

核内レセプターコアクチベーターp120 α 、 β の前立腺癌のアンドロゲン感受性への応用

細谷 剛、門伝 剛、小澤厚志、佐藤哲郎、山田正信、深堀能立、山中英寿、森 昌朋

第74回日本内分泌学会学術総会

CorepressorによるTRH遺伝子プロモーターのTR/RARによるリガンド非依存性転写活性化の増強機構の解析

佐藤哲郎、石塚高広、登丸琢也、門伝 剛、橋本貢士、山田正信、森 昌朋

第74回日本内分泌学会学術総会

新たな核内受容体コアクチベーターp23の機構解析

門伝 剛、岸 美紀子、細谷 剛、石塚高広、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

第74回日本内分泌学会学術総会

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 活性化はgrowth arrest and DNA damage inducible (GADD)153遺伝子発現を誘導し、ヒト非小細胞肺癌のアポトーシスを惹起する

登丸琢也、佐藤哲郎、山田正信、宮本 薫、森 昌朋

第74回日本内分泌学会学術総会

甲状腺ホルモンによる下垂体TSHへのネガティブフィードバック機構におけるTRHの解析III

山田正信、橋田 哲、小澤厚志、石井角保、門伝 剛、佐藤哲郎、森 昌朋

第74回日本内分泌学会学術総会

Uncoupling protein (UCP)2遺伝子のPPAR γ による転写調節機構の解析

石井角保、山田正信、橋田 哲、小澤厚志、門

伝 剛、佐藤哲郎、森 昌朋

第74回日本内分泌学会学術総会

変異甲状腺ホルモン受容体遺伝子導入マウスの解析によって得られた甲状腺ホルモン作用の新たな知見

橋本貢士、山田正信、森 昌朋、Wondisford FE

第74回日本内分泌学会学術総会

Cloning and characterization of a novel transcriptional coactivator specific for the thyroid hormone receptor that binds to the DNA-binding domain. Ishizuka T, Satoh T, Ishii S, Ozawa A, Hosoya T, Monden T, Yamada M, Mori M

11th International Congress of Endocrinology

A novel splicing variant of the nuclear receptor coactivator p120 function as a specific coactivator for androgen receptor. Hosoya T, Monden T, Ishii S, Ozawa A, Ishizuka T, Konaka S, Yamada M, Mori M

11th International Congress of Endocrinology

Multiple corepressors differentially modulate the ligand-independent stimulation of the mouse thyrotropin-releasing hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid receptors. Satoh T, Ishizuka T, Monden T, Ozawa A, Hosoya T, Ishii S, Yamada M, Mori M

11th International Congress of Endocrinology

TRH遺伝子の転写開始点下流領域に結合する核蛋白の解析

佐藤哲郎、登丸琢也、石塚高広、橋本貢士、門
伝 剛、山田正信、森 昌朋
第44回日本甲状腺学会

寒冷環境下におけるTRHの重要性：TRHノッ
クアウトマウスの解析
小澤厚志、山田正信、橋田哲、橋本貢士、門伝
剛、佐藤哲郎、山田正信
第44回日本甲状腺学会

妊娠中の母体甲状腺機能異常が生後の児に及ぼ
す影響
橋田 哲、山田正信、石井角保、小澤厚志、門
伝 剛、佐藤哲郎、森 昌朋
第44回日本甲状腺学会

甲状腺ホルモンレセプター $\beta 1$ の428番目のロイ
シンは機能及びダイマー形成を規定する
門伝 剛、二瓶康代、細谷 剛、佐藤哲郎、山
田正信、森 昌朋
第44回日本甲状腺学会

甲状腺ホルモン受容体(TR) β ノックインマウス
を用いた甲状腺ホルモン不応症の病態解析（コ
レステロール代謝を中心として）

橋本貢士、山田正信、Wondisford FE、森 昌
朋
第44回日本甲状腺学会

新たな変異甲状腺ホルモン受容体F455Sによる
甲状腺ホルモン不応症の病態生理
石井角保、山田正信、小澤厚志、橋田 哲、橋
本貢士、門伝 剛、佐藤哲郎、鬼形和道、森川
昭廣、森 昌朋
第44回日本甲状腺学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
3. 実用新案登録 なし

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

未分化甲状腺癌における甲状腺特異遺伝子の再発現誘導

分担研究者 女屋敏正 塩山市民病院 名誉院長

共同研究者 志村浩己 遠藤登代志 山梨医科大学第3内科

研究要旨

バセドウ病や分化型甲状腺癌においては放射性ヨード治療が広く行われているが、未分化甲状腺癌においては、ヨード取り込みと有機化に必要なNIS, Tg, TPO遺伝子の発現が消失しており、放射性ヨード治療の効果は期待できず、未だ有効な治療法がない。今回我々は、未分化甲状腺癌細胞においてこれらの甲状腺特異的遺伝子の発現誘導を試みた。まず、これら3者の遺伝子のプロモーターに働く甲状腺特異的転写因子であるTTF-1遺伝子をアデノウイルスベクターを用い導入した結果、TGおよびTPO遺伝子のmRNAおよびタンパク再発現が検出された。一方、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるdepsipeptideを未分化甲状腺癌細胞に加えた結果、Tg、TPO遺伝子のみならず、NIS遺伝子の発現も誘導した。さらにヨード取り込み能の誘導もみられた。以上からTTF-1遺伝子導入ないしはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、甲状腺癌細胞の分化誘導による有機化能の誘導を伴った¹³¹I治療を可能にすることが期待された。

A. 研究目的

甲状腺癌は、非常に頻度が高い悪性腫瘍であるが、その多くは分化癌であり、遠隔転移をきたしても、高い分化度が保たれていれば放射性ヨード治療が可能である。これは、本来の甲状腺にみられるTSHの刺激下においてナトリウム/ヨード輸送体(NIS)を介しヨードを血液中から取り込み、甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)の働きでサイログロブリン(TG)に結合させ、これをもとに甲状腺ホルモンを合成する機構を利用し、¹³¹Iを甲状腺癌に取り込ませ、有機化することで放射線を内照射する治療法である。しかし、遠隔転移をきたした甲状腺癌や、分化度の低い未分化癌においては、これらのNIS、TPO、TGおよびTSH受容体の発現が低下ある

いは消失していることが多く、放射性ヨード治療の効果も得られないことがほとんどであり、そのため、特に甲状腺未分化癌の1年生存率は10%前後と非常に低いのが現状である。

我々は、これまでヒト甲状腺癌より樹立された低分化甲状腺癌培養細胞などを用い、NIS遺伝子導入による実験的放射性ヨード治療を試み、甲状腺癌の治療に対してはヨード取り込みのみでは治療効果が上がらず、放射性ヨード治療を有効なものにするには、TGおよびTPOと一緒に発現させる必要があることを明らかにしてきた。これらの遺伝子のプロモーター領域に結合するいくつかの転写因子のうち、肺と甲状腺のみで発現している転写因子であるthyroid transcription factor-1 (TTF-1) は、これら3種

類すべての甲状腺特異的遺伝子のプロモーターに結合して転写を促進することが判明している。そこで今回我々は、TTF-1遺伝子発現させる非増殖性アデノウイルスベクターを作製し、未分化甲状腺細胞へ感染させ、不活化している内因性のTG, TPO遺伝子の再活性化ができないかどうか検討した。

一方、遺伝子発現は、転写因子によって誘導されてきた転写共役因子の持つヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性によってヒストンがアセチル化されることにより活性化され、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)によってこれが抑制されるが、癌細胞では一般的にHDACの発現が多く、遺伝子発現が不活化されていることが多い。今回我々は、HDAC阻害剤(HDACI)であるDepsipeptideおよびTrichostatin Aによる甲状腺特異的遺伝子の再発現についても検討を加えた。

B. 研究方法

(1) アデノウイルスベクターの作製と感染

E1領域を欠損した5型アデノウイルス遺伝子にrat TTF-1遺伝子とCMVプロモーターを挿入したAdTTF-1と、コントロール用としてLacZ遺伝子を挿入したAdLacZを作製した。これらのアデノウイルスベクターをヒト甲状腺乳頭癌より樹立された細胞株BHP18-21vに各MOIで感染させ、培養後RNAを回収しNorthern blotあるいはRT-PCRによってTg, TPO, NIS遺伝子発現を検討した。

(2) Tg, TPO, NIS, TTF-1 遺伝子発現の検討

各遺伝子のmRNA量は、Northern blotあるいはRT-PCR法によって測定した。タンパク発現は、抗TPOおよび抗Tgモノクローナル抗体を用いた免疫染色によって確認した。

(3) ヨード取り込みおよび有機化の測定

ヨード取り込みの測定は、 $1\mu\text{M NaI}+\text{Na}^{125}\text{I}$ 存在下にて60分培養後、細胞内に取り込まれた ^{125}I による放射活性を測定した。また、ヨード有機化は $1\mu\text{M NaI}+\text{Na}^{125}\text{I}$ 存在下にて60分培養後、トリクロロ酢酸によるタンパク抽出を行い、タンパクに結合した ^{125}I の放射活性を測定した。

C. 研究結果

(1) TTF-1遺伝子導入による甲状腺特異的遺伝子の発現誘導

：BHP18-21v甲状腺癌細胞へのアデノウイルスベクターの感染によるTTF-1遺伝子の導入によって、全く発現のなかったTG、TPO遺伝子の発現誘導がNorthern blotにより観察された。これは100 MOIより認められ、ウイルス濃度依存性に発現量が増加した。また、Tgの発現は感染3日後に最大となり、TPOは5日後に最大に達した。また、モノクローナル抗体を用いた免疫染色により、TG、TPOは細胞内の正しい局在にタンパクが発現していることが判明した。一方、甲状腺以外の臓器由来の培養細胞においては、これらの遺伝子の発現は認められなかった。

(2) HDACIによる甲状腺特異的遺伝子の発現誘導

：甲状腺低分化乳頭癌由来のBHP18-21v、BHP7-13と甲状腺未分化癌由来のARO細胞において、HDACI (Depsipeptide、Trichostatin A) の存在下で培養した結果、TPO、Tg mRNAの発現が濃度依存性に確認された。TPO、Tg mRNAはDepsipeptide 3ng/ml下で72時間後で最大発現を認めた。Depsipeptide 3ng/mlまたはTrichostatin A 300ng/ml存在下で培養したBHP18-21v細胞をTPO、Tgモノクローナル抗体を用いて免

疫染色したところ、TPO蛋白発現が細胞表面に認められ、Tg蛋白発現は細胞質領域に確認された。また、HDACIによってNIS mRNAの発現が誘導され、¹²⁵Iの取り込み能の出現も確認された。さらに、これら発現誘導された3者のタンパクにより、ヨードの有機化（タンパクとヨードの結合）を検討したところ、HDACIの濃度依存性に放射性ヨードの細胞内タンパクへの結合の増加が認められた。また、これらの遺伝子発現の機序を解析するため、転写因子の発現を検討したところ、BHP18-21vおよびARO細胞においてTTF-1 mRNAの発現誘導が確認された。一方、他の甲状腺特異的転写因子であるPax-8については、既に発現しているBHP18-21v細胞ではHDACIはmRNA量に影響を与えず、発現が消失しているARO細胞ではHDACIによるmRNA発現誘導は認められなかった。

D. 考 察

通常、分化型甲状腺癌では、TSHによる刺激によりNIS、Tg、TPO遺伝子の発現が増加し、この作用を利用して、分化癌の転移病巣に対しTSH刺激を与えた後、放射性ヨード治療を行う。しかし、未分化甲状腺癌においては、これらの遺伝子の発現が消失しており、これらの遺伝子発現を調節している転写因子の発現も消失していることが多い。今回我々は、初めてこの転写因子の一つであるTTF-1遺伝子をアデノウイルスに組み込んだベクターを作製し、遺伝子導入した結果、不活性化されていたTgおよびTPO遺伝子を活性化し、mRNAおよびタンパクを発現させることに成功した。これは、NIS遺伝子導入と組み合わせることにより、未分化甲状腺癌において放射性ヨードの集積と有機化

を誘導することが可能であることを示唆しており、新たな治療法の開発につながると期待できる。また、TTF-1遺伝子導入のNIS遺伝子に対する作用については現在検討中である。

一方我々は、HDACIによって3者の甲状腺特異遺伝子(TPO、Tg、NIS)を同時に発現誘導させることに成功した。さらに、ヨード取り込み能と有機化能の誘導も確認できたことから、HDACIも未分化甲状腺癌の治療に非常に有用であることが示唆された。

HDACIの分化誘導効果の機序としては、ストン脱アセチル化の阻害による各プロモーターの不活化の阻害に加え、TTF-1の発現誘導が関与していることが考えられた。これに加え、アデノウイルスベクターによるTTF-1遺伝子導入がTgおよびTPO遺伝子の発現を誘導しことから、これらの甲状腺特異的遺伝子の内因性（染色体）遺伝子からの発現には、TTF-1が非常に重要な役割を果たしていると考えられた。

E. 結 論

TTF-1遺伝子導入ないしはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は、未甲状腺癌細胞において甲状腺特異的遺伝子の発現を誘導し、ヨード有機化を伴った¹³¹I治療を可能にすることが期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimura H, Suzuki H, Miyazaki A, Furuya F, Ohta K, Haraguchi K, Endo T, Onaya T:: Transcriptional activation of the thyroglobulin promoter directing suicide gene expression by thyroid transcription factor-1 in thyroid cancer cells. *Cancer*

Res 61: 3640-3646, 2001.

2. Ohta K, Endo T, Haraguchi K, Hershman JM, Onaya T: Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2170-2177, 2001.
 3. Kang HC, Ohmori M, Harii N, Endo T, Onaya T: Pax-8 is essential for regulation of the thyroglobulin gene by transforming growth factor-beta1. *Endocrinology* 142: 267-275, 2001.
 4. Kogai T, Hershman JM, Motomura K, Endo T, Onaya T, Brent GA: Differential regulation of the human sodium/iodide symporter gene promoter in papillary thyroid carcinoma cell lines and normal thyroid cells. *Endocrinology* 142: 3369-3379, 2001.
2. 学会発表
1. Shimura H, Furuya F, Suzuki H, Miyazaki A, Ohta K, Haraguchi K, Endo T, Onaya T: Transcriptional activation of the thyroglobulin promoter directing suicide gene expression by thyroid transcription factor-1 in thyroid cancer cells. The 7th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, Tokyo, Japan, 2001 (Program and Abstracts p119, 2001).
 2. Furuya F, Shimura H, Suzuki H, Miyazaki A, Endo T, Onaya T: Adenovirus-mediated transfer of the TTF-1 gene restores differentiation of human thyroid carcinoma. 73rd Annual Meeting of the American Thyroid Association, Washington DC, USA, 2001 (Program and Abstract p205, 2001).
 3. Suzuki H, Shimura H, Furuya F, Miyazaki A, Haraguchi K, Endo T, Onaya T: Adenovirus-mediated TTF-1 gene transfer induces cell death in thyroid cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice. 73rd Annual Meeting of the American Thyroid Association, Washington DC, USA, 2001 (Program and Abstract p207, 2001).
 4. Furuya F, Shimura H, Haraguchi K, Onaya, Endo T, Kobayashi T: Histone deacetylase inhibitors restore radioiodide uptake and retention in poorly differentiated thyroid cancer cells by expression of the sodium/iodide symporter, thyroperoxidase and thyroglobulin. The 9th International Symposium on Molecular Thyroidology, Tottori, Japan, 2002.
 5. Ohta K, Endo T, Onaya T: Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit the growth of thyroid carcinoma cells by induction of cyclin dependent kinase inhibitor. The 8th International Symposium on Molecular Thyroidology, Tokyo, Japan, 2001.
 6. Ohmori M, Endo T, Onaya T: Regulation of Na⁺/I⁻ symportner gene expression. The 8th International Symposium on Molecular Thyroidology, Tokyo, Japan, 2001.
 7. 志村浩己, 鈴木英世, 古屋文彦, 原口和貴, 遠藤登代志, 女屋敏正: アデノウイルスベ

- クターを用いたTTF-1遺伝子導入による甲状腺癌細胞死誘導効果, 第74回日本内分泌学会総会, 2001 (日本内分泌学会雑誌 77: p117, 2001) .
8. 中里稔, 遠藤登代志, 女屋敏正: 組織非特異的転写因子nuclear factor I (NFI)と甲状腺特異的転写因子TTF-1およびPax-8の相互作用によるTTF-1遺伝子の発現調節機構, 第74回日本内分泌学会総会, 2001 (日本内分泌学会雑誌 77: p130, 2001) .
 9. 太田一保, 遠藤登代志, 女屋敏正: PPAR γ agonist によるヒト甲状腺癌細胞の増殖抑制と cyclindependent kinase(CDK) inhibitorの発現増加, 第74回日本内分泌学会総会, 2001 (日本内分泌学会雑誌 77: p119, 2001) .
 10. 池田真人, 温井郁夫, 遠藤登代志, 女屋敏正: NF-1を介する甲状腺ホルモン受容体(TR)による, T3依存性転写活性抑制作用, 第74回日本内分泌学会総会, 2001 (日本内分泌学会雑誌 77: p90, 2001) .
 11. 志村浩己, 鈴木英世, 古屋文彦, 原口和貴, 遠藤登代志, 女屋敏正: TTF-1遺伝子導入による実験的甲状腺癌の腫瘍増大抑制効果, 第44回日本甲状腺学会, 沖縄, 2001 (日本内分泌学会雑誌 77: p246, 2001) .
 12. 古屋文彦, 志村浩己, 鈴木英世, 原口和貴, 遠藤登代志, 女屋敏正: アデノウイルスベクターを用いたTTF-1遺伝子導入による低分化甲状腺癌における分化誘導効果, 第44回日本甲状腺学会, 沖縄, 2001 (日本内分泌学会雑誌 77: p245, 2001) .
 13. 池田真人, 温井郁夫, 遠藤登代志, 女屋敏正: NF-1を介する甲状腺ホルモン受容体(TR)による, T3依存性転写抑制の分子メカニズム, 第44回日本甲状腺学会, 沖縄, 2001 (日本内分泌学会雑誌 77: p259, 2001) .
 14. 温井郁夫, 池田真人, 滝克己, 遠藤登代志, 女屋敏正: ヒトIL-6遺伝子のプロモーター領域における甲状腺ホルモン応答配列の同定, 第44回日本甲状腺学会, 沖縄, 2001 (日本内分泌学会雑誌 77: p259, 2001) .
 15. 古屋文彦, 志村浩己, 原口和貴, 女屋敏正, 遠藤登代志, 小林哲郎: 低分化甲状腺癌細胞における, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による甲状腺特異的転写因子(TTF-1)及び甲状腺特異遺伝子(TPO, Tg, NIS)の再発現, 第18回甲状腺病態生理研究会, 東京, 2002.

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

外眼筋と甲状腺の共通蛋白myocilinの甲状腺内局在とその変化

分担研究者 紫芝良昌 三宿病院院長

研究要旨

myocilin mRNAが網膜、骨格筋以外に甲状腺にも豊富に存在することを見いだしてきたが、myocilin蛋白の甲状腺内での局在と、甲状腺刺激や阻害物質による変動を検討した。抗myocilin抗体を作成しラット甲状腺でのmyocilin免疫染色を行い、その存在と動態を観察した。myocilinは濾胞細胞細胞質内にあり、TSHによる刺激、PTUによる細胞増殖刺激と甲状腺機能抑制、T3による甲状腺機能抑制、増殖抑制により細胞内外の分布が大きく変動した。細胞膜を通過、移動する蛋白と考えられる。また、ラット外眼筋に蛋白として存在することもみだし、外眼筋・甲状腺の共通蛋白であることを証明した。バセドウ病眼症での病因的関与をさらに明らかにする必要がある。

A. 研究目的

我々は網膜や筋にその存在が証明されていたmyocilin mRNAが甲状腺にも豊富に存在することを発見した。外眼筋と甲状腺の共通蛋白であると考えられ、またこれまでバセドウ病眼症で知られていた自己抗体の抗原56k蛋白とも大きさが一致することなどから、バセドウ病眼症の成因からみて重要な蛋白である可能性が高いと考え研究を続けている。今年度は蛋白レベルで甲状腺内での存在を証明し、さらに細胞内の局在と各種マニュレーションによる変動から甲状腺でのmyocilinの機能を解析する手がかりを得ることを試みた。また外眼筋での存在様式についても検討した。

B. 研究方法

myocilin に対する抗体を家兎で作成した。抗原はE. coliで作ったGST-myocilin-His を用い

た。免疫染色に充分用いられる抗体の作成に成功した。これを用いてラット甲状腺切片で免疫染色を行った。In vivoでのTSH（3日間皮下投与、PTU（14日経口）、T3（3日間皮下）投与の影響をラット甲状腺で検討した。

C. 研究結果

1) 正常ラット甲状腺ではmyocilinは濾胞細胞の細胞質内に陽性を示した。細胞内に一様に存在するのではなく、部位によっては細胞質内の一部に限局した。2) PTU投与ラットの甲状腺では大きく腫大した濾胞細胞の細胞質全体に陽性を示した。3) TSH刺激を行ったラット甲状腺では濾胞腔内に陽性所見が見られた。4) T3投与により全体の陽性所見が低下した。5) ラット眼球及び眼窩組織の免疫染色も行ったが、眼球では網膜、trabecular meshworkなどに陽性所見が見られた。外眼筋が強く陽性であった。

外眼筋と甲状腺の共通蛋白であることが蛋白レベルでも明かとなった。

D. 考 察

56 k dalton蛋白myocilinが網膜や骨格筋以外に、甲状腺にも特異的に発現していることを蛋白レベルではじめて証明した。myocilinはそのmutationがopen angle glaucomaに関連する事が知られている。この蛋白の機能については不明ではあるが、trabecular mesh workでの研究で物質の分泌に関連することが推定されている。網膜、筋、甲状腺における機能については全く不明であったが、本研究でmyocilinの局在が濾胞細胞質内であり、条件によれば細胞外にも移動することが明らかとなった。甲状腺濾胞細胞の細胞膜の内側から外側への物質の分泌に関与する蛋白である可能性が強いと考えられる。

外眼筋にも強くmyocilin蛋白が免疫染色で証明されたことは、バセドウ病眼症の外眼筋障害と甲状腺とを結びつける重要な共通蛋白である可能性をあらためて示している。myocilinの外眼筋での機能、甲状腺での機能、その障害をもたらす結果、その抗原性についてさらに検討を進める必要がある。

E. 結 論

myocilinは外眼筋と甲状腺に共通に特異的に発現している蛋白で、甲状腺濾胞細胞内では細胞質内に存在し、刺激によって細胞外に移動することが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Manabu Taguchi, Hitoshi Kanno, Ryo Kubota, Shiro Miwa, Yoshimasa Shishiba, Yasunori Ozawa. Molecular cloning of rat myocilin and its expression profile. *Molecular Genetics and Metabolism*, submitted
- 2) Manabu Taguchi, Hitoshi Kanno, Ryo Kubota, Shiro Miwa, Yoshimasa Shishiba, Yasunori Ozawa. Molecular cloning of cDNA for rat myocilin. DDBJ/EMBL/GenBank. AB019393

G. 知的所有権の取得状況

特になし

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

病変部線維芽細胞を標的としたバセドウ病眼症治療の基礎的検討

分担研究者 對馬 敏夫 東京女子医科大学第二内科 教授
共同研究者 磯崎 収、宮川めぐみ、高野加寿恵、井上洋一*
東京女子医科大学第二内科、 *オリンピック眼科病院

研究要旨

バセドウ病眼症患者の後眼窩組織より樹立した培養線維芽細胞(GOF)はTSH受容体を発現すると共にglycosaminoglycan(GAG)の産生や脂肪細胞分化する能力を有し、バセドウ病眼症の発症や進展に深く関与すると考えられてきた。また、近年バセドウ病眼症に対してOctreotide(OT)の有効性が少数例について散発的に報告されているが、その作用機構は定かでないためGOFに対する作用について検討を行った。GOFはOTに対して高親和性を有する、somatostatin受容体のtype 2およびtype 3を発現しておりOTは10%ウシ胎児血清によるDNA合成およびForskolinによるcyclic AMP産生を抑制することが判明した。しかしながら高濃度のTSHによるDNA合成およびcyclic AMP産生反応は抑制しなかった。高濃度のTSHの作用がTSH受容体のみを介するかは不明であるがOTはIGF-I系による情報伝達系を介してGOFの細胞増殖を抑制し、cyclic AMPを介する系を抑制してGAGの産生を抑制する可能性が示唆された。また、OTは病変部浮腫の増悪因子である血管透過性/新生因子(VPF/VEGF)の遺伝子発現を抑制した。このようなOTの作用はSSTR2を介する細胞周期の進行抑制作用と考えられたが、臨床的には急速に眼窩内容積を減少させる作用を有することよりSSTR3を介するアポトーシス誘導作用についても今後の検討を要する。

A. 研究目的

悪性のバセドウ病眼症は希ではあるが時として急速に進行し、治療に抵抗性を示し、失明にいたる症例も存在し、臨床的にはバセドウ病の治療における最も重要課題の一つである。本邦ではステロイドおよび放射線照射または手術療法が一般に用いられているが、年々増加している糖尿病を伴う高齢者等ではステロイド以外の有効な治療法の確立が望まれている。このような中でOctreotide (OT)について散発的な少数例についての検討では有効性が示唆されている。

しかし、その作用機構についてはT細胞よりのサイトカインの放出を抑制するという報告があるのみで、ほとんど解明されていない。眼症に対するOTの有効性を確立するためにはその作用機構を明らかにする必要がある。私達は現在までにバセドウ病眼症の病変部の線維芽細胞が各種のサイトカインとTSH受容体刺激のクロストークの場であることを報告し、GOFがバセドウ病眼症の発症に大きな役割を果たしていることを示唆してきた、今回GOFに対するOT作用を明らかにし、眼症治療の新しい戦略を提唱する。

B. 研究方法

バセドウ病眼症(GO)の手術において、病変部の切除または病変部へのアプローチのため切除された組織のうち病理検査にて不要になったものを患者および主治医の承諾のもとに使用した。一部の組織より既報の方法を用いて線維芽細胞の培養を行った。線維芽細胞の培養は10%ウシ胎児血清(FCS)を含むPRMI1740培地で行った。各々の実験の前にFCSの濃度を0.2%に落として使用した。線維芽細胞の増殖に対する影響はDNAへの³H-thymidine 取り込みまたはMTTアッセイにて行った。Cyclic AMP増加反応は培地を0.5mMのIBMXを含むHanks塩類溶液に変えて既報のように行った。mRNAの測定はtotal RNAを抽出後にRT-PCRを行った。その定量はRT-PCR産物をImage analyzerにて測定した。

C. 研究結果

まずはじめにOTがGOFに特異的に作用する可能性を確認するためOTに特異的に結合するsomatostatin受容体のsubtypeの発現をsubtypeに特異的なRT-PCRで測定した。その結果octreotideに高親和性のclass I familyのSS受容体を形成する2型, 3型, 5型のうち2型および3型受容体のmRNAは病変部の組織においてかなり多量に発現していることが判明した。また同様の検討を病変部より培養した線維芽細胞細胞について検討したところ2型受容体mRNAはすべての線維芽細胞で多量に発現していた。3型のmRNA量も線維芽細胞により発現量にバラツキが認められたが発現していることが判明した。これらの結果より手術時に得られた病変部組織およびそれより確立された変部線維芽細胞がOTの標的となり得る可能性が確認された。

次にOTの細胞増殖に対する作用を検討した。OTは10nMの濃度で0.2%胎児牛血清を含む対照細胞のDNA合成には影響を与えなかったが10% FCSにて刺激したGOFのDNA合成を有意に抑制することが判明した。しかし、100mU/mlのTSHにて刺激したDNA合成は抑制を認めなかった。このことはGOFにおける高濃度のTSHの刺激作用は甲状腺細胞とは異なりTSH受容体以外の受容体または通常のシグナル伝達系を介さない可能性も示唆された。

さらに、GOFにおけるcyclic AMP産生反応に対するOTの影響について検討をおこなった。OTの前処置によりforskolin刺激によるcAMP産生は有意に抑制されたが、100 mU/mlのTSHによるcyclic AMP産生反応は抑制されなかった。このことはOTは高濃度のTSH以外の系を介してGOFの細胞増殖やGAG産生を抑制する可能性が示唆された。

次に種々のサイトカインや低酸素により眼症線維芽細胞において発現が認められ病変部の浮腫を増悪する因子の一つである血管透過性/新生因子(VPF/VEGF)の発現に対するOTの影響を検討した。OTの前処置はc-kinaseの活性化剤であるTPAによるVP/EGF mRNAの増加を抑制した。またforskolinによるVP/EGF mRNA増加も抑制したがIGF-IによるmRNA増加に対しては影響を与えなかった。

D. 考 察

バセドウ病眼症病変部の組織および病変部線維芽細胞(GOF)においてはOTに高親和性であるSSTRのsubtype 2 および 3 が発現していた。この結果に合致するようにOTは10%FCSによるGOFの細胞増殖と forskolinによるcAMP産生を抑制し、OTの眼症改善の作用機構の一つは

GOFの機能抑制である可能性が示唆された。しかし、眼症の発症や進展に何らかの役割をばたしていると考えられているGOFのTSH受容体を活性化すると予想される高濃度のTSHによるDNA合成およびcAMP産生を抑制しなかった。この結果はOTがTSH受容体を介する系を抑制できない可能性も示唆するが、高濃度のTSHがTSH受容体以外の系を介して非特異的な作用を及ぼしている可能性もあり、高濃度TSHの作用と意義についてはさらなる検討が必要である。

また、OTは眼症組織における浮腫の増悪因子の一つであるVPF/VEGFの発現を抑制したことはステロイド投与や高圧酸素以外の方法で局所の浮腫とそれに伴う眼窩内圧上昇の改善をもたらすと言う点で有望と考えられる。また、欧米では大腸癌に対しOTが血管新生抑制療法として有効であったと報告されており、VPF/VEGFの産生と活性もOTが抑制することが確認されている。このような作用はSSTRの2型を介する細胞周期進行阻止作用が関与していると考えられている。最近になりバセドウ病の甲状腺外症状の一つである前頸骨粘液水腫に対してOTの局注が有効であったとの報告されている。すなわちステロイドの外用で改善が認められなかった腫瘍形成を伴う粘液水腫がOTによりほぼ完全に消失したとのことで著者らはヒアルロン酸の合成抑制がその作用機序であると考えているが、OTにSSTR3を介してアポトーシスを誘導する作用が報告されているため、アポトーシスを介して腫瘍が消失した可能性がある。このようなアポトーシス誘導作用についてはSSTR3 agonistを用いて更に検討を行う予定である。

E. 結 論

バセドウ病眼症に対するOT療法の作用機構として浸潤Tリンパ球よりのサイトカイン放出抑制が考えられていたがOTが直接に線維芽細胞に作用して細胞増殖、GAGの産生、血管透過性因子の産生を抑制することが判明した。また、OTには急速な病変部体積減少作用を有することが予想されその機構の一つとしてアポトーシスの誘導が示唆された。これらの結果より新たなSSRT3のagonistを用いた治療や局所への注入療法などソマトスタチン誘導体を用いたより有効な眼症治療法の開発が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Severe thyrotoxicosis induced by thyroid metastasis of lung adenocarcinoma: a case report and review of the literature. Miyakawa M, Sato K, Hasegawa M, Nagai A, Sawada T, Tsushima T, Takano K. *Thyroid*. 2001 Sep;11(9):883-8.

Postoperative plasma cortisol levels predict long-term outcome in patients with Cushing's disease and determine which patients should be treated with pituitary irradiation after surgery. Imaki T, Tsushima T, Hizuka N, Odagiri E, Murata Y, Suda T, Takano K. *Endocr J*. 2001 Feb;48(1):53-62.

Effect of growth hormone on lipid metabolism. Tsushima T. *Nippon Rinsho*. 2001 Feb;59 Suppl

2:407-11.

Expression of functional leptin receptor in the thyroid: identification of long form of receptor mRNA and inhibition of iodide uptake and cell proliferation in rat FRTL-5 cells. O Isozaki, Tsushima, Y Nozoe, M Miyakawa and K Takano Submitted to J Endocrinology

Possible involvement of hypoxia in Graves' ophthalmopathy: its regulation on vascular permeability/endothelial growth factor gene expression. O Isozaki, Tsushima, M Miyakawa, Y Nozoe, K Takano and Y Inoue Submitted to Thyroid

抗甲状腺剤の副作用とその発症機構 磯崎 収、加藤慶子、對馬敏夫 内分泌・糖尿病科 12巻(1号)43-49頁 2001年

末端肥大症における甲状腺ヨード取り込み抑制は IGF-Iの甲状腺ヨードトランスポーターの活性と遺伝子発現抑制のためか 磯崎 収 西巻桃子、對馬敏夫、野添康子、宮川めぐみ、加藤慶子、高野加寿恵 ホルモンと臨床 50巻(2号) 65-68 頁、2002

2. 学会発表

IGF-I inhibition of iodide uptake and NIS mRNA expression in the FRTL-5 cells: a possible mechanism for the suppressed thyroidal ^{99m}Tc pertechnatate uptake in the patients with acromegaly ? Osamu Isozaki, Momoko Nishimaki, Toshio Tsushima, Yasuko Nozoe, Keiko Kato, Megumi Miyakawa, &

Kazue Takano 8th International symposium on molecular thyroidology. Program & abstracts p17, 2001.4.7 Tokyo, Japan

The mechanism of the suppressed thyroidal ^{99m}Tc-pertechnetate uptake in the patients with acromegaly: IGF-I inhibition of iodide uptake and NIS mRNA expression in the FRTL-5 cells. Momoko Nishimaki, Osamu Isozaki, Toshio Tsushima, Megumi Miyakawa, Keiko Kato, Kazue Takano Programs & Abstracts p274 83rd annual meeting of endocrine society, Denver, Colorado, USA June 20, 2001

Expression and functions of somatostatin receptors in orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy. O Isozaki, Tsushima, Y. Nozoe, K. Kato, M. Nishimaki, M. Miyakawa, K. Takano and Y. Inoue Programs & Abstracts p117 (Abstract #53). 200173rd Annual meeting of the American thyroid association. 2001.11.7. Washington D.C. U.S.A

Effects of octreotide on the orbital fibroblasts from patients with Graves ophthalmopathy. O. Isozaki, T. Tsushima, Y. Nozoe, K. Kato, M. Nishimaki, M. Miyakawa, K. Takano and Y. Inoue. Program & Abstract p31 The 3rd Korea-China-Japan Thyroid Conference, 2001.10.19, Soul, Korea

Propylthiouracil-induced MPO-ANCA: clinical and immunological analysis in Japanese patients with Graves' disease. Kato K, Isozaki O, Tsushima T, Nozoe Y, Nishimaki M,

Miyakawa M, and Takano K. Program &
Abstract p57 The 3rd Korea-China-Japan
Thyroid Congress, 2001.10.28, Seoul, Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行 年月日	刊行書店名	執筆者氏名
<p>Clin. Endocrinol., 55:789-795. An ultrasensitive assay revealed age-related changes in serum oestradiol at low concentrations in both sexes from infancy to puberty.</p>	<p>2001</p>		<p>Ikegami S, Moriwake T, Tanaka H, Inoue M, Kubo T, Suzuki S, Kanzaki S, and Seino Y.</p>

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行 年月日	刊行書店名	執筆者氏名
AM J REPROD IMMUNOL, 45:100-102. Influence of breast-feeding on the production of cytokines.	2001	Munksgard Copenhagen	Y. Shimaoka, Y. Hidaka, H. Tada, K. Takeoka, Y. Morimoto, N. Amino
CLIN CHIM ACTA, 305:35-40. Screening for primary hyperparathyroidism (PHPT) in clinic patients: Differential diagnosis between PHPT and malignancy- associated hypercalcemia by routine blood tests.	2001	Elsevier Science B.V.	S. J. Kim, E. Shiba, I. Maeda, T. Yoshioka N. Amino, S. Noguchi
AUTOIMMUNITY, 33:265-274. Characteristics of experimental autoimmune hypophysitis in rats: Major antigens are growth hormone, thyrotropin, and luteinizing hormone in this model.	2001	Harwood Academic Publishers	K. Watanabe, H. Tada, Y. Shimaoka, Y. Hidaka, K. Tatsumi, N. Amino
BR J CANCER, 85:102-106. Quantitative measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of patients after total thyroidectomy.	2001	The Macmillan Press Ltd.	T. Takano, A. Miyauchi, H. Yoshida, Y. Hasegawa, K. Kuma, N. Amino
ENDOCR J, 48:143-149. Analysis of the KAL1 gene in 19 Japanese patients with kallmann syndrome.	2001	The Japan Endocrine Society	Y. Izumi, K. Tatsumi, S. Okamoto, T. Ogawa, A. Hosokawa, T. Matsuo, Y. Kato, H. Fukui, N. Amino
JPN J CANCER RES, 92:645-648. Large-scale analysis of mutations in RET exon 16 in sporadic medullary thyroid carcinomas in Japan.	2001	Japanese Cancer Association	T. Takano, A. Miyauchi, H. Yoshida, Y. Hasegawa, K. Kuma, N. Amino
CANCER LETT, 168:51-55. Overexpression of α 1 tubulin mRNA in thyroid anaplastic carcinoma.	2001	Elsevier Science Ireland Ltd.	T. Takano, Y. Hasegawa, A. Miyauchi, F. Matsuzuka, H. K. Kuma, N. Amino

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行 年月日	刊行書店名	執筆者氏名
ENDOCR J, 48:345-354. Serum concentration of androstenediol and androstenediol sulfate in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism.	2001	The Japan Endocrine Society	N. Tagawa, T. Takano, S. Fukata, K. Kuma, H. Tada, Y. Izumi, Y. Kobayashi, N. Amino
ENDOCR J, 48:703-710. Blocking type anti-TSH receptor antibodies detected by radioreceptor assay in Graves' disease.	2001	The Japan Endocrine Society	H. Tada, Y. Izumi, Y. Watanabe, T. Takano, S. Fukata, K. Kuma, Y. Hidaka, N. Amino
Endocrinology, 4th edition, 1471-1480. Chronic (Hashimoto's) Thyroiditis (Chapter103), In: DeGroot LJ ed.	2001	W.B. Saunders Company, Philadelphia	N. Amino, H. Tada, Y. Hidaka

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行 年月日	刊行書店名	執筆者氏名
CANCER RESEARCH 61: 3640-3646 Transcriptional activation of the thyroglobulin promoter directing suicide gene expression by thyroid transcription factor-1 in thyroid cancer cells.	2001	American Association of Cancer Research	H. Shimura, H. Suzuki, A. Miyazaki, F. Furuya, K. Ohta, K. Haraguchi, T. Endo, T. Onaya
J CLIN ENDOCRINOL METAB 86: 2170-2177 Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells.	2001	The Endocrine Society	K. Ohta, T. Endo, K. Haraguchi, J.M. Hershman, T. Onaya
ENDOCRINOLOGY 142: 267-275 Pax-8 is essential for regulation of the thyroglobulin gene by transforming growth factor-beta1.	2001	The Endocrine Society	H.C. Kang, M. Ohmori, N. Harii, T. Endo, T. Onaya
ENDOCRINOLOGY 142: 3369-3379 Differential regulation of the human sodium/iodide symporter gene promoter in papillary thyroid carcinoma cell lines and normal thyroid cells.	2001	The Endocrine Society	T. Kogai, J.M. Hershman, K. Motomura, T. Endo, T. Onaya, G.A. Brent

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行 年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Moll.Cell(in press) Nuclear receptor function requires a TFTC- type histone acetyl transferase complex.	2002	Cell Press	Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Ynagisawa, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., McMahon, S. B., Cole, M.D., Tora, L., Takahashi, N., Kato, S.
Nucleic Acids Research(in press). Transcriptional regulatin of the mouse steroid 5alpha-reductase type II gene by progesterone in brain.	2002	Oxford University Press UK	Matsui, D., Sakari, M., Sato, T., Murayama, A Takada, I., Kim, M., Takeyama, K., Kato, S.
Eur. J. Biochem., 268, 6607-6615. Structure-function analysis CYP27B 1 and CYP27A1. Studies on mutants from patients with vitamin D-dependent rickets type I (VDDR-I) and cerebrotendinous xanthomatosis (CTX).	2001	FEBS	Sawada, N., Sasaki, T., Kitanaka, S., Kato Inouye, K
Biochem. Biophys. Res. Commun., 289, 763-768 N-terminal activation function is dominant in ligand-dependent transactivation of medaka estrogen receptor α in human cells.	2001	Elsevire Science	Mezaki, Y., Yoshida, T., Yanagisawa, J., Kato, S.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 13324- 13329. Doudenal calcium absorption in vitmin D receptor-knockout mice: functional and meolecular aspects	2001	National Academy of Sciences	Van Cromphaut, S. J., Dewerchin, M., Hoenderop, J. G. J., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R. J. M., Collen, D., Carmeliet, P.