

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：84305
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2012
 課題番号：20591106
 研究課題名（和文） 核内受容体によるエネルギー代謝調節の分子メカニズムに関する研究
 研究課題名（英文） Molecular mechanism in the regulation of energy metabolism by nuclear hormone receptors
 研究代表者 田上 哲也（TAGAMI TETSUYA）
 独立行政法人国立病院機構（京都医療センター臨床研究センター）
 内分泌代謝高血圧研究部・研究室長（分子内分泌代謝）
 研究者番号：60273439

研究成果の概要（和文）：

新規甲状腺ホルモン受容体（TR） β 4の基礎的・臨床的検討を行った。TRとRXRや転写共役因子の結合性と転写活性の関係を明らかにした。また、一部のARBがチアゾリジン誘導体とは異なった様式でPPAR γ 活性化作用を発揮することを示した。さらに、長鎖脂肪酸がTRの転写に及ぼす影響、フィブラートやイルベサルタンによるPPARs活性化、漢方薬構成生薬中のPPARs活性化成分の探索、GH/IGF-1下流の転写因子群と核内受容体間のクロストーク、TRやVDRによる骨、糖・脂質・エネルギー代謝に関わる遺伝子の転写調節について研究した。

研究成果の概要（英文）

A novel thyroid hormone receptor β isoform (TR β 4), recently we have cloned from human pituitary, may modulate hormone action as an endogenous antagonist in the tissue or cellular context. For example, aberrant expression of TR β 4 may partly contribute to the inappropriate secretion of TSH in a TSHoma. Sites for co-repressors (CoR), co-activators (CoA), and RXR binding partially overlapped, but CoR and CoA bindings were well correlated with T3-independent and T3-dependent transcriptional regulations, respectively, while RXR binding was not among TR mutants, suggesting that transcriptional regulation by TR is mainly mediated by an exchange of CoRs and CoAs. Telmisartan, one of angiotensin II receptor blockers, specifically activates PPAR γ . Telmisartan and thiazolidinediones (TZDs) had differential effects on the transcriptional control and interaction with cofactors among PPAR γ mutants, suggesting that these mutants could be powerful tools for developing novel therapeutic agents that retain the metabolic efficacy of PPAR γ activation with fewer adverse effects associated with TZDs. Moreover, we have studied the effects of FFA, fibrates or irbesartan on TR or PPAR mediated transcription, the search for PPAR activators in herb, and the crosstalk between nuclear hormone receptors and transcription factors that mediate GH/IGF-1 action or glucose, lipid and energy metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：甲状腺ホルモン受容体，PPAR，核内受容体，ミトコンドリア脱共役蛋白，転写制御

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

TR（甲状腺ホルモン受容体）、PPAR（ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体）、RXR（レチノイドX受容体）は、核内ステロイドホルモン受容体ファミリーのメンバーであり、TRやPPARはRXRと2量体を形成して標的遺伝子の上流にある特定の部位に結合し、その転写を活性化する。TRのアイソフォームとして、 $\beta 1-3$ 、 $\alpha 1,2$ がクローニングされているが、ヒトでは $\beta 1,2$ と $\alpha 1,2$ が確認されており、また $\alpha 2$ は $\alpha 1$ の調節蛋白と考えられている。PPARのアイソフォームとして、 α, γ, δ の3種類が同定されている。PPARのリガンドとして、フィブラート系高脂血症治療薬(PPAR α)やチアゾリジン系糖尿病治療薬(PPAR γ)が知られるが、最近 ARB系高血圧症治療薬の一部にPPAR γ 活性化作用のあることが報告され、その効果は既存の薬剤と異なることが示唆されている。RXRはTRやPPARのヘテロダイマーパートナーであり、RXR α, β, γ が同定されており、リガンドは9cisレチノイン酸である。これら核内受容体の相互作用が注目されているが、いまだ未知な部分が多い。

我々は、ヒトにおいてTRの新規アイソフォーム(TR $\beta 4$)をクローニングした。RT-PCRとノザンブロット解析により、そのmRNAが特に骨格筋に豊富に発現していることを見いだした。TR $\beta 4$ は、従来の機能性TRの機能を阻害し、甲状腺ホルモン作用の調節因子と考えられた。骨格筋は、全身の体組成の約40%を占め、生体のエネルギーバランスにおいて主要な役割を担う。ブドウ糖の取り込み、放出、貯蔵を行う中心的臓器であり、エネルギー消費の30%以上に関与する。脂質代謝にも影響し、筋肉活動(運動)によってグリコーゲンの後は中性脂肪が消費される。このように、骨格筋はインスリン抵抗性、高脂血症、肥満に関係し、メタボリック症候群の重要な治療ターゲットである。ミトコンドリア脱共役蛋白質(UCP)遺伝子は、骨格筋に豊富に発現し、エネルギー代謝を調節している。PPARやRXRのリガンドはこのUCP遺伝子発現を刺激する。甲状腺ホルモン(サイロキシン、体内でT3に変換される)は古来や世薬として使用されていたもので、TRに作用する。興味深いことに、T3もUCP遺伝子発現を刺激し、そこには、PGC1というPPARと共通のkey moleculeが介在する。このように、骨格筋では、TRとPPARの相互作用によって、UCP遺伝子発現を制御し、エネルギー

代謝を調節していることが想定されるが、その詳細な分子機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、(1)我々が見いだしたヒト新規TRアイソフォームの役割を解析すること、(2)ARBやフィブラート等の薬剤によるPPAR活性化の分子機構を甲状腺ホルモン不応症の研究で確立された分子生物学的手法を用いて受容体のアミノ酸レベルで明らかにすること、(3)エネルギー代謝調節の観点からTRとPPARの相互作用の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1)新規TRアイソフォームに対する特異抗体を作成し、主に骨格筋における当該蛋白の発現状況をウエスタンブロット法や免疫組織化学的手法を用いて解析する。

(2)PPAR発現ベクターを用いて、遺伝子工学的手法によりPPARのアミノ酸に人工的に変異を導入する。培養細胞株に種々の変異PPAR蛋白発現ベクターをルシフェラーゼ発現リポーター遺伝子と共に一時的に発現させる。培養液に薬剤を添加してルシフェラーゼ活性を測定し、アミノ酸変異が各種薬剤によるPPAR活性化に及ぼす影響を解析する。このようにして、薬剤特異的に関与するアミノ酸部位を同定する。

(3)クローニングしたアイソフォームを含むTRやPGC1など種々のコファクター(転写共役因子)を、作成した種々の変異PPARと共発現し、骨格筋に豊富に発現するミトコンドリアUCP遺伝子発現に対する薬剤の効果をみることで、各薬剤の骨格筋におけるエネルギー代謝調節機構に及ぼす影響を分子レベルで解明する。

4. 研究成果

(1)一部のアンギオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)がチアゾリジン誘導体とは異なった様式でペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ (PPAR γ)活性化作用を発揮することを示した(雑誌論文#1: Endocrinology, 2009)。ARBは高血圧症治療薬として広く使用されているが、そのうちのひとつであるテルミサルタンがPPAR γ を特異的に活性化することが示されている。我々はPPAR γ の変異体を作成し、テルミサルタンとチアゾリジン誘導体(TZD: PPAR γ 刺激性糖尿病治療薬)間で、PPAR γ 活性化における分子メカニズムの

違いを調べた。その結果、Y473Aはテルミサルタン特異的に刺激され、TZDとは転写共役因子のリクルート様式が異なっていることが示唆された。また、これらPPAR γ 変異体は、より副作用の少ないPPAR γ 刺激薬を創薬する上で有用であると思われた。

(2) 甲状腺ホルモン受容体 (TR) とレチノイド X 受容体 (RXR) や転写共役因子の結合性と転写活性の関係を明らかにした。(雑誌論文#2: J Mol Endocrinol, 2009). 13 種類の TR 変異体を作成し、RXR との結合性、転写共役因子 (コリプレッサーとコアクチベーター) のリクルートメント、ならびに転写活性との関係を調べた。その結果、TR の転写活性は RXR との結合性ではなく、おもに転写共役因子のリクルートメントによって説明されることが明らかとなった。

(3) 新規甲状腺ホルモン受容体アイソフォーム (TR β 4) の基礎的・臨床的検討を行った (雑誌論文#4: BBRC, 2010, 雑誌論文#6: JCEM, 2011). 我々は TR β 4 をヒト下垂体から同定した。TR β 4 は TR β 1 の splice variant であり、TR β 1 の C 末端が intron の塩基配列に置換されている。TR β 4 は T3 と結合せず、TR β 1 の機能 (転写活性) を阻害した。TR β 4 は骨格筋や精巣など比較的全身に分布し、TR α 1 に対する TR α 2 のように、TR β 1 に対して抑制的に作用していると考えられた。特異抗体を作成するとともに、GFP キメラ受容体を構築し細胞内局在を確認した。病態生理的意義を調べるために、TSH 産生下垂体腺腫 (TSHoma) における TR β 4 mRNA の発現を検討した。TSHoma は不適切 TSH 分泌症候群 (SITSH) を呈し、T3 不応症同様、T3 による thyrotroph への negative feedback 機構が破綻している。TSHoma では非機能性下垂体腺腫と比べ、TR β 1 や TR β 2 に対する TR β 4 の発現比率が高かった。培養細胞では、TR β 4 は DNA 結合のレベルで機能性 TR の機能を阻害し、T3 による TSH 抑制を阻害した。TR β 4 の発現の差が TSHoma での SITSH の一因となっている可能性が示唆された。

(4) さらに、長鎖脂肪酸が甲状腺ホルモンの転写活性に及ぼす影響評価、フィブラートによる PPAR 活性化作用の分子メカニズム、漢方薬構成生薬中の PPARs に対する有効成分の探索と効果の評価、イルベサルタンによる PPAR δ 活性化、GH/IGF-1 下流の転写因子群と脂質・エネルギー代謝に関わる核内受容体ファミリー間のクロストークの解析、PPARs

に対するアゴニスト探索と作用評価、甲状腺ホルモンによる骨代謝、糖・脂質・エネルギー代謝に関わる遺伝子の転写調節について研究した。

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 10 件)

- (1) Kawashima ST, Tagami T, (他 4 名), Naruse M, (他 5 名). Serum levels of IgG and IgG4 in Hashimoto thyroiditis. *Endocrine*. 2013 May 22 [Epub ahead of print] <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12020-013-9988-9> 査読有
- (2) Tagami T, (他 11 名), Naruse M. Short-term effects of β -adrenergic antagonists and methimazole in new-onset thyrotoxicosis caused by Graves' disease. *Intern Med* 51: 2285-2290, 2012, https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/51/17/51_51.7302/_article 査読有
- (3) Kanamoto N, Tagami T, (他 7 名), Forkhead box A1 (FOXA1) and A2 (FOXA2) oppositely regulate human type 1 iodothyronine deiodinase gene in liver. *Endocrinology* 153:492-500, 2012, doi: 10.1210/en.2011-1310, 査読有
- (4) Tagami T, (他 15 名), Naruse M. Multi-center study on the prevalence of hypothyroidism in patients with hypercholesterolemia. *Endocr J* 58:449-457, 2011, https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/58/6/58_K11E-012/_article 査読有
- (5) Tagami T, (他 4 名), Moriyama K, Naruse M. Aberrant expression of thyroid hormone receptor beta isoform may cause inappropriate secretion of TSH in a TSH-secreting pituitary adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E948-952, 2011, doi: 10.1210/jc.2010-2496, 査読有
- (6) Evans M, Sanders J, Tagami T, (他 12 名). Monoclonal autoantibodies to the TSH receptor, one with stimulating activity and one with blocking activity, obtained from the same blood sample. *Clin Endocrinol (Oxf)* 73(3):404-12, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2265.2010.03831.x, 査読有
- (7) Tagami T, Yamamoto Y, Moriyama K, (他 3 名), Naruse M. Identification of a novel human thyroid hormone receptor beta isoform as a transcriptional modulator. *Biochem Biophys Res Commun*

- 396:983-988, 2010, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.038, 査読有
- (8) **Tagami T.** (他 9 名), **Naruse M.** Lipid profiles in the untreated patients with Hashimoto thyroiditis and the effects of thyroxine treatment on subclinical hypothyroidism with Hashimoto thyroiditis. *Endocr J* 57:253-258, 2010, https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/57/3/57_K09E-315/_article 査読有
- (9) **Tagami T.**, Yamamoto Y, **Moriyama K.** (他 3 名), **Naruse M.** The retinoid X receptor binding to the thyroid hormone receptor: relationship with cofactor binding and transcriptional activity. *J Mol Endocrinol* 42:415-428, 2009, doi: 10.1677/JME-08-0153, 査読有
- (10) **Tagami T.**, Yamamoto Y, **Moriyama K.** (他 3 名), **Naruse M.** A selective peroxisome proliferator-activated receptor γ modulator, telmisartan, binds to the receptor in a different fashion from thiazolidinediones. *Endocrinology* 150:862-870, 2009, doi:10.1210/en.2008-0502, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- (1) **田上哲也**, **森山賢治**, 二若久美, 島津章, **成瀬光栄** 甲状腺ホルモンによる骨代謝、糖・脂質代謝に関わる遺伝子の転写調節 第 55 回日本甲状腺学会, 2012/11/29-12/1, 福岡
- (2) 安宅麻美, 二若久美, **山本裕之**, 島津章, **成瀬光栄**, **田上哲也**, **森山賢治** 新規甲状腺ホルモン受容体アイソフォーム β_4 の細胞内機能に関する基礎的検討 第 55 回日本甲状腺学会, 2012/11/29-12/1, 福岡
- (3) **田上哲也**, 二若久美, **森山賢治**, 臼井健, **成瀬光栄**, 島津章 GH/IGF-1 下流の転写因子群と脂質・エネルギー代謝に関わる核内受容体ファミリー間のクロストークの解析 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 2012/4/19-21, 名古屋
- (4) **森山賢治**, 李娟娥, 二若久美, **山本裕之**, 安宅麻美, **田上哲也** PPARs に対するアゴニスト探索と作用評価の試み 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 2012/4/19-21, 名古屋
- (5) 安宅麻美, **山本裕之**, 二若久美, **田上哲也**, **森山賢治** 新規甲状腺ホルモン受容体アイソフォーム β_4 の細胞内局在に関する基礎的検討 第 54 回日本甲状腺学会, 2011/11/21-23, 大阪
- (6) **森山賢治**, 李娟娥, **山本裕之**, 桑村優衣

- 子, 安宅麻美, **田上哲也** 漢方薬構成生薬中の PPARs に対する有効成分の探索と効果評価の試み 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 2011/5/19-21, 札幌
- (7) **田上哲也**, 臼井健, **山本裕之**, **森山賢治**, 島津章, **成瀬光栄** イルベサルタンによる PPAR δ 活性化 第 84 回日本内分泌学会, 2011/4/21-23, 神戸
- (8) **田上哲也**, **山本裕之**, **森山賢治**, 紅粉陸男, 臼井健, 島津章, **成瀬光栄** TSH 産生下垂体腺腫における新規甲状腺ホルモン受容体アイソフォームの発現 第 53 回日本甲状腺学会 2010/11/11-13, 長崎
- (9) **森山賢治**, **山本裕之**, 安宅麻美, 臼井健, **成瀬光栄**, **田上哲也** 新規甲状腺ホルモン受容体アイソフォーム β_4 に関する基礎的検討 第 53 回日本甲状腺学会 2010/11/11-13, 長崎
- (10) **田上哲也**, **山本裕之**, **森山賢治**, 沢井邦子, 臼井健, 島津章, **成瀬光栄** フィブラートによる PPAR 活性化作用の分子メカニズム 第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009/4/23-25, 前橋
- (11) **森山賢治**, **山本裕之**, 野井亜沙美, 濱口亜紀, 臼井健, **田上哲也** 長鎖脂肪酸が甲状腺ホルモンの転写活性に及ぼす影響評価 第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009/4/23-25, 前橋
- (12) **田上哲也**, **森山賢治**, **山本裕之**, 臼井健, 沢井邦子, **成瀬光栄** 甲状腺ホルモン受容体(TR)のレチノイド X 受容体(RXR)結合 転写共役因子結合と転写活性の関係 第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008/5/16-18, 青森

[図書] (計 4 件)

- (1) **田上哲也** (著) 甲状腺疾患の診かた, 考えかた. 中外医学社, 2012, 145 ページ.
- (2) **成瀬光栄**, 平田結喜緒, 島津章 (編) 田辺晶代, 寺内康夫, 高橋裕, 竹内靖博, **田上哲也** (編協) 内分泌代謝専門医ガイドブック改訂第 3 版, 診断と治療社, 2012, 411 ページ.
- (3) **成瀬光栄**, 織内昇, 平田結喜緒, 西川光重 (編) 田辺晶代, **田上哲也**, 柴田洋孝, 山田正三 (編協) 内分泌画像検査・診断マニュアル, 診断と治療社, 2011, 235 ページ.
- (4) **田上哲也**, 伊藤公一, **成瀬光栄**, 西川光重 (編) 甲状腺疾患診療マニュアル. 診断と治療社, 2009, 157 ページ.

6. 研究組織

(1)研究代表者

田上 哲也 (TAGAMI TETSUYA)
独立行政法人国立病院機構 (京都医療センター臨床研究センター) 内分泌代謝高血圧
研究部・分子内分泌代謝研究室長
研究者番号 : 60273439

(2)研究分担者

森山 賢治 (MORIYAMA KENJI)
武庫川女子大学薬学部・教授
研究者番号 : 00301739

(3)研究分担者

成瀬 光栄 (NARUSE MITSUhide)
独立行政法人国立病院機構 (京都医療センター臨床研究センター) 内分泌代謝高血圧
研究部・研究部長
研究者番号 : 40120018

(4)連携研究者

山本 裕之 (YAMAMOTO HIROYUKI)
武庫川女子大学薬学部・助教 (現在渡米中)
研究者番号 : 10466295