人TSH受容体発現のmRNAおよび蛋白レベルでの形態学的ならびに生化学的研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-12-08
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 水上, 勇治, Mizukami, Yuji
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00049262

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

KAKEN
1997
27

人TSH受容体発現のmRNAおよび蛋白レベルでの形態学的ならびに生化学的研究

08670196

平成８年度～平成９年度科学研究費補助金基盤研究(C)(2)研究成果報告書

平成１０年３月

研究代表者　水上　勇治
（金沢大学医学部保健学科教授）

KAKEN
1997
27

はしがき

TSH受容体はTSHと特異的に結合することにより，甲状腺濾胞細胞の増殖，機能のコントロールに中心的役割を果たしている．最近，TSH受容体cDNAがクローニングされ，TSH受容体は細胞膜を貫通し，細胞外と細胞内の領域をもつ分子量82,500のα，β-subunitよりなるG蛋白結合受容体であることが明らかとされた．私達は一昨年来，Paris South大学のMilgrom教授より供与された人TSH受容体β-subunit蛋白に対するモノクロナール抗体を用い，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とした．このことは腺腫，癌でTSH受容体が保たれていること，また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)．一方，現在まで甲状腺腫瘍やGraves病甲状腺におけるTSH受容体発現に関する定量的測定は，主としてnorthern blot法によるmRNAレベルでの検討が行われてきた．これらの報告によると甲状腺癌におけるTSH受容体mRNAの発現は正常甲状腺に比しむしろ低いとされている．また，Graves病甲状腺におけるTSH受容体mRNA発現は甲状腺刺激抗体による慢性刺激の結果down-regulation機構が働き，mRNAの発現は減少しているとする報告と，反対にup-regulation機構が働きmRNA量がむしろ増加しているとする相反する報告がある(Huber et al. Endocrinology 130 ;2858,1992)．私達のTSH受容体蛋白の発現に関する免疫組織化学的検討結果はHuberらの報告と一致するものであった．以上の点に関して，私達もTSH受容体の発現を蛋白レベルのみならず，さらにmRNA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る．また， in situ hybridization法を用いることにより，形態学的にもTSH受容体mRNAの発現を可視化することができ，TSH受容体蛋白に対する免疫組織化学的所見との対比を試みたい．現在のところ，TSH受容体の発現を蛋白レベルおよびmRNAレベルで並行して，定量的および形態学的検討を行った報告はみあたらない．今回の私達の研究は甲状腺腫瘍細胞におけるTSH受容体の動態およびGraves病甲状腺機能亢進症の病態を解明するものである．

研究組織

研究代表者　：　水上勇治　（金沢大学医学部保健学科 教授）
研究分担者　：　道岸隆敏　（金沢大学医学部核医学 助教授）

研究経費

平成８年度	１６００千円
平成９年度	７００千円
計	２３００千円

研究発表

未発表（平成１０年度発表予定）

8000-60050-1
金沢大学附属図書館

目次

Ⅰ．材料・方法と結果

A．Nothern blot法による解析

B．In situ hybridization法による解析

C．免疫組織化学的解析

Ⅱ．考察

Ⅲ．結語

Ⅰ．材料・方法と結果

A．Nothern blot法による解析

方法

1．RNA抽出

組織を凍らせたままハンマーで砕き，５倍量のGTC溶液（4.0Mグアニジンチオシアネート(GTC)；0.1M トリスー塩酸(pH7.5)；1% 2-メルカプトエタノール)を加え，１～２分間ポリトロンホモジェナイザーでホモジェナイズした．sodium N-lauroyl sarcosinateを0.5%になるように加えよく混合し，5,000rpm室温で１０分間遠心し，この上清を5.7M塩化セシウム溶液（5.7M塩化セシウム(CsCl；0.01M EDTA)をいれた遠心チューブの上層に界面をみださないように重層し，最上層に流動パラフィンを加え，18℃，35,000rpmで１２～２０時間遠心した．チューブの底面から5mm程度のところまで液を吸い取って除去し，チューブを逆さまにして残った液を除去し，チューブの底面をRNAペレットごと切り取った．ペレットが流されないよう注意しながら70%エタノールで洗い室温で１５分間風乾した．TES（10mMトリスー塩酸(pH7.4)；5mM EDTA；1% SDS）にRNAペレットを溶かし，3M酢酸ナトリウム(pH5.2)と100%エタノールを加え0℃で３０分以上放置した．これを15,000rpm, 4℃，１０分間遠心し，RNAをペレットにし，上清をすて，70%エタノールを加え，軽く撹拌した．これを15,000rpm, 4℃，２分間遠心し，上清を捨て水分を取り除き室温にて１０分間放置し，ペレットを風乾した．RNAは260nmにおける吸光度を測定することにより定量した．

2．RNAブロットハイブリダイゼーション解析

total RNAに10×MOPS泳動バッファー（0.4M MOPS(pH7.0)；100mM 酢酸ナトリウム；20mM EDTA），ホルムアルデヒド，ホルムアミドを加え65℃で１５分間加熱し，RNAの高次構造を変性させた．これを急冷し，軽く遠心し，ゲルローディング

バッファー（50%グリセロール；1mM EDTA(pH8.0)；0.25%ブロモフェノールブルー(BPB)；0.25%キシレンシアノール(XC)）を加えた後，18%のホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動した．泳動後，ゲルをエチジウムブロマイド染色液で振盪しながら２５分間染色し，200mM 酢酸ナトリウム(pH4.0)にてゲルの中和と脱染色を行った．ナイロンメンブランをゲルの上に密着させその上に濾紙，ペーパータオルをのせ1cm^{2}あたり5g程度の重さのおもりをのせ１２～１５時間放置し，トランスファーした．乾燥したメンブランをラップで包み、UVトランスイルミネーターで２～５分間紫外線照射し固定した．メンブランをプレハイブリダイゼーション溶液（5×SSPE，50% ホルムアミド、5×Denhardt's solution, 0.5%SDS,　変性サケ精子DNA）中で65℃，1時間インキュベートした後，標識したDNAプローブを含むハイブリダイゼーション溶液中で65℃,１２時間インキュベートした．インキュベート終了後，2×SSPE/0.1%SDS中，室温で10分間２回，1×SSPE/0.1%SDS中，65℃で２０分間２回，0.1×SSPE/0.1%SDS中，65℃で20分間洗浄を行った後，X線フィルムを用いて感光させた．

材料

１９９６年から１９９７年にかけて金沢大学第２外科にて手術で得られた１１例の甲状腺を対象とした．（正常甲状腺４例，腺腫２例，バセドー病甲状腺２例，濾胞癌１例，乳頭癌１例，慢性甲状腺炎１例）組織は切除後直ちに凍結して-80℃に保存された．

プローブ

TSH receptor遺伝子の検索に用いたプルーブはTSH receptor cDNA vector（Paris South 大学　Dr. Milgromより供与）であり内部対照としてhuman β-actin cDNA を用

いた.

結果

TSH受容体遺伝子のmRNA発現

Northern blot法により検討された種々の疾患における甲状腺組織１１例について正常甲状腺組織でのhTSHR/actinは平均0.71であるのに対し，腺腫では0.93さらにバセドー病では1.33と明らかに高値を示した．濾胞癌の１例はほぼ正常と同様の値であり，乳頭癌および慢性甲状腺炎では正常に比し低値を示した．（表１）

表１.

		hTSHR/β-actin	平均
1	正常甲状腺	0.55	0.71
2	正常甲状腺	0.65	
3	正常甲状腺	n.d	
4	正常甲状腺	0.92	
5	腺腫	0.94	0.93
6	腺腫	1.06	
7	バセドー病	1.59	1.33
8	バセドー病	1.10	
9	濾胞癌	0.72	
１０	乳頭癌	0.49	
１１	慢性甲状腺炎	0.45	

B. In situ hybridization法による解析

方法

ISH法によるTSHreceptor mRNAの検索

1．ラジオアイソトープ標識リボヌクレオチドプローブの作成

プローブの作製には，あらかじめプラスミドBluescript(Stratagene,California,USA)のマルチクローニングサイトのヒトTSH receptor cDNAの翻訳領域の一部を用いた．はじめに制限酵素によるプラスミドDNAの線状化を行った．次にα-[^{35}S]UTP(＞37TBq / mmol, Amersham,Buckinghamshire,UK)を使用し，線状化プラスミドDNAを鋳型としてT3RNAポリメラーゼ(Stratagene)によりアンチセンスリボヌクレオチドプローブを，また，T7RNAポリメラーゼ（東洋紡，東京）によりセンスリボヌクレオチドプローブを合成した．反応終了後，鋳型プラスミドDNAをDNアーゼⅠ(DNaseⅠ，宝酒造，滋賀）で分解し，フェノール・クロロホルム抽出，エタノール・アンモニウム酢酸沈殿によりプローブを回収した．プローブの組織浸透性を上昇させるために，転写産物にRNA切断緩衝液(40mM炭酸水素ナトリウム：60mM炭酸ナトリウム＝19：1）を加え60℃にて55分間反応し，プローブを約150塩基の長さに切断した．

2．材料

手術により得られた甲状腺組織を氷冷した4％パラホルムアルデヒド溶液中にて固定した．用いた甲状腺組織の内訳は，正常甲状腺3例，腺腫2例，バセドー病甲状腺3例，乳頭癌3例，慢性甲状腺炎1例，未分化癌1例であった．

3．プレパラート標本の作製

パラフィン包埋組織を約4μmに薄切し，シランコートスライド（ダコ・ジャパン，京都）にのせ，37℃で2時間，45℃で4時間放置し乾燥させた．脱パラフィン処理後プローブの浸透性と反応性を高める目的で塩酸処理（0.2N 塩酸,室温で２０分間）を行なった．次いで，1μg/mlのプロテナーゼK溶液（和光純薬工業，大阪）に37

℃で１０分間漬し，除蛋白処理をおこなった．さらに，非特異的なプローブの吸着を防止するため，0.25% 無水酢酸添0.1Mトリエタノールアミン溶液（(pH8.0)に１０分間漬した後，エタノール系列で脱水，風乾した．

４．プレハイブリダイゼーション

プローブの非特異的結合を阻止するため，プレハイブリダイゼーション溶液（50%ホルムアルデヒド; 0.3M塩化ナトリウム；20mMトリス塩酸，pH7.5; 2.5mMエチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム；10mM ジチオストレイトール；0.5ml/ml大腸菌トランスファーRNA；0.02%フィコール；0.02%ポリビニルピロリドン；0.02%ウシ血清アルブミン）をプレパラート標本切片上に滴下した後，50%ホルムアミド/0.3M塩化ナトリウムで飽和したモイストチャンバー中で室温に一晩インキュベーションした．

５．ハイブリダイゼーション

上述のプレハイブリダイゼーション液に，２×10^5cpm/μlとなるように^{35}S標識RNAプローブを加え，80℃で３分間加熱後，氷中で急冷した．これに硫酸デキストランナトリウムを最終濃度が10%となるように加えてハイブリダイゼーション液とした．切片にハイブリダイゼーション液を滴下し，50℃に加温したモイストチャンバー中で２０時間インキュベーションした．

６．ハイブリッドのオートラジオグラフィーによる検出

ハイブリダイゼーション終了後，プレパラート標本を50℃に加温した50%ホルムアミド加 2×SSC(1×SSC, 0.15M塩化ナトリウム/0.015Mクエン酸ナトリウム，pH7.0/10mMエチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム溶液中）に入れ，１時間洗浄した．次に20μg/mlになるようにRNaseA(Sigma)を加えた0.5M塩化ナトリウム/10mMトリスー塩酸(pH8.0)溶液中で37℃，３０分間のRNアーゼ処理を行った．その後，50℃に加温した2×SSC，0.5×SSC， 0.1×SSC溶液にて，順次組織を洗浄し

た．脱水，風乾の後，完全暗室内で，プレパラート標本に写真乳剤(Konica autoradiographic emulsion type NR-M2，コニカ，東京）を塗布し，風乾した．プレパラート標本をシリカゲルを入れた遮光箱に並べ４℃にて２ヶ月から３ヶ月露出後，現像した．その後ヘマトキシリン・エオジン染色で後染色し，脱水，封入した．標本は明視野と暗視野の切り替え可能な顕微鏡(Nikon SMZ-U，ニコン，大阪）を使って検鏡した．

結果

TSH受容体mRNAの陽性シグナルは基本的に濾胞細胞の細胞質にびまん性に認められた．免疫組織化学ではTSH受容体蛋白は主として濾胞細胞の基底側細胞膜中に認められたのに対してISH法での陽性シグナルの細胞内局在性は明らかではなかった．正常甲状腺では濾胞細胞が極めて扁平化しており，陽性シグナルの同定は困難であったが一般的に軽度の陽性シグナルを認めた．腺腫濾胞細胞での陽性シグナルは一般的に明瞭で正常に比し陽性度は高い．一般的に大型の腺腫濾胞細胞ほど強いシグナルを示す傾向がみられた．好酸性細胞のシグナルは減弱していた．バセドー病甲状腺の濾胞細胞のシグナルは全体的に中等度ー高度でNothern blotのTSH受容体mRNAの過剰発現を形態学的にも確認できる所見であった．同一切片内組織内の甲状腺濾胞細胞の増殖に応じてシグナルの強度に差異がみられ，一般的に増殖が強く濾胞細胞が増高する程，シグナルは増強する傾向がみられた．甲状腺乳頭癌におけるシグナル強度は腺腫とほぼ同等であり，正常甲状腺に比し明らかに増強していたが，バセドー病甲状腺濾胞細胞に比し，明らかにシグナル強度は低い．慢性甲状腺炎では濾胞細胞の変化が多彩であり，これに対応してTSH受容体mRNAシグナル強度も多彩であった．しかし全体的にシグナル強度は乳頭癌，腺腫に比し弱い傾向がみられた．未分化癌の例では陽性シグナルは腫瘍細胞に検出されなかった．

C．免疫組織化学的解析

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５μm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βsubunit(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 Hormnes et Reproduction, Faculte de Medicine de Bicetre, Universite Paris,Sud,Paris,France)

使用濃度

0.2-2.0μ g/ml（至適濃度1.0μ g/ml)

３．Image analyzerを用いた免疫染色の定量的測定

CAS200image 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（×１０倍）を選びそのＯＤを自動的に計算，平均化した．

4．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った．

結果

1．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ー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．

7）Image analyze

Image analyzer　を用いた各疾患における免疫染色性のＯＤは以下のとおりであった．

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．

Ⅱ．考察

TSH受容体は甲状腺濾胞細胞の機能をコントロールする最も重要なkey factorである．TSH受容体の分子構造は現在ほぼ解明され，細胞外，細胞膜，細胞内の３つの部分より成る分子量82,500の蛋白であり，これはS-S結合をもち，α-subunit，β-subunitに分けられる．私達は数年前より，Paris South大学のMilgrom教授より供与されたTSH受容体の604-764nに対するmonoclonal抗体を用い，種々の甲状腺疾患におけるTSH受容体の発現を免疫組織化学的に検討してきた．この結果得られた最も重要な所見は

１．TSH受容体蛋白は甲状腺濾胞細胞の基底側膜面で発現している．

２．機能的に不活性である甲状腺腺腫，甲状腺乳頭癌においてもTSH受容体蛋白は正常甲状腺以上に発現が増加している．

３．未分化癌ではTSH受容体の発現は全く認められず，機能的にもこれら未分化癌細胞は甲状腺濾胞細胞の性質を失っている．

４．バセドー病甲状腺では極めて強いTSH受容体蛋白の発現がみられ，これはTSH受容体のup-regulation機構が作動し，これがバセドー病の病因の一つであること．

などが明らかとなった．

今回の研究ではさらにTSH受容体cDNAを用い，以上の免疫組織化学の結果をnothern blot， in situ hybridization法により定量的，形態学的にmRNAレベルで検討をおこなった．免疫組織化学，nothern blot， in situ hybridization法と各々で，使用された甲状腺組織が異なり，個々の症例でこれら免疫組織化学，nothern blot， in situ hybridizationの結果を比較することは出来なかった．また，解析した症例数も少なく十分ではなかった．しかし，各疾患グループ別にみると免疫組織化学の結果を補強する結果が得られた．即ち甲状腺腺腫，乳頭状癌でも明らかにTSH受容体mRNAが発現しており，正常甲状腺に比しむしろ発現が増強していること，バセドー病甲状腺

ではさらにTSH受容体mRNA発現が増加しており，TSH受容体蛋白の増加がmRNAレベルでも認められるなど，mRNAレベルと蛋白レベルの発現に解離は認められなかった．今後さらに症例数を増し，以上の結果を統計学的に確認したいと考えている．さらに，甲状腺癌について，DNAレベルでの増幅についても検討し，甲状腺癌の生物学的な種々の側面についてTSH受容体の観点から総合的に検討したい．

Ⅲ．結語

１．種々の疾患の人甲状腺組織を用い，TSH受容体遺伝子のmRNA 発現，蛋白発現をnothern blot法， in situ hybridization法，免疫組織化学法用い検討した．

２．これら３種の方法を用いたTSH受容体発現は各疾患別にみてほぼ一致して結果が得られた．

３．バセドー病甲状腺ではmRNAレベル，蛋白レベル共に発現が高度に増加し，バセドー病甲状腺におけるTSH受容体のup-regulation機構が作動していることが推測された．

４．非機能性の甲状腺腺腫，乳頭癌においてもTSH受容体はmRNAレベル，蛋白レベルで発現が増加していた．

５．未分化癌のTSH受容体はmRNAレベル，蛋白レベル共に発現が認められなかった．