

Title	橋本病・バセドウ病患者の予後評価におけるIL1RN <sup>{VNTR}</sup> 遺伝子多型の有用性
Author(s)	磯野, 萌子
Citation	平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2017
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/60313">https://hdl.handle.net/11094/60313</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	磯野萌子	学部 学科	医学部 保健学科	学年	3年
ふりがな 共同 研究者名		学部 学科		学年	年
アドバイザー教員 氏名	岩谷良則	所属	医学系研究科保健学専攻 生体情報科学講座		
研究課題名	橋本病・バセドウ病患者の予後評価における IL1RN <sup>VNTR</sup> 遺伝子多型の有用性				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。				

### ○緒論

自己免疫性甲状腺疾患には橋本病とバセドウ病が存在する。橋本病は自己免疫反応により甲状腺に慢性炎症が生じて甲状腺組織が破壊される疾患で、バセドウ病は抗 TSH レセプター抗体 (TRAb) により甲状腺が刺激されて甲状腺機能亢進症を呈する疾患である。橋本病は約 10 人に 1 人の有病率ととても多いが、甲状腺機能低下症になる重症例は約 2 割と少ない。しかし、誰が機能低下になるかわからないので全員定期的に検診する必要がある。また、バセドウ病も抗甲状腺剤で寛解しない難治例は約 3 分の 2 と多いが、そのことが判明するのに数年を要する。従って、橋本病の重症例やバセドウ病の難治例になる病態の予後をあらかじめ予測することができれば、その医療効果は極めて大きい。

病気の発症や予後（重症度・難治度）は遺伝因子と環境因子によって規定されているが、橋本病とバセドウ病の場合は遺伝因子の関与が約 75% と大きい<sup>1</sup>。そして最近、自己免疫性甲状腺疾患、特にバセドウ病の難治性に対して IL-1 の産生能が高くなる遺伝子多型が関与していることが明らかになり<sup>2</sup>、さらに IL-1 の炎症反応を阻害する蛋白 IL-1Ra をコードする遺伝子 *IL1RN* 上の 86bp 繰り返しのコピー数多型 (rs2234663)<sup>3</sup> が橋本病<sup>4</sup> やバセドウ病<sup>5</sup> の発症に関連することが報告された。そこで本研究では、この *IL1RN* 遺伝子多型が橋本病およびバセドウ病の発症や予後の予測に有用ではないかと考え、この多型と自己免疫性甲状腺疾患との関連を調べた。

### ○対象

TRAb 陽性で甲状腺中毒症を発症した病歴をもつ患者をバセドウ病とし、そのうち抗甲状腺剤治療を 5 年以上行っても TRAb が陰性化せず、寛解導入できなかった患者を難治群、5 年未満の抗甲状腺剤治療で TRAb が陰性化し、投薬中止後 2 年以上無投薬でも甲状腺機能が正常である患者を寛解群とした。また、抗甲状腺マイクロゾーム抗体と抗サイログロブリン抗体の一方または両方が陽性である患者を橋本病とし、そのうち 50 歳以下で甲状腺機能低下症を発症して治療が必要な患者を重症群、50 歳を超えても甲状

腺機能が正常である患者を軽症群とした。甲状腺機能正常で、甲状腺自己抗体が陰性である者を健常群とした。

本研究では、日本人の健常群 89 名、バセドウ病患者 164 名（難治群 68 名、寛解群 50 名）、橋本病患者 146 名（重症群 72 名、軽症群 49 名）を対象とした。

#### ○方法

アドバイザー教員である岩谷教授の研究室に保存されているゲノム DNA を用いて解析を行った。本研究でのゲノム使用にあたっては、ゲノム提供者から研究目的の利用への同意書を得、また大阪大学研究倫理審査組織の承認を得て実験・解析を行った。

##### ①PCR 増幅

5' -CTCAGCAACACTCCTAT-3' と 5' -TCCTGGTCTGCAGGTAA-3' の 2 つのプライマーを用いて PCR 法により増幅し、②以降の *ILIRN* rs2234663 多型のタイピングに用いた。増幅条件は以下の通りである。

94°C 5min → {94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s} × 35 cycles → 72°C 7min

##### ②電気泳動

PCR 産物はアクリルアミドゲルにより電気泳動を行った。ゲルの組成は 30%アクリルアミド 2mL、1×TBE 6mL、APS 160 μL、TEMED 8 μL とし、電気泳動条件は 150V, 0.1mA で一時間程度とした。

##### ③染色

電気泳動後はエチジウムブロマイド染色を行い、可視化したバンドの PCR 産物長を判定することにより多型を分類した。先行研究では、PCR 産物として 410bp (A1, 4 repeat)、240bp (A2, 2 repeat)、325bp (A3, 3 repeat)、500bp (A4, 5 repeat)、595bp (A5, 6 repeat) が報告されており、本研究でもこれらのバンドが観察された。

##### ④解析

それぞれの患者群における多型の頻度を、 $\chi^2$ 適合度検定および Fisher の直接確率検定により統計学的に解析した。

#### ○解析結果

① *ILIRN* rs2234663 遺伝子多型の genotype 及び allele 頻度とバセドウ病及び橋本病の疾患感受性には有意な関連が見られなかった (表 1)。

② *ILIRN* rs2234663 遺伝子多型の A1A1 genotype 及び A1 allele の頻度は、橋本病の軽症群よりも重症群で有意に低かった (表 2)。

---

表1 *IL1RN* rs2234663 遺伝子多型と自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性との関連

	健常群	バセドウ病		橋本病	
	n (%)	n (%)	p value	n (%)	p value
<b>genotype</b>					
A1A1	80 (89.9)	147 (89.6)	n.s.	131 (89.7)	n.s.
A1A2	7 (7.9)	11 (6.7)	n.s.	12 (8.22)	n.s.
A1A3	2 (2.3)	0 (0)	n.s.	0 (0)	n.s.
A1A4	0 (0)	4 (2.4)	n.s.	3 (2.05)	n.s.
A1A5	0 (0)	1 (0.6)	n.s.	0 (0)	n.s.
A2A2	0 (0)	1 (0.6)	n.s.	0 (0)	n.s.
<b>carrier</b>					
A1	89 (90.8)	163 (90.6)	n.s.	146 (90.7)	n.s.
A2	7 (7.1)	12 (6.7)	n.s.	12 (7.5)	n.s.
A3	2 (2.0)	0 (0)	n.s.	0 (0)	n.s.
A4	0 (0)	4 (2.2)	n.s.	3 (1.9)	n.s.
A5	0 (0)	1 (0.6)	n.s.	0 (0)	n.s.
<b>allele</b>					
A1	169 (94.9)	310 (94.5)	n.s.	277 (94.9)	n.s.
A2	7 (3.9)	13 (4.0)	n.s.	12 (4.1)	n.s.
A3	2 (1.1)	0 (0)	n.s.	0 (0)	n.s.
A4	0 (0)	4 (1.2)	n.s.	3 (1.0)	n.s.
A5	0 (0)	1 (0.3)	n.s.	0 (0)	n.s.

表2 *IL1RN* rs2234663 遺伝子多型と自己免疫性甲状腺疾患の病態との関連

	バセドウ病			橋本病		
	難治群	寛解群	p value	重症群	軽症群	p value
	n (%)	n (%)		n (%)	N (%)	
<b>genotype</b>						
A1A1	59 (86.7)	42 (84.0)	n.s.	61 (84.7)	47 (95.9)	<b>0.0385</b>
A1A2	6 (8.8)	5 (10.0)	n.s.	9 (12.5)	2 (4.1)	n.s.
A1A3	0 (0)	0 (0)	n.s.	0 (0)	0 (0)	n.s.
A1A4	2 (2.9)	2 (4.0)	n.s.	2 (2.8)	0 (0)	n.s.
A1A5	1 (1.5)	0 (0)	n.s.	0 (0)	0 (0)	n.s.
A2A2	0 (0)	1 (2.0)	n.s.	0 (0)	0 (0)	n.s.
<b>carrier</b>						
A1	68 (88.3)	49 (86.0)	n.s.	72 (86.8)	49 (96.1)	n.s.
A2	6 (7.8)	6 (10.5)	n.s.	9 (10.8)	2 (3.9)	n.s.
A3	0 (0)	0 (0)	n.s.	0 (0)	0 (0)	n.s.
A4	2 (2.6)	2 (3.5)	n.s.	2 (2.4)	0 (0)	n.s.
A5	1 (1.3)	0 (0)	n.s.	0 (0)	0 (0)	n.s.
<b>allele</b>						
A1	127 (93.4)	91 (91.0)	n.s.	133 (92.4)	96 (98.0)	<b>0.0437</b>
A2	6 (4.4)	7 (7.0)	n.s.	9 (6.3)	2 (2.0)	n.s.
A3	0 (0)	0 (0)	n.s.	0 (0)	0 (0)	n.s.
A4	2 (1.5)	2 (2.0)	n.s.	2 (1.4)	0 (0)	n.s.
A5	1 (0.7)	0 (0)	n.s.	0 (0)	0 (0)	n.s.

○考察

本研究の結果、*IL1RN* rs2234663 遺伝子多型の A1A1 genotype 及び A1 allele の頻度が、橋本病の軽症群よりも重症群で有意に低かった。さらに、これらの頻度は、重症群で健常群よりも低く、軽症群で健常群よりも高い値であったことより、この genotype のもつ機能の大小が橋本病の病態（重症度）に関与している可能性が示唆された。A1A1 genotype の機能に関して、*H. pylori* 感染患者の胃幽門部の粘膜における *IL-1β* 遺伝子の発現が A1A1 genotype < A1A2 genotype < A2A2 genotype であり A2 non-carrier < A2 carrier であったこと<sup>6</sup>、さらに末梢血単核球の *IL-1β* 産生能が A2 allele を持つ人の方が A2 allele を持たない人よりも強かったこと<sup>7</sup>より、*IL1RN* rs2234663 遺伝子多型の A1A1 genotype では *IL-1β* 産生能が弱いと考えられた。従って、橋本病の重症群では A1A1 genotype の頻度が重症群のほうが軽症群よりも低かったことより、*IL-1β* の産生能は重症群のほうが軽症群よりも強いと考えられた。そして *IL-1β* は *IFN-γ* 産生細胞を増殖し細胞障害性 T 細胞が増強するため<sup>8</sup>、橋本病の甲状腺組織障害が進行して重症になると考えられた。しかし以前、*IL-1β* 産生能の高い *IL-1β* 遺伝子多型の genotype はバセドウ病の難治群に多かったが橋本病の重症群では有意差がなかったことより<sup>2</sup>、バセドウ病の難治化や橋本病の重症化

には、IL-1 $\beta$ に加えて、IL-1 $\beta$ 以外の別の因子が関与している可能性が示唆された。または *IL1RN* rs2234663 遺伝子多型の別の機能によるものかもしれない。

さらに、有意差は得られなかったものの、橋本病において、A2 allele をもつ患者が軽症群よりも重症群で多い傾向がみられた。この傾向は、今回の橋本病の病態間で認められた A1A1 genotype 及び A1 allele の頻度の差を反映しているものと考えられる。今までの *IL1RN*rs2234663 遺伝子多型に関する報告における、A2 allele の頻度が SLE<sup>9</sup> や潰瘍性大腸炎<sup>10</sup> などの自己免疫疾患の重症患者で多いという知見<sup>1</sup>とも一致している。従って、A1 や A2 allele の頻度のバランスが自己免疫疾患の病態・重症度に関連している可能性が示唆された。

*IL1RN* rs2234663 多型のような繰り返し配列は、インターフェロン $\alpha$  (IFN $\alpha$ )サイレンサーA、インターフェロン $\beta$  (IFN $\beta$ )サイレンサーB、急性期反応タンパクの結合部位として機能的に重要であることが知られている<sup>3</sup>。たとえば、IFN $\alpha$ の産生においてリピート数の違いにより IFN $\alpha$ の産生量が変化することが報告されているように<sup>11</sup>、本研究で解析した *IL1RN* rs2234663 多型においてもリピート数の違いが IFN $\alpha$ の産生抑制能の違いや IL-1Ra の産生量に影響し、橋本病やバセドウ病を含む自己免疫疾患の発症や病態の予後に関係している可能性が考えられた。

先行研究では、橋本病では A1A3 genotype が多く A1A4 genotype が少ないことがチュニジア人で報告されている<sup>4</sup>。しかし本研究では、橋本病の A1A3 および A1A4 genotype 頻度に有意差は認められなかった。また、バセドウ病で A2 carrier 及び A2 allele の頻度が有意に高いことがイギリスで報告されている<sup>5</sup>が、これらも本研究では有意差を認めなかった。これらの違いは、表3に示すように *IL1RN*rs2234663 多型の allele 頻度の人種差が大きいためであると考えられた。

今回、橋本病の重症群と軽症群で認められた *IL1RN* rs2234663 遺伝子多型の A1A1 genotype の頻度の差は、今までに解明された Th1、Th2、Th17 系の主なサイトカインの差に比べると小さいが、明確に橋本病の重症度を規定する遺伝因子であるため、橋本病の予後予測に有用であると考えられた。

表3 人種別 *IL1RN* rs2234663 遺伝子多型の allele 頻度

Allele	日本人の頻度 (%) <sup>12</sup>	中国人の頻度 (%) <sup>13</sup>	チュニジア人の頻度 (%) <sup>4</sup>	イギリス人の頻度 (%) <sup>5</sup>
A1	95.0	93.1	83.6	73.4
A2	4.1	5.8	10.4	24.1
A3	0.9	0.17	2.6	2.1
A4	0.0	0.96	3.2	0.4
A5	No data	No data	0.2	No data

## ○結語

*IL1RN* rs2234663 遺伝子多型は橋本病の病態（重症度）と関連しており、橋本病の予後予測に有用であると考えられた。

○参考文献

1. Thomas H.B., Laszlo H. 2012. Twin studies as a model for exploring the aetiology of autoimmune thyroid disease. *Clinical Endocrinology*.76(4)457-464
  2. Hayashi F, Watanabe M, Nanba T, et al. 2009. Association of the -31C/T functional polymorphism in the interleukin-1b gene with the intractability of Graves' disease and the proportion of T helper type 17 cells. *Clinical and Experimental Immunology*,158(3)281-286
  3. Tarlow J.K., Blakemore A.I.F., Lennard A, et al. 1993. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron-2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat, *Human genetics* ,91(4):403-404
  4. Zaaber I, Mestiri S, Marmouch H, et al. 2014. Polymorphisms in TSHR and *IL1RN* genes and the risk and prognosis of Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity*, 47(2):113-118
  5. Blakemore A.I.F. P.F.Watson, A.P. Weetnan, et al. 1995. Association of Grave's Disease with an Allele of the Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 111-115.
  6. García-González MA, Aísa MA, Strunk M, et al. 2009. Relevance of IL-1 and TNF gene polymorphisms on interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha gastric mucosal production. *Human Immunology*.70(11)935-945
  7. Santtila, Savinainen, Hurme, 1998. Presence of the IL-1RA Allele 2 (IL1RN\*2) is Associated with Enhanced IL-1b Production *In Vitro*,*Scandinavian journal of immunology*,47(3)195-198
  8. Ben-Sasson SZ, Wang K, Cohen J, et al. 2013. IL-1b strikingly enhances antigen-driven CD4 and CD8 T-cell responses. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*,78;117-124
  9. Blakemore A.I.F, Tarlow J.K., Cork M.J., Gordon C, et al. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum* 37: 1380-1385
  10. Mansfield J.C., Holden H, Tarlow J.K., et al. 1994. Novel genetic polymorphism between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 106:637-642
  11. Kuhl D, Fuente J de la, Chaturvedi, et al. 1992. Cloning and chromosome mapping of the human interleukin-1 receptor antagonist gene. *Cytokine* 4:83-89
  12. Suzuki H, Matsui Y, Kashiwagi H, et al. 1997. Interleukin-1 receptor antagonist gene
-

polymorphism in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40(2)  
389-90

13. Zhibin H, Minhua S, Yijang C, et al. 2006. Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene (*IL1RN*<sup>\*2</sup>) is associated with a decreased risk of primary lung cancer. *Cancer Letters* 236 2
- 
-