

網膜抗原の研究 (第1報)

—抗 IRBP モノクローナル抗体の作製—(図7)

阿部 徹・大坂 幸英 (秋田大学眼科)
山木邦比古・櫻木 章三

Production of Anti-IRBP Monoclonal Antibodies

Tohru Abe, Kouei Ohsaka, Kunihiko Yamaki,
and Shozo Sakuragi*Department of Ophthalmology, School of Medicine, Akita University*

要 約

ウシ網膜で免疫した Lewis ラット脾細胞と、マウスミエロマ細胞をポリエチレングリコール法で細胞融合させた。HAT 培地で選択し、ウシ IRBP に対し ELISA でスクリーニングし、限界希釈法によるクローニングで、2 クローン(TRA4, TRA5)の抗 IRBP ラットモノクローナル抗体が確立した。immunoblotting でウシおよびラット IRBP の両者が、モノクローナル抗体 TRA4および TRA5により、約140Kd の band として検出された。免疫組織学的に、ウシおよびラット網膜の両者における IRBP は、モノクローナル抗体 TRA4および TRA5により網膜外境界膜から網膜色素上皮先端部の間に検出された。精製したモノクローナル抗体 TRA4を標識し、モノクローナル抗体 TRA5との間に競合 ELISA を試みた。モノクローナル抗体 TRA4および TRA5は同一の抗原決定基に対応していた。(日眼 92:541-548, 1988)

キーワード: interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), モノクローナル抗体, immunoblotting, 免疫組織化学, Lewis ラット

Abstract

Spleen cells of Lewis rat previously immunized by bovine retina and mouse myeloma cells were fused by polyethylene glycol. Hybridomas were cultured with HAT medium and screened against bovine interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) by ELISA. Then hybridomas were cloned by the limiting dilution-culture method and 2 clones (TRA4, TRA5) of anti-IRBP monoclonal rat antibodies were established. In immunoblotting, both bovine and rat IRBP were detected as about 140Kd single bands by both monoclonal antibody TRA4 and TRA5. In immunohistochemical studies of the retina, both bovine and rat IRBP were detected from the retinal external limiting membrane to the apex of the retinal pigment epithelium by both TRA4 and TRA5. Competitive ELISA was between labelled monoclonal antibody TRA4 and native monoclonal antibody TRA5, against IRBP. Both monoclonal antibody TRA4 and TRA5 corresponded to an identical antigenic site. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 92: 541-548, 1988)

Key words: interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), monoclonal antibody, immunoblotting, immunohistochemistry, Lewis rat

別刷請求先: 010 秋田市本道 1-1-1 秋田大学医学部眼科学教室 阿部 徹 (昭和62年10月26日受付)

Reprint requests to: Michio Takagi, M.D. Dept. of Ophthalmol., Akita Univ. School of Med.

1-1-1 Hondo, Akita 010, Japan

(Accepted October 26, 1987)

I 緒 言

interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)は網膜 A 抗原と同一と考えられ¹⁾, 網膜可溶性成分に含まれる. この物質は, 網膜における vitamin A の代謝において重要な役割を持っており²⁾, ラット³⁾およびサル⁴⁾などに免疫することにより実験的自己免疫性ぶどう膜炎を発症させる. IRBP および IRBP による実験的自己免疫性ぶどう膜炎の詳細な研究に, 抗 IRBP モノクローナル抗体 (MAb) の必要性は大きい. 今回我々は, 抗 IRBP MAb を作製したので報告する.

II 方 法

1. IRBP の精製

IRBP の精製は, 望月ら⁵⁾の方法に準じておこなった. まず, ウシ網膜可溶性成分を50%硫酸で塩析し, 塩析物を Sephacryl S 300 (Pharmacia: Sweden) でゲルろ過した. 次に, 高野ら⁶⁾の方法に従い, 抗ウシ網膜可溶性成分ウサギ血清と double immunodiffusion で反応する150kilodaltons (Kd) 前後の gel filtration 分画を IRBP を含む分画とした. この分画を, Con-A Sepharose (Pharmacia) により, Adler ら⁷⁾の条件で chromatography をし, 精製 IRBP を得た. 精製 IRBP を, Laemmli⁸⁾の方法に準じ 7% gel で sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) し, 銀染色した⁹⁾.

ウシ網膜可溶性成分硫酸分画の一部は, 以下に述べる免疫にもちいた.

2. モノクローナル抗体作製

1) 免疫

ウシ網膜可溶性成分硫酸分画を等量の Freund 完全アジュバント (ヤトロソ) と混和し, その0.2ml (タンパク量1.0mg) を約12週齢, オスの近交系 Lewis ラット 1匹あたり (計5匹) の皮下に2週間間隔で計3回免疫した. すべてのラットが免疫後8日までに, 激しい実験的自己免疫性ぶどう膜炎を発症した.

2) 細胞融合

最終免疫後4日目のラット脾臓細胞 1×10^8 個と BALB/c マウス由来の P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) 株ミエローマ細胞¹⁰⁾ 3×10^7 個を混和し, 44.4% polyethylen glycol 1,000 (和光純薬) で細胞融合させた. 融合後, Dalbecco's modified Eagle medium (DMEM) (ニッスイ) に, ウシ胎児血清 (FCS) (Flow: Australia), ペニシリン G カリウム, 硫酸ストレプトマイ

シンおよび men non-essential amino acid (Gibco: USA) を加えた培地に細胞を浮遊させ, 96ウエルマイクロープレート (Costor: USA) に散布した.

細胞融合翌日より, hypoxanthine, aminopterin, thymidine (HAT) を含む培地を約7日間加え, ラット×マウス hybridomas を選択した.

3) 抗体産生 hybridomas のスクリーニング

抗原として, 精製ウシ IRBP (5 μ g/ml) を, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 用96ウエルマイクロープレートに coating した. bovine serum albumin で blocking 後, 細胞融合後約10日後の培養上清と反応させた. 第二抗体として, 2,000倍希釈の horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rat IgG rabbit serum (Dakopatts: Denmark), 基質として 0.003% H₂O₂, 1mg/ml 2,2'-Azino-bis (ABTS) を反応させ, 414nm の吸光度で判定した.

4) クローニング

スクリーニング後, 限界希釈法によるクローニングを2~3回おこない, 2クローン (TRA4, TRA5) が確立し, 培養上清を遠心して MAb を得た. feeder layer として生後4週前後の BALB/c マウスの胸腺細胞をもちいた. これまで述べた培養条件はすべて 5.0% CO₂, 37°C でおこなった.

3. 作製モノクローナル抗体の特異性の検討

1) immunoblotting

精製ウシ IRBP, ウシ網膜可溶性成分硫酸分画および Lewis ラット網膜可溶性成分をサンプルとして 7% gel で SDS-PAGE し, 0.45 μ m のニトロセルロース膜に非電氣的に転写した. 20% FCS で blocking したのち, ニトロセルロース膜上の抗原と MAb 培養上清原液と反応させ, 第二抗体として 200倍希釈の HRP-conjugated anti-rat IgG rabbit serum, 基質として 0.005% H₂O₂, 0.2mg/ml 3,3'-diaminobenzidine (DAB) を反応させ発色させた.

2) 免疫組織化学

ウシ網膜および Lewis ラット網膜を 3% パラホルムアルデヒドおよび 0.1% グルタルアルデヒドにて 4時間固定し, 洗浄後凍結切片を作製した. blocking 後, MAb 培養上清原液と反応させた. 第二抗体としての 500倍希釈 biotinylated-anti-rat IgG rabbit serum (Zymed: USA), 2 μ g/ml HRP-avidin D (Vector: USA) および DAB を反応させ発色させた.

3) モノクローナル抗体のタイピング

ラットモノクローナル抗体タイピングキット

(Miles : UK) を使用し, double immunodiffusion に より MAb TRA4 および TRA5 と抗ラット immunoglobulin (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}, IgM および IgA) の反応について検索した.

4) モノクローナル抗体 TRA4 の精製

MAb TRA4 の精製のため, 培養上清を50% 硫酸で塩析後, 0.01MPB pH 7.6 で透析し, あらかじめ0.01M PB pH 7.6 で平衡化したイオン交換ゲル DE52 (What-

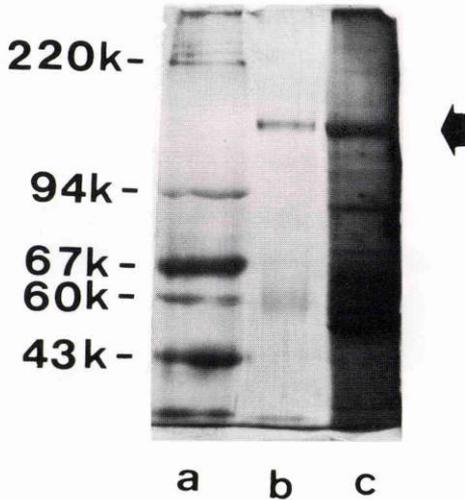


Fig. 1 7% gel SDS-PAGE of bovine IRBP. Lane a : molecular weight standards. Lane b : purified bovine IRBP. Lane c : salted out bovine retinal supernate. Arrow : bovine IRBP.

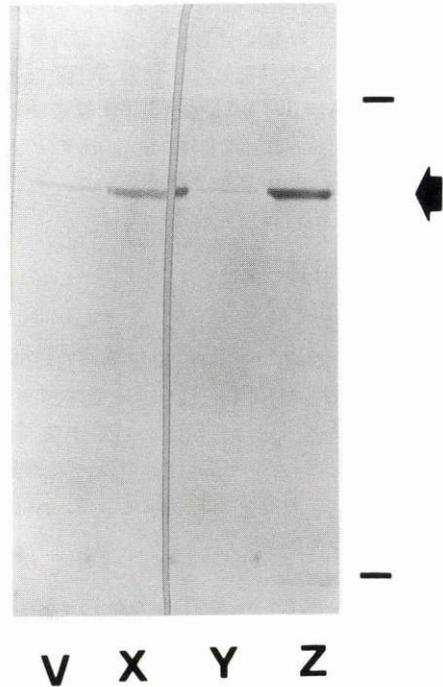


Fig. 2B

Fig. 2 Immunoblotting, antigen detected by monoclonal antibody TRA 4 or TRA 5. (A) Lane 1, 3 : purified bovine IRBP reacted with monoclonal antibody TRA 4 (lane 1) and TRA 5 (lane 3). Lane 2, 4 : salted out bovine retinal supernate reacted with monoclonal antibody TRA 4 (lane 2) and TRA 5 (lane 4). Arrow : bovine IRBP. (B) Lane V, Y : rat retinal supernate reacted with monoclonal antibody TRA 4 (lane V) and TRA 5 (lane Y). Lane X, Z : bovine retinal supernate reacted with monoclonal antibody TRA 4 (lane X) and TRA 5 (lane Z). Arrow : rat IRBP (lane V, Y), bovine IRBP (lane X, Z).

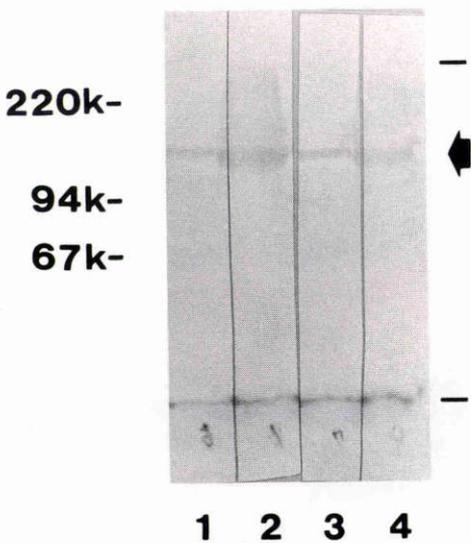


Fig. 2A

man : England) カラムに添加した. 添加後, 段階的溶出により, pass through の peak (分画 1), 0.01MPB 0.05M NaCl pH 7.6 による溶出の peak (分画 2) および, 1.6M 塩酸グアニジンによる溶出の peak (分画 3) をそれぞれ集めた. 分画 2 および分画 3 を0.01 MPB pH 7.6 で透析後, IRBP を抗原とする ELISA で各分画の抗体価を測定した. また各分画を10% gel で SDS-PAGE し, さらに anti-rat IgG により, immunoblotting をおこなった.

5) モノクローナル抗体の抗原決定基の検討

MAb TRA4 および TRA5 の IRBP における抗原決定基の検討を競合 ELISA でおこなった. まず橋本

ら¹¹⁾の方法に準じ、精製 MAb TRA4と N-hydroxy succinimidobiotin (Pierce:USA) を反応させ、ビオチン化 MAb TRA4を作製した。精製 IRBP を抗原とし、あらかじめ MAb TRA5を培養上清原液から3倍希釈で反応させ、plate を洗浄後、 $3\mu\text{g/ml}$ のビオチン化 MAb TRA4を plate に加え競合させた。その後、HRP-avidin D, ABTS で発色させた。

III 結 果

1. IRBP の精製

精製 ウシ IRBP は、SDS-PAGE 上、約140Kd に main band が認められた(Fig. 1)。ウシ眼球50個から、約4mg の IRBP が得られた。なお、IRBP と等量の Freund 完全アジュバントの混合物(タンパク量 $50\mu\text{g}$) を、Lewis ラットに免疫することによって、ぶどう膜炎が発症することを確認した。

2. immunoblotting

MAb TRA4および TRA5は、精製ウシ IRBP およびウシ網膜可溶性成分硫酸分画を抗原とした immunoblotting において、IRBP に相当する約140Kd の band と反応した(Fig. 2A)。Lewis ラット網膜可溶性成分を抗原とした immunoblotting において、ウシ IRBP とほとんど移動度の等しい band と反応した(Fig. 2B)。

3. 免疫組織化学

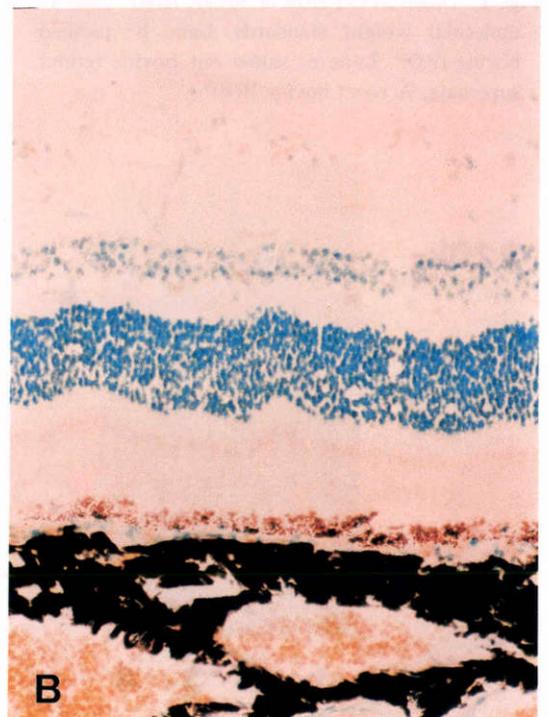
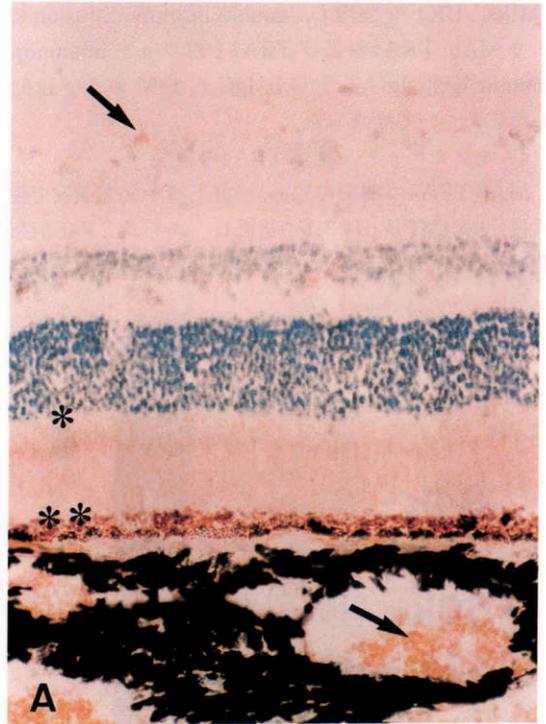
ウシ網膜に対する免疫組織学的検索で、MAb TRA4 および TRA5はいずれも、網膜外境界膜から網膜色素上皮先端部までと反応した(Fig. 3A)。色素の少ない部位では、視細胞外節と網膜色素上皮細胞との境界部で強い反応が認められた(Fig. 3C)。Lewis ラット網膜に対する免疫組織学的検索で、MAb TRA4および TRA5のいずれも、網膜外境界膜から網膜色素上皮先端部までと反応し、特に網膜色素上皮先端部で反応が強く、内節においてもやや強い反応が認められた(Fig. 4)。

4. モノクローナル抗体のタイピング

MAb TMA4および TRA5のいずれも、抗ラット IgG_{2a} とのみ反応した。

5. モノクローナル抗体 TRA4の精製

イオン交換ゲル DE52で chromatography をおこなった3分画について、IRBP に対し ELISA を検討したところ、pass through の peak (分画1) の抗体価が最も高かった。次に、分画1の10%gel の SDS-PAGE では、約55Kd と約28Kd の二つの主要な bands を形成



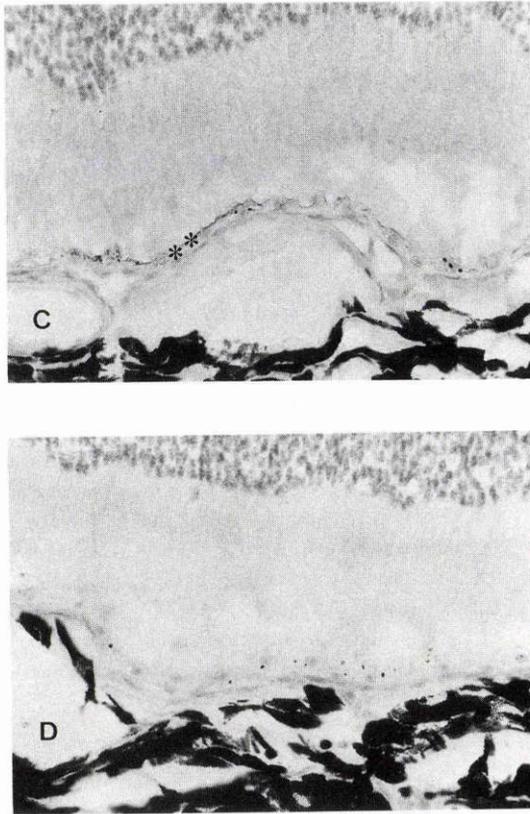


Fig. 3 Immunohistochemical studies of the bovine retina reacted with avidin-biotin-peroxidase complex technique. (A) Antigen detected by monoclonal antibody TRA 4, fixed with 3% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde, frozen section, stained with DAB and methylgreen, $\times 200$. Monoclonal antibody TRA 4 reacted from the external limiting membrane (*) to the apex of retinal pigment epithelium (**). Arrows: erythrocytes. Monoclonal antibody TRA 5 reacted identically. (B) P3U1 myeloma supernate control. (C) High magnification between the photoreceptor and retinal pigment epithelium, $\times 400$. Monoclonal antibody TRA 4 strongly reacted in the apex of retinal pigment epithelium (*). Monoclonal antibody TRA 5 reacted identically. (D) P3U1 myeloma supernate control.

もに染色された (Fig. 6). 以上から, 分画 1 を精製 MAb TRA4 として採取した.

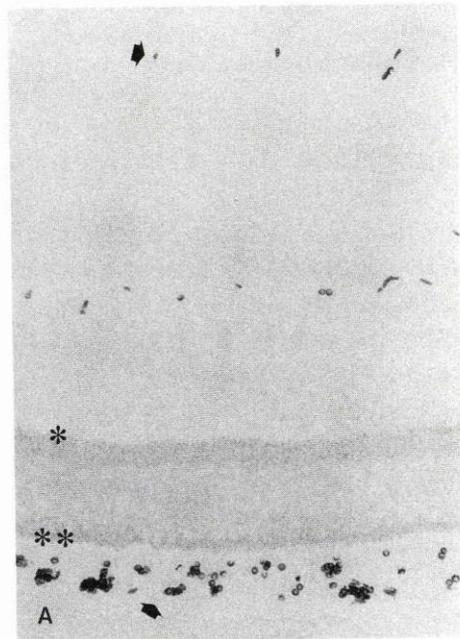
6. モノクローナル抗体の抗原決定基の検討

あらかじめ MAb TRA5 と反応させた IRBP に対して, MAb TRA4 の反応は阻害されており, MAb TRA4 と TRA5 は同一の抗原決定基に対する抗体であることが確認された (Fig. 7).

IV 考 按

Kohler & Milstein¹²⁾によって, 細胞融合による MAb 抗体作製法が確立され, 各分野の研究に多大な恩恵をもたらしている.

今回我々が精製したウシ IRBP (A 抗原) は, SDS-PAGE 上約 140Kd と, 過去の報告¹³⁾と一致しており, さらに uveitogenic な性質を有していることも確認した. 免疫に用いたウシ網膜可溶性成分硫酸分画および hybridoma のスクリーニングに用いた精製 IRBP を SDS-PAGE 後, ニトロセルロース膜に転写して両者を抗原とし MAb TRA4 および TRA5 の immunoblotting をおこなった. MAb TRA4 および TRA5 の両者とも, ウシ網膜可溶性成分硫酸分画および精製 IRBP の両抗原にたいし約 140Kd の band と反応した. さらに, ウシ網膜をもちいて免疫組織学的検索をおこなった. MAb TRA4 および TRA5 とも, 網膜外境界膜から網膜色素上皮先端部までと反応し, 過去に報告¹⁴⁾され



した (Fig. 5). 分画 1 を 10% gel で SDS-PAGE 後, ニトロセルロース膜に転写し, biotinylated-anti-rat IgG rabbit serum, HRP-avidin D および DAB をもちいて immunoblotting をおこなったところ, 約 55Kd (heavy chane) と約 28Kd (light chane) の二つの bands がと

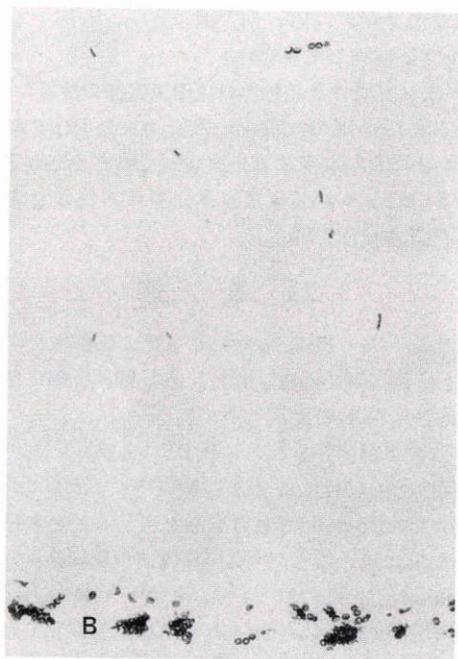


Fig. 4 Immunohistochemical studies of Lewis rat retina reacted with avidin-biotin-peroxidase complex technique. (A) Antigen detected by monoclonal antibody TRA 4, fixed with 3% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde, frozen section, stained with DAB, $\times 200$. Monoclonal antibody TRA 4 reacted from the external limiting membrane (*) to the apex of retinal pigment epithelium (**). Arrows: erythrocytes. Monoclonal antibody TRA 5 reacted identically. (B) P3U1 myeloma supernatant control.

た IRBP の局在と一致している。したがって、Mab TRA4および TRA5は、ウシ IRBP に対する Mab であることが確認された。

また、Lewis ラット網膜における Mab TRA4および TRA5の反応局在は、ウシ IRBP の局在と類似していた。Gonzalez-Fernandez ら¹⁵⁾のラット網膜における IRBP の局在の報告とも一致している。さらに Lewis ラット網膜可溶性成分を抗原とした immunoblotting において、ほぼウシ IRBP と移動度の等しい band と反応した。Gonzalez-Fernandez ら¹⁵⁾もウシ IRBP とラット IRBP の分子量はほぼ等しいと報告している。以上の二点から、Mab TRA4および TRA5と反応するラット網膜の抗原は、ラット IRBP であると考えられる。

今回作製した Mab TRA4および TRA5が2クロ-

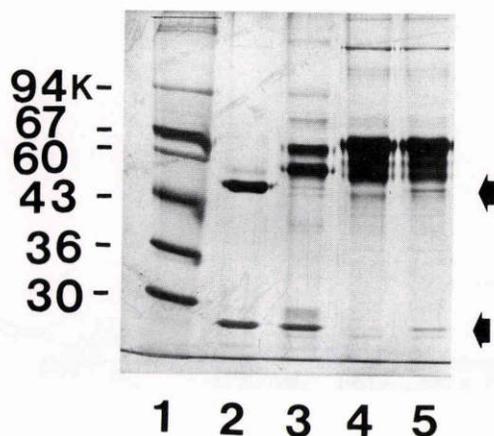


Fig. 5 10% gel SDS-PAGE of anti-IRBP rat monoclonal antibody TRA 4 purified by DE 52 ion exchange chromatography. Lane 1: molecular weight standards. Lane 2: DE 52 0.01MPB pH 7.6 pass through fraction. Lane 3: DE 52 0.01MPB 0.05MNaCl pH 7.6 elution fraction. Lane 4: DE 52 1.6M guanidine hydrochloride elution fraction. Lane 5: DE 52 applied sample (salted out monoclonal antibody TRA 4).

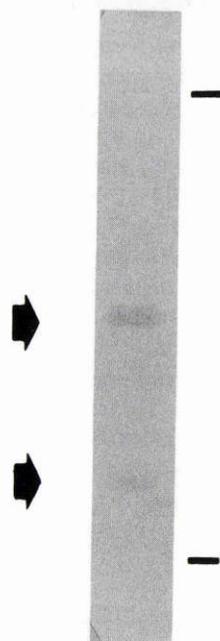


Fig. 6 Immunoblotting; antigen detected by rabbit antiserum to rat IgG. Lane: purified anti-IRBP rat monoclonal antibody TRA 4. Arrows: rat IgG heavy chain and light chain.

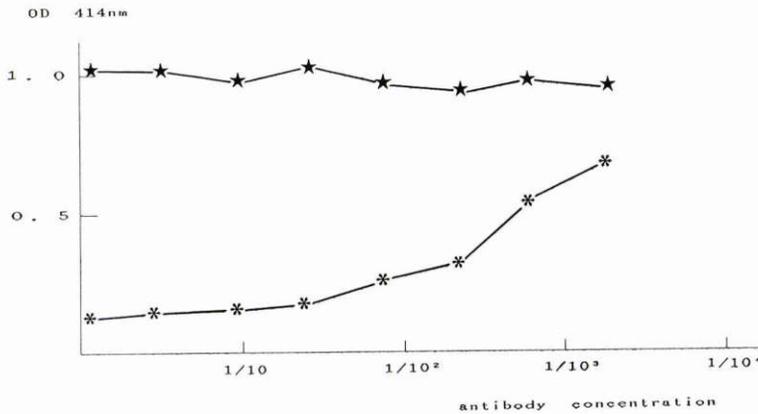


Fig. 7 ELISA ; bovine IRBP detected by biotinylated monoclonal antibody TRA 4. Bovine IRBP previously reacted with cultured supernate of hybridoma TRA 5 (mark *) or P 3U1 myeloma (mark ★), concentration from 1 to 1/3⁷.

ンとも、ウシ IRBP 上の同じ抗原決定基に対する抗体であることが確認され、さらに、2 クローンともに IgG_{2a} であった。つまり MAb TRA4 および TRA5 は、IRBP で免疫されたラット B リンパ球の同一クローン由来である可能性が大きい。一方、IRBP は高分子糖タンパクであり、その抗原決定基は複数個存在すると考えられている¹⁾が、MAb TRA4 および TRA5 の両者が同一の抗原決定基に対する抗体であることにより、この IRBP の抗原決定基は、強い抗原抗体反応を引き起こす抗原決定基かもしれない。さらに MAb TRA4 (TRA5) は、ウシ IRBP とラット IRBP に共通の抗原決定基と反応した。また、今回ウシ網膜可溶性成分硫酸分画で免疫した複数の Lewis ラットすべてが免疫後 8 日以内の早期に激しい実験的自己免疫性ぶどう膜炎を発症した。今回我々は検討していないが、同じ網膜可溶性成分に含まれる S 抗原に比較し、IRBP による実験的自己免疫性ぶどう膜炎の発症は早いとの報告が多く¹⁶⁾³⁾ MAb 作製に用いた Lewis ラットに発症したぶどう膜炎も IRBP の強い関与を受けていた可能性が大きい。したがって、今回確立した MAb に対応するウシ IRBP とラット IRBP の共通抗原決定基は、IRBP の uveitogenic な部位との密接な関係も推測され今後の重要な研究課題である。

さらに今回得られた、抗 IRBP ラット MAb を用い、IRBP および IRBP による実験的自己免疫性ぶどう膜炎の、より詳細な研究を検討中である。

文 献

1) Vistica BP, Usui M, Kuwabara T, et al:

IRBP from bovine retina is poorly uveitogenic in guinea pigs and is identical to A-antigen. *Current Eye Res* 6: 409—417, 1987.

- 2) Lai YL, Wiggert B, Liu YP, et al: Interphotoreceptor retinol-binding protein: Possible transport vehicles between compartments of the retina. *Nature* 298: 848—849, 1982.
- 3) Gery I, Wiggert B, Redmond MT, et al: Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1296—1300, 1986.
- 4) Hirose S, Kuwabara T, Nussenblatt RB, et al: Uveitis induced in primates by interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Arch Ophthalmol* 104: 1698—1702, 1986.
- 5) 望月 学, 藤野雄次郎, 奥村敦司他: 新しい網膜抗原の分離精製及び病原性について—Interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP)一. *日眼* 90(抄録): 109, 1986.
- 6) 高野 繁, 関 文治, 三橋正忠他: 網膜 S 抗原の新しい分析精製法について. *眼紀* 32: 491—496, 1981.
- 7) Adler AJ, Klucznik KM: Proteins and glycoproteins of the bovine interphotoreceptor matrix: Composition and fractionation. *Exp Eye Res* 34: 423—434, 1982.
- 8) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680—685, 1970.
- 9) Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Bio-*

- chem 105: 361—363, 1980.
- 10) **Yelton DE, Diamond BA, Kwan S-P, et al:** Fusion of mouse and spleen cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 81: 1—7, 1978.
 - 11) 橋本 昇, 高津聖志, 浜岡利之他: ビオチン化抗体とアビジン-リシン A 鎖複合体による特異的細胞障害法. 日本免疫学会編: 免疫実験操作法 XI, 金沢, 日本免疫学会, 3539—3549, 1982.
 - 12) **Köhler G, Milstein C:** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495—497, 1975.
 - 13) **Liou GI, Bridges CDB, Fong S-L, et al:** Vitamin A transport between retina and pigment epithelium—An interstitial protein carrying endogenous retinol (interstitial retinol-binding protein). *Vision Res* 22: 1457—1467, 1982.
 - 14) **Bunt-Milam AH, Saari JC:** Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J Cell Biol* 97: 703—712, 1983.
 - 15) **Gonzalez-Fernandez F, Landers RA, Glazebrook PA, et al:** An extracellular retinol-binding glycoprotein in the eyes of mutant rats with retinal dystrophy: Development, localization, and biosynthesis. *J Cell Biol* 99: 2092—2098, 1984.
 - 16) **Broekhuysse RM, Winkens HJ, Kuhlmann ED:** Induction of experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis by IRBP. Comparison to uveoretinitis induced by S-antigen and opsin. *Current Eye Res* 5: 231—240, 1986.
-