

氏名	川島 晃
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 820 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	甲状腺細胞傷害が誘導する自然免疫反応活性化機構の解明
論文審査委員	委員長 教授 坂井 貴文 委員 教授 小林 哲也 委員 教授 西垣 功一 委員 准教授 足立 明人 委員 鈴木 幸一（国立感染症研究所ハンセン病研究センター 感染制御部第 8 室 室長）

## 論文の内容の要旨

免疫系は、自然免疫と獲得免疫に大別される。自然免疫反応は、主にマクロファージや樹状細胞が病原体を認識することで活性化され、病原体を排除することを主な役割としている。しかし、近年病原体センサーの認識機構が明らかになるにつれて、自己の内因性分子が誘導する自然免疫反応が明らかになってきた。また、腫瘍免疫や移植免疫の研究により自己の内因性分子による慢性炎症や免疫疾患の報告がされる。これらの報告に伴い ‘Danger signal’ という概念が提唱された。これは、組織障害に伴って自己由来の分子によって引き起こされる炎症反応を示している。

甲状腺は、全身の代謝機能を調節している内分泌組織である。代表的な甲状腺自己免疫疾患であるバセドウ病や橋本病は、機能亢進や低下症を引き起こす。これらの自己免疫疾患の発病機序は未だ明らかになっていない。一般的には抗体の産生に先立って、病原体の感染などに由来する炎症反応の活性化が想定される。甲状腺においてウイルス感染症による炎症が発展し、自己免疫疾患に至る報告もあるが、明確なウイルスの同定はされていない。一方で、外傷や虚血再環流などによる細胞傷害は、炎症反応が想定されるものの検討はされていない。そこで我々は、甲状腺組織における自己免疫疾患の発病要因として、細胞傷害による自己の内因性分子による免疫反応活性化の誘導経路の解明を目的として実験を行った。

ラット甲状腺細胞 FRTL-5 に対し、電気刺激を用いた実験的細胞傷害によって検討を行った。これまでの検討により内因性分子として自己のゲノム DNA が、自然免疫の誘導に関与しているという結果が得られている。そこで、実験的細胞傷害を行った際に、細胞質中に暴露したゲノム DNA の存在を証明するために実験を行った。電気刺激を行った甲状腺細胞をショ糖濃度勾配遠心法によって細胞質を単離し、電気泳動法や PCR 法、吸光度の測定により、細胞傷害によって細胞質中に核酸が暴露することを確認した。

次に、細胞傷害によって誘導される免疫反応を RT-PCR を用いて、明らかにした。電気刺激によってインターフェロン (IFN) やインターロイキン 6 などのサイトカインの産生が誘導された。また、様々なケモカインの発現誘導が行われた。更に、抗原提示関連遺伝子として主要組織適合遺伝子複合体抗原 (MHC) クラス I、II の発現だけでなく、共刺激分子として CD80 や CD86 などの発現が誘導された。ルシフェラーゼアッ

セイを用いて測定を行った結果、電荷依存的に細胞傷害の程度が強くなり、それに伴って IFN $\beta$  の発現は強く誘導された。また、細胞傷害が内分泌機能に与える影響について RT-PCR、Real-time PCR、iodide uptake によって評価を行った。その結果、TSH の存在下においてサイログロブリンや Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) の発現が減少することを明らかにした。また、二本鎖の DNA の刺激によってヨードの取り込みが減少することが明らかになった。これらの結果より、甲状腺において傷害が起きた際、サイトカインの発現が誘導され、炎症反応が起き、ケモカインの発現により、免疫担当細胞が甲状腺に遊送されること。そして抗原提示関連遺伝子の発現により抗原が提示される可能性が示された。また、内分泌能は関連遺伝子の発現が減少することによって甲状腺ホルモンの発現が抑制されることを示す結果が得られた。

次に、細胞傷害による免疫反応誘導分子としてのゲノム DNA に対する受容体の探索を行った。FRTL-5 細胞の細胞質画分より二本鎖 DNA に結合するタンパクを精製し、TOF-MS 解析によりタンパクの同定を行った。その結果、Histone 関連タンパクが高いスコアを示した。また、共同研究者よりヒトの細胞で Histone H2B が自然免疫反応を誘導する合成二本鎖 DNA の受容体として働くという結果が得られた。そこで、FRTL-5 細胞において細胞傷害が起きた際のゲノム DNA 受容体としての Histone H2B の働きを確かめた。Histone H2B の発現抑制実験を行った結果、細胞傷害によって誘導される自然免疫反応は抑制された。また、細胞傷害によって抑制された内分泌能関連遺伝子 NIS は、Histone H2B の発現抑制により回復した。この結果より、FRTL-5 において細胞傷害が起きた際にゲノム DNA が細胞質中で Histone H2B によって認識され、自然免疫反応の誘導を行っていることが明らかになった。

これらの結果より、甲状腺組織において組織傷害が起きた際、内因性因子であるゲノム DNA が細胞質中に取り込まれ、Histone H2B によって認識されることによって自然免疫反応が誘導されること、抗原提示関連遺伝子の発現が誘導されること、内分泌能の機能の低下が誘導されることを示す結果が得られた。それにより、甲状腺組織では病原体の非存在下でも虚血再環流やヨードの過剰摂取、物理的傷害などにより細胞傷害が起きた際、免疫反応が誘導されることが明らかになった。また、細胞傷害に由来する免疫反応活性化が自己免疫疾患の発病に関与する可能性を示す結果が得られた。

## 論文の審査結果の要旨

川島晃君（申請者）の提出した学位論文について、本論文の審査委員会は平成 23 年 2 月 7 日に理学部 8 番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って内容を審査した。以下に審査結果の概要を示す。

甲状腺は、甲状腺ホルモンの分泌によって全身の代謝機能を調節している内分泌組織である。甲状腺を標的とした自己免疫疾患として、バセドウ病や橋本病が知られている。これらの自己免疫疾患は遺伝的要因と環境要因によって引き起こされる多因子疾患であるが、発症要因は明らかになっていない。自己に対する強力な抗体を産生する自己免疫疾患はそれに先行する自然免疫反応の活性化が必要であり、一般的に病原体の感染などに由来する炎症反応の活性化がその原因と考えられている。甲状腺において、ウイルスによる炎症が増悪し、自己免疫疾患に至る報告もあるが、明確なウイルスの同定はされていない。一方、外傷や虚血再還流などによる細胞傷害は、炎症反応を誘起することが明らかになっているものの自己免疫疾患との関連についての検討はされていない。このような背景を踏まえ、本研究は病原体の非存在下において、組織傷害に由来する自己の内因性分子が甲状腺の炎症反応を起こすメカニズムを甲状腺細胞株である FRTL-5 を用いて検討を行っている。本論文によって詳細に論じられている主要な課題と成果は以下の通りである。

### (1) 細胞傷害による免疫反応誘導の解明

甲状腺の組織傷害が起きた際の免疫反応を明らかにする為に、ラット甲状腺細胞株 FRTL-5 に対して電気刺激を用いた実験的細胞傷害を起こすことによって検討を行った。傷害を受けた細胞の細胞質画分を精製することによって、自然免疫反応を誘導する自己由来の分子としてゲノム DNA 断片が細胞質中に暴露することや、細胞傷害の程度に応じて細胞質中のゲノム DNA の量が増加することが明らかになった。また、RT-PCR 法やレポーターアッセイ法を用いることにより、細胞傷害に由来する自然免疫反応の誘導や獲得免疫反応の誘導を明らかにした。更に、定量的リアルタイム PCR 法やヨード摂取率の測定を行うことによって細胞傷害により甲状腺の内分泌機能が低下することを明らかにした。これらの結果より甲状腺において組織傷害が起きた際に自己由来のゲノム DNA 断片が細胞質中に暴露し、自然免疫反応や獲得免疫反応が誘導されること、内分泌機能低下することを示す結果が得られた。

### (2) 二本鎖 DNA 受容体 Histone H2B の同定

甲状腺細胞傷害が起きた際のゲノム DNA 断片による自然免疫活性化のメカニズムを明らかにすることを目的として、二本鎖 DNA 受容体の同定を行った。FRTL-5 の細胞質中のタンパク質で、一本鎖 DNA には結合せず二本鎖 DNA に特異的に結合する分子について electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) を用いた解析を行った。その結果、Histone H1d、Histone H2B、Histone H3c の 3 種類のヒストンタンパクが高いスコアを示した。これらのヒストンタンパクの内、Histone H2B はヒトの細胞株を用いた発現クロニング法により二本鎖 DNA を認識し、自然免疫の発現を誘導することが報告されている。そこで、FRTL-5 細胞における Histone H2B の関与を検討する為に siRNA を用いた発現抑制実験を行った結果、二本鎖 DNA 刺激や細胞傷害によって誘導される自然免疫反応は Histone H2B の発現抑制によって有意な減少を示すことがレポーターアッセイにより明らかになった。一方で二本鎖 RNA 刺激に対しては、有為な差は無かった。細胞傷害によって減少した Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) の発現は、Histone H2B の発現抑制によって寛解することを定量的リアルタイム PCR 法により明らかにした。これらの結果より、甲状腺細胞株 FRTL-5 において、二本鎖 DNA は細胞質中で Histone H2B と物理的に結合し自然免疫反

応の誘導を行うこと、細胞傷害の際にゲノム DNA が細胞質中の Histone H2B を介して自然免疫反応の誘導を行うことを明らかにした。

以上のことから、本論文より新たに得られた成果はラット甲状腺細胞株 FRTL-5 において(1)細胞傷害によって、細胞質中に自己由来のゲノム DNA 断片が暴露し、自然・獲得免疫反応が誘導されること。それに伴い NIS の発現の低下やヨードの取り込みが下がることによって、甲状腺内分泌能の低下を誘導すること。(2)二本鎖 DNA の受容体として Histone H2B が自然免疫反応の活性化を仲介すること、更に細胞傷害の際にゲノム DNA を細胞質中の Histone H2B が認識することによって自然免疫反応を活性化することを明らかにした。これらの結果は、甲状腺組織傷害の際、自己のゲノム DNA が細胞質に暴露されることによって自然・獲得免疫反応の誘導を起こし、自己免疫疾患の発症要因となる可能性を示した。本研究は、生体内の細胞傷害による免疫反応や自己免疫疾患の発症要因の解明において、新しい知見として高い意義を有すると言える。また、川島晃君は本論文の内容をすでにレフェリー制のある外国専門誌に発表した。これらの成果から、本審査委員会は、本学位論文を博士（理学）の学位を授与するに値するものとして判断した。