

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390150

研究課題名(和文) 免疫応答制御因子の遺伝子多型に基づく自己免疫疾患の発症予知診断法の開発

研究課題名(英文) Diagnostic methods to predict the development of autoimmune diseases by gene polymorphisms of immune regulatory factors

研究代表者

岩谷 良則 (Yoshinori, Iwatani)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60168581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫疾患である橋本病とバセドウ病を対象とし、免疫応答制御因子の遺伝子多型を解析した。その結果、50歳未満で甲状腺機能低下症を発症する重症の橋本病(重症群)には、ZFAT、MTRR、IL-10、TSHRの遺伝子多型が関連しており、抗甲状腺剤で5年以上治療してもTSG受容体抗体が陰性化しない寛解不能のバセドウ病(難治群)には、TBX21、HLX、IL-13、CD40、FCRL3、DNMT1、TSHRの遺伝子多型が関係していることを明らかにした。また血管形成能を有するEPOの遺伝子多型がバセドウ病の発症に関与することを明らかにし、これらが自己免疫疾患の発症予知診断法に利用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In order to develop the predictive diagnostic methods for the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases, we analyzed the single mononucleotide polymorphisms (SNPs) of immune regulatory factors in patients with Hashimoto's disease and with Graves' disease. We clarified the usefulness of ZFAT Ex9b-SNP10T/A, MTRR +66A/G, IL-10 -592A/C and TSHR rs179247A/G SNPs to predict the development of hypothyroidism under 50 years old in patients with Hashimoto's disease, and that of TBX21 -1514T/C, HLX -742C/G, IL-13 -1112C/T, CD40 -1C/T, FCRL3 -169C/T, DNMT1 +32204A/G and TSHR rs179247A/G SNPs to predict the intractability of Graves' disease against anti-thyroid drug therapy. Furthermore, we clarified the importance of an EPO -1125G/T SNP which determine the strength of angiogenic capability for the development of Graves' disease. These data indicate that the SNPs of immune regulatory factors are useful for the predictive diagnostic methods for autoimmune diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：免疫応答制御因子 遺伝子多型 自己免疫疾患 発症予知診断法 疾患感受性遺伝子 サイトカイン D
NAメチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の一塩基多型 (SNP) は、ヒトのゲノムに数百万個存在する究極の遺伝子多型である。数年以内に個人の遺伝子の全塩基配列の解読が 10 万円台の安い費用でしかも 15-30 分の短時間に実施可能になると予測されている (EMBO report 8:900, 2007)。従って、自己免疫疾患を初め、全ての疾患において、今後、臨床的に有用な SNP を明らかにすることは極めて重要である。

しかし現時点では、国内外を通じて、ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の探索が行われているが、オッズ比の低い結果 (<1.5) ばかり (J Hum Genet 55:195-206, 2010) で、これだけでは疾患の発症予知には極めて不十分である。その原因は、疾患の発症機序を考慮せずに疾患全体をまとめて解析している点にある。自己免疫疾患の発症に関しては、免疫学的自己寛容が破綻しやすい遺伝的素因 (自己免疫素因) と免疫応答が強いため重症化 (すなわち発症) しやすい遺伝的素因に分けて研究する必要があると考えられた。

そして事実、私たちは、自己免疫性甲状腺疾患の患者全体と健常人の間では有意差がないが、発症群と未発症群の間で大きな差のある遺伝子多型 (オッズ比 2.2-) を数多く見出してきた。しかし、未だに疾患の発症機序を考慮して SNP を解析している研究は見当たらない。

今回、免疫応答制御因子の遺伝子多型を解析することにより、自己免疫疾患の発症予知診断法の開発を行った。

2. 研究の目的

自己免疫疾患は自己抗体の存在によって潜在性の段階で診断できる。しかし将来発症するか否かは不明である。もし発症を予知することができれば、無駄な経過観察は省略でき、発症の予防や軽症化の研究も推進でき、極めて効率的かつ有効な医療を可能にする。

本研究では、自己免疫疾患の重症化 (発症) 規定因子の候補として、Th1 及び Th2 細胞のマスタ遺伝子などの免疫応答制御因子に着目し、発症予知に有用な遺伝子多型を見出し、有用な自己免疫疾患の発症予知診断法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

対象とする遺伝子及び MicroRNA に着目し、それらのプロモーター領域を中心に SNP を探索し、さらにその中で遺伝子の発現及び蛋白の産生に影響を及ぼす機能的な SNP を発見する。

自己免疫性甲状腺疾患を疾患対象とし、見出した SNP を、健常群、未発症群、発症群で解析・比較検討することにより、発症予知に有用な SNP を発見する。

1) 遺伝子多型 (SNP) の探索・解析

SNP のデータベース [東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター・科学技術振興事業団および SNP Consortium] を用いて、下記遺伝子のプロモーター領域を中心に探索し、その中から機能的 SNP の候補を見出す。既に SNP の特性が明らかなものについては、その情報を基に解析を進める。しかし現時点では、アリル頻度が不確かなものが多いため、健常人 100 人を対象にダイレクトシーケンシングによって SNP を探索する。患者群の SNP 解析は、TaqMan 法、RFLP 法、またはダイレクトシーケンシングで行う。臨床応用するには、SNP のマイナーアリルが 1-2 割以上存在することが望ましい。

2) SNP の機能解析

a. SNP が機能性であるか否かを、ルシフェラーゼアッセイで調べる。

b. SNP のある遺伝子の産生物が樹状細胞またはリンパ球の細胞膜蛋白質の場合には、フローサイトメトリーを用いて膜蛋白質の発現強度を調べて SNP の機能を解析する。

c. SNP のある遺伝子の産生物が培養甲状

腺上皮細胞の細胞膜蛋白質の場合は、蛍光顕微鏡を用いて膜蛋白質の発現強度を調べてSNPの機能を解析する。

3) 疾患軍での比較

a. 自己免疫性甲状腺疾患患者の中で、50歳までに甲状腺機能低下症を発症した橋本病の患者群と50歳以上でも甲状腺機能正常の潜在性の橋本病の患者群の間でSNPのアリルおよびゲノタイプの頻度を比較し、臨床的有用性の高い機能性SNPを発見する。

b. 上記SNPの比較を、抗甲状腺薬で寛解導入できたバセドウ病の患者群と5年以上治療しても寛解導入できない難治性のバセドウ病の患者群でも比較する。

4. 研究成果

免疫応答制御因子の遺伝子多型を解析することにより自己免疫疾患の発症予知診断法の開発を試みた。

1) Th1 及び Th2 細胞のマスター遺伝子 (TBX21, HLX, GATA-3) の多型

T-box (TBX21) と H2.0-like homeobox (HLX) は Th1 細胞の分科に関連する転写因子で、GATA-binding protein 3 (GATA-3) は Th2 細胞のマスター転写因子である。今回、TBX21-1514T/C (rs17250932)、-1993T/C (rs4794067) 多型、HLX -742C/G (rs2184658) 多型及び GATA3 -1420G/A (rs1269486) 多型を橋本病の重症群と軽症群、バセドウ病の難治群と寛解群、そして健常人で測定した。その結果、TBX21 -1514T/C (rs17250932)、-1993T/C (rs4794067) 多型の T アリルがバセドウ病の難治群で多く、TT ゲノタイプを持った人では HLX -742C/G (rs2184658) 多型の G アリルを持つ人が多かった。従って、TBX21 及び HLX の機能的な遺伝子多型がバセドウ病の難治度を関係しており、予後予測に利用できる可能性が示された。

2) Th2 サイトカイン (IL-5, IL-6, IL-13) の遺伝子多型

Th2 サイトカイン (IL-5, IL-6, IL-13) の遺伝子多型 (IL5 -746C/T, IL6 -572C/G, IL13 -1112C/T) を橋本病の重症群と軽症群、バセドウ病の難治群と寛解群及び健常人で測定した。その結果、バセドウ病及び橋本病におけるこれらの遺伝子多型のアリル及びゲノタイプ頻度は同様であったが、IL13 -1112C/T の T アリル、IL5 -746C/T 及び IL6 -572C/G の C キャリアの頻度がバセドウ病の寛解群で多かった。また IL6 -572C/G の G キャリアの頻度が橋本病の重症群で多かった。従って、Th2 サイトカインの遺伝子多型が自己免疫性甲状腺疾患の重症度や難治度に関係しており、予後予測に利用できる可能瀬が示された。

3) ゲノムワイド関連研究で同定された疾患感受性遺伝子の多型

CTLA-4, PTPN22, CD40, FCRL3, ZFAT がゲノムワイド関連研究で自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子として同定されたが、これらの遺伝子多型を、橋本病の重症群・軽症群、バセドウ病の難治群・寛解群で解析し、疾患の重症度・難治度との関連を調べた。その結果、CD40 -1C/T と FCRL3 -169C/T の遺伝子多型はバセドウ病の難治性と関連していること、ZFAT Ex9b-SNP10 T/A 多型は橋本病の重症度と関連しているが疾患感受性遺伝子ではないことが判明した。

4) DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MTHFR, MTRR 遺伝子多型

DNA のメチル化を制御する DNA methyltransferase 1 (DNMT1)、DNMT3A、DNMT3B と、DNA メチル化に必須の酵素である methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)、methionine synthase reductase (MTRR) の遺伝子多型と自己免疫性甲状腺疾患及びその重症度・難治度との関連を調べた。その結果、DNMT1 +32204A/G 多型が DNA の低メチル化とバセドウ病の難治度に関連すること、そして MTRR +66A/G 多型が橋本病の重症度と関連する可能性があることが判明した。

5) その他

CD24遺伝子の +2266C/T多型 (Ala57Val, rs8734) は、T細胞の維持に重要なCD24の発現が弱いCCゲノタイプがバセドウ病及び橋本病で少なかった。

IL-10遺伝子の -592A/C多型は、IL-10産生量の多いCCゲノタイプが橋本病の重症群で多かったが、血清IgG4濃度はCCゲノタイプでも橋本病の重症群でも高くはなかったため、甲状腺機能低下症になりやすい橋本病の重症群とIgG4甲状腺炎とは異なる病態であることが判明した。

EPO遺伝子の -1125G/T多型解析で、血管形成能を有するEPOの産生能が低いGGゲノタイプがバセドウ病にはいないことより、血管形成能がバセドウ病の発症に重要であることがわかった。

TSHR (TSH受容体) 遺伝子のrs179247A/G多型は、可溶性TSHRの発現が高いAAゲノタイプがバセドウ病の難治群で多く、低いGGゲノタイプが橋本病の重症群で多かった。

このように免疫応答制御に関連する多数の因子の遺伝子多型が自己免疫性甲状腺疾患の発症や重症度に関連することを明らかにすることができた。自己免疫疾患の発症予知診断法への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

Inoue, N., Watanabe, M., Nobuhara, T., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: The GG genotype of the 1125G/T polymorphism in the EPO gene protects against the development of Graves' disease. *Immunol Letters* 156:156-158, 2013. [doi: 10.1016/j.imlet.2013.10.006]

Inoue, N., Watanabe, M., Katsumata, Y., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: Different genotypes of a functional polymorphism of the TSHR gene are associated with the development and severity of Graves and

Hashimoto's diseases. *Tissue Antigen* 82:288-290, 2013 [doi: 10.1111/tan.12190]

Inoue, N., Watanabe, M., Wada, M., Morita, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: IL-10 -592A/C polymorphism is associated with severity of Hashimoto's disease. *Cytokine* 64:370-374, 2013. [doi: 10.1016/j.cyto.2013.05.014]

Matsumoto, C., Ito, M., Yamada, H., Yoshida, H., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Miyauchi, A., Takano, T.: Preparation of thyroid follicular cells for mRNA quantification after fluorescence-activated cell sorting. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 73, 245-252, 2013 [doi: 10.3109/00365513.2013.769624]

Inoue, N., Watanabe, M., Hayashi F., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: The association between a functional polymorphism in the CD24 gene and the development of autoimmune thyroid diseases. *Tissue Antigen*, 81(3), 161-3, 2013 [doi: 10.1111/tan.12070]

Hayakawa, K., Iwatani, Y.: An overview of multidisciplinary research resources at the Osaka University Center for Twin Research. *Twin Res Hum genet*, 2013 [doi: 10.1017/thg.2012.141]

Matsumoto, C., Ito, M., Yamada, H., Yamakawa, N., Yoshida, H., Date, A., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Miyauchi, A., Takano, T.: Genes that characterize T3-predominant Graves' thyroid tissues. *Eur J Endocrinol*, 168(2), 137-44, 2013 [doi: 10.1530/EJE-12-0507]

Nagase, S., Kohguchi, K., Tohyama, K., Watanabe, M., Iwatani, Y.: Interference by Pralidoxime (PAM) salts in clinical laboratory tests. *Clin Chim Acta*,

416:72-79, 2013 [doi:
10.1016/j.cca.2012.11.017]

Arakawa, Y., Watanabe, M., Inoue, N., Sarumaru, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: Association of polymorphisms in DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MTHFR, and MTRR genes with global DNA methylation levels and prognosis of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol*, 170(2):194-201, 2012 [doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04646.x]

Inoue, N., Watanabe, M., Yamada, H., Takemura, K., Hayashi, F., Yamakawa, N., Akahane, M., Shimizuishi, Y., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: Associations between autoimmune thyroid disease prognosis and functional polymorphisms of susceptibility genes, CTLA4, PTPN22, CD40, FCRL3, and ZFAT, previously revealed in Genome-wide association studies. *J Clin Immunol*, 32(6), 1243-52, 2012 [doi: 10.1007/s10875-012-9721-0]

Yamada, H., Takano, T., Kihara, M., Hirokawa, M., Yoshida, H., Watanabe, M., Iwatani, Y., Hidaka, Y., Miyauchi, A.: Measurement of TFF3 mRNA in aspirates from thyroid nodules using mesh filtration: The first clinical trial in 130 cases. *Endocrine J*, 59(7), 621-30, 2012 Apr 26 online. [doi:10.1507/endocrj.EJ12-0077]

Yamada, H., Yamakawa, N., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Takano, T.: Prolonged hybridization with a cRNA probe improves the signal to noise ratio for in-tube in situ hybridization for quantification of mRNA after fluorescence-activated cell sorting. *Biotech Histochem*, 87(5), 366-71, 2012 [doi:10.3109/10520295.2012.672650]

Morita, M., Watanabe, M., Inoue, N., Inaoka, C., Akamizu, T., Tatsumi, K.,

Hidaka, Y., Iwatani, Y.: Functional polymorphisms in TBX21 and HLX are associated with development and prognosis of Graves' disease. *Autoimmunity*, 45(2), 129-36, 2012 [doi:10.3109/08916934.2011.622013]

Hanada, H., Mugii, S., Takeoka, K., Maeda, I., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: Preparation of a cut-off solution that gives a clear index for distinguishing Le(a-b-) sera in CA19-9 assays using SphereLight 180 and Architect i2000 kits. *Clinica Chimica Acta*, 413(1-2), 278-281, 2012

Tomizawa, R., Watanabe, M., Inoue, N., Takemura, K., Hidaka, Y., Akamizu, T., Hayakawa, K., Iwatani, Y.: Association of functional GTR gene polymorphisms related to expression of GTR molecules with prognosis of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol*, 165(2), 141-147, 2011

Inoue, N., Watanabe, M., Morita, M., Tatsumi, K., Hidaka, Y., Akamizu, T., Iwatani, Y.: Association of functional polymorphisms in promoter regions of IL5, IL6, and IL13 genes with development and prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol*, 163(3), 318-323, 2011

Maruo, R., Yamada, H., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Takano, T.: mRNA quantification after fluorescence activated cell sorting using locked nucleic acid probes. *Mol Biotechnol*, 49(1), 42-47, 2011

Yamada, H., Takano, T., Matsuzuka, F., Watanabe, M., Miyauchi, A., Iwatani, Y.: Transcriptional activity of the 5'-flanking region of the thyroid transcription factor-1 gene in human

thyroid cell lines. Genet Mol Biol, 34(1),
6-10, 2011

Nishi, I., Sunada, A., Toyokawa, M.,
Asari, S., Iwatani, Y.: Evaluation of
amphotericin B and micafungin combination
against clinical isolates of Aspergillus
species. J Chemother, 23(2):102-6, 2011

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~previdiag/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩谷良則 (IWATANI Yoshinori)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60168581

(2) 研究分担者

日高 洋 (HIDAKA Yoh)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30243231

渡邊幹夫 (WATANABE Mikio)
研究者番号：50294088

(3) 連携研究者

()

研究者番号：