

安井 順一 論文内容の要旨

主 論 文

Minor contribution of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and programmed cell death ligand 1 in immune tolerance against mouse thyrotropin receptor in mice

マウス TSH 受容体に対する免疫寛容における CTLA-4 と PD-L1 の寄与は僅かである。

安井 順一、中原 麻美、嶋村 美加、蔵重 智美、安井 和明、
阿比留 教生、川上 純、永山 雄二

ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA・59 巻 13-17 頁 2014 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：川上 純 教授)

【緒言】

バセドウ病は、抗 TSH 受容体 (TSHR) 抗体 [thyrotropin receptor antibody (TRAb)] により甲状腺機能亢進症を来たす臓器特異的自己免疫疾患である。原研分子研究室で作製された誘導型バセドウ病マウスモデルでは好発系の野生型 [wild type (wt)] BALB/c マウスに「ヒト」TSHR を発現するアデノウイルス (Ad-hTSHR) を用いていたが、最近の研究で真の自己抗原である「マウス」TSHR を発現するアデノウイルス (Ad-mTSHR) を用いたところ、wt BALB/c マウスは全く反応せず、強い免疫寛容が存在することが示唆された。この免疫寛容は抗 CD25 抗体 (α CD25) を用いて制御性 T 細胞を除去しても解除することはできなかった。一方、TSHR ノックアウト (KO) BALB/c マウスは mTSHR によく反応した。免疫寛容には、中枢性免疫寛容と末梢性免疫寛容があるが、mTSHR に対する免疫寛容における両者の重要性はいまだ解明されていない。そこで、我々は cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) と programmed cell death ligand 1 (PD-L1) に対するアンタゴニスティック抗体および CD40 と CD137 に対するアゴニスティック抗体を用いて、mTSHR に対する末梢性免疫寛容の機序の解明を行った。

【対象と方法】

Ad-mTSHR および TSHR KO BALB/c マウス (TSHR^{-/-}) は、以前原研分子研究室で作製されたものを使用した。同腹仔である TSHR ヘテロ BALB/c マウス (TSHR^{+/-}) は wt BALB/c マウス (TSHR^{+/+}) と TSHR^{-/-} マウスを交配して作出した。TSHR^{+/+}、TSHR^{+/-}、TSHR^{-/-} マウ

スをAd-mTSHR (10^{10} particles/匹) を用いて3週間の間隔で大腿四頭筋内投与にて2回免疫を行った。

抗マウスTSHR免疫反応の評価は2回目の免疫の2週間後および6週間後に採血し、血清中のTRAb抗体価、Free T4 (FT4) 値を測定することにより行った。TRAbは、TSHRを発現するChinese hamster ovary (CHO)細胞にマウス血清を加え、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウスIgG 抗体を添加してフローサイトメトリーにて抗体価を測定する方法にて測定した。FT4の測定はラジオイムノアッセイにより行った。

各種抗体を後述のように投与した。 α CD25 は、1回目の免疫の4日前に1匹あたり1回につき $500 \mu\text{g}$ 腹腔内投与した。また、抗CTLA-4抗体 (α CTLA-4)、抗PD-L1抗体 (α PD-L1)、抗CD40抗体 (α CD40)、抗CD137抗体 (α CD137) は、それぞれ1回目の免疫から1回目の採血までの5週間に週2回ずつ1匹あたり1回につき $100 \mu\text{g}$ ずつ腹腔内投与した。

【結果】

TSHR^{-/-}マウスをAd-mTSHRで免疫すると、既報通りよく反応し、容易にTRAbが誘導された。一方、TSHR^{+/+}マウスとTSHR^{+/-}マウスではTRAbが誘導されず、強い免疫寛容が存在した。そこで、免疫したTSHR^{+/+}マウスとTSHR^{+/-}マウスに α CTLA-4と α PD-L1を投与すると、 α CD25の有無にかかわらず、TRAbが誘導された。しかし、いずれのマウスで誘導されたTRAbの抗体価(TSHR^{+/+} $223.0 \pm 29.8\%$ 、TSHR^{+/-} $314.8 \pm 119.7\%$)もTSHR^{-/-}マウスで誘導されたTRAbの抗体価($1039.8 \pm 829.6\%$)よりも有意に低かった($P < 0.01$)。また、TSHR^{+/-}マウスで誘導されたTRAbの抗体価は、TSHR^{+/+}マウスで誘導されたTRAbの抗体価よりも有意に高かった($314.8 \pm 119.7\%$ versus $223.0 \pm 29.8\%$ 、 $P < 0.01$)。TRAbが誘導されたTSHR^{+/+}マウスとTSHR^{+/-}マウスにおいて、いずれのマウスでもFT4の上昇は認めなかった。一方、 α CD40と α CD137を追加で投与しても、 α CTLA-4、 α PD-L1、 α CD25による免疫反応を増強することはできなかった。

【考察】

α CTLA-4と α PD-L1を用いて、共抑制因子であるCTLA-4とPD-L1に関わる免疫学的機序を遮断することにより、TSHR^{+/+}マウスとTSHR^{+/-}マウスにおいて部分的ではあるもののmTSHRに対する免疫寛容を解除することができた。このことから、mTSHRに対する免疫寛容において、末梢性免疫寛容が果たす役割は僅かである可能性が示唆された。また、TSHR^{+/-}マウスで誘導されたTRAbの抗体価はTSHR^{+/+}マウスよりも有意に高かった。免疫寛容には、中枢性免疫寛容と末梢性免疫寛容があるが、中枢性免疫寛容では胸腺髄質上皮細胞に発現している自己抗原による負の選択が行われる。胸腺髄質上皮細胞での自己抗原の発現が僅かに低下するだけでも自己免疫疾患の感受性が上昇することから、TSHR^{+/-}マウスにおける胸腺もしくは末梢でのmTSHRの発現量はTSHR^{+/+}マウスよりも低下している可能性が示唆された。

今回の研究結果から胸腺もしくは末梢でのmTSHRの発現量の違いが、mTSHRに対する免疫寛容にとって重要と考えられた。末梢性免疫寛容はmTSHRに対する免疫寛容に関与するが、その果たす割合は僅かである可能性が示唆されたことから、mTSHRに対する免疫寛容の機序を十分に解明するためには中枢性免疫寛容についてのさらなる研究が必要であると考えられた。