

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 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	阿部 早苗
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 歯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
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 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 T₃ 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]T₃ (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、10⁻⁹ M の甲状腺ホルモン (T₃) 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 日間、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 RT-PCR 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 TaqMan® 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]T₃ を添加すると、Negative Control に比べて [¹²⁵I]T₃ 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 T₃ 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 T₃ 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、T₃ を添加した細胞では分化が促進され、col10a1

の発現が早期に増加した。ところが、MCT10の発現を抑制した ATDC5 細胞では、T₃を添加しても col10a1の発現は早期に増加しなかった。以上から、MCT10の発現を抑制することにより、甲状腺ホルモンの軟骨細胞に対する増殖抑制効果と分化促進効果は減少したため、軟骨細胞における甲状腺ホルモンの取り込みは主に MCT10に依存していると考えられた。

【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。