

甲状腺ホルモン：多様な受容体を介した多様な働き

ジャック サマリユ

フランス 国立高等師範学校リヨン校

まず、私にデータのプレゼンテーションを行う機会と昨日および本日の非常に興味深いプレゼンテーションを聞く機会を与えてくださったこの会合の主催者の方々に深い感謝の意を表したいと思います。

妹尾博士は甲状腺ホルモン受容体の多様性を紹介されました。私は、主に哺乳動物における TR α と TR β の2つの遺伝子のそれぞれが、受容体の多数のアイソフォームを含んでいることを強調したいと思います。我々は、ノックアウト法の作成によりこれらの受容体の役割を明らかにすることにこの数年間関心を寄せてきました。

本日は、まず、これらノックアウトを用いた研究から我々が学んだことの概要をお見せしたいと思います。そして私の講演の2つ目のパートでは、マウスにおいてこれら受容体が *in vivo* で甲状腺ホルモンの存在下および欠如下でどのようにして機能を発揮しているのかをご覧ください。アイソフォームの大部分のノックアウトは、その大半が世界の3つの研究室によって行われてきました。Karolinska Institute (スウェーデン)の Bjorn Vennström の研究室、ニューヨークの Douglas Forrest の研究室、それと我々の研究室です。

これらの研究から得られた2つの主要な結論は、第1に、TR α と TR β の何れも胚期または後胚期発生には必要でないことです。そのことはダブルノックアウトのマウスについて言えることですが、これらマウスは生存可能であり、成熟した状態に達することができます。それらマウスが良好な状態にあるとは言えませんが、少なくとも実験室環境で生存しています。

第2に学んだことは、この2つの受容体の何れも発生で異なる役割を果たしていることです。そのことは、これらの2つの受容体に分岐した後、ごく初期から、それぞれの受容体が非常に特異的な機能を獲得したことを強く示唆しています。

マウスの発生と生理の何にそれぞれの受容体が関わっている可能性を要約すると、TR α は主に体の成長と骨の成熟に関与しています。従って、TR α をノックアウトした動物は骨成熟に著しい遅延が現れ、B細胞の発達に異常を来します。

しかし、付け加えておかなければならないのは、出生直後に脾臓と造血作用に若干の異常を来し、腸の発達に顕著な変調を呈し、基礎心拍数が減少し、糖代謝に若干の変調が生じ、そして興味深いことに、これら TR α ノックアウトマウスが糖尿病を示すことです。

TR β ノックアウトマウスは、聴覚ならびに色覚の発達にいくつかの変調を生じ、心刺激に関して甲状腺ホルモンに反応せず、コレステロール代謝に変調が見られます。

ダブルノックアウトでのみ変調する機能がいくつかあり、これは脳下垂体における成長ホルモンの生産で、ダブルノックアウトでのみ生産が停止し、体温の著しい調節不能が見られます。また、ダブルノックアウト動物は中枢神経系にいくつかの著しい変調を呈します。主に出生後の小脳の発達で、成熟したニューロンを供給する小脳の外顆粒層の発達に変調が生じます。

さらに、視神経におけるオリゴデンドロサイトの分化が不十分で、網膜の変性に至ることがあります。さらに、TSH の生産の調節に著しい変調が見られます。TR β および特に TR β -2 は、主に TSH 生産の制御に関わっている受容体です。しかし、ダブルノックアウト動物の知見から、このフィードバック調節プロセスでは TR β に関連して TR α も作動している可能性があるかと結論しなければなりません。

先ほど申し上げました通り、TRs は2つの方法でターゲット遺伝子の基礎的転写を調整しています。まず、甲状腺ホルモンの存在下では、リガンド結合型受容体はこれらの遺伝子の強力な活性体として機能し、甲状腺ホルモンの欠如下では、いわゆるアポレセプターが抑制体として機能しています。従って、これらの受容体は明らかにターゲット遺伝子に対する可逆的なスイッチの役割を果たしています。

この抑制作用は、哺乳類および細胞のトランスフェクションに関する *in vitro* 研究で明らかにされており、我々はそれがマウスの発生に生理学的意味があるかどうかを知りたいと思いました。この問題を解くため

に、我々は *in vivo* でこのアポレセプターがどのような機能を果たしているかを理解するための遺伝子的手法を開発しました。

その目的のために、我々は先天性甲状腺機能低下症のマウスをモデルにしました。そしてこれが *pax8*^{-/-} モデルです。*pax8* 遺伝子は甲状腺特異的転写因子をコードしており、ヒトにおける突然変異は先天性甲状腺機能低下を招くことが示されています。

Pax8 ノックアウトマウスは、Peter Gruss のグループが開発しました。これらのマウスでは甲状腺の濾胞細胞の発達が見られず、その結果、甲状腺機能低下のみを呈し、通常、離乳期に死亡しますが、出生直後に T4 を注射することにより延命できます。

この甲状腺機能低下症モデルは非常に興味深いモデルです。なぜなら、化学物質を注射する必要がなく、出生以降の生存期間の全体にわたり甲状腺機能低下を呈しているからです。

我々は、甲状腺ホルモンをまったく産生しないが受容体は依然として産生するこれらの先天性甲状腺機能低下症マウスの表現型を、受容体はないがホルモンを生産するダブルノックアウトマウスの表現型と比較したいと考えました。その比較のため、ホルモン投与により強く影響を受ける骨、脾臓、および腸の3つの異なる組織を観察しました。

最初に、骨の発達を観察すると、これは野生型ですが、ここではこのパネルをご覧ください。先天性甲状腺機能低下症マウスを見ると、骨形成に著しい変調があるのが分かります。例えば、ここの膝関節では、野生型と比べると骨形成の徴候がまったく見られません。次にダブルレセプターノックアウトを見ると、中間的な状況にあり、遅れてはいますがまばらな骨形成が見られます。

Pax8 ミュータントに見られる脾臓の発達を観察すると、脾臓はほぼ完全に無形成であり、これらの組織から塗抹標本を作成すると、造血細胞はまったく観察できません。ここでもダブルレセプターミュータントは中間的表現型を示しており、この脾臓には若干の造血作用がありますが、野生型と比較すると著しく低下しています。しかし、先天性甲状腺機能低下症マウスほど徹底的な抑制はありません。

腸について説明します。これらは腸の切片です。ここに示しているのは、腸上皮の基部にある陰窩の中で分裂している細胞で、これら分裂中の細胞は特異的抗体で染色しています。ご覧の通り、これらの *Pax8* ミュータントでは、分裂中の細胞の数は著しく減少しています。ダブルレセプターノックアウトの状況と比較すると、ここでもダブルレセプターノックアウトには野生型と先天性甲状腺機能低下症ミュータントとの中間的な表現型が見られます。

ここでご覧頂きたいのは、これらのミュータントに甲状腺ホルモンを注射すると、注射から 48 時間後に陰窩におけるこれら前駆細胞の増殖を回復させることができることです。

これは細胞の数ですが、先ほどご覧頂いたものを定量化したものです。このパネルをよく見ると、野生型ではここで細胞数が急増しているのが分かります。ご覧の通り、甲状腺機能低下症ミュータントには著しい低下があります。甲状腺ホルモンを投与すると、増殖を若干修復することができます。ここにあるのはダブルレセプターミュータントで、甲状腺機能低下症ミュータントと野生型との中間的表現型であることを示しています。

これらすべてのデータは、甲状腺ホルモンの完全な欠如が甲状腺ホルモン受容体の完全な欠如よりもはるかに有害であることを示しています。どのようにそれを説明することができるのでしょうか。

アポレセプターモデルをもとに、我々は、甲状腺ホルモン受容体の欠如下では、ターゲット遺伝子はある程度の基礎的な転写レベルを維持しており、そのことが一部の必須遺伝子が基礎的濃度で発現することを可能にしており、そのため軽度の表現型の形成が導かれるのだろうと考えました。

一方、甲状腺ホルモンの欠如下では、受容体はアポレセプターとして機能して、ターゲット遺伝子の転写を強力に抑制するため、必須遺伝子の発現を完全に抑制し、そのために次に非常に著しい表現型が導かれるのだろうと考えました。

この考えが正しいならば、甲状腺ホルモンの欠如下で受容体の発現を止めることができれば、表現型を部分的に回復させることが可能なはずで、従って、我々は、*pax8*^{-/-} の遺伝的背景の中でそれぞれの受容体を欠失させることを試みました。そこで我々が予測しているのは、一部の必須遺伝子が基礎的濃度で転写を復活して、それにより軽度の表現型が発現するという事です。

まず、複合動物の生存を見てみましょう。先ほどお話しましたが、*pax8*^{-/-}動物は生後1週間に達する前にすべて死亡し、すべて生存するダブルレセプターノックアウトとは対照的です。これら甲状腺機能低下症ミュータントに甲状腺ホルモンを短期投与すると、ほぼ50%の動物を救うことができ、それらの動物は生存することが可能です。

このような背景では、 β 受容体欠失を誘導すれば、動物の生存可能性は向上できません。一方、 α 受容体欠失を誘導すれば、ご覧の通り、少なくとも60%の動物の生存可能性を回復させることができます。従って、この甲状腺機能低下症ミュータントの生存可能性は、*TR α* 遺伝子欠失を誘導することにより、明らかに回復します。

次に、すべての組織の表現型を観察しましょう。再びこれは甲状腺機能低下症動物の無形成脾臓です。これらの動物で β 受容体欠失を誘導すると、何の改善もありません。しかし、 α を欠失させれば、ご覧の通り、造血機能を著しく回復させることができます。

骨について説明します。ここでもこれら *Pax8* ミュータントでは骨形成が見られません。 β 欠失を誘導しても、改善はまったくありません。次に α 受容体欠失を誘導すると、骨形成が著しく回復します。

次は腸です。このパネルをよくご覧ください。これは腸陰窩で増殖している細胞数です。これは甲状腺機能低下症ミュータントです。 β 受容体欠失を誘導しても、細胞の増殖には顕著な改善は見られません。 α 受容体の欠失を誘導すると、増殖する細胞数が著しく回復します。

これらすべてのデータは、*TR β* 遺伝子ではなく、*TR α* 遺伝子を不活性化すると、この先天性甲状腺機能低下という遺伝的背景において必須機能の顕著な回復を誘発させることを示しています。何がその分子的基础となっているのでしょうか。

もちろん、説明の一つは、*TR* アポレセプターが甲状腺機能低下症ミュータントにおいて必須遺伝子の発現を阻止しているかもしれないということです。この問題を解くために、我々は *TR α* 受容体のターゲットである可能性のあるいくつかの遺伝子を観察しました。

残念ながら、先ほど言及した3つの組織にそのようなターゲット遺伝子があるかどうか分かっていません。そこで、別の遺伝子に焦点を置きました。それは *HCN2* 遺伝子で、この遺伝子は特に心臓においてコード化されており、最近 Wolfgang Dillmann のグループが *TR α* により制御されている遺伝子であることを確認しています。この遺伝子は、ペースメーカー機構の構成要素の1つであるタンパクをコード化しています。

我々は、*mRNA* を数量化することにより、この遺伝子の心臓における発現を観察しました。これは野生型の *mRNA* のレベルです。ダブルレセプターノックアウトではあまり差はありません。そして恐らくこの濃度はこの動物の定常状態におけるある程度の基礎濃度を表しています。

逆に *Pax8* 甲状腺機能低下症ミュータントでは、この遺伝子の発現はほぼ完全に阻止されています。この動物に甲状腺ホルモンを投与すると、48時間以内にこの遺伝子の発現が強力に活性化されます。

このような背景で β 受容体の欠失を誘導しても、遺伝子発現は修復されません。しかし、 α の欠失を誘導すると、遺伝子発現は基礎濃度のある程度回復します。このことは、*TR α* アポレセプターが、*in vivo* でいくつかの必須遺伝子に対して転写リプレッサーとして作用していることをはっきりと示唆しています。

以上を要約すると、出生後の初期段階の離乳期には *Pax8* 先天性甲状腺機能低下症ミュータントはすべて死に至ることが観察されるということです。この期間に甲状腺ホルモンを短期投与すれば、これらの動物の回復が誘導できます。これらの動物で *TR β* 遺伝子を欠失させると、改善は見られません。逆に、 α 受容体を欠失させると、延命させることができます。

このことは、この先天性甲状腺機能低下という環境で著しく有害であるのは、 α 受容体であることを明らかに示しており、この期間にアポレセプターが出生後の発達に不可欠な遺伝子の発現を遮断していることを強く示唆しています。

興味深いことに、マウスの正常な発達では、この出生後の期間に血中甲状腺ホルモンの著しいピークがあります。この高濃度の血中ホルモンがどのような機能を果たしているかという点、このアポレセプターを活性のある受容体に変えることです。それにより、この受容体は、この期間に発達しなければならない骨、腸管、造血作用、中枢神経系などの多くの臓器において遺伝子の発現を誘導できるようになります。

我々が提唱するのは、出生後の発達に關与している特定の遺伝子の発現を起動させるメインスイッチの役割を TR α が果たしていることです。次の問題は、この出生後の初期に甲状腺ホルモンで起動される遺伝子とは何だということなのです。

この問題を解くために、我々は、NIH の Paul Meltzer と Paul Yen のグループと共同してこれらの実験計画を準備しました。我々は甲状腺機能正常、甲状腺機能亢進、PTU、または PTU+T3 の処理を行ったすべてのミュータントマウスを使用しました。これらのマウスから組織を分離し、マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現について調査しました。

いくつかの予備データは、例えば、肝臓では少なくとも 60 の遺伝子がこの時期に活性化され、ほぼ 30 の遺伝子が抑制されていることを示しています。例えば、小脳では、ここに活性化された一連の遺伝子があります。興味深い事に、サイクリン D2 は、ニューロンの成熟に必要な不可欠な役割を果たすことが分かっています。また、一連の遺伝子がこれらの組織で特異的に抑制されています。

このモデルを使用して現在我々が行いたいことは、出生後の初期にこれらの動物のほぼすべての組織において生じる T3 に応答した遺伝子発現の完全なパターンを明らかにすること、および、TR α と TR β の特異的なターゲットとなっている遺伝子を同定することです。

重要な点は、ここでご覧頂いたものは、*in vivo* のマウスでは apo-TR α (アポレセプター状態にある TR α) がリプレッサーとして作用しており、TR α が新生仔期における T3 を介した発達上のプロセスのメインスイッチであるということなのです。

我々は、TR α が、カエルにおける報告と同様に、哺乳類における若干の変態様プロセスを制御しているに違いないと考えます。また、「恐らく我々ヒトも若年期に若干の変態プロセスを経ている」と言ってもおかしくはないと思います。

また、このアポレセプター機能のため、我々は T3 の局所的濃度を考慮することが必要です。恐らく、T3 のアベイラビリティまたは局所的デリバリーが、遺伝子発現の調節に非常に重要な機序の 1 つであり、恐らく、T3 の局所的濃度が、組織における発達上の調節および生理学的調節の決定因子であると考えられます。

このことは、同じくこの TR アポレセプター作用の結果の 1 つであり、我々がヒトにおける TR α のドミナントネガティブな突然変異をまだ発見できていない理由を説明するものではないでしょう。

TR α と TR β は哺乳類の発達で明らかに異なる機能を果たしています。TR α は発達の途中でアポレセプターからホロリセプターへ切り替わります。TR α は、これらの組織の出生後の発達とある種の変態を作動させるスイッチを制御しており、一方、TR β は、その後様々な組織でかなり専門的な機能を果たしているに違いありません。

これらのモデルは、同じく内分泌攪乱化学物質の様々なターゲットも提供します。例えば、この期間に、いくつかの内分泌攪乱化学物質が TR α への甲状腺ホルモンの結合を阻害したり、TR α をアポレセプターの状態を維持したりすることが想像できます。

また、このような化学物質の結合が、TR α へ構造的な結合になり、TR α をドミナントネガティブ受容体に変換する可能性があることも想像できます。さらに、これらすべての機序が、いくつかの内分泌攪乱化学物質による攪乱のターゲットであるに違いありません。いくつかの内分泌攪乱化学物質はこれらの受容体の機能を過剰に活性化したり、不可欠な発生プロセスのためのこれら受容体の機能を阻害したりしているのではないのでしょうか。

研究に参加した研究者に感謝の意を表したいと思います。本日ご覧頂いた研究の大半は、我々の研究室の Frederic Flamant、Anne-Lise Poguet、および 2 名の日本人ポスドクが実施しました。また、研究の一部は、信州大学の橋爪教授のグループと共同で実施しました。ご清聴ありがとうございました。

質疑応答

妹尾：サマリユ博士、どうもありがとうございます。時間があまりありませんので、1つだけ質問をお受けしたいと思います。はい、どうぞ。

質問：甲状腺ホルモン受容体 α と β には異なる役割があるとのことですが、私は臓器に特異的な発現が生じて異なる役割を果たしていると言明できると思います。恐らく、甲状腺ホルモン受容体 α はあらゆる場所で発現するため、甲状腺ホルモン受容体 α のノックアウトが作用を減弱させたのではないのでしょうか。従って、発現パターンがあなたの結果の説明となるのではないのでしょうか。そのような説明は可能でしょうか？

サマリユ：いくつかの組織では可能性があるでしょう。しかし、あなたがおっしゃった通り、TR α は

ほとんどどこでも発現します。 α と β の両方が同時に発現する組織はたくさんあります。従って、私は2つの受容体が同時発現することがすべてを説明するわけではないと思います。

質問：タンパクはどうですか？ ウェスタンブロット法でタンパク濃度を調べましたか？

サマリユ：いいえ。RNAについては調べました。我々自身、タンパクについては経験がありません。なぜなら、特にTR α については、良い抗体がないからです。さらに、タンパクの発現濃度は非常に低いと考えられるからです。

妹尾：どうもありがとうございます。