

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16936

研究課題名(和文) 特異な臨床像を呈した転写因子PAX8変異G56Sの分子、組織、個体レベル機能解析

研究課題名(英文) Molecular, histological, and functional analysis of the transcription factor PAX8 mutant G56S with a distinctive clinical picture

研究代表者

阿部 清美 (Abe, Kiyomi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：30594973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺特異的転写因子PAX8の新規バリエーションG56Sを保有する4世代家系で、小児期に甲状腺機能低下症、成人期に腺腫様甲状腺腫が観察された。このG56Sの病原性と経時的甲状腺表現型の推移をマウスモデルで検証するため、Pax8 G56S遺伝子導入マウスを作成した。2週齢のG56SホモマウスはWtに比し、体重減少と甲状腺機能低下を示し、組織学的に濾胞形成不全が見られた。3か月齢G56Sマウスにおいて体重はWtと同等であったが、甲状腺機能低下は持続し、組織学的には腺腫様甲状腺腫の特徴的所見が認められた。G56Sホモマウスは、ヒト家系の表現型を再現し、G56Sが本疾患の病因であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規PAX8バリエーションG56Sにより甲状腺機能低下を来すこと、さらに組織学的に甲状腺濾胞形成不全と腺腫様甲状腺腫様の变化を来すことをマウスモデルで明らかにすることができた。既報のPAX8ノックアウトマウスと比較し、本遺伝子改変マウスは長期生存可能で軽症である。そのため経時的かつ長期的な甲状腺形態・病理学的観察が可能であり、未熟濾胞の変遷と腺腫様甲状腺腫の形成との関連の検証を通じて、新たな知見を得られると考える。その知見は、PAX8変異陽性患者の治療管理面で有用となるだけでなく、未だ原因が分かっていない甲状腺形成異常および甲状腺腫発生分子機序の解明を行う上でも重要な意義をなすと考える。

研究成果の概要(英文)：The thyroid-specific transcription factor PAX8 is indispensable for thyroid folliculogenesis. We studied a four-generation family with a novel PAX8 G56S variant, presenting congenital hypothyroidism (CH) in children and adenomatous goiter in adults. We created Pax8 G56S transgenic mice to investigate this age-dependent phenotype using CRISPR-Cas9.

We compared homozygous G56S mice with wild-type (Wt) littermates at 2 weeks and 3 months. G56S mice were viable long-term, showing growth retardation at 2 weeks but recovery by 3 months. They exhibited persistent hypothyroidism at 2 weeks and 3 months. Histologically, 2-week-old G56S mice showed follicular dysplasia, while 3-month-old mice exhibited irregular follicles and Sanderson polsters, characteristic of human adenomatous goiter.

G56S mice successfully reproduced the hypothyroidism and time-dependent transition of thyroid phenotype seen in the human G56S family. This demonstrated that the G56S variant is the cause of this phenotype.

研究分野：小児内分泌

キーワード：PAX8 先天性甲状腺機能低下症 甲状腺形成異常 未熟濾胞 腺腫様甲状腺腫 遺伝子改変マウス 転写因子

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

先天性甲状腺機能低下症の約85%は甲状腺形成異常によるが、その原因遺伝子の検出率は5%ほどで、多くは未解明である。器官特異的転写因子である Paired box 8 (PAX8)は、甲状腺において胎児期から終生にわたり高発現し、甲状腺の発生、分化、組織形成維持に重要な役割を果たす。PAX8 機能低下型バリエントは常染色体顕性遺伝し、甲状腺低形成を伴う先天性甲状腺機能低下症を惹起する。

我々は、4世代にわたる特徴的な臨床像（小児期：先天性甲状腺機能低下症、成人期：腺腫様甲状腺腫）を呈した大家系において新規 PAX8 G56S バリエントを同定した。In vitro 実験では、G56S バリエントの転写活性は野生型に比し高値となり、バリエントの病原性を示すことはできなかった。また、本家系で特徴的な甲状腺組織の経年変化の再現には、マウスモデルによる検討が不可欠である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2点である。新規 PAX8 G56S バリエントについて、遺伝子改変マウスを用い①甲状腺機能低下症の病原性の有無を検証する。②甲状腺形成異常、濾胞形成不全、成人期の甲状腺腺腫形成への関連を明らかにする。継時的な甲状腺形態および病理組織学的観察により、未熟な甲状腺濾胞組織の変遷と腺腫形成への関与を検証する。また、濾胞形成不全や腺腫発生の機序を探索する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子改変マウスの作出

ゲノム編集技術 (CRISPR-Cas9) を用いて Pax8 (G56S) バリエントマウス (以下 G56S) を作出した (国立成育医療センター高田修治先生に委託)。対照実験のため、Pax8 ノックアウトマウス (以下 KO) も作出した。

#### (2) 遺伝子改変マウスの表現型解析

甲状腺機能低下症の有無を検証するため、マウスの成長 (体重)、甲状腺機能 (血清甲状腺ホルモン T4) を評価した。

(3) 甲状腺組織の病理学的解析 (甲状腺未熟濾胞および腺腫様変化出現の有無の検証) マウスより甲状腺を摘出し、甲状腺形態および HE 染色で甲状腺組織像 (濾胞の形態および形成過程、腺腫様甲状腺腫の出現の有無) を比較 (慶應義塾大学医学部病理学教室藏本純子先生と共同研究) した。

#### (4) 甲状腺組織の遺伝子発現解析

長期飼育成獣マウス (3カ月齢以上) の甲状腺組織から RNA を抽出し、RNA-seq を行い、遺伝子発現を比較した。

また、(2)、(3)、(4) の比較には、Wt, G56S ヘテロ、G56S ホモ、KO ヘテロ、KO ホモを用い、比較時期として、ヒトの乳児期変化を想定して2週齢のマウスを、また、ヒト成人期の変化を想定して3か月齢以上の成獣マウスを用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子改変マウスの作出と維持

G56S ホモ、G56S ヘテロ、KO ヘテロは1年以上の長期生存可能であった。一方、KO ホモは、離乳前に致死となり、最長で3週間の生存期間であった。

##### (2) 遺伝子改変マウスの表現型解析

マウス2週齢と3カ月齢の①成長(体重)、②甲状腺機能(血清T4)の評価。G56Sヘテロ、KOヘテロは、それぞれWtと比較し、有意差がなかったため、WtとG56Sホモ、WtとKOホモについて、結果を示す。

G56Sは、Wtに比し、2週齢で体重は軽度低値であったが、3カ月齢は同等、T4は、2週齢でも3カ月齢でも低値だった(図1A)。KOはWtに比し2週齢で体重、T4ともに著明に低値(3週齢までに致死)であり(図1B)、G56SはKOに比し、軽症であった。

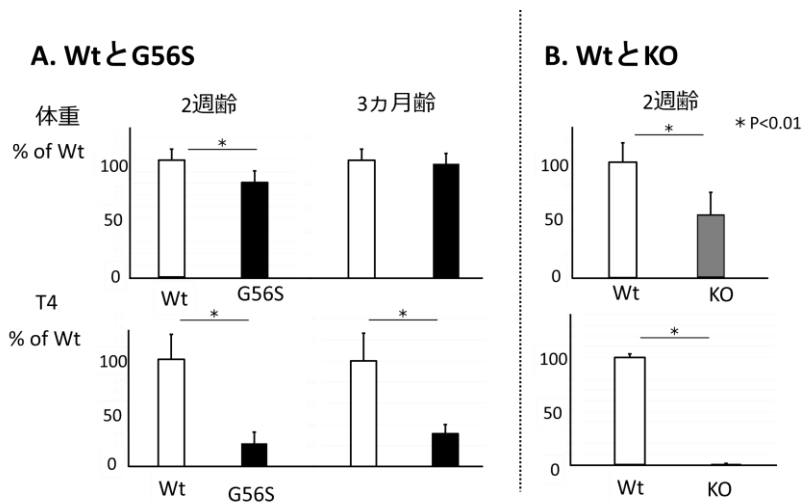


図1 ; A. Wt (白)、G56S (黒)、B. Wt (白)、KO (グレー)、上段に体重、下段にT4測定値。(KOは3週齢までに致死となるため、2週齢のデータのみ表示)

##### (3) 甲状腺組織の病理学的解析(甲状腺未熟濾胞および腺腫様変化出現の有無の検証)

① 2週齢の甲状腺組織像 ; Wtの甲状腺組織は、丸くコロイドで充満した濾胞腔(図1Aの実線○)が確認できるのに対し、G56Sは、コロイド貯留がほとんどない小濾胞や、濾胞の形成に至っていない濾胞細胞の集塊(図1Aの点線○)が見られた。一方、KOでの甲状腺濾胞組織は全欠損しておりC細胞の集簇を確認できるのみであった。

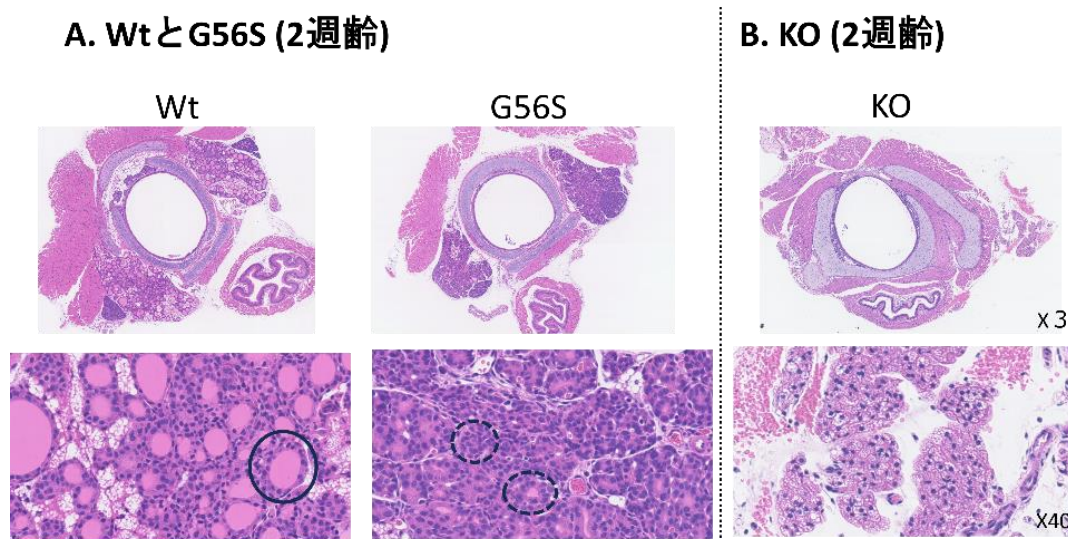


図2 ; A. WtとG56Sの2週齢マウスの甲状腺組織。Wtはコロイドで充満した濾胞腔(実線○)とG56Sはコロイド貯留少量の小濾胞や、濾胞形成に至っていない細胞集塊(点線○)。B. KOの甲状腺濾胞組織。C細胞の集簇のみ。

② **3カ月の甲状腺組織像** (KOは3週齢までに致死となるため Wt、G56S のみで検討) ; Wt は、コロイドが充満した濾胞構造を認めるが、G56S では正円性の濾胞はほとんど見られず、小濾胞と不整な管腔形態の巨大濾胞の混在を認めた。大型の濾胞の内部に小型濾胞の増生を伴う Sanderson polster という腺腫様甲状腺腫に特徴的な組織像が見られた。

### 3カ月齢甲状腺

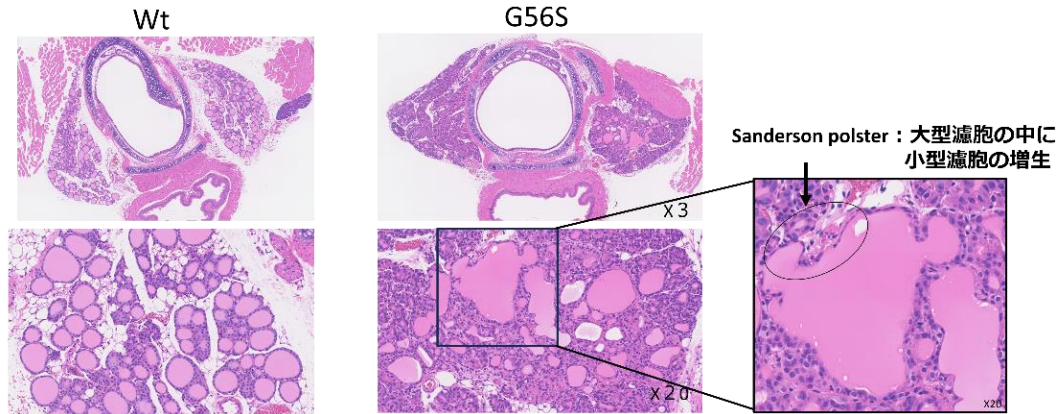


図3 ; Wt と G56S の3カ月齢マウスの甲状腺組織。3カ月齢の G56S マウス甲状腺には Sanderson polster を認めた。

#### (4) 甲状腺組織の遺伝子発現解析

Wt と G56S の5カ月齢マウスの甲状腺より RNA を抽出し、RNA シークエンスを実施した。結果は現在解析中である。

#### 結果まとめと考察

遺伝子改変マウス G56S の作出に成功した。G56S ホモマウスでは、生後少なくとも3カ月齢までの甲状腺機能低下を認めた。G56S ホモマウスの甲状腺組織では、2週齢で濾胞形成不全、3カ月齢で腺腫様甲状腺腫様変化をみとめた。以上より、ヒト PAX8 G56S バリエント保有家系の甲状腺表現型を再現できたと考え、G56S バリエントは同疾患の病因であると考え。今後、RNA-seq. の解析結果をもとに遺伝子発現量やパスウェイ解析を実施し、濾胞形成不全および腺腫様甲状腺腫を来すメカニズムについての解明を試みる。

本研究で作出した遺伝子改変マウスは既報の PAX8 機能欠損型 (KO) マウスと比較し、軽症で長期生存可能である。そのため、継時的かつ長期的な甲状腺形態・病理学的観察が可能であり、胎児様甲状腺組織の変遷と腺腫形成との関連の検証を通じて、新たな知見を得られると考える。その知見は、PAX8 バリエント陽性患者の治療管理面で有用となるだけでなく、未だ原因が分かっていない甲状腺形成異常および甲状腺腺腫発生の分子機序を解明する上でも重要な意義を成すと考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tanase-Nakao K., Iwashashi-Odano M., Abe K., Muroya K., Hasegawa T., Hishinuma A., Narumi S et.al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Genotype-Phenotype Correlations in 30 Japanese Patients With Congenital Hypothyroidism Attributable to TG Defects	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism	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） 10.1210/clinem/dgae098	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 -
1. 著者名 Abe Kiyomi, Li Jianrong, Liu Yan Yun, Brent Gregory A	4. 巻 6
2. 論文標題 Thyroid Hormone mediated Histone Modification Protects Cortical Neurons From the Toxic Effects of Hypoxic Injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/jendso/bvac139	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 Narumi Satoshi, Opitz Robert, Nagasaki Keisuke, Muroya Koji, Asakura Yumi, Adachi Masanori, Abe Kiyomi, Sugisawa Chiho, Kuhnen Peter, Ishii Tomohiro, Nothen Markus M, Krude Heiko, Hasegawa Tomonobu	4. 巻 31
2. 論文標題 GWAS of thyroid dysgenesis identifies a risk locus at 2q33.3 linked to regulation of Wnt signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3967 ~ 3974
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddac093	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 Tanase-Nakao Kanako, Muroya Koji, Adachi Masanori, Abe Kiyomi, Hasegawa Tomonobu, Narumi Satoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 A patient with congenital hypothyroidism due to a PAX8 frameshift variant accompanying a urogenital malformation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Pediatric Endocrinology	6. 最初と最後の頁 250 ~ 255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1297/cpe.2022-0030	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 -

1. 著者名 Liu Yan-Yun, Jiang Jingjing, Ke Sujie, Milanesi Anna, Abe Kiyomi, Gastelum Gilberto, Li Jianrong, Brent Gregory A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Thyroid hormone receptor alpha sumoylation modulates white adipose tissue stores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 e149425-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-03491-6	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 Ke Sujie, Liu Yan-Yun, Karthikraj Rajendiran, Kannan Kurunthachalam, Jiang Jingjing, Abe Kiyomi, Milanesi Anna, Brent Gregory A.	4. 巻 6
2. 論文標題 Thyroid hormone receptor sumoylation is required for thyrotropin regulation and thyroid hormone production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 24105-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.149425	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

[学会発表] 計15件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 阿部 清美;Li Jianrong;Liu Yan-Yun;Brent Gregory A.
2. 発表標題 甲状腺ホルモンはヒストン修飾を介し、大脳皮質ニューロンを低酸素性障害から保護する
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部清美、Li Jianrong、Liu Yan-Yun、Brent Gregory A
2. 発表標題 低酸素曝露下の神経細胞への甲状腺ホルモン投与によるヒストン修飾変化
3. 学会等名 第56回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鳴海覚志、長崎啓祐、上原絵理香、秋葉和壽、中尾佳奈子、志村和浩、阿部清美、杉澤千穂、桐谷光夫、都研一、長谷川行洋、室谷浩二、丸尾良浩、中林一彦、秦健一郎、高山順、島彦仁、菊池敦生、長谷川奉延
2. 発表標題 15q26.1における非コード配列変化を病因とする家族性先天性甲状腺機能低下症の新病型の同定
3. 学会等名 第56回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部清美
2. 発表標題 特異な甲状腺表現型を示したPAX8 G56S パリアントの多階層的解析：in vitroおよびin vivo複合アプローチによる検討
3. 学会等名 第66回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部清美
2. 発表標題 4世代にわたり特異的甲状腺表現型を示した家系とその病因PAX8新規パリアントG56Sの多階層的機能解析
3. 学会等名 第97回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 阿部清美、西岡淳子、小田野めぐみ、岩野麗子、室谷浩二、藏本純子、金井弥栄、秋葉和壽、高田 修治、寺尾美穂、石井智弘、鳴海覚志、長谷川奉延
2. 発表標題 マウスモデルによる新規PAX8 G56Sパリアントの時間依存的な甲状腺表現型推移の検討
3. 学会等名 第56回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 阿部 清美, 鳴海 覚志, 室谷 浩二, 安達 昌功, 朝倉 由美, 杉澤 千穂, 濃沼 政美, 長谷川 奉延
2. 発表標題 DUOX2 異常症 36 名の縦断的臨床経過
3. 学会等名 第 55 回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部 清美
2. 発表標題 シンポジウム 1 小児パセドウ病：ゆりかごから AYA 世代まで「思春期から始めたいパセドウ病のプレコンセプションケア」
3. 学会等名 第 55 回日本小児内分泌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中尾 佳奈子, 小田野 めぐみ, 阿部 清美, 杉澤 千穂, 長谷川 奉延, 鳴海 覚志
2. 発表標題 新生児マススクリーニング導入以降に出生したサイログロブリン欠損症28名の臨床像
3. 学会等名 第 55 回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部清美
2. 発表標題 内分泌・代謝セミナー「かかりつけ医が日常診療で知っておきたい知識」日常診療における甲状腺腫大の診かた
3. 学会等名 第32回小児科医会総合フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 阿部 清美、鳴海 覚志、室谷 浩二、朝倉 由美、安達 昌功、小田野めぐみ、中尾佳奈子、杉澤千穂、長谷川 奉延
2. 発表標題 先天性甲状腺機能低下症原因遺伝子 ヘテロ変異症例の臨床像
3. 学会等名 第54回小児内分泌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部清美
2. 発表標題 シンポジウム2 甲状腺ホルモン合成障害を単一遺伝子疾患の視点から紐解く
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部 清美、鳴海 覚志、室谷 浩二、朝倉 由美、安達 昌功、小田野めぐみ、中尾佳奈子、杉澤千穂、長谷川 奉延
2. 発表標題 先天性甲状腺機能低下症原因遺伝子 ヘテロ変異症例の臨床像
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 Kiyomi Abe, Gilberto Gastelum, Chengju Li, Harmie Rubinos, Alexandr Yamada, Yan-Yun Liu, Gregory A. Brent
2. 発表標題 Thyroid Hormone Receptor Alpha Sumoylation Is Important for the Development of Adipose Tissue
3. 学会等名 第102回米国内分泌学会；ENDO Online 2020: The Endocrine Society Annual Meeting, 2020, Online（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部 清美
2. 発表標題 Traumatic Brain Injury (TBI) に対する甲状腺ホルモンの有効性
3. 学会等名 第63回日本甲状腺学会学術集会 (Web開催) 基礎系シンポジウム 基礎甲状腺学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 成瀬光栄、田辺晶代、方波見卓行、高橋裕、田上哲也、竹内靖博、阿部清美、長谷川奉延 他	4. 発行年 2023年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 232
3. 書名 内分泌代謝疾患クリニカルクエスチョン100 改訂第2版	

1. 著者名 深田修司、菱沼 昭、小飼貴彦、大江秀美、鳴海覚志、阿部清美	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 408
3. 書名 遺伝性甲状腺疾患のすべて	

〔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

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
---------	---------