

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591375

研究課題名(和文) 感染や組織傷害による甲状腺自然免疫能活性化の自己免疫疾患発症への関与

研究課題名(英文) Effects of innate immune activation induced by infection or tissue damage on the development of thyroid autoimmunity

研究代表者

鈴木 幸一 (Suzuki, Koichi)

国立感染症研究所・感染制御部・室長

研究者番号：20206478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット甲状腺FRTL-5細胞やマウス初代培養甲状腺細胞に対して強い電荷をかけることで細胞傷害を誘導したり、ヒトヘルペスウイルスのゲノムDNAあるいは種々の塩基配列を有する合成2本鎖DNA(dsDNA)を導入することで、自然免疫や獲得免疫に関連する遺伝子発現が誘導されるとともに、サイログロブリン遺伝子発現や放射性ヨード取込みが抑制されることを明らかにした。また、dsDNAによるTg発現抑制は抗甲状腺薬であるメチマゾール(MMI)によって改善された。すなわち、甲状腺自然免疫活性化の際に甲状腺ホルモン合成能は抑制されるという機序が存在すると考えられた。今後はこの点についてさらに検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Rat thyroid FRTL-5 cells or primary culture of mouse thyroid cells were stimulated by electric pulse to induce cell damage, or transfected with human herpes virus genomic DNA or synthetic double-stranded polynucleotides. After these treatments, expression of series of genes essential for innate and acquired immune responses was induced. However, thyroglobulin gene expression and iodine uptake were suppressed by these treatments. These results suggest that when immune functions of thyroid cells are activated upon infection or tissue damage, thyroid hormone biosynthesis may be suppressed. Further studies are needed to confirm this possibility.

研究分野：自己免疫、自然免疫、感染免疫

キーワード：甲状腺 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の多くは、複数の遺伝的要因を背景として感染など何らかの環境的要因が複合的に作用して発症すると考えられている。免疫寛容の状態にあるべき自己抗原に対して免疫反応を開始させる直接の誘因は、多くの自己免疫疾患において未だ不明である。

甲状腺においては、ウイルス感染によって亜急性甲状腺炎を発症しさらにバセドウ病へと進展する例や、C型ウイルス性肝炎に対するインターフェロン(IFN)治療後に自己免疫疾患を発症するという報告もある。また、出産やストレス、アレルギー、薬剤の投与などによるTh1/Th2バランスや調節性T細胞数の変化も発症に関与すると考えられている。実際に、AIDS患者に対するART療法後の免疫能回復による免疫再構築症候群や、多発性硬化症に対するCampath-1H(anti-CD52抗体)投与によるリンパ球除去後によってバセドウ病が発症する事実も免疫学的状態の変化が発症に関与することを裏付けている。すなわち、感染や細胞傷害、あるいは大量のIFN投与などによって甲状腺局所あるいは全身の自然免疫系が強く活性化された際に、自己抗原に対する免疫寛容のバランスが崩れることが自己免疫反応を誘発する一因となり得る可能性が考えられる。

自己免疫反応が開始されるためには、自己抗原エピトープがTリンパ球に提示されることが必要である。ところが、実験動物にTSH受容体(TSHR)や甲状腺細胞を免疫してもバセドウ病は誘導出来なかった。一方で、主要組織適合性抗原複合体(MHC) class IIとTSHRを共に発現させた線維芽細胞でマウスを免疫することでバセドウ病を発症し、これが初めての動物モデルとなった。それに次いで、TSHRを組み込んだプラスミドやアデノウイルスの接種でもバセドウ病が誘導出来ることが明らかとなった。その理由として、プラスミドやウイルスのDNAにより接種部位の筋細胞などにMHC class IIとTSHRが共発現されるからではないかと我々は考えている。これらの実験結果と、バセドウ病患者の甲状腺濾胞上皮細胞上には、本来抗原提示細胞に発現するMHC class IIが異常発現している事実から、自然免疫活性化により甲状腺細胞自身に誘導されるMHC class IIによって、内在性抗原として処理(断片化)されたTSHRが提示されることがバセドウ病の自己免疫反応開始の引き金として重要である可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

代表的な自己免疫標的内分泌臓器である甲状腺における自己免疫反応開始誘因としての2本鎖DNAの作用を明らかにする。自己免疫疾患の発症誘因として自然免疫系の活性化が果たす役割が注目されているが、最近我々は、甲状腺細胞が傷害を受けた際に核

から漏出するゲノムDNA断片が細胞質中でhistone H2Bに認識される結果、甲状腺細胞が持つ自然免疫能と獲得免疫能が活性化することを報告した。本研究は、その成果をさらに進めて、甲状腺細胞傷害とそれともなうゲノムDNA断片の漏出が、これまで不明であった自己免疫反応を開始する誘因となり得るかどうかどうかについて、遺伝子やタンパク発現変化の網羅的解析、自己抗原の断片化の有無、さらにマウスにおける影響に関して総合的に評価を行う。

3. 研究の方法

多くの分化した機能を維持しているラット甲状腺由来FRTL-5細胞を用いて、強い電荷をかけることで純粋な細胞傷害を与える。また、FRTL-5細胞自身のゲノムDNA断片をトランスフェクションにより細胞質に導入する。そのような処理をした細胞からRNAと全タンパクを抽出して、免疫能および甲状腺機能関連遺伝子発現変化を総合的に明らかにする。また、マウス甲状腺から細胞を単離し、電気刺激、ゲノムDNA断片のトランスフェクション、インターフェロンやサイトカインによる刺激を行い、48時間培養して細胞表面にMHC class II分子が発現することをフローサイトメトリーで確認した後に同系マウスの腹腔内に免疫する。経時的に血清を採取し、常法にしたがってTG、TPO抗体およびTSHR抗体(TBIIおよび必要に応じてTSAbバイオアッセイ)を測定する。

4. 研究成果

(1)ラット甲状腺FRTL-5細胞やマウス初代培養甲状腺細胞に対して強い電荷をかけることで細胞傷害を誘導した。それらの細胞から核を除いた細胞質分画を精製し、その中に含まれるゲノムDNAを量的および質的に検討したところ、ゲノムDNAの量は電荷の強さに応じて増加した。また、それらのDNAは様々なサイズの断片としてアガロースゲル上でスメアとして確認された。その際に、I型インターフェロン、各種炎症性サイトカインやケモカイン遺伝子発現が誘導されており、その程度は細胞外から2本鎖DNAをトランスフェクション法により細胞内に導入した際に認められる効果とほぼ同様であった。また、抗原の処理や提示に必要な一連の遺伝子も同じく誘導されることが確認出来た。

(2)さらに、マウス甲状腺初代培養細胞を作製する際に甲状腺周囲の筋細胞も培養して同様の実験を行ったところ、これらの細胞においてもインターフェロン、サイトカイン、およびケモカインの遺伝子活性化が誘導されることが明らかになった。したがって、甲状腺周囲に炎症や細胞傷害が起こった際には、甲状腺だけでなく周囲の間葉系細胞に由来する炎症因子も相乗的に作用し、甲状腺における炎症反応の誘導や修復機転が働くも

のと考えられた。

(3) 感染や細胞傷害の際に甲状腺ホルモン合成に必要な機能遺伝子発現がどのような動態を示すか検討を行ったその結果、HSV 感染させたり 2 本鎖 DNA で刺激して、甲状腺細胞上に MHC class I, class II の異常発現が誘導される際に、甲状腺ホルモン合成に必要であり、また実際に自己抗体が産生されることも知られている種々の甲状腺機能遺伝子の中で、サイログロブリン(Tg)遺伝子発現のみが強く抑制されることがわかった。同様の Tg 遺伝子発現抑制は培養甲状腺細胞に強い電荷をかけることによる細胞傷害や 2 本鎖 RNA の導入によってもたらされたことから、広く甲状腺細胞の自然免疫活性化によって引き起こされる現象であると考えられた。また、放射性ヨード添加後の FRTL-5 細胞のヨード取込みも抑制された。また、これらの変化は抗甲状腺薬であるメチマゾール (MMI) で抑制された。

(4) マウス甲状腺初代培養細胞を 2 本鎖 DNA や IFN で刺激することにより、上記と同様の遺伝子発現変化が起こることを realtime PCR で確認し、甲状腺細胞表面に MHC class II 発現が増強していることを確認後にマウス腹腔内に接種した。しかし、検討した細胞数および接種回数においては、マウス甲状腺に内分泌学および形態学的変化を認めなかった。

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 12 件)

1. Akama T, Sue M, Kawashima A, Wu H, Tanigawa K, Suzuki S, Hayashi M, Yoshihara A, Ishido Y, Ishii N, Suzuki K: Identification of microRNAs that mediate thyroid cell growth induced by TSH. *Mol Endocrinol* 26(3), 493-501, 2012. doi: 10.1210/me.2011-1004.
2. Sue M, Akama T, Kawashima A, Nakamura H, Hara T, Tanigawa K, Wu H, Yoshihara A, Ishido Y, Hiroi N, Yoshino G, Kohn LD, Ishii N, Suzuki K: Propylthiouracil increases sodium/iodide symporter gene expression and iodide uptake in rat thyroid cells in the absence of TSH. *Thyroid* 22(8), 844-852, 2012. doi: 10.1089/thy.2011.0290.
3. Sue M, Hayashi M, Kawashima A, Akama T, Tanigawa K, Yoshihara A, Hara T, Ishido Y, Ito T, Takahashi S, Ishii N, Suzuki K: Thyroglobulin (Tg) activates MAPK pathway to induce thyroid cell growth in the absence of TSH, insulin and serum. *Biochem Biophys Res Commun* 420(3), 611-615, 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.046.
4. Yoshihara A, Hara T, Kawashima A, Akama T, Tanigawa K, Wu H, Sue M, Ishido Y, Hiroi N, Ishii N, Yoshino G, Suzuki K: Regulation of dual oxidase (DUOX) expression and H₂O₂ production by thyroglobulin. *Thyroid* 22(10), 1054-62, 2012. doi: 10.1089/thy.2012.0003.
5. Kawashima A, Yamazaki K, Hara T, Akama T, Yoshihara A, Sue M, Tanigawa K, Wu H, Ishido Y, Takeshita F, Ishii N, Sato K, Suzuki K: Demonstration of innate immune responses in the thyroid gland: potential to sense danger and a possible trigger for autoimmune reactions. *Thyroid* 23(4), 477-487, 2013. doi: 10.1089/thy.2011.0480.
6. Kobiyama K, Kawashima A, Jounai N, Takeshita F, Ishii KJ, Ito T, Suzuki K: Role of extrachromosomal histone H2B on recognition of DNA viruses and cell damage. *Front Genet* 4, 91, 2013. doi: 10.3389/fgene.2013.00091.
7. 鈴木幸一, 木村博昭: 橋本病の病因. *日本甲状腺学会雑誌* 4(1), 14-18, 2013.
8. 鈴木幸一: 損傷細胞由来 DNA と自己免疫疾患. *臨床免疫・アレルギー科* 60(3):247-257, 2013.
9. Ishido Y, Yamazaki K, Kammori M, Sugishita Y, Luo Y, Yamada E, Yamada T, Sellitti DF, Suzuki K: Thyroglobulin suppresses thyroid-specific gene expression in cultures of normal but not neoplastic human thyroid follicular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 99(4), E694-702, 2014. doi: 10.1210/jc.2013-3682.
10. Sellitti DF, Suzuki K: Intrinsic regulation of thyroid function by thyroglobulin. *Thyroid* 24(4), 625-638, 2014. doi: 10.1089/thy.2013.0344.
11. Luo Y, Kawashima A, Ishido Y, Yoshihara A, Oda K, Hiroi N, Ito T, Ishii N and Suzuki K: Iodine excess as an environmental risk factor for autoimmune thyroid disease. *Int J Mol Sci* 15, 12895-12912, 2014. doi: 10.3390/ijms150712895.
12. Yuqian Luo, 鈴木幸一: 甲状腺の疾患と生理機能に関わる microRNA. *ホルモンと臨床* 61(1), 75-80, 2014.

[学会発表](計 15 件)

1. 木村博昭, 岩間信太郎, 鈴木幸一, 高橋将文, Patrizio Caturegli. 甲状腺特異的 IFN γ トランスジェニックマウスの Hurthle 細胞の出現と甲状腺機能低下は相関する。第 53 回日本甲状腺学会。2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日、福岡市。
2. 川島晃, 山崎和子, 原武史, 赤間剛, 須江麻里子, 吉原彩, 谷川和也, 石藤雄子, 木村博昭, 佐藤幹二, 鈴木幸一. 自己免疫疾患発症に関わる甲状腺細胞が持つ自然免疫活性化機構の検討。第 53 回日本甲状腺学会。2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日、福岡市。
3. H. Kimura, K. Suzuki, S. Iwama, N.R. Rose, M. Takahashi, P. Caturegli. Reevaluation of

- mouse models of Hashimoto's thyroiditis. 第 53 回日本甲状腺学会、橋本病 100 周年記念国際シンポジウム『甲状腺と自己免疫』。2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日、福岡市。
4. 川島晃、山崎和子、原武史、赤間剛、須江麻里子、吉原彩、谷川和也、石藤雄子、木村博昭、高橋将文、佐藤幹二、鈴木幸一。甲状腺細胞による病原体や細胞傷害因子の検出機構と自然免疫活性化能の検討。第 29 回甲状腺病態生理研究会。2013 年 2 月 2 日、東京。
 5. 鈴木幸一。最近の免疫学からみた甲状腺自己免疫疾患の病因。伊藤病院クリニカルカンファランス。2013 年 5 月 7 日。東京。
 6. 石藤雄子、山崎和子、神森 眞、杉下佳之、Yuqian Luo、小田健三郎、山田恵美子、山田 哲、鈴木幸一。ヒト正常甲状腺細胞はサイログロブリン(Tg)による negative feedback 機構で機能遺伝子発現が抑制されるが腫瘍は Tg の影響を受けない。第 56 回日本甲状腺学会。2013 年 11 月 14-16 日。和歌山市。
 7. Yuqian Luo、赤間 剛、岡山明子、石藤雄子、平野 久、鈴木幸一。Thyroglobulin (Tg) は細胞膜の lipid raft を介して甲状腺機能遺伝子発現を調節する。第 30 回甲状腺病態生理研究会。2014 年 2 月 1 日。東京。(研究奨励賞)
 8. 鈴木幸一。サイログロブリンによる正常および疾患甲状腺細胞機能調節について。第 1 回金地病院基礎医学研究会、特別講演。2014 年 3 月 28 日。東京。
 9. Yuqian Luo、赤間 剛、岡山明子、石藤雄子、平野 久、鈴木幸一。脂質ラフト構造がサイログロブリン(Tg)による遺伝子発現調節機構を介在する。第 87 回日本内分泌学会総会。2014 年 4 月 24-26 日。福岡。
 10. 木村博昭、川島晃、鈴木幸一、岩間信太郎、Patrizio Caturegli、高橋将文。LMP7 欠損マウスの甲状腺異常。第 87 回日本内分泌学会総会。2014 年 4 月 24-26 日。福岡。
 11. Y. Luo, Y. Ishido, K. Yamazaki, M. Kammori, Y. Sugishita, E. Yamada, T. Yamada, D. F. Sellitti and K. Suzuki. 'Escape' from thyroglobulin (Tg) regulation in hyperplastic and neoplastic thyroid cells, but not in Graves' cells. ICE/ENDO 2014. June 21-24, 2014, Chicago, USA.
 12. Yuqian Luo, Takeshi Akama, Akiko Okayama, Yuko Ishido, Hisashi Hirano, Koichi Suzuki. Thyroglobulin (Tg) negatively regulates thyroid follicular function through membrane lipid raft. The 11th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry. September 28-29, Matsumoto, Japan.
 13. Yuqian Luo、石藤雄子、吉原彩、小田健三郎、山崎和子、神森眞、杉下佳之、山田恵美子、山田哲、Donald F. Sellitti、鈴木幸一。甲状腺腫および甲状腺癌細胞はサイログロブリン(Tg)による遺伝子発現調節機構

から逸脱する。第 18 回日本内分泌病理学会。2014 年 11 月 1-2 日、東京。

14. 駱予倩、赤間剛、岡山明子、石藤雄子、平野久、鈴木幸一。脂質ラフト構造がサイログロブリン(Tg)のネガティブフィードバック機能に關与する。第 57 回日本甲状腺学会。2014 年 11 月 13-15 日、大阪。
15. 石藤雄子、Yuqian Luo、吉原 彩、鈴木幸一。甲状腺濾胞からのホルモン分泌に対する濾胞内サイログロブリン(Tg)の作用。第 57 回日本甲状腺学会。2014 年 11 月 13-15 日、大阪。

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://members3.jcom.home.ne.jp/koichis0923/>

6 . 研究組織
(1)研究代表者
鈴木 幸一 (SUZUKI, Koichi)
研究者番号：20206478

(2)研究分担者
()
研究者番号：

(3)連携研究者
()
研究者番号：