

201320028A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

移植肝への C 型肝炎ウイルス再感染阻害法の確立
に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成 26 (2014) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

移植肝への C 型肝炎ウイルス再感染阻害法の確立
に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
移植肝への C 型肝炎ウイルス再感染阻害法の確立 に関する研究	----- 1
渡利 彰浩	
II. 分担研究報告	
scFv 提示ファージライブラリの構築 に関する研究	----- 16
角田 慎一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 23

「移植肝へのC型肝炎ウイルス再感染阻害法の確立」

研究代表者 渡利 彰浩 大阪大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨

我が国において年間3万5千人が肝臓により命を落としているなかで、肝移植は肝臓患者に対して臨床的意義が極めて大きな治療法となっている。しかしながら、肝臓患者の80~90%はC型肝炎ウイルス(HCV)陽性であり、肝移植治療を受けた肝臓患者の99%で移植片に対するHCVの再感染が観察されている。従って、移植片に対するHCV再感染制御法の開発は、肝臓治療における最重要課題の一つとなっている。最近、claudin(CL)-1がHCVの感染受容体であること、CL-1を標的としたHCVの感染阻害が報告されたことを期に、CL-1を標的としたHCV感染阻害戦略が提唱された。

これらの背景を踏まえ、本研究は独自のclaudin(CL) binder創製技術を有効活用し、現在HCV感染阻害効果を実証されているCL-1 binderを創製することで、移植片に対するHCVの感染阻害法の開発を目的とする。そのため、当研究グループが有するCL binder創製システムを有効活用し、組織浸透性に優れ、製造コストの低いCL-1結合性一本鎖抗体(scFv)の創製を試みる。

昨年度までは、hCL提示バキュロウイルスを免疫したマウス(CL欠損マウス、gp64トランスジェニックマウス)をもとに、scFv提示ファージライブラリを作製し、hCL1 binderのスクリーニングを行った結果、hCL1特異的に結合するものや様々なCLに結合性を示すものを得ることに成功した。そこで、これらのファージクローンをもとに、scFvの精製を行いCL-1への結合性を確認したが、CL-1に結合性を示すscFvの取得には至らなかった。そこで本年度は、CL binderのスクリーニング方法を改善すべく、CL発現細胞を利用したスクリーニング方法(Cellパンニング、Cell ELISA)の検討を行った。その結果、CL発現細胞を利用することによるCL binder取得の可能性を見出すことができた。

上記の成果を踏まえ、今後はCL発現細胞を利用したスクリーニング法の向上および最適化を目指すと共に、さらなるbinderスクリーニング系の開発を目指すことにより、HCV感染阻害活性を有するCL-1 binderの取得を推し進める。

研究分担者

角田慎一 独立行政法人医薬基盤研究所
プロジェクトリーダー

の患者において慢性化が認められ、その後、肝硬変、肝臓へと進行することが多い。現在、C型肝炎の治療法としては、PEG化インターフェロンとリバビリンの併用療法が最も効果の期待できるものとして行われているが、その奏功率は50%にとどまっているのが現状である。また、肝臓まで進行した患者に対する根本的な治療は困難であり、肝移植が残された臨床的意義のある治療法となっている。しかしながら、C型肝炎患者では移植肝に対する

A. 研究目的

現在、本邦では約200万人、世界においては約2億人もC型肝炎ウイルス(HCV)感染者が存在し、世界規模で見ると年間200~300万人ずつ感染者が増加している。C型肝炎を発症したほとんど

HCVの再感染が不可避であり、再感染後に高い確率で慢性肝炎に移行し、5年以内に10～30%の患者で肝硬変が認められている。さらに、肝硬変発症後1年以内に40%の患者で非代償性肝硬変へと進展している。さらに、肝移植患者では、ウイルス量が多く、ステロイドや免疫抑制剤を使用していることからインターフェロン療法の奏効率が低下していることも問題となっている。このような現状から、移植肝に対するHCVの再感染阻害法の開発がC型肝炎治療における重要課題の一つとなっているものの、HCV感染阻害法の開発は立ち遅れているのが現状である。

近年、claudin (CL)-1、CD81、Scavenger receptor class B type I (SR-BI)、occludinがHCV感染受容体として機能していることが明らかとなり、HCV感染受容体をターゲットとした新たなC型肝炎治療薬開発の可能性が話題となった。2010年に抗CL-1抗体がHCVの感染を阻害することが報告され、CL-1を標的としたHCV感染阻害戦略が提唱された。この報告から、CL-1アンタゴニストを利用したHCV感染阻害法の確立が期待されている。しかしながら、CLは疎水性の強い膜蛋白質であるため、リコンビナント蛋白質を精製するのが極めて困難であること、抗原性が低いことから機能的なCL-1アンタゴニストの創製は遅々として進展していない。

近年、出芽バキュロウイルス(BV)が目的膜蛋白質をウイルス膜上に立体構造・機能を保持したまま高効率に提示可能であることを東大先端研の浜窪隆雄博士らが見出した。BVを用いた方法では、精製が困難である膜蛋白質の発現が可能であり、実際に一部のCLファミリーを発現させたBVの作製に成功している。そこで当研究グループは、CL-1アンタゴニスト創製における問題点を克服するため、BVを用いた膜蛋白質発現技術を利用することで、迅速かつ簡便にCL binderを創製するシステムを構築した。そこで、本研究は当研究グループが独自に開発したCL binder創製システムを有効活用することで、HCV感染阻害活性を有するdruggable claudin-1 binderの創製を目的とする。

今回、創製を目指すCL1 binderとして、組織浸透性やコストパフォーマンス等に優れた、CL-1結合性一本鎖抗体の開発を試みる。本阻害法の開発は、肝移植患者等の健康寿命の延伸といった社会的側面のみならず、医療費の抑制、バイオ製薬メーカーの育成などの厚生労働行政の課題解決に資するものである。

B. 研究方法

B. 1 hCL4-BV の作製

B. 1. 1 pFastBac-hCL4 の作製

Human claudin-4 (hCL4) cDNA フラグメントはpOBT-hclaudin-4をテンプレートとしてPCR法により増幅した。pOBT-Claudin-4 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μ l、2.5 mM MgSO₄ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 5 μ l、10 μ M primers 3 μ l、滅菌精製水 30 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 1 μ lを混合しPCRを行った。Claudin-4 クローニング用のプライマーは、Forward primer (5'-tgatgaactgcgtggtg -3')、Reverse primer (5'-ggttgtagaagtcgcggtg -3')を用いた。PCRの条件は、94°C 2 min の後、94°C 30 sec、64°C 30 sec、68°C 1 minを32サイクル。PCR後、PCR産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素であるXhoIとNotIにより切断した。トランスフォーマクターpFastBac1のマルチクローニングサイト上にあるXhoI、NotIサイトを制限酵素XhoI、NotIで切断し、制限酵素で切断したPCR産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセルDH-5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミドDNAを回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析によりpFastBac-hCL4を得た。

B. 1. 2 hCL4 発現用 bacmid DNA の作製

作製したpFastBac-hCL4により大腸菌DH10Bac (Invitrogen社)をトランスフォーメーションさせ、50 μ g/ml kanamycin, 7 μ g/ml gentamicin, 10 μ g/ml tetracycline を含み、2% X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside) 100 μ l および 50 mM IPTG 100 μ l を塗布したLB培

地プレート(IPTG, X-gal 含有 TKG plate)に播種し、37°Cで 24 時間培養した。任意の白コロニーをピックアップし、アルカリプレップにて大腸菌から hCL4 発現カセットが組み込まれた bacmid DNA (hCL4-bacmid)を精製した。

PCR 法により目的遺伝子が挿入されていることを確認した。精製した bacmid DNA 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x LA PCR buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 3.2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 9.6 μ l、5 U/ μ l Takara LA taq 0.2 μ l を混合し PCR を行った。プライマーは Forward primer (5' - tgtaaacgacggccagt -3')、Reverse primer (5' - ggaaacagctatgaccatg -3') を用いた。PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 30 sec、55°C 30 sec、68°C 4 min を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動し目的遺伝子の挿入を確認した。Bacmid DNA により DH5 α をトランスフォーメーションさせ、IPTG, X-gal 含有 TKG plate で培養した。白色独立大腸菌クローンを培養し、QIAfilter™ plasmid Midi kit (QIAGEN) を用いて bacmid DNA を精製した。なお、野生型 BV(WT-BV)bacmid は青色独立大腸菌クローンから精製し、hCL4-bacmid と同じ条件で PCR を行い組換えが起きていないことを確認した。

B. 1. 3 hCL4 発現 Budded baculovirus (hCL4-BV) の作製

培養用 6 穴プレートに 1 \times 10⁶ cells/well の濃度で Sf9 細胞 (Invitrogen) を播種し、室温で 1 時間静置した。静置中に tube A 液 (cellfectin (Invitrogen) 6 μ l、血清・抗生物質を含まない Sf-900 培地 (Invitrogen) 100 μ l) と tube B 液 (各種 hCL4-bacmid DNA 1 μ g、血清・抗生物質を含まない Sf-900 培地 100 μ l) を用意し、tube A 液と tube B 液とをよく混和し、泡立てないようにゆっくりピペティング後、室温で 30 分間放置した。1 時間静置することで接着させた Sf9 細胞を Sf-900 培地 (血清、抗生物質なし) で洗浄後、培地を除去し、tube A 液と tube B 液との混合溶液に Sf-900 培地 (血清、抗生物質なし) 800 μ l を加え、ウェルに全量 1 ml 添加し、プレートをビニールテープで密封して

5 時間、27°Cで培養した。その後、培地を除去し、血清と抗生物質を含んだ 2 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) に交換し、27°Cで 3 日間培養した。3 日後、培養上清を 800 \times g で 10 分間遠心することで回収した (P1 ストック)。続いて、2 \times 10⁶ cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに 200 ml 用意し、そこに P1 ストック 2 ml を加え、27°Cで 2 日間培養した。2 日後、培養上清を 800 \times g で 10 分間遠心することで回収した (P2 ストック)。

培養用 6 穴プレートに 2 \times 10⁶ cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10, 100, 1,000 μ l ずつ加え、27°Cで 3 日間培養した (全量 2 ml)。3 日後、800 \times g で 10 分間遠心し、上清を回収した。沈殿物 (細胞) には protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-X を含む PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) で懸濁後、超音波処理で破碎し細胞可溶化液とした。培養上清および細胞可溶化液を用いて、Western blot 法にて目的とする蛋白質の発現を確認した。

4 \times 10⁶ cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに 100 ml 用意し、血清と抗生物質を含む 50 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) と、発現確認のできた P2 ストックを 50 ml 加え、27°Cで 3 日間培養した。3 日後、培養上清を 800 \times g で 10 分間遠心することで回収した。回収した培養上清を 18,400 \times g で 25 分間さらに遠心した。得られた沈殿を PBS で懸濁後、800 \times g で 10 分間遠心し、上清をさらに 18,400 \times g で 25 分間遠心した。得られた沈殿を protease inhibitor を含む TBS 200 μ l で懸濁し、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用いて蛋白質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

B. 2 hCL4 発現細胞の作製

B. 2. 1 pcDNA3.1 (-) -hCL4 の作製

pcDNA3.1 (-) -hCL4 を作製するにあたり、hCL4 の cDNA フラグメントとして pFastBac-hCL4 を用い、pFastBac-hCL4 をテンプレートとして PCR 法により hCL4 領域を増幅した。pFastBac-hCL4

溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 2 μ l、2.5 mM MgSO₄ 1 μ l、2.5 mM dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1.6 μ l、滅菌精製水 9.9 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 0.4 μ lを混合し PCRを行った。PCR の条件は、94°C 2 min の後、94°C 15 sec、61°C 30 sec、68°C 1 minを32サイクル。PCR後、PCR産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である Nhe I と Afl II により切断した。トランスファクター pcDNA3.1 (-) のマルチクローニングサイト上にある Nhe I と Afl II サイトを制限酵素 Nhe I、Afl II で切断し、制限酵素で切断した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析により pcDNA3.1 (-) -hCL4 を得た。

B. 2. 2 hCL4 発現 HT1080 細胞の作製

培養用 6 穴プレートに 8×10^5 cells/well の濃度でヒト繊維芽細胞株 HT1080 細胞を播種し、37°C 5% CO₂ 環境下で 12 時間培養した。作製した pcDNA3.1 (-) -hCL4 plasmid 2 μ g をそれぞれ Opti-MEM1 (GIBCO) 100 μ l と FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche) 4 μ l と混合し、15 min 常温静置した。HT1080 細胞の培地を交換し、上記の混合液をウェルに全量加えた。その後 100 ϕ dish に希釈し播種した。翌日に G418 二硫酸塩溶液 (nacalai tesque) が 600 μ g/ml となるように加え、5 日間、37°C 5% CO₂ 環境下で培養した。培地交換した後シングルコロニーをピックアップし、培養用 24 穴プレートに播種した。

B. 3 抗 hCL4 抗体産生マウスの作製

B. 3. 1 gp64トランスジェニックマウスへの hCL4-BV 免疫

雌性 gp64 トランスジェニックマウスに用時調整した hCL4-BV を 2 回投与し、最終免疫から 1 週間後に血液を眼底採血により回収し、3000 \times g で 10 分間遠心し、上清を血清として採取し、-80 °C で保存し

た。

B. 3. 2 FACS 解析による血清中抗 hCL4 抗体産生確認

hCL4 発現 HT1080 細胞を 5.0×10^5 /sample となるように 96 well plate に播種し、1.0% BSA-PBS で 1,000 倍希釈したマウス血清を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 1 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Goat anti-mouse IgG(H+L)-FITC 抗体 (ROCKLAND) を添加、攪拌し、氷上で遮光し 30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 mg/mL となるように希釈した PI (Miltyeni Biotec) を加え、FACS Calibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B. 4 hCL4 免疫 scFv 提示ファージライブラリの作製

B. 4. 1 hCL4 免疫マウス脾臓からの mRNA の精製と cDNA の合成

hCL4-BV 免疫マウスをイソフルランにより麻酔し、頸椎脱臼後、脾臓を摘出した。摘出した脾臓を TRIzol reagent (Invitrogen) に溶解させ、total RNA を回収した。回収した total RNA から mRNA Purification kit (GE Health Care) を用いて mRNA を精製した。精製した mRNA 500 ng から SuperScript III First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用い cDNA を合成した。

B. 4. 2 合成 cDNA における GAPDH の発現確認

B. 4. 1 で合成した cDNA を用い、GPDH の発現確認を行った。cDNA 溶液 1 μ l、10 x PCR buffer 2.5 μ l、dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 18.4 μ l、5 U/ml Takara ExTaq™ 0.1 μ l を混合して RT-PCR を行った。GAPDH の発現確認用プライマー配列は、Forward; 5' -tcttcaccaccatggagaag -3'、Reverse; 5' -accacctgtgtcctcagtga-3' とした。PCR の条件は、94 °C 5 min の後、94 °C 30 sec、55 °C 15 sec、72 °C 1 min を 20 サイクル。PCR の後、1 %アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を分離し、エチジウムブロマイドで DNA を染色した。

B. 5 hCL4 binder のスクリーニング

B. 5.1 scFv ライブラリ提示ファージの作製

scFv をコードした cDNA を組み込んだ pY03' ファージミドベクターで形質転換した TG1 のグリセロールストックを、2YTGA 培地 25 ml に OD600:0.09-0.1 となるように添加し、37 °C で OD600:0.3-0.6 となるまで培養した。次に M13K07 helper phage (Invitrogen) を $OD600 \times 8 \times 10^8$ (cells/ml) $\times 25$ (ml) $\div 10^{11}$ (CFU/ml) となるように添加し、37 °C で 30 分間静置した。さらに、37 °C、30 分間 250 rpm で振盪培養した後に、1000 $\times g$ で 10 分間遠心し、ペレットを回収した。100 $\mu g/ml$ ampicillin sodium, 50 $\mu g/ml$ kanamycin を添加した 2YT (2YTAK) 培地 50 ml にペレットを懸濁し、37 °C、250 rpm で振盪培養した。6 時間後、1000 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、その上清を回収した後、さらに 15660 $\times g$ 、15 分間の遠心分離を行なった。上清 40 ml に対して PEG-NaCl (20% PEG6000, Wako Pure Chemicals, 2.5 M NaCl) 溶液 10 ml を添加し、転倒混和後 4°C、2 時間～一晩まで静置した。次に、再び 15660 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、沈殿したペレットを NTE buffer (0.3 M NaCl, 10mM Tris, SIGMA, 1 mM EDTA-2Na, NACALAI TESQUE) 1 ml に溶解した後、0.45 μm フィルター (Millipore) を用いて濾過し、ファージ溶液を得た。

B. 5.2 scFv ファージライブラリの FLAG resin パンニング

4% Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL) を 4 °C で一晩作用させ固相化したエッペンに anti-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA) 100 μl を添加した。さらに NTE buffer 500 μl を添加し、1000 $\times g$ 、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を三回繰り返した後、ファージ溶液 50 μl および 2% Block Ace 50 μl 混合液を添加し、常温で 1 時間転倒混和した。0.1% T-PBS 500 μl を添加し、1000 $\times g$ 、5 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を五回繰り返した後、1 mg/ml 3 \times FLAG peptide (SIGMA) 100 μl を添加し、常温で 40 分間転倒混和した。10,000 rpm、30 sec 遠心分離を行い、上清をファージ溶液として回収

し、終濃度 10% となるようにグリセロールと混合した後、-80°C にて保存した。

B. 5.3 scFv ファージライブラリの HT1080/CL4 によるパンニング

まずは、hCL4/HT1080 の hCL4 以外に結合するクローンを除くため、Mock/HT1080 2×10^6 cells in 1 ml Tyrode's buffer にファージ液 100 μl を加え、4°C で 2 時間穏やかに回転した。遠心し、hCL4 以外に結合するクローンが除かれたファージを得た。

次に、hCL4/HT1080 2×10^6 cells のペレットを、さきほど得られたファージ液で懸濁し、4°C で 2 時間穏やかに回転した。遠心し、上清を除き、PBS 10 ml で懸濁し、再び遠心する wash 操作を 2 回、PBS 1 ml での wash 操作を 2 回行った。Wash 後の細胞のペレットを 20 mM glycine-HCl (pH2) 1 ml で懸濁し、室温で 15 分間穏やかに回転することで、細胞からファージを浮遊させた。2M Tris-HCl (pH8) 100 μl で中和後、細胞への再結合を防ぐため、すばやく新しいエッペンに移して遠心し、上清を得た。

Input と output を段階希釈し、TG1 に感染させ、petrifirm に播種し、培養後に数を数えて titer check を行った。また、ファージの代わりに NTE buffer および 2YTG を用いて petrifirm に播種し、コンタミチェックを行った。残った output 800 μl は TG1 と混合後、培養し、LAG plate に播種した。37°C・overnight で colony を回収してグリセロールストックを作製した。

B. 5.4 パンニングの ratio 計算

パンニングで回収したファージ溶液 (output phage) 5 μl を 10^2 - 10^7 倍に 2YT 培地を用いて希釈した。同様に、パンニング操作前のファージライブラリ溶液 (input phage) を 10^9 - 10^{11} 倍に希釈した。希釈ファージ 100 μl を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.3-0.6 に調整) 300 μl とそれぞれ混合後、37 °C、1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600 μl をさらに添加し、ペトリフィルムに播種し、37°C で一晩培養した。翌日コロニー数を計測することで titer を算出し、パンニング ratio (output/input) を求めた。

B. 5.5 モノクローン化 scFv ファージの作製

パンニング後のファージを感染させた TG1 グリセロールストックを希釈し、LAG 培地プレートに播種し、37°Cで一晩培養した。播種した LAG 培地プレートからコロニーを 2YTGA 培地 100 μ l を添加した 96 well plate (IWAKIGLASS) にピックアップし、37°Cで 1,000 rpm、4 時間振盪培養した。2YTGA 500 μ l を添加したディープウェル (Greiner Bio-One) に前培養した大腸菌を 10 μ l ずつ植え継ぎ、OD600 = 0.3-0.6 まで 37°Cで 1,000 rpm 培養後、M13K07 helper phage を添加した。37°C、1 時間静置した後、2000 rpm、15 分間遠心分離し、上清を除去した後、2YTAK 培地 1 ml を添加し、37°C、500 rpm で一晩振盪培養した。翌日 2,000 rpm、15 分間遠心分離した後、上清を回収し、これをモノクローン化ファージ溶液とした。なお、前培養のため 96 well plate で培養した大腸菌 TG1 のうち、植え継ぎに使用しなかった大腸菌は、終濃度 10%でグリセロールを添加し、-80°Cで保存した。

B. 5.6 scFv ファージを用いた Cell ELISA

グリセロールストックから、各クローンを 2YTGA で培養した。ヘルパーファージを加えて培地を 2YTAK に交換して培養後、上清を得て、各クローンのファージ液を得た。Mock/HT1080、hCL4/HT1080 (1.5 \times 10⁵ cells/200 μ l/well in blocking buffer) を丸底プレートに加えた。遠心して上清を除き、ファージ溶液(ファージの原液 100 μ l + blocking buffer 20 μ l) を加えて 4°Cで 2 時間振盪した。遠心して上清を除き、T-PBS で懸濁する wash 操作を 2 回行った。3000 倍希釈の anti M13 Ab HRP を 100 μ l 加えて、4°Cで 1 時間振盪し、T-PBS で 1 回 wash した。T-PBS で細胞を懸濁し、あらかじめ blocking buffer でブロッキングしておいた ELISA plate に移し、遠心して上清を除き、TMB で懸濁した。室温で 20 分反応させ、2 M H₂SO₄ で反応を止めた。また、同時に FLAG によるファージ発現確認を行った。anti FLAG mAb を 0.125 μ l/50 μ l/well を加え、4°C・overnight で固層化し、PBS で 3 回洗浄後、4% Block Ace を加えた。室温で 2 時間ブロッキングし、PBS で 3 回洗浄後、ファ

ージ溶液(ファージの原液 100 μ l + 4%B.A. 20 μ l) を加えて室温で 2 時間結合させ、T-PBS で 5 回洗浄した。3000 倍希釈の anti M13 Ab HRP を 100 μ l 加えて、室温で 1 時間置き、T-PBS で 3 回洗浄した。TMB 100 μ l で反応させ、十分に発色したところで H₂SO₄ 100 μ l で反応を止め、OD450 を測定した。

C. 研究結果

C. 1 hCL4 発現 BV の作製

hCL4 免疫ライブラリを作製するため、BV 膜上に hCL4 を発現させた BV (hCL4-BV) の作製を行った。まず、bacmid DNA へのトランスファーベクターである pFastBac1 の polyhedrin プロモーターの下流に、hCL4-DNA を組み込んだ pFastBac-hCL4 を作製した。作製した pFastBac-hCL4 の hCL4 領域の配列は、シーケンス解析により確認した。pFastBac を DH10Bac に導入し、相同組換えを起こさせることで、hCL4-BV 作製の bacmid DNA (hCL4-bacmid) を得た。

培養用 6 ウェルプレートに Sf9 細胞を播種し、cellfectin を用いて hCL4-Bacmid をトランスフェクションした。2 日間培養した後、培養上清に含まれる BV を回収し、回収した BV を再度 Sf9 細胞に感染させることにより、高力価の BV を得た。WT-BV と hCL4-BV を供した Western Blot 法により、hCL4-BV における hCL4 の発現解析を行った結果、hCL4 の発現を確認した (Fig. 1)。なお、ポジティブコントロールとして hCL4 発現 HT1080 細胞 (hCL4/HT1080) を用いた。

C. 2 gp64 トランスジェニックマウスへの hCL4-BV の免疫

雌性 gp64 トランスジェニックマウスに hCL4-BV を 2 回免疫した後、マウスより回収した血清を用いて抗体産生を確認した。FACS 解析から、hCL4 抗体の産生が確認された (Fig. 2)。

C. 3 hCL4 免疫 scFv ライブラリ作製用 cDNA の合成

抗体産生確認後、マウスの脾臓を摘出し、total RNA を抽出後、mRNA を精製した。精製した mRNA を鋳型にして cDNA を合成した。cDNA の合成を確認するため、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の発現を確認した結果、GAPDH の発現が確認できたことから、cDNA の合成に成功した (Data not shown)。

C. 4 Cell パンニングによる hCL4 binder のスクリーニング

作製した scFv 提示ファージライブラリ中の FLAG 未提示のファージを除去するため、1st スクリーニングを行う前に FLAG resin によるパンニングを行った。Anti-FLAG M2 Affinity Gel をエッペンに固相化して scFv ファージライブラリを添加した後、3×FLAG peptide の添加による結合競争により解離したファージを回収した。続いて、HT1080 へ結合するファージを除くため、回収したファージを HT1080 に添加した後、非結合ファージを回収し、大腸菌 TG-1 に感染させ増幅した。その後、調製したファージを HT1080/CL4 に作用させた。このサイクルを繰り返すことで HT1080/CL4 に対する結合性ファージの濃縮を試みた。パンニングの濃縮率の推移を観察すると 4 round 後には顕著な濃縮傾向が観察された (Fig. 3)。

パンニング操作を行った scFv ライブラリから、個々のファージクローンにおける HT1080/CL4 への結合性を確認した結果、HT1080/CL4 に対して結合性を有するクローンが複数観察された (Fig. 4)。HT1080/CL4 への結合性が見られた 8 クローンに関して再度結合性を確認するため、HT1080/CL4 に対する結合能を検討した。その結果、8 つのクローンはすべて HT1080/CL4 に結合性を示した。(Fig. 5)。

D. 考察

昨年度は、gp64トランスジェニックマウスを用いたファージディスプレイscFvライブラリの構築し、hCL発現BVを用いたhCL1 binderのスクリーニングを行った結果、gp64には結合せずにhCL1に結合す

るクローンを複数取得することに成功した。これらのクローンの中には、様々なCLに結合性を示すもの、hCL1にのみ結合性を示すものが含まれていた。そこで、得られたクローンをもとにscFv蛋白質を精製し、CL-1への結合性を確認したが、CL-1に結合性を示すscFvの取得には至らなかった。この結果を受けて、ファージディスプレイscFvライブラリのライブラリサイズ、多様性は十分であったため、スクリーニング方法に改善の余地があると判断し、CL発現BVによるスクリーニング方法から、よりCLの立体構造を保持していると判断されるCL発現細胞 (HT1080/CL)を用いたCellパンニングおよびCell ELISAによるスクリーニング方法を検討することにした。まず、CL binder取得のためのCellパンニング、Cell ELISA等の実験系構築のため、CL binderの開発において先行しているCL4 binderによる系の構築を試みた。

ライブラリについては、昨年度開発に成功している、gp64 トランスジェニックマウスを利用した方法を採用した。基本的な戦略は昨年度と同様に、gp64トランスジェニックマウスにhCL4-BVを免疫することで抗hCL4抗体の産生を誘導し、本マウスの脾臓をもとにscFv 提示ファージライブラリの構築を行った(角田班の報告を参照)。構築したライブラリからHT1080に結合するファージを除くため、サブトラクションパンニングを行った。続いて、hCL4 binderを取得するため、HT1080/CL4によるパンニング操作を4 round 行い、hCL4 binderを濃縮した。4th パンニング後のファージをモノクローン化し、HT1080/CL4 への結合性を調べたところ、HT1080/CL4 への結合性を有するクローンが複数得られた。また、これらのクローンは HT1080 には結合性を示さないものであった。従って、gp64 トランスジェニックマウスを利用することにより HT1080 には結合せず、HT1080/CL4 に結合性を示す binder を取得することに成功した。続いて、得られた binder の CL4 結合性を再確認するため、再度 HT1080/CL4 を利用した Cell ELISA を行った結果、HT1080/CL4 への結合性を再確認した。今回、Cell パンニングによる CL binder の取得を試み、

CL4 に結合性を示すファージクローンの取得に成功したものの、その結合能は十分とはいえないものであった。したがって、今後は今回確立した Cell パンニング、Cell ELISA の系を見直し、より CL 結合能の高い binder を取得できる系へと改善する必要があると考えられる。

E. 結論

本研究は、独自の CL binder 創製技術を有効活用することで、HCV 感染阻害剤の基盤分子となる hCL1 binder の創製を目的としている。

本年度は、(1) gp64 転スジェニックマウスを用いたファージディスプレイ scFv ライブラリの構築、(2) Cell パンニングおよび Cell ELISA を利用した CL binder スクリーニング系の確立を目指し、以下の成果を得た。

(1) gp64 転スジェニックマウスを用いたファージディスプレイ scFv ライブラリの構築

gp64 転スジェニックマウスに hCL4 提示 BV を免疫し、本マウスの脾臓から得た RNA をもとに、scFv 提示ファージ抗体ライブラリを作製した。作製したライブラリは、スクリーニングソースとして十分な多様性を有していた。

(2) Cell パンニングおよび Cell ELISA を利用した CL binder スクリーニング系の確立

Cell パンニングおよび Cell ELISA による CL binder スクリーニング系の構築を目指し、CL-4 binder スクリーニングをモデルとして系の構築を試みた結果、結合性は弱いものの、細胞外領域の CL-4 に結合性を示す scFv 提示ファージの取得に成功した。

上記の成果を踏まえ、今後は Cell パンニングおよび Cell ELISA の実験系の向上、およびさらなる CL binder スクリーニング系の開発を目指すことにより、HCV 感染阻害活性を有する CL-1 binder の取得を推し進める。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Yagi K., Acute and chronic nephrotoxicity of platinum nanoparticles in mice. *Nanoscale Res. Lett.* 8(1), 395, 2013.

2. 学会発表

1. Nagasse S., Yamashita M., Iida M., Kondoh M., Watari A., Fukasawa M., Yagi K., Development of claudin-1-specific ligand., Experimental Biology 2013, Apr 20-24, Boston, U.S.A.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Nagase S., Yamashita M., Iida M., Watari A., Yagi K., Fukasawa M., Kondoh M., Claudin-1-specific monoclonal antibodies and their inhibition of hepatitis C virus infection., 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society 2013, Jul 21–24, Honolulu, HI, U.S.A.
 6. Nagase S., Yamashita M., Iida M., Fukasawa M., Watari A., Yagi K., Kondoh M., CLAUDIN-1-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES AND THEIR INHIBITION OF HEPATITIS C VIRUS INFECTION., 7th ICLA Annual Conference, Sep 13–15, Washington, D.C., U.S.A.
 7. Nagase S., Yamashita M., Iida M., Watari A., Yagi K., Fukasawa M., 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, San Antonio, U.S.A.
 8. 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.
 9. Nagase S., Yamashita M., Iida M., Shirasago Y., Fukasawa M., Tada M., Ishii A., Watari A., Yagi Y., 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, U.S.A.
 10. 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, New Orleans, U.S.A.
 11. 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, New Orleans, U.S.A.
 12. 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DDS学会学術集会、平成25年7月4–5日、京都市
 13. 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
 14. 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
 15. 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
- 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)

- ・ 長瀬翔太郎(大学院生)
- ・ 山下真代(大学院生)
- ・ 飯田愛未(大学院生)
- ・ 木村友香(学部生)
- ・ 中嶋美咲(学部生)

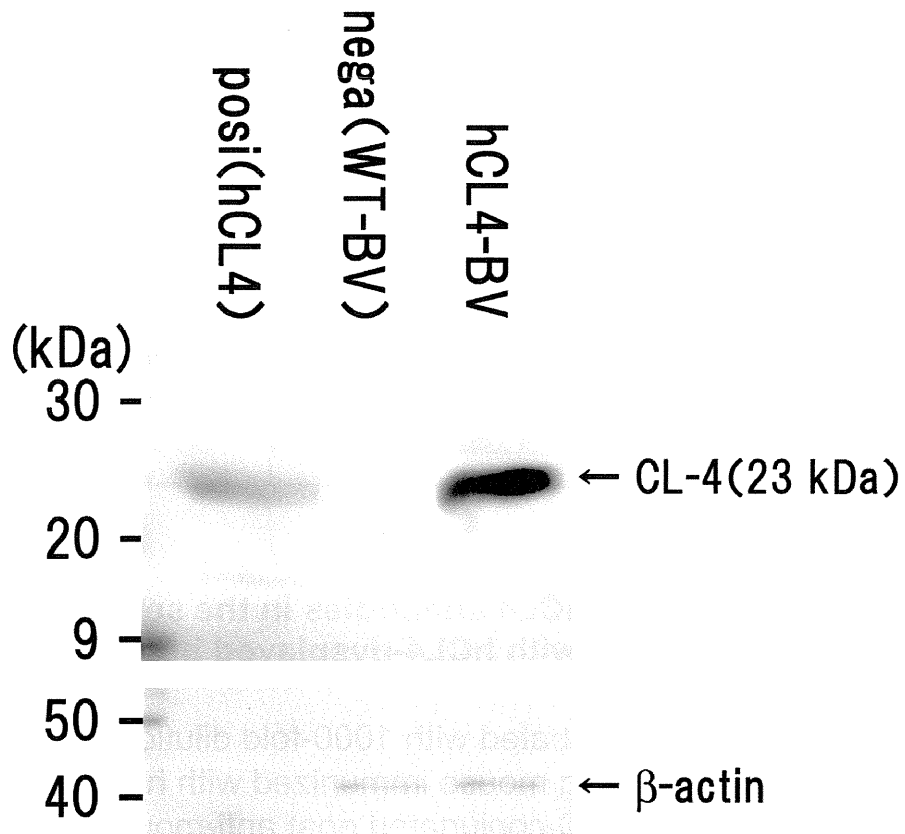


Figure 1 Preparation of CL4-expressing BVs.

A) WT-BV and hCL4-BV were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of hCL4/HT1080 cells was used as a positive control.

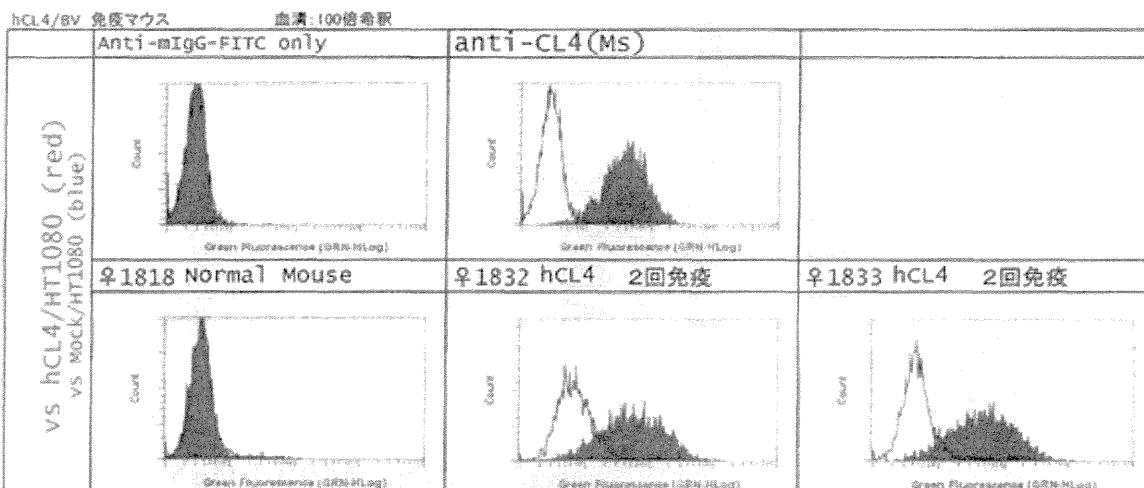


Figure 2 Detection of anti-hCL4 antibodies in the sera of gp64Tg mouse immunized with hCL4-displayed budded baculovirus.

hCL4/HT1080 cells were incubated with 1000-fold dilution of the sera of the sera of gp64Tg mouse immunized with hCL4-displayed budded baculovirus, and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). The antibodies-bound cells were detected using a flow cytometry. As a control, cells were incubated with phosphate buffered saline (PBS).

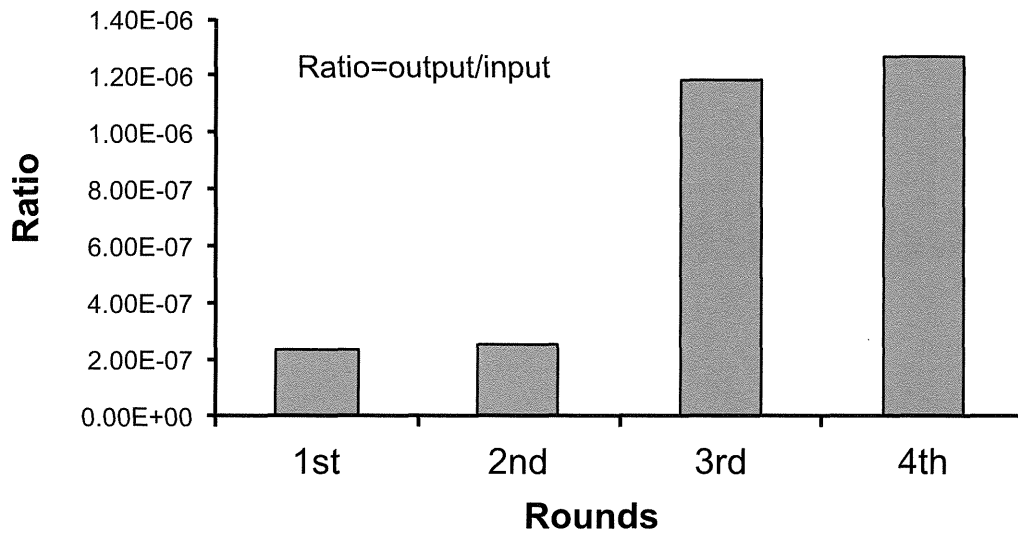


Figure 3 Panning of a hCL4 binder.

Enrichment of phages with affinity to hCL4-BV. HT1080/CL4 were incubated with the scFv phage (1st input phage). The phages bound to HT1080/CL4 were recovered (1st output phage). The HT1080/CL4 binding phages were subjected to another additional cycle of the incubation and wash step, resulting in 2nd, 3rd, and 4th output phage. The ratio of output phage to input phage titers was calculated.

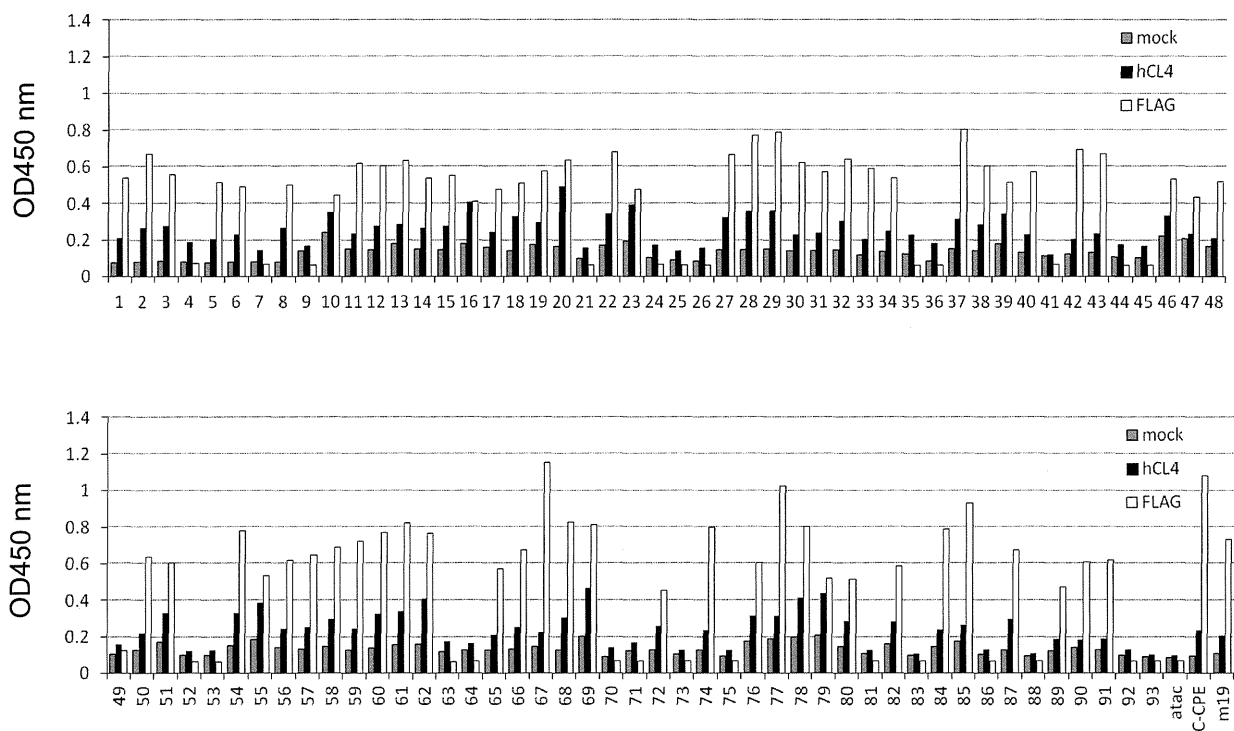


Figure 4 Screening of a hCL4 binder.

Monoclonal analysis of scFv phage. Phage clones after 3rd round panning with HT1080/CL4 were treated to the HT1080 or HT1080/CL4 cells. Phage clones bound to the HT1080 or HT1080/CL4 detected by ELISA with an anti-M13 mAb.

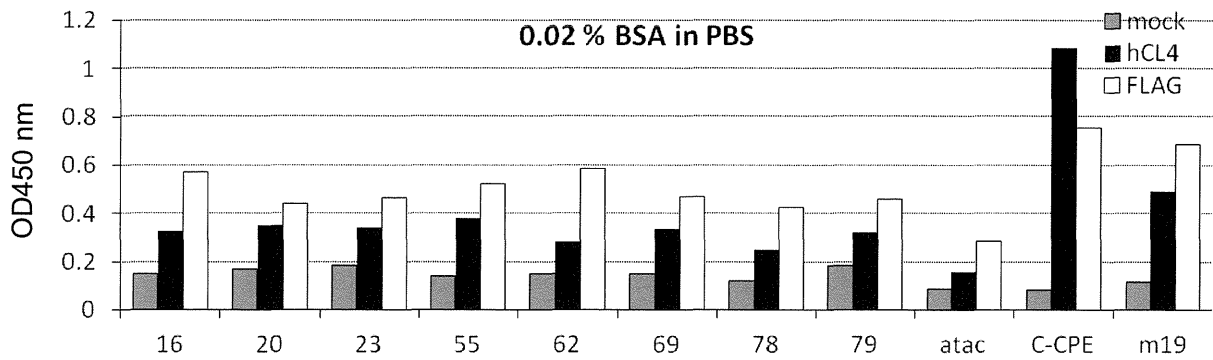


Figure 5 Retest of a hCL4 binder identified by cell panning screening.

Monoclonal analysis of scFv phage. Phage clones bind to HT1080/CL4 were treated to the HT1080 or HT1080/CL4 cells. Phage clones bound to the HT1080 or HT1080/CL4 detected by ELISA with an anti-M13 mAb.

scFv 提示ファージライブラリの構築

分担研究者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨

現在までに C 型肝炎ウイルスの感染受容体として、claudin(CL)-1、occludin、CD81、Scavenger receptor class B type I(SR-BI)などが同定され、感染受容体アンタゴニストを利用した C 型肝炎ウイルス感染阻害法の可能性が提唱された。2010 年に抗 CL-1 抗体が多様な genotype の C 型肝炎ウイルスに対し感染阻害活性をもつことが示されたことから、CL-1 アンタゴニストが C 型肝炎ウイルス感染阻害薬の候補として注目されている。しかしながら、CL-1 アンタゴニストの創製に成功した例は唯一この報告のみであり、druggable CL-1 binder の開発は未だ皆無である。

一本鎖抗体(scFv)は、抗体の可変領域(VH, VL)のみから構成され、IgG に比べ分子量が約 1/5 と低分子であることから、血管から組織への移行性に優れており、大腸菌による組換え蛋白質として産生可能であることから、製造コストが低く抑えられるなど創薬上のメリットがある。このように、scFv を利用した CL-1 アンタゴニストは druggable CL-1 binder としての可能性を秘めている、膜蛋白質である CL は精製が困難であり、抗原性も低いためその創製は立ち遅れているのが現状である。

本年度は、hCL4 提示バキュロウイルスを免疫した gp64 トランスジェニックマウスの脾臓から、 3.0×10^5 CFU サイズのファージディスプレイ scFv ライブラリを構築した。

A. 研究目的

現在までに、C 型肝炎ウイルス(HCV)の受容体として、CD81、claudin(CL)-1、occludin、Scavenger receptor class B type I(SR-BI)などが同定されている。HCV のエンベローブ蛋白質である E2 蛋白質がこれら感染受容体に結合すると、HCV 粒子はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。従って、HCV 感染受容体の細胞外領域に結合する分子は、感染阻害作用を有する C 型肝炎治療薬になり得る。実際、2010 年に抗 CL-1 抗体が多様な genotype の HCV に対し、感染阻害活性をもつことが示され、CL-1 アンタゴニストが C 型肝炎ウイルス感染阻害薬として有望であることが示された。しかしながら、CL-1 アンタゴニストの創製に成功し

た例は唯一この報告のみであり、druggable CL-1 binder の開発は立ち遅れているのが現状である。

本研究は、HCV 感染受容体の1つであるCL-1 をターゲットとしたC型肝炎治療および予防薬を、独自のファージディスプレイscFvライブラリ作製技術を利用することにより創製しようとするものであり、我が国の健康増進といった社会的側面のみならず、バイオメーカーの育成や知的財産の確保にも大きく貢献できるものである。

本年度は、gp64トランスジェニックマウスにhCL4提示バキュロウイルスを免疫することにより得たhCL4抗体産生マウスを利用し、scFvライブラリの構築を試みた。

B. 研究方法

B.1 scFv ファージライブラリの構築

hCL4-BV を免疫した gp64 トランスジェニックマウスから脾臓を摘出し、total RNA を回収した。Total RNA から mRNA を精製し、cDNA を合成した。cDNA 4 μ l を鋳型として forward primer set 2 μ l、reverse primer set 2 μ l、PCR buffer 5 μ l、dNTP 5 μ l、MgSO₄ 2 μ l、DMSO 1 μ l、KOD-plus 1 μ l の割合で混合したものをアニーリング温度 50°C で 30 sec、伸長反応 68°C で 1 min に設定した 35 サイクルの PCR 反応に供し、それぞれ VH 鎖、VL 鎖の cDNA を得た。この PCR 産物を PCR purification kit (QIAGEN) で精製し、続く PCR による VH、VL の連結、増幅 (assembly PCR) に供した。VH 鎖 cDNA を 100 ng、VL 鎖 cDNA を 100 ng、PCR buffer 5 μ l、dNTP 5 μ l、MgSO₄ 2 μ l、DMSO 1 μ l、KOD-plus 1 μ l の割合で混合したものをアニーリング温度 65°C で 1 分間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 18 サイクルの条件に設定し、assembly PCR を行った。さらに scFv 100 ng、Not I サイトを有する Y15 primer (5'-ggccagcttggagccttttttggagatcttcaacgtgaaaaattattatttcgcaattccttagttgttcctttctatgcgccagccggccatggcc-3') 0.4 μ l、Nco I サイトを有する Y16 primer (5'-ttagtaaatgaattttctgtatgaggttttctaaacaacttcoacagtctatgcgccagcgggttccacggatccggatccggcaccggccacctgcccgc-3') 0.4 μ l、PCR buffer 5 μ l、dNTP 5 μ l、MgSO₄ 2 μ l、DMSO 1 μ l、KOD-plus 1 μ l の割合で混合したものをアニーリング温度 65°C で 1 分間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 35 サイクルの条件に設定し PCR を行い、scFv を増幅した。PCR 産物を PCR purification kit を用いて精製し、scFv 遺伝子とした。scFv 遺伝子を Nco I、Not I で 37°C、20 時間処理し、切り出し精製を行った。同様に Nco I、Not I で 2 h 処理し、切り出し精製した pY03'-importin α を 1 μ g、scFv 遺伝子を 0.8 μ g 用いて T4 DNA ligase を用いて 16°C にて一晩ライゲーション反応を行なった。得られたライゲーション産物を PCR Purification Kit で精製した。ライゲーション産物を大腸菌 TG1 (STRATAGENE) にエレクトロポレーションすることにより導入した。その後、100 μ g/ml

ampicillin sodium と終濃度 2% D-glucose を添加した LB 培地 (LAG 培地) プレートに播種した。一晩培養後の大腸菌のコロニーをセルスクレーパーにより LAG 培地で回収した。この大腸菌溶液を終濃度 10% となるようにグリセロール (ナカライテスク) を添加して -80°C で保存し、hCL4-BV 免疫 gp64Tg ライブラリとした。

B.2 エレクトロポレーション

TG1 をグリセロールストックから 2YT (2-YT BROTH, Invitrogen) 培地 2 ml で一晩培養した。翌日、2YT 培地 200 ml に OD600:0.05-0.1 となるように植え継ぎ、37°C で OD600:0.4-0.6 まで培養した。その後、4°C、3000 rpm 10 分間遠心分離し、上清を捨て、milliQ 水を加え懸濁し、さらに 4°C、3000 rpm 10 分間遠心分離し、上清を捨てた。この洗浄作業を 3 回繰り返した後、TG1 を終濃度 10% のグリセロールを含む SP 水で懸濁した。TG1 溶液 50 μ l とライゲーション産物 1 μ l (30 セット) を氷上で 15 分間なじませた後、混合液をキュベットに移し、Gene pulser[®] (Bio-Rad Laboratories) を用いて電気パルスを与えた (Ec1)。その後、終濃度 2% D-glucose を添加した 2YT (2YTG) 培地 950 μ l に移し、37°C で 1 時間振盪培養した。Titer check 用として、この大腸菌溶液のうち 50 μ l を 100 μ g/ml ampicillin sodium を添加した 2YTG (2YTGA) 培地で 10²-10⁶ 倍希釈し、ペトリフィルム (3M Microbiology Products) に播き、37°C で一晩培養後、コロニー数を計測することでライブラリのサイズを求めた。また、残り的大腸菌溶液をプレート 1 枚あたり約 300 μ l となるように LAG 培地プレート 40 枚に播種した。翌日、プレート 1 枚あたり 2 ml の LAG 培地でセルスクレーパーを用いて大腸菌を回収し、終濃度 10% となるようにグリセロールを添加し、-80°C で保存した。

B.3 scFv ファージライブラリの多様性確認

エレクトロポレーションの際に播種したペトリフィルムからコロニーをランダムにピックアップし、LA 培地 3 ml で一晩培養した。その後、ミニプレップにより plasmid を精製した。精製した plasmid を鋳型として、