

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461547

研究課題名(和文)下垂体で機能する甲状腺ホルモントランスポーターの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of thyroid hormone transporters expressed in the pituitary

研究代表者

難波 範行 (NAMBA, Noriyuki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：10379076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺ホルモン(TH)トランスポーターMCT8の機能低下に起因するAllan-Herndon-Dudley症候群(AHDS)では、THによる甲状腺刺激ホルモン(TSH)に対するネガティブフィードバックは、下垂体レベルにおいて保持されている。

下垂体前葉でネガティブフィードバックを担うTHトランスポーターを網羅的に探索したところ、甲状腺ホルモンと親和性が高いことが報告されているOatp3a1の発現量が多いことが明らかになった。一方、MCT8の発現量は極めて少なかった。

研究成果の概要(英文)：The HPT (Hypothalamus-Pituitary-Thyroid) axis negative feedback loop is preserved at the pituitary level in Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS), a disease caused by monocarboxylate transporter 8 (MCT8) deficiency. This led us to hypothesize that thyrotropes utilize thyroid hormone (TH) transporters other than MCT8 for TH translocation across the cell membrane.

To determine the molecular mechanism of TH entry as well as thyroid stimulating hormone (TSH) regulation in these cells, all known TH transporters were screened and quantified using mRNA harvested from murine anterior pituitary. Oatp3a1 mRNA was most highly expressed among the TH transporters known to have high specificity for TH. On the other hand, expression of MCT8 was low.

研究分野：医歯薬学

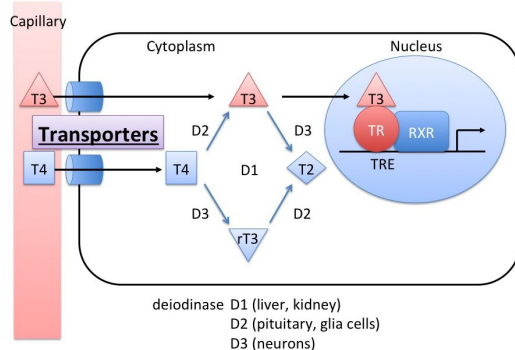
キーワード：甲状腺ホルモントランスポーター 下垂体 甲状腺刺激ホルモン ネガティブフィードバック

1. 研究開始当初の背景

Monocarboxylate transporter 8 (MCT8) は、甲状腺ホルモントランスポーターとして機能することが明らかにされた膜タンパクである (J Biol Chem 278:40128 (2003))。続いて MCT8 機能不全により、X 連鎖性の重度精神運動発達遅滞を示す Allan-Herndon-Dudley 症候群 (AHDS) が発症することも明らかとなり、ヒト神経細胞の甲状腺ホルモン取り込みは MCT8 依存性であることが示された (Lancet 364:1435 (2004), Am J Hum Genet 74:168 (2004), Am J Hum Genet 77:41 (2005))。これらの発見により、甲状腺ホルモンの作用を考えると、従来の視床下部・下垂体・甲状腺軸のみならず、甲状腺ホルモンの標的となる各種末梢組織・細胞に発現する甲状腺ホルモントランスポーターおよび脱ヨード化酵素の作用も考慮せざるを得なくなった。なぜなら甲状腺ホルモンの生物活性は細胞内  $T_3$  濃度により規定され、細胞内  $T_3$  濃度は、循環血漿中の甲状腺ホルモン量、細胞内への甲状腺ホルモン取り込み、脱ヨード化酵素による細胞内での甲状腺ホルモンの活性化・不活化に依存しているためである (図 1)。

図 1

Thyroid hormone action in a target cell



我々は特徴的な低  $fT_4$ 、高  $fT_3$  血症を呈した AHDS 児において新規の MCT8 遺伝子変異を同定し、児の臨床像を詳細に検討する中で、頭部 MRI 上、髄鞘化遅延が認められることを報告した (Eur J Pediatr 167:785 (2008))。そして、MCT8 が神経細胞のみならず、乏突起膠細胞 (oligodendrocyte) にも発現していることを見出した。さらに、AHDS では成長障害は軽度であることから、成長軟骨では MCT8 とは別の甲状腺ホルモントランスポーターである Monocarboxylate transporter 10 (MCT10) が機能していることも報告した (Endocrinology 153:4049 (2012))。

このように、甲状腺ホルモントランスポーターは組織・細胞に特異的な発現パターンを示すため、各組織・細胞における甲状腺ホルモン作用を理解するためには、各々の組織における甲状腺ホルモントランスポーターの

発現パターンを明らかにする必要がある。

MCT8 機能低下に起因する AHDS では、甲状腺ホルモンは血清  $fT_4$  低値、 $fT_3$  高値、TSH 軽度上昇と特徴的なパターンを示す。そして、AHDS 患者に生理量のレボチロキシン ( $LT_4$ ) を投与すると、血清  $fT_4$  値の正常化に伴って血清 TSH 値は低下する。したがって、甲状腺ホルモンによる TSH negative feedback 機構の、少なくとも一部は MCT8 非依存性であると考えられた (Eur J Pediatr 167:785 (2008))。一方、Mct8 欠損マウスを用いた検討では、視床下部室傍核 (PVN) TRH ニューロンにおける TRH mRNA の発現は  $T_4$  あるいは  $T_3$  を大量投与しない限り、減少しないことが示されている (J Clin Invest 117:627 (2007))。以上より、視床下部ではなく、下垂体において、生理量の  $T_4$  に反応する TSH negative feedback 機構が機能していることが示唆される。すなわち、下垂体 TSH 産生細胞における  $T_4$  取り込みは、MCT8 以外の甲状腺ホルモントランスポーターを介していることが想定される。

しかしながら、下垂体における TSH negative feedback 機構の入り口にあたる甲状腺ホルモントランスポーターの発現および機能について、研究開始当初は十分な検討がなされていなかった。

2. 研究の目的

以上より、本研究では下垂体における甲状腺ホルモントランスポーターの発現を網羅的に解析し、甲状腺ホルモンによる TSH negative feedback を担うトランスポーターを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス下垂体における甲状腺ホルモントランスポーターの発現解析

C57BL/6 マウス下垂体前葉より cDNA を作成し、RT-PCR 法で既知の甲状腺ホルモントランスポーターを網羅的にスクリーニングし、検出されたトランスポーターの mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により定量する。

マウス下垂体凍結組織切片を用い、in situ hybridization 法でこれらの甲状腺ホルモントランスポーターの発現を確認する。

連続切片を抗 TSH 抗体 (Dr. A. F. Parlow, National Hormone and Peptide Program, NIDDK より供与) を用いて免疫染色を行うことにより、TSH 産生細胞に特異的に発現する甲状腺ホルモントランスポーターを同定する。

(2) TSH 産生細胞における甲状腺ホルモントランスポーターの発現解析

SV40 ラージ T 抗原導入下垂体 TSH 産生細胞不死化株 T T1 (Endocrinology 139:4476 (1998), Dr. P. L. Mellon, University of California, San Diego より供与) を用い、

(1)と同様に、RT-PCR法で甲状腺ホルモントランスポーターを網羅的にスクリーニング後、定量的RT-PCR法およびWestern blot法でmRNA・タンパク発現量を定量する。

(3) TSH産生細胞に発現する甲状腺ホルモントランスポーターのクローニングおよび機能解析

(1)および(2)で同定したトランスポーターをクローニングし、発現ベクターの作製を行う。

ヒト胎盤絨毛癌由来JEG3細胞に強制発現する。

最近報告されたnon-RIの甲状腺ホルモン取り込みアッセイ系を(Endocrinology 156:2739 (2015))を確立し、この系で同定された甲状腺ホルモントランスポーターの甲状腺ホルモン輸送能を比較検討する。また、共発現したときの特性の変化の有無についても検討する。

(4) TSH産生細胞を用いた機能解析

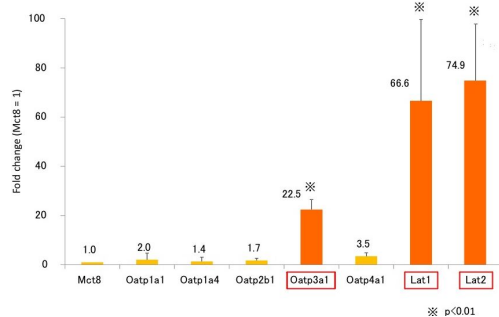
T<sub>1</sub>細胞において、同定された甲状腺ホルモントランスポーターをsiRNAでノックダウン後、培養上清中に $10^{-7}$ ~ $10^{-6}$  M T<sub>4</sub>または $10^{-9}$ ~ $10^{-8}$  M T<sub>3</sub>を添加し、TSH mRNA発現の変化を定量的RT-PCR法で測定することにより(Endocrinology 139:4476 (1998), Endocrinology 147:1735, (2006))、各々の甲状腺ホルモントランスポーターのTSH negative feedback機構における生理的意義を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) マウス下垂体における甲状腺ホルモントランスポーターの発現解析

C57BL/6マウス下垂体前葉よりcDNAを作成し、RT-PCR法で既知の甲状腺ホルモントランスポーターを網羅的にスクリーニングしたところ、Mct8, Oatp1a1, Oatp2b1, Oatp3a1, Oatp4a1, Lat1, Lat2が検出された。定量的RT-PCR法により定量したところ、発現量は1.0:2.0:1.4:1.7:22.5:3.5:66.6:74.9であった(図2)。

図2. マウス下垂体における甲状腺ホルモントランスポーターmRNA発現量

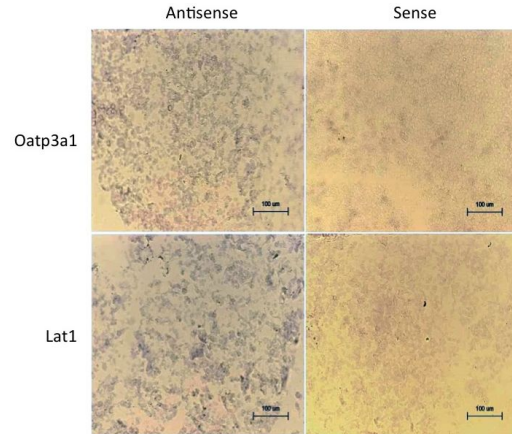


検出された甲状腺ホルモントランスポー

ターのうち、発現量が多く、かつ甲状腺ホルモンの親和性が高いことが知られているのはOatp3a1であるため、以後Oatp3a1に着手して研究を進めた。

マウス下垂体前葉凍結組織切片を用い、in situ hybridization法でOatp3a1, Lat1 (positive control)の発現を確認したところ、びまん性に発現がみとめられた(図3)。

図3



連続切片を抗TSH抗体で免疫染色したところ、TSH産生細胞と重なる部位でOatp3a1の発現が認められた。

(2) TSH産生細胞における甲状腺ホルモントランスポーターの発現解析

T<sub>1</sub>を用い、(1)と同様に、RT-PCR法で甲状腺ホルモントランスポーターを網羅的にスクリーニング後、定量的RT-PCR法を用いて定量したところ、下垂体前葉と同様に、Oatp3a1, Lat1, Lat2 mRNAの発現が最も多かった。

(3) TSH産生細胞に発現する甲状腺ホルモントランスポーターのクローニングおよび機能解析

RT-PCRによりOatp3a1を増幅し、pcDNA3.1に組み込んだ後、シーケンスを確認した。

ヒト胎盤絨毛癌由来JEG3細胞はMCT8を発現しないことが知られている(Mol Endocrinol 20:2761 (2006))。甲状腺ホルモンの親和性の高いトランスポーターの影響を可能な限り少なくしたいため、この細胞株を用いて強制発現したところ、良好な発現が得られることが確認できた。

non-RIの甲状腺ホルモン取り込みアッセイ

RIを用いたアッセイ系と比較して、実験上の制約は少ないが、手技は煩雑であり、まだ十分に信頼性のある結果を得られていない。

(4) TSH産生細胞を用いた機能解析

T<sub>1</sub>細胞において、Oatp3a1をsiRNAでノックダウンし、上述のアッセイ系で甲状腺

ホルモン添加後の甲状腺ホルモン取り込み、TSH mRNA の変動を計時的に観察する予定であったが、siRNA による T T1 細胞のダメージが大きく、十分に信頼性のあるデータが得られていない。現在優性阻害型 Oatp3a1 作成、恒常的発現株の樹立を試みている。

#### 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 4 件)

Ono E, Ariga M, Oshima S, Hayakawa M, Imai M, Ochiai Y, Mochizuki H, Namba N, Ozono K, Miyata I. Three novel mutations of the MCT8 (SLC16A2) gene: individual and temporal variations of endocrinological and radiological features. Clin Pediatr Endocrinol. 2016 Apr;25(2):23-35. doi: 10.1297/cpe.25.23. 査読有

難波範行. Monocarboxylate transporter 8(MCT8) 異常症. 日本甲状腺学会雑誌 2014 5(1):20-25. 査読無

難波範行, 大園恵一. Allan-Herndon-Dudley 症候群. 日本臨床 2014 別冊神経症候群 IV:437-440. 査読無

難波範行. 甲状腺ホルモントランスポーターとその異常. 成長代謝 Review 2014 5:10-11. 査読無

##### [学会発表](計 21 件)

###### 招待講演

難波範行. Allan-Herndon-Dudley 症候群の臨床症状と病態生理. 第 56 回日本小児神経学会学術集会, 2014.5.29-31, 浜松

Namba, Noriyuki. Consequences of thyroid hormone transporter deficiencies. Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research JOINT MEETING 2014, 2014.5.3-6, Vancouver, BC, Canada

難波範行. MCT8 異常症の病態と治療への展望. 第 23 回臨床内分泌代謝 Update, 2014.1.24-25, 名古屋

難波範行. 成長障害と骨におけるシグナル伝達機構に関する研究. 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 2013.4.25-27, 仙台

###### 学会発表

第 49 回日本小児内分泌学会学術集会, 2015.10.8-10, 東京

高桑聖, 難波範行, 山本賢一, 中山尋文, 武鍵真司, 藤原誠, 北岡太一, 窪田拓生, 大園恵一. MCT8 異常症には停留精巢が高頻度に合併する.

小野英利奈, 有賀賢典, 大島早希子, 早川美佳, 今井祐之, 落合幸勝, 望月弘,

難波範行, 大園恵一, 宮田市郎. 新規遺伝子変異が同定された MCT8 欠損症 3 症例における内分泌学的・放射線学的検討.

54th Annual ESPE (European Society for Paediatric Endocrinology) Meeting, 2015.10.1-3, Barcelona, Spain

Namba N, Takakuwa, S, Nakayama H, Yamamoto K, Fujiwara M, Ohata Y, Kitaoka T, Kubota T, Ozono K. Cryptorchidism is commonly observed in Allan Herndon Dudley syndrome.

第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 2014.9.25-27, 浜松

小野英利奈, 大島早希子, 今井祐之, 落合幸勝, 藤原誠, 櫻井舞子, 難波範行, 大園恵一, 宮田市郎. SLC16A2 遺伝子の exon3 内に 5 塩基挿入の新規変異が同定された MCT8 異常症の 1 男児例.

第 56 回日本小児神経学会学術集会, 2014.5.29-31, 浜松

上田理誉, 玉崎章子, 松村渉, 西村祥子, 難波範行, 前垣義弘. MCT8 異常症による甲状腺ホルモン輸送障害の 1 家系.

山崎早苗, 青天目信, 岸本加奈子, 新宝理子, 中野さやか, 岩谷祥子, 富永康仁, 下野九理子, 難波範行, 荒井洋, 酒井規夫, 永井利三郎, 大園恵一. Allan-Herndon-Dudley Syndrome(AHDS) の神経学的特徴

第 51 回日本社会保険医学会総会, 2013.11.07-08, 群馬

赤木幹弘, 小川博子, 矢野節子, 藤原真須美, 橋本達, 櫻井舞子, 藤原誠, 難波範行, 大園恵一. 早期に診断しえた MCT8 欠損症の一例

第 47 回日本小児内分泌学会学術集会, 2013.10.10-12, 東京

小野英利奈, 有賀賢典, 大島早希子, 早川美佳, 今井祐之, 落合幸勝, 宮田市郎, 難波範行, 大園恵一, 井田博幸. 新規遺伝子変異を認めた MCT8 異常症の 2 例における内分泌学的検討.

河野智敬, 小澤綾子, 会津克哉, 小野英利奈, 有賀賢典, 宮田市郎, 浜野晋一郎, 難波範行, 大園恵一, 望月弘. 甲状腺機能検査による Monocarboxylate transporter 8 遺伝子 (MCT8) 異常症のスクリーニングの可能性.

伊達木澄人, 中富明子, 原口康平, 里龍晴, 藤原誠, 難波範行, 大園恵一, 森内浩幸. 重度精神運動発達遅滞の精査で診断された Monocarboxylate transporter 8 異常症の 2 例.

9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology, 2013.09.19-22, Milan, Italy

Fujiwara M, Namba N, Kawai M, Yamamoto K, Miura K, Kitaoka T, Kubota T, Ozono K. Thyroid hormone transporter expression in the murine anterior

pituitary lobe.

Dateki S, Haraguchi K, Sato T, Nakatomi A, Fujiwara M, Sakurai M, Namba N, Ozono K, Moriuchi H. A novel MCT8 mutation in a Japanese patient with Allan-Herndon-Dudley syndrome.

Ono E, Ariga M, Oshima S, Hayakawa M, Imai M, Ochiai Y, Matsushima S, Miyata I, Namba N, Ozono K, Ida H. A case of MCT8 deficiency with a novel mutation in the SLC16A2 gene.

The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo, 2013 . 06 . 15-18 , San Francisco , USA

Ono E , Ariga M , Oshima S , Hayakawa M , Imai M , Ochiai Y , Matsushima S , Miyata I , Namba N , Ozono K , Ida H. Endocrinological investigations in two cases of MCT8 abnormality with novel mutations in the SLC16A2 gene.

第 30 回小児代謝性骨疾患研究会 (Recent progress in pediatric bone disease), 2013.6.2, 大阪

Namba N, Abe S, Abe M, Fujiwara M, Aikawa T, Kogo M, Ozono K. Expression and functional analysis of thyroid hormone transporters in chondrocytes.

第 86 回日本内分泌学会学術総会 , 2013.4.25-27, 仙台

藤原誠、難波範行、川井正信、山本景子、三浦弘司、北岡太一、窪田拓生、大園恵一。下垂体において甲状腺ホルモン negative feedback を担う甲状腺ホルモントランスポーターの検索

21 小野英利奈、有賀賢典、大島早希子、難波範行、今井祐之、宮田市郎、望月弘、大園恵一。新規遺伝子変異を認めた MCT8 異常症の 1 男児例。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

難波 範行 (NAMBA, Noriyuki)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号 : 10379076

### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3)連携研究者

川井 正信 (KAWAI, Masanobu)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・環境影響部門・研究員

研究者番号 : 50598117

北畠 康司 (KITABATAKE, Yasuji)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 80506494

### (4)研究協力者

藤原 誠 (FUJIWARA, Makoto)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 50625697

Mohammad Saiful Islam (ISLAM, Mohammad Saiful)

平成 26 年度より研究協力者