

Title	軟骨細胞における甲状腺ホルモントランスポーターに 関する検討
Author(s)	阿部, 早苗
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57602
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、〈a href="https://www.library.osaka- u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

# Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

なえ 名 阿 部 卓 氏

博士の専攻分野の名称 博士(歯学)

学 位 記 番 号 第 23721 号

学位授与年月日 平成22年3月23日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

**南学研究科統合機能口腔科学専攻** 

学 位 論 文 名 軟骨細胞における甲状腺ホルモントランスポーターに関する検討

- [1]

論 文 審 査 員 (主査)

教 授 古郷 幹彦

(副香)

教 授 豊澤 悟 講 師 山田 聡 講 師 佐伯万騎男

# 論文内容の要旨

【背景】 甲状腺ホルモン受容体は核内受容体であり、甲状腺ホルモンが作用を発揮するためには細胞 内に取り込まれる必要がある。従来、甲状腺ホルモンは細胞内に受動的に取り込まれると考え られていた。また、甲状腺ホルモンの細胞内取り込みに関与するとされるトランスポーターの 報告はあったものの、これらのトランスポーターはアミノ酸など他の物質に対する親和性も高 く、甲状腺ホルモンの細胞内取り込みの機序は不明であった。

ところが、2003 年に MCT8 (monocarboxylate transporter 8)が甲状腺ホルモンに特異的なト ランスポーターであることが報告された。さらに 2004~2005 年には、X 染色体連鎖性の精神発 達遅滞をきたす AHDS (Allan-Herndon-Dudley Syndrome)が、MCT8 の変異により発症するこ とが報告された。AHDS は重度の精神運動発達遅滞を主症状とした様々な症状を示すが、甲状 腺ホルモントランスポーターである MCT8 の機能は低下しているにもかかわらず、成長障害は 軽度である。

一方、未治療の先天性甲状腺機能低下症 (クレチン症)は甲状腺ホルモン作用の欠乏により軟 骨内骨化が障害され、骨伸長や仮骨中心の発現が遅延し、重度の成長障害をきたす。すなわち、 小児の成長には軟骨の正常な増殖と分化が必要であり、甲状腺ホルモンは軟骨細胞の増殖を抑 制し、分化を促進することにより、軟骨細胞を制御していると考えられている。

AHDS は成長障害が軽度であることより、軟骨細胞では MCT8 以外の甲状腺ホルモントラン スポーターが機能していると考えられるが、軟骨細胞におけるトランスポーター発現の詳細は 不明である。

【目的】 軟骨細胞における主要な甲状腺ホルモントランスポーターの同定

# 【方法】

① ATDC5 細胞における甲状腺ホルモントランスポーターの発現の検討

マウス由来軟骨前駆細胞株 ATDC5 を DMEM・F-12 HAM、5% FBS、1% ITS (Insulin-Transferrin-Selenium)下で培養し、得られた total RNA から RT によって cDNA を合 成した。甲状腺ホルモントランスポーターとして現在までに報告のある 20 種について網羅的に PCR 法にて発現を検討し、その中で発現が検出されたものについては SYBR® Green による Real-time PCR 法で定量した。さらに甲状腺ホルモンとの親和性が高いと報告されているトラ ンスポーターMCT8、MCT10、OATP1C1 (organic anion transporter 1C1)については TaqMan® による Real-time PCR 法で定量した。

② 軟骨細胞における T<sub>3</sub> 取り込みの検討

MCT10 の発現を抑制した ATDC5 細胞に 10.9 M (7.3×106 cpm)[125I]T<sub>3</sub> (Triiodothyronine, L·3,5,3'·[3'·125I]·, PerkinElmer)を添加し、37°C、120 分まで培養した。30 分ごとのタイムコー スで、0.1 M NaOH にて溶解し、シンチレーション検出器で細胞に取り込まれた[125I]T3の放射 線を計測した。

- ③ MCT10 の発現抑制が軟骨細胞に及ぼす影響の検討
  - i) 増殖 siRNA 法により MCT10 の発現を抑制した ATDC5 細胞において、109 M の甲状腺 ホルモン (T<sub>3</sub>)添加の有無による ATDC5 細胞の増殖の差異を検討した。増殖の評価は 1, 3, 5 日目に計算盤による細胞数のカウント及び BrdU 取り込みにより行った。
  - ii) 分化 siRNA 法により MCT10 の発現を抑制した ATDC5 細胞において、10.9 M の T3 添 加の有無による ATDC5 細胞の分化を検討した。分化誘導は 3 目間、アルジネート ビーズ法にて行い、分化は軟骨の肥大軟骨細胞層の分化マーカーcol10a1 の mRNA 発現を RTPCR 法により評価した。

# 【結果と考察】

① ATDC5 細胞において SYBR® Green による Real-time PCR 法で最も発現の多いトランスポー ターは LAT1 (L-type amino acid transporter 1)、次いで MCT10 であった。LAT1 は特殊な環 境下では甲状腺ホルモンを取り込むが、甲状腺ホルモンよりもアミノ酸に対する親和性が高く、 主にアミノ酸の取り込みに関与すると報告されている。従って、LAT1 の発現量は多いものの、 生理的状況下では甲状腺ホルモンの取り込みへの関与は低いと考えられた。そこで、現在まで に甲状腺ホルモンに親和性が高いと報告されているトランスポーターMCT10、MCT8、 OATP1C1の3種についてTagMan®によるReal time PCR法で定量を行ったところ、mRNA のコピー数は MCT10: MCT8: OATP1C1=46:1:0 であり、MCT10 の発現が最も多いこと がわかった。また ATDC5 細胞は、未分化軟骨前駆細胞から肥大軟骨細胞まで分化することが 知られているが、分化段階にかかわらず MCT10 の発現量は一定であった。

以上より、軟骨細胞においては、発現量と親和性の高さから MCT10 が主要な甲状腺ホルモ ントランスポーターである可能性が示唆された。

- ② MCT10 の発現を抑制した ATDC5 細胞に 10.9 M (7.3×106 cpm)[125I]T<sub>3</sub> を添加すると、 Negative Control に比べて[125]]T<sub>3</sub> の取り込みが約 30~40%低下した。従って、MCT10 が ATDC5 細胞において甲状腺ホルモンの取り込みに大きく関与していると考えられた。
- ③ 軟骨細胞に発現する MCT10 の発現を抑制し、軟骨細胞に対する影響を検討した。ATDC5 細 胞にT<sub>3</sub>を添加すると細胞増殖が有意に抑制された。ところが、MCT10の発現を抑制したATDC5 細胞では To を添加しても細胞増殖の抑制は認められず、BrdU の取り込み抑制も認められなか った。また、ATDC5 細胞を分化誘導すると、Taを添加した細胞では分化が促進され、col10a1

【結論】 軟骨細胞における甲状腺ホルモンの主要なトランスポーターは MCT10 であることが示唆された。そして、AHDS では MCT10 により軟骨細胞内に甲状腺ホルモンが取り込まれるため成長障害が軽度であると推測された。

# 論文審査の結果の要旨

本研究では軟骨細胞における甲状腺ホルモントランスポーターについて検討した。軟骨細胞のモデルとして ATDC5 を用いて発現及び機能解析を行い、軟骨細胞における主要な甲状腺ホルモントランスポーターは MCT10 であることを示した。

本研究結果は臨床において、原因不明の成長障害を示す疾患の原因を示唆するものであり、今後の MCT10 に関する研究に有用な基礎的情報を提供するものであり、博士(歯学)の学位申請に値するものである。