

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860772

研究課題名(和文)サイログロブリンによる甲状腺ホルモン分泌制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of thyroid function controlled by thyroglobulin

研究代表者

吉原 彩 (YOSHIHARA, Aya)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：10439995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺濾胞上皮細胞の機能を一様に調節するTSHとは異なり、濾胞内Tgは個々の甲状腺濾胞機能をnegative feedback機構により調節していると考えられる。このTgの作用はTSHを打ち消すほど強力である。本研究結果によって、濾胞内Tgが甲状腺ホルモン生合成において、これまで不明であったTgを再吸収して加水分解し、甲状腺ホルモンとして分泌する過程においても、遺伝子レベルで調節をしていることが明らかになった。今回の検討により、濾胞内Tgは濾胞腔内の蓄積の程度によって、個々の濾胞におけるホルモン合成、合成したホルモンの蓄積、ホルモンの放出の過程を調節していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Thyroglobulin (Tg) is a potent negativefeedback regulator of follicular function independent of TSH. We reported that Tg controlled the process from transporting of iodine and iodination of Tg in the course of thyroid hormone (TH) biosynthesis. In this study we further elucidated that Tg controlled thyroid specific genes in the period of reabsorption of Tg and outflow of thyroid hormone. Our results indicate that follicular Tg is as an intrinsic regulator of both TH synthesis and TH secretion and transport.

研究分野：内分泌学

キーワード：甲状腺 ホルモン分泌

1. 研究開始当初の背景

甲状腺は一層の濾胞上皮細胞がホルモン前駆体を蓄えたコロイドを取り囲む濾胞という特有の構造をとっており、個々の濾胞が甲状腺の最小機能単位である。全ての濾胞機能の総和としての血中の甲状腺ホルモン濃度は下垂体から分泌される甲状腺刺激ホルモン(TSH)によって一様に調節されている。しかしながら、甲状腺組織切片で個々の濾胞を観察した際には、濾胞ごとの機能は大きく異なっており follicular heterogeneity として知られていた。この点に関して、代表者が所属していたグループは、甲状腺濾胞内に蓄積する thyroglobulin (Tg) が、個々の甲状腺濾胞機能を negative feedback 機構により調節していることを報告してきた。甲状腺ホルモン産生の過程は、ヨードが甲状腺濾胞上皮細胞によってホルモン生合成の場である濾胞腔内に取り込まれて、濾胞内で有機化され、もう一度甲状腺濾胞上皮細胞に再吸収されて加水分解され、甲状腺ホルモンとして、最終的に血中に分泌される。これまでにヨードの取り込みから有機化までの過程に Tg が作用し、甲状腺機能を調節していることを報告してきたが、再吸収から加水分解され甲状腺ホルモンとして濾胞外に放出する過程における Tg の作用は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、甲状腺ホルモン合成過程のうち、甲状腺濾胞上皮細胞への Tg の再吸収から濾胞外への放出までのそれぞれの過程において、甲状腺濾胞内の Tg がどのような作用を持つかを明らかにすることを目的とする。甲状腺における Tg の作用は比較的新しい概念であり、この分野における研究は代表者等のグループが世界に先駆けて行ってきた。Tg の認識機構やシグナル伝達系路など、作用機序の詳細は未だ明らかになっていないが、生理的濃度の Tg の作用は TSH の作用を完全に打ち消すほど強力であることから、これを明らかにすることは甲状腺機能調節のメカニズムの解明に極めて重要である。

3. 研究の方法

濾胞内に蓄積する Tg が、コロイドの再吸収、加水分解、細胞外分泌のそれぞれの過程にどのような影響を与えるかについて明らかにする目的で、ラット甲状腺 FRTL-5 細胞を用いて実験を行った。

1) Tg によって変動する遺伝子およびタンパクの網羅的解析を行った。

Tg がホルモン分泌に与える影響を検討するのに先だって、Tg が甲状腺細胞機能に与える影響を総合的に把握しておくことが重要である。生理的な Tg の濃度は濾胞によって、0.1 mg/ml 程度を下限とし、>100 mg/ml まで大きな幅があるが、培養液に添加可能である 10 mg/ml の Tg を FRTL-5 細胞に添加し、6 時

間および 24 時間後に RNA とタンパクを回収した。コントロールとしてウシ血清アルブミン(BSA)を用い、その結果と比較することによって Tg 特異的に変化する遺伝子を RNA 発現およびタンパクの両面から同定した。

2) 1) で同定された、コロイドの再吸収や加水分解、膜からの輸送に関連するものに関して、個別に realtime PCR や Western blotting でより細かい時間変化を確認した。

Tg 刺激後の時間経過による遺伝子発現やタンパクリン酸化の消長が起こることから、Tg 濃度や観察時間などの条件を変えて実験を繰り返す必要がある。TSH が含まれる培養液に Tg が 0.1, 1, 2, 5, 10 mg/ml になるように添加し、FRTL-5 細胞の観察が可能である 120 時間後まで 6 時間毎に、RNA とタンパクを回収し、realtimePCR や Western blotting を用いて評価した。

4. 研究成果

1) Tg は、甲状腺機能遺伝子を調節する。

Tg によって変動する遺伝子を DNA マイクロアレイによって解析したところ、濾胞内コロイドの再吸収からホルモン放出に関わる甲状腺機能遺伝子のうち、甲状腺ホルモン生合成の過程においてヨードの再利用に関与する Dehal1 の発現が抑制され、甲状腺ホルモン輸送に関わる MCT8、CRYM、LAT1、CD98 の発現が誘導された。これらの結果より、甲状腺ホルモン生合成において、濾胞上皮細胞への再吸収から濾胞外への分泌過程にも Tg が作用して遺伝子レベルで甲状腺機能を調節している可能性が考えられた。

2) 濾胞内 Tg は、甲状腺ホルモン生合成過程において、濾胞上皮細胞への再吸収から TH の濾胞外への放出過程にも作用する。

1) で変動のあった遺伝子、タンパクについて各々検討を行った。0.1~10 mg/ml の種々の濃度の Tg を培養液に添加し、realtime PCR にて評価した。ヨード化された Tg の加水分解によって発生したヨードの再利用に関わる dehal1 は、Tg 濃度依存性に遺伝子発現が低下した。一方甲状腺ホルモンを濾胞上皮細胞から網細血管周囲腔へ放出するトランスポーターの一つである MCT8 と細胞内の甲状腺ホルモン輸送タンパクである CRYM は、Tg 濃度依存性に遺伝子発現が増加した。また、これらの変化は 72 時間にわたって、継続的に見られた。さらに Western blotting を用いて、タンパクの発現について評価をしたところ、遺伝子発現と同様に MCT8 と CRYM のタンパク発現量は増加し、72 時間にわたり変化が継続的にみられた。さらに、甲状腺ホルモン生合成の調節因子である TSH との関係を検討したところ、TSH によって、MCT8 と CRYM の遺伝子発現は上昇したが、Tg によってその作用は打ち消され、両遺伝子ともに発現量が減少することを確認した。(図.1) (Ishido Y

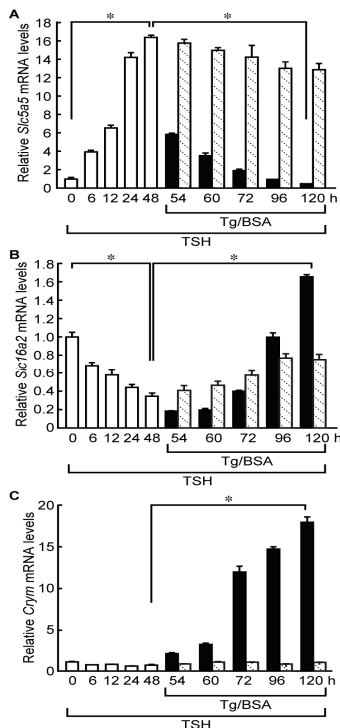


図.1

et al. Endocrine J, 62(11), 1007-1015)。これまでの我々の検討により、甲状腺ホルモン合成過程において、濾胞内 Tg がヨードの取り込みから、Tg の有機化を抑制することが明らかになっている。本研究結果により TH の濾胞外への放出の過程においても濾胞内 Tg が機能調節を行っていることが明らかになった。濾胞内に十分量の Tg が蓄積されることにより、ホルモン合成が抑制されるとともに、甲状腺ホルモンの放出が促進され、個々の甲状腺濾胞機能を調節している可能性が考えられた。

甲状腺濾胞上皮細胞の機能を一様に調節する TSH とは異なり、濾胞内 Tg は個々の甲状腺濾胞機能を negative feedback 機構により調節していると考えられる。この Tg の作用は TSH を打ち消すほど強力である。本研究結果によって、濾胞内 Tg が甲状腺ホルモン合成において、これまで不明であった Tg を再吸収して加水分解し、甲状腺ホルモンとして分泌する過程においても、遺伝子レベルで調節をしていることが明らかになった。今回の検討により、濾胞内 Tg は濾胞腔内の蓄積の程度によって、個々の濾胞におけるホルモン合成、合成したホルモンの蓄積、ホルモンの放出の過程を調節していることが示唆された。

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 1件)

1. Ishido Y, Luo Y, Yoshihara A, Hayashi M, Yoshida A, Hisatome I and Suzuki K. Follicular thyroglobulin enhances gene expression necessary for thyroid hormone secretion. Endocrine J, 62(11), 1007-1015, 2015 DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0263 (査読有)

[学会発表](計 5件)

1. Luo Yuqian, 赤間 剛, 岡山明子, 石藤雄子, 吉原 彩, 小田健三郎, 平野 久, 鈴木幸一: サイログロブリンによる甲状腺機能遺伝子発現抑制に flotillin 脂質ラフトが関与する. 第 19 回日本内分泌病理学会, アバンセ, 佐賀県佐賀市, 2015.10.24

2. Yoshihara A, Sue M, Oda K, Ishido Y, Luo Y, Hiroi Y, Suzuki K. Different effects of PTU and MMI on thyroid-specific gene expression. 15th International Thyroid Congress, Orlando, USA, 2015.10.21, 22

3. 吉原 彩: 濾胞内サイログロブリンによる血中への甲状腺ホルモン分泌制御に関する研究. 第 57 回日本甲状腺学会学術集会, ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター, 大阪府大阪市, 2014.11.14

4. 石藤 雄子, Luo Yuqian, 吉原 彩, 鈴木幸一: 甲状腺濾胞からのホルモン分泌に対する濾胞内サイログロブリン(Tg)の作用. 第 57 回日本甲状腺学会学術集会, ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター, 大阪府大阪市, 2014.11.14

5. Yuqian Luo, 石藤雄子, 吉原 彩, 小田健三郎, 山崎和子, 神森 眞, 杉下佳之, 山田恵美子, 山田 哲, Donald F. Sellitti, 鈴木幸一: 甲状腺腫および甲状腺癌細胞はサイログロブリン(Tg)による遺伝子発現調節機構から逸脱する. 第 18 回日本内分泌病理学会, 都道府県会館, 東京都千代田区, 2014.11.1

[図書](計 0件)

なし

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

なし

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
吉原 彩 (YOSHIHARA, Aya)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：10439995

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし