

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

小田健三郎より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 567 号

学位申請者 : お 小 田 健 三 郎

学位審査論文 : Follicular thyroglobulin induces cathepsin H expression and activity in thyrocytes

(濾胞内サイログロブリンは甲状腺細胞におけるカテプシン H の発現および活性を誘導する)

著 者 : Kenzaburo Oda, Yuqian Luo, Aya Yoshihara, Yuko Ishido, Kengo Sekihata, Kensei Usukura, Mariko Sue, Naoki Hiroi, Takahisa Hirose, Koichi Suzuki

公 表 誌 : Biochemical and Biophysical Research Communications

論文内容の要旨 :

【背景】甲状腺は一層の濾胞上皮細胞がホルモンの前駆体であるサイログロブリン(Tg)を蓄えたコロイドを取り囲むという特徴的な濾胞構造をとっており、これが甲状腺の最小機能単位を構成する。甲状腺刺激ホルモン(TSH)は濾胞周囲の密な毛細血管網から各濾胞に均一に供給されているが、組織切片で見る遺伝子発現やコロイド内のホルモン前駆体の濃度は濾胞ごとに大きく異なっており、follicular heterogeneity として知られていた。このような現象に対し、コロイド内に蓄積する Tg が、TSH の作用を打ち消すほどの強い生理作用で個々の濾胞機能を調節しているという「濾胞内 Tg による濾胞機能自己調節モデル」が我々の研究グループにより報告されてきた。個々の濾胞は、ヨード取り込みとホルモン生合成という内向きの輸送機構と、コロイドの再吸収とホルモン合成という外向きの輸送機構を持つ。これまでにヨード輸送やホルモンの合成に関わる sodium/iodide symporter (NIS)、Tg、thyroid peroxidase (TPO)、dualoxidase2 (Duox2) 等の甲状腺特異的な遺伝子発現は、濾胞内 Tg の濃度依存性に転写レベルで強く抑制されることが明らかとなっている。一方で、コロイドの再吸収から濾胞外へのホルモン分泌に対する Tg の作用としては、ホルモン輸送に関わる monocarboxylate transporter 8 (MCT8) や  $\gamma$ -crystallin (CRYM) の発現を増加させるとの最近の我々の報告があるに過ぎない。今回我々は、濾胞内に蓄積した Tg が、コロイド再吸収後のライソソームにおける加水分解酵素であるカテプシンに影響を与えるか否かについて検討を行った。

【方法】ラット甲状腺 FRTL-5 細胞に濾胞内濃度の Tg を添加して培養し、カテプシンの遺伝子発現量およびタンパク発現量を、

それぞれリアルタイムPCR、ウェスタンブロッティングを用いて評価した。酵素活性は、AFC (amino-4-trifluoromethyl coumarin) 標識基質を使用し、サンプル中のカテプシンHによって切断され遊離したAFCを、蛍光プレートリーダーで定量的に測定した。また、Tg添加後のカテプシンの細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

**【結果】** Tgの添加によって、FRTL-5細胞におけるカテプシンHの遺伝子発現量、タンパク発現量および酵素活性は、濃度依存性および経時的に増加した。一方、カテプシンB、D、K、LはTg添加後も有意な変化を示さなかった。また、未刺激時には細胞質内に均一に分布していたカテプシンHが、Tgの添加により顆粒状に集合し、一部がライソソームおよびTgと共局在することが観察された。

**【考察】** これまでの報告により、ホルモン合成に関わる内向きの輸送機構は全て濾胞内に蓄積するTgのネガティブフィードバック作用により抑制され、当該濾胞がホルモン合成を止めて分泌フェーズへと移行することを示唆していた。今回得られた結果は、そのような濾胞において、ホルモン分泌に必要なTgの加水分解がTgそのものの作用によってカテプシンHの発現量と活性の増強を介して誘導されることを示すものであった。すなわち、濾胞内に充分量のTgが蓄積すると、その濾胞ではそれ以上のホルモン合成は必要ないために新たなホルモン合成は抑制され、逆にそのようなホルモン前駆体濃度が高い濾胞から効率良く再吸収されたコロイドから、加水分解によってホルモンを遊離し分泌する機構が活性化するというダイナミックな調節が、濾胞内に蓄積するTgによって行われていることが明らかとなった。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 567 号	氏 名	小 田 健 三 郎
学位審査担当者	主 査	龍 野 一 郎
	副 査	川 合 眞 一
	副 査	池 田 隆 徳
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	赤 坂 喜 清

学位審査論文の審査結果の要旨 :

甲状腺は一層の濾胞上皮細胞がサイログロブリン(Tg)を蓄えたコロイドを取り囲む濾胞構造をとり、甲状腺の最小機能単位となっている。しかしながら、各濾胞での遺伝子発現やコロイド内のホルモン前駆体の濃度は濾胞ごとに大きく異なっており、follicular heterogeneity として知られており、研究者らのグループは「濾胞内 Tg による濾胞機能自己調節モデル」も提唱し、明らかにしてきた。濾胞はヨード取り込みとホルモン生成という内向きの輸送機構とコロイドの再吸収とホルモン合成という外向きの輸送機構があり、ヨード輸送やホルモンの合成に関わる sodium/iodide symporter (NIS)、Tg、thyroid peroxidase (TPO)、dualoxidase2 (Duox2)等の甲状腺特異的な遺伝子発現が Tg によって、強く抑制され、一方 ホルモン輸送に関わる monocarboxylate transporter 8 (MCT8)や crystallin (CRYM)の発現が増加することを報告してきている。本研究では Tg のコロイド再吸収後のライソソームにおける加水分解に重要な酵素でカテプシンへの影響をラット甲状腺 FRTL-5 細胞を用いて検討している。Tg は FRTL-5 細胞におけるカテプシン H の遺伝子発現量、タンパク発現量および酵素活性は、濃度依存性および経時的に増加した。一方、カテプシン B、D、K、L は Tg 添加後も有意な変化を示さなかった。また、未刺激時には細胞質内に均一に分布していたカテプシン H が Tg により顆粒状に集合し、一部がライソソームおよび Tg と共局在することが観察された。この結果から濾胞においてホルモン分泌に必要な Tg の加水分解が Tg そのものの作用によってカテプシン H の発現量と活性の増強を介して制御を受けている可能性を示すものであり、濾胞内に充分量の Tg が蓄積すると、その濾胞ではそれ以上のホルモン合成が必要ないために新たなホルモン合成は抑制され、逆にそのようなホルモン前駆体濃度が高い濾胞から効率良く再吸収されたコロイドから、加水分解によってホルモンを遊離し分泌する機構が活性化するというダイナミックな調節が、濾胞内に蓄積する Tg によって行われる可能性を明らかにした。

平成 29 年 1 月 24 日に行われた学位審査会において、本研究のベースとなる甲状腺のホルモン分泌機構、サイログロブリンの作用機構、TSH 刺激との使い分け、カテプシン K に注目した理由、カテプシン K の細胞内挙動、サイログロブリンによる甲状腺ホルモン産生制御の生理学的意義、臨床医学的意義、また 本研究の限界などへの質問に的確に答えた。

本研究は甲状腺における甲状腺ホルモン分泌に当たって Tg のコロイド再吸収後のライソソームにおける加水分解に重要な酵素でカテプシンの制御機構を新たに見出し、新たな濾胞内 Tg による濾胞機能自己調節機構を初めて明らかにした重要な研究である。

審査員一同は小田氏に十分な学識があることを確認し、学位に値する研究内容であると評価した。