

参考文献

1. Akamizu T, Mori T, Nako K: Pathogenesis of Graves' disease: Molecular analysis of anti-TSH receptor antibodies. *Endocrine J*, 44:633-646, 1997
2. Akamizu T, Matsuda F, Okuda J, et al. Molecular analysis of stimulatory anti-thyrotropin receptor antibodies (TSAbs) involved in Graves' disease: Isolation and reconstruction of antibody genes, and production of monoclonal TSAbs. *J Immunol* 157:3148-3152, 1996
3. 赤水尚史、松田文彦、森徹、中尾一和: 抗 TSH 受容体自己抗体遺伝子の単離と組換えモノクローナル抗体の作製 厚生省特定疾患ホルモン受容機構異常調査研究班 平成8年度総括研究事業報告書。43-45, 1997
4. 赤水尚史、三浦晶子、西條美佐、森山賢治、松田文彦*, 中尾一和: TSH 受容体抗体病の発症機構に関する研究 厚生省特定疾患ホルモン受容機構異常調査研究班 平成9年度総括研究事業報告書。6-9, 1998
5. Akamizu T, Moriyama K, Miura M, Saijo M, Kosugi S, Matsuda F, Nakao K. Characterization of recombinant monoclonal anti-thyrotropin receptor antibodies (TSHRAbs) derived from lymphocytes of patients with Graves' disease: Epitope and binding study of two stimulatory TSHRAbs. *Endocrinology*, 1999, *in press*
6. Sale MM, Akamizu T, Howard TD, Yokota T, Nakao K, Mori T, Iwasaki H, Rich SS, Jennings-Gee JE, Yamada M, Bowden DW. Association of autoimmune thyroid disease with a microsatellite marker for the thyrotropin receptor gene and CTLA-4 in a Japanese population. *Proc Assoc Amer Physician*, 109:453-461, 1997
7. Moriyama K, Akamizu T, Okuda J, Saijo M, Miura M, Matsuda F., Mori T, Nakao K: Preparation and functional analysis of recombinant inhibitory anti-TSH receptor antibodies involved in primary hypothyroidism. The 71th meeting of the American Thyroid Association, Portland, Oregon, p81 (abstract) 1998
8. 森山賢治、赤水尚史、奥田譲治、西條美佐、三浦晶子、松田文彦、森徹、中尾一和: リコンビナント・モノクローナル阻害型抗 TSH レセプター抗体の大量

- 生産と機能的解析。第 4 1 回日本甲状腺学会抄録、p287、1998
9. Akamizu T, Sale MM, Hiratani H, Miura M, Saijo M, Moriyama K, Noh JY, Rich SS, Bowden DW, Nakao K. Association of autoimmune thyroid disease with microsatellite markers for the thyrotropin receptor gene and CTLA-4 in a new set of Japanese population. The 71th meeting of the American Thyroid Association, Portland, Oregon, p80 (abstract), 1998
 10. Akamizu T, Sale MM, Hiratani H, Miura M, Saijo M, Moriyama K, Noh JY, Rich SS, Bowden DW, Nakao K. CTLA-4 is associated with autoimmune thyroid disease in a Japanese population.; some alleles may have protective effects while others result in disease susceptibility. The second Japan-Korea-China Thyroid Conference, Tokyo, Japan, p80 (abstract),p309, 1998

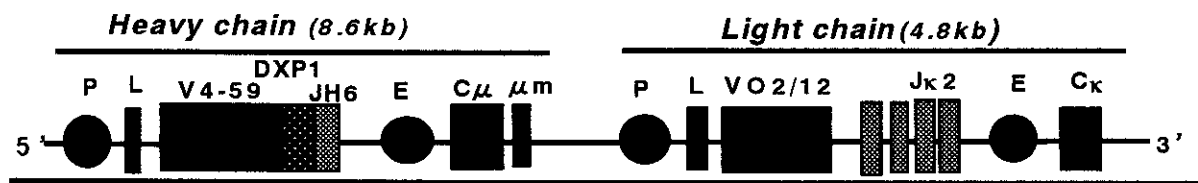


図 1 : 抗体遺伝子トランスジェニックマウスの DNA コンストラクト

TSH受容体抗体による甲状腺癌遠隔転移巣の増悪

御前 隆、笠木寛治、小西淳二（班員）

京都大学大学院医学研究科 核医学・画像診断学

【要旨】分化型甲状腺癌細胞にはTSH受容体が存在する。このため、癌にバセドウ病が合併すると、刺激型TSH受容体抗体（TSH receptor antibody, TRAb）が癌細胞をも刺激して予後が悪くなるとの説がある。我々は放射性ヨード治療を受けた患者の予後とTRAbの有無の相関を検討してこの仮説の真否に迫ろうと考えた。原発巣切除後の肺・骨転移症例60例中9例の血清がラジオレセプターアッセイでTRAb陽性であった。うち7例はFRTL5細胞を用いるバイオアッセイでthyroid stimulating antibody (TSAb)が、他の2例はthyroid-stimulation blocking antibody (TSBAbs)陽性であり、阻害型TRAbを含んでいるものと考えられた。TRAb陽性群の生存率は6/9で陰性群の38/51と有意差はないが、TRAb陽性有病生存のうち2例で局所再発による重篤な呼吸困難が生じている。TRAbが転移巣や再発巣の癌細胞の増殖を刺激して予後を悪化させている可能性が示唆された。

【目的】TRAbが分化型甲状腺癌の予後を悪化させるか否かを、原発巣切除後の転移・再発の進行ならびに生存率から解析する。

【対象と方法】当施設で過去10年間に放射性ヨード治療を受けた乳頭癌または濾胞癌の骨または肺転移症例114例のうち、血清が凍結保存されていた60例、男性15例女性45例、平均年齢59才を対象とした。内因性TSHが高値の検体では測定に偽陽性が出るため、甲状腺ホルモン剤投与中の血清を使用し、まず市販のキットによるラジオレセプターアッセイ（1）でスクリーニングを行なった。陽性例についてはさらに、FRTL5細胞のcAMP産生を指標としたバイオアッセイ（2）でその性質を検討した。

【結果と考察】 検討した60例中9例がラジオレセプターアッセイにおいてTRAb陽性であり、うち7例はTSAAb陽性、他の2例はTSBAb陽性を示した。TSAAb陽性7例のうち4例は過去にバセドウ病の加療歴があり、1例は甲状腺全摘ならびに放射性ヨード治療後にTSAAbが陽性となり甲状腺機能亢進症を発症した珍しい症例(3)、1例は術前潜在性機能亢進症、1例は全経過にわたり亢進症状がなかった。7例中5例の転移巣には放射性ヨードの集積が認められたが、うち2例は後に転移巣の進行により死亡、別の2例で頸部局所再発による重篤な気道閉塞が生じている。TSAAb活性とヨード集積との間に明らかな相関は認められなかった。TSBAb陽性2例では放射性ヨードの集積はみられず、うち1例は転移巣進行で死亡した。

ヒト甲状腺乳頭癌および濾胞癌細胞にTSH受容体が存在することはすでによく知られており、甲状腺ホルモン剤投与によってTSHを抑制し、癌の進展を抑えようとする治療の根拠ともなっている。バセドウ病の原因である刺激型TRAbが同様に癌を刺激して通常より予後が悪くなるとの説(4)には、実験データから肯定する意見(5)がある一方で、バセドウ病手術標本に見つかった癌の症例の予後は普通と変わらなかった(6)との反論もある。また、通常は甲状腺機能低下症の原因とされるTSBAbがTSAAbとともに癌の経過中に出現し、病巣の進行や未分化転化に寄与したとする症例報告(7)もある。今回の検討では、生命予後でみるとTRAb陽性例の生存率(平均観察期間約5年)は6/9で陰性群の38/51と有意差はなかった。しかしTSAAb陽性有病生存例の2例に局所再発による呼吸困難が生じたことは抗体による再発巣の癌細胞の増殖や脱分化の促進を示唆している。また、TSBAbは転移巣のヨード取り込みを阻害することで、放射性ヨード治療を無効とし、さらに予後を悪化させている可能性がある。

【結論】 TRAbは転移性甲状腺癌予後を悪くしている可能性がある。

【参考文献】

1. Konishi J, Kasagi K, Iida Y, Kousaka T, Misaki T, Arai K, Tokuda Y, Torizuka K. Optimization and clinical assessment of a radioreceptor assay for thyrotropin-binding inhibitor immunoglobulins. *Endocrinol Jpn* 1987; 34: 13-20.
2. Kasagi K, Konishi J, Iida Y, Tokuda Y, Arai K, Endo K, Torizuka K. A sensitive and practical assay for thyroid-stimulating antibodies using FRTL-5 thyroid cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1987; 115: 30-36.
3. Kasagi K, Takeuchi R, Miyamoto S, Misaki T, Inoue D, Shimazu A, Mori T, Konishi J. Metastatic thyroid cancer presenting as thyrotoxicosis: report of three cases. *Clin Endocrinol* 1994; 40: 429-434.
4. Belfiore A, Garofalo MR, Giuffrida D, Runello F, Filetti S, Fiumara A, Ippolito O, Vigneri R. Increased aggressiveness of thyroid cancer in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 830-835.
5. Filetti S, Belfiore A, Amir SM, Daniels GH, Ippolito O, Vigneri R, Ingbar SH. The role of thyroid-stimulating antibodies of Graves' disease in differentiated thyroid cancer. *N Engl J Med* 1988; 318: 753-759.
6. Kasuga Y, Sugeno A, Kobayashi S, Masuda H, Iida F. The outcome of patients with thyroid carcinoma and Graves' disease. *Surgery Today* 1993; 23: 9-12.
7. Fujiwara M, Okamura K, Sato K, Asano T, Yamashita K, Hirata T, Ohta M, Mizokami T, Kuroda T. Anaplastic transformation of a papillary carcinoma of the thyroid in a patient with Graves' disease with varied activity of thyroptropin receptor antibodies. *Thyroid* 1998; 8: 53-58.

異常甲状腺ホルモン受容体の発現と機能に関する研究： ドミナントネガティブ作用の機序の解析

浜松医科大学 第二内科

中村浩淑、安藤晋一郎、三沢啓子、西山孝三、夏目宏子、松下明生、佐々木茂和

【目的】

先天的な甲状腺ホルモン受容体(TR)遺伝子異常症である甲状腺ホルモン不応症は、これまで2例のみがホモ接合体で、残りはすべてヘテロ接合体である¹⁾。したがって生体内には正常TRと異常TRが同等に存在していると考えられる。Refetoffらによって見出された本症の第一例めは、その後の遺伝子解析でTR β が欠損しているホモ接合体であることが明らかとなった²⁾。興味深いことに、その両親は臨床的には正常であり、不応症ではなかった。このことは正常のTRが半減するだけでは不応症とはならず、不応症になるには異常TRが存在することが必須であることを示している。事実、見出されているもう一例の、TR β の337番目のアミノ酸(スレオニン)を欠失したホモ接合体患者は、きわめて重篤な不応症の症例であった³⁾。異常TRが不応症を引き起こすメカニズムとして、異常TRのドミナントネガティブ作用、すなわち異常TRが正常TR機能を阻害することが重要と考えられている。この異常TRのドミナントネガティブ作用の主な機序として、標的遺伝子のプロモーター上に存在するT3レスポンスエレメント(TRE)を異常TRが占有することが想定されているが、まだ不明な点が多い⁴⁾。

TRはパートナー蛋白であるレチノイドXレセプター(RXR)とヘテロダイマーを作りTREに結合する。最近、TRにT3が結合したときはSRC-1などのアクチベーターやCBPなどを含む転写活性化因子の複合体が、またT3が結合していないときはN-CoRやSMRTといったコレプレッサーを含む転写抑制の複合体がそれぞれ形成されて、転写を促進ないし抑制することが分かってきた⁵⁾。異常TRのドミナントネガティブ作用にも、コレプレッサーが関与している可能性が指摘されている⁶⁾。本研究では、いくつかの異常TRとRXRとの結合能、異常TRとコレプレッサーとの結合能をtwo-hybridアッセイ系で定量的に求め、正常TRに対するドミナントネガティブ効果の強さと比較することにより、ドミナントネガティブ作用にコレプレッサーが密

接な関与をしていることを明らかにした。

【方法】

正常TR β 1と以下の10種類の異常TR β 1を用いた。R338W、K443E、G345R、F451X、E449X、L428R、L456fs、R338W/K443E、G345R/K443E、R338W/F451X(いずれもアミノ酸は一文字表記、Xはそれ以下のアミノ酸欠失を、fsはフレームシフトを示す。R338W/K443E、G345R/K443E、R338W/F451Xは2個の変異が組合わさったものである)。異常TRのドミナントネガティブ効果は異常TRと正常TRをCV1細胞に等モル発現させ、DR4、pal2、Lapの3種類のTREのレポーター遺伝子を用いてその転写活性から算出した。Two-hybridアッセイ系によるTRとRXRの結合能の測定は以下のように行った。GAL4のDNA結合ドメインとRXRのリガンド結合ドメインを癒合させたキメラ受容体(GAL/RXR)、VP16と正常TR β 1のリガンド結合ドメインを癒合させたキメラ受容体(VP16/TR)をそれぞれ1:1でGAL4レポーター遺伝子とともにCV1細胞に発現させる。2つのキメラ受容体はRXRと正常TRを介して結合するため、VP16の強い転写活性によってGAL4レポーター遺伝子の転写は促進される。ここに異常TRをVP16/TRと等モルで発現させると両者はRXRを競合しあうため、GAL4レポーター遺伝子の転写は異常TRのRXR結合能に応じて阻害される。すなわち転写活性から異常TRのRXR結合能を求めることができる。異常TRとN-CoR、SMRTとの結合能も同様に、GAL/TRとN-CoR/VP16、あるいはGAL/TRとSMRT/VP16の組み合わせによる転写活性を、等モルで共存させた異常TRによる阻害効果から算出した。

【結果】

異常TRのドミナントネガティブ効果を、3種類のTREのレポーター遺伝子を用いて測定した。いずれのTREでも、F451Xのドミナントネガティブ効果はもっとも強く、R338WやE449Xのそれは比較的弱かった。既報⁷⁾のごとくR338Wを含むdouble mutantであるR338W/K443E、R338W/F451Xのドミナントネガティブ効果は、それぞれK443E、F451Xのそれより有意に減弱していた。またRXRとのヘテロダイマー形成が障害されているとされるL428R⁸⁾は、ドミナントネガティブ効果を示さなかった。

Two hybrid アッセイ系で異常TRのRXRに対する結合能を測定し、ドミナントネガティブ効果の強さとの相関を調べた。いずれのTREにおいても良好な正相関が見られた(図1)。ヘテロダイマー形成が障害され、ドミナントネガティブ作用を持たないL428Rの値を、特殊な異常TRとして統計から除去しても結果は同様であった。異常TRとN-CoRとの結合能と、ドミナントネガティブ作用との相関は、図2に示されるように、その傾向はあるものの有意ではなかった。一方、もう一つのコレプレッサーであるSMRTとの結合能とドミナントネガティブ作用との相関は、図3のごとく、きわめて強いものであった。

【考察】

異常TRが正常TR機能を阻害するドミナントネガティブ作用は、甲状腺ホルモン不応症の成立機序のもっとも重要な要因の一つである。その分子レベルでのメカニズムはまだ十分に解明されていないが、異常TRとRXRとのヘテロダイマーが標的遺伝子上のTREに結合するため、正常TRとRXRとのヘテロダイマーがTREに結合するのが阻害されるという機序が想定されている。TREによってはTR/TRホモダイマーも結合するが、T3がTRに結合するとTRホモダイマーはTREから解離する。しかし多くの異常TRはT3結合能が障害されているため、異常TRホモダイマーはT3によりTREから解離させられることなく留まり、結果として正常TR/RXRヘテロダイマーの結合を阻害する、という可能性もこれまでに発表されている⁹⁾。また異常TRが正常TRとダイマーを形成するため、機能的に働きうる正常TRの数が減少する、という機序もあるかもしれない。

TRはT3が結合していないときには転写活性の基礎レベルをさらに抑制する(サイレンシング作用)が、最近になりこのサイレンシング作用にコレプレッサーが重要な働きをしていることが明らかになった。すなわちTRに結合したコレプレッサーはmSin3、HDACを呼び寄せ、コアヒストン蛋白の脱アセチル化を引き起こすことにより転写を抑制すると考えられている⁵⁾。一方、ドミナントネガティブ作用にもコレプレッサーが関与しているのではないかという可能性も示されている。コレプレッサーはTRのヒンジ領域にあるCoRボックスに結合するためこの領域、たとえば214番目のアミノ酸を変異させる(P214R)と、コレプレッサーが結合できなくなる。Tagami & Jameson⁶⁾は、3種類の異常TRにP214R変異を導入しそれぞれコレプレッ

サーが結合できなくすると、ドミナントネガティブ作用が有意に減弱することを報告した。

我々は今回、10個の異常TRのドミナントネガティブ作用の強さと、two hybrid アッセイ系で求めたコレプレッサー、RXRとの結合能との相関を調べた。ドミナントネガティブ作用と異常TR/RXR結合能との間に正の相関が認められ、ヘテロダイマーを形成しやすいことがドミナントネガティブ作用を決める一つの要因であることを示した。さらに重要なことは、異常TRとコレプレッサーの一つであるSMRTとの結合能とドミナントネガティブ作用との間にきわめて強い正相関を見たことである。TRとコレプレッサーの結合はヘテロダイマー依存性であるが、SMRTとの相関はRXRとの相関よりはるかに高いものであり、単に異常TRがRXRとヘテロダイマーを形成する強さを反映しただけのものではない。異常TRはRXRとヘテロダイマーをなしTRE上で正常TRと競合するが、TREに結合した異常TR/RXRはSMRTを呼び込みドミナントネガティブ作用を発揮するのであろう。

興味あることに、もう一つのコレプレッサーであるN-CoRと異常TRとの結合能の強さはドミナントネガティブ作用と有意の相関を示さなかった。N-CoRはSMRTと構造上も機能上も類似性が高く、CV1細胞における発現量もほぼ同程度と報告されている¹⁰⁾が、二つのコレプレッサーは必ずしも機能的に同じ役割を担っているのではないことと考えられた。

【参考文献】

- 1) Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ : The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocrine Rev* 1993; 14: 348-399
- 2) Takeda K, Sakurai A, DeGroot LJ, Refetoff S : Recessive inheritance of thyroid hormone resistance caused by complete deletion of the protein-coding region of the thyroid hormone receptor- β gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 49-55
- 3) Ono S, Schwartz ID, Mueller OT, Root AW, Usala SJ, Bercu BB: Homozygosity for a dominant negative thyroid hormone receptor gene responsible for generalized resistance to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 990-994
- 4) Jameson JL : Mechanisms by which thyroid hormone receptor mutations cause clinical syndromes of resistance to thyroid hormone. *THYROID* 1994; 4: 485-492

- 5) Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L: Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 1996; 10:1167-1177
- 6) Tagami T, Jameson JL. : Nuclear corepressors enhance the dominant negative activity of mutant receptors that cause resistance to thyroid hormone. *Endocrinology*1998; 139: 640-650
- 7) Andoh S, Nakamura H, Sasaki S, Nishiyama K, Kitahara A, Nagasawa S, Mikami T, Natsume H, Genma R, Yoshim Ti: Introducing a point mutation identified in a patient with pituitary resistance to thyroid hormone (Arg 338 to Trp) into other mutant thyroid hormone receptors weakens their dominant negative activities. *J. Endocrinol* 1996; 151: 293-300
- 8) Nagaya T, Jameson JL : Thyroid hormone receptor dimerization is required for dominant negative inhibition by mutations that cause thyroid hormone resistance. *J Biol Chem* 1993; 268: 15766-15771
- 9) Yen PM, Sugawara A, Refetoff S, Chin WW : New insights on the mechanism(s) of the dominant negative: Effect of mutant thyroid hormone receptor in generalized resistance to thyroid hormone. *J Clin Invest* 1992; 90: 1825-1831
- 10) Misiti S, Schomburg L, Yen PM, Chin WW : Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 1998; 139: 2493-2500

Fig. 1 Relationship between dominant negative effects and binding affinities to RXR of mutant TRs

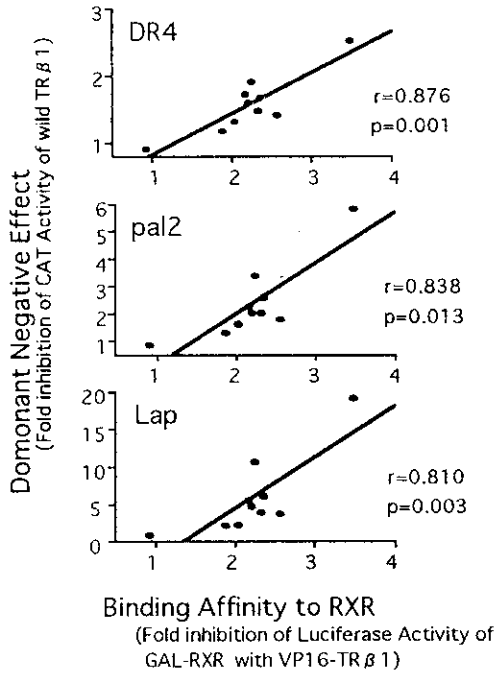


Fig. 2 Relationship between dominant negative effects and binding affinities to NCoR

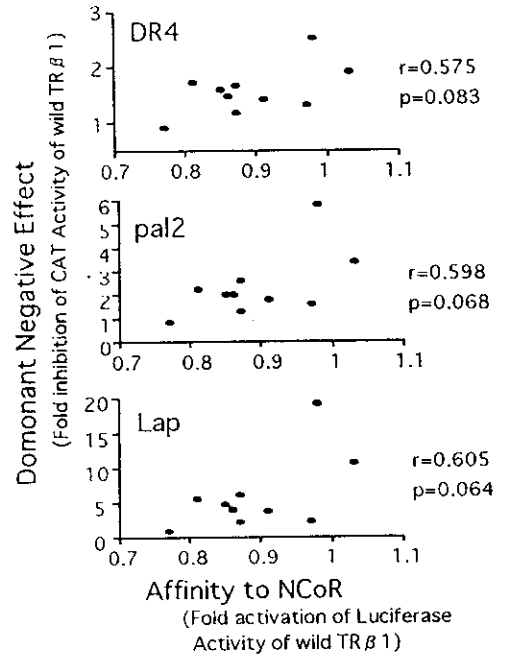
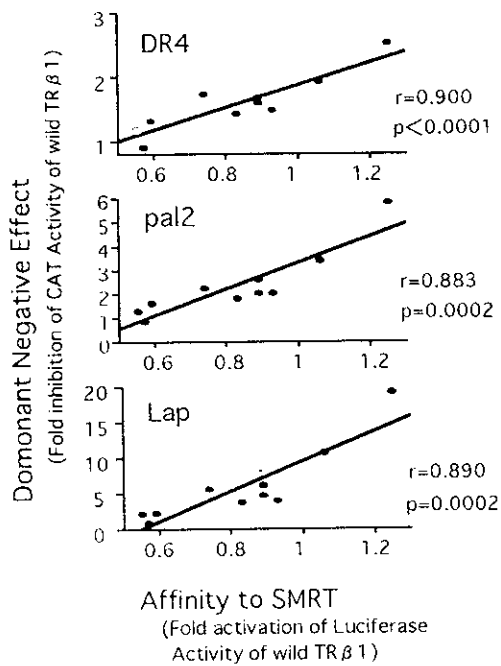


Fig. 3 Relationship between dominant negative effects and binding affinities to SMRT



甲状腺ホルモン不応症の発症におけるコリプレッサーの役割

名古屋大学環境医学研究所 分子細胞適応部門、内分泌代謝分野

妹尾 久雄、長屋 敬

【目的】 甲状腺ホルモン(T3)は核内に存在する甲状腺ホルモンレセプター(TR)に結合し、標的遺伝子の転写を活性化または抑制することにより作用を発揮すると考えられている。TRは、標的遺伝子の甲状腺ホルモン応答配列 (TRE)上でホモダイマー、あるいはレチノイドXレセプター(RXR)とのヘテロダイマーを形成して機能する¹⁾。さらに、T3の存在しない状態では、TRはコリプレッサーと呼ばれる共役因子と結合して転写を抑制し、T3が結合することによりコリプレッサーが解離して、コアクチベーターと呼ばれる共役因子が結合して、T3依存性の転写活性化が引き起こされる²⁾。コリプレッサーとして、N-CoR (nuclear receptor co-repressor)³⁾ や SMRT(silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor)⁴⁾ が、コアクチベーターとして SRC-1 (steroid receptor coactivator-1⁵⁾、AIB1; amplified in breast cancer 1 = ACTR = RAC3; receptor-associated coactivator = TRAM-1 ; thyroid hormone receptor activator molecule 1)⁶⁾、TIF-2/GRIP-1 (transcriptional mediators intermediary factor 2/glucocorticoid receptor-interacting protein-1)⁷⁾ などがクローニングされている。

一方、甲状腺ホルモン不応症 (RTH)は、甲状腺ホルモンに対する反応性の低下した病態で、血中甲状腺ホルモンが高値を示すにも関わらずTSHが抑制されていないことにより診断される。RTH家系の殆どにTRβ遺伝子の点突然変異が同定され、常染色体優性遺伝を示す。その発症機序として、変異TRが正常TRの機能を抑制するドミナントネガティブ作用が重要とされている⁸⁾。我々は、RTHをきたす変異TRβのドミナントネガティブ作用の発揮には、変異TRが正常TRと同様にDNAと結合し⁹⁾、またRXRとヘテロダイマーを形成すること¹⁰⁾が必須であることを報告してきた。この知見は、これまでRTH患者のTRβの変異がDNA結合ドメインや2量体形成ドメインでは検出されていないこととよく合致する。一方、RTH患者にはTRβがコリプレッサーと結合するヒンジ領域の変異も認められない。

そこで本研究では、変異TR β をコードするcDNAを用い、ヒンジ領域に変異を導入し、ドミナントネガティブ作用がどの様に修飾されるかを検討した。

【方法】強いドミナントネガティブ作用を示す変異TR β ：P453X（TR β のカルボキシル端の9つのアミノ酸が欠失したTR）を発現するcDNAはsite-directed mutagenesis法を用いて作成した。コリプレッサーとの結合に重要とされるTR β のヒンジ領域のアミノ酸に変異を導入した変異TR（P214R）も同じ方法で作成した。また、P453XにP214Rを導入し、P214R/P453Xを構築した。これら3つの変異TRのT3結合能を¹²⁵I-T3を用いたT3結合測定法にて、DNA結合能、ダイマー形成能をゲルシフト法にて¹⁰⁾、コリプレッサーのひとつであるN-CoRとの結合能をmammalian two hybrid法にて検討した。ドミナント・ネガティブ作用は、ヒト絨毛癌細胞株JEG-3細胞へT3応答して転写が活性化されるルシフェラーゼ・リポーター遺伝子(2xPal TK Luc)或いは転写が抑制されるTSH α Lucと正常TR発現プラスミド、変異TR発現プラスミドを遺伝子導入して検討した。これらのレポータープラスミドの構築は既に報告した¹¹⁾。正常TR β によるT3依存性のルシフェラーゼ活性増加或いは抑制が変異TR β によりどのように抑制されるかにより、ドミナントネガティブ作用を評価した。

【結果】T3結合能を測定した結果、ヒンジ領域の変異TR β （P214R）のT3結合能は正常であったが、P453Xおよびダブル変異(P214R/P453X)のT3結合能は測定感度以下であった。ゲルシフト法によって解析したこれら3つの変異TRのDNA結合能、ダイマー形成能は正常TR β と同様であった。mammalian two hybrid法にて検討したN-CoRとの結合能は、P453Xでは正常TR β と同等であったが、P214R、P214R/P453Xではその結合活性が低下していた。正常TR β 発現プラスミドと2xPal TK Lucを同時に遺伝子導入した場合、T3によりルシフェラーゼ活性は著しく増加した（T3非添加の場合の5.1倍）。このT3依存性の増加は、P453X発現プラスミドを同時に遺伝子導入することにより2倍へと抑制され、いわゆるドミナントネガティブ作用が認められた。このドミナントネガティブ作用は、そのP453X変異にP214Rを導入したダブル変異（P214R/P453X）では消失していた。また、正常TRによるT3依存性の転写活性の抑制が認められるTSH α Lucを用いた場合には、P453X発現プラスミドを同時にトランスフェクトすることによりこの抑制が解除されるドミナントネガティブ作用が認められ、この作用も

P214R/P453Xでは消失していた。以上の結果より、変異TRがコリプレッサーと結合することがドミナント・ネガティブ作用に必須であることが示唆された。

【考察、結論】 RTHの発症機序におけるコリプレッサーの役割を、コリプレッサーの結合部位とされるヒンジ領域にアミノ酸変異を導入して検討した。トリにおける赤芽球症の発癌遺伝子であるv-erbAはTRとほぼ相同な構造、アミノ酸配列をもっているが、その形質転換欠損株(td359)ではv-erbAの144番目のプロリンがアルギニンに変異していることが知られている¹²⁾。TRβの相同な部位に同じ変異を導入した変異TRβ (P214R)は、コリプレッサーとの結合が障害され、この変異をP453Xへ導入したダブル変異ではP453Xのもつドミナントネガティブ作用が消失した。従って、コリプレッサーと変異TRβとの結合能の保持がドミナントネガティブ作用発揮に重要であることが示された¹³⁾。

T3と結合できないRTH変異TRβは、T3の存在下でも安定してコリプレッサーとの複合体を形成して、転写を抑制することでドミナントネガティブ作用を発揮すると考えられた。RTH患者にTRβのコリプレッサー結合ドメインであるヒンジ領域に変異が同定されないことは^{14, 15)}、この部位が変異TRのドミナントネガティブ作用の発現に大きく関与している可能性を支持するものと考えられる。

今後、RTHを発症する変異TRの機能発現に及ぼすN-CoR以外のコリプレッサーやコアクチベーターなどの共役因子の作用を解析することにより、RTHの病態のみならず甲状腺ホルモンの作用機序を更に明らかにしたい。

【文献】

- 1) Lazar, M. A.: *Endocr. Rev.* 14: 184-193, 1993.
- 2) Horwitz, K. B., Jackson, T. A., Bain, D. L., Richer, J. K., Takimoto, G. S. & Tung, L.: *Mol. Endocrinol.* 10: 1167-1177, 1996.
- 3) Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., et al.: *Nature* 377: 397-404, 1995.
- 4) Chen, J. D. & Evans, R. M.: *Nature* 377: 454-457, 1995.
- 5) Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. & O'Malley, B.W. *Science* 270: 1354-1357, 1995
- 6) Voegel, J.J., Heine, M.J., Sechel, C., Champon, P. & Gronemeyer, H. *EMBO J* 15: 3667-3675, 1996.
- 7) Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D.L. & Stallcup, M.R. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4948-4952, 1996.

- 8) Chatterjee, V. K., Nagaya, T., Madison, L. D., Datta, S., Rentoumis, A. & Jameson, J. L.:
J. Clin. Invest. 87: 1977-1984, 1991.
- 9) Nagaya, T., Madison, L. D. & Jameson, J. L.: J. Biol. Chem. 267: 13014-13019, 1992.
- 10) Nagaya, T. & Jameson, J. L.: J. Biol. Chem. 268: 15766-15771, 1993.
- 11) Nagaya, T., Eberhardt, N.L. & Jameson, J.L. J. Clin. Endocrinol. Metab. 77, 982-990,
1993.
- 12) Damm, K., Beug, H., Graf, T. & Vennstrom, B. EMBO J 6, 375-382, 1987.
- 13) Nagaya, T., Fujieda, M. & Seo, H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 247: 620-623, 1998.
- 14) Refetoff, S., Weiss, R. E. & Usala, S. J.: Endocr. Rev. 14: 348-399, 1993.
- 15) Nagaya, T. & Seo, H.: Endocrine J (in press)

新たな自己抗原と考えられる甲状腺蛋白MYOCILIN

虎の門病院

小澤安則、田口学、紫芝良昌

【目的】我々は昨年までの研究でバセドウ病甲状腺機能亢進症患者や橋本病患者血清に存在する抗甲状腺濾胞細胞膜蛋白に対する抗体を、FRTL-5ラット甲状腺濾胞細胞株の膜蛋白分画との免疫blotting法で検討し、多数の種類膜蛋白に対する抗体が存在するを見いだした。それらの抗原蛋白の中で、バセドウ病では56K蛋白、64K蛋白が陽性になる頻度が高いことを見てきた。56K蛋白の抽出、同定を試み、精製蛋白を集めたが、その作業とともに、既知蛋白で、分子量56kで甲状腺に存在する可能性のある蛋白を選ぶ作業を行った。そのような蛋白のなかで網膜で同定されたmyocilinが56kでかつ膜貫通部分とも考えられる疎水部分をもつことに気づき、この蛋白がヒト甲状腺に存在しないか検討したところ、幸運なことに甲状腺に強く発現することを突き止めた。そこでこの蛋白が“56k蛋白”として抗原性を発揮しているかを明らかにしようとした。また、機能、生理的役割が全く不明なこの蛋白の機能などをラット甲状腺濾胞細胞系で検討するために、ラットmyocilinのcloningを試みた。

【方法】1) ヒトmyocilin蛋白の作成：ヒトmyocilinのfull sequenceにHis tagをつけたものをpGEMベクターに組み込み大腸菌XL-1 blueに発現させ、純化精製した。2) ヒトmyocilin蛋白に対する血中抗体の検討。FRTL-5細胞の56K蛋白、64K蛋白に対する抗体を検討したのと同じ方法で多数のバセドウ病、橋本病患者血清を用い免疫blottingを行った。3) myocilinの機能を解析する為にラットのmyocilin probeが必須なのでラットmyocilinのcloningを行った。既知のヒトmyocilinの塩基配列を基にラット網膜RNAをRTPCRし、その産物の塩基配列を解析した。平行してTA cloning法でsubcloningを行い塩基配列の確認を行った。4) ラットmyocilinの分布などに関する検討。Wistar系ラットの各組織を3)で得られたデータを基にプローブを作成しNorthern blottingで検討した。

【結果】1) 免疫blottingに十分なpureなヒトmyocilin蛋白が作成できた。56Kの蛋白で

あった。2) ヒトmyocilin蛋白に対する血中抗体がバセドウ病患者血清に存在することが明らかとなった。3) ラットmyocilinのcloningを終了しGenBankへの登録を終えた。Accession No. AB019393。我々がcloningしたラットmyocilinは塩基配列でヒトmyocilinと75.4%、マウスmyocilinと85.2%の相同性を示し、アミノ酸配列ではヒトと81.4%、マウスと92.0%の相同性が見られた。4) Wistar系ラットの各組織をNorthern blottingで検討したところ、網膜、横紋筋、平滑筋、甲状腺にラットmyocilin mRNAが存在した。肝、腎には全く存在しなかった。

【考察】我々はこの班研究で自己免疫性甲状腺疾患で生ずる自己抗体に対応する新たな甲状腺抗原の同定を試みてきた。殊に甲状腺のホルモン受容体との関連からその意義を明らかにするために甲状腺膜蛋白に的を絞って作業を進めた。その結果昨年度までに報告したように、FRTL-5濾胞細胞から膜蛋白として蛋白をとった場合も56K蛋白、64K蛋白が重要な抗原蛋白であることが判明した。この分子量の蛋白はWallらがバセドウ病眼症の成因を明らかにするために外眼筋から精製し抗原性が明らかになっている蛋白と大きさが一致する。Wallらの蛋白は甲状腺にも共通に存在することが判明しているので、我々が免疫blotting法でみたものはWallらの外眼筋蛋白と同じものである可能性が高いと考えられる。64K蛋白についてはこの数年の間に同定が進み、一つはミトコンドリアのsuccinate dehydrogenaseのflavoprotein subunitであることが判明している（文献1、2）。56kの蛋白については郡司らが蛋白のアミノ酸解析を一部分行い、G2sと呼んでいる。我々の同定した54k蛋白はアミノ酸配列はG2sとは異なっており別の蛋白と考えられる。この新たな甲状腺蛋白に流血抗体が発見されたことはこの蛋白に抗原性が有ることを意味し、疾患のマーカーとして使えるとともに、甲状腺の機能の解析、自己抗体の作用に新たな切り口を与えるものと期待できる。

Myocilinは窪田ら(文献3)が網膜からcloningし発見した蛋白であるが、網膜でどのような機能を持つのかは全くわかっていない。今回われわれは甲状腺にこの蛋白が存在することをmRNAレベルで明らかにしたわけであるが、この蛋白の甲状腺での機能を明らかにするために、ラットmyocilinのcloningを行った。これを用いてFRTL-5細胞系で機能に関する検討を現在行っている。

【文献】

- 1) Kubota S, et al. Thyroid 8:175-9,1998
- 2) Gunnji K et al. Clin Immunol Immunopathol 87:276-81, 1998
- 3) Kubota R, et al. BBRC 242:396-400, 1997

ヨードトランスポーター遺伝子を用いた甲状腺疾患の新たな診断と治療の確立

山梨医科大学 第三内科

女屋 敏正

【研究要旨】

ヨードトランスポーター(NIS)cDNAおよびその遺伝子をクローニングしさらにその抗体作成等により、種々の甲状腺疾患の病因・病態とNISの関連を探り、併せてNIS遺伝子を用いた甲状腺疾患の新たな診断と治療の確立を目指した。その結果、①培養甲状腺細胞ではNIS蛋白と活性に解離が認められNIS蛋白が十分量存在するが機能を示さない場合のあること、②ヒト甲状腺乳頭癌においてはNIS遺伝子、蛋白が発現しているが、同様に¹²⁵I摂取能を欠くこと、③バセドウ病、Plummer病ではNIS遺伝子の発現増強を認める、④橋本病、バセドウ病などの自己免疫性甲状腺疾患患者血清中にNISに対する自己抗体が存在し、これらの抗体がヨードトランスポートを抑制する機能を有することなどを初めて報告し、NISが自己免疫性甲状腺疾患や甲状腺腫瘍の病態と密接に関与することを明らかにした。さらにNIS遺伝子の甲状腺特異的発現機構の一部を解明し、リコンビナントNISを発現した実験的甲状腺癌の¹²⁵Iによる検出にも成功し、種々の癌転移巣の検出ならびにこれらの遺伝子治療の基礎的知見を得た。

【研究目的】

TSH, TSHレセプターの制御下にある甲状腺のヨード代謝は、自己免疫性甲状腺疾患や甲状腺腫瘍の診断・治療に重要であるが、それらの病因・病態とも密接に関与していると推定されている。本研究においては、ヨードトランスポーター(NIS)に注目し、その遺伝子発現機構の解明とともに、これらと種々の甲状腺疾患との関与を探り、併せてNIS遺伝子を用いた甲状腺疾患の新たな診断と治療の確立を目指す。

【研究方法】

ヒト、ラットNIS cDNAはλgt11 libraryよりPCRにて増幅したcDNAフラグメントをプローブとしスクリーニングを行ない各々全長をクローニングした。これらcDNAをpcDNA3またはpSG5に挿入し哺乳類細胞での発現ベクターを作成した。さらにpGEX-2TないしpTrc/Hisベクターに挿入し、E. coli 中にて recombinant proteinを作成し、affinity chromatographyにて精製後、家兎に免疫し抗ヒトNIS抗体、抗ラットNIS抗体を得た。ヒト甲状腺腫瘍組織ならびに周辺正常組織、ないしバセドウ病患者の甲状腺組織は手術時に得られたものを使用した。細胞、組織中のNIS mRNA, NIS蛋白は常法に従いNorthern blotお

よびWestern blotにて行なった。

【結果と考察】

- ① 培養甲状腺細胞, FRTL-5, においてTSHは経時的、容量依存的にNIS 遺伝子の発現を促進し、これに伴いNIS蛋白量も増加させる。この効果は細胞内cAMPを介した転写レベルの増加であるが、蛋白量とヨード取り込み能には必ずしも相関しない場合のあることが判明した。すなわち、TSH非存在下ではNIS蛋白が十分量存在するもののその活性がなく、いわばNISが機能不全状態にあると推定された。これらの事実はNISにはTSH依存性の活性調節因子が存在することを示唆する。
- ② 甲状腺乳頭癌組織は通常¹²³I摂取能を欠くが、予想に反してこれら組織ではNIS mRNA、NIS蛋白とも正常ないしそれ以上に強く発現していることが、Northern blotおよび抗ヒトNIS抗体を使用したWestern blotにより確認された。すなわち甲状腺乳頭癌組織ではNISは発現しているものの、FRTL-5細胞で観察されたと同様にヨード取り込み能を示さない機能不全状態にあると考えられ、この状態の解除されれば多くの甲状腺癌に対して¹³¹I内照射治療を可能にすると思われる。
- ③ バセドウ病患者の甲状腺組織ではNIS mRNAおよびNIS蛋白はともに増加していることが観察され、これら患者の¹²³I摂取能が亢進する原因の一部にNIS蛋白量の増加が関与していると考えられ、NISの機能と蛋白量に解離は認めなかった。さらに甲状腺のホルモン産生腫瘍であるPlummer病組織においては腫瘍部に一致して¹²³Iの集積が認められるが、NIS mRNA、NIS蛋白とも周囲の正常部に比し発現量が増加しており、NISの機能と蛋白量に関連を認めた。
- ④ NIS遺伝子の発現の詳細を明らかにする目的にて、ラットNISの遺伝子を単離しその5'上流域の構造・機能の解析を行った。NIS遺伝子の甲状腺細胞での発現に必須の最小プロモーター領域は翻訳開始点より上流の-467bpより下流であり、この領域に甲状腺特異的転写因子であるTTF-1が結合しそのプロモーター活性を増加させたことより、NIS遺伝子の甲状腺選択的発現にはTTF-1が関与することが判明した。さらにTSHによるNIS遺伝子発現促進効果には-420より-370bpが重要であり、この部位に新たな甲状腺特異的核蛋白が結合し、その発現を調節していることが明らかとなった。
- ⑤ リコンビナントNIS蛋白をニトロセルロースにブロットすることにより、橋本病、バセドウ病などの自己免疫性甲状腺疾患患者血清中にNISに対する自己抗体が存在することを明らかにした。合成ペプチドを用いた検討によりこれらの抗体は認識部位の一部は第6細胞外ループであることが判明した。また、これら自己抗体はNISの活性を抑制する機能性抗体であることも明らかとなり、自己免疫性甲状腺疾患の病態、臨床経過に関与すると思われる。
- ⑥ 腫瘍原性を有するラット甲状腺細胞であるFRTL-Tc細胞にpcDNA-human NISをトランスフェクショ