

人TSH受容体モノクローナル抗体を用いたTSH受容体の形態学的証明

著者	水上 勇治
著者別表示	Mizukami Yuji
雑誌名	平成6(1994)年度 科学研究費補助金 一般研究(C) 研究成果報告書
巻	1993-1994
ページ	8p.
発行年	1995-03
URL	http://doi.org/10.24517/00049263



人 T S H 受容体モノクローナル抗体を
用いた T S H 受容体の形態学的証明

研究課題番号 05670169

平成6年度科学研究費補助金 (一般研究C)
研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 水上勇治

(金沢大学医学部付属病院病理部講師)

人 T S H 受容体モノクローナル抗体を
用いた T S H 受容体の形態学的証明

研究課題番号 05670169

平成6年度科学研究費補助金 (一般研究C)

研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 水上勇治

(金沢大学医学部附属病院病理部講師)



8000-37169-3

金沢大学附属図書館

は し が き

甲状腺濾胞細胞におけるTSH受容体は、甲状腺濾胞細胞の機能と増殖をコントロールする最も重要な膜受容体である。最近慢性甲状腺炎、グレイブス病患者において患者血中にTSH受容体に対する自己抗体が存在することが知られ、これにはblocking typeとstimulating typeがあり、共に患者の甲状腺機能に深く関与している。また甲状腺癌においてもTSH受容体が存在し、癌の増殖、進展に深く関与していることが明らかとされている。しかしこのTSH受容体の分子構造や性状については十分に解明されておらず、また形態学的にも、TSH受容体の濾胞細胞での存在部位、種々の甲状腺疾患におけるTSH受容体の量的及び局在の変化については、現在まで全く明らかとされていなかった。

フランス国立内分泌研究所のMilgrom教授らは最近、人TSH受容体のcDNAを明らかにし、これを大腸菌に発現させて得られた蛋白に対するモノクローナル抗体を作成し、この抗体を用い人甲状腺においてTSH受容体を免疫組織化学的に検出することが可能であることを明らかにした。

本研究では、フランス国立内分泌研究所Milgrom教授より供与された、この人TSH受容体 β -subunit蛋白に対するモノクローナル抗体を用い、甲状腺組織におけるTSH受容体の局在、分布に関する免疫組織化学的検討を行ってきた。その結果、TSH受容体は甲状腺濾胞細胞の基底側細胞膜に存在し、その蛋白量は甲状腺腺腫、癌で正常甲状腺に比し増加し、さらにGraves病甲状腺では極めて増加していることを明らかにした。このことは腺腫、癌でTSH受容体が保たれていること、又Graves病甲状腺ではTSH受容体がup-regulateされ、これがGraves病における甲状腺機能亢進の病因の一つとなっている可能性を示唆するものであった(Mizukami Y. et al. J Clin Endocrinol Metab. 79: 616, 1994)。さらに私達はTSH受容体の発現を蛋白レベルのみならず、さらにmessenger RNAレベルでも検討し、免疫組織化学的に得られた結果をさらに検証すべきと考え、現在western blotting法およびin situ hybridization法を用いて検討中である。

研究組織

研究代表者： 水上勇治（金沢大学医学部付属病院病理部講師）

研究経費

平成5年度： 1, 500千円

平成6年度： 500千円

計 2, 000千円

研究発表

1) 論文発表

1. Mizukami Y., Hashimoto T., Nonomura A., Michigishi T., Nakamura S.,
Noguchi M., Matsukawa S.

Immunohistochemical demonstration of thyrotropin (TSH)-Receptor in normal and diseased human thyroid tissues using monoclonal antibody against recombinant human TSH-receptor protein.

J Clin Endocrinol Metab 79: 616-619, 1994.

2. Mizukami Y., Michigishi T., Nonomura A., Noguchi M., Nakamura H.

Thyroid carcinoma: clinical pathologic correlations.

Crit Rev Oncol Hematol 18: 67-102, 1995.

2) 口頭発表

1. Mizukami Y., Nonomura A., Michigishi T., Ohtaki S.

Immunohistochemical demonstration of TSH-receptor and thyroid peroxidase in normal and diseased human thyroids.

Sanning Microscopy International, May, 1994, Toronto

2. 水上勇治

抗人TSH受容体抗体を用いたTSH受容体の免疫組織化学的観察

第29回北陸合同内分泌・代謝懇話会 1994年 金沢

3. 水上勇治、野々村昭孝、松原藤継

各種甲状腺疾患組織におけるTSH受容体の免疫組織化学的検討

第84回日本病理学会総会 1995年 名古屋

研究

論文の別冊及び学会発表抄録の写しをもって代える。以下にその概要を記す。

近年の遺伝子クローニング技術の発展により、甲状腺におけるTSH受容体の分子構造が明らかとされ、これに基づきTSH受容体の合成、これに対する抗体の作製が可能となった。私達は、TSH受容体に対するモノクローナル抗体を用い、人甲状腺におけるTSH受容体の組織化学的及び生化学的検討を行なった。

材料と方法

I. 免疫組織化学的研究

材料) 手術時に得られた新鮮人甲状腺組織

腺腫様甲状腺腫	-----	5例
濾胞状腺腫	-----	11例
好酸性腺腫	-----	2例
乳頭状癌	-----	16例
未分化癌	-----	1例
髄様癌	-----	1例
クレブス病甲状腺	-----	3例

方法)

- 1) 新鮮甲状腺組織を直ちに-70℃に凍結
- 2) クリオスタットにて5 μ mに薄切
- 3) 10分間冷アセトン固定
- 4) 抗TSH受容体抗体(T3-356)と30分間室温で反応
- 5) Avidin-Biotin Alkaline-phosphatase kitを用い免疫染色
- 6) Vector Redを用い発色

抗体

TSH受容体の β -subunit(c-terminal region)(amino acids 604-764)に対するrecombinant 蛋白を抗原としたmonoclonal抗体(T3-356)
(Dr.Edwin Milgromより供与、Unite de Recherches Hormones et
Reproduction, Faculte de Medicine de Bicetre, Universite Paris.
Sud, Paris, France)

使用濃度 0.2-2.0 μ g/ml (至適濃度1.0 μ g/ml)

II. Image analyzerを用いた免疫染色の定量的測定

CAS200 image analyzerを用い、各症例における免疫染色性を定量的に測定した。各症例共、代表的5視野($\times 10$ 倍)を選びそのODを自動的に計算、平均化した。

III. Western blotting法を用いたTSH受容体蛋白の定量的測定

甲状腺組織をホモジナイズ後、細胞膜分画、cytosol分画に分け、各々を用いSDS電気泳動を行なった後、ニトロセルロース膜に転写、これを用いavidin-biotin-alkaline phosphatase kitを用い免疫染色を行なった。

結果

I. 免疫組織化学所見

1) 正常甲状腺

正常甲状腺では濾胞細胞の基底側細胞膜に沿って軽度-中等度の陽性所見が認められる。細胞質では殆ど認められない。

2) 腺腫様甲状腺腺腫

中等度の陽性所見が濾胞細胞の基底側細胞膜に認められる。細胞質内に

も軽度の陽性所見を認める。

3) 甲状腺腺腫

中等度の陽性所見が濾胞細胞の基底側細胞膜に認められる。好酸性腺腫ではその染色性が濾胞腺腫に比し、弱い傾向が認められた。

4) 乳頭状癌

比較的強い染色性が腫瘍細胞の基底側細胞膜に沿って認められる。細胞質内にもかなり陽性所見が認められる。また、乳頭状癌の扁平上皮化生部では、染色性は殆ど認められず、化生により容易にTSH受容体の失なわれることが示唆される。

5) 未分化癌 髄様癌

未分化癌や髄様癌では陽性所見は認められない。

6) グレブス病甲状腺

グレブス病甲状腺では増殖の強い部に一致して、強い陽性所見が基底側細胞膜に認められた。特に増殖の強い部では基底部に帯状に集積して認められ、グレブス病甲状腺におけるTSH受容体の強い発現が示唆された。

II. Image analyze

Image analyzerを用いた各疾患における免疫染色性のODは以下の通りであった。

正常甲状腺	1.02 ± 0.10
甲状腺腺腫	1.65 ± 0.18
乳頭状癌	2.03 ± 0.31
グレブス病甲状腺	2.49 ± 0.21

以上の結果は、顕微鏡的染色度判定の結果とよく一致した。

III. Western blotting法によるTSH受容体の定量的測定

現在、種々の条件下にてSDS電気泳動を行いbandの検出を試みているが再現

性のある結果が得られていない。T S H受容体の失活の可能性もあり、さらに泳動条件等について検討中である。