

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461385

研究課題名(和文) 免疫調節性ペプチドとSiglecリガンドによるバセドウ病の抗原特異的新規治療法

研究課題名(英文) Epitope-specific therapy for Graves' disease with immune-modulating peptides and siglec ligands

研究代表者

稲葉 秀文 (Inaba, Hidefumi)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70447770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はバセドウ病(GD)における抗原提示機構を明らかにして、抗原特異的治療法を開発することである。申請者は、GDにおいてヒトTSHR受容体(AA78-94)が重要なエピトープであることを報告した。本研究においては、その変異ペプチド：37mの作用を検討した。バセドウ病モデルHLA-DR3トランスジェニックマウスに37mを投与した結果、甲状腺中毒症の改善、TRAb産生の抑制、並びに脾臓細胞中の制御性T細胞分画増加を認め、すなわち免疫制御効果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is 1) to elucidate epitope presentation in Graves' disease (GD), and 2) to establish epitope specific therapy for GD. We have reported that human TSH receptor (AA78-94) was an important epitope. Therapeutic role of the mutant human TSH receptor peptide: 37m, was evaluated in this study. GD model of HLA-DR3 transgenic mice was treated with 37m. The thyrotoxicosis was improved, TRAb production was suppressed, and proportion of regulatory T-cells in the spleen was increased. Therefore, immune-regulatory effects of 37m were observed.

研究分野：内分泌学

キーワード：バセドウ病 TSH受容体 HLA T細胞

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患の中で自己免疫性甲状腺疾患は最も頻度が高く臨床的に重要であり、バセドウ病 (GD) と橋本病が代表的である。しかし GD の治療法に関しては死亡例もあり改善すべき点が多く、1940 年代から新規治療法の開発が喫緊の課題である。

GD は抗 TSH 受容体 (TSHR) 抗体 : TRAb が甲状腺濾胞細胞を刺激し甲状腺機能亢進症を来す疾患である。GD において HLA-DR3 が疾患発症に関与している。

申請者は図 1 に基づいて研究を行った。HLA-DR3 と human TSHR (hTSHR) に関して、A) *in silico* コンピューター結合予測解析、B) *in vitro* 結合アッセイ、C) HLA-DR3 トランスジェニック (TG) マウスを用いた *in vivo* の脾臓細胞反応性試験、D) GD 患者におけるリンパ球反応性試験の結果、複数の免疫原性 hTSHR 抗原ペプチド (epitope spreading) が同定された。その中で、HLA-DR3TG マウスにおいて hTSHR37 (AA78-94) が免疫反応初期から脾臓細胞を非常に強く刺激する重要なエピトープであることが証明された。更に、HLA-DR3 結合モチーフにおける 9 個のアミノ酸 (図 2 拡大図) のうち、4 番目のアミノ酸がグルタミン酸、あるいはアスパラギン酸である hTSHR ペプチドは免疫原性が高いと考えられた (Inaba et al J Clin Endocrinol Metab:2010;95:2909-2916, Inaba H et al Thyroid:2009;19:1271-1280, Inaba et al J Clin Endocrinol Metab:2006;91:2286-2294)。

図1:バセドウ病に関する研究計画の流れ

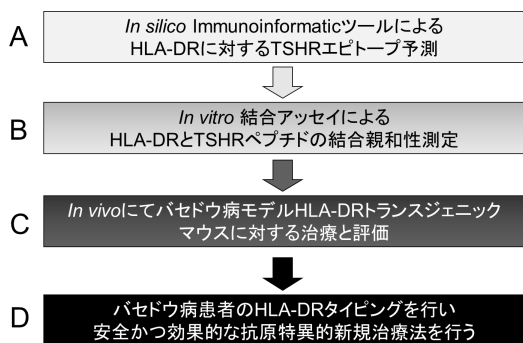
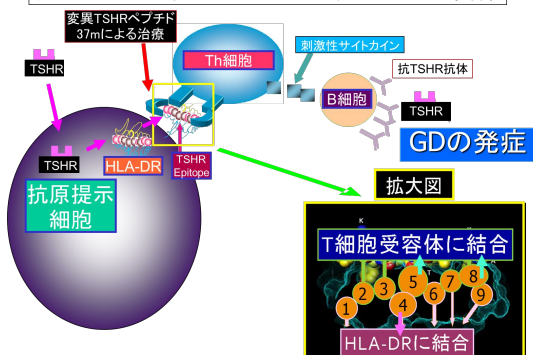


図2:バセドウ病におけるTSHR、HLA-DRの関係



2. 研究の目的

当研究の目的はこれらの知見を基盤に HLA-DR 分子の抗原提示に着目した新規免疫

調節性ペプチドや免疫抑制性 Siglec リガンドを用いた安全かつ効果的な GD や GD 眼症の抗原特異的治療への臨床応用である。

GD に関する TSHR エピトープは上記のように一部は解明されたが、Th1、Th2、Th17、制御性 T 細胞 (Treg) に関与する免疫機構、多種の HLA-DR に対する免疫反応、GD 眼症との相違点等が不明であるため、今回の研究対象とする。また、日本人 GD に多い HLA-DRB1*08:03 等、他の HLA-DR に関する研究を開始し臨床的に GD・GD 眼症の新規治療法の開発に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

申請者が開発した新規免疫寛容誘導ペプチド : 37m について概説する。上述の GD のエピトープである hTSHR (AA78-94) の変異ペプチド : 37m: ISRIYVSIDATLSQLES は、hTSHR37 に関する HLA-DR3/TCR 結合モチーフの 5 番目のアミノ酸の V が A に、8 番目のアミノ酸の Q が S に置換されており、HLA-DR3 に対する結合性を保持したまま、T 細胞受容体に対して結合力が減弱する。HLA-DR3TG マウスにおいて、hTSHR37 単独での免疫に比して、37m を共に免疫した場合は、B 細胞反応性と T 細胞反応性に対しての抑制効果がみられた (Inaba et al Endocrinology:2013;154:2234-2243)。

今回まず、hTSHR37 並びに 37m を GD モデル HLA-DR3TG マウスに接種し免疫抑制効果を評価した (下記 1 - 4)。

(1) 最初に、HLA-DR3 遺伝子を有する GD モデルマウスを作成するため、hTSHR-A サブユニット (AA1-289) をコードしたアデノウイルス : Ad-TSHR289 を精製濃縮し HLA-DR3TG マウスに免疫し、GD モデル HLA-DR3TG マウスの作成を試みた (確立された GD モデルマウス作成手法 : Endocr Rev:2005;26:800-32)。すなわちヒト免疫システムを有する GD モデルマウスを作成することを目標とした。まず血清にて TRAb、TSAb と甲状腺機能を測定した。次に、マウスから摘出・単離した脾臓細胞を抗原である hTSHR 蛋白と 72 時間培養後 BrdU アッセイにおいて細胞増殖反応を評価し、さらに甲状腺組織と眼組織を評価した。

(2) 次に Ad-TSHR289 の免疫前に抗 CD25 抗体を接種し Treg 抑制による GD の免疫応答増強効果を評価した。TRAb、TSAb、甲状腺機能に加えて、甲状腺組織と眼組織を評価した。(3) Ad-TSHR289 の免疫後に 37m を接種し、その免疫調節作用を評価した。37m の投与経路については、経口、皮下注射、腹腔内投与の検討を行い、更に 37m の溶媒は DMSO 溶解後に PBS にて希釈したものと IFA との混和後エマルジョンにて投与したものの検討を行った。

(4) GD モデル HLA-DR3TG マウスに 37m を投与し甲状腺機能、TRAb、脾臓細胞中の Treg 分画を評価した。

4. 研究成果

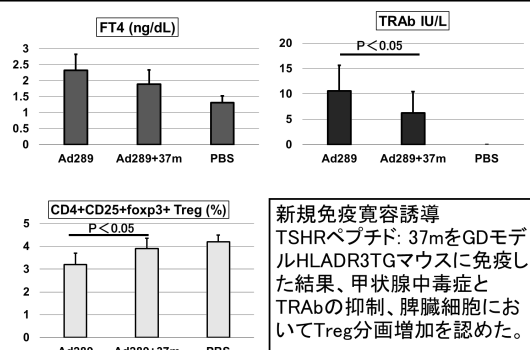
(1) 最初に、Ad-TSHR289 を HLA-DR3TG マウスに免疫し GD モデル HLA-DR3TG マウスの作成を試みた。その結果、7/10 匹のマウスにおいて TRAb 陽性あるいは TSAb 陽性と甲状腺機能亢進症を認めた。なお、マウスから摘出・単離した脾臓細胞が、*in vitro* にて抗原である TSHR 蛋白と 72 時間培養後 BrdU アッセイにおいて細胞増殖反応を示した。一部のマウスにおいて、組織学的には甲状腺濾胞上皮細胞の円柱化とコロイド増大とコロイド内空胞増加を認め、GD に矛盾しない所見であった。甲状腺内にリンパ球の浸潤は明らかではなかった。組織学的には軽度の眼症を認めた。以上よりヒト臨床モデルに近い GD モデルマウスが作成されたと考えられた。

(2) Ad-TSHR289 の免疫前に抗 CD25 抗体を接種した結果、多くの TRAb 陽性マウス (7/8 匹) および TSAb 陽性マウス (6/8 匹) を認めた。甲状腺機能は半数が軽度亢進で残りは正常であった。組織学的評価において、甲状腺内にリンパ球の浸潤を 10% 以上認めるマウスを 5/8 匹に認めた。興味深いことに、2 匹は眼窩脂肪組織が増殖様変化を示し GD 眼症の可能性が考えられた。抗 CD25 抗体を接種したマウスにおいても BrdU アッセイにおいて脾臓細胞が TSHR 蛋白に対して増殖反応を示した。すなわち、抗 CD25 抗体を接種したマウスにおいては GD に慢性甲状腺炎様の病態を合併したものと思われた。

(3) Ad-TSHR289 の免疫後に 37m を接種し、その免疫調節作用を評価した。37m の投与経路並びに 37m の溶媒の検討の結果、37m を IFA とのエマルジョンにて投与した際に最も TRAb 及び TSAb 値低下作用が見られた。よって、37m は GD モデル HLA-DR3TG マウスにおいて治療効果を有すると思われた。

(4) さらに、GD モデル HLA-DR3TG マウスに 37m を投与した結果、甲状腺中毒症と TRAb 産生の抑制、脾臓細胞中の Treg 分画の増加を認めた (図 3)。すなわち、37m により免疫が抑制され、治療効果が得られた。

図3 GDモデルHLA-DR3TGマウスに対する新規免疫寛容誘導TSHRペプチド:37mの免疫抑制効果



なお、表題に述べられている TRAb 産生抑制作用を有する Siglec リガンドプラスミドは現在作成途中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者は下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Diabetic ketoacidosis in a patient with acromegaly and central diabetes insipidus treated with octreotide long-acting release.

Inaba H (責任著者), Akamizu T (8 番目) 他 6 名 *Diabetology International* 誌 査読有り 2017 年 8, 237-242

DOI: 10.1007/s13340-016-0301-z

Thyrotropin Receptor Epitope and Human Leukocyte Antigen in Graves' Disease.

Inaba H (責任著者), De Groot LJ, Akamizu T *Front Endocrinol* 誌 査読有り 2016 年 23;7:120-125

DOI: 10.3389/fendo.2016.00120

A novel immunopathological association of IgG4-RD and vasculitis with Hashimoto's thyroiditis.

Inaba H (2 番目、責任著者), Akamizu T (12 番目) 他 10 名 *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* 誌 査読有り 2016 年 ;160004

doi: 10.1530/EDM-16-0004

Graves' disease in pediatric and elderly patients with 22q11.2 Deletion Syndrome.

Inaba H (3 番目、責任著者), Akamizu T (10 番目) 他 8 名 *Intern Medicine* 誌 査読有り 2016 年 December in press

doi: 10.2169/internalmedicine.56.7927

2016 Guidelines for the management of thyroid storm from The Japan Thyroid Association and Japan Endocrine Society (1st Edition)

Akamizu T (11 番目)、他 10 名 *Endocr J* 誌 査読有り 2016 年 10 月 15 日

doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0336.

Treatment and management of thyroid storm: analysis of the nationwide surveys

Akamizu T (11 番目)、他 10 名 *Clin Endocrinol* 誌 査読有り 2016 年 84:912-918

doi: 10.1111/cen.12949

Clinicopathological features of Riedel's thyroiditis associated with IgG4-related disease in Japan.

Inaba H (2 番目), Akamizu T (10 番目), 他 8 名 *Endocr J* 誌 査読有り 2015 年 62:725-731.

doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0175

Distribution of serum immunoglobulin G4 levels in Hashimoto's thyroiditis and

clinical features of Hashimoto's thyroiditis with elevated serum immunoglobulin G4 levels.
Inaba H (3 番目), Akamizu T (10 番目), 他 8 名 *Endocr J* 誌 査読有り 2015 年 62:711-717
doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0157

Bartter syndrome type 3 in an elderly complicated with adrenocorticotropin deficiency.
Inaba H (2 番目、責任著者), Akamizu T (14 番目), 他 12 名 *Endocr J* 誌 査読有り 2014 年 61:855-860
doi.org/10.1507/endocrj.EJ14-0125

Screening and management of hypothyroidism in pregnancy; results of an Asian survey.
Akamizu T (9 番目) 他 11 名 *Endocr J* 誌 査読有り 2014 年 61:697-704
doi.org/10.1507/endocrj.EJ14-0083

Elevated serum immunoglobulin G4 levels in patients with Graves' disease and their clinical implications
Inaba H (1 番目), Akamizu T (13 番目) 他 11 名, *Thyroid* 誌 査読あり 2014 年 24:736-743
doi: 10.1089/thy.2013.0448.

[学会発表](計 7 件)
<国際学会>

Novel peptide treatment for HLA-DR3 transgenic mice with Graves' disease
Inaba H (1 番目), Akamizu T (10 番目), 他 8 名 第 12 回 アジアオセアニア甲状腺学会 2017 年 4 月 16-19 日 韓国プサンロッテホテル

A mutant TSH receptor peptide for treatment of HLA-DR3 transgenic mice with Graves' disease
Inaba H (1 番目), Akamizu T (9 番目), 他 7 名 第 99 回 アメリカ内分泌学会 2017 年 4 月 1-4 日 米国オーランド コンベンションセンター

Immunogenicity of TSH receptor and thyroglobulin in HLA-DR3 transgenic mice
Inaba H (1 番目), Akamizu T (10 番目), 他 8 名 第 98 回 アメリカ内分泌学会 2016 年 4 月 1-4 日 米国ボストン コンベンションセンター

<国内学会>

HLA-DR3 トランスジェニックマウスにおける TSH 受容体とサイログロブリンの免疫原性
稲葉秀文、赤水尚史 (10 番目), 他 8 名

第 89 回 日本内分泌学会学術集会 2017 年 4 月 22-24 日 京都市 国立京都国際会館

高トリグリセリド血症を伴う糖尿病に発症したバセドウ病眼症の一例
稲葉秀文 (2 番目), 赤水尚史 (12 番目), 他 10 名 第 59 回 日本甲状腺学会学術集会 2016 年 11 月 3-5 日 東京都 虎ノ門ヒルズ

糖尿病性外眼筋麻痺とバセドウ病眼症が疑われた糖尿病の一例
稲葉秀文、赤水尚史 (10 番目), 他 8 名 第 53 回 日本糖尿病学会近畿地方会 2016 年 11 月 12 日 大阪市 大阪国際会議場

招待講演: 「IgG4 関連甲状腺疾患について」
稲葉秀文、竹島健、赤水尚史 第 87 回 日本内分泌学会学術総会シンポジウム 2014 年 4 月 福岡市 福岡アクロス

[図書](計 3 件)
「特集/分子メカニズム解明が進む内分泌疾患 甲状腺機能亢進症」
稲葉秀文、赤水尚史 科学評論社 内分泌・糖尿病・代謝内科誌 査読なし 2016 年第 42 巻 3 号 P142-149

「TSH 受容体活性化における新規 TSHR 分子内アゴニスト」
稲葉秀文 日本甲状腺学会誌 査読なし 2016 年 10 月号 No.2 P1-5

「バセドウ病と糖尿病」
稲葉秀文 糖尿病診療マスター誌 医学書院 査読なし 2016 年第 14 巻 6 号 475-477 頁

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

[その他]
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者
稲葉 秀文 (Inaba, Hidefumi)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70447770

(2) 研究分担者
赤水 尚史 (Akamizu, Takashi)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20231813

西 理宏 (Nishi, Masahiro)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90228148