

マウス甲状腺刺激ホルモン受容体を用いたバセドウ病モデル

永山 雄二

長崎大学原爆後障害医療研究所細胞機能解析部門分子医学研究分野 教授

はじめに

バセドウ病は、抗甲状腺刺激ホルモン受容体 (thyroid stimulating hormone receptor, TSHR) に対する自己抗体による自己免疫疾患である。自己抗原が明らかになっている数少ない自己免疫疾患の 1 つで、しかも産生された抗体が組織を破壊するのではなく、刺激して甲状腺機能亢進症を誘導するという特徴的な病態を呈する。なお、同じく臓器特異的甲状腺自己免疫疾患である橋本病 (慢性甲状腺炎) も、サイログロブリンや甲状腺ペロキシダーゼが自己抗原として認識されるという意味では同様に自己抗原が明らかな自己免疫疾患であるが、細胞性免疫により甲状腺が破壊されて甲状腺機能低下症を呈するという点で、自己免疫性甲状腺疾患という範疇の中ではバセドウ病の対極に位置する。

TSHR は G タンパク共役型受容体に属するが、同じ糖タンパクホルモン受容体である黄体形成ホルモン受容体 (luteinizing hormone receptor, LHR) や卵胞刺激ホルモン受容体 (follicle stimulating hormone receptor, FSHR) と共にリガンドの結合部位に相当する大きな細胞外領域を持つという特徴を持ち、glycoprotein hormone receptor (GPHR) というサブファミリーを形成する。図 1 に受容体構造の模式図を示す。大きな細胞外領域は、その N 端と C 端にシステイン豊富領域を持ち (図中の Cysteine-box (C-b)1 と C-b2 & 3)、中央部は 11 回のロイシン繰り返し構造 (leucine-rich domain, LRD) を含んでいる。さらに LHR や FSHR と異なり、唯一分子内限定分解を受けて、リガンド結合部位のほとんどを含む A-サブユニットと細胞膜貫通部分/細胞内外ループ/細胞内 C 端部分に相当する B-サブユニットに分かれるという特性を有する。この際、TSHR に存在して LHR や FSHR に存在しない約 50 個のアミノ酸に相当する部分 (C-ペプチド領域) が除去される。両サブユニットは限定分解直後はジスルフィド結合で結合しているが、さらにジスルフィド結合部位が分解を受け、細胞表面から A-サブユニットが遊離する。この遊離した A-サブユニットが自己抗原としてバセドウ病発症に深く関与していることが最近示され、これが LHR や FSHR ではなく TSHR のみが自己免疫反応の対象となることの原因ではないかと考えられている。なお、この A-サブユニットは 3 量体をとることが最近報告されている¹⁾。

このように色々な意味でバセドウ病の病態は非常にユニークであるが、自己抗原が明らかなので、実験的には抗原特異的な反応が見やすいとも言える。しかし

同時に蛋白の扱いが難しく，立体構造を保持したままでの蛋白大量精製は容易ではない。細胞膜貫通分はGタンパク共役型受容体に共通の7回膜貫通構造を呈する。なお，細胞外領域に結合したリガンドの刺激情報がいかに細胞膜貫通部分ひいてはG蛋白に伝えられるかは未だ不明であるが，構造的に細胞外と細胞内を連結し，情報伝達に重要な役割を果たしているであろうとの推測及びそれを支持する最近のデータから，細胞外領域C端のC-b2 & 3領域は蝶番領域（hinge region）と呼ばれる。最新の立体構造は他文献²⁾を参照されたい。

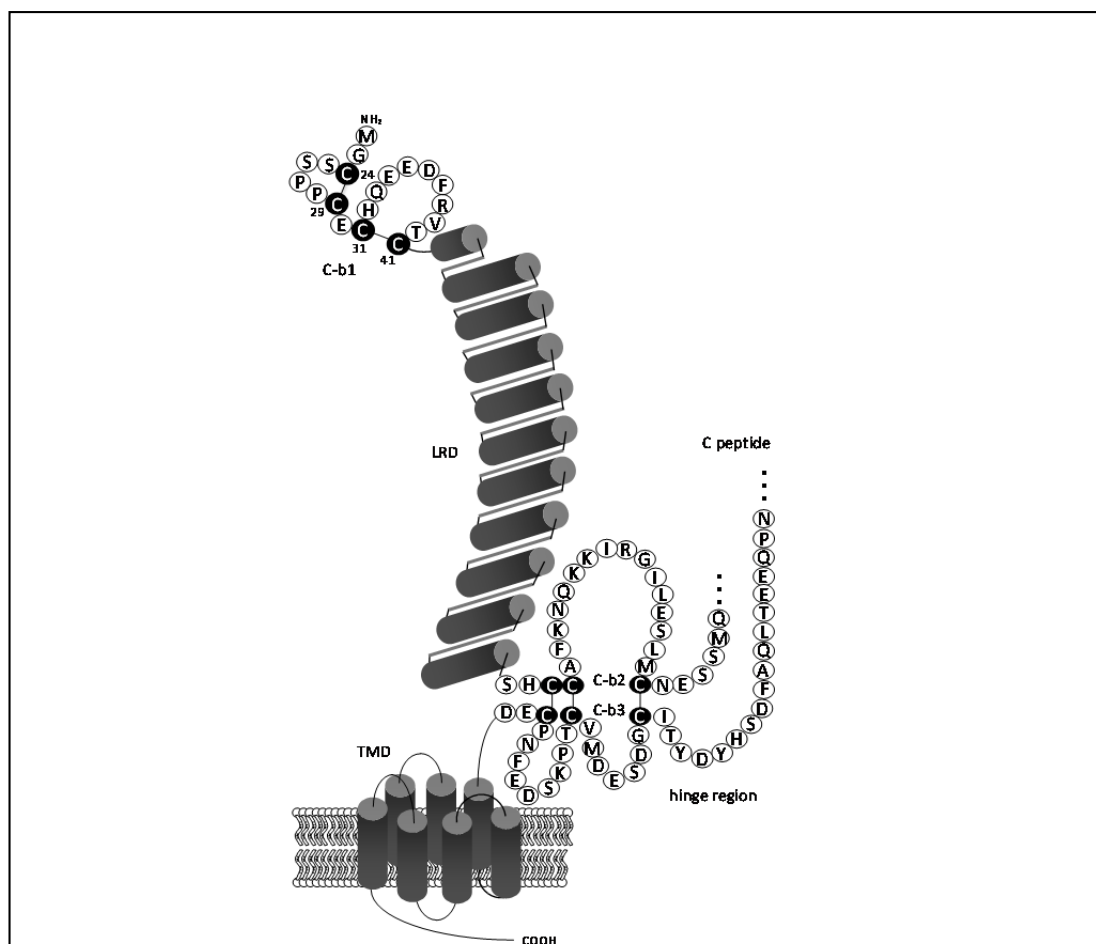


図1. TSHR 立体構造のシェーマ。C-b1 と蝶番領域は実際のアミノ酸配列を記している
ので，実際のサイズに比較して大きくなっている。なお，C-peptide 領域のアミノ酸
は省略。

*永山&西原. TSH 受容体. 医学のあゆみ「GPCR 研究の最前線 2016」(印刷中)より転載(許諾済)

マウス TSHR を用いた研究

ヒトの疾患の病態解明はヒトの試料を用いて行うのが理想であるが、ヒトの試料でできることには限界があり、どうしても動物モデルが必要となる。橋本病と異なりバセドウ病には自然発症モデルは存在しないため、誘導型モデルの樹立が必要であった。通常であれば精製抗原タンパク（+アジュバント）による免疫を行うところであるが、以前は立体構造を保ったままの精製が不可能であったため、遺伝子を用いた方法がとられた。詳細は省略するが、TSHR 遺伝子導入細胞（*in vitro* 遺伝子導入）による免疫から始まり、次いで *in vivo* での遺伝子導入として、DNA ワクチンと我々が樹立したアデノウイルスによる遺伝子導入法が報告されている。世界で最初の TSHR 導入細胞によるモデル³⁾、アデノウイルスによるモデル⁴⁾、DNA ワクチン法の *in vivo* electroporation による改善⁵⁾ などこの分野での日本人の貢献は大きい。

我々は1989年にヒト TSHR cDNA をクローニングし⁶⁾、続いて2002年に上記のようにヒト TSHR を発現するアデノウイルスを用いた実験的バセドウ病モデルを報告し、それを用いたバセドウ病の病態解明研究を行い、以下のような点を解明してきた。

1. 抗原提示細胞として樹状細胞は勿論だが、B細胞も重要な役割を果たしている。
2. バセドウ病は液性免疫異常であり、Th2タイプの免疫反応が中心と考えられてきたが、活性化されるT細胞はインターフェロンガンマを分泌するTh1タイプであり、Th2やTh17タイプの関与は少なく、さらに産生される抗体もIgG2aを中心とするTh1タイプである。
3. 免疫を負に調節する制御性T細胞（CD4+CD25+やCD8+CD122+）がバセドウ病発症抵抗性マウス系統（C57BL/6）での発症や、好発系マウス系統で（BALB/c）の疾患重症度に関与している。

他施設からの報告を含めて、上記以外の研究成果については他文献⁷⁾を参照されたい。幸運なことにこのモデルは高い再現性・発症率などから非常に優れたモデルとの評価を受け、前述の *in vivo* electroporation 法と共に世界中で汎用されている。しかし、同時にいくつかの問題も含有していた。以下に3つほど列挙する。

1. ヒトの受容体を用いてきたが、ヒトとマウス間での TSHR のアミノ酸レベルでの相同性は約80%で、厳密にはヒト TSHR はマウスの自己抗原とはいえない。マウスモデルではマウス TSHR を用いるべきと考えた。
2. このモデルでは甲状腺機能亢進状態が長続きしない。新規治療法の開発などを考慮すると、長期持続型が理想である。さらに言えば、自然発症モデルが理想である。

3. 眼症が見られない。バセドウ病の甲状腺外合併症として最も厄介である眼症の病態解明には是非動物モデルが必要である。

1. の問題解決のため、マウス TSHR 発現アデノウイルスを作製し、受容体の発現を *in vitro* 感染後のウエスタン解析実験で確認した後、野生型マウスを免疫したところ、全く免疫反応が認められなかった。投与ウイルス量の増量、抗 CD25 抗体を用いた CD4+CD25+制御性 T 細胞除去による免疫反応増強も効果を示さなかった。これらの結果は、野生型マウスは、マウス TSHR に対して強い免疫寛容を有することを示している⁸⁾。

つぎにこの免疫寛容を克服して、野生型マウスでマウス TSHR に対する免疫反応を観察できるか否か、TSHR ノックアウト (KO) マウスを用いて検討した。TSHR KO マウスは、文字通り TSHR が発現していないので、TSHR は自己抗原ではなく、免疫寛容を示さないはずである。実際、作製したマウス TSHR 発現アデノウイルスで KO マウスを免疫したところ、ヒト受容体で免疫した場合と同様に高い抗体価が得られた。これらの抗体には、強い甲状腺刺激活性が認められた。免疫反応の長期経過を観察すると、興味深いことに免疫後初期には刺激型抗体 (thyroid stimulating antibody, TSAb) 有意であったものが、6 か月後には阻害型抗体 (thyroid blocking antibody, TBAb) が有意となった⁹⁾。つまり TSAb 産生が一過性であることを示された。今までのモデルで、野生型マウスをヒト TSHR で免疫した場合と同様であった。いずれにせよ、マウス TSHR に対する免疫反応を観察できる系ができたわけだが、これらの実験の中で意外な実験結果を得た。野生型マウスをヒト TSHR で免疫して誘導された抗ヒト TSHR 抗体が、マウス TSHR を発現した CHO 細胞を用いた flow cytometry で検出できなかったのである。しかしマウス TSHR 発現 CHO 細胞を用いた TSAb アッセイでは陽性であったし、マウスが甲状腺機能亢進状態であることは、産生された抗ヒト TSHR 抗体が *in vivo* でマウスの甲状腺に発現するマウス TSHR に結合し刺激していることを意味するものであり、矛盾するデータであった。詳細は省略するが、種々の単クローン性抗体を用いた解析・他の施設の過去の報告から推測するに、ヒト TSHR 免疫で惹起される抗ヒト TSHR 抗体の大部分は neutral な抗体 (受容体の活性作用も阻害作用もない) でヒト TSHR 発現 CHO 細胞を用いた flow cytometry では検出されるが、マウス TSHR には交差反応を示さないため、マウス TSHR 発現 CHO 細胞を用いた flow cytometry では検出されない。一方、バセドウ病の原因となる抗ヒト TSHR に対する TSAb はマウス TSHR に交差反応して、マウス TSHR を刺激できるが、抗体濃度が極めて低いため、flow cytometry では検出感度以下となる、と考えられるに至った。

話を元に戻して、TSHR KO マウスのマウス TSHR による免疫法の欠点は、

マウスの甲状腺に TSHR が存在しないため、抗体の作用を *in vivo* で観察できないことである。この問題を解決するため、脾細胞養子免疫実験を行った。すなわち、免疫した TSHR KO マウスの脾細胞をヌードマウスに移入して、抗体を産生させ、その抗体の *in vivo* での効果を見ようとするものである。TSAb 優位の時期の免疫 TSHR KO マウスの脾細胞の移入により効率よくヌードマウスで抗体産生が観察された。興味あることに免疫により抗体産生が見られた KO マウスと見られない KO マウスからの脾細胞の効果には差が見られず、いずれでも効率よく抗体産生が誘導できた。この抗体産生は多少のタイターの低下はあるものの、観察期間である 6 か月にわたって認められた。多くの抗体産生マウスでは、初期に血中 T4 が上昇し TSAb 陽性で、バセドウ様の甲状腺機能亢進状態を呈した。しかし免疫した TSHR KO マウスの場合と同様に TSAb 産生は長続きせず、次第に血中 T4 及び TSAb 活性は低下し、6 か月後には、約半分のマウスが正常 T4 値を、残りの半分が低 T4 値と高 TSH 値を呈し、甲状腺機能正常から低下状態になった。勿論 TSAb 活性は最早見られず、代わりに高い TBAb 活性が認められた。この時の甲状腺機能低下のマウスの甲状腺組織は、多くが阻害型抗体による甲状腺機能低下状態に一致する組織像、すなわち、丈の低い甲状腺濾胞上皮細胞が観察されたが、一部のマウスでは広範なリンパ球の浸潤が見られ、かつ抗サイログロブリン抗体が血中に認められた。これらの所見は、TSHR に対する細胞性免疫反応により橋本病様の病態が生じ、破壊された甲状腺から漏出したサイログロブリンに対する抗体が 2 次的に出現したと解釈される。少なくとも実験的には、橋本病が抗 TSHR 免疫反応で惹起されることが示された。

このモデルでバセドウ病の厄介な合併症の 1 つである眼症の有無を検討したところ、わずかなマクロファージの浸潤が眼窩の筋肉と脂肪組織に認められた。ヒトの眼症からは程遠い所見ではあるが、TSHR が眼症に関与することを示す所見の 1 つといえるかもしれない。

この養子免疫のバセドウ病自然発症モデルとなる可能性も検討した。すなわち、免疫していない TSH KO マウスの脾細胞をヌードマウスに養子免疫して、抗 TSHR 免疫反応を測定した。残念ながらこれだけではほとんど免疫反応は見られなかったが、免疫反応を抑制する共抑制因子である programmed cell death-1 ligand (PD-L1) と cytotoxic T lymphocyte antigen (CTLA)4 に対する抗体でこの抑制を解除すると、抗体の産生が認められた。ただしその抗体価は非常に低く、T4 上昇には結びつかなかった。非免疫 TSHR KO マウスの脾細胞の養子免疫と共抑制因子による免疫抑制解除の組み合わせでは、十分な抗 TSHR 免疫反応を誘導できず、自然発症モデルの自立には至らなかった。

以上より、マウス TSHR を抗原とするバセドウ病モデルを作製したが、オリジナルのヒト TSHR を用いたモデル同様、甲状腺機能亢進症は一過性で、眼症も軽度

のマクロファージ浸潤のみ観察され、当初の問題点の 2. と 3. は未解決で残った。まず 2. に関しては、ドイツのグループから最近アデノウイルスによる長期間にわたる免疫で亢進症が長期継続することが報告された¹⁰⁾。また、アメリカから、橋本病を自然発症する NOD-H2h4 マウスと甲状腺特異的ヒト TSHR A-サブユニットトランスジェニックマウス¹¹⁾を交配して作出したマウスは抗 TSHR 抗体自然産生マウスとなることも報告された¹²⁾。後者はおそらく長期にわたり抗体を産生するはずで、長期モデルといえる。3. はイギリスのグループが、*in vivo* electroporation 法で、眼科病変が見られることを報告しているが、報告の度に病変が異なり（繊維化、リンパ球浸潤など）、モデルとしての確立には至っていない^{13, 14)}。

マウス TSHR に対する免疫寛容の研究

さて、TSHR KO マウスを用いてマウスの本来の自己抗原に対する免疫反応を見ることはできたが、本来どのような機序で野生型マウスがマウス TSHR に免疫寛容を示すのかは不明であった。その機序の 1 つとして末梢性免疫寛容の関与を検討した。この目的のために、次に示す抗体を種々の組み合わせで用いた。

1. 前述の抗 CD25 抗体
2. 前述の抗 PD-L1, CTLA4 抗体：共抑制因子である PD-L1 と CTLA-4 を抑制するため、免疫反応を増強する。
3. 抗 CD40, CD137 抗体：共刺激因子である CD40 と CD137 を刺激するため、これらも免疫反応を増強する。

それぞれの組み合わせの説明はここでは省略するが、マウス TSHR 免疫と抗体投与によって野生型マウスに抗体産生を誘導できた。しかしここでも抗体価は非常に低く、T4 上昇には至らなかった。これらの結果からは、マウスのマウス TSHR への免疫寛容における末梢性免疫寛容の役割は小さいと判断される¹⁵⁾。

現在、中枢性免疫寛容の関与を検討するために胸腺の移植実験を行っている。

さいごに

1989年にヒト TSHR cDNA をクローニングしてから 26年、マウスのバセドウ病モデルを報告してから 13年が経過した。受容体の立体構造も徐々に明らかになり、種々の単クローン性抗体も単離され、生理的な受容体機能、バセドウ病での病態解明も進んできたが、今後も完全な病態解明、新規治療法・予防法の開発を目指していきたい。

引用文献

- 1) Rapoport B, Aliesky HA, Chen CR, McLachlan SM. Evidence that TSH Receptor A-Subunit Multimers, Not Monomers, Drive Antibody Affinity Maturation in Graves' Disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(6):E871-875.
- 2) Kleinau G, Neumann S, Gruters A, Krude H, Biebermann H. Novel insights on thyroid-stimulating hormone receptor signal transduction. *Endocrine reviews.* 2013;34(5):691-724.
- 3) Shimojo N, Kohno Y, Yamaguchi K, Kikuoka S, Hoshioka A, Niimi H, Hirai A, Tamura Y, Saito Y, Kohn LD, Tahara K. Induction of Graves-like disease in mice by immunization with fibroblasts transfected with the thyrotropin receptor and a class II molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):11074-11079.
- 4) Nagayama Y, Kita-Furuyama M, Ando T, Nakao K, Mizuguchi H, Hayakawa T, Eguchi K, Niwa M. A novel murine model of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor. *J Immunol.* 2002;168(6):2789-2794.
- 5) Kaneda T, Honda A, Hakozaki A, Fuse T, Muto A, Yoshida T. An improved Graves' disease model established by using in vivo electroporation exhibited long-term immunity to hyperthyroidism in BALB/c mice. *Endocrinology.* 2007;148(5):2335-2344.
- 6) Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P, Rapoport B. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165(3):1184-1190.
- 7) McLachlan SM, Rapoport B. Breaking tolerance to thyroid antigens: changing concepts in thyroid autoimmunity. *Endocrine reviews.* 2014;35(1):59-105.
- 8) Nakahara M, Mitsutake N, Sakamoto H, Chen CR, Rapoport B, McLachlan SM, Nagayama Y. Enhanced response to mouse thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor immunization in TSH receptor-knockout mice. *Endocrinology.* 2010;151(8):4047-4054.
- 9) Nakahara M, Johnson K, Eckstein A, Taguchi R, Yamada M, Abiru N, Nagayama Y. Adoptive transfer of antithyrotropin receptor (TSHR) autoimmunity from TSHR knockout mice to athymic nude mice. *Endocrinology.* 2012;153(4):2034-2042.
- 10) Holthoff HP, Goebel S, Li Z, Fassbender J, Reimann A, Zeibig S, Lohse MJ, Munch G, Ungerer M. Prolonged TSH Receptor A Subunit Immunization of Female Mice Leads to a Long-Term Model of Graves' Disease, Tachycardia, and Cardiac Hypertrophy. *Endocrinology.* 2015;156(4):1577-1589.

- 11) Pichurin PN, Chen CR, Chazenbalk GD, Aliesky H, Pham N, Rapoport B, McLachlan SM. Targeted expression of the human thyrotropin receptor A-subunit to the mouse thyroid: insight into overcoming the lack of response to A-subunit adenovirus immunization. *J Immunol.* 2006;176(1):668-676.
- 12) Rapoport B, Aliesky HA, Banuelos B, Chen CR, McCarter MD. A unique mouse strain that develops spontaneous, iodine-accelerated, pathogenic antibodies to the human thyrotrophin receptor. *Endocrinology.* 2015;194(9):4154-4161.
- 13) Moshkelgosha S, So PW, Deasy N, Diaz-Cano S, Banga JP. Cutting edge: retrobulbar inflammation, adipogenesis, and acute orbital congestion in a preclinical female mouse model of Graves' orbitopathy induced by thyrotropin receptor plasmid-in vivo electroporation. *Endocrinology.* 2013;154(9):3008-3015.
- 14) Zhao SX, Tsui S, Cheung A, Douglas RS, Smith TJ, Banga JP. Orbital fibrosis in a mouse model of Graves' disease induced by genetic immunization of thyrotropin receptor cDNA. *The Journal of endocrinology.* 2011;210(3):369-377.
- 15) Yasui J, Nakahra 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 Med Nagasaki.* 2014;59(1):13-17.