

バセドウ病の疾患感受性遺伝子の同定、機能解析、臨床像との連関

● 赤水尚史

京都大学医学部附属病院・探索医療センター

＜研究の目的と進め方＞

本研究者はこれまでに、多因子性疾患の一つであるバセドウ病の遺伝的素因について検討してきた。まず、候補遺伝子アプローチとして、自己抗原であるTSH受容体遺伝子と免疫制御分子であるCTLA-4遺伝子を中心に検討し、マイクロサテライト多型マーカーによって有意な相関を得た。また、笹月・白澤らとの共同研究において、sib pairを用いたランダムスクリーニングによるポジショナルクローニングアプローチを行い、lod score 3以上の興味あるローカスを幾つか見出していた。そこで、今回の研究においては、1) 全ゲノムスクリーニングで見出されたバセドウ病疾患感受性遺伝子存在領域である5q23-33において、マイクロサテライト多型マーカーを用いて関連解析を行う。2) 5q23-33において、免疫関連遺伝子を中心として候補遺伝子をpick upし、SNPによる関連解析を行う。これによって新たな候補遺伝子を見出す、3) 臨床像（眼症の有無や重症度、抗甲状腺剤感受性や副作用、甲状腺腫の大きさなど）との関連を探る、4) エクソンとプロモーター領域のSNPについては、発現実験によって機能的解析を行う、5) 候補遺伝子の一つであるTSHレセプター遺伝子（バセドウ病の主要自己抗原遺伝子）の機能解析を行う、6) これらの遺伝子やCTLA-4、HLA遺伝子を含めて遺伝子間の相互作用を検討する、こととした。

＜研究開始時の研究計画＞（図1）

1. 候補遺伝子であるTSHレセプター遺伝子多型に関する検討：

J-SNPを中心とした新たなSNPについてまず関連解析やハプロタイプ解析を行い、陽性結果の得られたSNPに関して機能解析を行う。発現実験によってレセプター蛋白機能や発現量への影響、などについて検討する。これによって、病因・病態との直接的関与を研究する。また、予備的データではあるが、臨床像のうち抗甲状腺剤感受性や甲状腺腫の大きさとTSHレセプター遺伝子マイクロサテライト多型との関連を認めている。SNPについても種々の臨床パラメーター（眼症の有無や重症度、抗甲状腺剤感受性や副作用、甲状腺腫の大きさ、家族歴など）との関連を検討し、疾患における臨床的意義を探索する。これまで我々が収集したDNAサンプルについてはすべて詳細な患者プロフィールが保存されている（連結匿名化）ので、その豊富なデータベースが既に手元にある。

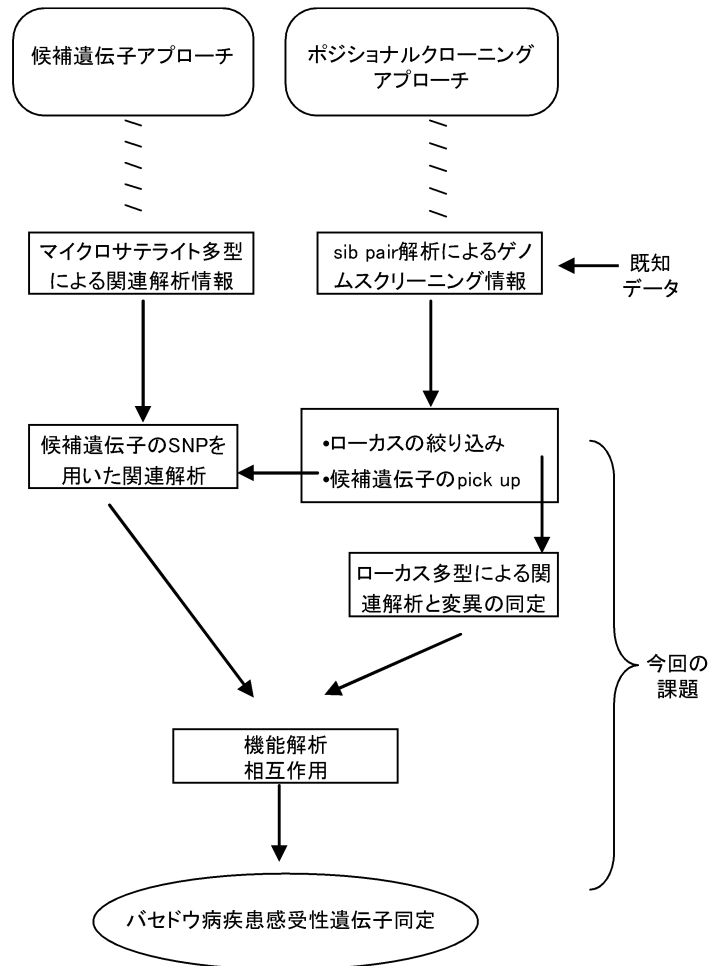


図1 研究開始時の研究計画

2. 5q23-33領域に関する検討：

共同研究において、sib pairを利用したランダムスクリーニングによるポジショナルクローニングによって高いlod scoreを示す単独頂値域を5q23-33領域に得ている。当初、この研究によるレゾリューションは10cMであるが、さらに細かいレゾリューションを有するマイクロサテライト多型マーカー(100-200kb間隔)を用いて関連解析を行う。また、この領域はサイトカインやケモカインがクラスター形成しており、他の自己免疫・アレルギー疾患との関連も多数報告されている。そこで、この領域に存在する候補遺伝子をpick upし、SNPによる関連解析を行う。これによって新たな候補遺伝子を見出し、1)と同様な機能解析や臨床像との連関に関する検討に供する。

3. 遺伝子間の相互作用の検討

上記の遺伝子やCTLA-4、HLA遺伝子を含めて遺伝子間の相互作用を検討する

4. 白澤らとの協同研究

DNAサンプル供与や実験計画の討議を通じて、Graves病と橋本病からなる自己免疫性甲状腺疾患の罹患同胞対を対象とした全ゲノムスクリーニングと罹患同胞対法による連鎖解析を協同して行った。さらに、その後の解析も協同して行った

〈研究期間の成果〉

1. TSHレセプター遺伝子多型に関する検討：

TSHレセプター遺伝子内の疾患感受性領域の絞込みを行うために、この遺伝子内におけるSNPを用いてハプロタイプブロックの存在を検討した。TSHR遺伝子内に存在するSNPの中で、5~30Kb間隔で10個のSNPを選び関連解析を行った(図2)。関連の見られた領域についてさらに関連解析を進めるとともに、連鎖不平衡(LD)解析とハプロタイプ解析を行った。

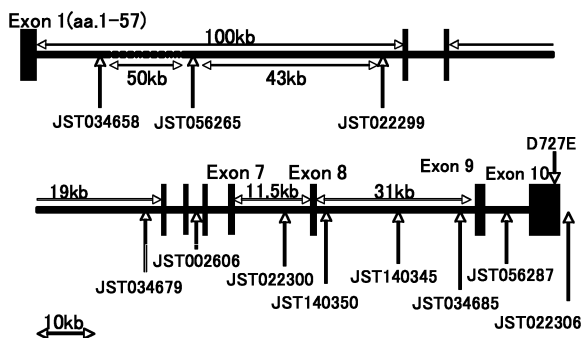


図2 関連解析に用いたTSHレセプター遺伝子のSNPの局在

これまでのSNPを用いた研究で、TSHR遺伝子領域は大きく3つのBlockに分割され、Block内haplotypeを用いた関連解析では、intron1後半からintron8前半を含む2つ目のBlockでバセドウ病と有意な関連が見られた。そこで、エクソン7から8付近に分布する10個のSNPを用いて連鎖不平衡解析を行い、3つのBlockに分割された。JST022302と連鎖不平衡にあるいくつかのSNPにおいてもバセドウ病との関連が認められた。橋本病とはこの領域内において関連は認められなかった。さらに、JST022302と連鎖不平衡の強い8つのSNP (Block3)を用いてハプロタイプ解析を行ったところ、2つのみの高頻度ハプロタイプが検出され、Major Haplotype頻度はAITD、特にGraves'で有意な上昇が見られた。

以上の結果から、TSHR遺伝子エクソン7-8領域はバセドウ病の疾患感受性領域と考えられ、研究成果1で報告した。今後、同領域SNPを用いた機能解析が必要である。

2. 5q23-3領域に関する検討：

染色体5q23-33領域について、同領域の6つのマイクロサテライト多型を用いて関連解析を行った。その結果、少なくとも2つのマーカー (D5S2115、D5S2117) において有意な関連を認めた。さらに、バセドウ病の臨床所見に基づいてsubgroup (眼症、抗体価、甲状腺腫の大きさ、抗甲状腺剤に対する反応性) に分けて各マーカーとの関連解析を行い、subgroupによる関連度の差を認めた。染色体5q23-33領域は、多数のサイトカイン遺伝子がクラスターを形成する部位であり、他の自己免疫疾患やアレルギー疾患の疾患感受性遺伝子座位として従来から興味をもたれてきた (図3)。バセドウ病に関しても全ゲノム

スクリーニングによって同病の疾患感受性遺伝子候補座位として白澤・笹月らによって見出された。今回、同領域の6つのマイクロサテライト多型のうち少なくとも2つのマーカーにおいて有意な関連を認めたことは、同領域に疾患感受性遺伝子が存在することを示唆している。さらに、バセドウ病の臨床所見に基づいてsubgroupに分けて各マーカーとの関連解析を行い、subgroupによる関連度の差を認めたことは、バセドウ病の臨床所見に関連する遺伝子である可能性を示唆している。以上の結果を研究成果2で報告した。

次いで、この領域内のCytokine Cluster・免疫関連遺伝子のSNPを用いて関連解析を行った。IL4、IL13、IL9のSNPを用いた関連解析では有意な関連が見られなかったが、IRF1のintron9にあるSNPでAITD、GDで有意な関連が見られた。そこで、このIRF1遺伝子内および、周囲のSNPを用いて関連解析を行った。関連の見られたIRF1intron9のSNP以外にこの領域では有意なSNPは見つからなかった。また、D5S2115近傍の遺伝子H2AFY、D5S2117近傍の遺伝子KIAA内のSNPを用いて関連解析を行ったが有意な関連は見られなかった。今後、多数のSNPを用いた更なる検討を要する。

3. 遺伝子間の相互作用の検討

上記の遺伝子やCTLA-4、HLA遺伝子を含めて遺伝子間の相互作用を検討した。まず、バセドウ病において関連が報告されている遺伝子、CTLA-4のCT60(3' -UTR)とHLA-DRB1 に関して関連解析を行った。CTLA-4-CT60のallele Gは自己免疫性甲状腺疾患、特にバセドウ病で頻度の有意な増加が見られ、橋本病では有意差ではなかったが頻度の増加が見られた。HLA-DRB1では特にDRB1*04の頻度がAITD、特に橋本病で上昇、またDRB1*09も橋本病で頻度が上昇していた。

次いで、上記のCTLA-4-CT60やHLA-DRB1との相互作用に関して検討を行った。その結果、CTLA-4-CT60の疾患感受性allele GとHLA-DRB1*04を共に有する頻度が健常者比べて自己免疫性甲状腺疾患、特に橋本病で有意

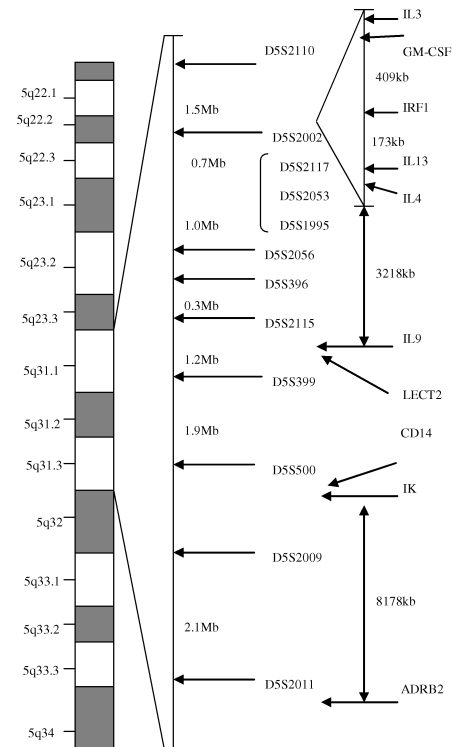


図3 5q23-q33領域の遺伝子多型や免疫関連遺伝子

に増加しており、バセドウ病ではゆるやかな増加が見られた。また、HLA-DRB1*03とallele Gを共に有する頻度は自己免疫性甲状腺疾患、特に橋本病で減少していた。

さらに、以前自己免疫性甲状腺疾患との強い関連を見出したTSHRのJST022302(intron7)と、HLA-DRB1との相互作用に関して検討を行った結果、TSHRの疾患感受性allele AとHLA-DRB1*04を共に有する頻度が健常者に比べて自己免疫性甲状腺疾患、特に橋本病で有意に増加しており、バセドウ病ではゆるやかな増加が見られた。また、HLA-DRB1*03とallele Aを共に有する頻度は自己免疫性甲状腺疾患、特に橋本病で減少していた。

以上より、HLA-DRB1と2つの遺伝子、CTLA-4-CT60、TSHRのJST022302との間には自己免疫性甲状腺疾患、特に橋本病において、軽度の相互作用が示唆された。

4. 白澤らとの協同研究

DNAサンプル供与や実験計画の討議を通じて、Graves病と橋本病からなる自己免疫性甲状腺疾患の罹患同胞対を対象とした全ゲノムスクリーニングと罹患同胞対法による連鎖解析を協同して行った。さらに、その後の解析も協同して行った

まず、罹患同胞対法による連鎖解析では、MLS>1の領域を14個の染色体の19領域に同定した。特に、橋本病の疾患感受性遺伝子座が8q23-q24領域 (MLS=3.77)に、また、自己免疫性甲状腺疾患共通のそれが5q31-q33領域 (MLS=3.14)に示唆され、研究成果3で報告した。

次いで、自己免疫性甲状腺疾患感受性領域8q23-q24から、患者515人、対照526人を対象に患者-対照相関解析を行い、新規ジंकフィンガー蛋白であるZFATを同定した。疾患感受性SNPであるEx9b-SNP10は、ZFAT遺伝子の第9イントロンに存在するが、スプライシングバリエーションのひとつであるTR-ZFATでは3コ非翻訳領域に、また相補鎖上に存在するSAS-ZFATではそのプロモーター領域にあたる。SAS-ZFATとTR-ZFATはCD19+ B細胞に発現しており、その発現量はお互いに逆相関の関係にある。また疾患相関Ex9b-SNP10 TアレルはSAS-ZFATの発現を抑制する。SAS-ZFATの低発現がTR-ZFATの高発現に関与し、B細胞の機能に影響することがAITD発症と関連するものと思われた。相補鎖上の非翻訳転写産物のプロモーター領域内SNPが自己免疫性甲状腺疾患感受性に関わることを示し、研究成果4で報告した。

最後に、CTLA4遺伝子の3つのSNPについて、日本人患者380人、健常対照者226人を対象に患者-対照相関解析を行った。JO31 SNPの患者相関GアレルはGraves disease (GD)およびAITDで相関が認められ、CTLA4遺伝子は日本人においてもGDやAITD感受性と関連することが示唆され、研究成果5で報告した。

<国内外での成果の位置づけ>

自己免疫性甲状腺疾患の遺伝子として、免疫応答関連蛋白遺伝子や甲状腺特異的自己抗原遺伝子を中心に我々を含めて複数の研究者によって検討がなされてきた。しかしながら、研究方法の違いや人種差などによるサンプルの相違などによって、HLAに関してさえ国際的なコンセンサスはまだ得られていない。TSHレセプター遺伝子多型の検討は、我々の検討が国内外において最も詳細である。TSHレセプター遺伝子のハプロタイプ解析を網羅的に初めて行い、かつバセドウ病特異的疾患感受性遺伝子の存在を初めて明らかにした。その後、イギリスのグループも我々の結果を裏づける結果を報告し、国内外で反響を呼んでいる。

日本人における全ゲノムスクリーニングの報告は我々のみである。この報告で見出された領域は欧米での検討と異なっている。バセドウ病を含む自己免疫性甲状腺疾患における5q23-q33領域の詳細な検討の報告は国内外を問わずほとんどなく、臨床像との関連を含めて我々が初めて報告した。また、この領域は他の自己免疫疾患やアレルギー疾患の感受性遺伝子領域としても興味をもたれている部位である。さらに、8q領域でのZFATの同定は世界初めてであり、その解析のダイナミックかつ精緻な点は、バセドウ病を含む自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子研究では抜きん出たものである。海外で驚嘆を呼んでいる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

エクソン7から8に存在するSNPについて、転写活性の制御、Splicing variantの可能性についての機能解析がまだ達成できていない。このような機能解析を行う実験系の確立を早急に行うことが困難であった。

バセドウ病との有意な関連を認めた5q23-33のマイクロサテライトマーカーのうち、最も強かった部位の近傍をさらに複数のマーカーで関連解析を行っているが、未だ領域を絞りきれていない。良いマーカーを選択できていないか、この部位に存在する複数のサイトカインや他の免疫関連遺伝子が疾患に複雑に関与している可能性がある。

HLAと他の候補遺伝子との相互作用の検討で明確な結果が得られなかった。その理由として、日本人バセドウ病とHLAとの関連が弱く、HLAアレルの確定不十分であることが挙げられる。

<今後の課題> (図4)

候補遺伝子であるTSHレセプター遺伝子多型の機能解析と臨床像との関連に関する検討をさらに進める必要がある。

5q23-33領域に存在するSNPによる関連解析をさらに進める必要がある。今後報告されるSNPやハプロタイプを利用して進めていく。また、これらの遺伝子多型についても機能解析と臨床像との関連に関する検討を進める

TSHレセプターや5q23-q33の候補遺伝子以外に、主要な疾患感受性遺伝子であることが明らかにされつつHLAやCTLA-4遺伝子についても全サンプルのタイピングを行い、各候補遺伝子多型間の相互作用について検討する。さらには、これらの遺伝子と環境因子との関連や相互作用も研究課題である。

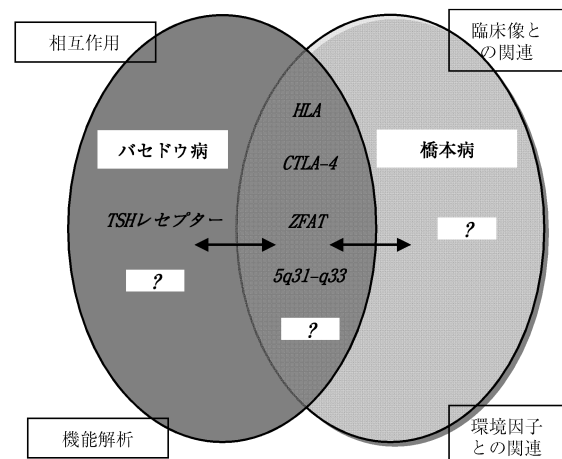


図4 今後の研究課題

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 0502231031

Hiratani H, Bowden DW, Ikegami S, Shirasawa S, Shimizu A, Iwatani Y, Akamizu T. Multiple major alleles of SNPs in intron 7 of thyrotropin receptor are associated with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (5), 6-9 (2005)

2) 30602142

Akamizu T, Hiratani H, Ikegami S, Rich SS, and Bowden DW. Association study of autoimmune thyroid disease at 5q23-33 in Japanese patients. *J Hum Genet*, 48(5):236-242, (2003)

3) 0110301441

Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, Ito K, Tamai H, Kuma K, Akamizu T, Tanimura M, Furugaki K, Yamamoto K, Sasazuki T. Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum Mol Genet*. 10:1379-86 (2001)

4) 0408171807

Shirasawa S, Harada H, Furugaki K, Akamizu T, et al. SNPs in the promoter of a B cell-specific antisense transcript, SAS-ZFAT, determine susceptibility to autoimmune thyroid disease. *Hum Mol Genet*. 13:2221-31, (2004)

5) 0408171757

Furugaki, K., Shirasawa, S., Ishikawa, N., Ito, K., Ito, K., Kubota, S., Kuma, K., Tamai, H., Akamizu, T., Hiratani, H., Tanaka, M., and Sasazuki, T. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with Graves' disease and autoimmune thyroid disease in the Japanese. *J Hum Genet*. 49(3),166-168 (2004)