

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791060

研究課題名(和文)自己免疫性甲状腺疾患におけるエフェクターT細胞の機能解析研究

研究課題名(英文) Analysis of the effector T cells in the pathogenesis of experimental autoimmune thyroid disease

研究代表者

堀江 一郎 (HORIE, Ichiro)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：30457577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：バセドウ病と橋本病(慢性甲状腺炎)は代表的な甲状腺特異的自己免疫疾患であるが、全く異なる正反対の臨床像を呈する。

自己免疫性甲状腺疾患において免疫反応を惹起するエフェクターT細胞と免疫を負に調節する制御性T細胞(Treg)のバランスに注目して研究を展開してきており、今回疾患の病因に関わる各種エフェクターT細胞[T helper type 1(Th1), Th17]の重要性・可塑性をそれぞれのマウスモデルを用いて比較検討した。結果、バセドウ病においてはTh1のみ、橋本病においては、Th1とTh17の双方が疾患形成に重要であることを証明することが出来た。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that robust induction of a single arm of effector T cells, either Th1 or Th17, might be sufficient for inducing thyroiditis in NOD-H2h4 mice. To address this hypothesis, enhanced immune responses consisting of either Th1 or Th17 were induced by anti-CD25 antibody-mediated depletion of regulatory T cells in thyroiditis-resistant IL-17 knockout or IFN-receptor KO, respectively, NOD-H2h4 mice. Depletion of Treg in IL-17 KO mice elicited antithyroglobulin autoantibodies and thyroiditis. Our findings demonstrate that a robust Th1 immune response can by itself induce thyroiditis in otherwise thyroiditis-resistant IL-17 KO mice. Thus, unlike Th17 cells in IFN-RKO mice, Th1 cells enhanced by Treg depletion can be sustained and induce thyroiditis.

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：医歯薬学

キーワード：甲状腺 自己免疫 IL-17 IFN-gamma Th17 Th1 バセドウ病 橋本病

## 1. 研究開始当初の背景

バセドウ病と橋本病(慢性甲状腺炎)は代表的な甲状腺特異的自己免疫疾患であるが、前者が甲状腺特異的自己抗原である甲状腺刺激ホルモン(以下、TSH)受容体に対する刺激型抗体により甲状腺が過剰刺激されて甲状腺機能亢進症を呈するのに対し、後者はサイログロブリンや甲状腺ペルオキシダーゼなどの甲状腺特異的自己抗原に対する細胞性免疫により甲状腺破壊ひいては甲状腺機能低下症を呈する疾患であり、同じ甲状腺特異的自己免疫疾患といえども、全く異なる正反対の臨床像を呈する点で非常に興味深い。よってこれらの疾患の病態の比較解析は、臓器特異的自己免疫疾患の病態解明には非常に有用と考えられる。我々は、2002年にマウスバセドウ病モデルを作製して(J Immunol.168:2789,2002)、以後病態解析研究を進めてきた(Endocr Rev. 26:800, 2005などの総説)。このマウスバセドウ病モデルはその再現性の高さ・発症頻度の高さ・全ての系のマウスに使用可能な点、などから最も病態解析に適したモデルであると考えられている。また同時に、橋本病の自然発症モデルである NOD-H2h4 マウスを用いた研究も展開している(Endocrinology.150:1545,2009など)。

また我々は、自己免疫性甲状腺疾患において免疫反応を惹起するエフェクターT細胞と免疫を負に調節する制御性T細胞(Treg)のバランスに注目して研究を展開してきた。バセドウ病における Treg の重要性は既に当研究室で明らかにされていた(Endocrinology.147:2417, 2006)ので、先ず橋本病モデルにおいても Treg が疾患発症に深く関与している事を確認した(J Autoimmun. 29:195,2007)。次に新規エフェクターT細胞である Th17 の橋本病とバセドウ病における関与を検討し、橋本病では、疾患の発症・進展に伴い Th1 細胞と共に Th17 細胞が甲状腺内及び脾臓に集積してくる事を明らかにし、次いで IL-17 ノックアウト(KO)マウスでは野生型マウスに比較して、橋本病の発症及び抗サイログロブリン抗体価が有意に抑制されることを見出し、橋本病病態における Th17 の関与を初めて明らかにした(Endocrinology.150:5135,2009)。一方、バセドウ病モデルでは、好発系である BALB/c マウスでは抗原刺激によっても脾細胞から IL-17 は分泌されず、IL-17 KO マウスでも疾患発症が野生型マウスと同様に認められたことから、バセドウ病病態への Th17 の関与は少ないと考えられた。ただし好発系ではない NOD-H2h4 マウスでは、元来バセドウ病発症は低いが、IL-17 KO により発症が完全に抑えられたことから、IL-17 の関与はマウスの系によって異なる事が示された(ヒトでは個々人で異なることを示唆する)(Autoimmunity. 44:159-165,2011)。

以前当研究室では橋本病・バセドウ病いずれにおいても Th1 免疫反応の重要性を見出していたので、合わせて、橋本病では Th1 と Th17、バセドウ病では Th1 免疫反応が重要という結論を導き出すことができた事になる。

前述の研究結果から、本研究では自己免疫性甲状腺疾患において、各エフェクターT細胞の病態への関与を再検討する必要があると考え、研究を進めることとした。

## 2. 研究の目的

自己免疫性甲状腺疾患におけるエフェクターT細胞、特に Th1 と Th17 に関する機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

(I) Th1 欠損マウスでの自己免疫性甲状腺疾患の発症の検討;

(1) バセドウ病モデル: IFN- $\gamma$ 受容体 KO NOD マウス(IFN- $\gamma$ R KO NOD)は既に入手している(Diabetes. 49:2007,2000)。これを野生型 BALB/c と最低7回バッククロスして(これでゲノムの95-98%が入れ替わる)、IFN- $\gamma$ R 遺伝子の genotyping と NOD と BALB/c の MHC class II の phenotyping を繰り返しながら、IFN- $\gamma$ R KO BALB/c マウスを樹立する。

このマウスを2群に分け、一方は抗 CD25 抗体で前処置して Treg を除去し、他方はコントロール抗体で処置し、次いで両群を既報に従って TSHR 発現アデノウイルスで免疫して(J Immunol.168:2789,2002)、バセドウ病の発症を比較検討する。評価には、甲状腺ホルモン値・抗 TSHR 抗体価・組織変化・脾細胞からのサイトカイン分泌等を用いる。

(2) 橋本病モデル: IFN- $\gamma$ R KO NOD マウスを野生型 NOD-H2h4 と掛け合わせて、IFN- $\gamma$ R 遺伝子の genotyping と NOD と NOD-H2h4 の MHC class I の phenotyping で確認しながら、IFN- $\gamma$ R KO NOD-H2h4 マウスを樹立する。なお、NOD と NOD-H2h4 は MHC のみが異なるので、頻回のバッククロスは必要ない。

このマウスを2群に分け、一方は抗 CD25 抗体で Treg を除去し、他方はコントロール抗体で処置し、次いで両群に0.15%ヨード含有飲料水を8週間与え(Endocrinology.150:5135, 2009)、橋本病の発症を組織変化・抗サイログロブリン抗体価・脾細胞からのサイトカイン分泌等を指標として比較検討する。

(II) Th1/Th17 両欠損マウスでの橋本病の発

症の検討；

以前作製した IL-17 KO NOD-H2h4 マウスと上記で作製した IFN- $\gamma$  KO NOD-H2h4 マウスから、IL-17/IFN- $\gamma$  double KO NOD-H2h4 マウスを樹立する。次いで上記のように、抗 CD25 抗体とヨード含有飲料水を用いて、橋本病発症を検討する。

この double KO マウスで発症が認められた場合、病態に關与する責任因子を同定するため、病変部に発現しているサイトカイン/ケモカインを包括的に RT-PCR 及び ELISA で測定する。技術的には、「inflammatory response and autoimmunity PCR arrays (SA Biosciences)」や「BioPlex cytokine assay (BioRad)」を用いて、mRNA レベル・蛋白レベルで網羅的にサイトカイン/ケモカイン発現の解析が可能である。

同定できたサイトカイン/ケモカインの機能は、使用可能な特異的抗体或いは KO マウスを用いて検討する。

#### 4. 研究成果

( ) Th1 欠損マウスでの自己免疫性甲状腺疾患の発症の検討；

(1) バセドウ病モデル：IFN- $\gamma$  受容体 KO NOD マウス (IFN- $\gamma$ R KO NOD) と野生型 BALB/c を掛け合わせて、IFN- $\gamma$ R KO BALB/c マウスを樹立した。まずこのマウスを TSHR 発現アデノウイルスで免疫して、既報通りバセドウ病が発症しないことを確認した。次に抗 CD25 抗体を用いて制御性 T 細胞を除去して免疫能を高めた状態で免疫下がやはり疾患発症には至らなかった。これより、橋本病モデルと同様に、バセドウ病においても、IFN- $\gamma$ 、つまり Th1 免疫反応の重要性が再確認された。

(2) 橋本病モデル：前年度の研究をさらに進展させるため、別の制御性 T 細胞である CD8+CD12+ T 細胞の抗 CD122 抗体による除去、また中和抗体による免疫抑制性接着因子 PD-L1 の阻害の橋本病発症に及ぼす影響を検討したところ、IL-17 KO NOD-H2h4 マウスでは発症したが、IFN- $\gamma$ R KO NOD-H2h4 マウスでは発症しなかった。よって、前年同様 Th17 に比較して Th1 の重要性が示された。

(II) Th1/Th17 両欠損マウスでの橋本病の発症の検討；以前作製した IL-17 KO NOD-H2h4 マウスと今回作製した IFN- $\gamma$ R KO NOD-H2h4 マウスから、IL-17/IFN- $\gamma$ R double KO NOD-H2h4 マウスを樹立し、Th1/Th17 両欠損マウスでの橋本病の発症の検討したところ、発症せず。従ってここでも Th17 に比較して Th1 の重要性が示された。( Horie, Endocrinology 152:4448-4454, 2011)

更に、in vitro 樹立抗原特異的

Th1/Th2/Th9/Th17 T 細胞による疾患誘導の検討した。マウス T 細胞を自己抗原 (TSHR 蛋白、或いはサイログロブリン) と樹状細胞と以下の組み合わせのサイトカインで培養し、それぞれの抗原特異的 Th1/Th2/Th9/Th17 T 細胞を作製する：Th1 条件：IL-12, 抗 IL-4 & 抗 IL-23, Th2 条件：IL-4, 抗 IFN- $\gamma$  & 抗 IL-12, Th9 条件：IL-4 & TGF- $\beta$ , Th17 条件：IL-6, TGF- $\beta$ , 抗 IL-4, 抗 IL-12 & 抗 IFN- $\gamma$  にて検討したところ、Th1 の条件のみで橋本病が発症し、あらためて Th1 の重要性が認識され、この系統の阻止が疾患制御に重要であると考えられた。

以上のように、同じ自己免疫性甲状腺疾患でも、異なるエフェクター T 細胞、即ち異なるサイトカイン、によって誘導されることが大いに考えられる。これは最近注目を集めている自己免疫疾患に対する抗サイトカイン療法において単一の抗体による治療の限界を示唆する。さらに、我々の以前のデータ (Th17 の重要性はマウスの系によって異なる) と共に、ヒトにおける病態の不均一さ (しかしエンドポイントである臨床像は同じ) を示唆していると考えられる。よって、ヒトでの自己免疫性甲状腺疾患も病態による階層化、治療の個別化が必要となるであろう。

#### 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 11 件)

1. Kuriya G, Uchida T, Akazawa S, Kobayashi M, Nakamura K, Satoh T, Horie I, et al. (15人中7番目)

Double deficiency in IL-17 and IFN- $\gamma$  signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. Diabetologia 56:1773-1780, 2013 年 (査読あり)

2. Horie I, Kawasaki E, et al. (9人中1番目)

Clinical and genetic characteristics of autoimmune polyglandular syndrome type 3 variant in the Japanese population. J Clin Endocrinol Metab 97:E1043-1050, 2012 年 (査読あり)

3. Murata F, Horie I, et al. (14人中2番目)

A case of glycogenic hepatopathy developed in a patient with new-onset fulminant type 1 diabetes: the role of image modalities in diagnosing hepatic glycogen deposition including gradient-dual-echo MRI. Endocr J 59:669-676, 2012 年 (査読あり)

4. Nagayama Y, Nakahara M, Shimamura M, Horie I, et al. (6人中4番目)

Prophylactic and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism, in mice.  
Clin Exp Immunol 168:268-273, 2012 年 (査読あり)

5. Morokuma H, Ando T, Hayashida T, Horie I, et al. (11人中4番目)  
A case of nonfunctioning pituitary carcinoma that responded to temozolomide treatment.  
Case reports in endocrinology 645914, 2012 年 (査読あり)

6. Horie I, Abiru N, et al. (5人中1番目)  
Induction of autoimmune thyroiditis by depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells in thyroiditis-resistant IL-17, but not interferon-gamma receptor, knockout nonobese diabetic-H2h4 mice.  
Endocrinology 152:4448-4454, 2011 年 (査読あり)

7. Horie I, Abiru N, et al. (7人中1番目)  
Distinct role of T helper Type 17 immune response for Graves' hyperthyroidism in mice with different genetic backgrounds.  
Autoimmunity 44:159-165, 2011 年 (査読あり)

8. Imaizumi M, Sera N, Ueki I, Horie I, et al. (15人中4番目)  
Risk for progression to overt hypothyroidism in an elderly Japanese population with subclinical hypothyroidism.  
Thyroid 21:1177-1182, 2011 年 (査読あり)

9. 堀江一郎, 山崎浩則, 他 (3人中1番目)  
インスリン受容体異常症B型の多様な治療反応性 - 自験2例と文献的考察 -.  
Diabetes Journal 39:102-106, 2011 年 (査読あり)

10. 堀江一郎, 江島英理, 他 (3人中1番目)  
原発性アルドステロン症の一例 ~ 日常診療で見逃されやすい common disease ~.  
佐賀市医師会報 平成 23 年 12 月号 5-8 頁 (査読なし)

11. 植木郁子, 堀江一郎, 他 (6人中2番目)  
バセドウ病に合併した類もやもや病の3例.  
日本甲状腺学会雑誌 2:112-115, 2011 年 (査読あり)

[学会発表] (計2件)

1 型糖尿病の成因における甲状腺自己免

疫の役割に関する検討 日本糖尿病学会九州地方会 2013.11.8-9 宜野湾市  
甲状腺分化癌に対する放射性ヨード内用療法後の体内放射線残存量に関する検討  
日本内分泌学会九州地方会 2013.8.24 那覇市

[図書] (計0件)

[産業財産権]  
出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
堀江 一郎 (HORIE, Ichiro)  
長崎大学・病院・助教  
研究者番号: 30457577