

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：85402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17253

研究課題名（和文）新規TMEM16Eモノクローナル抗体クローンの免疫組織化学用途へのバリデーション

研究課題名（英文）TMEM16E

研究代表者

久保 蘭 和美（Kubozono, Kazumi）

独立行政法人国立病院機構（呉医療センター臨床研究部）・その他部局等・その他

研究者番号：80750132

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：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、TMEM16Eの特異的検出は困難であった。本研究ではTMEM16Eを特異的に認識するモノクローナル抗体の開発を目的に、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、培養筋管細胞において、ウェスタンブロット及び免疫細胞染色で強い特異シグナルを検出することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TMEM16E遺伝子の異なった変異、すなわち機能獲得変異により上下顎の硬化性病変を伴う顎骨骨幹異形成症（GDD）を起こし、機能喪失変異が遅発性の筋ジストロフィーを起こす。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的とした。TMEM16Eの機能解明が、骨・筋肉疾患の病態解明につながり、TMEM16Eを高い信頼度で検出できるモノクローナル抗体を作製することで臨床診断ツールとして使用可能になる。

研究成果の概要（英文）：The TMEM16E antibody containing the commercially available product possessed a strong nonspecific reaction even in the absolute negative control TMEM16E knockout mouse, and specific detection of TMEM16E was difficult. In this study, for the purpose of developing a monoclonal antibody that specifically recognizes TMEM16E, a method for immunizing rats by introducing a TMEM16E expression vector in the vicinity of lymph nodes and expressing an antigen was implemented. As a result, it was confirmed that a strong specific signal was detected in cultured myotube cells by Western blotting and immunocyte staining.

研究分野：口腔外科

キーワード：TMEM16E ANO5 LGMD2L GDD GDD1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TMEM16E 遺伝子変異が2つの遺伝性疾患、顎骨骨幹異形成症 (GDD) と肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2L) の疾患責任遺伝子となる。すなわち、形質獲得変異の優性遺伝形質は骨系統疾患、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を起こし、機能喪失変異の劣性遺伝形質は上下肢帯部の骨格筋組織に特異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を起こす。

申請者はマウス TMEM16E 組換え蛋白抗原をラビットに免疫して得た抗 TMEM16E ポリクローナル抗体を用いて TMEM16E 蛋白の特異的検出を行ってきた。培養筋芽細胞から培養皿上で分化誘導した筋管において、免疫細胞染色ではロックアウト由来筋管の非特異的染色は非常に低く、野生型筋管での非常に強い染色は TMEM16E の局在を断定できるものであった。筋芽細胞を含む各種培養細胞ウエスタンブロット解析において、非特異バンドの検出は弱く、筋芽細胞を分化誘導した場合のみ TMEM16E 分子量の強いバンドが検出された。ところが、ホルマリン固定パラフィン包埋切片の各種免疫組織化学染色では、ロックアウトマウスにおいても非特異的染色が強く 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。

また顎骨骨幹異形成症 (GDD) と肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2L) の実験動物モデル、すなわち疾患変異ノックインマウス (TMEM16E^{gdd} ノックインマウス) および TMEM16E ノックアウトマウスの作製維持を行いその解析を行ってきたが、これまでの申請者の研究成果で、現在保有するポリクローナル抗体が免疫組織化学染色に適用できないことが判明したため、解析上大きな障害となっている。このため、新規に免疫組織化学染色においても高感度で非特異的反応がない抗体を開発することが必須である。

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) 遺伝子改変モデルマウスの系統維持と表現型解析:

GDD の疾患モデルとして疾患変異ノックインマウス (TMEM16E^{gdd} ノックインマウス) を、肢帯型筋ジストロフィーの疾患モデルとして TMEM16E ノックアウトマウスを作製している。これらマウスを用い、TMEM16E 分子機能および GDD、LGMD の病態解析を行う。

(2) 新規 TMEM16E モノクローナル抗体の作製:

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。

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。

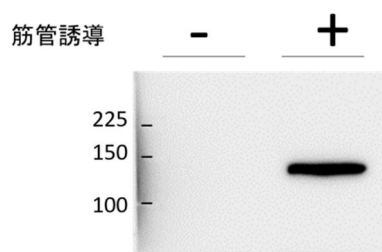
4. 研究成果

肢帯型筋ジストロフィーの疾患責任遺伝子は Dysferlin をはじめとして現在までに 20 以上の遺伝子が同定されてきたが、それらがコードする分子の構造、機能は全く異なり、な

ぜこれら分子が単独欠損することで、筋ジストロフィーが発症するのか、その機構は不明であった。しかし、近年 Dysferlin 遺伝子欠損マウスを疾患モデルとした肢帯型筋ジストロフィーの解析によって解明され始めている。生理的な状態において形成される筋細胞膜の微細な穴は、内部から膜パッチをあてることで恒常的に修復しているが、肢帯型筋ジストロフィーは微小な筋細胞膜損傷への膜パッチの不全が原因であると考えられており、特に Dysferlin がこの膜パッチ機能に関与していることが新たに示唆されてきた。一方臨床経過や症状は全く Dysferlin 欠損による筋ジストロフィーと区別がつかないにもかかわらず、Dysferlin に欠損がない罹患者において TMEM16E の欠損が報告された。すなわち 2 つの異なる遺伝子の欠損が、同様の病態を引き起こす原因となることから、両遺伝子が遺伝学的な上下関係に位置して骨格筋の恒常性、すなわち膜修復に関与していることが示唆されている。

本研究においてこれまでの解析結果では TMEM16E ノックアウトマウスに明らかな表現型が確認されていない。その理由として LGMD2L 表現型は Dysferlin の代償性活性化により相殺され、そのために TMEM16E ノックアウトマウスでは明らかな表現型が現れないと考えられる。これを裏付ける証拠として、*in vitro* の実験系において申請者は実際に筋管誘導した Dysferlin 欠損筋芽細胞において、膜パッチの形質膜への融合が遅延するために、形質膜直下に膜パッチ構造物が蓄積し、この蓄積した膜パッチに TMEM16E が選択的に局在することを発見した (*in press*)。

新規 TMEM16E モノクローナル抗体の作製については、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 (DNA 免疫法) を用いて、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。これを用いてウエスタンブロットを行ったところ、筋管誘導させたマウス筋芽細胞で TMEM16E 蛋白特異的なバンドが検出された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 久保園和美, 小野重弘, 太田耕司, 東川晃一郎, 重石英生, 小川郁子, 武知正晃	4. 巻 49
2. 論文標題 当科における含歯性嚢胞患者の臨床統計的検討	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 広島大学歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 153-157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保園和美, 奥村俊哉, 小野重弘, 武知正晃, 田中浩二
2. 発表標題 三叉神経帯状疱疹に継発した歯の自然脱落の1例
3. 学会等名 第63回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保園和美, 小野重弘, 太田耕司, 東川晃一郎, 重石英生, 武知正晃
2. 発表標題 当科における含歯性嚢胞患者の臨床統計的検討
3. 学会等名 第62回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----