

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04111

研究課題名（和文）ゲノム・エピゲノム情報に基づく自己免疫疾患の発症・予後予測診断法の開発

研究課題名（英文）Development of the diagnostic methods to predict the development and the prognosis of autoimmune diseases based on the genome and epigenome informations

研究代表者

岩谷 良則（IWATANI, Yoshinori）

大阪大学・医学系研究科・名誉教授

研究者番号：60168581

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患の発症・予後診断法を開発するため、自己免疫性甲状腺疾患をモデルに、その発症を規定する遺伝因子として、甲状腺特異抗原（Tg, TPO）と制御性TおよびヘルパーT（Th）細胞を誘導する副刺激分子（CD58, CD80/86）の遺伝子多型、そして環境因子として、miR-146aとTNFA遺伝子多型のDNAメチル化を解明した。さらに、その予後を規定する遺伝因子として、1型Th（Th1）やTh17細胞を制御する因子（IL18, MIR27A, CRTH2, IL17F, IL15, TLR7/TLR9, AGO2など）の遺伝子多型、そして環境因子として、IFNG及びIL6遺伝子のDNAメチル化を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単純に疾患と健常人を比較するこれまでのゲノムワイド関連解析等で解明された自己免疫疾患の遺伝因子はオッズ比が低く、疾患の発症予測等には利用できない。そこで、疾患の病態分類を厳密かつ詳細に行って解析した結果、オッズ比の高い結果が得られた。さらに、疾患の発症には、遺伝因子以外に環境因子も関与しているため、環境因子の影響を受けて遺伝子の発現を変化させるエピジェネティック因子（micro RNA, DNAメチル化など）を解明することにした。そして、これらのエピジェネティック因子の解明により、有用な自己免疫疾患の発症・予後予測診断法の開発が可能になった。

研究成果の概要（英文）：In order to develop the predictive diagnostic method for the development and prognosis of autoimmune disease, we examined genetic and epigenetic factors in autoimmune thyroid disease (AITD). Then, we found that gene polymorphisms of thyroid-specific antigens (Tg and TPO) and costimulatory molecules which induce regulatory T cells (CD58) and helper T (Th) cells (CD80/CD86) were the genetic factors for the development of AITD, and that micro RNA (miR-146a), which suppresses NF- $\kappa$ B activity via TRAF6, and DNA methylation of TNFA gene polymorphisms were the environmental factors for the disease development. On the other hand, we found that gene polymorphisms of various factors which regulate Th1 and Th17 cells (IL18, MIR27A, CRTH2, IL17F, IL15, TLR7/TLR9, AGO2 and et al.) were the genetic factors for the prognosis (severity) of AITD, and that DNA methylations of IFNG and IL6 genes were the epigenetic factors for the disease prognosis.

研究分野：自己免疫性甲状腺疾患の病因・病態

キーワード：自己免疫疾患 甲状腺 病因・病態 発症予測 遺伝子多型 エピジェネティクス マイクロRNA DNAメチル化

## 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。まもなく個人の遺伝子の全塩基配列の解読が極めて安価で短時間に実施可能になるが、ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の探索ではオッズ比の低い結果( $<1.5$ )ばかりであった。しかし私達は、疾患の診断・病態分類を厳密に行い、自己免疫疾患の発症に関連する遺伝因子を、免疫学的自己寛容の破綻に関係する遺伝因子と疾病の進行(予後)に関連する遺伝因子に分けて研究することによって、潜在性の病態も含む自己免疫性甲状腺疾患の患者全体と健常人の間では差が小さいが、発症群と発症しない群の間で大きな差のある遺伝子多型(オッズ比 $2.2\sim$ )を数多く見出してきた。

近年、自己免疫疾患の発症・予後に関連する因子として、今までは遺伝子(HLA、副刺激分子、サイトカインなどの免疫制御因子と標的臓器特異分子の遺伝子)が解析されてきたが、遺伝子の発現制御に重要な役割を担う Noncoding RNA やエピジェネティクスに関する研究は未だほとんどない。

そこで今回、私達は、遺伝子以外の発症・予後規定因子として、遺伝子の発現を制御している Noncoding RNA と DNA メチル化やヒストン修飾により遺伝子の発現を制御するエピジェネティクスに着目し、新たな遺伝子の解明とともに、既に自己免疫疾患との関連を明らかにした免疫制御因子や甲状腺特異分子等の遺伝子の発現を制御する Noncoding RNA の遺伝子多型やエピジェネティックな変化を分析する。そして、自己免疫疾患の発症・予後を規定している遺伝因子と環境因子の影響を総合的に解析することにより、より確実な発症・予後診断法を開発するという今回の着想に至った。

## 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。発症を予知できれば、発症しない人の無駄な経過観察は省略でき、発症の予防や軽症化の研究を推進でき、極めて効率的かつ有効な医療を可能にする。私達は既に多くの有用な発症・予後規定遺伝子の多型を発見してきたが、本研究では、新たな遺伝子の解明とともに、遺伝子以外の発症・予後規定因子として、遺伝子の発現制御に重要な働きをしている Noncoding RNA とエピジェネティクスに着目した。特に私達が見出した自己免疫疾患の発症・予後規定遺伝子において、それらを制御する Noncoding RNA と DNA メチル化およびヒストン修飾を解析し、発症予知に有用な Noncoding RNA の遺伝子多型やエピジェネティックな変化を見出し、より確実な自己免疫疾患の発症・予後診断法の開発と病因・病態の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

新たな自己免疫性甲状腺疾患(AITD)の発症・予後を規定している遺伝因子(遺伝子多型)とともに、私達が既に明らかにした AITD の発症・予後規定遺伝子の発現を制御している Noncoding RNA (ncRNA) [特に血清中のエクソゾームに含まれている microRNA (miRNA)] や発症・予後規定遺伝子の発現を制御しているエピジェネティックな変化(DNA メチル化やヒストン修飾)を解析する。そして、それらを AITD の発症群・非発症群等の病態間で比較検討することにより、発症・予後診断に有用な miRNA の SNP やエピジェネティックな変化を発見する。

解析する SNP は、NCBI 等のデータベースと、私達が既に病態別に 8 検体ずつマイクロアレイでタイプ化した約 50 万の SNP データを基に決定し、成功率を高める。そして有用な SNP やエピジェネティックな変化を組み合わせて、より確実な自己免疫疾患の発症予知診断法の開発を目指す。

## 4. 研究成果

### (1) AITD 発症規定遺伝因子

a. AITD の標的抗原である甲状腺グロブリン(Tg)と甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)の遺伝子発現が高

- いTG rs2703013 G carrier (GG + GT)及びTPO rs2071400 T carriers (CT + TT)Carriers とTPO rs2071403 T carriers (CT + TT)の頻度がAITDで高かった。
- b . CD58 と CD52 の結合が制御性 T (Treg) 細胞を刺激して免疫応答を抑制する CD58 遺伝子多型の CD58 発現が低くなる genotype の頻度がAITDで高かった。
  - c . CD80/CD86 と CD28 の結合がヘルパーT (Th)細胞を刺激し免疫応答を活性化する CD80/CD86 遺伝子多型の CD80/CD86 発現の高くなる genotype の頻度が橋本病(HD)で高かった。
  - d . TNF の産生能が高いTNFA -1031C carrier (CT + CC)の頻度がAITDで高かった。
- ( 2 ) AITD 予後 ( 重症度 ) 規定遺伝因子
- a . IL-2 存在下で IFN- $\gamma$  産生を誘導して細胞傷害性 T (Tc)細胞を活性化する IL-18 の産生能が高い IL18 -607CC genotype/C allele の頻度がHDの重症群の方が軽症群よりも、またバセドウ病 (GD) の寛解群の方が難治群よりも高かった。
  - d . IL-10 の産生を制御する MIR27A 遺伝子の多型の genotype/allele の頻度がHDの重症度と関連していた。
  - g . Th2 走化性関連遺伝子 (CRTH2、IL-25、TARC/CCL17、STAT6) では、CRTH2 がHDの重症度と、TARC/CCL17 の遺伝子多型がGDの難治性と関連していた。
  - h . Th17 関連遺伝子 (IL1Ra、IL6R、IL17R、IL21R、IL23R、CCR6、SOCS3、RORC、IL17A、IL17F、IL21) では、IL17F の遺伝子多型がHDの重症度と関連し、IL21、SOCS3、CCR6 の遺伝子多型がGDの難治性と関連していた。
  - b . Th17 細胞を誘導する IL-15 の産生能が高い IL-15 産生能が高い IL15 遺伝子多型の genotype/allele の頻度がHDの重症群の方が軽症群よりも高かった。
  - c . 白血球の TLR7/TLR9 比が高くなるような TLR 7 及び TLR 9 遺伝子多型の genotype/allele の頻度がGDの難治群で寛解群よりも高かった。
  - e . miRNA の合成に関わる Argonaute (AGO) 1 及び 2 遺伝子の発現と Th17 細胞比率に相関があり、その発現が高くなる遺伝子多型の genotype/allele の頻度が難治性のGDで高かった。
  - f . 1 型及び 2 型のヨードサイロニン脱ヨウ素酵素 (D1 及び D2) の遺伝子多型では、D2 活性が高くなる genotype の頻度が重症のHDで低かった。
  - i . 血管内皮増殖因子 (VEGF) と VEGF 受容体 (VEGFR) の結合は血管増生を促すが、VEGF 遺伝子多型の低活性型が重症HDに多く、VEGFR 遺伝子多型の高活性型が難治性のバセドウ病 (GD) と甲状腺腫の大きい患者に多かった。
- ( 3 ) AITD 発症規定環境因子
- a . miR-146a はAITDで発現が増加していた。
  - b . TNF の産生能が高いTNFA - 1031C carrier (CT + CC)を持つ人では、TNFA 遺伝子の-72 CpG 部位のメチル化率が橋本病 (HD) よりバセドウ病(GD)で高かった。
- ( 4 ) AITD 予後 ( 重症度 ) 規定環境因子
- a . IFN  $\gamma$  遺伝子のDNAメチル化率は、難治性のGDで高く、年齢と逆相関した。
  - b . IL6 遺伝子のDNAメチル化率は、難治性のGDで低く、年齢と逆相関した。
- 以上より、自己免疫疾患の発症と予後 ( 重症度 ) を規定している主要な遺伝因子と環境因子を解明することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19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 Inoue Naoya, Katsumata Yuka, Watanabe Mikio, Ishido Naoko, Manabe Yu, Watanabe Ayano, Masutani Ryota, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 50
2. 論文標題 Polymorphisms and expression of toll-like receptors in autoimmune thyroid diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 182～191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08916934.2016.1261835	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 -
1. 著者名 Arakawa Y., Watanabe M., Takemura K., Inoue N., Hidaka Y., Iwatani Y.	4. 巻 44
2. 論文標題 The IL15+96522 A>T functional polymorphism is related to the differentiation of Th17 cells and the severity of Hashimoto's disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Immunogenetics	6. 最初と最後の頁 41～50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iji.12305	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 -
1. 著者名 Otsu Hiroshi, Watanabe Mikio, Inoue Naoya, Masutani Ryota, Iwatani Yoshinori	4. 巻 55
2. 論文標題 Intraindividual variation of microRNA expression levels in plasma and peripheral blood mononuclear cells and the associations of these levels with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)	6. 最初と最後の頁 626-635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/ccIm-2016-0449	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 -
1. 著者名 Inoue Naoya, Watanabe Mikio, Nakaguchi Azusa, Ueda Daishi, Kawaguti Hayaka, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 64
2. 論文標題 Functional polymorphisms affecting Th1 differentiation are associated with the severity of autoimmune thyroid diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 695～703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ16-0551	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 -

1. 著者名 Mizuma Tomoyo, Watanabe Mikio, Inoue Naoya, Arakawa Yuya, Tomari Saki, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 50
2. 論文標題 Association of the polymorphisms in the gene encoding thyroglobulin with the development and prognosis of autoimmune thyroid disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 386 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08916934.2017.1344971	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 -

1. 著者名 Takuse Yukina, Watanabe Mikio, Inoue Naoya, Ozaki Ritsuko, Ohtsu Hiroshi, Saeki Minoru, Katsumata Yuka, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 46
2. 論文標題 Association of IL-10-Regulating MicroRNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells with the Pathogenesis of Autoimmune Thyroid Disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunological Investigations	6. 最初と最後の頁 590 ~ 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08820139.2017.1322975	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 -

1. 著者名 Tomari Saki, Watanabe Mikio, Inoue Naoya, Mizuma Tomoyo, Yamanaka Chika, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 64
2. 論文標題 The polymorphisms in the thyroid peroxidase gene were associated with the development of autoimmune thyroid disease and the serum levels of anti-thyroid peroxidase antibody	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1025 ~ 1032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ17-0191	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 -

1. 著者名 Watanabe Mikio, Takenaka Yoichi, Honda Chika, Osaka Twin Research Group, Iwatani Yoshinori	4. 巻 28
2. 論文標題 Genotype-Based Epigenetic Differences in Monozygotic Twins Discordant for Positive Antithyroglobulin Autoantibodies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 110 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2017.0273	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 -

1. 著者名 Araki Toshihiko, Onishi Mai, Yanagisawa Takufumi, Hirata Masayuki, Watanabe Yoshiyuki, Ogata Soshiro, Hayakawa Kazuo, Honda Chika, Watanabe Mikio, Iwatani Yoshinori, Yorifuji Shiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Frequency-specific genetic influence on inferior parietal lobule activation commonly observed during action observation and execution	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Report	6. 最初と最後の頁 17660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-17662-x	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 -

1. 著者名 Tokiyoshi Ena, Watanabe Mikio, Inoue Naoya, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 51
2. 論文標題 Polymorphisms and expression of genes encoding Argonautes 1 and 2 in autoimmune thyroid diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 35 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08916934.2017.1416468	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 -

1. 著者名 Morita Emi, Watanabe Mikio, Inoue Naoya, Hashimoto Hidemi, Haga Emi, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 51
2. 論文標題 Methylation levels of the TNFA gene are different between Graves' and Hashimoto's diseases and influenced by the TNFA polymorphism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 118-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08916934.2018.1448078	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 -

1. 著者名 Inoue N, Watanabe M, Katsumata Y, Ishido N, Hidaka Y, Iwatani Y.	4. 巻 47(5)
2. 論文標題 Functional Polymorphisms of the Type 1 and Type 2 Iodothyronine Deiodinase Genes in Autoimmune Thyroid Diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunol Invest	6. 最初と最後の頁 534-542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08820139.2018.1458861	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 -

1. 著者名 Omori N, Watanabe M, Inoue N, Taniguchi J, Hidaka Y, Iwatani Y.	4. 巻 65(8)
2. 論文標題 Association of the polymorphisms in Th2 chemotaxis-related genes with the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocr J	6. 最初と最後の頁 815-826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ18-0050	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 -

1. 著者名 Kunisato T, Watanabe M, Inoue N, Okada A, Nanba T, Kobayashi W, Inoue Y, Katsumata Y, Omori N, Nobuhara T, Takemura K, Hidaka Y, Iwatani Y.	4. 巻 51(7)
2. 論文標題 Polymorphisms in Th17-related genes and the pathogenesis of autoimmune thyroid disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 360-369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08916934.2018.1534963	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 -

1. 著者名 Hashimoto H, Watanabe M, Inoue N, Hirai N, Haga E, Kinoshita R, Hidaka Y, Iwatani Y.	4. 巻 123
2. 論文標題 Association of IFNG gene methylation in peripheral blood cells with the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytokine	6. 最初と最後の頁 154770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cyto.2019.154770	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 -

1. 著者名 Hirai N, Watanabe M, Inoue N, Kinoshita R, Ohtani H, Hidaka Y, Iwatani Y.	4. 巻 52(7-8)
2. 論文標題 Association of IL6 gene methylation in peripheral blood cells with the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 251-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08916934.2019.166956	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 -

1. 著者名 Yamamoto M, Watanabe M, Inoue N, Watanabe A, Ozaki H, Ohsaki M, Hidaka Y, Iwatani Y.	4. 巻 49(1-2)
2. 論文標題 Association of CD58 Polymorphisms and its Protein Expression with the Development and Prognosis of Autoimmune Thyroid Diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunol Invest	6. 最初と最後の頁 106-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08820139.2019.1659811	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 -

1. 著者名 Watanabe A, Inoue N, Watanabe M, Yamamoto M, Ozaki H, Hidaka Y, Iwatani Y.	4. 巻 49(1-2)
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 2020年
3. 雑誌名 Immunol Invest	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 -

1. 著者名 Okamoto M, Watanabe M, Inoue N, Ogawa K, Hidaka Y, Iwatani Y.	4. 巻 67(5)
2. 論文標題 Gene polymorphisms of VEGF and VEGFR2 are associated with the severity of Hashimoto's disease and the intractability of Graves' disease, respectively.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocr J	6. 最初と最後の頁 545-559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ19-0480	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕



〔その他〕

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻生体情報科学講座 予防診断学研究室  
<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~prevdiag/>

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
研究分担者	日高 洋  (HIDAKA Yoh)  (30243231)	大阪大学・医学系研究科・准教授   (14401)	
研究分担者	渡邊 幹夫  (WATANABE Mikio)  (50294088)	大阪大学・医学系研究科・教授   (14401)	