

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591349

研究課題名(和文)細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白質の生理的機能多様性：炎症と低T3症候群への関与

研究課題名(英文)Physiological diversity of cytosolic T3 binding protein.: Relationship between inflammation and low T3 syndrome

研究代表者

鈴木 悟 (Suzuki, Satoru)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30222061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：1. プロモーターの恒常的活性部位をdRlh-84細胞と低発現細胞株GH3を用い、比較検討した。転写開始地点から上流200塩基から100塩基間に、結合活性が変化する部位を見出した。ここにAP-1配列があり、この配列の役割を、定量PCRを用いたCRYM遺伝子発現変化により明らかにした。文献1にまとめた。

2. 先に確立したCRYM発現細胞株を用い、甲状腺ホルモンの種々の濃度に対する、甲状腺ホルモン応答遺伝子(成長ホルモン、脱ヨード酵素1型、2型)の発現変化を経時的に解析した。この結果、同じ甲状腺ホルモン応答遺伝子であっても、発現パターンに経時的に変化がみられることが判明した。文献2にまとめた。

研究成果の概要(英文)：1. To elucidate the mechanisms of its expression, we evaluated the promoter transactivity and insulin signaling via the AP-1 site in the promoter. The results indicated that the expression of mu-crystallin was regulated through the AP-1 site in the promoter. The signals related to AP-1 activation, such as insulin signaling may have diverse effects on mu-crystallin mRNA expression.

2. To examine the precise regulation of T3-responsive genes in the presence of CRYM, we evaluated serial alterations of T3-responsive gene expression by changing pericellular T3 concentrations in the media. The results suggest that CRYM expression increases and sustains the T3 responsiveness of genes in cells, especially with alteration of the pericellular T3 concentration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：甲状腺ホルモン ホルモン輸送 細胞質 クリスタリン NADPH

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモンは生体内のエネルギー代謝に關与するホルモンである。このホルモンを肥満や生活習慣病治療薬として使用することは、糖代謝、脂質代謝を活性化し、脂肪を燃焼させ、体重減少に寄与するため、数多くの利点があるが、心血管系への負荷がその副作用として問題となっている。分子生物学的な甲状腺ホルモン作用は、核受容体にホルモンが結合し、遺伝子発現調節により、その作用を発揮すると言われている。しかしながら、ホルモン作用が分単位で発揮されることから、核受容体を介さないホルモン作用は必ず存在する。この作用はその特異性から核外のホルモン結合部位が存在することを示唆する。核外で、最も甲状腺ホルモンに親和性の高い蛋白質は細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白(別名μクリスタリン:CRYM)と呼ばれる蛋白である(Suzuki S, et al. Trends Endocrinol Metab 2007)。

2. 研究の目的

細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白(CRYM)の生理的役割とこの蛋白を介した甲状腺ホルモン輸送機構を、既に独自に確立した恒常的にCRYM発現調節できる細胞(Mori,Suzuki, Endocrinology 2002)、特異抗体(Suzuki Eur J Endocrinol 2003)、遺伝子改変ノックアウトマウス(Suzuki Mol Endocrinol 2007)を用い解明する。特に、炎症やそれに伴う低T3症候群での甲状腺ホルモンとCRYMの役割を解析する。

1. 甲状腺ホルモン結合活性の細胞レベルでの細胞内輸送に対する役割について
2. 細胞内でのCRYMトランスロケーションの解明
3. in vivoでの甲状腺機能低下、亢進状態、炎症、酸化モデルでのCRYMの役割

について

3. 研究の方法

CRYMの細胞内でのT3輸送に関するメカニズムとin vivoでのCRYMの役割を明らかにするため、下記計画を平行で進行させる。..は細胞内実験、..は動物実験である。

.CRYM発現調節細胞を用いた酸化還元状態における甲状腺応答遺伝子の反応様式の解明

.CRYM特異的抗体を用いた細胞内でのCRYMトランスロケーションの解明

.ノックアウトマウスを用いた甲状腺機能低下、亢進状態、酸化還元モデルでの表現型の解析

4. 研究成果

初めに、甲状腺ホルモン結合活性の細胞内輸送に対する役割について、以下の二つの方法でアプローチした。

1. CRYMプロモーターの単離と、結合活性の評価
2. CRYM発現細胞とその親株であるGH3細胞を用いた、甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現変化の定量的解析

1. プロモーターの恒常的活性部位をCRYM高発現株dRLh-84細胞と低発現細胞株GH3を用い、比較検討した。転写開始地点から上流200塩基から100塩基までの間に、結合活性が変化する部位を見出した。ここにAP-1配列があり、この配列の役割を、定量PCRを用いたCRYM遺伝子発現変化により明らかにした。結果を文献1にまとめた。

2. 先に確立したCRYM発現細胞株を用

い、甲状腺ホルモンの種々の濃度に対する、甲状腺ホルモン応答遺伝子（成長ホルモン、脱ヨード酵素1型、2型）の発現変化を経時的に解析した。この結果、同じ甲状腺ホルモン応答遺伝子であっても、発現パターンに経時的に変化がみられることが判明した。このことから、甲状腺ホルモン濃度変化に対する遺伝子反応は、CRYMにより特異的にコントロールされていると考えられた。結果を文献2にまとめた。

次に炎症に対する vivo における役割について、ノックアウトマウスを使用し解析した。最初に、野生型 C57BL6 における、感染、炎症モデルとしてのリポポリサッカライド（LPS）に対する CRYM 発現変化につき、心臓を用い解析した。結果、炎症により、CRYM 発現は先の網膜同様上昇することが判明した。この場合、血清 FT3 濃度は減少した。次に、同様の実験をノックアウトマウスで施行した。LPS 投与前後で FT3 に変化を認めなかった。CRYM 消失により、血清 T3 の減少が消失したことから、感染による T3 の定価には、CRYM が関与している可能性が示唆された。

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 2 件)

1. Suzuki S, Nishio SI, Ishii H, Sekido T, Takeshige K, Ohkubo Y, Hiwatashi D, Takeda T, Komatsu M. Possible Roles of the AP-1 Site in the Cytosolic T3 Binding Protein Promoter and Insights into its Physiological Significance. *Horm Metab Res.* 45: 501-506 2013
2. Takeshige K, Sekido T, Kitahara JI, Ohkubo Y, Hiwatashi D, Ishii H, Nishio SI, Takeda T, Komatsu M, Suzuki S Cytosolic T3-binding protein modulates dynamic alteration of T3-mediated gene expression in cells. *Endocr J* 2014,

Mar 20 Epau ahead of print

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 鈴木悟、西尾真一、武田貞二、駒津光久 糖尿病における細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白質（CRYM）の発現について 第53回糖尿病学会 平成23年5月19-21日 札幌
2. 鈴木悟、西尾真一、武田貞二、駒津光久 数理モデルを用いた年齢依存性甲状腺ホルモン抵抗性について 第53回老年医学会 平成23年6月15-17日 東京
3. 鈴木悟、西尾真一、石井宏明、武田貞二、駒津光久 男性において、甲状腺ホルモン抵抗性は加齢により軽減する。第54回日本甲状腺学会学術集会 平成23年11月21-23日 名古屋
4. 鈴木悟、西尾真一、武田貞二、駒津光久 糖尿病における細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白質（CRYM）の発現変化について 第85回日本内分泌学会学術総会 名古屋 平成24年4月19日-21日
5. 武田貞二、西尾真一、山崎雅則、鈴木悟、駒津光久 カーボンナノチューブと組み換えアデノウイルスを用いた未分化甲状腺癌に対する遺伝子治療 第85回日本内分泌学会学術総会 名古屋 平成24年4月19日-21日
6. 関戸貴志、大久保洋輔、竹重恵子、樋渡大、石井宏明、西尾真一、武田貞二、鈴木悟、駒津光久 糖尿病における細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白質（CRYM）の発現変化について 第55回日本甲状腺学会 福岡 平成24年11月29日—12月1日
7. 竹重恵子、関戸貴志、大久保洋輔、樋渡大、石井宏明、西尾真一、武田貞二、鈴木悟、駒津光久 細胞質甲状腺ホルモン結合蛋白質（CRYM）による甲状腺ホルモ

ン応答遺伝子発現様式の細胞レベルでの
変化について 第55回日本甲状腺学会
福岡 平成24年11月29日—12月
1日

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木悟 (SUZUKI, Satoru)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：30222061

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：