



Impairment of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis caused by naturally occurring GATA2 mutations in vitro

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2022-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 酒井, 勇輝 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00004107

博士（医学） 酒井 勇輝

論文題目

Impairment of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis caused by naturally occurring *GATA2* mutations in vitro

（天然の *GATA2* 変異は、視床下部－下垂体－甲状腺軸を in vitro で障害する）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

転写因子 *GATA2* は血球・血管・中枢神経系など種々の組織に発現し、発生や恒常性維持に関わる重要な制御因子である。一方、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）による甲状腺刺激ホルモン（TSH）の産生促進、および甲状腺ホルモン（T3）と甲状腺ホルモン受容体（TR）による抑制は、視床下部－下垂体－甲状腺軸の中心的機構である。TSH は α 鎖と β 鎖の二量体であり、ホルモンとしての特異性は β 鎖（TSH β ）により規定される。*GATA2* は下垂体特異的転写因子 Pit1 とともに *TSH β* 遺伝子発現に必須であり、TRH による転写活性化と T3 結合 TR による抑制において、共通のプラットフォームとして機能する。さらに *GATA2* は TRH の前駆体である *preproTRH* の遺伝子発現においても中心的な役割を果たす。

ヒトにおける *GATA2* の機能喪失型変異は、当初 MonoMAC 症候群などの免疫不全症の原因として同定され、腫瘍性疾患・呼吸器疾患・難聴などの病態に関連することも報告された。2014 年には甲状腺機能低下症との関連を示唆する臨床研究の成果も報告されたが、甲状腺機能異常を惹起するメカニズムの詳細は不明である。そこで、*GATA2* の機能喪失型変異が視床下部－下垂体－甲状腺軸に与える影響について in vitro の解析を実施した。

〔材料ならびに方法〕

GATA2 は DNA 結合モチーフであるジンクフィンガー（ZF）ドメインを 2 つ有する。免疫不全症との関連が報告されているヒトの *GATA2* 変異のうち、N 端側の ZF（ZF1）内に存在する変異（R308P）、C 端側の ZF（ZF2）内に存在する 3 つの変異（T354M、R396Q、R398W）、ZF2 よりも C 端側に存在する変異（S447R）について発現プラスミドを作成した。次に *TSH β* あるいは *preproTRH* のプロモーターを持つ chloramphenicol acetyltransferase（CAT）遺伝子を、*GATA2* あるいは TR などの発現プラスミドとともに腎由来 CV1 細胞（内因性 *GATA2* 発現なし）に遺伝子導入し、T3 ないし PKC 活性化剤 tetradecanoylphorbol acetate（TPA）の刺激下、あるいは非刺激下における転写活性を調べた。さらに変異 *GATA2* を遺伝子導入した CV1 細胞を用い、タンパク質発現量をウェスタンブロットで確認するとともに、核抽出液を用いて ^{32}P で標識した *TSH β* あるいは *preproTRH* 遺伝子の GATA 応答配列（GATA-RE）との結合を電気泳動移動度シフト法（EMSA）

により解析した。

[結果]

(1) CV1細胞にGATA2を共発現することで*preproTRH*プロモーターをもつCATレポーター遺伝子 (TRH-CAT) は著明に活性化することが報告されている。この転写活性はS447R変異体では野生型と同等に保たれたが、R308Pでは約80%、ZF2内に存在する3つの変異体では何れも20%程度まで減弱した。(2) T3存在下のTRは、GATA2で活性化されたTRH-CATを約50%抑制することが報告されている。この抑制はS447Rでも認められたが、R308Pでは認められなかった。(3) CV1細胞にPit1とGATA2を共発現することで*TSHβ*プロモーターをもつCATレポーター遺伝子 (TSHβ-CAT) は著明に活性化することが知られている。この転写活性はS447RおよびR308Pでは野生型と同等に保たれたが、ZF2内に存在する3つの変異体では何れも50%以下に減弱した。またTSHβ-CATとTRH-CATに対する各変異体の活性化能を比較したところ、強い相関が得られた ($r^2 = 0.927$, $p < 0.002$)。 (4) T3存在下のTRは、Pit1とGATA2で活性化されたTSHβ-CATを約50%抑制することが報告されている。T3による抑制はS447Rでも認められたが、R308Pでは認められなかった。(5) Pit1とGATA2で活性化されたTSHβ-CATは、PKCによりさらに増強されることも報告されている。TPA添加時のTSHβ-CATの活性は、R308Pでは野生型に比して約80%、S447Rでは約60%、ZF2内に存在する3つの変異体では何れも10%程度まで減弱した。(6) GATA2はZF領域で*preproTRH*あるいは*TSHβ*のGATA-REを認識することが知られている。これらのGATA-REに対する結合をEMSAで検討したところ、ZF2内に存在する3つの変異体ではDNA結合の著明な減弱が認められた。R308PおよびS447RのGATA-REへの結合は、野生型と同等だった。(7) ウェスタンブロットによる検討で、意外なことにR398Wのみがタンパク質発現の減弱(野生型に比べて約50%)を呈した。GATA2はユビキチン化により分解されることが知られているが、プロテアソーム阻害剤MG132を添加した条件では、R398Wのタンパク質発現の減衰は認められなかった。

[考察]

免疫不全症との関連が報告されているヒトのGATA2変異は、種々のメカニズムを介して*TSHβ*あるいは*preproTRH*の転写活性化を障害することが示された。中枢性甲状腺機能低下症の原因として、下垂体におけるTSH貯蔵障害、あるいはTRHによるTSH産生細胞の刺激不全などが報告されている。本研究結果から、GATA2の機能喪失型変異は中枢性甲状腺機能低下症の一因になりうることが推察された。

R398W変異体ではタンパク質発現の減弱が認められ、そのメカニズムとしてユビキチン・プロテアソーム系の関与が示唆された。GATA2の機能喪失型変異の病態として、ユビキチン化の関与はこれまで報告されていないため、GATA2

異常症の病態の 1 つにユビキチン・プロテアソーム系が関わる可能性も本研究結果より初めて示された。

〔結論〕

疾患との関連が報告されているヒトの *GATA2* 変異は、種々のメカニズムを介して視床下部－下垂体－甲状腺軸の障害を惹起することが、*in vitro* の解析により示された。