

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780307

研究課題名(和文)自己免疫性内分泌疾患における自己抗体の標的抗原の検索

研究課題名(英文) Identification of autoantibodies in dogs with autoimmune endocrinopathies

研究代表者

西飯 直仁(Nishii, Naohito)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20508478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：犬の内分泌組織に対する自己抗体を検出する検査系を確立した。副腎蛋白に対する自己抗体が副腎皮質機能低下症の犬の11～33%で検出され、犬の副腎皮質機能低下症が自己免疫性である可能性が考えられた。また卵巣蛋白に対する抗体も検出され、複数の内分泌組織に対する抗体の存在が示唆された。また副腎および甲状腺に対する自己抗体を調べたところ、副腎皮質機能低下症および甲状腺副腎皮質機能において複数の自己抗体が検出された。これらの結果は犬の副腎皮質機能低下症および甲状腺機能低下症の早期診断および病態解明に役立つ。

研究成果の概要(英文)：We have developed the method for detecting autoantibodies against proteins isolated from canine adrenocortical gland and other tissues. Autoantibodies against the adrenal proteins were detected in 11 to 33% of dogs with hypoadrenocorticism. In these dogs, hypoadrenocorticism might be related to the autoimmune response. Anti-ovary protein autoantibodies were also detected, which indicated an autoimmune reaction against multiple endocrine tissues. In addition, multiple autoantibodies were found in dogs with hypoadrenocorticism or hypothyroidism. These proteins need to be identified. Results in this study may contribute to diagnosis or research of canine hypoadrenocorticism and hypothyroidism.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：自己抗体 犬 副腎皮質機能低下症 甲状腺機能低下症

1. 研究開始当初の背景

自己免疫によって起こる可能性が示唆されている犬の内分泌疾患として、甲状腺機能低下症、副腎皮質機能低下症、糖尿病が挙げられる。これらの疾患では内分泌組織の破壊によってホルモン分泌の欠乏が起こり、臨床症状が発現する。

犬の甲状腺機能低下症、副腎皮質機能低下症、糖尿病は、内分泌組織(甲状腺、副腎、膵細胞)に対する自己抗体の検出や、組織へのリンパ球浸潤などから、ヒトの各疾患と同様に病態に自己免疫が関与する可能性が考えられている。しかし、現在もこれらの疾患の病因は「特発性」と分類され、病態に関する詳細な検討は進んでいない。

自己抗体は生体の自己免疫反応を直接反映するため、自己免疫疾患の病態を調べるうえで、末梢血中に現れる自己抗体を評価する研究は非常に価値がある。犬の自己免疫性内分泌疾患においてもこれまでに様々な研究報告が発表されている。特に糖尿病と甲状腺機能低下症については、多くの報告が存在する。例えば、糖尿病の犬の約15~20%でインスリン自己抗体(IAA)、高グルタミン酸脱炭酸酵素抗体(GAD抗体)、インスリンノーマ関連蛋白2抗体(IA-2抗体)などの自己抗体がみられることが知られている。甲状腺機能低下症については、抗サイログロブリン抗体、抗サイロキシン抗体、抗サイトロピン抗体などが犬においても検出されることが報告されており、一部は臨床において診断に利用されている。

しかしこれらの自己抗体の標的抗原は、ヒトの疾患において検出された抗原を参考に、犬において測定されたものであり、これらの抗原が犬においても重要な役割を果

たしているか否かについての評価は行われておらず、他の抗原の関与に関しては報告がない。また犬の副腎皮質機能低下症においては自己抗体に関する研究はほとんどない。そしてサイログロブリン投与による甲状腺炎の誘導を除いては、抗原投与による疾患の誘導は報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、犬の甲状腺機能低下症、副腎皮質機能低下症、糖尿病の3疾患において、末梢血中の自己抗体の標的抗原を特定し、疾患の早期診断における有用性について評価するとともに、標的抗原を用いた免疫付与による疾患モデルの確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 自己免疫性内分泌疾患の犬の血清中自己抗体のスクリーニング

甲状腺機能低下症、副腎皮質機能低下症、糖尿病(その他の基礎疾患を持たない)の犬より血清サンプルを臨床症例より採集した。また健康な犬の甲状腺、副腎、膵臓、卵巣、精巣の組織サンプルを採取し、プロテアーゼインヒビターを加えた後、組織ホモジネートを作成した。副腎蛋白は未分画、ミクロソーム分画、ミトコンドリア分画に分離した。これらの犬組織由来蛋白およびヒト副腎特異的蛋白(P450c21、P450c17、P450c11)の蛋白質をウェルに固定したELISA測定系を作成し、血清サンプル中の自己抗体について定量した。

(2) ウエスタンブロッティングによる標的抗原の特定

組織ホモジネートを用いて電気泳動を行い、メンブレンにブロッティングした。自己抗体を含む血清サンプルを1次抗体としてウエスタンブロッティングを行い、正常犬の血清サンプルと比較することで特異的な自己抗体を検出した。

4. 研究成果

サンプル収集の問題から、実験は主に副腎皮質機能低下症の犬について行い、一部甲状腺機能低下症の犬においても実験を行った。

副腎未分画蛋白質、副腎ミクロソーム画分のELISAでは、副腎皮質機能低下症9症例全てで抗体陰性であった。しかし、副腎ミトコンドリア画分のELISAでは3症例で相対的抗体量の高値が認められ、この3症例の血清中に副腎ミトコンドリア画分に含まれる蛋白質と特異的に結合する抗体が含まれている可能性が高いと考えられた。ヒトP450c21のELISAでは3症例で相対的抗体量の高値が認められたため、この3症例ではP450c21を標的抗原とする自己免疫性副腎皮質機能低下症を発症している可能性が考えられた。また、ヒトP450c17のELISAでは1症例で抗体陽性であったことから、P450c17が犬の自己免疫性副腎皮質機能低下症の標的抗原となる場合があると考えられた。副腎以外の組織未分画蛋白質のELISAでは、1症例で卵巣に対する相対的抗体量が高値であった。ヒトの自己免疫性副腎皮質機能低下症で認められる抗ステロイド産生細胞抗体のようなステロイド産生細胞全般に対する抗体の存在が疑われた。

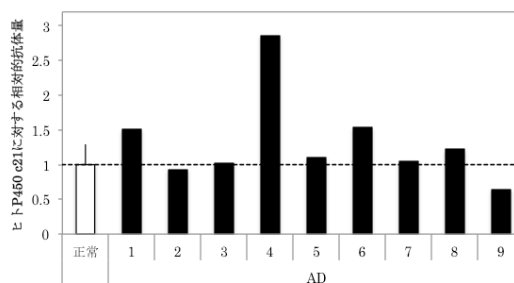


図1 副腎皮質機能低下症の犬におけるヒトP450c21に対する自己抗体ELISA測定結果

ウエスタンブロッティングでは、副腎皮質機能低下症の犬で副腎未分画蛋白質と副腎ミクロソーム画分、副腎ミトコンドリア画分の分子量約153 kDaと副腎ミトコンドリア画分の約125 kDa上で正常や他の症例よりも明らかに濃いバンドが検出された。この2つの分子サイズに分離される蛋白質に対する自己抗体が産生されている可能性がある。甲状腺機能低下症のサンプルを用いて同様にウエスタンブロッティングを行ったところ、甲状腺蛋白の53 kDaの部位にバンドがみられた。今後はこれらの自己抗体の標的抗原を特定する予定である。

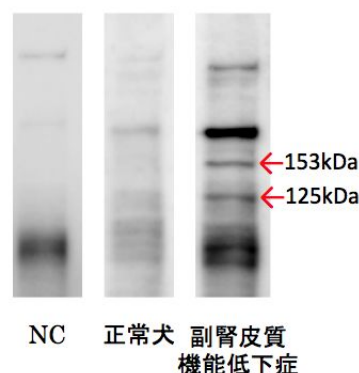


図2 副腎皮質機能低下症の犬における副腎ミトコンドリア画分に対する自己抗体のウエスタンブロッティング画像

本研究では副腎皮質機能低下症9症例中6症例で自己抗体が検出された。これら6

症例のうち4症例が若齢での発症または併発疾患をもつ症例であり、ヒトの多腺性自己免疫症候群と病態が類似している可能性がある。また甲状腺機能低下症においてもこれまで報告のない蛋白に対する抗体が検出された。今後の研究によって疾患の診断および病態の解明に寄与することが期待される。

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)

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

西飯 直仁 (NISHII NAOHITO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20508478