

研究種目：基盤研究C

研究期間：2007～2009

課題番号：19590569

研究課題名（和文）サイログロブリン遺伝子異常における甲状腺腫発生機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Goiter Development in Patients
with Thyroglobulin Mutations

研究代表者

家入 蒼生夫 (Tamio Ieiri)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：80049220

研究成果の概要（和文）：先天性甲状腺ホルモン合成障害の原因の一つにサイログロブリン遺伝子異常症がある。従来この疾患は稀と考えられていたが、病態が明らかになるに従い発見例数は増加している。成人例では甲状腺ホルモン値正常もしくは軽度機能低下の巨大甲状腺腫を特徴とし、甲状腺癌を高率に発症する。我々は、サイログロブリン遺伝子異常患者の甲状腺手術標本、および培養細胞に異常サイログロブリンを発現させ、遺伝子解析を行なった。その結果、いくつかの細胞増殖に重要な遺伝子が同定された。

研究成果の概要（英文）：One of the major causes of congenital thyroid dyshormonogenesis is thyroglobulin gene. Until recently mutations of Tg gene were believed rare. However, upon understanding of clinical characteristics, an increasing number of Tg mutations were identified. Adult patients present huge goiter with normal or subclinical hypothyroidism and frequently develop thyroid cancer. We studied gene expression profile of surgically removed patients' thyroid tissues and cultured cells expressing abnormal thyroglobulin *in vitro*. Several genes were identified which play a significant role in cell proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,200,000	360,000	1,560,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
21年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：サイログロブリン異常症、甲状腺ホルモン合成障害、びまん性甲状腺腫、

1. 研究開始当初の背景

我々は、日本におけるサイログロブリン異常症を解析し、すでに 41 家系 52 症例を報告した (Hishinuma, A., Fukata, S., Nishiyama, S., et al. 2006 Haplotype analysis reveals founder effects of thyroglobulin gene mutations C1058R and C1977S in Japan *J Clin Endocrinol Metab* 91:3100-3104.)。52 症例のうち 16 例は小児例で、マスキリーニングで発見され、甲状腺のびまん性腫大を特徴とする甲状腺機能低下症である。しかし、残りの成人例では甲状腺機能はほぼ正常で、甲状腺は徐々に増大する。さらに増大する甲状腺腫から高率に甲状腺癌が発症することも報告した (Hishinuma, A., Fukata, S., Kakudo, K., et al. 2005 High Incidence of Thyroid Cancer in Long-standing Goiters with Thyroglobulin Mutations. *Thyroid* 15:1079-1084)。一般的には、甲状腺ホルモン合成障害例では血清 TSH が高値となり、TSH の過剰分泌によって甲状腺が増大するが、サイログロブリン異常症では血清 TSH は正常であるにもかかわらず甲状腺が増大する。その機序は未だ不明であるが、甲状腺組織自体が増大する要因があると考えられる。そこで、今回の研究は甲状腺腫の増大要因を甲状腺内の遺伝子、蛋白発現の解析により解明しようとするものである。

サイログロブリンは分泌蛋白であり、リボゾームにて合成された後、小胞体に輸送され、ゴルジ装置を経て、コロイド腔に分泌される。しかし、異常サイログロブリンは細胞内を正常に輸送されることなく、小胞体内に滞って、コロイド腔に分泌されることはない (Hishinuma, A., Takamatsu, J., Ohyama, et al. 1999 Two novel cysteine substitutions (C1263R and C1995S) of thyroglobulin cause a defect in intracellular transport of thyroglobulin in patients with congenital goiter and the variant type of adenomatous goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:1438-1444.)。言わば、一種の小胞体貯蔵病で、細胞内では GRP94, GRP78, calreticulin といった分子シャペロンの発現が増加している。異常蛋白の小胞体内蓄積は、unfolded protein response (UPR) に総称される細胞内反応を引き起こすが、それには 3 系統の機序があり、PERK による転写全般の抑制、IRE1 による転写因子 XBP1 のスプライシング、転写因子 ATF6 のプ

ロセシングによる活性化がある。異常サイログロブリンの小胞体蓄積も、XBP1 のスプライシング、転写因子 ATF6 の活性化が認められることを我々は示した (Baryshev, M., Sargsyan, E., Wallin, G., et al. 2004 Unfolded protein response is involved in the pathology of human congenital hypothyroid goiter and rat non-goitrous congenital hypothyroidism. *J. Mol. Endocrinol* 32:903-20.)。異常蛋白が小胞体に蓄積されると細胞はアポトーシスを起こすが、甲状腺では甲状腺腫が増大し、甲状腺癌の発生源となる。サイログロブリン異常症の甲状腺癌発症の原因の多くは BRAF 遺伝子の活性化体細胞変異であり、分裂していく細胞内で遺伝子複製の過誤が起こり、その一つが BRAF 遺伝子の活性化体細胞変異であったり、他の癌抑制遺伝子等の不活化と考えられている。

2. 研究の目的

当研究では、まず、小胞体に蓄積されたサイログロブリンが細胞をアポトーシスに向かわせるのか、逆に、分裂に向かわせるのかを検討した。われわれは以前、培養細胞に異常サイログロブリンを発現させアポトーシスの状態や分裂速度を検討したが、培養細胞自体の分裂速度が速く有意差を得られなかった。そこで今回は、組織的検討にて、TUNNEL 法でアポトーシスの解析し、免疫組織学的手法で PCNA 蛋白等の発現を細胞レベルで検討した。

また、異常サイログロブリン蛋白を培養細胞内に発現させ、マイクロアレイ法にて発現遺伝子をプロファイリングすることにより、発現増加する遺伝子を同定した。同定した後には、実際に患者組織内で発現増加しているかを定量 RT-PCR 等にて定量し、さらにそれらの遺伝子を細胞内で発現させ、細胞内での経路を検討した。

3. 研究の方法

組織的研究では、アポトーシスに対しては、TUNNEL 法により DNA 鎖切断の状態を検討するとともに、各種蛋白の発現を免疫組織的に検討した。サイログロブリン異常症の甲状腺組織は、獨協医科大学や隈病院 (神戸市) の症例を使い、以前にサイログロブリン異常症と遺伝子診断により確定された症例である。使

用する組織はフォルマリン固定パラフィン切片で、キシレン脱パラフィンの後、クエン酸溶液中でマイクロウェーブ処理することにより、抗原性を回復させた。一次抗体として、抗サイログロブリン抗体、抗 GRP78 抗体、抗 Casp10 抗体、抗 PCNA 抗体を用いた。

次に、異常サイログロブリン蛋白を培養細胞に発現させ、それにより発現増加する遺伝子群をマイクロアレイ法と定量 RT-PCR 法にてプロファイリングした。まず、サイログロブリン cDNA 全長を pcDNA3.1 発現ベクターに再構築し、C1245R 変異と C1977S 変異を導入した。正常および変異サイログロブリン cDNA 発現ベクターはリポフェクション法で G401 腎細胞株に導入し、G418 選択培地中、限外希釈法にてクローニングし、サイログロブリン発現細胞株を樹立した。

細胞内でおこる遺伝子発現の変化は既知遺伝子の cDNA アレイを用いた。Atlas 3.6 array (3528 遺伝子) と Atlas stress array (234 遺伝子) を用いた検討では、アレイ上の全シグナルをリファレンスとし、C1245R または C1977S 変異サイログロブリン発現細胞株どちらかで 2 倍以上発現増加している遺伝子を陽性とした。また、発現量の差は定量的 RT-PCR 法にて検討した。

次に、変異サイログロブリン発現細胞株により発現増加する遺伝子を効率的にクローニングするため、変異サイログロブリン発現細胞株より得られた cDNA と正常サイログロブリン発現細胞株より得られた cDNA とサブトラクションハイブリダイゼーションした。サブトラクトされずに残った cDNA を PCR にて増幅し、ベクターに挿入し、大腸菌をトランスフォームしライブラリーを作製した。1500 クローンを単離し、ベクターに挿入された遺伝子を PCR 増幅した結果、654 クローンにインサートを認めた。これらのインサートをスライドグラスにスポットし、発現量の差をマイクロアレイにて検討した。最後に発現量の差が認められた 244 クローンをシーケンシングし、それぞれのクローンを同定した。

さらに、我々は、以上にて同定された遺伝子が実際に患者組織内で発現増加しているかどうかを、定量 RT-PCR にて検討した。

最後に、以上の実験より甲状腺細胞の増殖に関わる因子として同定された HMGA2、TWF1、MAPK1、PCNA の発現ベクターをそれぞれ作成し、FRTL5 甲状腺細胞に発現させることにより、発現経路の解析を行った。

4. 研究成果

異常蛋白が小胞体に蓄積されると細胞はアポトーシスを起こすが、甲状腺では甲状腺腫が増大し、甲状腺癌の発生母地となる。そ

こで、まず、小胞体に蓄積されたサイログロブリンが細胞をアポトーシスに向かわせるのか、逆に、分裂に向かわせるのかを検討した。まず、TUNNEL 法や免疫組織で細胞レベルでの検討をした。正常甲状腺細胞ではサイログロブリン蛋白は主に濾胞腔内に存在するが、サイログロブリンでは細胞質内に存在する。GRP78 の発現は増加しており、小胞体貯蔵病の所見と一致していた。TUNEL 法ではアポトーシスが散見され、同時に Casp10 発現細胞も認められた。また、PCNA 陽性細胞も存在し、一方でアポトーシスが起これると同時に細胞分裂も促進されていることが示唆された。癌化部位ではサイログロブリン、GRP78 の発現が低下するが、TUNEL 陽性細胞、PCNA 陽性細胞が共存し、癌組織内でもアポトーシスと細胞分裂同時に進行していることがわかった。

我々は、次に、異常サイログロブリン蛋白を培養細胞に発現させ、それにより発現増加する遺伝子群をマイクロアレイ法と定量 RT-PCR 法にてプロファイリングした。既知遺伝子の cDNA アレイでは、ubiquitin といった異常蛋白処理機構が活性化されている一方、アポトーシス (caspase10) や細胞増殖機構 (PCNA、JAK3、p55CDC) が活性化されていた。また、PAX3 や CRABP2 等の転写因子の発現も増加していた。次に、変異サイログロブリン発現細胞株により発現増加する新規遺伝子を同定するため、サブトラクションハイブリダイゼーションを行なった。得られた 244 遺伝子のうち、81 遺伝子はリボゾーム蛋白遺伝子であったが、他は分子シャペロン、プロテアゾーム、転写因子、アポトーシス、細胞増殖等に関連する遺伝子であった。これより変異サイログロブリンは細胞内で UPR のみでなく、他の多彩な細胞内応答を起こしていることがわかった。

さらに、我々は、以上の実験で発現増加する遺伝子を、実際に患者組織内で発現増加しているかどうか、定量 RT-PCR にて検討した。甲状腺特異的遺伝子群では、NIS の増加が著名で、50 倍以上であったが、他の遺伝子発現の増加は TRb の 5 倍が最大であった。また、細胞内輸送異常を反映して、GRP78、GRP94、PDI 等の分子シャペロン mRNA が増加していた。CASP10 も増加していたが、PCNA、MAPK、MAPKK 等の増殖マーカーが著増していたため、サイログロブリン異常症では、細胞増殖がアポトーシスを上回っていると考えられた。サイログロブリン異常症では、放置すると BRAF 遺伝子に活性化体細胞変異が生じ、癌が発生するが、発癌以前の組織内では BRAF mRNA の増加は 2 倍程度であった。MEK-MAPK 経路の活性化に比べ、BRAF の活性化がそれ程でないことより、UPR と MEK-MAPK 経路を繋ぐ経路が存在することが想定された。他の増殖に関連があ

ると予想される遺伝子としてはTWF1やHMGA2が著増していた。

最後に、HMGA2、TWF1、MAPK1、PCNAの発現ベクターをそれぞれ作成し、FRTL5甲状腺細胞に発現させることにより、発現経路の解析を行った。その結果、HMGA2はTWF1、MAPK1、PCNAすべてにより発現増加し、逆に、TWF1はいずれの遺伝子にても発現刺激は認められなかった。以上より、HMGA2はMEK-MAPK経路のさらに末梢で細胞増殖に関与していることが示唆された。

以上の研究より、サイログロブリン異常症では、異常サイログロブリン蛋白の細胞内輸送障害を反映してアポトーシスが活性化されているが、それを上回ってMEK-MAPK経路を介して細胞増殖が活性化されていることが判明した。また、新規遺伝子としてHMGA2が同定され、甲状腺細胞増殖にどのようなメカニズムで関与するか今後検討すべきと結論された。

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6件)

1. 家入蒼生夫、菱沼 昭、竹越一博(2008)

特集 臨床検査：現状と展望

トピックス II. 各論一実地医家に必要な新しい検査と重要な検査項目一

6. 内分泌・代謝疾患

日本内科学会雑誌 97(12):2983-2990.

査読 無

2. 深田修司、菱沼 昭、窪田純久、

隈 寛二、網野信行、宮内 昭 (2008)

家系内に集積したサイログロブリン(Tg)遺伝子異常症

日本内分泌学会雑誌 84(Suppl):38-41.

査読 無

3. Ohye H, Fukata S, Hishinuma A, Kudo

T, Nishihara E, Ito M, Kubota S, Amino N, Ieiri T, Kuma K, Miyauchi A. (2008)

A novel homozygous missense mutation of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene in an

adult patient with large goiter.

Thyroid 10(5): 561-566.

査読 有

4. Nishihara E, Nagayama Y, Amino N, Hishinuma A, Takano T, Yoshida H, Kubota S, Fukata S, Kuma K, Miyauchi A. (2007)

A novel thyrotropin receptor germline mutation (Asp617Tyr) causing hereditary hyperthyroidism.

Endocrine J. 54 (6):927-934.

査読 有

5. Fukata S, Hishinuma A, Kuma K, Miyauchi A, Sugawara M. (2007)

Letter to the Editor

Endemic goiter due to thyroglobulin gene abnormality and social ostracism.

Endocrine J. 54(3):485-486.

査読 有

6. Kanou Y, Hishinuma A, Tsunekawa K, Seki K, Mizuno Y, Fujisawa H, Imai T, Miura Y, Nagasaka T, Yamada C, Ieiri T, Murakami M, Murata Y. (2007)

Thyroglobulin gene mutations producing defective intracellular transport of thyroglobulin are associated with increased thyroidal type 2 iodothyronine deiodinase activity.

J Clin Endocrinol Metab 92(4):1451-1457.

査読 有

[学会発表] (計30件)

1. Hishinuma A, Fukata S, Ohmika N, Hayama N, Namatame T, Ieiri T. (2010. 3. 30)

Genomic microdeletion of 6,675 nucleotides encompassing exon 28 and 29 of thyroglobulin (Tg) gene was found with a compound heterozygous occurrence of single nucleotide deletion 7890delT
14th International Congress of Endocrinology (ICE2010) (Kyoto)

2. Hishinuma A. (2010. 3. 25)
Dyshormonogenesis by thyroglobulin mutation in basic and clinical aspects
Thyroid Satellite Symposium of 14th International Congress of Endocrinology (CE2010) (Kyoto)

3. Hishinuma A., Fukata S, Ohmika N, Hayama N, Namatame T, Ieiri T. (2009. 11. 2)
Novel compound heterozygous occurrence of single nucleotide deletion 7890delT and genomic microdeletion encompassing exon 28 and 29 of thyroglobulin gene causes multinodular goiter.
9th Asia and Oceania Thyroid Association Congress (Nagoya)

4. 菱沼 昭、深田修司、宮内 昭、家入蒼生夫 (2009, 4, 24)
公募シンポジウム 8 甲状腺癌の分子生物学の新知見と応用
サイログロブリン異常と甲状腺癌の特徴
第 82 回日本内分泌学会学術総会 (前橋)

5. 菱沼 昭 (2009, 3, 14)
クリニカルアワー 4 特殊な甲状腺機能亢進症の治療
小児におけるバセドウ病

第 19 回臨床内分泌代謝 Update (東京)

6. 菱沼 昭 (2008, 5, 17)
シンポジウム 4 遺伝子異常による甲状腺疾患
甲状腺ホルモン合成障害をきたす遺伝子異常
第 81 回日本内分泌学会 (青森)

7. 菱沼 昭 (2007, 11, 15)
国際分子甲状腺学シンポジウム
Genetic thyroid diseases in Japan featured by thyroglobulin mutations
第 50 回日本甲状腺学会 (神戸)

8. Hishinuma A. (2007, 11, 3)
Symposium (II) -Update in Clinical Thyroidology-
New Aspects of Thyroglobulin Mutations -Clinical Features, Pathogenesis, and High Incidence of Cancer-
Autumn Meeting of Korean Endocrine Society 2007

9. 菱沼 昭、家入蒼生夫 (2007, 10, 19)
シンポジウム「甲状腺疾患の病理と臨床のさらなる融合へ」
サイログロブリン遺伝子異常症—細胞内輸送異常と甲状腺癌
第 11 回日本内分泌病理学会 (札幌)

[図書] (計 5 件)

1. 菱沼 昭、家入蒼生夫 (2009)
サイログロブリン遺伝子異常—細胞内輸送異常と甲状腺癌—
In: 内分泌病理学 最近の進歩 2008 (上條桂一 編) pp73-79

ホルモンと臨床 2009 秋季増刊号
医学の世界社、東京

2. 菱沼 昭 (2009)

先天性甲状腺疾患

In: 甲状腺疾患診療マニュアル (田上哲也、
西川光重、伊藤公一、成瀬光栄 編)

pp82-83

診断と治療社、東京

3. 菱沼 昭 (2009)

小児 Basedow 病

In: 甲状腺疾患診療マニュアル (田上哲也、
西川光重、伊藤公一、成瀬光栄 編)

pp84-85

診断と治療社、東京

4. 菱沼 昭、家入蒼生夫 (2008)

サイログロブリン遺伝子異常と甲状腺腫
臨床検査 増刊号 ホルモンの病態異常
と臨床検査 52(11):1183.

医学書院、東京

5. Hishinuma A, Fukata S, Ieiri T.

(2007)

Emerging new features of patients with
thyroglobulin mutations, including
increased incidence of thyroid cancer.

Hot Thyroidology (European Thyroid
Association) August, No2:1-10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家入 蒼生夫 (Tamio Ieiri)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：8 0 0 4 9 2 2 0

(2) 研究分担者

菱沼 昭 (Akira Hishinuma)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：4 0 2 0 1 7 2 7