

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08982

研究課題名(和文) 高感度甲状腺刺激抗体測定法を用いたバセドウ病の病態解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of Graves' disease using highly sensitive thyroid stimulating antibody assay

研究代表者

日高 洋 (HIDAKA, YOH)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30243231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：バセドウ病患者の血液中に存在する甲状腺を刺激する自己抗体(TSAb)がバセドウ病の病因である。バセドウ病の新たな治療法を直ちに人で試すことは難しいため、体外で検討する方法が必要となる。そこで、バセドウ病患者の血液中のリンパ球を培養し、培養液中でTSAbを検出できるかを高感度の測定法で調べた。TSAbの指標となるサイクリックAMPの増加を培養液中で確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは、バセドウ病患者の血液中のリンパ球を培養しても培養液中に甲状腺を刺激する自己抗体(TSAb)を検出できなかったため、バセドウ病の新たな治療薬の候補を体外で検討することはできなかった。今回の研究で、十分ではないもののTSAbの指標となるサイクリックAMPの増加を培養液中で確認できたため、将来、体外の検討でTSAbの産生を抑制できた治療薬のみを人で投与することができるようになると期待される。

研究成果の概要(英文)：Autoantibodies (TSAbs) that stimulate the thyroid present in the blood of Graves' disease patients are responsible for the Graves' disease. Since it is difficult for humans to immediately try a new treatment for Graves' disease, it is necessary to examine it in vitro. Therefore, lymphocytes in the blood of patients with Graves' disease were cultured, and it was examined whether or not TSAb could be detected in the culture medium by a highly sensitive measurement method. An increase in cyclic AMP, which is an index of TSAb, could be confirmed in the culture medium.

研究分野：甲状腺

キーワード：バセドウ病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バセドウ病は TSH レセプターに対する抗体が血中で陽性であることより診断される。測定法は、TSH レセプターへの結合能として検出する抗 TSH レセプター抗体 (TRAb; TSH Receptor Antibody) と、甲状腺への刺激活性 (cAMP 産生能) として検出する甲状腺刺激抗体 (TSAb; Thyroid Stimulating Antibody) の 2 つがある。未治療バセドウ病の診断における、感度・特異度とも TRAb が TSAb より優れていたが、2013 年に高感度の TSAb 測定法 (ヤマサ) が開発された。この高感度法で測定した TSAb は未治療バセドウ病 98% で陽性で、TRAb の 91% より優れた検査であると報告された。この高感度の TSAb 測定法は *in vitro* での実験系の確立にも有用であると考え、今回の研究を計画した。

バセドウ病の治療は 50 年以上前に開発されたメチマゾールとプロピルチオウラシルで現在も行われているが、無顆粒球症や重篤な肝障害といった副作用での死亡例が報告されており、より安全な治療薬の開発が望まれている。治療薬の候補をピックアップするのに、上記実験系が利用できるものと考えた。

私はスギ花粉症が誘因となり、バセドウ病が発症したり増悪したりすることを報告した。スギ花粉症などの I 型アレルギーでは IL-4、IL-5 などを分泌する Th2 が活性化して IgE 産生や好酸球の活性化がおこることが知られている。これらのサイトカインは IgG 産生も誘導するため、スギ花粉症でおこる Th2 の活性化により、バセドウの病因 IgG 抗体である TSH レセプターに対する抗体の産生も誘導され、バセドウ病が発症・増悪するのではないかと推定している。これを証明するためには、スギ花粉症を合併したバセドウ病患者の末梢血リンパ球をスギ花粉で刺激することで TSH レセプターに対する抗体の産生が見られることを確認する必要がある。上記実験系を使用すればこれも証明できるものと考えた。

2. 研究の目的

バセドウ病の末梢血リンパ球から分泌される TSH レセプターに対する抗体を、高感度の TSAb 測定法を用いて、*in vitro* で検出できることを明らかにする。上記実験系を用い、抗体産生抑制作用のある抗 CD20 モノクローナル抗体などを用い、TSAb の産生を抑制できることを明らかにする。スギ花粉症を合併したバセドウ病患者の末梢血リンパ球をスギ花粉で刺激することによる TSAb の産生を明らかにする。

3. 研究の方法

バセドウ病患者の末梢血単核球 (PBMC) を Lymphoprep Tube で回収し、培養液 (10% FBS を加えた RPMI1640 液) で 2×10^6 cells/ml に調整し、6 日間培養する。培養上清中に産生された TSH レセプターに対する抗体を高感度の TSAb 測定法 (ヤマサ) で測定する。上記の検討で TSAb 産生がみられたバセドウ病患者の末梢血単核球 (PBMC) を、抗 CD20 モノクローナル抗体 (リツキシマブ) などを加えて 6 日間培養し、培養上清中に産生された TSAb が、加えない場合に比べ抑制されているかを検討する。スギ花粉症を合併したバセドウ病患者の PBMC を、スギ花粉抗原エキスと共に 6 日間培養し、上清中の TSAb を調べる。

4. 研究成果

無刺激の状態ではバセドウ病患者の PBMC を培養し、培養上清中の TSAb の指標となる cAMP 濃度を測定した。薬物の影響やスギ花粉の影響を調べるには、cAMP 産生量は十分ではないと判断した。

B 細胞を刺激する因子で抗体産生を促す必要があると判断し、バセドウ病患者の PBMC を Human B Cell Expansion Kit と共に培養し、培養上清中の cAMP 産生量が増加するかを検討した。残念ながら培養上清中の cAMP 濃度は刺激により有意な増加を示さなかった (図 1)。

そこで他の TSAb 産生を促す刺激が必要と判断し、バセドウ病患者の PBMC を TSH-R (TSH レセプター) とともに培養したところ、TSH-R なしで培養した場合に比べ、培養上清中の cAMP 産生量が増加したことより、TSH-R による刺激が有効であることが明らかになった (図 2)。しかし、薬物の影響やスギ花粉の影響を調べるには、十分な反応とはいえないと判断した。したがって、さらに高感度の TSAb 測定法で検討する必要があると考える。

図 1

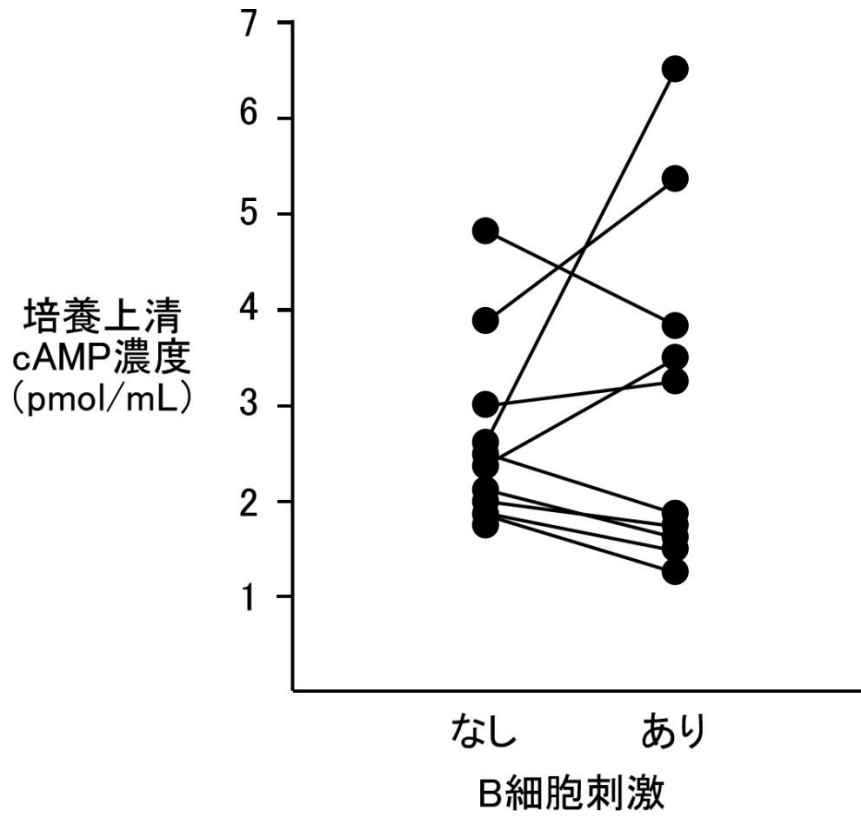
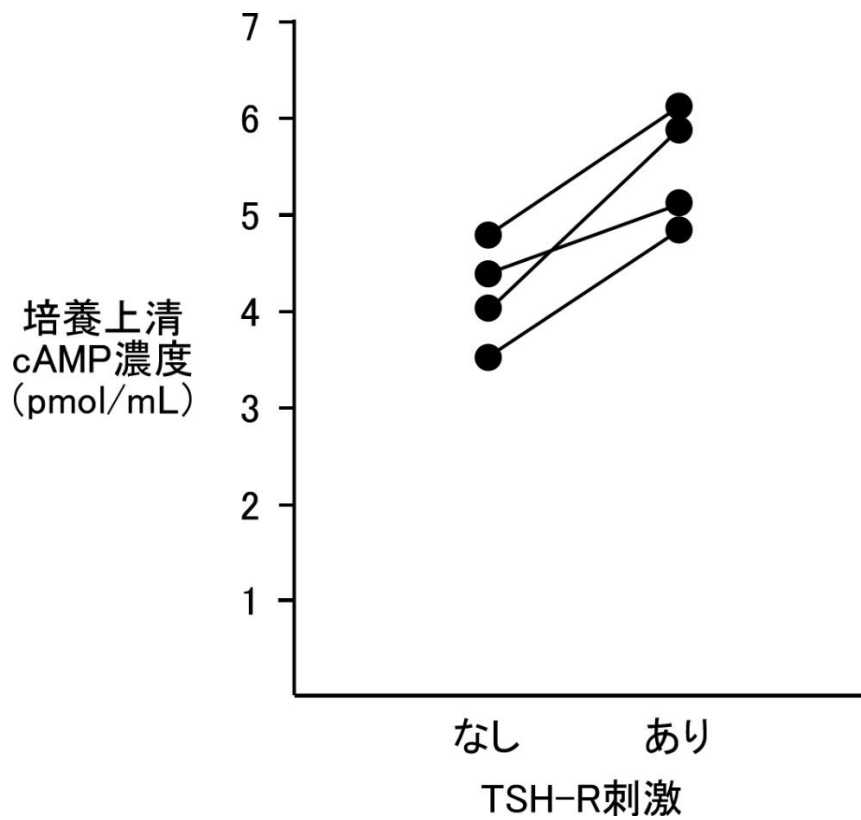


図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Omori N, Watanabe M, Inoue N, Taniguchi J, Hidaka Y, Iwatani Y	4. 巻 65
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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
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 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 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 2018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 Inoue, N., Watanabe, M., Katsumata, Y., Ishido, N., Hidaka, Y., Iwatani, Y.	4. 巻 47
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 Immunological Investigation	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 Yamamoto Mayu, Watanabe Mikio, Inoue Naoya, Watanabe Ayano, Ozaki Haruka, Ohsaki Mizuki, Hidaka Yoh, Iwatani Yoshinori	4. 巻 49
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 Immunological Investigations	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 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 2020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 -

1. 著者名 Fukano H., Takano T., Fujimoto Y., Nakatani R., Watanabe M., Hidaka Y., Shimomura I.	4. 巻 95
2. 論文標題 In tube immunocytochemistry for fluorescence-activated cell sorting that prevents RNA degradation in sorted cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnic & Histochemistry	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10520295.2019.1632485	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〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----