

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590695

研究課題名(和文) 双生児の検査成績に基づく臨床検査値への環境因子寄与率の解明

研究課題名(英文) Contributing rate of environmental factors to clinical laboratory tests based on the data using twins

研究代表者

渡邊 幹夫 (WATANABE, MIKIO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50294088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：一卵性双生児を用いるという、一致した遺伝的バックグラウンドの条件下で臨床検査値に及ぼす環境要因を厳密に検討する研究である。予備研究として、ゲノムのメチル化率がメチル化関連酵素をコードする遺伝子の多型によって異なることと、病態に関連することを報告し、遺伝子のメチル化が病態に影響し、ひいては臨床検査値にも影響していることを明らかにした。研究期間中にサンプリングした一卵性双生児約300組のなかから甲状腺自己抗体の陽性・陰性がペア内で一致しない一卵性双生児約25 - 30組について、ゲノムDNAのメチル化の差異を解析中である。

研究成果の概要(英文)：This study was proposed to examine the environmental factors affecting to the clinical laboratory tests using monozygotic twins, who have completely concordant genetic background. We indicated preliminarily that the methylation rates were different among the genotypes of polymorphisms in gene encoding the methylation-related enzymes, and that they can affect to the prognosis of autoimmune thyroid diseases. In addition, we have found 25-30 discordant twin pairs in the positivity of thyroid-specific autoantibodies, and are analyzing the intra-pair differences of methylation rates using these twins.

研究分野：臨床検査診断学

キーワード：臨床検査 双生児 環境因子

## 1. 研究開始当初の背景

臨床検査値におよぼす影響について、遺伝的な因子と環境的な因子が存在することは広く知られており、すでに個々の検査についての遺伝因子・環境因子が多数報告されている。しかしながら厳密な遺伝因子寄与率の解析のためには環境因子を一致させることが必要であり、厳密な環境因子寄与率の解析のためには遺伝因子を一致させる必要があるにもかかわらず、特に後者の解析はヒトを対象とした場合には基本的には不可能である。従って、環境因子については疫学的な調査をもとに集団として解析することとなり、厳密な解析には限界がある。

一卵性双生児は遺伝的背景が完全に同一であり、ヒトにおける環境因子の厳密な解析対象としては唯一無二のものである。一卵性双生児や二卵性双生児を用い、臨床検査値に環境因子が及ぼす影響について研究した成果についての報告はあるが、ACE モデル解析法 (Genet Epidemiol. 34(3), 238-45, 2010 他) を用いて遺伝因子寄与率と環境因子寄与率の理論的な算出に留まっているものが多く、具体的な環境因子ごとの寄与について体系的に明らかにしているものはほとんどない。

さまざまは疾患の診断や治療、また健康診査において臨床検査は必要不可欠であるにもかかわらず、臨床検査に及ぼす環境因子の影響については、これまで厳密に解明できていなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 大阪大学大学院医学系研究科附属ツインリサーチセンターに登録している一卵性双生児と二卵性双生児を対象とし、さまざまな臨床検査値の変化への遺伝因子寄与率と環境因子寄与率を解明する。

(2) 遺伝要因を一致させた対象で、臨床検査値に影響を及ぼす具体的な環境因子を解析し、遺伝要因の違いによる環境要因寄与率の変化を明らかにする。

(3) 最終的な到達目標

環境因子が臨床検査値の変化に及ぼす影響の正確な寄与率を遺伝的個体差と関連付けて解明し、臨床検査値の個別化利用を行うためのエビデンスを構築する

## 3. 研究の方法

(1) 大阪大学大学院医学系研究科附属ツインリサーチセンターの協力を得て、センターに登録されている高齢一卵性および二卵性双生児のサンプリング時に血清検体および核酸検体を得る。ゲノム DNA は分離保存し、RNA は安定化試薬で処理して凍結保存する。

(2) 同時に以下の生体検査 (生理検査) を行

う。

身長・体重・腹囲・血圧・心電図・握力・聴力等の基本項目測定

血圧脈波測定

内臓脂肪率測定

頸動脈超音波検査

骨塩量測定

(3) 同時に、認知症スクリーニング検査として Mini-Mental State Examination (MMSE-J) および Wechsler Memory Scale-Revised (WMS-R) を行う

(4) 同時に以下の疫学的調査を行い、環境因子のデータを取得する。

Cornell Medical Index (病歴調査)

Health Practice Index (生活習慣調査)

Pittsburgh Sleep Quality Index (睡眠調査)

WHO-QOL26 または SF-36 (生活の質の調査)

WHO-Subjective Well-being Inventory (主観的健康感・満足感調査)

POMS (気分調査)

BDHQ-1-1-L (食習慣調査)

(5) サンプリングした血清検体を用いて、別表 1 に項目を示す検体検査を市原清志教授 (山口大学) による臨床検査値の国際的正常値標準化プロジェクトと同一の測定法・測定機器により行う。

(6) 核酸検体を用いた多型解析のデータを臨床検査データと併せて蓄積する

## 測定した臨床検査項目等の一覧

### 生化学検査

HbA1c TP ALB (改良 BCP 法) ALB (BCG 法) UA  
CRE UN Ca IP Fe UIBC TCHO TG HDL LDL AST  
ALT ALP AMY GGT LD CK RF ASO CysC ApoA1 ApoB  
ApoE Lp(a) CRP IgG IgA IgM C3 C4 Tf RBP TTR  
Mg sdLDL Na K Cl Total IgE

### 腫瘍マーカー

AFP CA15-3 CEA CA125 CA19-9 PSA Tg

### 内分泌機能検査等

Cortisol DHEA-S Estradiol EPO Ferritin  
Folate FT4 FT3 TSH hFSH GH hLH Insulin PRL  
Progesteron PTH -hCG Vitamin B12

### 自己抗体検査

Anti-TPO Ab, Anti-Tg Ab

### 血球検査

白血球数 赤血球数 Hb Ht MCV MCH MCHC 血  
小板数 Neu% Neu 数 Ly% Ly 数 Mo% Mo 数  
Eo% Eo 数 Ba% Ba 数

(7) 遺伝因子寄与率と環境因子寄与率の解析を行う。一卵性双生児および二卵性双生児において実施した臨床検査項目を ACE モデリング手法により解析し、それぞれの検査項目について遺伝因子寄与率および環境因子寄与率を理論的に算出する。

(ACE モデリング: 共分散構造分析を用い、一卵性双生児では遺伝因子が一致し、環境因子が共通のものとしてユニークなもの二種あ

ること、二卵性双生児では遺伝因子が二分の一共通であり、環境因子が共通のものユニークなもの二種あることを利用し、理論的に遺伝因子寄与率と環境因子寄与率をモデル化する方法)

(8)特定の臨床検査に寄与する生活環境因子を厳密に明らかにする

ACE モデリングによる理論的環境因子寄与率の高い臨床検査について、それぞれを疫学調査結果と併せて解析し、寄与率の高い環境因子を具体的に選択する。このとき、遺伝因子の違いにより環境因子の寄与率が変化する可能性を併せて検討する。

(9)環境因子がエピゲノムに及ぼす影響を解明する

環境因子寄与率の高い臨床検査について、当該臨床検査値の変動要因もしくは関連疾患に係る遺伝子をターゲットに、エピゲノム変化を解析する。具体的には、標的遺伝子のプロモータ部位のDNAメチル化・ヒストンのアセチル化やメチル化などを候補とする。

(10)臨床検査値の評価法を、環境因子を考慮して確立する

生活環境要因による臨床検査値の変動を考慮した、臨床検査値のより有効な評価方法を確立する。

#### 4. 研究成果

(1)一卵性双生児および二卵性双生児のサンプリングは併せて297組を完了した。

(2)DNAのメチル化と関連するメチル化関連酵素遺伝子多型を見出し、自己免疫性甲状腺疾患の病態と関連していることを明らかにした。

Graves' disease	Intractable		In remission		P value	Odds ratio (95% CI)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
rs2228612	35 (44.3%)	25 (53.2%)	21 (44.7%)	0.009*		
+322044/G	29 (36.7%)	1 (2.1%)	71 (75.5%)	0.033*	1.8	(1.0-3.3)
Allele	99 (62.7%)	23 (24.5%)	46 (97.9%)	0.005**	10.8	(1.4-84.5)
G Allele	59 (37.3%)	1 (2.1%)	1 (2.1%)			
AA+AG	64 (81.0%)					
GG	15 (19.0%)					

(3)甲状腺自己抗体価の陽性・陰性が不一致な一卵性双生児を相当数見出した。(現在、メチル化の相違部位を解析中)

一卵性	TgAb	TPOAb	二卵性	TgAb	TPOAb
陰性ペア	143	159	陰性ペア	20	20
陽性ペア	22	10	陽性ペア	0	0
Discordant	29	25	Discordant	5	5

#### 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19件)

Inoue, N., Watanabe, M., Katsumata, Y., Ishido, N., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: Association between functional polymorphisms in the Toll-like receptor 4 (TLR4) gene and HD severity. *Tissue Antigens* (in press) [doi: 10.1111/tan.12518]

Ishido, N., Inoue, N., Watanabe, M., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: The Relationship between Skewed X Chromosome Inactivation and the Prognosis of Graves' and Hashimoto's Diseases, *Thyroid*, 25(2), 256-61, 2015. [doi: 10.1089/thy.2014.0318]

Inoue, N., Watanabe, M., Ishido, N., Katsumata, Y., Kagawa, T., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: The functional polymorphisms of VDR, GC and CYP2R1 are involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 178(2), 262-269, 2014

Inoue, Y., Watanabe, M., Inoue, N., Kagawa, T., Shibutani, S., Otsu, H., Saeki, M., Takuse, Y., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: Associations of single nucleotide polymorphisms in pri-miR-125a and the expression of mature miR-125a with the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 178(2) 229-235

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 Letters*, 156(1-2), 156-8, 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*, 82(4), 288-90, 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*, 64(1), 370-4, 2013 [doi: 10.1016/j.cyto.2013.05.014]

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*, 81(3), 161-3, 2013 [doi: 10.1111/tan.12070]

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*, 70(2), 194-201, 2012 [doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04646.x]

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*, 32(6), 1243-52, 2012 [doi: 10.1007/s10875-012-9721-0]

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

[学会発表](計33件)

Watanabe, M., Inoue, N., 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. AACC Annual Meeting & Clinical Lab Expo 2014, Chicago, July 27-31, 2014 (AACC Clinical Diagnostic Immunology Division Poster Award

2014)(Distinguished Abstract Award 2014)

渡邊幹夫： ヒトにおける自己免疫性甲状腺疾患の発症因子と病態規定因子(シンポジウム「自己免疫性甲状腺疾患の病因・病態はどこまで明らかになったか」)、第57回日本甲状腺学会学術集会(大阪)、2014.11.13

渡邊幹夫、井上直哉、勝又由佳、日高洋、岩谷良則： バセドウ病と橋本病の感受性にそれぞれ異なる関連を示す TSHR 遺伝子の機能的多型、第42回日本臨床免疫学会総会(東京)、2014.9.25-26

渡邊幹夫： 大阪大学ツインリサーチセンターでのサンプリング成果、第12回公衆衛生セミナー(三重大学公衆衛生・産業医学分野疫学センター)、2014.2.17

渡邊幹夫、富澤理恵、井上直哉、武村和哉、日高洋、早川和生、岩谷良則： GTR 遺伝子の多型が GTR の発現および自己免疫性甲状腺疾患の予後に及ぼす影響、第41回日本臨床免疫学会総会(下関)、2013.11.27

渡邊幹夫、富澤理恵、井上直哉、武村和哉、日高洋、早川和生、岩谷良則： GTR の発現に影響する機能的遺伝子多型とバセドウ病および橋本病の予後との関連、第56回日本甲状腺学会学術集会(和歌山)、2013.11.15

Watanabe, M., Inoue, N., Yamada, H., Takemura, K., Hayashi, F., Yamakawa, N., Akahane, M., Shimizuishi, Y., Hidaka, Y., Iwatani, Y.: Association between autoimmune thyroid disease prognosis and functional polymorphisms of susceptibility genes CTLA4, PTPN22, CD40, FCRL3 and ZFAT previously revealed in Genome-wide association studies. AACC Annual Meeting & Clinical Lab Expo 2013, Houston, July 28-August 1, 2013

渡邊幹夫、富澤理恵、井上直哉、武村和哉、日高洋、早川和生、岩谷良則： GTR の発現に影響を及ぼす機能的多型と自己免疫性甲状腺疾患の予後、第20回日本遺伝子診療学会大会(浜松)、2013.7.20

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連、第55回日本甲状腺学会学術集会(福岡)、2012.11.30

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連、  
第 40 回日本臨床免疫学会総会(東京)  
2012.9.27

Watanabe, M., Morita, 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. AACC  
Annual Meeting & Clinical Lab Expo  
2012, Los Angeles, July 15-19, 2012  
(Distinguished Abstract Award 2012)

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：自己免疫性  
甲状腺疾患の病態予後と全ゲノム関連  
解析による疾患関連遺伝子である CTLA4、  
PTPN22、CD40、FCRL3、ZFAT 遺伝子の機  
能的多型との関係、第 19 回日本遺伝子  
診療学会大会(千葉) 2012.7.28

〔その他〕

ホームページ等

<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~previdiag/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

早川 和生 (KAZUO HAYAKAWA)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：0142594

加藤 憲司 (KENJI KATO)  
神戸市立看護大学・准教授  
研究者番号：70458404