

学位論文題名

Phenotypic analysis of mice with congenital
hypothyroidism caused by the *grt* mutation in the
tyrosylprotein sulfotransferase 2 (*Tpst2*) gene

(チロシルプロテインスルフोटランスフェラーゼ2(*Tpst2*)遺伝子の*grt*変異により引き起こされる遺伝性甲状腺機能低下症を呈するマウスの表現型の解析)

学位論文内容の要旨

先天性甲状腺機能低下症 (CH) は、先天的な甲状腺の低形成や甲状腺ホルモンの分泌不全により甲状腺ホルモンの活性が低下することによって引き起こされる疾患である。適切な治療が行われなければ、成長遅延や精神発達遅延、また、しばしば両性において生殖障害を引き起こす。新生児の 3000~4000 人に 1 人が罹患すると言われており、最も一般的な内分泌疾患の一つである。CH の 80-90%が、甲状腺無形成、低形成、異形成を伴う甲状腺形成異常 (TD) による甲状腺ホルモンの合成障害に起因することがわかっている。

TD の原因としては、環境要因と遺伝的要因の両方が関与することが知られている。これまでに、TD の原因として thyroid stimulating hormone receptor (*TSHR*), thyroid transcription factor 1 (*TTF1*), *TTF2*, paired box gene 8, *NKX2.5*, *HHEX* の 6 つの遺伝子が報告されている。しかしながら、TD 家系の表現型ないし浸透率にばらつきが認められることなどから、TD は多遺伝子疾患であることが示唆されている。

DW/J-*grt* マウスは TD による CH のマウスモデルであり、劣性遺伝性の成長遅延、甲状腺ホルモンの低値、甲状腺低形成などの特徴を示す。DW/J-*grt* は翻訳後修飾の一つであるチロシン硫酸化反応を触媒する酵素 tyrosylprotein sulfotransferase 2 (*Tpst2*) 遺伝子においてアミノ酸置換を伴う遺伝子変異を有しており、これは TPST2 活性の低下を伴う。甲状腺の発達に重要な TSHR は、この TPST2 によるチロシン硫酸化修飾を受けるが、この修飾が TSH シグナル伝達に必要であることが分かっている。DW/J-*grt* マウスは、TSHR の TPST2 によるチロシン硫酸化が低下し、そのシグナル伝達が減弱するため、甲状腺は低形成を起こし、結果甲状腺ホルモン値が低下するため CH を発症する。

本研究では CH のモデル動物である DW/J-*grt* マウスを用い、病態ならびに遺伝学的な解析を行った。第一章では、TSHR 応答不全による TD を伴う CH を引き起こす *Tpst2^{grt}* 遺伝子のコンジェニックマウスを作製することで、CH における遺伝的背景の影響について検証を行った。実験動物として最も頻用性の高い C57BL/6J (B6) と 129 系統においてコンジェニックマウスを作製した結果、B6 では DW/J (DW) 系統と同様重篤な成長遅延を示したのに対し、129 系統では認められなかった。また、成長遅延と甲状腺機能の関連について検証するために、血清学および組織学的な甲状腺機能解析を行った。その結果、B6 では DW と同様、甲状腺ホルモンの低値や甲状腺の低形成像が認められたのに対し、129 ではそうした特徴は認められなかった。以上の結果から、129 は *Tpst2^{grt}* による CH に対して抵抗性であることが

示された。

第二章では、第一章の結果を受け、quantitative trait loci (QTLs) 解析による 129 系統の CH に対する抵抗性遺伝子の同定を試みた。*Tpst2^{grt}* による TD とそれに伴う CH に対して感受性を示す DW 系統と抵抗性を示す 129 系統間でバッククロス個体を作製し、その体重をもとに QTL 解析を行なった。その結果、雄雌共に第 2 染色体遠位端、*D2Mit62* と *D2Mit304* 間の *D2Mit255* 近傍において highly significant を超える QTL が同定された。バッククロス個体を *D2Mit255* の genotype で群別すると、129 由来の allele を有する個体において有意な体重および甲状腺形態の回復効果が認められた。続いて、この領域の効果について検証するために、*D2Mit62* と *D2Mit304* 以外の領域を DW 系統に置換したコンジェニックマウスを作製した。その結果、体重及び thyroid index において回復効果が認められた。以上の結果から、129 系統の *Tpst2^{grt}* による CH に対する抵抗性は第 2 染色体上の 104.0~154.3Mb 間に位置し、かつ、抵抗性遺伝子は TSH シグナル非依存性の甲状腺発達に関与している可能性が示唆された。

DW/J-*grt* は CH の他に、雌マウスの不妊という特徴も有する。多くの動物において CH と妊性の低下が関連するという報告がある一方、雌の繁殖に重要な働きを示す follicle stimulating hormone receptor や luteinizing hormone receptor が TPST2 による修飾を受け、かつ、その修飾がシグナル伝達に重要であることが示唆されている。第三章では、この雌マウスの不妊が甲状腺ホルモンの低下によるものか、それとも TPST2 の活性低下によるものかについて検証するため、甲状腺粉末給餌による CH 治療を行ない妊性が回復するか否かの検証を行なった。甲状腺粉末給餌個体では、成長遅延からの回復と共に、卵巣・子宮重量の回復および各種妊性パラメーターの向上が認められた。以上の結果から、DW/J-*grt* 雌マウスの不妊は、TPST2 活性の低下というよりはむしろ、CH によるものであることが判明した。

以上の結果は DW/J-*grt* マウスの CH モデル動物としての有用性を高めるばかりでなく、TD による CH に対する抵抗性遺伝子の同定による甲状腺の発達や機能の新たな知見の発見への道を開き、甲状腺機能低下症、甲状腺機能亢進症や甲状腺癌といったあらゆる甲状腺疾患に対する新規治療法の開発につながる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	安居院	高志
副査	教授	昆	泰寛
副査	教授	木村	和弘
副査	准教授	佐々木	宣哉

学位論文題名

Phenotypic analysis of mice with congenital hypothyroidism caused by the *grt* mutation in the tyrosylprotein sulfotransferase 2 (*Tpst2*) gene

(チロシルプロテインスルフトランスフェラーゼ2(*Tpst2*)遺伝子の*grt*変異により引き起こされる遺伝性甲状腺機能低下症を呈するマウスの表現型の解析)

申請者は先天性甲状腺機能低下症 (CH) のモデル動物である DW/J-*grt* マウスを用い、病態ならびに遺伝学的な解析を行った。申請者はまず甲状腺刺激ホルモン (TSH) 応答不全による甲状腺形成不全を伴う CH を引き起こす *Tpst2^{grt}* 遺伝子のコンジェニックマウスを作製することで、CH における遺伝的背景の影響について検証を行なった。実験動物として最も頻用性の高い C57BL/6J (B6) と 129 系統においてコンジェニックマウスを作製した結果、B6 系統では DW/J (DW) 系統と同様、重篤な成長遅延を示したのに対し、129 系統では認められなかった。また、成長遅延と甲状腺機能の関連について検証するために、血清学および組織学的な甲状腺機能解析を行なった。その結果、B6 系統では DW 系統と同様、甲状腺ホルモンの低値や甲状腺の低形成像が認められたのに対し、129 系統ではそうした特徴は認められなかった。以上の結果から、129 系統は *Tpst2^{grt}* による CH に対して抵抗性であることが示された。

次に申請者は、quantitative trait locus (QTL) 解析による 129 系統の CH に対する抵抗性遺伝子の同定を試みた。*Tpst2^{grt}* による甲状腺形成不全とそれに伴う CH に対して感受性を示す DW 系統と抵抗性を示す 129 系統間でバッククロス個体を作製し、その体重をもとに QTL 解析を行なった。その結果、雄雌共に第 2 染色体遠位端 *D2Mit62* と *D2Mit304* 間の *D2Mit255* 近傍において highly significant を超える QTL が同定された。バッククロス個体を *D2Mit255* の遺伝型で群別すると、129 系統由来のアレルを有する個体において有意な体重および甲状腺形態の回復効果が認められた。続いて、この領域の効果について検証するために、*D2Mit62* と *D2Mit304* 以外の領域を DW 系統に置換したコンジェニックマウスを作製した。その結果、体重及び thyroid index (甲状腺組織切片における甲状腺総面積に対する甲状腺濾胞面積の割合) において回復効果が認められた。以上の結果から、129 系統の *Tpst2^{grt}* による CH に対する抵抗性は第 2 染色体上の 104.0~154.3 Mb 間に位置し、かつ、抵抗性遺伝子は TSH シグナル非依存性の甲状腺発達に関与している可能性を示唆した。

DW/J-*grt* マウスは CH の他に、雌マウスの不妊という特徴も有する。多くの動物におい

て CH と妊性の低下が関連するという報告がある一方、雌の繁殖に重要な働きを示す卵胞刺激ホルモン受容体や黄体ホルモン受容体が TPST2 による修飾を受け、かつ、その修飾がシグナル伝達に重要であることが示唆されている。申請者は、この雌マウスの不妊が甲状腺ホルモンの低下によるものか、それとも TPST2 の活性低下によるものかについて検証するため、甲状腺粉末給餌による CH 治療を行ない妊性が回復するか否かの検証を行なった。甲状腺粉末給餌個体では、成長遅延からの回復と共に、卵巣および子宮重量の回復、更には各種妊性パラメーターの向上が認められた。以上の結果から、DW/J-*grt* 雌マウスの不妊は、TPST2 活性の低下というよりはむしろ、CH によるものであることが判明した。

以上の結果は DW/J-*grt* マウスの CH モデル動物としての有用性を高めるばかりでなく、甲状腺形成不全による CH に対する抵抗性遺伝子の同定による甲状腺の発達や機能の新たな知見の発見への道を開き、甲状腺機能低下症、甲状腺機能亢進症、甲状腺癌といったあらゆる甲状腺疾患に対する新規治療法の開発につながる可能性を提起した。

以上一連の研究成果は獣医学の分野において新しい知見を与えるものと判断された。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者、細田 弥生氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。