

A. 研究目的

甲状腺ホルモン (TH) 不応症 (RTH) は TH の標的組織での反応性が低下もしくは欠如した状態であり、TH 高値にも関わらず Thyrotropin (TSH) の高値を呈する TSH 不適切分泌 (SITSH) を認める。今まで RTH における下垂体甲状腺系の解析は国内外において精力的に行われて来たが、その他の下垂体前葉系ホルモンについては血中濃度、遺伝子発現などを含めほとんど分かっていない。

今回我々は RTH のモデルマウスである甲状腺ホルモンレセプター TR β ノックイン (TRKI) マウスを用いて、RTH における下垂体前葉系ホルモン遺伝子発現を解析した。さらに RTH においては視床下部-下垂体-甲状腺 (HPT) 系のネガティブフィードバックの破綻から、TRH もまた不適切に分泌されていることが予想される。しかしながら RTH における TRH の作用についてはほとんど解析されていない。今回我々は RTH においても、TRH は HPT 系を制御しているかを解析した。

B. 研究方法

TRKI マウス雄 4 週齢の各ゲノタイプの下垂体からトータル RNA を抽出し、各下垂体前葉系ホルモン遺伝子のプローブを用いてノーザンブロット解析と、各下垂体前葉系ホルモン特異的抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。さらに TRKI マウスホモ体と TRH ノックアウトマウスホモ体を交配し、KOKI マウ

スを作製した。雄 4 週齢の野生型、ノックインマウスホモ体 (KI) と KOKI マウスの下垂体よりトータル RNA を抽出しノーザンブロット、リアルタイム PCR で TSH β 遺伝子の発現を解析した。さらに TSH 特異的抗体で下垂体の免疫染色を行った。

(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

TSH β 遺伝子は野生型と比較し、ヘテロ体で 1.2 倍、ホモ体で 18 倍の発現の増加を認めた。また TSH α 遺伝子は野生型と比較し、ヘテロ体で 1.2 倍、ホモ体で 3.7 倍の発現の増加を認めた。免疫組織染色では野生型と比較してヘテロ体さらにホモ体で染色陽性細胞数の増加を認めた。GH 遺伝子は野生型とヘテロ体では有意な差を認めなかったが、ホモ体で野生型の 40% と発現の減弱を認めた。免疫組織染色でもホモ体で染色陽性細胞数の減少を認めている。PRL 遺伝子においても野生型とヘテロ体ではその発現に有意な差を認めなかったが、ホモ体で野生型の 60% と発現の減弱を認めた。PRL も免疫組織染色においてホモ体で染色陽性細胞数の減少が認められた。POMC 遺伝子では野生型よりもヘテロ体で 60% と発現の減弱を認め、ホモ体で 30% と更なる減弱を認めた。免疫組織染色でも野生型と比

較してヘテロ体さらにホモ体で染色陽性細胞数の減少を認めた。しかしながら LH や FSH では遺伝子発現にゲノタイプ間の差異を認めず、免疫組織染色でも染色陽性細胞数に差異を認めなかった。

さらに TSH β 遺伝子の発現は野生型に比して KI (ホモ体)、KOKI ともに著明に増加するが、KOKI では KI より約 20% の減少を認めた。しかし免疫染色では KI と KOKI で野生型に比して陽性細胞数は著明に増加したが両者に差異を認めず、末梢血中のフリー T4 値も両者では差異を認めなかった。

D. 考察

TSH 遺伝子では α 、 β とも野生型に比して、ヘテロ体で遺伝子発現が増加し、ホモ体で更なる増加を認めた。免疫染色の所見と併せて SITSH に合致するものと考えられた。PRL、GH はホモ体でのみ遺伝子発現の減少を認めたが、これはホモ体の飼育の不良及び生後 1 2 週以降の体重減少、骨格異常に関連するものと考えられた。最も TRKI マウスで減少を認めたのは ACTH (POMC) 遺伝子であるが、これは血中 ACTH、コルチコステロン値測定などさらなる検討が必要と考えられた。一方性ホルモンを規定する LH、FSH には大きな変化を認めず今後、雌の解析も必要と考えられた。

また TR β Δ 337T 変異体は TRH 非存在下でも SITSH を引き起こすと考えられた。TSH 遺伝子発現には閾値があり、

一定の値からは末梢の TH 値に影響しないことが示唆される。

E. 結論

1) RTH では下垂体前葉における GH、PRL、ACTH の遺伝子発現低下を認め、特に ACTH の低下の程度が顕著である。

2) RTH における LH、FSH の下垂体前葉における遺伝子発現は野生型と比して差異はない。

3) RTH においても TRH は TSH の遺伝子発現に影響を与えているが TSH 遺伝子発現には閾値があり、一定の値からは末梢の TH 値に影響しない。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hashimoto K, Yamada M, Matsumoto S, Monden T, Satoh T, Mori M.

Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology*. **147**:4292-4302, 2006

2) Hashida T, Yamada M, Hashimoto K, Satoh T, Okada S, Shibusawa N, Ishizuka T, Mori M.

Loss of Consciousness and Hypokalemia in an Elderly Man with a Mutation of the Thiazide-sensitive Na-Cl

Cotransporter Gene.

Endocr J. 53:859-863, 2006

3) Nikrodhanond AA, Ortiga-Carvalho TM, Shibusawa N, Hashimoto K, Liao XH, Refetoff S, Yamada M, Mori M, Wondisford FE.

Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis.

J Biol Chem. 281:5000-5007. 2006

2. 学会発表

森 昌朋

甲状腺疾患と肥満症に関する調節因子の研究 (日本内分泌学会学会賞受賞講演)
第79回日本内分泌学会学術総会

橋本貢士、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋
甲状腺ホルモンの作用と代謝に関する最近の進歩 糖脂質代謝における甲状腺ホルモン作用の新知見<甲状腺ホルモン不応症 (RTH) モデルマウスを用いた解析>(シンポジウム)

第79回日本内分泌学会学術総会

梅澤良平、山田正信、石井角保、石塚高広、渋沢信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森 昌朋

ヒストンコードと甲状腺ホルモンによる遺伝子発現抑制機構

第79回日本内分泌学会学術総会

堀口和彦、山田正信、梅澤良平、中島康代、石塚高広、渋沢信行、橋本貢士、佐藤哲郎、登坂雅彦、齊藤延人、森 昌朋
下垂体腺腫における MENIN 並びに p27(Kip1)mRNA の発現

第79回日本内分泌学会学術総会

佐藤哲郎、石塚高広、吉野 聡、登丸琢

也、渋沢信行、橋本貢士、山田正信、森 昌朋

甲状腺ホルモンによる TRH 遺伝子転写抑制におけるリガンド依存性 corepressor RIP140 ならびに L-CoR の役割

第79回日本内分泌学会学術総会

吉野聡、佐藤哲郎、登丸琢也、石塚高広、橋本貢士、渋沢信行、山田正信、森 昌朋
アミノ末端構造が異なるヒト PPAR γ -DNA-binding domain-interacting

protein 1 のアイソフォームの同定

第79回日本内分泌学会学術総会

松本俊一、橋本貢士、堀口和彦、吉野聡、梅澤良平、石塚高広、渋沢信行、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

Liver X receptorによる下垂体前葉ホルモン遺伝子発現制御機構の解析

第79回日本内分泌学会学術総会

山田正信、堀口和彦、梅澤良平、石井角保、中島康代、吉野聡、松本俊一、石塚高広、

渋沢信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森 昌朋
MENIN 依存性遺伝子群の同定

第79回日本内分泌学会学術総会

松本俊一、橋本貢士、堀口和彦、吉野聡、梅澤良平、中島康代、石塚高広、渋沢信行、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

甲状腺ホルモン不応症 (RTH) における Thyrotropin-releasing hormone (TRH) 作用の解析

第49回日本甲状腺学会

吉野聡、佐藤哲郎、登丸琢也、石塚高広、渋沢信行、橋本貢士、山田正信、森 昌朋
アミノ末端構造が異なるヒト PPAR γ -interacting cofactor (PRIC) 285 のアイソフォームの同定と機能解析

第49回日本甲状腺学会

佐藤哲郎、石塚高広、吉野聡、渋沢信行、橋本貢士、山田正信、森 昌朋

Tat-binding protein1 は甲状腺ホルモン

受容体と SRC1 の甲状腺ホルモン応答領域への適切なリクルートに必須である。

第49回日本甲状腺学会

橋本貢士、松本俊一、吉野聡、堀口和彦、梅澤良平、中島康代、石塚高広、渋谷信行、門傳剛、佐藤哲郎、山田正信、森 昌朋

Sterol Response Element Binding Protein(SREBP)-1c 遺伝子発現は甲状腺ホルモンで負に制御されている。

第49回日本甲状腺学会

堀口和彦、山田正信、梅澤良平、中島康代、石塚高広、渋谷信行、橋本貢士、佐藤哲郎、山田正三、登坂雅彦、森 昌朋
TSH 産生腺腫のオクトレオチド治療による下垂体ソマトスタチン受容体発現と治療効果に関する検討

第49回日本甲状腺学会

梅澤良平、山田正信、石塚高広、渋谷信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森 昌朋
ヒストンコード異常と甲状腺ホルモン不応症

第49回日本甲状腺学会

堀口和彦、山田正信、梅澤良平、石塚高広、渋谷信行、橋本貢士、佐藤哲郎、

山田正三、登坂雅彦、森 昌朋

TSH 産生腺腫におけるソマトスタチン受容体発現とオクトレオチドによる治療効果

第33回日本神経内分泌学会

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

Mouse Liver X Receptor- α Gene Expression Is Positively Regulated by Thyroid Hormone Receptor- β at Transcriptional Level

88th Endocrine Society Annual Meeting, Boston, MA, U.S.A.

Satoshi Y, Satoh T, Tomaru T, Ishizuka

T, Hashimoto K, Yamada M, Mori M.
HUMAN AND MOUSE PPAR α -INTERACTING COMPLEX (PRIC) 285 FUNCTION AS A COACTIVATOR OF THYROID HORMONE RECEPTOR.

31st Annual Meeting for the European Thyroid Association Naples, Italy.

Yamada M, Umezawa R, Shibusawa N, Horiguchi K, Hashimoto K, Satoh T, Mori M.

ROLE OF TRH IN THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-THYROID AXIS: ANALYSIS OF TRH DEFICIENT MICE.

31st Annual Meeting for the European Thyroid Association Naples, Italy.

Satoh T, Ishizuka T, Yoshino S, Shibusawa N, Hashimoto K, Yamada M, Mori M.

TAT-BINDING PROTEIN-1 IS REQUIRED FOR PROPER RECRUITMENTS OF THYROID HORMONE RECEPTOR AND STEROID RECEPTOR COACTIVATOR-1 TO THE PALINDROMIC THYROID HORMONE RESPONSE ELEMENT.

31st Annual Meeting for the European Thyroid Association Naples, Italy.

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^{S6K} 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：

本年の研究では、甲状腺ホルモン（TH）の主要な標的臓器である中枢神経系において PI3K→Akt/PKB シグナル系の活性化の意義を検討した。第一にどの TR アイソフォームがこの系の賦活に関与しているか、また TR 内のどの機能ドメインが必用とされるかを検討した。その結果、TR α 、TR β 共に TH による PI3K の活性化を媒介することが出来ることが証明された。以前よりリガンド結合領域が PI3K の活性化に必須であることを報告してきたが、本年の研究では positive, negative TRE (thyroid hormone response element)に全く結合しない DNA 結合領域の変異 TR β [TR β GS (125EG→GS)]を用いてこの領域が TH による PI3K の活性化に必須か否かを検討した。TR β GS を安定して発現する細胞株 N2aTR β GS では T3 添加により、PI3K→Akt/PKB シグナリングカスケードの活性化が認められ、DNA 結合領域は TH による PI3K の活性化には必用とされないことが示された。

神経細胞は、種々の刺激によりアポトーシスを起こす。我々は、血清除去により誘導される N2aTR α のアポトーシスを TH が抑制するか否かを検討した。血清除去によるアポトーシスの誘導は TH の添加により有意に抑制され、この抑制作用は PTEN やドミナントネガティブ Akt の過剰発現により失われた。以上、TR を介した TH による PI3K の活性化は DNA 結合領域を必用としない non-genomic action であることが確認され、この作用が神経細胞においても重要な役割を果たしていることが明らかにされた。これまでのヒト皮膚繊維芽細胞を用いた研究結果と本研究の結果から、甲状腺ホルモン不応症（RTH）の原因の殆どを占める変異 TR β は、中枢神経系においても TH による PI3K→Akt/PKB の賦活を抑制し、RTH における神経症状発症の一端を担っていると考えられる。

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（TR β ）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 TR β 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。ヒト皮膚繊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、ヒト皮膚繊維芽細胞から 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、 α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 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 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。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。我々も ZAKI-4 遺伝子産物が C 端を介して 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。

本年度の研究では、TH の重要な標的臓器である中枢神経系における T_3 による PI3K \rightarrow Akt/PKB の活性化に必需とされる甲状腺ホルモン受容体のドメイン構造の探索を行った。また、PI3K \rightarrow Akt/PKB 系の賦活は種々の細胞のアポトーシスを抑制することが知られているため、神経細胞のアポトーシスに対する作用も併せて検討した。

B. 研究方法

1) 甲状腺ホルモンによる PI3K \rightarrow PKB/Akt シグナリングカスケードの活性化に必需な TR の機能ドメインの検討

TR を全く発現しない神経細胞株 Neuro2a (N2a) とともに 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。DNA 結合を喪失した TR β GS (125EG \rightarrow GS) cDNA を pcDNA3.1 に組み込み、N2a にエレクトロポレーション法で導入し、安定した TR β GS 発現株 N2aTR β GS を G418 により選別した。N2a、N2aTR α 、N2aTR β GS を 10%FBS を添加した DMBM/F-12 中に培養した。実験によっては血清除去 18 時間後に T_3 を添加し、経時的に細胞を採取し、各種抗リン酸化蛋白抗体 [Akt (S473)、GSK3 β (S9)、FKHR (S256)、FKHRL1 (T32)、BAD (S136)] を用いて Western blot を行った。また、PI3K の活性化はその産物である phosphatidylinositolide (3, 4, 5) P3 = PI3, 4, 5-P3 をエンザイムイムノアッセイにより測定した。

2) T_3 による N2aTR α のアポトーシス抑制
野生型 N2a あるいは N2aTR α を 10%FBS 添加 DMBM/F-12 培養液から N2 サプリメントを添加した DMBM/F-12 に代え、 T_3 の存在、非存在下で 3 日間培養し、アポトーシスに陥った細胞を TUNEL 法及び FACS を用いた Guava 法で検出した。

更に、 T_3 による神経細胞のアポトーシス抑制作用機序を検討するため、米国 Columbia 大学の Sarkar 博士より供与された PTEN [phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)] 及びドミナントネガティブ Akt を発現するアデノウィルスベクターを用いた。これらウィルスベクターを MOI 60 で N2aTR α に感染し、1 日後 T_3 の添加、非添加血清除去培養液中で更に 2 日間培養し、上述の方法でアポトーシスに陥った細胞を検出した。

(倫理面への配慮)

組み換え DNA 指針に基づき、名古屋大学組み換え DNA 実験委員会の承認を得て実験を行った。

C. 研究結果

1) 甲状腺ホルモンによる PI3K→PKB/Akt シグナリングカスケードの活性化に必需な TR の機能ドメインの検討

我々は、既にヒト皮膚繊維芽細胞を用いた研究により、TH による PI3K→PKB/Akt シグナリングカスケードの活性化が TR β との結合を介することを報告した。近年、TH による PI3K→PKB/Akt シグナリングカスケードの活性化は TR β を介し、TR α は関与しないという論文(Storey NM et al. Proc Natl Acad Sci, USA 103 (13): 5197-5201, 2006)という報告がある。そこで、最初に TR を発現しない N2a 野生株と TR α を発現する N2aTR α を用いて T3 による PI3K の活性化を検討した。図 1A に示す如く、TR を発現しない野生型の N2a では PI3K の活性化は認められず、N2aTR α にのみ T3 による PI3, 4, 5-P3 の産生増加が認められた。この増加は PI3K 阻害剤である LY29402 の添加により完全に抑制された。TR α を介した T3 による PI3K の活性化は、TR α を発現するプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクトしても認められ、T3 が TR α を介して PI3K を活性化することが明らかとなった(図 1B)。今回の我々の結果は、最近の結果とよく一致する(Hiroi Y et al. Proc Natl Acad Sci 103 (38): 14104-14109, 2006)。

ヒト繊維芽細胞を用いたこれまでの検討からリガンド結合領域の変異の存在する TR では T3 による PI3K の活性化が認められないことが明らかにされた。今回は DNA 結合領域の中で標的遺伝子の TRE との結合に重要な P box に変異を導入し、positive, negative TRE との結合を完全に喪失した TR β GS (Shibusawa, N. et al. J Biol Chem 278:732-738, 2003)

を用いて PI3K→PKB/Akt シグナリングカスケードの活性化を検討した(図 2)。図 3 に示すごとく、TR β GS は、野生型 TR α 、TR β と同様に PI3K シグナリングカスケードの下流 Akt/PKB を活性化し、その基質 GSK3 β 、BAD のリン酸化も認められた。従って、TR は α 、 β アイソフォーム共に TH による PI3K の活性化を担うことが出来ることが明らかにされると共に、DNA 結合領域ではなく、リガンド結合領域がこの活性化に必須であることが示された。

2. 血清除去による神経細胞のアポトーシスに及ぼす甲状腺ホルモンの作用

図 4 に示す如く、N2TR α 細胞の培養液から血清を除去すると 473 番目のセリンのリン酸化を受けた活性化型 Akt が急速に脱リン酸化を受け不活性化した [T3(-)]。しかしながら T3 存在下ではこの脱リン酸化は抑制され、2 日間の培養においても活性化型 Akt が認められた。Akt 下流の基質である GSK3 β 、BAD の脱リン酸化も T3 により抑制された。この結果は、血清除去により抗アポトーシス作用の中心的役割を果たす活性化型 Akt が維持されず N2TR α 細胞のアポトーシスが増加し、T3 はこのアポトーシスを抑制すると考えられた。事実図 5A に示すように、T3 は血清除去により誘導される神経細胞死を有意に抑制した。この T3 による抗アポトーシス作用は PI3, 4, 5-P3 の 3 部位の脱リン酸化を行う PTEN および、Akt のキナーゼ活性を抑制するドミナントネガティブ Akt を過剰発現することにより完全に消失した(図 5B)。

D. 考察

T3 による PI3K の活性化に TR α 、TR β が同じく関与し得ることが明らかにされた。更にこの活性化には DNA 結合機能は必需とされず、リガンド結合能が必須であることが明らかにされた。TR を発現

する神経細胞株では、血清除去により誘導されるアポトーシスを T3 が抑制することが明らかにされた。このアポトーシスの抑制は T3 による PI3K→Akt/PKB シグナリングカスケードの活性化によることが明らかにされた。

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 T3 が核外に存在する TR と結合し、この複合体が PI3K の regulatory subunit p85α と結合することにより PI3K を活性化し、その下流の Akt/PKB→BAD、GSK3β などの基質をリン酸化し、アポトーシスを抑制することが明らかにされた。これまで中枢神経系における TH の genomic action の標的遺伝子は幾つかクロニングされているが、今回我々が明らかにした新たな TH の nongenomic action は神経細胞のアポトーシス抑制のみならず、神経突起の伸展、神経の可塑性に重要な役割を果たすと考えられ、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の原因究明に役立つと考えられる。

F. 健康危険情報：該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. YAMAMOTO Takuya, KAMBE Fukushi, CAO Xia, LU Xiuli, ISHIGURO Naoki, SEO Hisao: Prathyroid hormone activates phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bad cascade in osteoblast-like cells. Bone, 2006, in press.
2. CAO Xia, SEO Hisao: Nongenomic activation of phosphatidylinositol 3-kinase by thyroid hormone. Current Opinion in Endocrinology and Diabetes. 13 (5): 439-443, 2006.
3. KOBAYASHI Hironobu, KAMBE Fukushi, IMAI Tsuneo, HIBI Yatsuka, KIKUMORI Toyone, OHMORI Sachiko, NAKAO Akimasa, SEO Hisao: Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p27Kip1 and p57Kip2, by corticotropin in rat adrenal cortex. Journal of Endocrinology 189: 671-679, 2006.
4. Lu Xiuli, KAMBE Fukushi, CAO Xia, YOSHIDA Taemi, OHMORI Sachiko, MURAKAMI Kohji, KAJI Takahide, ISHII Takehisa, ZADWORNYY David, SEO Hisao: DHCR24-knockout embryonic fibroblasts are susceptible to serum withdrawal-induced apoptosis because of dysfunction of caveolae and insulin-Akt-Bad signaling. Endocrinology, 147(6), 3123-3132, 2006.
5. MOLLERR Lars C, CAO Xia, DUMITRESCU ALEXANDRA M., SEO Hisao, REFETOFF Samuel : Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor β through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Nuclear Receptor Signaling 4, e020, 2006. (Online Journal)
6. CAO Xia, KAMBE Fukushi, SEO Hisao: Regulation of expression of calcineurin inhibitor, ZAKI-4α. Journal of Koorean Society of Endocrinology (Review), 21(4), 261-265, 2006.

- 内分泌症候群（第2版）I—その他の内分泌疾患を含めて— II. 甲状腺その他
p508-512（日本臨床社）2006.
7. HIBI Yatsuka, KAMBE Fukushi, TOMINAGA Yoshihiro, MIZUNO Yutaka, KOBAYASHI Hironobu, IWASE Katsumi, IMAI Tsuneo, SEO Hisao: Up-regulation of the gene encoding protein kinase A type I κ B regulatory subunit in nodular hyperplasia of parathyroid glands in patients with chronic renal failure. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(2): 563-568, 2006.
 8. MURAKAMI Hisashi, MURAKAMI Ryuichiro, KAMBE Fukushi, CAO Xia, TAKAHASHI Ryotaro, ASAI Toru, HIRAI Toshihisa, NUMAGUCHI Yasushi, OKUMURA Kenji, SEO Hisao, MUROHARA Toyoaki: Fenofibrate Activates AMPK and Increases eNOS Phosphorylation in HUVEC. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(4): 973-978, 2006.
 9. MIRZA Rusella, HAYAKAWA Shizu, TAKAGISHI Yoshiko, KAMBE Fukushi, OHMORI Sachiko, MAKI Kazuko, YAMAMOTO Michiyo, MURAKAMI Kohji, KAJI Takahide, ZADWORNÝ David, MURATA Yoshiharu, SEO Hisao: DHCR24 gene knockout mice demonstrate lethal dermatopathy with differentiation and maturation defects in the epidermis. *Journal of Investigative dermatology* 126: 638-647, 2006.
 10. 妹尾久雄: チロキシン結合グロブリン (thyroxine-binding globulin=TBG) 異常症. 別冊日本臨床 新領域症候群シリーズ No. 1
2. 学会発表
 1. 曹霞、神部福司、妹尾久雄: Thyroid hormone (TH) stimulates neuronal differentiation of N2a cells expressing Tra through activation of PI3K-Akt/PKB signaling cascade. 第79回日本内分泌学会学術総会, 2006年6月. (神戸)
 2. 芦秀麗、神部福司、曹霞、妹尾久雄: DHCR24 suppresses activation of p38 MAP kinase and p53 in response to oxidative stress. 第79回日本内分泌学会学術総会, 2006年6月. (神戸)
 3. 日比八束、世古哲平、伊藤朝子、今井常夫、富永芳博、神部福司、妹尾久雄、岩瀬克己: 原発性上皮小体機能亢進症線腫における PPKAR1a の発現の検討. 第79回日本内分泌学会学術総会, 2006年6月. (神戸)
 4. 山本拓也、神部福司、曹霞、妹尾久雄、石黒直樹: ヒト骨芽細胞株 MG63 における PI3K-Akt/Bad 経路を介した PTH の抗アポトーシス作用. 第79回日本内分泌学会学術総会, 2006年6月. (神戸)
 5. 小崎康子、古根聡、神部福司、妹尾久雄、水村和枝: ブラジキニンによる細胞内カルシウム上昇反応のプロテインキナーゼAを介する脱感作用: Protein kinase A-mediated

desensitization of bradykinin-induced increase in intracellular calcium. 第29回日本神経科学大会 2006年7月。(京都)

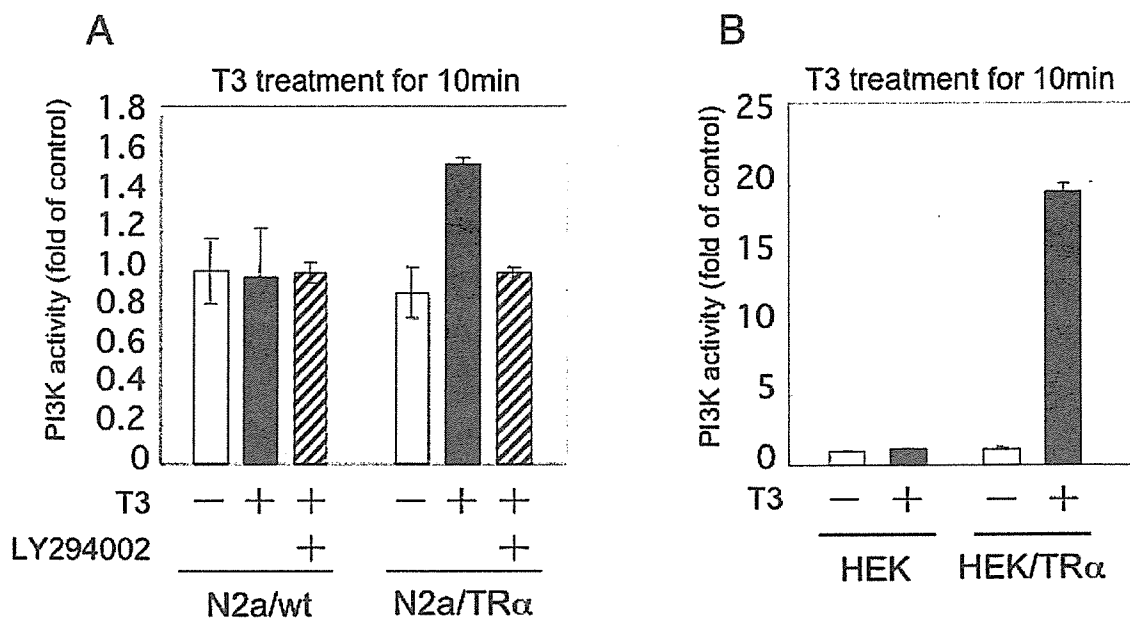
6. 曹霞、神部福司、妹尾久雄: Thyroid hormone (TH) enhances neuronal survival through activating PI3K-Akt signaling cascade. 第49回日本甲状腺学会, 2006年11月。(高松)

7. 山内雅子、神部福司、曹霞、芦秀麗、妹尾久雄、大磯ユタカ: 甲状腺ホルモンによるAMPKの活性化. 第49回日本甲状腺学会, 2006年11月。(高松)

G. 知的所有権の獲得状況

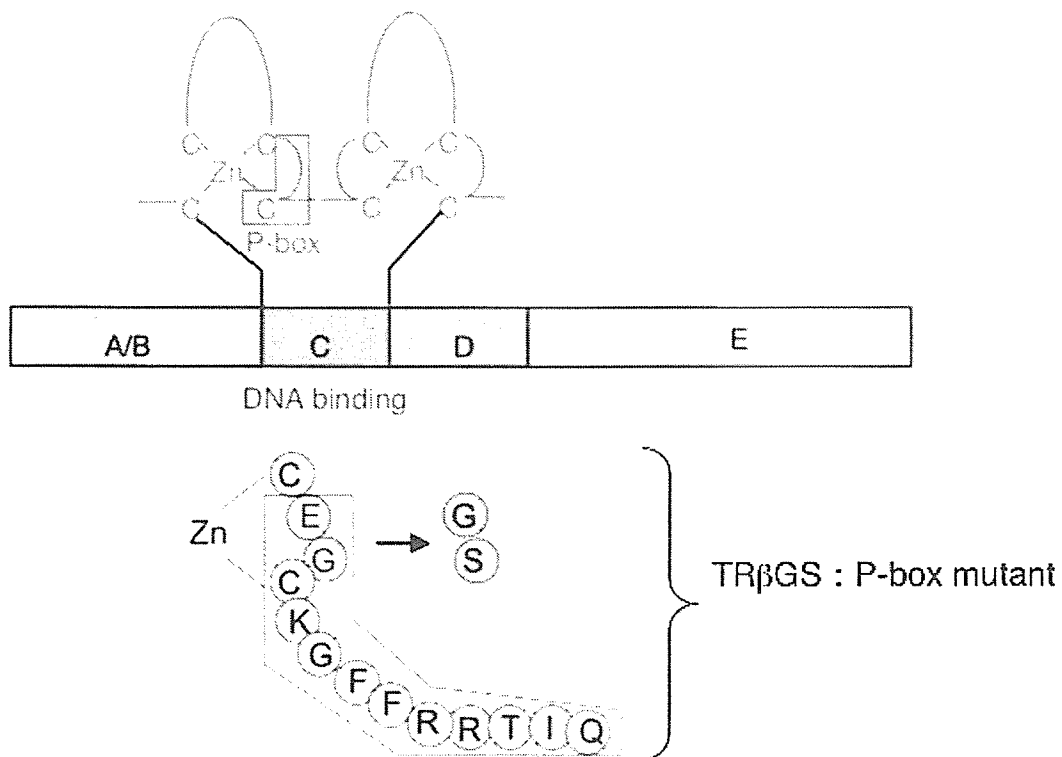
1. 実用新案登録: なし
2. その他: なし

図 1. TR α 発現細胞における PI3K 活性の T3 による増加



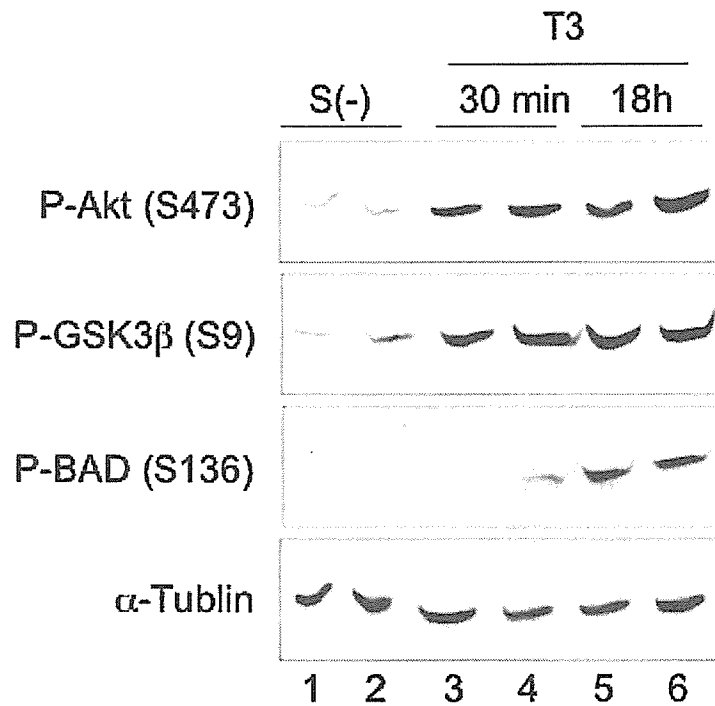
- A. T3 は、TR を発現しない野生型 N2a/wt では PI3K の活性化を促進しないが、TR α を発現する N2aTR α では活性化を促進し、この効果は PI3K 阻害剤である LY294002 により消失する。
- B. T3 による PI3K の活性化は HEK 細胞に TR α を強発現させた時にも観察される。

図2. TRE (thyroid hormone responsive element)と全く結合を示さないTRβGSの構造



このTRβGSは、Shibusawa, N. ら (J Biol Chem 278:732-738, 2003) によりpositive, negative TREと結合しないことが示されている。

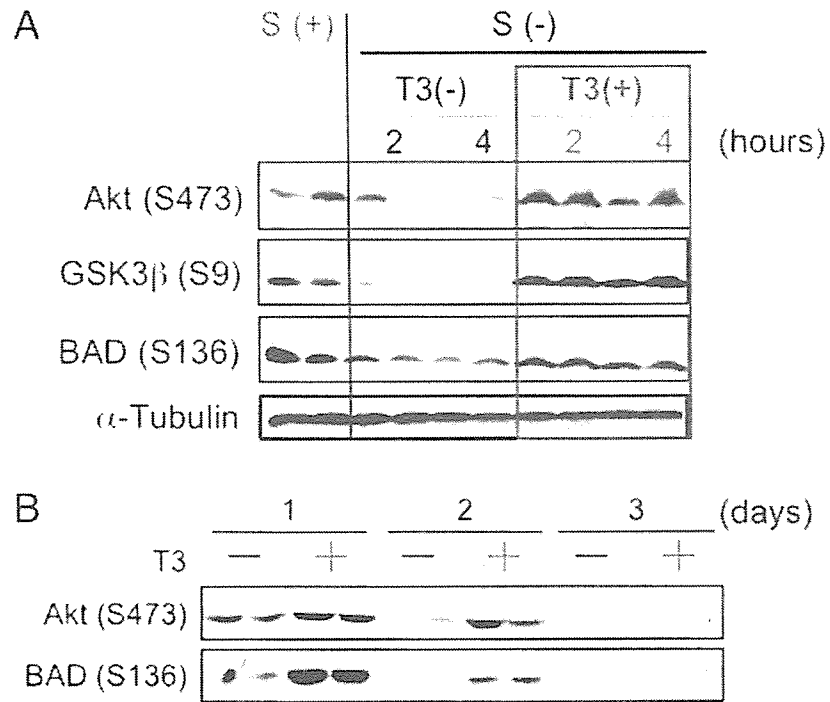
図3. TRβGSを発現するN2a細胞 (N2aTRβGS) におけるPI3K→Akt/PKBシグナリングカスケードの活性化



N2aTRβGSの安定発現株の作成：pcDNA3.1/TRβGS を野生型N2a にトランスフェクトし、トランスフォーマントを G418 を 800mg/ml の濃度で加え選択し、200mg/mlの濃度で維持した。

N2aTRβGS細胞を血清除去培養液中にT3の非存在下[レン1, 2] 或いは存在下[レン5, 6]で18時間インキュベート後、細胞を採取し、Western blotに供した。レン3, 4の細胞は18時間の血清除去後30分間T3を添加し細胞を採取した。

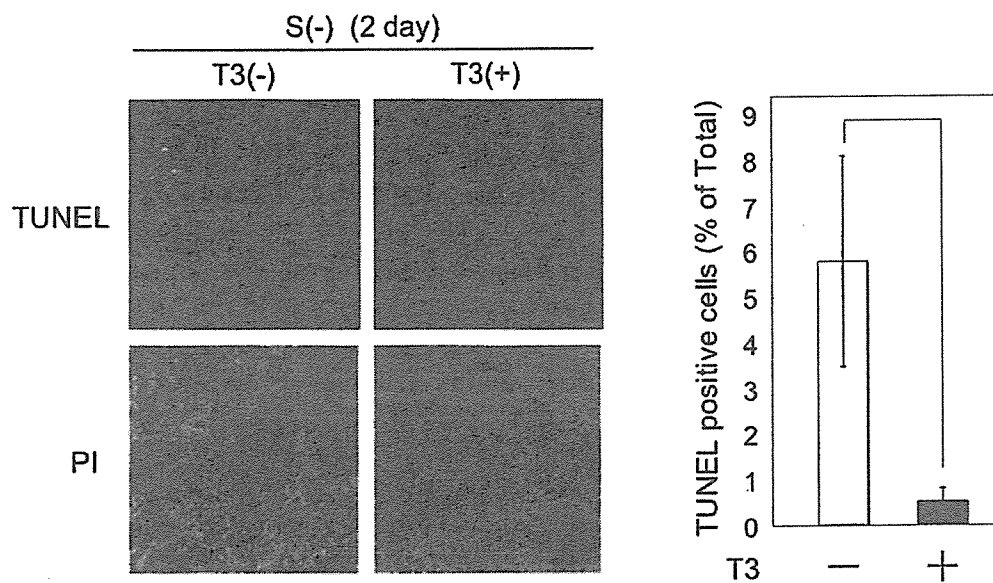
図4. T3は血清除去によるAktの脱リン酸化の誘導を抑制する



A. 血清除去 18 時間後、T3 の存在下、非存在下で 2 ないし 4 時間培養し、リン酸化された Akt、GSK3b、BAD を Western blot 法により検出した。

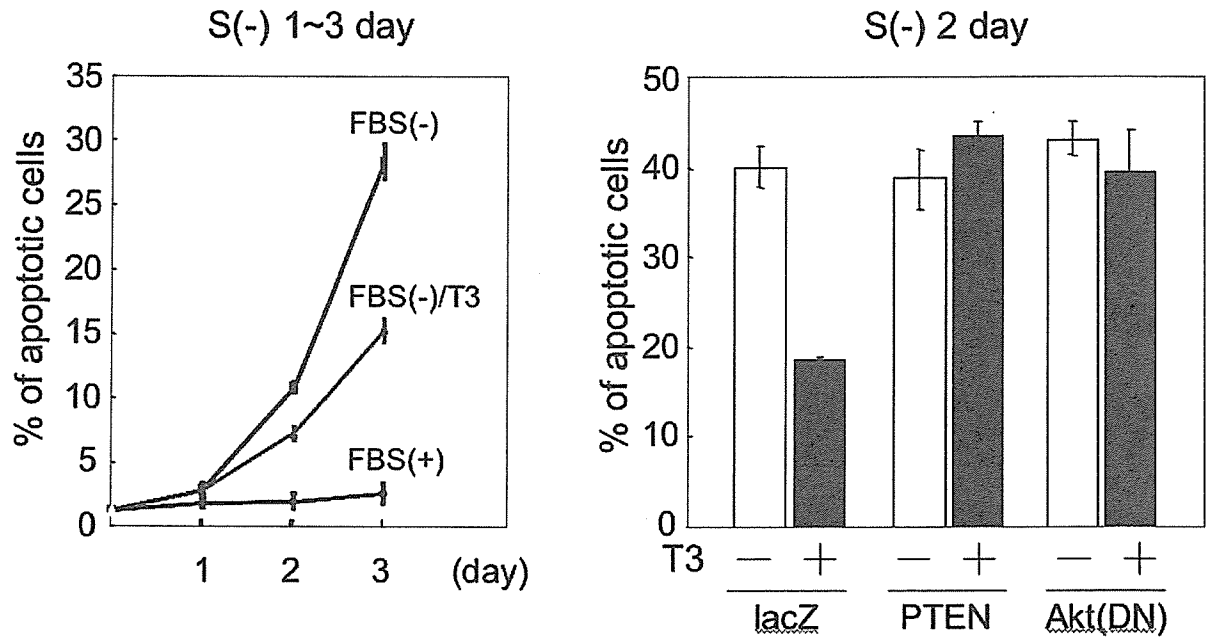
B. 血清除去 18 時間後、T3 の存在下、非存在下で 1～3 日間培養し、リン酸化された Akt、BAD を Western blot 法により検出した。

図 5A. 甲状腺ホルモンは血清除去による神経細胞のアポトーシスの誘導を抑制する



N2TRa 細胞を 2 日間血清除去し、T3 の存在下、非存在下で培養した。TUNEL 陽性細胞は、FACS を用いた Guava 法で検出した。

図 5B. T3 による血清除去によるアポトーシスの誘導の抑制は PTEN, dominant negative Akt の発現により消失する。



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

－バセドウ病眼症の疾患感受性遺伝子の検索－

研究協力者 廣松雄治 久留米大学医学部内科学講座内分泌代謝内科部門 教授

研究要旨：

T細胞の活性化を抑制するCTLA-4や免疫反応や細胞増殖、アポトーシスを調節する転写因子であるNFκB 1遺伝子の-94delATTG多型とバセドウ病やバセドウ病眼症との関連性を日本人を対象に検討した。NFκB 1遺伝子-94delATTG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。CTLA-4遺伝子49A/G多型CT60多型は日本人ではバセドウ病の発症との関連はみられたが、眼症との関連はみられなかった。

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。私もこれまで遺伝因子としてTNF-α遺伝子多型やICAM-1（intercellular adhesion molecule-1）遺伝子多型と関連性がみられることを報告してきた。

今回はCTLA-4遺伝子多型、NFκB 1（Nuclear Factor-κB）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。

B. 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309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97例）と医療スタッフの健常対照者240例、を対象とした。

遺伝子多型は、PCR-RFLP、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。

C. 研究結果

CTLA-4遺伝子プロモーター領域の-318C/T多型はgenotype頻度、allele頻度ともにバセドウ病患者群と健常群との間や、ATA class III以上の眼症を有する眼症患者群と眼症を有しないかあるいは軽症の眼症を有するバセドウ病患者群との間に差は認められなかった。49A/G多型やCT60多型はともにバセドウ病群で健常群に比較してGG genotype頻度、G allele頻度が有意に高率であった。しかし、ともに眼

症群と非眼症群の間に差はみられなかった。

NFκB 1 遺伝子-94delATTG 多型はバセドウ病患者群と健常群の間に genotype 頻度、allele 頻度ともに差がみられなかった。ATA class III 以上の眼症を有する群の-94delATTG/-94delATTG genotype 頻度は眼症を有さない群と比較して有意に高かった (23% vs. 13%)。-94delATTG allele 頻度も有意に高かった (46% vs. 34%)。

D. 考察

CTLA-4 は T 細胞の活性化を抑制的に調節する分子であり、HLA 遺伝子について第 2 の疾患感受性遺伝子であるとして注目されている。49A/G 多型は Ala から Thr への置換をきたし、processing に影響を与える。CT60 多型は sCTLA-4 の発現に影響を与える。今回の検討で 49A/G 多型や CT60 多型はバセドウ病の発症との関連は認められたが、眼症との関連性は認められなかった。

NFκB 1 は免疫反応や細胞増殖、アポトーシスを調節する転写因子であり、NFκB 1 遺伝子多型のプロモーター領域の-94delATTG 多型と潰瘍性大腸炎の間に関連性が報告されている。今回の検討ではバセドウ病との関連性は認められなかったが、眼症との関連性が示唆された。

私どもはこれまでに TNF-α 遺伝子多型、ICAM-1 遺伝子多型が、眼症と関連していることを報告してきたが、今回 NFκB 1 遺伝子多型も眼症と関連があることが明らかとなった。眼症

患者の後眼窩組織における TNF-α や ICAM-1 の発現、血中 soluble ICAM-1 の増加が報告されている。したがって TNF-α 遺伝子多型や 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、眼症の病態形成に重要な役割を演じていると推測される。NFκB 1 遺伝子多型も後眼窩組織の免疫反応やアポトーシスなどを介して眼症の発症に影響を与えている可能性が示唆される。

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もすすめる必要がある。

E. 結論

NFκB 1 遺伝子あるいは NFκB 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) Mukai T, Hiromatsu Y, Ichimura M, Fukutani T, Kaku H, Miyake I, Shoji S, Bednarczuk T, Koda Y. Lack of association of Interleukin-18 gene polymorphism with Graves' disease or Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2006 Mar; 16(3):243-8.
 - 3) Hiromatsu Y, Fukutani T, Ichimura M, Mukai T, Kaku H, Miyake I, Yamada K.: Interleukin-12B gene polymorphism does not confer susceptibility to Graves' ophthalmopathy in Japanese population. *Endocrine J.* 2006 Dec;53(6):753-9. Epub 2006 Sep 12.
 - 4) 広松雄治: バセドウ病眼症. 日本臨床内分泌症候群 (第2版) 別冊1巻5号 Page307-310、2006.
 - 5) 広松雄治: (バセドウ病とその周辺疾患基礎・臨床研究の最新動向) 特殊なバセドウ病 バセドウ病眼症の進展 ステロイド治療. 日本臨床、64巻12号 Page2279-2285、2006.
 - 6) 広松雄治: 【甲状腺疾患の新しい考え方】バセドウ病眼症に対する新しい考え方. ホルモンと臨床、54巻8号 Page665-673、2006.
- ## 2. 学会発表
- 1) 広松雄治、三宅育代、迎徳範、一村美智子、福谷知香: バセドウ病と ICAM-1 遺伝子多型 第110回日本眼科学会総会 平成18年4月13日~16日、大阪
 - 2) 広松雄治、一村美智子、福谷知香、迎徳範、三宅育代、賀来寛雄、山田研太郎: PTPN22多型とバセドウ病. 第79回日本内分泌学会総会 平成18年5月19日~21日、神戸
 - 3) Hiromatsu Y, Mukai T, Ichimura M, Fukutani M, Kaku H, Miyake I, Yamada K: IL-18 gene polymorphism confers susceptibility to the development of anti-GAD65 antibody in Graves' disease. Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Kurume University School of Medicine, Japan 31st Annual Meeting of the European Thyroid Association, Naples, Italy. September 2-6, 2006
 - 4) 広松雄治、一村美智子、福谷知香、迎徳範、賀来寛雄、三宅育代、山田研太郎: CTLA-4遺伝子多型とバセドウ病—ハプロタイプ解析—. 第49回日本甲状腺学会総会 平成18年11月2日~4日、高松
 - 5) 一村美智子、広松雄治、福谷知香、迎徳範、三宅育代、賀来寛雄、山田研太郎: PTPN22遺伝子多型は日本人のバセドウ病の発症に関与するか? 平成18年11月2日~4日、高松

H. 知的財産の出願・登録状況
なし