

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591368

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TSH受容体免疫反応と免疫寛容

研究課題名(英文) Studies on thyroid autoimmunity: anti-TSHR immune response and 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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：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が、TSHR KOマウスはこの免疫寛容を欠く。さらにKOマウスの脾細胞養子移入によりヌードマウスに抗TSHR免疫反応を誘導できるが、甲状腺機能亢進・TSAbが持続せず、容易に機能低下・BAb出現に陥る。本研究では、これらの免疫反応機序を詳細に検討した。種々の共抑制因子抑制、共刺激因子刺激による末梢性寛容抑制では抗体価上昇は見られたが、バセドウ病発症には至らなかった。一方中枢性寛容は技術的な問題で検討はできなかった。よって末梢性寛容と中枢性寛容の相対的な重要性は比較検討ができなかった。また養子免疫後のバセドウ病は繰り返し免疫で維持できた。

研究成果の概要(英文)： We have recently shown that (i) wt mice are tolerant, while TSHR KO mice are responsive to the mouse receptor in a mouse model of Graves' disease using adenovirus expressing mouse TSHR, and (ii) anti-TSHR immune response could be adoptively transferred from TSHR KO to nude mice but that hyperthyroidism and TSAb were transient and soon changed to hypothyroidism and TBAb. Therefore, we here studied (i) the mechanisms of immune tolerance and response in wt KO mice, respectively, and (ii) those of immune response in the adoptive transfer model. In the evaluation of the peripheral tolerance, inhibition of co-inhibitory molecules and stimulation of co-stimulatory molecules increased the anti-TSHR antibodies, but did not develop TSAb or hyperthyroidism. On the other hand, the studies on central tolerance did not technically work well. In the adoptive transfer model, Graves' disease could be maintained by repetitive immunization following transfer.

研究分野：内分泌学

キーワード：バセドウ病 マウスモデル TSH受容体

1. 研究開始当初の背景

甲状腺刺激ホルモン受容体 (thyroid stimulating hormone receptor; TSHR) は甲状腺特異的蛋白の1つで、自己抗原としてバセドウ病の病態に深く関与している。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、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以後、バセドウ病の病態研究を展開し、多くの論文・総説を出してきた。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、同時に以下のような幾つかの問題も抱えている。

(1) ヒトとマウスの TSHR の相同性は約 87% であり、ヒト TSHR は厳密な意味でマウスの自己抗原ではない。マウス TSHR の使用が推奨される。

(2) 誘導型であるため、疾患は 2~3 ヶ月しか持続しない。よってこのモデルは抗原に対する免疫反応誘導モデルとしては有用だが、異常免疫反応の慢性的持続 (すなわちヒトの自己免疫疾患の病態) のよいモデルとは言い難い。機能亢進状態がより長期にわたり持続するモデルが望ましい。さらに言えば自然発症長期持続型モデルがベストである。

これらの解決のため、我々はマウス TSHR 発現アデノウイルス (Ad-mTSHR A-subunit) を作製し、実験を行ったところ、野生型マウスは抗 TSHR 抗体/バセドウ病を発症せず、マウス TSHR 免疫に対して非常に強い免疫寛容を示すこと、この寛容は 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。これらのデータにより、野生型マウスはヒト TSHR とマウス TSHR に対して異なる免疫反応を呈することが明らかとなり、ヒト TSHR は厳密な意味でマウスでの自己抗原ではなく、マウスでの TSHR に対する自己免疫研究にはマウス TSHR の使用が必須であるという結論に至った。

しかし TSHR KO マウスは TSHR を欠くため抗 TSHR 抗体に反応できず、このままではマウス TSHR を自己抗原としたバセドウ病モデルとはなりえない。そこで免疫した KO マウスの脾細胞をヌードマウスに養子移入したところ、抗 TSHR 抗体産生は 6 ヶ月間にわたって認められ、初期には甲状腺ホルモンが上昇し TSAb 陽性であったが、半年後には甲状腺ホルモンは低下気味で、TSH が上昇し、阻害型抗体 (thyroid-

blocking antibody; TBAb) が陽性となった。

これらから、この養子移入法により長期にわたる抗 TSHR 抗体産生実験系が確立されたことになる。しかし、TSAb の産生は長期間観察されず TBAb へ自然に移行していく、つまり長期間にわたる抗体産生にも拘わらず、バセドウ病は長期化しないという新たな問題が浮かび上がった。

2. 研究の目的

我々はヒト 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作製して病態解析研究を行ってきたが、近年マウス TSHR を用いた実験系を確立し、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が、TSHR KO マウスはこの免疫寛容を欠くことを見出した。さらに KO マウスの脾細胞養子移入によりヌードマウスに抗 TSHR 免疫反応を誘導できることも明らかとした。本研究では、この野生型マウスにおける免疫寛容・KO マウスにおける寛容破綻の機序と養子移入モデルでの免疫反応を解析し、ヒトバセドウ病病態解明研究への展開の基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウスにおける免疫寛容・TSHR KO マウスにおける免疫寛容破綻の機序解明

(1) 免疫を末梢で負に制御する細胞群・共抑制因子を抗体で抑制し、さらに共刺激因子を抗体で刺激することの免疫寛容に及ぼす影響を観察した。野生型マウスを免疫する際、免疫を末梢で負に制御する細胞群・共抑制因子に対する抗体 (抗 CD25、CTLA4、PD-L1) 共刺激因子を刺激する抗体 (抗 CD40、CD137) を投与し、寛容が破綻できるか否か検討した。

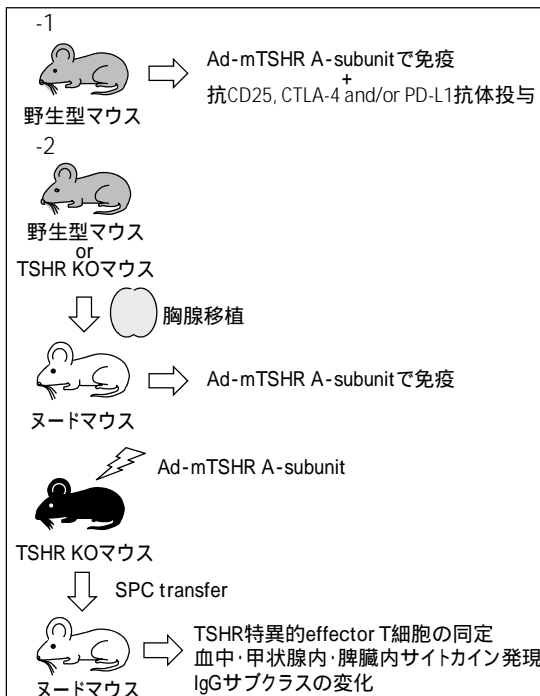
(2) 中枢性寛容の関与検討のため、野生型マウスと KO マウスの胸腺をヌードマウスへ移植し、ヌードマウスの T リンパ球を教育し、免疫寛容・寛容破綻を検討した。胸腺における TSHR 発現が中枢性寛容に重要であるという仮説のもと、野生型マウスの胸腺移植ではヌードマウスの TSHR 特異的 T 細胞が正常胸腺で除去され、抗体は産生されずバセドウ病は発症しないが、一方、KO マウスの胸腺移植ではヌードマウスの TSHR 特異的 T 細胞は胸腺で除去されず、抗体産生/バセドウ病発症がみられると考えた。

(3) 免疫寛容・寛容破綻の機序解明のため、野生型マウスとKOマウス間で胸腺除去後に胸腺移植を行い、免疫反応の変化を観察した。

野生型マウスから胸腺を摘出し、TSHR KOマウスの胸腺を腎被膜下に移植した。放射線照射にて骨髄を破壊し、野生型マウスの骨髄細胞を移植した。胸腺におけるTSHR発現が中枢性寛容に重要であるという我々の仮説が正しければ、野生型マウスのTSHR特異的T細胞が除去されず、免疫により野生型マウスに抗体産生/バセドウ病発症が見られると考えた。

次いで、TSHR KOマウスから胸腺を摘出し、野生型マウスの胸腺を腎被膜下に移植した。放射線照射にて骨髄を破壊し、KOマウスの骨髄細胞を移植した。胸腺におけるTSHR発現が中枢性寛容に重要であるという我々の仮説が正しければ、KOマウスが持つTSHR特異的T細胞が正常胸腺によって除去されるので、免疫してもKOマウスに抗体産生/バセドウ病発症が認められないと考えた。

養子移入系での経時的な免疫反応の変化を種々の指標をもとに解析した。



(1) 前述のように、マウス TSHR で免疫した TSHR KOマウス脾細胞のヌードマウスへの養子免疫モデルは、長期にわたる抗 TSHR 産生を可能にしたが、同時に TSAb/バセドウ病は一時的で徐々に TBAb/甲状腺機能低下へ移行するということも明らかとなった。この変化の原因を明らかにするために、養子免疫後の免疫反応の経時的変

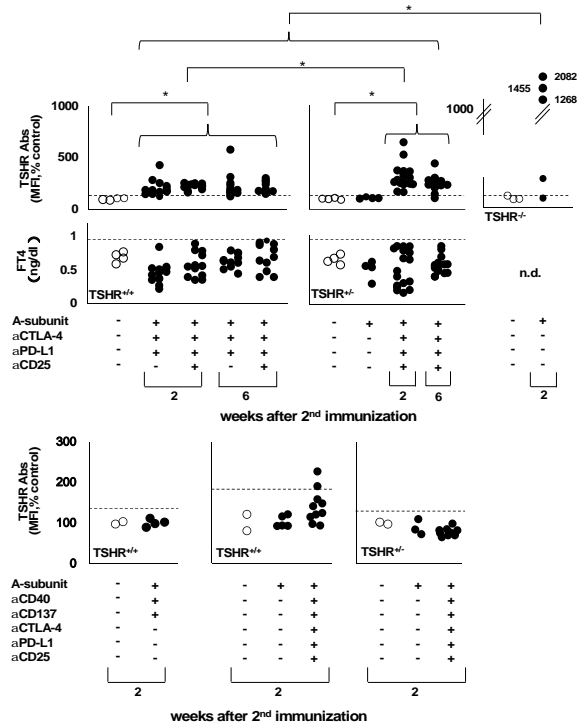
化を検討した。指標としては、(i) T cell recall assay 及び ELISPOT 法による TSHR 特異的 effector T細胞の同定(Th1、Th2、Th17) (ii) ELISA 及び RT-PCR による血中・甲状腺内・脾臓内サイトカイン発現、(iii) ELISA による IgG サブクラスの変化を検討した。

(2) 抗原連続投与による TSAb 産生の維持を試みた。

4. 研究成果

(1) 共抑制因子抑制、共刺激因子刺激の効果：

TSHR^{+/+}及び TSHR^{+/-}マウスを種々の作動性或いは拮抗性共刺激因子・共抑制因子抗体で処理後 TSHR で免疫した。下図に示すように、抗体価の上昇が認められたが、抗体価は TSHR^{-/-}の場合に比較して非常に低く、甲状腺ホルモン (FT₄) 上昇には至らなかった。TSAb は測定しなかったが、非機能的な抗体出現のみであろうと考えられた。



(2) 野生型マウスにおける免疫寛容・KOマウスにおける免疫寛容破綻の機序解明：

胸腺移植の基礎検討を行い、正常マウスの胸腺をヌードマウスの腎被膜下へ移植したところ、胸腺移植約4~6か月後にヌード

マウス末梢血にリンパ球の増加が認められることを確認した。しかしポジティブコントロールであるはずのヒトTSH受容体免疫で反応が認められなかったため、移植部位を変更して、腹腔内リンパ節への移植を試みた。これによっても、免疫系の再構築に成功したが、これでもポジティブコントロールに反応が見られず、これ以上の検討ができなかった。

(1) 養子移入後の経時的な免疫反応の変化:

バセドウ病が長期持続した群と機能低下へ変化した群での(i) T cell recall assay、(ii) ELISA による血中・甲状腺内・脾臓内サイトカイン発現、(iii) ELISA によるIgGサブクラスの変化には差異は認められなかった。TSAb 長期持続と短期消失群の際は見いだせなかった。

この実験系を用いて、TSHRノックアウトマウス胸腺の野生型マウスへの移植、さらには野生型マウスの胸腺のTSH受容体ノックアウトマウスへの移植により、正常胸腺によるTSHR自己反応性Tリンパ球のネガティブセレクションがTSH受容体への強力な免疫耐性に重要であることが明らかとなった。以前の末梢性免疫耐性実験で弱い末梢性耐性しか同定できなかったことと考え合せて、TSHRに対する免疫耐性は中枢性がより重要であることが示されたことになる。ヒトにおけるTSH受容体遺伝子の多型と胸腺における発現量、

バセドウ病の発生頻度のデータを支持する研究成果である。

(2) 抗原連続投与による TSAb 産生の維持:

マウス TSHR で免疫した TSHR ノックアウトマウスの脾細胞へヌードマウスへの養子免疫では、バセドウ病は誘導できたが、持続せず、刺激型抗体優位から阻害型抗体優位へ移行し、甲状腺機能低下症となった。それぞれの抗体を産生するリンパ球の寿命の違いによると考えられ、養子免疫後、間欠的にマウス TSHR 発現アデノウイルスで免疫して、抗原に暴露し続けることで、刺激型抗体産生リンパ球が維持され、甲状腺機能亢進症が持続することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

1. Kurashige T, Shimamura M, Yasui K, Mitsutake N, Matsuse M, Nakashima M, Minami S, Eguchi S, Nagayama Y. Expression of aldehyde dehydrogenase in normal and cancerous tissues of thyroids. *Hormone and Metabolic Research.* 47 (3): 194-199, 2015. (査読有)
2. Jia N, Nakazawa Y, Guo C, Shimada M, Sethi M, Takahashi Y, Ueda H, Nagayama Y, Ogi T. A rapid, comprehensive system for assaying DNA repair activity and cytotoxic effects of DNA-damaging reagents. *Nature Protcol.* 10 (1): 12-24, 2015.(査読有)
3. Nakashima M, Shimamura M, Yasui K, Mitsutake N, Matsuu-Matsuyama M, Matsuda K, Nagayama Y. Cancer stem cell theory and intratumor heterogeneity in thyroid carcinogenesis. *Journal of Basic Clinical Medicine.* 4 (1): 8-12, 2015. (査読有)
4. Orim F, Bychkov A, Shimamura M, Nakashima M, Mito M, Bogdanova T, Matsuse M, Suzuki K, Saenko V, Nagayama Y, Yamashita S, Mitsutake N. Thyrotropin signaling confers more aggressive features with higher genomic instability on BRAF^{V600E}-induced thyroid tumors in a mice model. *Thyroid.* 24 (3): 502-510, 2014. (査読有)
5. Shimamura M, Nakahara M, Kurashige T, Yasui K, Nakashima M, Nagayama Y. Disruption of transforming growth factor- β signaling in thyroid follicular epithelial cells or intrathyroidal fibroblasts does not promote thyroid carcinogenesis. *Endocrine Journal.* 61 (3): 297-302, 2014. (査読有)
6. Shimamura M, Nagayama Y, Matsuse M, Yamashita S, Mitsutake N. Analysis of multiple markers for cancer stem-like cells in human thyroid carcinoma cell lines. *Endocrine Journal.* 61 (15): 481-490, 2014. (査読有)
7. Yasui J, Nakahara M, Shimamura M, Kurashige T, Yasui K, Abiru N, Kawakami A, Nagayama Y. Minor contribution of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and programmed cell death 1 ligand 1 in immune tolerance against mouse thyrotropin receptor in mice. *Acta Medica Nagasakiensia.* 59 (1): 13-17, 2014. (査読有)

1. Kurashige T, Shimamura M, Yasui K, Mitsutake N, Matsuse M, Nakashima M, Minami S, Eguchi S, Nagayama Y.

8. Johnson KTM, Ziler B, Schott M, Müller M, Minich WB, Nagayama Y, Gulbins E, Eckstein AK, Berchner-Pfannschmidt U. Examination of Orbital Tissues in Murine Models of Graves' Disease reveals expression of UCP-1 and the TSHR in retrobulbar adipose tissues. *Hormone and Metabolic Research*. 45 (6): 401-407, 2013. (査読有)
9. Kobayashi M, Kaneko-koike C, Abiru N, Uchida T, Akazawa S, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Ida H, Kawasaki E, Yamasaki H, Nagayama Y, Sasak H, Kawakami A. Genetic deletion of Granzyme B does not confer resistance to the development of spontaneous diabetes in NOD mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 173 (3): 411-418, 2013. (査読有)
10. Kashiya K, Nakazawa Y, Shimada M, Sasaki K, Takahashi Y, Fawcett H, Lewin SO, Carr L, Yoshida K, Utani A, Hirano A, Yamashita S, Nagayama Y, Mitsutake N, Lehmann AR, Ogi T. Identification of new Cockayne syndrome patients deficient in the ERCC1 and XPF/ERCC4 gene. *American Journal of Human Genetics*. 92 (5): 807-819, 2013.(査読有)
11. Kuriya G, Abiru N, Kobayashi M, Nagayama Y, Akazawa S, Nakamura K, Sato T, Horie I, Kuwahara H, Kawasaki E, Yamasaki H, Yu L, Eisenbarth GS, Iwakura Y, Eguchi K. Double deficiency in IL-17 and IFN- γ signaling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*. 56 (8): 1773-1780, 2013. (査読有)
12. Yasui K, Shimamura M, Mitsutake N, Nagayama Y. SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition but not cancer stem cell-like properties in thyroid cancer. *Thyroid*. 23 (8): 989-996, 2013. (査読有)
13. Shimamura M, Nakahara M, Orim F, Kurashige T, Mitsutake N, Nakashima M, Kondo S, Yamada M, Taguchi R, Kimura S, Nagayama Y. Postnatal expression of BRAF^{V600E} does not induce thyroid cancer in mouse models of thyroid papillary carcinoma. *Endocrinology*. 154 (11): 4423-4430, 2013. (査読有)
14. 荻朋男、中沢由華、佐々木健作、郭朝万、吉浦孝一郎、宇谷厚志、永山雄二：紫外線高感受性症候群責任因子 UVSSA の分子機能解析 *生化学*. 85 (3): 133-144, 2013 (査読無)
15. Nagayama Y, Nakahara M, Shimamura M, Horie I, Arima K, Abiru N. Prophylactic and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism in mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 168 (3): 268-273, 2012. (査読有)
16. Nakahara M, Johnson K, Eckstein A, Yamada N, Taguchi R, Abiru N, Nagayama Y. Adoptive transfer of antithyrotropin receptor (TSHR) autoimmunity from TSHR knockout mice to athymic nude mice. *Endocrinology*. 153 (4): 2034-2042, 2012. (査読有)
17. 永山雄二、西原永潤：甲状腺機能異常症の病因と病態生理．最新医学別冊「新しい診断と治療の ABC (25) 甲状腺疾患 改訂第 2 版」(最新医学社). 43-849, 2012. (査読無)
18. 永山雄二：バセドウ病の免疫異常．カレントセラピー．31 (1): 76-80, 2012. (査読無)
- { 学会発表 }(計 6 件)
1. 永山雄二、藏重智美. 甲状腺細胞における放射線外照射・内照射誘発 DNA 二重鎖切断と抗酸化剤の効果の検討. 第 57 回日本放射線影響学会 (鹿児島) 10/1-3, 2014.
2. 永山雄二. バセドウ病・バセドウ病眼症のマウスモデル. 第 57 回日本甲状腺学会 (大阪) 11/13-15, 2014. (シンポジウム招待講演)
3. Nagayama Y. Animal models of Graves' diseases. Centennial of Hashimoto Disease (Fukuoka, Japan) 12/1-4, 2012. (シンポジウム招待講演)
4. Akazawa S, Abiru N, Uchida T, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Kobayashi M, Yui K, Nagayama Y, Kawakami A. Interferon regulatory factor 4 silencing suppresses type 1 diabetes in the non-obese diabetic

mice. 12th International Congress of the Immunology Diabetes Society (Victoria, Canada) 6/15-19, 2012.

5. Kuriya G, Uchida T, Abiru N, Akazawa S, Kobayashi M, Nakamura K, Nagayama Y, Kanagawa O, Iwakura Y, Kawakami A. IL-17/IFN- γ receptor double-knockout clearly suppresses the development of diabetes compared to the IL-17 single-knockout in the NOD mouse. 12th International Congress of the Immunology Diabetes Society (Victoria, Canada) 6/15-19, 2012.
6. Nishihara E, Fukata S, Hishinuma A, Nagayama Y, Amino N, Miyauchi A. The prevalence of TSH receptor mutation and clinical characteristics among 84 patients with hyperthyroidism with diffuse goiter and negative TBII. 15th International Congress of Endocrinology (Florence, Italy) 5/5-9, 2012.

〔図書〕(計 0 件)

〔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:
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