

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15723

研究課題名(和文)新規ヨードトランスポーターによる先天性甲状腺機能低下症の疾患概念の確立

研究課題名(英文) Establishment of the disease concept of congenital hypothyroidism by a novel iodine transporter

研究代表者

青山 幸平 (Aoyama, Kohei)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：40812095

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)：ヨードは甲状腺ホルモンの原料として必須の微量元素である。私たちは甲状腺ホルモン合成障害の家系に、これまで疾患の報告の無いSLC26A7遺伝子のホモ接合性機能喪失型変異を同定した。健康人の甲状腺組織を用いた免疫染色で、SLC26A7蛋白は甲状腺濾胞細胞の管腔側優位に発現を認めた。哺乳類細胞によるSLC26A7蛋白のヨード輸送能の評価では、濃度依存性にヨードの輸送が見られた。また患者変異の導入では、ヨード感受性YFP変異体を用いてヨード輸送能が有意に低下することを確認した。以上から、新規ヨードトランスポーターであるSLC26A7遺伝子の異常が先天性甲状腺機能低下症となることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺の材料であるヨードがどのように甲状腺内に取り込まれるかについて、これまでその全容は明かされていなかった。我々がヨードトランスポーターとしての役割を証明したSLC26A7遺伝子の発見により、ヨード取込機構の理解が格段に進んだ。

ヨード取込機構が明らかになることで、ヨード取込異常による甲状腺機能低下症については、甲状腺ホルモン内服以外に、新たな戦略としてヨード摂取の増量による治療や予防が根拠をもって検討されうる。

研究成果の概要(英文)：Iodine is an essential element for the production of thyroid hormones. We have identified a homozygous loss-of-function mutation in the SLC26A7 gene in a family with thyroid hormone synthesis disorder.

Immunostaining of thyroid tissue from normal subjects showed that SLC26A7 protein was expressed predominantly in the luminal side of thyroid follicular cells. Evaluation of the iodine transport capacity of SLC26A7 protein in mammalian cells showed that iodine transport was concentration-dependent. In addition, the introduction of patient mutations significantly reduced iodine transport capacity using iodine-sensitive YFP mutants. These results indicate that abnormalities in the SLC26A7 gene, a novel iodine transporter, result in congenital hypothyroidism.

研究分野：小児内分泌

キーワード：SLC26A7 ヨードトランスポーター 先天性甲状腺機能低下症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性甲状腺機能低下症で、現在遺伝子異常が同定されるのは20~30%と言われており、原発性の先天性甲状腺機能低下症の原因遺伝子は病因ごとに複数知られている。甲状腺ホルモン合成障害の原因遺伝子の中で、*SLC5A5* と *SLC26A4* が甲状腺濾胞細胞でヨードの輸送に関与する。ヨードは *SLC5A5* により甲状腺濾胞細胞の血管側から甲状腺濾胞細胞内に能動的に輸送され濃縮される。そして濃縮されたヨードは甲状腺濾胞細胞の管腔側へ *SLC26A4* により輸送され、濾胞内および濾胞内に面する細胞膜の領域でヨードは有機化され甲状腺ホルモンが合成される。しかしながら、*SLC26A4* の異常のみでは必ずしも甲状腺機能低下症は生じないことから、甲状腺濾胞細胞の管腔側でヨード輸送を担う未知のトランスポーターの存在が予想されていた。

私たちは先天性甲状腺機能低下症の既知の遺伝子変異を認めなかった甲状腺ホルモン合成障害の兄妹の家系に対し全エクソーム解析を行い、罹患者のみに *SLC26A7* のナンセンス変異をホモ接合性に同定した。*SLC26A7* はヨード輸送を担う *SLC26A4* のサブファミリーで、アニオントランスポーターとしての機能が知られてたが、疾患の関連性は未知であった。*SLC26A7* はマウスの腎臓で HCO₃⁻/Cl⁻ 対向輸送体として機能していることが示されていたが、甲状腺での機能は不明であった。私たちは *SLC26A7* が甲状腺濾胞細胞の管腔側の未知のヨードトランスポーターである可能性を考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は *SLC26A7* が先天性甲状腺機能低下症の原因遺伝子であることを突き止めることである。同時に、*SLC26A7* が甲状腺においてヨードトランスポーターとして働くことを特定し、未解明であったヨード輸送のメカニズムを明らかにする。最終的には、*SLC26A7* の変異による先天性甲状腺機能低下症の新たな疾患概念、診断、そして治療戦略を確立する。

3. 研究の方法

1) 免疫組織染色

パラフィン包埋のヒト甲状腺組織を用いて、免疫組織染色を行った。染色にはウサギ抗 *SLC26A7* 抗体、マウス抗 *SLC5A5* 抗体、ウサギ抗 *SLC26A4* 抗体を用いた。野生型 *SLC26A7* を安定的に発現している HeLa 細胞と、野生型および変異型 *SLC26A7* を一過性にトランスフェクトした HEK293T 細胞の両方について、細胞の局在を分析した。

2) 細胞培養と遺伝子導入

本研究では、イヌ腎臓細胞株 (Madin-Darby Canine Kidney II; MDCK)、不死化正常甲状腺濾胞細胞株 (Nthy ori-3; Nthy)、サル腎臓細胞株 (COS-7)、ヒト胚性腎臓細胞株 (HEK293T および HEK-GP2-293)、ヒト甲状腺癌細胞株 (WRO) およびヒト子宮頸部腺癌細胞株 (HeLa) を使用した。*SLC26A7* と *SLC26A4* の機能と比較するために、*SLC26A7*、*SLC26A4* または *SLC5A5* を導入した細胞を樹立した。FLAG タグ配列を含む *SLC26A7* の翻訳領域または *SLC26A4* の翻訳領域を pRetroX-tight-Pur ベクターに挿入した。また *SLC5A5* の翻訳領域は pQCXIH ベクターに挿入した。構築したベクターは、レトロウイルス発現システムを用いて、MDCK、Nthy および COS-7 細胞にトランスフェクションした。

3) 電気生理学的実験

HEK293T 細胞に *SLC26A7* コンストラクトを含む、あるいは含まない YFP をコードするプラスミド cDNA をトランスフェクトした。電気生理学および光学の実験を、トランスフェクションの 36~48 時間後に行った。パッチクランプ法によって電位を測定し細胞内外へのイオンの輸送を確認しヨードトランスポーターであることを特定した。

PCR を用いて 2 つの変異 (His148Gln/Ile152Leu) を YFP に導入し、ヨウ素感受性 YFP を作成した。またそれを発現させた HEK293 細胞に *SLC26A7* 変異体を強制発現させ、ヨード輸送の変化を評価した。

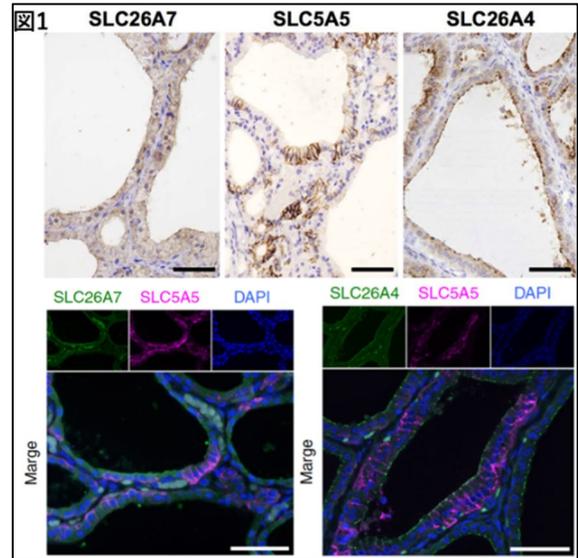
4. 研究成果

1)健康人の甲状腺組織を用いて免疫染色を行い、SLC26A7 が SLC26A4 と同様に甲状腺濾胞細胞の管腔側で発現していた(図 1)。

2)MDCK 細胞をシート状に培養して、放射性ヨードが血管側(下層)から細胞内に取り込まれ管腔側(上層)へと排出される様子を観察した。血管側へ発現する SLC5A5 を単独で強制発現させた場合には上層へのヨード輸送は見られなかったが、SLC5A5 と SLC26A7 を共発現させることで上層へのヨード輸送が確認できた。

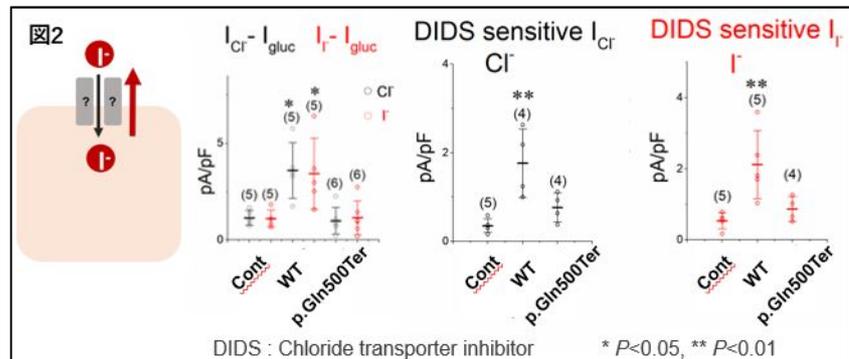
3)HEK293 細胞に SLC26A7 を強制発現させパッチクランプ法で評価したところ、細胞外から細胞内へのヨード輸送を確認した(図 2)。

1-3)の結果から SLC26A7 はヒトの甲状腺濾胞細胞の管腔側で働き、ヨード輸送を行なっていることが明らかとなった。



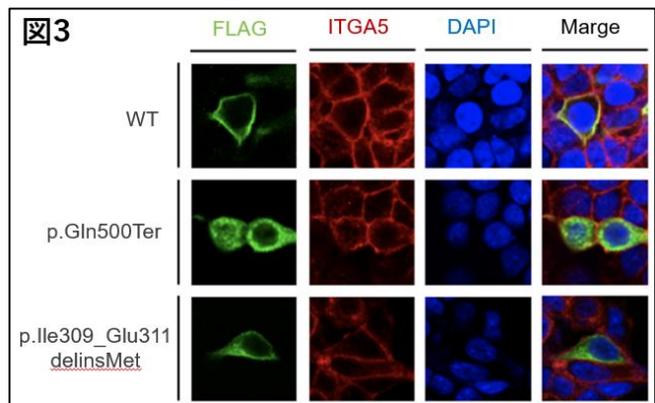
4)患者で認められた変異の影響を評価した。まず HEK293 細胞を用いて免疫染色でタンパクの細胞内での局在変化を評価したところ、野生型では細胞膜に発現が見られたが変異体では細胞質内に局在が変化していた(図 3)。

5)ヨードに対して感受性の高い YFP 変異体を発現させた HEK293 細胞に SLC26A7 変異体を強制発現したところ、野生型で見られていた細胞内へのヨード輸送が変異体では消失することを確認した。しかしながら SLC26A7 は SLC26A4 よりもヨード輸送能が弱いと考えられる結果であった。



以上より、SLC26A7 遺伝子は先天性甲状腺機能低下症の新規原因遺伝子であり、組織や培養細胞での実験結果からヒトの甲状腺濾胞細胞の管腔側で働く新規ヨードトランスポーターであることを特定した。

ただし、SLC26A4 と比較すると SLC26A7 のヨード輸送能は弱いため、その甲状腺内での詳細な機能については今後、ノックアウトマウスを用いてより生理的な条件下で検証をしていく必要があると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishii Jun, Suzuki Atsushi, Kimura Toru, Tateyama Michihiro, Tanaka Tatsushi, Yazawa Takuya, Arimasu Yu, Chen I-Shan, Aoyama Kohei, Kubo Yoshihiro, Saitoh Shinji, Mizuno Haruo, Kamma Hiroshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Congenital goitrous hypothyroidism is caused by dysfunction of the iodide transporter SLC26A7	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0503-6	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木敦詞, 石井順, 吉田あや, 山口直哉, 田中達之, 青山幸平, 立山充博, 陳以珊, 久保義弘, 木村徹, 矢澤卓也, 有益優, 菅間博, 齋藤伸治, 水野晴夫.
2. 発表標題 新規コードトランスポーターSLC26A7 遺伝子の両アレル機能喪失型変異は甲状腺腫を伴う先天性甲状腺機能低下症を引き起こす.
3. 学会等名 第53回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Suzuki, Jun Ishii, Aya Yoshida, Naoya Yamguchi, Tatsushi Tanaka, Kohei Aoyama, Michihiro Tateyama, I-Shan Chen, Yoshihiro Kubo, Toru Kimura, Takuya Yazawa, Yu Arimasu, Hiroshi Kamma, Shinji Saitoh, Haruo Mizuno.
2. 発表標題 Homozygous loss-of-function mutation in the SLC26A7 gene coding a novel iodide transporter causes goitrous congenital hypothyroidism.
3. 学会等名 The 58th Annual ESPE Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------