

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860369

研究課題名(和文) Toll様受容体の発現に着目した自己免疫性甲状腺疾患の新規検査法の開発

研究課題名(英文) The development of new examination in autoimmune thyroid disease used by Toll-like receptors

研究代表者

井上 直哉 (Inoue, Naoya)

大阪大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：80710269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：TLR4 rs41426344多型において、GC + CC genotypesとC alleleの頻度が橋本病軽症群において橋本病重症群よりも増加していた。また、B細胞におけるTLR7/TLR9発現比率がバセドウ病難治群においてバセドウ病寛解群よりも増加していた。

結論として、TLR4 rs41426344多型のGC + CC genotypesは甲状腺組織破壊を抑制を通して甲状腺機能低下症が発症しにくくしており、B細胞内TLR7/TLR9発現比率はバセドウ病の発症、難治性に関係しており、Unc93b1はGDの発症に関係していた。

研究成果の概要(英文)：In the TLR4 rs41426344 polymorphism, GC + CC genotypes and C allele were more frequent in the mild HD group compared to the severe HD group. The ratio of intracellular TLR7 and intracellular TLR9 intensities in B cells was lower in patients with GD in remission than in patients with intractable GD. In conclusion, the GC + CC genotypes of the TLR4 rs41426344 polymorphism protect against thyroid destruction and are less prone to hypothyroidism. The ratio of intracellular TLR7 and intracellular TLR9 intensities in B cells was associated with the development and intractability of GD and UNC93B1 polymorphisms were associated with the development of GD.

研究分野：臨床検査

キーワード：TLR 遺伝子多型 発現解析 検査法

1. 研究開始当初の背景

(1)現在の自己免疫性甲状腺疾患に対する検査法・治療法における問題点

自己免疫疾患の中でも自己免疫性甲状腺疾患は日本人の 1/10 が発症する頻度の高い疾患である。申請者は臨床検査技師として患者の検体を日々測定している中で甲状腺自己抗体、甲状腺ホルモンは疾患の診断において有用な検査項目であるが、病態変化による測定値の変動が遅く疾患の進行度、活動度を表す指標には不十分である点に着目し、より早期に自己免疫性甲状腺疾患の進行度、活動度を表す新しい検査法を開発することで、より最適な治療を行うことが可能になると考えた。また治療では、橋本病の治療に有効な薬剤はなく、生涯にわたるホルモン補充療法のみであり、パセドウ病では抗甲状腺剤が主に用いられるが寛解導入できるのは一部であり、残りは抗甲状腺剤を服用し続ける場合や手術による全摘、アイソトープ治療による甲状腺の破壊によって甲状腺ホルモンを生産にわたり服用することになる。したがって、申請者は患者の Quality of Life(QOL)を向上するためには自己免疫性甲状腺疾患の病態解明による活動度、進行度を鋭敏に反映する新たな検査法ならびに治療法の開発が必要であると考えた。

申請者らは、これまで Single Nucleotide Polymorphism(SNP)解析を中心とした自己免疫性甲状腺疾患の予後予測検査法を開発を目的として研究を行い、免疫調節因子の病態や疾患の予後への関与を明らかとしてきたが、病態解明という点では不十分であった。免疫調節因子の発現に対する主要な免疫反応の1つが自然免疫であり、TLRは自然免疫において中心的な存在である。したがって、TLRの解析により自己免疫性甲状腺疾患の新たな検査法・治療法が開発が可能であると考えた。

(2)TLRと自己免疫疾患との関連

ヒトには10種類のTLRが存在し、それらの発現をノックアウトすることにより自己免疫疾患の発症が抑制されることからTLRが自己免疫疾患発症に重要な役割をもつことが明らかとなっている (Mills KH, Nat Rev Immunol, 2011, 807-822)。図1はTLR7、TLR9シグナルを例として示しているが、このようなTLR刺激によるサイトカイン産生、アポトーシス耐性、抗体産生促進作用が自己免疫疾患発症の原因と考えられている。したがって、自己免疫性甲状腺疾患の病態解明にはTLRとの関連を明らかにすることは不可欠である。

(3)TLR遺伝子におけるSNP解析

SNPとは、1塩基単位の変異であるが遺伝子発現に影響を与えかつ検出が容易であることから、病態解明および検査法として応用する上で非常に重要なマーカーである。TLR遺伝子に存在するSNPと自己免疫疾患との関連も報告されているが、自己免疫性甲状腺疾患

を対象とした研究はなく、自己免疫性甲状腺疾患とTLR遺伝子におけるSNPとの関連を明らかにすることは自己免疫性甲状腺疾患の病態解明の上で重要である。

(4)TLR7、TLR9発現細胞解析、Unc93b1発現解析

図1のように小胞体で合成されたTLR7、TLR9は輸送蛋白であるUnc93b1によってエンドソームに輸送され、TLR7は1本鎖RNA、TLR9はCpG-DNAと反応する。TLR7、TLR9は主に細胞内に発現するTLRであるが、近年細胞表面にもTLR7、TLR9発現していることが報告されている。細胞表面に発現している場合、抗原と直接反応できるため抗原への反応性が高いと考えられる。したがって、細胞表面、細胞内TLR7,9発現の変化が自己免疫性甲状腺疾患の病態に関与していると考えられる。また、TLR9をノックアウトした場合TLR7発現が優位となり自己免疫反応が誘導される (Santiago-Raber ML, 2010, J Autoimmun, 339-348)。Unc93b1のmutationによりTLR7発現が優位になることが報告されている (Fukui, 2011, immunity, 69-81)。したがって、Unc93b1によるTLR7、TLR9発現バランスの変化が自己免疫性甲状腺疾患の病態に関与していると考えられる。しかしながら、ヒトの自己免疫疾患において細胞内、細胞表面におけるTLR7,TLR9発現とUnc93b1遺伝子におけるSNP、Unc93b1発現との関連を解析した例はなく、これらの解析は自己免疫性甲状腺疾患だけではなく自己免疫疾患の病態解明の上で非常に重要である。

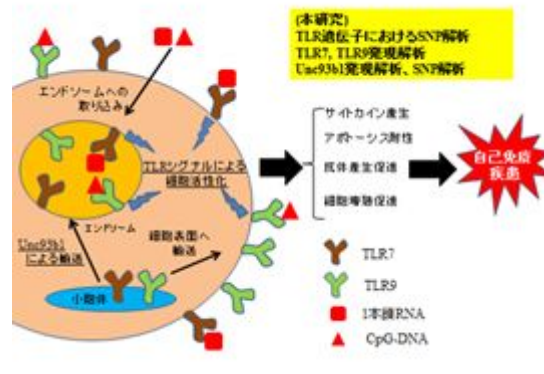


図1 自己免疫疾患におけるTLRの役割

2. 研究の目的

本研究ではTLRと自己免疫性甲状腺疾患との関連を遺伝学的・細胞学的解析法を使用することにより、自己免疫性甲状腺疾患の病態を解明し、新たな検査法、治療法の確立を目指し、そのため、以下の3つの点を明らかにすることを目的とする

(1)TLR遺伝子におけるSNPと自己免疫性甲状腺疾患との関連

自己免疫性甲状腺疾患患者、健常群から

DNA を抽出し、TLR1～10 遺伝子における SNP を解析し、これらの SNP と自己免疫性甲状腺疾患との関わりを明らかとする。

(2)末梢血単核球における TLR7,TLR 9 発現解析と自己免疫性甲状腺疾患との関連

自己免疫性甲状腺疾患患者、健常群から分離した末梢血単核球に、B 細胞抗原 CD19、TLR7、TLR9、T 細胞抗原 CD3 の計 4 色で染色し、フローサイトメーターで解析することで、細胞表面、細胞内 TLR7、TLR9 の発現細胞の割合ならびに発現強度比と自己免疫性甲状腺疾患との関わりを明らかとする。

(3)末梢血単核球における Unc93b1 発現と自己免疫性甲状腺疾患との関連

上記(2)で採取した末梢血単核球の一部から RNA を抽出し、リアルタイム PCR において Unc93b1 発現を解析する。上記(2)と同じ細胞を使用することで、細胞表面、細胞内 TLR7、TLR9 発現および発現強度比と Unc93b1 発現との関わりが明らかとなる。また、Unc93b1 遺伝子の SNP 解析も行うことで、Unc93b1 発現における SNP の影響を明らかにすることができる。

### 3. 研究の方法

(1)TLR 遺伝子に存在する SNP 解析

自己免疫性甲状腺疾患患者、健常群から DNA を抽出し、TLR1～10 に存在する SNP を解析する。

(2)末梢血単核球における TLR7,TLR9 発現解析ならびに自己免疫性甲状腺疾患との関連

自己免疫性甲状腺疾患患者、健常群血液中の末梢血単核球を B 細胞抗原 CD19、TLR7、TLR9、T 細胞抗原 CD3 の計 4 色で染色しフローサイトメーターで解析することで、末梢血単核球、リンパ球(T リンパ球、B リンパ球)、単球の細胞表面ならびに細胞内 TLR7、TLR9 の発現を評価する

(3)末梢血単核球における Unc93b1 発現と自己免疫性甲状腺疾患との関連

上記(2)にて採取した末梢血単核球から RNA を抽出し、Unc93b1 発現を解析し、同時に Unc93b1 遺伝子における SNP 解析も行う。

### 4. 研究成果

本研究により明らかとなった結果は主に 2 つの内容であり、これらはそれぞれ論文として公表している。

(1)TLR4 遺伝子多型と自己免疫性甲状腺疾患との関連

TLR4 は外来抗原として LPS と反応するが、内因性抗原として heat shock proteins や fibrinogen があり、これらによりサイトカイン産生が亢進し、自己免疫反応に関係していると予測されることから、関連性を明らかとするために、まず候補 SNP を絞り込むために、20 SNPs (rs144028493, rs11536888,

rs1057312, rs189683599, rs1064290, rs1057313, rs1057314, rs55910231, rs56332471, rs41426344, rs1064292, rs1057316, rs55861596, rs113017335, rs7869402, rs1057317, rs41296047, rs11536889, rs60972665)をランダムに選択した患者でタイピングし、マイナーアレル頻度が 5%以上であった rs41426344, rs11536889 多型に対し、PCR-RFLP 法を用いてタイピングした。その結果、以下のような知見が得られた。

rs41426344 多型において、C allele の頻度が自己免疫性甲状腺疾患患者ならびに橋本病患者において(それぞれ 5.6%、6.4%)健常群 (2.2%) よりも有意に増加していた ( $p=0.0459, 0.0311$ )。

rs41426344 多型において、GC + CC genotypes と C allele の頻度が橋本病軽症群において(それぞれ 26.7%、14.4%)橋本病重症群(それぞれ 6.8%、3.4%)よりも増加しており ( $p=0.0051, 0.0037$ )、健常群(それぞれ 4.4%、2.2%)に対しても同様に増加していた ( $p=0.0003, 0.0002$ )。

rs11536889 多型では有意な関連は認められなかった。

以上より、TLR4 rs41426344 GC + CC genotypes は橋本病の組織破壊に対して protective に働くことが示唆される結論となった。

(2)TLR7、TLR9、Unc93b1 と自己免疫性甲状腺疾患との関連

TLR と自己免疫疾患との関連が注目される分子であるが、研究背景(4)にて前述したように特に核酸に反応する TLR7、TLR9 は自己免疫疾患に対する関与が報告され、TLR7/TLR9 発現比率の増加により炎症反応が促進されることが報告されている。今回、我々は TLR7 rs179009 C/T, rs179010 C/T, rs179019 A/C、rs3853839 G/C 多型、TLR9 rs187084 C/T、rs352140C/T 多型、Unc93b1 rs3808971 A/G、rs3083238 A/G 多型をタイピングし、さらに B 細胞における TLR7、TLR9 発現を解析し自己免疫性甲状腺疾患の病態との関連を調べた結果、以下のような知見が得られた。TLR7 遺伝子は X 染色体に存在するため、男女各々において genotype、allele の頻度を解析した。

男性において、rs3853839 G allele の頻度がバセドウ病、自己免疫性甲状腺疾患患者、バセドウ病難治群において健常群よりも増加していた ( $P=0.0062, 0.0232, 0.0173$ )。

女性において、rs179009 TT genotype の頻度が橋本病患者において健常群よりも減少していた ( $P=0.0494$ )。男性では、有意な関連は認められなかった。

女性において、rs179010 CT genotype の頻度は HD 重症群では健常群よりも減少していた ( $P=0.0479$ )。

男性、女性双方において、rs179019 多

型とAITDの病態との間に有意な関連は認められなかった。

TLR9 rs352140CC genotypeの頻度がバセドウ病、自己免疫性甲状腺疾患患者において健常群よりも増加していた(P=0.0054、0.0160)。

TLR9rs352140 CC genotypeの頻度がバセドウ病難治群においてバセドウ病寛解群よりも増加していた。

TLR7rs3853839 GG genotypeをもつGD患者において、TLR9rs187084 T alleleとrs352140 C alleleの頻度がバセドウ病難治群においてバセドウ病寛解群よりも増加していた(P=0.0334、0.0023)。

B細胞におけるTLR7/TLR9発現比率がバセドウ病難治群においてバセドウ病寛解群よりも増加していた(P=0.0007)。

Unc93b1 rs308328 AA genotypeとA alleleの頻度がバセドウ病患者において橋本病患者よりも増加していた(P=0.0406、0.0316)。

これらの結果より、以下の結論を得た。

TLR7 rs3853839 G alleleは男性のバセドウ病患者の発症に関連する。

TLR7/TLR9発現比率の増加、つまりTLR7発現が優位になることはバセドウ病の難治性の一因である。

Unc93b1はバセドウ病の発症に関係する。

#### 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2件)

1. Inoue, N., Katsumata, Y., Watanabe, M., Ishido, N., Yu Manabe, Watanabe, A., Masutani, R., Hidaka, Y., Iwatani, Y: Polymorphisms in and expression of Toll-like receptors in autoimmune thyroid diseases, Autoimmunity (in press).

2. 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 85(3):209-11, 2015

[学会発表](計2件)

1. Inoue, N: The associations between TLR7 polymorphisms and autoimmune thyroid disease AACC Annual Meeting & Clinical Lab Expo 2016, Philadelphia, America, 2016.8.2

2. Inoue, N.: Association between functional polymorphisms in the Toll-like receptor 4 (TLR4) gene and HD severity. AACC Annual Meeting & Clinical Lab Expo, Atlanta, America, 2015.7.28

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井上 直哉 (INOUE Naoya)  
大阪大学医学部附属病院 臨床検査技師

研究者番号: 80710269

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

岩谷 良則 (IWATANI Yoshinori)

大阪大学大学院 医学系研究科  
保健学専攻 生体情報科学講座 教授

渡邊 幹夫 (WATANABE Mikio)

大阪大学大学院 医学系研究科  
保健学専攻 生体情報科学講座 准教授

日高 洋 (HIDAKA Yoh)

大阪大学医学部附属病院臨床検査部