

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390168
 研究課題名（和文）末梢性自己寛容誘導機序の解明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）Development of predictive diagnostic method for autoimmune diseases on the basis of the mechanism of peripheral self-tolerance induction
 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

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患の病因規定因子である末梢性自己寛容の誘導因子と標的臓器の発症制御因子に着目し、自己免疫性甲状腺疾患の発症増悪予知に有用な遺伝子多型を見出すことを試みた。その結果、GITR、Foxp3、HHHEX、Foxe1がAITDの重症度（予後）と関連し、CTLA-4がAITDの発症と関連していること、そして、これらのSNPsがAITDの発症増悪の予知診断法に有用であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We tried to find the genetic polymorphisms useful for the predictive diagnosis of the development or the prognosis of autoimmune thyroid disease on the basis of the possibilities that the induction factors for peripheral self-tolerance and the regulatory factors for target organ development are related to the pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD). As a result, we found that SNPs of GITR, Foxp3, HHHEX, Foxe1 and CTLA-4 were related to the prognosis or the development of AITD, and were useful for the predictive diagnostic methods for AITD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	10,400,000	3,120,000	13,520,000

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：発症予知 診断法 遺伝子多型 一塩基多型 自己免疫疾患 甲状腺 重症度 末梢性自己寛容

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は、自己抗体を検出することにより、発症する前の潜在性の病態で発見で

きる（Notkins AL: Sci Am 296:72-9, 2007）
 （甲状腺の場合は95%以上発見できる。）が、
 その中で実際に発症して治療が必要になる

ものは少ない。従って、潜在性の段階で、実際に発症して治療が必要になるものとそうでないものを予知することができれば、発症の予防や軽症化、さらには無駄な経過観察をなくすことができ、極めて効率的かつ有効な医療を実施することができる。これまでは免疫調節因子であるサイトカインの遺伝子多型に着目して、現時点の遺伝子検査としては非常に有用な（感度 20%、特異度 100%）の発症予知診断法を開発することができた。

2. 研究の目的

自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子の候補として、末梢性自己寛容誘導機序に関連する因子、すなわち制御性 T 細胞の誘導因子（この因子の機能が弱いと自己免疫応答の抑制が不十分になり、発症しやすくなる。）と標的臓器の発生制御因子（この因子の異常により臓器の発生が遅れると、その臓器に特異的な制御性 T 細胞の誘導が不十分になり、免疫学的自己寛容の成立が不完全になり、自己免疫疾患が発症しやすくなる可能性）に着目し、それらの遺伝子のプロモーター領域を中心に一塩基多型（SNP）を検索して発症予知に有用な遺伝子多型を見出し、より感度の高い確実な自己免疫疾患の発症予知診断法を開発することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

自己免疫疾患の代表例として、自己免疫性甲状腺疾患を対象とした。その疾患感受性遺伝子の候補として、末梢性自己寛容誘導機序に関連する因子、すなわち制御性細胞（Regulatory T 細胞、NKT 細胞）及びその誘導因子（GITR、Foxp3、CTLA-4 等）と標的臓器の発生制御因子（TTF-1、Pax-8、HHEX、Foxel 等）に着目し、それらの遺伝子のプロモーター領域を中心に SNP を検

索し、見つけた SNP の中から遺伝子の発現および蛋白の産生に影響を及ぼす機能的な SNP を発見した。そして、その SNP を健常群と疾患群、重症群と軽症群で測定・比較することにより、疾患の発症や増悪の予知に有用な SNP を発見し、確実な自己免疫疾患の発症予知診断法を開発を行った。

4. 研究成果

(1) 制御性 T 細胞の解析

① 制御性 T (Treg) 細胞の免疫抑制能と Glucocorticoid-induced TNF receptor family related protein (GITR) の発現が関連することから、GITR の rs3753348 C/G SNP 及び rs2298213 A/G SNP と自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) の病態との関連を調べた。まず、rs3753348 C/G SNP が CC genotype の時には、Treg 及び Teff 細胞における GITR 陽性細胞比率が高いことを明らかにしたが、この CC genotype の頻度が、橋本病の軽症群で重症群よりも高かった。また rs2298213 A/G SNP の AA genotype の頻度も同様に橋本病の軽症群で重症群よりも高かった。

② Treg 細胞に発現している膜型 TGF- β 1 分子（エフェクター T 細胞の抑制を誘導する）と GITR 分子（抗原提示細胞等が発現する GITR リガンド (GITRL) の刺激により抑制機能を亢進する) GITR の発現が、甲状腺内で末梢血よりも増強していることを解明した。また AITD の組織内では、間質に存在する単核球以外に、甲状腺上皮細胞も GITRL を発現していることを発見した。さらに正常の甲状腺組織においても、甲状腺上皮細胞が GITRL を発現していたが、AITD の発現の方が強かった。従って、甲状腺上皮細胞に発現する GITRL は、自己免疫性甲状腺疾患の進展を抑制している可能性が示唆された。

③ Treg 細胞の抑制能に関連する Foxp3 や

CTLA4 の SNP と AITD の病態との関連を解析した結果、Foxp3 -2383CC genotype の頻度が橋本病重症群で軽症群よりも高く、また Fosp3 の転写に欠陥のある-3279AA genotype がバセドウ病寛解群に存在しないことを見出した。さらに CTLA-4 CT60 SNP の GG genotype と +49A/G SNP の G allele の頻度が橋本病全体で高いことを明らかにした。

(2) 標的臓器の発生制御因子の解析

① 標的臓器である甲状腺の発生制御因子として、TTF-1、Pax-8、HHEX、Foxe1 に着目し、既に報告されている TTF-1 -854G/T、Pax-8 T225M、HHEX rs1111875 及び Foxe1 -283G/A の SNPs を解析した結果、HHEX rs1111875 GG genotype がバセドウ病寛解群には存在せず、高産生型の Foxe1 -283A allele の頻度が橋本病軽症群で高いことが判明した。

(3) 結論

① GTR、Foxp3 が AITD の重症度（予後）と関連し、CTLA-4 が AITD の発症と関連しており、発症予知診断法に有用であることを明らかにした。

② 標的細胞である甲状腺上皮細胞に GTR が発現しており、GTR-GITRL シグナルが自己免疫応答を抑制する可能性が示唆された。

③ 甲状腺の発生制御因子である HHEX rs1111875 GG genotype 及び Foxe1 -283A allele が AITD の発症増悪と関係する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Tomizawa R, Watanabe M, Inoue N, Takemura N, 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. (in press)

2. Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tatusmi 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):318-23, 2011

3. Inoue, N., Watanabe, M., Morita, M., Tomizawa, R., Akamizu, T., Tatusmi, K., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. Clin Exp Immunol, 162 (3), 402-406, 2010

4. Hayashi, F., Watanabe, M., Nanba, T., Inoue, N., Akamizu, T., Iwatani, Y. Association of -31C/T functional polymorphism in the interleukin-1beta gene with the intractability of Graves' disease and the proportion of Th17 cells. Clin Exp Immunol, 158(3):281-286, 2009

5. Nanba, T., Watanabe, M., Inoue, N., Iwatani, Y. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. Thyroid 19(5):495-501, 2009

6. Inoue, N., Watanabe, M., Nanba, T., Wada, M., Akamizu, T., Iwatani, Y. Involvement of functional polymorphisms in the TNFA gene in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases and production of anti-TSH receptor antibody. Clin Exp Immunol 156(2):199-204, 2009

7. Yamada H, Watanabe M. Nanba T, Akamizu T, Iwatani Y. The 869T/C polymorphism in the transforming growth

factor-beta1 gene is associated with the severity and intractability of autoimmune thyroid disease. Clin Exp Immunol 151:379-382, 2008

8. Nanba T, Watanabe M, Akamizu T, Iwatani Y: The -590CC Genotype in the IL4 Gene as a Strong Predictive Factor for the Development of Hypothyroidism in Hashimoto Disease. Clin Chem 54(3):621-3, 2008

9. Watanabe M, Nakamura Y, Matsuzuka F, Takamura Y, Miyauchi A, Iwatani Y: Decrease of intrathyroidal CD161+ Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in Graves' disease. Endocrine J 55:199-203, 2008

[学会発表] (計 50 件)

1. Watanabe M, Inoue, N., Morita, M., Tomizawa, R., Akamizu, T., Tatsumi, K., Hidaka, Y., Iwatani Y: (Discussed Poster) Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 gene with prognosis of autoimmune thyroid diseases. 14th International Thyroid Congress (ITC), Paris, Sept. 12, 2010

2. Watanabe M, Nanba, T., Inoue, N., Iwatani Y: Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. 14th International Congress of Endocrinology (ICE), Kyoto, Mar. 30, 2010

3. Inoue, N., Watanabe M, Nanba, T., Akamizu, T., Iwatani Y. Involvement of the functional polymorphisms in TNFA gene in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases and the production of anti-TSH receptor antibody. 9th Congress

of the Asia and Oceania Thyroid Association (AOTA), Nagoya, Nov. 2, 2009

4. Watanabe M, Hayashi, F., Nanba, T., Inoue, N., Akamizu, T., Iwatani Y. Association of the -31C/T functional polymorphism in the interleukin-1 β gene with the intractability of Graves' disease and the proportion of Th17 cells. 80th Annual Meeting of the American Thyroid Association, Palm Beach, Sep. 26, 2009

5. Watanabe M, Namba T, Akamizu T, Iwatani Y: Patients of Hashimoto's disease with -590CC genotype in the IL4 gene would develop hypothyroidism. The 79th Annual Meeting of the American Thyroid Association, Chicago, IL, October 3, 2008

[図書] (計 1 件)

1. 岩谷良則 編 臨床検査学実習書シリーズ 遺伝子検査学実習書、医歯薬出版株式会社、pp. 1-181、2010

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

渡邊 幹夫 (WATANABE MIKIO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50294088