

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24年 5月10日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591320

研究課題名（和文）

探索医療に基づく甲状腺ホルモントランスポーターの細胞特異的機能の解明

研究課題名（英文） Translational approach to identifying cell specific expression and function of thyroid hormone transporters

研究代表者

難波 範行 (NAMBA NORIYUKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10379076

研究成果の概要（和文）：著明な精神発達遅滞を示すAllan-Herndon-Dudley症候群（AHDS）は、甲状腺ホルモントランスポーターMonocarboxylate transporter 8（MCT8）の機能低下に起因する。AHDSの特徴である髄鞘化遅延、一般的な甲状腺機能低下症より成長障害が軽度である点に着目し、①乏突起膠細胞前駆細胞においてMCT8が発現していること、②成長軟骨の増殖・分化にはMonocarboxylate transporter 10（MCT10）が関与することを示した。

研究成果の概要（英文）：The Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS), caused by monocarboxylate transporter 8 (MCT8) mutations, is characterized by severe psychomotor retardation. We focused on two symptoms, delayed myelination and relatively normal growth compared to patients with congenital hypothyroidism and demonstrated that #1) oligodendrocyte precursor cells express MCT8 and #2) Monocarboxylate transporter 10 (MCT10) plays a role in growth plate chondrocyte proliferation and differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
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・小児科学

キーワード：甲状腺ホルモントランスポーター、軟骨細胞、成長軟骨、成長障害、乏突起膠細胞

1. 研究開始当初の背景

Monocarboxylate transporter 8 (MCT8) は最近甲状腺ホルモントランスポーターとして機能することが明らかにされた膜タンパクである (J Biol Chem 278:40128 (2003))。機能の解明に引き続き、X連鎖性の精神発達遅滞を示す Allan-Herndon-Dudley 症候群 (AHDS) の原因遺伝子であることも同定された (Lancet 364:1435 (2004), Am J Hum

Genet 74:168 (2004), Am J Hum Genet 77:41 (2005))。この発見により、甲状腺ホルモン不応症を考えると、視床下部-下垂体-甲状腺の系のみならず、各臓器・各細胞に発現する甲状腺ホルモントランスポーターおよび脱ヨード化酵素等の作用も考慮せざるを得なくなった (Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 21:277 (2007))。なぜなら甲状腺ホルモンの生物活性は細胞内 T_3 濃度

により規定され、細胞内 T_3 濃度は、循環血漿中の甲状腺ホルモン量、細胞内への甲状腺ホルモン取り込み、細胞内における脱ヨード化酵素による甲状腺ホルモンの活性化・不活性化に依存しているためである。しかしながら、このシステムの制御機構ならびに生理的意義に関して多くの点が未だに不明である。

我々は低 fT_4 、高 fT_3 を呈した児の遺伝子解析から新規の MCT8 遺伝子異常を同定し、児の臨床像を詳細に検討する中で、頭部 MRI 所見で髄鞘化遅延を認めること、視床下部・下垂体系および聴覚は MCT8 に完全には依存していないことを見出した (Eur J Pediatr 167:785 (2008))。齶歯類における研究より、中枢神経系では主として星状膠細胞において T_4 から T_3 が産生され、MCT8 により神経細胞に取り込まれると考えられているが、他の細胞については不明である。また、髄鞘化を担う乏突起膠細胞の正常な増殖・分化には甲状腺ホルモンが必要であることが知られているが、甲状腺ホルモントランスポーターの発現についての報告はない。以上より、髄鞘化遅延の発症機序として MCT8 機能不全による乏突起膠細胞内 T_3 不足が想定された。

一方、AHDS 家系例の報告より MCT8 機能低下では成長障害を来さないことも知られている (Am J Hum Genet 47:446 (1990))。全般的な甲状腺ホルモン作用の不足では著明な成長障害を来すことは周知の事実であり、成長軟骨の甲状腺ホルモン取り込みは MCT8 に依存していないことが予想された。甲状腺ホルモントランスポーターはいくつかのファミリーが同定されているが、このうち甲状腺ホルモンと特に親和性が高いものは、現在のところ MCT8、MCT10、OATP1C1 の 3 種類のみである (Trends Endocrinol Metab 19:50 (2007))。したがって、成長軟骨の甲状腺ホルモン取り込みは、主として MCT10 もしくは OATP1C1 による可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

AHDS 患者の身体所見より、甲状腺ホルモン取り込みを MCT8 に依存していると考えられる臓器・細胞、逆に MCT8 以外の甲状腺ホルモントランスポーターが関与していると考えられる臓器・細胞について甲状腺ホルモン取り込み機構の分子基盤の解明を目的とした (bedside to bench)。

(1) 乏突起膠細胞の正常増殖・分化には MCT8 が必要であると考えられた。そこで、初代培養乏突起膠細胞、およびマウス脳切片における MCT8 の発現について検討し、中枢神経系の髄鞘化における MCT8 の生理的意義を解明を目指した。

(2) 成長軟骨の甲状腺ホルモン取り込みは MCT8 以外の甲状腺ホルモントランスポー

ターによると考えられたため、そのトランスポーターの同定、ならびに同定されたトランスポーターの軟骨の増殖・分化における生理的意義の解明を目指した。

一方、これらの実験から各甲状腺ホルモン標的器官に特異的な甲状腺ホルモントランスポーターの情報を蓄積することにより、未だに原因不明の疾患の分子基盤の解明 (例: 甲状腺ホルモントランスポーター異常による成長障害) も目的とした (bench to bedside)。

3. 研究の方法

(1) 乏突起膠細胞における甲状腺ホルモントランスポーターの発現解析

マウス初代培養乏突起膠細胞前駆細胞から採取した RNA より cDNA を作成し、real-time PCR 法により甲状腺ホルモンに特異性が高いとされるトランスポーターの発現量を定量した。また、免疫染色法により Mct8 タンパクの発現も確認した。さらに、マウス脳組織切片を用い、乏突起膠細胞における Mct8 の発現を免疫染色法で確認した。

(2) 軟骨細胞における甲状腺ホルモントランスポーター発現の網羅的検討と機能解析

①培養細胞における甲状腺ホルモントランスポーターの網羅的解析

マウス由来軟骨前駆細胞株 ATDC5 より採取した RNA を用い cDNA を作成し、real-time PCR 法により、既知の甲状腺ホルモントランスポーターすべてについて網羅的に発現を定量した。

②軟骨細胞分化による発現変化の検討

ATDC5 細胞の分化を誘導し、分化にともなう甲状腺ホルモントランスポーターの発現量の変化を real-time PCR 法により検討した。

③in vivo 成長軟骨における甲状腺ホルモントランスポーターの発現解析

胎生 18 日マウス上腕骨を用い、in situ hybridization 法によりマウス成長軟骨における Mct10, Mct8, Lat1 の発現、局在を確認した。

④甲状腺ホルモン細胞内取り込みの検討

ATDC5 細胞を用い、阻害剤添加 (Lat1) もしくは siRNA 強制発現 (Mct10) による甲状腺ホルモン ($L-3,5,3'-[3'-125I]-[125I]T_3$) 細胞内取り込みの変化を検討した。

⑤Mct10 ノックダウンが甲状腺ホルモン作用に及ぼす影響の検討

Mct10 あるいは negative control siRNA を ATDC5 細胞に強制発現後、生理量の甲状腺ホルモン (T_3) による ATDC5 細胞の増殖抑制・分化促進作用の変化を検討した。細胞増殖は細胞数の変化、細胞分化は分化マーカー (Col10) を real-time PCR 法により定量することにより検討した。

4. 研究成果

(1) 乏突起膠細胞における甲状腺ホルモントランスポーターの発現解析

マウス初代培養乏突起膠細胞前駆細胞において甲状腺ホルモンに特異性が高いと報告されている *Mct8*, *Mct10*, *Oatp1c1* mRNA の発現を定量したところ、*Mct8* mRNA の発現が最多であった。初代培養乏突起膠細胞を用い、抗 *Mct8* 抗体、抗 *Cnp* 抗体（乏突起膠細胞のマーカー）で二重免疫染色を行ったところ、共局在が認められた。さらに、マウス脳のパラフィン切片でも抗 *Mct8* 抗体、抗 *Olig2* 抗体（乏突起膠前駆細胞のマーカー）二重免疫染色を行ったところ、乏突起膠細胞前駆細胞での共局在が認められた。

以上より *Mct8* は乏突起高細胞分化の初期において甲状腺ホルモンの細胞内取り込みに関与していると考えられた。また、AHDS 患者では、*Mct8* 欠損により適切なタイミングで乏突起膠細胞前駆細胞に甲状腺ホルモンシグナルが伝達されないため、中枢神経系の髄鞘化遅延を生じる可能性が示唆された。

(2) 軟骨細胞における甲状腺ホルモントランスポーター発現の網羅的検討と機能解析

①培養細胞における甲状腺ホルモントランスポーターの網羅的解析

マウス由来軟骨前駆細胞株 ATDC5 において、既知の甲状腺ホルモントランスポーターすべてを網羅的に定量したところ、発現が最も多かったのは *Lat1* であり、続いて甲状腺ホルモンに特異性が高いとされる *Mct10* であった。*Mct8* の発現は AHDS に重度の成長障害が認められないことから想定されるようにわずかであった。また、*Oatp1c1* は検出されなかった。

②軟骨細胞分化による発現変化の検討

軟骨細胞は分化にともない、形態、機能、遺伝子発現が変化することが知られているため、分化にとともなう *Mct8*, *Mct10* の発現変化を検討したところ、*Mct8* は分化とともに著増し、*Mct10* は分化とともに漸減することが明らかになった。

③in vivo 成長軟骨における甲状腺ホルモントランスポーターの発現解析

マウス由来軟骨前駆細胞株 ATDC5 で認められた①、②が実際に in vivo で認められるか検証するため、成長板における *Mct10*, *Mct8*, *Lat1* の発現を検討したところ、*Mct10* は静止軟骨細胞で発現が最も高く、増殖軟骨細胞に分化すると発現は減少した。一方、*Mct8*, *Lat1* は静止軟骨細胞では発現は低く、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞に分化するにつれて発現は上昇した。

以上、①～③より、軟骨細胞分化初期には、甲状腺ホルモンに特異性の高い甲状腺ホルモントランスポーターの中では *Mct10* の発現が最も高いことが明らかとなった。軟骨に

おける主要な甲状腺ホルモン受容体 TRα1 は静止軟骨層、増殖軟骨層（分化初期）に発現するが、肥大軟骨層（分化後期）には発現しないことが知られており、軟骨細胞分化初期には *Mct10* と TRα1 が共発現していると考えられる。未分化 ATDC5 細胞は軟骨細胞分化の初期段階を反映するため、引き続き軟骨細胞における *Mct10* の機能解析を ATDC5 細胞を用いて行った。

④甲状腺ホルモン細胞内取り込みの検討

まず、①で高発現が認められた *Lat1*, *Mct10* のうちどちらが甲状腺ホルモン細胞内取り込みに寄与しているか検証するため、それぞれのトランスポーターの機能を抑制した上で甲状腺ホルモン取り込みの変化を検討したところ、*Mct10* をノックダウンした時のみ甲状腺ホルモンの細胞内取り込みの減少が認められた。したがって、*Mct10* は生理的にも分化段階初期の軟骨細胞において甲状腺ホルモントランスポーターとして機能している可能性が高いと考えられた。

⑤*Mct10* ノックダウンが甲状腺ホルモン作用に及ぼす影響の検討

甲状腺ホルモンは ATDC5 細胞において増殖抑制、分化促進作用を示すことが知られている。*Mct10* が ATDC5 において有意な甲状腺ホルモン細胞内取り込み作用を発揮しているならば、*Mct10* ノックダウンにより甲状腺ホルモン添加時に ATDC5 細胞の挙動の変化が予想された。negative control siRNA を強制発現した ATDC5 細胞では、定常状態の ATDC5 細胞と同様に甲状腺ホルモンにより細胞増殖抑制、細胞分化促進が認められたが、*Mct10* をノックダウンした ATDC5 細胞では甲状腺ホルモンによるこれらの作用は消失した。

以上①～⑤より、*Mct10* は、軟骨細胞分化初期において、甲状腺ホルモンの細胞内取り込みの大部分を担うことが示された。AHDS 患者において重症甲状腺機能低下症患者ほどの成長障害が認められないのは、少なくとも軟骨細胞分化の初期段階においては *Mct10* を介して必要最低限の甲状腺ホルモンが供給されるためと考えられた。

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3件）

- ① 難波範行, 大藪恵一. 初経前後の骨発育のサポート. *Clinical Calcium* 21(9):1315-1321, 2011. 査読無
- ② 難波範行. 骨系統疾患の分類と遺伝子異常. *Clinical Calcium* 20(8):1159-1165, 2010. 査読無
- ③ Bessho K, Etani Y, Ichimori H,

Miyoshi Y, Namba N, Yoneda A, Ooue T, Chihara T, Morii E, Aoki T, Murakami M, Mushiaki S, Ozono K. Increased type 3 iodothyronine deiodinase activity in a regrown hepatic hemangioma with consumptive hypothyroidism. Eur J Pediatr. 2010 Feb;169(2):215-221.
査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

- ① Miyoshi Y, Namba N, Tachibana M, Kiyohara Y, Ito M, Ozono K. Serum Triiodothyronine to Thyroxine Ratio in a Child with T3-Predominant Graves Disease. The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting 6/4-7/2011, Boston, USA
- ② 難波範行. 甲状腺ホルモントランスポーターと甲状腺ホルモン作用の局所制御. 第 41 回九州小児内分泌談話会: 2/5/2011, 福岡
- ③ Abe S, Namba N, Kogo M, Ozono K. Monocarboxylate Transporter 10 Mediates Thyroid Hormone Transport in Chondrocytes. 32nd Annual Meeting ASBMR 2010: 10/14-21/2010, Toronto, Canada
- ④ 阿部早苗, 難波範行, 古郷幹彦, 大藪恵一. 軟骨細胞における甲状腺ホルモントランスポーターに関する検討. 第64回日本口腔科学会学術集会: 6/24-25/2010, 札幌
- ⑤ Namba N, Abe S, Kogo M, Ozono K. Chondrocytes Express the Thyroid Hormone Transporter Monocarboxylate Transporter 10 (MCT10). The Endocrine Society's 92nd Annual Meeting 6/19-22/2010 San Diego, USA
- ⑥ Namba N. Growth in Skeletal Dysplasias. International Symposium on Pediatric Endocrinology Official ICE 2010 Satellite Symposium 4/1/2010, Tokyo
- ⑦ 阿部早苗, 難波範行, 古郷幹彦, 大藪恵一. 軟骨細胞における甲状腺ホルモントランスポーターの発現. 第 43 回日本小児内分泌学会学術集会: 10/1/2009, 宇都宮
- ⑧ 阿部早苗, 難波範行, 古郷幹彦, 大藪恵一. MCT10 は軟骨細胞の主要な甲状腺ホルモントランスポーターである. 第 27 回日本骨代謝学会学術集会: 7/23-25/2009, 大阪
- ⑨ Namba N, Mohri I, Abe S, Kitaoka T, Miura K, Hirai H, Kitai Y, Sakai N,

Taniike M, Ozono K. Monocarboxylate Transporter8 (MCT8) Expression in Oligodendrocytes May Account for the Delayed Myelination in MCT8-Deficient Patients. The Endocrine Society's 91st Annual Meeting 6/13/2009 Washington, DC, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

難波 範行 (NAMBA NORIYUKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 10379076

(2) 連携研究者

毛利 育子 (MOHRI IKUKO)

大阪大学・連合小児発達学研究所・准教授

研究者番号: 70399351

(3) 研究協力者

阿部 早苗 (ABE SANAE)

大阪大学・歯学研究科・大学院生

研究者番号: なし

藤原 誠 (FUJIWARA MAKOTO)

大阪大学・医学系研究科・大学院生

研究者番号: 50625697