

ラットリンパ節法の実際:その2(つづき)

ラットリンパ節法を用いた抗ヒトIV型コラーゲン 6鎖抗体の作製

第1回目報告(抗原注射から陽性癒合細胞の確認まで):2005年4月12日

第2回目報告(新抗原注射から陽性癒合細胞の確認まで):2005年5月23日

重井医学研究所免疫部門 佐渡義一

前回はマウス4型コラーゲン 2鎖に対する抗体の作製を報告いたしましたが、今回はヒト4型コラーゲンの 6鎖に対する抗体作製の過程をご覧ください。モノクローナル抗体を作製している方、したことがある方、これからと考えている方には大変に参考になると思います。モノクローナル抗体が研究にとって重要な道具であることは理解していても、どうしても抗体作製に踏みきれない方の後押しになれば幸いです。

4型コラーゲンは基底膜の主要なコラーゲンです。鎖が6種類あり、1鎖から6鎖と名前がついています。同一の遺伝子から分化してきたのでこれらの鎖はよく似た配列を持っています。これを識別するには鎖に特異的なモノクローナル抗体を作製することが必要です。重井医学研究所では、すでに研究用にはこれらを識別するモノクローナル抗体を開発し終えています。しかし、今回作製を試みる6鎖に関しては分子の表面に出ている抗原決定基に対する抗体がありません。このため凍結腎臓切片を染色する場合は切片を酸性処理するなどの変性処理を行う必要があります。この処理が必要なため染色に手間と、時間と、技術が必要になっています。この点を解消する抗体を作製するのが今回の目的です。

【目的】凍結切片のヒトIV型コラーゲン 6鎖を染色する抗体の作製、以下の条件を満たすもの

- ・凍結切片の染色は酸性処理を必要としない。エピトープが表面に出ている。
- ・染色にブロッキングを必要としない。
- ・エピトープが限定されている(明らかな抗 6鎖抗体)。
- ・FITC 標識して直接法で染色できるようにする。二重染色用に利用する。

【用いた抗原】2種類用意した。(抗原が1種類だと抗体作製に失敗した場合、時間的ロスが大きいので通常は2種類の抗原を用意する。)これらのうち、初回はA615合成ペプチド抗原を用いた場合を中心に記す。これらの抗原はヒトの配列をもつ。配列がラットと異なることから抗原が免疫寛容になっていないと考えられる。

抗原1:A614合成ペプチド AcIPSPRRPMSNLWLKC

(14アミノ酸残基、ヒト 6(IV)鎖の imperfection XVIII+システイン)。カスタム合成、費用 31,500円。この配列はラット配列とは赤文字で示した4アミノ酸残基が異なる。

抗原2:A615合成ペプチド AcPSPEFETETLHNKESC

(15 アミノ酸残基、ヒト 6 (IV) 鎖の imperfection VIII+システイン)。カスタム合成、費用 31,500 円。この配列はラット配列とは赤文字で示した 11 アミノ酸残基が異なる。同じ 6 鎖において種間でこれほど異なる部位は珍しい。

【抗原免疫】 合成ペプチド A614 と合成ペプチド A615 をそれぞれ KLH に結合し、FCA と共にエマルジョンを作製してそれぞれ 2 匹の WKY ラットに注射した。

【リンパ節の取り出し】 抗原投与 2 週間後に血清ならびにリンパ節を取り出した。

【細胞融合】 A615 を注射した 2 匹のラットのリンパ節を混合し、その半分を用いて細胞融合を行った。50% ポリエチレングリコールで融合、融合後細胞を 4 枚の 96 穴プレートにまいた。

【ラット血清中の抗体価】 ラット屠殺時(注射 2 週間後)の抗体価は図 1 のように、血清を 2560 倍希釈しても十分に陽性が確認できた。(希釈倍率が 10 倍から 40 倍にかけてエライザの発色が弱いがこれは血清の希釈が低い場合に見られる現象である。)抗体価は予定していた結果の範囲であったが高い方に属する。



図 1 抗原注射 2 週間後の血清中の抗体価

1 と 2 の列は A614 を注射したラットの血清を 10 倍から倍々希釈したもの。

3 と 4 の列は A615 を注射したラットの血清を 10 倍から倍々希釈したもの。

C は BSA を吸着させた対照。

【エライザアッセイ】 融合後 9 日目に A615 を吸着抗原にしてアッセイ。陽性ウエル数(OD が 0.5 を超えるもの)133 ウエルを検出した(図 2)。期待していたより、約 2 倍の陽性ウエルがあった。この数ならば 8 枚のプレートに播いた方が、クローニングのことを考えると良かったかもしれない。1 ウエルに 2 個の陽性融合細胞が存在している確率が高く、クローニングで 2 種類入っている可能性を考えながら作業を進めることから確認作業がすこし煩雑になる。

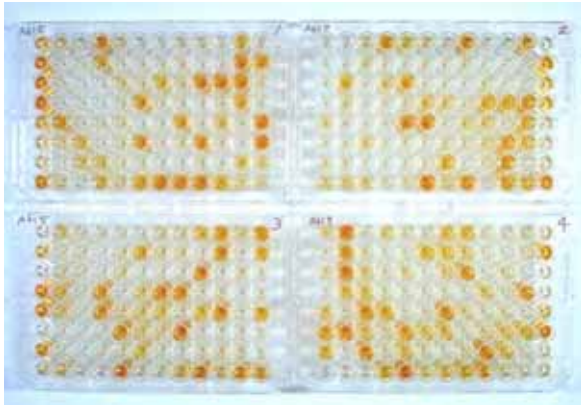


図2. 黄色に発色しているウエルに抗体を産生している融合細胞が存在している。

【ネイティブ スクリーニング】 エライザで陽性の抗体はあくまでも合成ペプチドと反応する抗体である。これらの抗体の中からヒトの生体の蛋白質と反応するものを選び出す必要がある。これがネイティブ スクリーニングである。

エライザでODの高い方から86ウエルの培養上清を用いてヒト腎臓凍結切片を染色した結果、陽性のウエルは0であった。残念ながらこの合成ペプチドは天然の6鎖蛋白質とは異なる構造をしていると考えられる。ネイティブ スクリーニングでこのようなことはよくあることである。このようなことで簡単に抗体作製をあきらめてはいけない。

染色を行った日は、今回用いた抗原が入荷してからちょうど5週間たったところである。この時点で抗体作製が成功かどうかの判断ができる。今回は有力な候補ウエルがないので、抗体作製の計画をもう一度練り直す必要がある。今回はみごとに切片陽性ウエルが0であることからこの抗原を用いた実験にはこれ以上期待できない。そこで、もう一つの抗原 A614 合成ペプチドを用いた実験に移行する。

ここまでの報告は成功事例ではないが、ラットリンパ節法の利点をよく、表現している。簡便さ、迅速性が感じられるとありがたい。次の抗原を用いた結果が出しだい報告したい。

(2005年4月12日 佐渡義一)

第2回目報告 (新抗原注射から陽性癒合細胞の確認まで): 2005年5月23日

第1回目報告ではペプチドと反応する抗体を産生する融合細胞は133ウエル見つかったが、ネイティブスクリーニングでは目的のウエルが見つからなかった。そこで、もう一つの抗原、抗原1: A614 合成ペプチド AcI**P**SP**R**RP**M**S**N**L**W**L**K**C を注射したラットのリンパ節を用いて細胞融合を行った。

【エライザアッセイ】 融合後 9 日目に A614 を吸着抗原にしてアッセイ。陽性ウエル数(OD が 0.5 を超えるもの)33 ウエルを検出した(図3)。期待の約半分の陽性ウエルであった。

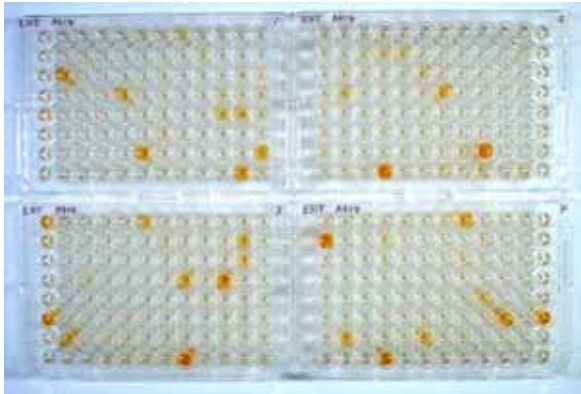


図3. 黄色に発色しているウエルに抗体を産生している融合細胞が存在している。

【ネイティブ スクリーニング】 エライザで陽性のウエルの培養上清を用いてヒト腎臓凍結切片を染色した結果、陽性のウエルは2個であった。しかし、この2個のウエルの染色強度は期待していたものより、明らかに薄く(図4)、実用に耐えないと判断した。残念ながらこの合成ペプチド A614 もまた、前回の A615 同様に天然の α 6 鎖蛋白質とは異なる構造をしていると考えられる。ネイティブ スクリーニングでこのようなことはよくあることである。このようなことで簡単に抗体作製をあきらめてはいけないが、この2種類の合成ペプチドでは目的の抗体を得ることは難しいと判断した。新しい合成ペプチドを注文して再度チャレンジするしかないと考えている。

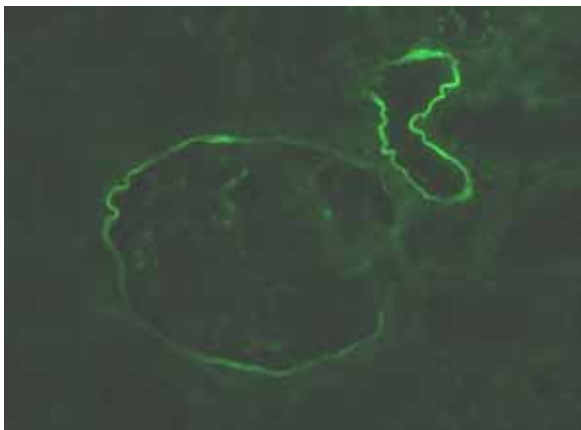


図4. ボウマン嚢基底膜と一部の尿細管基底膜が染色されていることからこの染色は明らかに α 6 鎖のパターンである。しかし、染色強度が不足である。(糸球体内の染色は非特異的なものであり、コントロール染色の切片でも認められた。)染色用抗体を作製するとき、染色強度が弱いことは日常茶飯事である。努力して染色強度が十分なものを作らなければいけない。

なぜモノクローナル抗体を作製しなければならないのか

今回の合成ペプチドを用いた実験から、なぜポリクローナル抗体ではなくモノクローナル抗体を作製しなければならないのかという疑問の回答の一つが得られる。

合成ペプチドを作製して動物に注射すると、合成ペプチドに対する抗体は必ずできる。私達の数十回に及ぶ経験では、合成ペプチドに対する血清中の抗体価はすべて十分上昇していた。しかし、ネイティブスクリーニングでモノクローナル抗体が得られるのは3割程度である。これは、合成ペプチドと天然の抗原の立体構造がかなり異なっているためと理解される。このことは、血清中のポリクローナル抗体は天然の蛋白質と反応しない抗体がほとんどであることを意味する。合成ペプチドの選択を誤ると動物をいくら追加免疫して抗体価を上げても、目的の抗体を作製できないことを示唆している。

逆に、合成ペプチドのポリクローナル抗体で切片染色ができた場合は合成ペプチドには天然の蛋白質を同じ立体構造が含まれているため、合成ペプチドをラットに免疫してモノクローナル抗体が確立できるチャンスがかなり高いことを意味する。モノクローナル抗体化することにより、実験系がすっきりして、再現性も高まる。急がば回れ。急がばモノクローナル抗体で。

以上