

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18220

研究課題名(和文) 血清miRNAsによるバセドウ病の予後予測法の確立

研究課題名(英文) The role of circulating MicroRNAs in Graves' Disease

研究代表者

平塚 いづみ (Hiratsuka, Izumi)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：30778428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームはmicroRNA(miRNA)などを内包し安定して血液中に存在し、細胞間コミュニケーションの作用を有することが知られている。近年、様々な疾患の病因・病態形成に積極的な役割を果たすことが明らかになっている。さらに、これら血中miRNAは癌をはじめとして様々な疾患において変動することが明らかにされており、新規バイオマーカーとして注目されている。本研究は自己免疫性甲状腺疾患における血中microRNAを解析し、変動するmiRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により自己免疫性甲状腺疾患、特にバセドウ病において変動する血中microRNAを明らかにした。これらの血中microRNAは甲状腺疾患の病態に関与することが示唆された。これら成果は、これまで不明であった自己免疫性甲状腺疾患の病態解明につながるものである。さらなる将来的には治療や診断法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Understanding the roles of circulating microRNAs (miRNAs) can provide important information regarding disease pathogenesis and a patient's clinical condition. This study revealed that different signature of circulating miRNAs are associated with intractable GD. Moreover, circulating miRNAs of patients with intractable GD may activate immune cells, which may play an important role in GD pathogenesis.

研究分野：内分泌

キーワード：甲状腺 エクソソーム miRNA 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

バセドウ病の罹患割合は 200-1000 人に1人程度と頻度の高い自己免疫疾患の一つである。治療法には簡便な薬物治療が主流となっている。しかし、薬物治療で長期寛解が得られる症例(寛解群)は半分以下にとどまり、残りは寛解に至らず、再燃を繰り返す(難治性群)ため臨床上的問題となっている。現在までに多くの探索研究が行われているが、バセドウ病の再燃を予測できる確かな方法はなく、難治性や寛解などの病勢を予測する新規バイオマーカーの同定が望まれている。

近年の研究で血液中に miRNAs が安定に存在することが示された。血中 miRNAs は、侵襲性も低く、高い感度・特異度を有するなどバイオマーカーとして有用な特徴が多くある。実際、この数年間で癌を中心として多くの疾患や病態により変動する有望な血中 miRNAs が同定されている。さらに、これら血中 miRNA はエクソソーム中に内包され安定して血液中に存在し、細胞間コミュニケーションの作用を有することが知られている。近年、様々な疾患の病因・病態形成に積極的な役割を果たすことが明らかとなり注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、自己免疫性甲状腺疾患において血中 miRNA を解析し、新規バイオマーカーの確立を目指した。さらに、自己免疫性甲状腺疾患の血中エクソソーム(miRNA)が生体に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

自己免疫性甲状腺疾患患者をリクルートし、血清を保存した。保存血清より miRNA を抽出し、miRNAs を定量解析した。さらに、保存血清からエクソソームを単離・精製した。血清より単離したエクソソームを健常人 PBMC に添加し、PBMC への取り込みを確認した。その後、24時間培養した PBMC を回収し、培養上清にけるサイトカイン(IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-17、TNF-、IFN-)を MAGPIX®-Luminex® assay システムを用いて定量した。

なお自己免疫性甲状腺疾患患者の対象者は外来または病棟で説明文書を見せ、口頭で説明し、文書で同意を得る。自由意志による同意取得を担保するように留意し、同意書ならびに説明書は倫理審査委員会であらかじめ審査・承認されたものを使用した。

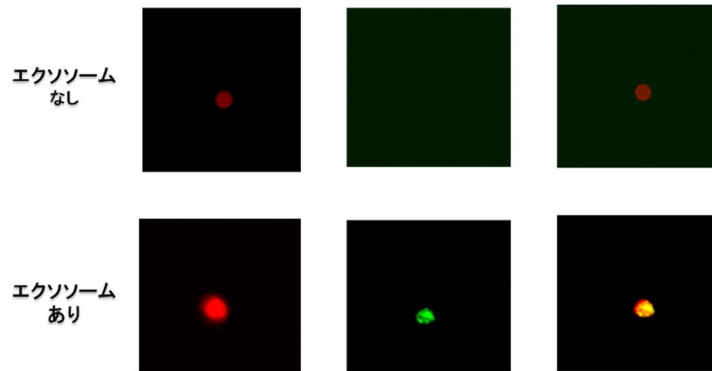
## 4. 研究成果

- (1)本研究では、バセドウ病患者の血清 miRNA を解析し、新たなバイオマーカーの確立を目的とした。バセドウ病患者の血清を取集することが終了した。これらサンプルを活用し、バセドウ病における血清 miRNAs 解析を進め、miR-22, miR-33, miR-92, miR-339 などが変動することを明らかにした。今後は臨床応用を視野に入れて、バセドウ病の寛解・増悪等の病態や治療経過の変動を明らかにする必要がある。そのためバセドウ病患者を対象として前向きに病勢を追跡し、血清サンプルの採取をスタートさせた。また、取集した血清からエクソソームを取集し、免疫細胞に及ぼす影響を解析した結果、炎症

に關与することが示唆されるデータが得られた。引き続き研究を進める必要がある。

(2) 本研究では、バセドウ病患者の血中エクソソームが病態にどのように關与するのかを解析した。バセドウ病患者の血清よりエクソソームを単離・精製した。単離した血中エクソソームを蛍光標識し末梢血

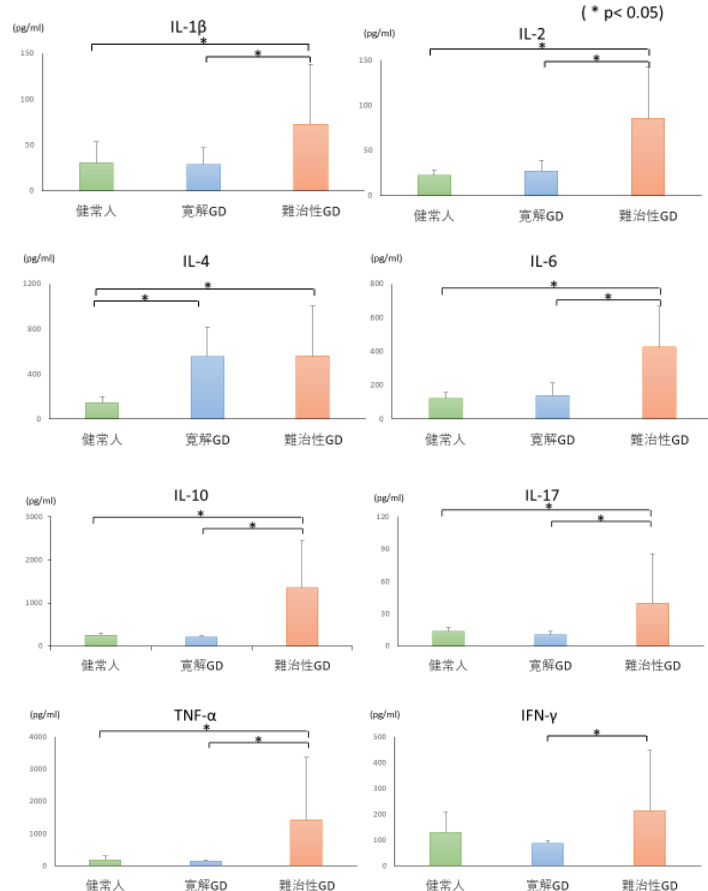
単核球細胞 (PBMC) への取り込みを蛍光顕微鏡により觀察した。培養から12時間後では PBMC への取り込みが確認された。また、24時間ではより多くの取り込みが確認された。そこで、24時間培養後の PBMC サイトカイン



(PKH: 細胞を標識 SYTO Green: エクソソームを標識)

産生量を測定した。バセドウ病患者のエクソソームが取り込まれると炎症性サイトカインの増加が確認された(図)。興味深いことに、難治性バセドウ病患者の血中エクソソームでより炎症性サイトカインの産生量が増加していた。難治性バセドウ病エクソソーム添加群では、寛解エクソソーム添加群較して PBMC における IL-1、TNF- $\alpha$  の遺伝子発現がそれぞれ 7.6 倍、3.0 倍、有意に高値を示し、また上清においては、IL-1、IL-2、IL-6、IL-17、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  の濃度がそれぞれ 2.5 倍、2.9 倍、3.1 倍、9.3 倍、2.4 倍、有意に高値を示した。

エクソソーム添加・培養後のPBMCのサイトカイン産生能 (\* p<0.05)



これらの結果よりバセドウ

病、特に難治性における血中エクソソームは炎症性サイトカイン産生量を増加させることで、バセドウ病の病勢悪化に關与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Hiratsuka I, Yamada H, Itoh M, Shibata M, Takayanagi T, Makino M, Sugimura Y, Hayakawa N, Hashimoto S, Suzuki A.	4. 巻 128
2. 論文標題 Changes in Serum Immunoglobulin G4 Levels in Patients with Newly Diagnosed Graves' Disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Clin Endocrinol Diabetes.	6. 最初と最後の頁 .119-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1055/a-0669-9333	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 Aida N, Kenmochi T, Ito T, Nishikawa T, Hiratsuka I, Shibata M, Suzuki A, Hasegawa M, Kawai A, Kusaka M, Hoshinaga K, Matsubara H.	4. 巻 47
2. 論文標題 Prediction of Insulin Secretion Ability With Microcirculation Evaluated by Contrast-enhanced Ultrasonography in Pancreas Transplantation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pancreas.	6. 最初と最後の頁 617-624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000001051.	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 平塚いづみ	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 自己免疫性甲状腺疾患における エクソソームの役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本甲状腺学会誌	6. 最初と最後の頁 55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平塚 いづみ, 山田 宏哉, 伊藤 光泰, 清野 祐介, 四馬田 恵, 高柳 武志, 牧野 真樹, 梶村 益久, 橋本 修二, 鈴木 敦詞
2. 発表標題 新規発症バセドウ病由来の血中エクソソームがサイトカイン産生に及ぼす影響
3. 学会等名 第61回日本甲状腺学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平塚 いづみ, 山田 宏哉, 植田 佐保子, 四馬田 恵, 高柳 武志, 牧野 真樹, 梶村 益久, 伊藤 光泰, 橋本 修二, 鈴木 敦詞
2. 発表標題 パセドウ病由来血中エクソソームによる制御性T細胞の免疫抑制性サイトカイン遺伝子発現に及ぼす影響(
3. 学会等名 日本内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 パセドウ病由来血中エクソソームによるCD4(+)T細胞の免疫調節遺伝子発現に及ぼす影響
2. 発表標題 平塚いづみ、山田宏哉、牧野真樹、伊藤光泰、橋本修二、鈴木敦詞
3. 学会等名 第60回日本甲状腺学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平塚いづみ、山田宏哉、伊藤光泰、宗網栄二、安藤嘉崇、藤沢治樹、四馬田恵、清野祐介、高柳武志、牧野真樹、梶村益久、橋本修二、鈴木敦詞
2. 発表標題 難治性及び寛解パセドウ病の血中エクソソームが制御性T細胞の免疫抑制機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回日本甲状腺学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----