

葛瑞夫茲氏病 (Graves' disease) 遺傳研究新進展

陳沛隆 張天鈞

國立台灣大學醫學院及附設醫院 內科

摘 要

葛瑞夫茲氏病是造成甲狀腺機能亢進的最重要原因，也是器官專一性自體免疫性疾病中盛行率較高的疾病。隨著基因體研究及統計學的發展，葛瑞夫茲氏病的遺傳研究在最近幾年也有快速的進步。本文首先對葛瑞夫茲氏病的臨床表現、檢查數據、以及致病機轉做簡單的回顧，接著對文獻上到目前為止的動物模式做系統性的整理，之後列舉葛瑞夫茲氏病與遺傳有關的證據，並介紹多因子性多基因性疾病的遺傳研究方法，最後則總結全球目前對葛瑞夫茲氏病基因研究的最新進度。葛瑞夫茲氏病的遺傳研究目前主要侷限在高加索人種的族群，非高加索族群的研究是一個很有潛力的領域。

關鍵詞：葛瑞夫茲氏病 (Graves' disease)

自體免疫性甲狀腺疾病 (Autoimmune thyroid disease)

動物模式 (Animal model)

遺傳研究 (Genetic study)

關聯分析 (Linkage analysis)

前言

葛瑞夫茲氏病 (Graves' disease，非英語系歐洲國家稱為 von Basedow's disease) 是造成甲狀腺機能亢進的最重要原因。根據英國所做的流行病學調查¹，在女性族群中盛行率大約是 2.7%，如果再加上橋本氏甲狀腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)，而成爲自體免疫性甲狀腺疾病這個範疇的話，整個盛行率直逼糖尿病，是內分泌領域中非常重要的疾病。相當多的人力已經投入這個疾病的研究，希望對於診斷、治療，以及預測能有所幫助。

還有另一個原因使得葛瑞夫茲氏病的研究受到重視，那是因爲這個疾病算是器官專一性自體免疫性疾病 (organ specific autoimmune diseases) 的代表，相較於其他的器官專一性自體免疫性疾病，葛瑞夫茲氏病的盛行率高，有明顯的臨床表現，而且有很好的血清學、抗體學、細胞學，以及影像學檢查，來作爲疾病活性的監測指標，相對上是比較容易著手的。而如果能夠在葛瑞夫茲氏病的致病機轉以及遺傳形式有所突破的話，對其他自體免疫性疾病的研究，將有非常重大的影響。

幾十年來在葛瑞夫茲氏病的病理生理學研究，有不少進步，但也遭遇到瓶頸，尤

其是在遺傳以及基因方面的探討，一直走得很辛苦。最近幾年來由於基因體計畫 (genome project) 的快速進展，以及其他遺傳學工具的出現，使得基因的研究再現曙光。一個很有前景的想法，是藉著遺傳及基因研究的突破，再回頭帶領病理生理學研究的前進。

葛瑞夫茲氏病的臨床表現及檢查數據

葛瑞夫茲氏病好發於生育年齡的女性，男性與女性的發病比例約為 1:10。臨床上的典型特徵包括了瀰漫性甲狀腺腫 (diffuse goiter)、甲狀腺功能亢進 (hyperthyroidism) 的系列表現、甲狀腺眼病變 (infiltrative orbitopathy)，以及脛前黏液水腫 (infiltrative dermopathy)。在每一個個別病人身上，以上這四項特徵可能單獨發生，也可能好幾項同時發生，但大致上的進程是彼此獨立的²。實驗室的檢查數據主要有甲狀腺激素的上升(包括 T3, T4,及 free T4 等)，以及 TSH (thyroid-stimulating hormone) 的下降。影像學及核子醫學的檢查，可以發現瀰漫性甲狀腺腫大及活性增加。

臨床上常用來作為檢查的自體抗體包括了 anti-TSHRAb (anti-TSH receptor antibodies)，anti-hTgAb (anti-human thyroglobulin antibodies, or ATA) 以及 anti-hTPOAb (anti-human thyroid peroxidase antibodies，或叫做 AMA, anti-microsomal antibodies)。這些自體抗體和橋本氏甲狀腺炎的自體抗體有相當多的重複的地方，也因此這兩個疾病常被統一放在自體免疫性甲狀腺疾病這一個更大的範疇之中來作為討論。特別要提的是，anti-TSHRAb 相對而言，是對葛瑞夫茲氏病較具有專一性的 (表一)，在以下的討論之中，也會介紹它與整個疾病的病理生理學上的關連。

如果把葛瑞夫茲氏病病人的甲狀腺拿來做病理檢查，可以看到淋巴球非均勻性浸潤 (non-homogeneous infiltration)，卻沒有甲狀腺濾泡 (follicles) 的破壞。雖然說這些淋巴球是混合性的，不過主要是以 T 淋巴球 (T lymphocytes) 為主，而且是以記憶性 T 淋巴球為主，不過這些表現在不同的病人可有相當程度的差別^{2,3} (表二，三)。

葛瑞夫茲氏病的致病機轉

葛瑞夫茲氏病的致病機轉其實還沒有定論。如果根據血液中的甲狀腺激素及種種自體抗體的變化，以及病理學在甲狀腺、眼窩組織以及皮下組織的發現，可以有以下推論：首先，會有 T 淋巴球浸潤在甲狀腺內，然後透過某些尚未清楚的機轉，這些 T 淋巴球會被活化，進而刺激 B 淋巴球的增生並製造甲促素受器抗體 (TSH receptor antibody)，跟著下一步就是造成瀰漫性甲狀腺腫及甲狀腺機能亢進。而甲狀腺眼病變以及脛前黏液水腫，雖不是甲促素受器抗體直接引起，但亦與 T 淋巴球有關²⁻⁵。

至於最開始為何 T 細胞會被活化而產生自體免疫的現象，目前有兩種假說：第一種是 molecular mimicry，認為某些感染物或是其他物質和甲狀腺內的 (尤其

是甲促素受器) 某些部分構造相像,而使得個體對自己身上甲狀腺內的抗原產生了自體免疫。第二種假說是 bystander hypothesis ,這種假說認為某些甲狀腺內傷害 (intra-thyroidal insult),譬如說是由病毒造成的,有可能會同時活化那時候在甲狀腺內的 T 細胞,接著 T 細胞可能會增加 HLA class I molecules 的表現,也促進甲狀腺濾泡細胞 HLA class II molecules 的表現,進而有效的造成某些針對甲狀腺自體抗原來反應的淋巴球增生 2。

這種種的假說,都需要靠分子生物學或是動物模式的研究才能支持。如果能找到確切的遺傳模式,則會更有幫助。

葛瑞夫茲氏病到目前為止的動物模式

很可惜的,葛瑞夫茲氏病到目前為止,並沒有很好的動物模式。

好的動物模式,往往可以對疾病的瞭解有突破性的幫助。即使是不完全吻合的動物模式,也可以拿來釐清許多觀念。

然而,自然界原有的自體免疫性疾病的動物模式本來就非常少。一直以來,比較好的自體免疫性甲狀腺疾病的動物模式只有 obese strain chicken、BB rat、以及某些 non-obese diabetic(NOD) mice。在以上的例子中,可以找到破壞性甲狀腺炎 (destructive thyroiditis),分別是針對 thyroglobulin (在 chicken 及 rat),以及 thyroid peroxidase (在 mouse) 而產生自體免疫。不論如何,長久以來一直沒有針對甲促素受器 (就如同葛瑞夫茲氏病致病機轉一般) 產生自體免疫的動物模式可以來研究。

在這裡簡短介紹一下甲促素受器這個分子,以及它的基因。甲促素受器基因位於 chromosome 14q31,原長 60 kilobases,由十個 exons 組成,產生的 mRNA 長度是 4 kilobases 左右。前 9 個 exons 構成了甲促素受器的大部分細胞外區域,而最大的第 10 個 exon 則是含有甲促素受器的部分細胞外區域、全部的細胞膜區域、以及全部的細胞內區域。甲促素受器本身含有 743 個胺基酸,分子量大約是 84.5kDa,其構造和 LH/CG receptor 具有 homology,也都隸屬於 G-protein 這個範疇之中。這個分子的 extracellular domain 還會經過一次的切割,然後靠雙硫鍵彼此連結。至於說甲促素受器的自體免疫的決定,一直就是很熱門的研究主題,目前的結果顯示可能不是靠某幾個特殊位置的胺基酸序列,而主要是根據某些整體結構而決定。人體其他組織也可能會有甲促素受器基因的表現,譬如說,甲促素受器的 mRNA 就可以在眼睛的 adipocytes or preadipocytes 找到 4,5,而在人體脂肪組織也被證實具有 TSH-binding and immunoreactivity。

根據葛瑞夫茲氏病的病理生理學原理,適當的動物模式就是想辦法引發動物產生對於甲促素受器的抗體,而能夠達到 (或一部份達到) 以下之表現 6:(1) 血中 thyroxine 值上升以及 (或是) TSH 值下降,(2) 針對甲促素受器產生抗體,最好是刺激性抗體,(3) 改變甲狀腺結構,(4) 淋巴球性甲狀腺炎,(5) 甲狀腺機能亢進的表現,(6) 類似甲狀腺眼病變的眼球變化,以及(7) 在脛前皮膚 (pretibial skin) 出現淋巴球浸潤。

有以下數種方式曾經被嘗試過：

最開始是試著使用分離出來的或是合成的 peptides or fragments of the receptor (由細菌或是昆蟲細胞中來製造) 配合著一些 immunological adjuvants 來打入動物體內，這樣子的方法僅能零星的引發某些葛瑞夫茲氏病的症狀。

Genetic immunization of inbred mice (將甲促素受器的 DNA 直接注射進入動物肌肉) 大部分能夠造成甲狀腺炎，但可惜的是很少產生甲狀腺刺激性抗體。另一個方法是把已經被活化的 (以 in vitro 的方式) T 淋巴球送入相同基因的動物體內⁷。這個方式在 non-obese diabetic (NOD) mice 會引起破壞性甲狀腺炎，而在 BALBc mice 則會造成淋巴球性甲狀腺炎 (17/25)，更有趣的是在這些具有甲狀腺炎的 BALBc mice 眼窩，還可以看到類似人類甲狀腺眼病變的一些變化。但是，此方法不能產生甲狀腺刺激性抗體，也沒有甲狀腺機能亢進。再一個方法是利用基因工程的方法，in vitro 使得 mice 的 fibroblast 同時表現有人類完整的甲促素受器以及鼠類的第二類主要組織相容複合體 (MHC class II)，然後植入相同基因的 AKR/N mice 中，此方法被發現可以產生甲狀腺刺激性抗體，也的確會造成甲狀腺素上升以及甲狀腺亢進的情形。不過這個方法產生的老鼠並不具有甲狀腺炎的表現。

以上這些方法，都是利用了 "inbred" mouse strains。最近有個看起來很有前景的方法，是選擇了另一種老鼠，NMR outbred strain，這種老鼠以前就知道沒有辦法接受皮膚移植，所以推測免疫機轉和先前提到的其他老鼠可能有些根本上的不同。實驗者把 genetic immunization 的方法用在這一種老鼠上，結果在 30 隻 female mice 內有 4 隻造成了甲狀腺素上升、甲狀腺刺激性抗體產生、甲狀腺炎，以及眼病變的情形⁸。看起來值得繼續發展下去。

基因學的研究以及動物模式是相輔相成的，當初 type 1 DM 的基因的找尋也得力於動物模式 (譬如說 non-obese diabetes mice) 頗多。我們很樂見目前動物模式研究的進展。在此，將到目前為止的一些進展整理如下 (見表四)。

葛瑞夫茲氏病與遺傳有關的證據

葛瑞夫茲氏病一直以來就被相信具有遺傳成份，因為我們常會觀察到同一個家族中有兩個以上罹病的人。事實上，根據統計，葛瑞夫茲氏病的病人有 50% 有家族病史⁹。幾十年下來，許多的家族分析也確認了這個趨勢¹⁰ (表五)。所以整體看來，如果家族中有人患有葛瑞夫茲氏病，則其他人患病的危險性的確比整個族群高上 6 到 9 倍 (mean λ Mother = 7.9, mean λ Sisters = 8.7, mean λ Siblings = 5.9)。

但是這樣子的數據無法叫人非常有信心的認為葛瑞夫茲氏病真的就有遺傳相關¹¹，第一個原因是算出來的 λ 值實在不大 (拿其他例子來做比較，像血友病的 λ 值就大於 1000)，另一個更重要的原因，則是這種危險性的增加，其實沒有辦法由家族分析，來區分究竟是由家族成員具有某些相同的遺傳背景而來，還是因為他們分享了某些共同的環境因子所造成。於是，我們必須藉助雙胞胎分析

(twin study) 來加以釐清。

自從 1876 年以來，Sir Francis Galton 所提出的雙胞胎分析，已經成為釐清遺傳因子與環境因子所佔比重的一個重要工具。它的基本理論在於同卵雙胞胎之間的遺傳基因完全一樣，而環境因子的差異和一般的兄弟姊妹差異程度都大致相同；異卵雙胞胎則是遺傳基因以及環境因子的差異和一般的兄弟姊妹差異程度大致相同。於是，如果某種疾病在同卵雙胞胎之間的相對危險性

(λ MZ twin) 比異卵雙胞胎之間的相對危險性 (λ HZ twin) 大很多的話，表示遺傳因素佔了很大的比重，相反的，如果完全沒有差別的話，可以說，就算有遺傳成份在內，所佔的比重也很小。

過去幾十年來，有好幾個關於葛瑞夫茲氏病的雙胞胎分析研究。在 1950 年代，有報告說同卵雙胞胎的 probandwise concordance rate 高達 86%，異卵雙胞胎則為 40%，另外一個報告則是同卵及異卵的 concordance rate 分別是 64%及 6%。最近一個經典的研究，是由 Brix 等人在 1998 年發表的丹麥雙胞胎系列追蹤研究 12，這次的研究，對葛瑞夫茲氏病的定義與確認有很嚴格的要求，最後的結果在同卵及異卵雙胞胎的 concordance rate 則分別是 36%及 0%。茲將這一系列的研究整理如下 (表六)。

根據以上所整理的家族分析以及雙胞胎分析，我們可以確認葛瑞夫茲氏病與遺傳有相當程度的關連。另外一個證據是在動物模式的建立時，依據同樣的方法，用在不同的老鼠時，就特別會在 NMR outbred strain 上產生類似葛瑞夫茲氏病的變化。可見遺傳因素的重要性。

不過，我們由雙胞胎研究也可清楚的發現，即便是葛瑞夫茲氏病病人的同卵雙胞胎姊妹，經過了二十幾年的追蹤，也只有三到四成的發病率，這代表了遺傳因子在這個疾病並不具備獨佔性的影響力，它應該是一個 multifactorial disease。這也預告了在找尋致病基因，或更準確一點的講法：易罹病基因 (susceptibility genes) ，的過程中會相當的艱辛。

如何找尋 multifactorial polygenic disease 的基因

一般而言，如果是符合孟德爾遺傳定律 (不論是顯性遺傳或隱性遺傳) 的單純遺傳性疾病，應該可以在家族譜的分析中有一些線索，然而，針對葛瑞夫茲氏病的分析，發現他不像是單一基因的遺傳形式。也就是說，它除了是一個 multifactorial disease 外，它在基因上還是一個 polygenic disease。針對這樣子一個疾病而來找尋它的易罹病基因，這在十年或是更早以前幾乎是不可能的事情。所幸，最近幾年來隨著 genome project 的接近完工，以及統計學的進步，使得這方面的發展有了一些曙光。Type 1 DM 相關基因就定是最好的例子 13。茲將幾個最重要的找尋方法整理如下 2,14,15：

首先，很直接的想法是實驗性交配 (experimental cross) ，如果能夠隨意將有病以及沒有病的個體交配，觀察其產生的子代，當然會有很大的幫助，不過這在人身上絕對不可能，倒是將來如果能有好的動物模式的話，可能會有所突破。

其次，傳統以來一直在使用的是族群內病例——對照分析 (population-based case-control studies)。基本的概念很簡單，就是試著比較有病以及沒有病 (對照組) 的族群中，某些 alleles 出現的比例有沒有不同。以這樣子的方法在最近的十年內陸續提出了很多的可能基因 (candidate genes)，到最後公認比較有意義的是 class II MHC region (chromosome 6p) 以及 CTLA-4 (chromosome 2q33)，有待進一步的檢證。這個方法的好處是能夠很快很有效率的找到個案以及對照組，也比較不會像在 family based study 中可能要面臨父母已經死亡這樣子的困難，而且，敏感度也相當好。可是，它至少有兩個很嚴重的缺點，首先，它必須先有所謂的 candidate gene 才能進行，以致於沒有辦法做 whole genome study；第二，它太過於敏感，也就因此有許多偽陽性的情形，尤其是對照組的找尋實在太難找到很正確合適的個體。所以，現在主流的研究已經進展到以下介紹的運用 family based data set 的方法了。

關聯分析 (classical linkage analysis) 可以說是目前在這一類研究中的黃金標準 (gold standard)。主要運用到的概念是 cosegregation, linkage, disequilibrium, allele-sharing, polymorphism, and microsatellites 等觀念，又可分為好幾種次類型。如果是蒐集許多的家族，以同時皆有發病的手足之 DNA 來作分析，叫做『無母數性』關聯分析 ("non-parametric" linkage analysis)，可以在完全不知道疾病的遺傳模式的狀態下進行分析，這種分析又可以因親代 DNA 是否能得到，而分為 identical by descent 或是 identical by state linkage analysis。另一類的則叫做『母數性』關聯分析 ("parametric" linkage analysis) 則可以擴充到分析好幾代 (multigenerational pedigrees) 的資料，但在這樣子分析的時候，必須先假設這個疾病的遺傳模式以及疾病穿透度 (mode of inheritance and likely penetrance)，但這種假設其實常常是很武斷而沒有根據的。一般而言，classical linkage analysis 算出來各個 locus 的可能性是以 LOD (logarithm of odds) score 來表示，如果算出來的數值大於 3 (或 2.5)，就可能是有意義的基因。根據這樣子的方法，在 type 1 DM 的研究上有很大的成功，至少找到了十個以上的基因，可是也有失敗的例子，就像對於 multiple sclerosis 的研究，一直就沒有進展。整體而言，linkage study 最大的好處是能夠在不需要 candidate genes 的狀況下運作，而且可以配合目前越來越多的 markers (microsatellites, or single nucleotide polymorphism, SNP) 來做 whole genome study。然而，缺點是這個方法比較不敏感，舉個例子來說，如果某個 locus 的 λ 值大概是介於 1.4 和 2，那麼，有人估計可能要 400 個家族譜才有辦法達到統計學上的意義。

最近還有一種新的分析方法，叫做 intrafamilial linkage disequilibrium。它測試的是 TDT (transmission disequilibrium test)，其內在精神是在評估 the transmission of alleles from a heterozygous parent to one or more offspring。根據目前幾個研究的結果看來，它比 classical linkage analysis 敏感，看起來是不錯的方法，不過它也需要先有 candidate genes，而且必須在這個基因有 polymorphism 才行。

總而言之，近年來由於 genome project 的進展，以致於各種可用的 markers 迅

速增加，再加上統計方法的更新，使得這一類 multifactorial polygenic disease 基因的探索成爲可能。Type 1 DM 基因找尋的一整套經驗，很值得拿來運用。

全球目前找尋葛瑞夫茲氏病基因的進展

尋找葛瑞夫茲氏病易罹病基因的方向一開始是針對特定 candidate genes 來進行 population-based case-control study。至於 candidate genes 主要包括和免疫相關的區域【包括 HLA 區域、CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated 4) gene、IL-1RA (interleukin 1)、TNF- β 、以及免疫球蛋白區域】，和甲促素受器相關的區域，和女性激素相關的區域，以及和糖尿病基因有關的區域等等，但結果大部分是令人失望的，少部分結果分歧的項目裡面，到最後還值得繼續研究的，大概只有 HLA region 以及 CTLA-4。茲將幾個重要關於 HLA 區域的研究列表如右（表七）：

後來進展到 linkage analysis 或是 whole genome analysis 的年代，又有些新的進展 17-24 (表八)。

Barbesino 和 Tomer 所做的關於自體免疫性甲狀腺疾病（包括葛瑞夫茲氏病以及橋本氏甲狀腺炎）甚至對整個 genome 上的 microsatellites 作地毯式的篩檢，以 parametric linkage analysis 的方式來找尋可能的基因 25。它們找到了 6 個 markers 可能和自體免疫性甲狀腺疾病有關連 (linkage)，包括 1 個共同 locus (AITD-1)、3 個葛瑞夫茲氏病專屬 loci (GD-1, GD-2, and GD-3)、以及 2 個橋本氏甲狀腺炎專屬 loci (HT-1 and HT-2) (表九)。這些發現需要其他族群的研究來檢驗，也還有待更細部的定位及分析。

值得注意的是，不同研究團隊利用不同國家病人所得到的可能基因位址不盡相同，這暗示著個別基因在特定族群中可能佔有不同的比重。

目前葛瑞夫茲氏病的遺傳研究主要侷限於高加索人種，其他人種內（包括中國人 17,26,27 或是日本人 28-30）的研究只有非常零星的報告，而且多爲傳統的族群內病例-對照分析 (population-based case-control studies)。一般而言，國內家族譜較高加索人種爲大，人種也較爲純粹，所以如果能在國內收集到足夠而且正確的病例，再加上新的具有威力的遺傳分析工具，很可能會有大的突破。

結語

葛瑞夫茲氏病是一個盛行率高的重要疾病，先前的病理生理學研究遭遇到了瓶頸，而目前的遺傳學研究正開始露出曙光，加入非高加索人種的研究，應該可以得到更快的進展。如果真能在遺傳學研究有所突破，並且建立良好的動物模式，相信必定能夠進一步瞭解葛瑞夫茲氏病的致病機轉，接著也就能提供更好的預防及治療，並可以藉由葛瑞夫茲氏病的理解，打開其他自體免疫疾病研究的希望之窗。

參考文獻

1. Tunbridge WMG, Evered DC, Hall R, et al. The spectrum of thyroid disease in the community: The Whickham Survey. *Clin Endocrinol* 1977;7:481-93.
2. Davies TF. Graves' disease. In: Braverman LE, Utiger RD (eds) *Werner & Ingbar's the Thyroid: a fundamental and clinical text*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000;518-31.
3. Larsen PR, Davies TF, Hay ID. The thyroid gland. In: Wilson JD, Foster DW, Krokenberg HM, Larsen PR (eds). *Williams Textbook of Endocrinology*. 9th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1998;389-451.
4. Wu SL, Chang TC, Chang TJ, Kuo YF, Hsiao YL, Chang CC. Cloning and sequencing of complete thyrotropin receptor transcripts in pretibial fibroblast culture cells. *J Endocrinol Invest* 1996;19:365-70.
5. Wu SL, Yang J, Wang HJ, Liao CL, Chang TJ, Chang TC. Demonstration of thyrotropin receptor mRNA in orbital fat and eye muscle tissues from patients with Graves' ophthalmopathy by in situ hybridization. *J Endocrinol Invest* 1999;22:289-95.
6. Ludgate M. Animal models of Graves' disease. *Eur J Endocrinol* 2000;142:1-8.
7. Many MC, Costagliola S, Detrait M, Deneff JF, Vassart G, Ludgate M. Development of an animal model of autoimmune thyroid eye disease. *J Immunol* 1999;162:4966-72.
8. Costagliola S, Many MC, Deneff JF, Pohlenz J, Refetoff S, Vassart G. Genetic immunization of outbred mice with thyrotropin receptor cDNA provides a model of Graves' disease. *J Clin Invest* 2000;105:803-11.
9. Martin L, Fisher RA. The hereditary and familial aspects of exophthalmic goiter and nodular goiter. *QJM* 1994;14:207-19.
10. Brix TH, Kyvik KO, Hegedus L. What is the evidence of genetic factors in the etiology of Graves' disease? A brief review. *Thyroid* 1998;8:727-34.
11. Philippou G, McGregor AM. The aetiology of Graves' disease: what is the genetic contribution? *Clin Endocrinol* 1998;48:393-5.
12. Brix TH, Christensen K, Holm NV, Harvald B, Hegedus L. A population-based study of Graves' disease in Danish twins. *Clin Endocrinol* 1998;48:397-400.
13. Todd JA. Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8560-5.
14. Allahabadia A, Gough SC. The different approaches to the genetic analysis of autoimmune thyroid disease. *J Endocrinol* 1999;163:7-13.
15. Heward JM, Allahabadia A, Daykin J, Carr-Smith J, Daly A, Gough SC. Linkage disequilibrium between the HLA class II region of the MHC and Graves' disease: replication using a population case control study and family based study. *J Clin*

- Endocrinol Metab 1998;83:3394-7.
16. Gough SC. The genetics of Graves' disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000;29:255-66.
 17. Heward JM, Allahabadia A, Carr-Smith J, et al. No evidence for allelic association of a human CTLA-4 promoter polymorphism with autoimmune thyroid disease in either population-based case-control or family-based studies. *Clin Endocrinol* 1998;49:331-4.
 18. Heward JM, Allahabadia A, Armitage M, et al. The development of Graves' disease and the CTLA-4 gene on chromosome 2q33. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2398-401.
 19. Vaidya B, Imrie H, Perros P, et al. The cytotoxic T lymphocyte antigen-4 is a major Graves' disease locus. *Hum Mol Genet* 1999;8:1195-9.
 20. Vaidya B, Imrie H, Perros P, et al. Evidence for a new Graves disease susceptibility locus at chromosome 18q21. *Am J Hum Genet* 2000;66:1710-4.
 21. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E, Davies TF. A new Graves disease-susceptibility locus maps to chromosome 20q11.2. International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease. *Am J Hum Genet* 1998;63:1749-56.
 22. Barbesino G, Tomer Y, Concepcion E, Davies TF, Greenberg DA. Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease: I. Selected immunoregulatory genes. International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1580-4.
 23. Barbesino G, Tomer Y, Concepcion ES, Davies TF, Greenberg DA. Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease. II. Selected gender-related genes and the X-chromosome. International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3290-5.
 24. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E, Davies TF. Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease. III. Detailed analysis of chromosome 14 localizes Graves' disease-1 (GD-1) close to multinodular goiter-1 (MNG-1). International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4321-7.
 25. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E, Davies TF. Mapping the major susceptibility loci for familial Graves' and Hashimoto's diseases: evidence for genetic heterogeneity and gene interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4656-64.
 26. Allahabadia A, Heward JM, Mijovic C, et al. Lack of association between polymorphism of the thyrotropin receptor gene and Graves' disease in United

- Kingdom and Hong Kong Chinese patients: case control and family-based studies. *Thyroid* 1998;8:777-80.
27. Wong GW, Cheng SH, Dorman JS. The HLA-DQ associations with Graves' disease in Chinese children. *Clin Endocrinol* 1999;50:493-5.
28. Sale MM, Akamizu T, Howard TD, et al. Association of autoimmune thyroid disease with a microsatellite marker for the thyrotropin receptor gene and CTLA-4 in a Japanese population. *Proc Assoc Am Physicians*. 1997;109:453-61.
29. Yanagawa T, Taniyama M, Enomoto S, et al. CTLA 4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. *Thyroid* 1997;7:843-6.
30. Awata T, Kurihara S, Iitaka M, et al. Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism (IDDM12 locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population. *Diabetes* 1998;47:128-9.

Progress in Genetic Study on Graves' Disease

Pei-Lung Chen, and Tien-Chun Chang

Department of Internal Medicine, National Taiwan University Hospital
and College of Medicine, National Taiwan University

Graves' disease is the leading cause of hyperthyroidism. It also has higher prevalence than other organ specific autoimmune diseases. Taking advantage of the genome research and new biostatistical tools, there has been significant progress in genetic study on Graves' disease during the latest 10 years. In this review article, we started with the clinical presentation, laboratory finding, and pathophysiology of Graves' disease. We then summarized the various animal models. Evidence of genetic factors in the etiology of Graves' disease was also examined. The methods for the study of multifactorial polygenic diseases were described. We ended up with the most update advance in genetic study on Graves' disease. However, most of the studies were restricted to the Caucasian populations. Further investigation on the non-Caucasian populations is necessary, and might provide important insight to this topic. (*J Intern Med Taiwan* 2001;12: 111-120)

表 1 : Prevalence of Thyroid Autoantibodies³

Group	TSHRAb(%)	HtgAb(%)	hTPOAb(%)
-------	-----------	----------	-----------

General population	0	5-20	8-27
Graves' disease	80-95	50-70	50-80
Hashimoto's thyroiditis	10-20	89-90	90-100
Relatives of patients	0	40-50	40-50
Type 1 DM	0	40	40
Pregnant women	0	14	14

TSHrAb: TSH receptor antibody ; hTgAb: human thyroglobulin antibody ;

hTPOAb: human thyroid peroxidase antibody

表 2 : Phenotypic Characteristics of Intrathyroidal T Cells²

CD4, CD29	Thyroid(%)	PBMC(%)
CD2	47±11	
CD4	18±4	
CD8	25±6	
CD4:CD8	0.7±0.1	2.9±10
%CD4, CD29	85±3	
%CD4, CD45RA	41±5	
CD29:CD45RA	2.6±1.0	8.2±2.0
Activated(DR)	19±5	

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

表 3 : Characteristics of Intrathyroidal T-cell Clones²

Source	(n)	CD4	CD8	MLR	Thyroid	Cytotoxic
PBMC	21	100%	0	55%	0	ND
Graves' disease	21	75%	25%	50%	33%	0
Hashimoto's thyroiditis	36	41%	58%	55%	11%	14%

MLR: mixed lymphocyte reactions; Thyroid: proliferation in response to crude thyroid antigen;

Cytotoxic: lysis of autologous thyroid cells; ND, not done;

PBMC, peripheral blood mononuclear cells

表 4 : Comparison of the Signs and Symptoms of Graves' Disease Induced by the Various Protocols⁶:

	TBII	TBAB	TSAB	T4, T3, TSH	Thyroiditis	Eye signs
Peptides	(+)	(+)	(-)	Mixed	(-)	ND
Procaryotic	(+)	(+)	(-)	Euthyroid	(+)focal Th2	ND
Eucaryotic	(+)	(+)	(-)	Mixed	(-)	ND
CDNA inbred	(+)	(+)	(-)	Euthyroid	(+)focal Th2	ND
CDNA outbred	(+)	(+)	(+)	T4 ↑ ,TSH ↓	(+)focal Th2	(+)
Fibro + class II	(+)	(+)	(+)	T4 ↑ ,TSH ↓	(-)	(-)
Transfer prot	(+)	(+)	(-)	Euthyroid	(+)Th2	(+)
Transfer cDNA	(+)	(+)	(-)	Euthyroid	(+)Th2	(+)
Transfer class II	(+)	(+)	(-)	T4 ↓	(-)	(-)

TBII: TSH-binding inhibitory immunoglobulin; TBAB: thyroid blocking antibody; TSAB: thyroid stimulating antibody,

considered positive only when more than 1 animal developed persistent antibodies giving at least a doubling of the cAMP levels;
 ND: not done; Fibro + class II: fibroblasts transfected with TSH receptor and MHC class II; Prot: transfer of T cells in vivo
 primed with ECD-MBP; (+): present; (-): absent

表 5 : Prevalence and Coefficient of Familial Clustering (λ_R) of Graves' Disease/Hyperthyroidism among the Probands' First-Degree Relatives¹⁰

Study	Background population	Mothers	Fathers	Sisters	Brothers	Daughters	Sons
Bartels, 1941	0.4%	6/201 (3%) $\lambda_M = 7.5$	0/198	17/337 (5%) $\lambda_S = 12.6$	3/352 (0.9%) $\lambda_B = 2.1$	2/137 (1.5%) $\lambda_D = 3.7$	0/169
Martin and Fisher, 1945	—	1/90 (1.1%)	0/90	8/79 (10.1%)	6/81 (7.4%)	—	—
Howel-Evans et al. 1967	1.1%	6/57 (10.5%) $\lambda_M = 9.6$	0/39	6/101 (5.9%) $\lambda_S = 5.4$	1/76 (1.3%) $\lambda_B = 1.2$	—	—
Stenzky et al. 1985	0.65%	19/445 (4.3%) $\lambda_M = 6.6$	9/483 (1.9%) $\lambda_F = 2.9$	23/435 (5.3%) $\lambda_S = 8.1$	0/357	7/132 (5.3%) $\lambda_D = 8.2$	0/128

表 6 : Twin Studies in Graves' Disease/Hyperthyroidism¹⁰

Study	MZ pairs		DZ pairs		Pairwise Concordance rate (%)		Probandwise concordance rate (%)	
	Number	Concordant	Number	Concordant	MZ	DZ	MZ	DZ
	Bartels, 1941	13	10	14	2	77	14	
Harvald, 1956	21	16	16	4	76	25	86	40
Verschuer, 1958	49	23	64	2	47	3	64	6
Brix et al. 1998	18	4	33	0	22	0	36	0

表 7 : Population-based, Case-control Study Associations between the HLA Region on Chromosome 6p21 and Graves' Disease (since 1990)¹⁶

Study	Size of Data set (n)	HLA Association	Relative Risk
Manglabruks et al, 1991	130	DR3	3.4
		DQB1*0201	3.3
Badenhoop et al, 1992	374	DR3	2.3
Badenhoop et al, 1995	542	DQA1*0501	2.5
Yanagawa et al, 1993	169	DR3	2.5
		DQA1*0501	3.7
Cuddihy and Bahn, 1996	134	DR3	3.5
Barlow et al, 1996	177	DR3	2.7
		DQA1*0501	3.8
		DRB1*0304	2.7
Heward et al, 1998	592	DQB1*0301/4	1.9
		DQA1*0501	3.2

表 8 : Graves' Disease Susceptibility Loci Identified in Family Data Sets^{16,21}

Locus	Study	Type of Data Set/ Analysis	Marker/Allele	Test Statistic
HLA (6p21)	Heward et al, 1998	TDT	DR3 haplotype	$\chi^2 = 11.95$
	Vaidya et al, 1999	ASP-NPL	D6S273-TNF α	LOD score=1.95
CTLA-4 (2q33)	Heward et al, 1999	TDT	A-G(exon 1)	$\chi^2 = 5.7$
	Vaidya et al, 1999	ASP-NPL	D2S117	LOD score=3.4
GD-1 (14q31)	Tomer et al, 1997-8	Ped-PL	D14S81-S1054	LOD score=2.5
GD-2 (20q11.2)	Tomer et al, 1998	Ped-PL	D20S195-S107	LOD score=3.5
GD-3 (Xq21.33-22)	Barbesino et al, 1998	Ped-PL	DXS8020	LOD score=2.5
IDDM6? (18q21)	Vaidya et al, 2000	ASP-NPL	D18S487	LOD score=3.46

HLA: human leukocyte antigen; CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated-4; TNF: tumor necrosis factor; GD: Graves' disease; TDT: transmission disequilibrium test; ASP: affected sib-pairs; Ped: multigenerational family pedigree; NPL: nonparametric linkage analysis; PL: parametric linkage analysis; LOD: logarithm of odds

表 9 : Two-point and multipoint LOD scores at the six loci that were found to be linked with AITD²⁵

Locus	Marker name	Chromosomal location	2-point LOD	Multipoint LOD	Penetrance/inheritance	NPL
AITD-1	D6S257	6p	2.2	2.9	0.3/ Recessive	2.3
GD-1	D14S81	14q31	2.1	2.5	0.3/ Recessive	1.9
GD-2	D20S195	20q11.2	3.2	3.5	0.3/ Recessive	2.4
GD-3	DXS8020	Xq21	1.9	2.5	0.4/ Recessive	1.8
HT-1	D13S173	13q32	1.8	2.1	0.3/ Recessive	1.0
HT-2	D12S351	12q22	1.7	-0.8	0.8/ Recessive	0

AITD: autoimmune thyroid disease; GD: Graves' disease; HT: Hashimoto's thyroiditis