

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08990

研究課題名(和文) 甲状腺濾胞内Tgによる濾胞機能feedback調節機構の解明と臨床的意義の検討

研究課題名(英文) Studies on negative feedback regulation of follicular function by follicular Tg and its clinical relevance

研究代表者

石藤 雄子 (Ishido, Yuko)

帝京大学・医療技術学部・研究員

研究者番号：90772997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺濾胞内に高濃度に蓄積されているホルモン前駆体であるサイログロブリンは、ホルモン合成に必要な遺伝子や、合成に利用されなかったヨードの再利用に必要な遺伝子などの発現を抑制するが、ホルモンの分泌過程に必要な遺伝子発現を誘導することを明らかにした。すなわち、濾胞内に蓄積するサイログロブリンは、ホルモン合成という内向きのベクトルと、分泌という外向きのベクトル輸送に関わるそれぞれのステップを濃度依存性に自己調節することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、甲状腺濾胞内に蓄えられたサイログロブリンが、下垂体から分泌される甲状腺刺激ホルモンの働きに拮抗して、ホルモンの合成や分泌を調節することが明らかとなった。甲状腺機能亢進症や低下症の中にはその原因が不明のものも多いが、このような強力な自己調節機構どこかが破綻することが発症の引き金となる可能性が示唆された。さらに研究を進める事により、そのような破綻を検出し修復するという新たな診断法や治療法の開発に結びつくことが期待された。

研究成果の概要(英文)：Thyroglobulin, a precursor of thyroid hormone accumulated in the thyroid follicles, downregulates gene expressions required for hormone synthesis and recycling of unused iodide, while it enhances gene expressions necessary for hormone secretion. Therefore, it is suggested that thyroglobulin stored in the follicle is an autocrine regulator of the thyroid function including of each step of hormone synthesis, an inward vector, and secretion, an outward vector.

研究分野：内分泌学

キーワード：甲状腺 サイログロブリン ヨード

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺は一層の濾胞上皮細胞で取り囲まれた濾胞と呼ばれる特有の構造を持っているが、甲状腺においてこの濾胞構造が最小機能単位としてホルモン合成を行っている。ヨード取り込み量やホルモン合成能、分泌能はそれぞれの濾胞ごとに均一ではなく、形態学者の間では follicular heterogeneity と呼ばれていたが、この理由については全く不明であった。我々は濾胞内に蓄積する甲状腺ホルモン前駆体であるサイログロブリン(Tg)が、ホルモン合成に必要な遺伝子発現を TSH に拮抗して転写レベルで強力に抑制することを報告してきた。さらにラット甲状腺組織切片上において、Tg 遺伝子自身の mRNA とタンパク質発現や、放射性ヨード輸送をそれぞれ *in situ* hybridization、免疫染色、<sup>125</sup>I 投与後 autoradiography で評価すると、それらの量は濾胞内 Tg の蓄積量に反比例することなどを明らかにしてきた。すなわち、濾胞ごとの機能状態は、それぞれの濾胞に蓄積する Tg の濃度依存性 negative feedback 機構によって、極めて合理的に自己調節を受けていることが明らかとなり、Tg が follicular heterogeneity を形成する一つの要因であることを示してきた。

このように、濾胞内濃度の Tg は TSH の作用を完全に打ち消すほど強力な生理活性を持っており、ホルモンの合成、濾胞内へのヨード輸送、Tg 上へのヨードの有機化等の、甲状腺ホルモン合成の各ステップを抑制するが、ホルモンの分泌やヨードの再利用などについても Tg による調節機構が働いているか全く不明であった。

また、強力な生理活性物質である Tg が影響を与える遺伝子に変異が生じると甲状腺の機能が障害されることが容易に想像される。これらの Tg 調節性甲状腺機能遺伝子を解明することで、未だ明らかとなっていない多くの甲状腺機能異常症の病因となっている可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では Tg の持つ強力な生理活性作用の詳細を明らかにするとともに、未だ明らかとなっていない甲状腺機能異常症の病因候補分子を同定することを目的として研究を行った。具体的には、濾胞内の Tg が調節する甲状腺機能遺伝子は、ホルモン合成だけでなくその分泌や有機化されたヨードの再利用など様々なステップを調節すると考えられる。これまでに明らかにしてきた Tg によって発現が変動する遺伝子群は、いずれも甲状腺ホルモンの生合成や分泌に密接に関与するものに限られていた。

したがって、Tg によって発現が変動する遺伝子を解析することによって、これまで知られていなかった、甲状腺機能に関与する因子を明らかに出来る可能性がある。すなわち、甲状腺ホルモンの合成や分泌に関わるそれぞれのステップにおける Tg の調節機構を明らかにすることは、真の甲状腺濾胞調節機構が解明につながると期待される。また、甲状腺ホルモンの生合成や分泌に関わる多数の遺伝子において、その異常が甲状腺機能低下症などの原因として同定されているが、我々のこれまでの研究成果は、それらの遺伝子の多くは濾胞内 Tg による遺伝子発現調節機構の制御下にあることを示してきた。これらの事実は、濾胞内 Tg による発現制御を受けている甲状腺遺伝子の全体像を明らかにすることで、甲状腺機能異常症の未知の原因遺伝子候補を提示することが出来る可能性を示しており、それによって原因遺伝子のスクリーニングに有用な情報を提供することができる。

### 3. 研究の方法

ラット甲状腺 FRTL-5 細胞の培養液中に種々の濾胞内濃度 Tg を添加し、経時的に mRNA を調製して DNA マイクロアレイによる網羅的解析を既に行っている。そのデータを再解析して、変動が大きかった遺伝子のうち甲状腺ホルモン合成や分泌に関係がある可能性のある遺伝子を選び出した。今回の検討では、それらの中で、リソソーム酵素である cathepsin H、脱ヨード化酵素 Dehal1、新規ヨード輸送体として同定された Slc26a7 の発現に対する Tg の役割について解析を行った。具体的には FRTL-5 の培養液中に種々の濾胞内濃度の Tg を添加し、経時的に mRNA やタンパク質を調製し Real-time PCR、Western blotting、および免疫蛍光染色などを用いて解析を行った。

(1) Cathepsin H はリソソーム内に局在する加水分解酵素であり、コロイドから再吸収された Tg を分解し甲状腺ホルモンを遊離する分子の一つである。リソソーム中に存在する Cathepsin H の Tg を分解する詳細な過程を明らかにするため、FRTL-5 細胞を用いて Tg とリソソームマーカーである Lyso Tracker、Cathepsin H を免疫染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡によって解析した。また、Tg を添加して培養後の FRTL-5 細胞から抽出したタンパク質を用いて Cathepsin H 活性を経時的に測定することによって、Tg が濾胞細胞内に再吸収され、ホルモン前駆体である Tg の加水分解にどのような影響を与えているのか評価した。

(2) Dehal1 はエーテル結合による甲状腺ホルモン合成に利用されなかった MIT および DIT を還元的に脱ハロゲン化し、ヨードを再利用する働きを持つ酵素である。Tg が細胞内へエンドサイトーシスによって取り込まれ、リソソーム中で Cathepsin H などによって加水分解を受ける際に、甲状腺ホルモンとして利用されなかった MIT と DIT が Dehal1 によって分解を受け、ヨウ素が再利用されると考えられている。そのため、リソソームと Dehal1 が共同在しているか明らかにするため、FRTL-5 細胞を用いて Tg 添加培養後の細胞免疫蛍光染色を行い、Tg を添加した後新しく形成されるリソソーム中の Dehal1 発現を解析した。

(3) 濾胞上皮内腔側膜に局在し細胞内のヨードを濾胞内へ輸送する新たなヨード輸送体とし

て Slc26a7 が最近同定されたが、その発現調節機構は未知のままであった。Slc26a7 が Tg による発現調節を受けていれば、甲状腺ホルモン合成に重要な働きを持っていると推測することが可能であることから、その発現を real-time PCR や Western blotting で解析するとともに、マウス甲状腺の組織切片を用いて Slc26a7 と Tg を免疫蛍光二重染色して、Tg が与える影響について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 甲状腺ホルモン分泌に関わるリソソーム酵素の Cathepsin H は、real-time PCR や Western blotting によって、濾胞内 Tg の濃度や時間依存性に、遺伝子およびタンパク質発現が増加することが明らかとなった。Tg がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、新しく形成されたリソソーム中に Cathepsin H の translocation を誘導することを明らかにした。また、Tg 添加培養後の FRTL-5 細胞から抽出されたタンパク質で Cathepsin H 活性を測定した結果、濾胞内 Tg によって酵素活性が亢進することを示した。甲状腺細胞には Cathepsin B と D が発現しているが、上記のいずれの作用も見られず、Tg は Cathepsin H に特異的に作用することも明らかになった。

(2) 甲状腺ホルモンに利用されなかった MIT および DIT から脱ヨード反応によってヨードを遊離して再利用するための酵素である Dehal1 は濾胞内 Tg によって遺伝子発現が低下することを real-time PCR によって明らかにした。また、FRTL-5 の培養液中に濾胞内濃度の Tg 添加すると、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた MIT や DIT を含む Tg は、新たに形成されたリソソーム中に Dehal1 とともに局在することを免疫蛍光染色によって明らかにした。

(3) 甲状腺ホルモン合成に関わる濾胞上皮細胞内腔側に局在する新規ヨード輸送体 Slc26a7 は、real-time PCR や Western blotting によって濾胞内 Tg の濃度や時間依存性に遺伝子およびタンパク質の発現が低下することを明らかにした。また、ラット甲状腺組織切片を用いた免疫蛍光二重染色では、Tg の蓄積が乏しい濾胞では Slc26a7 の発現が強く、逆に高濃度の Tg が蓄積する濾胞では Slc26a7 の発現が抑制されていることを明らかにした。

以上の結果より、本研究では、新たに3つの遺伝子発現や細胞内局在などについて詳細な解析を行い、Tg が甲状腺濾胞における甲状腺ホルモン合成から分泌、ヨードの再利用などの様々な過程を調節していることを再確認した。最小機能単位であるある濾胞において濾胞内に蓄積する Tg 濃度が増加すると、Tg が持つ negative feedback 調節機構により、その濾胞ではそれ以上のホルモン合成が抑制される。そのような濾胞は、ホルモン前駆体を蓄積するとともに必要に応じて分泌をおこなうのに都合の良い高濃度の Tg を蓄えている。濾胞内 Tg は、これまでに報告したホルモン分泌に関わる遺伝子と同様に、Tg の加水分解に必要な cathepsin H の発現と機能を誘導することによって、効率良くホルモン分泌をおこなう。

本研究によって明らかとなった知見は、甲状腺内分泌学の発展に寄与し、未だ明らかとなっていない Tg 調節機構の破綻による甲状腺機能異常症の病因に解明に寄与すると考えられる。それとともに、そのような異常の早期診断のための新たな臨床検査法の開発や、Tg 調節機構を分子標的とした新たな甲状腺機能異常症治療法の開発のための基盤となることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 川島晃、吉原彩、鈴木幸一	4. 巻 73
2. 論文標題 自己免疫性甲状腺疾患 - その分子機構 -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 657-661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 鈴木幸一、林もゆる	4. 巻 47
2. 論文標題 甲状腺ホルモン合成・分泌制御の分子制御機構 濾胞内サイログロブリンによる濾胞機能制御機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 内分泌・糖尿病・代謝内科	6. 最初と最後の頁 129-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 鈴木幸一、鈴木俊幸	4. 巻 1
2. 論文標題 Pendred症候群	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床 別冊	6. 最初と最後の頁 385-387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oda K, Luo Y, Sekihata K, Usukura K, Yoshihara A, Sue M, Ishido Y, Hiroi N, Hirose T, Suzuki K.	4. 巻 483
2. 論文標題 Follicular thyroglobulin (Tg) induces cathepsin H expression and activity in the thyrocytes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 541-546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.12.109.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川島晃、Yuqian、Chen Fei、木村博昭、石藤雄子、鈴木幸一
2. 発表標題 甲状腺細胞の自然免疫活性化が誘導する細胞死機構の解明
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牟禮優菜、川島晃、鈴木幸一
2. 発表標題 自然免疫活性化甲状腺細胞死誘導機構の解明
3. 学会等名 第13回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷村優太、川島晃、丸山航平、石藤雄子、近藤哲夫、加藤良平、鈴木幸一
2. 発表標題 濾胞内サイログロブリンはinhibitor of DNA-binding protein (ID)発現を抑制し甲状腺内分泌機能を制御する
3. 学会等名 第61回日本甲状腺学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenzaburo Oda, Yuqian Luo, Aya Yoshihara, Yuko Ishido, Kengo Sekihata, Kensei Usukura, Mariko Sue, Naoki Hiroi, Takahisa Hirose, Koichi Suzuki.
2. 発表標題 Follicular thyroglobulin induces cathepsin H expression and activity in the thyrocytes.
3. 学会等名 99th Annual Meeting and Expo of the Endocrine Society (ENDO 2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuqian Luo, Takeshi Akama, Akiko Okayama, Yuko Ishido, Hisashi Hirano, and Koichi Suzuki.
2. 発表標題 A novel role for flotillin-containing lipid rafts in negative-feedback regulation of thyroid-specific gene expression by thyroglobulin.
3. 学会等名 99th Annual Meeting and Expo of the Endocrine Society (ENDO 2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白倉健世、吉原 彩、Yuqian Luo、小田健三郎、石藤雄子、廣井直樹、鈴木幸一
2. 発表標題 ヨード再利用に関わる脱ヨード酵素Dehal1の甲状腺細胞における発現調節機構。
3. 学会等名 第33回甲状腺病態生理研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小田健三郎、Luo Yuqian、吉原彩、石藤雄子、関端健吾、白倉健世、廣井直樹、弘世貴久、鈴木幸一
2. 発表標題 濾胞内サイログロブリンは甲状腺細胞におけるカテプシンHの発現および活性を誘導する
3. 学会等名 第33回甲状腺病態生理研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	鈴木 幸一  (Suzuki Koichi)  (20206478)	帝京大学・医療技術学部・教授    (32643)	

