

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590671

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の発症予防に関する研究

研究課題名(英文) Prevention of the 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(研究院)・准教授

研究者番号：30243231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：バセドウ病の発症メカニズムを明らかにするため、バセドウ病患者の末梢血単核球の培養上清中のTSHレセプター抗体(TRA b)濃度とサイトカイン濃度の相関を調べたが、相関を認めなかった。バセドウ病の発症を予防するため、TRA bの産生を抑制できる薬物がないか検討したが、抗甲状腺薬(メチマゾール)、抗CD20モノクローナル抗体(リツキシマブ)ともにTRA bの産生を抑制しなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined the correlation between the levels of TSH receptor antibody (TRA b) and cytokines in the supernatant incubated with the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the patients with Graves' disease in order to analyze the mechanism of onset of Graves' disease. However we could not find the correlation between the level of TRA b and cytokines. We tried to find the drugs that could suppress the production of TRA b in order to prevent the onset of Graves' disease. However the production of TRA b was not suppressed by anti-thyroid drug (methimazol) and anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab).

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：バセドウ病 TSHレセプター抗体

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る。我々は代表的な自己免疫疾患である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、花粉症の発症後にバセドウ病が発症・増悪することを明らかにした。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)であることを明らかにした。これらのことより、自己免疫疾患は自己免疫素因(MHC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(花粉症、出産など)が加わると、顕性の自己免疫疾患になるものと考えている。したがって、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、つまり発症予防につながるものと考えている。

I型アレルギーでは、ヘルパーT細胞(Th)のうち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る。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る。しかし従来のTRAb測定法では、バセドウ病患者の末梢血単核球培養上清中のTRAbを測定することができなかったため、メカニズムを明らかに出来ていない。

最近開発された高感度のTRAb測定法を用いれば、バセドウ病の発症予防に関する研究が可能ではないかと考え、以下の検討を行った。

2. 研究の目的

まず、バセドウ病患者の末梢血単核球の培養上清中のTRAb濃度とサイトカイン濃度を測定し、その相関を調べることでバセドウ病の発症メカニズムを明らかにする。つぎに、バセドウ病の発症を予防するため、TRAbの産生を抑制できる薬物がないか検討する。

3. 研究の方法

(1) TRAbとサイトカインとの相関の検討

バセドウ病患者の末梢血単核球の培養上清中のTRAbを高感度ELISAで測定した。一方、培養上清中のサイトカインは無刺激の状態では測定できないことが明らかになり、poke weed mitogen (PWM)ないし phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) プラス ionomycin で刺激した。その後、TRAb濃度とサイトカイン濃度の相関を調べた。

(2) 薬物によるTRAb産生抑制の有無の検討

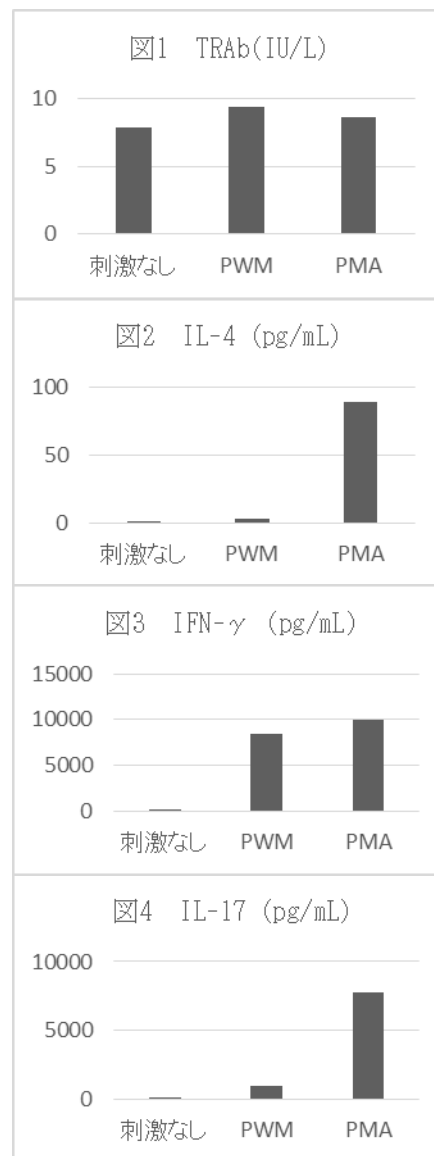
バセドウ病患者の末梢血単核球を抗甲状

腺薬であるメチマゾールないし抗CD20モノクローナル抗体であるリツキシマブと共に培養し、培養上清中のTRAbをELISAで測定した。

4. 研究成果

(1) TRAbとサイトカインとの相関の検討結果

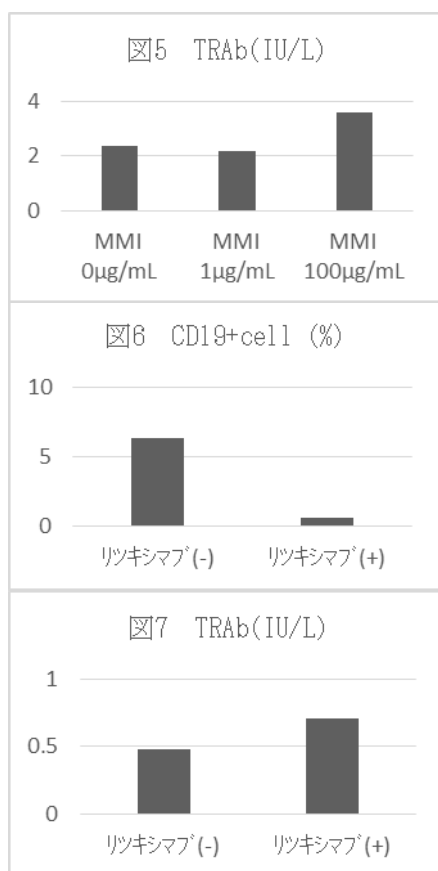
刺激物質なくてもバセドウ病患者の末梢血単核球はTRAbを産生することが明らかになった。また、刺激してもTRAb産生量がほとんど変化しないことも明らかになった(図1)。IL-4、IFN- γ 、IL-17は、刺激物質がない場合はほとんど産生されなかったが、刺激がある場合には著明に産生された(図2-4)。その後、TRAb濃度とサイトカイン濃度の相関を調べたが、相関を認めなかったことより、この方法ではバセドウ病の発症メカニズムを明らかにすることはできなかった。



(2) 薬物によるTRAb産生抑制の有無の検討結果

メチマゾールはTRAb産生を抑制しないこ

とが明らかになった(図5)。リツキシマブと共に培養することで、培養細胞中のB細胞(CD19陽性細胞)は著明に減少したが(図6)培養上清中へのTRAb産生の抑制は認められなかった(図7)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 34 件)

Date A, Maeda T, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Takano T: An Improved Protocol for mRNA Quantification After Fluorescence-Activated Cell Sorting with an Increased Signal to Noise Ratio in Flow Cytometry. *Mol Biotechnol*, 査読有, in press, 2014. DOI:10.1007/s12033-014-9733-5.

Inoue N, Watanabe M, Nobuhara T, Hidaka Y, Iwatani Y: The GG genotype of the -1125G/T polymorphism in the EPO gene protects against the development of Graves' disease. *Immunol Lett*, 査読有, 156(1-2), 156-158, 2013. DOI:10.1016/j.imlet.2013.10.006.

Inoue N, Watanabe M, Katsumata Y, Hidaka Y, Iwatani Y: Different genotypes of a functional polymorphism of the TSHR gene are associated with the development and severity of Graves' and Hashimoto's diseases. *Tissue Antigen*, 査読有,

82(4), 288-290, 2013. DOI: 10.1111/tan.12190.

Inoue N, Watanabe M, Wada M, Morita M, Hidaka Y, Iwatani Y: IL-10 -592A/C polymorphism is associated with severity of Hashimoto's disease. *Cytokine*, 査読有, 64(1), 370-374, 2013.

DOI:10.1016/j.cyto.2013.05.014.

Kimura T, Kozawa J, Matsui M, Nishizawa H, Yasuda T, Otsuki M, Iwahashi H, Kaneto H, Funahashi T, Hidaka Y, Imagawa A, Shimomura I: Pseudohypoglycemia or hyperglycemia caused by interference with self-monitoring blood glucose measurements in anticancer ascorbic acid therapy. *Journal of Diabetes Investigation*, 査読有, 4(6), 679-680, 2013. DOI:10.1111/jdi.12108.

Matsumoto C, Ito M, Yamada H, Yoshida H, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Miyauchi A, Takano T: Preparation of thyroid follicular cells for mRNA quantification after fluorescence-activated cell sorting. *Scand J Clin Lab Invest*, 査読有, 73(3), 245-252, 2013.

DOI:10.3109/00365513.2013.769624.

Inoue N, Watanabe M, Hayashi F, Hidaka Y, Iwatani Y: The association between a functional polymorphism in the CD24 gene and the development of autoimmune thyroid diseases. *Tissue Antigen*, 査読有, 81(3), 161-163, 2013. DOI: 10.1111/tan.12070.

Matsumoto C, Ito M, Yamada H, Yamakawa N, Yoshida H, Date A, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Miyauchi A, Takano T: Genes that characterize T3-predominant Graves' thyroid tissues. *Eur J Endocrinol*, 査読有, 168(2), 137-144, 2013. DOI: 10.1530/EJE-12-0507.

Inoue N, Watanabe M, Yamada H, Takemura K, Hayashi F, Yamakawa N, Akahane M, Shimizuishi Y, Hidaka Y, Iwatani Y: Associations between autoimmune thyroid disease prognosis and functional polymorphisms of susceptibility genes, CTLA4, PTPN22, CD40, FCRL3, and ZFAT, previously revealed in Genome-wide association studies. *J Clin Immunol*, 査読有, 32(6), 1243-1252, 2012. DOI: 10.1007/s10875-012-9721-0.

Mugii S, Hanada H, Okubo M, Masuda D, Takeoka K, Hidaka Y, Ohama T, Matsuyama A, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, Ishigami M, Komuro I,

Yamashita S: Thyroid Function Influences Serum Apolipoprotein B-48 Levels in Patients with Thyroid Disease. *J Atheroscler Thromb*, 査読有, 19(10), 890-896, 2012. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/19/10/19_12757/_pdf

Arakawa Y, Watanabe M, Inoue N, Sarumaru M, Hidaka Y, Iwatani Y: Association of polymorphisms in DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MTHFR, and MTRR genes with global DNA methylation levels and prognosis of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol*, 査読有, 170(2), 194-201, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04646.x.

Yamada H, Takano T, Kihara M, Hirokawa M, Yoshida H, Watanabe M, Iwatani Y, Hidaka Y, Miyauchi A: Measurement of TFF3 mRNA in aspirates from thyroid nodules using mesh filtration: The first clinical trial in 130 cases. *Endocr J*, 査読有, 59(7), 621-630, 2012. https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/59/7/59_EJ12-0077/_pdf

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*, 査読有, 87(5), 366-371, 2012. DOI: 10.3109/10520295.2012.672650.

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*, 査読有, 45(2), 129-136, 2012. DOI: 10.3109/08916934.2011.622013.

Hanada H, Mugii S, Takeoka K, Maeda I, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y: A solution for distinguishing Le(a-b-) sera in CA19-9 assays using SphereLight 180 and Architect i2000 assays. *Clin Chim Acta*, 査読有, 413(1-2), 278-281, 2012. DOI: 10.1016/j.cca.2011.09.009.

〔学会発表〕(計 73 件)

伊達亜理沙、高野 徹、渡邊幹夫、日高洋、岩谷良則：胎児性甲状腺細胞検出のための高感度 FACS-mQ の開発、日本甲状腺学会、第 56 回 (2013/11/15) 和歌山

池田勝義、大久保滋夫、松下一之、松本祐之、日高洋、康 東天、橋口照人、

土屋達行、吉田 耕、前川真人：検査目的に適合した検体の質を確保するための検体保存評価法の検討 標準化委員会プロジェクト報告、日本臨床検査意学会総会、第 60 回 (2013/11/3) 神戸

川端麻友美、渡邊幹夫、小林彩香、井上直哉、日高洋、岩谷良則：PD-1 遺伝子の機能的多型及び PD-1 発現強度と自己免疫性甲状腺疾患の病因・病態との関係、日本臨床化学学会年会 第 53 回 (2013/8/31) 徳島

竹尾映美、末久悦次、川崎富夫、徳 雅幸、林 貞夫、日高洋：凝固因子インヒビター測定法における血漿 pH の安定化法、日本検査血液学会、第 14 回 (2013/7/27) 東京

渡邊幹夫、井上直哉、山田宏哉、武村和哉、林 文明、山川法子、赤羽舞子、清水石裕、日高洋、岩谷良則：全ゲノム関連解析による自己免疫性甲状腺疾患関連遺伝子:CTLA4、PTPN22、CD40、FCRL3、ZFAT の機能的多型と病態予後との関係、日本甲状腺学会、第 55 回 (2012/11/30) 福岡

石戸奈穂子、井上直哉、渡邊幹夫、日高洋、岩谷良則：自己免疫甲状腺疾患における病態と skewed X-chromosome inactivation との関連、日本臨床検査意学会総会、第 59 回 (2012/11/30) 京都

井上直哉、渡邊幹夫、武村和哉、林 貞夫、日高洋、岩谷良則：CTLA4、PTPN22、CD40、FCRL3、ZFAT 遺伝子の個体差と自己免疫性甲状腺疾患の病態予後との関連、日本臨床化学学会年会 第 52 回 (2012/9/8) 盛岡

荒田尚子、村島温子、伊藤真也、大橋靖雄、小野瀬裕之、窪田純久、田尻淳一、浜田 昇、日高洋、深田修司、百瀬尚子、小崎健次郎、小崎里華、吉川裕之：妊娠初期に投与されたチアマゾールの妊娠結果に与える影響に関する前向き研究 (POEM スタディ): 中間報告、日本甲状腺学会、第 54 回 (2011/11/23) 大阪

高野 徹、日高洋、岩谷良則：新規臨床検査法、FACS-mQ の開発、日本臨床検査意学会総会、第 58 回 (2011/11/18) 岡山

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 の遺伝子多型と自己免疫性甲状腺疾患の病態との関連、日本臨床化学学会年会、第 51 回 (2011/8/27) 札幌

〔図書〕(計 6 件)

日高洋：甲状腺 (p.105-112) 副甲状腺 (p.112-116) 標準臨床検査医学 医学書院、東京、2013

日高洋：甲状腺機能亢進症・低下症

(p.316-320) 臨床検査のガイドライン
宇宙堂八木書店、東京、2012

日高 洋：原発性甲状腺機能低下症の診療のポイント (p.216-219) 代謝・内分泌疾患診療最新ガイドライン 総合医学社、東京、2012

阿部好文、網野信行、飯高 誠、伊藤公一、岡村 建、小澤安則、上條桂一、窪田純久、佐々木純、紫芝良昌、田尻淳一、田中祐司、對馬敏夫、中村浩淑、浜田 昇、日高 洋、深田修司、三橋知明、宮内 昭、百溪尚子、吉村 弘、内村英正、岡本泰之、小西淳二、中馱邦博、野口靖志、御前 隆：バセドウ病治療ガイドライン 2011 南江堂、東京、2011 .

日高 洋：無痛性甲状腺炎・亜急性甲状腺炎 (p.137-141) 外来でどう診る？甲状腺疾患 日本医事新報社、東京、2011

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし