

## 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15日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659052

研究課題名（和文）甲状腺濾胞細胞の新奇培養法を用いたサイログロブリンによる甲状腺機能制御機構の解明

研究課題名（英文）Study on the regulatory mechanism of thyroglobulin on thyroidal function by use of novel culture system of thyroid follicular cells

研究代表者

下仲 基之（SHIMONAKA MOTOYUKI）

東京理科大学 理学部・准教授

研究者番号：30277272

研究成果の概要（和文）：甲状腺ホルモンは甲状腺上皮細胞により構成される甲状腺濾胞で合成される。このホルモンの前駆体であるサイログロブリンが甲状腺の機能に及ぼす影響を調べるため、グラジエントカルチャーシステムを用いて甲状腺上皮細胞と血管内皮細胞とによる極性機能培養法を確立した。この培養法を用いて検討した結果、サイログロブリンは甲状腺ホルモン産生を亢進させるカテプシンKの濾胞への分泌を促進することが示され、ホルモン合成を直接調節していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Thyroid hormones are synthesized in the thyroid follicles consist of thyroid epithelial cells. To examine the effects of thyroglobulin, the precursor molecule of thyroid hormones, on the function of thyroid, we established the functional gradient culture system composed of thyroid epithelial cells and endothelial cells. Using this system, we found that thyroglobulin stimulated the secretion of cathepsin K, one of the key enzymes of thyroid hormone synthesis, to the follicular side. This suggests that thyroglobulin directly regulates the thyroid hormone synthesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	0	1,700,000
2010年度	700,000	0	700,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	210,000	3,310,000

研究分野：生物化学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：甲状腺, 上皮細胞, サイログロブリン, 極性培養

## 1. 研究開始当初の背景

サイログロブリンは分子量約660,000の巨大な糖タンパク質であるが、現在のところその機能は分子量わずか700程度に過ぎない甲状腺ホルモンを合成するための前駆体分子にとどまっている。しかしこのような巨大分

子が自身の1000分の1程度の大きさのホルモンを合成するためだけに存在しているのだろうか。サイログロブリンには未だ知られていない機能が隠されているのではないか。その答えの鍵となる現象として、サイログロブリンによる甲状腺濾胞機能の自己調節能

があげられる。すなわち、サイログロブリンは甲状腺刺激ホルモン (TSH) の作用とは独立して甲状腺における自身の合成・貯蔵・分泌をコントロールするとともに、甲状腺細胞の増殖・成長をも制御している可能性が明らかになりつつある。

甲状腺上皮細胞は甲状腺内で濾胞を形成し、基底側を毛細血管に取り囲まれた状態で存在する。上皮細胞で合成されたサイログロブリンは濾胞内腔に運ばれ、ここでヨウ素と結合し、甲状腺ホルモンを内包した状態で蓄積される。TSH の刺激を受けると濾胞内のサイログロブリンは再吸収され、加水分解を受けた後最終産物である甲状腺ホルモンが基底側に放出される。この過程は様々なプロテアーゼが協調的に作用しあうことで制御されている。ところが、甲状腺内の各濾胞は毛細血管を通して TSH による等価の刺激を受けているにも関わらず、ヨウ素の取り込み量やサイログロブリンおよび甲状腺ホルモンの分布、各種転写因子の発現などが濾胞ごとに大きく異なっていることが知られており、これを *follicular heterogeneity* と呼んでいる。なぜこのような不均一性が現れるのかについては、いまだに謎の部分が多く残されている。

鈴木らは、濾胞内腔のサイログロブリン濃度とヨウ素の取り込みやサイログロブリンの合成・再吸収との間には負の相関があることを報告している。また我々は、ウシやブタ由来のサイログロブリンは濃度依存的にラット甲状腺上皮細胞株 *FRTL-5* 細胞の増殖を促進することを報告し、さらにその作用の発現にはサイログロブリン分子の重合状態や糖鎖の存在が重要であることやその作用がホスファチジルイノシトール 3 キナーゼの経路を介して伝達されること、またホルモン合成に関わる各種プロテアーゼの活性とサイログロブリンによる甲状腺細胞増殖作用との間には負の相関があることなどを明らかにしてきた。このように現在、サイログロブリンには甲状腺ホルモン前駆体としての役割以外にも甲状腺の様々な機能を制御する因子としての機能を有している可能性が明らかになりつつあるが、詳細を解明するためには、様々なアプローチによるさらなる研究が必要とされる。

## 2. 研究の目的

これまで甲状腺の機能を解析するための *ex vivo* における研究は、主に *FRTL-5* 細胞などのラット甲状腺由来細胞株の単層培養や、ラット・ヒト・イヌなどの初代培養を用いて行われてきた。しかし甲状腺上皮細胞は

本来極性をもち濾胞を形成する細胞であり、さらに基底側は毛細血管に取り囲まれているため、このような条件下で培養した細胞の特質は必ずしも生理的条件下での細胞のそれと同等であるとは言えない。また我々は、*FRTL-5* 細胞の単層培養を行う際、培養担体の種類によってその増殖能や形態などに大きな差異が生じることを見いだしている。したがって従来の *FRTL-5* 細胞の単層培養による方法では、生理的条件を反映した甲状腺上皮細胞の総括的な機能解析を行うことは難しく、限界があるといえる。一方、初代培養を行う際に濾胞の形態を保持した状態で採取し、それをコラーゲンゲルに埋め込んだり、懸濁した状態で培養する方法が用いられることもあるが、この方法もそれぞれの濾胞間に不均一性が生じるとともに、定量的な解析を行い難いという問題点がある。

(1) このような問題点を解決するため、まずグラジエントカルチャーコンテナを用いた新しい培養系の確立を目的とする。カルチャーコンテナは、上室と下室、それらを隔てる仕切りから構成されている。上室と下室にはそれぞれ異なる培養液を循環させることができ、仕切りに物質透過能のある支持体を用いることで、上室と下室との間のコミュニケーションを行うことができる。支持体の上面と下面とを異なる培養液で培養することにより、上皮細胞の極性を維持した、生体に限りなく近い条件での培養が可能となるため、この系を用いて甲状腺濾胞機能を *ex vivo* で再構築することを目指す。

(2) 培養法が確立されれば、その系を用いて、サイログロブリンが甲状腺上皮細胞に及ぼす影響を検討する。甲状腺ホルモンは、サイログロブリンが濾胞内腔に蓄積され、その後細胞に再吸収され、細胞内で限定分解を受ける、という過程を経て産生・分泌される。このそれぞれの過程には様々なプロテアーゼが関与していることが知られているが、それらプロテアーゼの活性がどのような機構で制御されているかは明らかにされていない。そこで、この培養系にサイログロブリンを作用させることで、プロテアーゼの挙動がどのように変化するかを解明することを目的とする。

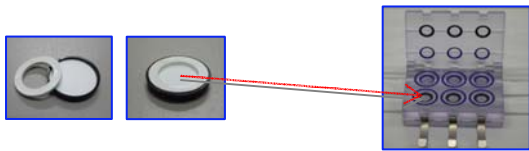
## 3. 研究の方法

(1) グラジエントカルチャーコンテナを用いた極性機能培養法の確立

甲状腺上皮細胞と血管内皮細胞とを同一の支持体に接着させ、両細胞間の相互作用を発現させるとともに上皮細胞に細胞極性を生じさせるために最適な支持体を選択する。

そのために支持体は、効率良く物質透過を行える小孔をもつものでなければならない。続いて、その支持体を様々な細胞外マトリックス成分などでコートし、おのこの細胞に対する接着性や増殖性を比較するとともに、細胞間の密着性が十分に保たれるような条件を決定する。

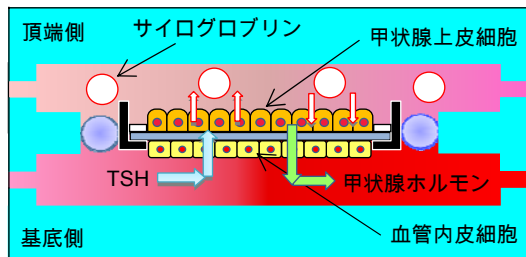
条件の最適化を行った後、支持体の上面に甲状腺上皮細胞、下面に血管内皮細胞を接着させた後、カルチャーコンテナの上室と下室とに異なる培養液を循環させて灌流培養を行う。おのこの細胞を安定に、機能を保持した状態で培養することのできる培養液の組成と流速について検討する。細胞の接着状態は蛍光染色法を用いて検討し、甲状腺の極性については、サイログロブリンの頂端側への分泌能を調べることにより検討する。



支持体（左）とカルチャーコンテナ（右）

#### (2) 甲状腺上皮細胞に対するサイログロブリンの作用の検討

カルチャーコンテナの上室側の培養液にサイログロブリンを添加することにより、甲状腺濾胞内腔を模した状態をつくりだす。添加するサイログロブリンの濃度を変化させることにより、甲状腺機能に関わる様々なタンパク質の発現量がどのように変化するかを検討する。サイログロブリン以外にもTSHやインスリンなど、甲状腺上皮細胞の増殖や機能に影響を及ぼす因子を上室または下室に添加し、同様に各種タンパク質の発現量の変化を検討する。また、最終的に甲状腺ホルモンが基底側であるカルチャーコンテナの下室の培養液中に分泌されるかどうかを、ELISAによって検討する。



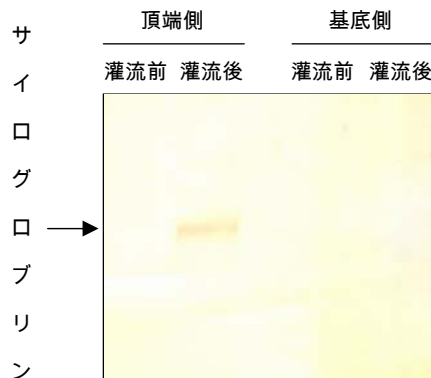
灌流培養系の模式図

## 4. 研究成果

### (1) ラット甲状腺上皮細胞株 FRTL-5 細胞

を用いて支持体の検討を行ったところ、ポリスチレン、ポリカーボネート、ニトロセルロースの中ではニトロセルロースが最も細胞の接着性が高かった。そこで孔サイズ0.45 μmのニトロセルロース膜を用いてコート剤の検討を行ったところ、ポリリシン、コラーゲン、マトリゲルの中でマトリゲルが最も細胞の接着性および密着性が高く、二相間の培養液の漏出がなく、培養に適していることがわかった。

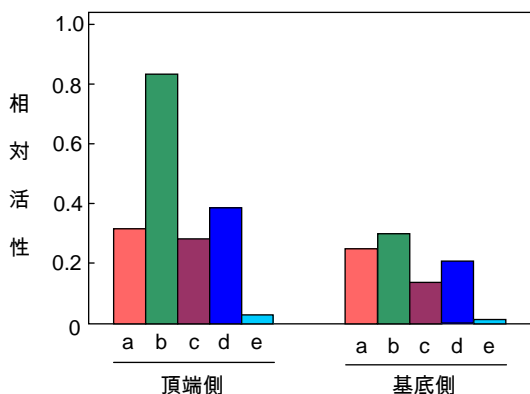
灌流培養を行うにあたり、まず支持体1枚あたりFRTL-5細胞を $5 \times 10^5$ 個播種し、48時間培養した。その後支持体の反対面に血管内皮細胞を $5 \times 10^5$ 個播種し、さらに48時間培養した。いずれの細胞もコンフルエントになっていることを確認した後、カルチャーコンテナにセットした。検討の結果、培養条件は、甲状腺上皮細胞側は基本培養液（5%ウシ血清を含むHam F12 培地に4種類のサプリメントを加えたもの）、血管内皮細胞側は基本培養液にTSHとインスリンを加えたものを用い、流速1.5 ml/hrで灌流することとした。この条件下で72時間灌流培養を行った後、それぞれの培養液を回収し、サイログロブリンが含まれているかどうかをWestern blottingにより調べた。その結果、頂端側の培養液にのみサイログロブリンが検出されたことから、この培養系により甲状腺濾胞機能を再構築することに成功した。



Western blotting によるサイログロブリンの検出

(2) 甲状腺上皮細胞に対するサイログロブリンの影響を、甲状腺ホルモン合成に関わるプロテアーゼに対する作用に着目して検討した。頂端側、基底側ともに基本培養液を用いて培養し、それぞれの培養液に含まれるカテプシンK活性およびカテプシンB・L活性を測定し、コントロールとした(a)。カテプシンKはサイログロブリンの濾胞からの再吸収に関わるプロテアーゼで、カテプシンB・Lはリソソームにおいてサイログロブ

リンの分解に関わるプロテアーゼである。続いて、両培養液にサイログロブリン、TSH、インスリンを様々な組み合わせで添加して培養し、培養後の各プロテアーゼ活性を測定した。その結果、頂端側にサイログロブリンを添加した場合、頂端側培養液中のカテプシンKの活性は約 2.5 倍に増加したのに対し、基底側培養液中の活性はほとんど変化しなかった (b)。続いて、両培養液に TSH を添加して培養したところ、頂端側のカテプシンK活性はほとんど変化せず、基底側の活性は約 1/2 に減少した (c)。また、インスリンを添加した場合は、頂端側で活性のわずかな増加が認められたが、基底側ではほとんど変化がなかった (d)。次に、両培養液に TSH とインスリンとを同時に添加して培養を行うと、頂端側・基底側とも、カテプシンKの活性はほぼ完全に消失した (e)。



#### サイログロブリンによるカテプシンK活性の調節作用

これらの結果から、濾胞内腔のサイログロブリン濃度が上昇するとカテプシンK活性が上昇し、サイログロブリンの再吸収が促されて甲状腺ホルモン産生が亢進するものと考えられ、サイログロブリンは甲状腺ホルモン合成の正の調節因子であることが示唆された。それに対し TSH やインスリンは甲状腺細胞におけるサイログロブリンの合成と濾胞への放出を促進させるために、カテプシンK活性を保持することで濾胞内腔におけるサイログロブリンの蓄積を誘導していると考えられ、サイログロブリンとは異なる形で甲状腺ホルモンの産生を制御していることがわかった。

次に、カテプシンKの場合と同じ条件で培養を行い、頂端側と基底側それぞれの培養液中のカテプシンB・Lの活性を測定した。その結果、いずれの場合も活性はほとんど検出されなかった。この酵素は本来細胞内のリソソーム中で作用するものであるため、各条件下で培養した細胞の抽出液中の活性を同様

に測定したところ、いずれの場合もほとんど活性に変化は認められなかった。

一方、カルチャーディッシュを用いた甲状腺上皮細胞の単層静的培養系に対しても同様に、培養液中に分泌されたカテプシンKの活性を測定した。その結果、サイログロブリンを加えた時のみ、カテプシンKの活性がわずかに増加していることがわかったが、グラジエントカルチャーシステムを用いた極性機能培養の場合に比べ、その活性は約 1/50 以下であることがわかった。これらの結果からも、本培養系が甲状腺上皮細胞の機能を十分発揮した状態で細胞を維持できるものであることが示された。

最後に、上記の条件下で甲状腺ホルモンが基底側培養液中に放出されているかを ELISA によって計測したところ、ホルモン量は検出感度以下であったため、定量的な評価を行うことはできなかった。今後、この培養系をさらにスケールアップすることにより甲状腺ホルモンの定量が可能になれば、サイログロブリンの甲状腺細胞に対する新たな機能やホルモン合成の制御機構などが明らかになると期待される。

#### 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)

[学会発表] (計 3 件)

1. 佐々木謙, 林もゆる, 堀口兼太郎, 下仲基之. サイログロブリンの新機能探索を目的とした甲状腺上皮細胞の新規極性培養系の確立. 第 34 回日本分子生物学会. 2011 年 12 月 14 日. 横浜
2. 佐々木謙, 林もゆる, 堀口兼太郎, 下仲基之. Gradient Culture Container を用いた甲状腺上皮細胞の極性機能培養系の確立. 平成 23 年度日本生化学会関東支部例会. 2011 年 6 月 25 日. 東京
3. 佐々木謙, 林もゆる, 落合大輔, 堀口兼太郎, 下仲基之. Gradient Culture Container を用いた甲状腺上皮細胞, FRTL-5, の極性機能培養系の確立. 第 83 回日本生化学会大会. 2010 年 12 月 10 日. 神戸

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

下仲 基之 (SHIMONAKA MOTUYUKI)

東京理科大学 理学部・准教授

研究者番号 : 30277272

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :