

を添加した細胞と同程度に抑制された（図7 B）。また、ZAKI-4 α と β の間にはルシフェラーゼの活性の抑制度に差が認められなかった。以上の結果から、ZAKI-4アイソフォームのN端は、ZAKI-4とカルシニューリンの結合、及びカルシニューリン活性の抑制に影響しないことが示された。

6. 甲状腺ホルモンによるZAKI-4遺伝子発現の調節

ZAKI-4は甲状腺ホルモン応答性遺伝子としてヒト皮膚線維芽細胞よりクローニングされたが、新たなアイソフォームが同定されたため、ヒト皮膚線維芽細胞におけるZAKI-4 α と β の発現と甲状腺ホルモンによる調節を検討した。ZAKI-4 α は、当初甲状腺ホルモン応答性遺伝子としてクローニングされたが、 β アイソフォームは、ヒト組織に普遍的に発現していることから、このアイソフォームもヒト線維芽細胞に発現していることが予測された。事実、図8に示す如く、線維芽細胞にはZAKI-4 α 、 β 共に発現が観察された。

そこで、甲状腺ホルモン(T3= triiodothyronine; 10^{-8} M) 添加12時間後、RNAを抽出し、ZAKI-4 α と β の発現量の変化をNorthern Blot法により検討した。ZAKI-4 α mRNAは甲状腺ホルモンによって著しく増加したが、 β mRNAは変化しなかった（図8）。これはZAKI-4 α と β が組織特異的に調節されるだけでなく、甲状腺ホルモンによる調節も異なることを示している。

T3によるZAKI-4 α mRNAの発現調節が甲状腺ホルモン受容体 (TR) を介しているか否かを検討するため、リガンド非依存性に転写活性化能を持つTRVP16を発現するプラスミドを構築した（図9-B）。このプラスミドは、甲状腺ホ

ルモン応答性配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドとコトランスフェクトすると、リガンド非依存性にルシフェラーゼの発現を促進した（図9-C）。

TRVP16と強いドミナントネガティブ作用を持つTR β (TRG345R) を発現するアデノウイルスを構築し、ヒト皮膚線維芽細胞に感染させ、T3の存在下、非存在下でZAKI-4 α mRNAの変化を検討した（図10）。ZAKI-4 α mRNAは、コントロールアデノウイルス（インサートを持たないウイルス）の感染下、T3により著しく増加し、この増加は、ドミナントネガティブTR β (TRG345R) の発現により完全に抑制された。一方、TRVP16の発現によりZAKI-4 α mRNAは、T3非依存性に増加することが示された。以上、甲状腺ホルモンによるZAKI-4 α の発現調節がTRを介していることが示された。

7. 甲状腺ホルモンによるZAKI-4 α 発現増加による内因性カルシニューリン活性の低下

甲状腺ホルモンによるZAKI-4 α の発現増加が内因性のカルシニューリン活性を抑制するかどうかを検討するため、T3添加後のカルシニューリン活性を経時的に検討した。図11に示す如く、カルシニューリン活性は、経時的に減少し、ZAKI-4 α mRNAの増加に伴う α アイソフォームの増加がこの減少をもたらしたと考えられた。

D. 考 察

ZAKI-4遺伝子はDSCR1、DSCR1L2とホモログであり、最近人類遺伝子命名委員会によって、DSCR1L1とも命名された。ZAKI-4とDSCR1のアミノ酸配列はよく保存され、遺伝子の構造もよく類似している。両者とも7つのエクソンか

らなり最後の3つのエキソンは、カルシニューリンとの結合領域を翻訳する。これらの遺伝子から翻訳される蛋白はカルシニューリン抑制因子として注目されるが、それぞれの発現分布と発現調節は異なっている。ZAKI-4 β とDSCR1は広範な組織に発現し、特に脳、心臓に多く発現している。しかし、ZAKI-4 α の発現は脳、DSCR1L2はリンパ細胞に限られている。細胞培養および動物実験でDSCR1はカルシウム-カルモジュリン-カルシニューリン経路の活性化によって発現量が増加し、この増加がカルシニューリンの活性を抑制する。従って、DSCR1は内因性カルシニューリンのフィードバック調節因子として働いていると考えられる。しかしながら、ZAKI-4 α , β の発現はカルシニューリンシグナリング系の活性化によって調節されず、 α アイソフォームの発現は甲状腺ホルモンによって増加する。ZAKI-4 α は主に脳に発現しているため、甲状腺ホルモンがZAKI-4 α の発現を介してカルシニューリンの活性を抑制し、脳の機能に重要な影響を与えると考えられる。こうした研究は、甲状腺ホルモンによる脳の機能調節に関する新たな知見を提供し、古くから知られてきた甲状腺ホルモンによる中枢神経系の発達、成熟に対する作用機序の解明に大きく貢献すると考えられる。

E. 結 論

蛋白脱リン酸化酵素カルシニューリンの抑制蛋白をコードするZAKI-4遺伝子の構造を明らかにし、3つの転写産物から2つのアイソフォーム α 、 β が生成することを明らかにした。 α 、 β は共に、共通するカルボキシル端を介してカルシニューリンと会合し、その活性を抑制する。

α アイソフォームは主として、脳に発現し、甲状腺ホルモンによりその発現が増加する。一方、 β アイソフォームは、各種臓器に発現するが甲状腺ホルモンによる調節は受けない。

甲状腺ホルモンは、 α アイソフォームの増加を介してカルシニューリン活性を抑制することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Cao X, Kambe F, Miyazaki T, Sarkar D, Ohmori S, Seo H: Novel human ZAKI-4 isoforms: Hormonal and tissue-specific regulation and function as calcineurin inhibitors. *Biochemical Journal*, 367, 459-466, 2002.
2. Takeuchi Y, Murata Y, Sadow P, Hayashi Y, Seo H, Xu Jianming, O' Malley BW, Weiss RE, Refetoff S: Steroid receptor coactivator-1 deficiency causes variable alterations in the modulation of T(3)-regulated transcription of genes in vivo. *Endocrinology*, 143(4): 1346-52, 2002.
3. Cao X, Kambe F, Ohmori S, Seo H: Oxidoreductive modification of two cysteine residues in paired domain by Ref-1 regulates DNA-binding activity of Pax-8. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297, 288-293, 2002.
4. Kato M, Nagaya T, Fujieda M, Saito K, Yoshida J, Seo H: Expression of PPAR γ and its ligand-dependent growth inhibition in human brain tumor cell lines. *Japan Journal of Cancer Research*, 93(6): 660-666, 2002.
5. Sakano S, Hasegawa Y, Murata Y, Ito T,

Genda E, Iwata H, Ishiguro N, Seo H: Inhibitory effect of bFGF on endochondral heterotopic ossification. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 293, 680-685, 2002.

6. Shibata A, Nagaya T, Imai T, Funahashi H, Nakao A, Seo H: Inhibition of NF- κ B activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 73: 237-243, 2002.

7. Rogatcheva M, Hayashi Y, Oda S, Seo H, Cua K, Refetoff S, Murakami M, Masatomo M, Murata Y: Type 1 iodothyronine deiodinase in the house musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora: Soricidae): cloning and characterization of complementary DNA, unique tissue distribution and regulation by T3. *General and Comparative Endocrinology*, 127, 48-58, 2002.

8. Wakabayashi K, Kambe F, Nagaya T, Kato M, Saito K, Yoshida J, Seo H: Effect of PPAR γ ligand on TNF α -dependent expression of EGF receptor in human glioma cell line. *Environmental Medicine*, 45, 33-35, 2002.

9. Murakami R, Kambe F, Mitsuyama H, Okumura K, Miwata S, Yamamoto R, Seo H: Effect of epidermal growth factor and cyclosporin A on interleukin-8 gene expression

in human aortic smooth muscle cells. *Environmental Medicine*, 45, 48-51, 2002.

2. 学会発表

1. Cao X, Kambe F, Seo H: A thyroid hormone responsive gene, ZAKI-4: Its gene organization and regulation of the expression. 9th International Symposium on Molecular Thyroidology, Yonago, 2002. 4.

2. Cao X, Kambe F, Sarkar D, Ohmori S, Seo H: Involvement of cyclosporin A (CsA) and rapamycin-sensitive pathway for the thyroid hormone-mediated induction of ZAKI-4 α expression. 84th Annual Meeting of the Endocrine Society, San-Francisco, USA, 2002. 6.

3. Cao X, Kambe F, Sarkar D, Ohmori S, Seo H: Human ZAKI-4 α calcineurin (CN) inhibitor: its gene organization and regulation of the expression. 第75回日本内分泌学会若手研究奨励賞審査講演, 2002. 6. (大阪)

4. Cao X, Kambe F, Ohmori S, Seo H: Cyclosporin A (CsA)- and rapamycin sensitive regulation of ZAKI-4 α . 第45回日本甲状腺学会, 2001, 11. (浜松)

G. 知的所有権の獲得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

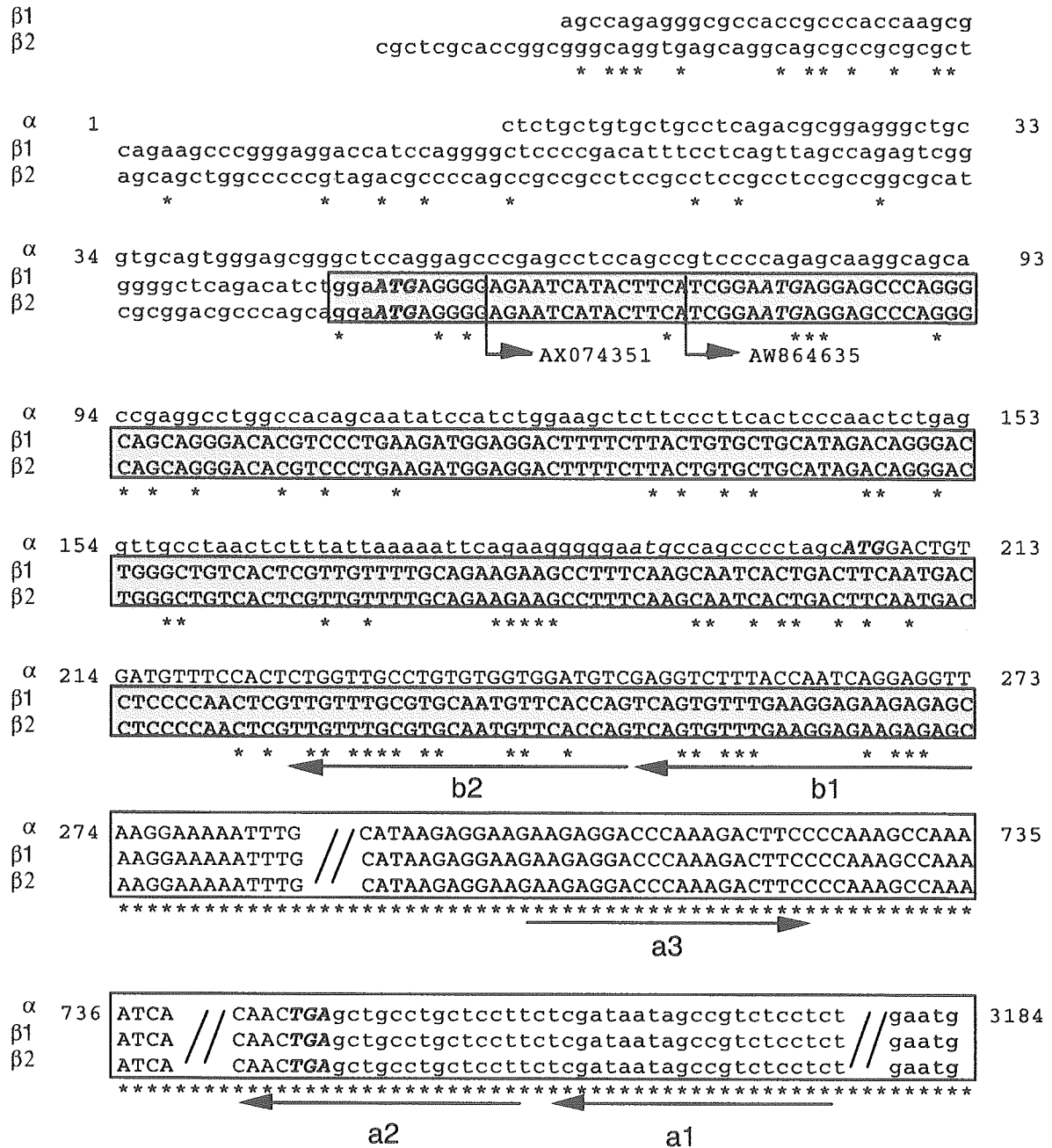


図 1. ZAKI-4転写産物の解析

ヒト脳から抽出されたRNAを鋳型に用い、RACEを行った。用いたプライマーはa1, a2, a3 およびb1, b2で示した。αの配列は、既報の皮膚皮膚線維芽細胞からクローニングされたZAKI-4と同一であった。β1, β2は、灰色のボックスで示した部分を共有し、α, β1, β2は白枠で示した部分は同一であった。AX074351, AW864635は、ホモロジー検索により検出されたcDNAクローンのGeneBank accession numberを示している。

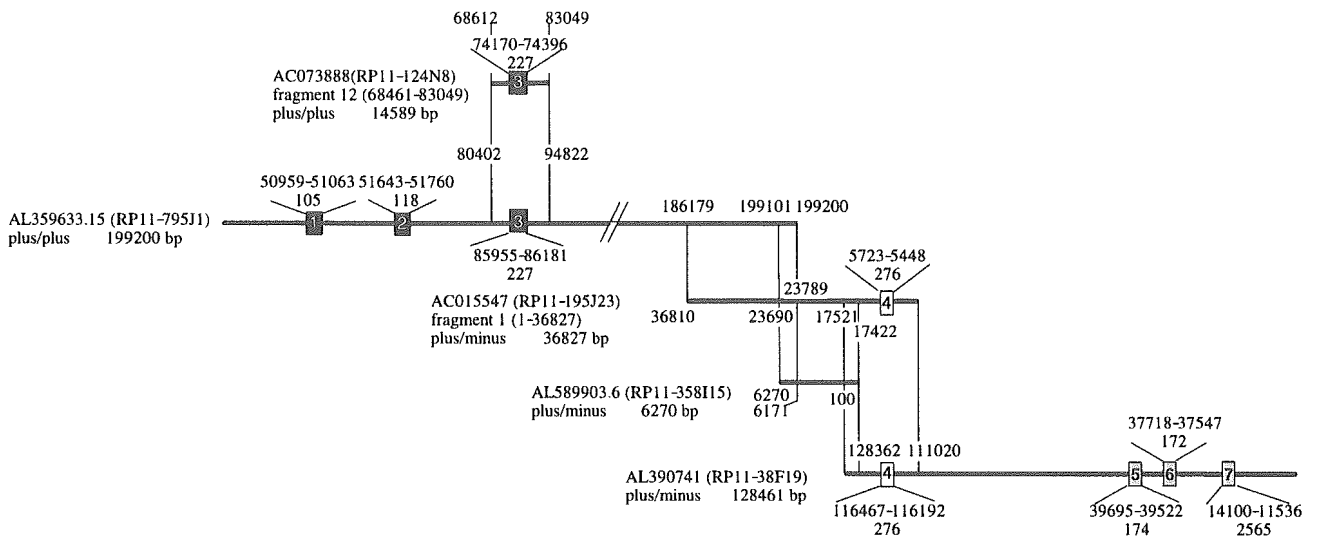


図2. ホモロジー検索により検出されたゲノムクローンによるエクソンの同定

5つのゲノムクローンがホモロジー検索により検出され、全てのエクソンの同定が可能であった。

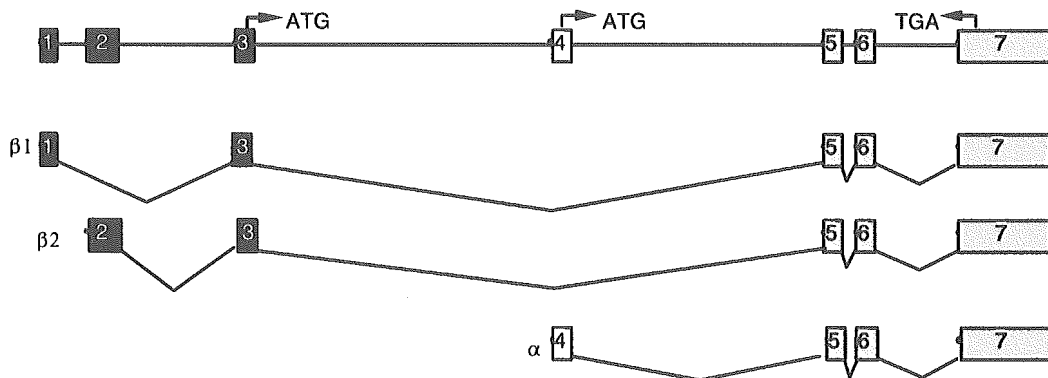


図3. ZAKI-4遺伝子から生成する3つの転写産物

単一のZAKI-4遺伝子は7つのエクソンより構成され、 α 、 $\beta1$ 、 $\beta2$ の3つの産物を転写すると考えられる。これらの産物は、転写開始点とスプライシングの差異により生成する。

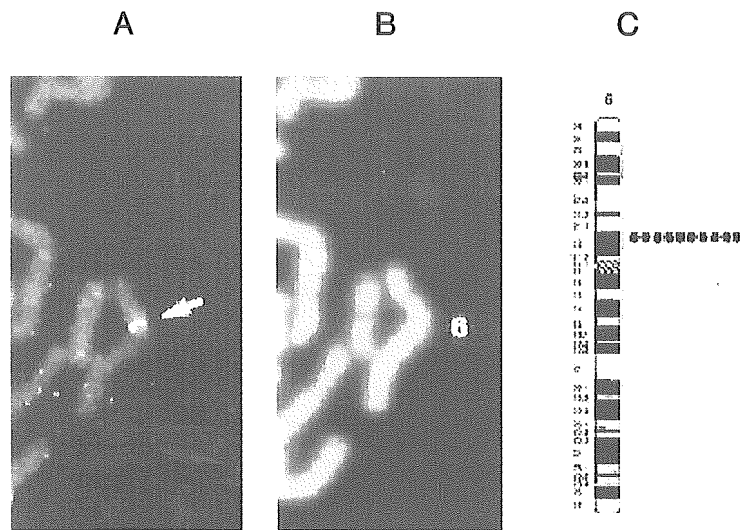


図4. ZAKI-4遺伝子の染色体における局在

A. FISH法をによるZAKI-4遺伝子の検出。B. DAPIバンディングによる染色体の同定。ZAKI-4は、第6染色体短腕に局在することが示された。

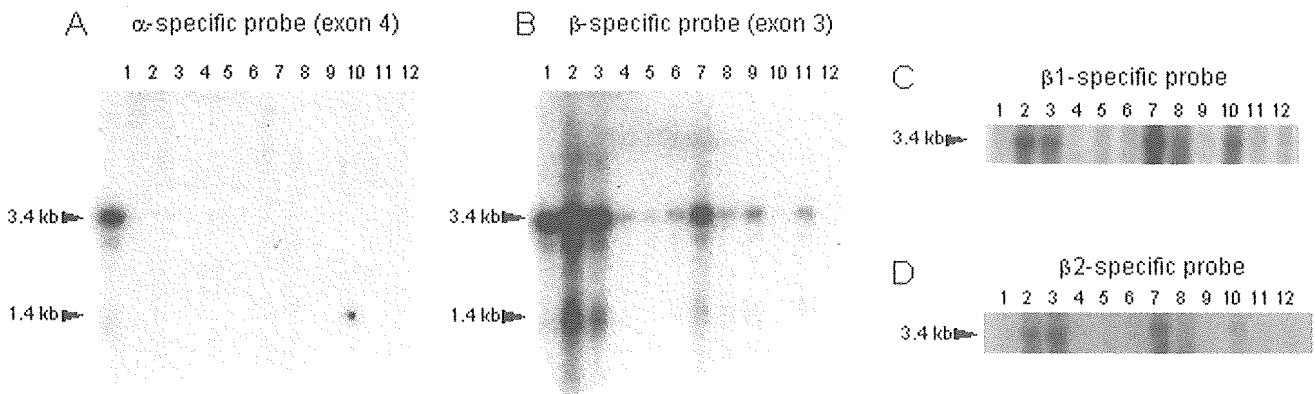


図5. ZAKI-4 α と β の各種ヒト組織における発現

Northern blot法で12種類の人組織での各々のアイソフォームの発現分布を示した。1) 脳, 2) 心臓, 3) 筋肉, 4) 結腸, 5) 胸腺, 6) 脾臓, 7) 腎臓, 8) 肝臓, 9) 小腸, 10) 胎盤, 11) 肺, 12) 末梢白血球から得られたRNA。実験に用いられたプローベは α 特異的エクソン4 (A) と β 特異的エクソン3 (B) に加え、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ に特異的なオリゴヌクレオチドプローベ (C, D) である。

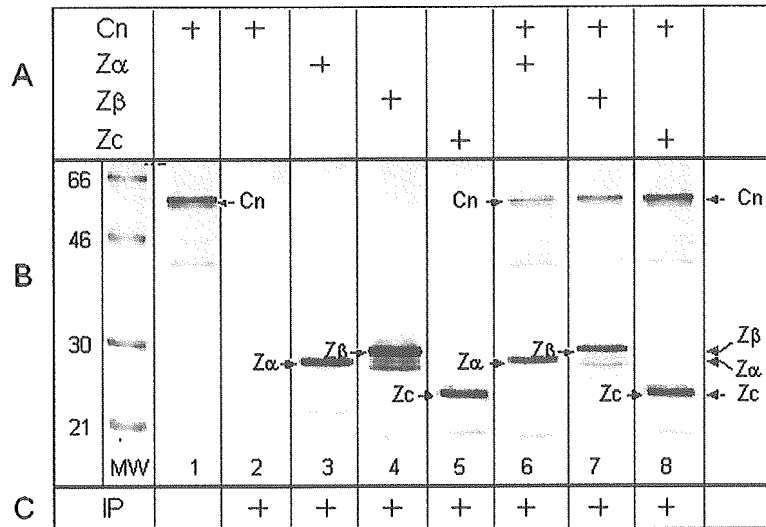


図6. ZAKI-4アイソフォームとカルシニューリンとの会合

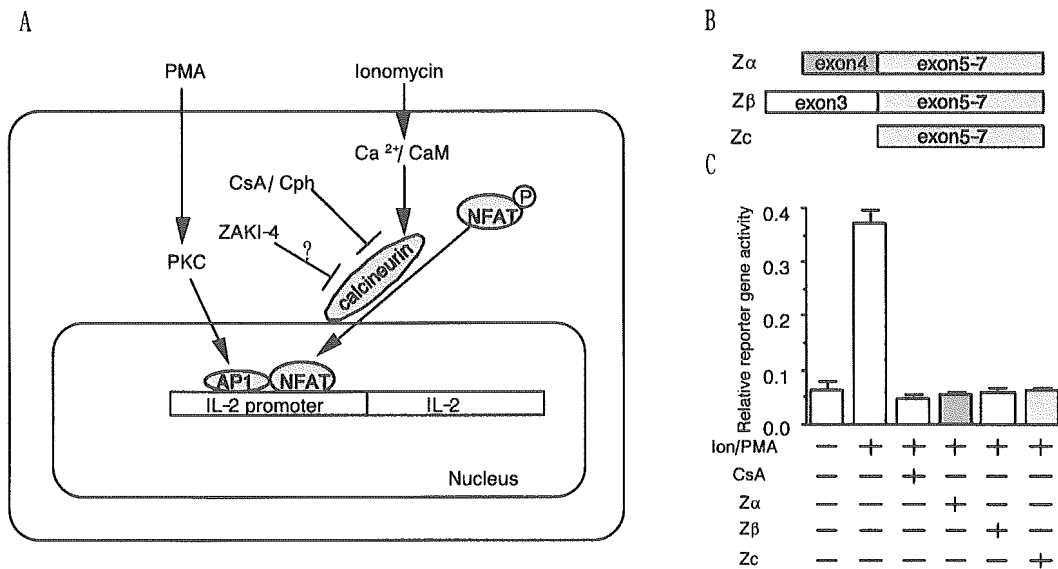


図7. ZAKI-4アイソフォームによるカルシニューリン活性の抑制 (IL-2 reporter geneを用いた検討)

A. IL-2 reporter gene を用いたカルシニューリン活性の測定原理。B. ZAKI-4アイソフォームの模式図。Zc は、 α 、 β アイソフォームに共通するC-t端部分を発現するよう開始コドンにN-端に挿入した。C. PMA, ionomycinにより活性化されるreporter geneはZAKI-4アイソフォームの何れによっても完全に抑制された。

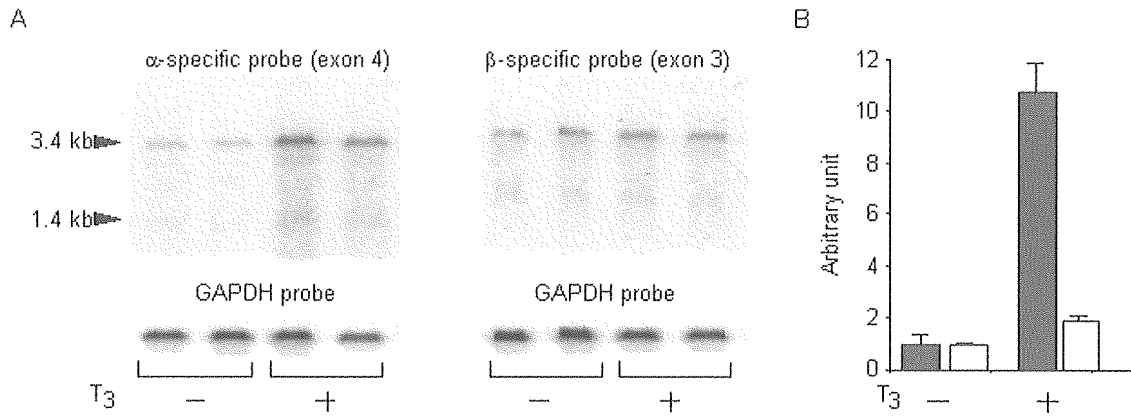


図8. ヒト皮膚皮膚線維芽細胞におけるT3によるZAKI-4 α 発現の促進

T3添加12時間後にRNAを抽出、ZAKI-4 α に特異的プローベ(exon 4)あるいは β 特異的プローベ (exon 3) を用いてNorthern blot解析を行った。

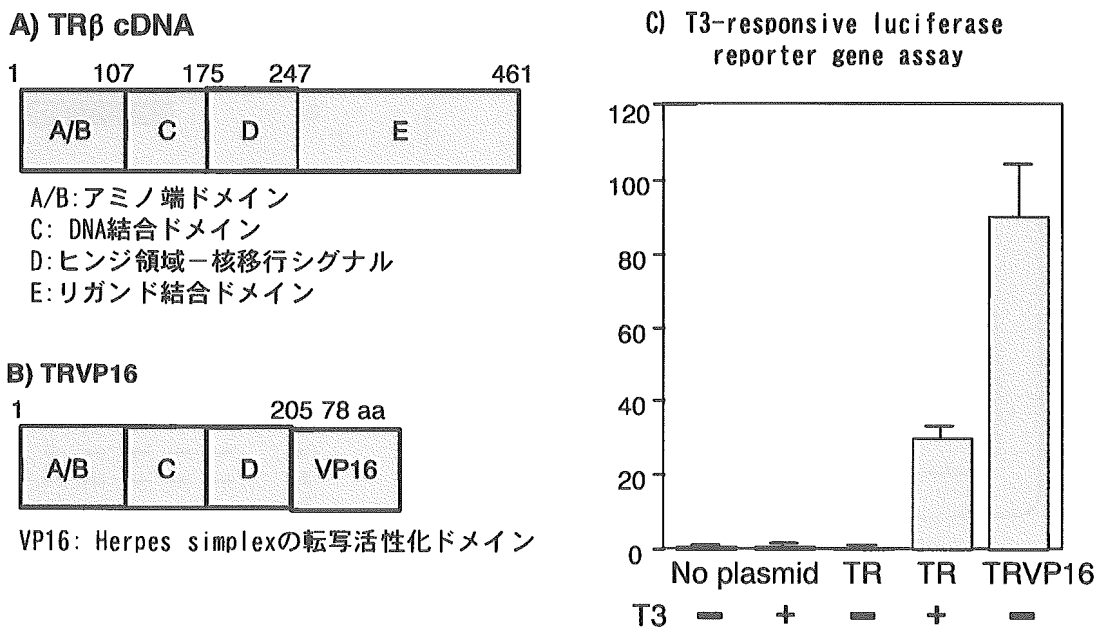


図9. リガンド非依存性に転写活性化能を持つTR β (TRVP16) の構築とその作用

TR欠失細胞株: JEG-3ヒト絨毛上皮癌細胞株に、甲状腺ホルモン応答性レポーター遺伝子とTR β , 或いはTRVP16を発現するプラスミドをコトランスフェクトした。TR β の導入時には、T3の添加時のみレポーター遺伝子の活性化が認められたが、TRVP16の発現によりリガンド非依存性のレポーター遺伝子の活性化が認められた。

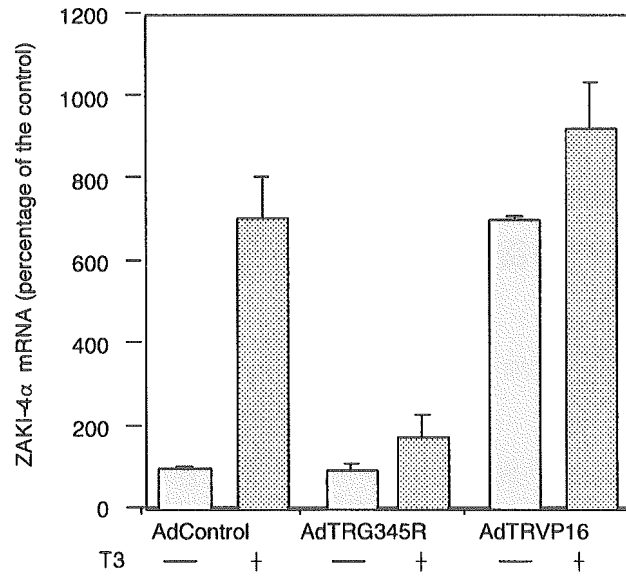


図10. TRG345RおよびTRVP16の発現によるZAKI-4 α mRNAの変化

T3依存性のZAKI-4 α mRNAの増加 (AdControl) は、TRG345Rの導入により完全に抑制され、TRVP16の導入は、リガンド非依存性にZAKI-4 α mRNA発現を増加させた。

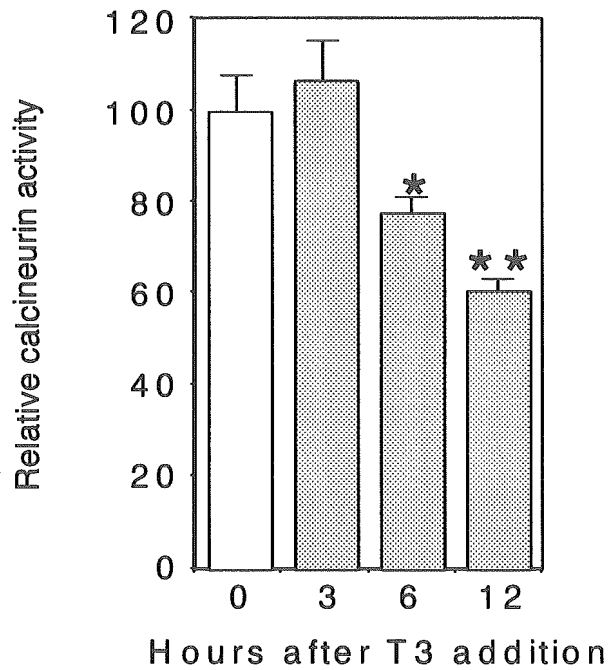


図11. T3添加後の内因性カルシニューリン活性の変化

ZAKI-4 α mRNAのT3添加後の増加に対応し、カルシニューリン活性は、6時間、12時間後に漸減した。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

バセドウ病眼症の発症メカニズムの解析と治療法の開発に関する研究

(1) バセドウ病眼症とCTLA-4遺伝子多型

(2) バセドウ病眼症患者の後眼窩組織におけるサイログロブリン遺伝子の発現

研究協力者 広松 雄治 久留米大学医学部内分泌代謝内科 助教授

(1) バセドウ病眼症とCTLA-4遺伝子多型 —ポーランド人と日本人との比較検討—

研究要旨

日本人310例とポーランド人264例のバセドウ病患者を対象に CTLA-4 遺伝子多型とバセドウ病眼症との関連性を検討した。CTLA-4 遺伝子 Exon 1, position 49 の G アレル頻度はポーランド人においても日本人においても有意にバセドウ病患者に高率であったが、眼症との関連性はポーランド人、日本人のいずれにおいても認められなかった。バセドウ病眼症の発症には CTLA-4 遺伝子以外の素因が関与しているものと推測される。

A. 研究目的

バセドウ病眼症はバセドウ病に高率に合併する自己免疫疾患であり、遺伝因子を背景に環境因子が働き発症すると考えられている。最近、英国とイタリアにおいて cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) 遺伝子多型とバセドウ病眼症の発症との関連性が報告された。そこで今回、私どもは日本人とポーランド人を対象に CTLA-4 遺伝子多型とバセドウ病眼症との関連性を検討したので報告する。

B. 研究方法

対象はポーランド人のバセドウ病患者264例（平均発症年齢41歳）と健常者194例、日本人のバセドウ病患者310例（平均発症年齢38歳）と健常者112例を対象とした。バ

セドウ病患者中、アメリカ甲状腺学会の分類でclass 3以上の眼症を有するものは、ポーランド人95例、日本人97例であった。

CTLA-4 多型は、PCR-RFLP法にて行い、エクソン1の49番目のA/G多型を解析した。用いたプライマーは、5'-CCACGGCTTCCTTTCTCGTA-3'; 5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3'で、制限酵素には Bst7II を用いた。

(倫理面の配慮)

倫理委員会の承認および患者ならびに健常者から同意を得て行った。

C. 結 果

バセドウ病患者におけるCTLA-4遺伝子 Exon 1, position 49のGアレル頻度は、ポー

ランド人48%、日本人69%でともに健常者における頻度よりも有意に高率であった (Table 1)。しかし眼症の重症度との関連性は認められなかった (Table 2)。

D. 考 察

バセドウ病眼症はバセドウ病に高率に合併する自己免疫疾患であり、遺伝因子を背

景に環境因子が働き発症すると考えられている。後眼窩組織では外眼筋や脂肪組織にリンパ球浸潤がみられ、T細胞の働きが眼症の病因に関与していると考えられている。CTLA-4はco-stimulatory moleculeであり、T細胞に発現し、T細胞のアポトーシスに関連している。CTLA-4遺伝子のExon 1のA49G多型はThrからAlaへのアミノ酸の

表1 CTLA-4遺伝子多型 (Exon 1, A49G) とバセドウ病

Polish	Genotype			Allele frequency	
	AA	AG	GG	A	G
Graves'	75	123	66	273 (52%)	255 (48%)
Control	77	85	32	239 (62%)	149 (38%)
	P=0.03			P=0.003	

Japanese	Genotype			Allele frequency	
	AA	AG	GG	A	G
Graves'	28	138	144	194 (31%)	426 (69%)
Control	15	63	34	93 (42%)	131 (58%)
	P=0.01			P=0.006	

表2 CTLA-4遺伝子多型 (Exon 1, A49G) とバセドウ病眼症

Polish

ATA class	Genotype			Allele frequency	
	AA	AG	GG	A	G
≥ 3	27	41	27	95 (50%)	95 (50%)
0 ~ 2	48	82	39	178 (53%)	160 (47%)
	P=0.3			P=0.6	

Japanese

ATA class	Genotype			Allele frequency	
	AA	AG	GG	A	G
≥ 3	12	41	44	65 (34%)	129 (66%)
0 ~ 2	16	97	100	129 (30%)	297 (70%)
	P=0.4			P=0.4	

変異をきたすことからCTLA-4分子の機能に影響を与えられ、自己免疫疾患の感受性遺伝子の有力な候補である。バセドウ病や橋本病、1型糖尿病でGアレル頻度が有意に高かったとの報告がみられる。最近、英国とイタリアにおいてCTLA-4遺伝子多型とバセドウ病眼症の発症との関連性が報告された。しかし、私どもの研究では、日本人およびCaucasiansであるポーランド人においてもCTLA-4多型はバセドウ病発症とは関連するものの、眼症とは関連が認められなかった。眼症の発症には、その他の遺伝因子や環境因子の関与が示唆され、さらなる研究が必要である。

E. 結 論

ポーランド人 (Caucasian) と日本人においては、CTLA-4 Exon 1, position 49, A→G 多型はバセドウ病の発症と関連する疾患感受性遺伝子の一つと考えられるが、バセドウ病眼症の発症との関連性は低い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Fukutani T, Jazdzewski K, Miskiewicz P, Osikowska M, Nauman J.: Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and non-genetic factors with Graves' ophthalmopathy in European and Japanese populations. *Eur J Endocrinol.* 148:13-18, 2003.

2. 学会発表

第107回日本眼科学会にて発表予定 (2003年4月、福岡)

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

(2) バセドウ病眼症患者の後眼窩組織におけるサイログロブリン遺伝子の発現

研究要旨

リアルタイム定量PCR法にて後眼窩組織におけるサイログロブリン(Tg) messenger RNA (mRNA) の発現を検討した。定量PCRはTgおよびGAPDHに対するTaq Manプローブを用いたリアルタイムPCR法にて行った。定量の結果はTg mRNA/GAPDH mRNAの比で表した。バセドウ病眼症患者の後眼窩脂肪組織 (7例) におけるTg mRNAの発現は0.008で、外眼筋組織 (5例) 0.003、非甲状腺疾患患者の胸部皮下脂肪組織 (5例) 0.002、健常者の末梢血 (19例) 0.001に比して高かったが、バセドウ病甲状腺組織 (5例) 12.09に比較して有意に低値であった。バセドウ病眼症患者の後眼窩脂肪組織に低レベルではあるがTg mRNAの発現を認めた。しかしながらこの臨床的意義についてはさらなる検討が必要である。

A. 研究目的

バセドウ病眼症では、外眼筋や後眼窩組織の炎症により、眼球突出、眼瞼腫脹、複視、視力障害などをきたし、患者のquality of lifeが著しく損なわれる。バセドウ病に高率に合併することから、後眼窩組織と甲状腺組織との共通抗原に対する自己免疫疾患と考えられているが、その発症の詳しいメカニズムは未だ不明である。自己抗原としては thyrotropin 受容体 (TSH-R) が最も重要であると考えられているが、その他の甲状腺抗原や外眼筋抗原などの関与も指摘されている。最近、western blot法でバセドウ病眼症患者の後眼窩組織に thyroglobulin (Tg) 蛋白質の存在が報告され、自己抗原としての役割が見直されつつある。そこで今回、私どもは定量 polymerase chain reaction (PCR)法にて後眼窩組織における Tg messenger RNA (mRNA)の発現を検討したので報告する。

B. 研究方法

バセドウ病眼症患者7例(男性2例、女性5例、平均年齢52.7歳)から得られた後眼窩脂肪組織(7例)、外眼筋組織(5例)、バセドウ病患者の甲状腺組織(5例)、非甲状腺疾患患者(5例)の皮下脂肪組織および健常者(19例)の末梢血から Qiagen kit を用いて total RNA を精製した。Reverse transcriptionにより各サンプルの complementary DNA (cDNA)を作製した後、定量PCRを行った。定量PCRはTgに対する Taq Manプローブを用いたリアルタイムPCR法にて行い、GeneAmp5700 sequence detector (PE Biosystems)にて検出した。内因性コントロールとして上記組織に大量に発現している house keeping geneの一つである glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH)の発現に関しても同様に検討した。定量の結果はTg mRNA/GAPDH mRNAの比で表した。定量PCRに用いたTgおよびGAPDHに対するプライマー、Taq Manプローブは下記に示す。

Tg: forward primer,

5' -CTGCTGGCTCCACCTTGTTT-3' ;

reverse primer,

5' -CAGGGCGTGGGGCATTTCCT-3' ;

Taq Man probe,

5' -FAM-CACTTCGATTCCAGGA
ATGGCCTGACCCT-TAMRA-3'

GAPDH: forward primer,

5' -GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3' ;

reverse primer,

5' -GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3' ;

Taq Man probe,

5' -FAM-CAAGCTTCCCCTTCTCAG CC-
TAMRA-3'

上述のプライマーで増幅したTgあるいはGAPDH cDNAを組み込んだレコンビナント pGEM TA-vectors (Promega, Tokyo, Japan) を標準サンプルとして使用した。各サンプルのcDNAをテンプレートに、各プライマー、TaqMan probeを含む反応液15 μ lの系で、triplicatesでPCRを行った。PCRは50 $^{\circ}$ C 2分、95 $^{\circ}$ C 10分後に、95 $^{\circ}$ C 15秒、60 $^{\circ}$ C 1分の40サイクル行った。統計処理は、分散分析を行った後、Fisher's protected least significant difference法にて各群間の比較を行った。

(倫理面への配慮)

検体の提供者から研究への協力の同意を得た。

C. 研究結果

定量的にサンプルを算出するのに必要な、標準サンプルのリアルタイムPCRの結果を図1Aに示した。横軸にPCRサイクル数、縦軸に蛍光強度を示すと、テンプレートの濃度が高いほど、少ないサイクルで蛍光強度の立ち上がりが見られた。そこで、指数増幅範囲のほぼ中央の蛍光強度の値から、解析を行った。各々の濃度に対して算出された値を基に、標準曲線を作成し、Tg mRNAおよびGAPDH mRNAの定量を行った。Tg mRNA、GAPDH mRNAの最小測定濃度はそれぞれ0.102pg/ml, 2.56 pg/mlであった。定量の結果は、Tg mRNA/GAPDH mRNAの比で表した。

Tg mRNAの発現はバセドウ病甲状腺組織12.09に対して、バセドウ病眼症患者の後眼窩脂肪組織や外眼筋組織ではそれぞれ0.0080、0.0026と有意に低値であった(図1)。非甲状腺疾患患者の皮下脂肪組織や健常者の末梢血でもそれぞれ0.0022、0.0012と低値であった。しかしながら、後眼窩脂肪組織におけるTg

mRNAの発現は末梢血中での発現に比較して高値であった。

D. 考 察

1970年代、KrissやKonishiらにより、バセドウ病眼症の病因の一つの仮説として、甲状腺と後眼窩を結ぶリンパ路が存在し、このリンパ路を介して、甲状腺の可溶性抗原とくにTgが後眼窩の外眼筋組織の膜分画に沈着して、後眼窩組織に炎症が惹起され眼症をきたすとの仮説が提唱された。1977年MullinらもTgが正常外眼筋組織にも存在し、Tgが眼症の病因に関連すると報告した。しかしながらバセドウ病眼症は橋本病よりもバセドウ病に高率に合併することや抗Tgモノクローナル抗体による検討の結果、後眼窩組織にTgやTg免疫複合体の沈着を証明できなかったことなどから、上記の仮説は疑問視され、代わってTSH受容体や外眼筋抗原などが自己抗原として提唱されるようになった。ところが、2001年Marinoらがバセドウ病眼症患者の後眼窩脂肪組織にT4残基を有する

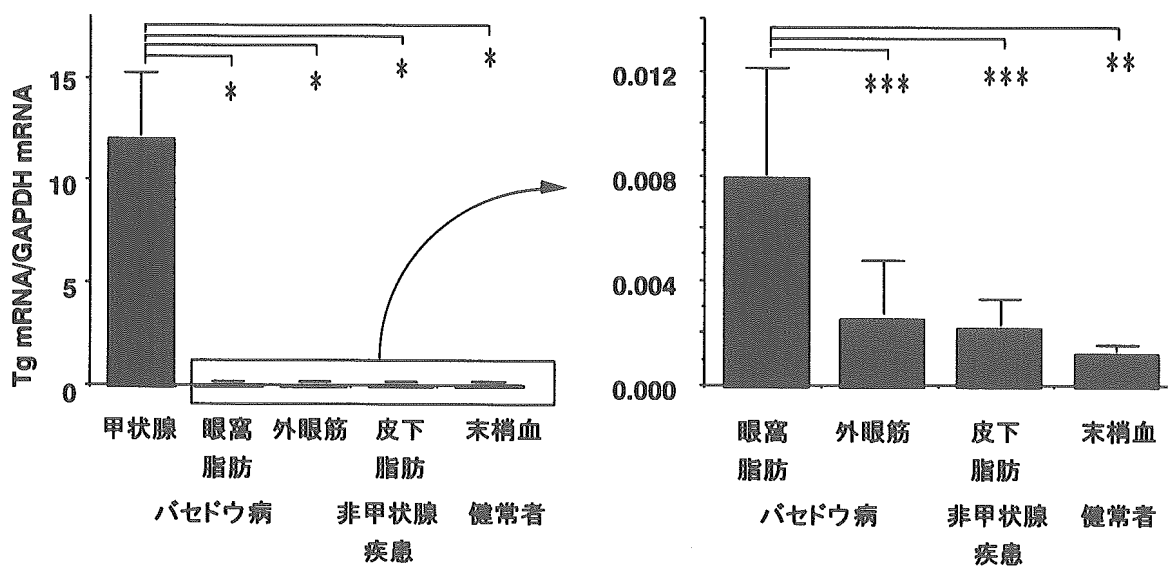


図1 定量PCR法によるサイログロブリン mRNAの発現

* P < 0.0001 ** P < 0.005 *** P < 0.05

Tgの沈着を報告したことから、再びKrissらの仮説が浮上した。彼らはさらに症例数を増やしてバセドウ病眼症患者10例中7例の後眼窩脂肪組織に甲状腺由来のTgが存在していたと追加報告した。そこで私どもは定量PCR法にて後眼窩組織におけるTg mRNAの発現を検討した。眼症患者の後眼窩脂肪組織および非バセドウ病患者の皮下脂肪組織にTg mRNAの発現を認めしたが、その発現は甲状腺に比較して極めて低率であった。Austらは後眼窩組織におけるTg, TSH受容体の発現を検討し、RT-PCR法ではこれらの抗原のmRNAの発現を認めたが、蛋白レベルでは発現が認められず、後眼窩組織における自己免疫反応の標的抗原としての役割を疑問視している。私どもの症例では活動性の低下した時期に検体が採取されており、Tg mRNAの発現が低レベルだったのが炎症が沈静化した結果なのかは不明である。今後、活動期の眼症患者での検討や健常者の後眼窩組織での発現を検討する必要がある。最近Tgの甲状腺以外の部位での発現が注目されている。Kohnらは腎メサンギウム細胞での発現を検討し、Tgはこれらの細胞の増殖に影響することを報告している。バセドウ病眼症の病因におけるTgの後

眼窩組織における発現の意義はさらに検討が必要である。

E. 結 論

バセドウ病眼症患者の後眼窩組織におけるTg mRNAの発現を定量RT-PCR法にて検討し、眼症患者の後眼窩脂肪組織に低レベルながらTg mRNAの発現を認めた。しかし、この臨床的意義については今後さらに検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

広松雄治、寺崎聖代、福谷知香、賀来寛雄、三宅育代：バセドウ病眼症患者の後眼窩組織におけるサイログロブリン遺伝子の発現。眼科紀要 (in press)

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（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発症およびその病態に関する研究：
甲状腺ホルモン受容体によるTSH β 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

研究要旨

甲状腺ホルモン不応症の最も中心的病態の一つが、T3によってTSHが適切に抑制されないいわゆる不適切 TSH 分泌状態(SITSH)である。この病態が解明されるためには、甲状腺ホルモン(T3)とその受容体(TR)によって TSH 遺伝子の転写が抑制される機序がまず解明されねばならない。従来このプロジェクトの実験に適した培養細胞系がなかったが、私たちは CV1 細胞に下垂体特異的転写因子 Pit1 および GATA2 を発現させることにより、T3/TRによるTSH β 遺伝子プロモーター転写抑制を高感度に観察できる系を開発した。この系を用いてこれまでに以下の結果を得ている。①T3非結合TRはTSH β 遺伝子の基礎転写活性を亢進せず、TR自身が転写活性化因子ではない、②T3/TRによるTSH β 遺伝子転写抑制には、TRのDNA結合領域が重要である、③コレプレッサーおよびコアクチベーターは必ずしも必須因子ではないが、抑制効果が100%発揮されるには必要である、④TSH β 遺伝子プロモーターの-80/-55の領域を除去することにより基礎転写活性が著明に増大する、⑤TSH β 遺伝子の転写活性化にはGATA2が特に重要と考えられる。現在、TRはpit1/GATA2という活性化因子を標的とし、その作用を阻害することによりTSH β 遺伝子の転写を抑制するという作業仮説をたてている。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症の最も中心的な病態である不適切TSH分泌状態(SITSH)を解明するため、T3/TRによるTSH遺伝子の転写抑制機構を明らかにする。これまで研究が非常に困難であった一つの理由が、TSH遺伝子活性の抑制を十分観察できる適切な細胞系がないことであった。私たちは、遺伝子実験で頻用されるサル腎臓由来CV1細胞に下垂体特異的転写因子を発現させ、TSH遺伝子発現を高感度で測定できる系を確立した。この系を用いて TR の TSH β 遺伝子転写制御機構を検討した。

B. 研究方法

CV1細胞にPit1、GATA2、レポーター遺伝子、受容体の各発現プラスミドをリン酸カルシウム法で導入し、20時間後リガンドを添加した。24時間培養後細胞抽出液を回収しCAT活性を測定、 β -ガラクトシダーゼ活性で導入効率の補正を行い、CMVコントロール遺伝子発現に対する相対的活性を算出した。基本的なレポーター遺伝子としてはヒトTSH β 遺伝子プロモーター (-128/+37) にCAT遺伝子を結合させたものを用いた。またプロモーター領域に種々の欠失を導入した変異レポーターも作成した。受

容体は正常TRのほか種々の変異TRを用いた。

(倫理面への配慮) In vitroの実験であり、倫理面では問題がない。

C. 研究結果

CV1細胞にPit1、GATA2を発現させることにより、導入したTSH β 遺伝子のプロモーター活性を高めることが出来た。Pit 1、GATA2は共に必要で、それぞれ用量依存的であった。TR自体がTSH β 基礎転写活性を上昇させることはなく、またPit1、GATA2と共発現した時もT3非存在下では転写活性をさらに上昇させることはなかった。T3添加は用量依存性に転写活性を抑制した。このことからTSH β 遺伝子の転写活性化因子はTR自身ではなく、pit 1、GATA2など別に存在すると考えられた。

転写抑制作用に必要なTR領域を種々の変異TRで検討したところ、T3結合能とDNA結合能は必須であった。コレプレッサーの関与を調べるため2種類の CoR-box 変異体(P214R、AHT)に加え、Marimuthuらの報告に従いN-CoRの結合に必要とされるTR領域に変異を入れた異常TRを種々作成し、T3結合能が正常に保たれているもの(C309K)を選び出し検討した。コレプレッサー結合能を失ったいずれの変異TRでも、TSH β 遺伝子に対するT3依存性転写抑制作用は観察され、このことからコレプレッサーの関与は必ずしも必須ではないと考えられた。一方、コアクチベーターの役割を調べるために、T3結合能は正常でコアクチベーター結合が障害されている異常TR(E457A)を用いて検討した。やはり転写抑制作用は発揮されたが、その程度は野生型TRより弱かった。このことから、コアクチベーターは negative regulation に必須ではないが、十分な抑制には必要な因子と考

えられた。

TR α 1、 β 1、 β 2の3種類のアイソフォームを比較すると、TR β 2がもっとも転写抑制力が強く、TSH産生下垂体細胞であるT α T1細胞における発現量もTR β 2がもっとも高いことから、TSH遺伝子の転写調節にはTR β 2が主体と考えられた。甲状腺ホルモン不応症患者から同定した8種類の異常TRを用いて、DR4レポーター遺伝子に対するpositive regulationとTSH β レポーター遺伝子に対するnegative regulationを同一条件下で比較したところ、生理的な1 nMT3で両者に正相関が見られなかった。これはpositive regulationとnegative regulationが単純な鏡像関係ではないことを示している。

TSH β 遺伝子プロモーターにおける責任領域を同定するため、種々の欠失レポーター遺伝子を作成して検討した。予想外のことに、従来TRが結合する塩基配列領域と考えられていた-1/+6およびその周辺に変異を導入したり欠失させても、T3/TRによるnegative regulationが確認された。さらに-80/-55を欠失させると基礎転写活性が10倍高まった。この機序はまだ不明であるが、この部位にTSH β 遺伝子発現を抑制するなんらかの因子が介在している可能性も考えられる。-80/-55欠失レポーター遺伝子が非常に高い基礎転写活性を有することから、これを用いてpit 1、GATA2の影響を調べたところ、pit 1単独では活性化効果は見られなかったが、GATA2は単独でも転写活性を上昇させた。興味深いことに、このGATA2によって高まったTSH β 遺伝子活性はT3/TRで抑制され、GATA2はnegative regulationにおいて特に重要であると推測された。

D. 考 察

CV1細胞で私たちが開発したアッセイ系は、内因性TRを含まず、TSH遺伝子プロモーター活性は pit 1/GATA2 を発現することによって始めて著明に上昇し、T3/TRにより非常に高感度に抑制される。これまでに報告されている研究は、TSH遺伝子活性が非常に低い条件下で行われているか、あるいは未知の活性化因子が存在していて TSH 遺伝子があらかじめ活性化された条件下で行われてきた。この点、今回私たちが組み立てた系は研究に大変適したものである。私たちの一連の研究でもっとも注目すべきは、T3非結合TRそれ自体が TSH β 遺伝子を活性するのではなく、活性化因子はTRとは別に存在するという所見である。甲状腺機能低下症で TSH が上昇することから、TRはT3と結合しないときTSH遺伝子を高め、T3結合によって転写を抑制するといった想像が容易になされていた。しかしながら、TSH β 遺伝子活性を高めるのはPit1、GATA2などの下垂体特異的転写因子であり、TR自体ではないことが明らかとなった。このことはTRを完全に欠失させたノックアウトマウスで、TSH遺伝子発現が非常に高まっているという報告とよく一致するものである。TR自体が活性化因子であるならば、TRノックアウトマウスではTSH遺伝子発現は低レベルであるべきである。

TRのDNA結合領域は転写抑制に絶対的に必要であるが、これまで negative T3 responsive elementと考えられてきた塩基配列は必ずしも必要領域ではなかった。しかしTRが TSH β 遺伝子プロモーターのどこに結合するのかはまだ確定していない。一方、コアクチベーターやコレプレッサーは必ずしも必須因子ではないが、抑制が100%発揮されるには必要であることが

示された。これは、コアクチベーターのSRC-1ノックアウトマウスで部分的SITSHが見られるという成績と合致するものである。

T3/TRがどのような機序で TSH β 遺伝子活性を抑制するかの解明には、さらなる実験が必要であるが、活性化因子が TR 自体ではなく pit 1、GATA2など別に存在することが明らかになったことから、作業仮説として、TRはT3が結合するとPit1、GATA2に関連し、それらのもつTSH β 遺伝子転写促進作用を阻害するのではないかと想定している。TSH β 遺伝子プロモーターにおいてTRはT3依存性にヒストン脱アセチル化酵素 HDAC2 をリクルートすることを佐々木が報告している(ENBO J 1999)。したがって、T3によりHDAC2がTRに関連し、pit 1/GATA2に干渉することが想像される。現在TRがpit 1/GATA2と直接関連するかどうか検討している。

E. 結 論

TSH遺伝子の転写を刺激する因子はPit1、GATA2などの下垂体特異的転写因子であり、TRではない。TRはT3依存性にHDAC2をリクルートし、Pit1、GATA2に干渉してそれらの転写促進作用を阻害する可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakano K, Matsushita A, Sasaki S, Misawa H, Nishiyama K, Kashiwabara Y, Nakamura H: Thyroid hormone-dependent negative

regulation of thyrotropin beta gene by thyroid hormone receptors: STUDY WITH A NEW EXPERIMENTAL SYSTEM USING CV1 CELLS Endocrinology (revised)

中村浩淑：甲状腺ホルモン不応症の診断と治療. ホルモンと臨床 50(7):77-81, 2002.

西山孝三、中村浩淑：甲状腺ホルモン受容体異常による疾患 日本臨牀 60(2): 379-384, 2002

2. 学会発表

Thyroid hormone-dependent negative regulation of thyrotropin gene promoters by thyroid hormone receptor in CV1 cells. (Nakamura H et al.) 第25回欧州甲状腺学会 (Gothenburg, Sweden) Topic highlights 2002年9月8-11日(J Endocrinol Invest 25 Suppl 7: 25, 2002 Abst #44)

The negative regulation of the thyrotropin promoters by thyroid hormone and its receptors. (Sasaki S, Nakamura H et al.) Keystone Symposia (Nuclear Receptor Superfamily) (Snowbird, Utah, USA) 2002年4月

Involvement of GATA2 in the T3 dependent negative regulation of the thyrotropin beta and alpha gene promoters by thyroid hormone receptor. (Sasaki S, Nakamura H et al.) 第74回国甲状腺学会 (Los Angeles, CA, USA) 2002年10月9-14日 (Abst #6)

甲状腺ホルモン受容体によるTSH β 鎖遺伝子の転写制御メカニズムの検討 (松下明生、中村浩淑 他) 第75回日本内分泌学会総会 2002年6月28-30日 (日本内分泌学会雑誌 78 (1): 84, 2002 Abst #H3-1)

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 α 鎖プロモーターへの負の調節に関する因子についての検討 (中野桂子、中村浩淑 他) 第75回日本内分泌学会総会 2002年6月28-30日 (日本内分泌学会雑誌 78 (1): 84, 2002 Abst #P176)

TSH β 鎖遺伝子の転写制御における甲状腺ホルモン受容体のメカニズムの検討 (松下明生、中村浩淑 他) 第45回日本甲状腺学会総会 2002年11月20-22日 (日本内分泌学会雑誌 78 (2): 249, 2002 Abst #24)

甲状腺ホルモンによるTSH α 鎖プロモーターへの負の調節制御因子の検討 (中野桂子、中村浩淑 他) 第45回日本甲状腺学会総会 2002年11月20-22日 (日本内分泌学会雑誌 78 (2): 250, 2002 Abst #25)

H. 知的所有権の獲得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生労働科学研究補助金（特定疾患研究事業）
分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症の病態における転写共役因子の役割

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

甲状腺ホルモン不応症患者に発見された新規の変異甲状腺ホルモン受容体を用いて、変異受容体と転写共役因子との関係、特に負の制御系の障害における転写共役因子の影響について検討した。その結果、同一の変異受容体でも、正の刺激系と負の抑制系ではまったくその作用が異なることが明らかになった。また、その一因として転写共役因子との相互作用が関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症 (RTH) 例では TSH の分泌抑制機構が障害されるために過剰の甲状腺ホルモンが分泌され、各臓器のホルモン感受性に応じて様々な症状を呈する。多くは甲状腺ホルモン受容体 (TR) β の変異が原因である。今回、11歳女児の RTH 散発例に TR β AF2 領域の新たな一塩基置換である F455S 変異を発見した。AF-2 領域はコアクチベーターやコリプレッサーといった転写共役因子の作用に重要であると考えられている。一方、これまでの研究の多くは、RTH の変異 TR による正の刺激系の障害のみが検討されており、病気の本態である負の抑制系の障害については未解決の問題が多い。そこで、F455S 変異を用いて、変異 TR と転写共役因子との関係、特に負の制御系の障害における転写共役因子の影響について検討した。

B. 研究方法

野生型 TR (Wt)、F455S、E457A 変異 TR の発現ベクターを作製し、結合実験にて T3 結合

能を検討した。レポーター遺伝子 DR4TRE-Luc、Pal TRE-Luc、TRH-Luc と各 TR を CV-1 細胞に遺伝子導入し、転写活性化能、dominant negative 作用を検討した。また、GST pull-down 法及び EMSA を用いて、コアクチベーターである SRC-1 およびコリプレッサーである NCoR との結合能を検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子検査に当たっては患者及び家族より文書によるインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

- 1) 各 TR のリガンド結合能、DNA 結合能、二量体形成能は保たれていた。
- 2) F455S の転写活性化能は比較的保たれていたが、E457A では活性化能をほとんど認めなかった。
- 3) 正の刺激系における F455S の dominant negative 作用は E457A より軽度であった。
- 4) 甲状腺ホルモンにより負に制御される