

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2011 年 2 月 21 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名：呼和哈斯

指導責任者名：鈴木幸一

所属部署名：感染制御部第8室 職名：室長

所在地：東京都東村山市青葉町4-2-1

電話：042-394-9092 内線：431



1. 助成金額： 600,000 円
2. 研究テーマ サイログロブリン(Tg)が持つ細胞増殖遺伝子発現調節機能を担う活性部位の同定

3. 成果の概要

本研究により、TgはMAPK経路のERKを介して甲状腺細胞増殖を誘導すること

を明らかにし、甲状腺細胞では、インスリンと血清非存在でTgにより誘導される細胞増殖は

複数のシグナル伝達カスケードを介して誘導されていることを示唆しました。

4. 研究業績

(1)学会における発表 無・有(学会名・演題)

(2)発表した論文 無・有(雑誌名・題名)

サイログロブリン (Tg) が持つ細胞増殖遺伝子発現調節機能を担う活性部位の同定

研究者氏名	呼和哈斯
中国所属機関	中国・内モンゴル・内蒙古中蒙医院
日本研究機関	国立感染症研究所ハンセン病研究センター
指導責任者	室長：鈴木幸一
共同研究者名	鈴木幸一、須江真理子

要旨

サイログロブリン(Tg)は660kDaの巨大なタンパク質であり、甲状腺ホルモン合成の基質として存在するだけでなく、甲状腺機能に関わる遺伝子発現を転写レベルで制御する強力な自己調節因子として作用することが知られ、ラット甲状腺細胞(FRTL-5)においては細胞増殖機能を示していることが報告されてきました。しかし、その分子機序に関してはまだ未知のままである。本研究ではラット甲状腺細胞 FRTL-5 細胞を用いて Tg の細胞増殖分子機序について検討を行った。マイクロアレイ解析で、Tg が MAPK 経路に関わる遺伝子 MEK と ERK の発現を高進させ、実際 MAPK/ERK 経路に関与する Raf, MEK 1/2 と ERK1/2 などのタンパクの発現も Tg により増加を示し、その細胞増殖が PD98059 (MEK 1/2 と ERK1/2 の抑制剤)により抑制された。c-myc, c-fos, and c-jun などの ERK 下流の転写因子も Tg により活性化され、CDKs と Rb のリン酸化も Tg により誘導された。

これらの結果から、Tg が MAPK 経路の ERK を介して甲状腺細胞増殖を誘導することを明らかにした。以前の Akt 経路の関与の報告を加え、我々の結果は甲状腺細胞ではインスリン、血清および甲状腺刺激ホルモン (TSH) 非存在で、Tg により誘導される細胞増殖は、複数のシグナル伝達カスケードによって媒介されていることを示唆した。

Key Words サイログロブリン (Tg), FRTL-5 細胞、細胞増殖、シグナル伝達カスケード。

緒言

サイログロブリン (Tg) は、濾胞内に蓄積する、ヨード有機化の担体であり、甲状腺ホルモン合成の基質であると長い間考えられてきた。しかし、近年濾胞内に蓄積した Tg の濃度によって、甲状腺機能を担う様々な遺伝子発現や細胞増殖がダイナミックに調節されることが明らかになった。

甲状腺細胞の増殖と機能は TSH、インスリン/IGF-1 シグナリングによって規制されていると考えられていた。一方、我々は、ラット甲状腺 FRTL-5 細胞では、TSH、インスリンと血清非存在で、低濃度の Tg が PI3K/Akt 経路を介して細胞増殖を誘導することと高濃度の Tg が細胞増殖を抑制することを報告し、Tg は TSH と同様 PI3K/Akt 経路を介して細胞増殖を誘導することを明らかにした。しかし、Tg と TSH の甲状腺細胞での異なった機能から細胞増殖に対しても異なった作用機序が存在する可能性があると考えられる。本研究は、Tg により誘導する PI3K/Akt 非依存細胞増殖経路を同定することを目的とした。

対象と方法

- 1)、Tg 処理と処理しない FRTL-5 細胞から RNA を精製、DNA マイクロアレイにより Tg 刺激に応じた遺伝子の変動を解析した。
- 2)、Tg 処理と処理しないおよび TSH 処理、MAPK/ERK 阻害剤 (PD98059) 処理 FRTL-5 細胞群の MAPK/ERK 経路に関わる遺伝子の変動をウェスタンブロットティングで評価し、BrdU により細胞増殖機能を確認した。
- 3)、Tg 処理と TSH 処理 FRTL-5 細胞の細胞増殖に関わる転写因子の mRNA とタンパクの変動を RT-PCR とウェスタンブロットティングにより評価した。

結果

1) FRTL-5 細胞で TSH、インスリン、血清非存在で Tg 刺激に応じた遺伝子
DNA マイクロアレイの解析により、FRTL-5 細胞では TSH、インスリン、血清非存在 Tg のみの刺激で 1095 の遺伝子発現が高進され、862 の遺伝子発現が減少を示し、MEK1, Fos, ERK1 など MAPK 経路関連遺伝子の発現が顕著に増加することを明らかにした。(図 1)

2) Tg により活性化した MAPK/ERK 経路
ウェスタンブロットティングによりリン酸化 c-Raf、MEK1/2 と ERK1/2 など MAPK/ERK 経路関連タンパクの変動を確認したところ、Tg 処理しない群に比べ Tg 処理群では発現増加が観察され、その増加が MAPK/ERK 阻害剤 (PD98059) により抑制された。Tg 処理と TSH 処理群の BrdU アッセイの比較で、PD98059 により抑制される Tg の細胞増殖活性が TSH 処理群では認められなかった。
(図 2)

3) MAPK/ERK の下流の細胞増殖因子が Tg により活性化された
RT-PCR とウェスタンブロットティングにより MAPK/ERK 経路の下流の遺伝子の mRNA とタンパク活性を評価したところ、c-myc, c-fos と c-jun などの転写因子が Tg 刺激により顕著に増加され、TSH では増加が認められなかった。また、細胞周期に関する遺伝子 cyclin D1, cyclin D2, CDK2 と CDK4 も Tg 刺激により経時的に増加、Rb のリン酸化が誘導された。(図 3)

考察

本研究では、我々は FRTL-5 細胞では、Tg が MAPK/ ERK 経路を活性化することにより CDKs など細胞周期関連遺伝子の DNA 合成と Rb のリン酸化を促進することを示唆した。Tg により誘導される細胞増殖は TSH と異なって MAPK/ ERK 経路を経由していることを示した。

MAPK/ERK 経路は、細胞増殖に関与する重要な経路であって、主に MEK、Raf と ERK から構成されている。本研究では、Tg がリン酸化 c-Raf、MEK1/2 and ERK1/2 の発現増加を誘導、その細胞増殖作用が MAPK/ERK 阻害剤 (PD98059) により抑制されたことをウェスタンブロットティングと BrdU アッセイで確認した。一方、TSH により誘導する細胞増殖は PD98059 処理に反応を示さなかった。ERK がリン酸化すると c-my、c-fos と c-jun などの転写因子が活性化され、細胞周期に関わる遺伝子 cyclin D1、cyclin D2、CDK2、CDK4 と Rb のリン酸化が誘導され、細胞が G1 期から S 期に移動細胞周期を活性化する。c-my、c-fos と c-jun などの mRNA とタンパクが Tg により活性化され cyclin D1、cyclin D2、CDK2、CDK4 の増加と Rb のリン酸化が誘導されたが、TSH では顕著な変化を示さなかった結果も Tg は TSH と異なった MAPK/ ERK 経路を介して細胞増殖を誘導していることを示した。

TSH は細胞膜に存在する TSH レセプターと結合、PI3K- Akt 経路を活性化させ、細胞増殖を誘導していると報告されている。最近、Rafp21 が TSH 誘発細胞分裂に関与し、その作用が Raf- ERK 経路を経由しないことが報告している。

一方、我々は、FRTL-5 細胞では、TSH、インスリンと血清非存在で低濃度の Tg が PI3K/ Akt 経路を介して細胞増殖を誘導することと高濃度の Tg が細胞増殖を抑制することを報告し、Tg は TSH と同様 PI3K/Akt 経路を介した細胞増殖をも誘導すること報告した。

これらのことから、Tg によって誘導される細胞増殖は TSH と同様な PI3K/Akt 経路を介する経路と PI3K/Akt を介さない MAPK/ ERK 経路の二つの経路を介していることを示唆した。

図

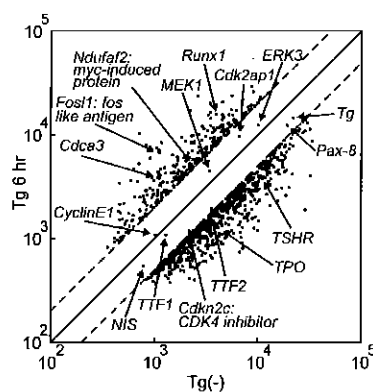


FIG. 1. DNA microarray analysis of genes expressed on FRTL-5 thyroid cells after stimulation of Tg without TSH, insulin, and serum. FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were exposed to 5 mg/ml of Tg for 6 hr, and total RNA was extracted. Scattered plot of the gene expression levels with Tg treatment are shown

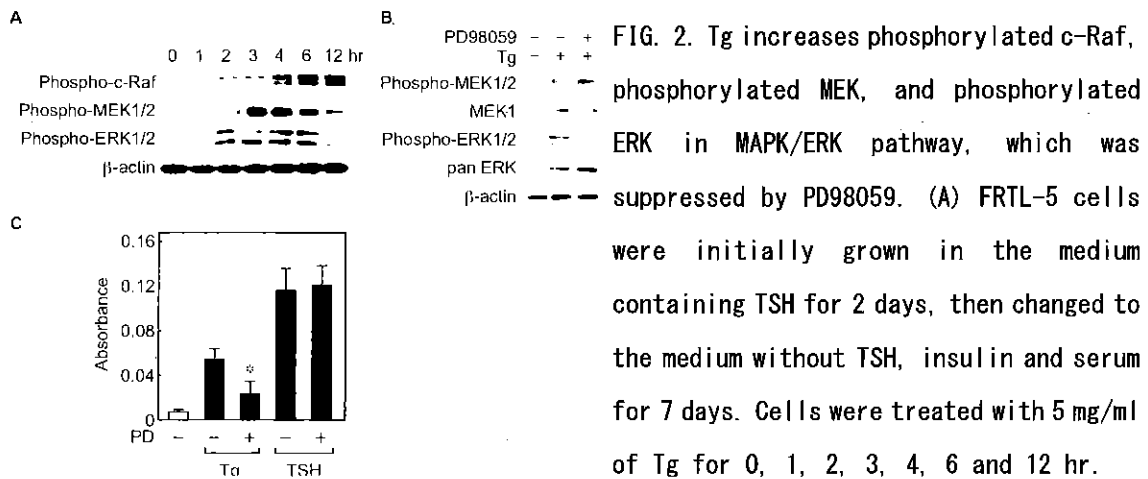


FIG. 2. Tg increases phosphorylated c-Raf, phosphorylated MEK, and phosphorylated ERK in MAPK/ERK pathway, which was suppressed by PD98059. (A) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin and serum for 7 days. Cells were treated with 5 mg/ml of Tg for 0, 1, 2, 3, 4, 6 and 12 hr.

Total proteins were extracted and analyzed by Western blot as described in Materials and Methods. (B) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were treated in the medium containing PD98059 with the final concentration of 50 μ M 30 min prior to the Tg stimulation. Total proteins were extracted after 24 hr of Tg treatment, and analyzed by Western blot as described in Materials and Methods. (C) PD98059 inhibits the Tg induced BrdU incorporation. FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were treated in the medium containing PD98059 with the final concentration of 50 μ M, 30 min prior to the Tg stimulation. Proliferation analysis was performed by BrdU incorporation as described in Materials and Methods. Results are the mean \pm SD of triplicate assays from three different experiments. *, $P < 0.001$.

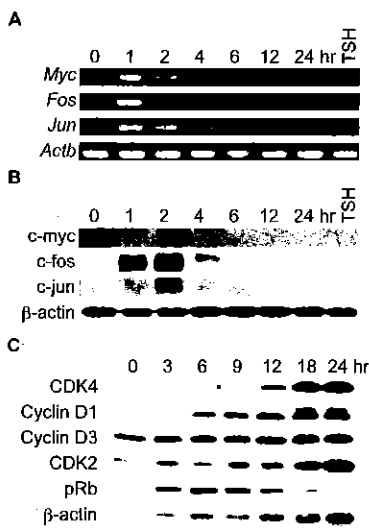


FIG. 3. Tg increases mRNA and protein levels of transcriptional genes. (A) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were challenged by Tg for 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 hr. Total RNA was extracted and analyzed by RT-PCR. The PCR products were analyzed on a 2% agarose gel electrophoresis. (B) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were challenged by Tg for 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 hr. Total proteins were extracted and analyzed

by Western blot as described in Materials and Methods. (C) FRTL-5 cells were initially grown in the medium containing TSH for 2 days, then changed to the medium without TSH, insulin, and serum for 7 days. Cells were challenged by Tg for 0, 3, 6, 9, 12, 18 and 24 hr. Total proteins were extracted and analyzed by Western blot as described in Materials and Methods.

参考文献

1. Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta M, Saito J, Pietrarello M, Kimura S, Katoh R, Kawaoi A and Kohn LD. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8251-8256, 1998.
2. Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ulianich L and Kohn LD. Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake through suppression of gene expression in the thyroid. *Endocrinology* 140: 5422-5430, 1999.
3. Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 141:839-845, 2000.
4. Suzuki K and Kohn LD. Differential Regulation of Apical and Basal Iodide Transporters in the Thyroid by Thyroglobulin. *J Endocrinol* 189:247-255, 2006.
5. Nedachi T, Akahori M, Ariga M, Sakamoto H, Suzuki N, Umesaki K, Hakuno F, Takahashi SI. Tyrosine kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activation are required for cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent potentiation of deoxyribonucleic acid synthesis induced by insulin-like growth factor-I in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 141:2429-38, 2000.
6. Noguchi Y, Harii N, Giuliani C, Tatsuno I, Suzuki K and Kohn LD. Thyroglobulin (Tg) induces thyroid cell growth in a concentration-specific manner by a mechanism other than thyrotropin/cAMP stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 391:890-894, 2010.
7. Sellitti DF, Suzuki K, Doi SQ, Lagranha C, Machado M, Matos T and Kohn LD. Thyroglobulin increases cell proliferation and suppress Pax-8 expression in mouse mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285:795-799, 2001.
8. Wu H, Suzuki S, Sellitti D, Doi SQ, Tanigawa K, Aizawa S, Akama T, Kawashima A, Mishima M, Ishii N, Yoshida A, Hisatome I, Koles NL, Katoh R and Suzuki K. Expression of a thyroglobulin (Tg) variant in mouse kidney glomerulus. *Biochem Biophys Res Commun* 389:269-273, 2009.

9. Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev.* 4(1):82-89, 1994.
10. Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science.* 6:249(4964):64-7, 1990.
11. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 12:369(6476):156-60, 1994.
12. Ekokoski E, Webb TE, Simon J, Törnquist K. Mechanisms of P2 receptor-evoked DNA synthesis in thyroid FRTL-5 cells. *J Cell Physiol.* 187(2):166-75, 2001.
13. Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* 1:13(7):1610-9, 1994.
14. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science.* 12:265(5174):966-70, 1994.
15. Pomerance M, Abdullah HB, Kamerji S, Correze C, Blondeau JP. Thyroid-stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade. Involvement of protein kinase A, rac1, and reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 22:275(51):40539-46, 2000.
16. Corrèze C, Blondeau JP, Pomerance M. The thyrotropin receptor is not involved in the activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinases by thyrotropin preparations in Chinese hamster ovary cells expressing the human thyrotropin receptor. *Thyroid.* 10(9):747-52, 2000.

2011年2月21日