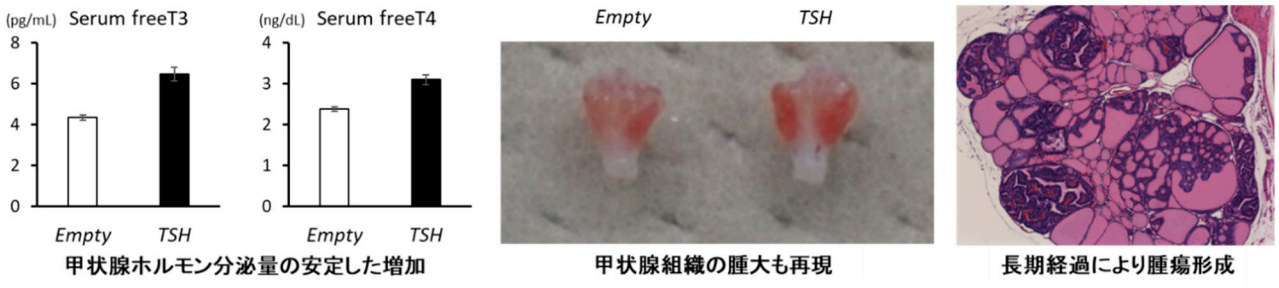
| 159　甲状腺機能亢進症の分子病態解明 | 山内　一郎 |
|---|---|

**【目的】**甲状腺機能亢進症は、バセドウ病が原因の多くを占め、1,000 人に 1 人と頻度の高い疾患である。しかし、治療は抗甲状腺薬に代表される薬物療法を中心として数十年にわたり大きな変化がなく、無顆粒球症などの重篤な副作用や治療抵抗性といった多くの問題を抱える。本研究は、より安全かつ治療効果の高い新規治療薬というアンメットニーズに応えるべく開始した。甲状腺機能亢進症の病態生理として、甲状腺特異的に発現する甲状腺刺激ホルモン受容体（TSH 受容体）の活性化が古くから知られているが、下流の分子やホルモン合成系以外の変化については驚くほど未解明である。生体の甲状腺組織を網羅的に解析した報告が非常に少ないだけでなく、甲状腺機能亢進症に対する研究報告は調べる限り見当たらない。我々は研究の推進を可能とするため、TSH 過剰発現処置により甲状腺機能亢進症と甲状腺腫を惹起する独自のモデルマウスを開発した。本研究では、この新規モデルマウスを駆使して、TSH 受容体シグナルを分子レベルで理解することにより、甲状腺機能亢進症に対する新規治療薬を開発するための標的を見出すことを目的とした。

**【方法】**甲状腺機能亢進症モデルマウスは、6 週齢雄の C57BL/6J マウスにハイドロダイナミック法を用いて TSH 発現ベクターを導入することにより作出した。このマウスの甲状腺を回収し、RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。甲状腺に特徴的な遺伝子群の中で、SLC26A4 の遺伝子発現が有意に増加していることを見出したことを受けて、SLC26A4 ノックアウトマウスに TSH 過剰発現処置を行い、その意義を検討した。最後に、濾胞上皮細胞レポーターマウスを、TPO-CreERT2 マウス（Jackson laboratory、No. 026512）と R26GRR マウス（理化学研究所、RBRC04874）を交配することにより作出した。

**【結果】**甲状腺機能亢進症モデルマウスでは、血清 TSH 濃度はベクター量依存的に上昇し、血清 fT4、fT3 濃度の上昇に加えて、甲状腺の腫大が肉眼的、顕微鏡的に見られており、モデルとして妥当であることを確認した。TSH 過剰発現による甲状腺トランスクリプトームの変化について、パスウェイ解析や発現変動の大きかった上位遺伝子の観点から精査した。甲状腺に特徴的な遺伝子群の中で、有意な変化は SLC26A4 に限られており、その意義を検討するため、SLC26A4 ノックアウトマウスに TSH 過剰発現処置を行った。意外なことに、このノックアウトマウスは甲状腺機能亢進の誘導に対し、有意なフェノタイプの変化を示さなかった。これまでの検討においては、治療標的獲得に至らなかったが、採取した甲状腺には、濾胞上皮細胞以外に副甲状腺、C 細胞、血管、血球など種々のコンポーネントが含まれ、パスウェイ解析の解釈が困難であったという制限があった。そこで、濾胞上皮細胞特異的に解析を行うべく、濾胞上皮細胞レポーターマウスを作出した。このマウスの甲状腺を酵素処理によりシングルセル化した後、セルソーターにて濾胞上皮細胞を回収することに成功した。

甲状腺機能亢進症モデルマウス




甲状腺ホルモン分泌量の安定した増加　　甲状腺組織の腫大も再現　　長期経過により腫瘍形成

# 159. 甲状腺機能亢進症の分子病態解明

山内　一郎

京都大学 大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学

Key words：甲状腺機能亢進症，TSH 受容体，トランスクリプトーム解析，ハイドロダイナミック法，レポーターマウス

## 緒　言

甲状腺機能亢進症は、甲状腺におけるホルモン合成が亢進し、過剰に血中に分泌された甲状腺ホルモンにより様々な自覚症状や代謝異常をきたす。バセドウ病が原因の多くを占め、1,000 人に 1 人と頻度の高い疾患であるが、治療は抗甲状腺薬に代表される薬物療法を中心として数十年にわたり大きな変化がない。さらにはこの第一選択となっている抗甲状腺薬ですら、無顆粒球症などの重篤な副作用や治療抵抗性といった多くの問題を抱える。我々は、より安全かつ治療効果の高い新規治療薬というアンメットニーズに応えたいと考えている。

甲状腺機能亢進症の病態生理として、甲状腺特異的に発現する甲状腺刺激ホルモン受容体（TSH 受容体）の活性化が古くから知られている。例えば、バセドウ病では TSH 受容体に結合し活性化する自己抗体が産生されている。TSH 受容体シグナルによるホルモン合成促進機序として、ナトリウムヨードシンポーター、甲状腺ペルオキシダーゼ、サイログロブリンの発現増加が知られているが［1］、他の分子やホルモン合成系以外の変化については驚くほど未解明である。生体の甲状腺組織を網羅的に解析した報告が非常に少ないだけでなく、甲状腺機能亢進症に対する研究報告は調べる限り見当たらない。甲状腺由来細胞株にはホルモン合成能を有するものが存在せず、バセドウ病モデルマウスは甲状腺機能亢進症を半数程度しか発症せず［2］、かつ炎症による病態の修飾が問題となり、適した実験系の構築が困難であったためと推測する。

我々は研究の推進を可能とするため、TSH 過剰発現処置により甲状腺機能亢進症と甲状腺腫を惹起する独自のモデルマウスを開発した［3］。このマウスはハイドロダイナミック法により、TSH 発現プラスミドベクターを導入して作製する。ハイドロダイナミック法は、任意のマウスおよび週齢において実施可能であり、汎用性も備えるという利点もある。本研究では、この新規モデルマウスを駆使して、TSH 受容体シグナルを分子レベルで理解することにより、甲状腺機能亢進症に対する新規治療薬を開発するための標的を見出すことを目的とした。

## 方法および結果

### 1. 甲状腺機能亢進症モデルマウスの解析

緒言で述べたように開発した甲状腺機能亢進症モデルマウスを詳細に解析するにあたり、以下の条件で実験を行った。6 週齢雄の C57BL/6J マウスにハイドロダイナミック法を用いて TSH 発現ベクター（pLIVE-*TSHB*、pLIVE-*CGA* の両者の共投与）を導入した。導入するベクター量を各 5 μg、各 25 μg と振り、1 週間後にサンプルを回収して、過剰発現された TSH の効果を確認した（図 1）。血清 TSH 濃度はベクター量依存的に上昇し（図 1a）、血清 fT4、fT3 濃度の上昇（図 1b、図 1c）、すなわち甲状腺機能の亢進も認められた。加えて、甲状腺の腫大が肉眼的（図 1d）、顕微鏡的（図 1e）に見られ、濾胞サイズの増大や濾胞上皮細胞の高さが増す（図 1f）などの形態変化が生じていた。

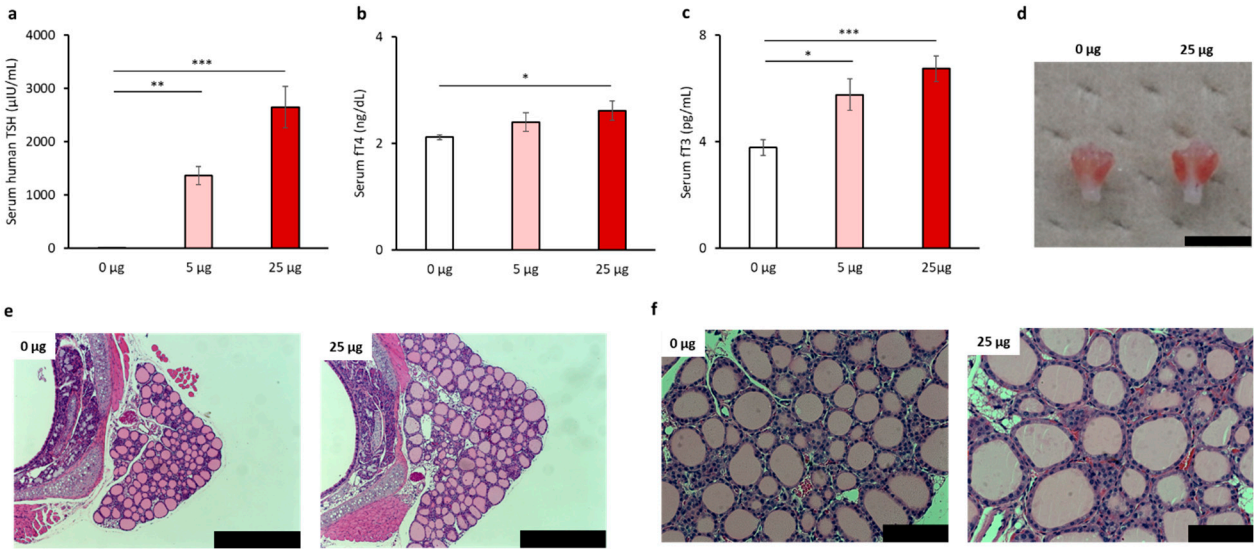



図 1. 甲状腺機能亢進症モデルマウスのフェノタイプ

a～c） 導入した TSH 発現ベクターの量依存的に、血清 TSH 濃度が上昇し、甲状腺機能（血清 fT4、fT3）の亢進を認めた。*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001（ANOVA Dunnett）。

d） 甲状腺外観写真。スケールバー：5 mm。

e，f） 甲状腺顕微鏡写真。0μg：ベクター導入なし、25μg：TSH 発現ベクター各 25μg 導入。スケールバー：e）500μm、f）100μm。

このマウスの甲状腺を回収し、RNA シーケンス（RNA-seq）によるトランスクリプトーム解析を行った（図 2）。新規治療標的の獲得に向けて、臨床で最も使用されている抗甲状腺薬のチアマゾール（MMI）の作用機序の解明を目指し、TSH 発現ベクター導入群に加え、TSH 発現ベクター導入＋MMI 投与群を作製し、解析した。TSH 過剰発現により、多くの遺伝子の発現が変動したが、MMI 投与による遺伝子発現変動は僅少であった。そこで TSH 過剰発現による変化を詳細に検討する方針とし、パスウェイ解析や発現変動の大きかった上位遺伝子を精査した。結果として、甲状腺に特徴的な遺伝子群の中で、SLC26A4（ペンドリン）の遺伝子発現が有意に増加していることを見出し、SLC26A4 ノックアウトマウスに TSH 過剰発現処置を行い、その意義を検討した。意外なことに、このノックアウトマウスは甲状腺機能亢進の誘導に対し、有意なフェノタイプの変化を示さなかった［3］。

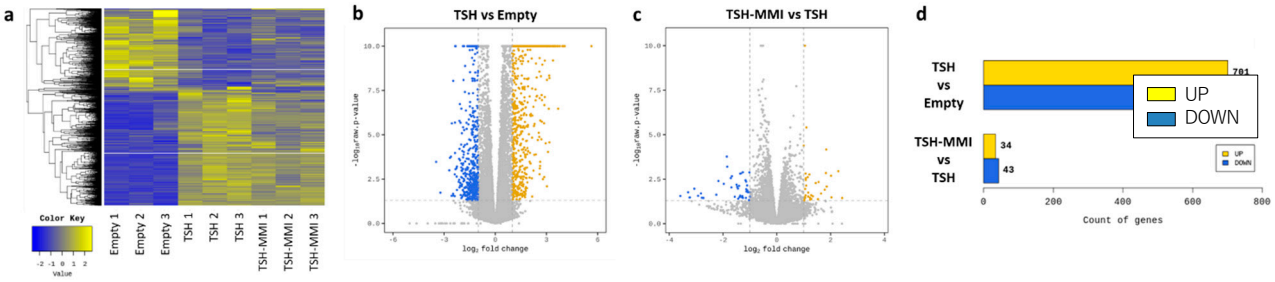



図 2. 甲状腺機能亢進症モデルマウスの甲状腺トランスクリプトーム

a） クラスタリング解析。

b，c） ボルケーノプロット。

d） 発現変動遺伝子数。Empty：空ベクター導入群、TSH：TSH 発現ベクター導入群、TSH-MMI：TSH 発現ベクター導入＋チアマゾール（MMI）投与群。

## 2. レポーターマウスを用いた濾胞上皮特異的解析

上述の解析においては、有望な治療標的の同定に至らなかったが、パスウェイ解析の解釈が困難であったことが大きいと考えた。具体的には、採取した甲状腺には、甲状腺ホルモン合成を行う濾胞上皮細胞以外に、副甲状腺、C 細胞、血管、血球など種々のコンポーネントが含まれ、抽出し解析に供する RNA も同様である。TSH 過剰発現処置を行うと、少なくとも副甲状腺、C 細胞由来の遺伝子発現が有意に減少し、これは濾胞上皮細胞由来の RNA の割合が増加したことによる可能性が高い。従って、パスウェイ解析の結果は、濾胞上皮細胞の変化以外に、他のコンポーネントの変化も反映していると考えられた。系統的に甲状腺機能亢進症の病態を解明するには、濾胞上皮細胞を特異的に解析する必要があると考え、下記に示すレポーターマウスを作製することとした。

レポーターマウスは、TPO-CreERT2 マウス（Jackson laboratory、No. 026512）と R26GRR マウス（理化学研究所、RBRC04874）を交配することにより作製した。このマウスは、タモキシフェン投与下に TPO（甲状腺ペルオキシダーゼ）を発現する濾胞上皮細胞のみが tdsRed を発現し、他の細胞は EGFP を発現する。このマウスの甲状腺を回収し、酵素処理によるシングルセル化の後、セルソーターにて赤色蛍光の認識により濾胞上皮細胞を回収した（図 3a）。tdsRed 発現細胞のトランスクリプトームを EGFP 発現細胞と比較し、tdsRed 発現細胞においては甲状腺ホルモン分泌に関連する遺伝子の発現量が多く、副甲状腺、C 細胞に関連する遺伝子の発現は極めて少なかった（図 3b）。すなわち、回収した tdsRed 発現細胞が濾胞上皮細胞に対応していることを確認しえた。

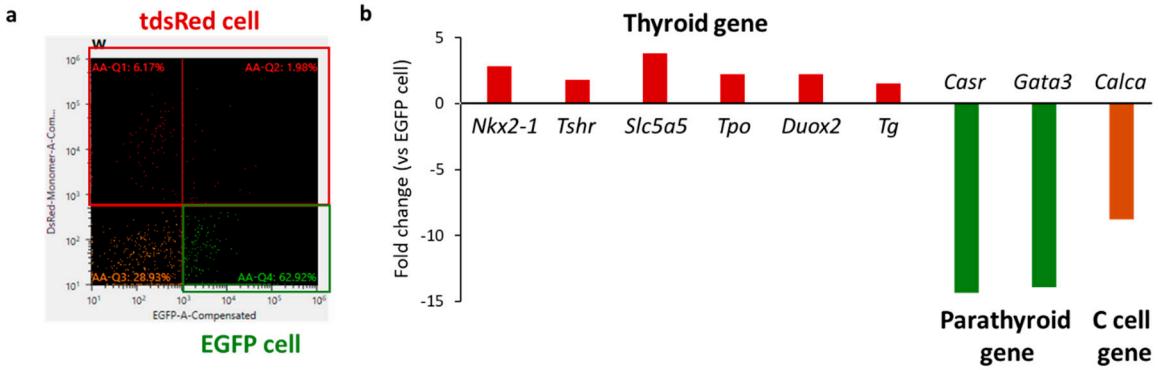



図 3. 濾胞上皮細胞レポーターマウスを用いた濾胞上皮細胞の選択的回収

a）セルソーターにより tdsRed 発現細胞と EGFP 発現細胞をそれぞれ回収する。

b）RNA-seq による tdsRed 発現細胞と EGFP 発現細胞の比較。tdsRed 発現細胞では、甲状腺ホルモン分泌に関連する遺伝子の発現が多く、副甲状腺、C 細胞に関連する遺伝子の発現は僅少であった。

## 考　察

本研究は、TSH 受容体シグナルを生体レベルで網羅的に解析するという初の試みである。加えて、我々の開発した甲状腺機能亢進症モデルマウスは、マテリアルとしての発展性も備える。フェノタイプとして甲状腺機能亢進症に限らず、甲状腺の腫大も見られており、本稿では割愛したが、細胞増殖に関わる経路についても検討を進めている。治療薬開発の視点に立つと、我々のモデルマウスを用いることで、甲状腺機能亢進症に対する治療効果を評価する系の構築が可能となる。今回検討した MMI に限らず、臨床で使用されている種々の抗甲状腺薬の作用機序は未だ不明な点が多いが、薬剤投与後の甲状腺に対する網羅的解析から知見を得ることが期待できる。実臨床に直結するような、適切な用法や併用療法の可能性を検討する投与実験も可能である。

一方で、病態解明を進めるために、濾胞上皮細胞レポーターマウスの開発を行った。結果の項に述べたように、既に解析可能な状況を整えており、このレポーターマウスに TSH 過剰発現処置を行う群と行わない群を作製し、各群の tdsRed 発現細胞のトランスクリプトームを比較するため、サンプル回収を進めている。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学研究室の岸本曜准教授である。

## 文　献

1） Jang D, Morgan SJ, Klubo-Gwiezdzinska J, Banga JP, Neumann S, Gershengorn MC. Thyrotropin, but Not Thyroid-Stimulating Antibodies, Induces Biphasic Regulation of Gene Expression in Human Thyrocytes. Thyroid. 2020 Feb;30(2):270-276. PMID: 31805824 DOI: 10.1089/thy.2019.0418

2） Zhang M, Jiang W, Lu G, Wang R, Lv Z, Li D. Insight Into Mouse Models of Hyperthyroidism. Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Jun 22;13:929750. PMID: 35813642 DOI: 10.3389/fendo.2022.929750

3） Yamauchi I , Sugawa T , Hakata T , Yoshizawa A , Kita T , Kishimoto Y , Kimura S , Kosugi D , Fujita H , Okamoto K , Ueda Y , Fujii T , Taura D , Sakane Y , Yasoda A , Inagaki N. Transcriptomic Landscape of Hyperthyroidism in Mice Overexpressing Thyroid Stimulating Hormone. bioRxiv. 2023. DOI: 10.1101/2023.10.27.564354.