

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293128

研究課題名(和文) 遺伝子の発現制御機構に基づく自己免疫疾患の発症・予後診断法の開発

研究課題名(英文) Diagnostic methods to predict the development and the prognosis of autoimmune diseases based on the regulatory mechanisms for gene expression

研究代表者

岩谷 良則 (Iwatani, Yoshinori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60168581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子の発現制御に重要な役割を担うmicroRNA(miR)等のnoncoding RNAやDNAメチル化等のエピジェネティクスを調べた結果、miRは個体内変動が大きい。miR-146aやmiR-125a、let-7aの発現レベルやmiR-125aの遺伝子多型、miRの生成に必要なDicerやDroshaの発現レベルや遺伝子多型、さらにヒストン修飾に関するSIRT1や自然免疫のTLR、そしてIL-15、TSHR、VDR、アポトーシス制御因子、ケモカイン等の遺伝子多型が自己免疫性甲状腺疾患の発症・予後と関連しており、これらが自己免疫疾患の発症・予後診断法の開発に利用できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to develop the predictive diagnostic methods for the development and prognosis of autoimmune diseases, we examined noncoding RNA such as microRNA (miRNA, miR) and epigenetic changes such as DNA methylation and histone modification, both of which have important roles in the regulation of gene expression in autoimmune thyroid diseases. Then, we found that some miRs (miR-146a, miR-125a, and let-7a), enzymes necessary for miR production (Dicer and Drosha) and for histone modification (SIRT1), single nucleotide polymorphisms of genes (TLR, IL15, TSHR, VDR, FASL, BCL, IL8, RANTES, and MIG) and the expression of these genes were useful for predicting the development and/or prognosis of autoimmune thyroid diseases. These data indicates that these regulatory factors of gene expression and single nucleotide polymorphisms can be used to develop the predictive diagnostic methods for autoimmune diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：マイクロRNA 遺伝子多型 エピジェネティクス 自己免疫疾患 予防医学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の一塩基多型 (SNP) は、ヒトのゲノムに数百万個存在する究極の遺伝子多型である。まもなく個人の遺伝子の全塩基配列の解読が極めて安価で短時間に実施可能になる (EMBO report 8:900, 2007) が、ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の探索ではオッズ比の低い結果 (<1.5) ばかり (J Hum Genet 55:195-206, 2010) であった。

しかし私達は、疾患の診断・病態分類を厳密に行い、自己免疫疾患の発症に関連する遺伝因子を、免疫学的自己寛容の破綻に関係する遺伝因子と疾病の進行 (予後) に関する遺伝因子に分けて研究することによって、潜在性の病態も含む自己免疫性甲状腺疾患の患者全体と健常人の間では差が小さいが、発症群と発症しない群の間で大きな差のある遺伝子多型 (オッズ比2.2~) を数多く見出してきた。

さらに自己免疫疾患の発症・予後に関連する因子として、今までは遺伝子 (HLA、副刺激分子、サイトカインなどの免疫制御因子と標的臓器特異分子の遺伝子) が解析されてきたが、遺伝子多型の解析も未だ不十分で (Immunol Rev 233:55, 2010, Thyroid 20:715, 2010)、さらに遺伝子の発現制御に重要な役割を担う Noncoding RNA (Immunol Rev 253:112-28, 2013) やエピジェネティクス (Nature Rev Genetics 13:679-92, 2012) に関する研究はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

自己免疫疾患は自己抗体の存在によって潜在性の段階で診断できる。発症を予知できれば、発症しない人の無駄な経過観察は省略でき、発症の予防や軽症化の研究を推進でき、極めて効率的かつ有効な医療を可能にする。

私達は既に多くの有用な発症・予後規定遺伝子の多型を発見してきたが、本研究では、遺伝子多型以外に、自己免疫疾患の発症・予後を規定している因子として、遺伝子の発現

制御に重要な働きをしている Noncoding RNA とエピジェネティクスに着目した。

そこで、自己免疫疾患の発症・予後を規定している新たな遺伝子の多型に加えて、私達が既に見出した発症・予後規定遺伝子を制御する Noncoding RNA と DNA メチル化、およびヒストン修飾を解析し、発症予知に有用な Noncoding RNA の遺伝子多型やエピジェネティックな変化を見出し、より確実な自己免疫疾患の発症・予後診断法の開発と病因・病態の解明を目的とする。

3. 研究の方法

自己免疫性甲状腺疾患の発症・予後を規定している新たな遺伝子の多型を探索すると共に、私達が既に明らかにした自己免疫性甲状腺疾患の発症・予後規定遺伝子の発現を制御している Noncoding RNA (ncRNA) [特に血清中のエクソゾームに含まれている microRNA (miRNA)] を対象とし、miRNA の発現や機能に影響する機能的な遺伝子多型 (SNP) を探索し解析する。

さらに、発症・予後規定遺伝子の発現を制御しているエピジェネティックな変化 (DNA メチル化やヒストン修飾) を解析する。

そして、それらを自己免疫性甲状腺疾患の発症群・非発症群等の病態間で比較検討することにより、発症・予後診断に有用な miRNA の SNP やエピジェネティックな変化を発見する。

解析する SNP は、NCBI 等のデータベースと、私達が既に病態別に8検体ずつマイクロアレイでタイピングした約50万の SNP データベースを基に決定し、成功率を高める。そして有用な SNP やエピジェネティックな変化を組み合わせ、より確実な自己免疫疾患の発症予知診断法を開発する。

4. 研究成果

(1) 5つの microRNA (miRNA, miR) (miR-125a, miR-146a, miR-155, let-7e, miR-106a) の個体内変動 (日内変動、日差変動) を調べた結果、CV が 70-100% とかなり大きかったが、miR-146a の発現は健常人よりも自己免疫性甲状腺疾患で約3倍高く、

病因と関連していた。(Clin Chem Lab Med 55:626-635, 2017)

(2) RANTES, IL-6, TGF- β のネガティブレギュレーターである miR-125a の遺伝子の3つの一塩基多型(SNP)(rs12976445, rs10404453, rs12975333)と、miR-125aの末梢血単核球における発現を調べた結果、rs12976445のCCゲノタイプとCアリルが健常人よりも橋本病で多く、寛解バセドウ病よりも難治性バセドウ病で多いことを発見した。またmiR-125aの発現が年齢と逆相関しており、健常人よりもバセドウ病で減弱していることを発見した。したがって、miR-125a 遺伝子の rs12976445 SNP と末梢血単核球における発現が自己免疫性甲状腺疾患の発症や予後と関連することを明らかにした。(Clin Exp Immunol 178:229-235, 2014)

(3) miR のひとつである let-7e の末梢血単核球における発現レベルと IL-10 mRNA の発現レベルおよび IL-10 陽性細胞比率を解析した結果、それらが逆相関すること、そして let-7e の発現レベルが健常人やバセドウ病よりも橋本病で高いことを発見した。したがって、let-7e が IL-10 の発現を制御することにより HD の病態と関係している可能性を明らかにした。(Endocr J 63:375-380, 2016)

(4) miR の生成に必要な RNaseIII 酵素である Dicer および Drosha と自己免疫性甲状腺疾患との関連を調べた結果、Dicer の SNP (rs1057035) がバセドウ病の発症と関連し、Drosha の SNP (rs644236) が橋本病とバセドウ病の発症の違いに関連することを明らかにした。さらに Dicer の発現が健常人よりも自己免疫性甲状腺疾患で低下し、難治性バセドウ病よりも寛解バセドウ病で低下していた。そして Drosha の発現も健常人よりも自己免疫性甲状腺疾患で低下しており、橋本病の軽症群よりも重症群で低下していた。したがって、Dicer および Drosha の SNP と発現が自己免疫性甲状腺疾患の発症と予後に関連することを解明した。

(Autoimmunity 49:514-522, 2016)

(5) 一卵性双生児のゲノムの DNA メチル化を網羅的に解析しペア間の DNA メチル化率の差を比較した結果、常染色体の DNA メチル化率の差の平均値は男の方が女よりも大きく、X 染色体の DNA メチル化率の差の平均値は女の方が男よりも大きかった。多重比較で、3つの常染色体上のメチル化部位(CpG island)と2つのX染色体上のメチル化部位が有意に男で DNA メチル化率の差が大きかったが、それらの近傍の遺伝子の関連疾患(グリオブラストーマ、自閉症、統合失調症など)がすべて男に多い疾患であったことより、男の方が環境によるエピゲノム変化を受けやすい可能性が示唆された。(BMC Med Genomics 9:55, 2016)

(6) Class nicotinamide adenine dinucleotide-dependent histone deacetylase (HDAC)である Sirtuin1 (SIRT1)と自己免疫性甲状腺疾患との関連を調べた結果、SIRT1 の SNP が甲状腺自己抗体の産生と関連することを明らかにした。

(Autoimmunity 49:329-337, 2016)

(7) 細胞内 TLR7 と TLR9 の蛍光強度比(濃度比)がバセドウ病の発症と難治度と関係し、TLR と UNC93B1 の SNP がバセドウ病の発症と関連することを明らかにした。

(Autoimmunity 26:1-10, 2016)

(8) TLR4 の SNP が橋本病の重症度と関連することを明らかにした。(Tissue Antigens 85:209-211, 2015)

(9) IL-15 の SNP が Th17 細胞の分化誘導を介して橋本病の重症度と関連することを明らかにした。(Int J Immunogenet 44:41-50, 2017)

(10) TSHR の遺伝子多型を網羅的に解析して自己免疫性甲状腺疾患との関連を調べた結果、エンハンサー領域に存在する SNP が最もバセドウ病(特に難治性バセドウ病)の発症と関連すること、さらに別のエンハンサー領域上の SNP が橋本病の発症と関連することを明らかにした。(Thyroid 27:111-119, 2017)

(11) ビタミン D 受容体 (VDR) 遺伝子の SNP が自己免疫性甲状腺疾患の発症およびバセドウ病の活動性と関連し、VDR 関連遺伝子である GC と CYP2R1 の遺伝子多型がバセドウ病の難治性と関連することを明らかにした。(Clin Exp Immunol 178:262-269, 2014)

(12) アポトーシス制御因子である FAS, FASL, TRAIL, BCL2, TNFR1, TNFR2 の遺伝子多型と自己免疫性甲状腺疾患との関連を調べた結果、FASL と BCL2 の SNP と sFas の血中レベルが免疫異常と関連することを明らかにした。(Hum Immunol 77:944-951, 2016)

(13) ケモカイン遺伝子である IL8, RANTES, MIG, IP10, MCP1, IL16 の SNP と自己免疫性甲状腺疾患との関連を調べた結果、IL8, RANTES, MIG の SNP が自己免疫性甲状腺疾患の発症と関連していること、そして RANTES の SNP がバセドウ病の若年発症と関連することを明らかにした。(Autoimmunity 49:312-319, 2016)

(14) 免疫応答を惹起する抗原提示において重要な役割を担う副刺激分子の一つである ICOS と ICOSL の SNP と自己免疫性甲状腺疾患との関連を調べた結果、自己免疫性甲状腺疾患の発症や予後に明らかな関連のある SNP はなかった。(Endocr J 63:61-68, 2016)

(15) 父方と母方由来の2つのX染色体の1つは、発生初期にメチル化によりランダムに不活性化する。しかしその不活性化が父方と母方のどちらかに偏って生じること

を skewed X chromosome inactivation (XCI) と呼ぶが、この skewed XCI がバセドウ病の難治群や橋本病の重症群で多く、自己免疫性甲状腺疾患の予後と関連することを明らかにした。(Thyroid 25:256-261, 2015)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

Otsu H, Watanabe M, Inoue N, Masutani R, Iwatani Y.: Intraindividual variation of microRNA expression levels in plasma and peripheral blood mononuclear cells and the associations of these levels with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. Clin Chem Lab Med. 2017 May 1;55(5):626-635.
doi: 10.1515/cclm-2016-0449.

Arakawa Y, Watanabe M, Takemura K, Inoue N, Hidaka Y, Iwatani Y.: The IL15 +96522 A>T functional polymorphism is related to the differentiation of Th17 cells and the severity of Hashimoto's disease. Int J Immunogenet. 2017 Apr;44(2):41-50.
doi: 10.1111/iji.12305.

Inoue N, Katsumata Y, Watanabe M, Ishido N, Manabe Y, Watanabe A, Masutani R, Hidaka Y, Iwatani Y.: Polymorphisms and expression of toll-like receptors in autoimmune thyroid diseases. Autoimmunity. 2016 Dec 26:1-10.
doi: 10.1080/08916934.2016.1261835.

Maeda T, Date A, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Takano T.: Optimization of Recovery and Analysis of RNA in Sorted Cells in

mRNA Quantification After Fluorescence-activated Cell Sorting. Ann Clin Lab Sci. 2016 Dec;46(6):571-577.

Saeki M, Watanabe M, Inoue N, Tokiyoshi E, Takuse Y, Arakawa Y, Hidaka Y, Iwatani Y.: DICER and DROSHA gene expression and polymorphisms in autoimmune thyroid diseases. Autoimmunity. 2016 Dec;49(8):514-522.

Fujii A, Inoue N, Watanabe M, Kawakami C, Hidaka Y, Hayashizaki Y, Iwatani Y.: TSHR Gene Polymorphisms in the Enhancer Regions Are Most Strongly Associated with the Development of Graves' Disease, Especially Intractable Disease, and of Hashimoto's Disease. Thyroid. 2017 Jan;27(1):111-119.
doi: 10.1089/thy.2016.0345. Epub 2016 Nov 18.

Watanabe M, Honda C; Osaka Twin Research Group., Iwatani Y, Yorifuji S, Iso H, Kamide K, Hatazawa J, Kihara S, Sakai N, Watanabe H, Makimoto K, Watanabe M, Honda C, Iwatani Y.: Within-pair differences of DNA methylation levels between monozygotic twins are different between male and female pairs. BMC Med Genomics. 2016 Aug 26;9(1):55.
doi: 10.1186/s12920-016-0217-2.

Inoue N, Watanabe M, Ishido N, Kodu A, Maruoka H, Katsumata Y, Hidaka Y, Iwatani Y.: Involvement of genes

encoding apoptosis regulatory factors (FAS, FASL, TRAIL, BCL2, TNFR1 and TNFR2) in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Hum Immunol.* 2016 Oct;77(10):944-51. doi: 10.1016/j.humimm.2016.07.232.

Akahane M, Watanabe M, Inoue N, Miyahara Y, Arakawa Y, Inoue Y, Katsumata Y, Hidaka Y, Iwatani Y.: Association of the polymorphisms of chemokine genes (IL8, RANTES, MIG, IP10, MCP1 and IL16) with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity.* 2016 Aug;49(5):312-9. doi: 10.3109/08916934.2015.1134507.

Sarumar M, Watanabe M, Inoue N, Hisamoto Y, Morita E, Arakawa Y, Hidaka Y, Iwatani Y. Association between functional SIRT1 polymorphisms and the clinical characteristics of patients with autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity.* 2016 Aug;49(5):329-37. doi: 10.3109/08916934.2015.1134506.

Kagawa T, Watanabe M, Inoue N, Otsu H, Saeki M, Katsumata Y, Takuse Y, Iwatani Y.: Increases of microRNA let-7e in peripheral blood mononuclear cells in Hashimoto's disease. *Endocr J.* 2016 Apr 25;63(4):375-80. doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0577. Epub 2016 Jan 28.

Yoshie N, Watanabe M, Inoue N, Kawaguchi H, Hidaka Y, Iwatani Y.: Association of polymorphisms in the ICOS and ICOSL genes with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Endocr J.* 2016;63(1):61-8. doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0435.

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.* 2015 Mar;85(3):209-11. doi: 10.1111/tan.12518. Epub 2015 Feb 6.

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.* 2015 Feb;25(2):256-61. doi: 10.1089/thy.2014.0318. Epub 2014 Dec 10.

Shimasue A, Yamakawa N, Watanabe M, Hidaka Y, Iwatani Y, Takano T.: Expression analysis of stemness genes in a rat thyroid cell line FRTL5. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2015 Jan;123(1):48-54. doi: 10.1055/s-0034-1389924. Epub 2014 Oct 14.

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. 2014 Nov;178(2):262-9. doi: 10.1111/cei.12420.

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 precursor-microRNA (miR)-125a and the expression of mature miR-125a with the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases. Clin Exp Immunol. 2014 Nov;178(2):229-35. doi: 10.1111/cei.12410.

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. 2014 Jul;56(7):591-8. doi: 10.1007/s12033-014-9733-5.

〔その他〕

ホームページ：

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

フェイスブック：

<https://www.facebook.com/OsakaPrevDiag>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩谷 良則 (IWATANI Yoshinori)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60168581

(2)研究分担者

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

渡邊 幹夫 (WATANABE Mikio)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授