

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20533

研究課題名(和文) TMEM16E 遺伝子欠損マウスを宿主とした特異的モノクローナル抗体の開発

研究課題名(英文) An establishing novel antibody for GDD1/TMEM16E/ANO5

研究代表者

久保 蘭 和美 (Kubozono, Kazumi)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：80750132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請時点で保有した市販品を含むTMEM16E抗体は、絶対的な陰性対照のTMEM16Eノックアウトマウスでも非特異反応が強く、各種アプリケーションにおけるTMEM16Eの特異的検出を断定することが困難であった。本研究ではTMEM16Eを高い信頼度で検出できる抗体の開発を目指し、リンパ節近傍にTMEM16E発現ベクターを導入して抗原を発現させてラットを免疫する方法を実施した。その結果、抗原免疫動物リンパ節より採取したリンパ球をラット骨髄腫由来細胞と融合した抗原反応抗体産生ハイブリドーマを多数ストックし、各種抗体アプリケーションにおいて高感度検出能力を示すモノクローナル抗体産生クローンが得られた。

研究成果の概要(英文)：Development of application-specific antibodies for TMEM16E will provide great advances in TMEM16E-related diseases understanding. In this DNA-immunization method project, application(eg, Western blotting, immunocytochemistry and flowcytometry)-specific high affinity monoclonal antibodies were established, which will provide further understanding of disease-related TMEM16E in mice tissues.

研究分野：口腔外科学

キーワード：TMEM16E ANO5 LGMD2L GDD GDD1

1. 研究開始当初の背景

TMEM16E 遺伝子の 1 アミノ酸変異は骨系統組織、特に上下顎に遅発性の硬化性病変を伴う顎骨骨幹異形成症に連鎖する。また、ノックアウト変異は上下肢帯部の骨格筋組織に特徴的な恒常性筋組織修復機構の不全が原因となる遅発性の筋ジストロフィーに連鎖する。

2. 研究の目的

申請時点で保有していた市販品を含む TMEM16E 抗体は絶対的な陰性対照である TMEM16E ノックアウトマウス免疫組織化学染色において非特異染色が強く TMEM16E の局在組織あるいは細胞内局在部位を断定することは出来なかった。そこで本研究では TMEM16E を高い信頼度で検出できる抗体の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) リンパ節近傍に TMEM16E 発現ベクターを導入して抗原を発現させラットを免疫 (DNA 免疫) した。

(2) リンパ節より採取したリンパ球をラット骨髓腫由来細胞と融合したハイブリドーマをストックした。ラットへの DNA 免疫、ハイブリドーマ作製は実施した和光ライフサイエンス社プロトコールに従った。

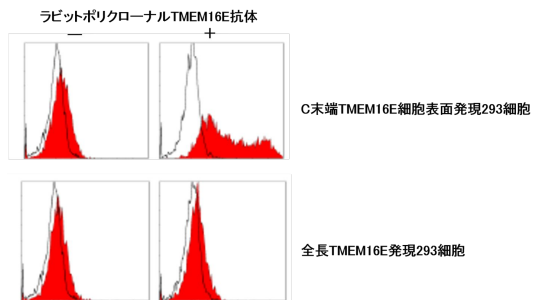
(3) 抗体の特異性評価は TMEM16E の C 末端を人為的に細胞外表面に発現させた 293 細胞を標的として非固定条件下での FCM 解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 生細胞フローサイトメトリによる TMEM16E 抗原検出系の確立

本研究で実施した DNA 免疫法による抗体作製は抗体特異性のスクリーニングを浮遊細胞表面抗原に対するフローサイトメトリ (FCM) により評価した。このため、まず TMEM16E 全長及び分泌シグナル及び細胞膜リテンション配列を付加した C 末端 TMEM16E を発現するベ

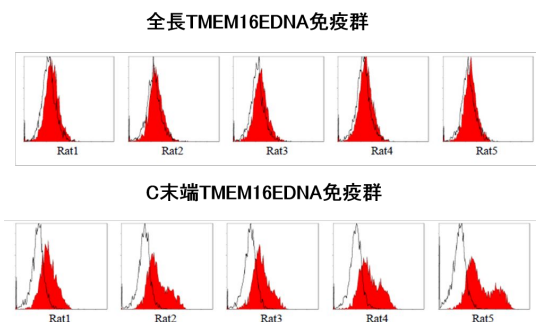
クターをそれぞれ構築した。申請者らが保有するラビットポリクローナル TMEM16E 抗体にてこれらを強制発現させた単一浮遊処理 293 細胞の検出を試みた。下図のように C 末端発現非固定浮遊細胞は良好に検出されたが、全長発現細胞では検出されなかった。したがって新規に作成する抗体の評価は C 末端に対する特異性により評価することに決定した。



図：黒線はベクター発現なし、赤塗りが右に示すベクター発現あり 293 細胞を示す。

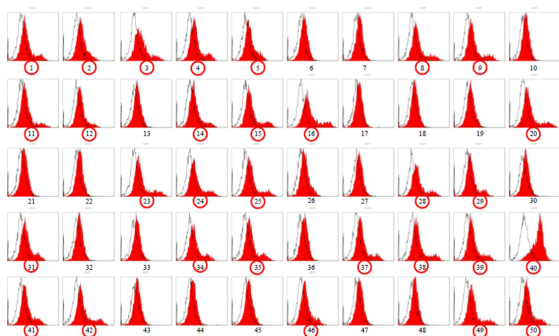
(2) DNA 免疫

TMEM16E 抗原の DNA 免疫はマウス、ヒト全長ベクターの混合 DNA および細胞膜リテンション配列を付加した C 末端ベクターの 2 種類で実施した。免疫終了後血清を採取し TMEM16E 認識抗体の産生を (1) の生細胞フローサイトメトリによって下図のように実施したところ、C 末端ベクター-DNA 免疫群ラットでは良好な抗体価の上昇が認められたが、全長ベクターの混合 DNA 免疫群のラットでは抗体価の上昇が検出されなかった。したがってハイブリドーマ作製は C 末端ベクター-DNA 免疫ラット群のみで行った。



(3) 陽性ハイブリドーム選択

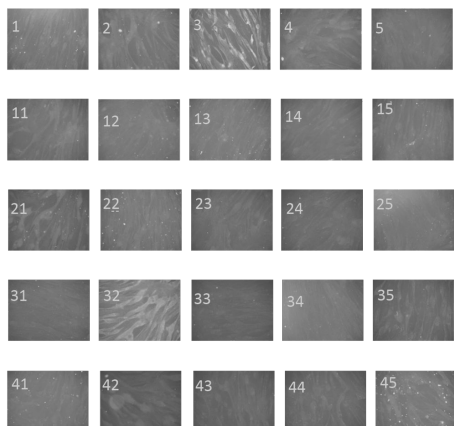
C末端ベクターDNA免疫ラット由来のHAT選択したハイブリドームは96ウェルプレート数枚でプールしながら培養上清を回収した。ハイブリドーム培養上清中のTMEM16E抗体価を(1)の生細胞フローサイトメトリによって評価し下図のように陽性ウェルを同定した。同定したウェルのハイブリドームは限界希釈法を用いてクローンを単離して拡大培養してモノクローナルTMEM16E産生細胞としてストックした。



図：解析結果の抜粋標的細胞の明確な右シフトが認められたハイブリドーム上清(赤丸印)

(4) 免疫化学染色適用性の評価

本研究の当初の目的は組織化学染色に用いることが可能な高感度TMEM16E抗体の開発であった。そこで上記のハイブリドーム選択の基準として下図に示す内在性TMEM16Eが唯一検出可能である培養筋芽細胞の免疫化学染色も同時に実施した。



図：ハイブリドーム上清による筋芽細胞免疫化学染色(抜粋)

まとめ

フローサイトメトリで陰性であったハイブリドーム上清でも強い染色性を示すものも複数認められた(3)(4)。しかし内在性TMEM16Eは培養筋芽細胞では分化した筋管特異的に細胞内顆粒像として検出されることを既に申請者らはウサギポリクローナル抗体を用いて確認していたため、非特異的染色像を排除できた。

一方、フローサイトメトリでは良好な抗体価を示すハイブリドームクローン産生抗体が免疫細胞染色では全く染色性を示さないケースも多かった。

今後の展開

今後は本計画で新規に樹立したTMEM16Eモノクローナル抗体クローンの用途のバリデーションを進め、申請者らが保有するTMEM16E遺伝子変異マウスの病態解析に供与する。

なかでも、ウエスタンブロットでの内在性TMEM16Eの検出と免疫細胞染色において非常に特異性の高いクローンが1クローン同定できた。これは今後のTMEM16E分子の組織学的及び生化学的解析に絶大な威力を発揮することが期待できるものであった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

(1) Shigeishi H, Ohta K, Fujimoto S, Nakagawa T, Mizuta K, Ono S, Shimasue H, Ninomiya Y, Higashikawa K, Tada M, Ishida F, Okui G, Okumura T, Fukui A, Kubozono K, Yamamoto K, Ishida Y, Seino S, Hashikata M, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Uetsuki R, Nimiya A, Takamoto M, Dainobu K, Tokikazu T, Nishi H, Sugiyama M, Takechi M.

Preoperative oral health care reduces
postoperative inflammation and
complications in oral cancer patients.

Exp Ther Med. 2016, 12:1922-1928

査読有 DOI: 10.3892/etm.2016.3532

(2) 久保園和美、小野重弘、太田耕司、
島末洋、水田邦子、中川貴之、武知正晃. リ
ーマーの破折片が上顎洞に迷入した 1 例
口腔顎顔面外傷 2016, 1544-48. 査読有
〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 飛梅圭、久保園和美、水田邦子

GDD1/ANO5/TMEM16E の細胞内局在分
布

第 38 回日本分子生物学会年会 2016.12.2
パシフィコ横浜 (神奈川県)

(2) 久保園和美、小野重弘、太田耕司、島末
洋、水田邦子、中川貴之、武知正晃. 上顎
洞に迷入した医原性異物の 1 例

第 17 回日本口腔顎顔面外傷学会総会・学
術大会 2106.7.11 和歌山県立医科大学
(和歌山県)

6 . 研究組織

研究代表者

久保園 和美 (KUBOZONO, Kazumi)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号 80750132