



Introducing a point mutation indentified in a patient with pituitary resistance to thyroid hormone (Arg338 to Trp) into other mutant thyroid hormone receptors weakens their dominant negative activities

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安藤, 晋一郎 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1081">http://hdl.handle.net/10271/1081</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 228号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏 名	安 藤 晋一郎		
論文題目	<p>Introducing a point mutation indentified in a patient with pituitary resistance to thyroid hormone (Arg 338 to Trp) into other mutant thyroid hormone receptors weakens their dominant negative activities  (下垂体型甲状腺ホルモン不応症患者で同定された点突然変異 R338W は他の変異甲状腺ホルモン受容体に導入させるとドミナントネガティブ作用を減弱させる)</p>		

博士(医学) 安 藤 晋一郎

## 論文題目

Introducing a point mutation identified in a patient with pituitary resistance to thyroid hormone (Arg 338 to Trp) into other mutant thyroid hormone receptors weakens their dominant negative activities

(下垂体型甲状腺ホルモン不応症患者で同定された点突然変異 R338W は他の変異甲状腺ホルモン受容体に導入されるとドミナントネガティブ作用を減弱させる)

## 論文内容の要旨

[はじめに]

甲状腺ホルモン不応症は、甲状腺ホルモン受容体 (TR) の遺伝子異常に基づく先天性疾患であり、臨床的に全身型と下垂体型に分類される。全身型甲状腺ホルモン不応症 (GRTH) では、末梢組織における T3 に対する不応性のために、甲状腺ホルモンは高値であるにもかかわらず、代謝状態は正常もしくは低下する。一方、下垂体型甲状腺ホルモン不応症 (PRTH) では、下垂体組織に比べて末梢での不応性が弱く、代謝状態は一般に亢進している。いずれの型も下垂体が甲状腺ホルモンに対して不応性を示すため、TSH の抑制は不十分となり、TSH 不適切分泌状態となる。甲状腺は TSH に対して正常に反応するため、血中甲状腺ホルモンレベルは高値となる。TR には  $\alpha$  と  $\beta$  があるが、GRTH と PRTH は、いずれも TR  $\beta$  の異常であることが発見されている。しかし、類似の遺伝子異常が、なぜ GRTH と PRTH という異なる表現型をとるかは不明である。TR  $\beta$  1 の 338 番目のアミノ酸が、アルギニンからトリプトファンへ点突然変異した変異 TR (R338W) は、数家系の PRTH から発見されており、PRTH を表現しやすい遺伝子異常と考えられる。不応症の発症には、変異 TR が正常 TR の転写活性を抑制するドミナントネガティブ作用が必要であるとされている。R338W はドミナントネガティブ作用が比較的弱いことが分かっている。本研究では、下垂体型不応症の発症機序を追及する目的で、R338W の機能をダブルミュータントを構築して検討した。

[方 法]

R338W の遺伝子異常を GRTH から同定した変異 TR に導入してダブルミュータントを構築し、R338W のもたらす TR 機能異常を検討した。R338W の遺伝子異常を、GRTH 患者の TR  $\beta$  1 のエクソン 10 において発見された K443E 及び F451X に各々導入して、ダブルミュータント R338W/K443E 及び R338W/F451X を作成した。コントロールとして、R338W と同様 TR  $\beta$  1 のエクソン 9 における GRTH の点突然変異 G345R を K443E に導入し、ダブルミュータント G345R/K443E を作成した。

Wild type TR  $\beta$  1、R338W、G345R、K443E、F451X 及び上記の 3 種類のダブルミュータントをリン酸カルシウム法で CV-1 細胞に発現させ、T3 依存性の転写活性を測定した。レポーター遺伝子として、positive に制御される T3 レスポンスエレメント (TRE) の DR4 または pal2 を含む tkCAT 遺伝子を用いた。また、wild type TR  $\beta$  1 と変異 TR  $\beta$  1 遺伝子を 1 : 1 の比で CV-1 細胞へトランスフェクションして、T3 存在下での転写活性を測定した。wild type TR のみの時に比べて、変異 TR  $\beta$  1 が wild type TR  $\beta$  1 の転写活性を抑制する程度でドミナントネガティブ作用を調べた。変異 TR  $\beta$  1 を CV-1 細胞に発現させた後、TR 分画を含む核抽出物を作成し、 $^{125}$ I-T3 と 4℃、over night で incubate して TR の T3 結合能を調べた。さらに、reticulocyte lysate で作成した  $^{35}$ S 標識変異 TR  $\beta$  1 と、TRE-DR4 または TRE-pal を用いて、ゲルモビリティシフトアッセイを行い、TRE 上での TR のダイマー形成能について

検討した。

### [結 果]

転写活性及び T3 結合能は、変異 TR ではいずれも障害されていた。R338W と K443E には、ある程度の T3 結合能が残されており、転写活性は R338W が K443E より強かった。G345R、F451X 及びダブルミュータントである R338W/K443E、R338W/F451X、G345R/K443E は、いずれも T3 結合能を殆ど失い、転写活性も殆どなかった。

Wild type TR  $\beta$  1 に対するドミナントネガティブ作用については、R338W は、GRTH のいずれの変異 TR よりも弱かった。また、R338W 変異を導入したダブルミュータントの R338W/K443E は、K443E に比べてドミナントネガティブ作用は減弱した。同様に、R338W/F451X のドミナントネガティブ作用も、F451X のそれに比べて有意に減弱していた。しかし、G345R/K443E のドミナントネガティブ作用は、K443E と差がなかった。

ゲルモビリティシフトアッセイでは、R338W 及び R338W を導入したダブルミュータントは、ホモダイマー形成能が低下していた。他の変異 TR のホモダイマー形成能は wild type TR  $\beta$  1 と同程度であった。変異 TR と hRXR  $\alpha$  とのヘテロダイマー形成能は、いずれも wild type TR  $\beta$  1 と同程度であった。

### [考察及び結論]

R338W は T3 結合能と転写活性がある程度保たれており、ドミナントネガティブ作用も比較的弱いものであった。この点突然変異の R338W を GRTH から発見された他の変異 TR へ導入すると、T3 結合能は著明に減弱し転写活性も殆ど失われた。ところが、wild type TR  $\beta$  1 に対するドミナントネガティブ作用は逆に減弱した。一方、G345R を導入は、ドミナントネガティブ作用を変化させなかった。このことから、R338W の導入によるドミナントネガティブ作用減弱効果は、比較的特異的なものであると考えられた。

R338W を導入したダブルミュータントでは、R338W と同様にホモダイマー形成能が低下していた。このことから、ホモダイマー形成能の低下がドミナントネガティブ作用の減弱に関与している可能性があると考えられた。

甲状腺ホルモン不応症の表現型は、末梢組織の遺伝子と negative に制御される TSH 遺伝子のバランスによって決まると考えられる。TSH 遺伝子を用いた正確な assay は困難であり未施行である。しかし、PRTH を生ずるには、positive に制御される末梢組織の遺伝子でのドミナントネガティブ作用が弱いことが一つの条件であると考えられる。R338W は、この条件を満たした遺伝子異常であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

甲状腺ホルモン不応症は甲状腺ホルモン受容体 (TR) に異常を持つ常染色体優性遺伝疾患であり、臨床的に全身型甲状腺ホルモン不応症 (generalized resistance to TH、GRTH) と下垂体型甲状腺ホルモン不応症 (pituitary resistance to TH、PRTH) に分類されている。いずれの型でも下垂体が甲状腺ホルモンに対して不応性を示すので TSH 分泌の抑制が不十分となり、甲状腺は TSH に対して正常に反応するため、血中甲状腺ホルモンレベルが高値となる。GRTH では末梢組織も甲状腺ホルモンに対して不応性を示すので、甲状腺ホルモンレベルが高値であるにもかかわらず代謝状態は正常かもしくは低下する。一方、PRTH では末梢組織の不応性が弱く、代謝状態が亢進して手指振戦、頻脈、多汗等の症

状が表われる。GRTH と PRTH はいずれも原因が  $TR\beta$  の変異であり、病因論的に同ースペクトル上の疾患であるにもかかわらず、何故このように異なる表現型を示すのかは不明である。

$TR\beta$  1 の R338W 変異（点突然変異により338番目のアミノ酸残基がアルギニンからトリプトファンに変化）は数家系の PRTH に見い出されているので PRTH を表現しやすい遺伝子異常と考えられる。不応症の発症には変異 TR が正常 TR の転写活性を抑制するドミナントネガティブ作用が必要とされており、R338W の場合にはこのドミナントネガティブ作用が比較的弱いことが既に申請者の研究グループで明らかにされていた。申請者は本研究において、PRTH の発症機構を更に深く追及するため、GRTH から同定した2種類の変異 TR、K443E（443番目のリシンがグルタミン酸に変化）と F451X（C 末端11 アミノ酸残基を欠く変異 TR）に R338W 変異を導入した二重変異 TR を CV1細胞に発現させ、T3依存性転写活性、ドミナントネガティブ作用、T3結合能および二量体形成能を検討した。R338W と同じく  $TR\beta$  1 のエクソン9にみられる GRTH の点突然変異 G345R を K443E に導入した二重変異体をコントロールとした。T3依存性転写活性とドミナントネガティブ作用は T3応答エレメント（TRE）を含む CAT 遺伝子をレポータとして、T3結合能は野性型あるいは各変異 TR を発現させた CV1細胞の核抽出液への<sup>125</sup>I- 標識 T3の結合により、二量体形成能は *in vitro* で調製した<sup>35</sup>S-TR と TRE オリゴヌクレオチドを用いて gel mobility shift assay を行うことによりそれぞれ測定した。実験の結果、R338W を他の GRTH の変異 TR に導入すると T3結合能は顕著に低下し、T3依存性転写活性とホモ二量体形成能もほとんど消失したが、野性型  $TR\beta$  1 に対するドミナントネガティブ作用は逆に減弱した。RXR とのヘテロ二量体形成能には影響がなかった。G345R の導入ではドミナントネガティブ作用の減弱は認められなかった。甲状腺ホルモン不応症の表現型は末梢組織の T3応答遺伝子と下垂体の TSH 遺伝子に対する変異 TR のドミナントネガティブ作用のバランスによって決まると考えられる。TSH 遺伝子に対する作用の解析は未だなされていないが、R338W は末梢組織遺伝子に対するドミナントネガティブ作用が弱いという PRTH のための一つの要件を満たしていることがこれにより確認された。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) R338W 変異が GRTH で見い出されることはないか
- 2) 下垂体型 R338W 変異と全身型 K443E 変異の甲状腺ホルモン不応の程度の判定の指標、血中甲状腺ホルモンおよび TSH のレベル、TRH 負荷に対する反応
- 3) R338W 変異による PRTH の患者に T3を投与するとどうなるか
- 4) TR の二量体形成に関して、 $TR\alpha$  -  $TR\alpha$ 、 $TR\alpha$  -  $TR\beta$ 、 $TR\beta$  -  $TR\beta$ 、 $TR\alpha$  - RXR（レチノイド X 受容体）、 $TR\beta$  - RXR のいずれの形態も取り得るのか、またこのうち実際に標的遺伝子の TRE に作用して T3依存性転写を引き起こす形態はどれか
- 5)  $TR\beta$  ホモ二量体および  $TR\beta$  - RXR ヘテロ二量体と TRE の相互作用に対する T3結合の影響および  $TR\beta$  - RXR ヘテロ二量体の TRE 識別機構
- 6) レチノイド X 受容体（RXR）のリガンドは 9 - cis- レチノイン酸だけか、あるいは全トランスレチノイン酸も結合するか、このリガンドの結合が RXR のヘテロ二量体形成のパートナー蛋白質としての機能に影響を及ぼすか
- 7)  $TR\beta$  1 の変異のホモ接合体、及び  $TR\beta$  1 をコードする領域を全く欠いたヘテロ接合体、ホモ接合体ではそれぞれどうなるか、この時には  $TR\alpha$  は代償作用を持つか

これらの質問に対する申請者の応答は適切であり、問題点もよく理解していた。また研究そのものも高いレベルでなされており、新しい知見を含むと評価された。以上により、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市 山 新

副査 副学長 五十嵐 良 雄 副査 教授 大 野 龍 三