

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09437

研究課題名(和文) 甲状腺自己免疫の研究：マウスにおける抗マウスTSH受容体免疫反応と中枢性免疫寛容

研究課題名(英文) Studies on thyroid autoimmunity: anti-mouse TSH receptor immune response and central tolerance in mice

研究代表者

永山 雄二 (NAGAYAMA, Yuji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号：30274632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスはヒト甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR)免疫に対し、効率よく抗体を産生するが、マウスTSHRに対しては免疫寛容を示す。この免疫寛容における末梢性寛容の関与はそれほど大きくないことを以前示したので、本研究では、中枢性寛容の関与の程度を検討した。抗RANKL抗体による胸腺細胞除去とZAP-70に遺伝子変異を持つSKGマウスを用いて検討したところ、TSHRに対する免疫寛容における中枢性寛容の関与が確認された。

研究成果の概要(英文)：Mice respond well to immunization with human thyrotropin receptor (TSHR), but not to immunization with mouse TSHR. We have previously found that peripheral immune tolerance plays a minor role in immune tolerance against mouse TSHR. The present studies was therefore designed to study a role for central tolerance in immune tolerance against mouse TSHR in BALB/c mice. By using deletion of thymic cells with anti-RANKL antibody and also SKG mice which have a point mutation in ZAP-70 gene, we here clearly showed a significant role for central tolerance in immune tolerance against mouse TSHR in mice.

研究分野：内分泌学

キーワード：甲状腺 自己免疫 バセドウ病 TSH受容体 マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

TSHR は甲状腺特異的蛋白の1つで、バセドウ病における自己抗原である。すなわちバセドウ病では刺激型抗 TSHR 抗体 (thyroid-stimulating antibody; TSAb) が甲状腺を過剰刺激することにより甲状腺機能亢進症を呈する。申請者は、1989年に世界で初めてヒト TSHR cDNA をクローニングし (Biochem Biophys Res Commun. 165(3):1184-1190, 1989)、その後2002年にヒト TSHR 発現アデノウイルスを用いたバセドウ病マウスモデルを作製して (J Immunol. 168 (6): 2789-2794, 2002)、以後バセドウ病の病態研究を展開してきた (Endocr Rev. 26 (6):800-832, 2005 (総説) など)。このモデルは発症率・再現性の高さ、汎用性などから優れたモデルとして高い評価を受けているが、病態解析研究を進めながら、同時に自己免疫の病態をより忠実に再現できるよう改善を重ねている。

その中でヒトとマウスの TSHR のアミノ酸レベルでの相同性は約 87%であるため、マウスにおける真の自己抗原である TSHR はヒト由来ではなくマウス由来と考え、マウス TSHR 発現アデノウイルスを作製して実験を行った。その結果、野生型マウスは抗 TSHR 抗体を産生せずバセドウ病を発症しないことから、マウス TSHR 免疫に対して非常に強い免疫寛容を示すこと、その寛容は TSHR ノックアウト(KO)マウスでは認められないことを見出した (Endocrinology. 151 (8): 4047-4054, 2010)。さらに免疫した KO マウス脾細胞のヌードマウスへの養子移入によって抗 TSHR 抗体産生が長期にわたって認められ、初期には TSAb 陽性・甲状腺ホルモン上昇と甲状腺機能亢進症を呈し、半年後には阻害型抗体が陽性となり、甲状腺ホルモン低下・TSH 上昇と甲状腺機能低下症へ移行した (Endocrinology. 153

(4): 2034-2042, 2012)。

以上より、マウスではマウス TSHR に対して強い免疫寛容を持ち、TSHR KO マウス脾細胞養子免疫により抗マウス TSHR に対する免疫反応によるバセドウ病を誘導できることが示された。

我々はこの免疫寛容の機序を解明するため、さらに実験を進め、まず末梢性免疫寛容の検討のため、種々の作動性共刺激因子抗体及び拮抗性共抑制因子抗体 [cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4), programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1), CD25, CD40, CD137] の影響を検討した。その結果、複数の抗体の組み合わせで抗 TSHR が誘導はされてくるものの、抗体価は低く、バセドウ病を誘導できるほどの強い免疫反応は誘導できなかった (Acta Med Nagasaki, 59 (1): 13-17, 2014.)。

これより、末梢性寛容の影響はあまり大きくないことが示唆された。よって、本研究課題では、中枢性寛容の関与を明らかにする。

2. 研究の目的

バセドウ病は甲状腺刺激ホルモン受容体 (thyroid stimulating hormone receptor; TSHR) に対する免疫寛容が破綻した臓器特異的自己免疫疾患であるが、その破綻原因は不明である。本研究計画では、TSHR に対する免疫寛容の機序としての中枢性免疫寛容の重要性をマウスモデルを用いて明らかにする。

申請者らは、ヒト TSHR 発現アデノウイルスを用いたマウスバセドウ病モデルを世界に先駆けて樹立したが、一方で野生型マウスは マウス TSHR に対して強い免疫寛容を呈することも明らかにしており、これらの

モデルが本研究に有用である。マウスモデルでの免疫寛容機序の解明は、ヒトバセドウ病の病態解明にも重要で、将来の免疫療法への応用も期待される。

3. 研究の方法

(1) 抗 RANKL 抗体による胸腺髓質細胞除去マウス作製と TSHR による免疫

最近 Khan IS らは阻害型抗 RANKL 抗体で効率よく胸腺髓質細胞を除去できることを報告している (J Exp Med. 211: 761, 2014)。なお、胸腺髓質細胞は胸腺での中枢性免疫寛容成立に重要な役割を果たしている細胞である。この方法に倣って、抗 RANKL 抗体の効果を確認する。

確認後、図 1 に示すように、100 μ g 抗 RANKL 抗体 (2A3、Bio X Cell 社より購入) を TSHR 感受性マウスである BALB/c マウスの腹腔に週 3 回、2 週間にわたって投与する。

胸腺を摘出して胸腺皮質細胞と髓質細胞の減少を FACS で検討する (胸腺皮質細胞: CD45⁻, EpCAM⁺, MHC II⁺, Ly51⁺, 髓質細胞: CD45⁺, EpCAM⁺, MHC II⁺, Ly51⁻)。後者の 80% 以上の除去が見られるはずである。同時に negative selection 欠如のための CD4⁺CD8⁺ (double positive) T 細胞の増加も確認する。

既報に従い、ヒト或いはマウス TSHR 発現アデノウイルスで 3 週間隔で 2 回免疫し、2 回目免疫の 2 週後に採血して、抗 TSHR 抗体・甲状腺ホルモンをそれぞれ Flow cytometry と radioimmunoassay (RIA) で測定する。

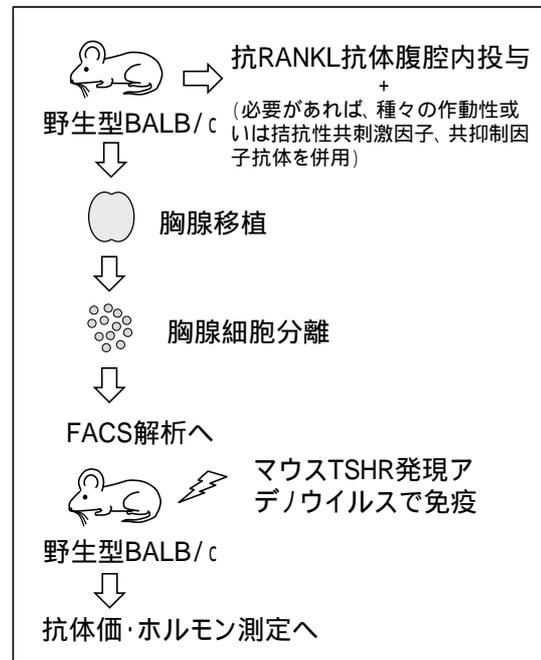


図 1. 抗 RANKL 抗体による胸腺髓質細胞除去マウス作製と TSHR による免疫のシエーマ

(2) 胸腺細胞における自己抗原刺激能の異なるマウスの作出と免疫反応の検討

(1)における TSHR に対する中枢性免疫寛容の重要性の証明から、胸腺における TSHR の発現量の変化が TSHR 免疫への感受性 (すなわちバセドウ病発症の感受性) を変えるという仮説が導き出せる。しかし、動物個体で胸腺での特定の自己抗原の発現レベルを調節することは困難である。そこで、代替法として、胸腺細胞での情報伝達系に關与する ZAP-70 に変異を持つマウスを用いる。ZAP-70 は MHC class II と結合した自己抗原に刺激された T 細胞受容体の細胞内領域に結合して細胞内情報伝達、つまり T 細胞の刺激ひいては negative selection に關与する因子で、これに点突然変異を持つ SKG マウスは ZAP-70 の機能低下のため自己反応性 T 細胞が除去されず、関節リウマチを自然発症する (Nature. 426: 454, 2003)。また、ZAP-70 KO ホモマウスは T 細胞受容体刺激後の細胞内情報伝

達が欠如し免疫不全を呈する。よって、図 2 に示すように、野生型と SKG マウスと ZAP-70 KO マウスを交配して種々のレベルの T 細胞内情報伝達効率を呈するマウスを作出すると、これらでは胸腺に発現する TSHR に種々の異なるレベルで反応する TSHR 反応性 T 細胞が生じることになり、下位になるほど TSHR 自己反応性 T 細胞が除去されず、TSHR 免疫で抗 TSHR 抗体産生 / バセドウ病発症が誘導される可能性がある。この仮説を検証する。



図 2. 胸腺細胞における自己抗原刺激能の異なるマウスの特徴

4. 研究成果

27 年度は胸腺細胞除去による TSHR に対する中枢性免疫寛容破綻実験で、細胞除去に成功し、甲状腺ホルモンの上昇は見られなかったものの、抗 TSHR 抗体価の上昇がみられたことから、胸腺における TSHR に対する中枢性免疫寛容の重要性が示唆された。この結果をさらに確認するため、胸腺細胞での情報伝達に参与する ZAP-70 という蛋白に変異を持つマウスを用いることとした。ZAP-70 は MHC class II と結合した自己抗原に刺激された T 細胞受容体の細胞内領域に結合して、細胞内にその情報を伝え、T 細胞を活性化、ひいては negative selection を誘導するもので、点突然変異を持つマウス (ZAP^{skg/skg} マウス) では、ZAP-70 の機能低下のため、自己反応性 T 細胞が除去されず、自己免疫疾患を発症する。そこで 28 年度は ZAP^{skg/skg} マウスと野生型マウスを掛け合わせて、ZAP-70 の機能に

種々のレベルの障害を持つマウスを作出した。

28,29 年度に ZAP-70^{wt/wt}、ZAP-70^{wt/skg}、ZAP-70^{wt/-}、ZAP-70^{skg/skg}、ZAP-70^{skg/-}、ZAP-70^{-/-} の 6 種類のマウスを作出した。既報に従って、ヒト或いはマウス TSHR A-サブユニット発現アデノウイルスを用いて 3 週間隔で 2 回免疫し、2 回免疫後 2 週で採血して、抗 TSHR 抗体を flow cytometry で、甲状腺ホルモンを ELISA で測定した。同時に甲状腺組織も摘出して組織学的に検討した。胸腺を摘出して、RNA を抽出し、RT-PCR にて ZAP-70 及び TSHR の発現量を測定した。脾細胞を分離して、TSHR 蛋白と共培養し、TSHR 特異的サイトカイン分泌を比較検討した。ヒト TSHR で免疫した場合は、アロ抗原であるため、従来報告通り野生型マウスで反応がよくみられたが、ZAP-70 の機能の低下と並行に T 細胞の機能も落ちるため、徐々に反応の低下がみられ、ZAP-70^{skg/skg}、ZAP-70^{skg/-}、ZAP-70^{-/-} マウスではもはや反応が見られなくなった。マウス TSHR で免疫した場合は、真の自己抗原であるため、野生型マウスでは反応が見られなかったが、ZAP-70 の機能低下に合わせて、negative selection がうまくいかず、自己反応性 T 細胞が出現し、ZAP-70^{skg/skg}、ZAP-70^{skg/-} マウスで徐々に反応が見られるようになった。しかし ZAP-70 の異常のため、T 細胞が十分に活性化されず、抗体の反応のみで、甲状腺ホルモンの上昇、すなわちバセドウ病の発症には至らなかった。ZAP-70^{-/-} マウスでは、おそらく ZAP-70 の機能低下の程度が著明なため、全く反応がなかった。

以上より、3 年間の研究で、TSHR に対する免疫寛容における中枢性寛容の関与が確認された。

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. Nagayama Y. Review article: Radiation Related Thyroid Autoimmunity and Dysfunction. J Radiat Res, in press, 2018. (査読有)
2. Nishihara E, Tsugawa M, Ozaki Y, Nagayama Y, Fukata S, Hirokawa M, Ito M, Nishikawa M, Nakamura H, Ito Y, Miyauchi A. Long-term follow-up of a patient with sporadic non-autoimmune hyperthyroidism due to a thyrotropin receptor mutation (D619G). AACE CI in Case Rep. 1: e85, 2018. (査読有)
3. Shimamura M, Kurashige T, Mitsutake N, Nagayama Y. Role of aldehyde dehydrogenase 1A3 for cancer stem properties of anaplastic thyroid cancer cell lines. Endocrine. 55 (3): 934-943, 2017. (査読有)
4. Kurashige T, Shimamura M, Nagayama Y. N-acetyl-L-cysteine protects thyroid cells against DNA damage induced by external and internal irradiation. Radiat Environ Phys. 56 (4): 405-412, 2017. (査読有)
5. Nagayama Y, Shimamura M, Mitsutake N. Cancer stem cells in the thyroid. Frontiers in Endocrinology, section Thyroid Endocrinology. 7:20, 2016. (査読有)
6. Kurashige T, Shimamura M, Nagayama Y. Differences in quantification of DNA double strand breaks between

53BP1/gammaH2AX focus formation assays and the comet assay in mammalian cells treated with irradiation and N-acetyl-L-cysteine. J Radiat Res. 57 (3): 312-317, 2016. (査読有)

7. Nikitski A, Saenko V, Shimamura M, Nakashima M, Matsuse M, Suzuki K, Rogounovitch T, Bogdanova T, Shibusawa N, Yamada M, Nagayama Y, Yamashita S, Mitsutake N. Targeted Foxe1 overexpression in mouse thyroid causes the development of multinodular goiter but does not induce carcinogenesis. Endocrinology. 157(5):2182-2195, 2016. (査読有)

[学会発表](計 97 件)

1. Nagayama Y. Thyroid cancer in Nagasaki/Hiroshima, Chernobyl and Fukushima. The 2nd summit Italy-Japan. 2017.
2. Nagayama Y. Mouse Models of Sporadic Thyroid Cancer with Lung Metastasis Derived from BRAF-V600E Alone or in Combination with PTEN Loss. 87th annual meeting of American thyroid association. 2017.
3. 永山雄二. 放射線と甲状腺癌・最近の知見. 原子爆弾被爆者指定医療機関等医師研究会. 2017
4. 永山雄二、嶋村美加、蔵重智美、渋沢信行、山田正信、中島正洋. マウスにおいて、BRAF^{V600E} は単独で肺転移を伴う甲状腺癌を誘発し、PTEN 欠失共存で低分化へ向かう. 第 60 回日本甲状腺学会. 2017
5. 嶋村美加、蔵重智美、永山雄二. 甲状腺

癌幹細胞の特性の検討～ROS を指標にして
～. 第2回放射線・災害研究拠点カンファ
ランス. 2017

6. 西原永潤、津川真美子、尾崎由和、永山雄二、深田修司、廣川満良、中尾朋恵、笠原俊彦、久門真子、井手 茜、工藤 工、伊藤 充、西川光重、中村浩淑、宮内 昭. 散発性非自己免疫性甲状腺機能亢進症に同定された TSH 受容体活性型変異 (D619G) . 第90回日本内分泌学会. 2017

7. Nagayama Y. Comparison of Radiation Disaster Between Nagasaki, Chernobyl and Fukushima. NASHIM symposium. 2016

8. 永山雄二. TSH 受容体の構造と機能 - 四半世紀の進展. 第58回甲状腺学会. 2016

9. Nagayama Y. Thyroid cancer stem cells do not exist. 86th annual meeting of American thyroid association. 2016

〔図書〕(計 1 件)

1. Nagayama Y. TSH Receptor (Thyrotropin Receptor). Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. 2017. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.96039-2

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

原爆後障害医療研究所ホームページ:
<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/index-sjis.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

永山雄二 (NAGAYAMA, Yuji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

研究者番号 : 30274632