

論 文 要 旨

Type 3 iodothyronine deiodinase is expressed
in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes
(ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に Type 3 iodothyronine deiodinase が発現している)

関西医科大学内科学第二講座
(指導：塩島 一朗 教授)

西村 久美子

【はじめに】

甲状腺ホルモンは、主に核内 T3 受容体を介してその作用を発揮する。よって、甲状腺より主に分泌される thyroxine(T4)は、前駆ホルモンと考えられている。T4 は 5'-脱ヨード反応により、活性型ホルモンである 3,5,3'-triiodothyronine (T3) に変換される。この過程は、type 1 及び type 2 iodothyronine deiodinase(D1 及び D2) により触媒される。一方、5-脱ヨード反応は T4 又は T3 を非活性型ホルモンである 3,3',5'-triiodothyronine (rT3)又は 3,3'- diiodothyronine (T2) にそれぞれ変換する。5-脱ヨード反応は type 3 iodothyronine deiodinase (D3)により触媒される。D1,D2,D3 はそれぞれ特有の臓器に発現し、発現する臓器の T3 濃度を調整している。さらに、D1,D2,D3 の発現する臓器には、種差が存在する。

成人ヒトの心筋には、D2 が発現しているが D3 は発現していない。一方、げっ歯類の心筋には、D2 も D3 もほとんど発現していない。しかし、げっ歯類に心筋梗塞などを作成すると、その心筋に D3 の発現が確認されている。本研究では、ヒト心筋細胞における甲状腺ホルモン代謝酵素の発現を、ヒト iPS 細胞 (hiPSCs)から分化させた心筋細胞(hiPS-CMs)を用いて検討した。

【研究方法】

1) 培養

hiPSCs は、京都大学 iPS 細胞研究所より分与頂いた。既報の通り、hiPSCs を培養し、hiPS-CMs に分化させた。抗体を用い magnetic activated cell sorting を用いて回収した細胞を hiPS-CMs として使用した。

2) 活性の測定

D3 活性は、超音波処理した細胞を 30mM dithiothreitol 存在下で T3 と 37°C で 2 時間インキュベートし、産生された T2 を liquid chromatography-tandem mass spectrometry を用いて測定した。

3) mRNA 測定

細胞をホモゲナイズし、Trizol 試薬を用いて total RNA を抽出した。Total RNA より cDNA を合成し、Taqman probe を用い、real time PCR 法 (QIAGEN Rotor-Gene Q) で mRNA の発現量を測定。18S を内部標準遺伝子として使用し算定した。

4) 統計

2 群間の統計は Student's *t* test を用いて検定した。2 群以上の統計は One-way ANOVA を行ったうえ、Student-Newman-Keuls *post hoc* test を用いて検定した。

【結果】

1) hiPSCs と hiPS-CMs の D3 活性を測定した。D3 活性は時間依存性、蛋白濃度依存性を示した。Lineweaver-Burk plot で基質である T3 に対する Km 値は hiPSCs と hiPS-CMs とでほぼ同等であった。Maximum velocity (V_{max}) は

hiPS-CMs で hiPSCs の 2.4 倍であった。D1、D2 活性は共に確認できなかった。

2) D3 mRNA は hiPSCs、hiPS-CMs の両方に発現を認めた。hiPS-CMs での D3 mRNA の発現量は hiPSCs の約 2 倍だった。

3) hiPS-CMs を 10^{-8} M T₃ を添加した培地 hiPS-CMs (hiPS-CMs+T₃)及び非添加の培地 hiPS-CMs(hiPS-CMs-T₃)で 48 時間培養し、D3 mRNA の発現量を比較した。結果、hiPS-CMs+T₃ で 2.5 倍の D3 mRNA の発現を認めた。

4) CoCl₂、Desferoxamine (DFO)によって、Hypoxia-inducible factor (HIF)が増加することが知られている。hiPSCs 及び hiPS-CMs の培地に CoCl₂又は DFO を添加し、D3 mRNA 発現レベルの影響について検討した。 10^{-4} M CoCl₂、 10^{-4} M DFO を培地に加えて 24 時間培養した細胞では、D3 mRNA の発現量の有意な上昇を認めた。

5) D3 活性を抑制する iopanoic acid (IOP)を用いて、内因性の D3 活性を低下させ、これによる T₃ 応答性の心筋細胞に発現する遺伝子への影響を検討した。IOP を加えることによって、MHC α 、MHC β 、Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA)、phospholamban (PLB)の mRNA レベルはすべて増加した。

【考察】

hiPSCs、hiPS-CMs の両方に D3 活性を認めた。hiPS-CMs の D3 活性の V_{max} は、hiPSCs の約 2.4 倍高値であった。hiPS-CMs の D3 mRNA の発現は、hiPSCs の約 2 倍高値であった。以上の結果から、hiPS-CMs において、D3 は翻訳前のレベルで増加していることを明らかにした。

D3 mRNA の発現は T₃、HIF といった様々な因子によって調整されることが報告されている。本研究において、T₃ 及び HIF の増加因子により、hiPS-CMs の D3 mRNA レベルが上昇することを確認した。

MHC α 、MHC β 、SERCA、PLB の mRNA レベルは hiPS-CMs へ分化後に増加した。MHC α 、SERCA は T₃ により positive に制御され、MHC β 、PLB は T₃ により negative に制御されることが報告されている。本研究では、hiPS-CMs に T₃ を加えることにより MHC α 、SERCA のみでなく MHC β 、PLB の mRNA レベルも増加していた。T₃ が hiPS-CMs の分化を促進するという報告がある。今回の結果より、MHC β 、PLB の遺伝子発現調節において、T₃ による直接的な影響よりも、T₃ による心筋の成熟の方が大きな影響を与えたことによるものと考えた。

IOP を加えて内因性の D3 活性を低下させた結果、添加した T₃ の MHC α 、MHC β 、SERCA、PLB の mRNA レベルの増加効果が増強された。内因性の D3 活性が hiPS-CMs の T₃ 濃度を抑制していることを裏付けるものであった。

D3 の発現は未分化細胞には多く認め、分化後に減ることが知られている。これまでの報告で hiPS-CMs は成人の心筋細胞よりも胎児の心筋細胞に近いと考えられている。今回の研究で hiPS-CMs に D3 が発現しているということは、hiPS-CMs が未熟な心筋細胞であることをさらに裏付けたと考える。

【結論】

hiPSCs 及び hiPS-CMs に D3 活性が存在することを明らかにした。また発現している D3 が細胞内の T3 濃度を抑制し、遺伝子発現に影響を与えている可能性を示した。