

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461387

研究課題名(和文) 抗pendrin自己抗体の測定法開発と臨床応用のための研究

研究課題名(英文) Establishment of measurement and clinical indication of anti pendrin antibody

研究代表者

吉田 明雄 (YOSHIDA, Akio)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：90158428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性甲状腺疾患の診断はこれまで、患者血清中の抗サイログロブリン、抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体の二つの甲状腺自己抗体が存在で診断されてきた。ペンドリンは甲状腺内膜側にあるヨード輸送体である。我々はウエスタンブロット法を用い、橋本病患者血清中に100%このタンパクに対する自己抗体が存在することを報告している。この抗体のさらなる簡便な測定法を開発することは、自己免疫性甲状腺疾患の診断の精度が、現在よりさらに高くなることを意味する。我々はELISA法の確立のため様々な方法を用い、一定の成果を得た。近い将来、完成したELISA法が自己免疫性甲状腺疾患の新たな方法として実用化されると思われた。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune thyroid diseases are diagnosed by existence of auto-antibody against thyroglobulin and/or thyro-peroxidase in the patients' sera. Pendrin is thyroid specific protein exists in the apical membrane of thyroid cells that transports iodide. We have revealed that all of the patients with Hashimoto disease have anti-pendrin antibody in the sera using western blot analysis. We tried to establish ELISA for this antibody for the advance of diagnosis of autoimmune thyroid disease. We have obtained several results that will contribute the establishment of ELISA in the near future.

研究分野：代謝内分泌

キーワード：甲状腺 ヨード ペンドリン イオン輸送体 陰イオン交換体 橋本病 バセドウ病 ELISA

1. 研究開始当初の背景

ペンドレット症候群は、先天性感音性難聴に加えて甲状腺におけるヨード有機化障害と甲状腺腫を伴う疾患であり、その原因遺伝子である pendrin (*SLC26A4*)は甲状腺、内耳、腎、子宮内膜などに高率に発現している。Pendrin タンパクの機能は細胞膜に存在する陰イオン交換体であることが示され、甲状腺では、濾胞上皮細胞の内腔側の細胞膜上に局在する。甲状腺において、無機ヨードは濾胞上皮細胞基底膜に発現する Na/I symporter (NIS; *SLC5A5*)によって細胞内に取り込まれ、pendrin によって濾胞腔内に輸送されることによって濾胞腔内で dual oxidase (DUOX)により産生される H₂O₂ や甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)の作用で thyroglobulin (Tg)のチロシン残基に有機化され、最終的に甲状腺ホルモンが合成される。

我々は、COS-7 細胞に NIS や pendrin をコードする発現 plasmid を transfection することによりこれらを細胞膜に発現させ、電気生理学的手法を用いることによって、世界に先駆けて上記のようなヨードの輸送メカニズムを明らかにしてきた(Yoshida A, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3356-61, 2002; Yoshida A, et al. *Endocrinology* 145: 4301-4308, 2004)。それらの研究の過程で、Tg や TPO と同様に濾胞上皮内腔側に発現する pendrin に対する自己抗体が存在する可能性があるのでは無いかと考え検討を行った。Pendrin 発現ベクターを transfection した COS-7 細胞 lysate を用いて SDS-PAGE を行い、ニトロセルロース膜に転写した後にバセドウ病患者血清と反応させるという western blotting を行うことによって、ウサギで作製した抗体と同じ位置にバンドを形成する **pendrin 特異的な自己抗体の検出に成功した**。この western blot 法により自己免疫性甲状腺疾患を中心に種々の疾患の患者血清の解析を行ったところ、その陽性率は、橋本病 97%、

バセドウ病 74%、甲状腺乳頭癌 0%、SLE 40%、RA 30%、健常人 0%という結果であり、その抗体価はウサギで作製した抗 pendrin 抗体と比べても十分に高い抗体価を示した(図2)。また、自己免疫性甲状腺疾患における pendrin 自己抗体の出現率を Tg および TPO 抗体のそれと比較しても十分な感度および特異性を有することが確認された(図3)(Yoshida A, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 94:442-8, 2009)。

しかし、膜タンパク自己抗体の完全な ELISA 法は確立したものが無い。膜タンパクは脂溶性の部位が多く、実験の課程すべてに抗体結合特異的なデタージェント(De)を必要とする。この選定が極めて難しく、また De の性質上、フォールディングの変化、抗体結合能の喪失、拡散障害、非特異的結合の変化、プレート壁からの抗体やタンパクを洗い落としてしまうなど様々な要因があるからである。

安定した膜たんぱくの ELISA 法の確立は極めて難しい状態にあった。

2. 研究の目的

Westernblot 法同様の結果が得られ、さらに高感度の、大量の検体が検査できる方法を開発することになった。

3. 研究の方法

通常の ELISA 法。

Detergent による影響を見るため、様々なデタージェントを使い抗体結合の影響を見る。HIS-Tag を付けたペンドリンを精製する。

デタージェントによる Well からのたんぱくの溶出を避けるため、

抗 HIS 抗体を固定したプレート上に目的たんぱくをトラップしそれで ELISA を行う。

Ni を固定したプレートで目的たんぱくをトラップし、ELISA を行う。

Ni, proteinG を固定した磁気ビーズにより、IgG, 目的タンパクをトラップし、IP を行って抗原抗体反応を見る。

目的タンパク末端にビオチンを結合させ、アビジンプレートに結合させることにより、デタージェントの影響を受けにくい強固な結合を得て、ELISAを行えるようにする。

4. 研究成果

様々な方法を検討したが、抗体や目的たんぱく質の非特異的な結合が多く、これがデタージェントによる影響なのか、脂溶性膜たんぱく質の特徴なのか、十分に解明されなかった。ある程度の陽性率を得ることはできたが安定した結果を得ることはどの方法でも十分ではない状態であり、さらなる方法の改良が必要と思われた。

ビオチンを結合させた目的たんぱく質の作成は成功した。

小麦を使った、Cell Free系のタンパク合成により、デタージェントや、リボゾームの非存在下では、タンパクが凝集してしまうことは確かめられ、これまで他施設が発表した論文で行われていた方法ではELISA法は行えないことが確認できた。

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 7件)

- 1). Endo R, Kurata Y, Notsu T, Li P, Morikawa K, Kondo T, Ogura K, Miake J, Yoshida A, Shirayoshi Y, Ninomiya H, Higaki K, Kuwabara M, Yamamoto K, Inagaki Y, Hisatome I.
Stabilization of Kv1.5 channel protein by the inotropic agent olprinone.
Eur J Pharmacol. 査読有
2015;765:488-494.
- 2). Peili Li, Yasutaka Kurata, Nani Maharani, Endang Mahati, Katsumi Higaki, Akira Hasegawa, Yasuaki Shirayoshi, Akio Yoshida, Tatehito Kondo, Youichi Kurozawa, Kazuhiro Yamamoto, Haruaki Ninomiya, Ichiro Hisatome

E3 ligase CHIP and Hsc70 regulate Kv1.5 protein expression and function in mammalian cells

J Mol Cell Cardiol. 査読有

2015;86:138-146.

- 3) Utami SB, Mahati E, Li P, Maharani N, Ikeda N, Bahrudin U, Munemura C, Hosoyamada M, Yamamoto Y, Yoshida A, Nakayama Y, Higaki K, Nanba E, Ninomiya H, Shirayoshi Y, Ichida K, Yamamoto K, Hosoya T, Hisatome I.
Apoptosis induced by an uromodulin mutant C112Y and its suppression by topiroxostat.
Clin Exp Nephrol. 査読有 2015;
4:576-584.
- 4) Matsugami H, Harada Y, Kurata Y, Yamamoto Y, Otsuki Y, Yaura H, Inoue Y, Morikawa K, Yoshida A, Shirayoshi Y, Suyama Y, Nakayama B, Iwaguro H, Yamamoto K, Hisatome I.
VEGF secretion by adipose tissue-derived regenerative cells is impaired under hyperglycemic conditions via glucose transporter activation and ROS increase.
Biomed Res. 査読有 2014;
6:397-405.
- 5) Sakata S, Kurata Y, Li P, Notsu T, Morikawa K, Miake J, Higaki K, Yamamoto Y, Yoshida A, Shirayoshi Y, Yamamoto K, Horie M, Ninomiya H, Kanzaki S, Hisatome I.
Instability of KCNE1-D85N that Causes Long QT Syndrome: Stabilization by Verapamil.
Pacing Clin Electrophysiol. 査読有
2014; 7 :853-863.
- 6). Iwai C*, Li P*, Kurata Y, Hoshikawa Y, Morikawa K, Maharani N, Higaki K,

Sasano T, Notsu T, Ishido Y, Miake J, Yamamoto Y, Shirayoshi Y, Ninomiya H, Nakai A, Murata S, Yoshida A, Yamamoto K, Hiraoka M, Hisatome I.

Hsp90 prevents interaction between CHIP and HERG proteins to facilitate maturation of wild-type and mutant HERG proteins.

Cardiovasc Res. 査読有 2013; 3 :520-528

* contributed equally

7). Peili Li, Kazuhide Ogino, Yoshiko Hoshikawa, Hiroko Morisaki, Keiko Toyama, Takayuki Morisaki, Kumi Morikawa, Haruaki Ninomiya, Akio Yoshida, Kiyoshi Hashimoto, Yasuaki Shirayoshi, Ichiro Hisatome.

AMP deaminase 3 plays a critical role in remote reperfusion lung injury

Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有 2013, 434:131-136

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 明雄 (YOSHIDA, Akio)
鳥取大学・医学系研究科・特任教授
研究者番号：90158428

(2) 研究分担者

久留 一郎 (HISATOME, Ichiro)
鳥取大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60211504

(3) 連携研究者

鈴木 幸一 (SUZUKI, Koichi)
帝京大学・医療技術部・教授
研究者番号：20206478