

gp64トランスジェニックマウスに hCL1-BV を免疫したマウスの脾臓から作製した cDNA を鋳型に、重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) の遺伝子を PCR 法により増幅した。VH、VL 遺伝子をリンカーで連結して得た scFv 遺伝子を Nco I/ Not I 処理し、ファージディスプレイ用ベクターである pY03' に組み込んだ。得られた産物をエレクトロポレーション法により大腸菌 TG-1 に導入したものを scFv 提示ファージライブラリとした。構築した scFv ライブラリのライブラリサイズは、 2.6×10^5 CFU だった。ライブラリの多様性を確認するため、ランダムに選出したクローンのシーケンス解析を行った (Table 2)。

C. 16 scFv ファージライブラリの構築 (gp64トランスジェニックマウス、hCL4-BV)

gp64トランスジェニックマウスに hCL4-BV を免疫したマウスの脾臓から作製した cDNA を鋳型に、重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) の遺伝子を PCR 法により増幅した。VH、VL 遺伝子をリンカーで連結して得た scFv 遺伝子を Nco I/ Not I 処理し、ファージディスプレイ用ベクターである pY03' に組み込んだ。得られた産物をエレクトロポレーション法により大腸菌 TG-1 に導入したものを scFv 提示ファージライブラリとした。構築した scFv ライブラリのライブラリサイズは、 3.0×10^5 CFU だった。

D. 考察

本研究の目的は、hCL1 へ結合性を示す scFv の取得である。そのため、CL を免疫したマウスを利用して scFv ライブラリの構築を試みるが、CL は疎水性の高い膜蛋白質であることから、抗原として利用する蛋白質の精製が困難なこと、膜蛋白質であり、ヒトとマウスにおいて相同性が高く抗原性が低いことから、CL に対する免疫誘導を行うことが困難であった。そこで、まず CL 抗原として、BV における膜蛋白質発現系を利用した CL 提示 BV を用い、抵抗原性に対しては、CL 欠損マウスを利用することにした。

BV における膜蛋白質発現系は、BV 膜表面上に外来膜蛋白質の発現が可能であること、BV 膜上に提示された膜蛋白質は本来の蛋白質構造を保って

いると予想されることから、CL 抗原を作製する方法として最適であると判断した。CL 欠損マウスは CL に対する免疫寛容が起こっていないため、CL 抵抗原性が回避できると考えられる。そこで、これらの方法を融合することで、scFv ライブラリ構築のための CL 免疫を試みた。今回、CL の低抗原性を回避する目的で用いる CL 遺伝子欠損マウスは、CL-1 遺伝子欠損マウスが生後すぐに死亡して利用できないため、CL-2 遺伝子欠損マウスを用いることにした。当研究グループの検討から、CL3-BV を免疫した CL3 遺伝子欠損マウスの脾臓回収時期を工夫することで、抗原として用いた CL-3 以外の CL メンバーに結合性を示す scFv が取得できることを確認している。従って、CL-2 を抗原に用いても CL-1 結合性 scFv の取得は可能であると考えられる。上記の知見をもとに、CL-2 欠損マウスに CL2-BV の免疫を行った結果、CL-2 に対する抗体産生の誘導に成功した。続いて、CL 抗体産生マウスの脾臓を利用し、scFv ライブラリの構築を行った。

免疫ライブラリは 10^5 - 10^6 CFU 程度のライブラリサイズを有し、非免疫ライブラリと比して多様性の面では劣るが、抗原への指向性の面では優れている。今回構築した hCL2 免疫 scFv ライブラリのライブラリサイズは 8.2×10^5 CFU であった。ランダムに選出した 5 つのクローンの内、2 つは FLAG 付き scFv を提示していたことから、このファージライブラリは 40% の割合で scFv 遺伝子をコードしていることが分かった。また、抗体遺伝子の配列の多様性は抗原との結合に重要な VH 鎖の CDR3 領域において見られることから、この領域に着目したところクローン間でのアミノ酸配列に多様性がみられた (Table 1)。そのため本ライブラリは hCL-1 binder 取得に際し有用なスクリーニングソースであると考え、hCL-1 binder スクリーニング実験に供した。

CL-1 binder の取得を目指し構築した scFv ライブラリに、CL 結合性 binder が含まれているかを確認するため、まず、免疫抗原として用いた hCL-2 への binder が存在するかを確認した。そのため、まず hCL2-BV を用いて hCL-2 binder を濃縮するためのパンニングを行ったところ、結合性ファージの濃縮は

あまり観察されなかったが、3rd パンニング後のファージをモノクローン化し、hCL2 への結合性を調べたところ、結合性を有するクローンが複数得られた。しかしながら、hCL2 に結合性を示したクローンは、WT-BV にも結合性を示していることが分かった。さらに、hCL1, 4, 5 に対する結合性を検討した結果、hCL2 特異的ではなく、各 CL にも結合していることが分かった。この結果から、BV 由来の膜蛋白質である gp64 に結合しているのではないかと予想された。そこで、WT-BV へ結合性を示すクローンを排除するため、サブトラクションパンニングを行い、gp64 に結合するクローンを排除することにした。その結果、パンニングを繰り返すことにより hCL-2 binder の濃縮が観察された。サブトラクションパンニングの結果、hCL-2 binder の濃縮が観察されたことから、hCL-1 binder のスクリーニングにおいても、サブトラクションパンニングを行った。その結果、パンニングの 3rd ラウンドにおいて CL-1 binder の濃縮が見られたが、やはり WT に結合するものがほとんどであった。

そこで、gp64 に対し免疫寛容が起こっている gp64 トランスジェニックマウスを利用することにより、gp64 に対する binder が除かれたライブラリの作製を試みた。gp64 トランスジェニックマウスに hCL1-BV を免疫することで抗 hCL1 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した。その結果、scFv 提示ファージライブラリのライブラリサイズは 2.6×10^5 CFU であったことから、十分なライブラリサイズであると考えられる。抗体遺伝子の配列の多様性は抗原との結合に重要な VH 鎖の CDR3 領域において見られることから、作製したライブラリの VH 鎖 CDR3 領域を調べたところ、クローン間でアミノ酸配列に多様性が認められた (Table 3)。従って、本ライブラリは hCL1 binder 取得に際し有用なスクリーニングソースであると考え、続く hCL1 binder スクリーニング実験に供した。

構築したライブラリから gp64 に結合する binder を排除するため、WT-BV を用いたサブトラクションパンニングを行った。続いて、hCL1 binder を取得するため、hCL1-BV によるパンニング操作を 3 round 行い、

hCL1 binder を濃縮した。3rd パンニング後のファージをモノクローン化し、CL への結合性を調べたところ、hCL1 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 WT 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 gp64 には結合性を示さず、hCL1 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 CL 結合特異性を調べた結果、hCL1 のみならず hCL2,4,5 にも結合性を示すクローン、結合性は弱いものの hCL1 特異的に結合性を示すクローンが存在した。CL への結合性が異なるクローンは、それぞれ独自の VL, VH 領域を保持していた。以上、hCL1 結合性ファージクローンの取得に成功した。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。

ライブラリは、これまで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。基本的なストラテジーは同様に、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。その結果、構築した scFv 提示ファージライブラリのライブラリサイズは 3.0×10^5 CFU であった。従って、構築したライブラリは十分なライブラリサイズであると考えられる。また、抗体遺伝子の配列の多様性は抗原との結合に重要な VH 鎖の CDR3 領域において見られることから、この領域に着目したところクローン間でのアミノ酸配列に多様性がみられた (Table 4)。従って、本ライブラリは hCL4 binder 取得に際し有用なスクリーニングソースであると考え、続く hCL4 binder スクリーニング実験に供した。

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 hCL-1 binder の創製を試み、以下の研究成果を得た。

(1) CL-1結合性scFv取得のための基盤材料の整備
scFvライブラリの作製やCL-1 binderのスクリーニングに用いるhCL 提示バキュロウイルス(hCL-1, 2, 4, 5-BV)を作製した。また、CL-1 binderのCL結合特異性を調べるために用いる4種のCL発現細胞(HT1080/hCL1, 2, 4, 5)を作製した。

(2) hCL2遺伝子欠損マウスを用いたファージディスプレイscFvライブラリの構築とCL binderのスクリーニング

hCL1の細胞外領域に特異的に結合するscFvを取得するため、膜表面にhCL2を提示したBVをCL-2

欠損マウスに免疫し、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。そこで、作製したライブラリからCL結合性ファージが存在するかをhCL-2 binderのスクリーニングにより検討した結果、各種CLへの結合性を示すファージクローンを確認できたものの、それらはWT-BVへも結合性を示すクローンであった。

(3) gp64トランスジェニックマウス(抗原:CL1-BV)を用いたファージディスプレイscFvライブラリの構築とCL binderのスクリーニング

バキュロウイルス膜蛋白質であるgp64に結合性を示すbinderを排除するため、gp64トランスジェニックマウスにhCL1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。作製したライブラリからWT-BVに結合するものを排除した後、hCL1-BVに結合するものをスクリーニングした結果、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。しかしながら、scFvに精製した際にCL-1に結合性を示すものは得られなかった。

(4) gp64トランスジェニックマウス(抗原:CL4-BV)を用いたファージディスプレイscFvライブラリの構築とCL binderのスクリーニング

gp64トラン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。続いて、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の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。

以上の成果を踏まえ、今後は最適な CL binder スクリーニング系の開発や当研究グループが保有する CL binder 開発技術を総動員することにより、HCV 感染阻害活性を有する CL-1 binder の取得を目指す。

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, Kondoh M, Watari A, Hasezaki T, Isoda K, Tsutsumi Y, Yagi K. Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice. *Pharmazie*, 66(4), 282-6, 2011.
2. Yoshikawa M., Mukai Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Okada N., Nakagawa S. : Modifying the antigen-immunization schedule improves the variety of monoclonal antibodies obtained from immune-phage antibody libraries against HIV-1 Nef and Vif., *J. Biosci. Bioeng.*, 111(5):597-599, 2011.
3. Abe Y., Yoshikawa T., Inoue M., Nomura T., Furuya T., Yamashita T., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive panning., *Biomaterials.*, 32(23):5498-504, 2011.
4. Narimatsu S., Yoshioka Y., Watanabe H., Masano T., Morishige T., Yao X., Tanabe A., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Lysine-deficient lymphotoxin- α mutant for site-specific PEGylation., *Cytokine.*, 56(2): 489-493, 2011.
5. Narimatsu S., Yoshioka Y., Morishige T., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Nishimura M., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Structure-activity relationship of T-cell receptors based on alanine scanning., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 415(4): 558-562, 2011.
6. Yamashita T., Okamura T., Nagano K., Imai S., Abe Y., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer., *Pharmazie*, 67: 253-255, 2011.
7. Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of a novel DDS for site-specific PEGylated proteins., *Chem. Gent. J.*, 5(25):1-6, 2011.
8. Takahashi A, Kondoh M, Suzuki H, Watari A, Yagi K. Pathological changes in tight junctions and potential applications into therapies. *Drug Discov Today*. 2012.
9. Watari A, Yagi K, Kondoh M. : A simple reporter assay for screening claudin-4 modulators., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 426(4):454-60, 2012.
10. Kitagaki M., Isoda K., Kamada H., Kobayashi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Niida T., Kujiraoka T., Ishigami N., Ishihara M., Matsubara O., Ohsuzu F., Kikuchi M. : Novel TNF- α receptor-1 antagonist treatment attenuates arterial inflammation and intimal hyperplasia in mice., *J. Atheroscler. Thromb.*, 19(1):36-46, 2012.
11. Yamashita T., Okamura T., Nagano K., Imai S., Abe Y., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer., *Pharmazie*, 67(3): 253-255, 2012.
12. Yamashita T., Nagano K., Kanasaki S., Maeda Y., Furuya T., Inoue M., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Annexin A4 is a possible biomarker for cisplatin susceptibility of malignant

- mesothelioma cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 421(1):140–4, 2012.
13. Morishige T., Yoshioka Y., Narimatsu S., Ikemizu S., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Mutants of lymphotoxin- α with augmented cytotoxic activity via TNFR1 for use in cancer therapy., *Cytokine.*, 61(2):578–84, 2013.
 14. Yoshikawa M., Mukai Y., Okada Y., Tsumori Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Aird WC., Yoshioka Y., Okada N., Doi T., Nakagawa S. : Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody–drug conjugates based on the rapid isolation of the anti–Robo4 cell–internalizing antibody., *Blood*, 121(14):2804–13, 2013.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. Nagano K., Kanasaki S., Yamashita T., Maeda Y., Inoue M., Higashisaka K., Yoshioka Y., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Expression of Eph receptor A10 is correlated with lymph node metastasis and stage progression in breast cancer patients., *Cancer Medicine*, 2: 972–977, 2013.
 19. Morishige T., Yoshioka Y., Narimatsu S., Ikemizu S., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Mutants of lymphotoxin- α with augmented cytotoxic activity via TNFR1 for use in cancer therapy., *Cytokine.*, 61(2):578–84, 2013.
 20. Takano M., Yamashita T., Nagano K., Otani M., Maekura K., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Tomiyama T., Mori H., Matsuura K., Matsuyama S. : Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer’s disease model mice by using two–dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis., *Neuroscience Letters.*, 534:85–9, 2013.
 21. Yoshikawa M., Mukai Y., Okada Y., Tsumori Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Aird WC., Yoshioka Y., Okada N., Doi T., Nakagawa S. : Robo4 is an effective tumor endothelial marker for antibody–drug conjugates based on the rapid isolation of the anti–Robo4 cell–internalizing antibody., *Blood.*, 121(14):2804–13, 2013
 22. Yamashita T., Kamada H., Kanasaki S., Maeda Y., Nagano K., Abe Y., Inoue M., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Katayama S., Inoue M., Tsunoda S. : Epidermal growth factor receptor localized to exosome membranes as a possible biomarker for lung cancer diagnosis., *Pharmazie.*, 68:969–973, 2013.
 23. Nagano T., Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Liver–specific microRNAs as biomarkers of nanomaterial–induced liver damage., *Nanotechnology.*, 24: 405102, 2013
 24. 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. 学会発表
1. 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
 2. Miki Kodaka, Azusa Takahashi, Toshiaki Yamaura, Yohei Kakamu, Koji Matsuhisa, Kyohei Matsushita, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A simple screening system for claudin binders using an scFv library derived from claudin–immunized mice. Experimental Biology 2011, Apr 4–13, Washington, DC, USA

3. 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.
4. 各務洋平、高橋梓、山浦利章、松久幸司、近藤昌夫、浜窪隆雄、八木清仁、Claudin 欠損マウスを利用した claudin binder 創製系の確立、第 27 回日本 DDS 学会、平成 23 年 6 月 9–10 日、東京
5. 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
6. 角田慎一：抗体プロテオミクス技術による創薬ターゲットタンパク質の効率的探索、生物化学的測定研究会第 16 回学術集会、大阪、2011 年 6 月。
7. 角田慎一：TNF 構造変異体の創製と機能解析、疾患治療への応用、回折構造生物第 169 委員会第 35 回研究会、東京、2011 年 6 月。
8. 角田慎一：機能性 TNF- α 変異体の創製と難治性疾患治療への応用、CPhI Japan 2011、大阪、2011 年 7 月。
9. 角田慎一、機能性 TNF- α 変異体の創製と難治性疾患治療への応用、第 7 回理研ものづくりシンポジウム、埼玉、2012 年 3 月。
10. 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, SanDiego, USA.
11. 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 19th International Symposium on Hepatitis C virus and Related viruses 2012*, Oct 5–9, Venice, ITALY.
12. 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.
13. 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.
14. Maeda Y., Nagano K., Yamashita T., Kanasaki S., Inoue M., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Functional evaluation of Eph receptor A10 as a therapeutic target for breast cancer, *HUPO 11th Annual World Congress (HUPO 2012)*, Boston (USA), 9–13 September, 2012.
15. Nagano K., Yamashita T., Kamada H., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Katayama S., Yoshioka Y., Abe Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Proteome analysis of lung cancer cell-derived exosomes for discovery of diagnostic biomarkers, *HUPO 11th Annual World Congress (HUPO 2012)*, Boston (USA), 9–13 September, 2012.
16. Kamada H., Inoue M., Abe Y., Nagano K., Hirose K., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Conformational and functional analysis for quality control of protein drugs using ion mobility mass spectrometry, *19th International Mass Spectrometry Conference*, Kyoto (Japan), 15–21 September, 2012.
17. 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.
18. 鈴木英彦、山根誠司、角谷英樹、高橋 梓、内田博司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁、Claudinを標的とした動態制御技術の現状と課題、第28回DDS学会学術集会、平成24年7月4日、札幌市、北海道
 19. 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回トキシンシンポジウム平成24年年8月30-31日、帯広市、北海道
 20. 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
 21. 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、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
 22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. 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
 26. 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 Maus 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
 27. 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 Maus 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
 28. 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
 29. 角田慎一: タンパク質工学による DDS を駆使した免疫応答制御法に関する研究., 日本 DDS 学会(受賞講演), 北海道(札幌), 2012年7月
 30. 前田祐香, 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: 新規乳がん分子標的治療薬の開発に向けた Eph receptor A10 に対するモノクローナル抗体の作製., 第28回日本 DDS 学会学術集会., 札幌(北海道), 2012年7月.
 31. 鎌田春彦, 山下琢矢, 長野一也, 前田祐香, 阿部康弘, 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤康央, 角田慎一: がん細胞分泌エクソソームのプロテオーム解析によるバイオマーカー候補蛋白質の探索., 日本プロテオーム機構 第10回大会, 東京(東京), 2012年7月.
 32. 瀧慎太郎, 鎌田春彦, 前田祐香, 長野一也, 向洋平, 堤康央, 角田慎一: 乳がん関連膜たんぱく質 EphA10 を標的とする新規 Bispecific 抗体の創製., 日本薬学会第133年会., 横浜(神奈川), 2013年3月.
 33. 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.

34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Mukai Y., Yoshikawa M., Okada Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Aird W.C., Yoshioka Y., Okada N., Doi T., Nakagawa S.: Tumor vascular targeting using anti-Robo4 cell-internalizing monoclonal antibody that is isolated via phage display-based screening system., *World Biotechnology Congress* 2013, Boston, 2013.
44. Nagano K., Maeda Y., Kanasaki S., Yamashita T., Inoue M., Higashisaka K., Yoshioka Y., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Evaluation of a novel breast cancer-related protein, Eph receptor A10 for targeting therapy., *40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society*, Honolulu, 2013.
45. Kamada H., Yamashita T., Inoue M., Nagano K., Katayama S., Mukai Y., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Proteomic analysis of tumor-derived exosomes derived from cultured human lung cancer cell as tumor biomarkers., *HUPO 12th Annual World Congress*, Yokohama, 2013.
46. Mukai Y., Yoshikawa M., Okada Y., Tsumori Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Aird W.C., Yoshioka Y., Okada N., Doi T., Nakagawa S.: Phage display-based high throughput screening to identify cell-internalizing monoclonal antibodies for antibody-drug conjugates., *12th HUPO World Congress*, Yokohama, 2013.
47. Nagano K., Yamashita T., Maeda Y., Higashisaka K., Yoshioka Y., Inoue M., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Search for biomarker proteins related to

cisplatin-susceptibility in malignant mesothelioma., HUPO 12th Annual World Congress, Yokohama, 2013.

48. Nagano K., Maeda Y., Yamashita T., Inoue M., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Anti-EphA10 monoclonal antibody is a potential therapy against EphA10 positive breast cancer., AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston, 2013.
49. Kamada H., Yamashita T., Inoue M., Nagano K., Katayama S., Mukai Y., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Proteome profiling and detecting method of lung cancer cell-derived exosomes as tumor biomarkers, AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston, 2013.
50. Taki S., Kamada H., Maeda Y., Nagano K, Mukai Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Development of EphA10/CD3 bispecific tandem scFv as a drug candidate against breast cancer., AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston, 2013.
51. 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
52. 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
53. 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

54. 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)
- ・ 吉田孟(大学院生)
- ・ 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)

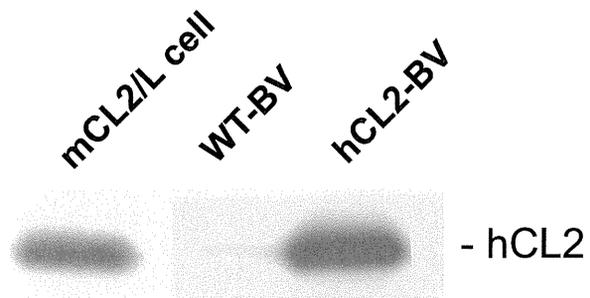


Figure 1 Preparation of hCL2-BV.

WT-BV and hCL2-BV (0.1 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of mCL2/L cell was used as a positive control.

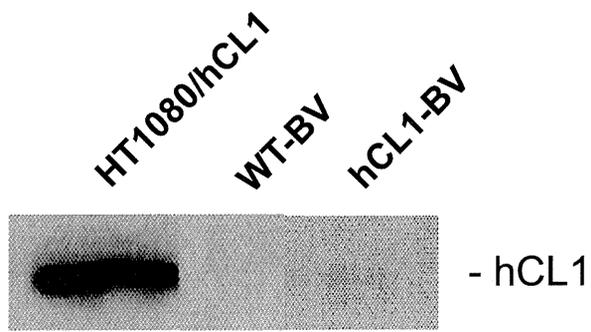


Figure 2 Preparation of hCL1-expressing BVs.

WT-BV and hCL1-BV were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of HT1080/hCL1 cells was used as a positive control.

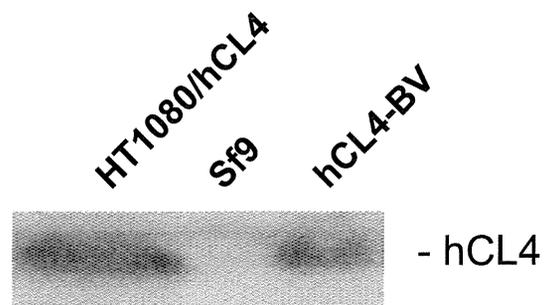


Figure 3 Preparation of hCL4-expressing BV.

Lysate of hCL4-expressing HT1080 (HT1080/hCL4), Sf9 and hCL4-BV were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysates of HT1080/hCL4 and Sf9 cells were used as a positive and negative control.

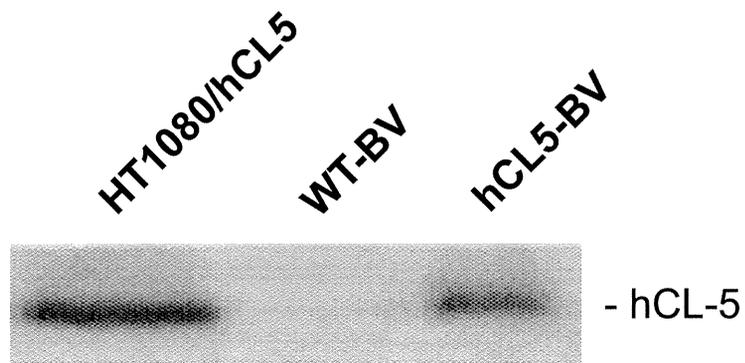


Figure 4 Preparation of hCL5-expressing BV.

WT-BV and hCL5-BV were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of HT1080/hCL5 cells was used as a positive control.

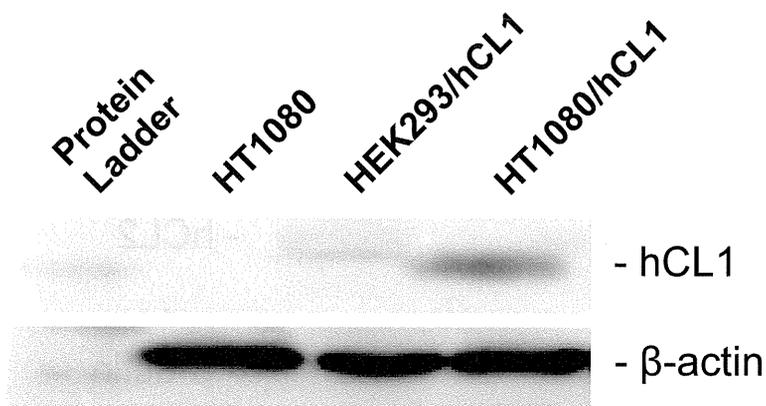


Figure 5 hCL1 expression in HT1080/hCL1 cells.

Lysates of HT1080, hCL1-expressing HEK293 (HEK293/hCL1) and hCL1-expressing HT1080 cells (HT1080/hCL1) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysates of HT1080 and HEK293/hCL1 were used as a negative and positive control.

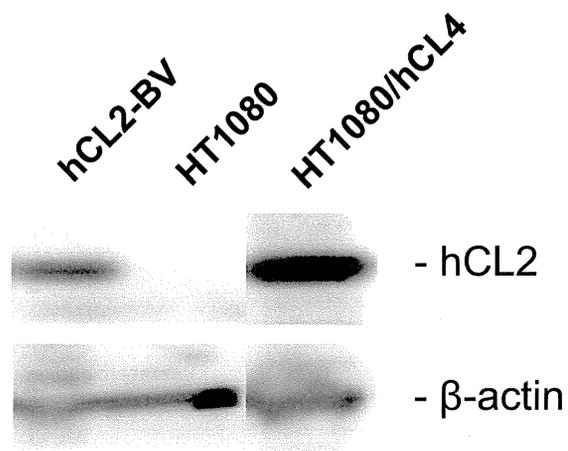


Figure 6 hCL2 expression in HT1080/hCL2 cells.

Lysates of hCL2-expressing Budded Baculovirus (hCL2-BV), HT1080 and hCL2-expressing HT1080 cells (HT1080/hCL2) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of HT1080 and hCL2-BV were used as a negative and positive control.

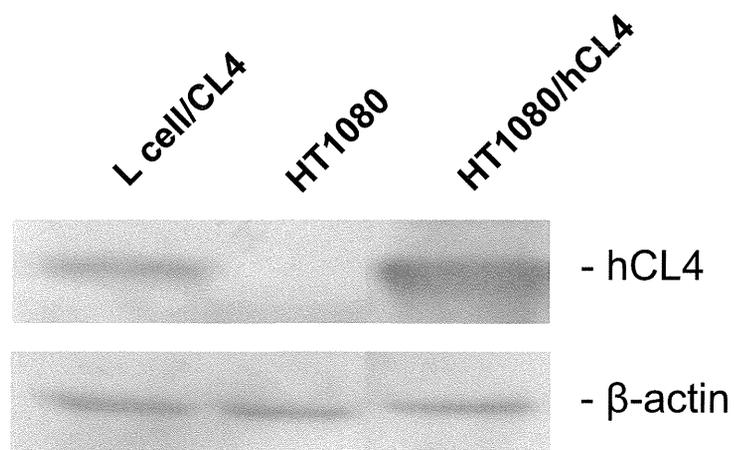


Figure 7 hCL4 expression in HT1080/hCL4 cells.

Lysates of CL4-expressing L cell (L cell/CL4), HT1080 and hCL4-expressing HT1080 cells (HT1080/hCL4) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysates of HT1080 and L cell/CL4 were used as a negative and positive control.

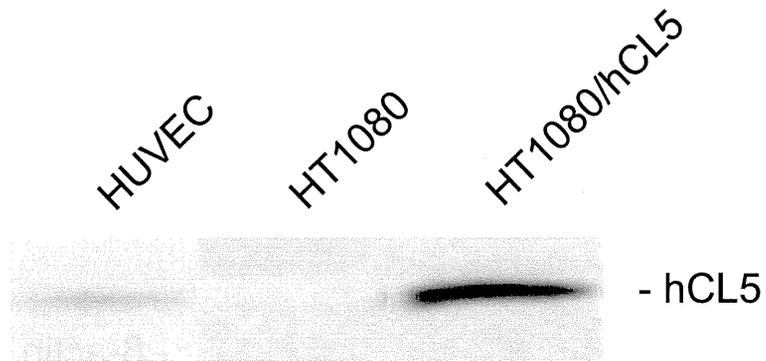
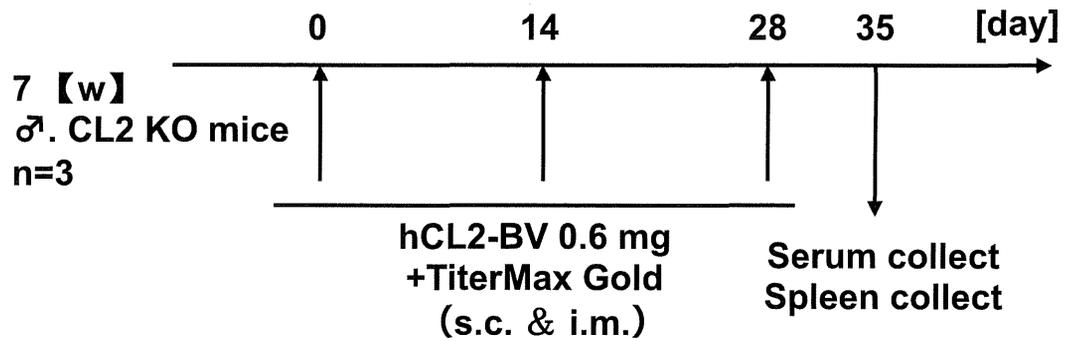


Figure 8 hCL5 expression in HT1080/hCL5 cells.

Lysates of HT1080 and HT1080/hCL5 (10 μ g/lane) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of HUVEC cells was used as a positive control.

A

<免疫スケジュール>



B

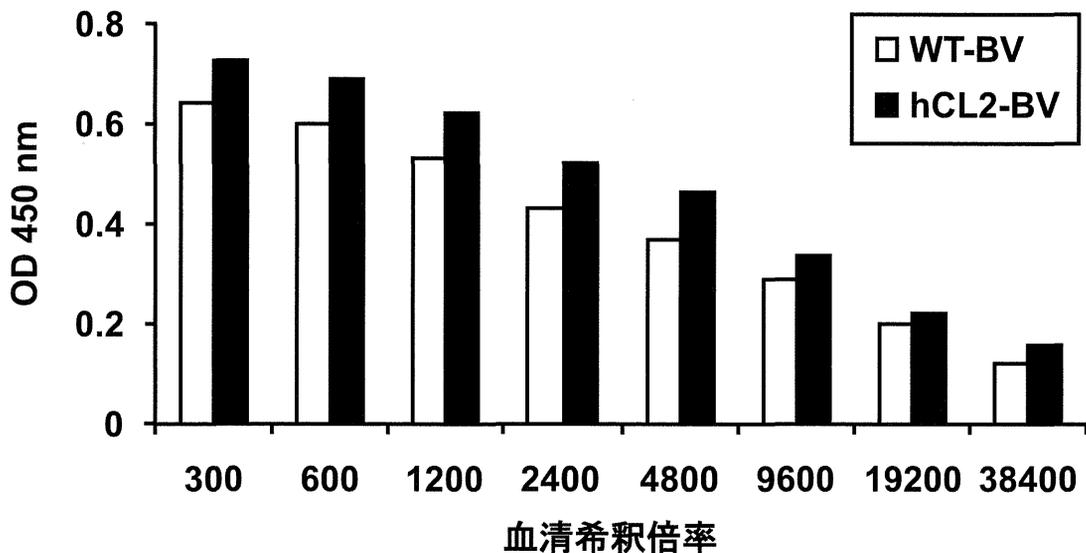


Figure 9 Immunization of hCL2-BV.

(A) The schedule of immunization and sample collection. Mice were immunized subcutaneously and intramuscularly with 0.6 mg of hCL2-BV in PBS and TiterMax Gold once two weeks for a 4 week period. Seven days after immunization, serum and spleen were collected. (B) Detection of specific anti-CL2 antibodies. Immunoplate was coated with 0.5 μ g WT-BV or hCL2-BV and diluted serum were added to the immunoplate. Antibodies in serum bound to the BV-coated plate were detected by ELISA with anti-mouse IgG antibody.

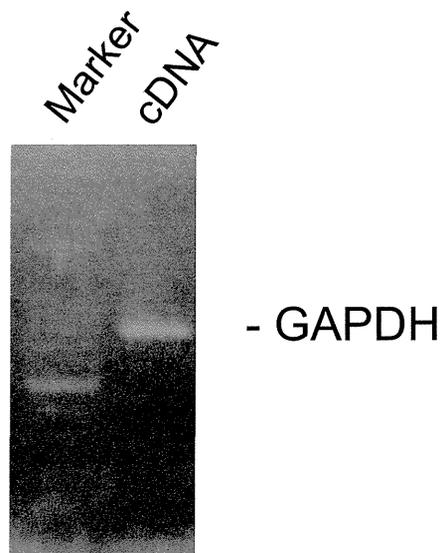
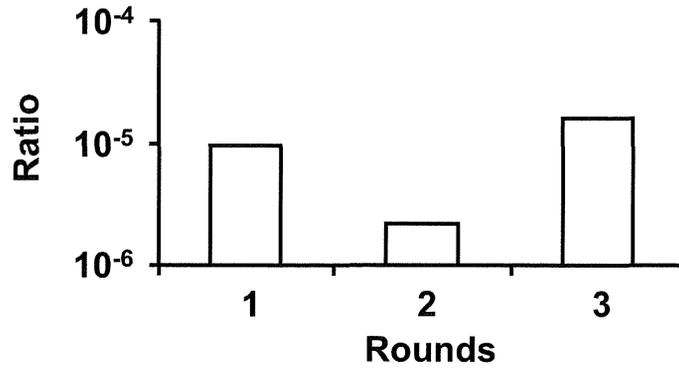
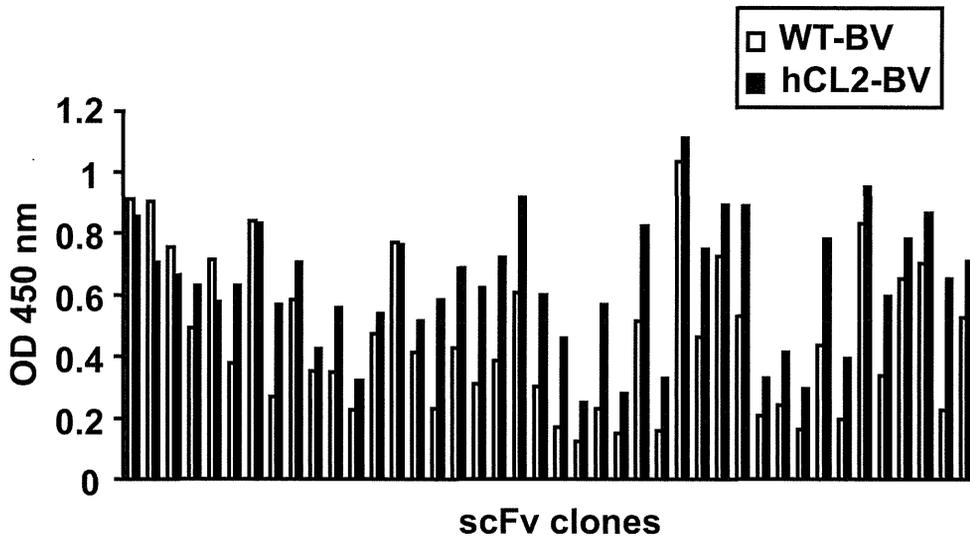


Figure 10 Preparation of cDNA for construction of scFv phage display library.

cDNA was made from mRNA purified from spleen in mice immunized with hCL2-BV. By using the cDNA, GAPDH expression was analysed by RT-PCR. The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis, followed by staining with ethidium bromide.

A**B****Figure 11 Screening of a hCL2 binder.**

A) Enrichment of phages with affinity to hCL2-BV. Immunoplate coated with hCL2-BV were incubated with the scFv phage library at 2.1×10^8 CFU titer (1st input phage). The phages bound to hCL2-BV were recovered (1st output phage). The hCL2 -BV-binding phages were subjected to two additional cycles of the incubation and wash step, resulting in 2nd, 3rd output phage. The ratio of output phage to input phage titers was calculated.

B) Monoclonal analysis of scFv phage. Phage clones after 3rd round panning with hCL2 -BV were adopted to the WT- or hCL2-BV-coated immunoplates. Phage clones bound to the CL-BV-coated immunoplates were detected by ELISA with an anti-M13 mAb.