

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 11日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590625

研究課題名（和文） 一卵性双生児を対象とし後天的遺伝要因に着目した自己免疫疾患予後予測検査法の開発

研究課題名（英文） Development of epigenetic factors for the prognosis of autoimmune thyroid disease using monozygotic twins

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

病態分類を確実に行った自己免疫性甲状腺疾患患者のゲノムDNAを多数例収集し、また一卵性双生児のゲノムDNAを40組程度収集した。いくつかの機能的な遺伝子多型が病態予後に影響することを明らかにするとともに、全ゲノムのメチル化頻度が、病態予後とも関連するDNMT1遺伝子の多型によって変化する可能性を初めて見出した。

研究成果の概要（英文）：

We have collected genomic DNA samples from patients with autoimmune thyroid diseases who were strictly classified into categories depend on their prognosis, and also from monozygotic twin pairs. We have clarified the associations of some functional polymorphisms in immune regulatory genes with the prognosis of Graves' and Hashimoto's diseases. In addition, we have reported for the first time that the global methylation of genomic DNA was related to the genotype of polymorphism in *DNMT1* gene, which also associated with the prognosis of autoimmune thyroid diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：病態予後、自己免疫疾患、遺伝子多型、エピジェネティクス、メチル化

1. 研究開始当初の背景

疾患の診断のあと、病態予後を予測することができれば、検査・治療を効率的に行うことが可能であり、患者の身体的・精神的・経済的なストレスを緩和できるのみならず、医療経済における効果も大きい。自己免疫疾患

は、潜在的な病態も合わせると非常に高頻度にみられる疾患であるが、病態予後を予測できないために、結果として過剰な検査や患者ストレスの増大をうむため、自己免疫疾患において病態予後予測を確実に行うことは、テーラーメイド医療の推進のためにも重要な

要因である。さらに病態予後に関連する因子に、遺伝的な先天性の要因と、環境に起因する後天的な要因が考えられ、後者においては遺伝的要因が同一である一卵性双生児を用いた研究が最も重要と考えられる。

2. 研究の目的

病態の把握が比較的容易な自己免疫性甲状腺疾患（橋本病・バセドウ病）をモデルとし、先天性・後天性遺伝要因を用いて自己免疫疾患の病態進展の予後を予測する検査法を開発しようとするものである。特に橋本病は慢性関節リウマチ等の組織破壊を生じる自己免疫疾患のモデルとして優れている。

後天的な遺伝子発現の変化を明確に解析するために、主に甲状腺自己抗体陽性者（橋本病患者）を甲状腺専門医によって病態ごとに分類し、それらのゲノムDNAを用いて免疫機能に影響を及ぼす可能性が有る候補領域のDNA多型を解析し、同様に候補領域のCpG アイランドにおけるDNAメチル化頻度を解析する。

これらの結果と臨床データとの関連および病態との関連を多変量で検証して、先天的・後天的な遺伝因子を同定して予後予測検査法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1)ゲノムDNA・リンパ球サンプルの収集

大阪大学倫理委員会の承認を得たプロトコルに従い、橋本病患者および健常コントロールの末梢血を採取し、ゲノムDNAを分離・収集し凍結保存する。またリンパ球サブセット特異的DNAメチル化の検討のために、サンプルの一部より比重遠心法でリンパ球を分離しDNAを分離する。

患者に関しては、診断・検査結果を詳細に検討し、重症度ごとに病態进行分类する。

(2)ゲノムDNA多型の同定

(1)で収集したゲノムDNAを用いて個体を候補多型タイピングして基本的な多型分類を行う。

(3)DNAメチル化頻度の解析

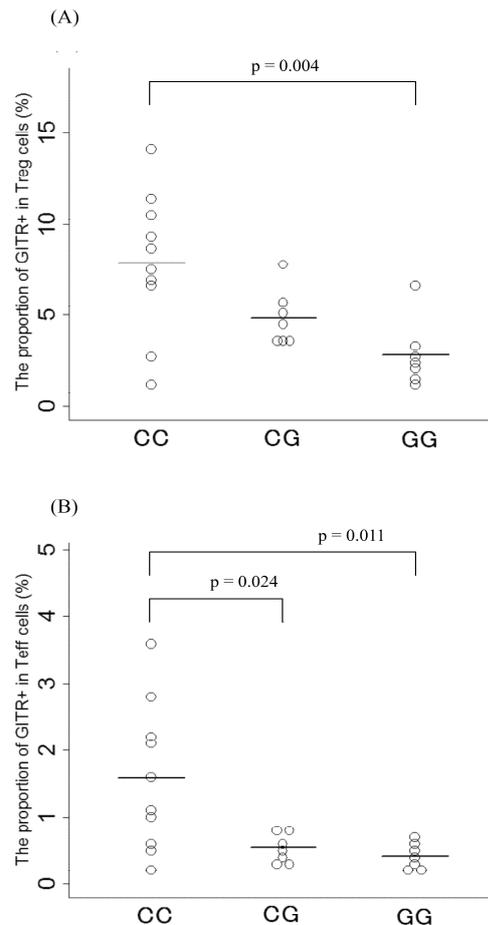
当該研究代表者がこれまでに得た知見から、これらの因子に免疫学的個体差をもたらす可能性のあるメチル化領域を文献的あるいは理論的に見出し、病態との関連を探る。

4. 研究成果

ゲノムDNAについては、バセドウ病患者および橋本病患者について、計500サンプル程度を収集した。そのうち、明確に病態分類が可能であったサンプルは約200程度である。双生児サンプルは43組を収集したが、明らかに自己免疫性甲状腺疾患について

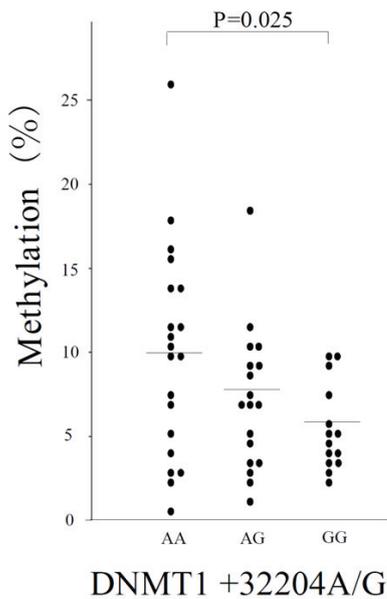
Discordant であるペアが有効なサンプル数見出されなかったため、引き続き収集を行っている。

ゲノムDNAの多型解析については、TNFA, IL1B, FOXP3, GITR, TBX21, HLX, DNMT1などの免疫制御因子をコードする遺伝子の機能的多型が、バセドウ病や橋本病の病態予後と密接に関連することを明らかにし、学術論文として発表するとともに国際学会等で公表した。また、GITRの多型についてはリンパ球におけるGITRの発現と関係していることを初めて明らかにした。(下図)



メチル化頻度については、DNMT1 に存在する機能的多型が、末梢血の全ゲノムメチル化頻度と関連していることを初めて明らかにし、これがバセドウ病・橋本病の病態予後と関連する後天的遺伝要因のひとつである可能性を学会発表を行い、原著論文として投稿中である(次ページ図)。

以上の成果を踏まえ、最終的には、収集中の一卵性双生児サンプルのうち、自己免疫疾患について Discordant なペアにおいて特定のエピジェネティックな変化が病態に関連していることを検証することにより、予後予測診断法の開発に繋がるということが可能となる。



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 18 件)

1. Yamada, H., Yamakawa, N., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Takano, T.: Prolonged hybridization with a cRNA probe improves the signal to noise ratio for in-tube in situ hybridization for quantification of mRNA after fluorescence-activated cell sorting. *Biotech Histochem* (in press) (doi:10.3109/10520295.2012.672650) (査読有)
2. Morita, M., Watanabe, M., Inoue, N., Inaoka, C., Akamizu, T., Tatsumi, K., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: Functional polymorphisms in *TBX21* and *HLX* are associated with development and prognosis of Graves' disease. *Autoimmunity*, **45**(2), 129-36, 2012 (doi:10.3109/08916934.2011.622013) (査読有)
3. 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*, **165**(2), 141-147, 2011 (doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04414.x) (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), 318-23, 2011 (doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04306.x) (査読有)
5. 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*, **49**(1), 42-47, 2011 (doi:10.1007/s12033-011-9375-9) (査読有)
6. Yamada, H., Takano, T., Matsuzuka, F., Watanabe, M., Miyauchi, A., Iwatani, Y.: Transcriptional activity of the 5'-flanking region of the thyroid transcription factor-1 gene in human thyroid cell lines. *Genet Mol Biol* **34**(1), 6-10, 2011 (doi:10.1590/S1415-47572010005000109) (査読有)
7. 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 (doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04229.x) (査読有)
8. Yamada, H., Maruo, R., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Takano, T.: Messenger RNA quantification after fluorescence activated cell sorting using in situ hybridization. *Cytometry Part A*, **77**(11), 1032-1037, 2010 (doi:10.1002/cyto.a.20973) (査読有)
9. 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 (doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.112) (査読有)
10. Kuromoto, K., Watanabe, M., Adachi, K., Ohashi, K., Iwatani, Y.: Increases in urinary creatinine and blood pressure

during early pregnancy in preeclampsia. *Ann Clin Biochem*, 47(Pt 4), 336-342, 2010

(doi:10.1258/acb.2010.090290) (査読有)

11. 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(Pt 1), 62-66, 2010 (doi:10.1258/acb.2009.009120) (査読有)
12. 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 (doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04034.x) (査読有)
13. 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 (doi:10.1089/thy.2008.0423) (査読有)
14. 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 (DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03884.x) (査読有)
15. Yamada H., Takano, T., Ito, Y., Matsuzuka, F., Miya, A., Kobayashi, K., Yoshida, H., Watanabe, M., Iwatani, Y., Miyauchi, A.: Expression of nestin mRNA is a differentiation marker in thyroid tumors. *Cancer Lett* 280(1), 61-64, 2009 (doi:10.1016/j.canlet.2009.02.006) (査読有)

[学会発表] (計20件)

1. 荒川裕也、渡邊幹夫、井上直哉、日高洋、巽圭太、岩谷良則: DNMT1, 3a, 3b 遺伝子の多型と自己免疫性甲状腺疾患の病態およびゲノムのメチル化率との関

連、第54回日本甲状腺学会学術集会(大阪)、2011.11.23

2. Watanabe, M., Inoue, N., Morita, M., Tomizawa, R., Akamizu, T., Tatsumi, K., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: 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. 13, 2010 (**Discussed Poster**)
3. Yamada, H., Takano, T., Kihara, M., Hirokawa, M., Yoshida, H., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y., Miyauchi, A.: Measuring TFF3/LGALS3 mRNA ratio in FNABS from thyroid nodule: a clinical trial of eighty cases. *14th International Thyroid Congress (ITC)*, Paris, Sept. 13, 2010
4. 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. 28, 2010
5. Yamada, H., Takano, T., Kihara, M., Hirokawa, M., Yoshida, H., Watanabe, M., Iwatani, Y., Hidaka, Y., Miyauchi, 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 (ICE)*, Kyoto, Mar. 29, 2010
6. 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. 3, 2009 (**Selected Poster / Young Investigator Award**)
7. Yamada, H., Takano, T., Ito, Y., Matsuzuka, F., Miya, A., Kobayashi, K., Yoshida, H., Watanabe, M., Iwatani, Y., Miyauchi, A.: Expression of nestin mRNA is a differentiation marker in thyroid tumors. *9th Congress of the Asia and Oceania Thyroid Association (AOTA)*, Nagoya, Nov. 3, 2009
8. 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. *9th Congress of the Asia and Oceania Thyroid Association (AOTA)*, Nagoya, Nov. 3, 2009

9. 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. 25, 2009

[その他]

ホームページ等

- <http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~prevdia/>
- <http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=6453>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

早川 和生 (HAYAKAWA KAZUO)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70142594