

平成22年 5月27日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591228
 研究課題名（和文） 甲状腺ホルモン欠乏による胎生期脳障害の病態解明に関する研究
 研究課題名（英文） Study of the pathogenesis of fetal brain damage due to lack of thyroid hormone.
 研究代表者
 伊藤 順庸 (ITO MASATSUNE)
 金沢医科大学・医学部・講師
 研究者番号：60367472

研究成果の概要（和文）：胎児脳での甲状腺ホルモンの影響について検討した。甲状腺ホルモン輸送体（MCT8）をクローニングし、プラスミドを作成した。野生型、変異型プラスミドの強制発現実験より、胎児脳の正常発達には甲状腺ホルモンが野生型とほぼ同等量が必要であることが示唆された。MCT8 遺伝子異常症では乳児期早期に乳酸が高値を示し、診断マーカーとして有用であることが示唆された。また脳の MCT8 タンパクの局在性を確認するため、MCT8 タンパクを抗原として、ウサギに免疫させ、抗ヒト MCT8 タンパク抗体を得た。

研究成果の概要（英文）： We studied the effect of thyroid hormone in fetal brain. Thyroid hormone transporter (MCT8) was cloned and plasmid was created based on cloning MCT8. For a normal fetal brain development, it was suggested that thyroid hormone is necessary equivalent amount of wild-type. MCT8 deficiency showed high levels of serum lactic acid in early infancy, it was suggested to be useful as a diagnostic marker. To confirm the localization of MCT8 protein in the brain, we immunized the rabbit with a synthetic peptide derived from human MCT8 and an antibody was purified from rabbit serum.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：甲状腺ホルモン輸送体（MCT8）、胎児脳発達、甲状腺ホルモン、乳酸、ピルビン酸

1. 研究開始当初の背景

クレチン症では、生後早期の甲状腺ホルモン（TH）補充は、必ずしも十分に脳障害を防ぐことができないことから、THは胎児脳発達

にも影響すると考えられている。ごく最近、THは、二つの証拠によって、胎生期脳発達に作用することが確実となった。ひとつはTH輸送体欠損症で、もうひとつは妊娠早期母体

低 T4 血症と注意欠陥多動性障害 (ADHD) との関連である。TH は、ある特定の時期に発達の開始信号として脳に作用し、各部位で発達に關与する遺伝子群の発現を制御する。脳の各部位には、TH に感受性を有する時期と、もはや TH 作用が認められない臨界期が存在する。TH 感受性は、甲状腺ホルモン輸送体や TH 代謝に關与する deiodinase (D2 または D3) によって制御されるが、臨界期を制御する機構は不明である。Monocarboxylate transporter 8 (MCT8) は神経細胞 TH 輸送体で、MCT8 欠損症では、発達脳における TH 感受性は失われ、TH 作用はみられない。この結果、胎生期脳発達が障害される。胎生期 TH 欠乏のプロトタイプは、ヨード欠乏地域にみられる神経クレチン症である。MCT8 欠損症の患児は生後まもなく重度の精神運動発達と特異的不随意運動を示す。この症状の一部は、神経クレチン症の症状と類似する。MCT8 欠損症の世界的認知は未だ乏しく、症例報告は極めて少ない。研究代表者は MCT8 欠損の本邦初例を報告し、遺伝子変異と臨床的特徴を明らかにした。すなわち、運動障害は下肢ジストニアと体幹の筋緊張低下である。入眠時体幹のミオクロニ発作は電気生理学検査から reticular myoclonus が疑われる。両側被殻には頭部 MRI、T2 強調画像で病変が認められ、不随意運動を含む運動障害は症状の中核となる。た、認知機能は遅れ、言語を認めないが、eye contact は良好であることから、特異な認知障害が推定される。Heuer らは、マウス脳の Mct8 遺伝子発現の分布を観察し、強い発現を脈絡叢、大脳皮質、嗅球、海馬および扁桃核に認めた。続いて線条体、小脳に中等度の、神経内分泌核には弱い発現を認めた。Mct8 欠損マウスでは、細胞によって異なる細胞内 TH 量が観察された。したがって、MCT8 以外にも TH 輸送体は存在すると推定される。また、Mct8 欠損マウスではヒト MCT8 欠損症にみられる特有の神経症状を欠如していた。このため、ヒト脳での MCT8 の局在はマウスと異なり、これを知ることが障害される神経回路と神経症状との関係を推定することが可能となるため、病態解明に大変有意義であると考えられる。さらに、MCT8 以外の TH 輸送体の脳での存在が明らかになれば、神経クレチン様症状を示す原因不明の症例では、これら TH 輸送体障害を疑い、これら遺伝子群を網羅的に解析することが可能となる。

胎児は胎齢 12 週まで TH を合成せず、この時期に TH 感受性を持つ大脳では、母体血遊離 T4 が唯一の TH 供給源となる。このため、subclinical な妊娠早期の母体低遊離 T4 血症が大脳の発達に影響する証拠がある。母体の低遊離 T4 血症と出生児の知能低下や注意欠陥多動性障害 (ADHD) との関連が報告されて

いる。ADHD は、適切な診断と治療・管理を必要とする発達障害で、大脳の機能障害も示唆される。また、TH 受容体遺伝子変異の子どもに ADHD を合併する率は高い。したがって、ADHD の一部は胎生期 TH 欠乏が原因となっていると推定される⁴⁾。妊娠 12 週の母体血中遊離 T4 が 10 パーセント以下以下の低値の母親から生まれた子どもの生後 3 週での発達は、正常対照 (遊離 T4 : 50-90 パーセント) の母親の子どもに比べて、有意に遅れていた。本邦においても、subclinical な母体遊離 T4 血症による胎児 TH 欠乏が出生後の脳発達障害の原因となるかどうか、疫学的な調査をおこない、対策を立てる必要がある。抗てんかん薬のひとつである CBZ は subclinical な低遊離 T4 血症と関係するという指摘がある。したがって、妊娠中の薬剤投与の有無と ADHD を含めた発達障害との関係を再調査する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、研究期間内に以下の二つを明らかにすることを目的とする。(1) TH 感受性に影響する脳内 TH 輸送体の存在を明らかにすること。このため、MCT8 を含む複数の TH 輸送体に対する抗体を作成し、免疫組織化学染色により、ヒト脳内 TH 輸送体の脳内局在を検討する。さらに胎生期脳における個体発生変化を検討する。(2) ADHD や他の発達障害と subclinical 母体低 T4 血症との関係を明らかにすることを目的とする。このため、妊娠早期の母体血中甲状腺機能検査と出生後 3 週間の発達、さらに ADHD との関係を調査する疫学研究は重要である。この準備段階として、本研究では、地域で管理する ADHD について、母親の甲状腺機能検査異常や CBZ や抗うつ薬など T4 低下を起す薬剤の内服の有無との関係をアンケート調査する。また、妊娠中に、抗てんかん薬を内服していた母親の子どもに対して、神経学的な発達を評価し、ADHD や発達障害の有無を調査する。思春期以降の治療中のてんかんの女兒では、血中甲状腺機能を検査し、subclinical な低 T4 血症の頻度を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 甲状腺ホルモン (TH) 輸送体の脳内局在に関する実験的検討

①ヒト MCT8 タンパクの合成

下記の paper にしたがって、ヒト MCT8 の C 末端の 41 アミノ酸に glutathione S-transferase を付加した塩基配列を、pET ベクターに組み込み、大腸菌にトランスフォームして合成タンパクを大量に得る。(MCT8 の配列のみで合成したタンパクで得たラビット抗体は組織の MCT8 抗原を detect できなかった。) これを glutathione-Sepharose カ

ラムを用いて抽出する。ゲル電気泳動で単一バンドを確認する。

(Friesema et al. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. J Biol Chem. 2003; 278:40128-35.)

②ヒト MCT8 タンパクに対する抗体の作成
合成した fusion タンパクは 100 μ g ずつを 4 回ラビットに投与し、血清を得る。ラビット血清から IgG 分画を抽出し、glutathione-Sepharose カラムを用いて精製する。

③成人脳組織におけるヒト MCT8 タンパクの局在

成人の正常脳組織は、海馬、扁桃核、基底核、小脳半球、大脳半球前頭葉、側頭葉、後頭葉、頭頂葉、視床、中脳、嗅球の 11 箇所を Biochain から購入する。作成した抗 MCT8 抗体を 1000 倍に希釈し、スライドガラス上に載せインキュベートする。洗浄後に、蛍光色素でラベルした二次抗体を用いて MCT8 抗原を可視化する。

④胎児脳組織におけるヒト MCT8 タンパクの局在

Biochain から胎児脳組織は、小脳半球、大脳半球前頭葉、側頭葉、後頭葉、頭頂葉、脳幹を購入し、③と同様に MCT8 を可視化する。

(2) てんかん児または ADHD を対象としたアンケート調査

①抗てんかん薬と subclinical 低 T4 血症との関係

研究代表者が所属する日本小児神経学会北陸地方会では、てんかん研究で、北陸三県の小児神経科医 8 名が共同して仕事をしている。これら小児科医が管理するてんかん患者は数百名に及ぶ。そこで、平成 19 年度に、思春期の女子の血中甲状腺機能検査について 8 名の小児神経科医を対象にアンケート調査をおこない、subclinical な低 T4 血症の頻度を明らかにする。

②ADHD と母親の抗てんかん薬を含む内服薬剤との関係

上記 8 名の小児神経科医を対象に、ADHD の子どもをもつ妊娠中の母親の内服薬についてアンケート調査をおこなう。

③subclinical な母体低 T4 血症と出生した児の発達との関係を明らかにする

妊娠中の母体血の血清を保存しておき、対象となった母体から出生した児がてんかんや ADHD を発症した際に、保存血清を用いて妊娠中の甲状腺機能を確認し、母体の subclinical 低 T4 血症と出生児の発達との関係を明らかにする。

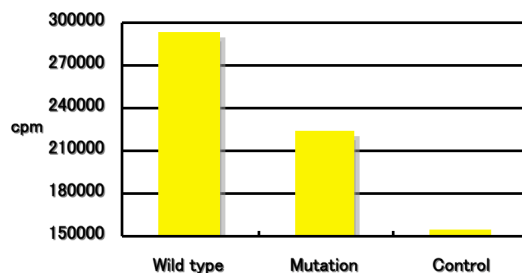
4. 研究成果

(1) 甲状腺ホルモン (TH) 輸送体の脳内局

在

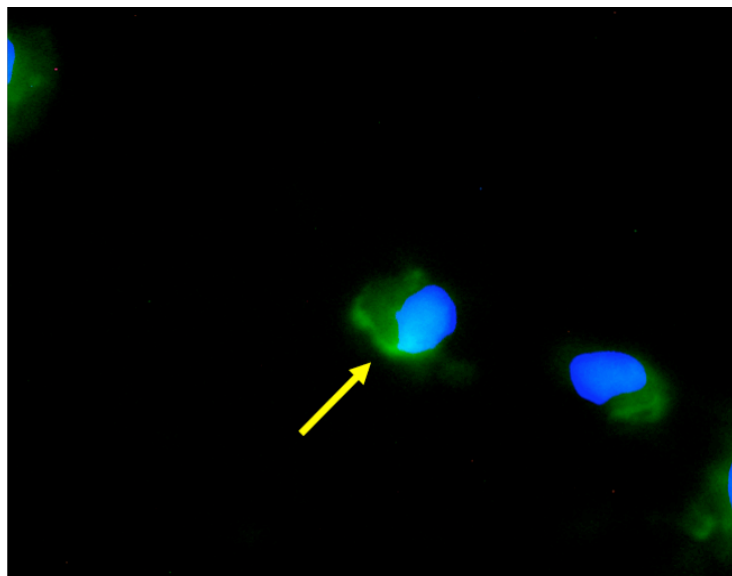
①ヒト MCT8 タンパクの合成

ヒト脳における海馬を試料として RNA を用い、RT-PCR および nested PCR によって、ヒト MCT8 遺伝子のクローニングに成功した。得られたクローンは直接塩基配列解析によって確認した。発現ベクターとして pBApo-CMV Neo DNA を用いて、プラスミドを作成した。得られたプラスミドをゲル電気泳動で確認した。得られたプラスミドの機能を確認するため、プラスミドを CHO-K1 細胞に強制発現させ、¹²⁵I-triiodothyronine の細胞内取込みを確認し、甲状腺ホルモンの輸送能を確認した。また C 末端に FLAG を挿入し、免疫化学染色により細胞内局在を確認した。あわせて mutagenesis 法により、我々が管理している MCT8 遺伝子異常症と同じ塩基配列を持つ変異プラスミドを作成し、野生型と比し、有意な甲状腺ホルモンの輸送能の低下 (野生型の約 50%) と細胞膜での発現を認めた。

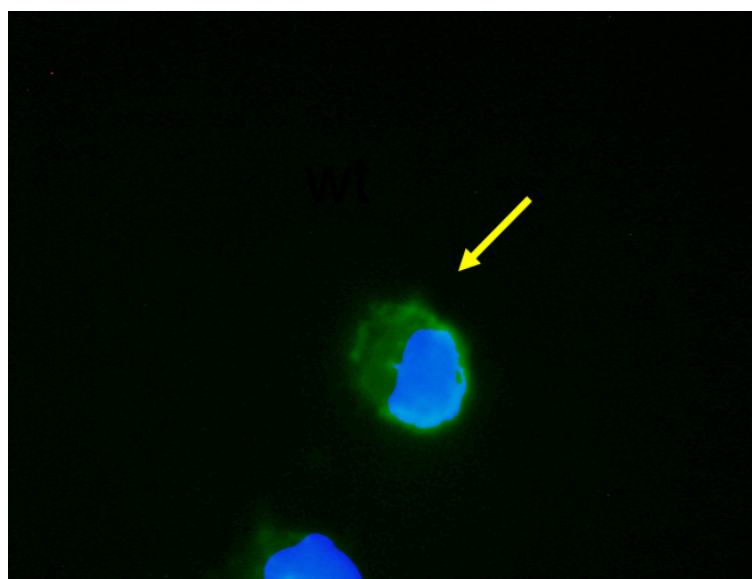


このことからほぼ野生型と同等の甲状腺ホルモン輸送能がなければ、不可逆的神経症状に発展することが推定された。また FLAG による膜タンパクの発現有無としては野生型、変異型ともに細胞膜に発現を認め、変異遺伝子は細胞膜で発現するものの、タンパクの構造変化により輸送能が低下しているものと考えられた。

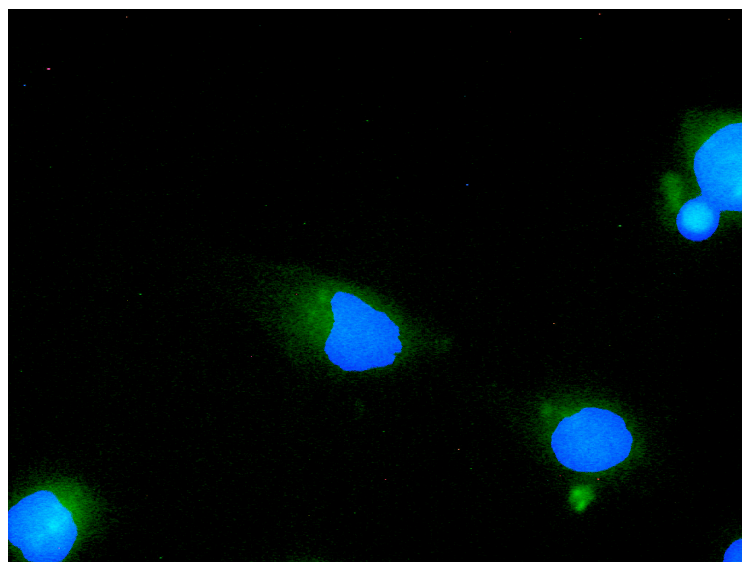
(野生型)



(変異型)



(対照)



また全国より MCT8 遺伝子異常症症例が蓄積されたため、その遺伝子異常症と臨床像を比較検討した。全症例において乳児期早期に血清乳酸値が高値となり、1 歳前後には治療経過などにかかわらず高乳酸血症が消失していた。

	遺伝子変異	検査時 月 齢	Lac (mg/dl)	Pyr (mg/dl)	L/P 比
Case 1	p. V235dup	6	48.3	2.12	22.8
Case 2	p. L304P	7	53.2	1.53	34.8
Case 3	p. N193LfsX47	8	57.3	2.15	26.7
Case 4	p. D498N	8	17.8	0.85	20.9

このことから精神運動発達遅延を呈し、かつ高乳酸血症を認める乳児では、甲状腺機能を確認し、MCT8 遺伝子異常症を鑑別疾患として考慮する必要があると考えられた

②ヒト MCT8 タンパクに対する抗体の作成
免疫動物としてウサギを選択した。膜タンパク質において比較的抗体が得られやすい細胞内領域を中心に、total antigenic score が良好で、かつホモロジー検索において配列保存性が低い部位を三カ所選択（80-96、142-158、593-609）し、カクテルペプチドで 6 回免疫した。得られた抗血清をアフィニティ精製し、抗ヒト MCT8 タンパク抗体として得た。得られた抗体は ELISA で、抗体能力を確認した。

③成人脳組織におけるヒト MCT8 タンパクの局在

現在、ヒト成人脳の組織を手に入れ、海馬、扁桃核、基底核、海馬、扁桃核、基底核、小脳半球、大脳半球前頭葉、側頭葉、後頭葉、頭頂葉、視床、中脳、嗅球の組織を、それぞれ凍結切片を作成し、免疫染色を開始する予定としている。

④胎児脳組織におけるヒト MCT8 タンパクの局在

現在、ヒト胎児脳の組織を手に入れ、胎児脳組織は、小脳半球、大脳半球前頭葉、側頭葉、後頭葉、頭頂葉、脳幹の組織を、それぞれ凍結切片を作成し、免疫染色を開始する予定としている。

(2) てんかん児または ADHD を対象としたアンケート調査

①抗てんかん薬と subclinical 低 T4 血症との関係

アンケート調査を行ったが、明らかな subclinical 低 T4 血症はおらず、抗てんかん薬と subclinical 低 T4 血症との因果関係は

不明であった。

②ADHD と母親の抗てんかん薬を含む内服薬剤との関係

アンケート調査で、ADHD の子どもをもつ妊娠中の母親の内服状況を確認したが、統一性はみられず、有意な所見は得られなかった。このため ADHD と母親の抗てんかん薬を含む内服薬剤との因果関係は不明であった。

③subclinical な母体低 T4 血症と出生した児の発達との関係を明らかにする

前向き研究として、100 名の母親の妊娠中の甲状腺機能を確認したが、fT4 が正常の 10 パーセント以下以下の低 T4 血症の母体は 1 人発見されたが、現時点で ADHD などの発達障害と新規に診断された出生児も認められなかった。発達障害は 5 歳以降に明らかになることが多いため、現時点では母体低 T4 血症と出生児の発達との因果関係は不明であった。

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 1 件)

①伊藤 順庸、甲状腺ホルモン MCT8 変異体 (235dupVal) の一過性発現実験による機能解析、金沢医科大学雑誌、査読有、32 巻、2008、p156-161

[学会発表] (計 3 件)

①伊藤 順庸、佐藤 仁志、山村 淳一、犀川 太、MCT8 遺伝子異常症の遺伝子変異と臨床像の比較検討、第 24 回北陸小児内分泌研究会、2010 年 1 月 23 日、金沢

②M ITOH, J YAMAMURA, H SATO, H KAKINUMA, FUNCTIONAL STUDIES OF A CUPLIVATION OF VALINE AT 235 BY A TRANSIENT ASSAY IN A BOY WITH MCT8 DEFFICIENCY, SOCIETH FOR THE STUDY OF INBORN ERRORS OF METABOLISM, 3 September 2008, Lisboa Portugal

③伊藤 順庸、柿沼 宏明、MCT8 欠損症例の分子基盤、第 50 回日本小児神経学会、2008 年 5 月 29 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 順庸 (ITO MASATSUNE)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：60367472

(H20：研究分担者→H21：研究代表者)

柿沼 宏明 (KAKINUMA HIROAKI)

金沢医科大学・看護学部・教授

研究者番号：60271376

(H19～20：研究代表者)

(2) 研究分担者

佐藤 仁志 (SATO HITOSHI)

金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：20303224

(3) 連携研究者

なし