

201109008A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

Claudinを標的とした創薬基盤技術の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成24（2012）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

Claudinを標的とした創薬基盤技術の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昌夫

平成24（2012）年 4月

目 次

I. 総括・分担研究報告	
Claudinを標的とした創薬基盤技術の開発	1
近藤昌夫・八木清仁	
II. 分担研究報告	
1. Claudin-1およびClaudin-4のヒトがんにおける発現	39
國安弘基	
2. C型肝炎ウイルス感染阻害評価系確立のための予備検討	44
深澤征義	
3. Claudin標的型粘膜ワクチンの開発に向けた呼吸器粘膜組織における抗原取り込み上皮細胞の同定と解析	48
國澤純	
4. DNAメチル化による血管内皮細胞特異的遺伝子発現制御	53
岡田欣晃	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷	64

Claudin を標的とした創薬基盤技術の開発

研究代表者 近藤 昌夫 大阪大学大学院 薬学研究科 准教授

研究分担者 八木 清仁 大阪大学大学院 薬学研究科 教授

研究要旨

昨今の上皮細胞生物学の進展により、タイトジャンクションシール機能を担う分子として、4回膜貫通蛋白質claudin (CL) が同定された。現在までにCLには27種類の分子が見出されており、CLを標的とした、非侵襲性投与方法、上皮がんターゲティング法、粘膜ワクチン、C型肝炎ウイルス(HCV)感染阻害法、薬物の血液脳関門透過法開発の可能性が示唆されている。しかしながら、CLは抗原性が低い上に立体構造が解析されておらず、CL binderの創製は著しく立ち遅れており、CLを標的とした創薬研究は遅々として進展していない。

現在までに申請者は、知的クラスター創成事業および文科省科研費の支援を受けて、CLを標的とした創薬研究を推進し、CL4 binderを用いたバイオ医薬の経粘膜吸収促進技術、癌ターゲティング法、粘膜ワクチン技術を世界に先駆けて確立してきた(PCT/JP2008/61723、特願2010-25259他)。さらに、CLを標的とした創薬基盤として、出芽バキュロウイルス(BV)を利用したCL蛋白質発現系を確立し、CL発現BVをCL欠損マウス等に免疫して作製した一本鎖抗体(scFv)ライブラリを用いた新規CL binderスクリーニング系を構築した。

上述した背景を踏まえ、本研究では、創薬上の重要度が高いCL1、4、5に焦点を絞り、癌ターゲティングおよびHCV感染阻害に資するCL1 binder、粘膜免疫組織・各種癌ターゲティングに資するCL-4 binder、血液脳関門制御に資するCL5 binderを開発することを目的とする。

本年度は、自己免疫疾患マウスなどを用いて scFv ライブラリの作製、抗体作製などに着手した。

A. 研究目的

上皮細胞は、生体内外・組織内外を隔てるバリアとして機能していること、悪性腫瘍の90%は上皮由来であること、上皮細胞層は多くの病原性微生物の侵入門戸となっていることから、創薬ターゲットとして高い可能性を秘めている。しかしながら、上皮細胞生物学の遅延から上皮細胞を標的とした創薬研究は立ち遅れている。

98年に上皮細胞のタイトジャンクションシール機能を担う分子として、4回膜貫通蛋白質 claudin (CL) が同定された。現在までに、CLには27種類のメンバーが見出されており、①皮膚バリアは角層バリアと重層上皮細胞バリアから構成されてお

り、CL1が重層上皮細胞バリアを担うこと、②CL5欠損マウスでは血液脳関門特異的に低分子(分子量1000未満)の透過性が上昇すること、③CL4が粘膜バリアを担っていること、④CLがヒトでは12種類余りの癌で高発現していること、⑤CL1がC型肝炎ウイルスの感染受容体であること、⑥CL4が粘膜免疫組織で高発現していることなどが見出されている(Trends Cell Biol, 16, 181, 2006; Drug Discov Today, 13, 180, 2008)。これらの報告は、CLが優れた創薬ターゲットになりうることを強く示唆している。

さて、CLを標的とした創薬ではCLに対するリガンド分子の創製が必須であるものの、CLは抗原

性が低い上に蛋白質精製も難しく、抗体を含めて CL binderの創製は著しく立ち遅れており、CLを標的とした創薬研究は遅々として進展していない。

本申請課題では、CL提示バキュロウイルスを利用したCL binder探索系などのCLを標的とした創薬研究基盤を有効活用することで、癌ターゲットインク法、粘膜ワクチン技術、C型肝炎ウイルス感染阻害法、血液脳関門制御法開発に資するCL1、CL4、CL5 binderを創出することを目的とする。

平成 23 年度は、当該プロジェクトの一里塚として、自己免疫疾患マウスなどを用いた scFv ライブラリの作製、抗体作製に着手した。

B. 研究方法

B. 1 hCL1 発現 BV の作製

B. 1. 1. pFastBac-hCL1 の作製

Human claudin-1 (hCL1) cDNA フラグメントは pEAK-hclaudin-1 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pEAK-hclaudin-1 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。CL1 クローニング用のプライマーは、forward primer (5' -gctctagaatggattacaaggat gacgacgataagatggccaacgcggggctgcagctg-3')、reverse primer (5' -cggggtacctcacacgtagtctttcccg ctggaaggtgcagg-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 XbaI と KpnI により切断した。トランスファーベクター pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある XbaI、KpnI サイトを制限酵素 XbaI、KpnI 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をコンピテントセル DH-5 α に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-hCL1 を得た。作製した pFastBac-hCL1 およびマウス CL1 遺伝子を組み込んだ pFastBac-mCL1 をもとに、CL1 蛋白質細胞外

領域の 1st loop がマウス、2nd loop がヒトのキメラ CL1 遺伝子を組み込んだ pFastBac-mhCL1、1st loop がヒト、2nd loop がマウスのキメラ CL1 遺伝子を組み込んだ pFastBac-hmCL1 を作製した。

B. 1. 2. hCL1 発現用 Bacmid ベクターの作製

作製した pFastBac-hCL1 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 TGK 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 bacmid DNA 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 TGK plate で培養した。白色独立大腸菌クローンを培養し、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、hCL1-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。pFastBac-mhCL1、pFastBac-hmCL1 からも同様に組み換え bacmid ベクターを作製した。

B. 1. 3. hCL1 発現 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 (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、 2×10^6 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 2×10^6 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 Na_2HPO_4 , 1.15 mM KH_2PO_4) 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。

4×10^6 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. 1. 4. hCL1 発現 BV における hCL1 の発現確認

蛋白質量として 10 μ g を供し 15 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、T-TBS により 1/2000 に希釈した一次抗体 (rabbit anti claudin-1 (ZYMED)) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回洗浄し、T-TBS により 1/3000 に希釈した二次抗体 (goat anti-rabbit IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland)) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) により CL1 蛋白質の検出を行った。

B. 2. hCL1 発現細胞の作製

B. 2. 1. pcDNA3.1 (-) -hCL1 の作製

hCL1 cDNA フラグメントは pFastBac-hCL1 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pFastBac-hCL1 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 \times PCR buffer for KOD plus 2 μ l、2.5 mM MgSO_4 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。hCaludin-1 クローニング用のプラ

イマーは、forward primer (5' -ctagctagcatggccaacgoggggctgca-3')、reverse primer (5' -aaacttaagtcacacgtagctctttcccgctgg-3') を用いた。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。トランスファーベクター 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 (-) -hCL1 を得た。

B. 2. 2. hCL1 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 (-) -hCL1 2 μ g を 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 (nacalaitesque) 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. 2. 3. hCL1 発現細胞における hCL1 発現確認

細胞を 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。

蛋白質量として 20 μ g を供し 15 %

polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、T-TBS により 1/2000 に希釈した一次抗体 (rabbit anti claudin-1 (invitrogen)) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回洗浄し、T-TBS により 1/5000 に希釈した二次抗体 (goat anti-rabbit IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland)) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) により CL1 蛋白質の検出を行った。

B. 3. CL1 scFv ファージライブラリの作製

B. 3. 1. CL1 発現 BVs の BXSb マウスへの免疫

6 週齢雌性 BXSb マウスに mhCL1-BV と hmCL1-BV の mixture 約 1 mg をアジュバンドの TiterMax gold と共に筋中および背部皮下に投与した。1 週間ごとに mhCL1-BV と hmCL1-BV の mixture を計 4 回投与し、投与後 hCL1-BV を用いた ELISA 法により抗 hCL1 抗体の産生を確認した。抗体産生を確認した後、最終免疫として mhCL1-BV と hmCL1-BV の mixture を尾静脈に投与し、3 日後に脾臓を摘出し、mRNA を抽出した。

B. 3. 2. ELISA 法による血清中抗 hCL1 抗体産生確認

96 well ELISA plate に 0.5 μ g/50 μ l TBS/well の WT および hCL1-BV を 4 °C で一晩静置するこ

とで固相化した。翌日、ELISA plate を PBS で 3 回洗淨し、4% Block Ace で常温 2 時間ブロッキングした。PBS で 3 回洗淨し、解凍した血清を 300, 600, 1200, 2400, 4800, 9600, 19200, 38400 倍まで 0.4% Block Ace で段階希釈し、常温 2 時間培養した。その後、T-PBS で三回洗淨し、40,000 倍希釈した HRP/anti-mouse IgG monoclonal antibody (Sigma) を 100 μ l 添加し常温 1 時間培養した。T-PBS で五回洗淨した後、TMB 試薬 100 μ l を添加し、約 2 分間反応後、2M H₂SO₄ 100 μ l を加えて反応を停止した。その後、450 nm で吸光度を測定した。

B. 3. 3. hCL1 免疫ファージ抗体ライブラリの作製

最終免疫を行った 3 日後のマウスをエーテル麻酔し、脾臓を摘出し、TRIzol reagent (Invitrogen) に溶解させ total RNA を得た。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。VH, VL 鎖領域の DNA 断片を得るため、cDNA 4 μ l (VL 領域)、8 μ l (VH 領域) を鋳型として forward, reverse primer set (医薬基盤研究所角田慎一先生、長野一也先生より供与) 各 2 μ l、PCR buffer 5 μ l、dNTP 5 μ l、MgSO₄ 2 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 1 分間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 35 サイクルの PCR 反応に供した。この PCR 産物を PCR purification kit で精製し、次の assembly PCR に供した。VH 鎖 DNA 断片を 25 ng、VL 鎖 DNA 断片を 25 ng、Not I サイトを有する Y15 primer (5'-ggccagctttggagcctttttttggagattttcaacgtgaaaaattattttatcgcaattccttt agttgttcctttotatgcggcccagccggccatggcc-3')、Nco I サイトを有する Y16 primer (5'-ttagtaaataatgattttc t g t a t g a g g t t t t g c t a a a c a a c t t t c a a c a g t c t a t g c g g c a c g c g t t c c a c g g a t c c g g a t a c g g c a c c g g c g c a c c t g c g g c c g c - 3')、PCR buffer 5 μ l、dNTP 5 μ l、MgSO₄ 2 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。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 それぞれで 37°C、4 時間処理し、切り出し精製を行った。同様に Nco I、Not I それぞれで 4 時間処理し、切り出し精製した pY03' を 1 μ g、scFv 遺伝子を 0.08 μ g 用いて T4 ligase (Promega, Corp., USA) 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、さらにエタノール沈殿により濃縮した。ライゲーション産物を大腸菌 TG1 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 ampicilin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) と終濃度 2% D-glucose (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地プレート(LAG plate)に播種した。一晩培養後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%グリセロール (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) と混合し、-80°Cで保存し、hCL1 免疫ファージ抗体ライブラリとした。

B. 3. 4. 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 培地 2 ml に植え継ぎ、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 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。この洗淨作業を 3 回繰り返した後、TG1 を終濃度 10%グリセロールを含む SP 水 (Fuso, Co., Ltd, Osaka) で懸濁した。TG1 溶液 40 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, Inc., C.A., USA) を用いて電気パルスを与えた (Ec1)。その後、2YTG 培地 450 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 ampicilin sodium を添加した 2YTG (2YTGA) 培地で 10³-10⁶ 倍希釈し、

ペトリフィルムに播き、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約 500 μ l /プレートとなるようにLAG 培地プレート 34 枚に播種した。翌日 2 ml LAG 培地/プレートでセルスクレーパーを用いて大腸菌を回収し、終濃度 10%グリセロールを添加し-80°Cで保存した。

B. 4. hCL1 binder のスクリーニング

B. 4. 1. パンニング

4% Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL)を 4 °C で一晩静置することで固相化したエッペンに anti-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA) 100 μ lを添加した。さらに NTE buffer 500 μ l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 3 回繰り返した後、ファージ溶液 50 μ lおよび 2% BSA 50 μ l混合液を添加し、常温で 1 時間転倒混合した。0.1% T-PBS 500 μ l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 5 回繰り返した後、1 mg/ml 3 \times FLAG peptide (SIGMA) 100 μ lを添加し、常温で 40 分間転倒混合した。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た。

hCL1-BV を 0.5 μ g/100 μ l in TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl)でイムノチューブに添加し、4°Cで一晩静置することで固相化した。翌日、PBS でイムノチューブを 3 回洗浄した後、4% Block Ace 200 μ l 添加し、常温で 2 時間ブロッキングした。また、ファージライブラリ 100 μ l と 4% Block Ace 20 μ l を混合し、4°Cで 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後のイムノチューブを PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージライブラリ液を 100 μ l 添加し、常温で 3 時間振盪した。その後、PBST で 5 回洗浄し、20 mM glycine-HCl (pH2.0) を 100 μ l 添加、4°C、10 分間作用させることで hCL1-BV に結合しているファージを解離させた。1 M Tris-HCl (pH8.0) 50 μ l を加えて HCl を中和し、ファージ溶液を回収した。その後、20 μ l glycine-NaOH (pH 11.0) を 100 μ l 添加し、4°C、10 分間作用させることで hCL1 に結合しているファージを解離させた。ファー

ジ溶液 200 μ l を大腸菌 TG1 (OD_{600} = 0.4-0.6 に調整) 200 μ l と混合し、37°C 1 時間静置することでファージを感染させた。その後、LAG 培地プレートに播種し一晩培養した。翌日 LAG 培地プレートから TG1 を、セルスクレーパーを用いて 2YTGA 培地で回収し、終濃度 10%のグリセロールと混合した後、-80°Cに保存した。さらに、冷凍保存したTG1 からファージを作製し、上記の作業を繰り返すことで 2nd、3rd パンニングを行なった。

B. 4. 2. 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) 10 μ l 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^{-7} - 10^{-11} 倍に希釈した。希釈ファージ 100 μ l を TG1 (OD_{600} = 0.3-0.6 に調整) 300 μ l とそれぞれ混合後、37°C 1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600 μ l をさらに添加し、ペトリフィルムに播種し一晩 37°Cで培養した。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. 4. 3. scFv モノクローン化ファージの作製

パンニング後のファージを感染させた TG1 のグリセロールストックを希釈し、LAG 培地プレートに播種、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ピックアップし、96 well plate (IWAKIGLASS, Co., Ltd, Japan) 2YTGA 培地 100 μ l で、37°C 4-6 時間培養した。その際、同時に atac 提示ファージ感染 TG1 と C-CPE m19 提示ファージ感染 TG1 のグリセロールストックも同様に 96 well plate で培養した。翌日、ディープウェル (Greiner Bio-One GmbH, Germany) 2YTGA 500 μ l に前培養大腸菌 10 μ l ずつ植え継ぎ、 OD_{600} = 0.3-0.6 まで 100 rpm 37 °C で培養後、M13K07 helper phage (Invitrogen)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、2YTAK 培地 1 ml/well を添加して 50 rpm 37°Cで一晩培養した。翌日 2000 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. 4. 4. モノクローン化ファージを用いた BV ELISA

96 well ELISA plate に 1.0 µg/50 µl TBS/well で、WT-BV および hCL1-BV、Anti-FLAG mAb (SIGMA)を 4°Cで一晩静置することで固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、4 % Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で常温 2 時間ブロッキングした。また、上記方法で作製したファージを、終濃度 1.6 % Block Ace で 4°C 1 時間ブロッキングした。BV をブロッキング後、PBS で 3 回洗浄し、同じくブロッキングしたファージを 100 µl/well で添加し、常温で 2 時間振盪させた。その後、PBST で 3 回洗浄し、anti M13-HRP mAb (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA)を 3000 倍希釈した溶液を 100 µl 添加して常温で 1 時間作用させた。PBST で 3 回洗浄した後、TMB 試薬 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 50 µl を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100 µl を加えて反応を停止した。その後マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。

B. 5. hCL4 発現 BV の作製

B. 5. 1. pFastBac-hCL4 の作製

hCL4cDNA フラグメントは pOBT-Claudin4 (神戸大学大学院医学研究科 古瀬幹夫博士より供与)をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pOBT-Claudin4 溶液 (0.1 mg/ml) 1 µl、10 x PCR buffer for KOD plus 5 µl、2.5 mM MgSO₄ 2 µl、2.5 mM dNTP mix 5 µl、10 µM primers 3 µl、滅菌精製水 30 µl、5 U/µl Takara kod plus 1 µl を混合し PCR を行った。CL4 クローニング用のプライマーは、forward primer (5' -gcatatgcttaaggatcct-3')、reverse primer (5' -agctaggatcccttaagcatatgcatg-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 Not I と Xho I により切断した。トランスファーベクター pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある Not I と Xho I サイトを制限酵素 Not I と Xho I 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をコンピテントセル DH5α に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 pFastBac1-hCL4 を得た。

B. 5. 2. hCL4 発現用 Bacmid ベクターの作製

作製したトランスファーベクターにより大腸菌 DH10Bac (Invitrogen) をトランスフォーメーションさせ、50 µg/ml kanamycin, 7 µg/ml gentamicin, 10 µg/ml tetracycline を含み、2% X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside) 100 µl および 50 mM IPTG 100 µl を塗布した LB 培地プレート (IPTG, X-gal 含有 TGK 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 bacmid DNA 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 µl、10 x LA PCR buffer 2 µl、25 mM MgCl₂ 2 µl、2.5 mM dNTP mix 3.2 µl、10 µM primers 1 µl、滅菌精製水 9.6 µl、5 U/µl Takara LA taq 0.2 µl 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 DH5α をトランスフォーメーションさせ、IPTG, X-gal 含有 TGK plate で培養した。白色独立大腸菌クローンを培養し、bacmid DNA を精製した。なお、Wild type-BV (WT-BV) bacmid DNA は青色独立大腸菌クローンから精製し、組換えが起きていないことを PCR により確認した。

B. 5. 3. hCL4 発現 BV の作製

培養用 6 穴プレートに 1×10^6 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 (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 液を泡立てないようにゆっくりピペティングして混和させた後、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 を添加し、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、hCL5 発現 BV を含む培養上清を 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、 2×10^6 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、hCL5 発現 BV を含む培養上清を 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 2×10^6 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 Na_2HPO_4 , 1.15 mM KH_2PO_4) 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 法にて目的とするタンパク質の発現を確認した。

4×10^6 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) を用いてタンパク質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

B. 5. 4. hCL4 発現 BV における hCL4 の発現確認

タンパク質量として 10 μ g を供し 15 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間タンパク質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、T-TBS により 2000 倍に希釈した一次抗体 (mouse anti claudin-4 (invitrogen)) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回洗浄し、T-TBS により 2000 倍に希釈した二次抗体 (goat anti-mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland)) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) により hCL4 蛋白質の検出を行った。

B. 6. hCL4 発現細胞の作製

B. 6. 1. pcDNA3.1 (-) -hCL4 の作製

hCL4 cDNA フラグメントは pFastBac1-hCL4 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。

pFastBac1-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。hCL4 クローニング用のプライマーは、forward primer 5'-gctagcatcatggcoctccatgggctaca-3)、reverse primer (5'-cccaagcttttacagtagttgctggcag-3') を用いた。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 EcoRI と Kpn I により切断した。トランスファーベクター pcDNA3.1 (-) のマルチクローニングサイト上にある EcoR I、Kpn I サイトを制限酵素 EcoRI、Kpn I 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をコンピテントセル DH5 α に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、sense primer として T7 promoter primer (5'-caggaaacagctatgac-3')、anti-sense primer として T7 terminator primer (5'-gtaaatgaatttctgtatgagg-3') を用い、シークエンス解析を (株) ジーンデザインに依頼した。シークエンスマッチングしたクローンを pcDNA3.1 (-) -hCL4 として得た。

B. 6. 2. hCL4 発現 HT1080 細胞の作製

培養用 6 well プレートに 8×10^5 cells/well でヒト線維芽細胞株 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 2 μ g を Opti-MEM1 (GIBCO) 100 μ l と FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche) 4 μ l と混合し、15 分間常温静置した。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 (nacal 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 well プレートに播種した。

B. 6. 3. hCL4 発現細胞における hCL4 発現確認

細胞を 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、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用いてタンパク質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

続いてタンパク質量として 10 μ g を供し 15 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、T-TBS により 2000 倍に希釈した一次抗体 (mouse anti claudin-4 (invitrogen)) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回洗浄し、T-TBS により 2000 倍に希釈した二次抗体 (goat anti-mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland)) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、LAS を用いて hCL4 タンパク質の検出を行った。

B. 6. 4. hCL4 発現細胞における hCL4 発現局在の確認

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 にて 400 倍に希釈した一次抗体 anti-human claudin-4 Antibody (R&D Systems) 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 1500 倍希釈した

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となつように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B. 7. hCL4 ハイブリドーマの作製

B. 7. 1. hCL4-BV の BXSB マウスへの免疫

6 週齢雄性 BXSB マウスに hCL4 発現 BV 1.0 mg をアジュバンド (TiterMax Gold) と共に腹腔および背部皮下 に投与した。その後、1 週間ごとに hCL4 発現 BV 1.0 mg を 2 回腹腔内または皮下に投与し、FACS により抗 hCL4 抗体の産生を確認後、最終免疫として hCL4 発現 BV 1.0 mg をアジュバンド (TiterMax Gold) と共に腹腔に投与し、3 日後に脾臓を摘出した。

B. 7. 2. hCL4 BV 免疫マウスの抗体価の確認

hCL4 発現 HT1080 細胞を $5.0 \times 10^5/\text{sample}$ となるように 96 well plate に播種し、1% BSA-PBS にて 1000 倍希釈した血清を添加、攪拌し氷上で遮光し 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 1 回洗浄後、1% BSA-PBS にて 500 倍希釈した Goat anti-mouse IgG (H+L)-FITC 抗体 (ROCKLAND) を添加、攪拌し氷上で遮光し 30 分間静置した。0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となつように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B. 7. 3. hCL4 免疫ハイブリドーマの作製

血清中に抗 hCL4 抗体の産生を確認したマウスを最終免疫の 3 日後に脱血死させ脾臓を無菌的に摘出し、FBS 非含有 RPMI 1640 培地中で細胞をほぐし、0.45 μm メッシュで脂肪などを取り除いた。リンパ球を 1500 rpm、5 分間、20 $^{\circ}\text{C}$ で遠心後、Tris-HCl (pH8.0) : NH_4Cl = 1 : 9 で混合した溶液を加え、室温で 5 分間放置することで赤血球を溶血させた。リンパ球およびミエローマ細胞 (P3X63-Ag8.653) を FBS 非含有 RPMI 1640 培地

中で 3 回 1500 rpm、5 分間、20 $^{\circ}\text{C}$ で洗浄後、リンパ球:ミエローマ=5:1 の割合となるように混合し、1500 rpm で 5 分間 20 $^{\circ}\text{C}$ で遠心後、PEG 1500 (Roche) 5 mL を 37 $^{\circ}\text{C}$ の湯浴上でゆっくりと攪拌するように加えた。続いて同様に FBS 非含有 RPMI 1640 培地 10mL を加え、 1.0×10^5 cells/mL となるように希釈し、96 well plate にミエローマ細胞が 2×10^4 cells / well となるように播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下で培養した。

B. 8. hCL4 ハイブリドーマのスクリーニング

B. 8. 1. BV ELISA

96 well ELISA plate に 0.5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ PBS/well で、WT-BV および hCL4-BV を 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置することで固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、1.6 % Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で常温 2 時間ブロッキングした。BV をブロッキング後、PBS で 3 回洗浄し、一次抗体としてハイブリドーマの上清を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加し、常温で 2 時間作用させた。その後、T-PBS で 5 回洗浄し、二次抗体 (goat anti-mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland)) を 2000 倍希釈した溶液を 100 μl 添加して常温で 1 時間作用させた。T-PBS で 5 回洗浄した後、TMB 試薬 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 100 μl を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100 μl を加えて反応を停止した。その後マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。

B. 8. 2. hCL4 発現細胞 FACS

hCL4 発現 HT1080 細胞を $5.0 \times 10^5/\text{sample}$ となるように 96 well plate に播種し、ハイブリドーマの上清を添加、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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSCalibur にて

測定し、CellQuestProにて解析を行った。

B. 9. hCL5 発現 BV および Sf9 細胞の作製

B. 9. 1. pFastBac-hCL5 の作製

hCL5 cDNA フラグメントは pEAK-Claudin5 (神戸大学大学院医学研究科 古瀬幹夫博士より供与)をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pEAK-Claudin5 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。CL5 クローニング用のプライマーは、forward primer (5'-ataagaatgcggccgcatcatcatcatcatatggggctccgcagcgttgagatcctg-3')、reverse primer (5'-ccgctcagtcagacgtagttcttcttctgctagtcgcc-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 Not I と Xho I により切断した。トランスファーベクター pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある Not I と Xho I サイトを制限酵素 Not I と Xho I 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をコンピテントセル DH5 α に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 pFastBac1-hCL5 を得た。

B. 9. 2. hCL5 発現用 Bacmid ベクターの作製

作製したトランスファーベクターにより大腸菌 DH10Bac (Invitrogen) 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 TGK 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 bacmid DNA 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'-ggaacagctatgacctg-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 TGK plate で培養した。白色独立大腸菌クローンを培養し、bacmid DNA を精製した。なお、Wild type-BV (WT-BV) bacmid は青色独立大腸菌クローンから精製し、hCL5 bacmid DNA 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取得した。

B. 9. 3. hCL5 発現 BV および Sf9 細胞の作製

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 (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 液を泡立てないようにゆっくりピペティングして混合させた後、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 を添加し、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、hCL5 発現 BV を含む培養上清を 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、hCL5 発現 BV を含む培養上清を 800 × 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 × 10⁶ cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10, 100, 1,000 μl ずつ加え、27°C で 3 日間培養した (全量 2 ml)。3 日後、800 × 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 法にて目的とするタンパク質の発現を確認した。

4 × 10⁶ cells/ml の Sf9 細胞をスピナーラスコに 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 × 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 × 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 × g で 10 分間遠心し、上清をさらに 18,400 × g で 25 分間遠心した。得られた沈殿を protease inhibitor を含む TBS 200 μl で懸濁し、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用いてタンパク質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

また、hCL5 発現 BV 作製時に培養した Sf9 細胞を PBS により洗浄後、PBS に懸濁し免疫原とした。

B. 9. 4. hCL5 発現 Sf9 細胞における hCL5 の発現確認

タンパク質量として 10 μg を供し 15 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間タンパク質を転写した。転写後、PVDF 膜を

5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、T-TBS により 2000 倍に希釈した一次抗体 (rabbit anti claudin-5 (invitrogen)) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回洗浄し、T-TBS により 2000 倍に希釈した二次抗体 (goat anti-rabbit IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland)) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) により hCL5 蛋白質の検出を行った。

B. 10. hCL5 発現細胞の作製

B. 10. 1. pcDNA3.1 (-) -hCL5 の作製

hCL5 cDNA フラグメントは pFastBac1-hCL5 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pFastBac1-hCL5 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μl、10 × PCR buffer for KOD plus 2 μl、2.5 mM MgSO₄ 1 μl、2.5 mM dNTP mix 2 μl、10 μM primers 1.6 μl、滅菌精製水 9.9 μl、5 U/μl Takara kod plus 0.4 μl を混合し PCR を行った。hCL5 クローニング用のプライマーは、forward primer (5' -ggaattcgaaatgggggtccgcagcggtt-3')、reverse primer (5' -gggggtacctcagacgtagttcttct-3') を用いた。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 EcoRI と Kpn I により切断した。トランスファーベクター pcDNA3.1 (-) のマルチクローニングサイト上にある EcoR I、Kpn I サイトを制限酵素 EcoR I、Kpn I 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をコンピテンセル DH5 α に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、sense primer として T7 promoter primer (5'-caggaaacagctatgac-3')、anti-sense primer として T7 terminator primer (5'-gtaaatgaattttctgtatgagg-3')を用い、シークエンス解析を(株)ジーンデザインに依頼した。シークエンスマッチングしたクローンを pcDNA3.1 (-) -hCL5 として得た。

B. 10. 2. hCL5 発現 HT1080 細胞の作製

培養用 6 well プレートに 8×10^5 cells/well でヒト線維芽細胞株 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 (-) -hCL5 2 ug を Opti-MEM1 (GIBCO) 100 ul と FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche) 4 ul と混合し、15 分間常温静置した。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 (nacalaitesque) が 600 ug/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 well プレートに播種した。

B. 10. 3. hCL5 発現細胞における hCL5 発現確認

細胞を 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、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用いてタンパク質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

続いてタンパク質量として 10 μg を供し 15 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl,

0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、T-TBS により 2000 倍に希釈した一次抗体 (rabbit anti claudin-5 (invitrogen)) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回洗浄し、T-TBS により 2000 倍に希釈した二次抗体 (goat anti-Rabbit IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland)) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、LAS を用いて hCL5 タンパク質の検出を行った。

B. 10. 4. hCL5 発現細胞における hCL5 発現局在の確認

24 well plate に 5 ug / cm² で Collagen Type I Rat Tail (BD Bioscience) をコーティングし、1 時間静置した。その後 PBS で洗浄し、細胞を播種した。細胞がコンフルエントになり次第、4% PFA を室温で 15 min 作用させた。PBS で 2 回洗浄後 T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 1% Tween 20) で 5 min 洗浄し、1% BSA で常温 1 時間ブロッキングした。PBS で 2 回洗浄した後に 1% BSA により 1/500 に希釈した一次抗体 (rabbit anti claudin-5 (invitrogen)) を加え 1 時間常温で振盪した。PBS で 3 回洗浄し、1% BSA により 1/2000 に希釈した二次抗体 (Gt x Rbt IgG FLUOR (CHEMICON)) を加え 40 min 常温暗所で振盪した。PBS で 3 回洗浄し Slow Fade® Antifade Kit COMPONENT A (invitrogen) を加えカバーガラスに封入し、FSX-BSW を用いて蛍光観察を行った。

B. 11. hCL5 ハイブリドーマの作製

B. 11. 1. hCL5 発現 Sf9 細胞の BXSb マウスへの免疫

6 週齢雄性 BXSb マウスに hCL5 発現 Sf9 細胞 1×10^7 cells をアジュバンド (PERTUSSIS

TOXIN A PROTMER)と共に腹腔および背部皮下に投与した。その後、1週間ごとに hCL5 発現 Sf9 細胞 1×10^7 cells を 4 回腹腔内投与し、Western blot により抗 hCL5 抗体の産生を確認後、最終免疫として hCL5 発現 Sf9 細胞 1×10^5 cells をアジュバンド(PERTUSSIS TOXIN A PROTMER)と共に尾静脈に投与し、3 日後に脾臓を摘出した。

B. 11. 2. hCL5 BV 免疫マウスの抗体価の確認

WT-BV および hCL5-BV をタンパク質量として 0.5 μ g を供し 15 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回 洗浄し、hCL5-BV を計 4 回免疫したマウスより回収した血清を T-TBS で 10000 倍希釈したものを 1 次抗体とし、室温で 2 時間盪した。T-TBS で 3 回洗浄後、T-TBS により 2000 倍に希釈した二次抗体 (goat anti-mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland)) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) により hCL-5 蛋白質の検出を行った。

B. 11. 3. hCL5 免疫ハイブリドーマの作製

血清中に抗 hCL5 抗体の産生を確認したマウスを最終免疫の 3 日後に脱血死させ脾臓を無菌的に摘出し、FBS 非含有 RPMI 1640 培地中で細

胞をほぐし、0.45 μ m メッシュで脂肪などを取り除いた。リンパ球を 1500 rpm、5 分間、20 °C で遠心後、Tris-HCl (pH8.0) : NH₄Cl = 1 : 9 で混合した溶液を加え、室温で 5 分間放置することで赤血球を溶血させた。リンパ球およびミエローマ細胞 (P3X63-Ag8.653) を FBS 非含有 RPMI 1640 培地中で 3 回 1500 rpm、5 分間、20 °C で洗浄後、リンパ球:ミエローマ=5:1 の割合となるように混合し、1500 rpm で 5 分間 20 °C で遠心後、PEG 1500 (Roche) 5 ml を 37°C の湯浴上でゆっくりと攪拌するように加えた。続いて同様に FBS 非含有 RPMI 1640 培地 10ml を加え、 1.0×10^5 cells/ml となるように希釈し、96 well plate にミエローマ細胞が 2×10^4 cells / well となるように播種し、37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

B. 12. hCL5 ハイブリドーマのスクリーニング

B. 12. 1. BV ELISA

96 well ELISA plate に 0.5 μ g/50 μ l PBS/well で、WT-BV および hCL5-BV を 4°C で一晩静置することで固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、1.6 % Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で常温 2 時間ブロッキングした。BV をブロッキング後、PBS で 3 回洗浄し、一次抗体としてハイブリドーマの上清を 100 μ l/well で添加し、常温で 2 時間作用させた。その後、T-PBS で 5 回洗浄し、二次抗体 (goat anti-mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland)) を 2000 倍希釈した溶液を 100 μ l 添加して常温で 1 時間作用させた。T-PBS で 5 回洗浄した後、TMB 試薬 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 100 μ l を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100 μ l を加えて反応を停止した。その後マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。

B. 12. 2. hCL5 発現細胞 FACS

hCL5 発現 HT1080 細胞を 5.0×10^5 /sample となるように 96 well plate に播種し、ハイブリドーマの上清を添加、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1500倍希釈した 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となつように希釈した PI (Miltenyi Biotec)を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B 13. CL5 scFv 提示ファージライブラリの作製

B 13. 1. BV の作製

hCL5 の遺伝子を有する bacmid を含む DH5 α のグリセロールストックより大腸菌を少量とり、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin 含有 LB 培地 (Invitrogen Corp.) で一晩振盪培養し、回収した大腸菌から bacmid を精製した。

培養用 6 穴プレート (Becton, Dickinson and Company) に 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞 (Invitrogen Corp.) を播種し、室温で 1 時間静置した。静置中に tube A [cellfectin (Invitrogen Corp.) 6 μl 、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 (Invitrogen Corp.) 100 μl] と tube B (bacmid 1 μg 、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 μl) を用意し、tube A と tube B とを泡立てないようにゆっくりピペティングした後、室温で 30 分間放置した。プレートに接着した Sf9 細胞を血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地で洗浄後、培地を除去し、tube A と tube B との混合溶液に血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 800 μl を加え、well 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、10% Fetal Calf Serum (FCS ; Tissue culture Biologicals) と Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Nacalai Tesque, inc.) を含む 2 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen Corp.) に交換し、 27°C で 3 日間培養した。3 日後、 $800 \times g$ で 10 分間遠心し培養上清を回収した (P1 ストックと称する)。続いて、 2×10^6 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、 $800 \times g$ で 10 分間遠心し培養上清を回収した (P2 ストックと称す

る)。

スピナーフラスコに 2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞を 500 ml 用意し 5 ml の P2 ストックを加えて 27°C で 1 週間培養した。細胞をサンプリングして細胞生存率を算出し、90% 以上の細胞が死亡するまで培養した (培養開始から 10~14 日程度)。 $800 \times g$ で 10 分間遠心し、培養上清を回収した (ハイトイターストックと称する)。

培養用 6 穴プレートに 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 250 $\mu\text{l}/\text{well}$ 、ハイトイターストックを 50、100、200、1,000 $\mu\text{l}/\text{well}$ 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、培養上清を回収した。沈殿物 (細胞) には protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton X-100 (MP Biomedicals) を含む pH 7.4 の PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na_2HPO_4 , 1.15 mM KH_2PO_4) 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。すなわち、サンプルに 4 \times SDS buffer (250 mM Tris-HCl, 20% 2-mercaptoethanol, 8% SDS, 40% glycerol, 0.004% bromophenol blue) を添加して 95°C で加熱後、サンプルを SDS-PAGE に供し、TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories) によりゲル中のタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に転写した。PVDF 膜を 5% スキムミルク (Becton, Dickinson and Company) および 0.05% Tween20 (MP Biomedicals) 含有 Tris-buffered saline [TBS; 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl] (TBS-T) に浸して室温で 2 時間浸透しブロッキングした。TBS-T で 5 回洗浄後、2,000 倍希釈した mouse anti-claudin-4 (Zymed) を室温で 2 時間反応させ、TBS-T で洗浄後 5,000 倍希釈した Gt \times Ms IgG(H+L) HRP (Millipore Corp.) を室温で 1 時間反応させた。検出には ECLTM Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用い露光した X 線フィルム (FUJIFILM) を現像した。

4×10^6 cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコ

に 100 ml 用意し、発現確認ができたハイタイターストックを 20 ml 加え液量を 200 ml にし、27°C で 3 日間培養した。3 日後、800 ×g で 10 分間遠心し、上清をさらに 10,000 ×g で 25 分間遠心した。得られた沈殿を 1% protease inhibitor を含む TBS 200 μl で懸濁し、hCL5-BV を得た。尚、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用いて蛋白質濃度を測定し、検量線には BSA を用いた。

B 13. 2. hCL5-BV の免疫

雌性 gp64 トランスジェニックマウスに hCL5-BV を免疫し、抗血清をサンプリングして FACS 解析にて抗体価を測定した。まず、ヒト CL5 発現 HT1080 細胞をトリプシン処理により回収し、完全にばらばらになるまで分散し、細胞数を計数して 5.0×10^5 cells/well となるように 96 穴 U 底 plate (Nalge Nunc International) に播種した。1,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去して、1% BSA および 0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (pH 7.4) を用いて 1,000 倍希釈した抗血清を 100 μl/well 添加し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA および 0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (pH 7.4) を 200 μl 加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心し上清を除去した。次に 1% BSA および 0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (pH 7.4) を用いて 500 倍希釈した Anti-MOUSE IgG (H+L) (GOAT) Antibody Fluorescein Conjugated (ROCKLAND) を 100 μl 添加し、氷上で 30 分間遮光して静置した。0.2% BSA および 0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (pH 7.4) を 200 μl 加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心し上清を除去する操作を 2 回繰り返す。0.2% BSA、0.1% アジ化ナトリウムおよび 5 μg/ml PI (Miltenyi Biotec) 含有 PBS (pH 7.4) を 500 μl 添加し、FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company) により解析した。

尚、CL5 発現 HT1080 細胞の培養には、10% FCS、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution、2 mM L-glutamine (Wako Pure Chemical Industries) および 150 μg/ml G418 Disulfate Aqueous Solution (Nacalai Tesque, Inc.) 含有 DMEM を用い、37°C、

5%CO₂ の条件下で培養した。

B 13. 3. hCL5 免疫ライブラリの作製

抗 hCL5 抗体の産生を確認したマウスの脾臓を摘出し、TRIZOL reagent (Invitrogen Corp.) を加えてホモジネートして室温で 5 分間静置した。クロロホルムを加えて転倒混和後、室温で 3 分静置し 4°C、13,000 rpm で 15 分遠心した。その後、イソプロパノール沈殿、エタノール沈殿を行い、DEPC 水に tRNA を溶解させた。mRNA Purification kit (GE Healthcare) を用いて 1.25 mg の total RNA から mRNA を精製し、続いて SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Corp.) を用いて 500 ng の mRNA から RT-PCR により cDNA を合成した。ハウスキーピング遺伝子 GAPDH で cDNA の合成を確認するため、cDNA 1 μl、forward primer (5'-GTG AGG CCG GTG CTG AGT-3') 1 μl、reverse primer (5'-TTG CTG GGG TGG GTG GTC-3') 1 μl、*Ex Taq* (TaKaRa) 0.1 μl、10× *Ex Taq* Buffer (TaKaRa) 2 μl および dNTPmix 2 μl を用いて total 20 μl として、アニーリング温度 62°C で 1 分間、伸長反応 72°C で 1 分間に設定した 20 サイクルの PCR 反応を行った。PCR 産物を 2% TAE アガロースゲルに泳動し、700-800 bp 程度の遺伝子の増幅を確認した。

次に、0.4、0.8、1.6 μl の cDNA を鋳型として primer set (医薬基盤研究所 角田慎一先生、長野一也先生より供与) 中の primer を 25 μM に調製し等量混合した forward primer および reverse primer をそれぞれ 0.4、0.8、1.6 μl、KOD-plus (TOYOBO Co. Ltd.) 0.4 μl、10× Buffer for KOD-Plus 2 μl、25 mM MgSO₄ 0.8 μl、2 mM dNTPs 2 μl および DMSO (Nacalai Tesque, Inc.) 0.4 μl を用いて total 20 μl とした。アニーリング温度 50、55 または 60°C で 30 秒間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 35 サイクルの PCR 反応を行い、2% TAE アガロースゲルで泳動して、VL 鎖、VH 鎖遺伝子の増幅に最適な条件を検討した。条件検討結果をもとに、VL 鎖の増幅は、cDNA 1.6 μl (実際の PCR は total 50 μl で行ったため 4 μl 使用)、25 μM primer を 0.4 μl

(実際の PCR では 1 μ l 使用) 用い、アニーリング温度 55°C で PCR を行った。VH 鎖の増幅は、cDNA 1.6 μ l (実際の PCR では 4 μ l 使用)、25 μ M primer を 0.4 μ l (実際の PCR では 1 μ l 使用) 用い、アニーリング温度 50°C で PCR を行った。作製した PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製後、1% アガロースゲルで泳動し、400 bp 程度に認められたバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。次に、VL 鎖、VH 鎖の遺伝子を連結するために、それぞれの遺伝子を 50、100 または 200 ng、KOD-plus 1 μ l、10 \times Buffer for KOD-Plus 5 μ l、25 mM MgSO₄ 2 μ l、2 mM dNTPs 5 μ l および DMSO 1 μ l を用いて total 50 μ l とした。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 PCR 反応を行い、VL 鎖と VH 鎖を連結させて scFv とした。続いて、PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製し、25、50 または 100 ng の scFv 遺伝子、NotI サイトを有する forward primer (5'-GGC CAG CTT TGG AGC CTT TTT TTT GGA GAT TTT CAA CGT GAA AAA ATT ATT TAT TCG CAA TTC CTT TAG TTG TTC CTT TCT ATG CGG CCC AGC CGG CCA TGG CC-3')、NcoI サイトを有する reverse primer (5'-TTA GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GGT TTT GCT AAA CAA CTT TCA ACA GTC TAT GCG GCA CGC GGT TCC ACG GAT CCG GAT ACG GCA CCG GCG CAC CTG CGG CCG C-3')、KOD-plus 1 μ l、10 \times Buffer for KOD-Plus 5 μ l、25 mM MgSO₄ 2 μ l、2 mM dNTPs 5 μ l および DMSO 1 μ l を用いて total 50 μ l とした。アニーリング温度 60 または 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 PCR 反応を行い、2% TAE アガロースゲルで泳動して、scFv 遺伝子増幅に最適な条件を検討した。条件検討結果をもとに、50 μ l の溶液中に VL 鎖および VH 鎖の遺伝子をそれぞれ 200 ng 含む反応液を 12 本分作製して PCR を行い scFv 遺伝子とした。PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製後、50 μ l の溶液中に scFv 遺伝子

100 ng を含む反応液を 48 本分作製し、アニーリング温度 65°C で PCR 反応を行い scFv 遺伝子を増幅した。PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製後、140 μ g の scFv 遺伝子を NcoI (New England Biolabs) で 37°C、6 時間処理した。さらに、QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製後、NotI (New England Biolabs) で 37°C、12 時間処理し、2% アガロースゲルで泳動して切断を確認した。pCANTAB5E を改変したファージミドベクター (大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野 堤康央先生より供与) を NcoI および NotI で 37°C、4 時間処理し、1% アガロースゲルで泳動して切断できていることを確認した。制限酵素処理した scFv 遺伝子およびファージミドベクターを 1% アガロースゲルで泳動し、scFv は 800 bp 程度のバンドを、ファージミドベクターは 4500 bp 程度のバンドを切り出して QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製した。次に、ファージミドベクター:scFv 遺伝子 = 1:3 もしくは 1:5 でライゲーションし、最適なライブラリ作製条件を検討した。すなわち、制限酵素処理したファージミドベクター 0.1 μ g (0.034 pmol)、scFv 遺伝子 0.05 μ g (0.102 pmol) または 0.08 μ g (0.17 pmol)、T4 DNA ligase (New England Biolabs) 1 μ l および 10 \times T4 DNA ligase Reaction Buffer 1 μ l を用いて 16°C、一晩ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製後、MicroPulser® (Bio-Rad Laboratories) を用いて調製した大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションした。その後、2% D-glucose (SIGMA-Aldrich Corp.) 含有 2-YT BROTH (2YT 培地、Invitrogen Corp.) (2YTG 培地) に添加し、1 時間、37°C で振盪培養した。培養後のサンプルから 50 μ l を取り 2YTG 培地で 10 倍毎に段階希釈し、各段階のサンプル 450 μ l に対して 100 μ g/ml ampicillin および 2% D-glucose 含有 2YT 培地 (2YTGA 培地) 550 μ l を添加し、ペトリフィルムに播種後一晩培養し、菌数を計算した。条件検討結果をもとに、ファージミドベクター:scFv 遺伝子 = 1:3 となるよう、2.5 μ g の scFv 遺伝子と 5 μ g のファージミドベクターを用いてライゲーションし、QIAquick