

PCR Purification Kit を用いて精製後、調製した TG1 にエレクトロポレーションする操作を 43 回繰り返した。その後 2YTG 培地を添加し、1 時間、37°C で振盪培養した。エレクトロポレーション後のサンプルから 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 550 μ l の 2YTGA 培地を添加し、ペトリフィルムに播種、一晚培養し、得られたコロニー数からライブラリサイズを算出した。ライブラリサイズの算出は、10 の n 乗希釈した段階のコロニー数 m から、ライブラリサイズ = $m \times 1000 / 50 \times 500 / 450 \times 10^n / 10$ (CFU/ml) として計算した。また、エレクトロポレーション後のサンプルの残りは、100 μ g/ml ampicillin、2% D-glucose 含有 LB agar (LAG プレート) に播種し、一晚培養後、得られたコロニーを全て回収して、終濃度 10% となるようにグリセロールを加え、-80°C にて保存した。

ライブラリサイズ算出に使用したペトリフィルムからコロニーをピックアップし、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、ライブラリの多様性を確認した。尚、primer には pY03-AS-1 (5'-GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG-3') を使用した。

C. 研究結果

C. 1. hCL1 発現 BV および hCL1 発現 HT1080 の作製

hCL1 binder 取得のためのスクリーニング材料として、hCL1 発現 HT1080 の作製を行った。HT1080 に hCL1 発現ベクターである pcDNA3.1 (-)-hCL1 を導入し、hCL1 発現細胞のクローニングを行った。24 クローンを取得した後、hCL1 の発現が高かったクローンに関して、ウエスタンブロット法により発現を確認した (Figure 1)。

hCL1 免疫ファージ抗体ライブラリの作製および CL1 binder のスクリーニングに使用するため、BV 膜上に hCL1 を発現させた hCL1 発現 BV (hCL1-BV)、CL1 細胞外領域の 1st Loop がマウス、2nd Loop がヒトのキメラ CL1 を発現させた CL1 発現 BV (mhCL1-BV)、1st loop がヒト、2nd loop がマウスのキ

メラ CL1 を発現させた CL1 発現 BV (hmCL1-BV) を作製した。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 hCL1 の cDNA の挿入を行い pFastBac-hCL1 を得た。続いて、pFastBac-hCL1、pFastBac-mCL1 を鋳型とし、pFastBac-mhCL1、pFastBac-hmCL1 を作製した。

次に、相同組換えにより各種 CL1 発現カセットの bacmid DNA への搭載を行った。Bacmid DNA 挿入部位の両外側に位置する primer を用いて PCR を行い、発現カセットの搭載を確認した。作製した bacmid DNA を Sf9 細胞に導入し、増幅・精製を行うことで、各種精製 CL1-BV を得た。hCL1-BV、mhCL1-BV、hmCL1-BV における hCL1 の発現を Western blotting 法により確認した (Figure 2)。

C. 2. hCL1 免疫ファージ抗体ライブラリの作製

mhCL1-BV と hmCL1-BV の mixture を抗原として免疫した BXSB マウスから血清を回収し、hCL1 に対する抗体産生が行われているかを確認した。hCL1-BV を用いた ELAS 法により確認した結果、hCL1 に対する抗体の産生が確認された (Figure 3)。

抗体産生確認後のマウスの脾臓を摘出し、total RNA を抽出後、mRNA を精製した。RT-PCR により mRNA を鋳型にして cDNA を合成し、さらに cDNA を鋳型に重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) を PCR で増幅した。VH、VL 鎖をリンカーで連結して得た scFv 断片を Nco I / Not I 処理し pY03' に組み込んだ。得られた cDNA ライブラリをエレクトロポレーション法により大腸菌 TG-1 に導入したものをライブラリとした。構築した hCL1 免疫 scFv ライブラリのライブラリサイズは 7.95×10^5 CFU だった。

C. 3. hCL1 binder のスクリーニング

hCL1-BV をイムノチューブに固相化して scFv ライブラリを添加した後、結合したファージクローンを回収した。回収したファージを大腸菌 TG-1 に感染させ増幅した。再び調製したファージを CL1-BV

に作用させた。このサイクルを繰り返すことで各種 CL-BV 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 CL1 への結合性を有するファージの濃縮は観察されなかった (Figure 4 A)。3rd パンニング後のファージを個々に評価するため、plate に 1 クローンずつコロニーを培養することでファージクローンを作製し、各クローンの hCL1-BV への結合性を ELISA 法により解析した。その結果、hCL1-BV に結合性を有するクローンが複数得られた (Figure 4 B)。

C. 4. hCL4-BV の作製

抗 hCL4 抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングするため、BV 膜上に hCL4 を発現させた 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 の cDNA の挿入を行った。次に、相同組換えにより hCL4 cDNA 発現カセットの bacmid DNA への搭載を行った。Bacmid DNA 挿入部位の両外側に位置する primer を用いて PCR を行い、発現カセットの搭載を確認した。作製した bacmid DNA を Sf9 細胞に導入し、増幅・精製を行い、精製 BV を用いて Western blotting 法により hCL4 タンパク質の発現を確認した。その結果、ポジティブコントロールと同等な分子量付近にバンドが確認された (Figure 5)。

C. 5. hCL4 発現細胞の作製

hCL4 ハイブリドーマをスクリーニングに使用するため、膜表面上に hCL4 を発現させた安定細胞株の作製を行った。まず、pcDNA3.1(-) の T7 promoter の下流に hCL4 の cDNA の挿入を行った。次に得られた pcDNA3.1(-)-hCL4 plasmid をヒト線維芽細胞株 HT1080 にトランスフェクションし、G418 二硫酸塩溶液 (nacalai tesque) により細胞のセレクションを行った。作製した hCL4 発現 HT1080 細胞の hCL4 発現を Western blotting 法により確認したところ、目的タンパク質は mCL4 発現 L 細胞に発現している CL4 と同じ分子量にバンドが確認された (Figure 6A)。さらに、抗 claudin-4 抗体を用い

た FACS による解析により、作製した HT1080/hCL4 細胞の hCL4 は細胞膜上に発現していることが確認された (Figure 6B)

C. 6. 抗 hCL4 抗体産生ハイブリドーマの作製

雄性の BXSb マウスに PBS で懸濁した hCL4 発現 BV をアジュバントとして TiterMax Gold と共に腹腔または皮下投与した後、血清中の抗 hCL4 抗体の産生を FACS により確認した (Figure 7)。

FACS による解析から、免疫したマウス血清中に hCL4 に対する抗体の産生が確認されたため、最終免疫を行いマウスより脾臓を無菌的に回収し、細胞融合で汎用されている PEG 法によりマウスミエローマ細胞 (P3X63-Ag8.653) と細胞融合を行い、HAT セレクション法によりハイブリドーマを作製し、次項の実験に供した。

C. 7. 抗 hCL4 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

1 次スクリーニングとして hCL4 発現 BV を用いた ELISA 法を行った。その結果、hCL4 発現 BV に反応性を示したハイブリドーマが複数得られた (Figure 8)。

続いて 2 次スクリーニングとして hCL4 発現 HT1080 細胞を用いた FACS 解析により、hCL4 の細胞外領域を認識するクローンの選別を行った。その結果、いずれのクローンも hCL4 の細胞外領域を認識せず、クローンの獲得に至らなかった (data not shown)。

C. 8. hCL5-BV の作製

抗 hCL5 抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングするため、BV 膜上に hCL5 を発現させた 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 hCL5 の cDNA の挿入を行った。次に、相同組換えにより hCL5 cDNA 発現カセットの bacmid DNA への搭載を行った。Bacmid DNA 挿入部位の両外側に位置する primer を用いて PCR を行い、発現カセットの搭載を確認した。作製

した Bacmid を Sf9 細胞に導入し、増幅・精製を行い、精製 BV を用いて Western blotting 法により hCL5 タンパク質の発現を確認した。目的タンパク質は hCL5 の分子量付近にバンドが確認された (Figure 9)。

C. 9. hCL5 発現細胞の作製

抗 hCL5 抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングするため、膜表面上に hCL5 を安定的に発現させた細胞株の作製を行った。まず、pcDNA3.1(-) の T7 promoter の下流に hCL5 の cDNA の挿入を行った。次に得られた pcDNA3.1(-)-hCL5 plasmid をヒト線維芽細胞株 HT1080 にトランスフェクションし、G418 二硫酸塩溶液 (nacalai tesque) により細胞のセレクションを行った。作製した hCL5 発現 HT1080 細胞の hCL5 発現を Western blotting 法により確認したところ、hCL5 発現臍帯静脈内皮細胞細胞 HUVEC が発現している hCL5 と同じ分子量にバンドが確認された (Figure 10A)。さらに、hCL5 の発現部位を免疫染色法により確認した結果、多くが細胞膜表面上に発現していることを確認した (Figure 10B)。

C. 10. 抗 hCL5 抗体産生ハイブリドーマの作製

雄性の BXSB マウスに PBS で懸濁した hCL5 発現 Sf9 細胞をアジュバントとして pertussis toxin B と共に腹腔または皮下投与した後、血清中の抗 hCL5 抗体の産生を Western blotting 法により確認した (Figure 11)。

Western blotting 法による解析から、免疫したマウス血清中に hCL5 に対する抗体の産生が確認されたため、最終免疫を行いマウスより脾臓を無菌的に回収し、細胞融合で汎用されている PEG 法によりマウスミエローマ細胞 (P3X63-Ag8.653) と細胞融合を行い、HAT セレクション法によりハイブリドーマを作製した。

C. 11. 抗 hCL5 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

1 次スクリーニングとして hCL5 発現 BV を用

いた ELISA 法を行った。その結果、hCL5 発現 BV に反応性を示したハイブリドーマが複数得られた (Figure 12A)。

続いて 2 次スクリーニングとして hCL5 発現 HT1080 細胞を用いた FACS 解析により、hCL5 の細胞外領域を認識するハイブリドーマの選別を行った。その結果、hCL5 の細胞外領域を認識するハイブリドーマの獲得に成功した (Figure 12B)。本ハイブリドーマには、hCL5 以外の分子に対する抗体を産生するハイブリドーマも含まれている可能性があるため、限界希釈法によるモノクローン化を行う予定である。

C. 12. 抗原用 hCL5-BV の作製

Sf9 細胞に hCL5-BV の P2 ストックを 250 $\mu\text{l}/\text{well}$ 、ハイタイターストックを 50、100、200 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ加え、27°C で 3 日間培養し、回収した培養上清および細胞溶解液を SDS-PAGE に供して、Western blot 法により CL5 の発現を確認したところ、P2 ストック、いずれの添加量のハイタイターストックにおいても CL5 の発現が認められた (Figure 13)。

C. 13. hCL5-BV の免疫

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。その結果、マウス 1823 (3 回免疫後) およびマウス 1824 (4 回免疫後) の抗血清は、HT1080 細胞に比して hCL5 発現 HT1080 細胞に対し強く反応しており、hCL5 に対する抗体価の上昇が認められた (Figure 14)。

C. 14. hCL5 免疫ライブラリの作製

FACS 解析により hCL5 に対する抗体価の上昇が認められたマウスの脾臓を摘出し、total RNA を抽出後、mRNA を精製した。RT-PCR により mRNA から cDNA を合成し、ハウスキーピング遺伝子 (GAPDH) のプライマーを用いて PCR 反応を行い、cDNA 合成の確認を行った。その結果、700-800 bp 付近に GAPDH のバンドが認められた

ことから、cDNA を合成できていると判断した (data not shown)。

次に、cDNA を鋳型として軽鎖可変領域 (VL) および重鎖可変領域 (VH) を増幅するため、cDNA と primer set の使用量、アニーリング温度を振り PCR を行った。その結果、VL 鎖の遺伝子は、液量 20 μ l の系において、cDNA 1.6 μ l、primer 0.4 μ l 用いアニーリング温度 55°C で最も効率よく増幅できた (data not shown)。VH 鎖の遺伝子は、液量 20 μ l の系において、cDNA 1.6 μ l、primer 0.4 μ l 用いアニーリング温度 50°C で最も効率よく増幅できていた (data not shown)。そこで、条件検討結果をもとに、50 μ l の系で 18 本ずつ PCR を行い、VL 鎖、VH 鎖の DNA を増幅した。PCR 産物の一部を 2% アガロースゲルにて泳動したところ、VL 鎖、VH 鎖ともに 400 bp 程度にバンドが認められ、遺伝子の増幅が認められた (data not shown)。次に、VL 鎖と VH 鎖にあらかじめ付加していた G4S リンカーで連結し scFv 遺伝子を得るため assembly PCR の条件検討を行った。VL 鎖および VH 鎖の DNA 量を振り PCR を行った後、scFv 遺伝子量、scFv 増幅時のアニーリング温度を振り PCR を行った。その結果、50 μ l の系で VL 鎖、VH 鎖の遺伝子をそれぞれ 200 ng 用いて PCR を行い、続いて、50 μ l の系で連結した scFv 遺伝子を 100 ng 用いてアニーリング温度 65°C で PCR を行った条件において最も効率よく scFv 遺伝子が増幅されていた (data not shown)。条件検討結果をもとに、VL 鎖と 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、続いて scFv 遺伝子を 100 ng 含む反応液を 48 本分作製して PCR を行い、scFv 遺伝子を増幅した。PCR 産物を少量とり 2% TAE アガロースゲルに泳動したところ、800-900 bp 付近にバンドが認められており、scFv 遺伝子の増幅を確認した (data not shown)。scFv 遺伝子およびファージミドベクターを NcoI および NotI で処理し、ベクター:インサート=1:3 (0.1 μ g:0.05 μ g) または 1:5 (0.1 μ g:0.08 μ g) でライゲーションし、大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションして最適なライブラリ作製条件を検討した。その結果、ベクター:インサ

ート=1:3 では 10^1 希釈で確認できたコロニー数は 49 個、1:5 では 10^1 希釈で確認できたコロニー数は 23 個であったことから 1:3 の条件を採用した。条件検討結果をもとに、ベクター:インサート=1:3 (5 μ g:2.5 μ g) でライゲーションし、TG1 にエレクトロポレーションする操作を 43 回繰り返した。エレクトロポレーション後のサンプルの一部を力価計算に使用し、残りはライブラリのグリセロールストック作製に用いた。得られたライブラリのサイズは 3.86×10^5 CFU であった。ライブラリ中のクローンをピックアップしてシーケンス解析したところ、全てのクローンが異なる配列を有しており、独立したクローンで構成されたライブラリであることが示唆された (Table1)。

D. 考察

本年度は、CL に対するモノクローナル抗体作製の問題点として挙げられる、①抗原性の低さ、②タンパク作製の困難さを回避するために、①自己免疫疾患マウスに対して免疫を行うこと、②膜表面上にタンパクを intact な状態で提示可能な BV を免疫原として用い、各種 scFv ライブラリおよび抗体作製に着手した。

D. 1. CL1 binder 創製に向けた検討

自己免疫疾患マウス BXSb に CL1-BV を免疫することで CL1 scFv ライブラリの作製を試みた。抗原用の hCL1-BV の作製を試みたところ、作製効率が低く、抗原として利用可能な量の確保が困難な状況となった。そこで、細胞外領域をヒトおよびマウスのキメラにした mhCL1-BV と hmCL1-BV を作製したところ、十分量の BV を調整することができた。両 BV の mixture を免疫したところ、hCL1 に対する抗血清を有するマウスが得られ、本マウスの脾臓から精製した RNA を用いて免疫抗体ライブラリの構築を試み、 7.95×10^5 CFU のライブラリサイズ有するライブラリの作製に成功した。標準的な免疫抗体ライブラリは 10^5 - 10^6 CFU 程度のサイズであることから、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サイズを有していると考

えられた。

次に、本 hCL1 免疫ファージライブラリから hCL1 結合性ファージクローンのスクリーニングを行ったものの、hCL1 に結合性を有するクローンの濃縮が観察されなかった。2nd パニングと 3rd パニング後のファージをモノクローン化した後に、hCL1 に結合性を示したクローンを比較すると、round ごとに hCL1 結合性ファージが濃縮されていた。そこで、3rd パニング後のファージをモノクローン化し、hCL1 への結合性を調べたところ、hCL1 結合性クローンが複数得られた。しかしながら、hCL1 に結合クローンは、WT-BV にも結合していた。今回、免疫抗原として用いている CL1-BV では BV 由来の膜蛋白質 gp64 が高い抗原性を有することが知られており、gp64 結合性クローンが濃縮されているものと推察された。

以上の結果を踏まえ、現在、①WT-BV への結合性を示すクローンを排除した後にパニングを行うサブトラクションパニングの利用、②gp64 トランスジェニックマウスの利用を実施している。さらに、DNA 免疫法と自己免疫疾患マウスを組合せた抗体作製を開始した。

D. 2. CL4 binder 創製に向けた検討

自己免疫疾患マウス BXSB に CL4-BV を免疫することで CL4 抗体の作製を試みたところ、CL4-BV 免疫マウスの抗血清中に hCL4 に対する抗体が確認できた。そこで次に、脾臓を回収し、マウスミエローマと PEG 法により細胞融合を行い約 500 クローンのハイブリドーマを作製した。hCL4 発現 BV を用いた ELISA によってスクリーニングを行ったところ、WT-BV に比して hCL4 発現 BV への結合性に優れるクローンが複数観察された。これらのクローンを増幅し、hCL4 発現 HT1080 細胞を用いた FACS 解析により 2 次スクリーニングを実施したところ、hCL4 に結合性を示すハイブリドーマクローンは得られなかった。上述したように、CL4-BV を抗原として免疫した場合、BV エンベロープタンパク質 gp64 に対する抗体が惹起されることが知られており、今回の 1 次スクリーニングで得られたク

ローンも gp64 を認識している可能性がある。

以上の結果を踏まえ、①gp64 トランスジェニックマウスを利用した scFv ライブラリの作製、② DNA 免疫法を利用した抗体作製を開始した。

D. 3. CL5 binder 創製に向けた検討

自己免疫疾患マウス BXSB に CL5-BV を免疫したところ、血清中に hCL5 に対する抗体産生が認められた。当該マウス脾臓を回収し、定法に従いハイブリドーマを作製(約 500 クローン)した。1 次スクリーニングとして hCL5 発現 BV を用いた ELISA 法による 1 次スクリーニング、hCL5 発現 HT1080 細胞を用いた FACS 解析による 2 次スクリーニングを行い、hCL5 に結合性を示すクローンを複数獲得した。今後、限界希釈法によるモノクローン化を進めていく予定である。さらに、DNA 免疫法を用いた抗体作製のバックアップ実験も開始している。

2003 年に CL5 が血液脳関門バリアを担っていることが見出され、世界中の研究者が CL5 binder の開発を進めているものの、依然として抗体を含めて CL5 binder の創製に成功した例は皆無である。そこで、hCL5-BV を gp64 トランスジェニックマウスに免疫し、CL5 scFv ライブラリの作製を試みた。免疫マウスの血清を用いた解析で、抗 CL5 抗体の産生が認められたマウスから脾臓を回収し、定法に従い scFv ライブラリの作製を試み、 3.86×10^5 CFU の多様性を有するライブラリを構築した。ライブラリから任意のクローンをピックアップし、シーケンス解析したところ、抗原認識に関与する CDR3 領域が異なるクローンであった。本ライブラリ中には、BV エンベロープ gp64 を認識する scFv が含まれている可能性は極めて低いことから、優れた質を有しているものと考えられる。今後は、当該ライブラリを用いて、CL5 binder のスクリーニングを進めていく予定である。

E. 結論

本研究は、独自の CL binder 研究を有効活用することで、HCV 感染阻害剤、抗がん剤、経皮吸

収促進剤、粘膜ワクチン開発に資するCL binderを創製することを目的としている。

本年度は、各種CL binder創製に向けた基盤整備を行い、以下の成果を得た。

① hCL1 binder創製

hCL1-BV免疫自己免疫疾患マウスを用いてscFvライブラリを作製し、gp64トランスジェニックマウスを用いたscFvライブラリ作製を進めている。また、hCL1発現細胞を樹立し、CL1 binderスクリーニング系を構築した。

自己免疫疾患マウスにDNA免疫することで、モノクローナル抗体の作製に着手した。1stスクリーニングの結果、5種類余りのポジティブクローンが得られている。現在、これらのクローンを基に、ハイブリドーマのセレクションを進めている。

②hCL4 binder創製

hCL4-BV免疫自己免疫疾患マウスを用いてscFvライブラリを作製し、gp64トランスジェニックマウスを用いたscFvライブラリの作製に着手した。さ

らに、hCL4発現細胞を樹立し、CL4 binderスクリーニング系を構築した。

また、DNA免疫によるラットモノクローナル抗体の作製を試み、1stスクリーニングの結果、60種類余りのハイブリドーマが得られた。現在、これらのクローンの中で抗体産生能に優れた30種類余について2ndスクリーニングを実施している。

③hCL5 binder創製

hCL5-BV免疫自己免疫疾患マウス、hCL5-BV免疫gp64トランスジェニックマウスを用いて、scFvライブラリを作製した。さらに、hCL5発現細胞を樹立し、CL5binderスクリーニング系を構築した。

また現在バックアップ実験として、DNA免疫によるラットモノクローナル抗体の作製を進めている。

上記の結果を有効活用することで、平成 24年度は CL binder の創出を図っていく予定である。

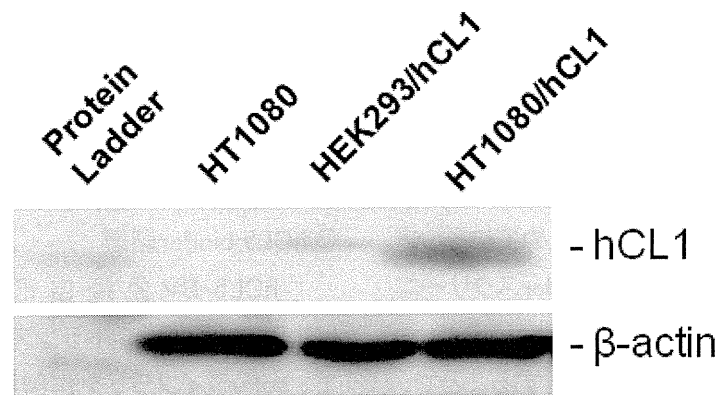


Figure 1 hCL1 expression in HT1080/hCL1 cells.

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

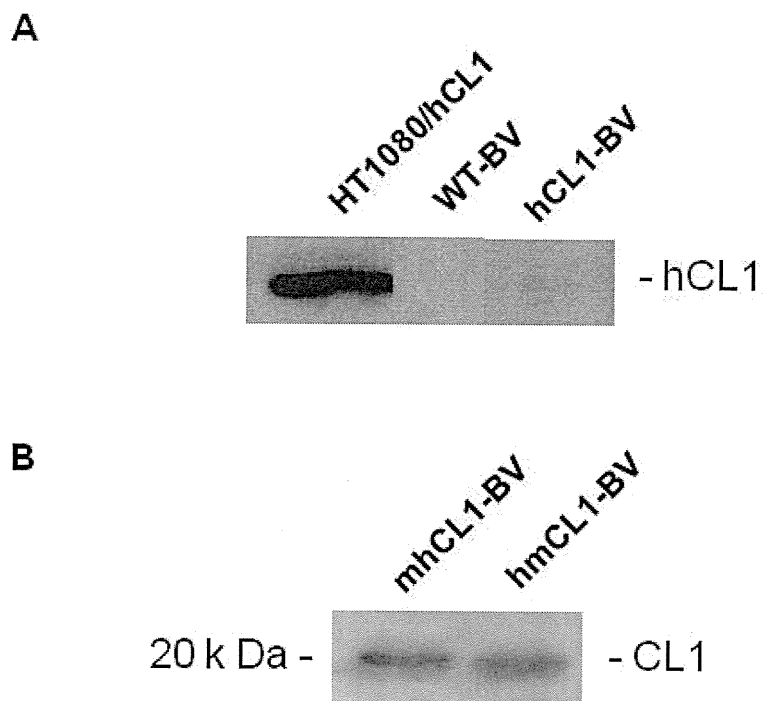


Figure 2 Preparation of CL1-expressing BVs.

A) 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. B) mhCL1-BV and hmCL1-BV were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot.

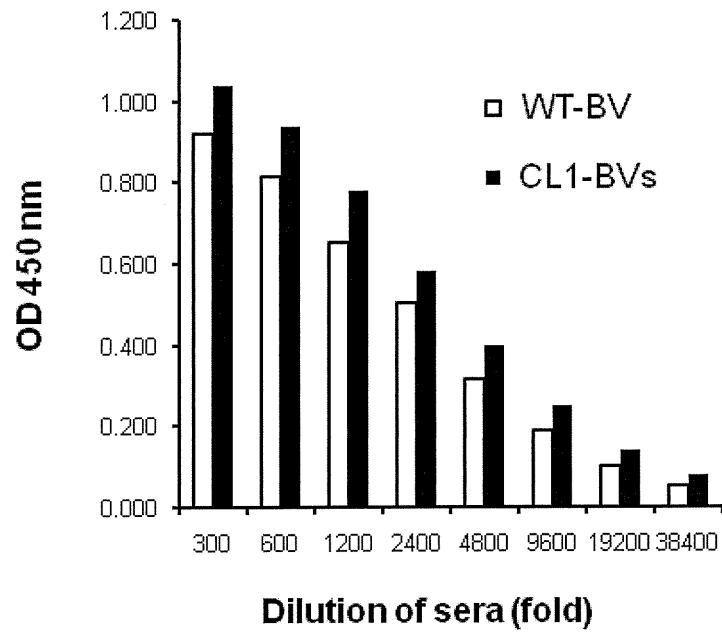


Figure 3 Detection of anti-CL1 antibodies in the mouse sera.

Immunoplate was coated with 0.5 μ g WT-BV or hCL1-BV, and the serial dilution of sera was added to the wells. Anti-CL1 antibodies were detected by ELISA with anti-mouse IgG antibody.

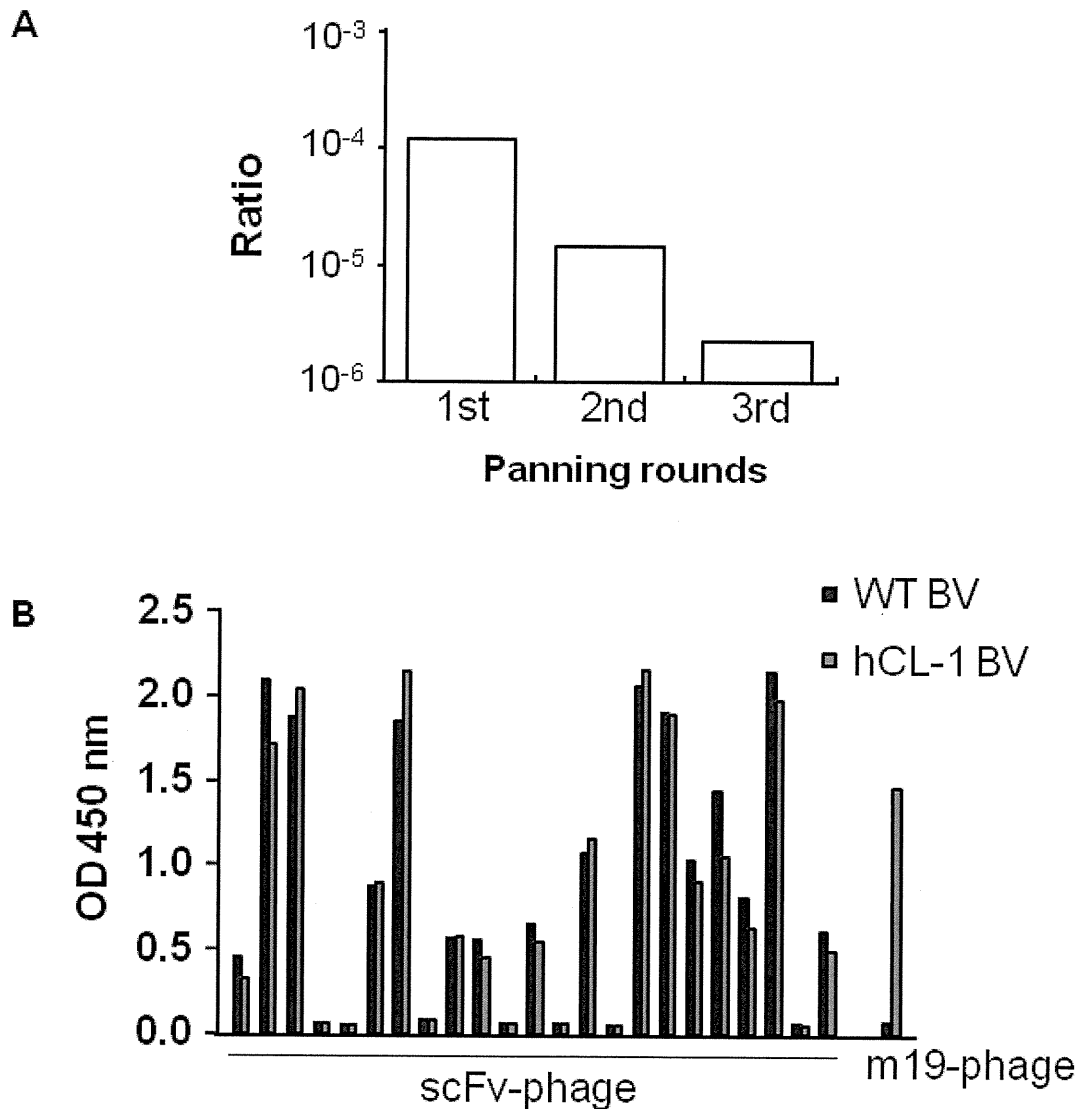


Figure 4 Screening of hCL1 binding scFv phages.

A) Enrichment of phages with affinity to hCL1-BV. hCL1-BV coated on immunotubes were incubated with the hCL1-immune scFv phage library at 7.95×10^5 CFU titer (1st input phage). The phages bound to hCL1-BV were recovered (1st output phage). The hCL1-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 hCL1-immune scFv phage. hCL1-BV-bound phage clones were isolated from the 2nd output phages, and the interaction of the monoclonal phage with hCL1-BV was examined by ELISA with HRP-anti-M13 Ab.

WT-BV mCL4/L hCL4-BV

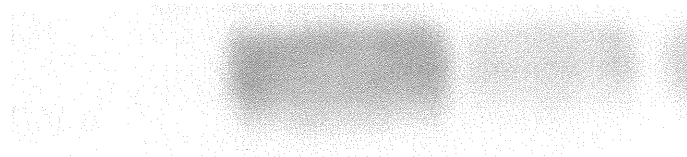
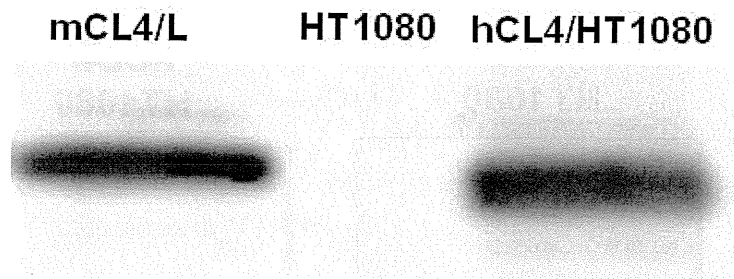
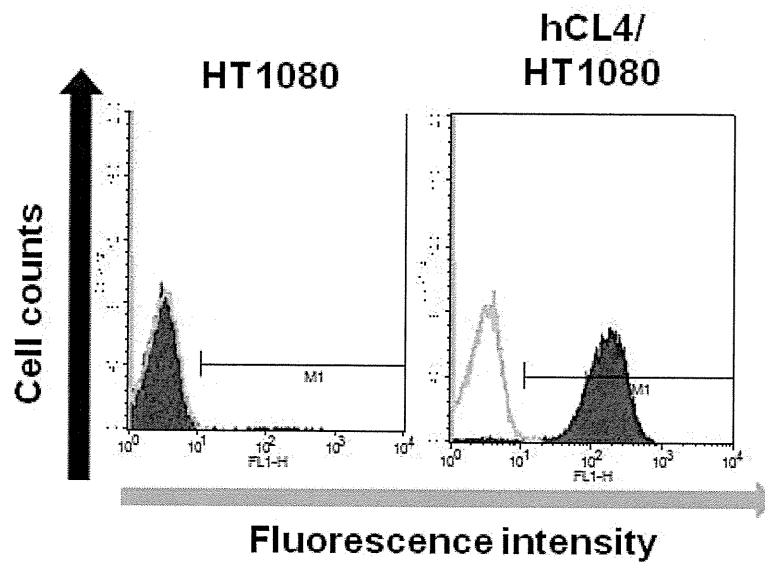


Figure 5 Preparation of BVs.

WT-BV and hCL4-BV (10 μ g/lane) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis with anti-CL4 antibody. Lysates of mCL4/L was used as a positive control.

A**B****Figure 6 Preparation of hCL4 expressing cells.**

A) Immunoblot analysis. Lysates of mCL4-expressing L cells (mCL4/L), HT1080 and hCL4-expressing HT1080 cells (hCL4/HT1080) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot. The lysate of mCL4/L and HT1080 cells were used as a positive and negative control. B) FACS analysis. hCL4/HT1080 cells were incubated with diluted anti-CL4 antibody and stained with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(H+L). The CL4-expressing cells were detected using a flow cytometer. As a control, cells were incubated with phosphate buffered saline (PBS).

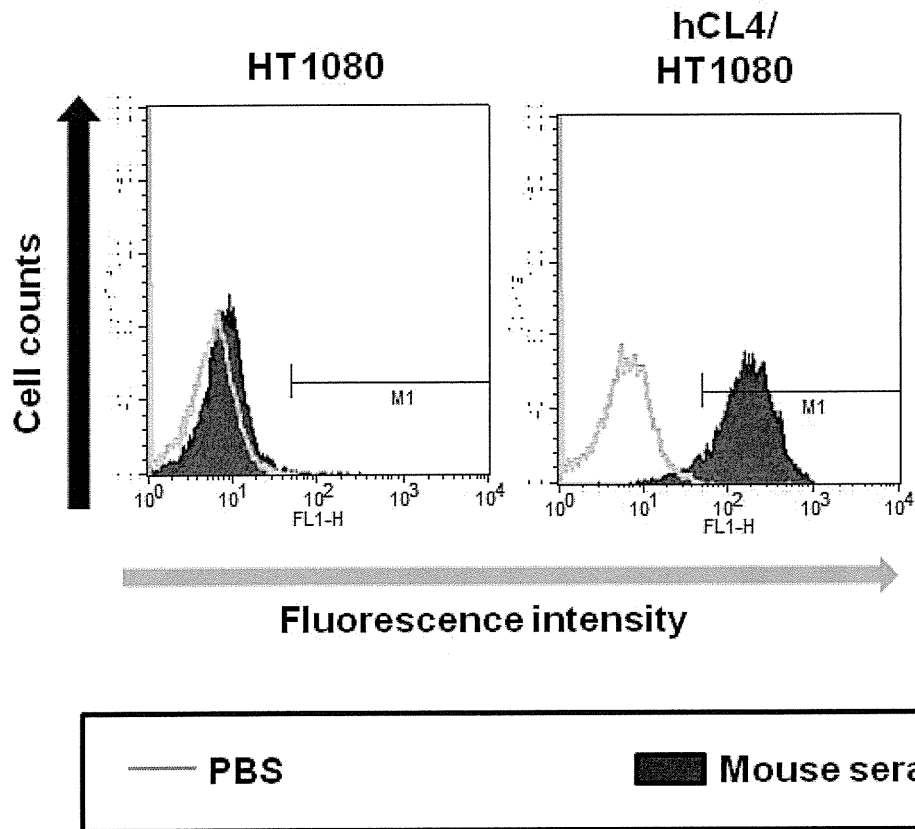


Figure 7 Detection of anti-CL4 antibodies in the mouse sera
 hCL4/HT1080 cells were incubated with 1000-fold dilution of mouse sera, and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). The antibodies-bound cells were detected using a flow cytometer. As a control, cells were incubated with phosphate buffered saline (PBS).

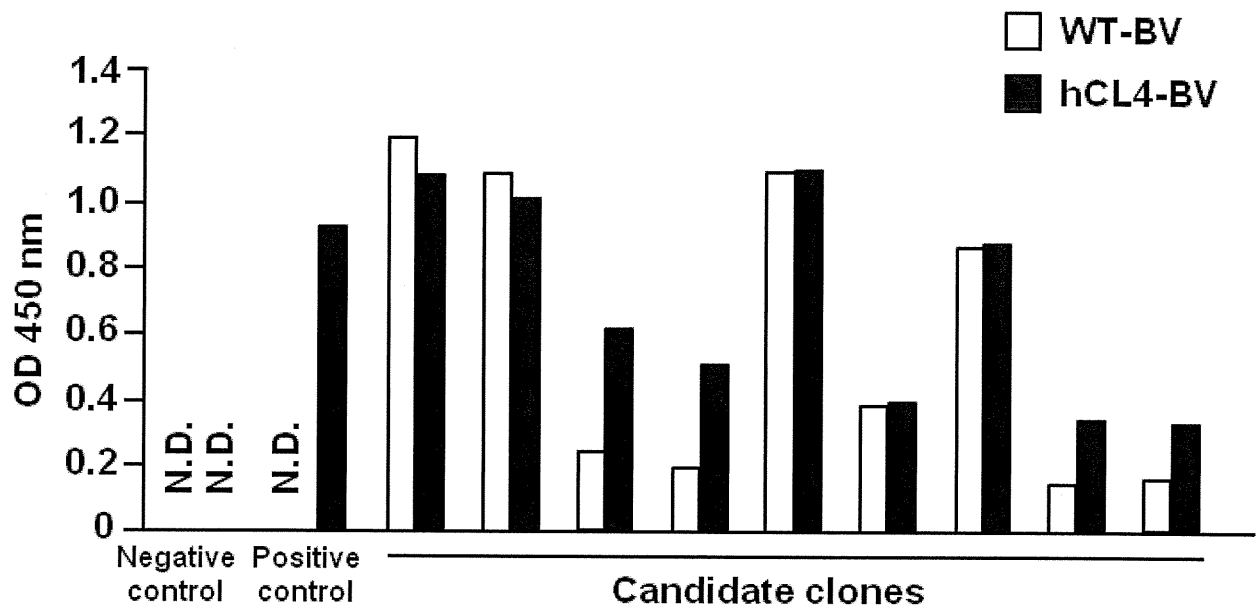


Figure 8 Screening of hybridomas producing a monoclonal CL4 antibody

The conditioned mediums of hybridomas were added to BVs-coated immunoplates. Anti-CL4 antibodies were detected by ELISA using HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). N.D., not detected.

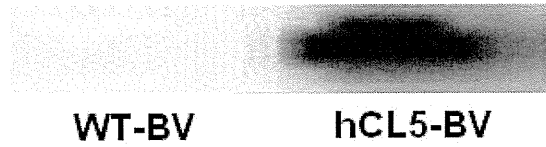
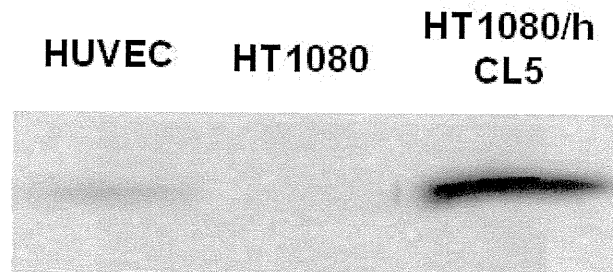


Figure 9 Preparation of hCL5-expressing BVs.
WT-BV and hCL5-BV (10 μ g/lane) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot with anti-CL5 antibody.

A



B

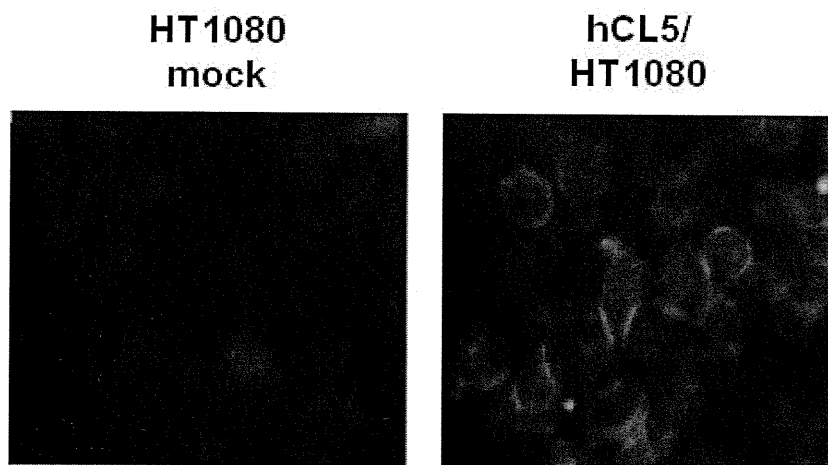


Figure 10 Preparation of hCL5-expressing cells.

A) Immunoblot analysis. 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. B) Immunofluorescent analysis. HT1080/hCL5 cells were incubated with rabbit anti-claudin 5 antibody and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L). The FITC labelled cells were detected under a immunofluorescent microscopy.

WT-BV hCL5-BV

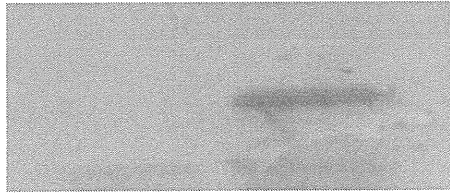


Figure 11 Detection of anti-CL5 antibodies in mouse sera
WT-BV or hCL5-BV (0.5 μ g/lane) were subjected to SDS-PAGE,
followed by immunoblot analysis with mouse sera.

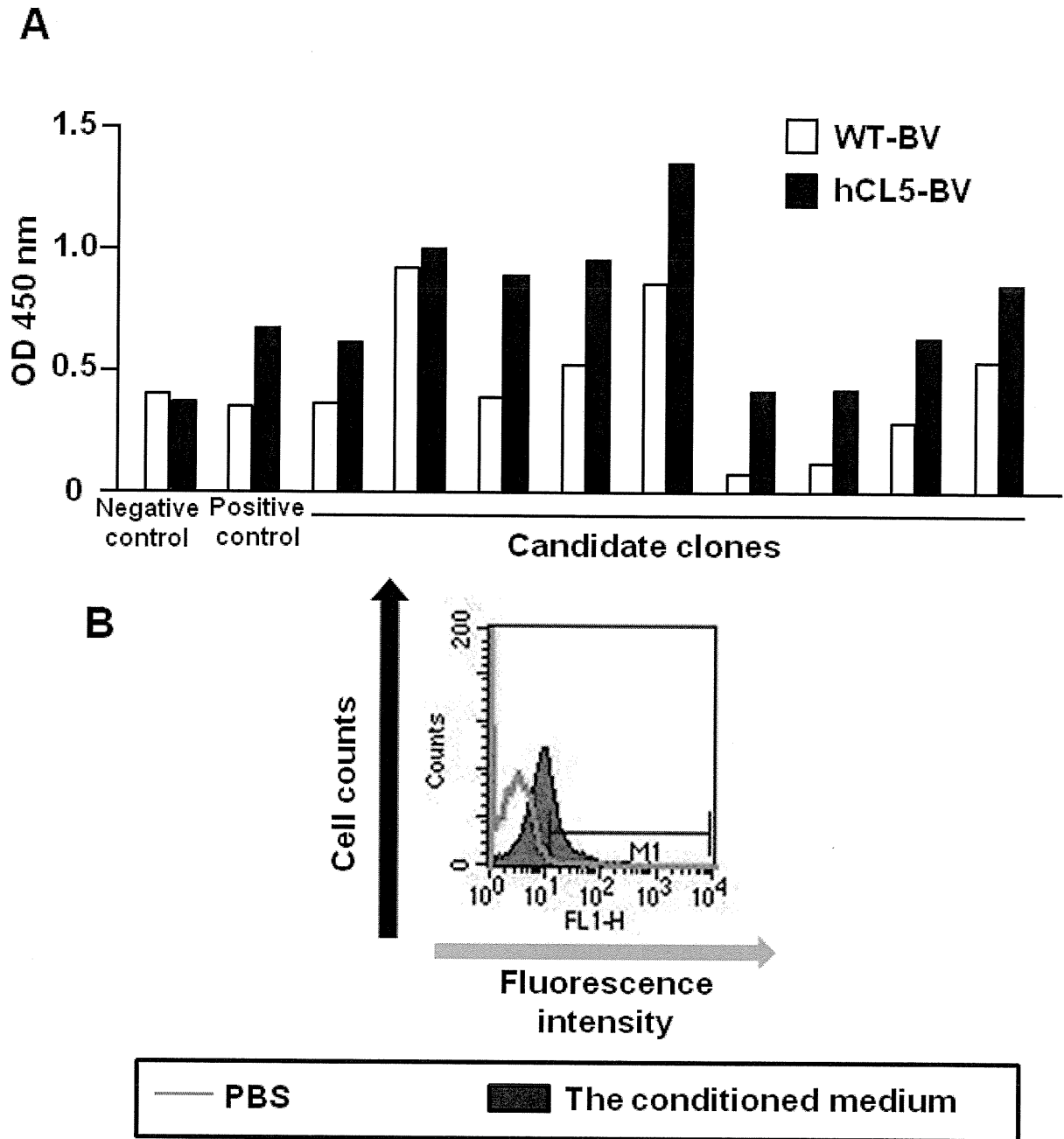


Figure 12 Screening of hybridomas producing anti-CL5 antibodies
 A) ELISA. The conditioned mediums of hybridomas were added to BVs-coated immunoplates. Anti-CL4 antibodies were detected by ELISA using HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). B) FACS analysis. HT1080/hCL5 cells were incubated with a hybridoma sera and stained with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). The anti-CL5 antibodies-bound cells were detected by a flow cytometer. As a control, cells were incubated with phosphate buffered saline (PBS).

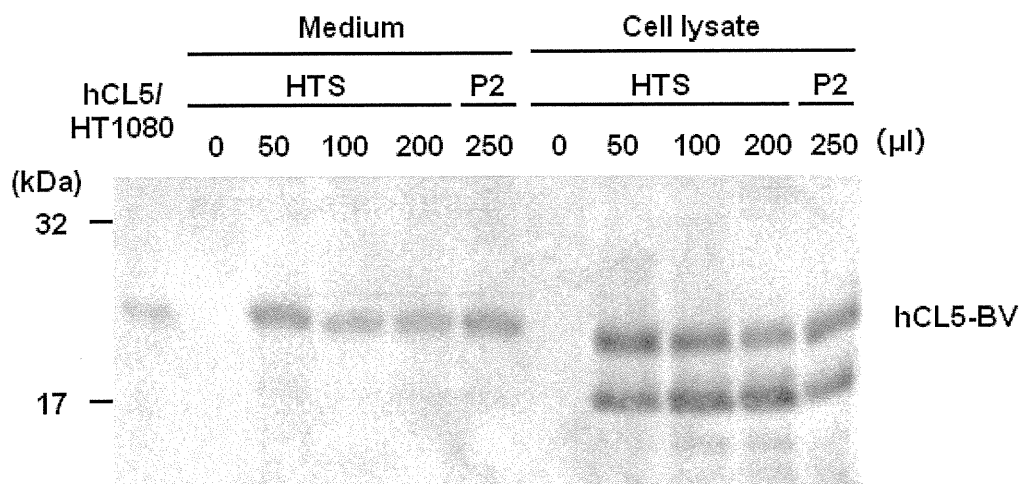


Figure 13 Preparation of BVs.

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

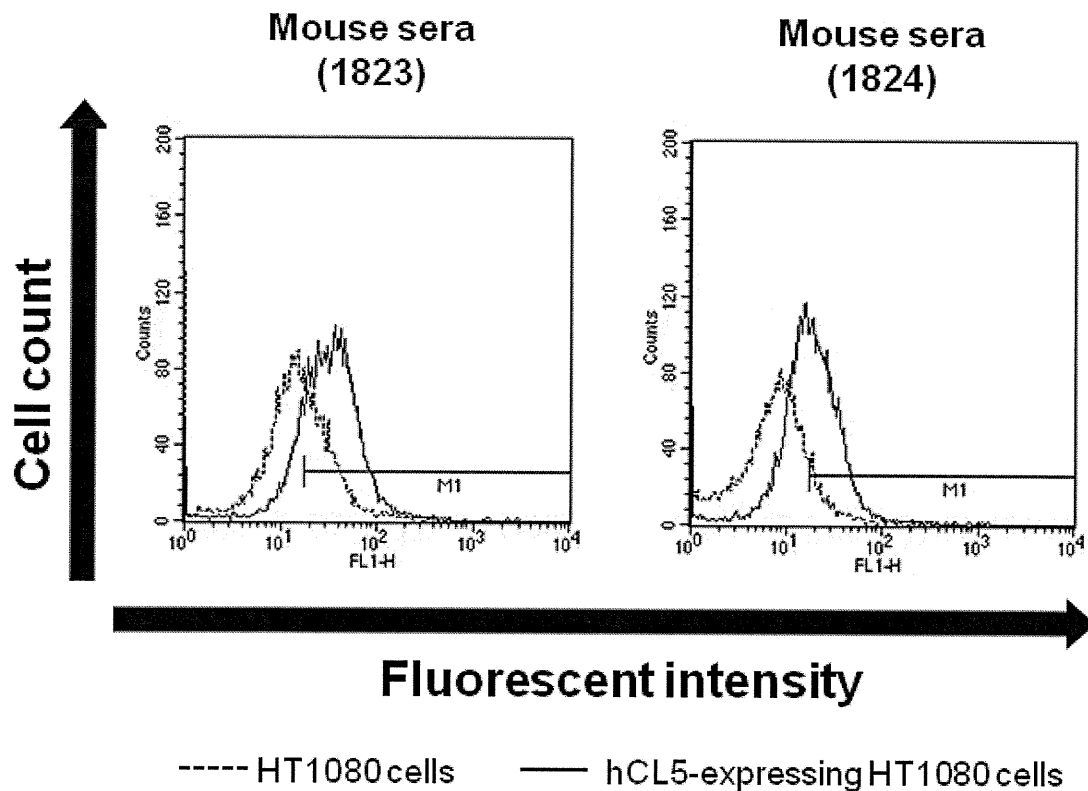


Figure 14 Detection of anti-CL5 antibodies in mice serum
 hCL5-expressing HT1080 cells were incubated with diluted 1000-fold dilution of mouse sera and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). The antibodies-bound cells were detected by a flow cytometer.