

間遠心分離し大腸菌を回収した。

500 ml の大腸菌培養液のうち 100 ml を可溶化条件の検討に用い、400 ml は精製条件の検討に用いた。100 ml culture の大腸菌を buffer A (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride, 1 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) 1 ml に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 40 秒を 3 回行い大腸菌を破碎した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し上清を回収後、沈殿に 2 % TrironX-100 含有 buffer A を 1 ml 加え超音波処理を行った。遠心分離後沈殿に 8 M Urea 含有 buffer A を 1 ml 加え超音波処理をした。遠心分離後上清を回収し、沈殿に buffer A を 1 ml 加え超音波処理を行い懸濁させた。それぞれの溶液画分 20 µl に 4×SDS を 6.7 µl 加え、99°C で加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い CBB 染色した後、OVA-C-CPE 194 N309A/S313A が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

OVA-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 µl を BL21 10 µl に加え、氷上で 15 分間なじませ、45 秒間 heat shock を行い 15 分間氷上で静置したのち、SOC 培地 100 µl を加え 37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し一晩培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 100 ml に移し、37°C で一晩培養した。翌日 TA 培地 1 リットルに大腸菌培養液すべてを移し、37°C で 2 時間振とう培養した後、最適濃度の IPTG を添加し 37°C で 3 時間振とう培養した。その後 10,000 rpm で 1 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-20°C で凍結保存した。

大腸菌を氷上で溶解した後、可溶化条件の検討結果に従い、buffer A を用いて OVA-C-CPE 194 N309A/S313A の可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm , 15 分にて遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA , MilliQ , NiSO<sub>4</sub> , buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) にサンプルを流し、OVA-C-CPE 194 N309A/S313A を吸着させた。100 µM の imidazol 溶

液 10 ml で洗浄した後、400 µM の imidazol 溶液 10 ml で OVA-C-CPE 194 N309A/S313A を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

OVA-C-CPE 194 N309A/S313A が溶解している buffer を PBS (-) (137 mM NaCl , 2.68 mM KCl , 8.14 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , 1.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いた。あらかじめ PD-10 column に PBS を 30 ml 流して平衡化しておき、HiTrap™ Chelating HP で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 µl ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、OVA-C-CPE 194 N309A/S313A タンパク質の濃度を算出した。

#### B-12. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の発現確認

上記の操作により得た、PBS に溶解した OVA-C-CPE 194 N309A/S313A 蛋白質を 100 µg/ml にて調整した。その溶液 20 µl に 4×SDS を 6.7 µl を加え、99 °C で 5 分間加熱しサンプルとした。サンプルは 20 µl (蛋白量として 2 µg) アプライした。一方分子量マーカーとして Broad Range (BIO-RAD Laboratories, Inc., USA) を用いた。12 % polyacrylamide gel を用いて 20 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB で 1 時間染色し MilliQ で脱色した後、62 kDa 付近に存在する OVA-C-CPE 194 N309A/S313A 蛋白質を確認した。

#### B-13. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の CL4 結合性

96 穴 ELISA plate (Greiner Bio-One GmbH, Germany) に BV-mClaudin-4 (ネガティブコントロールとして wild BV および BV-mClaudin-1) を 0.5 µg/well の条件で、4°C で一晩インキュベーションすることで固相化した。翌日、PBS(-) で 3 回洗浄後、1.6 % ブロックエース (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で室温、2 時間ブロッキングし、PBS(-) で 3

回洗浄した。続いて、C-CPE タンパク質量として 0.02  $\mu\text{g}/\text{well}$  の条件で各種タンパク質を添加し、室温で 2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、0.05% tween-PBS(-) (T-PBS) で 3 回洗浄後、1.6% ブロックエースで 3,000 倍に希釈した Mouse anti His-tag Ab (Zymed Laboratories Inc., Co, USA) を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、T-PBS で 3 回洗浄後、0.4% ブロックエースで 2,000 倍に希釈した Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated を添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、T-PBS で 5 回洗浄後、TMB solution (Thermo Scientific, Rockford, IL) を加えた。20 分インキュベート後、2 M の硫酸を 100  $\mu\text{l}/\text{well}$  加え、吸光度を測定した。(450 nm , ref 595 nm)

#### B-14 C-CPE 修飾 polyethyleneglycol (PEG) リポソームの調製

1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) : Cholesterol : N-(Carbonyl-methoxypoly ethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE-PEG2k-OMe) : 3-(N-succinimidylxyglutaryl) aminopropyl, poly ethyleneglycol (2k)-carbonyl distearoylphosphatidyl-ethanolamine (DSPE-PEG2k-NHS) = 50 : 40 : 3 : 3 (モル比) の脂質をエタノール 1.0 mL に溶解した。この脂質エタノール溶液を 10 mL の 9%スクロース溶液にボルテックスミキサーによる攪拌下で注入しリポソームを作製した。その後、extrusion 法で平均粒子径を約 100 nm にした。このリポソームに C-CPE を C-CPE : DSPE-PEG2k-NHS = 1 : 200 となるように混合し、4°Cで一晩反応させ C-CPE306A/L315A, C-CPE  $\Delta$  N21, C-CPE N309A/S131A ( $\Delta$  N21)をリポソーム表面に修飾した。未反応のポリペプチドは超遠心操作により除去し、その後、凍結乾燥を行った。

#### B-15. 1. C-CPE 修飾リポソームの調製

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) : Cholesterol : N-Glutaryl-L- $\alpha$ -phosphatidyl ethanolamine, Distearoyl. (DSPE-Glu) = 63.3 : 31.5 : 5 (モル比) の脂質をクロロホルムに溶解し、NBD で蛍

光ラベルした Dipalmitoylphosphatidylethanolamine (NBD-PE) を総脂質量の 1% (モル比) となるように添加した。溶媒を約 60°Cの水浴上でロータリーエバポレーターにより減圧留去し、1.5 時間乾燥させ、lipid film を調製した。10 mM MES buffer で再懸濁し、凍結融解を 5 回繰り返し、extrusion 法で平均粒子径を約 600 nm にした。このリポソームに N-hydroxysulfosuccinimide、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide を加え、DSPE-Glu を活性化した。C-CPE を C-CPE : DSPE-Glu = 1 : 100 となるように混合し、4°Cで一晩反応させ、C-CPE306A/L315A, C-CPE  $\Delta$  N21 をリポソームに修飾した。未反応のペプチドは超遠心操作により除去した。モデル抗原として OVA をリポソームに加え、凍結乾燥した。復水操作により、OVA をリポソームに封入し、OVA 封入 C-CPE 修飾リポソームを調製した。未封入の OVA は超遠心操作により除去した。

#### B-15. 2. C-CPE 修飾リポソームの調製 (エタノールインジェクション法)

1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) : Cholesterol : N-(Carbonyl-methoxypoly ethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE-PEG2k-OMe) : 3-(N-succinimidylxyglutaryl) aminopropyl, poly ethyleneglycol (2k)-carbonyl distearoylphosphatidyl-ethanolamine (DSPE-PEG2k-NHS) = 63 : 31 : 5 : 1 (モル比) の脂質をエタノール 100  $\mu\text{L}$  に溶解した。この脂質エタノール溶液を 1 mL の PBS 溶液にボルテックスミキサーによる攪拌下で注入しリポソームを作製した。このリポソームに C-CPE を C-CPE : DSPE-PEG2k-NHS = 1 : 10 となるように混合し、4°Cで一晩反応させ C-CPE306A/L315A, C-CPE 194N309A/S313A 1 をリポソーム表面に修飾した。未反応のポリペプチドは超遠心操作により除去し、その後、9%スクロース溶液で置換し凍結乾燥を行った。

### B-15. C-CPE 修飾リポソームの調製 (ハイドレーション法)

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) : Cholesterol : N-Glutaryl-L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine, Distearoyl. (DSPE-Glu) = 63.3 : 31.5 : 5 (モル比) の脂質をクロロホルムに溶解し、NBD で蛍光ラベルした Dipalmitoylphosphatidylethanolamine (NBD-PE) を総脂質量の 1% (モル比) となるように添加した。溶媒を約 60°C の水浴上でロータリーエバポレーターにより減圧留去し、1.5 時間乾燥させ、lipid film を調製した。10 mM MES buffer で再懸濁し、凍結融解を 5 回繰り返し、extrusion 法で平均粒子径を約 150 nm にした。このリポソームに N-hydroxysulfosuccinimide、1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide を加え、DSPE-Glu を活性化した。C-CPE を C-CPE : DSPE-Glu = 1 : 20 となるように混合し、4°C で一晩反応させ、C-CPE306A/L315A、C-CPE 194N309A/S313A をリポソームに修飾した。未反応のペプチドは超遠心操作により除去し、その後、9%スクロース溶液で置換し凍結乾燥を行った。

### B-16. C-CPE 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への結合性評価 (フローサイトメトリー)

マウス繊維芽細胞 (L 細胞) および Claudin-1 (CL-1) もしくは CL-4 遺伝子を導入し CL-1, CL-4 を発現させた L 細胞 (L CL-1, L CL-4) にそれぞれ C-CPE 修飾リポソームを添加し、4°C で 1 時間、NaN<sub>3</sub> (0.1%) 存在下で作用させた。細胞を洗浄後、細胞とリポソームとの結合をフローサイトメトリーにより評価した。

### B-17. C-CPE 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への結合性評価 (共焦点顕微鏡)

マウス繊維芽細胞 (L 細胞) および Claudin-1 (CL-1) もしくは CL-4 遺伝子を導入し CL-1, CL-4 を発現させた L 細胞 (L CL-1, L CL-4) をガラスベースディッシュに播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 日培養した。それぞれの細胞に C-CPE 修飾リポソームを添加し、4°C で 1 時間、NaN<sub>3</sub> (0.1%) 存在下で作用さ

せた。細胞を洗浄後、DAPI で核を染色し、共焦点顕微鏡により観察した。

### B-18. C-CPE 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への特異的な結合性評価 (競合阻害実験、フローサイトメトリー)

L-CL-4 細胞に C-CPE 194N309A/S313A ペプチドを添加した。その後、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームを添加し、4°C で 1 時間、作用させた。細胞を洗浄後、細胞とリポソームの結合をフローサイトメトリーにより評価した。

### B-19. C-CPE 修飾リポソームの PP への移行性評価 (ホールマウント、共焦点顕微鏡)

Balb/c マウス (雌, 6 週齢) の十二指腸に Rhodamine により蛍光標識した C-CPE 修飾リポソームを投与した。2 時間後、PP を回収し、FITC 標識 UEA1 (Ulex eruogaeus agglutinin-1) により M 細胞を染色した。封入後、共焦点顕微鏡による Z-stack 解析を行った。

## C. 研究結果

### C-1. CL-BV の作製

CL4 の遺伝子を T-Easy vector に挿入した pGTCL-4 を鋳型とし、制限酵素サイト (*Xba* I/*Kpn* I) を付加したプライマーを用いて DNA 鎖を増幅した。増幅した配列を pFastBac に組み込んだ後、DH5 $\alpha$  にトランスフォーメーションした。シーケンス確認後、CL4 の遺伝子配列と一致したものを pFastBac-CL4 とし、これを DH10Bac と相同組換えさせ bacmid をえた。

培養用 6 ウェルプレートに Sf9 細胞を播種し、cellfectin を用いて CL4-Bacmid をトランスフェクションした。培養後の上清を Sf9 細胞に感染させて高力価の BV を生成する過程を繰り返し、TBS 溶液に懸濁させた CL4-BV を得た。

WT-BV と CL4-BV を供した Western Blot による CL4 の発現解析を行った結果、目的の位置 (23 kDa) にバンドが確認された。なお、コントロールとして CL4 発現 L (CL4/L) 細胞を用いた。

## C-2. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の免疫誘導

OVA-C-CPE194 N309A/S313A をマウスに経鼻投与し、各種サンプルを回収し、OVA 特異的抗体価を ELISA 法により検証した。その結果、OVA-C-CPE194 投与群に比して OVA-C-CPE194 N309A/S313A 投与群では抗 OVA 特異的 serum IgG および抗 OVA 特異的 nasal IgA の有意な上昇が認められた。さらに遠隔粘膜面である膈および腸管粘膜においても抗 OVA 特異的 IgA の産生が確認された(Fig. 1, 2, 3 and 4)。

## C-3. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の免疫特性

OVA-C-CPE194 N309A/S313A をマウスに経鼻投与し、血清サンプルを回収し、OVA 特異的 IgG サブクラスの抗体価を ELISA 法により検証した。その結果、OVA-C-CPE194 投与群に比して OVA-C-CPE194 N309A/S313A 投与群では IgG1 および IgG2a の有意な上昇が観察されたことから、細胞性および液性免疫双方の活性誘導が可能であることが示唆された(Fig. 5)。

また、脾臓細胞より分泌される Th1 系サイトカイン:IFN- $\gamma$  および Th2 系サイトカイン:IL-13 の産生を確認した結果、OVA-C-CPE194 N309A/S313A による IFN- $\gamma$  および IL-13 の誘導が認められた(Fig. 6)。これらのことから、OVA-C-CPE194 N309A/S313A は細胞性免疫および液性免疫の双方を活性可能であることが示された。

## C-4. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A のワクチン活性

OVA 発現がん細胞 E.G.7-OVA をマウスに移植した担癌モデルマウスを用いて、OVA-C-CPE194N309A/S313A による腫瘍増殖抑制効果を検証した結果、OVA-C-CPE194N309A/S313A 投与群は OVA-C-CPE194 投与群に比して有意な抗腫瘍効果を発揮したことから、OVA-C-CPE194N309A/S313A はワクチン活性に優れていることが示唆される(Fig.

7)。

## C-5. V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A

HIV に対するワクチン効果を検証するに当たり、HIV 関連抗原である V3 と C-CPE194 N309A/S313A との融合タンパク質を作製した。まず、pET16b-MCS-C-CPE194 N309A/S313A plasmid に V3 遺伝子を導入し、pET16b-V3-C-CPE194 N309A/S313A plasmid を作製した(Fig. 8A)。作製した plasmid を BL21 にトランスフォーメーションし、IPTG および可溶バッファの検討を行った。決定した IPTG および可溶バッファを用い、AKTA によりタンパク質の精製を行った。作製したタンパク質を CBB 染色より発現を確認した(Fig. 8B)。予想される V3-C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の分子量付近にバンドが認められたことから、V3-C-CPE194 N309A/S313A のタンパクが精製できていることを確認できた。

続いて作製した V3-C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の CL 結合性を mCL 発現 BV を用いた ELISA 法により確認した。WT、mCL1 および mCL4-BV をイムノチューブに固相化して、V3-C-CPE194 N309A/S313A を添加し、HRP 標識抗体を用いて結合性を検証した。結果、V3-C-CPE194 N309A/S313A は V3 を付加した場合でも mCL4 に対して特異性を示し、結合性に変化は認められなかった(Fig. 9)。

## C-6. V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A による免疫賦活化効果の検証

HIV に対するワクチン効果を検証するため、HIV 関連抗原である V3 と C-CPE194 N309A/S313A との融合タンパク質を作製し、CL4 への結合性を確認した。本融合タンパク質を用い、マウスに経鼻投与することにより抗原特異的抗体が誘導されるかを検証した。その結果、いずれの C-CPE 変異体融合タンパク質投与群においても抗原特異的抗体価の上昇は観察されなかった。(Fig. 10)

### C-7. PspA および PspA-C-CPE 変異体の作製

CL4 を標的とした粘膜ワクチン開発のために肺炎球菌のワクチン抗原として期待されている PspA と各種 C-CPE 変異体との融合タンパク質を作製した。まず、pET16b に PspA および各種 C-CPE の cDNA を組み込み、pET16b-PspA および pET16b-PspA-C-CPE 変異体 plasmid を作製した。作製した plasmid を BL21 にトランスフォーメーションし、IPTG および可溶化バッファの検討を行った。決定した IPTG 濃度および可溶化バッファを用い、AKTA により各種タンパク質の精製を行った。精製したタンパク質の CBB 染色および Western blot 法を行い、それぞれのタンパク質の発現が認められた。(Fig. 11 A,B)

続いて、作製した PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の CL 結合性を mCL 発現 BV を用いた ELISA 法および CL 発現 L 細胞を用いた FACS により検証した。各種 BV を 96 well プレートに固相化し、PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質を添加し、His tag 抗体、HRP 標識抗体の順に作用させ、その結合性を評価した。その結果、PspA および PspA と mCL4 に結合性を示さない C-CPE Y306A/L315A との融合体はいずれの BV に対しても結合性を示さなかった。一方で、PspA と mCL4 に結合性を示す C-CPE、C-CPE194 N309A/S313A および C-CPE205 N309A/S313A 融合体は mCL4 に対する結合性が認められた (Fig. 12)。

さらに、mCL 発現 L 細胞を用いた FACS により PspA および PspA-C-CPE タンパク質の結合性を検証した所、ELISA 法の結果と同様に、PspA および PspA-C-CPE Y306A/L315A は mCL4 に結合性を示さず、PspA-C-CPE、PspA-C-CPE194 N309A/S313A および PspA-C-CPE205 N309A/S313A は mCL4 結合性を有していた。(Fig. 13)

### C-8. C-CPE 変異体修飾リポソームの作製

消化酵素による抗原分解回避のために C-CPE 変異体を修飾したリポソームを作製した。まず、作製した C-CPE 変異体修飾リポソームを復水し、mCL4

発現 L 細胞を用いた FACS によりその結合性を検証した。その結果、未修飾リポソームは mCL4 発現 L 細胞に対し結合性が認められなかったのに対し、C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームは mCL4 発現 L 細胞に対して結合性を示した。(Fig. 14)

上記の結果を受け、各種リポソームに OVA を封入したリポソームを作製し、その mCL4 結合性を維持しているかを mCL4 発現 L 細胞を用いた FACS により検証した。その結果、未修飾および C-CPE Y306A/L315A 修飾リポソームでは mCL4 発現 L 細胞に対して結合性を示さなかったのに対し、C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームは mCL4 発現 L 細胞に対し結合性を示した。しかしながら、C-CPE194 N309A/S313A 同様に mCL4 結合性に優れる C-CPE205 N309A/S313A を修飾したリポソームは結合性を示さなかった。(Fig. 15)

### C-9. C-CPE の体内動態解析

まず、蛍光物質 CF750 標識 C-CPE (CF750-C-CPE) および CL-4 への結合性が低い C-CPE (CF750-C-CPE mutant) 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-C-CPE mutant はいずれの 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、C-CPE の CL 結合性に影響を及ぼさないことを確認した (Fig. 16)。

次に、蛍光標識 C-CPE および C-CPE mutant の正常マウスにおける体内分布を検討した。BALB/c マウスに蛍光標識した C-CPE もしくは C-CPE mutant を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

(Fig. 17)。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 (Fig. 18)。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 (Fig. 17, 18)。以上の結果から、C-CPE は一時的に肝臓への集積性を示すことが観察された。

#### C-10. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の作製

C-CPE194 N309A/S313A によるワクチン効果を検証するに当たり、モデル抗原として汎用されている卵白アルブミン OVA との融合タンパク質を作製した。まず、pET16b-C-CPE194 N309A/S313A plasmid に OVA 遺伝子を導入し、pET16b-OVA-C-CPE194 N309A/S313A plasmid を作製した。作製した plasmid を BL21 にトランスフォーメーションし、IPTG による蛋白質発現誘導および可溶バッファの検討を行った。決定した IPTG 濃度および可溶バッファを用い、AKTA によりタンパク質の精製を行った。作製したタンパク質を CBB 染色および Western blot 法により発現を確認した (Fig. 19)。予想される OVA-C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の分子量付近にバンドが認められたことから、OVA-C-CPE194 N309A/S313A のタンパク質が精製できていることを確認した。

#### C-11. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の CL 結合性

作製した OVA-C-CPE194 N309A/S313A の CL 結合性を CL 発現 BV を用いた ELISA 法および CL 発現細胞を用いた FACS 法により確認した。

WT、mCL1 および mCL4-BV をイムノチューブに固相化して、OVA-C-CPE194 N309A/S313A を添加し、HRP 標識抗体を用いて結合性を検証した。その結果、OVA-C-CPE194 N309A/S313A は OVA を付加した場合でも mCL4 に対して特異性を示し、結合性に変化は認められなかった。また、OVA-C-CPE194 N309A/S313A は OVA-C-CPE 194 に比して同等以上の mCL4 結合性を示した

(Fig. 20)。さらに、CL 発現細胞を用いた FACS により OVA-C-CPE194 N309A/S313A の結合性を検証した所、ELISA 法の結果と同様に mCL4 に対して特異性を示した (Fig. 21)。

#### C-12. 凍結乾燥復水法による C-CPE 修飾 PEG リポソームへの OVA 封入 (1)

リポソーム内にたん白質等の高分子を封入する方法として凍結乾燥復水法が知られている。これはリポソームを凍結乾燥し、高分子溶液で復水することで、膜の再構成に伴い効率的に高分子がリポソーム内に封入される方法である。そこで、凍結乾燥復水法による C-CPE 修飾 PEG リポソームへの OVA 封入の検討を行った。調製した C-CPE 修飾 PEG リポソームを凍結乾燥した。OVA 溶液による復水後のリポソームへの OVA 封入率評価および OVA 封入 C-CPE 修飾 PEG リポソームの CL-4 発現細胞への結合性評価は研究代表者に依頼した。

#### C-13. OVA 封入リポソームの粒子径の調整

リポソームに polyethyleneglycol (PEG) を修飾することで血中安定性、滞留性が向上することが知られている。しかしながら、PEG を修飾することにより、リポソームの細胞への取り込みが減少することが報告されている。また、リポソームの粒子径を 400-600 nm 程度にすることで、樹状細胞やマクロファージに効率的に取り込まれることが報告されている。経口ワクチン開発のためには、抗原を効率的に PP へ送達することが重要となる。そこで、PEG を修飾していない粒子径約 600 nm の C-CPE 修飾リポソームの調製を行った。動的散乱法により粒子径を評価し、OVA 封入量については ELISA 法により評価した。その結果、各種 OVA 封入 C-CPE 修飾リポソームの平均粒子径は 600 nm 程度あり (Table 1)、OVA 封入量はおよそ 200  $\mu\text{g}/\text{mg}$  lipid であった。

#### C-14. OVA 封入リポソームの粒子径の調整

PEG を修飾していない C-CPE 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への結合性をフローサイトメトリーにより検討した。その結果、L/CL-4 細胞ではペプチド

未修飾リポソームおよび C-CPE14 修飾リポソームと比較し、C-CPE04 修飾リポソーム処理群において、高い蛍光強度が認められた (Fig. 22)。L 細胞および L/CL-1 細胞では、いずれのリポソーム処理群においても顕著な蛍光強度の増大は認められなかった。これらの結果から、PEG を修飾していない C-CPE04 修飾リポソームは CL-4 発現細胞特異的に結合することが明らかとなった。

#### C-15. C-CPE 修飾リポソームの L/CL-4 細胞への結合性

PEG を修飾していない C-CPE 修飾リポソームの L/CL-4 細胞への結合性を共焦点顕微鏡により検討した。その結果、ペプチド未修飾リポソームおよび C-CPE14 修飾リポソーム処理群と比較し、C-CPE04 修飾リポソーム処理群において NBD の蛍光が強く観察された (Fig. 23)。このことから、PEG を修飾していない C-CPE04 修飾リポソームは CL-4 に特異的に結合することが明らかとなった。

#### C-16. エタノールインジェクション法を用いた C-CPE 修飾リポソームの調製

リポソームにペプチドやタンパク質を修飾するために、N-ヒドロキシスクシンイミドを用いた活性エステルを介した方法が知られている。この原理は、活性化されたカルボン酸とアミンの反応によるアミド結合の生成である。しかしながら、この活性エステルは水溶液中で速やかに加水分解されてしまう。そのため、活性エステルを含む DSPE-PEG2k-NHS を構成成分とするリポソームを短時間で調製し C-CPE ペプチドと反応させることが必要となる。そこで、短時間でリポソームを調製可能なエタノールインジェクション法を用いた C-CPE 修飾リポソームを調製し、L-CL-4 細胞との結合性をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、ペプチド未修飾リポソームおよび C-CPE306A/L315A 修飾リポソーム処理群と比較し、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群において、高い蛍光強度が認められた (Fig. 24)。この結果から、C-CPE ペプチドは活性エステルを介しリポソームの PEG 末端に修飾されていると考えられる。

また、調製したリポソームの粒子径を動的散乱法により測定したところ、いずれのリポソームにおいても、粒子径は 150 nm 程度であった (Table 2)。

#### C-17. 競合阻害実験 (1)

C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームと L-CL-4 細胞との競合阻害実験を行った。その結果、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群で認められた蛍光強度の増大は、C-CPE 194N309A/S313A ペプチドを処理することにより顕著に減弱した (Fig. 25)。このことから、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームは C-CPE 194N309A/S313A を介して L-CL-4 細胞と特異的に結合していることが示唆された。

#### C-18. 凍結乾燥復水法による C-CPE 修飾 PEG リポソームへの OVA 封入 (2)

再度、C-CPE 修飾リポソームを凍結乾燥し、復水操作を行った後、リポソームの粒子径および L-CL-4 への結合性を評価した。その結果、調製したリポソームの粒子径は 150-200 nm 程度であった (Table. 2)。また、フローサイトメトリーによる測定を行ったところ、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群における蛍光強度の増大は認められなかった (Fig. 26)。この結果から、調製した C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームは凍結乾燥操作により構造変化を起こし、L-CL-4 細胞との結合性を消失したと考えられる。そのため、抗原封入 C-CPE 修飾リポソームを創製するにあたり、エタノールインジェクション法を用いたリポソーム製剤は利用できないと考えられる。

#### C-19. ハイドレーション法を用いた C-CPE 修飾リポソームの調製

エタノールインジェクション法を用いて調製した C-CPE 修飾リポソームは凍結乾燥後に L-CL-4 細胞との結合性を示さなかった。この原因の一つとしてエタノールの存在が考えられる。そこで、エタノールを使用しないハイドレーション法を用いた C-CPE 修飾リポソームの調製を行い、L-CL-4 細胞との結合

性をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、ペプチド未修飾リポソームおよび C-CPE306A/L315A 修飾リポソーム処理群と比較し、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群において蛍光強度の増大が認められた (Fig. 27)。また、凍結乾燥および復水操作後のリポソームと L-CL-4 細胞との結合性を評価したところ、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群において高い蛍光強度が認められた (Fig. 27)。しかしながら、凍結乾燥前と凍結乾燥後を比較すると、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームの L-CL-4 への結合性は若干減弱した (Fig. 27)。これらの結果から、ハイドレーション法により調製した C-CPE 修飾リポソームは凍結乾燥操作による影響を受けるものの、CL-4 に対して結合性を示すことが明らかとなった。今後、C-CPE 修飾リポソームの調製法の最適化、詳細な抗原封入率、抗原封入リポソームの CL-4 との結合性を検討する予定である。

#### C-20. 競合阻害実験 (2)

C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームと L-CL-4 細胞との結合が C-CPE 194N309A/S313A を介したものであるか評価するため、競合阻害実験を行った。その結果、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群で認められた蛍光強度の増大は、C-CPE 194N309A/S313A ペプチドを処理することにより顕著に減弱した (Fig. 28)。このことから、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームは C-CPE 194N309A/S313A を介して L-CL-4 細胞と特異的に結合していることが示唆された。

#### C-21. C-CPE 修飾リポソームの CL 結合特異性

C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームの CL-4 との特異的な結合を評価するため、L 細胞、L-CL-1 細胞および L-CL-4 細胞においてリポソームの結合性をフローサイトメトリーにより検討した。その結果、L-CL-4 細胞ではペプチド未修飾リポソームおよび C-CPE306A/L315A 修飾リポソーム処理群と比較し、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソーム処理群において、高い蛍光強度が認められた (Fig. 29)。

L 細胞および L-CL-1 細胞では、いずれのリポソーム処理群においても顕著な蛍光強度の増大は認められなかった (Fig. 29)。これらの結果から、C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームは CL-4 発現細胞と特異的に結合することが明らかとなった。

#### C-22. C-CPE 修飾リポソームの PP への移行性

C-CPE 修飾リポソームにより PP へ抗原を効率的にデリバリー可能か評価するにあたり、C-CPE 修飾リポソームの PP への移行性を評価した。その結果、Rhodamine 標識した C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームの蛍光が PP で認められた。また、M 細胞を染色した緑色の蛍光と C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームの赤色の蛍光が一部重なっていることを確認した (Fig. 30)。

#### D. 考察

本研究では CL4 を標的とした経口ワクチン開発の課題である粘膜免疫組織への抗原送達に関して C-CPE に比して CL4 結合性に優れる C-CPE 194N309A/S313A を用いて検証を行った。まず、モデル抗原として OVA と C-CPE 194N309A/S313A の融合タンパクを作製し、CL4 結合性を検証した結果、従来の OVA-C-CPE と比べて OVA-C-CPE 194N309A/S313A では CL4 結合性に優れたものであった。本タンパクをマウスに経鼻投与した結果、OVA-C-CPE 194N309A/S313A は OVA-C-CPE に比して有意な全身免疫および粘膜免疫の誘導活性が認められた。また、細胞性免疫および液性免疫に関しても各種サイトカイン、IgG サブクラスの上昇が観察された。さらに、OVA-C-CPE 194N309A/S313A によるワクチン効果を担癌モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の観点から評価したところ、OVA-C-CPE 194 投与群に比して OVA-C-CPE 194N309A/S313A 投与群では有意な腫瘍増殖抑制効果が観察された。これらの成果からも C-CPE 194N309A/S313A は C-CPE に比して粘膜免疫組織への抗原送達を効率よく行えるものと考えられる。しかしながら、これらの結果は OVA 量 0.5  $\mu$ g または 0.1  $\mu$ g 投与のみで OVA-C-CPE 194N309A/S313A による有意な免疫

誘導が観察され、OVA 量 5  $\mu\text{g}$  では観察されなかった。これは、鼻腔粘膜に発現している CL4 に対して CL4 binder が飽和状態になっていることにより抗体価の上昇などが観察されなかったものと推察される。しかしながら、鼻腔粘膜に比して腸管粘膜はその表面積が広く CL4 も多く発現しているものと考えられる。

また、OVA はインフルエンザや HIV 関連抗原に比して抗原性が高いことから、HIV 関連抗原である V3 を用いたワクチン効果を検証することにした。OVA を用いた検証と同様に V3 と C-CPE 194N309A/S313A との融合タンパク質を作製した。本タンパク質の mCL 結合性を検証した結果、V3- C-CPE 194N309A/S313A は mCL4 に対する結合性を有していた。続いて、本融合タンパク質を投与した際の免疫賦活化作用を検証した。まず、HIV のモデル抗原として利用されている V3 との融合タンパク質を作製し、経鼻投与による V3 特異的抗体の産生誘導を調べたところ、抗体価の上昇は観察されなかった。一方、モデル抗原として汎用されている OVA との融合タンパク質では、既存の C-CPE に比して高い免疫賦活化作用が検出されている。V3 は 20 アミノ酸程度と抗原サイズが小さいため、免疫誘導が起きにくかった可能性を考え、疾患モデル抗原を肺炎双球菌抗原である PspA (サイズ約 45 kDa) に変更することにした。PspA と C-CPE 変異体との融合タンパク質を作製し、CL-4 との結合性を確認したところ、十分な CL-4 結合性を示した。

また、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体の取得に成功したことから、CL-4 binder を修飾したリポソーム経口ワクチンの開発に向けた基礎的な検討を行った。抗原封入のための凍結乾燥復水操作によるリポソームの粒子径への影響は少ないことが明らかとなった。また、樹状細胞やマクロファージに効率的に抗原をデリバリーするために、PEG を修飾していない粒子径約 600 nm の OVA 封入 CL-4 binder 修飾リポソームを調製した。この CL-4 binder (C-CPE  $\Delta$  21) 修飾リポソームは CL-4 発現細胞に特異的に結合することをフローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡による検討から明らかとした。

樹状細胞やマクロファージに効率的に抗原をデリバリーするために、PEG を修飾していない粒子径約 150 nm の CL-4 binder 修飾リポソームを調製した。抗原封入のための凍結乾燥復水操作によるリポソームの粒子径への影響は少ないことが明らかとなった。また、凍結乾燥後も CL-4 binder (C-CPE 194N309A/S313A) 修飾リポソームは CL-4 発現細胞に特異的に結合することを確認し、一部パイエル板へも移行することを共焦点顕微鏡による検討から明らかとした。

CL-4 は TJ 構成タンパク質として、肝臓、腎臓、甲状腺、腸などの様々な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、C-CPE を利用した際の安全性を検討する目的で、C-CPE の体内動態を検討した。評価する CL-4 binder として、C-CPE および比較対照群として 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 (Data not shown) を実験に用いた。

それぞれの 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られる。今回の検討では C-CPE を静脈内に投与することで C-CPE が体内に侵入した際の動態

を調べたが、C-CPE を経口ワクチンとして利用するには経口投与した際の動態を調べる必要がある。

## E. 結論

本研究は、CL-4を標的とした粘膜ワクチン技術とリポソーム技術を融合・システムアップすることで、PP 指向性経口ワクチンの開発を試み、以下の研究成果を得た。

### ① C-CPE 194N309A/S313A を用いた免疫誘導活性

CL-4 高結合性 C-CPE である C-CPE 194N309A/S313A による免疫誘導活性を検証するに当たり、モデル抗原 OVA との融合タンパク質を作製し、マウスに経鼻投与することにより検証を行った。その結果、OVA-C-CPE 194N309A/S313A 投与群は C-CPE 194 投与群に比して有意な免疫誘導能を発揮した。

### ② C-CPE 194N309A/S313A によるワクチン効果

C-CPE 194N309A/S313A によるワクチン効果を検証するに当たり、OVA 発現がん細胞を移植した担癌モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の観点から評価した。その結果、OVA-C-CPE 194N309A/S313A 投与群では OVA-C-CPE 194 投与群に比して有意な腫瘍増殖効果が観察された。

### ③ C-CPE 194N309A/S313A を用いた感染症関連抗原に対するワクチンの基盤開発

CL4 を標的とした感染症に対するワクチン効果を検証するに当たり HIV 関連抗原である V3 もしくは肺炎双球菌抗原である PspA と C-CPE 194N309A/S313A との融合タンパク質を作製した。本融合タンパク質の mCL 結合性を検証した結果、mCL4 に対する指向性を有していた。

### ④ C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームの作製

C-CPE194 N309A/S313A を修飾したリポソームを作製し、CL-4 への結合性を確認した。また、OVA を封入した C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソ-

ームにおいても CL-4 結合性を確認した。

### ⑤ C-CPE194 N309A/S313A 修飾リポソームの PP 移行性

C-CPE 194N309A/S313A 修飾リポソームをマウス腸管に導入した結果、本リポソームの PP への移行性が確認された。また、一部は M 細胞上にも認められた。

### ⑥ 蛍光標識 C-CPE の作製

CF750 で化学修飾した C-CPE を作製し、各種 CL 発現 L 細胞での結合性を確認した結果、修飾無し C-CPE と同じ L/CL-3 及び L/CL-4 細胞への結合性を示した。

### ⑦ 蛍光標識 C-CPE の体内動態

蛍光標識した C-CPE はネガティブコントロールと同様な体内動態を心臓、肺、脾臓、腎臓、甲状腺、胃、腸、脳、精巣において示した。一方、肝臓へは一時的な集積が観察された。

CL-4 高結合性 C-CPE 変異体修飾リポソームがマウスの腸管粘膜免疫組織パイエル板への移行性が確認されたため、本リポソームがパイエル板へ抗原送達可能であることが示唆された。今後は、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体のリポソーム修飾条件などの最適化を試みることで、経口ワクチンに資する CL-4 binder 修飾リポソームの作製を推し進める。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takahashi A., Kondoh M., Suzuki H., Watari A., Yagi K., Pathological changes in tight junctions and potential applications into therapies., *Drug Discov Today*. 3-14:727-32. 2012.
2. Watari A., Yagi K., Kondoh M., A simple reporter assay for screening claudin-4 modulators.,

- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 426(4):454–60, 2012.
3. 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.
  4. Iida M., Yoshida T., Watari A., Yagi K., Hamakubo T., Kondoh M., A baculoviral display system to assay viral entry., *Biol. Pharm. Bull.*, 36(11), 1867–9, 2013.
  5. 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.*, 14(52), 132–7, 2014.
  6. Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Bubble Liposomes and Ultrasound Promoted Endosomal Escape of TAT-PEG Liposomes as Gene Delivery Carriers. *Mol Pharm.*, 8: 2416–2423 (2011)
  7. Un K, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.: Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure. *J Control Release* 156: 355–363 (2011)
  8. Shiraishi K, Endoh R, Furuhashi H, Nishihara M, Suzuki R, Maruyama K, Oda Y, Jo J, Tabata Y, Yamamoto J, Yokoyama M.: A facile preparation method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors. *Int J Pharm*, 421: 379–387 (2011)
  9. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Suppression of Melanoma Growth and Metastasis by DNA Vaccination Using an Ultrasound-Responsive and Mannose-Modified Gene Carrier. *Mol Pharm.* 8: 543–554 (2011)
  10. Negishi Y, Matsuo K, Endo-Takahashi Y, Suzuki K, Matsuki Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y. Delivery of an Angiogenic Gene into Ischemic Muscle by Novel Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure. *Pharm Res.* 28: 712–719 (2011)
  11. Hagiwara K, Nishioka T, Suzuki R, Takizawa T, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Ohsuzu F, Kikuchi M. Enhancement of ultrasonic thrombus imaging using novel liposomal bubbles targeting activated platelet glycoprotein IIb/IIIa complex—in vitro and in vivo study. *Int J Cardiol.*, 152: 202–206 (2011)
  12. Omata D, Negishi Y, Yamamura S, Hagiwara S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Involvement of Ca<sup>2+</sup> and ATP in enhanced gene delivery by bubble liposomes and ultrasound exposure. *Mol. Pharm.*, 9: 1017–1023 (2012)
  13. Oda Y, Suzuki R, Otake S, Nishiie N, Hirata K, Koshima R, Nomura T, Utoguchi N, Kudo N, Tachibana K, Maruyama k.: Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis. *J. Control. Release*, 160: 362–366 (2012)
  14. Hagiwara K, Nishioka T, Suzuki R, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Nishida Y, Iida K, Luo H, Siegel RJ.: Thrombus-targeted perfluorocarbon-containing liposomal bubbles for enhancement of ultrasonic thrombolysis: in vitro and in vivo study. *J. Thromb. Haemost.*, 11: 1565–1573 (2013).
  15. Sawaguchi Y, Hirata K, Suzuki R, Utoguchi N, Maruyama K.: Suppression of murine collagen-induced arthritis by vaccination of synovial vascular endothelial cells. *Life Sci.*, 92:1125–1130 (2013).
  16. Negishi Y, Tsunoda Y, Hamano N, Omata D,

- Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Ultrasound-mediated gene delivery systems by AG73-modified bubble liposomes. *Peptide Sci.*, 100: 402-407 (2013).
17. Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Nakamura A, Suzuki D, Ukai S, Sugimoto K, Moriysasu F, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y.: pDNA-loaded Bubble liposomes as potential ultrasound imaging and gene delivery agents. *Biomaterials*, 11: 2807-2813 (2013).
  18. Hamano N, Negishi Y, Omata D, Takahashi Y, Manandhar M, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Bubble liposomes and ultrasound enhance the antitumor effects of AG73 liposomes encapsulating antitumor agents., *Mol. Pharm.*, 10: 774-779 (2013).
  19. Negishi Y, Hamano N, Tsunoda Y, Oda Y, Chojiamts B, Endo-Takahashi Y, Omata D, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Emoto M, Aramaki Y.: AG73-modified Bubble liposomes for targeted ultrasound imaging of tumor neovasculature., *Biomaterials*, 34: 501-507 (2013).
  20. Sugano M, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Hamano N, Usui M, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y, Yamamoto M.: Gene delivery to periodontal tissue using Bubble liposomes and ultrasound. *J. Periodontal Res.*, *in press*.
2. 学会発表
1. Azusa Takahashi, Yumiko Saito, Koji Matsuhisa, Yohei Kakamu, Miki Kodaka, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Preparation of a dual claudin binder using a fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA*
  2. Yohei Kakamu, Kyohei Matsushita, Yumiko Saito, Azusa Takahashi, Koji Matsuhisa, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Biochemical analysis of a novel dual claudin binder. *Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA*
  3. Kiyohito Yagi, Seiji Yamane, Hidehiko Suzuki, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Development of novel claudin-4 binder and its application in mucosal vaccine. *Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA*
  4. Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Fukasaka, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Targeting to claudin-4 is a novel strategy for the development of mucosal vaccine. *The 7th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientist 6, Jun 2-4, 2011, Seoul National University, Korea*
  5. Koji Matsuhisa, Azusa Takahashi, Yohei Kakamu, Miki Kodaka, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a novel claudin binder using baculoviral display for its application in mucosal absorption of drugs. *38th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 30-Aug 3, 2011, National Harbor, MA, USA.*
  6. Seiji Yamane, Hidehiko Suzuki, Hideki Kakutani, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A novel strategy for mucosal vaccination using a claudin binder. *38th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 30-Aug 3, 2011, National Harbor, MA, USA.*
  7. Hidehiko Suzuki, Seiji Yamane, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Kiyohito Yagi, Preparation of claudin-4 binder using C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin and its application to mucosal vaccination. *51st annual meeting of the American society for cell biology, Dec 3-7, 2011, Denver, CO, USA.*
  8. 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 *Clostridium perfringens*

- enterotoxin., *Experimental Biology* 2012, Apr 21–25, San Diego, USA.
9. 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 19<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses* 2012, Oct 5–9, Venice, ITALY.
  10. 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.
  11. 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.
  12. Shimizu Y., Kondoh M., Watari A., Fukasawa M., Yagi K., Effect of claudin on cytochrome P450 activity., *Experimental Biology* 2013, Apr 20–24, Boston, U.S.A.
  13. 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, Boston, U.S.A.
  14. 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, Boston, U.S.A.
  15. Suzuki H., Kunisawa J., Watari A., Yamashita M., 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* 2013, Jul 21–24, Honolulu, HI, U.S.A.
  16. Doyama R., Matsuhisa 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, San Antonio, U.S.A.
  17. Li X., Watari A., Yagi K., Kondoh M., Tissue-distribution and safety evaluation of a claudin-3/4 binder in mice., *The American society for Cell Biology*, Dec 14–18, 2013, New Orleans, U.S.A.
  18. Watari A., Hasegawa M., Yagi K., Kondoh M., Identification of chemical compounds that modulate claudin-4 expression by cell-based screening. *The American society for Cell Biology*, Dec 14–18, 2013, New Orleans, U.S.A.
  19. 松久幸司、高橋梓、角谷秀樹、佐伯理恵、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、*Clostridium perfringens* enterotoxin を利用したドラッグデリバリーシステムの開発、第 58 回トキシシンポジウム、平成 23 年 7 月 6–7 日、東京
  20. 高橋梓、松下恭平、斉藤郁美子、嵩原綱吉、各務洋平、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、*Clostridium perfringens* enterotoxin 変異体 m19 の claudin 結合性解析、第 58 回トキシシンポジウム、平成 23 年 7 月 6–7 日、東京
  21. 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
  22. 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
23. 長瀬糊太郎、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
  24. 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
  25. 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
  26. 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
  27. 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-CPE)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
  28. 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・サブナノ白金のマウス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
  29. 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・サブナノ白金のマウス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
  30. 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
  31. 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、奈良県、吉野町
  32. 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、奈良県、吉野町
  33. 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、奈良県、吉野町
  34. 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回毒素シンポジウム、平成25年7月17-19日、兵庫県、宍粟市
  35. 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DDS学会学術集会、平成25年7月4-5日、京都市
  36. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Risa Koshima, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, The Combination Therapy of Therapeutic Ultrasound and Dendritic Cell-Based Immunotherapy, WFUMB2011、オーストリア、2011年8月26-30日
  37. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波造影・治療技術の最新展開、日本バイオイメージング学会、北海道、2011年9月1-2日
  38. 佐藤紗也佳、真柴拓哉、本田亜紀、Citterio Daniel、小田雄介、鈴木 亮、丸山一雄、鈴木孝治、静岡 DDSカンファランス、静岡、2011年9月16日
  39. Ryo Suzuki, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Induction of anti-tumor immunity in the combination of therapeutic ultrasound and dendritic cell-based immunotherapy、日本癌学会、名古屋、2011年10月3-5日

40. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Development of an effective gene delivery system with sonoporation in cancer gene therapy, AAPS2011, 米国, 2011年10月22-27日
41. 鈴木 亮、小田雄介、平田圭一、野村鉄也、宇都口直樹、丸山一雄、リポソーム型微小気泡を利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用によるがん治療効果の増強に関する研究、東京、2011年11月26日
42. 鈴木 亮、小田雄介、丸山一雄、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入特性の評価、マイクバブルと超音波の相互作用に関するシンポジウム、名古屋、2012年1月20日
43. 鈴木 亮、根岸洋一、必ずうまくいくソノポレーション法: 実験の実際とコツ、第4回超音波分子診断治療研究会、福岡、2012年3月3日、招待講演
44. 澤口能一、小田雄介、小俣大樹、鈴木 亮、萩沢康介、丸山一雄、超音波、バブルリポソーム併用血栓溶解療法の基礎的検討、日本薬学会第133年会、横浜、2012年3月27-30日
45. 根井彰浩、根岸洋一、小俣大樹、山村 翔、高橋葉子、濱野展人、鈴木 亮、丸山一雄、新禎幸彦、バブルリポソームと超音波併用によるペプチド修飾リポソームの遺伝子導入増強効果、日本超音波医学会 第85回学術集会、2012年5月25-27日
46. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Daiki Omata, Yoshikazu Sawaguchi, Kazuo Maruyama, Enhancement of anti-tumor effect by the combination of ultrasound mediated mild hyperthermia and immunotherapy, ICHO&JCTM 2012, 京都、2012年8月28-31日
47. 小俣大樹、根岸洋一、鈴木 亮、丸山一雄、野水基義、新禎幸彦、超音波技術を利用した AG73 修飾 PEG リポソームによる遺伝子導入法の開発、第21回 DDS カンファレンス、静岡、2012年9月1日
48. 根井彰浩、根岸洋一、高橋佐慧子、小俣大樹、鈴木 亮、丸山一雄、野水基義、新禎幸彦、核移行シグナルペプチド内封 AG73 修飾リポソームによる新規遺伝子デリバリーツールの開発、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、仙台、2012年9月24-26日
49. 関むつみ、小田雄介、鈴木 亮、小俣大樹、澤口能一、岡田直貴、中川晋作、丸山一雄、バブルリポソームによる樹状細胞への超音波抗原送達法における抗原提示経路の解析、遺伝子・デリバリー研究会第13回シンポジウム、東京、2013年5月11日
50. 宇留賀仁史、小俣大樹、小沼俊也、鈴木 亮、小田雄介、関むつみ、直井智幸、澤口能一、根岸洋一、丸山一雄、超音波を利用した脳への遺伝子導入に関する基礎的検討、遺伝子・デリバリー研究会第13回シンポジウム、東京、2013年5月11日
51. 石川 舞、小田雄介、宇留賀仁史、鬼塚沙也加、鈴木 亮、小俣大樹、関むつみ、直井智幸、澤口能一、根岸洋一、丸山一雄、構成脂質の異なるバブルリポソームを用いた超音波遺伝子導入特性の評価、遺伝子・デリバリー研究会第13回シンポジウム、東京、2013年5月11日
52. 竹澤知明、小俣大樹、鈴木 亮、小田雄介、関むつみ、直井智幸、澤口能一、根岸洋一、丸山一雄、超音波を利用した肝臓特異的遺伝子導入に関する基礎的検討、遺伝子・デリバリー研究会第13回シンポジウム、東京、2013年5月11日
53. 小俣大樹、鈴木 亮、小沼俊也、小田雄介、澤口能一、宇留賀仁史、関むつみ、直井智幸、根岸洋一、丸山一雄、バブルリポソームと超音波による脳選択的遺伝子導入法の開発、第29回日本 DDS 学会学術集会、京都、2013年7月4-5日
54. 小田雄介、鈴木 亮、小俣大樹、澤口能一、宇留賀仁史、関むつみ、根岸洋一、川上茂、樋口ゆり子、橋田充、丸山一雄、バブルリポソームの安定性におよぼす脂質組成の影響、第29回日本 DDS 学会学術集会、京都、2013年7月4-5日
55. Daiki Omata, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yoshikazu Sawaguchi, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama, Targeted gene delivery in liver by bubble

liposomes and ultrasound, CRS Annual Meeting  
2013, Honolulu, 2013年7月21-24日

56. Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Daiki Omata, Yoshikazu Sawaguchi, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama, Brain Specific Gene Delivery by Bubble Liposomes and Ultrasound, CRS Annual Meeting 2013, Honolulu, 2013年7月21-24日
57. Daiki Omata Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yoshikazu Sawaguchi, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama, Selective gene delivery for brain by bubble liposomes and ultrasound, Tht 5<sup>th</sup> Asian Arden Conference, 名古屋、2013年8月5-6日
58. 小俣大樹、鈴木 亮、小田雄介、澤口能一、宇留賀仁史、関むつみ、直井智幸、根岸洋一、丸山一雄、バブルリポソームと超音波を利用した肝臓選択的な遺伝子導入、第57回日本薬学会関東支部大会、東京、2013年10月26日
59. 小沼俊也、鈴木 亮、小俣大樹、小田雄介、澤口能一、宇留賀仁史、関むつみ、直井智幸、根岸洋一、丸山一雄、バブルリポソームと超音波による脳標的型遺伝子デリバリーシステム、第57回日本薬学会関東支部大会、東京、2013年10月26日
60. 小田雄介、鈴木 亮、関むつみ、澤口能一、小俣大樹、宇留賀仁史、岡田直貴、中川晋作、丸山一雄、バブルリポソームと超音波により抗原送達した樹状細胞ワクチンによるがん転移予防効果、第57回日本薬学会関東支部大会、東京、2013年10月26日
61. 関むつみ、小田雄介、鈴木 亮、小俣大樹、澤口能一、宇留賀仁史、岡田直貴、中川晋作、丸山一雄、がん免疫療法における樹状細胞への抗原送達に向けた新たな戦略、第57回日本薬学会関東支部大会、東京、2013年10月26日
62. 宇留賀仁史、鈴木 亮、小俣大樹、小田雄介、関むつみ、澤口能一、根岸洋一、岡田直貴、中川晋作、丸山一雄、バブルリポソームと超音波を用いたサイトカイン発現遺伝子導入による癌治療効果、第57回日本薬学会関東支部大会、東京、2013年10月26日

## 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

### 3. その他

該当事項なし

## I. 研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科:

- ・ 八木清仁(教授)
- ・ 近藤昌夫(准教授)
- ・ 吉田孟史(大学院生)
- ・ 松久幸司(大学院生)
- ・ 鈴木英彦(大学院生)
- ・ 李相儒(大学院生)
- ・ 土山遼(大学院生)
- ・ 山下真代(大学院生)
- ・ 早石知浩(大学院生)
- ・ 井口大輔(大学院生)
- ・ 畑智幸(大学院生)

帝京大学薬学部:

- ・ 小俣 大樹
- ・ 小田 雄介
- ・ 平田 圭一
- ・ 宇留賀 仁史
- ・ 関 むつみ

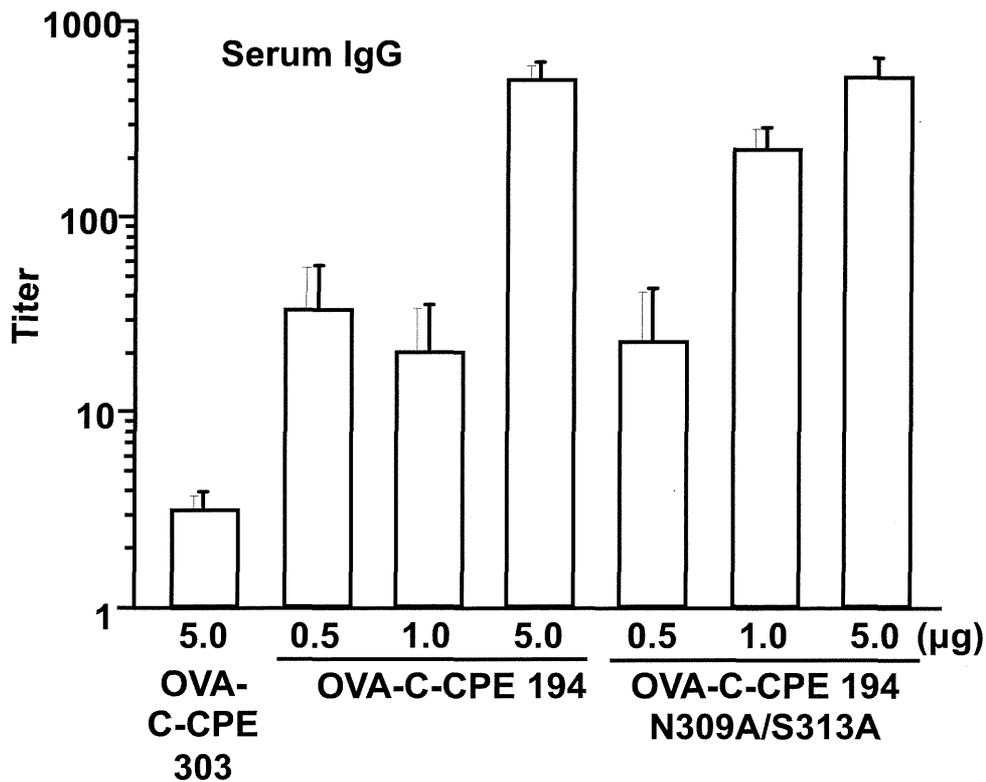


Fig.1 Production of OVA specific IgG in serum by OVA-C-CPE 194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE 194, or OVA-C-CPE 194 N309A/S313A (5, 1 or 0.5 mg of OVA) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization, the levels of serum IgG were determined by ELISA. Data are means  $\pm$  SEM (n=3~5). The results are representative of three independent experiments.

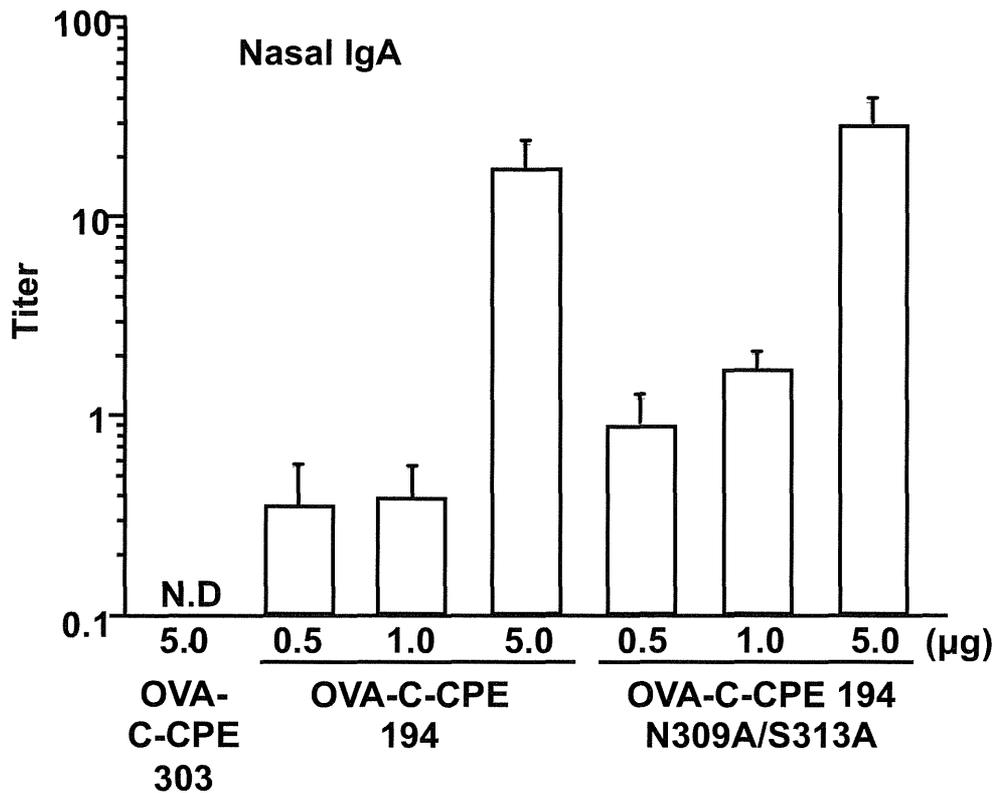


Fig.2 Production of OVA specific IgA in nasal by OVA-C-CPE 194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE 194, or OVA-C-CPE 194 N309A/S313A (5, 1 or 0.5 mg of OVA) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization, the levels of nasal IgA were determined by ELISA. Data are means  $\pm$  SEM (n=3~5). The results are representative of three independent experiments. N.D., not detected.

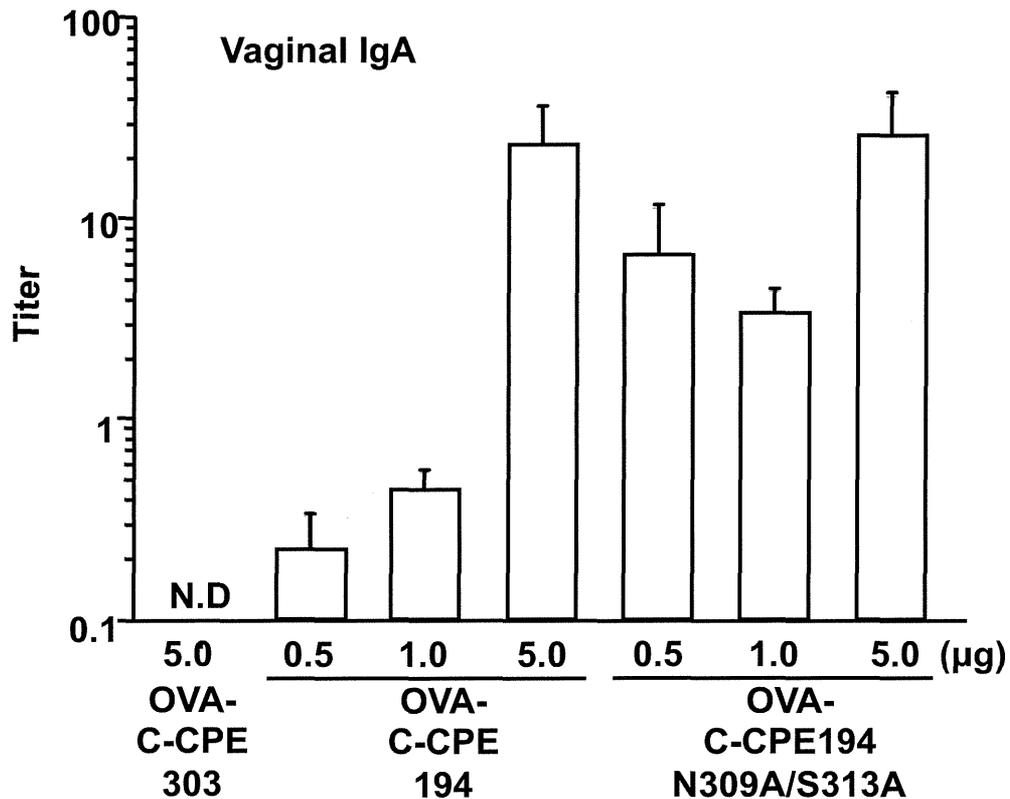


Fig.3 Production of OVA specific IgA in vagina by OVA-C-CPE 194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE 194, or OVA-C-CPE 194 N309A/S313A (5, 1 or 0.5 mg of OVA) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization, the levels of vaginal IgA were determined by ELISA. Data are means  $\pm$  SEM (n=3~5). The results are representative of three independent experiments. N.D., not detected.

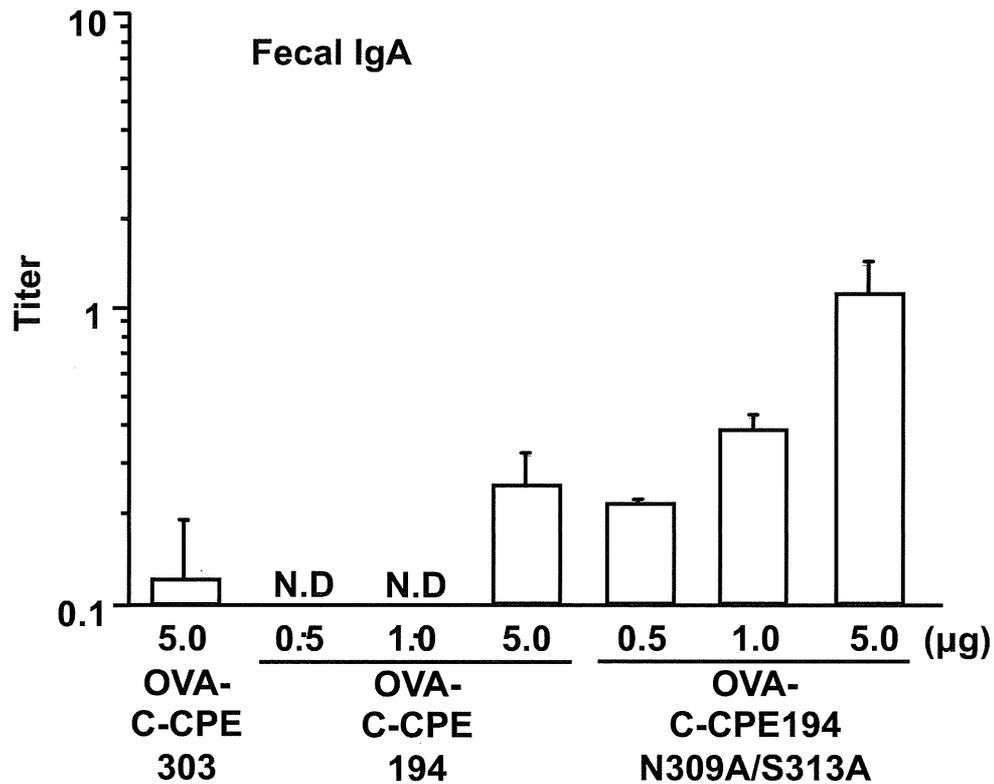


Fig.4 Production of OVA specific IgA in feces by OVA-C-CPE 194 N309A/S313A.

Mice were nasally immunized with OVA-C-CPE 303, OVA-C-CPE 194, or OVA-C-CPE 194 N309A/S313A (5, 1 or 0.5 mg of OVA) once a week for three weeks. Seven days after the last immunization, the levels of fecal IgA were determined by ELISA. Data are means  $\pm$  SEM (n=3~5). The results are representative of three independent experiments. N.D., not detected.