

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591360

研究課題名(和文)リンパ球性漏斗下垂体後葉炎の新規病因自己抗原候補76kD蛋白の病態への関与

研究課題名(英文)A novel autoantigen in lymphocytic infundibulo-neurohypophysitis

研究代表者

梶村 益久(Yoshihisa, Sugimura)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50456670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は最近、プロテオミクス解析などの手法を用いて病態の詳細が未だ不詳であるリンパ球性漏斗下垂体後葉炎(LINH)の新規病因自己抗原候補76kD蛋白を同定した。本研究では、LINHにおける76kD蛋白の自己免疫機序への関与、及び76kD蛋白のバソプレシン(AVP)分泌機構障害への関与を検討した。76kD蛋白をマウスに免疫し、下垂体の炎症を示唆する所見が得られた。また、マウスES細胞よりAVP産生細胞(ES-AVP細胞)を選択的に分化誘導し、ES-AVP細胞で76kD蛋白を発現が認められ、76kD蛋白のAVP分泌への関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Lymphocytic infundibulo-neurohypophysitis (LINH) is an increasingly recognized entity among idiopathic CDI, however, the differential diagnosis from other pituitary diseases including tumors can be difficult due to similar clinical and radiological manifestations. The definite diagnosis of LINH requires invasive pituitary biopsy. We used shotgun liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) on immunoprecipitates obtained from patient sera incubated with posterior pituitary protein lysate, and the results revealed that 76kD protein is an autoantigen in LINH. We further validated this autoantibody as a novel diagnostic marker. To evaluate the role of 76 kD protein in the pathogenesis of LINH, we developed the 76kD protein-immunized mice and observed the pituitary inflammation. In addition, we found that mouse ESC are self-differentiated into AVP neurons that express 76kD protein.

研究分野：内分泌内科学

キーワード：リンパ球性漏斗下垂体後葉炎 76kD蛋白 ES-AVP細胞

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテオミクス解析などの手法を用いて病態の詳細が未だ不詳であるリンパ球性漏斗下垂体後葉炎 (lymphocytic infundibuloneurohypophysitis, LINH) の新規病因自己抗原候補 76kD 蛋白を同定した。抗 76kD 蛋白抗体は優れた診断マーカーと考えられる。また、76kD 蛋白また 76kD 蛋白抗体は LINH の病態形成にも強く関与していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、LINH における 76kD 蛋白の自己免疫機序への関与、及び 76kD 蛋白のバゾプレシン (AVP) 分泌機構障害への関与を検討する。

3. 研究の方法

具体的な研究項目は、76kD 蛋白での免疫動物の作成、抗 76kD 蛋白抗体の作成と動物への移入、胚性幹細胞 (ES 細胞) から分化誘導された AVP 細胞を用いた細胞培養系での AVP 分泌機序の解析である。

4. 研究成果

(1) 76kD 蛋白での免疫動物の作成、抗 76kD 蛋白抗体の作成について

76kD 蛋白をマウスに免疫しリンパ球性漏斗下垂体後葉炎モデルを作成した。

作成の方法を下に示す。

免疫動物: SJL/J 7 週齢

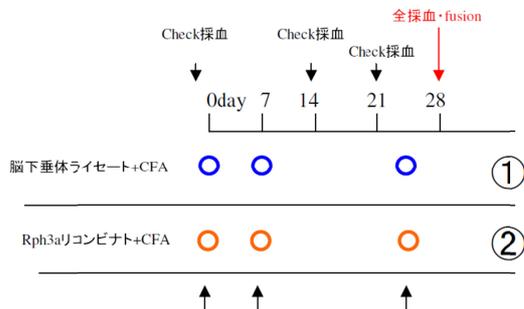
免疫原: Whole pituitary extract (WPE), 76 kD リコンビナント蛋白

免疫方法: リンパ節法

WPE+ アジュバンド (complete adjuvant (FREUND)をまぜ、エマルジョンにしたものをマウスに免疫した。合計 3 回免疫を行い、その後細胞融合を行った。

76 kD 蛋白とアジュバンド (complete adjuvant (FREUND)をまぜ、同様にエマルジョンにしたものをマウスに免疫した。合計 3 回免疫を行い、その後細胞融合を行った。また、ともに注射部位は背足後ろ足、鼠径部位とした。

下にその方法を図示する (unpublish data)。

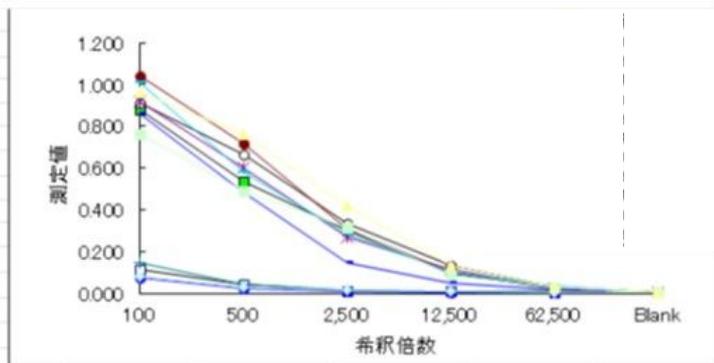


力価確認

方法: ELISA 法

抗原感作: WPE 及び 76kD 蛋白を PBS で希釈し感作用プレートに分注し、4 で over night 静置した。免疫前マウス血清と免疫後のマウス血清の希釈系列を 100, 500, 2500, 12500, 62500 倍、blank とし、PBS で希釈したものを加え室温で 60 分間反応させた。その後、抗マウス IgG の標識抗体を用いて発色させ、吸光度を測定した。

下図にその結果を示す (unpublish data)。



抗体産生 B 細胞ハイブリドーマ作出、モノクローナル抗 76kD 蛋白抗体作成について

免疫原である 76kD 蛋白に対する力価の上昇が確認された。その後、コロニー形成を確認し、培養上清のスクリーニングを行い、陽性クローンを選択し、最終的に 76kD を免疫したマウスから免疫原のプレートに反応するハイブリドーマ株は 3 4 種得られた。

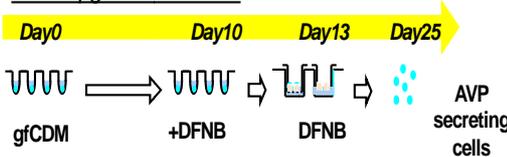
下垂体炎組織の病理学的検討を行い、免疫組織化学法によってリンパ球、単球の浸潤などを確認した。自己免疫機序における 76kD 蛋白の関与に関する知見が得られた。

(2) 胚性幹細胞 (ES 細胞) から分化誘導された AVP 細胞を用いた細胞培養系での AVP 分泌機序の解析について

マウス ES 細胞より SFEBq/gfCDM 法を用い AVP 産生細胞 (ES-AVP 細胞) を選択的に分化誘導した。下図参照。

Induction of ES-AVP cells

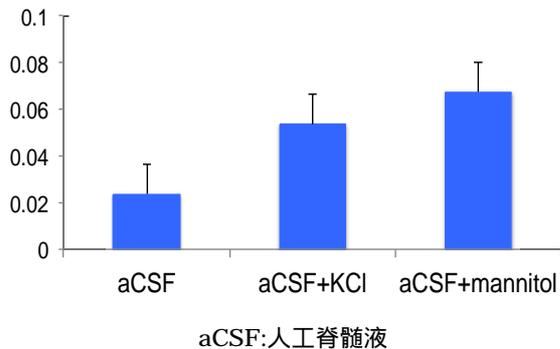
SFEBq/gfCDM culture



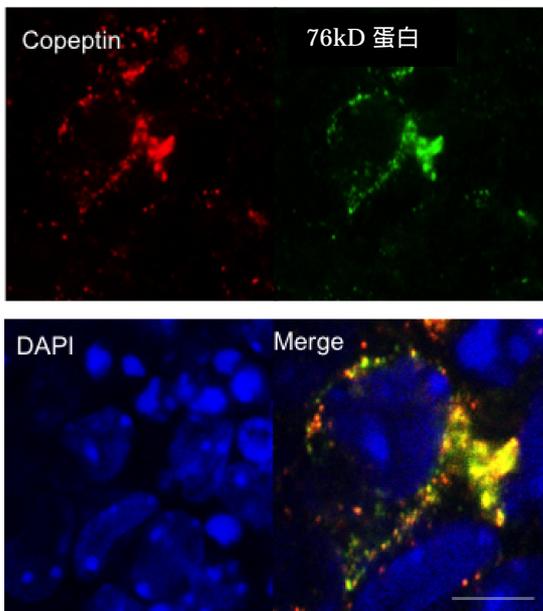
For SFEBq differentiation, ES cells were dissociated to a single cell using 0.25% trypsin-EDTA and quickly aggregated in growth factor-free chemically defined medium (gfCDM).

ES-AVP 細胞では mannitol による浸透圧刺激や KCl による脱分極刺激により AVP 分泌は亢進した。下図参照。(unpublish data)

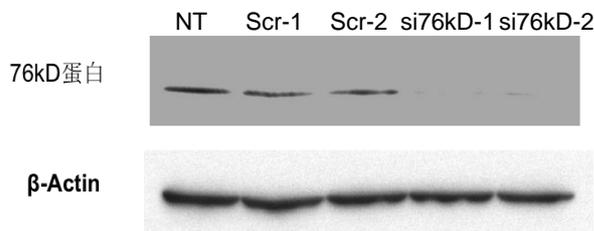
AVP 濃度



ES-AVP 細胞で、76kD 蛋白を発現が認められた。また AVP のマーカーである copeptin と共在することが確認された。下図参照 (unpublish data)



ES-AVP 細胞培養系で、遺伝子導入による 76kD 蛋白の過剰発現、及び siRNA によるノックダウン実験に成功した。ノックダウンの結果を下に示す (unpublish data)

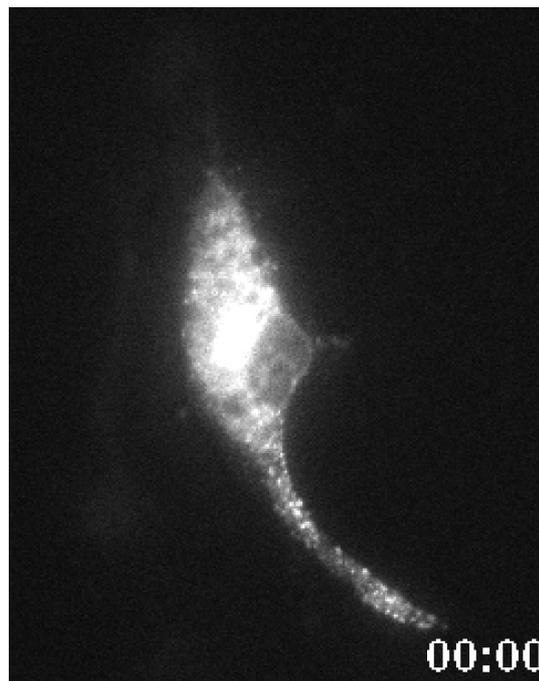


NT: non-treat, Scr: scramble

さらに ES-AVP 細胞での AVP 小胞に蛍光タンパク質を融合させ、time lapse イメージングで AVP 小胞の可視化に成功した。下にその方法と、イメージング画像を示す (unpublish data)



EGFP を AVP 遺伝子 C 末に融合させた plasmid を導入し 48 時間後に平面培養系で評価した。



また、全反射蛍光顕微鏡を用いた開口放出解析も可能になった。また、タンパク質間相互作用を Pull-Down Assay、免疫沈降法で解析し、新たな知見を得た。

以上、ES-AVP 細胞培養系において 76kD 蛋白の AVP 分泌に対する関与を示唆する所見を得た。

### 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 12 件)

Identification of the novel autoantigen candidate Rab GDP dissociation inhibitor alpha in isolated adrenocorticotropin deficiency.

Kiyota A, Iwama S, Sugimura Y, Takeuchi S, Takagi H, Iwata N, Nakashima K, Suzuki H, Nishioka T, Kato T, Enomoto A, Arima H, Kaibuchi K, Oiso Y.

Endocr J. Oct 26. [Epub ahead of print], 2014 査読あり

Activating Transcription Factor 6a Is Required for the Vasopressin Neuron System to Maintain Water Balance under Dehydration in Male Mice.

Azuma Y, Hagiwara D, Lu W, Suga H, Goto M, Banno R, Sugimura Y, Oyadomari S, Mori K, Shiota A, Asai N, Takahashi M, Oiso Y, Arima H. *Endocrinology*. 9:en20141522. [Epub ahead of print], 2014 査読あり

Minocycline prevents osmotic demyelination associated with aquaresis.

Takagi H, Sugimura Y, Suzuki H, Iwama S, Izumida H, Fujisawa H, Ogawa K, Nakashima K, Ochiai H, Takeuchi S, Kiyota A, Suga H, Goto M, Banno R, Arima H, Oiso Y. *Kidney Int.* 23. doi: 10.1038/ki.2014.119. 2014 査読あり

Arginine vasopressin neuronal loss results from autophagy-associated cell death in a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus.

Hagiwara D, Arima H, Morishita Y, Wenjun L, Azuma Y, Ito Y, Suga H, Goto M, Banno R, Sugimura Y, Shiota A, Asai N, Takahashi M, Oiso Y. *Cell Death Dis.* 27;5:e1148. doi: 10.1038/cddis.2014.124. 2014 査読あり

GABA type B receptor signaling in proopiomelanocortin neurons protects against obesity, insulin resistance, and hypothalamic inflammation in male mice on a high-fat diet.

Ito Y, Banno R, Shibata M, Adachi K, Hagimoto S, Hagiwara D, Ozawa Y, Goto M, Suga H, Sugimura Y, Bettler B, Oiso Y, Arima H. *J Neurosci.* 33:17166-73, 2013 査読あり

Inflammatory changes in adipose tissue enhance expression of GPR84, a medium-chain fatty acid receptor: TNF $\alpha$  enhances GPR84 expression in adipocytes.

Nagasaki H, Kondo T, Fuchigami M, Hashimoto H, Sugimura Y, Ozaki N, Arima H, Ota A, Oiso Y, Hamada Y. *FEBS Lett.* 586:368-72, 2012 査読あり

〔学会発表〕(計 19 件)

第 24 回臨床内分泌代謝 Update シンポジウム  
リンパ球性漏斗下垂体後葉炎の

新規診断マーカー 抗ラブフィリン 3a 抗体  
梶村益久、岩間信太郎、大磯ユタカ  
2014 年 11 月 28 日 埼玉県さいたま市 大宮  
ソニックシティ 2014 年

第 37 回日本神経科学大会

Analysis of cell death in dentate gyrus of rat model of hyponatremia accompanied by adrenal insufficiency  
Hisakazu Izumida, Yoshihisa Sugimura, Hiroshi Takagi, Haruki Fujisawa, Kohtaro Nakashima, Seiji Takeuchi, Hiroshi Ochiai, Namba, Shintaro Iwama, and Yutaka Oiso  
9 月 13 日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 2014 年

第 87 回日本内分泌学会学術総会

シンポジウム 下垂体と自己免疫  
リンパ球性漏斗下垂体後葉炎の新規診断マーカー 抗ラブフィリン 3a 抗体  
梶村益久、大磯ユタカ  
4 月 26 日 福岡県福岡市 福岡国際会議場 2014 年

第 87 回日本内分泌学会学術総会

慢性低ナトリウム環境において、ミクログリアは過剰な活性化へとプライムされ、浸透圧性脱髄症候群の病態形成に關与する  
高木 博史、梶村 益久、鈴木 陽之、泉田 久和、藤沢 治樹、中島 孝太郎、小川 晃一郎、竹内 誠治、落合 啓史、岩間信太郎、須賀 英隆、土井 由紀子、川ノ口 潤、竹内 英之、水野 哲也、有馬 寛、錫村 明生、大磯 ユタカ  
4 月 24 日 福岡県福岡市 福岡国際会議場 2014 年

第 87 回日本内分泌学会学術総会

抗腫瘍免疫療法薬イピリムマブによる二次性下垂体炎の発症機序の解明  
岩間信太郎、Patrizio Caturegli、梶村益久、大磯ユタカ  
4 月 24 日 福岡県福岡市 福岡国際会議場 2014 年

第 40 回神経内分泌学術集会

ES 細胞由来 AVP 細胞培養系における Rab3a、Rabphilin3a、SNAP25 の AVP 分泌への關与 (会議録)  
清田 篤志、梶村 益久、竹内 誠治、中島 孝太郎、小川 晃一郎、泉田 久和、落合 啓史、藤沢 治樹、高木 博史、須賀 英隆、渡辺 崇、長崎 弘、有馬 寛、大磯 ユタカ 10 月 26 日 宮崎県宮崎市 宮崎市民プラザ 2013 年

第 40 回神経内分泌学術集会

高用量のバソプレシン受容体拮抗薬による血清 Na の急激な上昇は浸透圧性脱髄症候群や頭蓋内出血を惹起する危険性がある(会議録)

高木 博史, 梶村 益久, 泉田 久和, 藤沢 治樹, 中島 孝太郎, 小川 晃一郎, 竹内 誠治, 落合 啓史, 清田 篤志, 須賀 英隆, 有馬 寛, 大磯 ユタカ

10月26日 宮崎県宮崎市 宮崎市民プラザ  
2013年

第40回神経内分泌学会  
慢性低ナトリウム血症はラットにおいて歩行障害を惹起する(会議録)

藤沢 治樹, 梶村 益久, 溝口 博之, 高木 博史, 泉田 久和, 中島 孝太郎, 小川 晃一郎, 竹内 誠治, 落合 啓史, 清田 篤志, 須賀 英隆, 竹内 英之, 有馬 寛, 村田 善晴, 大磯 ユタカ

10月25日 宮崎県宮崎市 宮崎市民プラザ  
2013年

第36回日本神経科学大会、  
Neuroscience 2013  
Involvement of Rab3a and Rabphilin3a in AVP secretion in ES cell-derived AVP neurons

Atsushi Kiyota, Yoshihisa Sugimura, Seiji Takeuchi, Hisakazu Izumida, Hiroshi Ochiai, Haruki Fujisawa, Hiroshi Takagi, Kazuki Fukuoka, Hidetaka Suga, Takashi Watanabe, Hiroshi Nagasaki, Yutaka Oiso  
6月20日 京都市左京区 国立京都国際会議場 2013年

第86回日本内分泌学会学術総会  
シンポジウム 中枢内分泌・視床下部下垂体に関する最近の進歩 基礎と臨床の両面から

リンパ球性漏斗下垂体後葉炎の診断マーカーの発見  
梶村益久

4月25日 仙台市青葉区 仙台国際センター  
- 2013年

第86回日本内分泌学会学術総会  
慢性低Na環境のミクログリアは過剰に活性化され浸透圧性脱髄症候群の病態に關与する

高木 博史, 梶村 益久, 鈴木 陽之, 泉田 久和, 藤沢 治樹, 竹内 誠治, 落合 啓史, 清田 篤志, 須賀 英隆, 土井 由紀子, 川ノ口 潤, 竹内 英之, 水野 哲也, 有馬 寛, 錫村 明生, 大磯 ユタカ

4月26日 仙台市青葉区 仙台国際センター  
- 2013年

第86回日本内分泌学会学術総会  
ES細胞由来AVP産生細胞におけるRab関連タンパク質のAVP分泌への關与

清田 篤志, 梶村 益久, 竹内 誠治, 泉田 久和, 藤沢 治樹, 高木 博史, 福岡 一貴, 渡辺 崇, 長崎 弘, 有馬 寛, 大磯 ユタカ  
4月26日 仙台市青葉区 仙台国際センター

- 2013年

バソプレシン研究会

ES細胞から分化誘導したAVP産生ニューロン培養系におけるRab3a関連蛋白のAVP分泌への關与の検討

清田 篤志, 梶村益久, 竹内誠治, 泉田久和, 落合啓史, 藤沢治樹, 高木博史, 福岡 一貴, 須賀英隆, 渡辺 崇, 長崎弘, 有馬寛, 大磯ユタカ  
東京都新宿区 慶応大学病院  
1月12日 2013年

第39回日本神経内分泌学会学術総会  
シンポジウム

リンパ球性漏斗下垂体後葉炎の疾患マーカー

梶村益久

9月28日 福岡県北九州市 北九州国際会議場 2012年

第35回日本神経科学大会、  
Neuroscience 2012 (口演)

Identification of a novel autoantigen and a diagnostic marker in lymphocytic infundibuloneurohypophysitis (LINH)

Yoshihisa Sugimura, Shintaro Iwama, Atsushi Kiyota, Hiroshi Takagi, Takuya Kato, Atsushi Enomoto, Yutaka Oiso  
9月18日 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場 2012年

第35回日本神経科学大会、  
Neuroscience 2012

Involvement of Ras related proteins in AVP secretion in ES cell-derived AVP neurons

Atsushi Kiyota, Yoshihisa Sugimura, Hiroshi Takagi, Kazuki Fukuoka, Takashi Watanabe, Hiroshi Nagasaki, Yutaka Oiso  
9月19日 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場 2012年

第35回日本神経科学大会、  
Neuroscience 2012

A rapid rise in serum sodium levels due to water diuresis as well as hypertonic saline administration in chronic hyponatremia causes osmotic demyelination syndrome

Hiroshi Takagi, Yoshihisa Sugimura, Haruyuki Suzuki, Atsushi Kiyota, Kazuki Fukuoka, Yutaka Oiso  
9月21日 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場 2012年

第85回日本内分泌学会学術総会  
シンポジウム 自己免疫機序と内分泌代謝疾患

リンパ球性漏斗下垂体後葉炎

梶村益久

4月19日 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場 2012年

第85回日本内分泌学会学術総会

プロテオーム解析による ACTH 単独欠損症  
とリンパ球性下垂体前葉炎の自己抗原の検  
索

清田篤志、梶村益久、岩間信太郎、鈴木陽之、  
高木博史、福岡一貴、西岡朋生、榎本篤、有  
馬寛、大磯ユタカ

4月21日 愛知県名古屋市 名古屋国際会  
議場 2012年

長崎 弘 (HIROSHI NAGASAKI)

藤田保健衛生大学・准教授

研究者番号：30420384

〔図書〕(計 5 件)

抗下垂体抗体の評価法とその臨床的意義  
(解説)

岩間 信太郎(名古屋大学総合保健体育科学セ  
ンター)、梶村 益久、押田 芳治、大磯 ユタ  
カ

内分泌・糖尿病・代謝内科(1884-2917)39 巻  
1号(69-75)(2014.07) 科学評論社

下垂体疾患最前線 漏斗下垂体後葉炎

梶村 益久

ホルモンと臨床(0045-7167)60 巻 10 号  
(41-46)(2012.10)

医学の世界社 実際の発行月 2014年4  
月

内分泌緊急症 リンパ球性漏斗下垂体後  
葉炎の診断マーカー

梶村 益久

内分泌・糖尿病・代謝内科(1884-2917)38 巻  
2号(172-175)(2014.02)

科学評論社

リンパ球性漏斗下垂体後葉炎

梶村益久、大磯ユタカ

下垂体疾患診療マニュアル (243-244)

内分泌シリーズ 診断と治療社 2012年4月

リンパ球性下垂体炎の自己抗体

梶村益久、大磯ユタカ

下垂体疾患診療マニュアル (256)

内分泌シリーズ 診断と治療社 2012年4月

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

梶村 益久 (SUGIMURA YOSHIHISA)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50456670

### (2)研究分担者

大磯 ユタカ (YUTAKA OISO)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40203707

### (3)連携研究者

笹井 芳樹 (YOSHIKI SASAI)

独立行政法人理化学研究所・グループディレ  
クター

研究者番号：20283616