(三宅賞受賞論文)

甲状腺ホルモン代謝並びに作用に関する最近の知見

京都大学 医学部 第二内科

稲 田 満 夫

Recent Progress in Studies on Thyroid Hormone
Metabolism and Action

Mitsuo INADA

2nd Division, Department of Internal Medicine,
Kyoto University School of Medicine,
Kyoto, Japan

It has been shown that the monodeiodination of T_4 to either T_3 or rT_3 is an important step in T_4 metabolism. Moreover, recent studies reported that T_3 is converted further to either 3, 3'- T_2 or 3, 5- T_2 and rT_3 is converted to either 3, 3'- T_2 or 3', 5'- T_2 . To evaluate the physiological significance of the sequential monodeiodination of T_4 , several experiments were performed and the following results were obtained.

(1) Serum 3, 3'- T_2 , 3', 5'- T_2 and 3, 5- T_2 as well as T_4 , T_3 and rT_3 concentrations were determined by RIAs in 81 normal subjects, aged 24~81 years. Although no significant relation existed between T_4 levels and age, serum T_3 showed a significant inverse correlation with age. In contrast, no significant correlation was observed between rT_3 and age. Serum 3, 3'- T_2 , 3', 5'- T_2 and 3, 5- T_2 values all had significant inverse correlation with age. These findings suggest that sequential monodeiodinating activities of T_4 decrease with increasing age.

(2) The conversion of T_4 to T_3 was studied in normal, Graves' and neoplastic thyroid tissues. The T_3 generation in the thyroid tissue was dependent on the amount of tissue used, temperature and pH, suggesting the enzymatic nature of T_4 5'-monodeiodinating activity in the thyroid. The conversion of T_4 to T_3 was observed in differentiated thyroid neoplasma and was markedly enhanced in Graves' thyroid tissues compared to that of normal thyroid tissues.

(3) The conversion of T_4 to T_3 was studied in the rat anterior pituitary, using paper chromatography. The T_3 generating activity from T_4 increased with an increase in the amount of tissue and was temperature- and pH-dependent. T_4 5'-monodeiodinating activity was consistently, though minimally, detected in fetal rat pituitaries and increased after birth, reaching the maximum at 22 days. Serum TSH levels were markedly elevated in the fetus. They decreased after birth, reaching their nadir at 22 days. Thus, a reciprocal relation was observed between intrapituitary T_3 generating activity from T_4 and serum TSH levels in developing rats.

(4) The rT_3 generation from T_4 and $3, 3'$ - T_2 generation from T_3 , representing T_4 or T_3 5-monodeiodination, and the conversion of rT_3 to $3, 3'$ - T_2 , representing rT_3 5'-monodeiodination, were studied in the p_2 fraction of rat brain homogenate. T_4 or T_3 5-deiodinating activity was dependent upon the amount of the tissue, temperature and pH and was mainly found in synaptosomal fractions. Moreover, the conversion of rT_3 to $3, 3'$ - T_2 was also dependent on tissue amount, temperature and pH. T_4 or T_3 5-monodeiodinating activity was highest in the cerebral cortex and was far lower in the cerebellum, while rT_3 5'-monodeiodinating activity was highest in the rat cerebellum and lower in the cerebral cortex. These findings suggest that two different deiodinases are present in the rat brain.

(5) Studies were undertaken to define the existence of specific T_3 binding sites in the synaptosomal fraction of the rat cerebral cortex. Scatchard analysis was compatible with the existence of two sets of high affinity T_3 binding sites, the higher affinity, lower capacity site and the lower affinity, higher capacity site. In contrast to nuclear T_3 receptors, the maximal binding capacity of the higher affinity synaptosomal T_3 binding sites was low in neonatal rats and increased thereafter to the levels of adult rats, coinciding with the development of the organization of synapses. These findings clearly indicate that there exist specific T_3 binding sites in synaptosomes, different from nuclear T_3 receptors.

緒 言

近年, Radioimmunoassay (RIA) により, 血中サイロキシシン (T_4), $3, 5, 3'$ -トリヨードサイロニン (T_3) 濃度の測定が可能になり⁴⁾, また, 1970年, Braverman ら¹⁾ が, 人において T_4 の脱ヨードによる T_3 の産生を見出して以来, 甲状腺ホルモン代謝の研究は, 急速に進歩した⁶⁾。そして, T_4 , T_3 以外の種々の血中ヨードサイロキシンの RIA が開発され¹²⁾, T_4 の脱ヨードによる代謝過程がほぼ明らかになった²⁾, 一方, Oppenheimer ら¹³⁾ による T_3 の核レセプターの発見により, 甲状腺ホルモンの作用機序も次第に解明されつつある。

本稿では, 以上の甲状腺ホルモン代謝並びに作用に関する最近の知見を, 我々の成績を中心に概説する。

脱ヨードによる T_4 代謝と加令の影響

甲状腺より分泌された T_4 の代謝は, 主として脱ヨードにより進行する。すなわち, T_4 の 5' 位の脱ヨードにより T_3 が産生され, 5 位の脱ヨードにより $3, 3', 5'$ -トリヨードサイロニン (リバース T_3 , rT_3) が産生される。このような T_4 より T_3 或いは rT_3 への転換が, T_4 代謝の第一段階であり, また, T_3 は T_4 に比し速効性で, 作用効果が大きく, 一方, rT_3 は生物学的に不活性に近いホルモンであり, $T_4 \rightarrow T_3$ は T_4 の活性化経路, $T_4 \rightarrow rT_3$ は T_4 の不活性化経路と考えられている¹⁰⁾。

T_3 は更に, $3, 3'$ -ジヨードサイロニン ($3, 3'$ - T_2) および $3, 5$ - T_2 へ転換され, rT_3 は $3, 3'$ - T_2 および $3', 5$ - T_2 へ転換され, 図 1 に示す連続的な T_4 の脱ヨード代謝経路が考えられる²⁾。

我々は人において, T_4 崩壊量を算出した際に, 70才以上の健康老年者では, 若年者に比して T_4 崩壊量が約60%に低下し, 老年者では, 少ない T_4 で Homeostasis が保たれている事を明らかにした⁵⁾。

Fig. 1. Sequential monodeiodination of thyroxine.

従って、図1に示す種々のヨードサイロニンの血中濃度が加齢により変動する事が予想される。そこで我々は先づ、 $3, 3'-T_2$, $3', 5'-T_2$ および $3,5-T_2$ RIAを開発し¹²⁾、24才より81才までの健康人81名(男64名, 女17名)の血中 T_4 , T_3 , rT_3 と共にそれら3種の T_2 濃度を測定した¹²⁾。血中 T_4 と rT_3 は加齢による有意な変動を示さなかったが、血中 T_3 と共に $3, 3'-T_2$, $3', 5'-T_2$ および $3,5-T_2$ は、図2に示す様に、加齢に従って有意に減少した($P<0.01$)¹²⁾。すなわち、甲状腺より分泌された T_4 は主として、連続的脱ヨードにより代謝され、それが加齢と共に低下する事が考えられた。

Fig. 2. Age-related changes of serum $3, 3'-T_2$ (top panel), $3', 5'-T_2$ (middle panel) and $3,5-T_2$ (bottom panel) concentrations in normal subjects.

The small dots represent the individual T_2 concentrations, illustrated at the middle of each decade, and the larger dots give the means $\pm$ SDs in each decade. Each regression line represents T_2 concentrations as a function of individual age (not by the mean value of the decade) and has a significant ($p<0.01$) negative slope.

A, Incubation was carried out at 37°C for 60 min. B, Before incubation, the homogenate was preheated at 56°C for 30 min. C, Incubation was carried out at 4°C for 60 min.

Fig. 3. Metabolism of $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ added to the incubation mixture with thyroid adenoma homogenate, as assessed by radioactive scan of paper chromatograms.

人甲状腺組織における T_4 代謝

T_4 の連続的脱ヨード反応には、脱ヨード酵素の関与している事が知られ、肝、腎、甲状腺、下垂体前葉および脳で、脱ヨード酵素活性がみとめられている²⁾。とくに、 T_4 より T_3 を産生する T_4 5'脱ヨード酵素に関しては、肝で最もよく検討され、肝が T_3 を供給する重要な器官とされている²⁾。

我々は、正常人甲状腺組織、バセドウ病甲状腺組織および甲状腺々腫組織においても T_4 5'脱ヨード反応がみとめられ、それが酵素的に行われる事を見出した⁷⁾。すなわち、図3は甲状腺々腫のホモジネートに $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ を加え、37°C にて一定時間インキュベートし、そのメジウムのペーパークロマトグラムであるが、上段に示す様に $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ の生成が明らかである。また、図3の中段、下段に示す様にホモジネートを56°C 30分間加熱したり、4°C でインキュベートした場合、 $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ の生成はみとめられない⁷⁾。更に、この様な T_3 産生は組織量、pH 依存性であり、酵素的反応と考えられた⁷⁾。 T_4 より T_3 の産生は正常甲状腺組織でもみとめられ ($M \pm S.E. = 3.2 \pm 0.6 \text{ p mol T}_3 / \text{mg protein} \cdot \text{min}$)、また、バセドウ病甲状腺組織でのそれは有意に高値であった ($M \pm S.E. = 11.9 \pm 2.0 \text{ p mol T}_3 / \text{mg protein} \cdot \text{min}$, $P < 0.01$)⁷⁾。

さて、甲状腺内での T_4 より産生された T_3 が、甲状腺よりの T_3 分泌にどれほど関与しているかが重要な問題である。我々は、手術中に得られた甲状腺動静脈間の T_3 濃度差と同一症例の甲状腺内 T_4 5'脱ヨード活性の関係をみたが、両者間に有意の正相関がみとめられた。従って、甲状腺より分泌される T_3 には、 T_4 より転換されたものが含まれ、バセドウ病甲状腺ではそれが高いと考えられる。

Fig. 4. Change of serum TSH levels (open circle) and intrapituitary T_4 5'-monodeiodinating activities (closed circle) in rats of varying ages.

ラット下垂体前葉における T_3 産生と TSH 分泌調節

肝或いは甲状腺の様に、そこで T_3 を産生して他臓器に供給する場合の他に、局所的な T_3 産生がその臓器自体の機能を調節する場合がある。その代表例が下垂体前葉における T_4 の 5' 脱ヨードによる T_3 産生と TSH 分泌との関係である⁸⁾。

我々は、ラット下垂体前葉ホモジネートに ^{125}I - T_4 を加え、Dithiothreitol (DTT) 存在下に、37℃ にて一定時間インキュベートし、メジウム中の ^{125}I - T_3 生成量をペーパークロマトグラフィーにより検討した¹¹⁾。この下垂体前葉での T_4 の 5' 脱ヨード反応は、酵素的反応である事が確められ、 T_3 生成量はラットの月令別に、大きく変動する事が見出された¹¹⁾。すなわち、図 4 に示す様に、胎児ラット下垂体の T_3 産生は 7.6 ± 1.8 ($M \pm S.E.$) f mol T_3 /mg protein·min であるが、生後上昇し、生後 22 日で頂値 ($M \pm S.E. = 146 \pm 1.3$ f mol T_3 /mg protein·min) に達し、以後、成熟ラットのレベル ($M \pm S.E. = 29.8 \pm 4.0$ f mol T_3 /mg protein·min) に下降した。一方、ラット血中 TSH 濃度の変動をみると、胎児ラットで著明に高値 ($M \pm S.E. = 280 \pm 37.8$ ng/ml) で、生後下降し、生後 22 日で最低となる ($M \pm S.E. = 36 \pm 7.3$ ng/ml)。以後、成熟ラットの血中 TSH 濃度 ($M \pm S.E. = 180 \pm 12.2$ ng/ml) へ上昇した。かくして、下垂体における T_3 産生と血中 TSH 濃度の間に Reciprocal な関係があり¹¹⁾、下垂体前葉における局所的な T_3 産生が TSH 分泌調節に密接に関与している事を示唆する。

ラット脳における甲状腺ホルモン代謝

脳の発育、その機能の維持には甲状腺ホルモンの作用は極めて重要である。我々は脳における甲状腺ホルモンの作用機序を知る目的で、先づ、作用と密接に関連する T_4 の脱ヨードによる代謝に関して検討した¹⁴⁾。

ラット脳のホモジネートの $1.000 \times \text{g}$ 上清の $17.000 \times \text{g}$ 沈渣 (P_2 分画) の浮遊液に T_4 を加え、DTT の存在下に 37℃ で一定時間インキュベートして、メジウム中に産生される T_3 および rT_3 を RIA で測定

した。 T_3 に関しては現在の T_3 RIAの感度では測定不能であったが、 rT_3 の産生は明らかにみとめられ、それは組織量、pHおよび温度に依存し、酵素的反応と考えられた¹⁰⁾。すなわち、ラット脳では T_4 5脱ヨード酵素活性の存在を示し、従って、上記の実験で T_4 の代りに T_3 を加えた場合、3, 3'- T_2 の産生がみとめられた。この T_4 5脱ヨード酵素活性はラット大脳皮質において最も高く ($M \pm S.E. = 62.6 \pm 10.7$ f mol rT_3 /mg protein $\cdot$ min), 小脳では極めて低く ($M \pm S.E. = 1.2 \pm 0.7$ f mol rT_3 /mg protein $\cdot$ min), 著明な部位差がみとめられた。更に、 T_4 および T_3 5脱ヨード酵素活性の細胞内局在をみると、表1に示す様にシナプトソーム分画に有意に高値であった¹⁰⁾。かくして、前述の様に rT_3 の生物学的活性は極めて低いため、5脱ヨード活性の生理的意義はむしろ、 T_3 の代謝に密接に関与し、それはシナプトソームに局在する事が考えられた。

次に、 T_4 より T_3 を産生する T_4 5'脱ヨード反応に関しては、Kaplanら⁹⁾は、ペーパークロマトグラフィーを用いて ^{125}I - T_4 の ^{125}I - T_3 への転換をみとめている。我々はラット脳の P_2 分画浮遊液に rT_3 を加え、3, 3'- T_2 のRIAにて3, 3'- T_2 産生量を測定して5'脱ヨード活性を検討した¹⁵⁾。この活性は酵素的反応であり、更に、そのラット脳内分布をみると5脱ヨード活性と対称的に大脳皮質で最も低く ($M \pm S.E. = 17.6 \pm 3.3$ f mol 3, 3'- T_2 /mg protein $\cdot$ min), 小脳で最も高値であった ($M \pm S.E. = 60.0 \pm 8.1$ f mol 3, 3'- T_2 /mg protein $\cdot$ min)¹⁵⁾。肝において、 T_4 より T_3 を産生する反応と rT_3 より3, 3'- T_2 を産生する反応には同一の酵素が関与している事が報告されている²⁾が、脳においても rT_3 より3, 3'- T_2 を産生する5'脱ヨード活性の見出された事は T_4 5'脱ヨード酵素の存在を示すものである。従って、ラット脳では T_3 の産生系(5'脱ヨード酵素)と T_3 の代謝系(5脱ヨード酵素)が存在する事が示唆された。

Table 1. Subcellular localization of 5-monodeiodinating activities.

Fraction	rT_3 produced (fmol/mg prot/min)	3, 3'- T_2 produced (fmol/mg prot/min)
crude P_2 fraction	84 ± 10	38 ± 7
myelin fraction	79 ± 9	20 ± 1
synaptosomal fraction	111 ± 9	46 ± 7
mitochondrial fraction	47 ± 9	13 ± 5

Values were obtained from five separate experiments, and are expressed as mean $\pm$ SE. The production rate of rT_3 in the synaptosomal fraction was significantly higher than in the myelin ($p < 0.05$) and the mitochondrial ($p < 0.01$) fraction. That of 3, 3'- T_2 in the synaptosomal fraction was significantly higher than those in myelin ($p < 0.01$) and the mitochondrial ($p < 0.01$) fraction.

ラット大脳皮質シナプトソームにおける特異的 T_3 結合

前述のラット脳における甲状腺ホルモン代謝の生理的意義を知る目的で、ラット大脳皮質 P_2 分画における T_3 結合について検討した¹⁰⁾。すなわち、 P_2 分画に ^{125}I - T_3 を加えて25℃にて2時間インキュベートし、次いで、非連続的蔗糖密度勾配遠心法にて分画し、各分画への ^{125}I - T_3 の分布をみた。かくして、シナプトソーム分画に最も著明に ^{125}I - T_3 の分布がみられ、しかもそれは過剰な T_3 の

添加によって抑制された。つまり、ラット大脳皮質シナプトソームに、Saturableな T_3 結合部位のある事が示唆された。さて、このシナプトソームの T_3 結合の Scatchard plot を行くと、二つの結合部位が見出された。一つの Apparent dissociation constant (Kd) は $3.22 \pm 0.63 \times 10^{-11}$ M (M $\pm$ S.E.), また, Maximum binding capacity (MBC) は 3.2 ± 0.3 (M $\pm$ S.E.) pg T_3 /mg protein であり, もう一つの Kd は $2.64 \pm 0.15 \times 10^{-9}$ M (M $\pm$ S.E.), MBC は 218.3 ± 15.0 (M $\pm$ S.E.) pg T_3 /mg protein で, 極めて親和性が高く, また, T_3 に対して極めて特異的であった¹⁰。

従来, 脳には T_3 核レセプターが存在するが, 核レセプターは Triac に対しても高い親和性を有する。一方, シナプトソームにおける T_3 結合は Triac に対し親和性は全く有しなかった。また, 核レセプターの MBC は細胞分裂の旺盛な新生児期に高く, 我々の成績でも図5に示す様に, 生後2日ラットの MBC が最も高く (M $\pm$ S.E. = 143.5 ± 17.9 pg T_3 /g tissue), 生後14日, 49日の順に下降した¹⁰。一方, シナプトソームにおける T_3 結合の MBC は新生児期にきわめて低く (M $\pm$ S.E. = 20.3 ± 1.2 pg T_3 /g tissue), 生後14日 (M $\pm$ S.E. = 28.1 ± 1.0 pg T_3 /g tissue), 生後49日 (M $\pm$ S.E. = 50.4 ± 2.2 pg T_3 /g tissue) と著増した¹⁰。この変化はラット脳におけるシナプス形成の時間的關係とほぼ平行するものであり, ラット脳において核レセプター以外のシナプソームにおける T_3 結合部位の存在を示すものである。

以上の成績は従来の細胞核を介する T_3 の作用以外の作用機序が³⁾, ラット脳でみとめる事を示し, 前述の T_3 の産生系および代謝系の存在, その細胞内局在より考えて, T_3 に Neurotransmitter 或いは Neuromodulator としての作用が想定された。

The values are expressed as mean $\pm$ S.E.

Fig. 5. Maximal binding capacity of T_3 binding to nuclear T_3 receptor (closed circle) or to synaptosomes (open circle) prepared from rat cerebral cortex during development.

ま と め

- 1) T_4 代謝はその連続的脱ヨード反応が主体をなし、それは加齢と共に全体として低下する。
- 2) 人甲状腺組織には T_4 より T_3 を産生する5'脱ヨード酵素が存在し、甲状腺よりの T_3 分泌に関与し、それがバセドウ病甲状腺組織で高値である。
- 3) ラット下垂体前葉での T_4 5'脱ヨード酵素による局所的な T_3 産生は、TSH分泌調節に重要である。
- 4) ラット脳には T_3 産生系である5'脱ヨード酵素および T_3 代謝系である5脱ヨード酵素が存在し、両者は対称的な脳内分布を示した。また、5脱ヨード酵素はシナプトソームに局在した。
- 5) ラット大脳皮質シナプトソームで核レセプターとは異なる、親和性が高く、特異的な T_3 結合部位が見出され、脳における T_3 の新しい作用が想定された。

稿を終えるに臨み、終始、暖かい御指導と御鞭達を賜った恩師、三宅儀名誉教授、鳥塚莞爾教授および井村裕夫教授に衷心より感謝の意を表します。また、本研究は西川光重、内藤公一、石井均、田中清および真尾泰生各氏の日夜のたゆまぬ努力によりなされたものであり、深く感謝するものであります。

本研究は、厚生省特定疾患調査研究費補助金、文部省科学研究費補助金および代謝異常治療研究基金よりの補助金により行われた事を記し、謝意を表します。

文 献

- 1) Braverman, L.E., Ingbar, S.H. and Sterling, K.: Conversion of thyroxine (T_4) to triiodothyronine (T_3) in athyreotic human subjects. *J. Clin. Invest.* 49: 855-864, 1970.
- 2) Chopra, I.J., Solomon, D.H., Chopra, U., Wu, S.Y., Fisher, D.A. and Nakamura, Y.: Pathways of metabolism of thyroid hormones. *Recent Progr. Horm. Res.* 34: 521-567, 1978.
- 3) Dratman, M.B., Crutchfield, F.L., Axelrod, J., Colburn, R.W. and Thoa, N.: Localization of triiodothyronine in nerve ending fractions of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 941-944, 1976.
- 4) Gharib, H., Ryan, R.J., Mayberry, W.E. and Hockert, T.: Radioimmunoassay for triiodothyronine (T_3). I. Affinity and specificity of the antibody for T_3 . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33: 509-516, 1971.
- 5) Inada, M., Koshiyama, K., Torizuka, K., Akagi, H. and Miyake, T.: Clinical studies on the metabolism of 131 I-labeled L-thyroxine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 24: 775-784, 1964.
- 6) Inada, M., Kasagi, K., Kurata, S., Kazama, Y., Takayama, H., Torizuka, K., Fukase, M. and Soma, T.: Estimation of thyroxine and triiodothyronine distribution and of the conversion rate of thyroxine to triiodothyronine in man. *J. Clin. Invest.* 55: 1337-1348, 1975.
- 7) Ishii, H., Inada, M., Tanaka, K., Mashio, Y., Naito, K., Nishikawa, M. and Imura, H.: Triiodothyronine generation from thyroxine in human thyroid; Enhanced conversion in Graves' thyroid tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 1211-1217, 1981.
- 8) Kaplan, M.M.: Thyroxine 5'-monodeiodination in rat anterior pituitary homogenates. *Endocrinology* 106: 567-576, 1980.
- 9) Kaplan, M.M. and Yaskoski, K.A.: Phenolic and tyrosyl ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. *J. Clin. Invest.* 66: 551-562, 1980.
- 10) Mashio, Y., Inada, M., Tanaka, K., Ishii, H.,

- Naito, K., Nishikawa, M., Takahashi, K. and Imura, H.: High affinity 3, 5, 3'-triiodothyronine binding to synaptosome in rat cerebral cortex. *Endocrinology* in press.
- 11) Naito, K., Inada, M., Mashio, Y., Tanaka, K., Ishii, H., Nishikawa, M. and Imura, H.: Reciprocal relation between serum thyrotropin levels and intrapituitary 3, 5, 3' L-triiodothyronine generating activities from thyroxine in perinatal rats. *Endocrinol. Japon.* 28:461-468, 1981.
- 12) Nishikawa, M., Inada, M., Naito, K., Ishii, H., Tanaka, K., Mashio, Y. and Imura, H.: Age-related changes of serum 3, 3'-diiodothyronine, 3', 5'-diiodothyronine, and 3, 5-diiodothyronine concentrations in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52: 517-522, 1981.
- 13) Oppenheimer, J.H., Koerner, D., Schwartz, H.L. and Surks, M.I.: Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35: 330-333, 1972.
- 14) Tanaka, K., Inada, M., Ishii, H., Naito, K., Nishikawa, M., Mashio, Y. and Imura, H.: Inner ring monodeiodination of thyroxine and 3, 5, 3' L-triiodothyronine in rat brain. *Endocrinology* 109: 1619-1624, 1981.
- 15) Tanaka, K., Inada, M., Mashio, Y., Ishii, H., Naito, K., Nishikawa, M., Takahashi, K. and Imura, H.: Characteristics of rT₃5'-monodeiodination in rat brain; Comparison with T₄ and T₃5-monodeiodination. to be published.
- 16) Vagenakis, A.G., Burger, A., Portnay, G.I., Rudolph, M., O'Brain, J.T., Azizi, F., Arky, R.A., Nicod, P., Ingbar, S.H. and Braverman, L.E.: Diversion of peripheral thyroxine metabolism from activating to inactivating pathways during complete fasting. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41: 191-194, 1975. (受付日: 56.11.9)