

令和元年6月20日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19676

研究課題名(和文) MCT8異常症の新規診断法の開発と神経障害モデル動物を用いた遺伝子治療の有効性

研究課題名(英文) Development of early diagnosis of MCT8 deficiency and the efficacy of gene therapy using animal model of neurological defect

研究代表者

岩山 秀之(Hideyuki Iwayama, Iwayama)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：00757726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： 遺伝性甲状腺疾患であるMCT8異常症は、甲状腺ホルモンの細胞膜輸送体蛋白(MCT8)の遺伝子異常により発症する。本研究では早期診断、モデルマウスの作製を研究した。

正常新生児において、濾紙血から甲状腺ホルモン代謝物(reverse T3)を抽出し、LC-MS/MSにて測定が可能であることを確認した。すでに正常新生児からの濾紙血100例、およびMCT8異常症患者由来の濾紙血5例が集まっている。今後、reverse T3を測定し、新生児期に濾紙血にてMCT8異常症の早期診断が可能かを調べる。Crispr/Cas9法でフレームシフト変異により欠失・挿入を持つノックアウトマウスが得られ解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児濾紙血のreverse T3を測定することにより、MCT8異常症を症状が出現する前に診断できる可能性がある。現在は、MCT8異常症に対する根本的な治療法は存在しないが、将来的には遺伝子治療などで治療可能となる可能性があり、その際に早期診断法が存在すれば不可逆的な脳障害の発症を防ぐことができる。残念ながら、すでにMCT8異常症の症状が生じている確定診断例では、早期診断法が開発されても意義はほとんどない。

研究成果の概要(英文)： MCT8 deficiency, one of the inherited thyroid disease, is developed due to loss of function of MCT8, which encode the membrane transporter of thyroid hormone. In this study, we investigated the early diagnosis of MCT8 deficiency and developed its neurological deficit model.

We confirmed that reverse T3 extracted from dried blood spot (DBS) at newborn age, could be measured by LC-MS/MS. Reverse T3 is one of the metabolite of thyroid hormone, which does not have thyroid hormone activity. We have collected 100 DBS from normal newborn and 5 DBS from the patients with MCT8 deficiency. We will measure the concentration of reverse T3 in these DBS and determine whether early diagnosis of MCT8 deficiency can be done using DBS at neonatal period. In addition, we obtained knockout mice produced by Crisper Cas9, which had the mutation of insertion and/or deletion, resulting in frameshift. Now, we are investigating the phenotype of these mice.

研究分野：小児内分泌

キーワード：MCT8異常症 reverse T3 早期診断 遺伝子治療 Crispr/Cas9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性甲状腺疾患である MCT8 異常症は、甲状腺ホルモンを細胞内に運ぶ膜輸送体蛋白 (MCT8) の遺伝子異常により発症する疾患である (Fig1)。甲状腺ホルモンが細胞 (特に脳神経細胞) で不足するため、脳神経の発達に著明な障害を引き起こす。MCT8 異常症は通常、男子でのみ発症するが、患者は歩くこともしゃべることもできない。しかし、現在までに根本的な治療法はなく、分子生物学的手法を用いた治療法の開発が望まれている。

現状では、すでに同胞が診断されている場合の遺伝子検査以外に、早期診断に必要な検査がない。本症患者では、甲状腺ホルモン代謝物の 1 種である reverse T3 (rT3) の血清濃度は明瞭な異常値を示すため [Dumitrescu, 2009], [Fig 2]、rT3 測定により本症の疑いのある患児を早期に発見できる可能性がある。

ヒトでは甲状腺ホルモン膜輸送体蛋白として MCT8 蛋白しか存在しないが、マウスでは MCT8 蛋白に加えて OATP1C1 蛋白がその機能を果たす (Fig1)。そのため、MCT8 単独ノックアウトマウスでは脳障害を来さないため、MCT8 異常症の脳障害モデルマウスとして不適当だった。MCT8 とともに OATP1C1 もノックアウトしたダブルアウトマウスを作製すれば、MCT8 異常症の脳障害モデルマウスとして実験に使用できると考えられた。

研究計画では、遺伝子治療の開発も含まれていたが、モデルマウスの作製に遅れが生じており、計画通りに研究が進んでいない状況にある。今後、基礎研究室の連携を強化し、遅れを取り戻すよう計画を修正する予定である。

### 2. 研究の目的

そこで、MCT8 異常症に対する早期診断を目的として、新生児マススクリーニングで用いられる濾紙血中の rT3 濃度測定を行った。また、モデルマウスの作製、遺伝子治療の効果判定に用いることを目的として、MCT8 異常症の脳障害モデルマウスの開発を行った。

### 3. 研究の方法

早期診断については、新生児マススクリーニングで用いる濾紙血を使って、LC-MS/MS により rT3 の測定を行った。正常新生児からの濾紙血は、共同研究施設である産科クリニックから母親の同意を文書で得た上で通常の新生児マススクリーニングでの採血に 1 スポット (約 100  $\mu$ L) の血液を余分に採取した。MCT8 異常症新生児からの濾紙血は、出生した後 1-2 年以内に MCT8 異常症と遺伝子検査で確定診断された患児に対し、出生時の新生児マススクリーニング検査で用いた濾紙血が保存されているかを確認し、両親の同意を文書にて得た上で、濾紙血を取り寄せた。濾紙血の保存期間は、出生した県の新生児マススクリーニング事業を担当する施設により異なる。得られた濾紙血は 3mm または 8mm の濾紙血用パンチで測定用試料を採取し、有機溶媒法を用いた凍結乾燥法により rT3 を抽出し、得られた抽出液を LTQ-Velos (Thermo Fischer) にて測定した。測定には安定同位体を内部標準として用いた。また、研究の途中で、rT3 単独の測定よりも T3 も組み合わせる評価したほうがより正確に判断できる可能性が考えられたため、T3 の測定も同時に LC-MSMS にて測定を行うこととした。

モデルマウスの作製は、Crispr/Cas9 法にて OATP1C1 ノックアウトマウスを作製した。

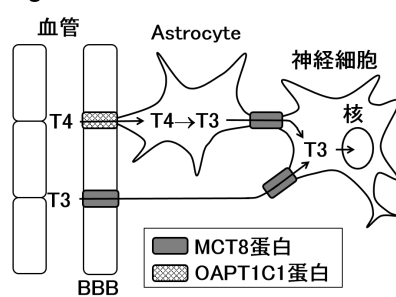
### 4. 研究成果

#### 4 - 1 抽出条件の検討

正常新生児において、濾紙血から甲状腺ホルモン代謝物を抽出し、LC-MS/MS にて T3, rT3 の測定が可能であることを確認した。パンチ穴の大きさの検討では、3mm の場合は正常新生児のうち半分は測定が可能だったが、残りの半分は測定感度以下となってしまう測定ができなかった。8mm の場合は正常新生児の全例で T3, rT3 の測定が可能だった。

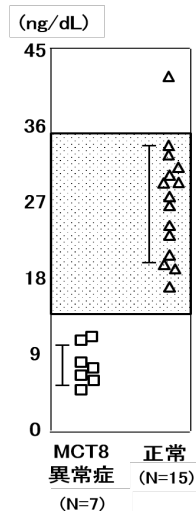
抽出法については、エタノール：水酸化アンモニウム (98 : 2) の使用量と抽出時間について検討した。使用量は 3mm のパンチに対しては 10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、50  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L で抽出した場合を比較したところ、100  $\mu$ L までは容量依存性に高いピークが得られた。100  $\mu$ L と 200  $\mu$ L ではほとんどピークに差がなかったため、3mm のパンチの抽出には 200  $\mu$ L のエタノール：水酸化アンモニウム (98 : 2) を使用するのが良いという結果が得られた。8mm のパンチに対しては、50  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、500  $\mu$ L、1000  $\mu$ L で抽出した場合を比較したところ、500  $\mu$ L までは容量依存性に高いピークが得られた。500  $\mu$ L と 1000  $\mu$ L ではほとんどピークに差がなかったため、8mm のパンチの抽出には 1000  $\mu$ L のエタノール：水酸化アンモニウム (98 : 2) を使用するのが良いという結果が得られた。LC-MSMS への注入量は 15  $\mu$ L と 30  $\mu$ L を比較したところ、30  $\mu$ L の方が高いピークが得られた。凍結乾燥後にフィルターを通ると、得られる抽出液は 60-70  $\mu$ L となるため再測定となった場合に備えて 30  $\mu$ L が最

Fig1. マウス脳の甲状腺ホルモン代謝



甲状腺ホルモンはMCT8とOATP1C1を介して神経細胞に取り込まれる。ヒトではOATP1C1は存在しない。

Fig2. 血清とrT3



適であるという結論を得た。

また、いずれの抽出条件でも低濃度の測定では問題となりうるノイズが確認されたので、ノイズを減らすために抽出時間を短くする方向で検討を行った。従来の方法では抽出時間は30分だったが、15分と30分を比較したところ15分でノイズの高さが半分程度に減少したため抽出時間は15分の方が望ましいという結論を得た。この結論は、15分より短い時間での検討は行っていないため、さらなる検討の余地があると考えられる。

#### 4 - 2 標準曲線作成に使用する試料

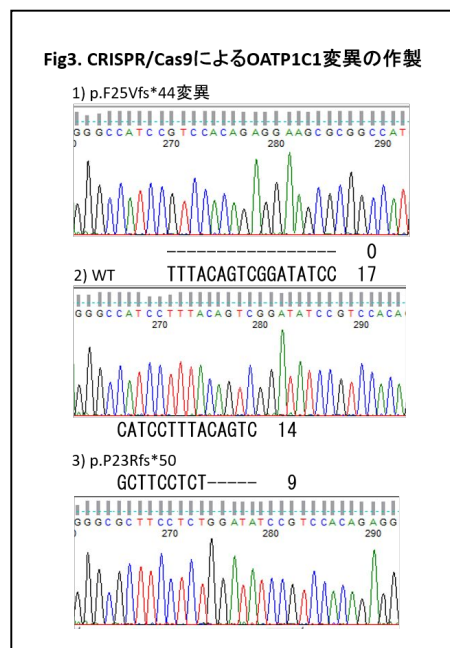
それ以外の濾紙血中のホルモン測定の問題として、標準曲線を得るための試料をどのように設定するかという問題がある。血清であれば、無ホルモン血清に既定の濃度のホルモンを加えてそれを標準曲線として使用できるが、濾紙血では全血をもちいるため、理想的にはホルモンを含まない全血を用意するのが望ましい。しかし、無ホルモン血清は商業的に購入することが可能だが、無ホルモン全血は市販されておらず作成するのも非常に困難である。無ホルモン血清を全血の代用として用いることも検討したが、血清を全血と比較すると濾紙への浸透する速度や単位面積当たりの濾紙に浸透する量などは全く異なり標準曲線を得るための試料として適さない。そこで、血球中にどれくらいのT3, rT3が含まれているのかを検討した。

方法は、健常人から採取したEDTA 2Na血を遠心して得られた血漿(1)と、そこで得られた血球成分に無ホルモン血清を加えた試料(2)の濃度を比較した。(1)の濃度比べて(2)の濃度は、ノイズに隠れてしまって無視できるレベルからせいぜい1/10程度で、血球成分にはほとんどT3, rT3が含まれていないという結論を得た。ただし、(2)を作成する際に遠心された血球成分を液体にするために-80度に冷却後、室温に戻して溶解させるという手順を加えている。濾紙への浸透する面積について、100 $\mu$ Lの全血と(2)を濾紙血に添加して広がる面積を比べたところ、(2)の直径が全血の1.5倍ほどとなり、濾紙への浸透する速度や単位面積当たりの濾紙に浸透する量が異なることが推察された。また、健常人からえた血球成分を測定に用いることの妥当性についても今後、標準曲線作成に使用する試料を検討する必要がある。

今後、MCT8異常症患者から得られた濾紙血を用いてT3, rT3を測定し、正常新生児と比較して、新生児期に濾紙血にてMCT8異常症の早期診断が可能かを調べる予定である。

#### 4 - 3 MCT8異常症脳障害モデルマウス

欠失・挿入によりフレームシフト変異が起こり、標的タンパク質が早期に切断蛋白となるノックアウトマウスが得られた。遺伝子変異をサンガー法にて確認し、合計8系統のノックアウトマウスが得られたことが分かった。現在、その表現型を解析中である。



#### 5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

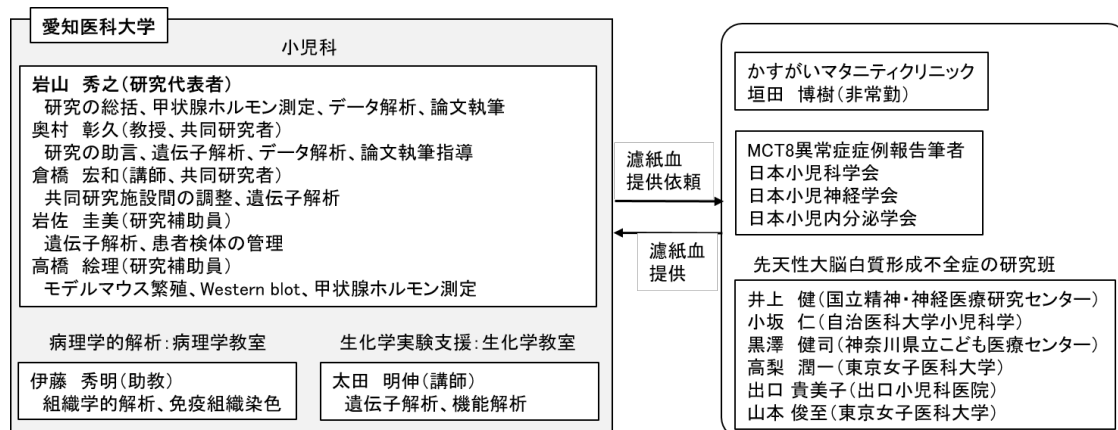
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：<https://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060703/10.html>



## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：奥村 彰久

ローマ字氏名：Akihisa Okumura

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：60303624

研究分担者氏名：太田 明伸

ローマ字氏名：Akinobu Ota

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：30438048

研究分担者氏名：伊藤 秀明

ローマ字氏名：Hideaki Ito

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：90711276

研究分担者氏名：垣田 博樹

ローマ字氏名：Kakita Hiroki

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：40528949

(2)研究協力者

研究協力者氏名：倉橋 宏和

ローマ字氏名：Hirokazu Kurahashi

研究協力者氏名：岩佐 圭美

ローマ字氏名：Masumi Iwasa

研究協力者氏名：高橋 絵理

ローマ字氏名：Eri Takahashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。