

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17523

研究課題名（和文）血中エクソソームに着目したバセドウ病の重症化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigating the Role of Circulating Exosomes in the Aggravation Mechanisms of 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：エクソソームはmicroRNA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。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。本研究は自己免疫性甲状腺疾患における血中エクソソームを解析し、バセドウ病の病態に及ぼす影響を解析した。バセドウ病の血液エクソソームは炎症性のサイトカインの産生能を促進すること明らかとした。また、寛解・増悪等の各種病態においても、サイトカイン産生能に及ぼす影響は異なることを明らかにした。バセドウ病の病態形成に血中エクソソームが関与していることが示唆された。

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、特にバセドウ病の血中エクソソームが病態に関与することを明らかにした。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。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）：Exosomes are known to encapsulate microRNAs (miRNAs) among other substances, and to stably exist in the bloodstream where they play a role in intercellular communication. It has been elucidated that they actively participate in the etiology and pathogenesis of various diseases. In this study, we analyzed the circulating exosomes in autoimmune thyroid diseases, and examined their impact on the pathogenesis of Graves' disease. We found that the blood exosomes in Graves' disease enhance the production of pro-inflammatory cytokines. Additionally, we discovered that the influence on cytokine production capability varies in different pathological states such as remission or exacerbation. These findings suggest that circulating exosomes are implicated in the pathogenesis of Graves' disease

研究分野：内分泌・代謝内科学

キーワード：バセドウ病 エクソソーム microRNA バイオマーカー サイトカイン 増悪

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方法の開発が望まれている。エクソソームは血液を介して生体内を移動し、細胞間でmiRNAsを伝搬する(Annu Rev Physiol. 2015; 77:13-27)。いわば、ホルモン様の作用を持つ。エクソソームは多くの疾患で積極的に病態形成に関与することが明らかにされている。これまでに我々は、難治性バセドウ病のエクソソーム miRNAs が異なるプロファイルを持つことを報告している。さらにこれら miRNA が免疫細胞の機能に影響を及ぼすことが知られている。つまり、血中のエクソソームはバセドウ病の病因・病態に関与していることが示唆される。これまで不明であったバセドウ病の増悪機序は、『エクソソームの異常』という新たな事象を考慮することで理解できるかもしれない。本研究は、バセドウ病のエクソソームが自己免疫反応や調整にどのように関与するかを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究は、バセドウ病のエクソソームと免疫応答の関連を調べることにより、バセドウ病の病態形成に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

バセドウ病の血清からエクソソームを抽出し、免疫機能に与える影響を in vitro で解析した。バセドウ病の血中エクソソームが自己免疫反応の誘導や、免疫寛容にどう関与するかを明らかにすることで、難治性バセドウ病の病因・病態を解明する。

本研究の対象者は健常人14名とバセドウ病65名であり、特性を表に示す。自己免疫性甲状腺疾患の対象者のリクルートは、藤田医科大学病院における外来または病棟で説明文章を見せ、口頭で説明し文章で同意を得た。手順や方法などはあらかじめ倫理審査委員会で審査・承認されたものを使用している。

	コントロール	バセドウ病
N	14	65
Male/Female	0/14	10/55
Age (years)	45.6±2.2	44.8±12.7
FT3 (pg/mL)	2.80±0.35	6.70±9.32*
FT4 (ng/dL)	1.17±0.15	1.57±0.91*
TSH (μIU/mL)	1.16 (1.01-1.61)	0.0104 (0.0026-0.9366)*
TRAb (IU/L)	0.4 (0.33-0.40)	5.3 (0.6-21.9)*

Data presented as mean ± standard deviation, median (25th-75th percentiles). FT3, free T3; FT4, free T4; TSH, thyroid stimulating hormone; TRAb, TSH receptor autoantibody;

対象者の血清より Exosome isolation kit によりエクソソームを単離した。これらエク

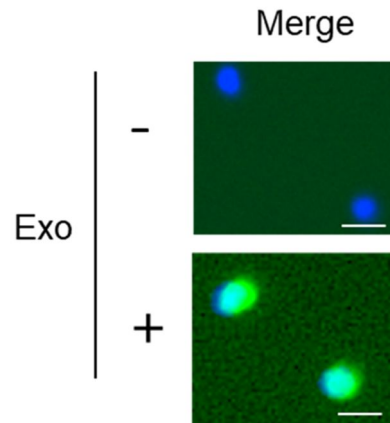
クソームを蛍光標識し、PBMC への取り込みを蛍光顕微鏡にて評価した。さらにエクソソームを PBMC 添加培養し、24 時間後の培養上清における 30 種のサイトカインを MAGPIX®-Luminex® assay システムを用いて定量した。

4. 研究成果

バセドウ病患者の血液からエクソソームを単離・精製した。単離したエクソソームからエクソソームマーカーである CD63 を確認した。またエクソソームのタンパク量や核酸量は健常郡と比較してバセドウ病群で有意な差は

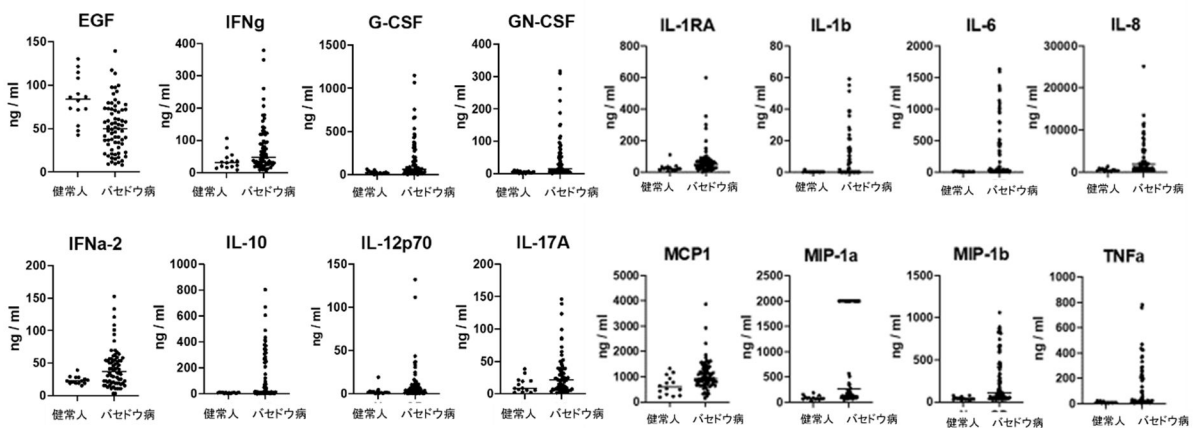
図1. 蛍光標識エクソソームのPBMCへの取り込み

認められなかった。次に、単離したエクソソームを蛍光標識し、末梢血単核球 (PBMC) への取り込みを確認した(右図)。核を DAPI で染色し、緑色に光る SYTO Green にて標識したエクソソームを添加したときの蛍光顕微鏡像である。6 時間後では PBMC への取り込みが確認でき、24 時間ではより多くの取り込みを確認することができた。これら結果は、これまで報告している我々の実験結果と一致している。また、取り込み量についてもバセドウ病群と健常郡で違いは認められ



れなかった。そこで、24 時間培養後の免疫応答を確認した。具体的には、24 時間後の培養上清からサイトカイン・ケモカインを測定した。代表的な結果を下図で示す。

図2. バセドウ病エクソソームによるサイトカイン産生能の評価



バセドウ病由采の血中のエクソソームは

PBMC に取り込まれることを確認した。バセドウ病は健常人と比較して、多種多様のサイトカイン産生を促進することが明らかになった。特に、炎症性サイトカインの産生を促進することが示された。現在、詳細な臨床情報との関連を解析している。また、継続的フォローアップしているため、寛解・増悪等の病態や治療経過などとの関連を明らかにすることを進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Takayanagi T, Hirai H, Asada Y, Yamada T, Hasegawa S, Tomatsu E, Maeda Y, Yoshino Y, Hiratsuka I, Sekiguchi-Ueda S, Shibata M, Seino Y, Sugimura Y, Akamatsu H, Itoh M, Suzuki A.	4. 巻 49(7)
2. 論文標題 Terminal differentiation of keratinocytes was damaged in type 2 diabetic mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep.	6. 最初と最後の頁 5875-5882
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-022-07367-4.	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 Ito T, Kenmochi T, Aida N, Hiratsuka I, Matsushima H, Kurihara K, Suzuki A, Shibata M, Kusaka M, Hasegawa M, Ishihara T, Go H, Yabusaki K, Shintani A.	4. 巻 51(6)
2. 論文標題 An Examination of Donor Factors That Impact the Results of the Glucagon Stimulation Test as an Assessment of the Pancreatic Graft Endocrine Function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pancreas.	6. 最初と最後の頁 634-641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000002093	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, Ito T, Kurihara K, Hiratsuka I, Shibata M, Suzuki A, Kenmochi T.	4. 巻 11(8)
2. 論文標題 Evaluation of the Efficacy and Effects of Common Hepatic Artery Reconstruction in Pancreas Transplantation: A Randomized Controlled Trial.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 2258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm11082258.	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 -

〔学会発表〕 計1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, 宗綱 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94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------