

## 論文の内容の要旨

論文題目 ホルモン／自己抗体／増殖因子による甲状腺細胞増殖のメカニズム  
その機序の基礎的検討  
新しいバセドウ病病勢判定法開発への応用

指導教官 藤田敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成7年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 瀬尾麻理

### バセドウ病病態生理の理解の現況とその問題点

バセドウ病は臓器特異的自己免疫疾患に属し、TSH 受容体抗体が甲状腺機能亢進症と甲状腺腫を惹起すると考えられている。その最重要かつほぼ唯一の細胞内シグナルは cAMP-PKA 系であり、cAMP 産生を介して病態が形成されると信じられてきたが、確証は得られていない。

従来の TSH 受容体抗体測定法のうち TSH 受容体への結合阻害率を指標とする方法 (TBII=TSH binding inhibitory immunoglobulins) は簡便ながら病勢を良く反映し临床上重用されている。しかし単独では診断や寛解判定の指標とはなり得ず、病勢を反映しない例が散見される。

そこで TSH 受容体抗体の生物活性を評価する方法として、cAMP 産生を指標とする甲状腺刺激型抗体 (TSAAb=Thyroid-stimulating antibodies) 測定系が開発された。しかしその有用性は TBII に劣り、TSAAb は甲状腺腫の大きさや TBII 値と相関しないことがわかってきた。また、特発性粘液水腫の原因と考えられている刺激阻害型抗体 (TSBAAb=Thyroid-stimulation blocking antibodies) が TSH による cAMP 産生の抑制率を指標として測定可能となったが、未治療バセドウ病患者においてもしばしば陽性となることが判明した。これらのことから cAMP 産生を指標とする方法ではバセドウ病を評価できない可能性が示唆された。

より正確なバセドウ病病勢判定の指標として、患者 IgG の有する増殖刺激能に着目した。バセドウ病寛解の臨床指標として甲状腺腫の縮小が有用であるからである。増殖刺激能を指標とする新しい TSH 受容体抗体測定法を開発し、有用性を確認後、患者 IgG による増殖刺激経路を解明することにより、なぜ患者 IgG の有する増殖刺激能が cAMP 産生能より病勢を反映するのかという疑問の解決を試みる事を研究目的とした。

## 甲状腺細胞増殖を指標とするバセドウ病病勢測定系(GSAb)の確立

バセドウ病患者 IgG が甲状腺細胞増殖刺激能を有することは 20 年ほど前から知られていたが、測定方法が煩雑で精度にも問題があり臨床応用には至らなかった。そこで本研究においては簡易細胞数測定法(MTT 法)を利用し、患者 IgG の有する増殖刺激能を簡便に算出することによる病勢測定法(Growth-Stimulating Antibodies=GSAb)を確立した(FRTL/MTT 法)。具体的には精製した患者 IgG を FRTL-5 細胞に添加し、3日間培養後の細胞数変化を MTT 法にて計測し TSH 当量に換算して GSAb とした。その有用性を TBII/TSAb などと比較し検討した。

活動性バセドウ病では GSAb が高く、対照群では有意に低値であった。典型例のみならず、TSAb/TBII が低値の活動性例で GSAb は高値で、TSAb/TBII が高値の非活動性例(euthyroid Graves')で GSAb は低値を示した。GSAb は TSAb や TBII よりも臨床病勢や甲状腺腫の大きさと良く相関した。血中サイログロブリン(Tg)濃度は抗 Tg 抗体非存在下にてバセドウ病病勢を反映する事が知られ、抗 Tg 抗体強陽性者は Tg 値が正確に測定できないため除外したところ、GSAb と血中 Tg 濃度や患者 IgG に刺激・分泌される培養液中 Tg 濃度との間に、良い相関が得られた。

GSAb は非常に簡便な測定系ながら、TSAb・TBII・Tg 以上にバセドウ病の診断・寛解判定に有用である可能性が考えられた。このことから本症の病態が cAMP 刺激よりも増殖刺激により強く関連した機構で形成されている可能性を考えた。

## バセドウ病患者 IgG が活性化する FRTL-5 細胞増殖刺激経路の解析

増殖刺激がバセドウ病病態形成・維持に重要であると考えられるため、患者 IgG による増殖促進機構を理解する目的で患者 IgG や TSH の増殖刺激経路を cAMP アナログや PKA 阻害薬を利用し、同法(FRTL/MTT 法)にて増殖刺激活性(Growth-stimulation activity=GSA)を測定し解析した。

cAMP アナログは単独で TSH 同様、濃度依存性に FRTL-5 細胞の増殖を刺激したが、高濃度で投与しても TSH による最大増殖刺激には至らなかった。cAMP アナログと TSH とをそれぞれ最大増殖刺激が得られる量にて同時に添加すると TSH 単独時と同程度であり、TSH が cAMP 依存性経路のみならず cAMP 非依存性経路を利用して増殖刺激を伝達する可能性が示唆された。PKA 阻害薬は TSH の増殖刺激を濃度依存性に抑制したが、完全な抑制はできないことからその可能性が考えられた。

バセドウ病患者 IgG については cAMP アナログ と同時にそれぞれ最大増殖刺激が得られる濃度で添加すると更なる増殖が認められること、及び PKA 阻害薬が IgG の増殖刺激を全く抑制しないことから、cAMP 依存性経路よりはむしろ cAMP 非依存性経路が増殖刺激に重要である可能性が示唆された。

## 各種モノクローナル抗体が示す増殖刺激活性 ～cAMP 産生能と増殖刺激能の比較～

近年、京都大学の赤水らはバセドウ病患者由来モノクローナル抗体の単離・樹立に成功し、TBII 陽性クローンと TSAb 陽性クローンは別のリンパ球から産生される別種の抗体であり、両方の活性を同時に有する抗体は存在しないこと、及び TBII 陽性クローンの多くは TSH の cAMP 産生を抑制する TSBAb 活性を持っていることを報告した。このことから cAMP 非依存性経路を介して増殖を刺激する IgG の主体がこれらの TSBAb 陽性クローンである可能性を考え、バセドウ病患者由来モノクローナル TSAAb (296-1/291-11)・TSAb (B6B7/101-2) の増殖刺激活性を同法 (FRTL/MTT 法) にて測定し確認した。

TSBAb クローンは濃度依存性に FRTL-5 細胞の増殖を刺激し、その  $5\mu\text{g/ml}$  の活性は 0.05TSH 当量に達した。なお、TSAb クローンも増殖刺激活性を有したが効果発現には  $30\mu\text{g/ml}$  以上を要した。一方、特発性粘液水腫患者由来 TSBAb クローン (32A-5) は単独で増殖刺激活性をもたず、TSH 存在下でその増殖刺激を抑制した。

バセドウ病患者由来 TSBAb クローンは TSAb クローンより強い増殖刺激活性を有していることから、cAMP 産生能は欠くものの増殖刺激活性を有し、バセドウ病の形成・維持に関与している可能性が考えられた。また、この TSBAb クローンは粘液水腫患者由来の所謂『真の阻害型抗体』とは別個であり、増殖刺激活性の有無で GSAb (Growth-stimulating antibodies) と GSBAb (Growth-stimulation blocking antibodies) に区別できると思われた。

## バセドウ病の新しい病因モデル ～各モノクローナル抗体の役割～

以上より、cAMP-PKA 系が TSH/TSH 受容体抗体の最重要かつほぼ唯一のシグナルである、という従来のバセドウ病学のセントラルドグマが必ずしも真ではないとする仮説、すなわち TSAb クローンだけではなく増殖刺激活性をもつ TSBAb クローンも、cAMP 非依存性経路を刺激して病態形成に関与しているという可能性を考えるに至った。(図参照)

この病因モデルにより以下の疑問点が説明可能となる。①TSBAb クローンは TSAb クローンより強い増殖刺激活性を有していること。②バセドウ病患者血中ポリクローナル IgG の増殖刺激活性が PKA 阻害薬で抑制されず、cAMP アナログ添加が増殖刺激に相加効果をもたらすことから、患者 IgG による増殖刺激は主に cAMP 非依存性経路を利用していると想定されること。③TBII は TSAb よりバセドウ病の臨床マーカーとして有用であり、GSAb はこれらよりも良い指標である可能性が考えられること。④モノクローナル抗体レベルで TBII 活性をもつ抗体の多くが TSBAb 陽性であること。⑤TSAb クローンから作成されたバセドウ病の動物モデルでホルモン過剰産生はみられるのに甲状腺腫は認められないこと。⑥TSH 受容体を免疫したバセド

ウ病の動物モデルで甲状腺腫が形成され血中 TSBAb 活性が陽性になること。⑦TSAb 値は甲状腺サイズと全く相関しないこと。⑧一般に cAMP は多くの細胞系で増殖抑制因子として働くこと。⑨TSAb 値と TBII 値が相関しないこと。⑩TSAb や TBII が陰性の活動性バセドウ病患者が10%程度存在すること。⑪比較的多くの活動性バセドウ病患者において病初期から TSBAb 活性が陽性であること。①から③までは自己実験データによるもので、④から⑪までは従来の報告または一般に認知されていることである。

本研究において、患者 IgG の有する増殖刺激活性を指標とする新しいバセドウ病病勢判定法を開発し、その有用性からバセドウ病の病態が cAMP 刺激よりも増殖刺激により強く依存した機構で形成されているという可能性を考えた。患者 IgG による甲状腺細胞増殖刺激経路の解明を試みた結果、cAMP 非依存性経路が重要であったことから、その主体が TSBAb クローンであるという独自の発想を持った。赤水らが作成した種々のモノクローナル抗体の供与を受け、増殖刺激活性を測定することによりその発想の正当性を確認できた。今後更に、この病因モデルの正当性を明確にしていきたい。

## 我々の作業仮説

