

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09444

研究課題名(和文)コロイド内Tgによる遺伝子発現抑制機構を解明し甲状腺機能異常症の背景を捉え直す

研究課題名(英文) Understanding of the pathogenesis of thyroid disorder by studying the effect of colloidal Tg on gene regulation

研究代表者

鈴木 幸一 (Suzuki, Koichi)

帝京大学・医療技術学部・教授

研究者番号：20206478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺濾胞のコロイド内に高濃度のサイログロブリンが蓄積することにより、甲状腺ホルモンの生合成やその材料であるヨード輸送に必要な各種遺伝子発現は強く抑制されるとともに、コロイドの再吸収、加水分解、ホルモン輸送や分泌に関わる遺伝子発現は誘導されることが明らかになった。これは、一定量の甲状腺刺激ホルモンによる制御下において、ホルモンの合成、蓄積、再吸収などの機能状態は、濾胞ごとに濾胞内サイログロブリンによる自己調節を受けていることを示している。この機構が異常亢進することで甲状腺機能低下症となり、機能を喪失すると甲状腺機能亢進症となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have uncovered that high concentration of thyroglobulin accumulated in the follicular lumen of the thyroid has two distinct activity: one is to suppress gene expressions necessary for biosynthesis of thyroid hormone and iodine transport and the other is rather to enhance colloid resorption, hydrolysis, transport, and secretion. This evidence indicates that follicular thyroglobulin is the intrinsic autoregulator of thyroid hormone biosynthesis, its storage and secretion by negative-feedback mechanisms. It is speculated that gain-of-function of this mechanism will lead to hypothyroidisms and loss-of-function will induce hyperthyroidisms.

研究分野：甲状腺内分泌学、分子細胞生物学、病理病態学

キーワード：甲状腺 サイログロブリン 甲状腺ホルモン 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

甲状腺の最小機能単位である濾胞の機能状態(ヨード取込み、ホルモン合成、ホルモン蓄積量など)には濾胞間で大きな差があり、*follicular heterogeneity*として知られていたが、その理由は不明であった。申請者は、濾胞内に蓄積するサイログロブリン(Tg)が、ホルモン合成に必要な一連の遺伝子発現を転写レベルで強力に抑制することを初めて報告した。すなわち、TSHやinsulin/IGF存在下で発現が誘導された培養ラット甲状腺FRTL-5細胞の機能遺伝子は、培養液に添加したTg濃度依存性に抑制され、甲状腺組織切片において、Tg遺伝子自身のmRNAとタンパクの発現および放射性ヨード輸送をそれぞれ*in situ* hybridization、免疫染色、¹²⁵I投与後 autoradiography で評価すると、それらは濾胞内のTg蓄積量に反比例する結果が得られた。また、最近我々は、このようなTgの作用を手術時に得られた正常部ヒト甲状腺初代培養細胞でも確認した。

Tgの作用は甲状腺ホルモン合成に関わる遺伝子に特異的である。例えば、濾胞内腔側におけるヨードの有機化に必要な過酸化水素合成系のNADPH oxidaseであるdual oxidaseのうち、甲状腺で機能している*Duox2*とその活性化因子*Duoxa2*はTgにより発現と機能が強く抑制されるが、甲状腺で発現はあるが機能していない*Duox1*と*Duoxa1*の発現量はTgの影響を全く受けない。このことから、濾胞内Tgは、血中からの一定量のTSH供給の下で、negative feedbackにより濾胞ごとの機能状態を制御する、極めて合理的なautocrine調節機構を担っていると考えられる。これらの知見によって、申請者は、濾胞機能は蓄積するTg濃度依存性に濾胞ごとに自己調節されており、個々の濾胞はそれぞれのリズムでホルモンの合成、蓄積、分泌というサイクルを繰り返しているというモデルを提示し、そのような機能状態の差が*follicular heterogeneity*として観察され得ることを示した。

このように、濾胞内濃度のTg(血中濃度では無い)は、TSHの作用を完全に打ち消すほど強力な生理活性を有するが、2量体で分子量660kDという巨大なTg分子中の活性部位、甲状腺細胞によるその認識、シグナル伝達経路など、Tg作用の分子機構の詳細は未だ不明のままである。しかし、そのような強力な生理活性を発揮する経路に阻害や活性化が起こると、甲状腺機能に重大な影響が及ぶことは容易に想像される。

2. 研究の目的

本研究では、甲状腺機能の真の調節因子と言えるTg作用機構の全体像を明らかにするとともに、甲状腺機能異常症の発症機序解明と新規治療法探索に向けた研究を行う。具体的には、Tg作用の分子機構を解明することで

甲状腺の生理機能の新しい理解に資することを主な目的として研究を行う。

現在においても、ヨード摂取量の多寡や自己免疫機序以外の甲状腺機能異常の発症誘因はほとんど分かっていないが、Tg作用経路の異常は機能異常に直結すると考えられることから、その解明は甲状腺機能異常症の病因解明や新規治療標的開発にも重要な意味を持つことが期待される。

3. 研究の方法

(1) ラット甲状腺FRTL-5細胞においてTgに結合する全タンパクを免疫沈降した後に質量分析によって網羅的に解析した。多くの新規Tg結合タンパクが見出された中で、細胞膜の脂質ラフト構成タンパクの一つであるflotillinの機能解析を行った。具体的には、発現ベクターやsiRNAを用いた遺伝子の過剰発現やノックダウン、および特異的阻害剤の効果などを、Tgによって発現が抑制される標的遺伝子の抑制解除を指標としてrealtime PCRで評価した。また、Tgの作用に関しては、全長のTg分子が濾胞内腔側細胞膜上で認識される可能性と、コロイドとともにendocytosisされ加水分解された小断片が細胞内で認識される可能性の両方が考えられることから、得られた結合タンパクの細胞内局在も共焦点レーザー走査型顕微鏡観察で明らかにした。

(2) FRTL-5細胞を用いたDNAマイクロアレイの結果では、Tg刺激後24時間で発現量が2倍以上増強する遺伝子が291個、半分に減少する遺伝子が709個あった。その中には甲状腺機能遺伝子発現の変動をはるかに凌ぐ大きな増減を示す遺伝子も多数存在するが、それらの甲状腺内分泌機能における役割は未知であった。一方、これまでの検討で、Tgの作用はホルモン合成に必須の機能遺伝子およびそれらの発現を制御する転写因子に特異的であったことから、甲状腺細胞に発現しその量がTgによって大きく変動するこれら機能未知の遺伝子は、甲状腺内分泌機能に何らかの重要な働きを持つ可能性が高い。したがって、その機能を解明することにより、甲状腺ホルモンの合成だけでなく、コロイドの再吸収、Tgの加水分解、ホルモンの輸送や細胞外への分泌など一連の甲状腺内分泌機能制御に関わる新しい遺伝子が見出されることが期待される。具体的には、発現ベクターやsiRNAを用いた当該遺伝子の過剰発現やノックダウン、および特異的阻害剤の効果などをrealtime PCRで評価した。

4. 研究成果

(1) ラット甲状腺FRTL-5細胞においてTgに結合する全タンパクを免疫沈降した後に質量分析によって網羅的に解析したところ、新規Tg結合タンパクとして細胞膜の脂質ラフト構成タンパクであるflotillinが同定された。

Flotillin は培養液に添加した Tg とエンドゾームに共局在した。また、細胞をラフト阻害剤で処理したり、siRNA を用いて flotillin 発現をノックダウンすることにより、Tg による甲状腺機能遺伝子発現抑制が有意に阻害された。これらの結果から、Tg が甲状腺細胞膜のラフト構成タンパクによって認識されることで、その強力な遺伝子発現抑制作用を発揮することが証明された。

(2) DNA マイクロアレイ解析の結果、Tg の加水分解酵素の一つカテプシン H が Tg 処理による発現増加が見られた。リソソーム中で Tg の分解を行うことは、甲状腺ホルモンの合成・修飾の過程に必要である。カテプシン H は、Tg の濃度、時間依存的にカテプシン H の発現誘導が行われること、甲状腺のリソソーム活性が増加すること、カテプシン H と Tg が細胞質のリソソーム中で共局在することを明らかにした。

(3) 甲状腺乳頭癌等の手術時に得られたヒト甲状腺の腫瘍周囲の正常組織から初代培養を作製し、Tg 処理した細胞から以前抽出した mRNA を用いて、昨年度までの検討で明らかになった遺伝子の変動につき計画に従って検討を行った。Tg によって甲状腺ホルモン輸送体である MCT8 の発現が濃度依存的かつ時間依的に減少するという、ラット甲状腺細胞株 FRTL-5 による変化とは異なる結果が得られた。また関連する遺伝子である LAT1, CD98, xCT の発現量は Tg による影響を受けなかった。

(4) 未使用のヨードを再利用するための脱ヨード酵素である Dehal 1 の発現を FRTL-5 細胞で調べたところ、Dehal 1 発現は、insulin、TSH、血清によって誘導され、Tg とヨードによって抑制されるという結果が得られた。また、insulin と血清の添加により著明に発現量が増加したが、それに TSH を加えると発現量の増加が逆に抑制されることが判明した。すなわち、ラット甲状腺 FRTL-5 細胞におけるこれまでの検討で、Tg はホルモン合成経路に関わる遺伝子発現を抑制し、ホルモン分泌に関わる遺伝子発現を誘導することが明らかになっていたが、今回新たにヨード再利用に関わる遺伝子発現をも抑制するという合理的な作用があることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Luo Y, Hara T, Ishido Y, Yoshihara A, Oda K, Makino M, Ishii N, Hiroi N and Suzuki K. Rapid preparation of high-purity nuclear proteins from a small number of cultured cells for use in electrophoretic mobility shift assays.

BMC Immunol 15:586, 2015.

Ishido Y, Luo Y, Yoshihara A, Hayashi M, Yoshida A, Hisatome I and Suzuki K. Follicular thyroglobulin enhances gene expression necessary for thyroid hormone secretion. *Endocrine J* 62(11):1007-15, 2015.

Kimura H, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Shirasuna K, Inoue Y, Komada T, Kobayashi M, Mizushina Y, Kasahara T, Suzuki K, Iwasaki Y, Yada T, Caturegli P, Takahashi M. Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency improves obesity and metabolic disorders. *Sci Rep* 5:15883, 2015.

Kimura H, Caturegli P, Takahashi M, Suzuki K. New insights into the function of the immunoproteasome in immune and non-immune cells. *J Immunol Res*, ID 541984, 2015.

Luo Y, Akama T, Okayama A, Yoshihara A, Sue M, Oda K, Hayashi M, Ishido Y, Hirano H, Hiroi N, Katoh R and Suzuki K. A novel role for flotillin-containing lipid rafts in negative-feedback regulation of thyroid-specific gene expression by thyroglobulin. *Thyroid* 26(11):1630-1639, 2016.

Luo Y, Yoshihara A, Oda K, Ishido Y, Hiroi N, Suzuki K. Naked DNA in cells: An inducer of major histocompatibility complex molecules to evoke autoimmune responses? *World J Trans Med* 5(1), 46-52, 2016.

Luo Y, Yoshihara A, Oda K, Ishido Y, Suzuki K. Excessive cytosolic DNA fragments as a potential trigger of Graves' disease: an encrypted message sent by animal models. *Front Endocrinol* 7, Article 144, 2016.

Oda K, Luo Y, Sekihata K, Usukura K, Yoshihara A, Sue M, Ishido Y, Hiroi N, Hirose T, Suzuki K. Follicular thyroglobulin (Tg) induces cathepsin H expression and activity in the thyrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 483(1): 541-546, 2017.

Kawashima A, Karasawa T, Tago K, Kimura H, Kamata R, Usui-Kawanishi F, Watanabe S, Ohta S, Funakoshi-Tago M, Yanagisawa K, Kasahara T, Suzuki K, Takahashi M. ARIH2 ubiquitinates NLRP3 and negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *J Immunol* 199(10):3614-3622, 2017.

[学会発表](計16件)

A. Yoshihara, M. Sue, K. Oda, Y. Ishido, Y. Luo, N. Hiroi, K. Suzuki. Different effects of PTU and MMI on thyroid-specific gene expression. 15th International Thyroid Congress. October 18-23, 2015. Florida, USA.

Yuqian Luo, 赤間 剛、岡山明子、石藤雄子、吉原 彩、小田健三郎、平野 久、鈴木幸一。サイログロブリンによる甲状腺機能遺伝子発現抑制に flotillin 脂質ラフトが関与する。第 19 回日本内分泌病理学会。2015 年 10 月 24-25 日。佐賀市。

駱 予倩、赤間 剛、岡山明子、石藤雄子、平野 久、鈴木幸一。サイログロブリン(Tg)による甲状腺機能遺伝子発現調節は細胞膜脂質ラフトの flotillin によって介在される。第 58 回日本甲状腺学会。2015 年 11 月 5-7 日。福島市。

木村博昭、臼井文武、唐澤直義、川島 晃、笠原 忠、鈴木幸一、岩崎有作、矢田俊彦、高橋将文。高脂肪食による肥満・メタボリック病態における免疫プロテアソーム欠損の有益な効果。第 89 回日本内分泌学会学術総会。2016 年 4 月 21-23 日。京都。

小田健三郎、関端健吾、Luo Yuqian、臼倉健世、吉原彩、石藤雄子、廣井直樹、弘世貴久、鈴木幸一。甲状腺ホルモン分泌機構に対する Thyroglobulin の影響。第 20 回日本内分泌病理学会学術総会。2016 年 9 月 16-17 日。東京。

吉原 彩、臼倉健世、Luo Yuqian、小田健三郎、石藤雄子、廣井直樹、鈴木幸一。甲状腺ホルモン生合成におけるヨード再利用の調節機構。第 59 回日本甲状腺学会学術集会。2016 年 11 月 3-5 日。東京。

小田健三郎、関端健吾、Luo Yuqian、臼倉健世、吉原 彩、石藤雄子、廣井直樹、鈴木幸一。濾胞内サイログロブリンはカテプシン H 活性を増強する。第 59 回日本甲状腺学会学術集会。2016 年 11 月 3-5 日。東京。

鈴木幸一。コロイド内 thyroglobulin による濾胞機能 autocrine negative feedback 調節機構研究の展開。第 59 回日本甲状腺学会学術集会、基礎甲状腺学セミナー。2016 年 11 月 3-5 日。東京。

小田健三郎、Luo Yuqian、吉原彩、石藤雄子、関端健吾、臼倉健世、廣井直樹、弘世貴久、鈴木幸一。濾胞内サイログロブリンは甲状腺細胞におけるカテプシン H の発現および活性を誘導する。第 33 回甲状腺病態生理研究会。2017 年 2 月 4 日。東京。

臼倉健世、吉原 彩、Yuqian Luo、小田健三郎、石藤雄子、廣井直樹、鈴木幸一。ヨード再利用に関わる脱ヨード酵素 Dehal1 の甲状腺細胞における発現調節機構。2017 年 2 月 4 日。東京。

Yuqian Luo, Takeshi Akama, Akiko Okayama, Yuko Ishido, Hisashi Hirano, and Koichi Suzuki. A novel role for flotillin-containing lipid rafts in negative-feedback regulation of thyroid-specific gene expression by thyroglobulin. 99th Annual Meeting and Expo of the Endocrine Society (ENDO 2017). April 1-7, 2017. Orland, FL, USA.

Kenzaburo Oda, Yuqian Luo, Aya Yoshihara, Yuko Ishido, Kengo Sekihata, Kensei Usukura, Mariko Sue, Naoki Hiroi, Takahisa Hirose, Koichi Suzuki. Follicular thyroglobulin induces cathepsin H expression and activity in the thyrocytes. 99th Annual Meeting and Expo of the Endocrine Society (ENDO 2017). April 1-7, 2017. Orland, FL, USA.

吉原 彩、臼倉健世、Yuqian Luo、川島 晃、小田健三郎、石藤雄子、廣井直樹、鈴木幸一。甲状腺ホルモン合成におけるヨード代謝調節の検討。第 90 回 日本内分泌学会学術総会。2017 年 4 月 20-22 日。京都。

駱 予倩、赤間 剛、岡山明子、石藤雄子、平野 久、鈴木幸一。サイログロブリン(Tg)は flotillin lipid raft を介して甲状腺機能遺伝子発現を調節する。第 90 回 日本内分泌学会学術総会。2017 年 4 月 20-22 日。京都。

吉田明雄、松本和久、井澤正一郎、大倉毅、松澤和彦、谷口晋一、鈴木幸一。新技術、小麦のタンパク発現系とリポソームを用いたペンドリンタンパク精製と、自己免疫性甲状腺疾患の抗ペンドリン抗体測定。第 60 回日本甲状腺学会学術集会。2017 年 10 月 5-7 日。別府。

Fei Chen, Yuqian Luo, 川島晃、石藤雄子、吉原彩、鈴木幸一。夏枯草 (*Prunella vulgaris*) の抗甲状腺炎作用分子機構の解明。第 34 回甲状腺病態生理研究会。2018 年 2 月 3 日。東京。

[図書] (計 2 件)

Luo Y, Sellitti DF and Suzuki K. The calpain proteolytic system. In: Bradshaw RA and Stahl PD (Eds): *Encyclopedia of Cell Biology*, vol 1, Academic Press, Waltham, MA, 670-680, 2016.

Suzuki K and Luo Y. Chapter Four-Histone acetylation and the regulation of major histocompatibility class II gene expression. Donev R (Ed): *Adv Protein Chem Struct Biol: Chromatin Remodelling and Immunity*. Elsevier, Kidlington, Oxford UK, 106:71-111, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://plaza.umin.ac.jp/suzuki-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木幸一 (SUZUKI, Koichi)
帝京大学・医療技術学部臨床検査学科・教授

研究者番号：20206478

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

川島晃 (KAWASHIMA, Akira)
石藤雄子 (ISHIDO, Yuko)
駱予倩 (LUO, Yuqian)
吉原彩 (YOSHIHARA, Aya)
小田健三郎 (ODA, Kenzaburo)
臼倉健世 (USUKURA, Kensei)