Effects of Interleukin-1β, Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-α on Type I Iodothyronine 5'-deiodinase Activity in Rat Functional Thyroid Cell Line, FRTL-5

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8484

金沢大学十全医学会雑誌　第102巻　第6号　776－786 (1993)

ラット機能性培養甲状腺細胞 (FRTL-5) のI型 5'-脱ヨード活性に及ぼすインターロイキン-1β, インターロイキン-6 および腫瘍壊死因子の影響とその作用機序

金沢大学医学部小児科学講座（主任：谷口　昂教授）
橋　本　浩　之

ラット機能性培養甲状腺細胞である FRTL-5 細胞を用いて，インターロイキン-1β (interleukin-1β, IL-1β)，インターロイキン-6 (interleukin-6, IL-6) および腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor-α, TNF-α)，の甲状腺 I 型 5'-脱ヨード酵素 (type I iodothyronine 5'-deiodinase, type I I-5'-D) 活性および I-5'-D の mRNA 発現への影響について検討した．FRTL-5 細胞を 0.5μM のリバーストリヨードサイロニン (reverse triiodothyronine, rT3) とトレーサー量の ^{125}I-rT3 を含む培養液で24時間培養後，培養液中の遊離 I^- をダウエックス 50W-X2 カラムで分離しその放射活性を測定した．FRTL-5 生細胞の脱ヨード活性は甲状腺刺激ホルモン (thyroid stimulating hormone, TSH) 添加により基礎値の約 3 倍に増加し，プロピールチオウラシル (propylthiouracil, PTU) により著明に抑制され，またサイロキシン (thyroxine, T4) により容量依存性に阻害された．これらの所見から，FRTL-5 生細胞の脱ヨード活性は甲状腺 I 型 I-5'-D の特性と同様で，細胞破砕物を用いた従来の I-5'-D 測定系よりも，生理的状態下での甲状腺組織 I-5'-D 活性をよく反映するモデルであることが示唆された．100pg/ml の IL-1β および IL-6 は TSH 存在下および非存在下の I-5'-D 活性を有意に抑制したが，TNF-α の抑制効果は高濃度でのみ観察された．サイトカイン除去によりこれらの効果は消失したことから，サイトカインの効果は細胞毒性によるものではないことが示唆された．一方，リバーストランスクリプターゼ－ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) で IL-1β および IL-6 は I-5'-D mRNA の発現を著明に抑制した．加えて，これらのサイトカインは TSH により誘導された cAMP 産生およびジブチル cAMP (dibutyl cAMP, $(Bu)_2$cAMP) により誘導された I-5'-D 活性を有意に抑制した．一方，活性化酸素捕集剤であるカタラーゼ (catalase)，フォスフォリパーゼ A2 (phospholipase A2) 阻害剤であるデキサメサゾン (dexamethasone) およびサイクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase) 阻害剤であるインドメタシン (indomethacin) は，いずれもサイトカインの I-5'-D 抑制効果を阻害しなかった．これらの所見から，サイトカインは甲状腺 I 型 I-5'-D 活性および I-5'-D mRNA の誘導を有意に抑制し，その力価は IL-1β>IL-6≫TNF-α であること，サイトカインは TSH により誘導される cAMP 産生系抑制ならびに cAMP 産生以後の末梢で作用しその効果を発現する可能性をもつこと，サイトカインによる I-5'-D 抑制機序には活性化酸素産生やフォスフォリパーゼ A2 系の活性化は含まれないことが示唆された．

Key words FRTL-5, interleukin-1β, interleukin-6, tumor necrosis factor-α, thyroidal type I iodothyronine 5'-deiodinase

サイトカイン (cytokine) は免疫系においてリンパ球や単球で産生される液性調節物質で生体防御機構において重要な役割を演じるが，単に免疫系の細胞のみでなく，生体の種々の細胞で産生され他の生物活性も有することが明らかとなった．近年，ウイルス性肝炎でインターフェロン (interferon, IFN) やインターロイキン-2 (interlenkin-2) 療法を受けた患者で自己免疫性甲状腺炎や甲状腺機能低下症の発症が見られたり[1)~5)]，腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor-α, TNF-α) やインターロイキン-1β (interleukin-1β, IL-1β) が動物実験で甲状腺ホルモンの低下を引き起こし，甲状腺刺激ホルモン (thyroid stimulating hormone, TSH) に対する甲状腺の反応性の低下をもたらすとされ[6)~8)]，サイトカインが下垂体－甲状腺系機能に様々な影響を与えている証拠が報告されつつある．生体外での実験系でも，TNF や IL-1 が甲状腺細胞内への $^{125}I^-$ の取り込みおよび有機化の抑制[9)~12)]，サイログロブリン (thyroglobulin) や cAMP 産生の修飾[13)14)]，培養甲状腺細胞の成長を調節する[11)12)14)15)]などの幾つかの甲状腺への生物活性を共有することが報告された．インターロイキン-6 (interleukin-6, IL-6) もまた，我々の臨床研究において，急性呼吸器感染症患児の血清 IL-6 値と血清トリヨードサイロニン (triiodothyronine, T3) 値，T3/サイロキシン

平成5年10月28日受付，平成5年11月22日受理

Abbreviations: $(Bu)_2$cAMP, dibutyl cAMP; CRP, C-reactive protein; 5H, 5-hormone-containing; 6H, 6-hormone-containing; IFN, interferon; IL-1β, interleukin-1β; IL-6, interleukin-6; I-5'-D, iodothyronine 5'-deiodinase; L-T4, L-thyroxine; PTU, propylthiouracil; rIL-1β, recombinant interleukin-1β; rIL-6,

(thyroxine, T4) 比が有意な負の相関を示し[16]，生体外実験系でも甲状腺ペルオキシダーゼ (thyroid peroxidase) 遺伝子発現，cAMP 産生や T3 分泌の抑制などの甲状腺への直接作用を持つことが報告されている[17)~19)].

このようにサイトカインは甲状腺機能に対し様々な影響を与えるにも関わらず，血清 T3 の約 80% を産生する肝臓のⅠ型 5' 脱ヨード反応に対するサイトカインの影響は僅かにラットおよびマウスを用いた 3 例について報告されているにすぎず[6)~8)]，甲状腺のⅠ型 5' 脱ヨード反応に及ぼす影響はまだ報告されていない．最近，ラットの機能性培養甲状腺細胞である FRTL-5 の細胞破砕物中にⅠ型 5' 脱ヨード酵素 (type Ⅰ iodothyronine 5'-deiodinase, type Ⅰ I-5'-D) 活性の存在が報告され，甲状腺 I-5'-D 活性の検討に有用であることが示された[20)21)]．本研究では，より生理的な状態である FRTL-5 の生細胞を用いた I-5'-D 活性測定系の有用性を確立し，この測定系を用いた TNF-α, IL-1β および IL-6 の甲状腺 Ⅰ-5'-D 活性への直接的影響およびリバーストランスクリプターゼ-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) を用いたこれらサイトカインの Ⅰ-5'-DmRNA 発現への影響について検討した．また，サイトカイン活性の発現メカニズムに含まれるとされるフォスフォリパーゼ A2 系 (phospholipase A2 pathway) の活性化[22)] や H_2O_2[23)], O_2^-[24)] などの活性化酸素の産生が，これらサイトカインの甲状腺 Ⅰ-5'-D 活性への影響に関与するか否かについても検討を加えた．

材料および方法

Ⅰ．材　料

1．試薬

本研究では以下の試薬を使用した．牛胎児血清 (Gibco, Grand island, 米国)，ウシ　インスリン (bovine insulin) (Sigma, St. Louis, 米国)，グリシル-L-ヒスチジル-L-リジン酢酸 (glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate) (Sigma)，ハイドロコルチゾン (hydrocortisone) (Sigma)，ヒト　アポ-トランスフェリン (human apo-transferrin) (Sigma)，ソマトスタチン (somatostatin) (Sigma)，ウシ TSH (bovine TSH) (Sigma)，リバーストリヨードサイロニン (reverse triiodothyronine, rT3) (Sigma), ^{125}I-rT3 (Amersham Japan, 東京)，牛血清アルブミン (bovine serum albumin) (Sigma)，トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid) (和光純薬，大阪)，3-イソブチル-L-メチルキサンチン (3-isobutyl-L-methyl-xanthin) (Sigma)，3-(4, 5)-ジメチルチアゾール-2, 5-ジフェニールテトラゾリウムブロマイド (3-(4, 5)-dimethylthiazol-2, 5,-diphenyltetrazoliumbromide (Sigma)，オリゴ d(T) プライマー (oligo d(T) primer, pd(T)$_{12-18}$) (Pharmacia, Uppsala, スエーデン)，ラウス関連ウイルスリバーストランスクリプターゼ (Rous associated virus reverse transcriptase) (宝酒造，京都)，*Thermus aquaticus* DNA ポリメラーゼ (Ampli Taq *Thermus aquaticus* DNA polymerase) (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, 米国)，アガロース (agarose) (H14 TAKARA, 宝酒造)，エチヂウムブロマイド (ethidium bromide) (Pharmacia)，ジチオスレイトール (dithiothleitol) (和光純薬)，プロピールチオウラシル (propylthiouracil, PTU) (Sigma), L-サイロキシン (L-thyroxine, L-T4) (Sigma)，ジブチル cAMP (dibutyl cAMP, (Bu)$_2$cAMP) (生化学工業，東京)，カタラーゼ (catalase) (Sigma)，デキサメサゾン (dexamethasone) (Sigma)，インドメタシン (indomethacin) (Sigma)

2．サイトカイン

ヒト組み換え型 TNF-α (recombinant tumor necrosis factor-α, rTNF-α) (4.8×10^7U/mg) はサントリー株式会社 (東京) から，ヒト組み換え型 IL-1β (recombinant interleukin-1β, rIL-1β) (2×10^7U/mg) は大塚製薬株式会社 (徳島)，平井嘉勝博士から，ヒト組み換え型 IL-6 (recombinant interleukin-6, rIL-6) (5×10^6U/mg) は大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター，平野俊夫博士から供与されたものを用いた．

3．培養細胞

National Institute of Health (Bethesda, 米国) の Kohn 博士より供与されたラット機能性培養甲状腺細胞である FRTL-5 を用いた．56℃ で30分間処理して非働化した 5% 牛胎児血清を含むハム F-12 培養液 (Ham F-12 medium) (Gibco) に，10μg/ml ウシ　インスリン，10ng/ml グリシル-L-ヒスチジル-L-リジン酢酸，10nM ハイドロコルチゾン，5μg/ml ヒト　アポ-トランスフェリン，10μg/ml ソマトスタチンを加えた 5 ホルモン含有 (5-hormone-containing, 5H) 培養液または 5H 培養液に 1mU/ml のウシ TSH を加えた 6 ホルモン含有 (6-hormone-containing, 6H) 培養液を用い，100単位/ml ペニシリン G (明治製菓，東京) および 10μg/ml ゲンタマイシン (シェリングプラウ，大阪) を添加した．細胞は37℃，CO_2 濃度 5% の条件下，6H 培養液中で培養した．通常，細胞数はトリプシン処理後コールターカウンター (coulter counter, Coulter Electronics, Hialeah, 米国) を用いて計測した．

Ⅱ．方　法

1．FRTL-5 生細胞を用い rT3 を基質とした脱ヨード反応の測定

FRTL-5 細胞をトリプシン処理後，48穴培養プレート (Coster, Cambridge, 英国) に FRTL-5 細胞を 1 ウエル (well) あたり 1×10^5個ずつ 6H 培養液中で培養し，単層状態となったところで実験に供した．また，TSH 除去実験では単層状態となった後 5H 培養液に換え，さらに 8 日間培養後実験に用いた．

細胞を，0.5μM rT3 とトレーサー (tracer) 量の ^{125}I-rT3 を含む 400μl の 5H 培養液または 6H 培養液中で，37℃，CO_2 濃度 5% の条件下に培養し，培養終了時に上清 100μl を採取．100μl の 2% 牛血清アルブミン，800μl のトリクロロ酢酸を加え 3000回転10分間遠心し，上清をダウエックス 50W-X2 カラム (室町化学工業，京都) で I^- を吸着．2ml の 10% 酢酸で I^- を溶出し分離された $^{125}I^-$ をウエル型 γ-カウンター (well type γ-counter) で測定した．

2．培養液中の cAMP の測定

FRTL-5 細胞の cAMP 産生に及ぼすサイトカインの影響を検討するため培養液中の cAMP 濃度を測定した．10ng/ml TNF-α, 1ng/ml の IL-1β または IL-6 を含む 5H または 6H 培養液と48時間培養後，0.5mM 3-イソブチル-L-メチルキサンチ

recombinant interleukin-6 ; rTNF-α, recombinant tumor necrosis factor-α ; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction ; rT3, reverse triiodothyronine ; tDNA, template DNA ; TNF-α, tumor necrosis factor-α ; TSH, thyroid stimulating hormone ; T3, triiodothyronine ; T4, thyroxine

Table 1. Oligonucleotide primers for amplification of the type I I-5'-D

Sequence	Location	Orientation
5' TGTCCCAGCTATGGCTGTGG 3'	14−33	Sense
5' ACTGAGGCATGTGTCCAGGT 3'	756−775	Antisense

All primer sequences are presented in the sense orientation.

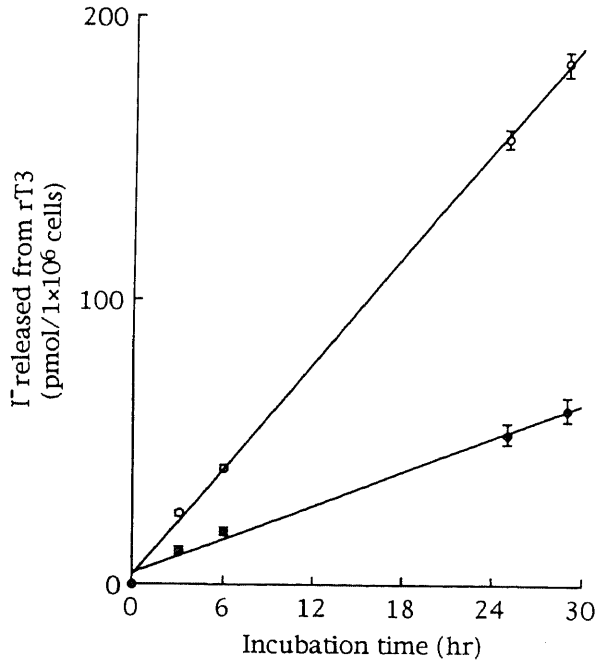

Fig. 1 Time course of the deiodination from reverse triiodothyronine (rT3) in live FRTL-5 cells cultured in 5H medium (5-hormone-containing medium, ●) or 6H medium (6-hormonecontaining medium, 5H medium plus 1 mU/ml of TSH, ○). Points are the mean±SD of triplicate determinations. Results are expressed as liberated I^- from rT3 per 1×10^6 cells. Cells in 5H medium were cultured without TSH for 8 days before assayed.

Table 2. The effects of propylthiouracil (PTU) and thyroxine (T4) on the release of I^- from reverse triiodothyronine (rT3) in live FRTL-5 cells

Drug	Release of I^- (pmol/1×10^6 cells·24hr) (mean±SD, n=3)	
	5H medium[a]	6H medium[b]
Control	41.2±2.8	143.5±4.39
PTU Conc.[c] (mM)		
0.001	12.0±1.9***	33.8±2.9***
0.01	11.0±0.1***	34.6±0.9***
0.1	13.0±2.1***	26.0±2.0***
T4 Conc. (μM)		
5	33.3±1.8**	133.5±1.7*
50	13.2±2.4***	82.6±7.2***

a) 5H medium (5-hormone-containing medium) contains 10 μg/ml insulin, 10 ng/ml glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate, 10 nM hydrocortisone, 5 μg/ml transferrin and 10 ng/ml somatostatin.
b) 6H medium (6-hormone-containing medium) indicates 5H medium with 1 mU/ml bovine thyroid stimulating hormone (TSH).
c) Conc., concentration.
*$P<0.05$, **$p<0.02$, ***$p<0.001$ compared with control

ンと上記サイトカインを含むまたは含まない，新鮮な 5H または 6H 培養液に交換し，さらに24時間後上清 100μl を採取し酵素免疫法による測定キット (RPN225 cyclic AMP EIA, kit, Amersham Japan) により測定した．培養終了時の生細胞数は 3-(4,5)-ジメチルチアゾール-2,5-ジフェニールテトラゾリウムブロマイドによる発色法[25] にて算出し，cAMP 量は pmol/1×10^6 細胞・24hr で表現した．

3．RT-PCR 法による I-5'-D mRNA の検出

FRTL-5 細胞は 6H 培養液中で培養し，1×10^6 個の細胞から抽出した全 RNA をオリゴ d(T) プライマー160ng を含む 50μl の反応液に溶解した．65℃で15分間前処置し，ラウス関連ウイルスリバーストランスクリプターゼを加えた後さらに1時間保温．50μl の水を加えセファデックス G-50 1ml を充填したスパンカラム (spun column) に注ぎ1500回転5分間遠心し，得られた溶液の 5% を PCR の鋳型 DNA (template DNA, tDNA) として用いた．tDNA を表1に示すラット I-5'-D に特異的なプライマー対[26] で *Thermus aquaticus* DNA ポリメラーゼを用い DNA サーマルサイクラー(DNA thermal cycler) (宝酒造) で増幅した．1-PCR サイクルを94℃ 60秒，60℃ 120秒，72℃ 180秒とし，本実験では25，28及び31サイクル増幅して評価した．最終 PCR サイクルで72℃10分間伸張反応後，反応産物を 1.5% アガロースゲルで電気永動しエチヂウムブロマイドで可視化した．内部標準としてベーターアクチン (β-actin) の mRNA を，β-actin 特異的プライマー対を用いて同様に RT-PCR 法で評価した．1-PCR サイクルは94℃ 90秒，55℃ 90秒，72℃ 120秒とした．

4．統計学的検討

全ての実験は1検体につき3回 (triplicate) 測定し，得られた成績は平均値±標準偏差 (standard deviation, SD) にて表記した．平均値の検定には多群間の比較では1元配置分散分析後 Sheffè の多重比較検定を，また2群間の比較では Student t 検定を用いた．危険率 5% をもって有意差ありと判定した．

成 績

I．FRTL-5 生細胞の脱ヨード活性の特徴

図1に FRTL-5 生細胞による rT3 の脱ヨード反応の経時的変化を示す．遊離されたI量は時間依存性に29時間まで直線的に増加した．ゆえに以下の実験では24時間の反応時間を採用した．6H 培養液で遊離ヨード量は 5H のそれの約3倍で TSH 依存性を示した．臓器のホモジネート (homogenate) や細胞破砕物中の I-5'-D 活性測定時に用いるジチオスレイトールは 0.25mM 以上で細胞毒性を発揮したため以下の実験では使用し

なかった．表2に示すようにFRTL-5生細胞の脱ヨード反応は0.001mM プロピールチオウラシルにより著明に，またL-T4により容量依存性に脱ヨード反応を抑制した．以上の結果よりFRTL-5 生細胞による rT3 の脱ヨード反応は甲状腺Ⅰ型 I-5'-D によるものと考えられた．

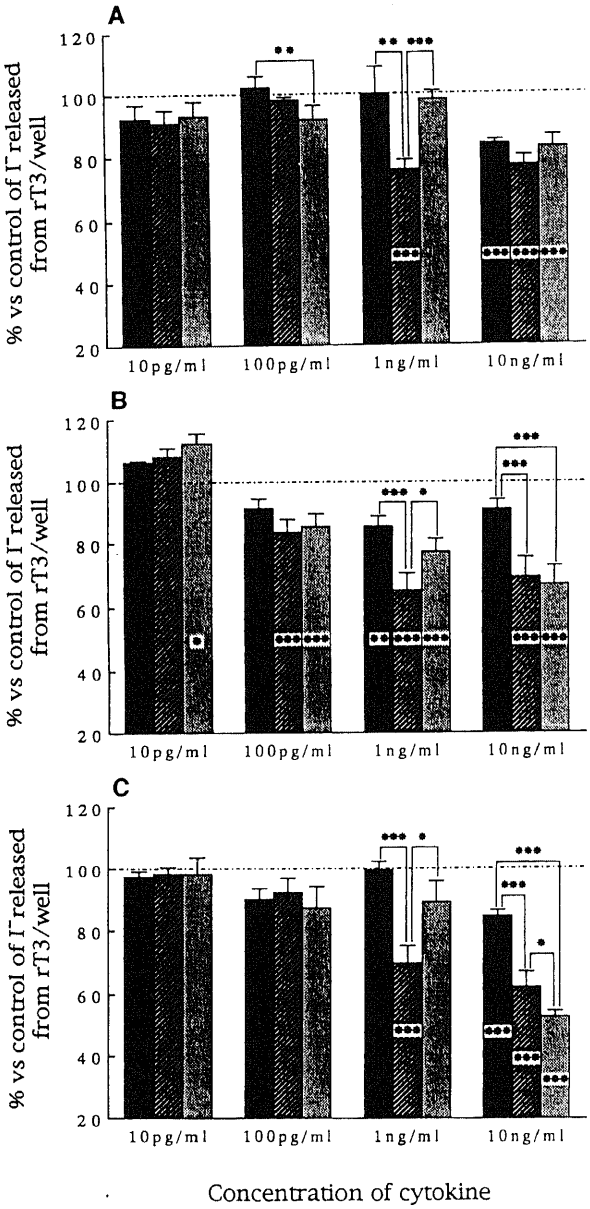

Fig. 2　The effects of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interlenkin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6) on I-5'-D activity in live FRTL-5 cells cultured in 5H medium. Cells were cultured without thyroid stimulating hormone (TSH) for 8 days before assayed. The I-5'-D assay was performed for 0−24 hr (A), 48−72 hr (B) and 144−168 hr (C) after the addition of cytokines (10 pg/ml−10 ng/ml). Each column represents the mean±SD of triplicate determinations. Results are expressed as the percentage of liberated I⁻ per well in comparison with control (cultured without cytokines). ■, TNF-α; ▨, IL-1β; ▤, IL-6. * $p<0.05$, ** $p<0.025$, *** $p<0.01$. Symbol in the column means comparison with control, and on the bar means comparison between each column.

Ⅱ．FRTL-5 生細胞の I-5'-D 活性に対するサイトカインの影響

サイトカインがFRTL-5生細胞のI-5'-D活性に及ぼす影響を添加早期から長期にかけて検討するため，サイトカイン負荷後0−24時間，48−72時間および144−168時間において I-5'-D アッセイ (assay) を行なった．このため，培養中に各ウエルの細胞数に変化がないか否かを検討するため，10ng/ml のTNF-α, IL-1β および IL-6 の負荷後24時間，72時間および168時間に，コールターカウンターを用いて細胞数を計測した．細胞数は時間と共に徐々に増加したが，サイトカイン負荷群および非負荷群の間に有意差は見られなかった．よって，以下の実験

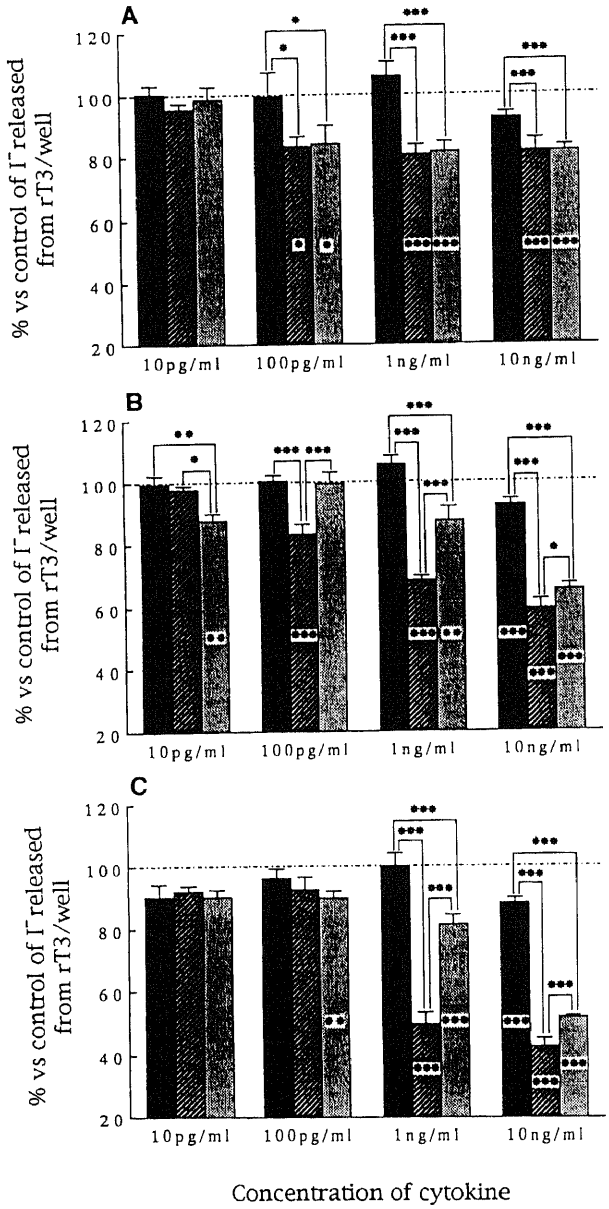

Fig. 3　The effects of TNF-α, IL-1β and IL-6 on I-5'-D activity in live FRTL-5 cells cultured in 6H medium. A, 0-24 hr; B, 48-72 hr; C, 144-168 hr incubation after the addition of cytokines. ■, TNF-α; ▨, IL-1β; ▤, IL-6. The procedure for experiments and statistical analysis, and the mean of the symbols were the same employed in the 5H medium-assay.

では各ウエル当たりの rT3 からの脱ヨード量を対照（サイトカイン非負荷）のそれと比較し，百分率で表記した．また，サイトカインの負荷濃度はそれぞれ 10pg/ml から 10ng/ml とし，5H および 6H の両培養液でそれぞれ I-5'-D 活性の測定を行なった．

図2に 5H 培養液，図3に 6H 培養液の成績を示す．5H 培養液では 100pg/ml IL-1β および IL-6 の負荷後48－72時間のアッセイで，有意な脱ヨード活性の抑制が見られた．しかし，0－72時間，144－168時間のアッセイに有意な変化は見られなかった．0－24時間のアッセイでは，1ng/ml 以上の IL-1β, 10ng/ml の TNF-α および IL-6 において，I-5'-D 活性の有意な低下はほぼ同程度の約 20% であった．48－72時間，144－168時間のアッセイでは，高濃度の IL-1β および IL-6 において容量依存性の I-5'-D 抑制効果が見られた．また，10ng/ml の IL-1β, IL-6 では，抑制効果は時間依存性に増強した．TNF-α の有意に抑制効果は 1ng/ml で初めて見られたが，それは IL-1β, IL-6 に比べ有意に弱かった．

6H 培養液でも 5H 培養液とほぼ同様の成績が得られた．サイトカイン負荷後 0－24時間のアッセイでは 100pg/ml 以上の IL-1β, IL-6 で約 20% の I-5'-D 活性の抑制が見られ容量依存性はなかった．48－72時間，144－168時間のアッセイでは IL-1β, IL-6 の抑制効果は時間および容量依存性であった．そして IL-1β の抑制力価は IL-6 より有意に強かった．TNF-α の I-5'-D 活性抑制効果は 10ng/ml で初めて見られた．しかしその効果は IL-1β, IL-6 に比べ明らかに弱かった．

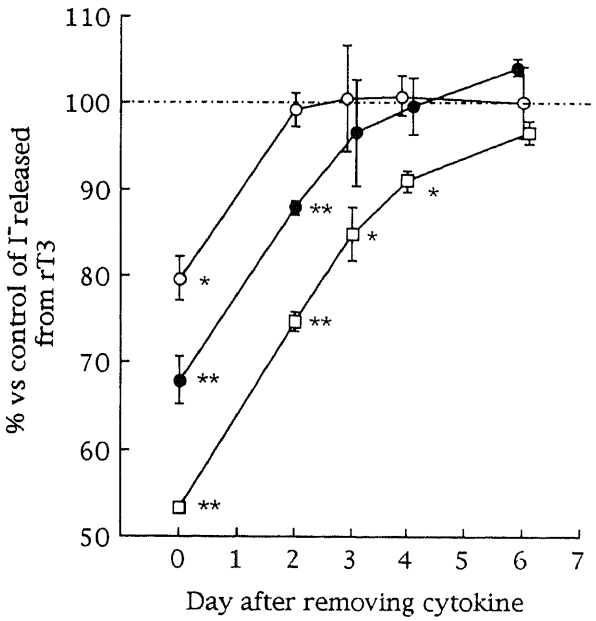

Fig. 4 Time course of recovery of I-5'-D activity after removal of cytokine. FRTL-5 cells were incubated in 6H medium with 20 ng/ml of TNF-α (○), 2 ng/ml of IL-1β (□) or IL-6 (●), or without cytokine for 168 hr. After 144-168 hr (day 0) assay of I-5'-D, cytokine was removed. I-5'-D assay for 24-48 (day 2), 48-72 (day 3), 72-96 (day 4) and 120-144 hr (day 6) after removing cytokine were performed. Results are expressed as the percentage of liberated I⁻ per well in comparison with control (cultured without cytokines). Points are the mean±SD of triplicate determinations. *p<0.01, **p<0.001 compared to control (cultured without cytokines).

Ⅲ．サイトカイン除去後の FRTL-5 生細胞 I-5'-D 活性の回復

図にサイトカイン除去後の I-5'-D 活性の変化を示す．FRTL-5 細胞は 20ng/ml TNF-α, 10ng/ml IL-1β または IL-6 を含む 6H 培養液で培養し，サイトカイン添加後144－168時間の I-5'-D アッセイ (day 0) を行なった後サイトカインを除去．除去後24－48時間 (day 2)，48－72時間 (day 3)，72－96時間 (day 3)，120－144時間 (day 6) にアッセイを行なった．TNF-α による約 20% の I-5'-D 活性の抑制は day 2 には消失していた．IL-1β による約 50% および IL-6 による約 30% の I-5'-D 活性の抑制は約 10% の抑制となるまで直線的に減少した．そして，IL-6 の抑制効果は day 3, IL-1β のそれは day 6 には消失した．

Ⅳ．cAMP により誘導された I-5'-D 活性に及ぼすサイトカインの影響

FRTL-5 細胞を 5H 培養液で 8 日間培養後，0.5mM の $(Bu)_2$cAMP を加えさらに培養した．I-5'-D 活性は経時的に増加し 8 日後にはピーク (5H 培養液単独の約1.6倍) に達した．よって，$(Bu)_2$cAMP 添加 8 日後に実験を開始した．I-5'-D アッセイは，10ng/ml の TNF-α, 1ng/ml の IL-1β または IL-6 の 5H 培養液への添加後，0－24時間，48－72時間及び144－168時間に行なった。図 5 に成績を示す．これらのサイトカインは $(Bu)_2$cAMP より誘導された I-5'-D 活性を有意に抑制した．その結果は 6H 培養液で見られた I-5'-D 抑制効果（図 3）とほぼ同様であった．

Ⅴ．サイトカインの I-5'-D 抑制効果に対する活性化酸素捕集剤の影響

H_2O_2 や O_2 などの活性化酸素捕集剤であるカタラーゼを用い，サイトカインの I-5'-D 抑制効果を減弱させるか否か検討した．11-100μg/ml のカタラーゼと 10ng/ml の TNF-α, 1ng/ml の

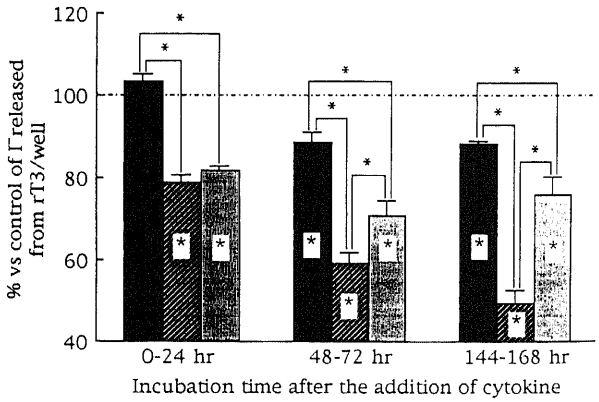

Fig. 5 The effects of TNF-α (10 ng/ml), IL-1β (1 ng/ml) and IL-6 (1 ng/ml) on cAMP induced I-5'-D activity. After cultured in 5H medium for 8 days, 0.5 mM $(Bu)_2$c-AMP was added to the 5H medium. After 8 days' culture in 5H medium with $(Bu)_2$cAMP, I-5'-D assay for 0-24, 48-72 and 144-168 hr after the addition of cytokines was performed. Each column represents the mean±SD of triplicate determinations. Results are expressed as the percentage of liberated I⁻ per well in comparison with control (cultured without cytokines). ■, TNF-α; ▨, IL-1β; ▩, IL-6. *p<0.01. Symbol in the column means comparison with control, and on the bar means comparison between each column.

IL-1β または IL-6 を含む 6H 培養液中で FRTL-5 を培養し，培養開始後48－72時間のアッセイを行なった。図 6 にその成績を示す．カタラーゼはそれ自身容量依存性に有意な I-5'-D 活性の抑制を示した．しかし，サイトカインの I-5'-D 抑制効果は阻害されなかった．

Ⅵ．サイトカインの I-5'-D 抑制効果に対するフォスフォリパーゼ A2 系阻害剤の影響

フォスフォリパーゼ A2 系がサイトカインの I-5'-D 抑制効果の発現系に含まれるか否かを検討するためフォスフォリパーゼ A2 阻害剤であるデキサメサゾンを 4-400ng/ml またはサイクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase) 阻害剤であるインドメタシンを 5-40μM, 10ng/ml の TNF-α, 1ng/ml の IL-1β または IL-6 を含む 6H 培養液中で FRTL-5 を培養し，培養開始後48－72時間のアッセイを行なった。図 7 にその成績を示す．デキサメサゾンとインドメタシンはそれ自身，I-5'-D 活性を有意に増加させたがサイトカインによる阻害は影響を受けなかった．

Ⅶ．サイトカインが FRTL-5 の cAMP 産生能に及ぼす影響

cAMP 産生の変化がサイトカインの効果発現系に含まれるか否かを検討するため，培養液中の cAMP 量を測定した．表 3 に示すように，TNF-α, IL-1β, IL-6 共に 5H 培養液 (TSH 非依存性) での cAMP 産生量には有意な変化を与えなかった．しかし，6H 培養液 (TSH 依存性) では，いずれのサイトカインも FRTL-5 細胞の cAMP 産生量を有意に減少させた．

Ⅷ．FRTL-5 細胞の I-5'-D mRNA 発現に及ぼすサイトカインの影響

FRTL-5 細胞は 6H 培養液で培養し，10ng/ml の TNF-α,

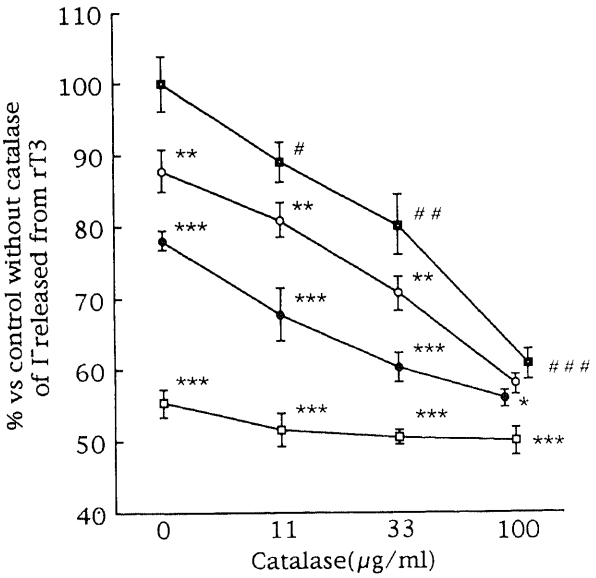

Fig. 6　The effects of catalase (scavenger of active oxygen species) on the inhibitory effect of cytokines on I-5'-D activity in 6H medium. I-5'-D assay in 6H medium for 48-72 hr after the addition of 10 ng/ml of TNF-α (○) or 1 ng/ml of IL-1β (□) or IL-6 (●), and 11-100 μg/ml catalase was performed. #p<0.02, ##p<0.01, ###p<0.001 compared to control 0 (cultured without cytokines and catalase). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to control (cultured without cytokines ◘). Results are expressed as the percentage of liberated I⁻ per well in comparison with control 0. Points are the mean±SD of triplicate determinations.

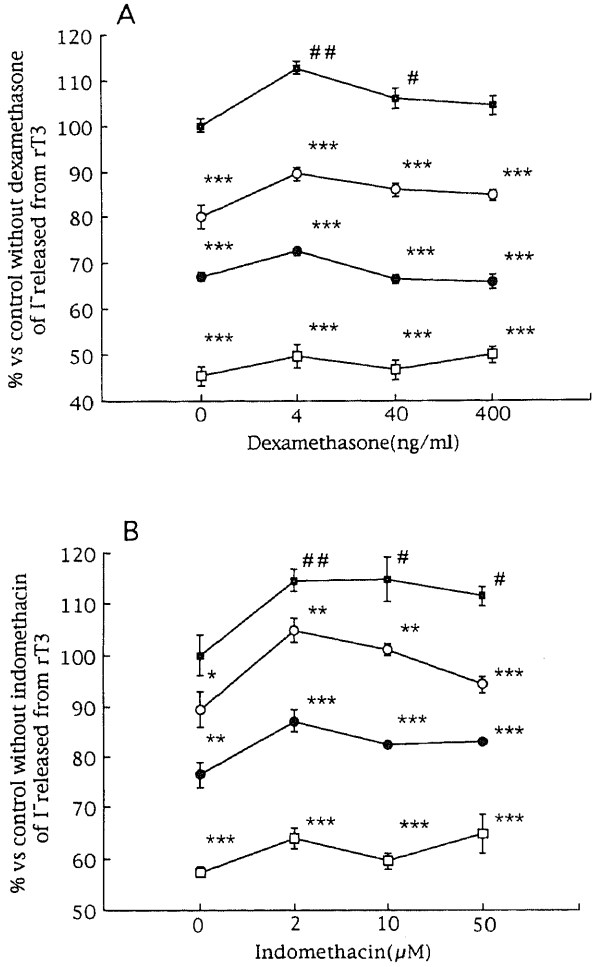

Fig. 7　The effects of dexamethasone (a phspholipase A_2 inhibitor, 4-400 ng/ml, A) and indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor, 2-50 μM, B) on the inhibitory effect of cytokines on I-5'-D activity in 6H medium. I-5'-D assay in 6H medium for 48-72 hr after the addition of 10 ng/ml of TNF-α (○) or 1 ng/ml of IL-1β (□) or IL-6 (●), and dexamathasone or indomethacin was performed. Results are expressed as the percentage of liberated I⁻ per well in comparison with control 0 (cultured without cytokines and Phospholipase A_2-pathway inhibitor). #p<0.025, ##p<0.01 compared to control 0. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to control (cultured without cytokines ◘). Points are the mean±SD of triplicate determinations.

Table 3. The effects of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6) on cAMP production of FRTL-5 cells

Cytokine	cAMP (pmol/1×10⁶ cells·24h) (mean±SD, n=3)	
	5H medium	6H medium
Control	2.57±0.36	9.43±0.40
TNF-α (10ng/ml)	2.54±0.26	7.29±1.01*
IL-1β (1ng/ml)	2.69±0.23	7.92±0.58*
IL-6 (1ng/ml)	2.41±0.21	7.47±0.72*

*p<0.03 vs Control

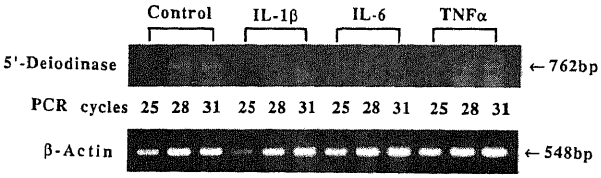

Fig. 8 The effects of cytokines on I-5'-D mRNA expression in FRTL-5 cells. Cells were cultured in 6H medium and samples were obtained at 12 hr after the addition of 10 ng/ml TNF-α, IL-1β or IL-6. Twenty-five, 28 and 31 cycle RT-PCR of I-5'-D and β-actin mRNA were performed.

IL-1β および IL-6 負荷後12時間で検体を採取した．図8は，IL-1β および IL-6 の FRTL-5 細胞 I-5'-D mRNA 発現の抑制効果を示す．IL-1β においてコントロールと比べ25サイクル PCR の β-actin の mRNA 発現はやや弱いが，I-5'-D の mRNA は28，31サイクルでもほとんど検出されず，その発現の抑制は明らかであると考えられた．IL-6 もまた，明らかに I-5'-D mRNA の発現を抑制したが，TNF-α とコントロール間の I-5'-D mRNA 発現には有意差は見られなかった．I-5'-D mRNA の発現抑制効果は I-5'-D 活性の抑制効果と同様に，IL-6 に比べ IL-1β でより強かった．

考　　察

本研究では FRTL-5 生細胞を用いた rT3 からの脱ヨード反応が，PTU により著明にまた T4 により容量依存性に抑制される，脱ヨード活性が TSH 依存性である，など今までに報告された甲状腺の I 型 I-5'-D 活性と同様の特性を持つことを示した[20)21)27)~31)]．これらの所見は FRTL-5 生細胞を用いた脱ヨード反応が甲状腺の I 型 I-5'-D 活性を良く反映することを示し，細胞破砕物や臓器のホモジネート (homogenate) を用いた測定より，より生理的な状態下での甲状腺 I 型 I-5'-D 活性を評価できるモデルであることを示唆する．また，本法では様々な物質の I-5'-D 活性に対する直接的効果を非常に簡便に評価できる利点を持つ．

現在までサイトカインと甲状腺脱ヨード活性に関する報告はなく，本研究は初めて甲状腺 I-5'-D 活性に与えるサイトカインの直接的な影響について示した．感染症患者で臨床的に見られる濃度 (100pg/ml) の IL-1β, IL-6[16)32)] は TSH 依存，TSH 非依存生の I-5'-D 活性を有意に抑制しその力価は IL-1β でより著明であった．TNF-α は高濃度 (10ng/ml) で I-5'-D 活性の弱い抑制を示したのみであった．さらに本研究は，I-5'-D の mRNA の発現が IL-1β, IL-6 により著明に抑制され，I-5'-D 活性と同様にその力価は IL-1β で最も強いことを示した．これらのサイトカインは甲状腺組織に浸潤している単核球[33)] および甲状腺細胞自身からも分泌されることから[34)~37)] 自己免疫性甲状腺炎や甲状腺機能低下症の発症に関与している可能性を持ち，サイトカインがオートクリン (autocrine)，パラクリン (paracrine) に作用し，その I-5'-D 抑制効果がこれらの疾患で見られる甲状腺機能の変化に影響を与えている可能性が示唆される．また，サイトカイン除去後の I-5'-D 活性の変化で，いずれのサイトカイン負荷でも除去後コントロールの脱ヨード活性レベルまで回復することから，サイトカインの効果は細胞毒性を伴わないものと考えられた．本研究では I-5'-D 蛋白の定量は行なわなかったが，最近ブロモアセチル T4 (bromoacetyl T4) を用いたアフィニティラベリング (affinity labeling) で甲状腺細胞内の 27-KDa 蛋白が I-5'-D 酵素量を反映することが明らかになったことから[38)]，今後この系を用いてサイトカインの I-5'-D 蛋白量に与える影響が明らかにされるものと思われる．

次に，サイトカインによる甲状腺 I-5'-D 活性抑制のメカニズムについて検討した．TSH は cAMP 産生を通してその効果を発揮するが，TNF-α, IL-1β, IL-6 ともに TSH により誘導された cAMP 産生を抑制したことから，cAMP 産生の減少を介して I-5'-D 活性を抑制している可能性が示唆される．一方，これらのサイトカインは cAMP により誘導された I-5'-D 活性を抑制した．これは，これらのサイトカインの作用部位が cAMP 産生よりさらに末梢のレベルにも存在することを示唆する．また，TNF は好中球の H_2O_2 産生を増加させ[23)] 血管内皮細胞でのフォスフォリパーゼ A2 活性を誘導しフォスフォリパーゼ A2 活性化蛋白の合成を促すことが知られており[22)]，IL-1 と IFN-γ は血管内皮細胞の O_2 産生刺激作用を持つ[24)]．加えて甲状内にフォスフォリパーゼ A2 系が存在し甲状腺細胞自体が活性化酸素産生機構を持つことから[10)39)]，この両者がサイトカインの I-5'-D 抑制効果発現系に含まれるか否かを検討した．活性化酸素捕集剤であるカタラーゼは，Pang らが H_2O_2 の細胞毒性を完全に阻害したと報告している 100μg/ml の濃度で[10)]，それ自体が I-5'-D 活性を抑制したが，いずれのサイトカインの効果も阻害されなかった．これとは対照的にフォスフォリパーゼ A2 阻害剤のデキサメサゾン，サイクロオキシゲナーゼ阻害剤のインドメタシンはそれ自体に I-5'-D 活性を刺激する効果があったが，カタラーゼと同様にいずれもサイトカインの効果を阻害しなかった．これは，サイトカインの I-5'-D 活性抑制効果の発現過程には，フォスフォリパーゼ A2 系の活性化や活性酸素濃度の増加が含まれないことを示唆する．

低 T3 症候群は非甲状腺疾患患者で臨床的には甲状腺機能低下症状を伴わないにもかかわらず，TSH の上昇を伴わない血清 T3 値の低下および重症例では T4 値の低下を伴う病態であり，肝臓における T4 から T3 への脱ヨード能の低下が主要な原因とされているが[40)]，現在までにサイトカインが肝臓の I-5'-D 活性に及ぼす影響について検討した報告は 3 例しかない[6)~8)]．Ozawa ら[6)]は，マウスへの TNF-α の 3 日間投与が肝ホモジネートの I-5'-D 活性に影響を与えなかったと報告し，これに対し Pang ら[8)]は，TNF 投与 8 時間後に I-5'-D 活性は有意に抑制されたと報告した．また，Fujii ら[7)]は，3 日間の IL-1α の投与がマウス肝ホモジネートの I-5'-D 活性を増強したと報告するなど一定の見解は得られていない．しかし，これら 3 報告および TNF のヒトへの投与[41)]は血清甲状腺ホルモン値および TSH 値が低 T3 症候群患者と類似の変動を示し，我々は比較的軽症例である急性呼吸器感染症患児において血清 IL-6 上昇者の血清 T3 値が有意に低いことおよび血清 T3, T3/T4 比と IL-6, C-反応蛋白 (C-reactive protein, CRP) が有意な負の相関を持つことを示した[16)]．また，血清 TNF 上昇者で血清 T3 値が有意に低かったとの報告もあることから[42)]，サイトカインが低 T3 症候群の誘因の一つである可能性が示唆される．感染症や他の炎症性疾患患者の血清中に見られる CRP などの急性期蛋白は肝臓で産生され，モノカイン (monokine)，なかでも IL-6 により強く誘導される[43)~47)]．加えて，血清 IL-6 と CRP 値の間には有意な正相関がみられる[16)]．さらに，IL-6 は肝芽細胞腫由来の Hep G2 細胞の甲状腺ホルモン結合蛋白の分泌や遺伝子発

現を抑制すると報告され[48]，肝臓が IL-6 の標的臓器であるとともに血清甲状腺ホルモン代謝へ影響を与えている可能性が示唆される．また，TNF, IL-1, IL-6 はモノカイン・カスケード (monokine cascade) を形成して様々な感染源に対する免疫反応を増幅し，IL-6 がその最終産物であることから，TNF, IL-1 も直接あるいは間接的に肝臓に作用する可能性があるものと思われる[49)~52)]．甲状腺のⅠ型 I-5'-D の生理的な意義は未だ明らかではないが，本研究で示されたサイトカインの甲状腺 I-5'-D 活性への影響は，サイトカインの肝 I-5'-D 活性への影響を推察する上で重要な手掛かりとなるものと考えられ，これらのサイトカインが肝 I-5'-D 活性の抑制を介して，様々な疾患患者で見られる低 T3 症候群の原因の一つとなりうる可能性が示唆された．

結　　論

FRTL-5 生細胞を用いた甲状腺Ⅰ型 I-5'-D 活性測定法を確立した．さらに，この系を用いて IL-1β, IL-6 および TNF-α の 3 種類のサイトカインの影響について検討し，以下の結論を得た．

1．FRTL-5 生細胞を用いた rT3 からの脱ヨード反応が 1) PTU により著明にまた T4 により容量依存性に抑制される，2) 脱ヨード活性が TSH 依存性である，など甲状腺のⅠ型 I-5'-D 活性と同様の特性を持つことを示した．

2．FRTL-5 生細胞を用いた I-5'-D アッセイが従来の細胞破砕物や臓器のホモジネートを用いた測定法より，より生理的に甲状腺Ⅰ型 I-5'-D 活性を評価できるモデルであることを示した．本法は様々な物質の I-5'-D 活性に対する直接的効果を非常に簡便に評価できる利点を持つと考えられた．

3．IL-1β, IL-6 および TNF-α のサイトカインは，甲状腺Ⅰ型 I-5'-D 活性および I-5'-D mRNA の誘導を有意に抑制した．その力価は IL-1β>IL-6≫TNF-α であった．

4．サイトカインは TSH による cAMP 産生よりも末梢で作用し，また TSH により誘導される cAMP 産生の減少をも介して，その効果を発現する可能性をもつと推察された．

5．サイトカインによる I-5'-D 抑制系には活性化酸素産生やフォスフォリパーゼ A2 系活性化の過程は含まないと考えられた．

6．以上の所見から自己免疫性甲状腺疾患や低 T3 症候群において，これらのサイトカインが I-5'-D 活性の抑制を介して，その甲状腺ホルモン動態に影響を与えている可能性が示唆された．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました恩師谷口　昂教授に心より深甚なる感謝の意を表します．また終始直接御指導を賜りました医療情報部佐藤　保教授，小児科学教室五十嵐登助手ならびに教室員の皆様に深謝致します．さらに，FRTL-5 細胞を供与していただいた NIH の Kohn 博士，TNF-α 供与していただいたサントリー株式会社，IL-1β を供与していただいた大塚製薬株式会社の平井嘉勝博士，IL-6 を供与いただいた大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センターの平野俊夫博士に謝意を表します．

文　　献

1) **Rémy, J. J., Salamero, J., Bechet, M. M. & Charreire, J.**: Experimental autoimmune thyroiditis induced by recombinant interferon-γ. Immunol. Today, **8**, 73 (1987).

2) **Burman, P., Karlsson, F. A., Öberg, K. & Alm, G.**: Autoimmune thyroid disease in interferon-treated patients. Lancet, **2**, 100-101 (1985).

3) **Burman, P., Totterman, T. H., Öberg, K. & Karlsson, F. A.**: Thyroid autoimmunity in patients on long term therapy with leukocyte-derived interferon. J. Clin. Endocrinol. Metab., **63**, 1086-1090 (1986).

4) **Atkins, M. B., Mier, J. W., Parkinson, D. R., Gould, J. A., Berkman, E. M. & Kaplan, M. M.**: Hypothyroidism after treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. N. Engl. J. Med., **318**, 1557-1563 (1988).

5) **Van, Liessum, P. A., Mulder, P. H. M., Mattijssen, E. J. M., Corstens, F. H. M. & Wagener, D. J. T.**: Hypothyroidism and goiter during interleukin-2 therapy without lak cells. Lancet, **1**, 224 (1989).

6) **Ozawa, M., Sato, K., Chol, Han, D., Kawakami, M., Tsushima, T. & Shizume, K.**: Effects of tumor necrosis factor-α/cachectin on thyroid hormone metabolism in Mice. Endocrinology, **123**, 1461-1467 (1988).

7) **Fujii, T., Sato, K., Ozawa, M., Kasono, K., Imamura, H., Kanaji, Y., Tsushima, T. & Shizume, K.**: Effects of interleukin-1 (IL-1) on thyroid hormone metabolism in mice: stimulation by IL-1 of iodothyronine 5'-deiodinating activity (Type 1) in the liver. Endocrinology, **124**, 167-174 (1989).

8) **Pang, X-P., Hershman, J. M., Mirell, C. J. & Pekary, A. E.**: Impairment of hypothalamic-pituitary-thyroid function in rats treated with human recombinant tumor necrosis factor-α (cachectin). Endocrinology, **125**, 76-84 (1989).

9) **Sato, K., Sato, T., Shizume, K., Ozawa, M., Chol, Han, D., Imamura, H., Tsushima, T., Demura, H., Kanaji, Y., Ito, Y., Obara, T., Fujimoto, Y. & Kanaji, Y.**: Inhibition of ^{125}I organification and thyroid hormone release by interleukin-1, tumor necrosis factor-α, and interferon-γ in human thyrocytes in suspension culture. J. Clin. Endocrinol. Metab., **70**, 1735-1743 (1990).

10) **Pang, X-P., Hershman, J. M., Smith, V., Pekary, A. E. & Sugawara, M.**: The mechanism of action of tumor necrosis factor-α, and interleukin 1 on FRTL-5 rat thyroid cell. Acta Endocrinol. (Copenh.), **123**, 203-210 (1990).

11) **Patwardhan, N. A. & Lombardi, A.**: Effect of tumor necrosis factor on growth and differentiated function of FRTL-5 cells. Surgery, **110**, 972-977 (1991).

12) **Zakarija, M. & Mckenzie, J. M.**: Influence of cytokines on growth and differentiated function of FRTL-5 cells. Endocrinology, **125**, 1260-1265 (1989).

13) **Rasmussen, Å. K., Bech, K., Feldt-Rasmussen, U., Poulsen, S., Holten, I., Ryberg, M., Dinarello, C. A., Siersbak-Nielsen, K., Friis, T. & Bendtzen, K.**: Interleukin 1 affects the function of cultured human thyroid cells. Allergy, **43**, 435-441 (1988).

14) **Zeki, K., Azuma, H., Suzuki, H., Morimoto, I. &**

Eto, S.: Effects of interleukin 1 on growth and adenosine 3', 5'-generation of the rat thyroid cell line FRTL-5 cells. Acta Endocrinol. (Copenh.), **124**, 60-66 (1991).

15) **Azuma, H., Zeki, K., Tanaka, Y., Suzuki, H., Yamashita, U., Morimoto, I. & Eto, S.**: Inhibitory effect of IL-1 on the TSH dependent growth of rat thyroid cell (FRTL-5). Endocrinol. Japon., **37**, 619-627 (1990).

16) **Hashimoto, H., Igarashi, N., Yachie, A., Miyawaki, T. & Sato, T.**: The relationship between serum levels of interleukin-6 and thyroid hormone in children with acute respiratory infection. J. Clin. Endocrinol. Metab., in press.

17) **Rasmussen, Å. K., Kayser, L., Feldt-Rasmussen, U., Bech, K., Bendtzen, K., Diamant, M. & Perrild, H.**: Interleukin-6 is not a second mediator of interleukin-1 induced suppression of thyroid function in cultured human thyrocyte. Exp. Clin. Endocrinol., **97**, 179-181 (1991).

18) **Rasmussen, Å. K., Kayser, L., Bech, K., Feldt-Rasmussen, U., Perrild, H. & Bendtzen, K.**: Influence of interleukin 6 on the function of secondary cultures of human thyrocytes. Acta Endocrinol. (Copenh.), **24**, 577-582 (1991).

19) **Tominaga, T., Yamashita, S., Nagayama, Y., Morita, S., Yokoyama, N., Izumi, M. & Nagataki, S.**: Interleukin 6 inhibits human thyroid peroxidase gene expression. Acta Endocrinol. (Copenh.), **124**, 290-294 (1991).

20) **Borges, M., Ingbar, SH. & Silva, J. E.**: Iodothyronine deiodinase in FRTL-5 cells: predominance of type I 5'-deiodinase. Endocrinology, **126**, 3059-3068 (1990).

21) **Toyoda, N., Nishikawa, M., Horimoto, M., Yoshikawa, N., Mori, Y., Yoshimura, M. & Masaki, H.**: Graves' immunoglobulin G stimulates iodothyronine 5'-deiodinating thyroid cell. J. Clin. Endocrinol. Metab., **70**, 1506-1511 (1990).

22) **Clark, M. A., Chen, M-J., Crooke, S. T. & Bomalaski, J. S.**: Tumor necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A2 activity and synthesis of a phospholipase A2 activating protein in endothelial cells. Biochem. J., **250**, 125-132 (1988).

23) **Klebanoff, S. J., Vadas, M. A., Harlan, J. M., Sparks, L. H., Gamble, J. R., Agosti, J. M. & Waltersdorph, A. M.**: Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. J. Immunol., **136**, 4220-4225 (1986).

24) **Matsubara, T. & Ziff, M.**: Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. J. Immunol., **137**, 3295-3298 (1987).

25) **Green, L. M., Reade, J. L. & Ware, C. F.**: Rapid colormetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. J. Immunol. Methods, **70**, 257-268 (1984).

26) **Berry, M. J., Banu, L. & Larsen, P. R.**: Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. Nature, **349**, 438-440 (1991).

27) **Wu, S. Y.**: Thyrotropin-mediated induction of thyroidal iodothyronine monodeiodinases in the dog. Endocrinology, **112**, 417-424 (1983).

28) **Ericson, V. J., Cavalieri, R. R. & Rosenberg, L. L.**: Phenolic and nonphenolic ring iodothyronine deiodinase from rat thyroid gland. Endocrinology, **108**, 1257-1264 (1981).

29) **Wu, S. Y., Reggio, R. & Florsheim, W. H.**: Characterization of thyrotropin-induced increase in iodothyronine monodeiodinating activity in mice. Endocrinology, **116**, 901-908 (1985).

30) **Ishii, H., Inada, M., Mashio, Y., Nishikawa, M. & Imura, H.**: Triiodothyronine generation from thyroxine in human thyroid: enhanced conversion Graves' thyroid tissue. J. Clin. Endocrinol. Metab., **52**, 1211-1217 (1981).

31) **Ishii, H., Inada, M., Tanaka, K., Mashio, Y., Naito, K., Nishikawa, M., Matsuzuka, F., Kuma, K. & Imura, H.**: Sequential deiodination of thyroxine in human thyroid gland. J. Clin. Endocrinol. Metab., **55**, 890-896 (1982).

32) **Damas, P., Reuter, A., Gysen, P., Demonty, J., Lamy, M. & Franchimont, P.**: Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. Crit. Care. Med., **17**, 975-978 (1989).

33) **Bottazzo, G. F., Todd, I., Mirakian, R., Belfiore, A. & Pujol-Borrell, R.**: Organic-specific autoimmunity: A 1986 overview. Immunol. Rev., **94**, 137-169 (1986).

34) **Grubeck-Loebebstein, B., Buchan, G., Chantry, D., Kassal, H., Londei, M., Pirich, K. Barrett, K., Turner, M., Waldhausl, W. & Feldmann, M.**: Analysis of intrathyroidal cytokine production in thyroid autoimmune disease: thyroid follicular cells produce interleukin-1α and interleukin-6. Clin. Exp. Immunol., **77**, 324-330 (1989).

35) **Diamant, M., Kayser, L., Rasmussen, Å. K., Rech, K. & Feldt-Rassmussen, U.**: Interleukin-6 production by thyroid epithelial cells. Enhancement by interleukin-1. Autoimmunity, **11**, 21-26 (1991).

36) **Zheng, R. Q. H, Abney, E., Chu, C. Q., Field, M., Grubeck-Loebebstein, B., Maini, R. N. & Feldmann, M.**: Detection of interleukin-6 and interleukin-1 production in human thyroid epithelial cells by non-radioactive in situ hybridization and methods. Clin. Exp. Immunol., **83**, 314-319 (1991).

37) **Zheng, R. Q. H, Abney, E. R., Chu, C. Q., Field, M., Maini, R. N. Lamb, J. R. & Feldmann, M.**: Detection of in vivo production of tumor necrosis factor-alpha by human thyroid epithelial cells. Immunology, **75**, 456-462 (1992).

38) **Toyoda, N., Nishikawa, M., Yoshikawa, N., Mori, Y.,Yoshimura, M., Masaki, H., Gondou, A. & Inada, M.**: Identification of a 27-kDa protein with the property of type I iodothyronine 5'-deiodinase in human thyroid gland. J. Clin. Endocrinol. Metab., **74**, 533-538 (1992).

39) **Degroot, L. J. & Niepomniszcze, N.**: Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. Metabolism., **26**, 665-718 (1977).

40) **Wartofsky, L. & Burman, K. D.**: Alternations in thyroid function in patients with systemic illnes: the "euthyroid sick syndrome". Endocr. Rev., **3**, 164-217 (1982).

41) Poll, T. V. D, Romijn, J. A., Wiersinga, W. M. & Sauerwein, H. P.: Tumor necrosis factor: A putative mediator of the euthyroid sick syndrome in man. J. Clin. Endocrinol. Metab., 71, 1567-1572 (1990).

42) Mooradian, A. D., Reed, R. L., Osterweil, D., Schiffman, R. & Scuderi, P.: Decreased serum triiodothyronine is associated with increased concentration of tumor necrosis factor. J. Clin. Endocrinol. Metab., 71, 1239-1242 (1990).

43) Ganlgie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorf, P. & Baumann, H.: Interferon-b2/B-cell stimulating factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating regulate the major acute phase response in liver cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7251-7255 (1987).

44) Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Hirano, T., Kishimoto, T. & Heinrich, P. C.: Induction of rat acute phase proteins by interleukin-6 in vitro. Eur. J. Immunol., 18, 717-721 (1988).

45) Marinkovic, S., Jahreis, G. P., Wong, G. G. & Barmann, H.: Interleukin-6 modulate the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo. J. Immunol., 142, 808-812 (1989).

46) Ramadori, G., Van, Damme, J., Reider, H., Meyer, Zum. & Büschenfelde, K. H.: Interleukin-6, The third mediator of acute-phase reaction, modulate hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin-1β and tumor necrosis factor-α. Eur. J. Immunol., 18, 1259-1264 (1988).

47) Ueno, Y., Takano, N., Kanegane, H., Yokoi, T., Yachie, A., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.: The acute phase nature of interleukin 6: Studies Kawasaki disease and other febrile illness. Clin. Exp. Immunol., 76, 337-342 (1989).

48) Bartalena, L., Farsettif, A., Flink, I. L. & Robbins, J.: Effects on interleukin-6 on the expression of thyroid hormone-binding protein genes in cultured human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. Mol. Endocrinol., 6, 935-942 (1992).

49) Beutler, B. & Cerami, A.: Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. Endocr. Rev., 9, 57-66 (1988).

50) Le, J. & Vilcek, J.: Biology of disease. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab. Invest., 56, 234-248 (1987).

51) Dinarello, C. A. & Mier, J. W.: Lymphokines N. Eng. J. Med., 317, 940-945 (1987).

52) Tosato, G. & Jones, K. D.: Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. Blood, 75, 1305-1310 (1990).

Effects of Interleukin-1β, Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-α on Type I Iodothyronine 5'-deiodinase Activity in Rat Functional Thyroid Cell Line, FRTL-5

Hiroyuki Hashimoto, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
J. Juzen Med Soc., **102,** 776−786 (1993)

Key words FRTL-5, interleukin-1β, interleukin-6, tumor necrosis factor-α, thyroidal type I iodothyronine 5'-deiodinase

Abstract

Cultured FRTL-5 rat functioning thyroid cell line was used to study the effects of cytokines, such as interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) on the thyroidal type I iodothyronine 5'-deiodinase (I-5'-D) activity and the mode of action. FRTL-5 cells were incubated with medium containing 0.5 μM rT3 with a tracer amount of ^{125}I-rT3. After 24 hr incubation, released I^- in the medium was separated by Dowex 50W-X2 column and radioactivity was counted. Deiodination activity in live FRTL-5 cells was enhanced about 3 times from basal level by the addition of TSH, which was inhibited markedly by propylthiouracil and dose-dependently by T4. These findings strongly suggest that deiodination in live FRTL-5 cells has properties similar to those of thyroidal type I I-5'-D and that FRTL-5 cells are a more suitable model for the assay of thyroidal I-5'-D activity than generally used homogenated thyroid tissue or sonicated FRTL-5 cells. Basal and TSH-induced I-5'-D activities were significantly inhibited by 100 pg/ml of IL-1β and IL-6, while the inhibitory effect of TNF-α was only seen at 10 ng/ml. The inhibition by IL-1β and IL-6 was constantly observed irrespective of the time course of cell proliferation. These effects were not due to cytotoxicity of the cytokines, since the cells recovered I-5'-D activity by removal of the cytokines from the incubation medium. In addition, these cytokines significantly suppressed TSH-induced cAMP production, and $(Bu)_2$cAMP induced I-5'-D activity was also inhibited by the cytokines. Catalase (scavenger of active oxygen species), dexamethasone (a phospholipase A_2 inhibitor) and indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor) did not abolish the inhibitory effects of cytokines. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction revealed a marked suppres-

sion of I-5'-D mRNA expression by IL-1β and 6. From these findings, we conclude that these cytokines inhibit the thyroidal type I I-5'-D activity in order of potency, IL-1β $>$IL-6$\gg$TNF-α, probably by way of suppression of induction of I-5'-D mRNA. The site of inhibition of these cytokines may be distal to TSH-mediated cAMP production, and the inhibitory effects of cytokines may also be exhibited by decreasing the TSH-induced generation of cAMP. The inhibitory effect of cytokines on thyroidal type I I-5'-D activity may not be associated with phospholipase A_2-pathway or production of active oxygen species.