

討した。TSHR遺伝子内に存在するSNPの中で、5～30Kbp間隔で10個のSNPを選び関連解析を行った。関連の見られた領域についてさらに関連解析を進めるとともに、連鎖不平衡 (LD) 解析とハプロタイプ解析を行った。

染色体5q23-33領域については、同領域約1cM毎に設定したMicrosatelliteMarkerでの解析とCytokine Cluster・免疫関連遺伝子のSNPを用いて関連解析を行った。

### C. 研究結果

#### 1) TSHR遺伝子内のSNPを用いて関連解析：

これまでのSNPを用いた研究で、TSHR遺伝子領域は大きく3つのBlockに分割され、Block内haplotypeを用いた関連解析では、intron1後半からintron8前半を含む2つ目のBlockでバセドウ病と有意な関連が見られた。そこで、エクソン7から8付近に分布する10個のSNPを用いて連鎖不平衡解析を行い、3つのBlockに分割された。JST022302と連鎖不平衡にあるいくつかのSNPにおいてもバセドウ病との関連が認められた。橋本病とはこの領域内において関連は認められなかった。さらに、JST022302と連鎖不平衡の強い8つのSNP (Block3) を用いてハプロタイプ解析を行ったところ、2つのみの高頻度ハプロタイプが検出され、Major Haplotype頻度はAITD、特にGraves' で有意な上昇が見られた。

#### 2) Ch5q21-33領域の解析：

これまでのCh5q23-31領域にあるマイクロサテライトマーカーを用いた研究で、D5S2115、D5S2117でAITDとの有意な関連が見られた。この領域内の、免疫関連遺伝子IL4、IL13、IL9等のSNPを用いた関連解析では有意な関連が見られなかったが、IRF1のintron9にあるSNPで

AITD、GDで有意な関連が見られた。そこで、このIRF1遺伝子内および、周囲のSNPを用いて関連解析を行った。関連の見られたIRF1intron9のSNP以外にこの領域では有意なSNPは見つからなかった。また、D5S2115近傍の遺伝子H2AFY、D5S2117近傍の遺伝子KIAA内のSNPを用いて関連解析を行ったが有意な関連は見られなかった。

### D. 考察

SNPやハプロタイプによる関連解析の結果から、TSHR遺伝子エクソン7-8領域はバセドウ病の疾患感受性領域と考えられた。今後、同領域SNPを用いた機能解析が必要である。また、他の疾患感受性遺伝子 (CTLA-4やHLAなど) との相互作用の検討も要する。

5q23-33のマイクロサテライトマーカーのうち、最も強かった部位の近傍をさらに複数のマーカーで関連解析を行っているが、未だ領域を絞りきれていない。良いマーカーを選択できていないか、この部位に存在する複数のサイトカインや他の免疫関連遺伝子が疾患に複雑に関与している可能性がある。

### E. 結論

TSHR遺伝子エクソン7-8領域はバセドウ病の疾患感受性領域と考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- ① Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y, Kangawa K. Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. The

- Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 90 (1):6-9, 2005.
- ② Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, and Nakao K. Transgenic Mice Overexpressing Des-Acyl Ghrelin Show Small Phenotype. *Endocrinology* 146 (1): 355-364, 2005.
- ③ Li YS, Kanamoto N, Hataya Y, Moriyama K, Hiratani H, Nakao K, Akamizu T. Transgenic Mice Producing MHC Class II Molecules on Thyroid Cells Do Not Develop Apparent Autoimmune Thyroid Diseases. *Endocrinology*. 145(5): 2524-30. 2004.
- ④ Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A, Tada H, Miura K, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Tanaka K and Kangawa K: Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur J Endocrinol*. 150: 447-455, 2004.
- ⑤ Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K and Nakao K. Genomic Structure and Characterization of the 5'-Flanking Region of the Human Ghrelin Gene. *Endocrinology* 145 (9): 4144-4153, 2004.
- ⑥ Nakai Y, Hosoda H, Nin K, Ooya C, Hayashi H, Akamizu T, Kangawa K. Short-term secretory regulation of active form of ghrelin and total ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*. 150:913-934, 2004.
- ⑦ 赤水尚史, 西條美佐. 特集：分子甲状腺学の進歩2004. 刺激型抗TSH受容体トランスジェニックマウスの作製と解析. ホルモンと臨床 52 (3): 243-248. 2004.
- ⑧ 金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、森山賢治、中尾一和. Ⅲ. グレリン. 基礎研究の進展. グレリン遺伝子発現調節. 日本臨床 (増刊号) 臨床分子内分泌学 1 - 心血管内分泌代謝系 (上) -. 62 (Suppl 9) : 340- 343. 2004年9月28日
- ⑨ 赤水尚史、五十子大雅、細田洋司、高屋和彦、寒川賢治. Ⅲ. グレリン. 特論. グレリンのトランスレーショナルリサーチー内分泌代謝疾患ー. 日本臨床 (増刊号) 臨床分子内分泌学 1 - 心血管内分泌代謝系 (上) -. 62 (Suppl 9) : 424- 429. 2004年9月28日.

## 2. 学会発表

- ① Hataya Y, Akamizu T, Hosoda H, Anamoto N, Moriyama K, Takaya K, Arai H, Kangawa K, Nakao K. Alteration of plasma ghrelin levels in rats with lipopolysaccharide-induced wasting syndrome and effects of ghrelin treatment on the syndrome. 12<sup>th</sup> *Endocrinology*. August. 31- September 4, 2004, The Lisbon Congress Centre. Lisbon, Portugal.
- ② Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Arai H, Kangawa K, Nakao K. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. 12<sup>th</sup> *International Congress of Endocrinology*. August. 31-September 4, 2004, The Lisbon Congress Centre. Lisbon, Portugal.
- ③ 赤水尚史、五十子大雅、細田洋司、高屋和彦、寒川賢治. グレリンの臨床応用. 第77回日本内分泌学会学術総会、国立京都国際会館.

2004年6月24日～26日.

④ 金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、旗谷雄二、有安宏之、森山賢治、高屋和彦、細田洋司、児島将康、荒井宏司、寒川賢治、中尾一和。USF (Upstream stimulatory factor) はヒトグレリン遺伝子発現に関与する。第77回日本内分泌学会学術総会、国立京都国際会館。2004年6月24日～26日。

⑤ 有安宏之、高屋和彦、細田洋司、荒井宏司、赤水尚史、寒川賢治、中尾一和。グレリンの分泌調節と、トランスジェニックマウスによる作用の解明。第77回日本内分泌学会学術総会、国立京都国際会館。2004年6月24日～26日。

⑥ 岩倉浩、細田公則、孫徹、藤倉純二、富田努、野口倫生、高屋和彦、伊藤裕、赤水尚史、益崎裕章、小川佳宏、林達也、井上元、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和。Rat glucagon promoter-およびrat insulin II promoter-ghrelin transgenic mouseの解析。第77回日本内分泌学会学術総会、国立京都国際会館。2004年6月24日～26日。

⑦ 旗谷雄二、赤水尚史、細田洋司、金本巨哲、森山賢治、高屋和彦、荒井宏司、寒川賢治、中尾一和。エンドトキシン投与ラットを用い

たグレリンの臨床応用への検討。第41回日本臨床分子医学会学術集会九州大学医学部百年講堂、2004年7月16日～17日。

⑧ 赤水尚史。成長ホルモン分泌促進物質の再生医療への応用。第20回日本DDS学会。京王プラザホテル。2004年7月15日、16日。

⑨ 赤水尚史。TSHレセプター、同抗体およびその測定アッセイに関して。第5回日本内分泌学会近畿支部学術集会、大阪国際会議場、2004年10月23日。

⑩ 平谷仁美、Donald Bowden、清水章、赤水尚史。TSHレセプター遺伝子内SNPを用いた日本人自己免疫性甲状腺疾患のCase-Control解析および連鎖不平衡解析。第47回日本甲状腺学会、前橋テルサ、2004年11月11日～13日。

⑪ 赤水尚史。甲状腺疾患に関わるSNP解析。第47回日本甲状腺学会、前橋テルサ、2004年11月11日～13日。

⑫ 旗谷雄二、赤水尚史、金本巨哲、森山賢治、荒井宏司、島津章、中尾一和。大量胸水、全身浮腫および多彩な検査異常を伴った特発性粘液水腫の一例。第47回日本甲状腺学会、前橋テルサ、2004年11月11日～13日。

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：  
甲状腺ホルモン受容体によるTSH  $\beta$  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は一般に甲状腺ホルモン受容体（TR）異常のため生じる疾患であるが、発症機序や病態については未だ不明な点が多い。とくに最も中心的な病態である不適切TSH分泌状態（SITSH）の機序はまったく未解決である。これを明らかにするため、まず甲状腺ホルモン受容体（TR）がT3依存性にTSH  $\beta$  遺伝子の転写を抑制する機序を追求した。これまでに、TSH産生下垂体細胞の分化に必須の特異的転写因子Pit1およびGATA2をCV1細胞に発現させることにより、T3/TRによるTSH  $\beta$  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ている。この系を用いて以下の実験結果を得た。①TSH  $\beta$  遺伝子の基礎転写活性を亢進させる活性化因子はGATA2である、②TRはそのDNA結合領域でGATA2のZnフィンガー領域とT3非依存性に結合する、③T3/TRによるTSH  $\beta$  遺伝子の転写抑制にTRAP220が重要な役割をしている、④T3添加後すみやかにヒストンH3の脱アセチル化が生じ、一方TRAP220がすみやかに解離される。現在次のようなモデルを考えている。もっとも主要なTRはTR  $\beta$  2であり、これがTSH  $\beta$  遺伝子の活性化因子であるGATA2と関連している。T3がTRに結合すると、おそらくHDACが呼び込まれてヒストンの脱アセチルが起こる。クロマチン構造がコンパクトに織り込まれ、TRAP220がGATA2から解離して転写が抑制される。

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）の機序を解明する。そのために、T3/TRによるTSH  $\beta$  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

系を用いて検討を加える。

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導入し、リガンド添加後24時間培養しCAT活性を測定した。TRとGATA2の結合は、Glutathione-S-Transferase (GST) にGATA2のZn-フィンガー領域を融合させ、プルダウンアッセイ法で調べた。またT  $\alpha$  T1細胞を用い、T3添加後のGATA2結合部位におけるアセチル化ヒストンH4、TRAP220を

chromatin immunoprecipitation (ChIP) assayで調べた。

(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  $\beta$  遺伝子活性を発現させることが出来るが、TATA-box上流の配列を欠失させPit 1とGATA2の結合配列のみにしたプロモーターコンストラクトでは、GATA2単独で基礎転写活性は著明に上昇し、Pit 1は不要であった。TRはT3依存性にこの転写活性を抑制した。このことからTSH  $\beta$  遺伝子の活性化因子はGATA2と考えられた。GATA2で活性化されるCD34遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイでも、T3/TRによる抑制が確認された。

GATA2とTRの相互作用を調べるため、それぞれいくつかの変異体を作成して検討した結果、GATA2はZn-フィンガー領域が、またTRはDNA結合領域が重要であることが分かった。GATA2のZn-フィンガー領域をGSTと融合させ、GST-プルダウンアッセイを行ったところ、TR  $\beta$  1、 $\beta$  2、 $\alpha$  1はT3の有無にかかわらずGATA2と結合することが示された。

種々の変異体を用いた検討結果、コアクチベーター、コレプレッサーはいずれもT3/TRによる転写抑制に必ずしも必須ではないが、抑制が100%発揮されるには必要であることが分かった。TRAP/DRIP複合体の構成成分であるTRAP220がGATA2と連関することから、阻害型TRAP220を作成し過剰発現させたところ、T3/TRによる転写抑制が解除された。このことからTRAP220の重要な関与が推測された。

TSH産生細胞株T  $\alpha$  T1細胞を用いたChIPアッセイで、T3添加後のGATA2結合部位におけるアセチル化ヒストンH4を調べた。T3添加後15分で、ヒストンH4は有意に脱アセチル化され、一方TRAP220はGATA2結合部位から有意に解離した。

TSH  $\beta$  遺伝子プロモーターの解析実験から、GATA2結合領域に隣接する約30塩基配列を欠失させるとGATA2による転写活性が著増することを見いだした。ゲルシフトアッセイで、T  $\alpha$  T1細胞にこの部位に結合する蛋白が存在することを証明した。Pit 1とGATA2の相互作用を検討した実験結果から、pit 1はこの抑制蛋白の作用を解除している可能性が示された。

### D. 考 察

これまで得た研究結果と平成16年度に得られた結果をまとめると、以下ようになる。①TR  $\beta$  2がTSH制御におけるもっとも主体な受容体である。②TSH  $\beta$  遺伝子のプロモーター領域において、従来T3/TRによる負調節に重要とされていた領域は必要ではなく、pit 1、GATA2結合領域のみとしたコンストラクトで十分である。③GATA2結合領域に隣接する約30塩基配列になんらかの抑制蛋白が結合する。この領域を除去するとGATA2のみで転写活性は著増し、それはT3/TRにより抑制される。Pit 1はこの抑制蛋白の作用を解除している。④TR-DNA結合領域はGATA2-Znフィンガー領域とT3非依存性に結合する。⑤T3がTRに結合するとすみやかにヒストンの脱アセチル化が生じる。⑥TRAP220がT3/TRによる転写抑制に重要な働きをしている。

以上の結果から、次のようなモデルを考えている。TSH遺伝子制御にもっとも主要なTRは

TR $\beta$ 2である。TR $\beta$ 2は、TSH $\beta$ 遺伝子の活性化因子であるGATA2と関連している。T3がTRに結合すると、おそらくHDACが呼び込まれてヒストンの脱アセチルが起こる。クロマチン構造がコンパクトに織り込まれ、TRAP220がGATA2から解離して、転写活性は抑制される。Pit 1はGATA2と安定な複合体を形成することで、抑制蛋白による阻害からGATA2を保護している。

## E. 結 論

TSH遺伝子の転写活性因子はGATA2であり、TRはT3依存性にヒストンの脱アセチル化を起こし、TRAP複合体を解離して、GATA2の転写促進作用を阻害する。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kawai K, Sasaki S, Morita H, Ito T, Suzuki S, Misawa H, Nakamura H: Unliganded thyroid hormone receptor- $\beta$ 1 represses liver X receptor  $\alpha$ /oxysterol-dependent transactivation. *Endocrinology* 145: 5515-5524, 2004.

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

中村浩淑、長山浩士：甲状腺ホルモンの非ゲノ

ム作用. *内分泌・糖尿病科* 19(6): 635-639, 2004.

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.

西山孝三、中村浩淑：異常甲状腺ホルモン受容体の甲状腺特異的発現マウスの作製とその機能解析. *ホルモンと臨床* 52(3): 77-82, 2004.

### 2. 学会発表

GATA2 is essential to mediate the negative regulation of TSH alpha subunit gene by T3 and T3 receptor. (Sasaki S, Nakamura H et al.) International Symposium on Molecular Thyroidology (Naha, Japan) 2004年3月

The negative regulation of thyroid stimulating hormone (TSH) beta gene is mediated through the interaction between DNA binding domain of thyroid hormone receptor and the zinc finger region of transcription factor, GATA2. (Sasaki S, Nakamura H et al.) 第75回米国甲状腺学会 2004年10月 (Vancouver, BC, Canada)

Hypothyroidism of transgenic mice expressing a dominant negative mutant thyroid hormone receptor in thyroid (Nishiyama K, Nakamura H et al.) 第75回米国甲状腺学会 2004年10月 (Vancouver, BC, Canada)

甲状腺ホルモンによるTSH  $\alpha$ 、 $\beta$ 鎖遺伝子への負の転写調節. (佐々木茂和、中村浩淑) 第76回日本内分泌学会総会 2004年6月 (日本内分泌学会雑誌 80(1): 44, 2004 Abst #S2-3)

TSH  $\beta$  鎖遺伝子の転写調節における甲状腺ホルモン受容体と転写因子GATA2の相互作用の検討。(松下明生、中村浩淑 他) 第76回日本内分泌学会総会 2004年6月(日本内分泌学会雑誌 80(1): 117, 2004 Abst #133)

TSH  $\beta$  鎖遺伝子も転写抑制におけるPit1 とGATA2の連関について。(柏原裕美子、中村浩淑 他) 第76回日本内分泌学会総会 2004年6月(日本内分泌学会雑誌 80(1): 122, 2004 Abst #P002)

Estrogen とその受容体によるTSH  $\beta$  鎖遺伝子の転写抑制(長山浩士、中村浩淑 他) 第76回日本内分泌学会総会 2004年6月(日本内分泌学会雑誌 80(1): 122, 2004 Abst #P001)

異常甲状腺ホルモン受容体甲状腺特異的発現トランスジェニックマウスの機能解析(西山孝三、中村浩淑 他) 第76回日本内分泌学会総会 2004年6月(日本内分泌学会雑誌 80(1): 122, 2004 Abst #P004)

TSH  $\beta$  鎖遺伝子の負の転写調節における甲状腺ホルモン受容体の役割の検討(松下明生、中村浩淑 他) 第46回日本甲状腺学会総会

2004年11月(日本内分泌学会雑誌 80(2): 298, 2004 Abst #Y06)

TSH ならびにTPA (phorbol 12-0-tetra decanoate-13-acetate) はGATA2 依存性のTSH  $\beta$  鎖転写活性化を刺激する。(佐々木茂和、中村浩淑 他) 第46回日本甲状腺学会総会 2004年11月(日本内分泌学会雑誌 80(2): 298, 2004 Abst #04)

甲状腺特異的異常甲状腺ホルモン受容体発現トランスジェニックマウスを用いた異常甲状腺ホルモン受容体の転写調節機能解析(西山孝三、中村浩淑 他) 第46回日本甲状腺学会総会 2004年11月(日本内分泌学会雑誌 80(2): 303, 2004 Abst #21)

甲状腺ホルモン受容体と甲状腺ホルモン不応症(三宅賞受賞講演)(中村浩淑) 第46回日本甲状腺学会総会 2004年11月

## 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病態解明の研究  
—TRH遺伝子をモデルとした甲状腺ホルモン受容体による  
ネガティブフィードバック機構の分子メカニズムの解析—

分担研究者 森 昌朋 群馬大学大学院医学系研究科 病態制御内科学教授

研究要旨

TRHは甲状腺機能を制御する視床下部ホルモンであり、変異TRによるTRH遺伝子の発現調節異常が甲状腺ホルモン不応症（RTH）の病態に深く関与することが明らかとなりつつある。昨年度、私達は新規RTH症例において見出されたF455S変異TR $\beta$ が、T3結合後の立体構造変化異常のため転写共役因子nuclear receptor corepressorの解離障害をきたし、その結果ヒストン脱アセチル化異常を生じ、TRH遺伝子の転写抑制障害をきたすことを報告し、RTHの病態の本態が変異TRによるヒストン修飾異常にあることを明らかとした。しかしながら、TRによるTRH遺伝転写抑制の詳細な分子機構については、プロモーターへのTRの直接結合が必要であるかも含め不明な点が多い。本年度研究では、RTHの更なる病態解明に向けて、TRによるTRH遺伝子のネガティブフィードバック調節分子機構の詳細な解析を行った。その結果、TRH遺伝子の転写開始点下流領域の転写抑制に必須のDNA領域に、転写因子Leader binding protein-1c（LBP-1c）が結合し、LBP-1cを介してTRがTRHプロモーターに間接的にリクルートされることが判明した。更に、T3存在下においてヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）2ならびに3が一過性にLBP-1/TR複合体にリクルートされ、ヒストン脱アセチル化が惹起される結果TRH遺伝子転写が抑制されることが明らかとなった。TRによる遺伝子転写調節機構の詳細な解明は、RTHのみならず他の核内受容体の関与する種々の疾患の病態解明と治療へと応用されるものと考えられる。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン受容体（thyroid hormone receptor; TR）は、標的遺伝子の転写をリガンド依存性に活性化するのみならず、そのネガティブフィードバック作用として下垂体甲状腺刺激ホルモン（thyroid stimulating hormone; TSH）や視床下部TSH放出ホルモン（thyrotropin-releasing hormone; TRH）遺伝子などの発現をリガンド依存性に抑制することが

知られている。しかしながら、TRによる詳細な転写抑制機構の分子メカニズムは未だ確立されていない。私達は、TRH遺伝子プロモーター領域をクローニングし、そのnegative thyroid hormone response element（nTRE）が転写開始点下流に存在し（+6～+50）、その領域にはTRは直接結合しないが、機能的にTRのDNA結合領域（DBD）が必須である事を報告した。本研究では、TRH遺伝子のnTREに結合



する未知の因子を同定し、その蛋白とTRとの結合解析を行い、更に転写抑制に関与する他の転写共役因子の役割について解析する事を目的とした。

## B. 研究方法

TRH遺伝子のnTREに既存の転写因子結合配列が存在するかコンピューター解析を行う。GH4C1細胞核蛋白とnTREとの結合をゲルシフトアッセイにて検討し、結合した核蛋白がコンピューター解析によって得られた転写因子と同一のものであるか確認する。その転写因子にTR $\beta$ が直接結合するか否かを*in vivo*ならびに*in vitro*結合解析で確認する。Histone deacetylase (HDAC) や nuclear receptor corepressorなどのTRの転写共役因子とこの転写因子が*in vivo*においてTRHプロモーターにリクルートされるかクロマチン免疫沈降(chromatin immuno-precipitation; ChIP)法を用いて検討する。更に、この新規転写共役因子に対するshort interfering RNA (siRNA)を用いて内因性蛋白を消失させることにより、T3による転写調節が減弱するか検討した。

(倫理面への配慮)

全ての研究は、組み換えDNA実験に関する指針に則って、当学倫理委員会にて承認を得た上で遂行した。

## C. 研究結果

コンピューター解析の結果、負の転写制御に必須のプロモーター領域に転写因子Leader-binding protein-1c (LBP-1c) のコンセンサス結合配列が3ヶ所存在することが判明した。LBP-1cは、元来human immunodeficiency virus (HIV) type 1 long terminal repeat (LTR) の転

写開始点近傍領域に結合し、LTRの転写を抑制する因子として単離された蛋白である。実際に、LBP-1cがnTREに結合するか検討したところ、GH4C1細胞核蛋白ならびに*in vitro*で作製したLBP-1c蛋白がこの領域に同様に結合し、両者の結合がLBP-1cに対する特異抗体によりスーパーシフトした。この結果より、LBP-1cがTRHプロモーターのnTREに実際に結合することが明らかとなった。次にTR $\beta$ とLBP-1cが結合するか否かを*in vivo*ならびに*in vitro*の結合解析にて確認したところ、LBP-1cがTRのDBDに直接結合することが判明した。培養細胞を用いた一過性遺伝子導入実験では、LBP-1cのcotransfectionはTRHプロモーターのTRによるリガンド非依存性転写活性化を強く増強した。続いてT3による転写抑制にヒストン脱アセチル化が関与するかHDAC阻害剤であるトリコスタチンA (TSA)を用いて検討した。TSAはT3による転写抑制を解除したことより、TRによるTRHプロモーターのリガンド非依存性転写活性化にはヒストンアセチル化が、転写抑制にはヒストン脱アセチル化が関与することが示唆された。次に、LBP-1cやTRが*in vivo*においてTRHプロモーターにリクルートされるか否かChIP法を用いて検討した。T3非存在下では、LBP-1とTRはプロモーターにすでにcorecruitされており、TRHプロモーターはアセチル化ヒストン3に結合していた。一方、T3添加1時間後に内因性HDAC2、3がプロモーターに一過性にリクルートされたが、HDAC1のリクルートは全く認められなかった。HDACのリクルートに伴って、アセチル化ヒストン3に結合したTRHプロモーターも減少した。LBP-1c特異的siRNAの細胞導入により、LBP-1c mRNAならびに蛋白量は容量ならびに時間依存性に減少

したが、コントロールであるcyclophilin蛋白量に明らかな変化を認めなかった。LBP-1c特異的siRNA存在下では、TRによるリガンド非依存性活性化及び依存性抑制が有意に減弱した。また、*in vitro*結合解析においてLBP-1cとHDAC2ならびに3が直接結合することも明らかとなった。

以上の成績から、LBP-1c/TR複合体が特異的HDACをTRHプロモーターにリクルートし、ヒストン蛋白のアセチル化状態を変化させることによりTRによるリガンド非依存性ならびに依存性転写制御を惹起することが明らかとなった。

#### D. 考 察

従来の多くの研究にもかかわらず、TRによるネガティブフィードバック機構の詳細な分子機構は現在まで明らかとなっておらず、本研究によりHDACなどの転写共役因子を含めたより詳細なTRH遺伝子の転写抑制分子機構が世界に先駆けて明らかとなった。正の刺激系とは全く異なるDNAへの直接的な結合を介さないTRによる転写調節機構は、甲状腺ホルモンによって発現抑制を受けるTRH以外の標的遺伝子の調節機構にも共通点を有する可能性が考えられ、また他の核内受容体による転写抑制機構の解明にも応用されると思われる。

本研究は、主に*in vitro*の実験系や培養細胞を用いて遂行されており、実際に生体内で同じことが起るのか確証はなく、今後更にマウスなどを用いた*in vivo*の系（例えば*in vivo* ChIP assayなど）で確認することは重要である。また、甲状腺ホルモンによって正の転写調節をうける遺伝子において、多くの蛋白を含んだ異なるクラスの転写共役因子複合体が順次プロモ-

ーターにリクルートされて転写が活性化される事が報告されている。負の転写抑制系においても、本研究で明らかとなった蛋白以外にも多くの共役因子群が転写調節に関与しているものと思われる。今後、これら共役因子複合体が精製、同定されることによって、TRによる転写抑制機構の理解が更に深まり、甲状腺ホルモン不応症の真の病態解明ならびに他の核内受容体の関与する種々の疾患の病態解明や治療にも応用可能と予想される。

#### E. 結 論

TRによる視床下部TRH遺伝子の転写調節分子機構の詳細が明らかとなった。RTH症例に認められた変異TRによるTRH遺伝子転写調節機構異常の本態が、ヒストン修飾の異常によるものであることが強く示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ishii S, Yamada M, Satoh T, Monden T, Hashimoto K, Shibusawa N, Onigata K, Morikawa A, Mori M. Aberrant dynamics of histone deacetylation at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*. 2004, 18:1708-20.

Monden T, Yamada M, Nihei Y, Kishi M, Tomaru T, Ishii S, Hashida T, Shibusawa N, Hashimoto K, Satoh T, Kasai N, Mori M.

Unliganded RXR acts as an inhibitory factor on troglitazone-induced activation. Life Sci 2004, 76: 731-741

Hashimoto K, Yamada M, Monden T, Satoh T, Wondisford FE, Mori M. Thyrotropin-releasing hormone specifically induces P-Lim-CBP binding to activate the glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit gene promoter. J Mol Endocrinol 2005, 229, 11-20

渋沢信行、橋本貢士、山田正信、Wondisford Fredric E、森 昌朋

甲状腺ホルモン受容体TR- $\beta$ のDNA結合能の生体における意義 GS125 TR- $\beta$  ノックインマウスの作製と解析。

ホルモンと臨床 (0045-7167) 52巻3号 Page 193-199(2004.03)

## 2. 学会発表

佐藤哲郎、橋本貢士、山田正信、森 昌朋

甲状腺ホルモンによる遺伝子発現制御機構に関する最近の知見。

第77回日本内分泌学会学術総会

橋田 哲、山田正信、梅沢良平、登丸琢也、石井角保、渋沢信行、橋本貢士、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Cyhr1の解析。

第77回日本内分泌学会学術総会

渋沢信行、橋本貢士、門伝 剛、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

TR- $\beta$  遺伝子変異ノックインマウスにおける小

脳Purkinje細胞発達への影響。

第77回日本内分泌学会学術総会

登丸琢也、佐藤哲郎、石塚高広、梅沢良平、中島康代、石井角保、橋田 哲、渋沢信行、小澤厚志、門伝 剛、山田正信、森 昌朋

PDIP-1は甲状腺ホルモン受容体の転写共役因子として機能する。

第77回日本内分泌学会学術総会

石井角保、山田正信、渋沢信行、橋本貢士、門伝 剛、山田正信、森 昌朋

転写因子病における標的遺伝子のクロマチン構造のダイナミクス異常。

第77回日本内分泌学会学術総会

橋本貢士、梅沢良平、中島康代、登丸琢也、石井角保、橋田 哲、渋沢信行、門伝 剛、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

マウスSREBP-1c遺伝子発現の甲状腺ホルモン受容体(TR) $\beta$ による負の制御機構。

第77回日本内分泌学会学術総会

梅沢良平、山田正信、渋沢信行、橋本貢士、門伝 剛、佐藤哲郎、森 昌朋

甲状腺ホルモンによる下垂体TSH発現分泌調節へのTRHの制御機構。

第77回日本内分泌学会学術総会

橋田 哲、山田正信、渋沢信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森 昌朋

TRHにより制御される脳内ペプチドMDPIの解析およびELISA測定系の確立。

第31回日本神経内分泌学会

石井角保、山田正信、橋田 哲、渋谷信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森 昌朋

甲状腺ホルモン不応症における標的遺伝子のクロマチン構造のダイナミクス異常。

第47回日本甲状腺学会

橋本貢士、梅沢良平、中島康代、石井角保、橋田 哲、渋谷信行、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

甲状腺ホルモン受容体(TR) $\beta$   $\Delta$ 337T変異ノックインマウスにおけるコレステロール代謝の包括的解析。

第47回日本甲状腺学会

梅沢良平、山田正信、石井角保、登丸琢也、橋田 哲、渋谷信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森 昌朋

TRAP220の甲状腺ホルモンの負の制御機構に与える影響。

第47回日本甲状腺学会

登丸琢也、佐藤哲郎、石塚高広、吉野 聡、梅沢良平、石井角保、橋本貢士、山田正信、森 昌朋

新規転写共役因子PDIP-1と甲状腺ホルモン受容体 (TR) との結合解析

第47回日本甲状腺学会

渋谷信行、橋本貢士、橋田 哲、佐藤哲郎、山

田正信、森 昌朋

甲状腺ホルモン受容体TR- $\beta$  DNA結合ドメイン変異体 (GS125 TR- $\beta$ ) ノックインマウスにおける感覚器異常。

第47回日本甲状腺学会

Mori M.

Management of hyperthyroidism.

12<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology

Satoh T, Tomaru T, Ishizuka T, Ishii S, Hashimoto K, Monden T, Yamada M, Mori M. Negative regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by thyroid hormone requires direct interaction between Leader binding protein-1c and the DNA-binding domain of thyroid hormone receptor.

12<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology

Tomaru T, Satoh T, Ishizuka T, Hashida T, Shibusawa N, Hashimoto K, Monden T, Yamada M, Mori M.

Isolation of a novel DNA binding cofactor that binds the DNA-binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$

12<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology

#### H. 知的所有権の出願、取得状況

現在のところなし

厚生労働科学研究費補助金（難治疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症の発症機序：受容体を介した  
甲状腺ホルモンのnon-genomic actionによる  
PI3K→Akt/PKB→mTOR→p70<sup>S6K</sup> シグナリングカスケードの賦活

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遺伝子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 $\alpha$ 、 $\beta$ のアイソフォームの中で、 $\alpha$ 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)。昨年度の研究では、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 $\alpha$ 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た。本年度の研究では甲状腺ホルモンによるmTORの活性化機序を詳細に検討し、甲状腺ホルモンが受容体と結合することにより細胞膜のPI3Kの調節サブユニットと結合し、PI3Kを活性化し、この活性化がAkt/PKB→mTOR→p70<sup>S6K</sup>のシグナリングカスケードを活性化することを明らかにした。甲状腺ホルモン不応症患者から得られた線維芽細胞では、このシグナリングカスケードの活性化は認められず、不応症の発症機序の一因と考えられた。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症 (Resistance to Thyroid Hormone = RTH) は、甲状腺ホルモンに対する応答性の低下した病態で、多くは常染色体優性遺伝を示し、 $\beta$ 型甲状腺ホルモン受容体 (TR $\beta$ ) 遺伝子の点突然変異がその原因として報告されてきた。突然変異の多くは、リガンド結合領域に存在し、甲状腺ホルモン (T<sub>3</sub>) との結合を欠き、正常の受容体機能を阻害するドミナントネガティブ作用がその発症機序であることが多くの *in vitro* の研究により示

されてきた。更に、マウスのTR $\beta$  遺伝子にヒトと同様の突然変異を導入したノックインマウスなどを用いて *in vivo* での発症機序も解明されつつあるが、ヒト細胞を用いた研究は殆ど認められない。ヒト皮膚線維芽細胞は検体が得られやすく、継代培養が可能のため、RTH発症機序の解明に有用であると考えられ、我々は、ヒト皮膚線維芽細胞から mRNA differential display法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., 271: 14567, 1996)。本厚生労働研究費補助金に

よりZAKI-4遺伝子が第6染色体の短腕に位置し、この遺伝子から3種類の転写産物、 $\alpha$ 、 $\beta$ 1、 $\beta$ 2が産生されることを明らかにした。 $\beta$ 1、 $\beta$ 2は同じ蛋白をコードし $\alpha$ とはC端に共通配列を有し、N端のアミノ酸配列が異なっていた。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 region1)、ZAKI-4 (DSCR1L1), DSCR1L2が報告されている。これらの遺伝子産物のカルボ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ため、ZAKI-4遺伝子産物がCNと結合しその活性を抑制することを明らかにすると共に、 $\alpha$ アイソフォームのみが甲状腺ホルモン ( $T_3$ ) により増加することを明らかにした。更に、 $T_3$ による $\alpha$ アイソフォームの増加がセリン・スレオニンキナーゼであるmTOR (mammalian target of rapamycin) の特異的阻害剤Rapamycinにより完全に抑制されることを明らかにした。

本年度の研究では、 $T_3$ によるmTORの活性化機序を明らかにし、RTH発症機序との関連を検討した。

## B. 研究方法

### 1) 甲状腺ホルモン ( $T_3$ ) 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除去した牛胎仔血清5%を含む培地で2日間培養した後、 $10^{-8}M$ の $T_3$ を添加し更に12時間培養し、RNAを抽出した。ノーザンブロット法を用いてZAKI-4  $\alpha$  mRNAを検出した。各

mRNA量はGAPDH mRNA量により補正した。PI3K阻害剤LY294002 ( $50\mu M$ ) は、 $T_3$ 添加30分前に培養液に添加した。PI3Kの阻害は、PI3Kの調節サブユニットp85 $\alpha$ のドミナントネガティブフォーム ( $\Delta p85\alpha$ ) を発現するアデノウイルスベクターを用いても行った。コントロールにはGFP発現ウイルスを用いた。

### 2) $T_3$ によるPI3K $\rightarrow$ Akt/PKBによる活性化機序の検討

mTORが $T_3$ により活性化されることが明らかになったため、その上流のキナーゼであるPI3K $\rightarrow$ Akt/PKBが $T_3$ によりどのように活性化されるかをPI3Kの阻害剤LY294002、wortmanninやDp85 $\alpha$ を発現するアデノウイルスベクターを用いて検討した。

### 3) 甲状腺ホルモン受容体 (TR) を介した $T_3$ によるPI3Kの活性化

ヒト皮膚線維芽細胞を緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH7.4), 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM PMSF,  $1\mu g/ml$  aprotinin,  $1\mu g/ml$  leupeptin,  $1\mu g/ml$  pepstatin, 1 mM  $Na_3VO_4$  and 1 mM NaF] にて溶解し、 $4^\circ C$ 、114,000gにて15分間遠心後、上清を、非動化した抗p85 $\alpha$ 抗体、抗TR $\beta$ 抗体による免疫沈降に供した。PI3Kの活性はEchelon Biosciences Inc.製のELISAキットを用いて測定した。

### (倫理面への配慮)

ヒト線維芽細胞は米国シカゴ大学のRefetoff教授より供与されたものであり、研究への使用につき患者からのinformed consentが得られている。

## C. 研究結果

昨年度の研究により、T<sub>3</sub>が転写を介すること無く、mTORを活性化し、いわゆるT<sub>3</sub>のnongenomic actionが示された。また、TR $\beta$ 遺伝子異常 (TRG345RあるいはTRA317T) を有するRTH患者からの得られた皮膚線維芽細胞ではT<sub>3</sub>依存性のmTORの活性化は認められなかった。従ってT<sub>3</sub>によるmTORの活性化には甲状腺ホルモン受容体 (TR) が必須であることも示された。

本年度の研究では、T<sub>3</sub>によるmTORの活性化機構を更に詳細に検討し、T<sub>3</sub>がPI3K→Akt/PKB→mTOR→p70<sup>S6K</sup>シグナリングカスケードを活性化することを明らかにした。

### 1) T<sub>3</sub>によるPI3K→Akt/PKB→mTOR→p70<sup>S6K</sup>シグナリングカスケードの活性化

インスリンがmTORを活性化することはよく知られている。インスリンが受容体に結合すると、受容体自身とIRS (insulin receptor substrate) を磷酸化しPI3Kの調節サブユニットp85 $\alpha$ と会合することによりPI3Kを活性化し、phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns (4, 5) P<sub>2</sub> = PIP<sub>2</sub>) をPtdIns (3, 4, 5) P<sub>3</sub> (PIP<sub>3</sub>) に転換する。PIP<sub>3</sub>はAkt/PKBを細胞質から細胞膜に誘導し、Akt/PKBのT308及びS473の磷酸化を介して活性化する。T308の磷酸化はPDK1によるとされているが、S473の磷酸化酵素はまだ同定されていない。T<sub>3</sub>によりAkt/PKBのS473の磷酸化が誘導されるか否かを検討すると、図1のようにT<sub>3</sub>添加5分以内という短時間に磷酸化が観察された。

Akt/PKBの基質の多くが核内に存在することは知られているが、磷酸化により活性化されたAkt/PKBの核内移行については殆ど報告が

見られない。そのため、T<sub>3</sub>により活性化を受けたAkt/PKBとmTORの細胞内局在を各々の坑磷酸化抗体を用いて検討した。その結果、T<sub>3</sub>の添加により活性型Akt/PKBは細胞質から核内へ速やかに移行した (図2)。一方、mTORは初めから核内に存在し、Akt/PKBの核内移行に伴い磷酸化を受けた。また、このAkt/PKBの活性化と核内への移行は、PI3Kの阻害剤であるwortmanninにより完全に阻止された。以上の結果は、T<sub>3</sub>によるAkt/PKB→mTOR→p70<sup>S6K</sup>の活性化の第一段階としてPI3Kの活性化が必要であることを示唆した。事実、PI3Kの阻害剤であるwortmannin、LY294002を添加するとT<sub>3</sub>によるAkt/PKB→mTOR→p70<sup>S6K</sup>の活性化が完全に抑制された。また、PI3K活性を抑制するドミナントネガティブp85 ( $\Delta$ p85) を発現するアデノウイルスを感染すると、T<sub>3</sub>によるAkt/PKB→mTOR→p70<sup>S6K</sup>の活性化が阻害された (図3)。またT<sub>3</sub>によるZAKI-4 $\alpha$ の発現増加もwortmannin、LY294002、 $\Delta$ p85により完全に抑制された (図4)。

### 2) TRを介したT<sub>3</sub>によるPI3K活性化

近年、エストロゲン受容体 (ER) が内皮細胞においてリガンド依存性にp85 $\alpha$ と結合し、PI3Kを活性化することが報告された。TRはERと共にステロイドホルモン受容体ファミリーに属するため、TRがp85 $\alpha$ と結合するか否かを正常TR $\beta$  或いは変異TR $\beta$  1 (G345R) を発現するアデノウイルスを繊維芽細胞に感染させた後、24時間後、T<sub>3</sub>添加後30分に細胞を採取し、溶解液を坑TR $\beta$ 抗体にて免疫沈降し、沈降産物を坑p85 $\alpha$ 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った (図5)。その結果、正常TR $\beta$ 、変異TR $\beta$ 共にp85 $\alpha$ と結合することが示され、

この結合はT<sub>3</sub>非依存性であった。TRがp85 $\alpha$ とT<sub>3</sub>非依存性に結合することが示されたため、PI3Kの活性化にはTRとT<sub>3</sub>の結合が必要であることが推測された。この証明のため、正常TR $\beta$  或いは変異TR $\beta$  (G345R) を過剰発現後、T<sub>3</sub>を添加し、細胞溶解液を調整し、PI3K活性をELISAにて測定した。その結果、変異TR $\beta$  を過剰発現した場合にはT<sub>3</sub>の添加によりPI3Kの活性化は認められず、正常TR $\beta$  の過剰発現あるいはコントロール (GFAP過剰発現) 細胞では、T<sub>3</sub>の添加によりPI3K活性が誘導された (図6)。従って、TRとp85 $\alpha$ との結合はT<sub>3</sub>を必要としないが、PI3Kの活性化にはTR-T<sub>3</sub>複合体の形成が必要であることが示された。

#### D. 考 察

本年度の研究によりT<sub>3</sub>がTRとの結合を介してPI3K $\rightarrow$ Akt/PKB $\rightarrow$ mTOR $\rightarrow$ p70<sup>S6K</sup>シグナリングカスケードを活性化し、カルシニューリン阻害蛋白ZAKI-4 $\alpha$ の発現を誘導することを世界に先駆けて明らかにした。

我々は、T<sub>3</sub>によるZAKI-4 $\alpha$ の発現増加には*de novo*の蛋白合成が必要とされることを報告した (J Biol Chem, 1996)。従って、T<sub>3</sub>によるAkt/PKB $\rightarrow$ mTOR $\rightarrow$ p70<sup>S6K</sup>の活性化により合成される蛋白がZAKI-4 $\alpha$ の発現調節に関わっていると考えられる。p70<sup>S6K</sup>の標的蛋白はS6 ribosomal proteinであり、その磷酸化は5' TOP mRNAの翻訳を促進し翻訳伸展因子、リボゾーム蛋白などの合成を促す。従って、mTOR $\rightarrow$ p70<sup>S6K</sup>の活性化は蛋白の翻訳促進に重要な役割を果たしている。mTOR $\rightarrow$ p70<sup>S6K</sup>の活性化に伴う翻訳機構のT<sub>3</sub>によるZAKI-4 $\alpha$ の発現増加に関わっている可能性が示唆される。

我々は既にT<sub>3</sub>がZAKI-4 $\alpha$ の発現増加を介し

てCN (protein phosphatase 2B = PP2B) の活性を抑制することを示したが (Biochem J 2002)、活性型 mTORは、protein phosphatase 2A (PP2A) の磷酸化を介して4E-BP1とp70<sup>S6K</sup>の脱磷酸化を抑制することが知られている。従って、T<sub>3</sub>はPP2BのみならずPP2Aの活性調節に関わっている可能性がある。

p85 $\alpha$ は、SH2、SH3、Rho-GAPなどの機能ドメインを持ち、これらのドメインを介して幾つかの蛋白と結合することが知られている。インスリン受容体やIRSはSH2ドメインを介し、Rhoファミリー蛋白 (Rac、Cdc42等) は、Rho-GAPドメインを介してp85 $\alpha$ と結合し、PI3Kを活性化する。SH2ドメインへの結合にはインスリン受容体やIRSのチロシン磷酸化が必要とされるが、TRにはチロシン磷酸化部位は存在しないため、SH2ドメインを介した結合ではないと考えられる。一方、Rho-GAPドメインにはTRと結合する共役因子 (SRC-1、TIF2等) との結合モチーフLXXLLが3つ存在する。従ってT<sub>3</sub>-TR複合体はRho-GAPドメインとの結合によりPI3Kを活性化すると考えられる。

PI3K $\rightarrow$ Akt/PKB $\rightarrow$ mTOR $\rightarrow$ p70<sup>S6K</sup>シグナリングカスケードは、骨格筋・心筋の肥大、神経の発育・分化、種々の細胞株の増殖・分化に重要な役割を果たしていることが知られている。従って、T<sub>3</sub>によるこのカスケードの活性化は古典的な転写を介さない作用により多彩な機能を調節していると考えられる。

#### E. 結 論

これまでT<sub>3</sub>の作用は、核内の受容体 (TR) を介して標的遺伝子の発現を調節するgenomic actionと考えられてきた。しかし、本研究により、T<sub>3</sub>が転写を介さないnongenomic作用によ



ってカルシニューリン抑制蛋白ZAKI-4  $\alpha$  の発現を調節していることが明らかにされた。即ち、T<sub>3</sub>が核外に存在するTRと結合し、この複合体がPI3Kのregulatory subunit p85  $\alpha$  と結合することによりPI3Kを活性化し、その下流のAkt/PKB→mTOR→p70<sup>S6K</sup>からなるキナーゼカスケードを活性化することによりZAKI-4  $\alpha$  の転写を促進することを明らかにした。このT<sub>3</sub>のnon-genomic actionはこれまで報告が無く、新たなT<sub>3</sub>の作用機序の発見と共にRTHの症状、特にattention deficit、精神・知能発育遅延などの中枢神経系症状の発症に本研究により明らかにされたPI3K→Akt/PKB→mTOR→p70<sup>S6K</sup>→ZAKI-4  $\alpha$  が関与している可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. CAO X, KAMBE F, MOELLER LC, REFETTOFF S, SEO H: Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/PKB-mTOR-p70<sup>S6K</sup> cascade through PI3K in human fibroblasts. *Molec.Endocrinol.*, 19(1): 102-112, 2005
2. 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-kappaB in human osteoblast-like cells. *J. Bone. Miner. Res.*, 19(4): 671-679, 2004.
3. MIZUNO Y, KANOU Y, ROGATCHEVA M, IMAI T, REFETTOFF S, SEO H, MURATA Y: Genomic organization of mouse ZAKI-4 gene that encodes ZAKI-4 alpha and beta isoforms, endogenous calcineurin inhibitors, and changes in the expression of these isoforms by thyroid hormone in adult mouse brain and heart. *Europ. J. Endocrinol.*, 150: 371-380, 2004.
4. HIBI Y, NAGAYA T, KAMBE F, IMAI T, FUNAHASHI H, NAKAO A, SEO H: Is thyroid follicular cancer in Japanese caused by a specific t(2;3)(q13;p25) translocation generating Pax-8-PPAR-gamma fusion mRNA? *Endocr. J.*, 51(3): 361-366, 2004.
5. WAKABAYASHI K, KAMBE F, CAO X, MURAKAMI R, MITSUYAMA H, NAGAYA T, SAITO K, YOSHIDA J, SEO H: Inhibitory effects of cyclosporin A on calcium mobilization-dependent interleukin-8 expression and invasive potential of human glioblastoma U251MG cells. *Oncogene*, 23(41): 6924-6932, 2004.
6. KAMIJO T, HAYASHI Y, SEO H, YAMAMOTO M, OGAWA M, CHOSKI CS, SAWANT NJ, COLACO MP, DESAI MP: A nonsense mutation (E72X) in growth hormone releasing hormone receptor (*GHRHR*) gene is the major cause of familial isolated growth hormone deficiency in Western region of India: founder effect suggested by analysis of dinucleotide repeat polymorphism close to *GHRHR* gene. *Growth Horm.IGF Res.*, 14(5): 394-401, 2004.
7. HOSHINO S, TAKAGISHI Y, KANOU Y, HAYASAKA S, HATTORI K, KAMBE F, SEO H, MURATA Y: Spatial and intracellular distribution of the endogenous

calcineurin-inhibitory proteins, ZAKI-4, in mouse brain. Acta Histochem. Cytochem., 37(4): 247-257, 2004.

## 2. 学会発表

1. 小林宏暢, 今井常夫, 神部福司, 村田善晴, 妹尾久雄: 副腎皮質幹細胞の同定とACTHによるその増殖と分化: 第77回日本内分泌学会雑誌, 109, 2004.
2. 曹 霞, 神部福司, 芦 秀麗, 小林奈津子, 妹尾久雄: Glutathionylation of two Cys residues in paired domain (PD) regulates DNA-binding activity of Pax-8. 第77回日本内分泌学会雑誌, 138, 2004.
3. 芦 秀麗, 神部福司, 曹 霞, 大森幸子, 中川幸光, 妹尾久雄: Lack of Diminuto increases susceptibility to serum withdrawal-induced apoptosis and impairs insulin-dependent Akt and Bad signaling in mouse embryonic fibroblasts. 第77回日本内分泌学会雑誌, P047, 2004.

4. ミルザ・ルセラ, 早坂 静, 大森幸子, 中川幸光, 神部福司, 村田善晴, 妹尾久雄: Features of lethal restrictive dermatopathy in DHCR24 knockout (KO) mice. 第77回日本内分泌学会雑誌, P389, 2004.

5. KOZAKI Y, KAMBE F, SEO H, MIZUMURA K: Prostaglandin EP3 receptor-mediated augmentation of bradykinin-induced increases in intracellular calcium. The 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. S113, 9, 2004.

## G. 知的所有権の獲得状況

### 1. 特許取得:

発明の名称: 皮膚病関連遺伝子の用途  
発明者: 妹尾 久雄、村田 善晴  
出願日: 平成16年5月31日  
出願番号: 特願2004-160953

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし

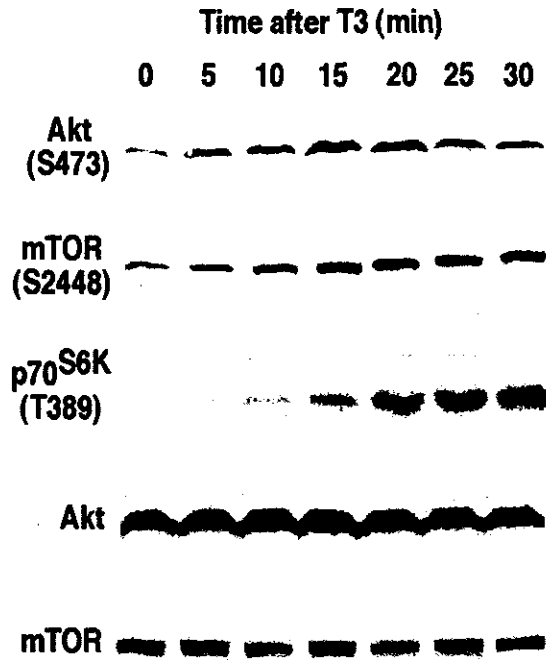


図1. T<sub>3</sub>によるAkt, mTOR, p70<sup>S6K</sup>活性化経時的変化

正常ヒト皮線維芽細胞を甲状腺ホルモン除去FBSを5%含むDMEM中に2日間培養後、T<sub>3</sub> (10<sup>-8</sup>M)を添加し、経時的に細胞を採取した。Akt/PKB, mTOR, p70<sup>S6K</sup>の活性化は図括弧内に示したS (serine)或いはT (threonine)のリン酸化を認識する抗体を用いて検討した。

下段のAkt, mTORは、リン酸化されたキナーゼとされていないキナーゼの両者を認識する抗体を用いた。Akt/PKBの活性化はT<sub>3</sub>添加後5分間で既に認められ、この活性化に次いで、mTOR, p70<sup>S6K</sup>の活性化が認められた。一方、T<sub>3</sub>はAkt/PKB, mTORの量には影響を与えなかった。

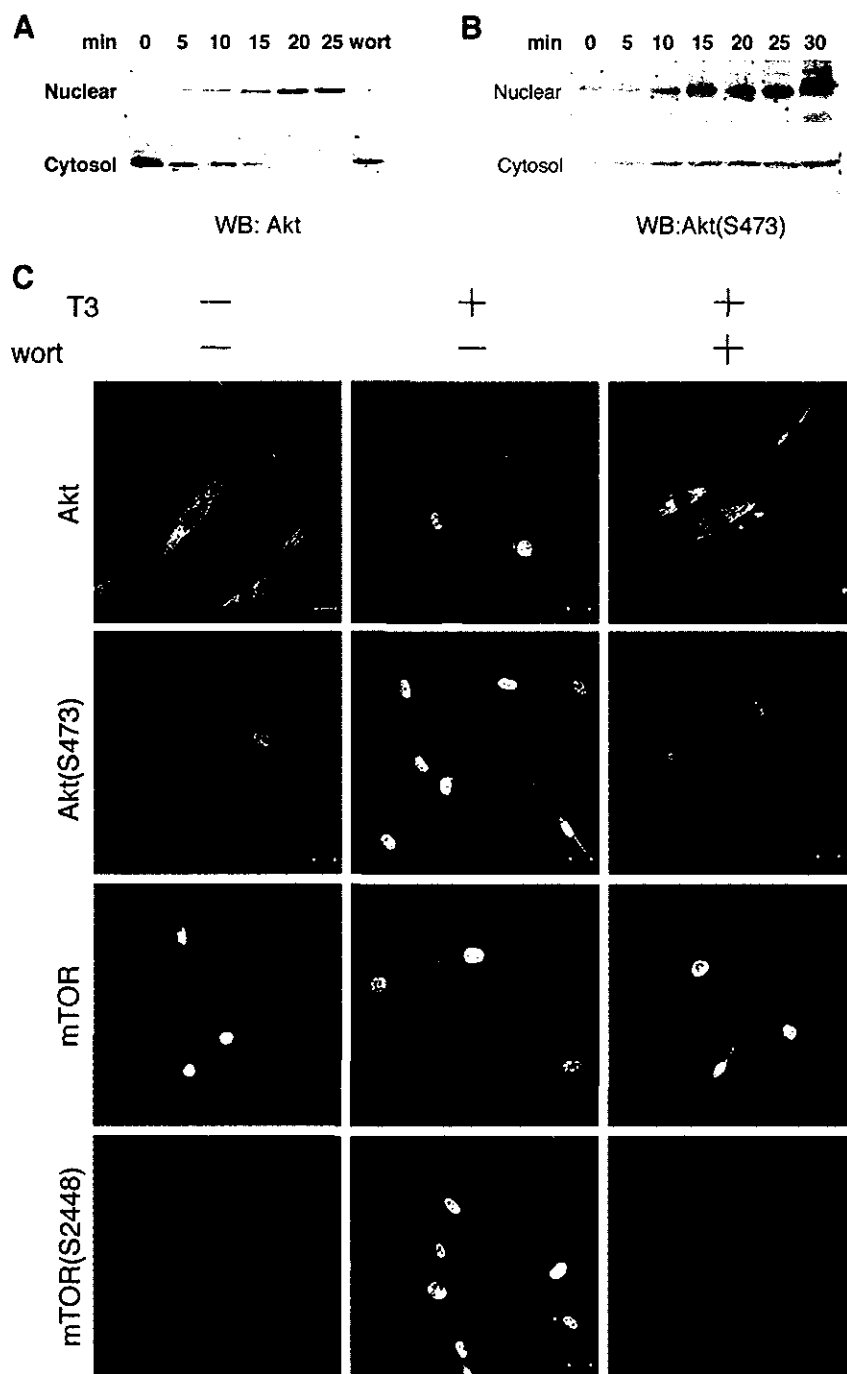


図2. T<sub>3</sub>によるAkt/PKBの核内への移行とmTORの活性化

腺維芽細胞を血清を含まないDMEM中で1日培養後T<sub>3</sub>を添加し、経時的に細胞を採取した。Wortmannin (100nM)はT<sub>3</sub>添加前30分に加えた。ウェスタンブロットにAでは抗Akt/PKB抗体をBでは抗リン酸化Akt抗体を用いた。Cでは、T<sub>3</sub>添加後30分でのAkt/PKBとmTORと活性化されたリン酸化型の細胞内局在を2次抗体に蛍光抗体 (Alexa Flour→488)を用いて検出した。