

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591099

研究課題名（和文） 自己免疫性甲状腺疾患の病態解析研究：遺伝子改変マウスを中心に

研究課題名（英文） Studies on the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases:
using genetically-engineered mice

研究代表者

永山 雄二 (NAGAYAMA YUJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30274632

研究成果の概要（和文）：遺伝子改変マウス（TSH 受容体トランスジェニックマウス、TSH 受容体KOマウス、IL-17 KO マウス、AIRE KO マウス）を用いて、自己免疫性甲状腺疾患（バセドウ病、橋本病）の病態解析を行う。

研究成果の概要（英文）：To scrutinize the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases (Graves' disease and Hashimoto' thyroiditis) using genetically-engineered mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：甲状腺自己免疫、TSH 受容体、橋本病、バセドウ病

1. 研究開始当初の背景

(A) 病態に関わるサイトカイン・エフェクターT細胞の同定：病態に関与するサイトカイン・エフェクターT細胞は今までTh1/Th2バランスで検討されてきたが、最近新規エフェクターT細胞としてTh17が同定され、自己免疫への関与が注目されてきている。

(B) TSH 受容体トランスジェニックマウスでの寛容と橋本病発症の機序解明：甲状腺特異的TSH受容体トランスジェニックマウスではTSH受容体の対する強い寛容が認められた。しかも制御性T細胞の除去により甲状腺機能低下を伴う橋本病発症が誘発された。

2. 研究の目的

(A) バセドウ病・橋本病病態へのTh17の関与を明らかにする。

(B) この寛容の胸腺発現自己抗原とAIREの関連、バセドウ病と橋本病の病態の比較を行う。

3. 研究の方法

(A) 分与を受けたIL-17 KO NOD マウスをNOD-H2^{h4} マウスと交配することによりIL-17 KO NOD-H2^{h4} マウスを作製し、橋本病発症を検討する。また、別入手したIL-17 KO BALB/c マウスをバセドウ病発症実験に用いる。

(B) 分与を受けたAIRE KO マウスとTSH受容体KOマウスをBALB/c 遺伝子背景にし、自己

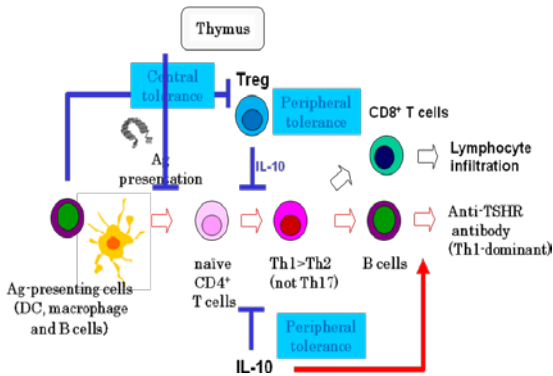
免疫性甲状腺疾患の発症・各種抗体価の検討を行う。

4. 研究成果

(A) IL-17 KO マウスを用いて、自己免疫性甲状腺疾患の発症を検討したところ、NOD-H2^{h4} マウスを用いた橋本病モデルでは、明らかに疾患発症と抗サイログロブリン自己抗体価が抑制された。さらに、IL-17 欠損により、Th17 の消失は勿論だが、Th1 細胞の数も減少した。以前の研究で IFN- γ 欠損 NOD-H2^{h4} マウスでも疾患発症が抑制されたことから、橋本病発症には、Th1 と Th17 の両方が重要であることが、示唆された。

一方、バセドウ病モデルでは、BALB/c マウスを用いた場合、IL-17 欠損は疾患発症に影響を及ぼさなかった。脾細胞からの抗原特異的サイトカイン分泌実験では、IFN- γ のみの分泌が認められたことから、IL-17 はバセドウ病では分泌されず、Th17 は病態形成に関与していないことが示唆された。しかし、NOD-H2^{h4} マウスで検討したところ、Th17 KO マウスでは発症が抑制された。これらのデータはエフェクター T 細胞の重要性はマウス系で異なる事を示唆している。これはヒトでの病態の heterogeneity を反映していると考えられる。

今までの当研究室での研究成果をまとめると抗 TSH 受容体免疫反応は下図のように調節されており、いずれかの異常により疾患が発症すると考えられる。



(B) AIRE KOマウスでのTSH受容体自己免疫反応を我々が以前開発したマウスバセドウ病モデルを用いて野生型マウスと比較検討したところ、わずかなホルモン値と抗体価の上昇が認められたのみで、著変はなかった。そこで、胸腺におけるTSH受容体の発現を検討したところ、AIRE KOマウスにおいて、わずかな発現の低下が見られるのみで、胸腺でのTSH受容体の発現はAIREへの依存が非常に低いことが明らかとなった。以上から、TSH受容体の中枢性寛容に関する実験には、AIRE KO

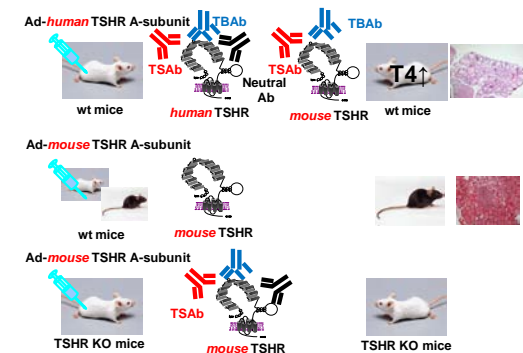
マウスは不適切であることが分かった。

そこで、次にTSH受容体 KOマウスを用いる実験へ移行した。さらに、真の自己免疫反応を見るために、ヒトではなく、マウスTSH受容体を抗原として用いた。そうすると野生型マウスはマウスTSH受容体に全く反応せず、マウスTSH受容体に対する寛容は非常に強固であった。しかしTSH受容体 KOマウスでは、マウスTSH受容体に対する高い抗体価の上昇がみられた。これは恐らく、TSH受容体の胸腺での発現が消失して、中枢性寛容が解除されたためと考えられる。

以上から、TSH受容体への寛容は中枢性寛容が大きな役割を果たしているが、他の多くの自己抗原と異なり、AIRE非依存性であることが明らかとなった。

TSH受容体KOマウスで抗体の上昇がみられたが、KOマウスは受容体を持たないため、バセドウ病は発症しない。そこで、TSH受容体KOマウスの脾細胞のヌードマウスへのトランスファー実験を行った。免疫したTSH受容体KOマウスからの脾細胞はヌードマウスにおいて、6カ月にわたり抗TSH受容体抗体を産生し、非免疫TSH受容体KOマウスからの脾細胞はトランスファーのみでは抗体産生しなかったが、co-inhibitory moleculeであるCTLA4に対する抗体投与によって自然に抗体を産生することを見出した。これはある意味TSH受容体自己免疫の自然発症モデルと言え、今後の関連破綻機序解明に非常に有用なモデルができたと考えられる。

マウスをヒトTSH受容体で免疫した場合とマウスTSH受容体で免疫した場合に誘導される抗体の種類と交叉性をまとめると下図のようになる。



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)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Fukushima K, Kobayashi M, Nagayama Y, Satoh T, Nakahara M, Kawasaki E, Yamasaki H, Ueha S, Matsushima K, Liu E, Eisenbarth GS, Eguchi K, Abiru N. Combined activation of innate and adaptive immunity with polyinosinic-polycytidylic acid and insulin B:9-23 self-peptide in the genetically susceptible NOD mouse: differential effects on insulinitis and diabetes progression. **Biochem Biophys Res Commun.** 367 (4): 719-724, 2008.
2. Nagayama Y, Kaminoda K, Mizutori Y, Saitoh O, Abiru N. Exacerbation of autoimmune thyroiditis by a single dose of whole body irradiation in NOD-H2^{h4} mice. **Int J Radiat Biol.** 84 (9): 761-769, 2008.
3. Mizutori Y, Nagayama Y, Flower D, Misharin A, Aliesky HA, Rapoport B, McLachlan SM. Role of the human A-subunit in transgenic mice that develop thyroid lymphocytic infiltration after immunization and regulatory T cell depletion. **Clin Exp Immunol.** 154 (3): 305-315, 2008.
4. Nakahara M, Nagayama Y, Sogawa R, Saitoh O, Tone S, Abiru N. Expression of immuno-regulatory molecules on the thyrocytes protects NOD-H2^{h4} mice from developing autoimmune thyroiditis. **Endocrinology.** 150 (3): 1545-1551, 2009.
5. Misharin A, Aliesky H, Nagayama Y, Rapoport B, McLachlan SM. Studies in mice deficient for the Autoimmune Regulator (Aire) and transgenic for the thyrotropin receptor reveal a role for Aire in tolerance for thyroid autoantigens. **Endocrinology.** 150 (6): 2948-2956, 2009.
6. Misharin AV, Nagayama Y, Holly A, Aliesky AH, Mizutori Y, Rapoport B, McLachlan SM. Attenuation of induced hyperthyroidism in mice by pre-treatment with thyrotropin receptor protein: diversion of thyroid stimulating antibody to non-functional antibody induction. **Endocrinology.** 150 (8): 3944-3952, 2009.
7. Saitoh O, Mitsutake N, Nakayama T, Nagayama Y. Fibroblast-mediated *in vivo* and *in vitro* growth promotion of thyroid carcinoma FTRL-Tc, not normal thyroid FRTL5, cells. **Thyroid.** 19(7): 735-742, 2009.
8. Horie I, Abiru N, Nagayama Y, Saitoh O, Ichikawa T, Iwakura Y, Eguchi K. T helper type 17 immune response plays an indispensable role for development of experimental autoimmune thyroiditis in NOD-H2^{h4} mice. **Endocrinology.** 150 (11): 5135-5142, 2009.
9. Nagayama Y, Ichikawa T, Saitoh O, Abiru N. Induction of late-onset, spontaneous autoimmune thyroiditis by a single low-dose irradiation in non-obese diabetic-H2^{h4} mice. **J Radiat Res.** 50 (6): 573-577, 2009.
10. Nagayama Y. Observations on the proposed "nonclassical" model of autoimmune hypothyroidism. **Thyroid.** 20 (6): 665-666, 2010.
11. Nakahara M, Mitsutake N, Sakamoto H, Ichikawa T, Abiru N, Chen C-R, Rapoport B, McLachlan SM, Nagayama Y. Enhanced response to mouse thyrotropin (TSH) receptor immunization in TSH knockout mice. **Endocrinology.** 151 (8): 4047-4054, 2010.
12. Chen C-R, Hamidi S, Braley-Mullen H, Nagayama Y, Bresee CMS, Rapoport B, McLachlan SM. Antibodies to thyroid peroxidase arise spontaneously with age in NOD.H-2h4 mice but are not associated with experimentally induced thyroiditis. **Endocrinology.** 151 (9): 4583-4593, 2010.
13. Taira Y, Hayashida N, Brahmanandhan GM, Nagayama Y, Yamashita S, Takahashi J, Gutevitc A, Kozlovsky A, Urazalin M, Takamura N. Current concentration of artificial radionuclides and estimated radiation doses around the Chernobyl Nuclear Power Plant, the Semipalatinsk Nuclear Testing Site, and in Nagasaki. **J Radiat Res.** 52 (1): 88-95, 2011.
14. Ueki I, Abiru N, Kobayashi M, Saitoh O, Ichikawa T, Kerley, Eguchi K, Nagayama Y. B Cell-Targeted Therapy with anti-CD20

monoclonal antibody in a mouse model of Graves' Hyperthyroidism. **Clin Exp Immunol.** 163(3):309-317, 2011.

15. Horie I, Abiru N, Saitoh O, Ichikawa T, Iwakura Y, Eguchi K, Nagayama Y. Differential role of T helper type 17 immune response for Graves' hyperthyroidism in mice with distinct genetic backgrounds. **Autoimmunity.** 44(2): 159-165, 2011.

16. Nakahara M, Nagayama Y, Ichikawa T, Liping Yu, George S. Eisenbarth, Abiru N. The effect of Regulatory T cell depletion on the spectrum of organ-specific autoimmune diseases in non-obese diabetic mice at different ages. **Autoimmunity.** in press.

17. Satoh T, Abiru N, Kobayashi M, Zhou H, Nakamura K, Kuriya G, Nagayama Y, Kawasaki E, Yamasaki H, Yu L, Eisenbarth GS, Araki E, Mori M, Oyadomari S, Eguchi K. CHOP deletion does not impact the development of diabetes but suppresses the early production of insulin autoantibody in the NOD mouse. **Apoptosis.** in press.

[学会発表] (計 19 件)

1. Nagayama Y. Recent advances in mouse models of Graves' hyperthyroidism (symposium). Korean Thyroid Meeting (Gwangju, South Korea), 2008

2. Nagayama Y. Mouse models of Graves' disease. International Society of Endocrinology (Rio de Janeiro, Brazil), 2008.

3. Misharin A, Aliesky H, Nagayama Y, Rapoport B, McLachlan SM. *Aire*-deficiency modulates induction of TSHR antibodies and hyperthyroidism in a mouse model of Graves' disease. The 90th Meeting of Endocrine Society (San Francisco, USA), 2008.

4. Nagayama Y. Introduction of our global COE program titled "Global Strategic Center for Radiation Health Risk Control". 5th International scientific-practical

conference <<ECOLOGY, RADIATION AND HEALTH>> (Semipalatinsk, Kazakhstan), 2009.

5. Nagayama Y. Recent Advances in Studies on Mouse Models of Autoimmune Thyroid Disease. International Symposium on Molecular Thyroidology (Nagoya), 2009

6. Saitoh O, Mitsutake N, Nagayama Y. Fibroblast-Mediated Growth Promotion of Thyroid Carcinoma FRTL-Tc Cells. The 91th Meeting of Endocrine Society (Washington DC, USA) 2009.

7. Horie I, Saitoh O, Abiru N, Nagayama Y. Different Roles of T Helper Type 17 Immune Response in Experimental Graves' Hyperthyroidism Induced in BALB/c and NOD-H2h4 Mice. The 91th Meeting of Endocrine Society (Washington DC, USA) 2009.

8. Nakahara M, Abiru N, Nagayama Y. Age-dependent Alteration in a Spectrum of Organ-Specific Autoimmune Diseases in Nonobese Diabetic Mice. The 91th Meeting of Endocrine Society (Washington DC, USA) 2009.

9. Kobayashi M, Kaneko C, Abiru N, Kan Nakamura, Kuriya G, Satoh T, Kawasaki E, Yamasaki H, Nagayama Y, Eguchi K. Granzyme B Deficiency Reduces Cyclophosphamide Induced Diabetes, But Not Spontaneous Diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. IDS 10 (Sweden), 2009.

10. Kuriya G, Abiru N, Nagayama Y, Nakamura K, Sato T, Kobayashi M, Kawasaki E, Yamasaki H, Iwakura Y, Eguchi K. Loss of IL-17 does not impact on the development of diabetes, but reduces the expression of insulin autoantibodies in NOD mice. IDS 10 (Sweden), 2009.

11. Nakahara M, Nagayama Y. Enhanced response to mouse thyrotropin (TSH) receptor immunization in TSH receptor knockout mice. The 14th International Thyroid Congress (Paris, France) 2010.

12. Johnson KT, Ziler B, Thanos M, Carpinteiro A, Schmid KW, Minich W, Gulbins E, Nagayama Y, Eckstein AK. Immunization of C57BL/6 and BALB/C with adenoviral TSHR289 casuses significant infiltration of orbital tissues with macrophages and T-lymphocytes. International Thyroid Congress (Paris, France) 2010.

13. Nagayama Y. Human *versus* Mouse Thyrotropin Receptor as an Autoantigen in a Mouse Model of Graves' Hyperthyroidism. International Society of Endocrinology (Kyoto, Japan), 2010.

14. Nagayama Y. Animal models of Graves' diseases. (symposium) International Thyroid Congress (Paris, France), 2010.

15. 永山雄二. 自己免疫性甲状腺疾患マウスモデルの開発と最近の新知見. 第 24 回甲状腺病態生理研究会 (東京) 2008

16. 永山雄二. Recent advances of mouse models of autoimmune disease. 第 52 回日本甲状腺学会 (名古屋) 2009.

17. 永山雄二. マウスバセドウ病モデルにおける免疫反応とトレランス. 第 32 回京都甲状腺研究会 (京都) 2010.

18. 永山雄二. マウス甲状腺自己免疫疾患の病態解析—免疫反応とトレランス—. 第 8 回 1 型糖尿病研究会 (長崎) 2010.

19. 永山雄二. 理想的な甲状腺癌マウスモデルの作製. 第 53 回日本甲状腺学会 (長崎) 2010.

[図書] (計 2 件)

1. Nagayama Y. Mouse models of Graves' disease. **The Proceeding for 13th International Congress of Endocrinology.** pp.115-118, 2008.

2. Nagayama Y. Animal models of autoimmune thyroid disease. (In) **Immunoendocrinology: Scientific and Clinical Aspects.** Eisenbarth G (ed), Humana Press, pp.415-426, 2011.

[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

<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/genetech/genkenbunshi/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永山 雄二 (NAGAYAMA YUJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 30274632

(2) 研究分担者

阿比留 教生 (ABIRU NORIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 00380981