

松本俊一、橋本貢士、堀口和彦、吉野 聡、
梅澤良平、登丸琢也、石塚高広、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) β Δ 337T 変異
ノックインマウスにおける下垂体前葉ホ
ルモン遺伝子発現の解析
第48回日本甲状腺学会

梅澤良平、山田正信、石井角保、登丸琢
也、石塚高広、渋谷信行、橋本貢士、佐
藤哲郎、森 昌朋
ヒストン修飾と甲状腺ホルモンによる遺
伝子発現抑制機構
第48回日本甲状腺学会

橋本貢士、松本俊一、石塚高広、渋谷信
行、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋
甲状腺ホルモンによるマウス Liver X
receptor (LXR) α 遺伝子発現制御の解析
第48回日本甲状腺学会

Mori M.
AOTA prize lecture
13th International Thyroid Congress

Yamada M
TRH AND TRH receptor knock-out mice
13th International Thyroid Congress

Umezawa R, Yamada M, Ishii S, Satoh T,
Hashimoto K, Shibusawa N, Ishizuka T,
Mori M. ABERRANT HISTONE

MODIFICATION AT THE THYROTROPIN-
RELEASING HORMONE GENE IN RESISTANCE OF
THYROID HORMONE

13th International Thyroid Congress

Hashimoto K, Yamada M, Matsumoto S,
Satoh T, Mori M.

Mouse Sterol Response Element Binding
Protein (SREBP)-1c Gene Promoter Is
Negatively Regulated by Thyroid
Hormone.

87th Endocrine Society Annual Meeting

H. 知的所有権の出願、取得状況
現在のところなし

受容体を介した甲状腺ホルモンの non-genomic action と
甲状腺ホルモン不応症発症機序

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が受容体と結合することにより細胞質の PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 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 (mammalian target of rapamycin) →p70^{S6K} 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、甲状腺ホルモンによる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。本年度の研究では、甲状腺ホルモンによるこのシグナリングカスケードが神経細胞においても活性化されるか否かを検討し、神経細胞のアポトーシス抑制、分化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

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、β型甲状腺ホルモン受容体 (TRβ) 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(T₃)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 TRβ

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)。この遺伝子から3種類の転写産物、α、β1、β2 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 α 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。ZAKI-4 遺伝子産物は 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、 α 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 (Biochem J 367: 459-466, 2002)。 T_3 による α アイソフォームの増加が PI3K \rightarrow Akt/PKB \rightarrow mTOR のキナーゼカスケードの活性化によることを明らかにした。更に、PI3K の活性化は PI3K の調節サブユニットに結合した TR に T_3 が結合することによることを明らかにした (Mol Endocrinol 19:102-12 2005)。本年度の研究では、1) 表現系の異なる RTH 患者から得られた皮膚繊維芽細胞においてこの T_3 によるこのシグナリングカスケードの活性化が異なるか否か、2) 神経細胞におけるこのカスケードの活性化の役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) TR β 遺伝子の変異により異なる表現型、ドミナントネガティブ効果を示す 3 家系から得られた皮膚繊維芽細胞を用いた検討

下記の変異 TR β 遺伝子を持つ患者と正常者から得られた皮膚繊維芽細胞を検討に用いた。

A317T: 精神・知能発育遅延と強いドミナントネガティブ効果を示す

G345R: 強いドミナントネガティブ効果を

示すものの知能発育遅延はない

P453S: ドミナントネガティブ効果は弱く、精神・知能発育遅延も認められない

正常および RTH 患者から得られた甲皮膚繊維芽細胞を甲状腺ホルモン除去血清を含む培地で 2-3 日間培養した後、 T_3 を添加し、経時的に細胞溶解液を作成した。即ち、皮膚繊維芽細胞を緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 1 mM Na_3VO_4 and 1 mM NaF] にて溶解し、4 $^{\circ}$ C、114,000 g にて 15 分間遠心後、上清を、非動化した抗 p85 α 抗体、抗 TR β 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。また、PKB/Akt, mTOR の活性化は特異的リン酸化抗体を用い、Western blotting 法によって検討した。この検討により甲状腺ホルモンにより活性化される PI3K \rightarrow PKB/Akt \rightarrow mTOR シグナリングカスケードが変異 TR のドミナントネガティブ効果と関連があるか否かが明らかにされる。

(倫理面への配慮)

ヒト繊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。

2) 甲状腺ホルモンによる活性化される PI3K \rightarrow PKB/Akt シグナリングカスケード

の神経系における役割

TR を全く発現しない神経細胞株 Neuro2a (N2a) とそれに TR α を恒常的に発現するようにトランスフォームした神経細胞株 Neuro2aTR α (N2a/TR α) は、Instituto de Investigaciones Biomedicas CSIC-UAM (スペイン) の Bernal 博士より供与を受けた。

N2a と N2aTR α は 10%牛胎児血清 (FBS) を含む DMEM/F12 で維持した。コンフルエントになった時点で、FBS を含まず N2 supplement を加えた培養液に変え、4 日間培養後、更に N2 supplement 除去した培養液に 4 時間培養し、T3 添加後経時的に PI3K の下流の基質蛋白のリン酸化を検討した。N2aTR α のアポトーシスは T3 添加、非添加の N2-supplement を含む DMEM/F12 中で 3 日間培養し、TUNEL 法を用いて検討した。更に神経細胞の神経突起の成長に対する影響は T3 添加、非添加の N2-supplement を含む DMEM/F12 中で 5-6 日間培養し形態学的観察を行った。

C. 研究結果

1) TR β 遺伝子の変異により異なる表現型、ドミナントネガティブ効果を示す 3 家系から得られた皮膚繊維芽細胞を用いた検討

我々は、正常 TR β 、変異 TR β 共に p85 α と結合し、この結合は T₃ 非依存性であることを報告した。しかしながら、PI3K 活性の活性化には T3 と TR β との結合が必須

であることを報告した (Mol Endocrinol 19:102-12 2005)。今回は表現系、ドミナントネガティブ効果の異なる変異 TR β 遺伝子 (A317T、G345R、P453S) のヘテロ接合体患者から得られた皮膚繊維芽細胞に T3 を添加し、PI3K \rightarrow Akt/PKB \rightarrow mTOR の活性化を検討した。何れの繊維芽細胞においてもこのシグナリングカスケードの活性化は認められず。ドミナントネガティブ効果の強さには関係なく、T3 結合を欠如する TR β は PI3K の活性化できないことが明らかにされた。

2) 甲状腺ホルモンによる活性化される PI3K \rightarrow PKB/Akt シグナリングカスケードの神経系における役割

神経細胞株 Neuro2a (N2a) は、TR β 、TR α の何れも発現していないことを PCR を用いて確認した。一方 Neuro2aTR α (N2a/TR α) は、TR α のみを発現していた。T3 の添加により、N2a では PI3K の活性化が認められず、N2a/TR α においては認められた。神経細胞では、PI3K の下流の基質として蛋白リン酸化酵素 Akt/PKB、GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) や、転写因子 FOXO1、FOXO3 (a member of Forkhead box-containing protein, *FOX* subfamily)、アポトーシス関連蛋白 Bad などが知られている。図 1A に示す如く、N2a/TR α においては T3 添加後速やかにこれらの基質がリン酸化された。T3 によるこれらの基質のリン酸化は PI3K インヒビターの wortmannin により阻害され (図 1B)、PI3K

の活性化が T3 作用の開始点であることが確かめられた。更に、図 2 に示すように、N2a/TR α は血清除去後により Akt/PKB、GSK3 β 、BAD などの脱リン酸化が認められるが、T3 の存在によりリン酸化が保持された。

リン酸化された BAD はミトコンドリアからのチトクローム C の放出を抑制しアポトーシスを抑制することが知られている。リン酸化 FOXO は核内から核外へ移送され、アポトーシス関連遺伝子の転写が抑制される。図 3 に示す如く、血清を含まず N2 supplement を添加した培養液に 3 日間にわたり、T3 を添加すると、AKT/PKB、BAD のリン酸化が維持され、TUNEL 陽性細胞の著しい減少が認められた。

GSK3 β のリン酸化による不活性化は軸索の伸展を誘導することが知られている。事実、図 3C に示す如く軸索特異的蛋白 neurofilament 陽性の神経突起の伸展が 5 日間の T3 添加により認められた。

D. 考察

甲状腺ホルモンが中枢神経系の発達、成熟に重要な役割を果たしていることはよく知られている。これまで、幾つかの甲状腺ホルモン応答性遺伝子が中枢神経系において同定されているが、T3 の non-genomic action を介した作用は報告されていない。我々は甲状腺ホルモンが TR を介して PI3K \rightarrow Akt/PKB カスケードを活性化することを正常人から得られたヒト皮膚繊維芽細胞において示し、RTH 患者から得られた皮膚繊維芽細胞ではこれが

認められないことを示した。この活性化機序が神経系にも存在するか否かを Neuro2A/TR α を用いて検討した。甲状腺ホルモンは神経細胞においても TR 依存性に PI3K を活性化し、その下流の基質のリン酸化により、アポトーシスを抑制し、分化を促進することが初めて示された。

E. 結論

これまで T₃ 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、T₃ が転写を介さない nongenomic 作用によって神経細胞の機能を調節していることが示された。この T₃ の non-genomic action はこれまで報告が無く、新たな T₃ 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. Lu X, Kambe F, Cao Xia, Yoshida T, Ohmori S, Murakami K, Kaji T, Ishii T, Zadworny D, Seo H: DHCR24-knockout embryonic fibroblasts are susceptible to serum withdrawal-induced apoptosis because of dysfunction of caveolae and insulin-Akt-Bad signaling. *Endocrinology*. 2006 (in press)

2. Kobayashi H, Kambe F, Imai T, Hibi Y, Kikumori T, Ohmori S, Nakao A, Seo H: Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p27Kip1 and p57Kip2, by corticotropin in rat adrenal cortex. *J Endocrinol.* 2006. (in press)
3. Murakami H, Murakami R, Kambe F, Cao X, Takahashi R, Asai T, Hirai T, Numaguchi Y, Okumura K, Seo H, Murohara T. Fenofibrate activates AMPK and increases eNOS phosphorylation in HUVEC. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 24;341(4):973-8.
4. Mirza R, Hayasaka S, Takagishi Y, Kambe F, Ohmori S, Maki K, Yamamoto M, Murakami K, Kaji T, Zadworny D, Murata Y, Seo H. DHCR24 Gene Knockout Mice Demonstrate Lethal Dermopathy with Differentiation and Maturation Defects in the Epidermis. *J Invest Dermatol.* 2006 Mar;126(3):638-47.
5. Hibi Y, Kambe F, Tominaga Y, Mizuno Y, Kobayashi H, Iwase K, Imai T, Seo H. Up-regulation of the gene encoding protein kinase A type I alpha regulatory subunit in nodular hyperplasia of parathyroid glands in patients with chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Feb;91(2):563-8.
6. Cao X, Kambe F, Lu X, Kobayashi N, Ohmori S, Seo H. Glutathionylation of two cysteine residues in paired domain regulates DNA binding activity of Pax-8. *J Biol Chem.* 2005 Jul 8;280(27):25901-6.
7. Cao X, Kambe F, Seo H. Requirement of thyrotropin-dependent complex formation of protein kinase A catalytic subunit with inhibitor of κ B proteins for activation of p65 nuclear factor- κ B by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology.* 2005 Apr; 146(4): 1999-2005.
8. Cao X, Kambe F, Moeller L C., Refetoff S, Seo H: Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/Protein kinase B-mammalian target of rapamycin -p70^{S6K} cascade through Phosphatidylinositol

- 3-kinase in human fibroblasts. Jan., Molec. Endocrinol. 2005 19(1):102-12.
9. Desai M P., Upadhye. S., Kamijo T, Yamamoto M, Ogawa M, Seo Hisao, Nair S. R.: Growth hormone releasing hormone receptor (GHRH-R) gene mutation in Indian children with familial isolated growth hormone deficiency: A study from Western India. J Pediat Endocrinol Metab. 2005 Aug.;18(10):955-73.
2. 学会発表
1. SEO Hisao, CAO Xia, KAMBE Fukushi, MOELLER Lars C., REFETOFF Samuel: Regulation of the expression of a calcineurin inhibitors, ZAKI-4alpha by thyroid hormone through activation of P13K-Akt/PKB-mTOR signaling cascade. Spring Symposium of Korean Endocrinology Society, 4, 2005. (Seul)
2. 妹尾久雄: 内因性カルシニューリン抑制蛋白, ZAKI-4 の中枢神経系における役割. 第3回21世紀COE国内シンポジウム, 7, 2005. (名古屋)
3. SEO Hisao: Upregulation of calcineurin inhibitor through T3-dependent activation of P13K-Akt/PKB-mTOR signalling. 7th International Workshop on Resistance to Thyroid Hormone, 9, 2005. (Lyon)
4. 妹尾久雄: *DHCR24* 遺伝子の欠損と上皮の分化. 環境への生体適応の分子細胞機構. 環境医学国際シンポジウム, 11, 2005. (名古屋)
5. 芦 秀麗, 神部福司, 曹 霞, 大森幸子, 村上弘次, 妹尾久雄: Dysfunction of caveolae is the cause of impairment of insulin signaling induced by cholesterol depletion in embryonic fibroblasts from *DHCR24-KO* mice (*KO* MEFs). 第78回日本内分泌学会学術総会 7, 2005. (東京)
6. 曹 霞, 神部福司, 大森幸子, 村上弘次, 妹尾久雄: Cholesterol biosynthesis is essential for neurite outgrowth. 第78回日本内分泌学会学術総会, 7, 2005. (東京)
7. MIRZA Rusella, 早川 静, 大森幸子, 村上弘次, 神部福司, 村田善晴, 妹尾久雄: Cholesterol biosynthesis is essential for epidermal

differentiation and formation of epidermal barrier. 第78回日本内分泌学会学術総会, 7, 2005. (東京)

8. 小林宏暢, 今井常夫, 柴田有宏, 菊森豊根, 神部福司, 妹尾久雄: 副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)による副腎皮質幹細胞の増殖と分化. 第78回日本内分泌学会学術総会, 7, 2005. (東京)

G. 知的所有権の獲得状況

1. 実用新案登録: なし

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

バセドウ病眼症の病因・病態の解明と診断・治療法の開発に関する研究
-バセドウ病眼症と ICAM-1、PTPN22 遺伝子多型について-

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

研究要旨：

T細胞の活性化に関与する ICAM-1 や PTPN22 遺伝子多型がバセドウ病やバセドウ病眼症の発症や重症度と関連しているか否かを日本人を対象に検討した。ICAM-1 遺伝子多型とバセドウ病眼症の発症との間には有意な関連が認められた。PTPN22 遺伝子多型は日本人ではバセドウ病や眼症の発症と関連はみられなかった。人種、地域により遺伝因子の関与の程度は異なることが示唆された。

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。私どもはこれまでに遺伝因子として TNF- α 遺伝子多型との関連を報告してきた。

今回は ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 遺伝子、PTPN22 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22) 遺伝子多型とバセドウ病やバセドウ病眼症との関連性について検討した。

1. 研究方法

対象は久留米大学病院受診中のバセドウ病患者 429 例（アメリカ甲状腺学会の分類で class III 以上の眼症を有するもの

125 例）と医療スタッフの健常対照者 235 例、を対象とした。

遺伝子多型は、dot-blot hybridization with SSOP、PCR-RFLP、sequence specific PCR、direct sequence 法にて測定し、解析した。

（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。

2. 研究結果

ICAM-1 遺伝子 G241R 多型はバセドウ病患者も健常者も日本人では全例 GG genotype であり、多型は認められなかった。K469E 多型はバセドウ病と健常者との比較では差がみられなかったが、ATA class III 以

上の眼症を有するバセドウ病患者では眼症がないかあるいは軽い症例に比較して AA genotype の頻度が有意に高かった (表 1)。

PTPN22 遺伝子 R620W 多型はバセドウ病患者および健常者ともに GG genotype であり、日本人では R620W 多型は存在しなかった。PTPN22 遺伝子 JST119816 多型について検討したが、バセドウ病患者と健常者の間で genotype 頻度、allele 頻度ともに差がみられなかった。眼症の有無でも差がみられなかった (表 2)。

3. 考察

ICAM-1 は抗原提示細胞上の接着分子で T 細胞上の LFA-1 と結合し、T 細胞の活性化やリンパ球浸潤などに重要な役割を果たしている。眼症患者では後眼窩組織における ICAM-1 の発現や血中 soluble ICAM-1 の増加が報告されている。したがって ICAM-1 遺伝子多型はその発現を介して、後眼窩組織での自己免疫反応に影響を及ぼし、眼症の病態形成に大きな役割を演じていると推測される。

PTPN22 は T 細胞活性化を抑制する作用を有し、その遺伝子多型は白人においてはバセドウ病の発症と関連があることが示されている。今回の日本人での検討では白人で報告されている R620W 多型は存在しなかった。JSNP で報告されている JST119816 多型について検討したが、バセドウ病や眼症の発症と関連はみられなかった。PTPN22 遺伝子が日本人では関係し

ていないと結論するには PTPN22 遺伝子上のさらに多くの SNPs について検討する必要がある。また人種、地域により遺伝因子の関与は異なるので、日本人での遺伝因子を明らかにする必要性が示唆された。眼症は外眼筋腫大をきたして眼球運動障害を呈するものや脂肪組織の増大をきたし眼球突出を呈するものなど大きく 2 つの病型が存在する。今後はこれらの病型別の解析をすすめる必要がある。

4. 結論

ICAM-1 遺伝子あるいは ICAM-1 遺伝子と連鎖不均衡にある遺伝子は、バセドウ病眼症の発症と関連する疾患感受性遺伝子の一つと推測される。

5. 健康危険情報

なし

6. 研究発表

2. 論文発表

1) Mukai T, Hiromatsu Y, Fukutani T, Ichimura M, Kaku H, Miyake I, Yamada K. A C/T polymorphism in the 5' untranslated region of the CD40 gene is associated with later onset of Graves' disease in Japanese. *Endocr J.* 2005 Aug; 52(4):471-7.

2) Kurylowicz A, Kula D, Ploski R, Skorka A, Jurecka-Lubieniecka B, Zebracka J, Steinhof-Radwanska K, Hasse-Lazar K, Hiromatsu Y, Jarzab B,

Bednarczuk T. Association of CD40 Gene Polymorphism (C-1T) with Susceptibility and Phenotype of Graves' Disease. *Thyroid*. 2005 Oct; 15(10):1119-24.

3) Hiromatsu Y, Mukai T, Kaku H, Miyake I, Ichimura M, Fukutani T, Nakayama H, Takata K, Imamura Y, Shoji S, Yamada K, Koda Y, Bednarczuk T. IL-18 Gene Polymorphism Confers Susceptibility to the Development of Anti-GAD65 Antibody in Graves' Disease. *Diabetic Medicine* 23: 211-215, 2006.

4) 広松雄治, 迎徳範, 賀来寛雄, 三宅育代: バセドウ病患者における抗 GAD 抗体. *内分泌・糖尿病科* (1341-3724) 20 巻 4 号 Page414-418 (2005. 04)

5) 広松雄治: 【内分泌疾患 UPDATE】甲状腺 Basedow 病眼症の病因・診断・治療 *医学のあゆみ* (0039-2359) 213 巻 5 号 Page355-359 (2005. 04)

6) 広松雄治: バセドウ病眼症 ソマトスタチン・アナログ薬. 阿部好文・西川哲男 (編) *臨床に直結する内分泌・代謝疾患治療のエビデンス*. 文光堂 63-65, 2005

2. 学会発表

1) Hiromatsu Y: Therapeutic approaches for Graves' ophthalmopathy. Symposium; 13th International

Thyroid Congress, Buenos Aires, Argentina, October30-November 4, 2005

2) 広松雄治, 福谷知香, 一村美智子, 迎徳範, 賀来寛雄, 三宅育代, 今村洋一, 小路眞護, 山田研太郎: IL-12B 遺伝子多型とバセドウ病 第 78 回日本内分泌学会総会 平成 17 年 7 月 1 日~3 日、東京

3) 迎徳範, 広松雄治, 三宅育代, 賀来寛雄, 一村美智子, 福谷知香: バセドウ病における ICAM-1 遺伝子多型 第 48 回日本甲状腺学会総会 平成 17 年 11 月 21 日~23 日、東京

7. 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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子に関する検討

分担研究者 赤水尚史 京都大学医学部附属病院 探索医療センター 助教授

研究要旨：

我々はこれまでに、マイクロサテライトマーカーおよび SNP を用いて、自己免疫性甲状腺疾患患者群（AITD）と健常者コントロール群との関連解析を行い、CTLA-4 遺伝子や TSHR 遺伝子が疾患感受性遺伝子である可能性を示唆してきた。今回、自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子である HLA 遺伝子を含めてこれら 3 遺伝子間の相互作用について検討した。その結果、HLA-DRB1、CTLA-4-CT60、TSHR-JST022302 の遺伝子多型との間には自己免疫性甲状腺疾患、特に橋本病において、相互作用が示唆された。さらに、全ゲノムスクリーニングで見出されたバセドウ病疾患感受性遺伝子存在領域である 5q23-33 において、マイクロサテライト多型マーカーを用いて関連解析を行った。IRF1 の intron9 の SNP 以外にこの領域では有意な関連を示す SNP は見つからなかった。今後、さらに多数の SNP を用いた検討を要すると考えられた。

A. 研究目的

自己免疫性甲状腺疾患は、複数の遺伝因子と環境因子によって引き起こされる臓器特異的自己免疫性疾患である。我々はこれまでに、多因子性疾患の一つである自己免疫性甲状腺疾患の遺伝的素因について検討してきた。候補遺伝子アプローチとして、自己抗原である TSH レセプター遺伝子と免疫制御分子である CTLA 遺伝子を中心に検討し、マイクロサテライト多型マーカーによって有意な相関を得た。また、共同研究において、sib pair を用いたランダムスクリーニングによる

ポジショナルクローニングアプローチを行い、lod score 3 以上の興味あるローカスを幾つか見出している。さらに、同ローカスのうち 5q23-33 に存在するマイクロサテライト多型マーカーを用いてうち数個において有意な関連を認めた。そこで、今回の研究においては、1) 候補遺伝子の一つである TSH レセプター遺伝子、CTLA-4 遺伝子、HLA 遺伝子の多型を用いて、これら 3 遺伝子間の相互作用について検討した。2) 全ゲノムスクリーニングで見出された同病疾患感受性遺伝子存在領域である 5q23-q33 において、免疫関

連遺伝子を中心として候補遺伝子を pick up し、SNP やマイクロサテライト多型マーカーによる関連解析を行った。

B. 研究方法

遺伝子相互作用の検討では、自己免疫性甲状腺疾患と有意な連関のある HLA Class II DRB1 の遺伝子多型、CTLA-4 遺伝子の SNP-CT60 多型、TSHR の JST022302 多型を用いた。

染色体 5q23-33 領域については、同領域約 1 cM 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) 遺伝子間相互作用の検討：

CTLA-4-CT60 の allele G は AITD、特にバセドウ病で有意に増加し、橋本病でも増加傾向を示した。HLA-DRB1 では DRB1*04 の頻度が AITD、特に橋本病で上昇、また DRB1*09 も橋本病で頻度が上昇していた。上記の CTLA-4-CT60 や HLA-DRB1 との相互作用に関する検討では、CTLA-4-CT60 の疾患感受性 allele G と HLA-DRB1*04 を共に有する頻度が健常者に比べて AITD、特に橋本病で有意に増加しており、バセドウ病でもゆるやかな増加が見られた。また、HLA-DRB1*03 と allele G を共に有する頻度は AITD、特に橋本病で減少していた。TSHR の JST022302 (intron7) と、HLA-DRB1 との相互作用に関する検討では、TSHR の

疾患感受性 allele A と HLA-DRB1*04 を共に有する頻度が健常者に比べて AITD、特に橋本病で有意に増加しており、バセドウ病でもゆるやかな増加が見られた。また、HLA-DRB1*03 と allele A を共に有する頻度は AITD、特に橋本病で減少していた。

2) Ch5q21-q33 領域の解析：

IL4、IL13、IL9 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 IRF1 intron9 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

HLA-DRB1 と 2 つの遺伝子、CTLA-4-CT60、TSHR の JST022302 との間には自己免疫性甲状腺疾患、特に橋本病において、相互作用が示唆された。

5q23-q33 領域の解析に関しては、今後さらに多数の SNP を用いた検討を要すると考えられた。

E. 結論

自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性候補遺伝子間に軽度の相互作用が示唆され

た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Akamizu T, Murayama T, Teramukai S, Miura K, Bando I, Irako T, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Tada H, Matsuyama A, Kojima S, Wada T, Wakatsuki Y, Matsubayashi K, Kawakita T, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Kangawa K: Plasma ghrelin levels in healthy elderly volunteers: the levels of acylated ghrelin in elderly females correlate positively with serum IGF-1 levels and bowel movement frequency and negatively with systolic blood pressure. *J Endocrinol.* 188 (2): 333-344, 2006.
- ② Iwakura H, Hosoda K, Son C, Fujikura J, Tomita T, Noguchi M, Ariyasu H, Takaya K, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Itoh H, Toyokuni S, Kangawa K, Nakao K: Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagons promoter-ghrelin transgenic mice. *J Biol Chem.* 280 (15): 15247-15256, 2005.
- ③ Hiratani H, Bowden DW, Ikegami S, Shirasawa S, Shimizu A, Akamizu T: Multiple major alleles of SNPs in intron 7 of thyrotropin receptor are associated with Graves' disease. *J*

Clin Endocrinol Metabo. 90(5): 2898-2903, 2005.

④ Shinomiya T, Fukunaga M, Akamizu T, Irako T, Kangawa K, Nakai Y, Nakai Y: Plasma acylated ghrelin levels correlate with subjective symptoms of functional dyspepsia in female patients, *Scand J Gastroenterol* 40 (6): 648-653, 2005.

⑤ 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. *J Clin Endocrinol Metabo.* 90 (1):6-9, 2005

⑥ 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.

2. 学会発表

① Akamizu T: Genetic susceptibility and familial Graves' disease. 13th International Thyroid Congress, Oct30-Nov.4, 2005, Buenos Aires, Argentina.

② Akamizu T: Susceptible genes of autoimmune thyroid diseases. *Journal of Korean Society of Endocrinology*, Nov.18-20, 2005, Gyeongju, Korea

③有安宏之、岩倉浩、五十子大雅、金本巨哲、中尾一和、赤水尚史、寒川賢治：甲状腺機能亢進状態におけるエネルギーバランス変動の血中グレリン濃度に与える影響。第48回日本甲状腺学会。品川インターシティホール。平成17年11月21日～23日。

④平谷仁美、赤水尚史：Ch5q23-q33領域内候補遺伝子のSNPを用いた自己免疫性甲状腺疾患との関連解析。第48回日本甲状腺学会。品川インターシティホール。平成17年11月21日～23日。

⑤岩倉浩、細田公則、藤倉純二、富田努、有安宏之、五十子大雅、赤水尚史、細田洋司、中尾一和、寒川賢治：脾臓におけるグレリン過剰発現トランスジェニックマウスの解析。第42回日本臨床分子医学会学術集会。京都大学医学部百周年記念施設芝蘭会館。平成17年7月22日～23日。

⑥金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、旗谷雄二、有安宏之、森山賢治、細田洋司、児島将康、荒井宏司、寒川賢治、中尾一和：ヒトグレリン遺伝子プロモーター解析と遺伝子転写調節におけるUSF(Upstream stimulatory factor)の意義。第78回

日本内分泌学会学術総会。京王プラザホテル。平成17年7月1日～3日。

⑦平谷仁美、Bowden Donald、池上賢、清水章、赤水尚史：HLA-DRB1遺伝子型およびCTLA-4遺伝子多型の遺伝子間相互作用の検討。第78回日本内分泌学会学術総会。

京王プラザホテル。平成17年7月1日～3日。

⑧金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、旗谷雄二、有安宏之、森山賢治、荒井宏司、寒川賢治、中尾一和：ヒトグレリン遺伝子発現調節機構の解析。第102回日本内科学会総会。大阪国際会議場。平成17年4月7日～9日。

⑨有安宏之、高屋和彦、金本巨哲、岩倉浩、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および作用の解明とその臨床的意義。第102回日本内科学会総会。大阪国際会議場。平成17年4月7日～9日。

⑩金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、旗谷雄二、有安宏之、森山賢治、八十田明宏、小松弥郷、荒井宏司、中尾一和：甲状腺ホルモンによるヒトグレリン遺伝子転写調節に関する検討。第48回日本甲状腺学会。品川インターシティホール。平成17年11月21日～23日。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

五十子大雅（京都大学医学部）

岩倉浩（京都大学医学部）

有安宏之（京都大学医学部）

寒川賢治（京都大学医学部、国立循環器
病センター）

IV. 研究成果の刊行に関する一覧

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ito Y, Inoue D, Kido S and <u>Matsumoto T</u>	c-Fos degradation by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in osteoclast progenitors.	Bone	37 (6)	842-849	2005
Shibata H, Abe M, Hiura K, Wilde J, Moriyama K, Sano T, Kitazoe K, Hashimoto T, Ozaki S, Wakatsuki, S Kido S, Inoue D, <u>Matsumoto T</u>	Malignant B-lymphoid cells with bone lesions express RANK ligand and VEGF to enhance osteoclastogenesis.	Clin Cancer Res	11 (17)	6109-6115	2005
Oshima T, Abe M, Asano J, Hara T, Kitazoe K, Sekimoto E, Tanaka Y, Shibata H, Hashimoto T, Ozaki S, Kido S, Inoue D, <u>Matsumoto T</u>	Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2.	Blood	106 (9)	3160-3165	2005
<u>Matsumoto T</u> , Miki T, Hagino H, Sugimoto T, Okamoto S, Hirota T, Tanigawara Y, Hayashi Y, Fukunaga M, Shiraki M, Nakamura T	A New Active Vitamin D, ED-71, Increases Bone Mass in Osteoporotic Patients under Vitamin D Supplementation: A Randomized, Double Blind, Placebo-controlled Clinical Trial	J Clin Endocrinol Metab	90 (9)	5031-5036	2005
Nawata H, Soen S, Takayanagi R, Tanaka H, Takaoka K, Fukunaga M, <u>Matsumoto T</u> , Tanaka H, Fujiwara S, Miki T, Sagawa A, Nishizawa Y, Seino Y	Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis (2004 edition)	J Bone Miner Metab	23 (2)	105-109	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iu MF, Kaji H, Sowa H, Naito J, <u>Sugimoto T</u> and Chihara K.	Dexamethasone suppresses Smad3 pathway in mouse osteoblastic cells.	J Endocrinol	185(1)	131-138	2005
Matsumoto T, Miki T, Hagino H, <u>Sugimoto T</u> , Okamoto S, Hirota T, Tanigawara Y, Hayashi Y, Fukunaga M, Shiraki M and Nakamura T.	A new active vitamin D, ED-71, increase bone mass in osteoporotic patients under vitamin D supplementation: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial.	J Clin Endocrinol Metab	90	5031-5036	2005
Kaji H, Yamauchi M, Chihara K and <u>Sugimoto T</u> .	Eur J Endocrinol 153(3):373-378. The threshold of bone mineral density for vertebral fractures in patients with primary hyperparathyroidism.	Blood	106 (9)	3160-3165	2005
Iu MF, Kaji H, Sowa H, <u>Sugimoto T</u> and Chihara K.	Low-dose parathyroid hormone and estrogen reverse alkaline phosphatase activity suppressed by dexamethasone in mouse osteoblastic cells.	J Bone Miner Metab	23(6)	450-455	2005
Kaji H, Kanatani M, <u>Sugimoto T</u> and Chihara K.	Statins modulate the levels of osteoprotegerin/receptor activator of NfκB ligand mRNA in mouse bone cell cultures.	Horm Metab Res	37(10)	589-592	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaji H, Kosaka R, Yamauchi M, Kuno K, Chihara K and <u>Sugimoto T.</u>	Effects of age, grip strength and smoking on volumetric bone mineral density and bone geometry by peripheral quantitative computed tomography: comparisons between female and male.	Endocr J	52(6)	659-666	2005
Kaji H, Tobimatsu T, Naito J, Iu MF, Yamauchi M, <u>Sugimoto T</u> and Chihara K.	Body composition and vertebral fracture risk in female patients treated with glucocorticoid.	Osteoporosis Int	31	1-7	2005
Yamaguchi T, Kanatani M, Yamauchi M, Kaji H, Sugishita T, Baylink DJ, Mohan S, Chihara K and <u>Sugimoto T.</u>	Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)I, IGF-binding proteins-3, -4 and -5: their relationships to bone mineral density and the risk of vertebral fractures in postmenopausal women.	Calcif Tissue Int	78(1)	18-24	2005
Kaji H, Yamauchi M, Chihara K and <u>Sugimoto T.</u>	The threshold of bone mineral density for vertebral fracture in female patients with glucocorticoid-induced osteoporosis	Endocrine J	53(1)	27-34	2005
Tobimatsu T, Kaji H, Sowa H, Naito J, Canaff L, Hendy GN, <u>Sugimoto T</u> and Chihara K	Parathyroid hormone increases β -catenin levels through Smad3 in Mouse Osteoblastic Cells.	Endocrinology		in press	2005