

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06902

研究課題名(和文)臓器特異的な甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の発現調節因子の探索と機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism in organ-specific regulation of thyroid hormone deiodinase

研究代表者

坂根 依利子(Sakane, Yoriko)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：70781342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓に多く発現する核内受容体であるLXRはヒト甲状腺ホルモン脱ヨード酵素1型の転写調節を行い、プロモーター領域のLXR結合部位では、甲状腺ホルモン受容体とのクロストークが行われていることが分かった。また、成長ホルモンが甲状腺ホルモン血中濃度を調節しており、各種細胞株に対する投与実験から、甲状腺由来細胞株においてのみヒト甲状腺ホルモン脱ヨード酵素2型が増加することを明らかにした。これら2つの研究成果を論文として報告した。また、新規の調節因子の探索のために、プロモーターアッセイを応用した新たな検出系を構築し、化合物ライブラリーによるスクリーニングを開始し、現在解析中である。

研究成果の概要(英文)：Based on our progress last year, we published two articles. In one article, we demonstrated that LXR which was expressed mainly in the liver regulated the transcription of thyroid hormone deiodinase type 1 (D1) and also demonstrated the crosstalk between LXR and thyroid hormone receptor on the promoter region of human D1 gene. In the other article, we demonstrated that growth hormone regulated the concentration of thyroid hormone levels and only in thyroid cell lines, growth hormone increased the activity of thyroid hormone deiodinase type 2. In addition, to investigate novel regulators of the activity of thyroid hormone deiodinases we started to establish new promoter assay system using chemical library.

研究分野：内分泌

キーワード：甲状腺ホルモン脱ヨード酵素 甲状腺ホルモン 化合物ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモン (TH) は下垂体より分泌される甲状腺刺激ホルモン (TSH) により、甲状腺から分泌される。TH の作用は、個体の発生、組織分化、中枢神経系の発達・維持、脂肪や骨格筋でのエネルギー代謝、肝臓での脂質代謝、骨代謝など様々な作用を有する。しかし TH の作用過剰は神経発達障害、心悸亢進、骨粗鬆症などの有害な事象を起こしうる。

甲状腺から分泌される TH の約 80% が作用活性の低いサイロキシン (T4) で、残りの約 20% が活性の高いトリヨードサイロニン (T3) である。甲状腺から分泌された TH は血管を通り、TH 輸送担体を通じて、標的臓器・細胞に入り、核内の甲状腺ホルモン受容体 (TR) に結合することで様々な遺伝子の発現調節を行う (左図: Dayan, C. M et al., *Nat. Rev. Endocrinol.* 2009)。細胞内で TR と結合し生理活性を発揮するのは主に T3 であり、したがって、T3 の細胞内での濃度は重要である。細胞内の T3 は血中からも移行するが、大半が細胞内で T4 から T3 へと代謝されることで維持される。この細胞内の T3 濃度の調節に必要なのが甲状腺ホルモン脱ヨード酵素 (以下、脱ヨード酵素) である。脱ヨード酵素には、1 型 (D1)、2 型 (D2)、3 型 (D3) とあり、D1 は肝臓、腎臓に主に発現し TH の活性化 (T4 → T3) と不活化 (T3 → rT3) を、D2 は中枢神経系、下垂体、心臓、脂肪組織、骨格筋などに発現し TH の活性化を行い、D3 は神経細胞や胎盤に多く発現し TH の不活化を行う (Bianco AC et al., *Endocr Rev.* 2002)。

上記の TH 代謝経路のうち、1) TH の細胞内への輸送担体、2) TR サブタイプ、3) 脱ヨード酵素の発現・調節に臓器関連性 (特異性) があり、その異常により一個体内で臓器特異的な TH 作用の不足、あるいは過剰を生じることが考えられる。すなわち、疾患例として 1) に関連しては、X 連鎖性遺伝形式をとり、重度の精神遅滞、乳児期の筋緊張低下、全身の

筋力低下、発作性または運動誘発性ジスキネジアを伴うジストニー運動を特徴とする Allan-Herndon-Dudley 症候群がある。本疾患は脳への TH 輸送担体となる Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8) の遺伝子異常により起こり、脳内では TH 作用不足の状態となるが、下垂体では TH 作用不足により下垂体への TH によるネガティブフィードバックがかからず TSH 分泌が増加する。それに伴い血清 TH が上昇するため、末梢では TH 作用過剰状態となることが報告されている (Charles E. Showartz et al., *Am J Hum Genet.* 2005)。2) に関連しては、甲状腺ホルモン不応症 (RTH) がある。TR には TR α 型と β 型の 2 つのサブタイプがあり、臓器により分布が異なる。RTH は TR をコードする遺伝子 (*THRA* あるいは *THRB*) の異常により起こるが、TR β 遺伝子異常が多い。正常な下垂体は TR β を発現するが、異常 TR β を発現する下垂体ではネガティブフィードバックが適切に働かず TSH が上昇、それに伴い血清 TH が上昇することで、正常 TR α を多く発現する心臓で TH 作用が過剰となり動悸や心不全を起こす。さらに、異常 TR β を発現する内耳では TH 作用不足で聴覚障害を起こすこともある (Ortiga-Carvalho TM et al., *Nat Rev Endocrinol.* 2014)。3) に関連する疾患の報告は未だなく、各脱ヨード酵素遺伝子の Single nucleotide polymorphism (SNP) と耐糖能異常や双極性障害などとの相関を示唆する報告はあるが、未だ一致した見解はない (Verloop H et al., *Eur J Endocrinol.* 2014)。これらの病態は各臓器毎に、1) TH 輸送担体、2) TR サブタイプ、3) 脱ヨード酵素の分布に特徴があるために起こるものであり、臓器により TH 作用が異なるモデルと考えられる。そして、これらの因子を調節することができれば、臓器特異的な TH 作用の調節を可能にすることが期待できる。これまでに、2) TR サブタイプ、特に TR β 型の選択的アゴニストとして sobetirome

などの薬剤開発が進められてきたが、未だ実用化に至っていない。また、1)や3)を利用した薬剤開発の報告はない。申請者らはこれまで、THの脂質代謝改善作用に注目し、肝臓特異的にD1を増加させTHを活性化することで、心悸亢進や骨粗鬆症などの有害作用を避け、脂質代謝のみを改善させる因子を追究し、肝臓特異的にD1遺伝子の発現を調節する因子、forkhead box (FOX) A1, FOXA2, upstream stimulatory factor (USF)を同定し、これら転写因子が相互作用しながらD1遺伝子のプロモーター領域に結合しD1遺伝子の発現を調節することを示した(Kanamoto N, Tagami T, Ueda-Sakane Y et al., *Endocrinology*. 2012)。これは、肝臓特異的にTHの代謝を調節し、脂質代謝を改善させる可能性のある創薬の基盤となり得る結果である。本研究ではこれまでの成果をさらに発展させて、臓器特異的なTH作用の調節機序を解明し、それらを介したより広範な認知機能や代謝改善への創薬の基盤構築を目指す。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに *in vitro* の実験系において肝臓でD1遺伝子の発現・調節を行う因子を同定した。本研究では、脱ヨード酵素1型に加え2型、3型に関しても広く臓器特異的な脱ヨード酵素の調節機序を解明し、それに基づいた薬剤開発の基盤構築を行う。

具体的には、以下の方法により各項目を明らかにする

臓器特異的に脱ヨード酵素の発現・調節を行うプロモーター領域の解析

臓器特異的に脱ヨード酵素の発現・調節を行う新規因子または化合物の探索

新因子の生体内での脱ヨード調節効果の解析

3. 研究の方法

臓器特異的に脱ヨード酵素の発現・調節

を行うプロモーター領域の解析

脳神経細胞株(human neuroblastoma cell line)、グリア細胞株(human H4 glioma cells)、褐色脂肪株(human HAdpc-28-E6E7-TERT)、骨格筋細胞株(rat L6)、肝細胞株(human HepG2)、腎細胞株(human TSA 201)、皮膚細胞株(human SF-TY)、骨芽細胞株(mouse KUSA-A1)の安定した細胞培養条件を確立する。各細胞株のRNA抽出とreverse transcriptionによりcDNAを作成し、各脱ヨード酵素の発現をReal-time PCRで定量するとともに、酵素活性を調べ、どの脱ヨード酵素(D1, D2, D3)を主に発現しているかで細胞株を分類する(D1発現臓器モデル、D2発現臓器モデル、D3発現臓器モデルとする)。そして、申請者がいままで行ってきた脱ヨード酵素のプロモーターアッセイ系を用いて、各脱ヨード酵素発現臓器モデルにおいて脱ヨード酵素遺伝子のプロモーターアッセイを行い、臓器特異的にプロモーター活性を調節する領域を同定する。

D1遺伝子のプロモーターアッセイに用いるコンストラクトは確立したものを保有しており、D2, D3のコンストラクトについても本研究期間内に作成する。

臓器特異的に脱ヨード酵素の発現・調節を行う新規因子または化合物の探索

プロモーター内において同定した責任領域に対して、JASPER database (Mathelier A et al., *Nucleic Acids Res*. 2014)などのdatabaseを用いることで、putativeな転写因子の結合領域と転写因子の探索を行うとともに、同領域にタンパクが実際に結合することをゲルシフトアッセイで確認する。また、これと並行して、京都大学大学院医学研究科医学研究支援センター 創薬拠点コアラボ (<http://support-center.med.kyoto-u.ac.jp/SupportCenter/>)の支援を得て、プロモーターアッセイ系に化合物ライブラリーを

添加することで、より効率よくプロモーター活性を上げる化合物の探索を行い、候補化合物を得る。

プロモーター内の責任領域に結合する転写因子を同定できない場合は、ゲルシフトアッセイの DNA/タンパク質結合反応系をスケールアップした条件下で、magnetic beads を用いた streptavidin-mediated DNA/protein pull down assay (Jutras BL et al., *Curr Protoc Microbiol.* 2012) を行い、候補タンパクを抽出し、LC-MS/MS による解析を行う。Streptavidin-mediated DNA/protein pull down assay では、高純度の streptavidin を共有結合した磁気ビーズを用いる。Streptavidin と強い親和性のある biotin で末端を修飾した合成オリゴヌクレオチド(目的配列を有するオリゴヌクレオチド)と目的タンパク質を含む核抽出物、及び磁気ビーズを反応させることで、磁気ビーズに streptavidin-biotin を介した DNA/タンパク質の複合体を形成させる。その後、高い塩濃度をもつ溶液でオリゴヌクレオチドに結合した目的タンパク質を溶出する。

上記実験より得た候補タンパク質を細胞内で強発現させる、あるいは候補化合物を添加することにより、脱ヨード酵素の活性の変化を評価し、既知の TH 反応性の遺伝子群の変化を real-time PCR で定量する。脱ヨード酵素自体の発現・活性、及びその TH 標的遺伝子群が変化することで、臓器特異的に TH 作用を調節する候補タンパク質、あるいは候補化合物をさらに厳選することが可能である。

さらに、脱ヨード酵素の活性変化、あるいは TH 反応性の遺伝子群の変化を認めなくとも、転写翻訳後に脱ヨード酵素の代謝が変化する可能性がある。そのため、例えば D2 に関しては、翻訳後修飾によるユビキチン化による修飾が指摘されているため(Werneck de Castro JP et al., *J Clin Invest.* 2015)、

ユビキチン活性化酵素 UBC6 や UBE2G1、あるいはユビキチンリガーゼである the hedgehog-inducible WSB-1 や TEB4 などの酵素に関しても評価する。D3 に関しては、シグナルによりエンドゾーム内にとりこまれその酵素活性を下げるのがわかっており (Baqui M et al., *J Biol Chem.* 2003)、局在変化による酵素活性の変化に関しても、GFP 修飾 D3 タンパクの作成を考慮し、蛍光顕微鏡下で局在変化を調べるなど準備を行う。

また、各脱ヨード酵素活性に関連して他分子が関与していることが予測される場合、候補因子を用い、マイクロアレイによる関連分子の探索を行う。

新規因子の生体内での脱ヨード調節効果の解析

マウスへの薬剤投与実験を行い、脳、褐色脂肪織、骨格筋、肝臓、腎臓、皮膚、骨での脱ヨード酵素遺伝子の発現変化を観察し、各組織における TH 濃度の評価、血清の生化学所見を薬剤非投与群と比較し解析を行う。

4. 研究成果

今回の研究期間内においては、これまでに得た知見を活かして検討を進めた。その結果、肝臓において多く発現する核内受容体である LXR はヒト甲状腺ホルモン脱ヨード酵素1型 (D1) の転写調節を行い、プロモーター領域における LXR の結合部位では、甲状腺ホルモン受容体とのクロストークが行われていること、及び、成長ホルモンが甲状腺ホルモン血中濃度を調節しており、各種細胞株に対する投与実験を行ったところ、甲状腺由来細胞株においてのみヒト甲状腺ホルモン脱ヨード酵素2型 (D2) が増加することを明らかにし、2報の論文報告を行った。

また、新規の調節因子の探索のために、化合物ライブラリーによるスクリーニングを開始した。甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の領域

では、性能の良い特異抗体がなく、酵素活性の測定もラジオアイソトープやカラム処理を要するなど、ハイスループットな検出が困難であった。そこで、プロモーターアッセイを応用した新たな検出系を構築した。具体的には、ヒト甲状腺ホルモン脱ヨード酵素のプロモーターをクローニングし、下流にレポーターとして高い発光強度と安定性を有する NanoLuc[®];ルシフェラーゼを用い、384ウェルプレートと少ない試薬量で十分に検出できる、ランニングコストと安定性に優れた系である。トランスフェクション効率が高いヒト由来細胞株であるHEK293Tを用い、細胞播種・化合物分注などいずれの工程においても種々の分注器を使用し、誤差を可能な限り小さくした。今研究期間内に、ヒトD2のスクリーニングは終了しており、再現性・濃度依存性を確認し、複数のヒット化合物を得た。今回使用したのは臨床応用されている薬剤のライブラリーであり、各化合物についての基礎・臨床の豊富な知見を活かして、現在メカニズムの解析しているところである。

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)

坂根 依利子、金本 巨哲、山内 一郎、田上 哲也、森田 雄介、三浦 晶子、曾根 正勝、八十田 明宏、木村 剛、中尾 一和、稲垣 暢也

PLoS One. 査読有、2017;12:e0179213

山内 一郎、坂根 依利子、廣田 圭昭、植田 洋平、金井 有吾、山下 唯、近藤 絵里、藤井 寿人、田浦 大輔、曾根 正勝、八十田 明宏、稲垣 暢也

Endocrine. 査読有、2018 ;59:353-363

[学会発表](計0件)

[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

坂根 依利子 (SAKANE, Yoriko)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号: 70781342

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

山内 一郎 (YAMAUCHI, Ichiro)