

氏名	谷村 優太		
博士の専攻分野の名称	博士（医科学）		
学位記番号	医工農博甲 第49号		
学位授与年月日	令和3年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
専攻名	人間環境医工学専攻		
学位論文題名	甲状腺刺激ホルモン (TSH)による Slc26a7 の発現調節機構の解明 Regulation of solute carrier family 26 member 7 (Slc26a7) by thyroid stimulating hormone in thyrocytes		
論文審査委員	委員長	教授	森石 恆司
	委員	准教授	古屋 文彦
	委員	准教授	中村 勇規

学位論文内容の要旨

【目的】

ヨードは甲状腺ホルモンの生合成に必須であり、ヨードの低下が甲状腺機能低下症の原因となる。甲状腺は一層の上皮細胞で囲まれた濾胞構造を持ち、血中から濾胞へヨードを輸送し甲状腺ホルモンT₃、T₄を生合成している。ヨードの取り込みは主に濾胞上皮細胞の基底側にあるナトリウム/ヨウ素イオン共輸送体SLC5A5 (NIS; solute carrier family 5 member 5)を通して濾胞上皮細胞内に輸送し、内腔側の陰イオン交換体SLC26A4 (pendrin)やヨードチャンネルなどによって濾胞腔内に運ばれる。近年、先天性甲状腺機能低下症の原因遺伝子として同定されたSLC26A7が、濾胞上皮細胞内腔側に発現する新たなヨードトランスポーターであることが明らかになった。しかし、甲状腺におけるSLC26A7の発現調節機構については、未だ不明な点が多い。

本研究では、甲状腺ホルモン生合成に必要な多くの遺伝子発現を転写レベルで誘導を促す甲状腺刺激ホルモン (TSH)が、Slc26a7の発現調節や細胞内局在に与える影響について、甲状腺のヨードトランスポーターであるSlc5a5、Slc26a4と比較しながら検討を行った。

【方法】

ラット由来の甲状腺細胞株FRTL-5細胞を用いて、以下の1), 2), 3)の検討を行った。

- 0.01-1 mU/mLのTSHを培養液にそれぞれ添加し、TSHの濃度変化および6-24hの経時変化によるSlc26a7、Slc26a7、Slc26a4の遺伝子発現をreal-time PCRで評価した。また、TSHシグナルの下流にあるアデニル酸シクラーゼを活性化するforskolin、cyclic AMP誘導体であるdibutyryl cAMP (dbcAMP)によるSlc26a7、Slc26a7、Slc26a4の遺伝子発現も同様に解析した。さらに、TSH、forskolin、dbcAMPによるSlc26a7のタンパク質の発現をWestern blottingで評価した。
- TSH/cAMPシグナルがSLC26A7の転写調節の影響を調べるために、SLC26A7遺伝子の5'フラン

キング領域をPCRで増幅し、pGL3-Basicに組み込みレポータープラスミドを作製し、ルシフェラーゼアッセイによって*SLC26A7*のプロモーター活性を評価した。

3) *Slc26a7* の細胞内局在を明らかにするために、1 mU/mL の TSH を加え、*Slc26a7* の免疫蛍光染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で細胞内局在の変化を観察した。

【結果】

本研究により、大きく以下の結果が得られた。

1) *Slc26a7*の発現は、TSH、forskolin、dbcAMPにより抑制される。

FRTL-5細胞を用いてTSHによる各ヨードトランスポーターの遺伝子発現をreal-time PCRで評価した結果、*Slc26a7*、*Slc26a4*遺伝子発現はTSH濃度依存性に抑制された。一方、*Slc5a5*の遺伝子発現は、TSH濃度依存性に誘導された。Forskolin、dbcAMP添加においても、TSHと同様に*Slc26a7*遺伝子発現は濃度依存性に抑制された。さらにWestern blottingを用いて、タンパク質の発現を評価した結果、TSH、forskolin、dbcAMPによって*Slc26a7*のタンパク質発現は濃度依存的に抑制された。

2) *SLC26A7*プロモーター活性は、TSH/cAMPシグナルの活性化により抑制される。

TSH、forskolin、dbcAMPによって、*SLC26A7*の5' -2,207から-1,653のプロモーター領域で活性の抑制が確認された。PROMOおよびCiiiDERを用いて解析した結果、甲状腺転写因子であるNKX2-1 (TTF-1)の結合領域に位置していることから、他の甲状腺特異的遺伝子の転写制御と類似して、TSH/cAMPシグナル伝達の影響を介して*SLC26A7*プロモーター活性を制御していることが示唆された。

3) *Slc26a7*タンパク質はTSHにより核近傍から細胞膜へ局在する。

TSH非存在下の培地では、*Slc26a7*タンパク質が核の近傍に分布しているが、TSHにより、*Slc26a7*は6-12hで核周辺から細胞質に移動し、その後24-120hで細胞膜に局在が変化した。

【考察】

TSH、forskolin、dbcAMPによって*Slc26a7*の発現が抑制され、3つのNKX2-1結合部位を含む*SLC26A7*プロモーター活性も抑制されることから、TSH/cAMPシグナルの活性化による*SLC26A7*プロモーター活性の抑制は、NKX2-1の発現抑制を媒介していることが示唆された。また、これまでの研究でTSHによって*Slc26a4*の細胞膜局在が誘導されることが示されていたが、本研究により*Slc26a7*においても同様の結果が得られたことから、TSHによる細胞内局在の変化は、*Slc26a7*の遺伝子やタンパク質発現の調整に加え、ヨード輸送能を活性化していることが示唆された。これらの結果は、TSHによる*Slc26a7*の発現調節機構とトランスポーター機能等の甲状腺の生理機能の解明につながるものである。

【結論】

FRTL-5細胞において、TSH/cAMP刺激により*Slc26a7*は遺伝子、タンパク質発現ともに抑制され、*SLC26A7*プロモーター活性も抑制されることを明らかにした。一方で、TSH刺激により*Slc26a7*は細胞膜に局在が誘導され、ヨード輸送能の活性化を示唆する結果を示した。

論文審査結果の要旨

1. 学位論文研究テーマの学術的意義。

ヨウ素は甲状腺ホルモンを構成する必須因子である。甲状腺へのヨウ素の輸送は Iodine transporter が担っており、甲状腺の濾胞内外の Apical 側に複数の Iodine transporter は局在している。それらが濾胞内のヨード濃度を調節し、甲状腺ホルモン生成をコントロールしている。Iodine transporter である SLC5A5 や SLC26A4 の発現機序の詳細は多くの論文で報告されているが、近年同定された SLC26A7 の発現調節機序に不明な点が多い。本論文では、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 刺激によって SLC26A7 の転写レベルが減弱し、形質膜へ局在化することを明らかにしている。甲状腺ホルモンに起因する疾患の予防診断治療を考える上で、意義あるテーマであると思われる。

2. 学位論文及び研究の争点、問題点、疑問点、新しい視点等。

TSH 刺激によって、TSH 受容体下流の Adenylate cyclase が活性化し、cyclic AMP の産生が亢進する。甲状腺細胞株 FRTL-5 に対して TSH、Forskolin あるいは dbcAMP 処理すると、SLC26A7 の mRNA 産生の低下がみられた。また、SLC26A7 のプロモーター領域によるレポーターアッセイを行ったところ、TSH、Forskolin あるいは dbcAMP の処理によってプロモーター活性が減弱した。また、SLC26A7 は定常状態時で核近傍に局在しており、TSH 刺激によって形質膜 (Apical 面) に局在が変化した。以上のことから、TSH は TSH 受容体に結合し、cyclic AMP 産生亢進を通じて SLC26A7 の転写を抑制し、SLC26A7 自体の Apical 面への局在化を誘導することが示唆された。

3. 実験及びデータの信頼性。

適正に実験されており、データの信頼性は高いものと思われる

4. 学位論文の改善点、等々。

TSH によるトランスポーター活性の変動、TSH 受容体下流の責任転写因子の同定と機能解析、*in vivo* 試験などに関して、より詳細な実験データが必要と思われる。しかしながら、TSH による SLC26A7 の転写調節および空間的調節という重要な知見を含んでおり、当該領域に有用であると思われる。委員との討議の結果、谷村優太氏の博士論文は学位に値するという結論に至った。