

201320028B

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23-25年度 総合研究報告書

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 23-25 年度 総合研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成 26 (2014) 年 5 月

# 目 次

## I. 総合研究報告

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

渡利 彰浩

----- 1

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 56

## III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 61

## 「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3万5千人が肝癌により命を落としているなかで、肝移植は肝癌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、肝癌患者の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癌患者の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、肝癌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。

CL-1結合性scFvを創製するため、まずscFvライブラリの作製およびCL-1 binderスクリーニングの際に用いる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結合特異性を確認する際に用いる4種のCL発現細胞(HT1080/hCL1, 2, 4, 5)を作製した。続いて、hCL提示バキュロウイルスを免疫したCL欠損マウスをもとに、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が、得られたbinderのほとんどがバキュロウイルスの膜蛋白質であるgp64にも結合するものであった。そこで、gp64に結合するbinderを排除するため、gp64に対し免疫寛容が成立しているgp64トランスジェニックマウスを利用することにより、再度scFv提示ファージライブラリを構築した。作製したライブラリからhCL1 binderのスクリーニングを行ったところ、gp64には結合せず、hCL1に結合性を示すファージクローンなどを複数得ることに成功した。しかしながら、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、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。

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。

### 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

現在、本邦では約200万人、世界においては約2億人もの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の患者において慢性化が認められ、その後、肝硬変、肝癌へ

### A. 研究目的

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、その奏効率は50%にとどまっているのが現状である。また、肝癌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 hCL1, 2, 4, 5-BVの作製

#### B.1.1 pFastBac-hCL1, 2, 4, 5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  $\mu$ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5  $\mu$ l、2.5 mM MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 3  $\mu$ l、滅菌精製水 30  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l Takara kod plus 1  $\mu$ l を混合し PCR を行った。Claudin-1 クローニング用のプライマーは、Forward primer (5' -gctctagaatggattacaaggatgacgacgataagatggccaacgcggggctgcagctg-3')、Reverse primer (5' -cggggtacctcacacgtagtctttcccgtggaaggtgcagg-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によりコンピテントセル DH-5 $\alpha$  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-hCL1 を得た。

Human claudin-2 cDNA フラグメントは、pDNR-LIB-claudin-2 (ATCC) をテンプレートとして KOD-plus- を用いた PCR 法により増幅した。

pDNR-LIB-Claudin-2 溶液 1  $\mu$ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5  $\mu$ l、2.5 mM MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 1  $\mu$ l、滅菌精製水 34  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l Takara KOD plus 1  $\mu$ lを混合し PCRを行った。なお、Forward primerとして 5'-ggactagtagtggcctctcttg gcctccaac-3'を、Reverse primerとして 5'-cggggtacct cacacataccctgtcaggctgtag-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 1 minを 35 サイクル。得られた PCR産物を Gel Extraction Kit(QIAGEN)を用い精製後、Spe I および Kpn Iを用い、37°Cで一晩制限酵素処理した。あらかじめ Spe I および Kpn I 処理した pFastBac1 と T4 DNA ligase (NEB)を用いて 16°Cで一晩ライゲーション反応を行い、続いて Not Iを用いて制限酵素処理を行った。ライゲーション産物から QIAprep  $\oplus$  Spin miniprep Kit (QIAGEN)を用い、プラスミドを精製した。ライゲーション産物により大腸菌 DH5  $\alpha$ をトランスフォーメーションさせ、100  $\mu$ g/ml ampicillinを含む LB 培地 (LA)培地プレートに播種し、37°Cで一晩培養した。培養後、コロニーをピックアップし、LA 培地によりスモールスケールで培養し、プラスミドを精製した。インサートの確認およびシーケンス解析により pFastBac-hCL2を得た。

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  $\mu$ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5  $\mu$ l、2.5 mM MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 3  $\mu$ l、滅菌精製水 30  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l Takara kod plus 1  $\mu$ 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'-tggatgaactgcgtggtg-3')、Reverse primer(5'-ggttgtagaagtcgcgatg-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。トランスファーベクター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  $\alpha$ 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。

Human claudin-5 (hCL5) cDNA フラグメントは pEAK-hClaudin-5 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pEAK-hclaudin-5 溶液 (0.1 mg/ml) 1  $\mu$ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5  $\mu$ l、2.5 mM MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 3  $\mu$ l、滅菌精製水 30  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l Takara kod plus 1  $\mu$ lを混合し PCRを行った。hcaludin-5 クローニング用のプライマーは、Forward primer(5'-ataagaatcgccgcatgcatcatcatcatcatatg gggctcgcagcgttgagatcctg-3')、Reverse primer (5'-ccgctcagtcagacgtagttcttctgtcgtagtcgcc-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 NotI と XhoI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 NotI、XhoIサイトを制限酵素 NotI、XhoI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  $\alpha$ 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-hCL5を得た。

#### B. 1. 2 hCL1, 2, 4, 5 発現用 bacmid DNA の作製

作製した pFastBac-hCL1, 2, 4, 5 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  $\mu$ g/ml kanamycin, 7  $\mu$ g/ml gentamicin, 10  $\mu$ g/ml tetracycline を含み、2% X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside) 100  $\mu$ l および 50 mM IPTG 100  $\mu$ 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 hCL1, 2, 4, 5 発現カセットが組み込まれた bacmid DNA(hCL1, 2, 4, 5-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  $\mu$ l、10 x LA PCR buffer 2  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 3.2  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 1  $\mu$ l、滅菌精製水 9.6  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l Takara LA taq 0.2  $\mu$ lを混合し PCRを行った。

プライマーは Forward primer(5'-tgtaaacgacgcccagt-3'), Reverse primer(5'-ggaacagctatgaccatg-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 $\alpha$ 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、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、hCL1, 2, 4, 5-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 hCL1, 2, 4, 5 発現 Budded baculovirus (hCL1, 2, 4, 5-BV) の作製

培養用6穴プレートに1 × 10<sup>6</sup> 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  $\mu$ l、血清・抗生物質を含まない Sf-900 培地 (Invitrogen) 100  $\mu$ l) と tube B 液 (各種 hCL-bacmid DNA 1  $\mu$ g、血清・抗生物質を含まない Sf-900 培地 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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 × 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<sup>6</sup> 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 × 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<sup>6</sup> cells/wellの濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを10, 100, 1,000  $\mu$ l 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)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<sup>6</sup> 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 × 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  $\mu$ 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 各種 hCL 発現 BV における hCL 発現確認

各種 hCL 発現 BV のウイルス溶解液を作製し、hCL 発現確認のためのウエスタンブロット法を行うため、蛋白質量として 10  $\mu$ 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)、rabbit anti claudin-2 (ZYMED)、mouse anti claudin-4 (ZYMED)、もしくは rabbit anti claudin-5 (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) もしくは 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、それぞれ claudin-1, 2, 4, 5 蛋白質の検出を行った。

## B. 2 hCL1, 2, 4, 5 発現細胞の作製

### B. 2. 1 pcDNA3.1 (-) -hCL1, 2, 4, 5 の作製

pcDNA3.1 (-) -hCL1 を作製するにあたり、hCL1 の cDNA フラグメントとして pFastBac-hCL1 を用い、pFastBac-hCL1 をテンプレートとして PCR 法により hCL1 領域を増幅した。pFastBac-hCL1 溶液 (0.1 mg/ml) 1  $\mu$ l、10 x PCR buffer for KOD plus 2  $\mu$ l、2.5 mM MgSO<sub>4</sub> 1  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 1.6  $\mu$ l、滅菌精製水 9.9  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l Takara kod plus 0.4  $\mu$ 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' -aaacttaagtcacacgtagtctttcccgctgg-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  $\alpha$  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。

pcDNA3.1 (-) -hCL2 を作製するにあたり、hCL2 の cDNA フラグメントとして pFastBac-hCL2 を用い、

pFastBac-hCL2 をテンプレートとして PCR 法により hCL2 領域を増幅した。hCL2 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  $\mu$ l、10 x PCR buffer for KOD plus 2  $\mu$ l、2.5 mM MgSO<sub>4</sub> 1  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 1.6  $\mu$ l、滅菌精製水 9.9  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l Takara kod plus 0.4  $\mu$ l を混合し PCR を行った。hCaludin-2 クローニング用のプライマーは、Forward primer (5' -ataagaattcggcgcgcaatggcctctcttggcctcca-3' )、Reverse primer (5' -ggaattctcacacataccctgtcaggc -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 Not I と EcoR 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 Not I、EcoR I サイトを制限酵素 Not I、EcoR 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によりコンピテントセル DH-5  $\alpha$  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 (-) -hCL2 を得た。

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  $\mu$ l、10 x PCR buffer for KOD plus 2  $\mu$ l、2.5 mM MgSO<sub>4</sub> 1  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 1.6  $\mu$ l、滅菌精製水 9.9  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l Takara kod plus 0.4  $\mu$ l を混合し PCR を行った。hCaludin-4 クローニング用のプライマーは、Forward primer 5' -gctagcatcatggcctocatggggctaca-3 )、Reverse primer (5' -ccaagcttttacacgtagttgctggcag-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 Hind III 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 Hind III サイトを制限酵素 Nhe I、

HindIII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  $\alpha$  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。

pcDNA3.1 (-) -hCL5 を作製するにあたり、hCL5 の cDNA フラグメントとして pFastBac-hCL5 を用い、pFastBac-hCL5 をテンプレートとして PCR 法により hCL5 領域を増幅した。pFastBac1-hCL5 溶液 (0.1 mg/ml) 1  $\mu$ l、10 x PCR buffer for KOD plus 2  $\mu$ l、2.5 mM MgSO<sub>4</sub> 1  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 1.6  $\mu$ l、滅菌精製水 9.9  $\mu$ l、5 U/ $\mu$ l Takara KOD-plus 0.4  $\mu$ l 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' - ggaattcgaaatggggtccgcagcgtt -3')、Reverse primer (5' - ggggtacctcagacgtagttcttct -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 EcoRI、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によりコンピテントセル DH5  $\alpha$  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、sense primer として T7 promoter primer (5' -caggaaacagctatgac-3')、anti-sense primer として T7 terminator primer (5' - gtaaatgaatttctgtatgag g-3') を用い、シーケンス解析を (株) ジーンデザインに依頼した。シーケンスマッチングしたクローンを pcDNA3.1 (-) -hCL5 として得た。

#### B. 2.2 hCL1, 2, 4, 5 発現 HT1080 細胞の作製

培養用 6 穴プレートに 8  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well の濃度でヒト繊維芽細胞株 HT1080 細胞を播種し、37°C 5% CO<sub>2</sub> 環境下で 12 時間培養した。作製した pcDNA3.1 (-) -hCL1, 2, 4, 5 plasmid 2  $\mu$ g をそれぞれ Opti-MEM1 (GIBCO) 100  $\mu$ l と FuGENE® HD

Transfection Reagent (Roche) 4  $\mu$ 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  $\phi$  dish に希釈し播種した。翌日に G418 二硫酸塩溶液 (nacalai tesque) が 600  $\mu$ g/ml となるように加え、5 日間、37°C 5% CO<sub>2</sub> 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, 2, 4, 5 発現細胞における各種 hCL 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 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  $\mu$ 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)、rabbit anti claudin-2 (ZYMED)、mouse anti claudin-4 (ZYMED)、もしくは rabbit anti claudin-5 (ZYMED) 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) もしくは 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 claudin-1, 2, 4, 5 蛋白質の検出を行った。

### B. 3 抗 hCL2 抗体産生マウスの作製

#### B. 3.1 マウスへの hCL2-BV 免疫

hCL2-BV とアジュバントである TiterMax Gold(フナコシ)とを等量で混合し、エマルジョンを調製した。7 週齢の雄性 CL2 ノックアウトマウス(神戸大学医学系研究科古瀬幹夫博士より供与)に 2 週間 1 回、計 3 回用時調整した hCL2-BV 0.6 mg を皮下および筋肉投与し、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 × 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 ELISA 法による血清中抗 hCL2 抗体産生確認

96 well ELISA plate に 0.5 μg/50 μl TBS/well の WT および hCL2-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 回洗浄し、4% Block Ace で常温 2 時間ブロッキングした。PBS で 3 回洗浄し、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 で三回洗浄し、40,000 倍希釈した HRP/anti-mouse IgG monoclonal antibody (Sigma) を 100 μl 添加し常温 1 時間培養した。T-PBS で五回洗浄した後、TMB 試薬 100 μl を添加し、約 2 分間反応後、2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 μl 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. 4 hCL2 免疫 scFv 提示ファージライブラリ作製用 cDNA の合成

#### B. 4.1 hCL2-BV 免疫マウス脾臓からの mRNA の精製と cDNA の合成

hCL2-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 47.2 μl を利用し、SuperScript III First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用いることで 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 μl、10 × PCR buffer 2.5 μl、dNTP mix 2 μl、10 μM primers 1 μl、滅菌精製水 18.4 μl、5 U/ml Takara ExTaqTM 0.1 μl 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'-accacctggtgctcagtga-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 hCL binder のスクリーニング(1)

#### 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 = 0.05-0.1 となるように添加し、37 °C で OD600 = 0.4-0.6 となるまで培養した。次に M13K07 helper phage (Invitrogen) を OD = 8 × 10<sup>8</sup> (cells/ml) × 25 (ml) ÷ 10<sup>11</sup> (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 × g で 10 分間遠心し、ペレットを回収した。100 μg/ml ampicillin sodium, 50 μg/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 × g で 10 分間遠心分離し、その上清を回収した後、さらに 15660 × 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 × 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 パンニングおよび WT-BV サブトラクション

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  $\mu$ l を添加した。さらに NTE buffer 500  $\mu$ 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。この操作を三回繰り返した後、ファージ溶液 50  $\mu$ l および 2% Block Ace 50  $\mu$ l 混合液を添加し、常温で 1 時間転倒混和した。0.1% T-PBS 500  $\mu$ 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。この操作を五回繰り返した後、1 mg/ml 3  $\times$  FLAG peptide (SIGMA) 100  $\mu$ l 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た。さらに 96 well ELISA plate (greiner bio-one) に 0.5  $\mu$ g/well/100  $\mu$ l TBS の WT-BV を 4°C で一晩静置することで固相化した。翌日、PBS で 3 回洗浄した後、4% Block Ace 200  $\mu$ l を添加し、常温で 2 時間静置しブロッキングした。また、scFv ファージライブラリ 100  $\mu$ l と 4% Block Ace 50  $\mu$ 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 ELISA plate を PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージ溶液を 100  $\mu$ l 添加し、常温で 250 rpm、2 時間振盪培養した。上清をファージ溶液として回収した。また、残りのファージ溶液 100  $\mu$ l を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.4-0.6 に調整) 300  $\mu$ 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 1 枚に播種し、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% 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 hCL-BV に対するパンニング

B. 5. 2 において冷凍保存した TG1 グリセロールストックから、ファージ溶液を作製した。0.5  $\mu$ g/well/100  $\mu$ l TBS の hCL1-BV または hCL2-BV を 96 well ELISA

plate 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 well を 3 回洗浄した後、4% Block Ace 200  $\mu$ l を添加し、常温で 2 時間静置し、ブロッキングした。また、scFv ファージライブラリ 100  $\mu$ l と 4% Block Ace 25  $\mu$ 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 ELISA plate を PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージ溶液を 100  $\mu$ l 添加し、常温で 250 rpm、2 時間振盪培養した。その後、0.1% T-PBS で 5 回洗浄し、20 mM glycine-HCl (pH 2.0) を 100  $\mu$ l 添加し、4°C、10 分間作用させることで hCL1-BV または hCL2-BV に結合しているファージを解離させ、上清を 1 M Tris-HCl 50  $\mu$ l を加えたエッペンに回収した。さらに ELISA plate に 20 mM glycine-NaOH (pH 11.0) を 100  $\mu$ l 添加し、4°C、10 分間作用させ、上清を同じエッペンに回収し、ファージ溶液となった。ファージ溶液 200  $\mu$ l を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.4-0.6 に調整) 200  $\mu$ 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 2 枚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% 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。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. 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  $\mu$ 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  $10^8$ - $10^{11}$  倍に希釈した。希釈ファージ 100  $\mu$ l を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.4-0.6 に調整) 300  $\mu$ 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  $\mu$ l 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 BV ELISA

96 well ELISA plate に 0.5  $\mu$ g/50  $\mu$ l TBS/well の WT または hCL2-BV および 0.125  $\mu$ g/50  $\mu$ l 炭酸 buffer (pH9.6)/well の FLAG tag 抗体 (SIGMA) 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 回洗浄し、4% Block Ace で常温 2 時間ブロッキングした。PBS で 3 回洗浄し、4% Block Ace を 20  $\mu$ l/well、さらに作製したモノクローン化ファージを 100  $\mu$ l/well 添加し、常温で 250 rpm、2 時間振盪培養した。その後、0.05% T-PBS で三回洗浄し、3,000 倍希釈した anti M13-HRP mAb (Invitrogen) 溶液を 100  $\mu$ l 添加し、常温で 250 rpm、1 時間振盪培養した。0.05% T-PBS で五回洗浄した後、TMB 試薬 100  $\mu$ l を添加し、約 5 分間反応後、2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100  $\mu$ 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. 6 抗 hCL1 抗体産生マウスの作製

#### B. 6.1 gp64 トランスジェニックマウスへの hCL1-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 hCL1-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. 6.2 FACS 解析による血清中抗 hCL1 抗体産生確認

hCL1 発現 HT1080 細胞を  $5.0 \times 10^5$ /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 (Miltenyi Biotec) を加え、FACS Calibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

### B. 7 hCL1 免疫 scFv 提示ファージライブラリの作製

#### B. 7.1 hCL1 免疫マウス脾臓からの mRNA の精製と cDNA の合成

hCL1-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. 7.2 合成 cDNA における GAPDH の発現確認

B. 7.1 で合成した cDNA を用い、GPDH の発現確認を行った。cDNA 溶液 1  $\mu$ l、10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ l、dNTP mix 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M primers 1  $\mu$ l、滅菌精製水 18.4  $\mu$ l、5 U/ml Takara ExTaqTM 0.1  $\mu$ 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'-accacctggtgctcagtga-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. 8 hCL binder のスクリーニング (2)

#### B. 8.1 scFv ファージライブラリの FLAG resin パンニング

グおよび hCL2-BV,hCL4-BV,hCL5-BV によるサブトラクション

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  $\mu$ l を添加した。さらに NTE buffer 500  $\mu$ 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。この操作を三回繰り返した後、ファージ溶液 50  $\mu$ l および 2% Block Ace 50  $\mu$ l 混合液を添加し、常温で1時間転倒混和した。0.1% T-PBS 500  $\mu$ 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。この操作を五回繰り返した後、1 mg/ml 3 $\times$  FLAG peptide(SIGMA) 100  $\mu$ l 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た。さらに 96 well ELISA plate (greiner bio-one)に 3.3  $\mu$ g/well/100  $\mu$ l TBS ずつ hCL2-BV,hCL4-BV,hCL5-BV(計 10  $\mu$ g/well/100  $\mu$ l の BV)を4°Cで一晩静置することで固相化した。翌日、PBSで3回洗浄した後、4% Block Ace 200  $\mu$ l を添加し、常温で 2 時間静置しブロッキングした。また、scFvファージライブラリ 100  $\mu$ l と4% Block Ace 50  $\mu$ 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 ELISA plate を PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージ溶液を 100  $\mu$ l 添加し、常温で 250 rpm、2 時間振盪培養した。上清をファージ溶液として回収した。また、残りのファージ溶液 100  $\mu$ l を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.4-0.6 に調整) 300  $\mu$ 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 1 枚に播種し、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%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. 8. 2 scFv ファージライブラリの hCL1-BV によるパンニング

B. 8. 1 において冷凍保存した TG1 グリセロールストックから、ファージ溶液を作製した。0.5  $\mu$ g/well/100  $\mu$ l TBS の hCL1-BV を 96 well ELISA plate 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 well

を 3 回洗浄した後、4% Block Ace 300  $\mu$ l を添加し、常温で 2 時間静置し、ブロッキングした。また、scFv ファージライブラリ 100  $\mu$ l と4% Block Ace 25  $\mu$ 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 ELISA plate を PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージ溶液を 100  $\mu$ l 添加し、常温で 250 rpm、2 時間振盪培養した。その後、0.1% T-PBS で五回洗浄し、20 mM glycine-HCl (pH 2.0) を 100  $\mu$ l 添加し、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、上清を 1 M Tris-HCl 50  $\mu$ l を加えたエッペンに回収した。さらに ELISA plate に 20 mM glycine-NaOH (pH 11.0)を 100  $\mu$ l 添加し、4 °C、10 分間作用させ、上清を同じエッペンに回収し、ファージ溶液となった。ファージ溶液 200  $\mu$ l を大腸菌 TG1 (OD600 = 0.3-0.6 に調整) 200  $\mu$ 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 2 枚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%となるように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. 8. 3 hCL1 結合性 scFv のシークエンス解析

hCL1 結合性を示したクローンの TG1 グリセロールストックを 2YTGA 培地 3mL ずつに入れ、37°Cで一晩培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用いて精製し、30  $\mu$ l の SP 水で溶出した。エッペンに、プラスミド 10  $\mu$ l、Nco I ,Not I 各 4  $\mu$ l、10 $\times$  NEB3、10 $\times$  BSA 各 3  $\mu$ l、SP 水 6  $\mu$ l を混合し、37°Cで 2 時間静置した。その後、1%アガロースゲル、TAE 電気泳動(100V、25 分)により、scFv の挿入を確認した。

残りの培養液に 2YTGA 培地 12ml を加え、37°Cで一晩培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用いて精製し、合計 60  $\mu$ l の SP 水で溶出した。精製した phagemid 3  $\mu$ l (300-600ng) とプライマー 6.4mol(forward primer:pY03 s-1,reverse primer:pY03AS-1 の合計)を混合し、SP 水で合計 14  $\mu$ l になるよう希釈し、株式会社ファスマックにシークエンス解析を委託した。

## B. 9 抗 hCL4 抗体産生マウスの作製

### B. 9. 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、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### B. 9. 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  $5.0 \times 10^5/\text{sample}$  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 (Miltenyi Biotec) を加え、FACS Calibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

## B. 10 hCL4 免疫 scFv 提示ファージライブラリの作製

### B. 10. 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. 10. 2 合成 cDNA における GAPDH の発現確認

B. 10. 1 で合成した cDNA を用い、GAPDH の発現確認を行った。cDNA 溶液 1  $\mu\text{l}$ 、10 x PCR buffer 2.5  $\mu\text{l}$ 、dNTP mix 2  $\mu\text{l}$ 、10  $\mu\text{M}$  primers 1  $\mu\text{l}$ 、滅菌精製水 18.4  $\mu\text{l}$ 、5 U/ml Takara ExTaqTM 0.1  $\mu\text{l}$  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' -accacctggtgctcagtga-3' とした。PCR の条件は、 $94^{\circ}\text{C}$  5 min の後、 $94^{\circ}\text{C}$  30 sec,  $55^{\circ}\text{C}$  15 sec,  $72^{\circ}\text{C}$  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. 11 hCL binder のスクリーニング (3)

### B. 11. 1 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  $2 \times 10^6$  cells in 1 ml Tyrode's buffer にファージ液 100  $\mu\text{l}$  を加え、 $4^{\circ}\text{C}$  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  $2 \times 10^6$  cells のペレットを、さきほど得られたファージ液で懸濁し、 $4^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  は TG1 と混合後、培養し、LAG plate に播種した。 $37^{\circ}\text{C}$ ・overnight で colony を回収してグリセロールストックを作製した。

### B. 11. 2 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 ( $1.5 \times 10^5$  cells/200  $\mu\text{l}$ /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  $\mu\text{l}$  + blocking buffer 20  $\mu\text{l}$ ) を加えて  $4^{\circ}\text{C}$  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  $\mu$ 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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  $\mu$ l/50  $\mu$ 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  $\mu$ l + 4 % B.A. 20  $\mu$ 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  $\mu$ l 加えて、室温で 1 時間置き、T-PBS で 3 回洗浄した。TMB 100  $\mu$ l で反応させ、十分に発色したところで H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100  $\mu$ l で反応を止め、OD450 を測定した。

## B. 12 scFv ライブラリの作製

### B. 12. 1 scFv ファージライブラリの構築 (CL2 欠損マウス、hCL2-BV)

hCL2-BV を免疫した CL2 遺伝子欠損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  $\mu$ l を鋳型として forward primer set 2  $\mu$ l、reverse primer set 2  $\mu$ l、PCR buffer 5  $\mu$ l、dNTP 5  $\mu$ l、MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、DMSO 1  $\mu$ l、KOD-plus 1  $\mu$ 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  $\mu$ l、dNTP 5  $\mu$ l、MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、DMSO 1  $\mu$ l、KOD-plus 1  $\mu$ 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'-ggccagctttggagccttttttggagattttcaacgtgaaaaaatt

atttattogcaattccttagtgttctcttctatgcgcccccagccggccatggcc-3') 0.4  $\mu$ l、Nco I サイトを有する Y16 primer (5'-ttagtaaagaattttctgtatgaggttttgctaaacaactttcaacagtctatgcggaacggttccacggatccggatagcgacacogcgccacctgcccgc-3') 0.4  $\mu$ l、PCR buffer 5  $\mu$ l、dNTP 5  $\mu$ l、MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、DMSO 1  $\mu$ l、KOD-plus 1  $\mu$ 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  $\alpha$  を 1  $\mu$ g、scFv 遺伝子を 0.8  $\mu$ 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形質導入した。その後、100  $\mu$ 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、scFv ライブラリとした。

### B. 12. 2 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、hCL1-BV)

hCL1-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  $\mu$ l を鋳型として forward primer set 2  $\mu$ l、reverse primer set 2  $\mu$ l、PCR buffer 5  $\mu$ l、dNTP 5  $\mu$ l、MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、DMSO 1  $\mu$ l、KOD-plus 1  $\mu$ 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

$\mu\text{l}$ 、dNTP 5  $\mu\text{l}$ 、 $\text{MgSO}_4$  2  $\mu\text{l}$ 、DMSO 1  $\mu\text{l}$ 、KOD-plus 1  $\mu\text{l}$  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'-ggccagcctttggagcctttttttggagattttcaacgtgaaaaaatt atttattcgcaattccttttagttgttcctttctatgcgccagccggccat ggcc-3') 0.4  $\mu\text{l}$ 、Nco I サイトを有する Y16 primer (5'-ttagtaaatgaattttctgtatgaggttttctaaacaactttcaacag tctatgcgccagcgcggttccacggatccggatacggcaccggcgcacct gcggccgc-3') 0.4  $\mu\text{l}$ 、PCR buffer 5  $\mu\text{l}$ 、dNTP 5  $\mu\text{l}$ 、 $\text{MgSO}_4$  2  $\mu\text{l}$ 、DMSO 1  $\mu\text{l}$ 、KOD-plus 1  $\mu\text{l}$  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  $\alpha$  を 1  $\mu\text{g}$ 、scFv 遺伝子を 0.8  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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、hCL1-BV 免疫 gp64Tg ライブラリとした。

### B. 12.3 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)

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  $\mu\text{l}$  を鋳型として forward primer set 2  $\mu\text{l}$ 、reverse primer set 2  $\mu\text{l}$ 、PCR buffer 5  $\mu\text{l}$ 、dNTP 5  $\mu\text{l}$ 、 $\text{MgSO}_4$  2  $\mu\text{l}$ 、DMSO 1  $\mu\text{l}$ 、KOD-plus 1  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$ 、dNTP 5  $\mu\text{l}$ 、 $\text{MgSO}_4$  2  $\mu\text{l}$ 、DMSO 1  $\mu\text{l}$ 、KOD-plus 1  $\mu\text{l}$  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'-ggccagcctttggagcctttttttggagattttcaacgtgaaaaaatt atttattcgcaattccttttagttgttcctttctatgcgccagccggccat ggcc-3') 0.4  $\mu\text{l}$ 、Nco I サイトを有する Y16 primer (5'-ttagtaaatgaattttctgtatgaggttttctaaacaac tttcaacagtctatgcgccagcgcggttccacggatccggatacggcaccg gcgcacctgcggccgc-3') 0.4  $\mu\text{l}$ 、PCR buffer 5  $\mu\text{l}$ 、dNTP 5  $\mu\text{l}$ 、 $\text{MgSO}_4$  2  $\mu\text{l}$ 、DMSO 1  $\mu\text{l}$ 、KOD-plus 1  $\mu\text{l}$  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  $\alpha$  を 1  $\mu\text{g}$ 、scFv 遺伝子を 0.8  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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. 12.4 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 (2-YT BROTH,

Invitrogen) 培地 2 ml で一晚培養した。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。この洗浄作業を三回繰り返した後、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  $\mu$ l とライゲーション産物 1  $\mu$ 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<sup>®</sup> (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  $\mu$ 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  $\mu$ l を 100  $\mu$ g/ml ampicilin sodium を添加した 2YTG (2YTGA) 培地で  $10^2$ - $10^6$  倍希釈し、ペトリフィルム (3M Microbiology Products) に播き、37°C で一晚培養後、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  $\mu$ 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. 12.5 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 で一晚培養した。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、primer として pY03'-S-1 (5' - caggaaacagctatgac-3') を用い、シーケンス解析を行った。

### C. 研究結果

#### C. 1 各種 hCL 発現 BV の作製

hCL2 免疫ライブラリの作製、および hCL1 binder の結合特異性を確認するため、BV 膜上に hCL2 を発現させた BV (hCL2-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、hCL2 DNA を組み込んだ pFastBac-hCL2 を作製した。

作製した pFastBac-hCL2 の hCL2 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、hCL2-BV 作製の bacmid DNA (hCL2-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 hCL2-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 hCL2-BV を供した Western Blot 法により、hCL2-BV における hCL2 の発現解析を行った結果、hCL2 の発現が確認できた (Figure 1)。なお、ポジティブコントロールとして mCL2 発現 L (mCL2/L) 細胞を用いた。

続いて、hCL1 binder のスクリーニングのため、hCL1 発現 BV (hCL1-BV) の作製を行った。さらに、hCL1 binder の CL 結合特異性を確認するため、hCL4、hCL5 発現 BV (hCL4-BV, hCL5-BV) の作製を行った。hCL2-BV の作製と同様に、各種 hCL を組み込んだ bacmid DNA を作製し、Sf9 細胞に bacmid DNA をトランスフェクションすることにより、hCL1, 4, 5 発現 BV (hCL1-BV, hCL4-BV, hCL5-BV) を得た。各種 hCL 発現 BV の CL 発現確認のため Western Blot 法を行った結果、それぞれの BV において CL の発現が確認された (Figure 2, 3 and 4)。

#### C. 2 各種 hCL 発現 HT1080 細胞の作製

細胞膜表面上に発現している hCL1 に対する binder を取得するため、膜表面上に hCL1 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 hCL1 の DNA の挿入を行った。次に、得られた pcDNA3.1(-)-hCL1 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 hCL1 発現細胞のセクションを行った。クローニングした hCL1 発現 HT1080 細胞 (HT1080/hCL1) の hCL1 発現は、Western Blot 法により確認できた (Figure 5)。

続いて、hCL1 binder のスクリーニングにおいて、CL 結合特異性を確認するために使用する、hCL2、

hCL4, hCL5 発現 HT1080 ( HT1080/hCL2, HT1080/hCL4, HT1080/hCL5 ) の作製を行った。HT1080/hCL1 の作製と同様に、pcDNA3.1(-)の T7 promoter の下流に hCL2, 4, 5 の DNA をそれぞれ挿入した。次に、得られた pcDNA3.1(-)-hCL2, 4, 5 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 hCL2, 4, 5 発現細胞のセレクションを行った。クローニングした各種 CL 発現 HT1080 における CL の発現を Western Blot 法により確認したところ、それぞれの CL において発現が確認された (Figure 6, 7, 8)。

### C. 3 CL2 KO マウスへの hCL2-BV の免疫

7 週齢の雄性 CL2 ノックアウトマウスに hCL2-BV 0.6 mg とアジュバント TiterMax Gold と等量混合し調製したエマルジョンを免疫スケジュールに従い、皮下および筋肉投与した (Figure 9A)。3 回免疫を行った後、マウスより血清を回収し、それをを用いて抗体産生を確認した。ELISA による解析から、hCL2 抗体の産生が確認された (Figure 9B)。

### C. 4 hCL2 免疫 scFv ライブラリ作製用 cDNA の合成

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。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 (Figure 10)。

### C. 5 hCL binder のスクリーニング (CL2 欠損マウス、hCL2-BV 利用ライブラリ)

作製した scFv 提示ファージライブラリに hCL binder が含まれているかを確認するため、予備実験として hCL2 binder のスクリーニングを行った。作製した scFv 提示ファージライブラリの多様性を調べたところ、FLAG を提示しないファージが確認された。そこで、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。回収したファージを hCL2-BV を固相化した ELISA plate に添加した後、結合したファージを回収し、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 hCL2-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。しかしながら、パンニングの濃縮率の推移を観察すると顕著な濃縮傾向が観察されなかった (Figure 11A)。パンニングを繰り返すことで hCL2-BV 結合性ファージが濃縮されることが期待されるが、パンニングを過剰に繰り返すことで非特異的な吸着が増加することが報告されているため、今回の検討ではこれ以上のパンニングを繰り返さないことにした。

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 hCL2 結合性を確認した結果、hCL2-BV に対して結合性を有するクローンが複数観察された (Figure 11B)。hCL2 への結合性が見られた 17 クローンに関して CL 結合特異性を確認するため、hCL1-BV、hCL4-BV、hCL5-BV に対する結合性を検討した。その結果、すべてのクローンに対して、結合性が見られた (Figure 12)。今回の CL 結合性検討において、WT-BV における結合性も高く見られたことから、得られた hCL2 binder は、BV 由来の膜蛋白質 gp64 を認識する可能性が高いと予想された。

この問題点を解決するため、FLAG resin パンニングの後、さらに WT-BV 結合性ファージを除くためのサブトラクションパンニングを行った。その後、hCL2-BV によるパンニング操作を行った。その結果、パンニングにより濃縮率が向上した (Figure 13)。従って、hCL1 binder をスクリーニングする際にも、WT-BV でのサブトラクションのパンニングが必要であると考えられる。

上記の検討から、作製した scFv 提示ファージライブラリに hCL binder が含まれていることが確認できたため、hCL1 binder のスクリーニングを行うことにした。ライブラリ中に WT-BV に結合性を示すものが多く存在することが判明したため、hCL1 binder のスクリー

ニングに際し、WT-BV によるサブトラクションパンニングを行った。その後、hCL1-BV によるパンニング操作を行ったところ、濃縮率の向上が確認された (Figure 14)。

#### C. 6 hCL1 発現 BV の作製

hCL1 免疫ライブラリの作製、および hCL1 binder の結合特異性を確認するため、BV 膜上に hCL1 を発現させた BV (hCL1-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、hCL1-DNA を組み込んだ pFastBac-hCL1 を作製した。作製した pFastBac-hCL1 の hCL1 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、hCL1-BV 作製用の bacmid DNA (hCL1-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 hCL1-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 hCL1-BV を供した Western Blot 法により、hCL1-BV における hCL1 の発現解析を行った結果、hCL1 の発現を確認した (Figure 15)。なお、ポジティブコントロールとして hCL1 発現 HT1080 細胞 (hCL1/HT1080) を用いた。

#### C. 7 gp64 トランスジェニックマウスへの hCL1-BV の免疫

雌性 gp64 トランスジェニックマウスに hCL1-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、hCL1 抗体の産生が確認された (Figure 16)。

#### C. 8 hCL1 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 (Figure 17)。

#### C. 9 hCL1 binder のスクリーニング (gp64 トランスジェニックマウス、hCL1-BV 利用ライブラリ)

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。また hCL1 特異的な結合性ファージを取得するため、回収したファージを hCL2, hCL4, hCL5-BV を固相化した ELISA plate 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。その後再び調製したファージを hCL1-BV に作用させた。このサイクルを繰り返すことで hCL1-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 3 round 後には顕著な濃縮傾向が観察された (Figure 18)。

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 hCL1 結合性を確認した結果、hCL1-BV に対して結合性を有するクローンが複数観察された (Figure 19)。hCL1 への結合性が見られた 9 クローンに関して CL 結合特異性を確認するため、hCL2-BV、hCL4-BV、hCL5-BV に対する結合性を検討した。その結果、2 つのクローンは hCL1 特異的に結合した。7 つのクローンはすべての CL-BV に結合性を示した。 (Figure 20)。

hCL1 への結合性が見られた 9 クローンに関して、酵素処理を行い、電気泳動による scFv 挿入の確認を行った結果、すべてのクローンで scFv と思われる 750bp 付近のバンドが観察された。そこで、9 クローンすべてのシーケンス解析を行った結果、1 クローンは VH 領域に変異があり配列を特定することは出来なかったが、残り 8 クローンから 6 つのユニークな配列を同定することが出来た。その内、1 つの配列は hCL1-BV 特異性を示唆したクローンの配列である。 (Table 1)

### C. 10 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 (Figure 21)。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. 11 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 (Figure 22)。

### C. 12 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. 13 hCL1 binder のスクリーニング (gp64 トランスジェニックマウス、hCL4-BV 利用ライブラリ)

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 (Figure 23)。

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 (Figure 24)。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。(Figure 25)。

### C. 14 scFv ファージライブラリの構築 (CL2 欠損マウス、hCL2-BV)

hCL2-BV を抗原として免疫した CL-2 遺伝子欠損マウスから脾臓を摘出し、total RNA を抽出後、mRNA を精製し、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型にして重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) を PCR により増幅した。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。構築したライブラリのサイズは  $8.2 \times 10^5$  CFU であった。

### C. 15 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、hCL1-BV)