

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15774

研究課題名(和文) B7ファミリータンパクを用いた自己免疫性甲状腺疾患の新規検査法の開発

研究課題名(英文) Development of new examination for autoimmune thyroid disease by B7 family

研究代表者

井上 直哉 (Inoue, Naoya)

大阪大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：80710269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、B7ファミリーと自己免疫性甲状腺疾患との間に関連性があるのかどうか明らかとするために、我々は自己免疫性甲状腺疾患患者および健常群において遺伝子多型をタイピングし、B7ファミリー発現を調べた。その結果、我々は、CD80 rs1599795A/TおよびCD86 rs2222631多型がそれぞれ橋本病の重症度およびバセドウ病の活動性に関与しており、一方CD86 rs2715267A/C多型は橋本病の疾患感受性に関係しており、末梢血中B細胞におけるCD80発現また末梢血単球におけるCD86発現が自己免疫性甲状腺疾患の重症度および疾患感受性にそれぞれ関与する、以上の内容を初めて明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで、副刺激分子であるB7ファミリーと自己免疫性甲状腺疾患との関係は、明らかではない部分が多かったが、本研究において遺伝子多型解析および免疫細胞における発現解析を行った結果、B7ファミリーと自己免疫性甲状腺疾患の病態との関係がより明らかとなった。本研究結果により、自己免疫性甲状腺疾患の病態解明につながり、さらに病態を鋭敏に反映する新規検査法の開発にもつながる結果であり、患者さんへの利益につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify whether any association between B7 family and Autoimmune thyroid disease exist associations, we genotyped polymorphisms and examined B7 family expressions in patients with Autoimmune thyroid disease and control subjects. We firstly reported that CD80 rs1599795 A/T and CD86 rs2222631 C/T were associated with HD severity and GD activity, respectively. CD86 rs2715267 A/C was also associated with the susceptibility of HD. In peripheral blood, CD80 on B cells and CD86 on monocytes were related to the severity and the susceptibility of Autoimmune thyroid disease, respectively.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：自己免疫性甲状腺疾患 遺伝子多型 B7ファミリー

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)現在の自己免疫性甲状腺疾患に対する検査法における問題点

自己免疫疾患の中でも自己免疫性甲状腺疾患は日本人の 1/10 が発症する頻度の高い疾患である。申請者は臨床検査技師として患者の検体を日々測定している中で甲状腺自己抗体、甲状腺ホルモンは疾患の診断において有用な検査項目であるが、自己免疫反応の進行度や活動度を表す指標としては不十分であるために治療開始や投薬量の変更が遅れ、最適な治療が困難である問題に直面した。生体内における自己免疫反応の進行度や活動度を鋭敏にとらえることは、現在の検査法のみでは困難であるため、新たな検査法の開発が必要である。したがって、申請者は自己免疫反応の進行度や活動度を鋭敏に反映する新しい検査法を開発することで、最適な治療を行うことが可能となり、自己免疫性甲状腺疾患患者の QOL の向上(重症化の予防、早期の寛解導入)が可能になると考えた。しかしながら、新たな検査法の開発には自己免疫性甲状腺疾患の病態解明が不可欠であるが、未だその病態は明らかとなっていない。このため、申請者は自己免疫性甲状腺疾患の病態解明を通して新たな検査法を開発することを目的とした。

申請者は、これまで Single Nucleotide Polymorphism(SNP)解析を中心とした自己免疫性甲状腺疾患の予後予測検査法を開発を目的として研究を行い、免疫調節因子の有用性を明らかとてきたが、病態解明という点では不十分であった。免疫反応には抗原提示細胞(APC)と T 細胞受容体(TCR)による主刺激と副刺激分子と呼ばれる分子による副刺激の 2 つの刺激が T 細胞に伝わるのが必須である。副刺激分子によるシグナルが存在しない場合、T 細胞は不応答(アナジー)状態となり免疫反応は起きない。したがって、副刺激分子の解析により自己免疫反応の進行度や活動度を鋭敏に反映する新たな検査法が開発が可能であると考えた。

### (2)副刺激分子と自己免疫疾患との関連

副刺激分子には多数の分子が存在しているが、その中でも B7 ファミリーが代表的である。副刺激分子は基本的には細胞上に発現するため、細胞間接触によりシグナルを伝達する(図 1(A))。一方、副刺激分子にはプロテアーゼによる切断およびスプライシングにより可溶性タンパクになる分子が存在することが知られている。可溶性タンパクとなった場合、サイトカインのように離れた T 細胞に対してもシグナルを伝達することが可能となることから、膜発現型よりも多くの細胞にシグナルを伝達することが可能と考えられている(図 1(B))。

特にプロテアーゼによる可溶性タンパク合成が促進した場合、膜結合型の発現が低下することが報告されている。

したがって、**膜結合型のみを発現解析では全く逆の結果になる可能性があり、膜結合型、可溶性型の双方を測定することが非常に重要である。**

B7 ファミリーシグナルには CD80、CD86、CD28 または CTLA-4、PD-1、PDL-1、ICOS、ICOSL、結合する T 細胞上の分子が詳細に判明していない B7-H3、B7-H4 がある。申請者は今までに CTLA-4 の遺伝的発現能が AITD の疾患感受性に関係することを報告し、さらに我々のグループでは ICOS、ICOSL

の遺伝的発現能は AITD に対して関連がないことを報告している。しかしながら、CD80、CD86 は B7 ファミリーの代表格であるにもかかわらず、AITD 患者における遺伝的、細胞学的解析は進んでいないのが現状であり、また近年発見された B7-H3、B7-H4 に関する解析はほぼなされていないのが現状である。そこで、申請者は自己免疫性甲状腺疾患の病態解明には副刺激分子の代表格である B7 ファミリータンパクとの関連を明らかにすることが重要であると考えた。

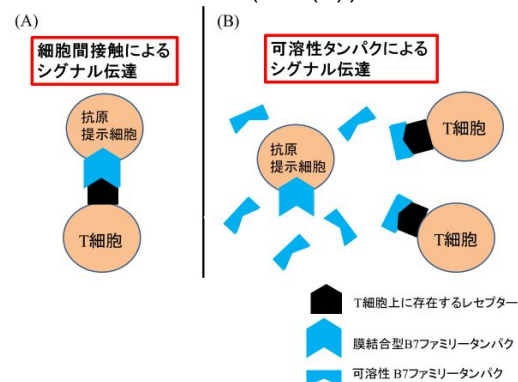


図 1 B7 ファミリータンパクのシグナル伝達

## 2. 研究の目的

自己免疫性甲状腺疾患は、日本人の 1/10 が罹患する疾患である。しかし、病態に及ぼす因子が十分に解明されていないため、自己免疫反応の進行度や活動度を鋭敏に反映する検査法が少なく、最適な治療が困難である。そこで申請者は、臨床検査技師として新たな検査法を開発することにより患者の Quality of Life(QOL)の向上につながると考えた。しかしながら、新たな検査法を開発するには自己免疫性甲状腺疾患の病態に及ぼす因子の解明が急務である。したがって、本研究では**遺伝学的・細胞学的解析法を使用することにより、副刺激分子である B7 ファミリータンパクと自己免疫性甲状腺疾患の病態との関連を解明し、新たな検査法の確立を目的とした。**

### 3. 研究の方法

#### (1) B7 ファミリータンパク遺伝子に存在する SNP 解析

自己免疫性甲状腺疾患患者における B7 ファミリータンパク遺伝子に存在する SNP を解析する。

#### (2) 末梢血単核球上の B7 ファミリータンパクの発現解析ならびに自己免疫性甲状腺疾患との関連

自己免疫性甲状腺疾患患者血液中の末梢血単核球をフローサイトメーターにより末梢血単核球、リンパ球、単球の B7 ファミリータンパクの発現を解析する。

#### (3) 血清中における可溶性 B7 ファミリータンパクの定量ならびに自己免疫性甲状腺疾患との関連

血清中に存在する可溶性 B7 ファミリータンパクを測定し、自己免疫性甲状腺疾患との関連を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) CD80 および CD86 と自己免疫性甲状腺疾患との関連

CD80 および CD86 は B7 ファミリーの代表的な分子であるにもかかわらず、自己免疫性甲状腺疾患との関連を調べた報告は少なく、その関連性は明らかではない。そこで、CD80 および CD86 遺伝子に存在する遺伝子多型をタイピングし、さらに末梢血単核球における CD80 および CD86 発現の解析も行った。その結果、以下のような知見を発見し、論文として公表した。

CD80 rs1599795 T carrier の頻度が、橋本病重症群において橋本病軽症群よりも増加していた ( $p=0.0290$ )。

CD86 rs2715267 AA genotype の頻度が橋本病患者において健常群よりも増加していた ( $p=0.020$ )。

CD19 陽性 B 細胞における CD80 陽性細胞の割合が高い (>8%) 人の割合が、橋本病、バセドウ病、バセドウ病難治群および橋本病重症群において、健常群よりも高く ( $p=0.0140$ ,  $p=0.0149$ ,  $p=0.0029$  および  $p=0.0018$ )、バセドウ病難治群における割合はバセドウ病寛解群より高かった ( $p=0.0176$ )。

バセドウ病および橋本病患者における CD86 の発現強度は、健常群よりも増加していた ( $p=0.0017$ ,  $p<0.0001$ )。

以上より、CD80 および CD86 遺伝子多型及び蛋白発現は、自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性および病態予後に関係していることを我々は、初めて明らかとした。

#### (2) B7-H3、B7-H4、B7-H5 および B7-H6 と自己免疫性甲状腺疾患との関連

CD80 および CD86 と同じ B7 ファミリーの分子には B7-H3、B7-H4、B7-H5 および B7-H6 が存在するが、これらの分子と自己免疫性甲状腺疾患との関連性は、CD80 および CD86 以上に明らかとなっていないのが現状である。

そこで本研究において、B7-H3、B7-H4、B7-H5 および B7-H6 も同様に自己免疫性甲状腺疾患との関連を調べる為、これらの遺伝子に存在する遺伝子多型のタイピング並びに末梢血単核球における蛋白発現解析を行った。一部の結果は既に学会にて発表しており、これらの分子が自己免疫性甲状腺疾患の病態に関係する可能性を我々は初めて明らかとした。現在、最終結果を論文として投稿すべく、作業を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Ayano, Inoue Naoya, Watanabe Mikio, Yamamoto Mayu, Ozaki Haruka, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 49
2. 論文標題 Increases of CD80 and CD86 Expression on Peripheral Blood Cells and their Gene Polymorphisms in Autoimmune Thyroid Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunological Investigations	6. 最初と最後の頁 191 ~ 203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08820139.2019.1688343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上直哉、渡邊幹夫、渡辺彩乃、山本麻由、日高洋、岩谷良則
2. 発表標題 CD80およびCD86遺伝子多型と自己免疫性甲状腺疾患との関連
3. 学会等名 第29回臨床化学会近畿支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北原希望、井上直哉、渡邊幹夫、日高洋、岩谷良則
2. 発表標題 自己免疫性甲状腺疾患の発症・病態予後とB7H5およびB7H6遺伝子多型との関連
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上直哉、渡邊幹夫、日高洋、岩谷良則
2. 発表標題 自己免疫性甲状腺疾患におけるCD80およびCD86の遺伝子多型および蛋白発現解析
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎悠、川口隼佳、渡邊幹夫、井上直哉、日高洋
2. 発表標題 自己免疫性甲状腺疾患の病態とB7H3、B7H4遺伝子多型との関連
3. 学会等名 第61回 日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎悠、渡邊幹夫、井上直哉、渡辺彩乃、日高洋、岩谷良則
2. 発表標題 自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性・病態予後とB7H4遺伝子多型との関連
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----