

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590569

研究課題名（和文） 高感度TSHレセプター抗体測定法を用いたバセドウ病発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analyze the mechanism of onset of Graves' disease, using high sensitivity method for TSH receptor antibody

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

研究成果の概要（和文）：スギ花粉症を合併したバセドウ病患者の末梢血単核球をスギ花粉で刺激し、培養上清中のTSHレセプター抗体（TRAb）を高感度法で測定したところ、検出可能であった。しかし、スギ花粉症を合併したバセドウ病患者の末梢血単核球をスギ花粉なしで培養した場合でも、またスギ花粉症を合併していないバセドウ病患者の末梢血単核球をスギ花粉と培養した場合でも、上清中にTRAbが検出された。したがって、スギ花粉刺激がTRAb産生の誘因であることの証明は出来なかった。

研究成果の概要（英文）：The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the Graves' patients complicated with cedar pollen allergy were stimulated with cedar pollen. TSH receptor antibody (TRAb) could be detected in the supernatant using high sensitivity method. However, TRAb also could be detected in the supernatant incubated without the stimulation of cedar pollen. Moreover, TRAb could be detected in the supernatant incubated PBMC from the Graves' patients without cedar pollen allergy. Therefore, we could not demonstrate that the cedar pollen stimulates the production of TRAb.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学

キーワード：TSHレセプター抗体、バセドウ病、スギ花粉症

## 1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は現在なお難病の多くを占めています。我々は代表的な自己免疫疾患であるバセドウ病が出産後増悪することを明らかにし、またバセドウ病の増悪前に末梢血好酸球が増加していることに注目し、バセドウ病がI型アレルギーのなかで最も頻度の

高い疾患であるアレルギー性鼻炎発症後にも発症・増悪することを世界で始めて明らかにしました（J Clin Endocrinol Metab, 1993）。我々はさらに出産後にバセドウ病を発症した（顕性バセドウ病）症例では、妊娠初期血中の甲状腺ホルモンが正常にもかかわらずその病因抗体が陽性（潜在性バセドウ病）で

あることより (Clin Endocrinol, 1994)、自己免疫疾患は一般に自己免疫素因 (MHC、CTLA-4 など) のある人が何らかの原因 (ウイルス感染など) により潜在性の自己免疫疾患になり、この状態に増悪因子 (出産、アレルギー性鼻炎など) が加わると顕性の自己免疫疾患になるものと考えています。このことより、自己免疫疾患の増悪機序を解明しそれを抑えこむことは、自己免疫疾患の顕性化 (発症) 予防につながるものと考えています。

I 型アレルギーでは、ヘルパー T 細胞 (Th) のうちインターロイキン 4 (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をおこすことが分かっています。これらのサイトカインは IgG 産生も誘導するので、我々は I 型アレルギーでおこる Th2 の活性化により、バセドウ病の病因 IgG 抗体である TSH レセプター抗体 (TRAb) 産生が誘導され、バセドウ病が増悪するのではないかと推定しています。これを証明するためには、アレルギー性鼻炎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 TRAb の産生が見られることを証明する必要があります。しかしながら従来の TRAb 測定法では、その感度の問題でこのことを証明することができませんでした。したがってこれまでは以下のような研究で、上記仮説を間接的に証明してきました。

① I 型アレルギーと同様 Th2 がバセドウ病の病因に重要であることの証明; Th2 サイトカインの IL-5 がバセドウ病で高値であることを報告しました (Thyroid, 1998)。

② I 型アレルギーがバセドウ病の病因に密接に関係していることの証明; バセドウ病患者は好酸球が活性化されると放出される EDN が高値であることを報告しました (Thyroid, 2003)。

③ I 型アレルギーで IgG 産生が亢進することの証明; アレルギー性鼻炎患者の末梢血リンパ球をスギ抗原で刺激すると、IL-4 と IgG の産生がみられることを報告しました (J Invest Allerg Clin, 2007)。

しかし最近になって TRAb 測定法は第 3 世代が開発され、その感度が向上したことを受けて今回、アレルギー性鼻炎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し、TRAb の産生を調べることで、アレルギー性鼻炎によるバセドウ病の発症メカニズムをより直接的に証明することにしました。

## 2. 研究の目的

まずバセドウ病患者の末梢血リンパ球を強力に刺激することにより、その上清中の TRAb を検出するシステムを高感度 TRAb 測定法で確立する。

つぎにアレルギー性鼻炎を合併したバセ

ドウ病患者の末梢血リンパ球をスギ花粉で刺激し、TRAb の産生を調べる。同時にサイトカインの濃度を調べることにより、そのメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 培養上清中の TRAb を検出する方法を確立する

バセドウ病患者の末梢血単核球を Ficoll-Paque Plus で回収し、無血清液体培養液 X-VIVO 10 medium 中で  $2 \times 10^6$  cells/ml に調整する。PWM (pokeweed mitogen) と共に 7 日間培養後の上清を濃縮し、産生された TRAb を第 3 世代 TRAb 測定法で検出する。

(2) 高感度 TRAb 測定法を用いて、スギ花粉症によるバセドウ病の発症メカニズムを解明する

スギ花粉症を合併したバセドウ病患者の末梢血単核球をスギ花粉抗原と共に 7 日間培養し、上清中の TRAb を測定する。さらにそのメカニズム解明のため、上清中の IL-4 濃度も ELISA で測定する。

## 4. 研究成果

(1) 培養上清中の TRAb を検出する方法の確立

バセドウ病患者 4 名の末梢血単核球を無血清液体培養液 X-VIVO 10 medium 中で  $2 \times 10^6$  cells/ml に調整し、PWM と共に 7~13 日間培養し、上清を濃縮し、産生された TRAb を 2 種類の第 3 世代 TRAb 測定法で測定した。1 名のバセドウ病患者において TRAb が明らかに陽性であった。以上の研究により、バセドウ病患者では、末梢血単核球培養上清中の TRAb を高感度の第 3 世代 TRAb 測定法で検出できることが明らかになった。

(2) スギ花粉症を合併したバセドウ病患者での検討

スギ花粉症を合併したバセドウ病患者の末梢血単核球をスギ花粉抗原と刺激したところ、6 名中 2 名で培養上清中の TRAb を検出できた。以上の研究により、スギ花粉症を合併したバセドウ病患者では、末梢血単核球培養上清中の TRAb を高感度の第 3 世代 TRAb 測定法で検出できることが明らかになった。

(3) 再現性の検討

上記とは別のスギ花粉症を合併したバセドウ病患者の末梢血単核球をスギ花粉抗原で刺激し、培養上清中の TRAb を高感度第 3 世代 TRAb 測定法で測定したところ、6 名中 3 名で検出できた。

(4) 特異性の検討

① スギ花粉症を合併したバセドウ病患

者の末梢血単核球をスギ花粉抗原なしで培養した場合、②スギ花粉症を合併していないバセドウ病患者の末梢血単核球をスギ花粉抗原と共に培養した場合、共に上清中で TRAb が検出された。したがって、スギ花粉刺激が TRAb 産生の誘因であることの証明は出来なかった。

#### (5) サイトカインの産生

スギ RAST 陽性の 3 名のバセドウ病患者の末梢血単核球をスギ花粉抗原の刺激のない状態とある状態で培養し、上清中の IL-4 を測定した。スギ花粉抗原の刺激のない状態では 0.4pg/mL 未満であったが、刺激のある状態では 0.7~1.7pg/mL と検出可能であった。一方、スギ RAST 陰性のバセドウ病患者では、スギ花粉抗原刺激のある状態でも、上清中の IL-4 は 0.4pg/mL 未満であった。

#### (6) 今後の展望

今回の研究で確立した高感度 TRAb 測定法によるバセドウ病患者末梢血単核球培養上清中の TRAb 検出法は、スギ花粉症以外の誘因とバセドウ病の発症・増悪との関連を検討する際にも役立つもの期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 36 件)

- ① Tomizawa R, Watanabe M, Inoue N, Takemura K, 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) 査読有
- ② Torita S, Suehisa E, Kawasaki T, Toku M, Takeo E, Tomiyama Y, Nishida S, Hidaka Y: Development of a new modified Bethesda method for coagulation inhibitors: the Osaka modified Bethesda method. Blood Coagul Fibrinolysis (in press) 査読有
- ③ Maruo R, Yamada H, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Takano T: mRNA quantification after fluorescence activated cell sorting using locked nucleic acid probes. Mol Biotechnol (in press) 査読有
- ④ Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tatsumi 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): 318-323, 2011 査読有
- ⑤ Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tomizawa R, Akamizu T, Tatsumi 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. 査読有
- ⑥ Yamada H, Maruo R, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Takano T: Messenger RNA quantification after fluorescence activated cell sorting using intracellular antigens. Biochem Biophys Res Commun 397(3): 425-428, 2010. 査読有
- ⑦ Suehisa E, Kawasaki T, Toku M, Hidaka Y: Low level of factor V is associated with development of deep-vein thrombosis in Japanese patients. Thromb Res 125(2): 128-133, 2010. 査読有
- ⑧ Kuroda S, Watanabe M, Santo T, Shimizuishi Y, Takano T, Hidaka Y, Kimura T, Iwatani Y: Postpartum increase of serum thioredoxin concentrations and the relation to CD8 lymphocytes. Ann Clin Biochem 47(Pt1): 62-66, 2010. 査読有
- ⑨ Takano T, Yane K, Oue T, Otsuki N, Nibu K, Hidaka Y: Outpatient administration of radioactive iodine after total thyroidectomy for pediatric thyroid cancer: A report of three cases. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 73(12):1810-1813, 2009. 査読有
- ⑩ Hanada H, Mugii S, Takeoka K, Maeda I, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y: Early detection of metastasis and relapse of colorectal cancer by recognizing NCA-2 in commercially available CEA assay. Clin Chem 55(9):1747-1748, 2009. 査読有
- ⑪ Nojima J, Iwatani Y, Ichihara K, Ishikawa T, Tsuneoka H, Yanagihara M, Takano T, Hidaka Y: Acquired activated protein C resistance is associated with IgG antibodies to protein S in patients with systemic lupus erythematosus. Thromb Res 124(1): 127-131, 2009. 査読有
- ⑫ Maeda I, Yamada H, Takano T, Nishihara E, Ito Y, Matsuzuka F, Miya A, Kobayashi K, Yoshida H, Miyauchi

A, Hidaka Y: Increased expression levels of *tensin3* mRNA in thyroid functional adenomas as compared to non-functioning adenomas. *Exp Clin Endocr Diab* 117: 191-193, 2009. 査読有

- ⑬ Yasunaga C, Suehisa E, Toku M, Kawasaki T, Hidaka Y: Frequencies of mild factor V, VII and X deficiencies in a Japanese population. *Blood Coagul Fibrinolysis* 19(6):597-600, 2008. 査読有
- ⑭ Hidaka Y, Tatsumi K: Spontaneous transient Graves' thyrotoxicosis. *Thyroid* 18(10): 1133-1134, 2008. 査読有

[学会発表] (計 44 件)

- ① 山田宏哉、高野 徹、木原 実、廣川満良、吉田 博、渡邊幹夫、岩谷良則、日高 洋、宮内 昭: *TFF3/LGALS3* mRNA 発現比定量による甲状腺癌の穿刺吸引核酸診断法の臨床検討 日本甲状腺学会 2010 年 11 月 12 日 長崎
- ② 武村和哉、富澤理恵、2 渡邊幹夫、井上直哉、早川和生、赤水尚史、日高 洋、岩谷良則: *GITR* 遺伝子多型と自己免疫性甲状腺疾患の難治度・重症度との関連 日本臨床化学学会年会 2010 年 9 月 23 日 山梨
- ③ 高野 徹、日高 洋、岩谷良則: 新規臨床検査法、*FACS-mQ* の開発 日本臨床検査学会総会 2010 年 9 月 11 日 東京
- ④ 鳥田澄子、末久悦次、徳 雅幸、竹尾映美、川崎富夫、日高 洋: 凝固因子インヒビター測定の新たなベセスダ法変法の開発 日本検査血液学会 2010 年 7 月 24 日 東京
- ⑤ Kousaka K, Tatsumi K, Hidaka Y: Analysis of pituitary-rich KIAA1324/mabal in prolactin secretion. 14th International Congress of Endocrinology 2010 年 3 月 30 日 京都
- ⑥ Yamada H, Takano T, Kihara M, Hirokawa Y, Yoshida H, Watanabe M, Iwatani Y, Hidaka Y, Miyuchi A: Preoperative diagnosis of thyroid nodules by measuring *TFF3/LGALS3* mRNA (T/G) ratio: a clinical trial of fifty cases. 14th International Congress of Endocrinology 2010 年 3 月 28 日 京都
- ⑦ Maruo R, Yamada H, Takano T, Watanabe M, Iwatani Y, Hidaka Y: An in-tube in situ hybridization method for the novel stem cell detection system, *FACS-mQ* The 9th Asia and Oceania Thyroid Association Congress 2009

年 11 月 2 日 名古屋

- ⑧ 巽 圭太、須崎由起子、松井昌彦、竹岡啓子、林 貞夫、渡邊幹夫、岩谷良則、日高 洋: 簡便な患者検体結果の代表値(中央値)の評価と管理検体結果と組み合わせた後方視的な利用法の検討 日本臨床検査学会総会 2009 年 8 月 27 日 札幌
- ⑨ 家入蒼生夫、池田 斉、小田桐恵美、片上秀喜、亀子光明、桑 克彦、竹岡啓子、武田京子、日高 洋: 第 29 回免疫アッセイ検査全国コントロールサーベイ成績報告 日本内分泌学会学術総会 2009 年 4 月 24 日 前橋
- ⑩ 日高 洋、巽 圭太、高野 徹: 一過性バセドウ病の 3 例 日本甲状腺学会 2008 年 11 月 22 日 宇都宮
- ⑪ 松井昌彦、正司浩規、木村茂樹、末久悦次、前田育宏、井山 茂、林 貞夫、日高 洋: LIS のデータチェックロジック 日本臨床化学学会年会 2008 年 8 月 29 日 浜松

[図書] (計 2 件)

- ① 日高 洋: 医薬ジャーナル 内分泌代謝疾患・糖尿病診療マニュアル (改訂版) 2009 バセドウ病 (p. 174-180) バセドウ病眼症 (p. 181-184) 無痛性甲状腺炎 (p. 188-191) 亜急性甲状腺炎 (p. 192-194) 甲状腺クリーゼ (p. 195-198) 妊娠と甲状腺疾患 (p. 211-215)
- ② 網野信行、高野 徹、日高 洋: 永井書店 よくわかる甲状腺疾患のすべて (改訂第 2 版) 2009 橋本病の診断 (p. 31-35) 日高 洋、網野信行: 橋本病と妊娠、産後の異常 (p. 254-258)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日高 洋 (HIDAKA YOHO)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 30243231

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし