

- disease. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 90-97, 1999.
2. Kamijo K, Nagata A, Sato Y. Clinical significance of a sensitive assay for thyroid-stimulating antibodies in Graves'disease using polyethylene glycol at high concentrations and porcine thyroid cells. *Endocr J* 46: 397-403, 1999.
  3. Kasagi K, Iida Y, Hatabu H, et al. Evaluation of TSH receptor antibodies as prognostic markers after cessation of antithyroid drug treatment in patients with Graves' disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 117: 173-180, 1988.
  4. Kasagi K, Hatabu H, Tokuda Y, et al. Studies on thyrotrophin receptor antibodies in patients with euthyroid Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 29: 357-366, 1988.
  5. Konishi J, Iida Y, Endo K, et al. Inhibition of thyrotropin induced adenosine 3'5'-monophosphate increase by immunoglobulins from patients with primary myxoedema. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 544-549, 1983.
  6. Endo T, Ohmori M, Ikeda M, et al. Heterogeneous responses of recombinant human thyrotropin receptor to immunoglobulins from patients with Graves' disease. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 1391-1396, 1992.
  7. Kakinuma A, Chazenbalk GD, Jaume JC, et al. The human thyrotropin (TSH) receptor in a TSH binding inhibition assay for TSH receptor autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2129-2134, 1997.
  8. Sato K, Yamazaki K, Yamada E, et al. Immunoglobulins of untreated Graves' patients with or without thyrotropin receptor antibody (determined by porcine thyrocytes) universally elicit potent thyroid hormone-releasing activity in cultured human thyroid follicles. *Thyroid* 9: 979-988, 1999.
  9. Kasagi K, Konishi J, Arai K, et al. A sensitive and practical assay for thyroid-stimulating antibodies using crude immunoglobulin fractions precipitated with polyethylene glycol. *J Clin Endocrinol Metab* 62:855-862, 1986.
  10. Akamizu T, Mori T, Ishii H, et al. Clinical significance of elevated labeled TSH binding (LTB) activity in sera of patients with Graves' disease and other thyroid disorders. *J Endocrinol Invest* 10: 459-464, 1987.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

TSH受容体抗体トランスジェニックマウスとバセドウ病の  
遺伝因子に関する研究

研究協力者 赤水尚史 京都大学医学部臨床病態医科学 講師

研究要旨

バセドウ病のモデル動物の開発のために、抗TSH受容体抗体トランスジェニックマウスを作製した。1系統のトランスジェニックマウスにおいて、自己反応性Bリンパ球の減少を認めて自己寛容の成立が確認された。さらに、LPS投与によって自己寛容破綻が導かれる可能性が示唆された。また、バセドウ病の遺伝因子に関する研究では、家族性バセドウ病の疫学調査を開始した。ポジショナルクローニングアプローチによって、染色体5q31-33にバセドウ病患者との高い連鎖を示す遺伝子領域が見い出された。

A. 研究目的

バセドウ病は、TSH受容体自己抗体によって引き起こされる臓器特異的自己免疫性疾患である。我々は同病のモデル動物を作製して病因・発症機構・病態を明らかにし、新たな治療法開発を期している。本年度は、抗TSH受容体抗体トランスジェニックマウスを作製した。また、バセドウ病の遺伝因子の研究として、疫学的データ収集のため家族発症バセドウ病の全国的調査を行う。また、バセドウ病感受性遺伝子の同定を候補遺伝子及びポジショナルクローニングアプローチによって検討する。

B. 研究方法

我々はこれまでに、バセドウ病患者の末梢血リンパ球から単離されたヒト抗TSH受容体抗体免疫グロブリン遺伝子を利用して、抗TSHレセプター抗体遺伝子トランスジェニックマウスの作成を行ってきた。1系統のF1マウス血

中とB細胞表面においてヒトIgMの検出に成功した。同マウスにおいて、末梢血、骨髓、脾臓、腹腔内のリンパ球サブセットをFACSにて解析する。血中IgM濃度はELISAによって測定する。トランスジーン挿入場所はFISHにて同定する。B細胞増殖刺激としてLPS投与などを行う。

家族発症バセドウ病の全国的調査は厚生省特定疾患調査研究事業「特定疾患に関する疫学調査研究」班との共同で行い、岡山大学倫理委員会承認を受ける。バセドウ病感受性遺伝子領域のポジショナルクローニングは、九州大学との共同研究笹月・白澤との共同で行い、連鎖の強い領域について関連解析を行う。遺伝子解析については京都大学倫理委員会の承認を受ける。

C. 研究結果

抗TSHレセプター抗体遺伝子トランスジェニックマウスのラインを樹立した。同マウスにおいて、末梢血、骨髓、脾臓のいずれにおいて

もB細胞数の減少が認められ、自己寛容の成立が示唆された。また、血中ヒトIgM濃度もB細胞数の減少を反映して軽度の上昇の留まった。LPS投与によって、B細胞数と血中ヒトIgM濃度の上昇が認められた。今後、LPS投与後の甲状腺ホルモンを測定する予定である。F0マウスにおけるトランスジーン挿入場所はFISHにより染色体の3箇所に挿入されていることが判明した。

家族性バセドウ病の全国疫学調査を開始した。一次調査票をすでに送付し、返答を待って集計および二次調査票送付の予定である。ポジショナルクローニングアプローチによって、染色体5q31-33にバセドウ病患者との高い連鎖を示す遺伝子領域が見い出された。この領域のマイクロサテライト多型を用いて関連解析を行い、有意の結果を示すアリルを認めた。

## D. 考 察

1系統のトランスジェニックマウスにおいて、マウスB細胞数の減少が見られたことは、(1) clonal deletion、(2) B cell receptorのdown modulation あるいはallelic exclusion、の可能性が考えられた。また、LPS投与のよって、上記の自己寛容破綻の可能性が示唆された。今後、さらに同マウスの内分泌学的機能解析を行う予定である。

日本人バセドウ病疾患感受性遺伝子領域として5q31-33が有力と考えられた。

## E. 結 論

- ① 抗TSHレセプター抗体遺伝子トランスジェニックマウスのラインを樹立した。
- ② 同マウスの末梢血、骨髄、脾臓のいずれにおいてもB細胞数の減少が認められ、自己寛

容の成立が示唆された。

- ③ LPS投与によって自己寛容破綻の可能性が示唆された。
- ④ 家族性バセドウ病の全国疫学調査を開始した。  
バセドウ病感受性遺伝子領域の候補として5q31-33が見い出された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Akamizu T, Kohn LD, Hiratani H, Saijo M, Tahara K, Nakao K. Hashimoto's thyroiditis with heterogeneous anti-thyrotropin receptor antibodies: unique epitopes may contribute to the regulation of thyroid function by the antibodies. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 2116-2121, 2000.
- ② Akamizu T, Sale MM, Rich SS, Hiratani H, Yoshimura Noh J, Saijo M, Moriyama K, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K, Bowden DW. Association of autoimmune thyroid disease with microsatellite markers for the thyrotropin receptor gene and CTLA-4 in Japanese patients. *Thyroid*, 10: 851-858, 2000.
- ③ Akamizu T, Nakao K. Air in the thyroid. *Thyroid* 10: 535-536, 2000.
- ④ Sellitti DF, Dennison D, Akamizu T, Doi S, Kohn LD, Koshiyama H. Thyrotropin regulation of cyclic adenosine monophosphate production in human coronary artery smooth muscle cells. *Thyroid*, 10: 219-225, 2000.
- ⑤ Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y,

- Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin strongly stimulates growth hormone (GH) release in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 4908-4911, 2000.
- ⑥ Akamizu T, Kaneko H, Noguchi N, Kashii S, Nakao K. Moisture Chamber for Management of Corneal Ulcer due to Graves' Ophthalmopathy, *Thyroid*, 10: 1123-1124, 2000.
- ⑦ Sellitti DF, Akamizu T, Doi S, Kim GH, Kariyil JT, Kopchik JJ, Koshiyama H. Renal expression of two thyroid-specific genes, thyrotropin receptor and thyroglobulin. *Experimental Nephrology*, *Exp Nephrol* 2000 Oct; 8(4-5): 235-243.
- ⑧ Misaki T, Iwata M, Kasagi K, Iida Y, Akamizu T, Kosugi S, Konishi J. Hyperthyroid Graves' disease after hemithyroidectomy for papillary carcinoma: Report of three cases. *Endocr J*. 47: 191-195, 2000.
- ⑨ 赤水尚史：「Basedow病」増刊号「Evidenceの基づく内科的治療の進め方」、最新医学、55: 1349-1358, 2000。
- ⑩ 赤水尚史：抗TSH受容体抗体の多様性と自己免疫性甲状腺疾患。内分泌・糖尿病科、10: 283-287, 2000。
2. 学会発表
- ① Akamizu T, Kohn LD, Kanamoto N, Saijo M, Hattori Y, Moriyama K, Nakao K. Unique epitopes of heterogeneous anti-thyrotropin receptor antibodies contribute to the regulation of thyroid function in Hashimoto's thyroiditis. The 25th World Congress of Internal Medicine. Cancun, Mexico, 2000.
- ② Hattori Y, Akamizu T, Saijo M, Kanamoto N, Moriyama K, Nakao K. Secretion, ligand binding and autoantibody interaction of the ectodomain of thyrotropin receptor produced by the recombinant baculovirus system. 12<sup>th</sup> International Thyroid congress, Kyoto, Japan, 2000.
- ③ Moriyama K, Tagami T, Usui T, Hattori Y, Saijo M, Kanamoto N, Akamizu T, Nakao K. Methimazole and Propylthiouracil Suppress Gene Transcription Mediated by Thyroid Hormone and its Receptors 12<sup>th</sup> International Thyroid congress, Kyoto, Japan, 2000.
- ④ Akamizu T, Saijo M, Kanamoto N, Hattori Y, Moriyama K, Ohmori K, Suzuki M, Matsuda F, Ikuta K, Honjo T, Nakao N. Establishment Of Anti-Tsh Receptor Antibody Transgenic Mouse. Hamamatsu Japan, 2000.
- ⑤ Moriyama K, Tagami T, Kanamoto N, Saijo M, Hattori Y, Usui T, Akamizu T, Nakao K. Bisphenol A inhibits transcriptional activity mediated by the thyroid hormone receptors. 6th IFTS (International federation teratology society), 40th Japan Teratology Society Matue, Japan, 2000.
- ⑥ Saijo M, Akamizu T, Hattori Y, Kanamoto N, Moriyama K, Ohmori K, Matsuda F, Ikuta K, Honjo T, Nakao K. Generation of Anti-TSH Receptor Antibody Transgenic Mice. 11th International Congress of Endocrinology, Sydney, 2000.
- ⑦ Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T,

- Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin Strongly Stimulates Growth Hormone (Gh) Release in Humans. 11th International Congress of Endocrinology, Sydney, 2000.
- ⑧ Akamizu T, Ozaki S, Hiratani H, Uesugi H, Kanamoto N, Saijo M, Hattori Y, Moriyama K, Ohmori K, Nakao K. Anti-Neutrophil Cytosolic Antibodies Associated Withpropylthiouracil-Induced Neutropenia. 11th International Congress of Endocrinology, Sydney, 2000.
- ⑨ Hosoda K, Kojima M, Hosoda H, Iwakura H, Son C, Matsuda J, Harada M, Mori K, Takaya K, Ogawa Y, Itoh H, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K. cDNA Cloning of Mouse Ghrelin and Its Tissue Distribution. 11th International Congress of Endocrinology, Sydney, 2000.
- ⑩ Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Hosoda H, Iwakura H, Son C, Matsuda J, Mori K, Ogawa Y, Akamizu T, Nakao K. cDNA cloning of mouse ghrelin and its tissue distribution. The 82th Annual Meeting of the Endocrine Society, Tronto, Canada, 2000.
- ⑪ Iwakura H, Hosoda K, Son C, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Matsuda J, Akamizu T, Fujii S, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin gene was expressed in human placenta The 82th Annual Meeting of the Endocrine Society, Tronto, Canada, 2000.
- ⑫ 永田 恵、金本巨哲、西條美佐、森山賢治、赤水尚史、島津 章、高橋 淳、橋本信夫、中尾一和。肥満を伴わず多発性骨折を主訴とした男性Cushing病の一例。第10回臨床内分泌代謝：Update, 2000. 3. 17-18、高松市。
- ⑬ 西條美佐、赤水尚史、井村嘉孝、井上大輔、金本巨哲、森山賢治、柏井 聡、越山裕行、大野仁嗣、中尾一和。バセドウ病眼症に合併した外眼筋のMalignant Lymphoma。第10回臨床内分泌代謝：Update, 2000. 3. 17-18、高松市。
- ⑭ 田中祐司、瀬尾麻理、尾形毅樹、村上健彦、山本通子、元吉和夫、西條美佐、森山賢治、赤水尚史、藤田敏郎。バセドウ病自己抗体によるcAMP非依存性増殖促進モノクローナル抗体の存在とその病態形成上の意義の考察日本内科学会、2000. 4、京都。
- ⑮ 服部喜之、赤水尚史、金本巨哲、西條美佐、森山賢治、中尾一和。バキュロウイルス昆虫細胞発現系によって作製した可溶性TSHレセプターに関する解析。第73回日本内分泌学会学術総会、2000. 6. 16-18、京都。
- ⑯ 森山賢治、赤水尚史、服部喜之、西條美佐、金本巨哲、田上哲也、臼井 健、中尾一和。内分泌攪乱化学物質Bisphenol Aの甲状腺ホルモン受容体に及ぼす作用メカニズムに関する基礎的解析。第73回日本内分泌学会学術総会、2000. 6. 16-18、京都。
- ⑰ 西條美佐、赤水尚史、金本巨哲、森山賢治、服部喜之、大森 勝、生田宏一、松田文彦、鈴木 揆、本庶 佑、中尾一和。高TSHレセプター抗体遺伝子トランスジェニックマウスの作製。第73回日本内分泌学会学術総会、2000. 6. 16-18、京都。
- ⑱ 金本巨哲、赤水尚史、西條美佐、服部喜之、森山賢治、細田公則、島津 章、細山洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和。FRTL-5細胞におけるGhrelin遺伝子発現に関する検討。第73回日本内分泌学会学術総会、2000. 6. 16-18、京都。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症の成立機序に関する研究  
(2) T3/甲状腺ホルモン受容体によるTSH遺伝子転写抑制機構

分担研究者 中村 浩淑 浜松医科大学第二内科 教授

共同研究者 佐々木茂和、西山 孝三、夏目 宏子、松下 明生、中野 桂子

研究要旨

甲状腺ホルモンによるTSH産生制御は、下垂体-甲状腺系の恒常性維持にもっとも重要な機構であるが、T3/甲状腺ホルモン受容体(TR)がTSH遺伝子の転写を抑制する分子機構はまったく不明である。TSH遺伝子における転写抑制機構の研究が困難である理由の一つは、実験に適した培養細胞系がないことである。転写制御機構の実験で頻用されるサル腎臓由来CV1細胞で、T3/TRによるTSH遺伝子発現制御を検討できる系を確立し、この系で正常、異常TRの作用を検討した。CV1細胞に転写因子Pit1とGATA2をTSHbetaプロモーターと同時発現させると、TSHbetaプロモーターの基礎転写活性が観察できた。ここにTRのみを発現させても転写活性に変化はなかったが、T3を加えると用量依存性に有意に転写が抑制された。甲状腺ホルモン不応症患者から得た変異TRbeta1の作用の検討から、TSHbeta遺伝子に対するnegative regulationは、T3により正に調節される遺伝子のpositive regulationの単純な鏡像関係ではないことが示された。また3つの機能的TRアイソフォームのうち、TSH産生制御にはTRbeta2が主要な役割を演じていると考えられた。

研究目的

T3/TRによる遺伝子の負の制御機構はまったく不明である。甲状腺ホルモン不応症では、TR遺伝子異常の結果、下垂体TSH産生細胞に対するネガティブフィードバックが障害されて不適切TSH分泌（SITSH）が生じるが、この分子機構も明らかでない。TSH遺伝子の負の制御機構を研究する良い培養細胞系がないことが、研究を困難にしている一因であるため、遺伝子実験で頻用されているサル腎臓由来CV1細胞で、TSH遺伝子発現を検討できる系の確立をはかった。またこの系を用いて、TSH遺伝子転写抑制における正常TRならびに不応症患者

者の変異TRの作用を検討した。さらに、TRの3つの機能的アイソフォームのどれがTSH制御の主体であるかを検討した。

研究方法

甲状腺ホルモン不応症患者から得られた3種類の変異TRbeta1（K443E、F451X、E449X）およびF451X、E449Xと同一のアミノ酸変異をもつよう人工的に作成した変異TRbeta2（F504X、E502X）の発現プラスミドを使用した。レポーター遺伝子としてはヒトTSHbeta遺伝子プロモーター（-128/+37）にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ

(CAT) 遺伝子を結合させたものを用いた。CV1細胞にTSHbeta-CAT、Pit1、GATA2、TRの各発現プラスミドをリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションし、20時間後T3を添加した。さらに24時間培養後、細胞抽出液を回収しCAT活性を測定した。それぞれのCAT活性値はbeta-ガラクトシダーゼ活性で導入効率の補正を行った。ウエスタンブロッティング法は、既存の報告に従い採取したTalphaT1細胞の核抽出液をSDS-電気泳動後、TRalpha1、beta1、beta2それぞれに特異的な1次抗体と反応させ、さらに2次抗体と反応させた後、ECL detection reagentでバンドを検出した。

## 研究結果

CV1細胞にPit1、GATA2を発現させることによって、TSHbeta遺伝子の転写が活性化された。ここにTRbeta1のみを発現させても、T3が存在しないとTSHbeta遺伝子の転写活性は変化しなかった。T3が存在すると転写はT3の濃度依存性に有意に抑制された。またT3結合能のない変異TRbeta1 (F451X、E449X) はTSHbeta遺伝子の転写活性を変化させなかった。このことから、リガンド非結合TRはTSHbeta遺伝子の転写を上昇させるものではないことが示された。

変異TRと正常TRを1:1で発現させ、変異TRが正常TRの機能を阻害するドミナントネガティブ作用を検討した。3種の変異TRbeta1のうち、T3により正の制御を受けるレポーター遺伝子ではF451Xが最も強く正常TRの作用を阻害し、F451XとE449Xの阻害効果には有意の差があったが、TSHbeta遺伝子においてはF451XとE449Xの阻害作用には差が見られなかった。変異TRの阻害効果が正の制御を受ける遺伝子と負の制御を受ける遺伝子で異なること

から、T3/TRによるnegative regulationがpositive regulationの単純な鏡像関係のものではないことが示された。

TRの各アイソフォームの蛋白発現量をマウスTSH産生細胞株TalphaT1細胞を用いたウエスタンブロッティングで検討したところ、TRbeta2の発現のみが確認され、TRalpha1、beta1は検出されなかった。またTSHbeta遺伝子の転写制御における各アイソフォームの作用を比較すると、TRalpha1、beta1が転写活性を約50%低下させたのに対して、TRbeta2は70%低下させ、TRbeta2が最も強い抑制効果を示した。このことから下垂体におけるTSH産生制御には、TRbeta2が主要な役割を演じている可能性が高いと考えられた。変異TRbeta2 (F504X、E502X) の機能を調べたところ、変異TRbeta1と同様に、正常TRbeta1およびbeta2のTSHbeta遺伝子に対する転写抑制作用を阻害した。

## 考 察

T3依存的なTSHbeta遺伝子の負の制御を観察する実験系を新たに開発し、同じCV1細胞系で、T3/TRによる正の制御と負の制御を比較検討することを可能とした。この系で正常TRに対する変異TRの阻害作用を調べたところ、その強さが正の制御と負の制御とで異なっていた。これまでT3/TRによるnegative regulationがpositive regulationの鏡像関係にあるようなモデルが提唱されていたが、私たちの成績は、両者の制御機構が同一ではないことを示唆している。また、TSHbeta遺伝子の転写はT3/TRによって抑制され、リガンド非結合TRは影響しなかったが、これはTRが完全に欠損したマウスが著明なTSH高値を示す所見と合致する。TSH産生細胞での蛋白発現量の検討とTSHbeta

遺伝子の転写抑制機能の検討から、TRの3つの機能的アイソフォームのうちTSHbeta2がTSHの負の制御に最も重要であると考えられた。最近、TRH遺伝子においてもTRbeta2がalpha1、beta1より転写を強く抑制すること、またTRbeta2の選択的ノックアウトマウスがSITSHの病態を引き起こすことが報告された。これらの所見は今回の結果と一致するものであり、TRH、TSHのネガティブフィードバックにおいてはTRbeta2が中心的役割を果たしていると考えられる。甲状腺ホルモン不応症患者からはTRbeta1遺伝子異常が同定されているが、患者の下垂体では同じ遺伝子異常がTRbeta2でも発現していると考えられる。人工的に作成した変異TRbeta2はbeta1と同様に、正常TRによるTSHの負の制御を阻害した。このことから、甲状腺ホルモン不応症患者でSITSHの病態を引き起こす主体は、変異TRbeta2である可能性が高い。

## 結 論

TSH遺伝子の転写はT3/TRによって抑制される。T3非結合型TRは転写に影響しない。甲状腺ホルモン不応症の不適切TSH分泌の発症には、異常TRbeta2が主要な役割を演じている。

## 研究発表

### A. 論文発表

Sasaki S, Lesoon-Wood LA, Dey A, Kuwata T, Weintraub BD, Humphrey G, Yang W, Seto E, Yen PM, Howard BH, Ozato K. LIGAND-INDUCED RECRUITMENT OF A HISTONE DEACETYLASE IN THE NEGATIVE-FEEDBACK REGULATION OF THE THY-

ROTROPIN BETA GENE. EMBO Journal 18 : 5389-5398, 1999.

A. Matsushita, S. Sasaki, H. Natsume, K. Nishiyama, H. Nakamura INVOLVEMENT OF THYROID HORMONE RECEPTOR BETA 2 IN THE NEGATIVE FEEDBACK REGULATION OF THYROTROPINE BETA GENE BY THYROID HORMONE 投稿準備中

### B. 学会発表

S. Sasaki, A. Matsushita, A. Nakano, K. Nishiyama, H. Natsume, R. Genma, H. Nakamura NEGATIVE REGULATION OF THYROTROPIN BETA GENE BY THYROID HORMONE AND THYROID HORMONE RECEPTORS. 12th International Thyroid Congress 2000. 10 (Kyoto).

A. Matsushita, S. Sasaki, A. Nakano, K. Nishiyama, H. Natsume, R. Genma, H. Nakamura POSSIBLE INVOLVEMENT OF THYROID HORMONE RECEPTOR BETA 2 IN THE NEGATIVE FEED BACK REGULATION OF THYROTROPIN BETA GENE BY THYROID HORMONE. 12th International Thyroid Congress 2000. 10 (Kyoto).

佐々木茂和、中村浩淑、尾里啓子 甲状腺ホルモンとその受容体による甲状腺刺激ホルモンbeta鎖への転写抑制機構 高峰カンファランス 2000年2月(東京)。

佐々木茂和、松下明生、中野桂子、西山孝三、夏目宏子、源馬理恵子、中村浩淑 甲状腺ホルモンによるTSHbeta鎖への転写抑制に必要な細胞特異因子の検討 第73回日本内分泌学会総会 2000年6月(京都)。

松下明生、佐々木茂和、中野桂子、西山孝三、



夏目宏子、源馬理恵子、中村浩淑 甲状腺ホルモン不応症における不適切TSH分泌の発生機序：変異TRalpha1とbeta1の比較検討 第73回日本内分泌学会総会 2000年6月（京都）。

中野桂子、佐々木茂和、松下明生、西山孝三、

夏目宏子、源馬理恵子、中村浩淑 リガンド非結合T3受容体beta1自体はTSHbeta遺伝子の転写活性化因子ではない 第73回日本内分泌学会総会 2000年6月（京都）。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症発症機序に関する研究

分担研究者 妹尾 久雄 名古屋大学環境医学研究所 内分泌・代謝分野教授

研究協力者 村田 善晴<sup>1</sup>、Samuel Refetoff<sup>2</sup>、神部 福司<sup>1</sup>、林 良敬<sup>1</sup>、武内 陽子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学環境医学研究所、<sup>2</sup>シカゴ大学医学部

研究要旨

遺伝子相同組み換えにより $\alpha$ 型甲状腺ホルモン受容体（TR $\alpha$ ）遺伝子の発現を完全に阻止したマウス（TR $\alpha$ 0/0）を用い、TR $\alpha$ の機能を検討した。その結果、TR $\alpha$ のアイソフォームの発現が無いマウスでは、TR $\beta$ が主として発現している下垂体および肝臓において甲状腺ホルモンに対する感受性が増大することが明らかにされた。この感受性の増大は、甲状腺ホルモン非結合型のアイソフォームによるのドミナントネガティブ作用がTR $\alpha$ 0/0では発揮されないことによると考えられた。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症（Resistance to Thyroid Hormone = RTH）は、甲状腺ホルモン（TH）に対する反応性の低下した病態で、その家系の殆どで、第3染色体に存在する $\beta$ 型甲状腺ホルモン受容体（TR $\beta$ ）遺伝子の点突然変異が同定されている。変異の多くは、C端のリガンド結合領域に存在し、優性遺伝形式をとることからRTH発症には変異TR $\beta$ 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。一方、TRは、第17染色体に位置する $\alpha$ 遺伝子によってもコードされるが、これまでTR $\alpha$ 遺伝子の変異によるRTHの発症は報告されていない。

TR $\alpha$ 、TR $\beta$ 遺伝子の転写産物のからは、alternative splicingにより生じたmRNAにより $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、Da1、Da2および $\beta 1$ 、 $\beta 2$ のアイソフォームが合成される。このうち、 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ は、甲状腺ホルモン（TH）と結合する。一方、 $\alpha$

2、Da1、Da2は、TH結合能を示さず真の受容体ではない。これらのTH非結合TR $\alpha$ アイソフォームは、in vitroの培養細胞を用いた実験系においてTHによる標的遺伝子の発現促進を抑制することが示され、TRの機能をドミナントネガティブに抑制すると考えられてきた。しかしながらin vivoでのTH非結合型のTR $\alpha$ アイソフォームの役割に関しては未だ報告されていない。

本研究では、遺伝子相同組み換えによりTR $\alpha$ 遺伝子産物の全ての発現を阻止したノックアウトマウス（TR $\alpha$ 0/0）を用いてTHに応答する種々のパラメーターを測定し、TR $\alpha$ の機能を解析した。

B. 研究方法

同じ系統（C57BI/6J）の野生型（WT）、TR $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、Da1、Da2発現を阻止したノックアウトしたマウス（TR $\alpha$ 0/0）、 $\beta$ 型TR遺伝子をノックアウトし、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の発現を阻止したマ

ウス( $TR\beta^{-/-}$ )を実験に用いた。 $TR\alpha 0/0$ では、 $TR\alpha$ アイソフォームの全ての mRNA の発現が無いことを確認し、 $TR\beta^{-/-}$ では、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$  mRNA の発現が無いことを確認した。

生後4週目に各々のマウスを2群(1群7匹)に分け、1群にはプロピルチオウラシル(0.15%)含有低ヨード食(0.8 p.p.mのヨード)を投与し甲状腺機能低下症とし、低ヨード食開始7日目から体重100g当たり2.0mgのT3を4日間腹腔内投与し、最後のT3注射後12~16時間後に心臓採血により屠殺した。他の群にも同じ飼料を与え、7日目からは生理的食塩水を4日間腹腔内投与した。

別の実験では、通常の飼料を与えたWT、 $TR\alpha 0/0$ に体重100g当たり0.2mgのT3を4日間投与し、ついで次の4日間は体重100g当たり0.8mgのT3を4日間投与し、T3量を変える毎に300mlの血液を採取した。

更に別の実験では、WT、 $TR\alpha 0/0$ で体重100g当たり0.80mgのT3を4日間投与し、投与前後にTRHテストを行った。TRHテストは、最後のT3注射後12~16時間に0.257mgのTRHを腹腔内投与し、投与前及び投与15分後に採血し、各々のマウスにおけるTRH投与に対するTSHの反応を検討した。

血中コレステロールはオートアナライザーで、TSH、T4、T3濃度はRIAにて測定した。

心拍数は含水クロラル(体重10g当たり4mgを腹腔内投与)により麻酔し、心電図を装着して検討した。

肝臓におけるT3結合能を測定すると共に、Spot14 mRNA、5'-deiodinase(5'-DI) mRNA、Malic enzyme (ME) mRNAをNorthern blot法で解析し、心臓におけるSERCA2 (Sarcoendoplasmic calcium ATPase 2) mRNA、MHC  $\beta$

(Myosin Heavy Chain  $\beta$ ), MHC  $\alpha$  mRNAも検討した。

全てのデータは、mean  $\pm$  SEMで表示し、統計学的検討はゲノタイプが異なる場合には2-way ANOVAを用い、同じ場合にはStudent's t testを用いた。

## C. 研究結果

### 1. WT、 $TR\beta^{-/-}$ 、 $TR\alpha 0/0$ マウスの甲状腺機能と下垂体-甲状腺系のネガティブフィードバックに対する感受性

血中TSH濃度は、 $TR\alpha 0/0$ で $22 \pm 3.5$  mU/L、WTマウスで $25 \pm 3.0$  mU/Lと同様のレベルを示すのにも関わらず、T4濃度は $TR\alpha 0/0$ マウスで有意に低値を示した( $TR\alpha 0/0$ :  $3.29 \pm 0.09$  mg/dl、WT:  $3.76 \pm 0.01$  mg/dl)。血中T3濃度は $TR\alpha 0/0$ 、WT群で差異を認めなかった。これまでの報告と同様に、 $TR\beta^{-/-}$ では、血中T4、T3濃度高値にも関わらず、TSH高値を示した。血中T4とTSHレベルには負の相関関係が知られている。 $TR\alpha 0/0$ マウスでは血中TSHはWTと同レベルにも関わらず、T4が有意の低値を示したことは、 $TR\alpha 0/0$ における下垂体-甲状腺系のネガティブフィードバック機構がWTと異なることを示唆している。

この原因を追及するため、通常の飼料で飼育したWT、 $TR\alpha 0/0$ マウスに体重100g当たり0.2mgのT3を4日間投与し、ついで次の4日間は体重100g当たり0.8mgのT3を4日間投与した。T3投与群の血中TSHは感度以下のため、T3投与前後の血中T4を測定し、TSH分泌の抑制度の指標とした。体重100g当たり0.2mgのT3を4日間投与すると、 $TR\alpha 0/0$ マウスのT4濃度は $2.26 \pm 0.01$  mg/dlに低下し、WTマ

ウスでは、 $3.01 \pm 0.11$  mg/dlに低下した。T3投与によるT4の減少度を検討すると、TR $\alpha$ 0/0マウスでは $34.0 \pm 5.4\%$ とWTの $18.2 \pm 3.7\%$ に比し、有意に減少度が大きかった ( $p < 0.005$ )。体重100g当たり0.8mgのT3を4日間投与するとT4は両群とも0.5mg/dl以下に減少した。この結果は、TR $\alpha$ 0/0マウスにおいては、T3投与によるTSH分泌抑制の感受性が高いことを示唆している。これを証明するため、体重100g当たり0.8mgのT3を4日間投与し、投与前後で、TRHテストを行った。TRHに対するTSHの反応は、T3投与により減弱したが、その抑制度は、WTの $42.8 \pm 15.8\%$ に対し、TR $\alpha$ 0/0では $77.3 \pm 5.7\%$ とTR $\alpha$ 0/0で有意に高かった。この結果は、TR $\alpha$ 0/0マウスの下垂体-甲状腺系のネガティブフィードバック調節におけるT3に対する感受性がWTより高いことを示している。

更に、下垂体-甲状腺系のネガティブフィードバック調節に果たすTR $\alpha$ の役割を検討するため、甲状腺機能低下マウスを作成し、T3の作用を検討した。甲状腺機能低下症にすることにより、血中甲状腺ホルモン濃度WT、TR $\alpha$ 0/0マウス、TR $\beta$ -/-で等しくし、全ての群に体重100g当たり2.0mgのT3を4日間投与して、TSHの抑制度を検討した。

甲状腺機能低下症WTマウスのTSHは $8,700 \pm 1,150$  mU/Lで、TR $\alpha$ 0/0の $10,650 \pm 1,850$  mU/L、TR $\beta$ -/-の $10,300 \pm 1,850$  mU/Lと同レベルであった。T3投与により、TR $\alpha$ 0/0では $8.0 \pm 1.5$  mU/Lに低下したが、WTマウスでは、 $18.0 \pm 1.5$  mU/Lとその抑制は軽度であった。この結果も下垂体-甲状腺系のネガティブフィードバック調節におけるT3に対する感受性がTR $\alpha$ 0/0で高いことを示唆した。

一方、TR $\beta$ -/-のT3投与後のTSHは、 $247.0 \pm 82.5$  mU/Lで、これまで報告されて来たようにTHに対する感受性の低下が示され、RTHの臨床所見に合致していた。

## 2. 肝でのTH作用におけるTR $\alpha$ の役割

肝でのTH作用に果たすTR $\alpha$ の役割を解明するため、上述の如く甲状腺機能低下マウスにT3を投与し、甲状腺ホルモンに応答する種々のマーカーを測定した。甲状腺機能低下症WTマウスにT3を投与すると肝臓の湿重量の低下率は $14.2 \pm 2.9\%$ であったが、TR $\alpha$ 0/0では $26.7 \pm 1.6\%$ と有意に大きかった。

甲状腺機能低下WTマウスのコレステロールは、 $190.0 \pm 9.6$  mg/dlで、TR $\alpha$ 0/0では $167.1 \pm 11.2$ 、TR $\beta$ -/-では $150.3 \pm 5.9$  mg/dlであった。T3投与により、コレステロールは各群で、 $89.0 \pm 4.5$ ,  $60.3 \pm 4.2$ ,  $112.5 \pm 4.9$  mg/dlとなった。従って、T3投与によるコレステロールの低下もTR $\alpha$ 0/0の方がWTに比し大きく、前者の $63.1 \pm 3.1\%$ に対し、WTでは $52.5 \pm 3.2\%$ であった ( $p < 0.005$ )。一方、TR $\beta$ -/-でのT3によるコレステロールの低下は軽度であった。

Type I 5'-deiodinase (5'-DI)、spot 14、malic enzyme (ME)などは、甲状腺ホルモン応答性遺伝子としてよく知られている。そこで、これら遺伝子の発現に対するTH作用をWT、TR $\alpha$ 0/0、TR $\beta$ -/-を用いてマウスで検討した。

甲状腺機能低下マウスでは、どの群でも5'-DI mRNAは殆ど検出されなかった。T3投与による増加はTR $\alpha$ 0/0の方がWTに比し大きかった。またTR $\beta$ -/-ではT3による増加はWTより低かった。同様の結果は、spot 14、

ME mRNAの発現でも認められた。

肝臓におけるT3結合能を検討すると、WTマウスの144 fmol/100 mg DNAに対し、TR $\alpha$ 0/0では66%に、TR $\beta$ -/-では21%に減少していた。従って、TR $\alpha$ 0/0の肝臓におけるT3に対する感受性の亢進は、TRの代償性の増加によらないことが示唆された。

### 3. TR $\alpha$ 0/0、TR $\beta$ -/-マウスの心臓に対するTHの作用

TR $\alpha$ 0/0マウスの心拍数は358 ± 22 beats/minで、WTマウスの470 ± 6 beats/minに比し、有意に低値であった。この心拍数の減少は、これまで報告されているTR $\alpha$ 1のみ発現を阻止したマウスと同様であった。一方、TR $\beta$ -/-ではWTマウスに比し、522 ± 8 beats/minと有意に心拍数が上昇していた。心臓で発現するTRが主として $\alpha$ 型であることより、TR $\beta$ -/-においては上昇したTHがTR $\alpha$ を介して心拍数の増加をもたらしたと考えられる。

甲状腺機能低下にするとWT、TR $\beta$ -/-共に心拍数は有意に減少したが、TR $\alpha$ 0/0マウスではこの低下は認められなかった。

心臓のsarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) mRNAは、甲状腺機能低下マウスにT3を投与すると、WT、TR $\beta$ -/-では有意の増加を認めたが、TR $\alpha$ 0/0マウスではこの増加が認められなかった。MHC $\alpha$  mRNAもWT、TR $\beta$ -/-で共に有意の増加が認められたが、TR $\alpha$ 0/0では増加しなかった。

### D. 考 察

THは、核内受容体、TR $\alpha$ 1、TR $\beta$ 1、TR $\beta$ 2と結合し、標的遺伝子の発現を調節することにより作用を発揮する。本研究では、TR $\alpha$ 遺伝子に

由来するアイソフォームの全てを発現しないノックアウトマウスを用いることによりTR $\alpha$ アイソフォームの機能を検討した。

TR $\alpha$ 1欠損マウス (TR $\alpha$ 2は発現している) と同様、TR $\alpha$ 0/0マウスにおいても血中T4の低下が認められた。しかしながら、TR $\alpha$ 1欠損マウスではTSH濃度の上昇が認められるにも関わらず、TR $\alpha$ 0/0マウスではこの上昇が認められず、このマウスにおけるTHに対する感受性の亢進が示唆された。更に、TR $\alpha$ 0/0マウスの方がWTマウスより低用量のT3で血中T4を低下させること、TRHに対するTSHの反応のT3による抑制がTR $\alpha$ 0/0マウスの方がWTに比し顕著であることが示された。

肝臓においてもTR $\alpha$ 0/0マウスの方がWTよりTHに対する感受性が高いことが示された。肝臓の湿重量のT3による減少はグリコーゲンの減少を反映するとされているが、甲状腺機能低下マウスにT3を投与すると、湿重量の減少はTR $\alpha$ 0/0群の方がWT群よりも有意に大きかった。THは肝臓のLDL (low-density lipoprotein) 受容体およびcholesterol 7- $\alpha$  hydroxylase 遺伝子の発現促進を介し、血中のコレステロールを低下させることが知られている。甲状腺機能低下マウスにT3を投与した際のコレステロールの低下もTR $\alpha$ 0/0マウスの方がWTより大きかった。また、5'-DI、spot 14、ME mRNAのT3による増加もTR $\alpha$ 0/0マウスで大きかった。

下垂体、肝臓では主としてTR $\beta$ が発現していることが知られている。TR $\alpha$ 2ならびにDa1、Da2は、in vitroのトランスフェクションを用いた研究でドミナントネガティブ作用を示すことが知られ、TR $\alpha$ 0/0マウスにおいてTR $\beta$ を主として発現する下垂体、肝臓でTHに対する感受性の亢進が示され、この亢進がTR $\beta$ の代償性

の増加によらないことが示された。従って、TH非結合型のTR $\alpha$ アイソフォームの発現が阻止されると、THに対する感受性が増大すると考えられ、in vivoでもin vitroとこれらのアイソフォームがドミナントネガティブ作用を発揮していることが示唆された。

一方、心臓は主としてTR $\alpha$ 遺伝子が発現しているため、TR $\alpha$ 0/0ではTHに対する応答性が減弱していたと考えられた。

## E. 結 論

TR $\alpha$ 0/0マウスを用い、TH非結合型のTR $\alpha$ アイソフォームがin vivoでドミナントネガティブ作用を発揮することが示された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

T Nagaya, M Fujieda, G Otsuka, J-P Yang, T Okamoto, H Seo. A Potential role of activated NF- $\kappa$ B in the pathogenesis of euthyroid sick syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 106(3), 393-402, 2000.

A Iseki, K Kambe, H Seo. Regulation of thyroid follicular cell function by intra-cellular redox-active copper. *Endocrinology* 141, 4373-4382, 2000.

S Futaki, Y Takagishi, Y Hayashi, S Ohmori, Y Kanou, M Inouye, S Oda, H Seo, Y Murata. Identification of a novel myosin-Va mutation in an ataxic mutant rat, dilute-opisthotonus. *Mammalian Genome*, 11, 649-655, 2000.

A Iseki, F Kambe, H Seo. Pyrrolidine

dithiocarbamate inhibits TNF- $\alpha$ -dependent activation of NF- $\kappa$ B by increasing intracellular copper level in human aortic smooth muscle cells. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 276, 88-92, 2000.

PE Macchia, Y Takeuchi, T Kawai, K Cua, O Chassande, H Seo, Y Hayashi, J Samarut, Y Murata, R Weiss, S Refetoff. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 98, 349-354, 2001.

林 良敬, 妹尾久雄. 甲状腺ホルモンレセプターの生理機能—甲状腺ホルモン不応症とノックアウトマウス. *実験医学*18 (2), 197-202, 2000.

長屋 敬, 妹尾久雄. レチノイドX受容体 (RXR) の蛋白分解による甲状腺ホルモン作用の修飾. *ホルモンと臨床* 48 (3), 31-39, 2000.

### 2. 学会発表

M Rogatcheva, Y Hayashi, H Seo, S Oda, M Murakami, Y Murata. Cloning of the cDNA for an T3-insensitive type I deiodinase in the house musk shrew (*Suncus murinus*, insectivora: Soricidae). 7th International Symposium on Molecular Thyroidology, 2000.

D Sarkar, 神部福司, 大森幸子, 妹尾久雄. Identification of E16/CD98LC /hLAT1 as a 2, 3, 7, 8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin (TCDD)-responsive gene by cDNA representational difference analysis (RDA). 第73回日本内分泌学会, 2000.

武内陽子, 河合智子, 林 良敬, 妹尾久雄, REFETOFF S, SAMARUT J, 村田善晴. 変異甲状腺ホルモン受容体(TR) bを導入したTR $\alpha$ お

よびTRbのノックアウトマウス(KO)肝におけるT3作用. 変異TRaはin vivoにおいてTRa、TRb双方に対しドミナントネガティブ(DN)作用を示すか? 第73回日本内分泌学会, 2000.

長屋 敬, 藤條美幸, 妹尾久雄. 骨格筋細胞株におけるT3およびTroglitazone依存性の脱共

役蛋白発現増加のTNF $\alpha$ による抑制. 第73回日本内分泌学会, 2000.

柴田有宏, 林 良敬, 大森幸子, 今井常夫, 船橋啓臣, 妹尾久雄. 乳癌患者におけるAIB1遺伝子のpoly-Qの多型性の検討. 第73回日本内分泌学会, 2000.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

核内受容体コアクチベーター-p120 $\beta$ の臨床的意義

分担研究者 森 昌朋 群馬大学医学部第一内科 教授

研究要旨

核内ホルモンレセプターコアクチベーター-p120にスプライシングバリエーションが存在し、それがアンドロゲンレセプター特異的なコアクチベーターとして機能し前立腺疾患で発現比が変化することが判明した。

A. 研究目的

核内ホルモン受容体による遺伝子制御機構と疾患との関連が研究され臨床応用がなされている。PPAR $\gamma$ のリガンドが糖尿病治療薬、PPAR $\alpha$ のリガンドが高脂血症治療として使用され、またホルモン受容体転写機構に重要なヒストンのアセチル化、脱アセチル化と各種癌との関連が解明されつつある。我々は甲状腺ホルモン受容体を用いてそのコアクチベーターであるp120 $\alpha$ をクローニングし解析してきた。p120にはスプライシングバリエーション (p120 $\beta$ )が存在しており、その発現比率が組織により異なっている。またp120 $\alpha$ は甲状腺ホルモンレセプター、RXR、RAR、PPAR $\gamma$ 等に作用するがp120 $\beta$ はアンドロゲンレセプター特異的に作用するコアクチベーターであることが判明した。そこでp120 $\alpha$ 、 $\beta$ と各種疾患（特にアンドロゲン依存性の疾患）との関連を解析することを目的とした。本研究により核内ホルモン受容体の遺伝子制御機構と疾患との関連が解明され、コアクチベーターの異常に基づく新たな疾患概念が確立することが期待される。

B. 研究方法

p120 $\alpha$ と $\beta$ を同時に検出できる特異的なプライマーを用いて RT-PCR法を用いて正常組織における発現を検討する。

p120 $\alpha$ と $\beta$ の機能を細胞内遺伝子導入法により検討する。

p120 $\alpha$ と $\beta$ の発現を前立腺肥大、前立腺癌において検討する。

C. 研究結果

1. p120 $\alpha$ と $\beta$ は幅広い組織に発現しているが、その比率は異なる。RT-PCR法を用いて正常組織を検討すると心筋、骨格筋、平滑筋、肝、下垂体においては $\alpha$ の発現が優位であるが、前立腺においては $\beta$ の発現が優位であった。
2. p120 $\beta$ は甲状腺ホルモンレセプター、RXRと結合するLXXLL配列を欠損しており、これらの受容体にはコアクチベーターとして機能しなかった。しかし、アンドロゲンレセプターに対しては $\alpha$ と $\beta$ は同等の機能を有しており、p120 $\beta$ はアンドロゲンレセプターに特異的なコアクチベーターであることが判



明した。

3. 前立腺肥大症の組織においては $\alpha$ と $\beta$ の発現比率は正常前立腺と同様 $\beta$ が優位であった。しかし培養前立腺癌PC-3細胞（アンドロゲン抵抗性癌細胞）においては正常前立腺と異なり、 $\alpha$ の発現が優位であった。

#### D. 考 察

転写因子が疾患の病態にどのように関係しているか詳細は不明である。今回、アンドロゲン特異的なコアクチベーターp120 $\beta$ が前立腺癌のアンドロゲン抵抗性と関連することが考えられ、この機構を解明することによりp120が新たな前立腺癌の予後マーカーになり臨床に利用できる可能性が示唆された。

#### E. 結 論

核内レセプターコアクチベーターp120 $\beta$ はアンドロゲン受容体特異的に機能し、前立腺癌において発現が変化する。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

2000年度はなし。

##### 2. 学会発表

門伝 剛、細谷 剛、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋 核内レセプターコアクチベーターの構造、機能による新たな分類 第73回日本内分泌学会シンポジウム2000年6月16日。

細谷 剛、門伝 剛、小澤厚志、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋 核内レセプターコアクチベーターp120 $\alpha$ 、 $\beta$ のアンドロゲン不応性前立腺癌における作用の解析 第73回日本内分泌学会2000年6月16日。

T Monden, M Kishi, T Hosoya, T Satoh, M Yamada, M Mori Cloning and characterization of a novel nuclear receptor coactivating protein p23. 第12回国際甲状腺学会2000年10月26日。

T Hosoya, T Monden, S Ishii, A Ozawa, T Ishizuka, S Konaka, M Yamada, M Mori A novel splicing variant of the nuclear receptor coactivator p120 functions as a specific coactivator for androgen receptor. 第11回国際内分泌会議 2000年11月2日。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

バセドウ病眼症の成因の研究：  
甲状腺と外眼筋の共通蛋白myocilinについて

分担研究者 紫芝 良昌 虎の門病院分院長  
研究協力者 小澤 安則（虎の門病院内分泌代謝科部長）、  
竹下 章（同医員）、田口 学（同医員）

**研究要旨**

バセドウ病眼症の成因研究のため、抗原となりうる外眼筋と甲状腺の共通蛋白として新たな甲状腺蛋白myocilinを同定したが、この蛋白の生理的意義を明らかにするために、mRNA レベルで検討するとともに蛋白としての動きをpolyclonal antibodyを作成して免疫化学的に検討した。甲状腺では濾胞細胞細胞質内に存在した。甲状腺の機能を変動（刺激、抑制など）させmyocilinの変動を検討したところ、この蛋白は細胞外への蛋白輸送に関与していることを示唆する結果を得た。

**A. 研究目的**

バセドウ病眼症で外眼筋が障害の標的となる機序を解明するために、我々は甲状腺と筋肉の共通蛋白に注目している。バセドウ病の患者血清中にWestern blottingで存在が証明される56K蛋白の本態を検討中に網膜や筋に存在が知られていたmyocilinが甲状腺に豊富に存在することを我々は見いだした。そしてこの蛋白に対する自己抗体がバセドウ病患者の一部に存在することを見いだしてきた。myocilinの生理的な作用は全くわかっていないのでその解析を行った。

**B. 研究方法**

(1) われわれがcloningしたラットのmyocilin、ヒトのmyocilinのsequenceを元にGST-myocilin-Hisを大腸菌で作製し、家兎に免疫しpolyclonal抗体を作り出すことに成功した。

この抗体を用いて蛋白としての存在を免疫抗体法で各種組織にて検討した。細胞内局在についても検討した。

- (2) 甲状腺での細胞のbehaviorやTSH刺激などでmyocilinがmRNAレベルで、また蛋白レベルでいかなる変動を示すかin vivoで検討した。mRNAレベルはNorthern blottingおよびTaqman法にて、また蛋白は免疫組織化学的手法で検討した。
- (3) 甲状腺myocilinのsizeを上記の抗体を用いて検討した。

**C. 研究結果**

(1) 免疫組織化学的手法で検討した結果、甲状腺濾胞細胞内に豊富に存在することが判明した。主な局在部位は細胞質内である。さらに甲状腺濾胞のみならず他の内分泌細胞（C細胞など）にもmyocilinが存在することが判明

した。

- (2) TSH刺激を行ったラット甲状腺では myocilinがmRNAレベルでは大きな変動はなかったが、免疫化学法では濾胞腔も陽性となる所見が得られた。PTU投与でホルモン合成を阻害した状態では細胞内への貯留が見られた。
- (3) 甲状腺myocilinの大きさを上記の抗体を用いてsizeを検討したところ56K蛋白以外に80-90Kの大きな陽性蛋白が存在することが判明した。筋でも同様であった。

#### D. 考 察

免疫組織化学においてもmyocilinが甲状腺、筋に存在することが明らかとなった。甲状腺のホルモン合成を刺激する系と抑制した系でmyocilinの局在が異なったことは、この蛋白が甲状腺のホルモンの合成に関わることを示している。甲状腺はサイログロブリンを合成し濾胞腔に分泌するが、この系に関与する可能性が高いと我々は考えている。また分子量がcDNAから想定されるよりも、またreticulocyte lysate systemで作成した蛋白よりも大きいものが存在したことは、myocilinがさらに化学的修飾を受けているか、または他の蛋白と会合している可能性を示唆するものと考えている。また他の内分泌細胞における検討も必要である。

#### E. 結 論

myocilinは甲状腺での検討では、細胞質内に存在し、その機能はpeptideホルモンなどの蛋白を細胞外へ輸送する機序に関与することが考えられる。外眼筋をはじめ筋での作用については今のところ全くわからないが、甲状腺と共通の機序があるものと推定する。網膜、筋以外で

は甲状腺に特異的に発現している蛋白と考えていたが、その他の一部の内分泌細胞にも発現するものがあることが明かとなった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

M.Taguchi, H. Kanno, R. Kubota, S. Miwa, Y. Shishiba, Y. Ozawa. Molecular cloning of rat myocilin and its expression profile. *Molecular Genetics and Metabolism*, 70: 75-80, 2000.

A. Takeshita, Y. Ozawa, W.W.Chin. Nuclear Receptor coactivators facilitate vitamin D receptor homodimer action on direct repeat hormone response elements. *Endocrinology*, 141, 1281-1284, 2000.

A. Takeshita, N. Koibuchi, J. Oka, M. Taguchi, Y. Shishiba, and Y. Ozawa. Bisphenol-A, an Environmental Estrogen, Activates the Human Orphan Nuclear Receptor SXR/PXR-mediated transcription. *European Journal of endocrinology*, submitted.

##### 2. 学会発表

A.Takeshita, Y. Shisiba, Y. Ozawa. Class II transactivator acts as a coactivator of thyroid hormone receptor. The American Endocrine Society's 82nd Annual Meeting. June 21-24, 2000.

竹下 彰、紫芝良昌、小澤安則 CIITAによる甲状腺ホルモン受容体 (TR) のコアクティベーター作用 第73回 日本内分泌学会学術総会 June 16-18, 2000.

A. Takeshita, Y. Shishiba, Y. Ozawa. Nuclear receptor coactivators in thyroid hormone action 12th international thyroid congress. Oct 22-27, 2000.

A. Takeshita, M. Taguchi, Y. Shishiba, and Y.

Ozawa. Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear hormone receptor SXR/PXR-mediated transcription. 第3回日本内分泌攪乱化学物質学会 研究発表会 Dec 15-16, 2000.