

soma-tostatin, hydrocortisone, transferrin, glycyl-L-lysine, throtropin 存在下で培養した。

(3) 遺伝子導入動物の作成

TSHPR(-320/EGFP は C57B6 マウス前核胚 (200個) に導入し、その検出は PCR および Southern blot により行った。

C 結 果

(1) 甲状腺細胞 (FRTL-5) での TSHR 遺伝子プロモーター活性

FRTL-5 細胞を TSH 存在下に培養し、TSHPR(-320/EGFP, TgP/EGFP, pEGFP を各々 10 μ g/10⁶ cell に electroporation により遺伝子導入し、G418 にて選択し安発現株を得た。これらの GFP 蛍光活性を蛍光分計にて定量したところ、TSHPR(-320/EGFP は陰性コントロールである pEGFP の約15倍の蛍光強度を示し、TgP/EGFP の約 1/3 の強度であった。またこれらは蛍光顕微鏡下で十分観察可能であった。

FRTL-5 細胞を TSH 非存在下に 4 日培養し、10mU/ml の TSH を添加したところ、TgP/EGFP 導入 FRTL-5 細胞では GFP 蛍光が 3 日後約 2 倍に増加したか、TSHPR(-320/EGFP 細胞では 1/3 まで減少した。

以上より、TSHR 遺伝子プロモーター (-320bp は従来の報告とうり、甲状腺細胞特異的に発現し、かつ TSH による負の調節を受けることか判明した。

(2) TSHPR(-320/EGFP トランスジェニックマウスの樹立

TSHPR(-320/EGFP は C57B6 マウス前核胚 (200個) に導入し、42匹の子を得た。このうち tail DNA の PCR により導入か確認されたの

は 4 系統であった。これら F0 マウスより F1 の作成したところ、1 系統はキメラマウスであり、3 系統 (A, B, C系) のトランスジェニックマウスか樹立された。

(3) TSHPR(-320/EGFP トランスジェニックマウスの性質

A ~ C 系のマウスは顕著な外表奇形はなく、出生率の低下、成長の遅れも観察されなかった。甲状腺に関しても形状 重量についても陰性コントロールと比較して有意味な差は認めなかった。

これらの陽性動物の甲状腺、脂肪組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定後凍結切片を作成して、蛍光顕微鏡下に観察したところ、甲状腺、脂肪組織に有意な GFP 蛍光は観察されなかった。

さらに、これら動物に 0.3% メルカノールを飲水にて投与し、3 週後同様の観察を行ったか、やはり有意な GFP 蛍光の発現は認めなかった。

D. 考 察

今回 TSHR 遺伝子 minimal promoter region とされる -320 ~ -1bp の活性か細胞レベルでは十分であったにもかかわらず、in vivo レベル不十分であったことはこの領域に結合する転写因子か細胞と組織では異なる事を意味する。事実この領域に含まれる CRE と TTF-1 結合域の間には抑制因子の結合することか報告されており、細胞では組織に比しこの抑制因子か減少している、ないし組織でこの因子かより多量に存在する事か推定される。一方、大森らは TSHR 遺伝子の上流 -1.9Kb までを解析し、-800bp 付近にさらに TTF-1 結合部位か存在することを報告している。従って in vivo レベルでの TSHR 遺伝子の発現には、-320bp よりさ

らに上流域が必要である可能性が高く、現在我々は-10Kb までをクローニングし、その機能を解析中である。TSHR 遺伝子プロモーターに駆動される GFP が陽性細胞を in vivo で検出することは、ハセトウ病の甲状腺外症状の病態解析に重要であり、これらのトランスジェニックマウスの作成を計画している。

E. 結 論

従来報告されていた TSHR 遺伝子 minimal promoter region の活性は in vivo では不十分

あり、この領域を用いた解析は真にその発現を反映していないと推定された。より上流の配列を含めた解析が必要である。

F. 研究発表

Adenovirus-mediated transfer of thyroid transcription factor-1(TTF-1) induce radiiodine organification and retention in thyroid cancer cells Furuya F, Shimura H, Miyazaki A, Takai K, Ohta K, Haraguchi K, Onaya T, Endo T, Kobayashi T Endocrinology in press

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
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

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

甲状腺不応症は受容体異常症であり、甲状腺ホルモン受容体 (TR) が甲状腺にも発現していることから、異常TRが甲状腺自身にも影響している可能性がある。これを解明するために、強いトミナントネカティブ作用を発揮する異常 TR α 1(α F397X)あるいは β 1(β F451X)を甲状腺に特異的に発現したトランスジェニック (Tg) マウスの作成を試みた。それぞれ1系統ずつ Tg マウスのライン化に成功し、現在までに以下の結果を得た。① α F397X、 β F451X-Tg マウスとも出生可能で、奇形や胎内発育遅延を認めないが、授乳期から徐々に発育不良となった。②Tg マウスは血中 T3、T4 低値、TSH 高値を示し、原発性甲状腺機能低下症であった。③成育した Tg マウスの甲状腺は、軽度のひまん性甲状腺腫大を示した。甲状腺濾胞は扁平化した濾胞上皮細胞に囲まれ、コロイドが充満して拡大していた。④出生直後の Tg マウスは、濾胞形成が未発達で未熟な甲状腺組織像を示し、サイロクロフリンの発現は正常マウスに比し低下していた。しかし成育した Tg マウスでは、サイロクロフリンの発現は正常マウスと同等であった。⑤甲状腺特異的転写因子である TTF-1、Pax-8 の発現は、正常マウスと同等に認められた。以上の結果から、異常TRのトミナントネカティブ作用は、甲状腺濾胞形成、甲状腺ホルモン合成に抑制的に働くと考えられ、甲状腺不応症でも異常TRが甲状腺機能に障害的に作用している可能性がある。

A 研究目的

甲状腺ホルモン不応症は甲状腺ホルモン受容体 (TR) 遺伝子異常症であるか、TR は甲状腺組織自体にも発現していることから、異常TRが甲状腺機能にも何らかの影響を与えている可能性がある。これを明らかにするために、T3 結合能を喪失し強いトミナントネカティブ作用を持つ異常 TR α 1ないし β 1を甲状腺に特異的に発現させたトランスジェニックマウスを作成し、表現型の変化、甲状腺機能を調べた。

B 研究方法

不応症患者から同定した異常 TR β F451X、あるいは相同する変異を人為的に導入した α F397X の cDNA をサイロクロフリンプロモーターに組み込んだ導入遺伝子を作製した。発現産物を確認するために FLAG ペプチドを組み入れた。導入遺伝子を注入受精卵を偽妊娠マウスに移植し、PCR、Southern blot 解析で誕生したマウスの導入遺伝子の存在を確認した。マウスの血中 T3、T4、TSH を測定し、甲状腺組織を病理組織学的に検討した。

(倫理面への配慮) 本研究は浜松医科大学動物実験委員会の審査を経て実施された。

C 研究結果

1 α F397X-Tgマウス

1系統の F0- α F397X-Tg マウスから22匹のヘテロ接合体 F1-Tg マウスを得ることか出来た。出生時には奇形や胎内発育遅延を認めなかったか、授乳期から徐々に発育不良となり、体重測定可能な離乳期以降は Non-Tg 同腹仔に比し明らかな低体重を示した。成育 Tg マウスの血中総 T4、T3 は、ともに同月齢の Non-Tg マウスより有意に低下しており、T4 の低下は T3 の低下より顕著であった。成熟 F1- α F397X-Tg マウスの甲状腺はひまん性に軽度腫大し、組織所見は扁平化した濾胞上皮細胞で囲まれコロイトを充満した巨大濾胞が散在し、一部の濾胞腔では乳頭状細胞増殖を示していた。甲状腺における α F397X の発現は、FLAG に対する抗体を用いて免疫組織化学染色と Western blot 解析で確認した。サイログロフリン蛋白は、Tg マウスと Non-Tg 同腹仔甲状腺で同等に発現しており、Tg マウス甲状腺では拡大化した濾胞腔内にも、未熟な娘濾胞の集塊と考えられる乳頭状の細胞増殖を有する濾胞腔内にも認められた。

F1-Tg マウスからホモ接合体 Tg マウスの作成を試みたが成功せず、甲状腺機能低下症のため、F2-Tg マウスも極少数しか誕生しなかった。

2 β F451X-Tg マウス

低体重と甲状腺組織変化を示した1匹の F0- β F451X-Tg マウスから、現在までに14匹の F1-Tg マウスを得た。F1- α F397X-Tg マウス

と同様に、出生時には奇形や胎内発育遅延を認めないものの、授乳期から発育障害が顕著となった。成熟 Tg マウスの甲状腺所見は、肉眼的にも病理組織学的にも α F397X-Tg マウスと極めて類似しており、左右両葉全体に扁平化した濾胞上皮細胞で囲まれコロイトを充満した拡大濾胞の形成を示した。Western blot で解析したサイログロフリン蛋白、TTF-1、Pax-8 の発現量は Non-Tg 同腹仔と差はなかった。一方、出生直後の F1-Tg マウスでは、濾胞形成の不十分な未熟な濾胞上皮細胞の集塊像を呈した。サイログロフリン蛋白は、Non-Tg 同腹仔の甲状腺では濾胞腔内コロイトに一致して全体に均一に存在するのに対し、Tg マウスでは全体に発現が低下していた。やはり F1-Tg メスマウスの妊孕能は非常に低く、ホモ接合体 F2-Tg マウスの作成は不可能である。

D 考察

同一の異常を持つ異常 TR α 1 と β 1 をそれぞれ甲状腺に特異的に発現させたトランスノエニクマウスを作成したところ、共通して以下のような変化が甲状腺に認められた。①胎生145日からの異常 TR 発現では、胎生期に致死的とならず、胎生期の発育障害も来さない、②出生後より体重増加不良をきたし、原発性甲状腺機能低下症をきたす、③成熟 Tg マウスでは、扁平化した濾胞上皮細胞に囲まれコロイトを充満し拡大化した濾胞を形成するか、サイログロフリンの発現は正常である。④甲状腺の発育に重要な TTF-1、Pax-8 は正常に発現している。

吸収空胞のない充満したコロイトや又の低い濾胞上皮細胞からなる濾胞は、活動性の低下した甲状腺を示している。甲状腺ホルモンの低ト

や体重増加不良を考え合わせると、トミナントネカティブ作用を発揮する異常 TR α 1、 β 1 の胎生 14 5 日からの甲状腺での発現は、甲状腺ホルモンの合成を阻害する方向に働くと考えられる。 α F397X-Tg マウスと β F451X-Tg マウスの表現型、甲状腺組織所見が極めて類似していたことは、異常 TR α 1 と β 1 は同一の機序で甲状腺に障害をもたらすのであろう。

甲状腺における異常 TR の作用は、もしヨートの有機化障害など甲状腺ホルモン合成阻害にあるのなら、甲状腺濾胞は立方～円柱状の丈の高い濾胞上皮細胞で囲まれ、濾胞腔は狭小化、コロイトは渇乏することか予測される。おそらく異常 TR は、単にヨートの取り込みや有機化を障害するだけではなく、甲状腺濾胞形成のものにも障害を与えるのであろう。TTF-1、TTF-2、Pax-8 は甲状腺原基の出芽、前頸部への移動、濾胞上皮細胞の機能的分化、増殖に重要な役割を果たす因子である。TTF-1 と Pax-8 の発現量を Western blot 解析で調べたところ、Tg マウスとコントロールで差は見られなかった。甲状腺が正常に位置し、むしろ軽度のひまん性腫大を呈したことからも、胎生期における甲状腺原基の形成、前頸部への移動には障害はないと考えられる。

異常 TR α の原型ともいえる癌遺伝子 v-erbA を全身に過剰発現したマウスでは、血中甲状腺ホルモンが低下し、甲状腺濾胞は扁平な濾胞上皮細胞で囲まれ、コロイトが充満して拡大し、一部の濾胞腔内には剥離細胞塊を認めたと報告されている (Barlow et al EMBO J, 1994)。また TR α 2 ノックアウトマウスでも、TR α 1 が過剰発現し、血中甲状腺ホルモンは低下、甲状腺濾胞は径が不均一で、扁平な濾胞上皮細胞で囲まれ、コロイトが充満して拡大していた

(Salto et al Mol Endocrinol 2001)。興味深いことに、これらのマウスでの甲状腺変化は、我々が作成した Tg マウスの所見と非常に類似したものである。おそらく、リカントの結合していない TR や異常 TR が発揮するサイレンシク作用が、甲状腺に重篤な障害をもたらすのであろう。甲状腺ホルモン不応症でも、異常 TR が甲状腺機能に抑制的な影響を及ぼしている可能性が考えられる。

E 結 論

トミナントネカティブ型異常 TR の甲状腺における過剰発現は、甲状腺濾胞形成、甲状腺ホルモン合成に阻害的に働き、甲状腺機能低下症をきたす。甲状腺ホルモン不応症においても異常 TR β が甲状腺機能に影響している可能性がある。

F. 健康危険情報

本研究において、健康を害する危険性は無い。

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 Biochem J 378 549-557, 2004

Nishiyama K, Baba S, Yamada T, Matsushita A, Natsume H, Nakano K, Sasaki S, Nakamura H Embryonic lethal effect of expressing a

dominant negative mutant human thyroid hormone receptor $\alpha 1$ in mice Endocrine J 50 561-570, 2003

Natsume H, Sasaki S, Kitagawa M, Kashiwabara Y, Matsushita A, Nakano K, Nishiyama K, Nagayama K, Misawa H, Nakamura H Beta-catenin/Tcf-1-mediated transactivation of cyclin D1 promoter is negatively regulated by thyroid hormone Biochem Biophys Res Commun 309 408-413, 2003

Yokomura K, Suda Y, Sasaki S, Inui N, Chida K, Nakamura H Increased expression of the 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase gene in alveolar macrophages of patients with lung cancer J Clin Endocrinol Metab 88 5704-5709, 2003

中村浩淑 甲状腺ホルモン不応症の診断と治療 よくわかる甲状腺疾患のすべて 水井書店、2003、p256-260

中村浩淑 甲状腺ホルモン不応症の動物モデル 最新医学 58(7) 1671-1678, 2003

西山孝三、中村浩淑 甲状腺ホルモンによる情報伝達機構 内分泌 糖尿病科 18(2) 130-137, 2004

2 学会発表

Analysis of transgenic mice expressing a dominant negative mutant thyroid hormone receptor in thyroid (Nakamura H et al) 第26

回欧州甲状腺学会 (Edinburgh, UK) Topic highlights 2003年10月

GATA2 is Essential to mediate the negative regulation of TSH alpha subunit gene by T3 and T3 receptor (Sasaki S, Nakamura H et al) 第75回米国甲状腺学会 (Palm Beach, FL, USA) 2003年9月

Functional analysis of transgenic mice expressing a dominant negative mutant human thyroid hormone receptor alpha1, alpha F397X, in mouse thyroid (Nishiyama K, Nakamura H et al) 第10回国際分子甲状腺シンポジウム (松本) 2003年4月

甲状腺ホルモン不応症の診断と治療 (中村浩淑) 日本医学会総会総会 2003年4月 (福岡)

マウス甲状腺における異常ヒト甲状腺ホルモン受容体 $\alpha 1$ の発現とその機能解析 (西山孝三、中村浩淑 他) 第76回日本内分泌学会総会 2003年5月9~11日 (日本内分泌学会雑誌 79(1) 125, 2003 Abst #3)

トミナントネガティブ作用を発揮する異常甲状腺ホルモン受容体のマウス甲状腺における機能解析 (西山孝三、中村浩淑 他) 第46回日本甲状腺学会 2003年11月19~21日 (日本内分泌学会雑誌 79(2) 309, 2003 Abst #13)

G 知的所有権の取得状況

- | | |
|----------|----|
| 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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症の分子機構

分担研究者 森 昌朋 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科 教授

研究要旨

甲状腺ホルモン不応症の本態である転写抑制系の障害において、クロマチン構造変化が果たす役割を検討した。転写抑制系において甲状腺ホルモン添加によりヒストン脱アセチル化酵素の結合とヒストンの脱アセチル化が生じてクロマチン構造が変化し転写が抑制された。変異甲状腺ホルモン受容体存在下ではヒストンの脱アセチル化によるクロマチン構造変化が障害されることが判明した。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症 (RTH) 例では甲状腺ホルモン受容体 (TR) β の変異により 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。これまでの研究の多くは変異 TR による正の刺激系の障害のみが検討されており、病態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。一方、TR による転写機構においてはヒストンのアセチル化、脱アセチル化によるクロマチン構造の変化が重要な役割を果たしているか、特に抑制系においてその詳細は不明である。そこで、RTH 患者に認められた F455S 変異 TR を用いて、クロマチン構造を保った転写抑制系のモデルを確立し、負の制御系の障害におけるクロマチン構造変化の影響について検討した。

B. 研究方法

クロマチン構造を保った転写抑制系のモデルとしてレポーター遺伝子 TRH-Luc と野生型

(Wt) 及び F455S 変異 TR を恒常的に発現する GH4C1 細胞を樹立した。この系にてヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 Trichostatin A (TSA) の影響を検討した。また、ChIP アッセイを用いてヒストンのアセチル化や HDAC の動態を検討した。

(倫理面への配慮)

細胞系であり該当しない。

C. 研究結果

樹立した細胞系において TSA は TRH プロモーターの T3 による転写抑制を阻害し、転写抑制がヒストン脱アセチル化によって生じることが判明した。ChIP アッセイにて、TRH プロモーターのヒストン 3、4 は基底状態でアセチル化されており、T3 添加によって15分以内に HDAC2、3 の結合とヒストン脱アセチル化が生じて転写が抑制されることが明らかになった。F455S 存在下では HDAC 結合とヒストン脱アセチル化が著明に障害され、RTH におけ

る転写抑制の障害の原因と考えられた。

D. 考 察

今回の結果から、T3 による転写抑制系においては、基底状態でヒストンがアセチル化されており、T3 によって HDAC 結合とヒストン脱アセチル化が生じて転写が抑制されることか判明した。RTH 患者では変異 TR の存在により HDAC 結合とヒストン脱アセチル化が障害され、転写が抑制されなくなると考えられた。

E. 結 論

甲状腺ホルモン不応症 (RTH) の本態である抑制系の障害は、ヒストン脱アセチル化によるクロマチン構造の変化の異常が原因であることが明らかになった。RTH は「クロマチン構造病」であるといえる。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

論文発表

Monden T, Yamada M, Ishu S, Hosoya T, Satoh T, Wondisford FE, Hollenberg AN, Mori M Leucine at codon 428 in the ninth heptad of thyroid hormone receptor beta1 is necessary for interactions with the transcriptional cofactors and functions regardless of dimer formations *Thyroid* 2003 13(5) 427-35

学会発表

1 Shibusawa N, Hashimoto K, Yamada M, Wondisford FE, Mori M DNA-binding function of thyroid hormone receptor-b in mice 10th

International Symposium on Molecular Thyroidology

2 Satoh T, Tomaru T, Ishizuka T, Hashimoto K, Nihei Y, Ishu S, Monden T, Yamada M, Mori M Negative regulation of the mouse TRH gene by thyroid hormone requires direct interaction between leader binding protein-1 and the DNA-binding domain of thyroid hormone receptor 85th Annual Meeting of the Endocrine Society

3 Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Monden T, Hashida T, Ishu S, Tomaru T, Nihei Y, Mori M, Wondisford FE The role of the unliganded thyroid hormone receptor in cholesterol metabolism 85th Annual Meeting of the Endocrine Society

4 橋本貢士、山田正信、佐藤哲郎、門伝剛、橋田哲、石井角保、登丸琢也、二瓶康代、Wondisford FE、森昌朋 コレステロール代謝における甲状腺ホルモン受容体 (TR) β Δ 337T 変異体と LXR α とのクロストーク 第76回日本内分泌学会学術総会

5 石井角保、山田正信、橋田哲、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 新たな変異甲状腺ホルモン受容体による TRH 遺伝子発現機構 第76回日本内分泌学会学術総会

6 橋田哲、山田正信、二瓶康代、登丸琢也、石井角保、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 TRH により制御される新たな脳内ペプチド MDP1 の解析 第76回日本内分泌学会学術総会

7 沢沢信行、橋本貢士、橋田哲、山田正信、Wondisford FE、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体 TR β DNA-binding domain 変異体 (GS125TR β) ノックインマウスの作成と解析 第76回日本内分泌学会学術総会

8 佐藤哲郎、登丸琢也、橋本貢士、門伝剛、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体(TR)による TRH 遺伝子転写抑制機構の解析

第76回日本内分泌学会学術総会

9 橋本貢士、梅沢良平、二瓶康代、登丸琢也、石井角保、橋田哲、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体(TR)によるマウス SREBP1-c 遺伝子制御機構の解析 第46回日本甲状腺学会

10 門伝剛、二瓶康代、登丸琢也、石井角保、橋田哲、森昌朋 甲状腺ホルモンの甲状腺ホルモンレセプターの新たなコアクチベーター SCRT (Small Coactivating Protein of TR) の機能解析 第46回日本甲状腺学会

11 森昌朋、橋本貢士、橋田哲、山田正信、Wondisfort FE、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体 TRb DNA 結合ドメイン変異体 (GS125TRb) ノックインマウスにおける甲状腺ホルモン調節 第46回日本甲状腺学会

12 佐藤哲郎、登丸琢也、橋本貢士、門伝剛、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体(TR)による TRH 遺伝子転写抑制における histone deacetylase の役割 第46回日本甲状腺学会

13 石井角保、山田正信、森昌朋、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 クロマチン構造の変化による TRH 遺伝子発現制御機構の解明 第46回日本甲状腺学会

14 梅沢良平、山田正信、石井角保、橋田哲、登丸琢也、二瓶康代、森昌朋、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 TRAP220 の甲状腺ホルモンの負の遺伝子制御機構における役割 第46回日本甲状腺学会

15 山田正信、橋本貢士、森昌朋、石井角保、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 甲状腺ホルモン不応性の分子機構 第45回日本甲状腺学会シンポジウム

16 森昌朋、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 小脳 Purkinje 細胞の発達における TRb の役割 第30回日本神経内分泌学会

17 橋田哲、山田正信、森昌朋、橋本貢士、門伝剛、森昌朋 TRHにより制御される新たな脳内ペプチド MDP1 の解析 第30回日本神経内分泌学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

甲状腺ホルモン受容体を介した non-genomic action と
甲状腺ホルモン不応症：
カルシニューリン阻害蛋白 ZAKI-4 α の発現調節

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

研究要旨

我々は、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて甲状腺ホルモン応答性遺伝子 ZAKI-4 をクローニングした (J Biol Chem, 1996)。次いで脳組織から抽出した RNA を用いてそのトランスクリプトを詳細に検討し、ZAKI-4 遺伝子の構造を明らかにすると共に、その蛋白産物がカルシニューリンと結合し、その活性を抑制することを明らかにした。更に、同一遺伝子から産生される α 、 β のアイソフォームの中で、 α アイソフォームのみが甲状腺ホルモンにより増加すること、その発現の主要部位が脳であることを報告した (Biochem J, 2002, Endocrinology, 2001)。本研究では、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて甲状腺ホルモンによる ZAKI-4 α の増加が、mTOR (mammalian target of rapamycin, a serine-threonine kinase) の特異的阻害剤 rapamycin により阻害されることを明らかにし、更に 1) 甲状腺ホルモンが mTOR の磷酸化を介して活性化すること、2) この活性化は蛋白合成阻害剤による抑制を受けないこと、3) 活性化が極めて短時間に誘導されることを明らかにした。これらの結果は、甲状腺ホルモンによる mTOR の活性化が nongenomic action であることを強く示唆した。この nongenomic action には甲状腺ホルモン受容体が必要とされることも甲状腺ホルモン不応症を引き起こす変異甲状腺受容体 (G345R) を発現するアデノウイルスを用いて明らかにした。mTOR は、種々の因子の磷酸化を介し、細胞増殖などを制御している。従って、甲状腺ホルモン不応症の発症にこれまで報告されることの無かった nongenomic action が関わる可能性が示された。

A. 研究目的

我々は、mRAN differential display 法を用い、ヒト皮膚線維芽細胞より甲状腺ホルモン応答性遺伝子として ZAKI-4 cDNA をクローニングした (J Biol Chem, 271: 14567, 1996)。近年、ZAKI-4 に相同性を有する一群の遺伝子が同定され、ヒトでは DSCR1 (Down's syndrome candidate region)、ZAKI-4 (DSCR1L1)、

DSCR1L2 が報告されている。これらの遺伝子産物のカルホキシル端がよく保存され、DSCR1 はこのC端を介してカルシニューリン (CN) と結合し、その活性を抑制することが報告された。しかしながら、ZAKI-4 遺伝子産物の機能に関しては報告されていない。

CN はカルシウム-カルモジュリンにより活性化されるセリン-スレオニン脱水素

てあり、酵素活性を持つ A サフユニットと調節サフユニット B からなっている。1991年、免疫抑制剤であるシクロスポリン A (CsA) と FK506 か、それぞれシクロフィリン A (cyclophilin A)、FK506-binding protein (FKBP) と結合し、CN と複合体を形成することによりその活性を抑制することか明らかにされた。一方、CN は転写因子 NF-AT (nuclear factor of activated T cell) を脱リン酸化により活性化し、T 細胞を活性化することも明らかにされ、免疫抑制剤は、NF-AT の活性化を抑制をし、その作用を発揮することか示された。CN は生体に広く分布し、T細胞の活性化の他、神経の可塑性に関わる長期増強 (long-term potentiation = LTP) や長期抑制 (long-term depression = LTD) を制御していることや神経細胞のアポトーシス、心筋あるいは骨格筋の肥大にも関与していることも明らかにされつつある。従って、内因性 CN 抑制蛋白は、生体の種々の臓器の機能調節に重要な役割を果たしていると考えられる。甲状腺ホルモンによる ZAKI-4 遺伝子の発現調節機序の解明は、このホルモンによるカルシニューリンを介した新たな作用を明らかにすると共に、甲状腺ホルモン不応症 (Resistance to Thyroid Hormone = RTH) の病態解明に役立つと考えられる。

我々は、ヒト ZAKI-4 遺伝子の構造を明らかにし、2つのアイソフォーム ZAKI-4 α と ZAKI-4 β コートすること、両アイソフォームが共に CN 活性を抑制することを明らかにした (Biochem J, 367 459, 2002)。更に、各アイソフォームが組織特異的に発現していること、甲状腺ホルモンが α アイソフォームのみを増加することを明らかにした (Biochem J, 367 459, 2002)。近年、ZAKI-4 遺伝子ファミリーの1つ

である DSCR1 の発現が CN の活性化により増加することか報告された (Circ Res, 87 E61 2000)。そこで我々は、CN が甲状腺ホルモンによる ZAKI-4 α アイソフォームの増加に CN の活性化か関わっているか否かを検討するため、CN の抑制剤 FK506 とそのアナログ rapamycin を用いた検討を行った。その結果、ZAKI-4 α の発現増加は FK506 によっては抑制されず、rapamycin により抑制されることが明らかにされた。Rapamycin はセリノスレオニンキナーゼである mTOR (mammalian target of rapamycin) の特異的阻害剤として知られる。従って、甲状腺ホルモンは CN の活性化ではなく、mTOR の活性化により ZAKI-4 α の発現を増加させることか推測された。本研究では、甲状腺ホルモンによる mTOR 活性化機序とこの活性化に甲状腺ホルモン受容体 (TR) が関与していることを明らかにした。

B. 研究方法

1 甲状腺ホルモンによる ZAKI-4 遺伝子発現調節

正常および甲状腺ホルモン不応症 (RTH) 患者から得られた皮膚線維芽細胞を甲状腺ホルモンを除く処置をした牛胎児血清を 5% 含む培地で 2 日間培養した後、 10^{-8} M の T3 を添加し更に 12 時間培養し、RNA を抽出した。Real time PCR 法およびノーサンブロット法を用いて ZAKI-4 α 、 β mRNA を検出した。各 mRNA 量は GAPDH mRNA 量により補正した。FK506 (1 μ M) と rapamycin (10 μ M) は、T3 添加 30 分前に培養液に添加した。

2 甲状腺ホルモンによる mTOR の磷酸化

ヒト皮膚線維芽細胞を甲状腺ホルモンを除去

した牛胎児血清を5%含む培地で24時間培養した後、 10^{-8} MのT3を添加し、経時的に細胞を採取し、蛋白を抽出した。同量の蛋白(40 μ g)を75%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、Western blot法を用いて燐酸化mTORとp70^{S6} kinase (p70^{S6K})を検出した。Rapamycin (10 μ M)あるいはサイクロヘキソミド(CHX)はT3添加30分前に培養液中に加えた。Western blotには、抗mTOR抗体(燐酸化の有無に関わらずmTORを認識する抗体)、抗燐酸化mTOR抗体(S2448の燐酸化を認識)、抗燐酸化p70^{S6K}抗体(T389の燐酸化を認識)を用いた。

3 ミナントネカティブTRによるT3依存性のmTOR活性化の阻害

正常TR β および強いトミナントネカティブ作用を発揮するTRG345R(TR β の345番目のクリニンカアルキニンに置換されたmutant)を発現するアデノウイルスベクターを用いた。ヒト皮膚線維芽細胞を90%confluenceまで培養し、無血清培地DMEMに各々のアデノウイルス(MOI 200)を感染させ、1時間後甲状腺ホルモンを除去した牛胎児血清を含む培養液で2日間培養した。その後、T3(10^{-8} M)を添加し30分後に細胞を採取し、蛋白を抽出した。mTORの活性化は上述の如くWestern blot法により検討した。Green Fluorescent Protein(GFP)を発現するアデノウイルスベクターを構築し、最も適当なMOIを検討すると共にコントロールとして用いた。

C. 結 果

1 RTH患者の皮膚線維芽細胞ではT3によるZAKI-4 α の増加が認められない

図1に示した如く、2人の健常者から得られ

た皮膚線維芽細胞ではT3の濃度依存性にZAKI-4 α mRNAの増加が認められ、 β mRNAの増加は認められなかった。この結果は、既報(Biochem J, 367:459, 2002)と合致する。一方、TR β 遺伝子異常(TRG345RあるいはTRA317T)を有するRTH患者からの皮膚線維芽細胞ではT3依存性のZAKI-4 α mRNAの増加は認められない。この結果は、甲状腺ホルモン不応症の病態形成にT3依存性のZAKI-4 α mRNA増加の欠如が関わっている可能性を示唆している。

2 T3依存性のZAKI-4 α mRNA増加はrapamycinより抑制される

図2に示す如く、正常皮膚線維芽細胞では、T3依存性のZAKI-4 α mRNAの増加はFK506の添加により何ら影響を受けないか、rapamycinの添加により著しく抑制された。この結果は、T3依存性のZAKI-4 α mRNAの増加にmTORの活性化が必要とされることを示唆している。これまで、甲状腺ホルモンがmTORを活性化するという報告は認められず、以下にその活性化機構を検討した。

3 T3はS2448の燐酸化によりmTORを活性化する

mTORの活性化には2つのセリン残基、S2481とS2448の燐酸化が重要とされている。S2481の燐酸化は、mTOR自身による自己燐酸化によるとされている。そこで、T3がS2448の燐酸化を介してmTORを活性化するか否かを抗S2448燐酸化mTOR抗体を用いて検討した。活性化の確認にはmTORの基質p70^{S6K}の燐酸化(T389)を指標とした。

図3に示す如く、T3はmTORのS2481の燐

酸化を誘導し、この燐酸化は rapamycin により完全に抑制された。mTOR の S2448 の燐酸化は、p70^{S6K} の燐酸化 (T389) を伴い、mTOR が T3 により活性化されることか示された。

4 T3 の nongenomic action による mTOR の燐酸化

図 4 A に示す如く、T3 により mTOR の S2448 の燐酸化は30分から認められ、12時間まで持続した。そこで、30分以内の短時間で T3 による S2448 の燐酸化か誘導されるか否かを検討すると、T3 は10分で既に燐酸化を誘導し、この燐酸化は p70^{S6K} の燐酸化 (T389) を伴っていた (図 4 B)。T3 による mTOR の燐酸化は図 4 C に示す如く、CHX の添加により抑制されず、この T3 作用に de novo の蛋白質合成か必要とされないことか示された。以上の結果は T3 が転写を介すること無く、mTOR を活性化することを示し、いわゆる T3 の nongenomic action か示された。

5 T3 による mTOR の活性化には TR が必要とされる

近年、T3 が標的遺伝子の転写調節を介さず作用する nongenomic action を示すことか明らかにされつつある。しかしながら、T3 の nongenomic action に TR が必要か否かは明らかにされていない。そこで T3 依存性の mTOR の活性化に TR が必要とされるか否かをトミナントネカティブ変異 TR(G345R) を用いて検討した。TRG345R は TR のリカント結合ドメインのアミノ酸置換によりホルモン結合能を欠き、正常の TR 機能を強く抑制するトミナントネカティブ作用を発揮する。皮膚線維芽細胞にコントロール (ADGFP)、正常 TR(wild type)、

変異 TR(G345R) を MOI 200 にて感染し、1時間後甲状腺ホルモンを除去した牛胎児血清を含む培養液で2日間培養した後 T3 (10⁻⁸M) を添加し30分後に細胞を採取し、蛋白を抽出した。図 5 に示す如く、コントロール (GFP) と wild type TR 発現アテノウィルスの感染により、T3 による mTOR の活性化は影響を受けなかったか、TRG345R の発現により T3- 依存性の mTOR の S2448 の燐酸化は著しく抑制された。この結果は、nongenomic action による mTOR の活性化に T3 と結合した TR が必要とされることを強く示唆するものと考えられた。

D. 考 案

甲状腺ホルモンの作用は、genomic action と称され、核内受容体を介する標的遺伝子の転写調節により発揮されると考えられてきた。しかしながら転写調節を介することなく T3 が作用を発揮する nongenomic action も細胞機能に重要な役割を果たしていることか報告されるようになってきた。細胞内蛋白移送、細胞骨格、protein kinase C, mitogen-activated protein kinase などが T3 の nongenomic action により調節されていることか報告されている。

本研究では、T3 が nongenomic action により mTOR を活性化し、その活性化に T3 と結合した TR が必須であることを世界に先駆けて初めて示した。

E. 結 論

甲状腺ホルモンは、内因性 CN 阻害蛋白である ZAKI-4 α の発現を増加する。更に、ZAKI-4 α は、ヒト皮膚線維芽細胞のみならず脳に広汎に発現している。一方、CN は、神経細胞の可塑性、アポトーシスに重要な役割を果たすこと

から、甲状腺ホルモンは、ZAKI-4 α の調節を介して中枢神経系の発育 発達に重要な役割をはたしていることが推測された (Current Opinion in Endocrinology & Diabetes, 10 357 2003)。

本年度の研究では、甲状腺ホルモンによる ZAKI-4 α の調節には TR を介した mTOR の活性化が必要であり、この活性化は T3 の non-genomic action によることか示された。T3 による mTOR 活性化機序の検討はこれまで報告されたことか無く、新たな甲状腺ホルモンの作用機序を提示することかてきた。TR 遺伝子異常により起因する RTH の発症に mTOR 活性化障害か関与している可能性か示された。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1 SADOW PM, KOO E, CHASSANDE O, GAUTHIER K, SAMARUT J, XU J, O'Malley BW, SEO H, MURATA Y, WEISS RE Thyroid hormone receptor-specific interactions with steroid receptor coactivator(SRC)-1 in the pituitary Molecular Endocrinology, 17(5) 882-894, 2003
- 2 CAO X, SEO H Thyroid hormone-dependent regulation of ZAKI-4 α , an inhibitor of calcineurin, and its implication in brain development and function Current Opinion in Endocrinology & Diabetes, 10(5) 357-363, 2003
- 3 MURAKAMI R, KAMBE F, MITSUYAMA H, OKUMURA K, MUROHARA T, NIWATA S, YAMAMOTO R, SEO H Cyclosporin A Enhances Interleukin-8 Expression by Inducing Activator Protein-1 in Human Aortic Smooth Muscle Cells Arterioscl Thromb Vasc Biol, 23(11) 2034-2040, 2003
- 4 MITSUYAMA H, KAMBE F, MURAKAMI R, CAO X, ISHIGURO N, SEO H Calcium signaling pathway involving calcineurin regulates interleukin-8 gene expression through activation of NF- κ B in human osteoblast-like cells Journal of Bone and Mineral Research, in press,
- 5 IWATA H, ITOH T, SAKANO S, SUGIURA H, KAWAMURA M, MURATA Y, SEO H Is bone matrix still important substitute for bone graft surgery-from point of view of heat and MBP activity Bone, 32(5) S120(Suppl), 2003
- 6 OHMORI S, KANDA K, MITSUYAMA H, MIYAZAKI T, CAO X, KAMBE F, SEO H Tail-suspension induces altered expression of GAPDH and ZAKI-4 β mRNAs in rat hindlimbs Implication for disuse muscle atrophy Environmental Medicine, 47 15-19, 2003
- 7 HATTORI K, HAYANO S, SEO H Expression of ZAKI-4 in mammalian cells Environmental Medicine, 47 13-14, 2003
- 8 KOBAYASHI H, IMAI T, KAMBE F, MIRZA R, SEO H Effect of ACTH on the proliferation of the rat adrenal gland Environmental Medicine, 47 20-21, 2003
- 9 ZADWORNÝ D, SARKAR D, IMAI T, MIRZA R, KAMBE F, SEO H The involvement of 3 β -hydroxysterol- Δ^{21} -reductase, a post-squalene enzyme in cholesterol biosynthesis, in desmosterolosis Environmental Medicine, 47 1-11, 2003

2 学会発表

- 1 CAO X, LEE J-K, MOELLER LC, KAMBE F,

- HAYASHI Y, REFETOFF S, SEO H Thyroid hormone receptor-mediated regulation of ZAKI-4 α Expression involves the activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) A novel mechanism of TH action 第10回国際分子甲状腺学シンポジウム, 2003, 4 (松本)
- 2 光山浩人, 神部福司, 村上隆一郎, 石里直樹, 妹尾久雄 カルシニューリン (CN) を介した NF- κ B の活性化による IL-8 遺伝子発現誘導 竹芽細胞様細胞 HOS-TE85 を用いた検討 第76 回日本内分泌学会 (HOT TOPICS), 2003, 5 (横浜)
- 3 曹 霞, 李鐘国, MOELLER LC, 神部福司, REFETOFF Samuel, 妹尾久雄 Activation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by thyroid hormone (TH) Involvement of in the activation of ZAKI-4 gene 第76回日本内分泌学会, 2003, 5 (横浜)
- 4 MITSUYAMA H, KAMBE F, MURAKAMI R, CAO X, ISHIGURO N, SEO H Calcium signaling pathway involving calcineurin regulates IL-8 gene expression through activation of NF- κ B in human osteoblast-like cells The Endocrine Society's 85th Annual Meeting, 2003, 6 (Philadelphia, USA)
- 5 MURAKAMI R, KAMBE F, MITSUYAMA H, OKUMURA K, NIWATA S, YAMAMOTO R, SEO H Cyclosporin A enhances IL-8 expression by inducing AP-1 in human aortic smooth muscle cells The Endocrine Society's 85th Annual Meeting, 2003, 6 (Philadelphia, USA)
- 6 WAKABAYASHI K, KAMBE F, MITSUYAMA H, MURAKAMI R, YOSHIDA J, SEO H IL-8 gene expression in human glioma U251MG cells is regulated by calcium signaling pathway through activation of NF- κ B The Endocrine Society's 85th Annual Meeting, 2003, 6 (Philadelphia, USA)
- 7 KAMBE F, CAO X, OHMORI S, SEO H Oxidoreductive modification of two cysteine residues in paired domain of Pax-8 regulates its DNA-binding activity The Endocrine Society's 85th Annual Meeting, 2003, 6 (Philadelphia, USA)
- 8 CAO X, LEE J-K, MOELLER LC, KAMBE F, HAYASHI Y, REFETOFF S, SEO H Thyroid hormone receptor-mediated regulation of ZAKI-4 α expression involves the activation of P13K and mammalian target of rapamycin (mTOR) The Endocrine Society's 85th Annual Meeting, 2003, 6 (Philadelphia, USA)
- 9 服部公彦, 曹 霞, 神部福司, 妹尾久雄 内因性カルシニューリン抑制タンパク質 ZAKI-4 アイソフォームの異なる発現制御機構 第21回内分泌代謝学セミナー, 2003, 7 (神奈川)
- 10 若林健一, 神部福司, 齋藤 清, 吉田 純, 妹尾久雄 glioma増殖因子としての IL-8 の発現調節機序 Ca signalingによる IL-8 の発現促進と Cyclosporin A による抑制 第62回日本脳神経外科学会総会, 2003, 10 (仙台)

11 史 裕茜, 李 鍾国, 長屋 敬, 三輪佳子, 安月健二, 神谷香一郎, 妹尾久雄, 児上逸雄
アミオタロン活性代謝産物 (desethylamiodarone) の心筋活動電位延長作用 甲状腺ホルモン受容体を介した遺伝子転写調節の関与 第8回アミオタロン研究会, 2003, 9 (東京)

12 曹 霞, 神部福司, 服部公彦, MOELLAR LC, REFETOFF S, 妹尾久雄 Thyroid hormone-dependent ZAKI-4_α induction requires activation of PI3K-Akt/PKB-mTOR signaling cascade 第46回日本甲状腺学会, 2003, 11 (名古屋)

13 服部公彦, 曹 霞, 神部福司, 妹尾久雄
内因性カルシニューリン(Cn)抑制タンパク質 ZAKI-4アイノフォームの異なる発現制御機構

第46回日本甲状腺学会, 2003, 11 (名古屋)

14 水野 豊, 加納安彦, 今井昂夫, 妹尾久雄, 村田善晴 マウスZAKI-4アイノフォームcDNAのクローニングとそのin vivoでの発現に及ぼす甲状腺ホルモンの作用 第46回日本甲状腺学会, 2003, 11 (名古屋)

15 CAO X, KAMBE F, MOELLAR LC, REFETOFF S, SEO H Thyroid hormone-dependent ZAKI-4_α induction requires activation of PI3K-PKB-mTOR Signaling cascade 7th Asia and Oceania Thyroid Association Congress, 2003, 12 (Singapore)

G 知的所有権の獲得状況

1 特許取得 なし

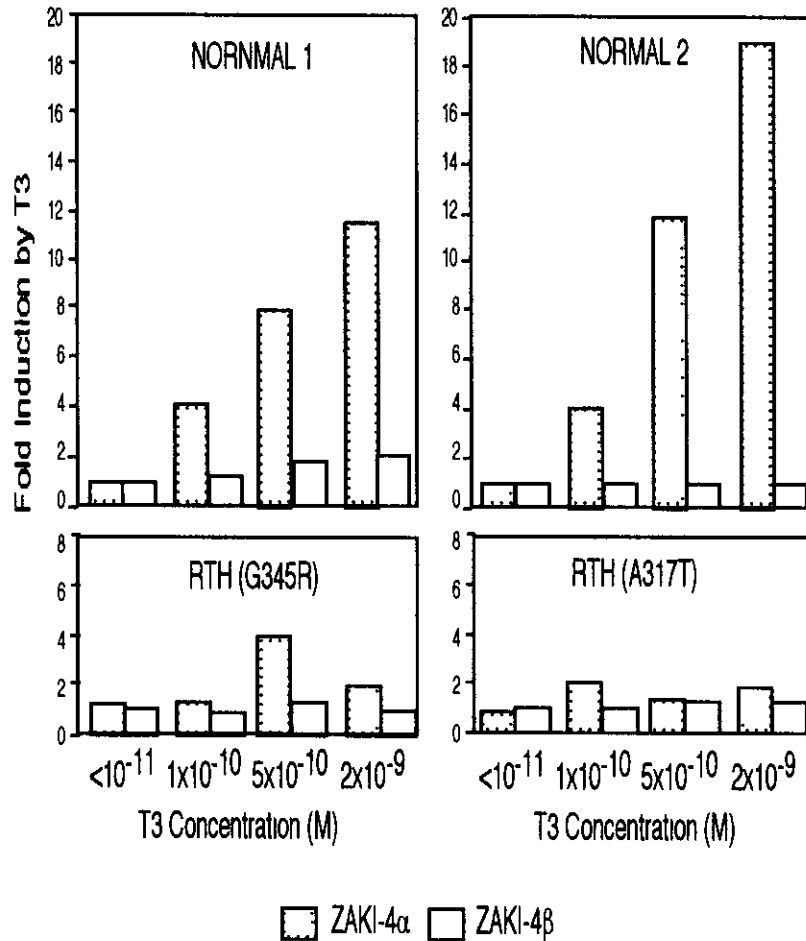


図1 正常および甲状腺不応症患者の皮膚線維芽細胞における T3 の ZAKI-4 α 、 β mRNA 発現に対する効果

皮膚線維芽細胞は、T3 を除去した 5%DMEM において48時間培養後 T3 (10^{-8} M) を添加し、12時間後に RNA を抽出し、real time PCR 法により ZAKI-4 α 、 β mRNA を定量した。

2人の健常者から得られた皮膚線維芽細胞では T3 の濃度依存性に ZAKI-4 α mRNA の増加が認められ、 β mRNA の増加は認められなかった。この結果は、既報 (Biochem J367 459, 2002) と合致する。一方、TRb 遺伝子遺伝子異常 (TRG345R, TRA317T) を有する甲状腺ホルモン不応症患者からの皮膚線維芽細胞では T3 依存性の ZAKI-4a mRNA の増加は認められないなかった



図2 皮膚線維芽細胞において T3-依存性の ZAKI-4 α mRNA 増加は FK506 ではなく rapamycin により抑制される

皮膚線維芽細胞は、T3 を除去した 5%DMEM において48時間培養後 T3 (10^{-8} M) を添加し、12時間後に RNA を抽出し、Northern blot 法により ZAKI-4 α 、GAPDH mRNA を検出した。T3-依存性の ZAKI-4 α mRNA の増加は、CN 抑制剤 FK506 によっては影響を受けなかったが、rapamycin により完全に抑制された。

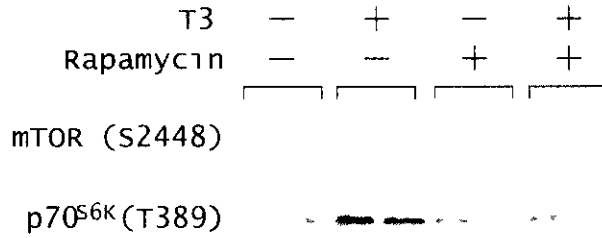


図3 T3 は S2448 の磷酸化を介して mTOR を活性化する

皮膚線維芽細胞は、T3 を除去した 5%DMEM において48時間培養後、T3 (10⁻⁸M) を添加し12時間後に蛋白を抽出した。Rapamycin は T3 添加前30分に培養液中に加えた。Western blot 法により磷酸化 mTOR (S2448) およびp70^{S6K} を検出した。T3 は mTOR の S2448 の磷酸化を誘導し、この磷酸化はその基質である p70^{S6K} の T389の磷酸化を伴い、T3 による mTOR の活性化が示された。Rapamycin は T3 による mTOR の活性化を完全に抑制した。

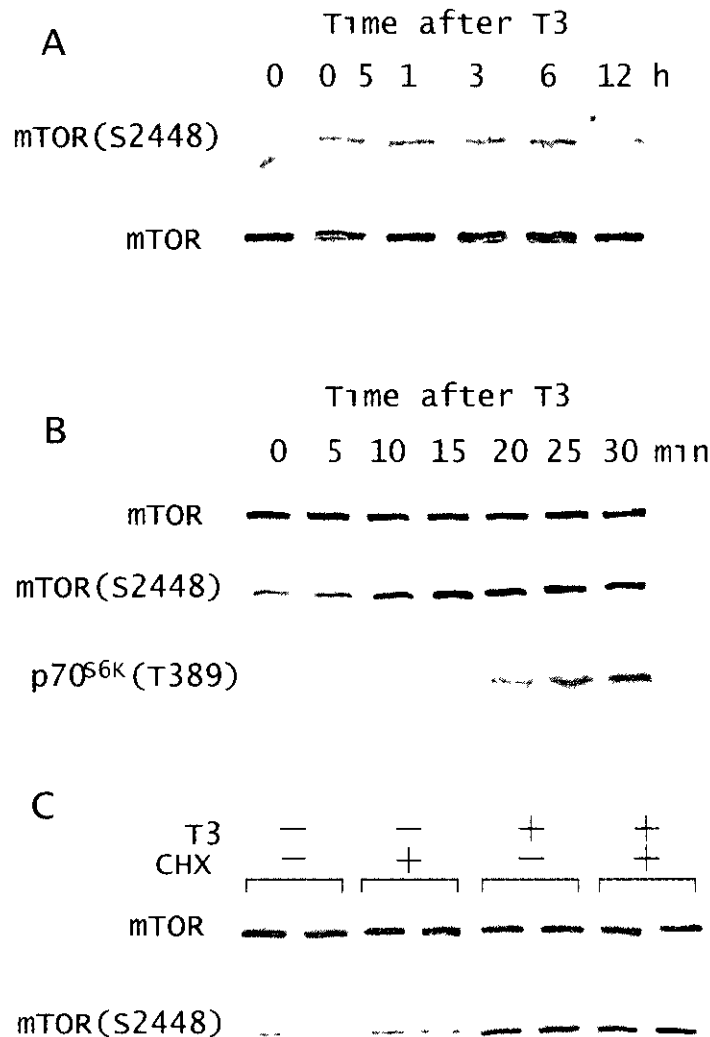


図4 T3 による mTOR の活性化は極めて迅速であり、蛋白合成を必要としない

- A T3 の非存在下では磷酸化 mTOR は殆ど検出されず、30分で明らかな磷酸化が認められ、12時間まで持続した。
- B S2448 の磷酸化された mTOR は T3 添加後10分以内に増加し、30分まで持続した。
- C T3 による mTOR の磷酸化は CHX の添加により影響を受けず、蛋白合成を必要としないことが示された。

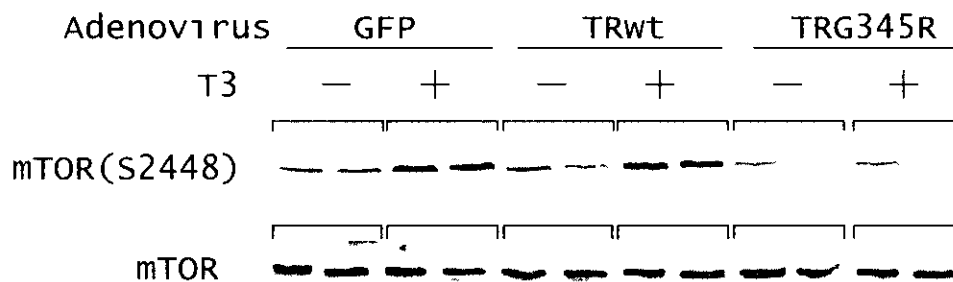


図5 トミナントネカティブ TR の発現は T3 による mTOR の活性化を完全に抑制する

ヒト皮膚線維芽細胞を 90%confluence まで培養し、無血清培地 DMEM に wild type TR, TRG345R を発現するアデノウイルス (MOI 200) を感染させ、1時間後甲状腺ホルモンを除去した牛胎児血清5%を含む培養液で2日間培養した。その後、T3 (10^{-8} M) を添加し30分後に細胞を採取し、蛋白を抽出した。mTOR の活性化は上述の如く Western blot 法により検討した。コントロールとして Green Fluorescent Protein (GFP) を発現するアデノウイルスベクターを用いた。

IV. 研究成果の刊行に関する一覧