

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790948

研究課題名(和文)よりよいバセドウ病・バセドウ病眼症マウスモデルの作製

研究課題名(英文) Establishment of better mouse models of Graves' disease and Grave's ophthalmopathy

研究代表者

中原 麻美 (Nakahara, Mami)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・客員研究員

研究者番号：90622605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：(1)アデノウイルスを用いたバセドウ病マウスモデルでウイルスの至適量を決定するため、種々の異なるウイルス量で免疫したところ、低用量ほど効率的に刺激型抗体・甲状腺機能亢進症を誘導したが、容易に刺激型抗体が阻害型抗体に代わり亢進症は長期間持続しなかった。(2)SKG、ZAP-70 KOマウスを用いて作出したT細胞内情報伝達系に種々のレベルの異常を持つマウスではバセドウ病自然発症・免疫による誘導共に認められなかった。(3)TSHR + calsequestrin or collagen XIIIで免疫し、同時にたばこ煙に暴露したところ、たばこ煙暴露によるマクロファージの眼窩浸潤増加のみが認められた。

研究成果の概要(英文)：(1) To determine the appropriate amounts of adenovirus, various amounts of adenovirus were used to immunize mice, revealing that the lower amounts of virus induced higher titers of TSAbs and hyperthyroidism, the latter, however, did not last long. (2) Naturally occurring or immunization-induced Graves disease was not observed in mice generated by using SKG and ZAP-70 KO mice having various levels of defects in the signal transduction pathway in T lymphocytes. (3) Experiments of immunization of mice with TSHR + calsequestrin or collagen XIII plus exposure to cigarette smoke revealed that cigarette smoke exacerbated macrophage infiltration in the orbits.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：甲状腺自己免疫 甲状腺刺激ホルモン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

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甲状腺刺激ホルモン受容体(thyroid stimulating antibody, 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・甲状腺瀰漫性腫大を呈する。当研究室では、1989年に世界に先駆けてヒト 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、多くの原著論文・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きた。しかし、ヒトとマウス TSHR の相同性はアミノ酸レベルで約 87 %で、ヒト TSHR は厳密な意味でマウスの自己抗原ではない。よって申請者は、マウス TSHR 発現アデノウイルスを作製して実験を行ったところ、野生型マウスでは抗 TSHR 抗体/バセドウ病発症は見られず、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 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 TSHR 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、以下のような幾つかの興味ある結果が得られた。

(I) 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 上昇かつ阻害型抗体(thyroid blocking antibody, TBAb)陽性となった。我々はこの現象を、マウス TSHR 発現アデノウイルス免疫により活性化された TSHR 特異的リンパ球が、胸腺欠如のためリンパ球減少状態のヌードマウスへの養子移入によりさらに homeostatic proliferation で刺激され、大量の抗体を産生するようになったと解釈している。当研究室の以前の研究で抗 TSHR 免疫反応が強すぎる場合、TSAb より TBAb が強く出現してくる事がわかっているので、homeostatic proliferation により免疫反応が増強されすぎて TBAb が優位に誘導されたのではないかと考えている。

(II) しかし、免疫していない TSHR KO マウスの脾細胞養子移入は、ほとんど無効であった。よって、ナイーブな TSHR 特異的 T 細胞

に免疫なしにヌードマウスの内因性 TSHR 抗原を認識させるのは困難であることが示唆された。

(III) また興味あることに、これらのマウスのうち数匹では眼窩脂肪組織・筋肉組織にマクロファージの浸潤が認められた。これはバセドウ病眼症を示唆する病理所見であり、初めて実験的に抗 TSHR 免疫反応と眼症を関連付けることができた。

## 2. 研究の目的

この TSHR KO マウス脾細胞養子移入モデルは、マウス TSHR を用いた抗 TSHR 自己免疫反応研究の優れたモデルであると考えられるが、同時に幾つかの問題点も含有している。本研究では、このモデルをさらに改善して理想的なバセドウ病及びバセドウ病眼症モデルを確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

[I] TSHR KO マウス脾細胞養子移入モデルにおける低用量アデノウイルスでの免疫を試み：前述のように、TSHR KO マウス脾細胞養子移入モデルは、長期にわたる抗 TSHR 抗体産生を誘導する優れたモデルであるが、免疫反応が強すぎるためか TSAb より TBAb が優位になり易い。この問題を解決するため、低用量アデノウイルスを用いた免疫を試みた。 $10^{10}$  から  $10^7$  particles/マウスまでの異なる量のウイルスで免疫後、ヌードマウスへ養子移入を行い、抗 TSHR 受容体抗体を TSAb・TBAb・TSHR 発現 CHO 細胞を用いた flow cytometry 法・ELISA 法で測定し、甲状腺ホルモン  $T_4$  も RIA 法で測定した。次いで決定した至適ウイルス量で TSHR KO マウスを免疫後、脾細胞を正常リンパ球数を有する野生型マウスへ養子移入した。抗 TSHR 抗体価・ $T_4$  を上記方法で経時的に測定し、バセドウ病の発症頻度・持続期間を検討した。

[II] 自然発症バセドウ病モデルの作製：自然発症バセドウ病モデルの作製：理想的な疾患モデルはヒトでの発症と同様に自然発症型である。TSHR KO マウスが TSHR 反応性 T 細胞を有していることは間違いないので、その活性を上げるため SKG マウスと ZAP-70 KO マウスを京都大学坂口研より分与を受けて、交配により TSHR KO;SKG マウスを作製し、抗 TSHR 免疫反応の有無、さらには TSHR KO/SKG マウス脾細胞のヌード或いは野生型マウスへの養子移入実験を行った。

[III] 眼症のモデル実験：バセドウ病眼症患者血清では calsequestrin や collagen XIII、G2s 等に対する自己抗体も頻繁に検出されることからこれら抗原も眼症の病態に関与していることが示唆される。よってこれらの抗原と TSHR で共免疫することによって、

眼症発症を顕性化させるため、ここでは遺伝子が入り得る calsequestrin と collagen XIII を共発現するアデノウイルス Ad-mTSHR A-subunit-IRES-calsequestrin と Ad-mTSHR A-subunit-IRES-collagen XIII を作製した。なお、internal ribozyme entry site (IRES) を用いることによって1つのプロモーターから2つの遺伝子を発現させることができる。これらウイルスでマウスを免疫し、これらの抗原に対する抗体価・T<sub>4</sub>測定、眼窩組織の病理学的検索を行った。さらに喫煙の影響に関しては、たばこ煙吸入実験装置を使用して、たばこ煙に暴露した。眼窩病理は以前からの共同研究者であるドイツの Prof. Anja Eckstein & Dr. Kristian Johnson に依頼した。

#### 4. 研究成果

[I] TSHR KO マウス脾細胞養子移入モデルにおける低用量アデノウイルスでの免疫を試み：10<sup>7</sup> から 10<sup>10</sup> particles/マウスの異なるウイルスで免疫後、1か月後脾細胞の養子免疫をヌードマウスに対して行い、抗体価を TAb・TBAb・flow cytometry 法・ELISA 法で、T<sub>4</sub> を RIA で経時的に測定した。その結果低ウイルス量では TAb/TBAb 比が高く、より刺激抗体が産生され、ひいては高率に甲状腺機能亢進症を誘導できたが、高ウイルス量では総抗体価は高いものの、TAb/TBAb 比が低く、その結果機能亢進症の頻度も低かった。しかしいずれの場合も、長期間観察後にはやはりこの TAb/TBAb 比率が低下し、TBAb 優位となり、甲状腺機能は正常化～低下を来した。よって、TAb/TBAb 比率とバセドウ病の頻度は上げることができたが、バセドウ病が長期間持続するモデル作製には至らなかった。

[II] 自然発症バセドウ病モデルの作製：京都大坂口研より、SKG マウス (ZAP-70 に塩基変異を持つ) と ZAP-70 KO マウスも分与を受け、野生型マウスや TSHR KO マウスと交配し、T 細胞内情報伝達系に種々のレベルの異常を持つマウスを作製した (ZAP-70 の遺伝子型：SKG/SKG, SKG/-, -/-)。まず自然発症の有無を観察したが、1年間の観察では全く抗体価上昇、甲状腺ホルモン変動は見られず、自然発症は認められなかった。次いで上記で至適ウイルス量を決定した低用量ウイルスで免疫を試みたが、免疫反応は全く認められなかった。原因は精査中であるが、ウイルスに対する中和抗体も産生されなかったことから、アジュバントとしてのウイルスに対する免疫反応が低下して、抗原特異的な免疫反応が惹起できなかつたと考えられた。これら ZAP-70 に変異を持つマウスは、T 細胞内情報伝達系の異常のために、関節炎などを自然発症するという意味では自己免疫疾患研究に非常に有用であるが、免疫による免疫反応誘導には適さないことが示唆された。

[III] 眼症のモデル実験：作製した2種類のアデノウイルスを用いて TSHR +calsequestrin or collagen XIII で免疫し、同時にたばこ煙吸入実験装置でたばこ煙に暴露した。たばこ煙暴露効果は肺組織における抗酸化酵素遺伝子発現誘導にて確認できた。その結果、TSHR 単独に比較して、calsequestrin や collagen XIII を加えた免疫では眼窩病理の変化の増悪は認められなかった。一方たばこ煙暴露はマクロファージの眼窩浸潤を増加させたが、リンパ球浸潤誘導までには至らなかった。従来から臨床的知見として眼症の増悪因子の1つとされているたばこ煙の意義が示唆された。

全体として、バセドウ病及びバセドウ病眼症マウスモデルの著明な改善には結びつかなかった。今後、甲状腺機能亢進症が長期持続すると言われているプラスミドを用いた in vivo electroporation 免疫法の導入、他の遺伝子改変マウスの使用が必要であろうと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Yasui J, Nakahara M, Shimamura M, Kurashige T, Kasui 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 Med Nagasaki*, in press. (査読有)
2. Shimamura M, Nakahara M, Kurashige T, Yasui K, Nakashima M, Nagayama Y. Disruption of transforming growth factor- $\beta$  signaling in thyroid follicular epithelial cells or intrathyroidal fibroblasts does not promote thyroid carcinogenesis. *Endocrine J.* 61(3): 297-302, 2014. (査読有)
3. Shimamura M, Nakahara M (equally contributed), Orim F, Kurashige T, Mitsutake N, Nakashima M, Kondo S, Yamada M, Taguchi R, Kimura S, Nagayama Y. Postnatal expression of BRAFV600E does not induce thyroid cancer in mouse models of thyroid papillary carcinoma. *Endocrinology.* 154(11): 4423-4430, 2013. doi: 10.1210/en.2013-1174 (査読有)
4. 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. Clin Exp Immunol.168 (3): 268-273, 2012.  
doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04578.x.  
( 査読有 )

5. 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.  
doi: 10.1210/en.2011-1846. ( 査読有 )

[学会発表](計 0 件)

[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

<http://www-sdc.med.nagasaki-u.ac.jp/index-sjis.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中原 麻美 (NAKAHARA, Mami)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・客員研究員

研究者番号：90622605