

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07875

研究課題名(和文) 甲状腺疾患の病因解明に向けた濾胞内Tgによる濾胞機能調節シグナル伝達経路の同定

研究課題名(英文) Identification of signaling pathways regulating follicular function by follicular Tg to elucidate the pathogenesis of thyroid diseases

研究代表者

鈴木 幸一 (Suzuki, Koichi)

帝京大学・医療技術学部・教授

研究者番号：20206478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺における最小機能単位である濾胞内に蓄積するホルモン前駆体サイログロブリンは、濃度依存性ネガティブフィードバック機構で濾胞ごとの機能状態をTSHの作用に拮抗して制御している。今回の検討により、Tgの作用機構はTSH受容体下流のシグナルを直接阻害するのではなく、その他の経路を介してホルモン合成に必要な遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。また、Tgは最近同定された新規ヨード輸送体SLC26A7の発現量および細胞膜局在を抑制することによって、濾胞ごとにおけるホルモン合成能を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺濾胞内に蓄積するサイログロブリンは、下垂体から分泌される甲状腺刺激ホルモン(TSH)の作用を強力に阻害する。本研究によって、その作用は予測されたTSH受容体下流のシグナルを直接阻害するのではなく、未知の経路を介することが明らかとなった。Tg作用の異常は甲状腺機能異常に直結すると考えられることから、そのような異常の新たな診断法や治療法の開発に展開できることが期待された。

研究成果の概要(英文)：Thyroglobulin, a precursor of thyroid hormone accumulated in the thyroid follicles, completely reverse the ability of TSH to induce thyroid hormone synthesis by an autocrine negative-feedback action. We have shown that Tg does not directly inhibit signaling downstream of the TSH receptor, but regulates the expression of genes required for hormone synthesis through other pathways. In addition, we showed that the expression level and membrane localization of novel apical iodide transporter SLC26A7 are down-regulated by follicular concentration of Tg, suggesting that the function of individual follicles is tightly regulated by the level of Tg accumulated in the follicle.

研究分野：内分泌学、分子細胞生物学、病理学

キーワード：甲状腺 サイログロブリン 細胞内シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺機能は、下垂体前葉から分泌される甲状腺刺激ホルモン (TSH) によって主に制御されていると理解されてきた。しかし申請者等は、甲状腺の最小機能単位である個々の濾胞におけるホルモン合成に関わる一連の遺伝子発現が、各濾胞内に蓄積するサイログロブリン (Tg) の濃度依存性ネガティブフィードバック機構により転写レベルで抑制されることを明らかにしてきた。すなわち、培養ラット甲状腺 FRTL-5 細胞におけるホルモン合成に関わる遺伝子発現は、添加した Tg の濃度依存性に抑制されることを明らかにし、甲状腺組織切片において Tg 遺伝子自身の mRNA とタンパク質の発現、放射性ヨード輸送を *in situ* hybridization, 免疫染色、autoradiography でそれぞれ評価すると、いずれの量も濾胞内の Tg 蓄積量に反比例した。逆に、コロイドの再吸収・加水分解・血中への分泌に関わる遺伝子発現は、Tg により誘導されることを示した。また、このような Tg の作用は甲状腺ホルモン合成に関わる遺伝子に特異的であることを示し、同様の作用を甲状腺乳頭癌手術時に得られた腫瘍周囲の正常部ヒト甲状腺初代培養細胞でも確認した。これらのことから、濾胞ごとの機能状態は、各濾胞内 Tg の濃度依存性ネガティブフィードバック機構によって、極めて合理的な autocrine 調節を受けていることが明らかになった (図 1)。

以上により、Tg は TSH によって誘導される甲状腺機能遺伝子の発現を完全に打ち消すほど強力な作用を有することから、Tg の作用経路の機能が不全状態になると持続的な甲状腺機能亢進状態が起こり、逆に経路上のどこかに過剰活性化するような異常が起こると機能低下状態に陥ることが考えられた。しかし、濾胞内 Tg が濾胞上皮細胞にどのようなシグナル伝達経路を介してそのような強力な作用を発揮するか未だ不明である。また、強力な生理作用を持つ Tg が制御する甲状腺機能遺伝子に変異が生じることで甲状腺機能に影響を与えることは容易に想定され、Tg が制御する新たな甲状腺機能遺伝子を同定することで、未だ明らかとなっていない甲状腺機能異常症の病因が明らかとなる可能性が考えられた。

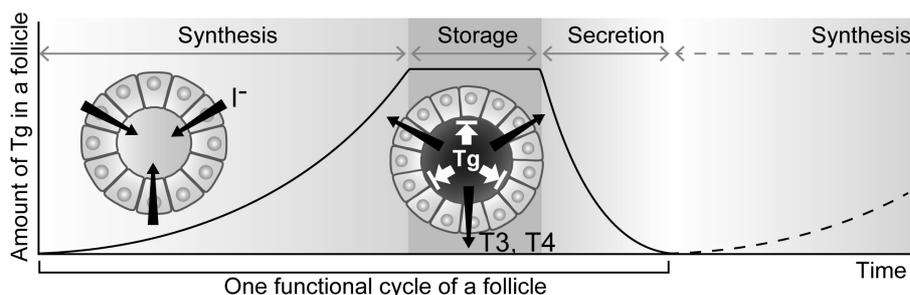


図 1. 甲状腺濾胞の機能的サイクルのモデル。Tg の蓄積量が低い濾胞ではヨード輸送やホルモンの合成が活性化し、充分量の Tg が蓄積する濾胞では新たな合成の抑制とコロイドの再吸収・血中へのホルモン分泌が促進される。これにより濾胞内 Tg は減少し、再びサイクルが繰り返される。

### 2. 研究の目的

本研究では、濾胞内 Tg による細胞内シグナル伝達経路の全体像を明らかにし、未だ明らかでない甲状腺機能異常症の病因となり得る分子の同定を目的として研究を行った。濾胞内の Tg が制御する甲状腺機能遺伝子はホルモン合成に関わる遺伝子だけでなく、ホルモンの分泌やヨードの有機化、再利用など様々な濾胞機能に関わる遺伝子の発現を調節している。また、TSH 非存在下において、濾胞内 Tg は甲状腺細胞の増殖にも寄与しており、TSH シグナルに拮抗した甲状腺機能遺伝子を制御するシグナル分子だけでなく、様々な細胞内シグナル伝達経路を介して甲状腺細胞内に作用していることが考えられる。

したがって、Tg によってリン酸化される細胞内タンパク質や、発現が変動する遺伝子を解析することにより、未知の甲状腺機能に関与している分子を明らかに出来ると考えられる。すなわち、甲状腺ホルモンの合成・蓄積・分泌のそれぞれの過程における Tg の調節機構を明らかにすることで、真の甲状腺濾胞調節機構を明らかにできると期待される。また、甲状腺機能低下症などの原因遺伝子として同定されている多くの遺伝子は、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我々は明らかにしてきた。したがって、濾胞内 Tg による発現制御を受けている甲状腺機能遺伝子の全体像を明らかにすることで、未だ明らかでない甲状腺機能異常症の病因遺伝子の候補を提示することが可能であり、それにより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 細胞を用いて、培養液中に TSH または濾胞内濃度の Tg を添加し、細胞内タンパク質を回収し、TSH 受容体シグナル下流に存在する protein kinase A (PKA) や mitogen-

activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)経路に関わる種々のタンパク質のリン酸化状態を特異的リン酸化抗体を用いた Western blotting で解析した。Tg シグナルへの関与が予想される分子に対する阻害剤や siRNA を用いて Tg の作用が失われるかについて、Tg により調節される甲状腺機能遺伝子の発現変化を real-time PCR を用いて解析を行った。さらに、TSH の影響を完全に打ち消してしまうほど強力な Tg の作用は、既知の細胞内シグナル伝達経路単独では説明出来ない可能性もあることから、培養液中に Tg を添加した FRTL-5 細胞から全タンパク質を精製し、Tg でリン酸化されるタンパク質を質量分析によって網羅的に解析した。

我々は過去において、FRTL-5 細胞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 を調製して DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行っている。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最新新たに同定された甲状腺機能低下症の原因遺伝子である新規ヨード輸送体 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 細胞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、luciferase reporter gene assay および免疫蛍光染色などを用いて解析を行った。さらに、ラット甲状腺組織切片を用いて、SLC26A7 と Tg の蛍光二重染色を行い、濾胞内 Tg と SLC26A7 の発現を共焦点レーザー走査型顕微鏡により解析した。

#### 4. 研究成果

濾胞内濃度の Tg は TSH によって誘導される PKA シグナル下流である CREB などのリン酸化を単独で誘導し、TSH と同時に加えるとその作用は相加的に増強した。また MAPK 経路の Raf/MEK/ERK などのリン酸化は、TSH では誘導されないが Tg はそれらを誘導することが明らかとなった。PI3K-Akt 経路においては、Akt とその下流にある GSK のリン酸化が Tg および TSH によってともに誘導された。甲状腺ホルモン合成に必須であるヨード輸送体 NIS の遺伝子発現は、TSH、forskolin、あるいは dbcAMP によって強く誘導されることが知られているが、これらとともに Tg で刺激した結果、TSH、forskolin、dbcAMP で誘導された NIS の mRNA 発現量は、Tg の濃度および時間依存性に強く抑制され、Tg は TSH 受容体下流シグナルを阻害すること無く、甲状腺機能遺伝子の発現を抑制していることが明らかとなった。Tg が誘導した各種リン酸化シグナル経路の阻害剤や RNAi を用いて、Tg が制御する甲状腺機能遺伝子の発現を解析したところ、Tg の効果は阻害されなかった。そこで、それらシグナル伝達経路を組み合わせることで阻害することによる Tg 作用への影響について検討を行ったところ、それぞれ単独の経路を阻害しても Tg の効果は阻害されなかったのに対し、PKA 経路と PI3K/Akt 経路を同時に阻害することで Tg の効果が阻害されることが明らかとなった。したがって Tg は PKA 経路と PI3K/Akt 経路の両方の経路を介して甲状腺機能遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された（投稿準備中）。

Tg の細胞内シグナル伝達経路に関わるタンパク質の網羅的解析を行うため、培養液中に濾胞内濃度の Tg を添加した FRTL-5 細胞からタンパク質を精製し、質量分析によって解析した結果、全体で 2,448 タンパク質、8,180 リン酸化ペプチドが同定され、同定されたリン酸化部位は 7,602 箇所であった。また、得られたリン酸化タンパク質をエンリッチメント解析し、Tg シグナルの候補を推測した結果、Tg はアミノ酸代謝やβ酸化、神経栄養因子の受容体シグナルに関係したタンパク質のリン酸化を誘導することが明らかとなった（図2）（投稿準備中）。

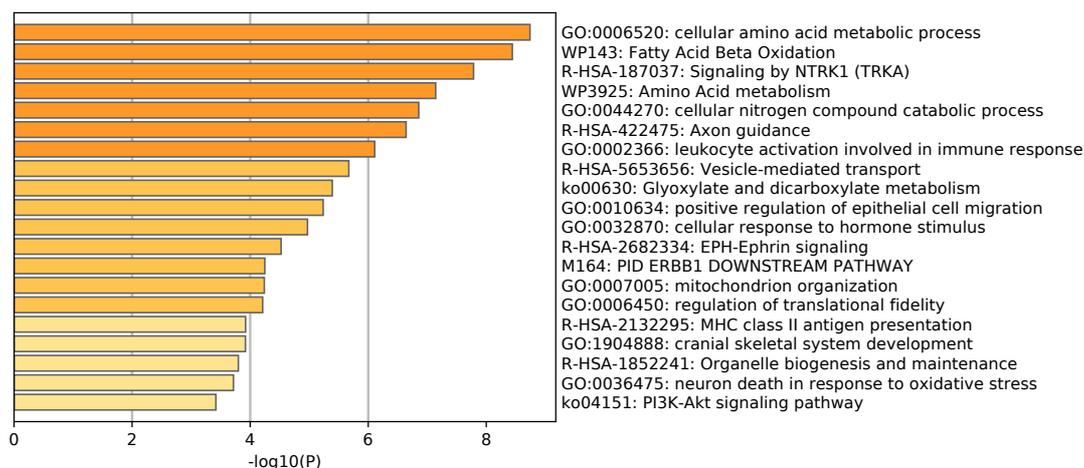


図 2. 濾胞内 Tg が与える甲状腺細胞内の全リン酸化タンパク質のエンリッチメント解析。培養液に濾胞内濃度の Tg またはコントロールとして BSA を添加し、120 分経過後の全リン酸化タンパク質を質量分析し、BSA と比較して 5 倍以上にリン酸化を誘導したタンパク質をエンリッチメント解析した結果、アミノ酸代謝やβ酸化、神経栄養因子の受容体シグナルに関係したタンパク質のリン酸化を誘導することが明らかとなった。

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 (図 3)。SLC26A7 のプロモーター領域をクローニングし、luciferase reporter gene assay を行ったところ、転写開始部位の上流、2207 から 1653 塩基に強いプロモーター活性が確認され、Tg によってその活性は強く抑制されることを明らかにした。また、SLC26A7 は TSH 存在下で輸送体として機能する細胞膜に局在を誘導したが、濾胞内濃度の Tg を同時に添加したところ、TSH による SLC26A7 の膜局在を完全に消失させることを明らかにした。さらに、ラット甲状腺組織切片を用いた免疫蛍光二重染色では、濾胞内の Tg 蓄積量が少ない濾胞では SLC26A7 の発現が濾胞上皮細胞の内腔側膜に強く観察され、濾胞内の Tg 蓄積量が多い濾胞では、SLC26A7 の細胞膜の発現も低下していることを明らかにした (図 4) (Kiriya M, *et al.*, *Endcr J*, 2022)。

本研究によって明らかとなった知見は、甲状腺生理学の発展に寄与し、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の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。

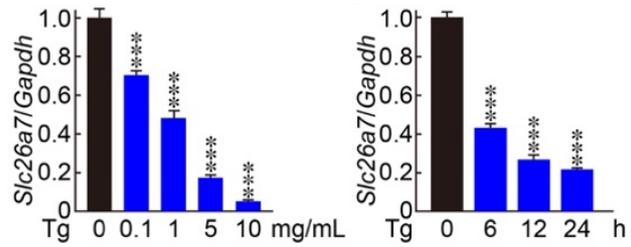


図 3. FRTL-5 細胞に濾胞内濃度の Tg を添加した結果、*Slc26a7* の mRNA 発現量は濃度および時間依存性に強く抑制された。

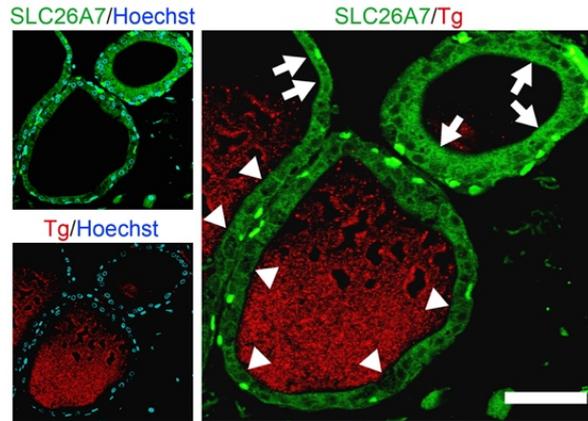


図 4. 濾胞内の Tg 蓄積量と SLC26A7 の発現は逆相関する。ラット甲状腺組織切片を用いて Tg (赤) と SLC26A7 (緑) の免疫蛍光二重染色を行った結果、濾胞内の Tg 蓄積量が少ない濾胞では、SLC26A7 の発現が濾胞上皮細胞の内腔側膜に強く観察され (矢印)、濾胞内の Tg 蓄積量が多い濾胞では、SLC26A7 の細胞膜の発現も低下していることを明らかにした (矢頭)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanimura Yuta, Kiriya Mitsuo, Kawashima Akira, Mori Hitomi, Luo Yuqian, Kondo Tetsuo, Suzuki Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Regulation of solute carrier family 26 member 7 (Slc26a7) by thyroid stimulating hormone in thyrocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ20-0502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kiriya M, Kawashima A, Fujiwara Y, Tanimura Y, Yoshihara A, Nakamura Y, Tanigawa K, Kondo T, Suzuki K.	4. 巻 6(4)
2. 論文標題 Regulation of gene expression by follicular thyroglobulin.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Endocrinol Thyroid Res	6. 最初と最後の頁 -
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kiriya M, Kawashima A, Fujiwara Y, Tanimura Y, Yoshihara A, Nakamura Y, Tanigawa K, Kondo T, Suzuki K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Thyroglobulin regulates the expression and localization of the novel iodide transporter SLC26A7 in thyrocytes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 -
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 1件）

1. 発表者名 桐谷光夫、谷村優太、川島晃、森仁美、谷川和也、近藤哲夫、鈴木幸一
2. 発表標題 甲状腺における新規ヨード輸送体Slc26a7は濾胞内濃度のサイログロブリン（Tg）によって発現調節される
3. 学会等名 第4回日本ワンヘルスサイエンス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷村優太、桐谷光夫、川島晃、森仁美、Yuqian Luo、近藤哲夫、鈴木幸一
2. 発表標題 TSHは甲状腺濾胞上皮内腔側の新規ヨウ素輸送体Slc26a7の発現量を低下させ細胞膜への局在を誘導する
3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桐谷光夫、谷村優太、川島晃、森仁美、Yuqian Luo、近藤哲夫、鈴木幸一
2. 発表標題 サイログロブリン (Tg) による新規ヨード輸送体Slc26a7の発現調節機構の解明
3. 学会等名 第63回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桐谷光夫、川島晃、山中大介、近藤哲夫、鈴木幸一
2. 発表標題 サイログロブリン (Tg) が持つ抗TSH作用機序の検討
3. 学会等名 第62回日本甲状腺学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuo Kiriya, Yuta Tanimura, Akira Kawashima, Yasuhiro Nakamura, Kazunari Tanigawa, Tetsuo Kondo, Koichi Suzuki.
2. 発表標題 Follicular thyroglobulin regulates expression and localization of Slc26a7, a novel iodide transporter at the apical membrane.
3. 学会等名 43rd Annual Meeting of the European Thyroid Association. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桐谷光夫、川島晃、中村康宏、谷川和也、藤原葉子、近藤哲夫、鈴木幸一
2. 発表標題 濾胞内サイログロブリンは甲状腺濾胞上皮内腔側ヨード輸送体であるSLC26A7の発現を抑制する。
3. 学会等名 第25回日本臨床内分泌病理学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桐谷光夫、谷村優太、川島晃、中村康宏、谷川和也、藤原葉子、近藤哲夫、鈴木幸一
2. 発表標題 新規ヨード輸送体SLC26A7の発現調節機構の解明
3. 学会等名 第37回甲状腺病態生理研究会
4. 発表年 2022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	山中 大介  (Yamanaka Daisuke)  (10553266)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教   (12601)	
研究分担者	川島 晃  (Kawashima Akira)  (60624913)	帝京大学・医療技術学部・研究員   (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------