

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07451

研究課題名（和文）SLC26A7とPendrinの調節機構と結節性甲状腺腫の発病機序の関係

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of SLC26A7 and Pendrin in relation to the pathogenesis of multinodular goiter

研究代表者

菅間 博（Kamma, Hiroshi）

杏林大学・医学部・特任教授

研究者番号：10195191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）： SLC26A7（Isidrin）とPendrinのオーソログ解析の結果、魚類の種分枝過程でIsidrinはPendrinから分かれたと考えられた。プロモーター解析の結果、IsidrinはCRE配列がみられ、cAMP経路で発現調整されと考えられた。

特異的な抗体を作成し免疫組織学的に検討した。バセドウ病の活動性濾胞でのIsidrinの先端膜発現は、高濃度サイログロブリンを含む濾胞で低下していた。結節性甲状腺腫のSanderson's pollsterでのIsidrinの発現が亢進している症例があり、Isidrinによるヨウ素貯蔵の調節異常が発病機序に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Isidrinは2019年に我々がPendrinの機能を補完する新たな甲状腺のヨウ素トランスポーターである。今回、PendrinとIsidrinの分子系統的な違い、およびヨウ素トランスポーターが2種類ある理由をはじめて示した。Isidrinは、ヨウ素貯蔵が必要な環境で生物が生息するためにPendrinから分かれたこと、そしてIsidrinの発現はホルモンの機能調節機構（cAMP）の影響を強く受けることも明らかにした。新たにIsidrin特異的な抗体を作成し、実臨床検体の濾胞局所でのIsidrinとPendrinの発現様式の違いを明らかにし、結節性甲状腺腫の発病機序につながると考えた。

研究成果の概要（英文）： As a result of ortholog analysis of SLC26A7 (Isidrin) and Pendrin, it was thought that Isidrin parted from Pendrin in the phylogenetic process of fish. As a result of promoter analysis, CRE sequence was found in Isidrin, and it was thought that expression of Isidrin is regulated by a cAMP signal system.

I made a specific antibody and performed an immunohistological study. In the active follicles of the Basedow's disease, the apical expression of Isidrin decreased in a follicle including the highly-concentrated thyroglobulin. In some cases of multinodular goiter, Isidrin was overexpressed in Sanderson's pollsters, suggesting a possibility that regulatory abnormality of the iodine storage by Isidrin is associated with pathogenesis of multinodular goiter.

研究分野：Pathology

キーワード：甲状腺濾胞 ヨウ素輸送蛋白 SLC26A4 Isidrin SLC26A4 Pendrin 腺腫様甲状腺腫 ヨウ素貯蔵調節

1. 研究開始当初の背景

甲状腺の濾胞腔内にヨウ素を輸送するトランスポーターとして SLC26A4 が知られていた。SLC26A4 の先天異常は難聴と結節性甲状腺腫を示し、発見者の名前から Pendred 症候群と呼ばれ、SLC26A4 蛋白は Pendrin と命名された。2019 年に我々は、SLC26A7 が Pendrin の機能を補完する甲状腺のヨウ素トランスポーターであることを明らかにし、Isidrin (Iodide-Specific Import DRiving protein) と名づけた。また、Isidrin の先天異常は甲状腺機能低下を伴う結節性甲状腺腫を示すことを明らかにした。

結節性甲状腺腫(腺腫様甲状腺腫)は甲状腺の腫瘍様病変に位置付けられるが、組織形態学的には濾胞細胞の増殖より濾胞腔の拡大による甲状腺腫大である。甲状腺の濾胞腔は甲状腺ホルモンの原料となるヨウ素の貯蔵庫である。よって結節性甲状腺腫の発病機構に、ヨウ素の輸送と貯蔵の異常が関与すると推測される。

2. 研究の目的

Isidrin と Pendrin の遺伝子レベルの発現様式の違いから、ヨウ素の輸送、貯蔵における生理的な機能の違いを予測する。さらにバセドウ病と結節性甲状腺腫における Isidrin と Pendrin の蛋白レベルの発現様式の違いを明らかにし、結節性甲状腺腫の発病機構に迫る。

3. 研究の方法

(遺伝子レベルの比較解析)

- 1) 遺伝子データベース(NCBI/Gene データベース、EMBL-EBI データベース)を用いて、Isidrin と Pendrin 遺伝子のオーソログを系統発生的に比較解析した。
- 2) Isidrin と Pendrin 遺伝子のプロモーター領域のコンセンサス配列を、Eukaryotic Promoter Database [<https://epd.epfl.ch//index.php>]や転写因子モチーフデータベース(JASPAR [<http://jaspar.genereg.net/>])等)、遺伝子発現データベース(Gene Expression Omnibus[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>]) (accession No. GSE83919, GSE29341)を参照して比較解析した。

(蛋白レベルの比較解析)

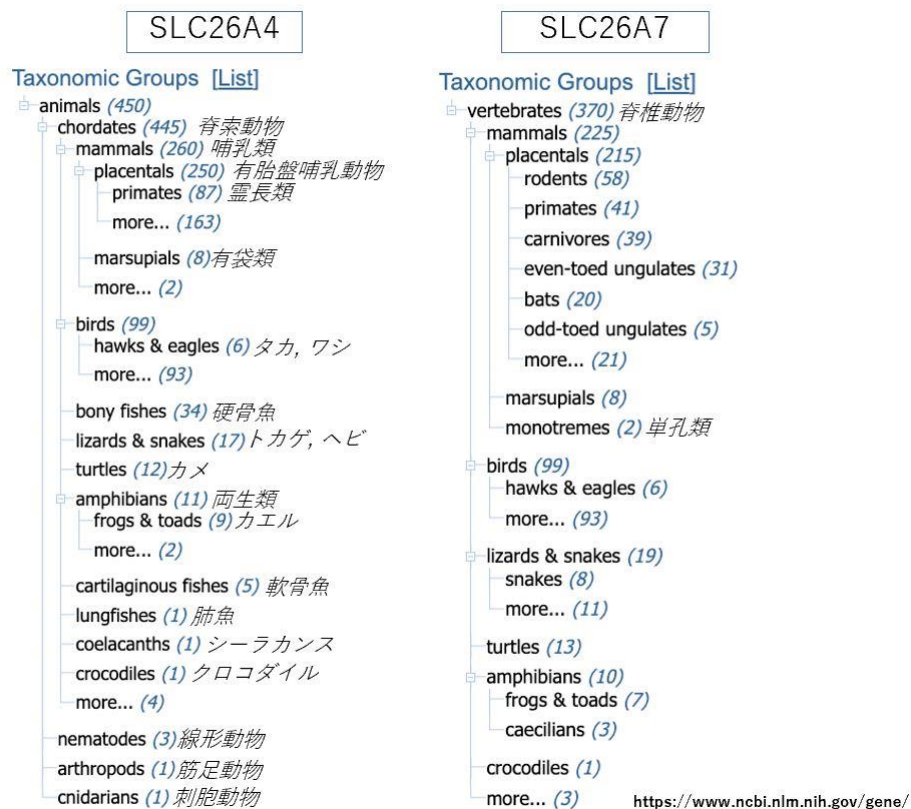
- 3) Isidrin 蛋白の 3 次構造等に注目して抗原ペプチドを作成し、Isidrin 特異抗体を作製した。Pendrin 特異抗体は市販品を購入した。
- 4) ヒト甲状腺組織の手術標本ならびに病理解剖標本を対象として、Isidrin と Pendrin の蛋白レベルの局在発現を、特に活動性濾胞(バセドウ病の濾胞)に着目して、免疫組織学的に比較解析した。
- 5) 結節性甲状腺腫の手術標本ならびに病理解剖標本を対象として、Isidrin と Pendrin の蛋白レベルの発現パターンを免疫組織学的に明らかにする。

4. 研究成果

(遺伝子レベルの比較解析)

1) Isidrin と Pendrin 遺伝子のオーソログの比較系統解析

Pendrin 遺伝子のオーソログは線形動物、筋足動物、刺胞動物から脊椎動物まで確認されるが、Isidrin 遺伝子のオーソログは脊椎動物のみで確認される。脊椎動物では Isidrin 遺伝子と Pendrin 遺伝子のオーソログは魚類からほ乳類まで同様に確認される。ただし、魚類では Isidrin 遺伝子のオーソログは、Pendrin 遺伝子のオーソログが確認されない 49 種中の 45 種を含む70種の魚類で認められない。



以上から、分子系統的に Isidrin 遺伝子は Pendrin 遺伝子より進化した遺伝子であり、脊椎動物の魚類の種分枝過程で Isidrin 遺伝子は Pendrin 遺伝子から分かれたパラログ遺伝子と考えられる。魚類の生息する水中のヨウ素の濃度は、海水か淡水かにより異なる。両生類以上の陸上生物では生息環境によってヨウ素摂取が困難で、甲状腺ホルモンの原料であるヨウ素を貯蔵する必要があるが生じる。ヨウ素トランスポーターの Pendrin と Isidrin は機能が異なり、その差は生物のヨウ素の摂取環境の変化に対応するために生じたのではと考えられる。

2) Isidrin、Pendrin、NIS とサイログロブリンの遺伝子のプロモーター解析

Pendrin 遺伝子と NIS 遺伝子のプロモーターは、甲状腺に特異的な転写因子である PAX8 との結合配列をもつ。一方、Isidrin 遺伝子と Tg 遺伝子のプロモーターは PAX8 結合配列に加えて cAMP 応答配列 (CRE 配列) をもつ。siRNA によって培養細胞における PAX8 を抑制する事で、SLC26A4 と SLC26A7 の発現は両者とも減弱することが報告されている。以上から、Pendrin と NIS は恒常的に発現がみられるが、Isidrin と Tg は TSH 受容体刺激下の cAMP シグナルの影響を受け発現が変化し、濾胞の活性化状態により変化することが予測される。

3) Isidrin 特異抗体の作製

Isidrin 蛋白の 3 次構造から抗原候補部位を選択し、同部のペプチドを合成してウサギを免疫して血清を採取し、ELISA、ウェスタンブロットと免疫染色にて特異性のスクリーニングを行った。当初、2 か所の細胞内ドメインのアミノ酸配列からなるペプチドを抗原としたが、特異的な抗体が得られなかったため、4 か所の細胞外ドメインのアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として、ウサギを免疫した。その結果、ELISA と免疫染色にて特異的に反応する抗体が 1 種得られた。

Pendrin、NIS、サイログロブリンの特異抗体は市販品を購入した。

4) 甲状腺組織における Isidrin と Pendrin の発現の免疫組織学的な比較解析

バセドウ病では抗 TSH-R 抗体により TSH 受容体が持続的に刺激される結果、濾胞細胞が増殖し、小型の活動性濾胞が増加するとともに、濾胞細胞が濾胞内腔へ嵌入増殖する(図1)。ホルモンの産生が亢進状態にある活動性の濾胞は、内腔にコロイド(サイログロブリン+ヨウ素)を容れるが、淡明で再吸収像がみられる。

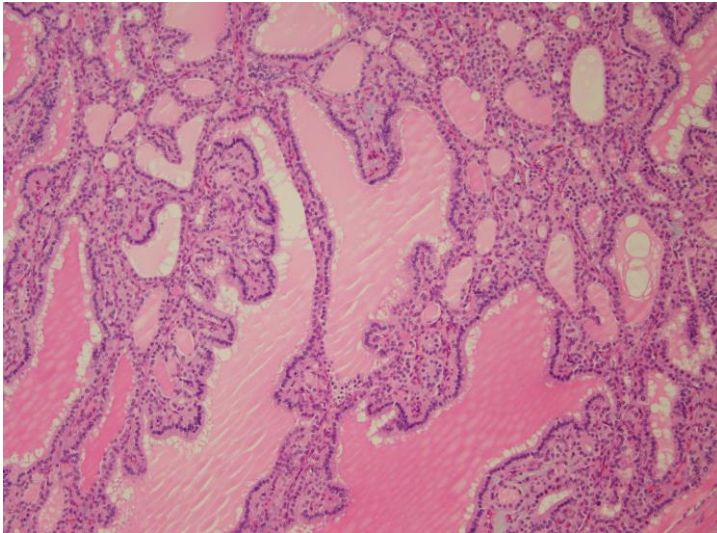


図1 バセドウ病の組織像

小型～不整形に拡大した濾胞が増加し、濾胞細胞は立方化し、濾胞内腔に突出増殖する。濾胞内のコロイドは薄く不均質(Tg 濃度は不均一)で、再吸収空胞を伴う。

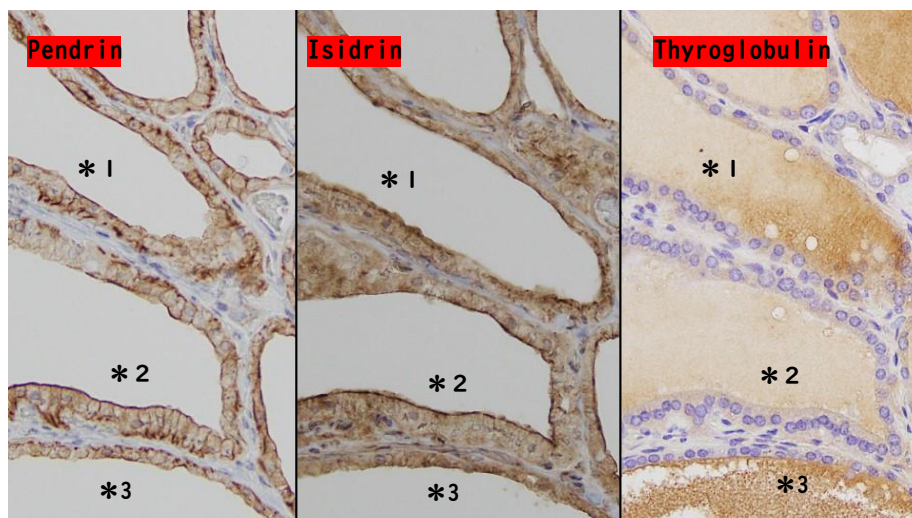


図2 Pendrin(左)、Isidrin(中)、サイログロブリン(右)の免疫染色像

*1, *2 (Tg が淡く、再吸収像+) ↔ *3 (Tg が濃く、再吸収像-)

Pendrin ↑、Isidrin ↑ ↔ Pendrin ↑、Isidrin ↓

特異抗体を用いた免疫染色により、Pendrin と Isidrin の局在を検討した。Pendrin はサイログロブリン(Tg)の濃さに関係なく全ての濾胞に発現がみられ、内腔側の先端膜(Apical)や側面(Lateral)とともに基底側(Basal)にも破線状に発現がみられる。Isidrin の発現は Tg が淡く、再吸収像のみられる濾胞の Apical に局在するが、Tg が濃い濾胞では発現が減弱ないし消失する。即ち、バセドウ病では Pendrin の濾胞細胞の先端膜における発現は全般に亢進するが、Isidrin の発現は濾胞ないし細胞単位で調節され変化する。高濃度の Tg を含む濾胞では Isidrin の発現が低下し、

ヨウ素の濾胞への輸送ないし貯蔵を調節している可能性が考えられる。

5) 結節性甲状腺腫における Isidrin と Pendrin の発現の免疫組織学的な比較解析

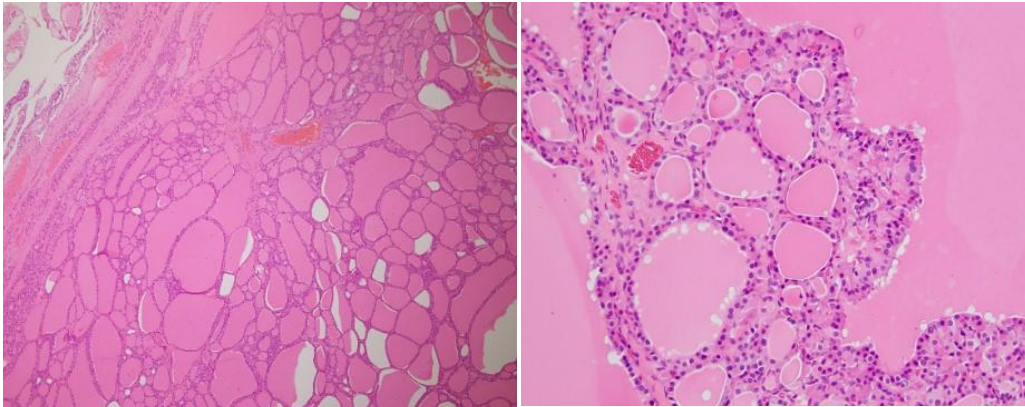


図3 結節性甲状腺腫の組織像

結節性甲状腺腫は大小不動がめだつ大型不整形濾胞からなり、濾胞腔内に濃いコロイドを容れる(図3左)。大部分の濾胞は、コロイドが貯留し拡大し非活性状態である。特徴的な構造として、拡大した濾胞腔に活動性の小濾胞が集簇して突出する構造(Sanderson's pollster)(図3右)がみられる。

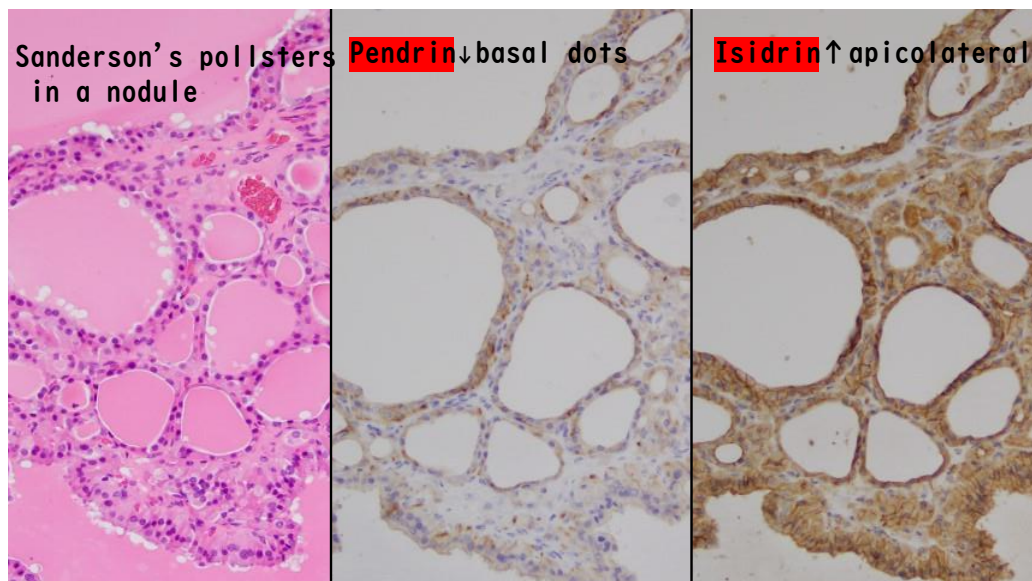


図 4 結節性甲状腺腫の Sanderson's pollster(右:H・E)における Pendrin(中)、Isidrin(右)の免疫染色像

Sanderson's pollster における Pendrin の発現は保たれているが、Apical の発現は弱く、basal に不連続ドット状に発現がみられる。Isidrin の発現は亢進し、Apical だけでなく lateral にも局在してみられる。

結節性甲状腺腫では、一般に濾胞内のコロイドないし Tg は濃い割に、Isidrin の Sanderson's pollster での発現亢進が目立ち、Apical から Lateral に局在してみられる症例がある。これは TSH 持続刺激状態のバセドウ病における Pendrin と Isidrin の発現と逆のパターンであり、Pendrin と Isidrin による甲状腺濾胞へのヨウ素の輸送と貯蔵の調節メカニズムに異常が生じている可能性を示唆していると考えられる。

ヨウ素輸送分子 Pendrin と Isidrin による濾胞内へのヨウ素の輸送と貯蔵の調節メカニズムが、結節性甲状腺腫の発病機構の解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 1.Kamma H, Kameyama K, Kondo T, Imamura Y, Nakashima M, Chiba T, Hirokawa M	4. 巻 69(2)
2. 論文標題 Pathological diagnosis of general rules for the description of thyroid cancer by Japanese Society of Thyroid Pathology and Japan Association of Endocrine Surgery.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocr J	6. 最初と最後の頁 139-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirokawa Tatsuya, Arimasu Yuu, Nakazato Yoko, Chiba Tomohiro, Fujiwara Masachika, Kamma Hiroshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Effect of single-nucleotide polymorphism inTERTpromoter on follicular thyroid tumor development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 210～216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirokawa Tatsuya, Arimasu Yuu, Chiba Tomohiro, Nakazato Yoko, Fujiwara Masachika, Kamma Hiroshi	4. 巻 87
2. 論文標題 Regulatory Single Nucleotide Polymorphism Increases <i>TERT</i> Promoter Activity in Thyroid Carcinoma Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 338～344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000509752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirokawa Tatsuya, Arimasu Yuu, Chiba Tomohiro, Fujiwara Masachika, Kamma Hiroshi	4. 巻 70
2. 論文標題 Clinicopathological significance of the single nucleotide polymorphism, rs2853669 within the TERT promoter in papillary thyroid carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 217～223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirokawa Mitsuyoshi、Matsuse Michiko、Mitsutake Norisato、Suzuki Ayana、Higuchi Miyoko、Hayashi Toshitetsu、Kamma Hiroshi、Miyauchi Akira、Akamizu Takashi	4. 巻 18
2. 論文標題 Non-hyalinizing trabecular thyroid adenoma: a novel thyroid tumor with diagnostic pitfalls of hyalinizing trabecular adenoma and medullary thyroid carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13000-023-01361-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅間 博
2. 発表標題 甲状腺腫瘍の病理診断と遺伝子異常
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅間 博
2. 発表標題 甲状腺腫瘍の分類について
3. 学会等名 第8回日本甲状腺病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅間 博
2. 発表標題 甲状腺癌病理組織分類と遺伝子変異
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉知宏、住石歩、菅間博
2. 発表標題 結節の鑑別における分子診断
3. 学会等名 日本臨床内分泌病理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	平野 浩一 (Hirano Koichi) (30189849)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	
研究 分担者	矢澤 卓也 (Yazawa Takuya) (50251054)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究 分担者	中里 陽子 (Nakazato Yoko) (60424115)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	
研究 分担者	石井 順 (Isii Jun) (80749599)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------