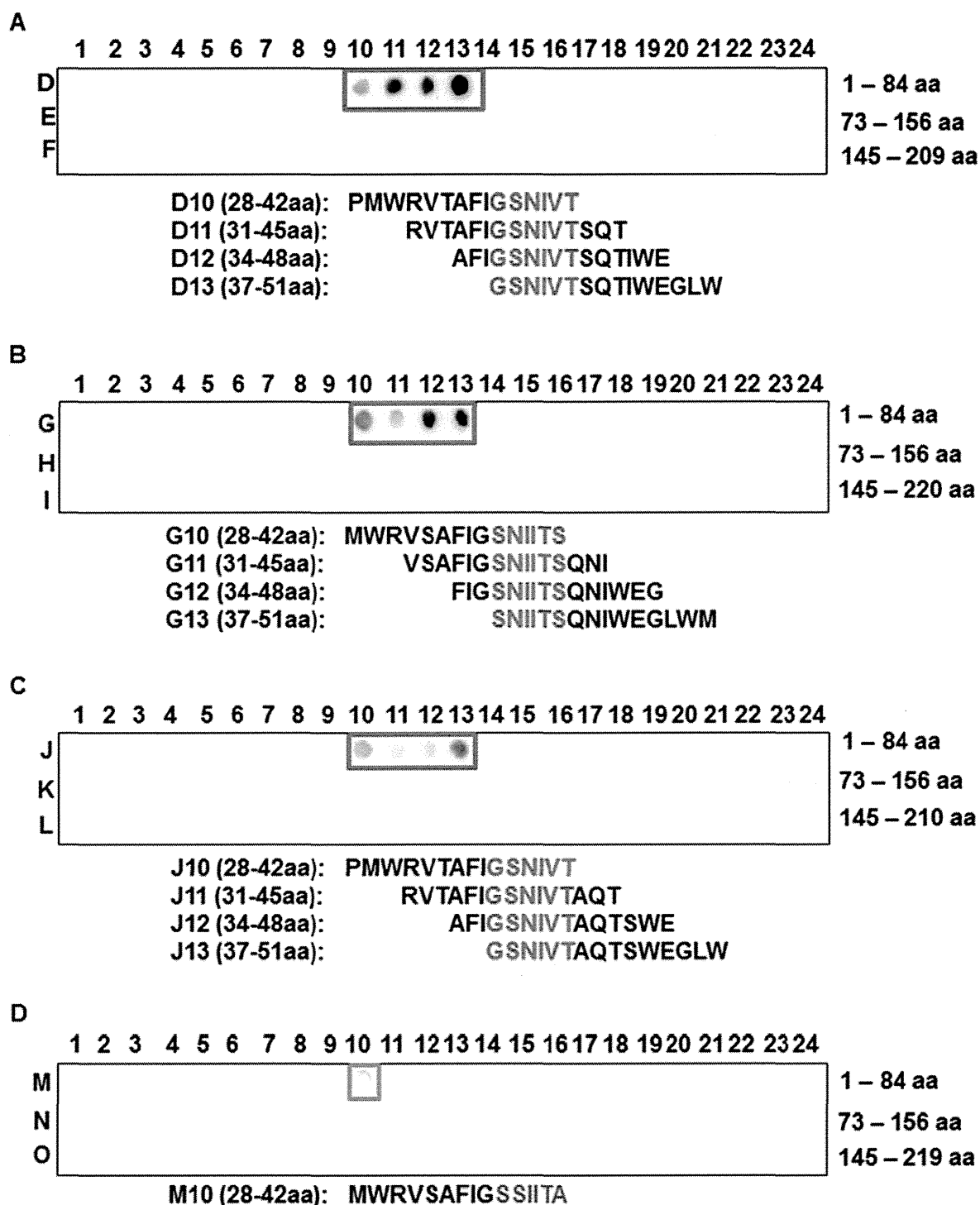


Figure 43 Peptide array based on the full-length sequence of CLs.
 hCL-4 (A), hCL-3 (B), mCL-4 (C) and mCL-3 (D) full-length sequence peptide array were reacted with 0.5 µg/mL 9g7 and goat anti-rat IgG HRP conjugated. Imaging is detected by ECL™ Western Blotting Detection Reagents.

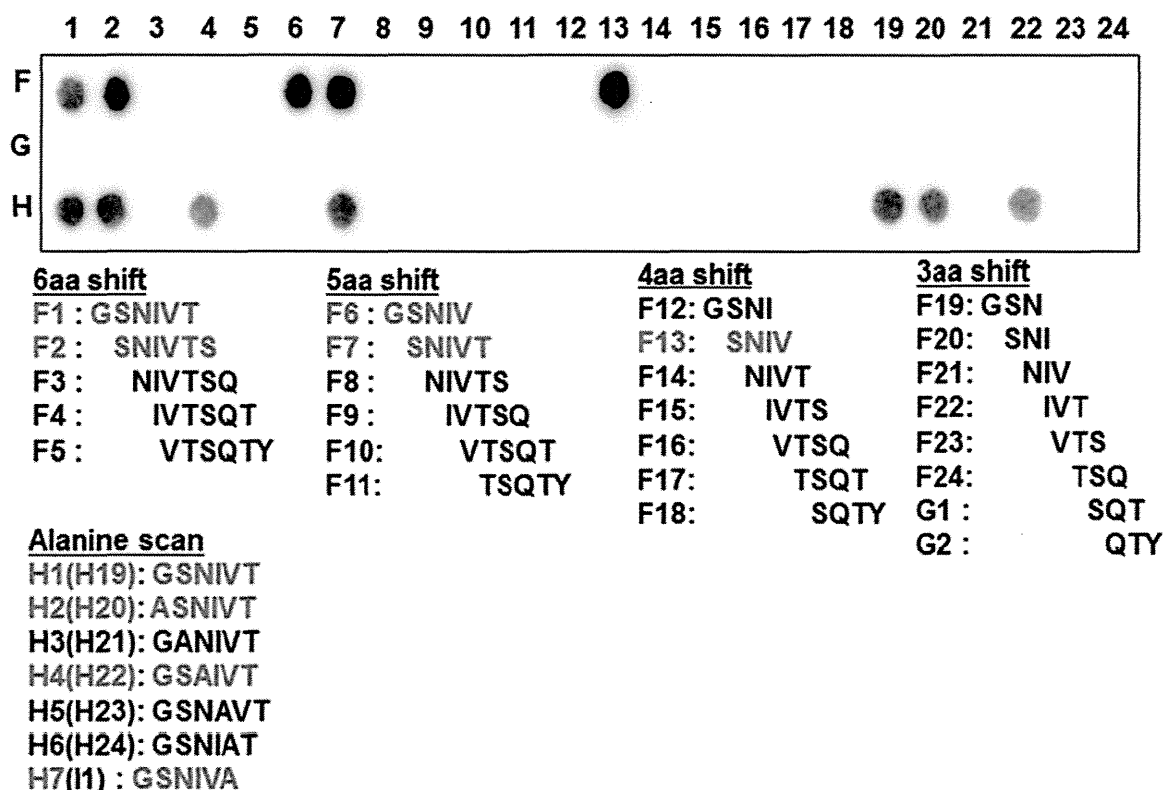


Figure 44 Peptide array using candidate peptide of hCL-4.

Several candidate peptide of hCL-4 were reacted with 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 9g7 and goat anti-rat IgG HRP conjugated. Imaging is detected by ECL™ Western Blotting Detection Reagents.

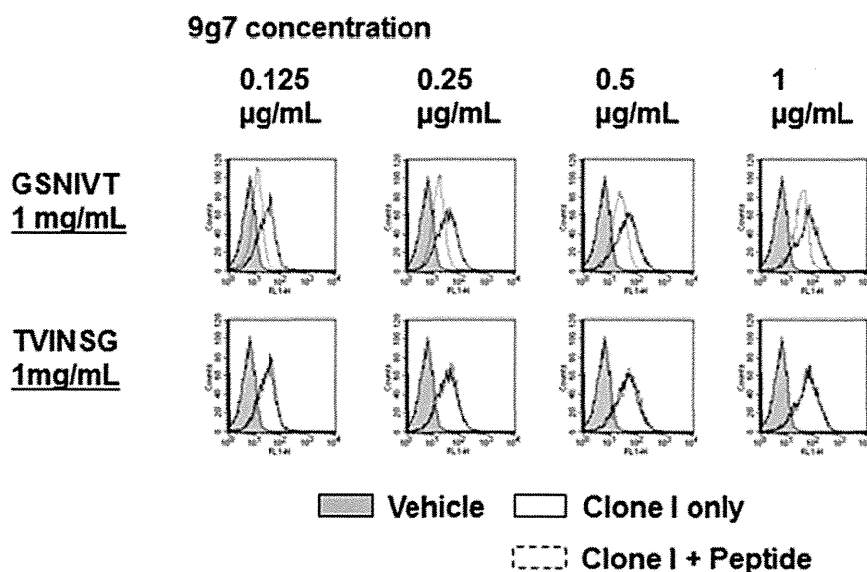


Figure 45 Competition assay using free peptide fragment and 9g7.

hCL-4/HT1080 cells were incubated with the mix of 9g7 and peptide, and then FITC-conjugated goat anti-rat IgG (H+L). The antibodies-bound cells were detected using a flow cytometer. As a control, cells were incubated with PBS.

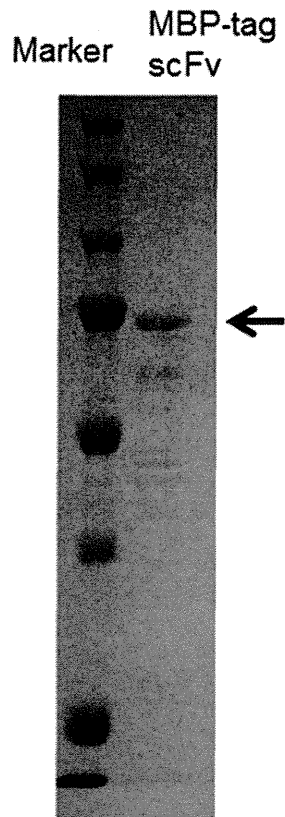


Figure 46 Specificity of the generated MBP-tag scFv.
 Stained the purified the MBP-tag scFv with CBB, Coomassie brilliant blue staining. Their specificities were confirmed on the arrow (75 kDa).

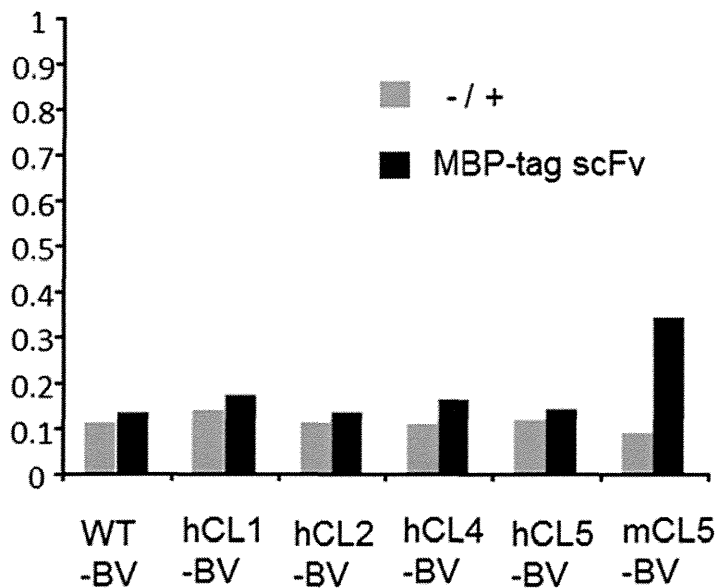


Figure 47 Interaction of the MBP-tag scFv with claudins.
 The MBP-tag scFv (0.2 µg) were added to CL-BV-coated immunoplates, followed by detection of the MBP-tag scFv bound to CL-BV.

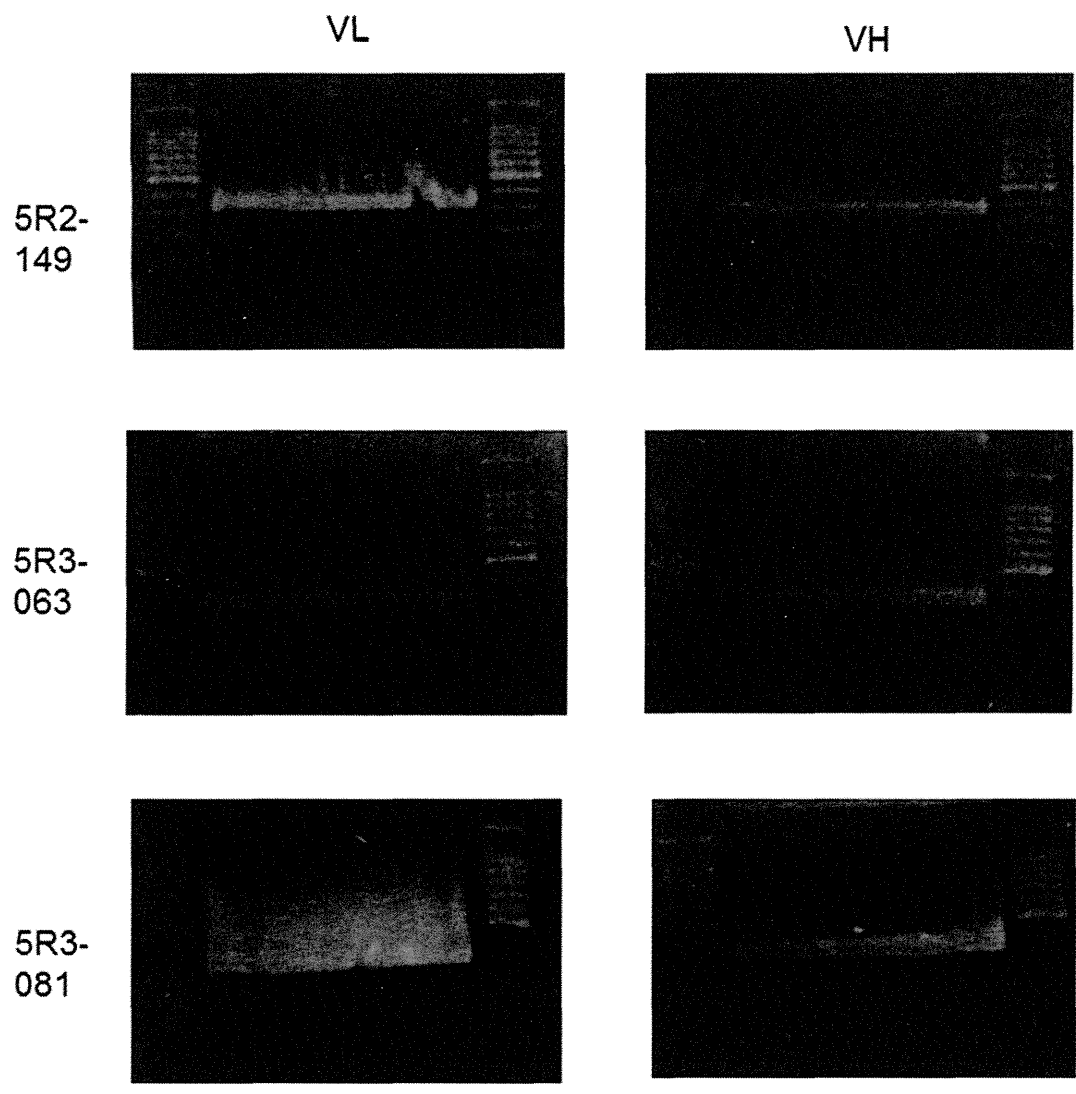


Figure 48 Isolation of VL, VH regions of claudin-5 binding scFv
VL and VH regions of claudin binding scFv (5R2-149, 5R3-063, 5R3-081) were identified by PCR amplification, followed by agarose gel electrophoresis

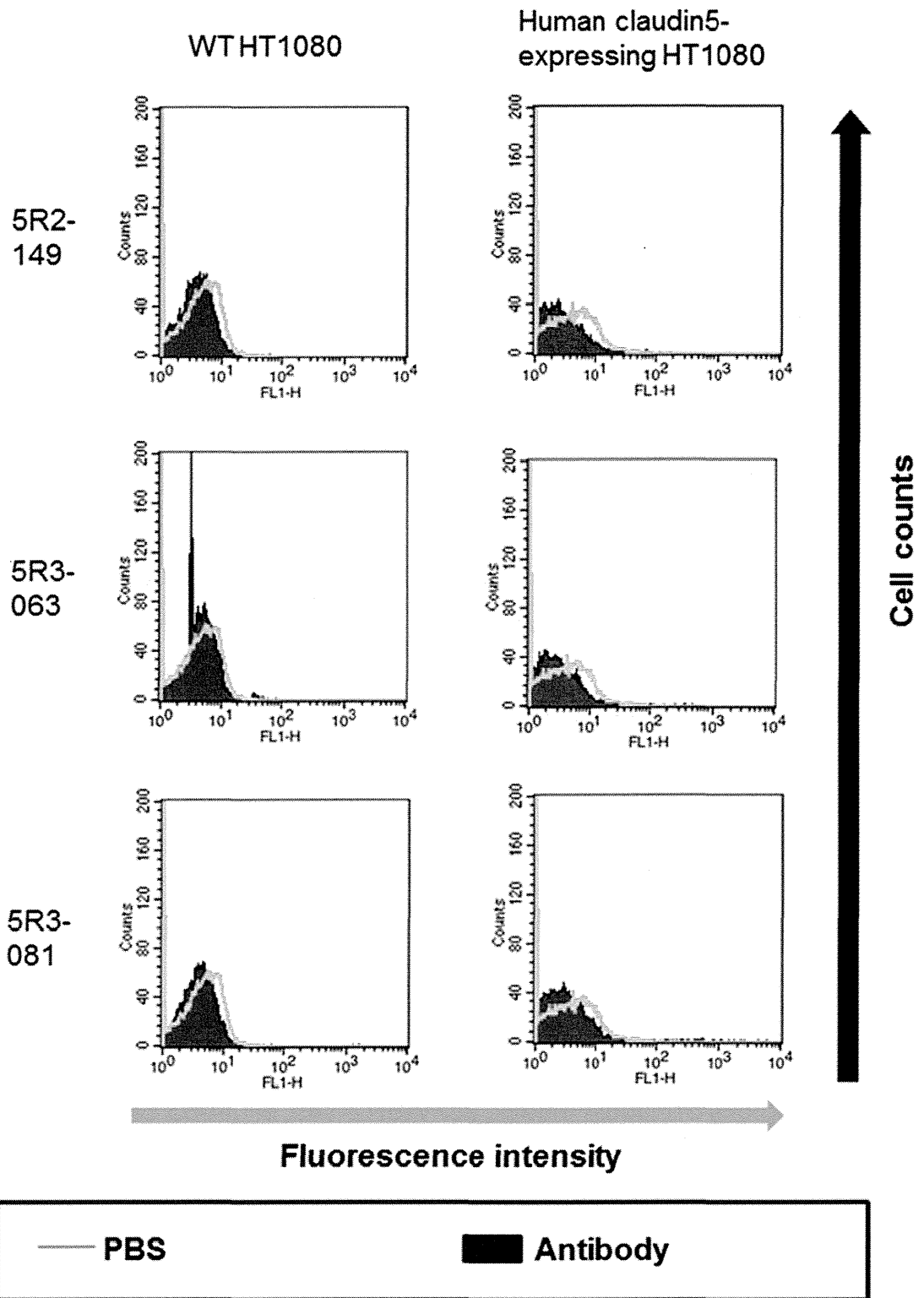


Figure 49 FACS analysis of the interaction between human claudin-5 expressing cells and antibody generated by scFv . Claudin-expressing cells were treated with antibody generated by scFv (5R2-149, 5R3-063, 5R3-081). Line histograms (green) indicate background binding level of anti-Human IgG FITC labeled antibodies without antibody generated by scFv. The binding cells were detected by FACS analysis.

Marker GAPDH

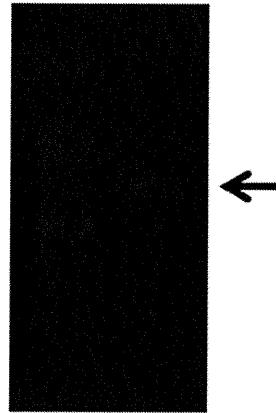


Figure 50 Identification of cDNA

The cDNA generated from mRNA which is belonged to mouse immunized with human claudin-5 DNA was identified (arrow) by PCR amplification, followed by agarose gel electrophoresis.

Claudin-1 および Claudin-4 のヒトがんにおける役割

國安弘基 奈良県立医科大学 教授

研究要旨

Claudin-1・Claudin-4 の発現と癌の進展に相関の見られた肺癌および大腸癌に関して、その役割を培養細胞・実験動物を用いた実験系で検討した。肺癌においては、Claudin-4 発現は、stage、T 因子、N 因子との間に有意な相関を示した。ヒト肺腺癌細胞株 PC9 を抗 Claudin-4 抗体 4D3 により処理すると、①抗体濃度依存性の細胞増殖抑制、②5FU による細胞障害作用の抗体濃度依存性増強、③5FU 細胞内濃度の抗体濃度依存性増加が見られた。④PC9 細胞ヌードマウス皮下腫瘍モデルでは、5FU・4D3 併用による相乗的な腫瘍増大抑制効果が認められた。一方、PC9 細胞の TGF- β 誘導 EMT は抗 Claudin-1 抗体 2C1 により抑制され、2C1 処理 PC9 細胞の肺転移は抑制された。大腸癌においても、Claudin-4 発現は、stage および M 因子との間に有意な相関を示し、ヒト大腸癌細胞株 HT29 において、①5FU 細胞障害作用の 4D3 濃度依存性増強と、②5FU 細胞内濃度の抗体濃度依存性増加が見られた。ヌードマウス皮下腫瘍モデルでは、Claudin-4 高発現 HT29 細胞では 5FU・4D3 併用による相乗的な腫瘍増大抑制効果が認められたが、Claudin-4 低発現 Colo320 細胞では相乗効果は認められなかった。乳癌では、Claudin-1 および-4 とも N 因子や stage と逆相関を示したが、triple negative 症例で Claudin-4 が高発現していた。このように、抗 Claudin-4 抗体は、とくに抗がん剤との併用により抗癌作用の増強をもたらしており、有用性が確認された。

A. 研究目的

Claudin-1 および Claudin-4 は、tight junction を形成する細胞間接着因子として正常上皮組織に広く発現している。昨年度の課題において、膀胱癌および膀胱癌に関する Claudin-1・Claudin-4 の発現について検討し、とくに抗体による Claudin-4 標的とする抗腫瘍活性が認められたが、本年はさらに、日本人の癌死の1位および3位である肺癌および大腸癌に関して、その役割を培養細胞・実験動物を用いた実験系で検討し明らかにする。さらに、乳癌に関しても同様の検討を行う。

B. 研究方法

B-1. ヒト肺癌における Claudin-1 および Claudin-4 の発現と役割

臨床病理学的情報の明らかな非小細胞肺癌

186例(腺癌86例、扁平上皮癌100例)のパラフィン包埋切片を用いて Claudin-1 および Claudin-4 の発現を免疫染色を施行し、組織学的 grade、病期(Stage)、腫瘍進展(T)、リンパ節転移(N)、遠隔転移(M)と比較した。

また、ヒト肺癌細胞株を用いて、抗 Claudin-1 および Claudin-4 抗体の与える影響についても検討を行った。

B-2. ヒト大腸癌における Claudin-1 および Claudin-4 の発現と役割

臨床病理学的情報の明らかな大腸癌 126 例のパラフィン包埋切片を用いて Claudin-1 および Claudin-4 の発現を免疫染色を施行し、組織学的 grade、病期(Stage)、腫瘍進展(T)、リンパ節転移(N)、遠隔転移(M)と比較した。

また、ヒト大腸癌細胞株を用いて、抗 Claudin-1 および Claudin-4 抗体の与える影響についても検討を行った。

B-3. ヒト乳癌における Claudin-1 および Claudin-4 の発現と役割

臨床病理学的情報の明らかな乳癌 88 例のパラフィン包埋切片を用いて Claudin-1 および Claudin-4 の発現を免疫染色を施行し、組織学的 grade、病期(Stage)、腫瘍進展(T)、リンパ節転移(N)、遠隔転移(M)と比較した。

C. 研究結果

C-1. ヒト肺癌における Claudin-1 および Claudin-4 の発現と役割

ヒト肺癌における Claudin-1 および Claudin-4 の発現は 186 例中、それぞれ 174 例(94%)、および、186 例(100%)に認められた。Claudin-1 および Claudin-4 の発現と臨床病理学的パラメーターとの相関を検討すると、Claudin-4 発現は、stage ($P < 0.0001$), T factor ($P = 0.0001$), N factor ($P = 0.0001$)との間に有意な相関が認められた(Fig. 1)。これらの相関は、腺癌・扁平上皮癌のいずれにおいても認められた。一方、Claudin-1 発現は、N factor および stage と逆相関していた($P = 0.0384$, $P < 0.0001$)。なお、Claudin-1 および Claudin-4 とも grade との相関は見られず、また両者の発現に相関は認められなかった。

ヒト肺腺癌細胞株 PC9 を抗 Claudin-1 抗体 2C1、または、抗 Claudin-4 抗体 4D3 により処理すると、4D3 では濃度依存性の細胞増殖抑制が認められた(Fig. 2)。これに対し、2C1 では抑制は見られなかった。4D3 を用いて、さらに 5FU の細胞障害作用への影響を培養系で検討すると、5FU による細胞障害作用を 4D3 は濃度依存性に増強し、5FU と 4D3 の間には相乗効果が認められた(Fig. 2)。この相乗効果について tight junction の障害による 5FU の癌細胞への accessibility の亢進によると考え、細胞内 5FU 濃度を測定した(Fig. 2)。5FU 細胞内濃度は 4D3 濃度依存性に増加していた。

さらに、4D3 が培養系で示した単独での抗腫瘍作用、および、5FU 抗腫瘍作用の増強効果をヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて検討した(Fig. 3)。PC9細胞の皮下接種から Day1, 3, 7 に 5FU, 4D3、または、両者を投与し 4 週まで腫瘍増大を観察したところ、4 週間後には 4D3 単独で 22%、5FU 単独で 37%、両者の併用では 61%の腫瘍増大抑制効果が認められた。

Claudin-1 については、腫瘍の臨床病理学的パラメーターとの間に逆相関が認められたことから、昨年度検討した腎癌における Claudin-1 のように上皮間葉移行(EMT)との関係が認められるかを検討した。ヒト肺腺癌細胞株 PC9 を TGF- β 処理すると EMT が誘導され E-cadherin 発現低下、vimentin, snail, nucleostemin 発現亢進が認められたが、この系で 2C1 抗 claudin-1 抗体を処理すると EMT が抑制された。この EMT 抑制活性が癌転移能を抑制する可能性を検討するため、PC9 細胞を 2C1 抗体で前処置した後、ヌードマウス尾静脈から inoculate し肺転移を測定すると、2C1 処理により転移の 30%減少が認められた(Fig.3 右)。

C-2. ヒト大腸癌における Claudin-1 および Claudin-4 の発現と役割

ヒト大腸癌における Claudin-1 および Claudin-4 の発現は 114 例中、それぞれ 99 例(87%)、および、113 例(99%)に認められた。Claudin-1 および Claudin-4 の発現と臨床病理学的パラメーターとの相関を検討すると、Claudin-1 では、相関係数を解析すると stage との間に逆相関が認められた($P = 0.0424$)。Claudin-4 では、T factor とは逆相関を示し ($P = 0.0076$), N factor とは相関はなく、M factor とは相関し($P = 0.0222$)、stage とも相関した ($P = 0.0424$)(Fig. 4)。特に、肝転移巣や腹膜播種巣を免疫染色すると強い Claudin-4 染色性が認められた。なお、Claudin-1 および Claudin-4 とも grade との相関は見られず、また両者の発現に相関は認められなかった。

ヒト膵癌・膀胱癌・肺癌において抗癌剤と抗 Claudin-4 抗体との相乗効果が認められたことか

ら、ヒト大腸癌細胞株 HT29 を用いて、抗 Claudin-4 抗体 4D3 と 5FU との細胞障害作用への影響を培養系で検討した。すると、5FU による細胞障害作用を 4D3 は濃度依存性に増強していた (Fig. 5)。HT29 の細胞内濃度を測定すると、4D3 濃度依存性に増加していた (Fig. 5)。この際、大腸癌組織で高頻度に分泌されているサイトカインである TNF α が Claudin-4 および-1 発現を抑制する可能性があり、それを検討すると、TNF α 処理濃度依存性に HT29 細胞における Claudin-4 および-1 の発現は減少した。

さらに、抗 Claudin-4 抗体 4D3 が培養系で示した 5FU 抗腫瘍作用の増強効果をヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて検討した (Fig. 6)。Claudin-4 高発現株である HT29 細胞の皮下接種から Day1, 3, 7 に 5FU, 4D3、または、両者を投与し 4 週まで腫瘍増大を観察したところ、4 週後には 4D3 単独で 16%、5FU 単独で 48%、両者の併用では 69% の腫瘍増大抑制効果が認められた。

一方、Claudin-4 低発現株である Colo320 細胞の皮下接種から Day1, 3, 7 に 5FU, 4D3、または、両者を投与し 4 週まで腫瘍増大を観察したところ、4 週後には 4D3 単独で 2%、5FU 単独で 58%、両者の併用では 62% の腫瘍増大抑制効果が認められた。

このように、大腸癌では Claudin-4 発現量により抗体の有する抗癌剤増感作用が影響を受けることが明らかになったが、大腸癌では転移巣で Claudin-4 の発現が高い可能性があり、転移治療への応用も考慮されるべきである。

C-3. ヒト乳癌における Claudin-1 および Claudin-4 の発現と役割

ヒト乳癌における Claudin-1 および Claudin-4 の発現は 88 例中それぞれ 67 例 (76%)、および、88 例 (100%) に認められた。Claudin-1 および Claudin-4 の発現と臨床病理学的パラメーターとの相関を検討すると (Fig. 7)、両者とも、N factor および stage との間に逆相関が認められた。しかし、8 例認められた triple negative 症例 (ER-/PgR-/Her-) では、Claudin-4 が有意に高発現しており (P = 0.0036)、

triple negative 症例に対する新規分子標的となる可能性が示唆された (Table 1)。

D. 考察

Claudin-1 および-4 の発現は上皮性悪性腫瘍において高頻度に認められるが、その役割は腫瘍ごとに異なっている可能性が昨年度同様明らかになった。

Claudin-1 については、今回検討した肺癌・大腸癌・乳癌では腫瘍進展に対し抑制的に作用することが示唆された。肺腺癌細胞株を用いた検討では、Claudin-1 は膀胱癌と同様に EMT に対して抑制的に作用している可能性が考えられ、抗 Claudin-1 抗体は Claudin-1 膜局在を介して EMT を抑制し転移能を減じる可能性が示唆された。

一方、Claudin-4 は、肺癌では腫瘍進展との相関が認められたが、大腸癌ではその傾向は弱く、乳癌では逆相関が認められた。抗 Claudin-4 抗体を用いた細胞株の検討では、抗 Claudin-4 抗体は単独で抗腫瘍効果を示すのみならず、5FU という抗癌剤との併用により、抗腫瘍効果の相乗効果が生じることが肺癌・大腸癌においても確認された。さらに動物実験では、抗体により有意な抗癌剤効果への上乗せ効果が認められ、その程度が標的である Claudin-4 の発現量に相関する可能性が認められた。これらの所見は、大腸癌転移巣のように原発巣よりも Claudin-4 発現が高いものや、Claudin-4 発現と腫瘍進展との相関が認められない癌であっても、Claudin-4 が高発現していれば抗癌剤増感療法としての抗 Claudin-4 抗体の適応となりうる可能性を示唆するものと考えられる。

E. 結論

本年度の検討から、昨年度膀胱癌および膀胱癌で認められた Claudin-1 の腫瘍進展抑制作用、Claudin-4 の腫瘍促進作用と近藤班長が開発された特異的抗体を用いた targeting による抗体単独ならびに抗癌剤との併用による腫瘍抑制作用が、肺癌・大腸癌でも確認された。今後は、他の臓器癌における検討・抗体の有用性の検討を拡大する

とともに、大腸癌転移への治療効果、triple negative 乳癌における効果、Claudin-1 と EMT、Claudin-4 抗体の直接抗腫瘍効果の機構、

Claudin-4 核内局在の意義と機構など基礎的な解明もさらに行ってゆく予定である。

Fig. 1. ヒト肺癌における claudin-1, claudin-4 の発現と臨床病理学的因子との相関

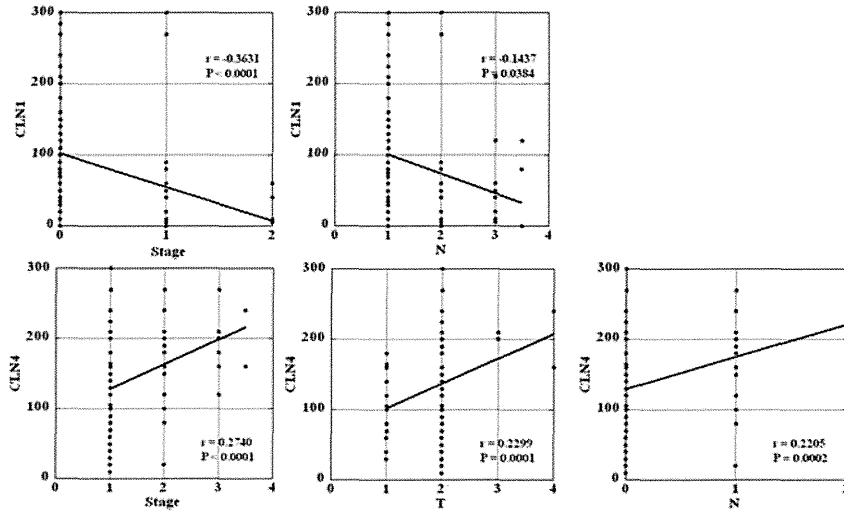


Fig. 2. ヒト肺腺癌 PC9 細胞における抗 claudin-4 抗体 4D3 の 5FU 抗腫瘍作用増強効果 および抗 claudin-4 抗体 4D3 による 5FU 癌細胞内移行の促進

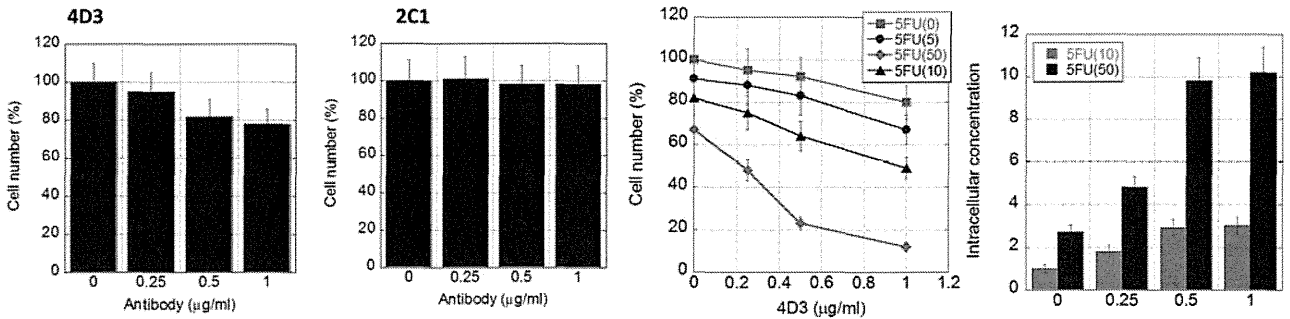


Fig. 3. ヒト肺腺癌細胞 PC9 のヌードマウス皮下腫瘍における抗 claudin-4 抗体 4D3 の 5FU 抗腫瘍作用の増強効果および claudin-1 抗体 2C1 処理による PC9 細胞の肺転移抑制

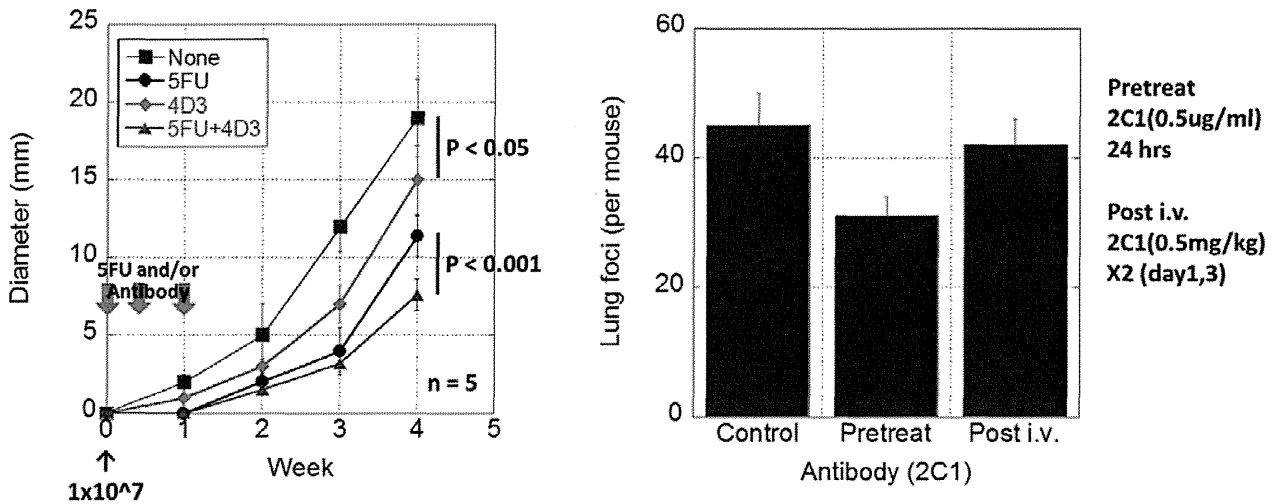


Fig. 4. ヒト大腸癌における claudin-1, claudin-4 の発現と臨床病理学的因子との相関

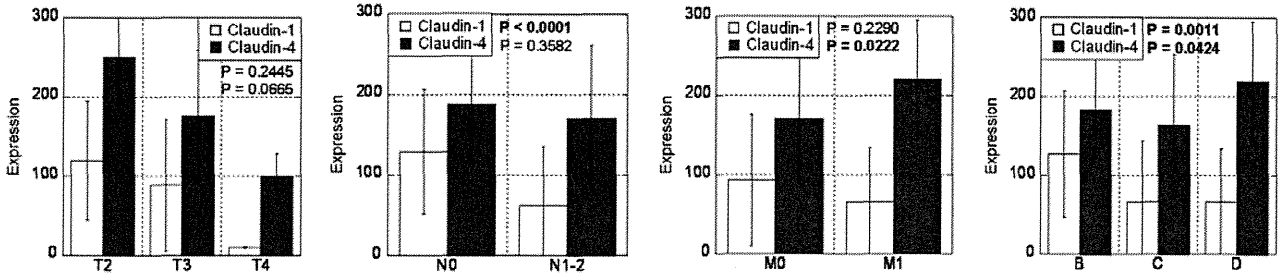


Fig. 5. ヒト大腸癌 HT29 細胞における抗 claudin-4 抗体 4D3 の 5FU 抗腫瘍作用増強効果
および抗 claudin-4 抗体 4D3 による 5FU 癌細胞内移行の促進

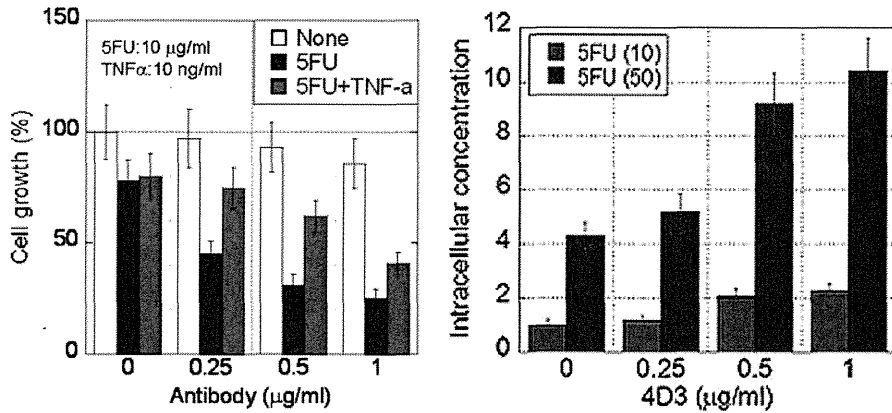


Fig. 6. ヒト大腸癌細胞 HT29 (claudin-4 高発現株) および Colo320 (claudin-4 低発現株) のヌードマウス皮下腫瘍における抗 claudin-4 抗体 4D3 の 5FU 抗腫瘍作用の増強効果

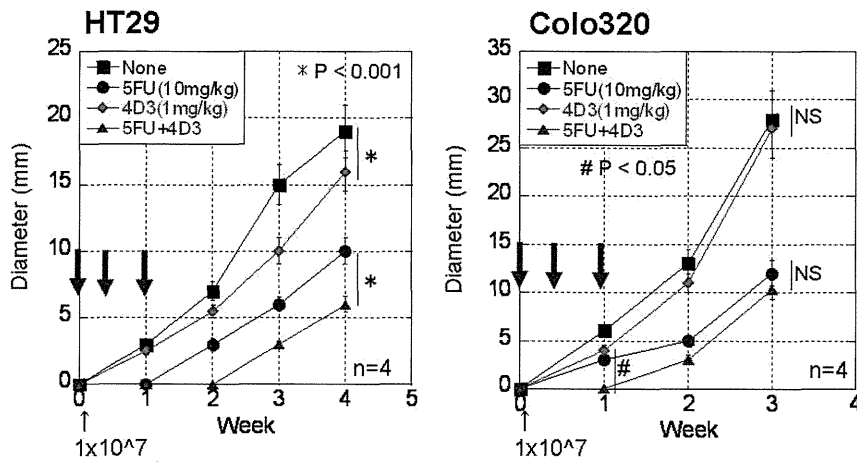


Fig. 7. ヒト腎癌における claudin-1, claudin-4 の発現と臨床病理学的因子との相関

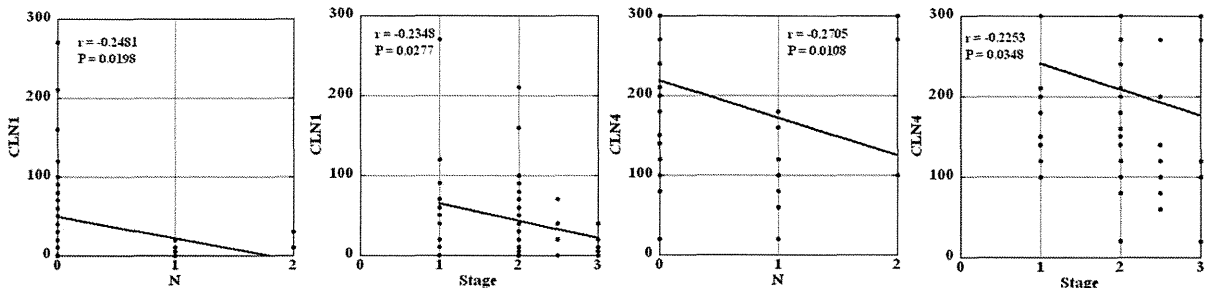


Table 1. Triple negative ヒト乳癌における claudin-4 の発現

Receptors	Number	CL-4
ER+/PgR+/Her-	57	204±76
Her+	23	197±79
ER-/PgR-/Her-	8	296±11

P = 0.0036

Claudin-1 抗体の性状解析とC型肝炎ウイルス感染阻害活性解析

国立感染症研究所細胞化学部 室長 深澤征義

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染は、我が国における肝がん発症の主要な原因であり、その対策が強く求められている。最近になってウイルスを標的とした薬剤（DAA製剤，direct-acting antivirals）が開発され成功を収めつつあるが、薬剤耐性ウイルスの問題があり、今後に向けて新たな治療戦略を模索する必要に迫られている。タイトジャンクション分子であるClaudin-1（CL-1）はHCV感染時の肝細胞への侵入過程に必須の宿主因子である。CL-1を標的とした抗HCV創薬基盤の確立を目指し、本年度は以下の検討を行った。まず、昨年度樹立した、培養細胞レベルで抗HCV作用を示す4クローンのマウス抗CL-1モノクローナル抗体について、その安全性を細胞レベルで検討した。その結果、HCV感染を阻害する濃度でタイトジャンクションのバリア機能には影響がないことがわかった。さらに、ヒト肝臓キメラマウスを用いたin vivo HCV感染系において、検討した2クローンの抗CL-1抗体（3A2, 7A5）は、毒性を示さずにHCV感染阻止能を有することが明らかとなった。以上の結果から、本抗体は創薬シーズとして非常に有用であると考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染は、我が国における肝がん発症の主要な原因と考えられており、抗HCV治療に向けた対策が強く求められている。近年、ウイルスを標的とした薬剤（DAA製剤，direct-acting antivirals）が臨床適用され治療成果を上げているが、薬剤耐性ウイルスの問題があり、今後に向けて新たな治療法を開発する必要も指摘されている。HCVが肝細胞に侵入する過程にはタイトジャンクション分子であるClaudin-1（CL-1）が必須であることが明らかとなり、宿主因子であるCL-1

を標的としたHCV感染阻害法の可能性が考えられる。本分担研究ではCL-1を標的とした抗HCV創薬基盤の確立を最終目標とする。昨年度までに、DNA免疫法、CL-1欠損細胞を用いた独自のスクリーニング法により、ヒトCL-1の細胞外ドメインに特異的に結合する4クローンのマウスモノクローナル抗体の樹立に成功した。さらに、これらモノクローナル抗体はin vitro培養細胞系においてHCV感染阻害能を示すことを明らかとした。特に3クローンは非常に強いHCV感染阻害活性を示したことから、創薬シーズとして非常に有用と考えられた。

宿主因子を標的とする創薬は、薬剤耐性ウイルスの懸念はほとんどないものの、宿主因子の生理機能阻害による毒性が懸念される問題がある。そこで本年度は、抗体の安全性についての細胞レベルでの検討、そして、*in vivo*（動物実験系）での本抗体の毒性・HCV阻害能について検討した。

B. 研究方法

B-1 培養細胞におけるHCV感染阻害活性の解析法

抗CL-1抗体のHCV感染阻害活性の解析には、これまでに樹立した簡便・高感度なHCV感染阻害評価系を用いた。具体的には、以下のように行った。コラーゲンタイプIコート48穴プレート（コーニング）にHuh7.5.1-8細胞を 5×10^4 cells/well (500 μ l) でまいた。培地は、以下すべて10% Fetal Bovine Serum (Cell Culture Bioscience)-非必須アミノ酸 (Hyclone)-penicillin/ streptomycin (Wako) 含有D-MEM (Wako) を用いた。37°C、1日間、CO₂インキュベータ中で培養した。培地を除き、4種のClaudin-1精製抗体を0.1~5 μ g含む培地（200 μ l）に交換後、室温（25°C）で1時間インキュベートした。

その後、HCV（JFH1由来適応変異株）（HCV coreタンパク質濃度として1.56pmol/L, MOI: ~0.5に相当）を含む培地（200 μ l）を加え、室温（25°C）で2時間感染させた。HCVを含む培地を除き、500 μ lの培地で3回細胞を洗浄後、各Claudin-1精製抗体を0.1~5 μ g含む400 μ lの培地下で4日間培養を行った。各サンプルのHCV量につい

ては以下の方法で測定し、感染の評価を行った。

感染細胞中のHCVタンパク質（Coreタンパク質、NS3タンパク質）については、イムノブロット法により検出した。方法は、Novex NuPAGE Gel Electrophoresis-XCell II Blot Module (Invitrogen) システム及びSNAP i.d. 吸引式免疫反応システム (Millipore) を用いて行った。細胞を500 μ lのPBSで洗浄後、100 μ lのNuPAGE LDS Sample Buffer (4 \times)に溶解し、13 μ lをNuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 17 well にて分離した。Invitrogen社マニュアルに従いPVDF膜に転写後、Millipore社マニュアルに従い免疫反応を行った。抗HCV core抗体（ANOGEN）を2,000倍希釈、抗HCV NS3抗体（Abcam）を1,000倍希釈、抗GAPDH抗体（Abcam）を20,000倍希釈、二次抗体（HRP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG(H+L), Jackson Immuno Research）を2,000倍希釈で用いた。シグナルの検出は、ECL試薬（GE Healthcare）を用いて、マニュアルに従い行った。

感染細胞中のHCV ゲノムRNA量の測定は、以下のように行った。細胞を500 μ lのPBSで洗浄後、Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Kit (Favorgen) を用い、マニュアルに従い全RNAを精製した。100~200ngの全RNAを用い、qRT-PCR法（RNA-direct Realtime PCR Master Mix, Toyobo, 方法はマニュアルに従う）にて、HCVゲノムRNAの定量を行った。HCVゲノムRNA検出用のDNAプライマーは、AGGAAGACTTCCGAGCG 及び

GGGTGACAGGAGCCATCを合成し用いた。

培養上清中のHCV濃度については、以下のように行った。Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Favorgen) を用い培養上清中よりHCV RNAを精製し、定量は上記と同様にqRT-PCR法により測定した。方法はマニュアルに従った。

B-2 細胞レベルでのCL-1抗体の安全性の検討

1) タイトジャンクションへのCL-1の分布に対する抗CL-1モノクローナル抗体の影響

コラーゲンコートカバーガラス (IWAKI) 上にHuh7.5.1-8細胞を 1×10^5 cells/24-well(1ml)でまいた。1日後に5 μ gのコントロール抗体及び各CL-1抗体を添加し、4日間培養を行った。その後、細胞内ドメインをエピトープとする市販の抗CL-1抗体 (Life Technologies) を用いて免疫蛍光細胞染色を行った。

2) タイトジャンクションのインテグリティに対する抗CL-1抗体の影響

タイトジャンクションのインテグリティを測定する指標としてBile canalicular surface (BC) の形成を見る方法が知られている。本実験はBCの形成が顕著であるHepG2細胞を用いて検討した。

HepG2細胞をコラーゲンタイプIコート24穴プレート (コーニング) に 1×10^5 cells/well(1ml)でまいた。5日後にコントロール抗体及び各CL-1抗体を5 μ g/mlで添加した。ポジティブコントロールとしてTNF α (0.1 μ g/ml) の処理も行った。4時間培養後、5 μ M CMFDAでBCを染色し (37°C、

10min) 、蛍光顕微鏡にてその数を算出した。

3) タイトジャンクションバリア機能に対する抗CL-1抗体の影響

タイトジャンクションのバリア機能の測定にはタイトジャンクションのシールがきれいに形成されるヒト小腸上皮細胞由来Caco-2細胞を用いて行った。

Caco-2細胞をTranswell chamber上にまき込み細胞シールを形成させる。その後、1, 10, 50 μ g/mlの各CL-1抗体を上層に添加し、細胞上下の培養液間の抵抗値を経時的に測定した。ポジティブコントロールとしてタイトジャンクションを壊すことが知られるC-CPE由来ペプチド (m19) 20 μ g/mlを用いた。

B-3 in vivo HCV感染阻害能測定

ヒト肝臓キメラマウス (uPA-SCIDマウスにヒト肝細胞を移植したもの、PXB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、体重及び血中ヒトアルブミン濃度の平均値を考慮してマウスを3群 (各4匹) に振り分けた。

コントロール抗体、抗CL-1抗体 (3A2または7A5) を、マウスに腹腔内投与した。初回投与日をday0とし、抗体投与量はday0に30 mg/kg、day3に20 mg/kg、day7に10 mg/kg、day10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 1.0×10^5 copies/mLに調製したHCV (genotype