

令和 4 年 4 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17508

研究課題名(和文) TSH過剰発現マウスを用いた甲状腺機能亢進症に対する新規治療の基盤構築

研究課題名(英文) Exploring therapeutic targets for hyperthyroidism using TSH-overexpressing mouse

研究代表者

山内 一郎 (Yamauchi, Ichiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20844715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺機能亢進症の新規治療創出に向けて、我々が開発した甲状腺機能亢進症モデルマウスの解析を行った。具体的には、長らく不明であった第一選択薬である抗甲状腺薬チアマゾールの作用点の同定を目指し、このモデルマウスへ抗甲状腺薬を投与し、採取した甲状腺についてRNA-seqを用いた遺伝子発現に関する網羅的解析を行った。チアマゾールによる遺伝子発現変化は乏しく、既報により示されている甲状腺ペルオキシダーゼ活性の抑制が主な作用であることが示唆された。一方でコントロールマウスとモデルマウスの結果を比較することにより、甲状腺機能亢進症のメカニズムの理解に貢献するデータを得ることができた(論文投稿準備中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バセドウ病に代表される甲状腺機能亢進症は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ている。求められてきた甲状腺機能亢進症の新たな治療薬のシーズを得るために、独自に開発したモデルマウスを用いてこの領域において初となる網羅的解析を実施した。治療標的候補となる分子を複数同定することができ、今後の創薬研究に貢献する成果であり、また甲状腺機能亢進症のメカニズムを理解する上で学術的に重要な示唆を与えるデータセットも得た。

研究成果の概要(英文)：To explore new therapeutic targets for hyperthyroidism, we analyzed model mice of hyperthyroidism that we recently generated. Specifically, model mice were treated with thiamazole, an antithyroid drug. We collected their thyroid glands and performed transcriptome analyses using RNA-seq. As a result, thiamazole changed expressions of few genes, which suggested that actions of thiamazole were mainly mediated by inhibition of thyroperoxidase activity as shown in previous reports. Meanwhile, comparisons between control mice and model mice provided valuable data contributing on understanding pathophysiology of hyperthyroidism.

研究分野：内分泌学、甲状腺学

キーワード：甲状腺機能亢進症 モデルマウス TSH トランスクリプトーム解析 チアマゾール 抗甲状腺薬

1. 研究開始当初の背景

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疾患である。心悸亢進に伴う日常生活に著しい支障をきたす動悸・労作時呼吸苦、代謝亢進に伴う体重減少・筋力低下に加え、心房細動や骨粗鬆症等の合併症も生じる。原因は、バセドウ病が多くを占め、日本人では稀であるがホルモンを産生する甲状腺腫瘍（機能性結節）によることもある。患者数は多く、人口の0.1%程度という報告もある。甲状腺機能亢進症は、甲状腺刺激ホルモン受容体（TSH受容体）のシグナルが異常に促進されることにより生じる。バセドウ病ではTSH受容体を刺激活性化する自己抗体が産生され、機能性結節ではTSH受容体の機能獲得型変異が見られる。

以下患者数が多いバセドウ病について述べるが、治療は抗甲状腺薬に代表される薬物療法、放射性ヨウ素内用療法、手術療法があるが、数十年にわたり大きな変化がない。本邦では、抗甲状腺薬が第一選択となっているが、問題点として種々の副作用がある。軽度な副作用として肝障害、皮疹、搔痒感をしばしば認めるほか、稀ではあるがチアマゾールでは重篤な感染症に繋がる無顆粒球症、プロピルチオウラシルでは重篤な肝障害や血管炎が起こりうる。またチアマゾールには催奇形性があり、妊娠初期には使用することができない。放射性ヨウ素内用療法では、永続的な甲状腺機能低下症になることも多く、手術療法はその侵襲が問題となる。したがって、現代においてもバセドウ病に代表される甲状腺機能亢進症は安全に治療を受けられる状況にあるとは言いがたい。残念ながら、甲状腺機能亢進症の新たな治療薬の開発は長らく止まっているが、下記の2つの問いが解決できれば前進できると考えた。

Q「抗甲状腺薬（チアマゾール、プロピルチオウラシル）の作用機序は？」

この2剤は甲状腺機能亢進症の制御に関しては安定して効果を得られる薬剤である。作用点を同定できれば有害事象の少ないより特異的な薬剤の開発に繋がる。

Q「甲状腺機能亢進症への治療効果を評価可能な実験モデルがないか？」

甲状腺由来細胞株はほとんどが腫瘍性であり、ホルモン合成能を有するものが存在しない。実験動物については、バセドウ病モデルマウスの開発が行われてきたが、甲状腺機能亢進症に必ずなるわけではなく、またその過程で甲状腺に炎症を生じ病態が修飾される。治療薬開発を見据えると、確実に甲状腺におけるホルモン合成が亢進するモデル動物が存在するか否かは非常に重要である。

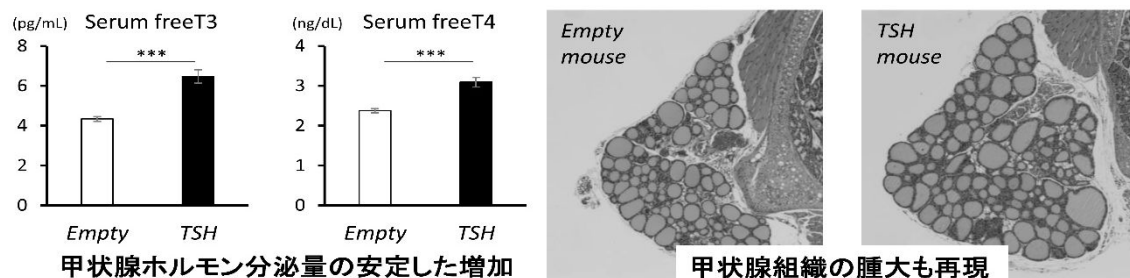
我々は甲状腺機能亢進症の患者を多く診療する中で、現在使用できる薬剤、治療法では行き詰まることを多々感じてきた。さらには、標準治療に用いる抗甲状腺薬には重篤な副作用のリスクがつきまとう。より安全かつ確実に治療できる薬剤、難治例に対する抗甲状腺薬と併用可能な作用機序の異なる薬剤があれば、甲状腺機能亢進症の治療を飛躍的に発展させることができると考えるに至った。

2. 研究の目的

バセドウ病に代表される甲状腺機能亢進症は、患者数も多く、引き起こされる症候はしばしば重篤である。しかし治療は数十年新薬がなく、現在使用できる薬剤には重篤な副作用の懸念がある。本研究では、甲状腺機能亢進症の新たな治療薬を開発するための標的を探索し、今後の研究の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

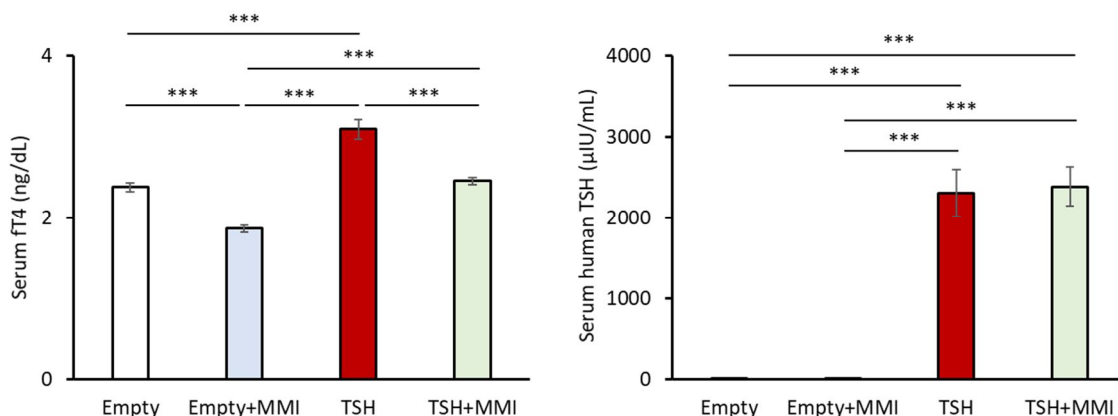
この目的を達成するためには甲状腺機能亢進症の治療を再現する実験系の構築が必要であるが、我々は遺伝子導入によりTSHを後天性に過剰発現させることで、マウスにおいて甲状腺機能亢進症を惹起することを可能とした（下図）。



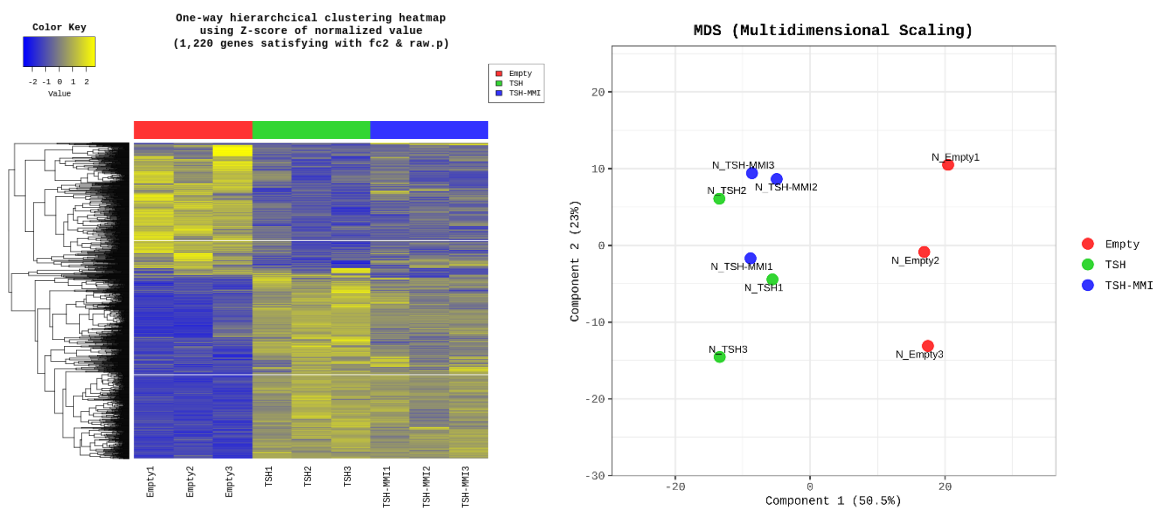
本研究では、TSH 過剰発現を含む種々の処置を行ったマウスの甲状腺を摘出し、RNA シークエンシング (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析を行った。甲状腺機能正常群と甲状腺機能亢進症群を比較 (TSH 過剰発現の有無) し、TSH 受容体の活性化による変化を検討したのに加え、甲状腺機能亢進症群と甲状腺機能亢進症 + 治療群 (チアマゾールの有無) を比較し、甲状腺ホルモン作用と独立した抗甲状腺薬による変化を見出すことを目指した。

4. 研究成果

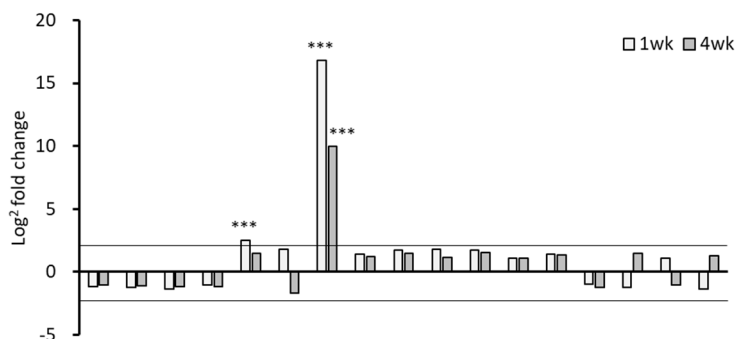
まず、甲状腺機能正常群 (Empty 群) と甲状腺機能亢進症 + チアマゾール群 (TSH+MMI 群) の甲状腺ホルモン血中濃度である fT4 が同等となるように、給水投与するチアマゾール濃度を設定するための条件検討を重ね、下図のように妥当な結果を得た。



これらのマウスから採取した甲状腺から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。下図に示す階層的クラスタリング、主成分解析により、解析した個体間の変動が少ない良質なデータを得ることができたと考えた。また、TSH 過剰発現 (TSH 群 vs Empty 群) では正に変化した発現変動遺伝子は 701 個、負に変化したのは 473 個と多数認められたが、MMI 投与 (TSH+MMI 群 vs TSH 群) では正に変化したのが 34 個、負に変化したのが 43 個とわずかであった。



この時点で抗甲状腺薬の作用において遺伝子発現調節の寄与度は小さいと考察した。すなわち、作用点の同定からのアプローチは困難であると判断した。そこで、TSH 過剰発現 (TSH 群 vs Empty 群) の結果を詳細に解析した。結果として、下図に示すように甲状腺ホルモン合成に関わる分子の 1 つが顕著に発現亢進していることを見出した。この分子についてはその発現亢進の生理的意義を検証するため、ノックアウトマウスを用いた実験を計画している。



さらに系統的に甲状腺機能亢進症の主な病態生理である TSH 受容体の活性化による変化を明らかにするため、GO 解析や KEGG パスウェイ解析を行うも、判断が困難であるという問題に直面した。採取し解析した甲状腺内には副甲状腺や血球、血管、C 細胞など、様々なコンポーネントが存在するために、抽出した RNA における各コンポーネントの占める比率が TSH 過剰発現にて甲状腺腫大した際に変化することが見て取れた。この問題を解決するためには、解析したいコンポーネントである甲状腺濾胞上皮細胞を特異的に回収する系の構築が必要である。我々は、甲状腺濾胞上皮細胞に特異的に発現する TPO 遺伝子のプロモーター下に Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスに、loxP 配列除去により蛍光を発するレポーターマウスを交配する戦略により、蛍光による濾胞上皮細胞選別を可能にするべく、今後も研究を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内 一郎
2. 発表標題 TSH過剰発現マウスの作成と甲状腺機能に関する検討
3. 学会等名 第63回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内 一郎
2. 発表標題 機能獲得型TSHR遺伝子変異を有する中毒性多結節性甲状腺腫の1例
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 山内 一郎
2. 発表標題 全エクソーム解析を行った中毒性多結節性甲状腺腫の1例
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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