

令和元年6月17日現在

機関番号：34438

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19207

研究課題名(和文) DNMT1とTreg/Th17関連遺伝子の解析-新規バセドウ病病態鑑別法の確立-

研究課題名(英文) Association analysis of DNMT1 and Treg / Th17 related genes in Graves' disease

研究代表者

荒川 裕也 (Arakawa, Yuya)

関西医療大学・保健医療学部・助教

研究者番号：30733175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル化によるAITD病態関連遺伝子の候補として複数の遺伝子を同定した。GDにおいて、TG rs2703013 Tアレルが難治群に比べ寛解群で増加し、TT型でTgAb価が低下していた。またDISER mRNA発現が難治群に比べ寛解群で低値であった。HDにおいて、DROSHA mRNAは、軽症群に比べ難治群で高かった。また、IL15 +96522 AA型及びAアレルが軽症群に比べ、重症群で高く、Th17細胞増加との関連が示唆された。結論として、GDの病態にはTG及びDISER、HDの病態にはDROSHAが関連している可能性がある。これらの遺伝子のメチル化との関連については現在解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、バセドウ病の治療における奏功性に関連する遺伝子や橋本病の甲状腺機能低下症発症に関連する遺伝子が明らかとなった。この発見は、新たなAITD病態の解明や予防診断検査の開発に貢献できると考えられる。さらに現在進行中であるこれらの遺伝子におけるメチル化との関連が明らかになれば、DNMT1制御による新たなバセドウ病治療法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Several genes were identified as candidates for AITD disease related gene by DNA methylation. In GD, the TG rs2703013 T allele was increased in the remission group compared to the intractable group, and the TgAb value was decreased in the TT type. In HD, the DROSHA mRNA was decreased in the severe group compared to the mild group. In addition, IL15 +96522 AA type and A allele are increased in the severe group compared to the mild group. In conclusion, TG and DISER may be related to the pathological condition of GD and DROSHA may be related to the pathological condition of HD. The association with the methylation of these genes is currently under analysis.

研究分野：遺伝子

キーワード：自己免疫甲状腺疾患 SNP IL15 サイログロブリン DISER バセドウ病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### [1] GD における検査の現状

GD は日本人の 200~400 人に一人が発症する頻度の高い疾患である。その中には、抗甲状腺剤により寛解し投薬無しで甲状腺機能が正常である寛解群と、抗甲状腺剤により甲状腺機能正常であるが投薬を中止すると再び甲状腺機能亢進となる難治群の病態が存在する。現在の GD 検査は、病態を予測する指標となるバイオマーカーが存在しないため、最適な治療が困難である。

### [2] GD の病態識別に関する研究の現状

我々は、Single Nucleotide Polymorphism(SNP) 解析により、様々な遺伝子がバセドウ病の病態に関連していることを報告しているが、その中でも T 細胞サブセット分化に関連する遺伝子が多くみられる。Th17 細胞分化を促進させるサイトカインの遺伝子である IL1B、TGFB における SNP の高産性型が GD 難治群に多く<sup>1,2</sup>、制御性 T (Treg) 細胞のマスター制御転写因子遺伝子である FOXP3 における SNP の低産性型が GD 難治群で増加していたこと<sup>3</sup>から GD 難治は、Th17 細胞の促進及び Treg 細胞の抑制によって引き起こされると考えられる。

### [3] GD の病態識別における DNA メチル化の関連

先行研究により、DNA のメチル化酵素遺伝子である DNMT1 における SNP が GD の病態を反映することを報告しており、GD 難治群において低メチル化型が増加していた。しかし、GD 病態間において全ゲノムメチル化率は変化していなかった<sup>4</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究は GD の治療効果に関連する Treg/Th17 バランス関連遺伝子を中心とした DNA メチル化が DNMT1 によって制御されていることを明らかにすることを目的としている。本研究の成果は、GD 病態の解明につながるだけでなく予後予測法及び新規治療法の開発に役立つと考えられる。

## 3. 研究の方法

我々はバセドウ病患者を 5 年以上の薬物治療で寛解しない難治群と寛解後 2 年間無投薬でも再発しない寛解群に分類することで病態の解析を行った。本研究の主な目的はバセドウ病の病態に注目したメチル化の影響を解析することであるが、橋本病における重症度もまたメチル化との関連があると考えられるため、橋本病に関しても解析を行った。橋本病は甲状腺抗体陽性者の中で甲状腺機能低下症を 50 歳以上で発症しないものを軽症群、50 歳以下で発症したものを重症群とした。

実験方法は、まず末梢血から CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し DNA 抽出を行う。その後、Treg/Th17 バランス異常に関わると考えられる *FoxP3* 遺伝子においてパイロシーケンスによるメチル化解析を行い、DNMT1 SNP との比較を行う。また、mRNA 発現をリアルタイム PCR で測定し、メチル化率との相関分析を行う。また、本研究では SNP 解析により GD 病態に関わる他の遺伝子の探索も同時に行う。GD 病態との関連が発見された遺伝子に関してメチル化との関連も検討する。

## 4. 研究成果

本研究における DNA メチル化測定は現在、進行中であるため SNP 解析による結果を報告する。

### *DICER, DROSHA*

マイクロ RNA の形成に必要な酵素の遺伝子である *DICER* 及び *DROSHA* における遺伝子多型をタイプングし、AITD の病態間において比較した。*DICER* rs1057035 TT 型が健常人よりもバセドウ病で頻度が多く、*DROSHA* rs644236 CC 型が橋本病患者に比べバセドウ病患者で頻度が多いことを明らかにした。また、mRNA 発現について、*DICER* は健常人に比べ AITD 患者で低く、バセドウ病難治群より寛解群で低かった。*DROSHA* は、健常人比べ AITD 患者で低く、橋本病軽症群に比べ難治群で高かった。

前炎症性サイトカインとして知られる IL-15 の遺伝子には機能的な SNP である,+96522 A>T 及び+82889 A>G が存在する。自己免疫性甲状腺疾患の病態別でこれらの SNP をタイピングした所,+96522 AA 型及び A アレルが橋本病軽症群に比べ,重症群で出現頻度が高いことを明らかにした。また,+96522 AA 型は,AT 型及び TT 型と比べ,血清中 IL-15 レベルが高いことを明らかにした。また,リコンビナント IL-15 を加えて末梢血単核球を培養した所,Th17 細胞の増加及び Treg 細胞の維持を認めた。

#### TG

甲状腺ホルモンの形成に必要なサイログロブリン (TG) の遺伝子における遺伝子多型と AITD の病態との関連を解析した。rs180195 GG 型が橋本病患者で多く,mRNA レベルが AG+AA 型に比べ有意に増加していた。rs2703013 TT 型が AITD 患者で少なく,血清中 TG 量が有意に減少していた。また,T アレルがバセドウ病 (GD) 寛解群に比べ難治群で増加しており,GD 病患者において TT 型保持者はサイログロブリン抗体 (TgAb) 価が有意に低値であった。 rs2076740 TC+TT 型は橋本病患者において TgAb 価が有意に高値であった。

#### 〔引用文献〕

1, F. Hayashi, M. Watanabe, T. Nanba, N. Inoue, T. Akamizu and Y. Iwatani, Association of the -31C/T functional polymorphism in the interleukin-1b gene with the intractability of Graves' disease and the proportion of T helper type 17 cells, Clinical and Experimental Immunology, 158: 281-286, 2009

2, H. Yamada, M. Watanabe, T. Nanba, T. Akamizu and Y. Iwatani, The +869T/C polymorphism in the transforming growth factor-b1 gene is associated with the severity and intractability of autoimmune thyroid disease, Clinical and Experimental Immunology, 151: 379-382, 2008

3, Aiko Nakano, Mikio Watanabe, Takao Iida, Shoko Kuroda, Fumio Matsuzuka, Akira Miyauchi, and Yoshinori Iwatani, Apoptosis-induced Decrease of Intrathyroidal CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Autoimmune Thyroid Diseases, THYROID, 17(1),25-31, 2007

4, Y. Arakawa, M. Watanabe, N. Inoue, M. Sarumaru, Y. Hidaka and Y. Iwatani, Association of polymorphisms in DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MTHFR and MTRR genes with global DNA methylation levels and prognosis of autoimmune thyroid disease, Clinical and Experimental Immunology, 170: 194-201, 2012

#### 5 . 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

1, Mizuma T, Watanabe M, Inoue N, Arakawa Y, Tomari S, Hidaka Y, Iwatani Y., Association of the polymorphisms in the gene encoding thyroglobulin with the development and prognosis of autoimmune thyroid disease., Autoimmunity, 50(6):386-392, 2016(査読有)

2, Y. Arakawa, M. Watanabe, K. Takemura, N. Inoue, Y. Hidaka & Y. Iwatani., The IL15 +96522 A>T functional polymorphism is related to the differentiation of Th17 cells and the severity of Hashimoto's disease., Int J Immunogenet.44(2):41-50, 2016(査読有)

3, Saeki M, Watanabe M, Inoue N, Tokiyoshi E, Takuse Y, Arakawa Y, Hidaka Y, Iwatani Y., DICER and DROSHA gene expression and polymorphisms in autoimmune thyroid diseases., Autoimmunity. 49(8):514-522, 2016(査読有)

##### 〔学会発表〕(計 2 件)

1, The functional SNP and expression of IL15 gene are associated with the development of autoimmune thyroid disease., Y. Arakawa, M. Watanabe, K. Takemura, N. Inoue, Y. Hidaka

& Y. Iwatani, 69th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo, San Diego, Aug, 2019

2, 橋本病の重症度に及ぼす、Th17 細胞の増殖を介した IL-15 の影響, 荒川 裕也、渡邊 幹夫、武村 和哉、井上 直哉、岩谷 良則, 第 56 回日本臨床化学会 熊本, Dec, 2016

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

研究代表者 荒川裕也〔ARAKAWA Yuya〕

関西医療大学 保健医療学部 臨床検査学科 助教

研究者番号 30733175

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：岩谷 良則

ローマ字氏名：IWATANI Yoshinori

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 教授

研究協力者氏名：渡邊 幹夫

ローマ字氏名：WATANABE Mikio

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 准教授

研究協力者氏名：日高 洋

ローマ字氏名：HIDAKA yoh

大阪大学医学部附属病院 検査部

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。