

氏 名 (本籍) 佐 山 典 代

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 3082 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 10 年 9 月 9 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 60 年 3 月 26 日
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Effects of Thyroid Hormone on Carbonic Anhydrase I Concentration in Human Erythroid Burst-Forming Unit Derived Cells.

(ヒト赤芽球バースト形成細胞由来細胞の炭酸脱水酵素I アイソザイム濃度に対する甲状腺ホルモンの影響)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 伊 藤 貞 嘉 教 授 豊 田 隆 謙

教 授 佐 々 木 毅

論文内容要旨

【目 的】

これまでの我々の研究グループは、甲状腺機能亢進症において赤血球中の炭酸脱水酵素 I アイソザイム (Carbonic Anhydrase I : 以下 CA I) およびその構成成分である亜鉛濃度が数ヵ月前の平均化された甲状腺機能を反映すること (JCEM72 : 515-518, 1991), および甲状腺ホルモン (T3) が赤芽球系培養細胞株である YN-1 の CA I 濃度を減少させること (JCEM 79 : 71-75, 1994) を報告してきた。今回は甲状腺ホルモンが骨髓における赤血球の成熟課程に作用して CA I 濃度を減少させるのではないかという仮説を確かめる目的で、健康人末梢血の単核球を培養して得た赤芽球バースト形成細胞由来細胞 (BFU-E-derived cell) の CA I 濃度に及ぼす甲状腺ホルモンの影響について検討した。

【方法及び結果】

健康人末梢血から 10ml のヘパリン採血を施行, Ficoll で単核球を分離し, Epo, IL-3, GM-CSF, SCF 等のサイトカインを添加, 甲状腺ホルモンを除去した Fetal bovine serum (FBS) 30% を含む培地でメチルセルロース法にて 14 日間培養した。14 日目にコロニーを形成した赤芽球バースト形成細胞由来細胞 (BFU-derived cell) を採取し, 細胞数を確認, 10^6 個/ml 当たりの CA I 濃度, 蛋白, ヘモグロビン濃度を測定, 甲状腺ホルモンの影響を検討した。

抗ヒト CA I ヒツジ抗体を用いて Western blotting 法で検討したところ BFU-E-derived cell には成熟赤血球と同様に分子量約 30kDa の CA I のバンドが存在した。T3 非添加時の CA I 濃度は平均 5×10^{-12} mol/ 10^6 cells ($n=8$) であった。

BFU-E 由来細胞の培養系に T3 を添加して 14 日間培養すると, 3×10^{-9} mol/L 以上の濃度の T3 では細胞数が有意に減少した (非添加群に比較して 55% に減少 ; $p<0.05$)。また 3×10^{-10} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} mol/L という生理的濃度の T3 の添加で BFU-E-derived cells の CA I 濃度は, 非添加群に比較して, それぞれ 28%, 47%, 75% と有意な減少 (それぞれ, $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.01$) が認められた。なお 30%FBS を含む培養液に 1×10^{-9} mol/L の T3 を添加した際の遊離 T3 濃度は 9×10^{-12} mol/L であった (健康人の血清遊離 T3 濃度の正常値は約 5×10^{-12} mol/L)。さらに T4 添加による検討も施行したが, 遊離濃度では T3 に比して約 10 倍の濃度 (9×10^{-11} mol/L) で CA I 濃度および細胞数を減少させた。

rT3 は 10^{-7} mol/L まで添加しても, BFU-E-derived cells の細胞数, CA I 濃度にはほとんど変化がみられなかった。甲状腺ホルモンの核レセプターへの親和性は, T3>T4>rT3 の順に認

められる。以上の結果から、T3のBFU-E由来細胞CA I濃度に及ぼす影響は核レセプターを介している可能性が考えられた。

また、赤血球の成熟過程において、どの段階でT3を添加した時、CA I濃度に影響が認められるかを検討するため、培養開始時、3日目、7日目、10日目、12日目に 3×10^{-9} mol/LのT3を添加し検討した。7日目ではCA I濃度の減少がみられたが、10日目以降の添加においてはCA I濃度に変化は認められなかった。このことより成熟過程の比較的早期の段階でのT3の暴露が、BFU-E-derived cellsのCA I合成に影響してくることが考えられた。

さらに、甲状腺ホルモンを添加することによって、BFU-E-derived cellsの蛋白レベル、ヘモグロビンレベルに影響が現れるか否かについて検討したが、いずれの濃度のT3においても有意な減少は認められなかった。このことよりBFU-E-derived cellsのCA I合成を低下させる作用はT3の特異的な作用と考えられた。

【研究の意義，独創的な点】

- 1) 今回の研究で、in vitroの実験で甲状腺ホルモンが赤血球の骨髄における成熟過程において、濃度依存性にCA I濃度を減少させることを明らかにした。この結果は、T3がCA Iの合成を阻害し、赤血球寿命(約120日)を考慮すると甲状腺機能亢進症において赤血球のCA I濃度は数ヵ月前の甲状腺ホルモンを反映するという仮説を支持する。
- 2) これまで個人個人の細胞を用い、甲状腺ホルモンの作用を検討できるよい系はなかった。この系では、個人個人の細胞で検討できるので、甲状腺ホルモン不応症や年齢、疾患別に甲状腺ホルモンの感受性の違い等を検討していくことができると思われ、臨床的に極めて有用と思われる。

審査結果の要旨

炭酸脱水酵素 I アイソザイム (Carbonic Anhydrase I: 以下 CAI) は亜鉛含有酵素で、主に酸塩基平衡に関わっている。我々は、甲状腺機能亢進症において赤血球中の CAI 及びその構成成分である亜鉛濃度が数ヵ月前の平均化された甲状腺機能を反映すること (JCEM. 72 : 515-518, 1991, Metabolism. 39 : 182-186, 1990) を見出した。このことにより、一過性の甲状腺中毒症 (亜急性甲状腺炎, 無痛性甲状腺炎等) とバセドウ病とが、末梢血採血による検査で容易に鑑別することが可能となった。更に、甲状腺ホルモン (T3) が赤芽球系培養細胞株である YN-1 の CAI 濃度を減少させること (JCEM. 79 : 71-75, 1994) を報告してきた。今回は、T3 が骨髄における赤血球の成熟過程に作用して、CAI 濃度を減少させるのではないかという仮説を確かめる目的で、健常人末梢血の単核球を培養して得た赤芽球バースト形成細胞由来細胞 (BFU-E-derived cell) の CAI 濃度に及ぼす甲状腺ホルモンの影響について検討した。

今回の研究により、*in vitro* の実験で甲状腺ホルモンが赤血球の骨髄における成熟過程において、濃度依存性に CAI 濃度を減少させることを明らかにした。また、BFU-E-derived cells の成熟過程における T3 による CAI 濃度を減少させる作用は、生理的濃度の範囲で認められる反応であり、この結果は、T3 が CAI の合成を阻害し、赤血球寿命 (約 120 日) を考慮すると、甲状腺機能亢進症において赤血球の CAI 濃度は数ヵ月前の甲状腺ホルモンを反映するという臨床データを裏付けている。さらに、甲状腺ホルモンを添加することによって、BFU-E-derived cells の蛋白レベル、ヘモグロビンレベルに影響が現れるか否かについて検討したが、いずれの濃度の T3 においても有意な減少は認められなかった。このことにより、BFU-E-derived cells の CAI 合成を低下させる作用は T3 の特異的な作用と考えられ、個々の生体に対する甲状腺ホルモンの感受性を表す良い指標となりうる。今後、甲状腺ホルモンの作用機序の研究や、甲状腺ホルモン不応症の病因の研究等に役立つと思われる。

BFU-E-derived cell の培養は、人の細胞の分化増殖過程を経時的にみることのできる貴重な培養系である。腫瘍細胞からの cell line のように transformation を起こしていない細胞を用いることから、より *in vivo* に近い培養系である。また、末梢血を用いることにより侵襲が少なく、簡便に個人の甲状腺ホルモンの感受性を検討できる。これまで個人個人の細胞を用い、甲状腺ホルモンの作用を検討できる良い系はなかった。この系では、個人個人の細胞で検討できるので、甲状腺ホルモン不応症や年齢、疾患別に甲状腺ホルモンの感受性の違い等を検討していくことができると思われ、臨床上に極めて有用であり、学位に値するものと思われる。