

論文内容の要旨

Analysis of medaka mutant *c119*: a model for congenital hypothyroidism

(先天性甲状腺機能低下症モデルメダカ *c119* の解析)

氏名 關水康伸

1. 概要

先天性甲状腺機能低下症は、かつては精神遅延の主要な原因の一つであった。新生児の約 3000 人から 4000 人に 1 人の割合で出生する事が知られている。今日ではホルモン剤などの投与による対処療法が確立されているが、先天性甲状腺機能低下症の分子メカニズムの理解は進んでいない。これまでに幾つかの原因遺伝子が特定され、そのうちの幾つかはノックアウトマウスが作られ、解析されている。しかし先天性甲状腺機能低下症をより深く理解するためには、さらに多くの疾患モデルを確立し、それに対応した遺伝子の解析を網羅的に行う事が必要である。しかし一般的に用いられているマウスなど哺乳類の実験動物では既知の遺伝子の解析手法は確立されているが、網羅的な疾患モデルの確立や未知の遺伝子の探索を行うには技術的障壁が大きい。一方で、近年モデル動物として注目を集めているゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類は、順遺伝学的手法が応用できる上、ゲノム塩基配列の情報も充実してきている。従って、これらのモデル動物を用いれば網羅的かつ大規模な先天性甲状腺機能低下症の変異体スクリーニングが可能であると考えられる。

本研究の目的は、実際に小規模なテストスクリーニングを行う事により、メダカを用いた先天性甲状腺機能低下症の変異体系統の確立と解析が可能であるかを評価する事である。私はスクリーニングの結果、実際に先天性甲状腺機能低下症の変異体系統 *c119/kamaitachi* を確立する事に成功し生理学的・組織学的な解析を行った。*kamaitachi* 変異体はこれまでに報告のないタイプの先天性甲状腺機能低下症モデルであり、ホモ接合体で容易に系統を維持する事ができた。しかし血中のチロキシン (T4) の濃度は野生型の 40%程度に減少していた。また、*kamaitachi* 変異体の甲状腺組織は肥大しており、甲状腺濾胞細胞は活性型の形態を示していた。これらの表現型はサイトロピン (TSH) による刺激が TSH 受容体を通して常に入力されている事を示唆するものであり、典型的な先天性甲状腺機

能低下症の表現型である。以上の結果から、メダカを用いた先天性甲状腺機能低下症モデルの確立と解析が可能である事が示された。

さらに私は *kamaitachi* 変異体のヒレの表現型に注目し解析を行った。*kamaitachi* 変異体はヒレの再生が異常である。一般的に魚類のヒレは強力な再生能力を持つ事で知られているが、一方で哺乳類は、魚類や両生類が持つ再生の能力を進化の過程で殆ど失っている。再生の研究は我々人間にとって失われた能力を取り戻す試みでもあり、多くの研究者の注目を集めてきた。これまで再生は両生類を用いて精力的に研究が進められてきたが、近年では遺伝学を応用可能なゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類のヒレの再生が注目を集めている。しかしながら、これまでヒレの再生と甲状腺ホルモンの関わりについて調べた研究は報告がない。本研究では *kamaitachi* 変異体と薬剤を使った実験により、甲状腺ホルモンがヒレの再生に影響を及ぼす事を明らかにした。

2. *kamaitachi* 変異体の表現型

kamaitachi は当研究室で私が行った先天性甲状腺機能低下症のスクリーニングにおいて、野生群から単離された自然発生の突然変異体である。スクリーニングにおいては甲状腺の形態を可視化するために、T4 に対する抗体を使用した。血中の遊離型 T4 は速やかに拡散するため、この抗体を用いた染色では、甲状腺濾胞の内腔に蓄積されたチログロブリン結合型 T4 (Tg-T4) のみが可視化される。*kamaitachi* はこの抗体のシグナルがほぼ欠失する変異体として単離された。*kamaitachi* はメンデル遺伝を示す劣性突然変異体であり、ホモ接合体で系統維持が可能である。本研究では主にホモ化した *kamaitachi* 系統を用い解析を行った。

始めに甲状腺濾胞の分化状態を調べるために、分子マーカーの発現パターンを胚発生期の各段階で調べた。メダカの甲状腺は胚発生初期に咽頭上皮から甲状腺原基として領域化されるが、*kamaitachi* 変異体においても初期の領域化マーカーである *nkx2.1* や *hex* の mRNA の発現パターンは正常であった。しかし、甲状腺濾胞が形成される胚発生後期以降は、mRNA の発現パターンに異常が見られた。野生型では *hex* mRNA の発現は孵化胚まで保たれるが、*kamaitachi* 変異体では低下していた。また、野生型では孵化期まで *pax8* mRNA の発現は殆ど検出されず、*tg* mRNA の発現は保たれるが、*kamaitachi* 変異体では *pax8* mRNA と *tg* mRNA がともに上昇するという表現型を示した。これは血中甲状腺ホルモン濃度の低下に応答して、血中 TSH の濃度が上昇し、甲状腺濾胞細胞が過剰に活性化した結果であると考えられる。

次に、孵化胚期における甲状腺組織の状態を確認するために、*tg* mRNA と Tg タンパク質の二重染色で甲状腺組織を可視化し、組織像を観察した。野生型では *tg* mRNA を発現する甲状腺濾胞細胞によって形成された濾胞の内腔に Tg タンパク質の強い染色が確認されたが、*kamaitachi* 変異体では *tg* mRNA を発現していた甲状腺濾胞細胞が野生型に比べ厚みを増しており、濾胞内腔への Tg タンパク質の蓄積は著しく低下している事が明らかとなった。

続いて Tg-T4 の蓄積が起きない原因が視床下部・脳下垂体にあるかどうかを調べるために、変異体に甲状腺ホルモンを投与し、その応答を調べた。ホモ系統の孵化胚に対し、甲状腺ホルモンを飼育水中に 30ng/ml で投与した場合、濾胞内腔における T4 のシグナルが復活した。これは血中の T4 濃度の上昇に応答して TSH の濃度が低下し濾胞内腔への開口分泌が優位になった事を示唆する。従って、この変異体においても甲状腺ホルモンの濃度をモニターする機構は機能している事、また甲状腺ホルモンが産生されている事が明らかになった。

さらに、*kamaitachi* 変異体の血中甲状腺ホルモン濃度をラジオイムノアッセイにより測定した(京都大学の田川正朋助教授との共同研究)。その結果、T4 の濃度は平均 1 ng/ml であり、野生型の約 40% に低下している事が明らかになった。一方で、トリヨードチロシン (T3) の濃度

は野生型に比べ有意に上昇しており、*kamaitachi* 変異体においては低レベルの血中 T4 を補償するために T3 の産生機構が過剰に活性化している事が予想された。

次に孵化胚から成体に目を移し、*kamaitachi* 変異体の甲状腺組織を観察した。野生型では咽頭歯骨下の心外膜上部に限局して甲状腺が観察されたが、変異体においては甲状腺がこの領域にとどまらずに肥大し、血管に隣接する形で甲状腺濾胞が鰓入動脈、キュービエ管、腎臓にまで広がっている事が明らかとなった。また *kamaitachi* 変異体の甲状腺濾胞細胞は、濾胞内腔が極端に小さくなったものから、異常に巨大な濾胞を作るものまで様々な形態異常を示した。濾胞細胞は野生型に比べ様に細胞の厚みが増しており、異常な活性型の状態を示していた。

kamaitachi 変異体は血中甲状腺ホルモン濃度が低下しており、その雌から産まれる受精卵もまた低甲状腺ホルモン状態にあった。そこで受精卵中の甲状腺ホルモン濃度の低下がメダカの初期発生に及ぼす影響を調べるために、初期発生を観察した。*kamaitachi* 変異体では骨形成が異常な個体が野生群に比べ若干増加したが、正常発生率、発生速度は野生型と概ね変わらなかった。また正常に孵化した胚について、孵化後 6 週間後に生存率、体長、体重を測定したが、いずれも野生型との間に有意差はなかった。

以上の結果より、*kamaitachi* 変異体は甲状腺ホルモンの合成能が低下した変異体であると考えられる。通常の生育には十分な甲状腺ホルモンを産生する事は可能だが、そのホルモンバランスは過剰な TSH による刺激によって維持されている可能性が高く、先天性甲状腺機能低下症のモデルとして考える事ができる。

3. *kamaitachi* 原因遺伝子の探索

kamaitachi 変異体の原因遺伝子を特定するために、連鎖解析を試みた。*kamaitachi* は南方系の遺伝的バックグラウンドを持つため、連鎖解析のために北方系と掛け合わせ、約 3200 個体の組み替えパネルを作製した。その結果、原因遺伝子が 7 番染色体の 40Kb の領域に存在する事が遺伝学的に確認された。この領域には 4 つの遺伝子の ORF が予測されており、原因遺伝子としての最有力候補は *mslc26a10* である。*mslc26a10* はヒトの solute carrier (SLC) family 26 に属する偽遺伝子である *slc26a10* と高い相同性を持つ。SLC26 ファミリーにはヒトの遺伝病で甲状腺種を引き起こすペンドレッド症候群の原因遺伝子である *pendrin/slc26a4* が含まれる。SLC26A4 タンパク質は甲状腺濾胞細胞の頂端膜に存在し、細胞内のヨウ素を濾胞内腔に運ぶ事により、濾胞内腔でのチログロブリンのヨード化を促進すると考えられている。機能未知の *mslc26a10* もヨードの運搬を担う可能性が考えられる。

そこでメダカの *mslc26a10* の発現を RT-PCR により確認し、3' および 5' RACE 法により全長を決定した。さらに *kamaitachi* ホモ個体の配列を確認したところ C 末端側にストップコドン をコードする一塩基置換が確認された。この事から、*kamaitachi* の原因遺伝子は *mslc26a10* である可能性が高い。

4. *kamaitachi* 変異体を用いたヒレの再生実験

kamaitachi 変異体 は通常の飼育状態で、成体のヒレに傷が入ったまま再生しないものが散見される。野生型ではこういったヒレの傷は数日から 2 週間ほどで再生するため、先天性甲状腺機能低下症である *kamaitachi* 変異体においてヒレの再生異常が起きている事が予想された。そこで本研究ではまず、野生型のヒレの再生に甲状腺ホルモンが関わっている事を調べるために、ヒレを切断した魚に甲状腺阻害剤や甲状腺ホルモンを加えそのヒレの再生長を測定した。その結果ヒレの切断後 14 日目の野生型雄無処理群ではヒレが平均 2.2mm 再生したのに対し、切断と同時に甲状腺ホルモン合成阻害剤である thiourea を加えた群では、平均 1.6mm しか再生せず、野生型に比べ有意に低下した ($p < 0.01$) また、thiourea 処理をヒレの切断の 2 週間前から

始めた群ではさらに低下し、平均 1.2mm しかヒレの再生がみられなかった。一方で、thiourea とともに T4 を 30ng/ml 加えた群では平均 2.1mm のヒレの再生が観察され、表現型が回復した。また、*kamaitachi* 変異体において同様の実験を行ったところ、無処理雄でも平均 1.9mm と野生型と比べ有意に再生長が低下していた($p < 0.01$)。一方で thiourea に T4 を加えた *kamaitachi* 変異体群では平均 2.0mm のヒレの再生が観察され、野生型の thiourea-T4 処理群と同程度に表現型が回復した。

以上の事から、甲状腺ホルモンはヒレの再生に関わっている事が強く示唆された。