

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08226

研究課題名(和文) アクアポリン2を介した甲状腺ホルモンの体液調節機構の研究

研究課題名(英文) Study of body fluid regulation by thyroid hormone mediated by transcriptional regulation of aquaporin 2

研究代表者

松下 明生 (Matsushita, Akio)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50402269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アクアポリン2(AQP2)は腎集合管に発現する水チャンネル分子で、その発現にGATA2が重要と報告されている。我々は、腎由来の培養細胞に甲状腺ホルモン(T3)受容体(TR)とGATA2を発現させAQP2遺伝子の転写活性を検討した。抗利尿ホルモンDDAVPはGATA2によるAQP2の転写を増強し、DDAVPに拮抗してT3はAQP2の転写を抑制した。AQP2遺伝子上のGATA2結合配列を破壊するとT3/TRによるAQP2の転写制御が消失し、DDAVPシグナルの下流にあるCREB結合配列を破壊した場合はT3/TRの転写制御が維持されたことから、GATA2とTRの相互作用の重要性が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺機能低下症では、浮腫や体重増加が認められ水分貯留傾向となることが知られている。甲状腺ホルモン(T3)はGATA2との相互作用を介してAQP2の転写を抑制し利尿効果を発揮していることが考えられた。甲状腺機能低下症ではAQP2の転写抑制がなくなり、AQP2が高発現することにより抗利尿効果が強まって水分貯留傾向となるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin 2 (AQP2) is a water channel molecule expressed in renal collecting duct cells. It has been reported that the transcription factor GATA2 is important for the expression of the AQP2 gene. We examined the transcriptional activity of the AQP2 gene by expressing the thyroid hormone (T3) receptor (TR) and GATA2 in cultured kidney-derived cells. The antidiuretic hormone DDAVP enhanced GATA2-mediated transcription of AQP2, while T3 antagonized DDAVP and suppressed AQP2 transcription. Disruption of the GATA2 binding sequence on the AQP2 gene abolished the T3/TR-mediated transcriptional regulation of AQP2, while disruption of the CREB binding sequence downstream of the DDAVP signal maintained the T3/TR transcriptional regulation, confirming the importance of the interaction between GATA2 and TR.

研究分野：内分泌代謝内科

キーワード：甲状腺ホルモン 甲状腺ホルモン受容体 アクアポリン2 抗利尿ホルモン GATA2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎集合管に発現するアキアポリン 2(AQP2) は、抗利尿ホルモン(ADH)刺激に反応して水再吸収に働く水チャンネル分子であり、重要な体液調節因子である。一方、甲状腺ホルモン(T3) は甲状腺ホルモン受容体(TR)を介して様々な標的遺伝子の転写を正または負に調整することでホルモン作用を発揮している。

重篤な甲状腺機能低下症では、腎機能低下や水利尿障害を生じ、浮腫や低 Na 血症がしばしば認められる。したがって T3 は体液調節に重要な役割を果たすと考えられるが、T3 の腎臓への作用に関しては不明な点が多い。AQP2 遺伝子の発現は、甲状腺機能低下状態で増加、機能亢進状態で減少することが報告されており、T3 は AQP2 遺伝子を負に転写制御して水利尿作用を発揮していると考えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。

我々は、これまで T3 による標的遺伝子の負の転写調節に関して研究し、転写因子 GATA2 を介した下垂体 TSH 鎖遺伝子、2 型脱ヨード酵素遺伝子、視床下部 prepro-TRH 遺伝子の負の転写制御モデルを報告している。最近 GATA2 が AQP2 遺伝子の主要な活性化因子であることが報告されており、AQP2 にも GATA2 を介する共通の分子機構があるとの仮説を立て本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腎集合管における AQP2 遺伝子の発現を T3 が転写レベルで負に調節していることを確認し、T3/TR の作用点を明らかにすることである。甲状腺ホルモンによる体液調節メカニズムの解明を目標としている。

3. 研究の方法

腎集合管に TR と AQP2 が発現していることを確認

末梢組織で作用する TR には TR₁ と TR₁ の 2 つのアイソフォームが存在する。腎集合管に TR と AQP2 が共に発現していることを確認するためマウス腎臓組織切片を用いて抗 TR₁ (TR₁) 抗体と AQP2 抗体による 2 重免疫染色を行った。

AQP2 遺伝子の転写制御における GATA2 と TR の相互作用の検討

AQP2 遺伝子上流に存在する GATA site を含むプロモーター領域を CAT 発現ベクターに組み込んだレポーター遺伝子(AQP2-CAT)をリポフェクション法で培養細胞系に発現させ、GATA2、TR の存在下で T3 による転写調節が再現されるかを検討した。GATA 結合配列の破壊実験および TR との結合能喪失した変異 GATA2 の発現実験により AQP2 遺伝子制御における GATA2 と TR の相互作用を確認した。

ADH/PKA 系による AQP2 の発現調節と T3/TR の転写調節の関わりを検討

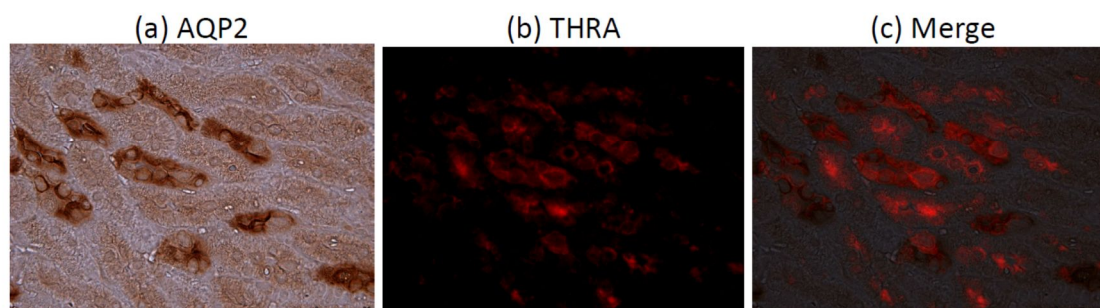
ADH は、プロテインキナーゼ A(PKA)を活性化し CREB リン酸化を介して AQP2 の発現を増加させ、GATA2 と協調して AQP2 の転写を活性化していると考えられる。T3/TR の負の制御と ADH の活性化との相互作用を調べるため、マウス腎集合管由来 mIMCD-3 細胞へ PKA 活性化剤である Forskolin(FK)、と Isobutyl-methylxanthine (IBMX)、長時間作用型の抗利尿ホルモンである酢酸デスマプレシン(DDAVP)を添加して AQP2-CAT の転写活性を検討した。

4. 研究成果

腎集合管主細胞には TR₁ と AQP2 が共に発現している

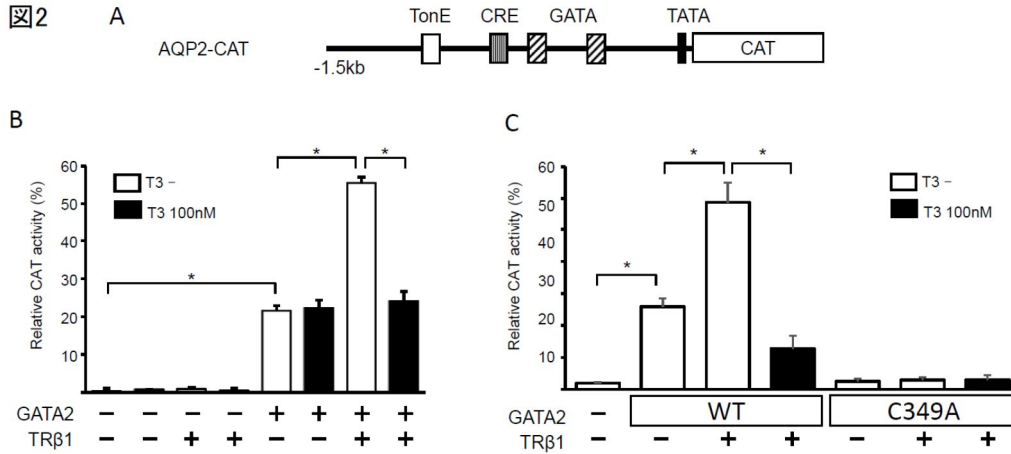
マウス腎臓の組織切片を抗 AQP2 抗体と反応させペルオキシダーゼ(POD)標識二次抗体と DAB で染色すると、集合管主細胞が同定された(図 1a)。抗 TR₁、TR₁ を用いた免疫染色では、TR₁ では発現が確認できなかったが、TR₁ が染色されることが確認できた(図 1b)。両者の 2 重染色により集合管主細胞に AQP2 と TR₁ が共に発現していることが示された(図 1c)。

図 1



TRはGATA2との相互作用を介してAQP2遺伝子の転写をT3依存性に抑制する

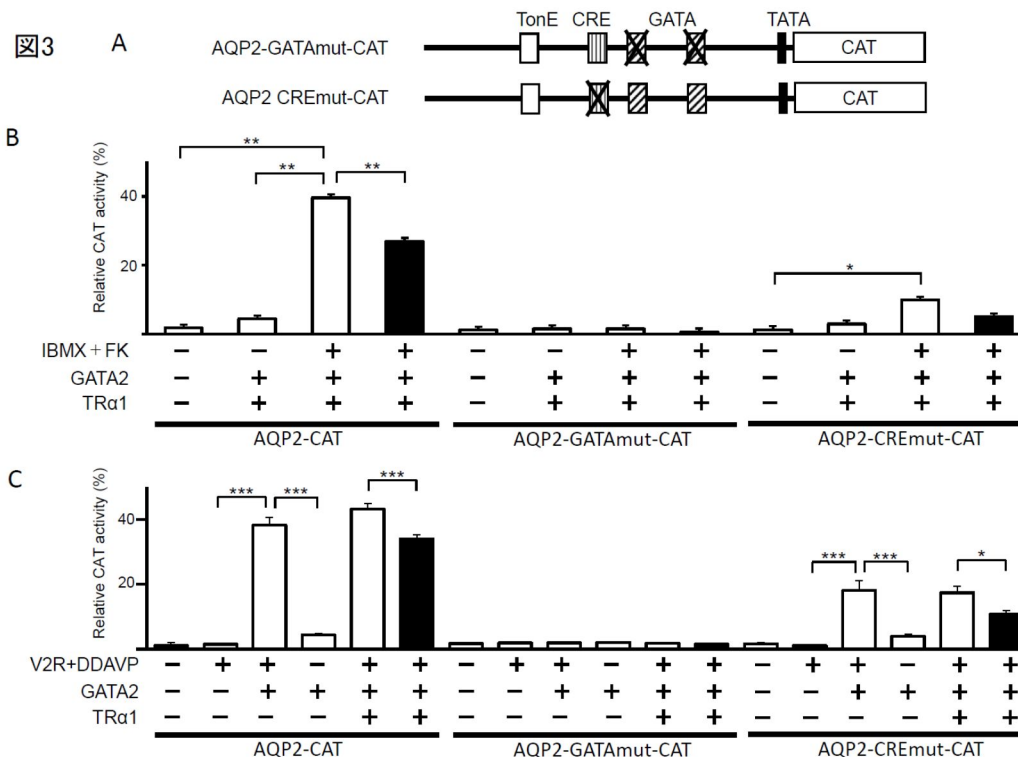
AQP2 遺伝子上流に存在する GATA site を含むプロモーター領域を CAT 発現ベクターに組み込んだレポーター遺伝子(AQP2-CAT、図 2A)をリポフェクション法でサル腎臓由来 CV1 細胞に導入し、GATA2 を発現させると AQP2-CAT の転写が活性化し、T3/TR により抑制されることが確認できた(図 1B)。TR との結合能を喪失した変異 GATA2(C349A)を発現させた場合は転写の活性化は認められず、T3/TR による転写制御も消失した(図 2C)。



ADH/PKA系によるAQP2の発現にはGATA2の存在が必須である

mIMCD-3 細胞へ FK と IBMX を添加して PKA 系を活性化すると、GATA2 による AQP2 の転写活性化が著しく増強された。TR 1 は T3 添加により AQP2 の転写を抑制した。AQP2 遺伝子プロモーター上の CREB 結合配列に変異を導入した AQP2-CREmut-CAT (図 3A) では IBMX+FK 添加と GATA2 の協調効果は減弱した(図 3B)。さらに AQP2 遺伝子プロモーター上の GATA 結合配列に変異を導入した AQP2-GATAmut-CAT(図 3A)では AQP2 の転写活性化は完全に消失した(図 3B)。

mIMCD-3 細胞へバソプレッシン受容体(V2R)と GATA2 を発現させ DDAVP を添加すると AQP2 の転写は著明に増強された。GATA2 の発現がない場合には DDAVP による転写活性化は認められなかった(図 3C)。AQP2-CREmut-CAT では DDAVP と GATA2 による転写活性化は減弱したが、TR 1 と T3 による負の調節は維持されていた。AQP2-GATAmut-CAT では DDAVP と GATA2 による活性化は全く認められなかった(図 3C)。



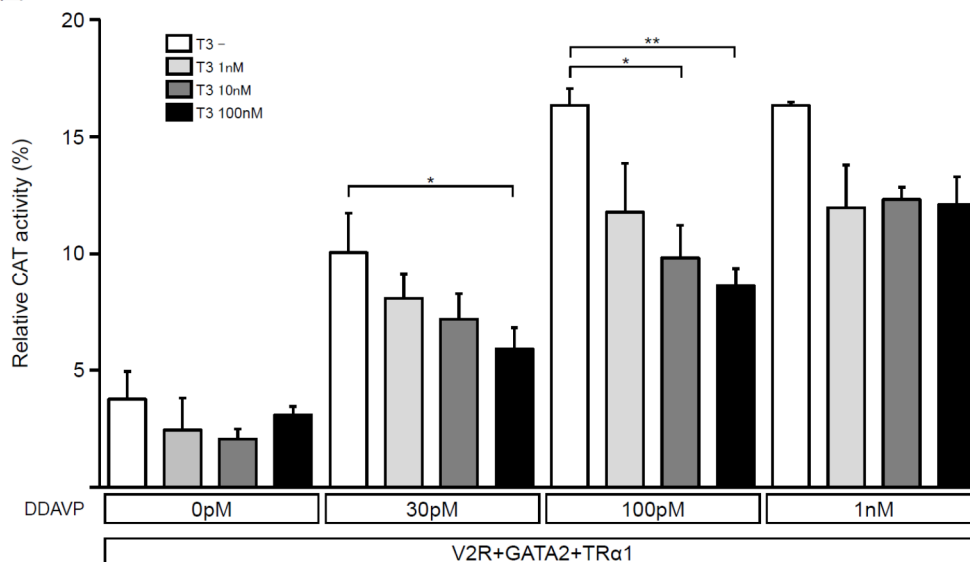
これらの結果から、AQP2 遺伝子の ADH-PKA 系刺激による転写活性化には GATA2 の存在が

必須であること、ADH と GATA2 が協調して活性化した AQP2 の転写を T3/TR が抑制することが示された。

ADHによるAQP2の転写活性化をTR 1はT3濃度依存性に抑制する

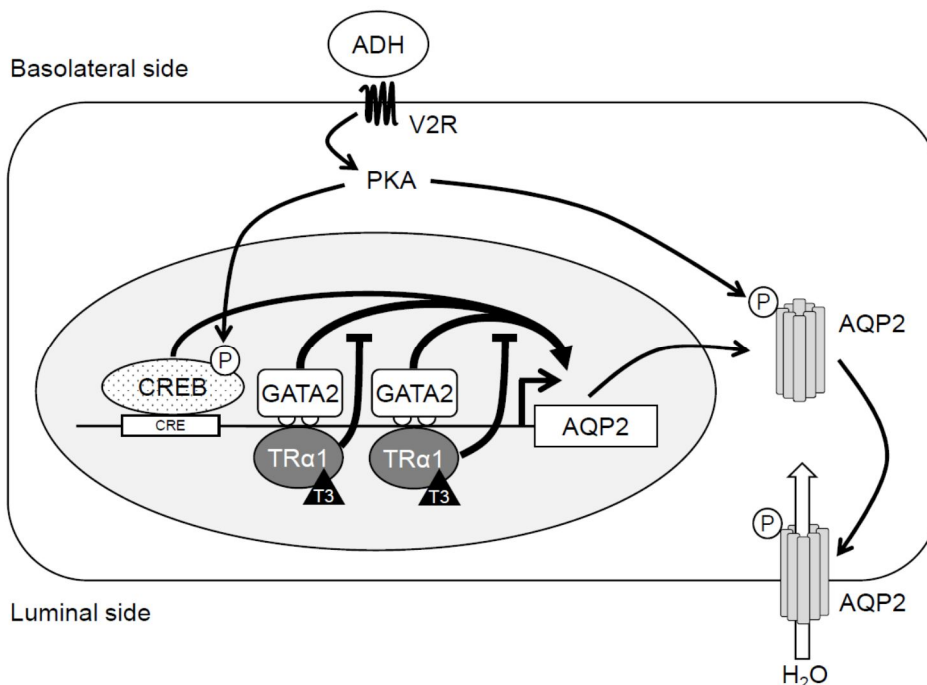
DDAVP と T3 を同時に添加した場合、AQP2-CAT の転写は DDAVP の濃度依存性に活性化され、T3 は DDAVP に拮抗して AQP2 の転写を濃度依存性に抑制することが示された (図 4)。

図4



以上の結果から、ADH 刺激に伴う AQP2 遺伝子の発現に GATA2 の存在は必須であり、ADH と GATA2 は協調して AQP2 遺伝子の転写を活性化していることが判明した。腎集合管に発現する TR 1 は GATA2 との相互作用を介して ADH 刺激に拮抗して AQP2 の発現を濃度依存性に抑制していると考えられた (図 5)。

図5



甲状腺機能低下症では、T3/TR による AQP2 遺伝子発現抑制がなくなり、ADH 刺激による AQP2 発現が優勢となっていると考えられる。重篤な甲状腺機能低下症では、ADH/PKA 系のシグナルが軽度でも AQP2 の発現が増加しており ADH 不適切分泌症候群(SIADH)で認められる水貯留傾向と類似した病態が生じる結果、低 Na 血症や浮腫を引き起こすものと推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Tokumaru Mitsuaki, Ohba Kenji, Kashiwabara Yumiko, Takase Hiroyuki, Hayashi Chiga, Iwaki Takayuki, Suzuki Yasuhide, Matsushita Akio, Sasaki Shigekazu, Suda Takafumi, Maekawa Masato	4. 巻 60
2. 論文標題 Falsely elevated thyroid hormone levels associated with fibrin interference in patients receiving oral anticoagulant therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine	6. 最初と最後の頁 249 ~ 258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/00045632231159280	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 -

1. 著者名 松下明生	4. 巻 91
2. 論文標題 甲状腺ホルモンの作用とその関連薬	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 産科と婦人科	6. 最初と最後の頁 72-78
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田総一郎、松下明生、大場健司、黒田豪、佐々木茂和
2. 発表標題 COVID19 ワクチン接種後に破壊性甲状腺炎 を発症した 1 例
3. 学会等名 第 65 回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木茂和、大場健司、黒田豪、酒井勇輝、中村啓子、松下明生
2. 発表標題 制御性 T 細胞(Treg)の分化決定 因子 Foxp3 発現は転写因子 GATA3 によって活性化され、T3 によって負に調節される
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松下明生、新海信介、岩倉考政、酒井勇輝、黒田豪、中村啓子、大場健司、安田日出夫、佐々木茂和
2. 発表標題 甲状腺ホルモンによるアクアポリン2の発現調節機構の検討
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松下明生	4. 発行年 2023年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 80
3. 書名 かかりつけ医のための甲状腺疾患治療ガイド	

〔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	佐々木 茂和 (Sasaki Shigekazu) (20303547)	浜松医科大学・医学部附属病院・講師 (13802)	

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
---------	---------