

## 9032 甲状腺ホルモンによる血清ナトリウム濃度の調節に関する研究

田中 清(京都大学)

血清ナトリウム濃度がホルモンによって調節されていることはいうまでもないが、甲状腺ホルモンとの関係については報告が少ない。昨年の本助成研究においては主に下垂体後葉を研究の対象とし、甲状腺ホルモン欠乏ラットでは抗利尿ホルモン(ADH)の分泌が亢進していることを明らかにした。今回は腎尿細管におけるNa/K-ATPaseの活性調節における甲状腺ホルモンの意義を検討した。

甲状腺ホルモンはThyroxine( $T_4$ )として甲状腺から分泌されるが $T_4$ はそれ自身ホルモン作用を持たず、酵素5'-Deiodinase(5'-D)により活性型ホルモン3,5,3'-Triiodothyronine( $T_3$ )に代謝されて作用を発揮する。すなわち5'-Dは甲状腺ホルモン作用発現の最も重要な規定因子である。5'-DにはType-I, Type-IIという2つのIsozymeが存在し、従来腎にはType-Iという $T_4$ に親和性の低いIsozymeしか存在しないとされていたが、最近これらと別にLow Km 5'-Dという $T_4$ に高親和性のIsozymeの存在が報告された。すなわち腎局所での甲状腺ホルモン活性化の重要性が示唆される。従来5'-Dの活性調節に関する研究は肝に集中しており、絶食での低下、インスリンによる促進など報告されてきたが、腎については報告が乏しかった。我々の研究では腎では肝と異なり摂食やインスリンの影響を受けなかった。脱水、カテコラミンの影響についても報告する。

Na/K-ATPaseは広く体内に分布する酵素であり、ATPのエネルギーを用いて細胞内からNaを汲み出し、代わりにKを入れることにより細胞内外の電解質濃度差を維持している。腎においても尿細管に分布しており、甲状腺ホルモンにより誘導される。今回の検討でも $T_3$ 投与にてNa/K-ATPase活性の増加を認めた。 $T_4$ でも同様であったが、5'-Dの阻害剤であるIopanoic acidの同時投与ではほとんど効果を認めなかった。すなわち甲状腺ホルモンのNa/K-ATPaseに対する作用発現には5'-Dによる活性化が必須である。甲状腺ホルモンの作用発現は他の因子にも規定されるが、絶食などの影響についても検討した。

通常甲状腺ホルモンは主に脱ヨードにて代謝されるとされているが、今回腎において $T_3$ がdecarboxylation, deaminationにて3,5,3'-Triiodothyroacetic acid (Triac)に代謝されることを見いだした。Triacは甲状腺ホルモンの核受容体に対し $T_3$ 以上の親和性を示すにもかかわらず意義の必ずしも明らかでない誘導体である。Triacの腎のNa/K-ATPase調節における意義についても考察する。



## 9032 甲状腺ホルモンによる血清ナトリウム濃度の調節に関する研究

田中 清 (京都大学)

## 1. 研究目的

甲状腺ホルモンはステロイドホルモンとならんで、全身の代謝を調節する最も重要なホルモンである。糖、脂質代謝に比して、電解質代謝に関する研究は少ない。臨床的には甲状腺機能低下症で低Na血症の起こることが知られているが、その成立機序は不詳で、甲状腺ホルモンと下垂体後葉の関係については研究がほとんどなかった。そこで昨年の本助成研究では、甲状腺ホルモンによる抗利尿ホルモン分泌に対する影響を主に研究し、甲状腺機能低下症でADH分泌が亢進していることを報告した(1)。しかし甲状腺機能異常におけるNa代謝異常は腎のNa/K ATPaseの低下によるという説もあり(2)、今回腎における甲状腺ホルモンの代謝と作用を、特にNa/K ATPaseとの関連において研究し、昨年の研究と相補いあって、甲状腺ホルモンのNa代謝における意義を探るべく本研究を行なった。

## 2. 研究方法

甲状腺ホルモン(Thyroxine;  $T_4$ , 3,5,3'-L-Triiodothyronine;  $T_3$ , 3,3',5'-L-Triiodothyronine; reverse  $T_3$ ,  $RT_3$ )はSigma(St. Louis, USA)及びHenning(Berlin)より購入した。[ $^{125}I$ ]  $RT_3$ はAmershamより購入し、使用直前にLH-20ミニカラムにて精製し、使用した。不純物は $^{125}I$ のみで、約2%であった。

実験動物としては、Wistar系雄ラットを生後6-7週にて購入し、約3週間飼育後実験に供した。甲状腺機能低下症ラットは、0.03% Methimazoleを3週間飲水として与えて作成した。甲状腺ホルモン投与実験としては、 $T_3$  (50  $\mu$ g/day)、 $T_4$  (250  $\mu$ g/day)を3日間i.p.投与して行った。5'-Deiodinaseの阻害剤であるIopanoic acid (IOP)の投与は甲状腺ホルモン投与の12時間より開始し、以後甲状腺ホルモン投与の直前に投与した(1回5mg i.p.)。

Na過剰投与実験としては1.7%NaClを飲水として12日間投与し、利尿剤投与実験としては、Furosemideを7日間i.p.投与した。絶食実験は、3日間完全絶食とした。

カテコラミン投与実験は、Norepinephrine、Isoproterenol、Phenylephrineを1mg/kg B.W.のdoseにてs.c.投与し、3時間後実験に供した。

血液の採取は断頭にて行ない、trunk bloodを試験管に採取し血清分離した。

Na/K ATPaseの測定はOuabain Binding Assayにて行なった(3)。すなわちラット腎組織を

0.25M Sucrose, 5mM Histidine, 5mM EDTA, 0.1% Na deoxycholate, 10 $\mu$ M Dithiothreitol (DTT) (TrisにてpH7.4に調整) 中にてhomogenizeし、100,000xg 60minのpelletを10mM Tris/HCl pH7.4にsuspendし酵素標品とした。酵素標品を [<sup>3</sup>H]Ouabain, 200nM 非標識Ouabain と1mM orthophosphate, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM Tris/HCl pH 7.4中にて37C, 90min incubateし100,000xg 30min遠心にてB/F分離を行なった。Pelletを0.5ml 0.1N NaOHに溶解し、HClにて中和後液体シンチレーションカウンターにて測定した。シンチレーターにはクリアゾル (ナカライ) を使用し、quenchingは外部線源法にて補正した。

血清Naは炎光光度法によった。

甲状腺ホルモン代謝酵素、5'-DeiodinaseはLeonardの方法によった(4)。すなわちラット肝、腎を100mM Phosphate, pH7.0にてhomogenizeし1000xg, 15min遠心し、その上清を50-100倍希釈したものを酵素標品とした。酵素標品をDTT存在下 (肝腎は0.5mM、筋肉は10mM)、 [<sup>125</sup>I]標識RT<sub>3</sub>と (肝腎は0.5 $\mu$ M、筋肉は約0.2nM) インクベートし (肝腎は5分、筋肉は60分)、2% BSA及び10% TCA添加にて反応停止後1500xg、10分遠心し、その上清をDow ex-50ミニカラムにapplyし、遊離した [<sup>125</sup>I-] を分離した。酵素の活性は<sup>125</sup>I- (%) で評価した。

### 3. 結果

#### (1) 甲状腺ホルモン投与及び甲状腺機能低下症ラットにおけるOuabain Binding Site(OBS)の変動

図1は、甲状腺ホルモン投与及び甲状腺機能低下症ラットにおけるOBSを示し、コントロールラットの値を100%としている。甲状腺機能低下症ではコントロールの50.8%と約半分に低下し、T<sub>3</sub>投与では207.2%と約2倍に増加していた。T<sub>4</sub>投与でも168.5%に増加していたが、T<sub>4</sub>と同時にIOP投与した群では全く増加を示さなかった。

#### (2) 甲状腺ホルモン投与及び甲状腺機能低下症ラットにおける5'-Dの変動

図2は甲状腺ホルモン投与及び甲状腺機能低下症ラットにおける5'-Dの変動を示し、コントロールラットの値を100%としている。甲状腺機能低下症ラットではコントロールの半分以下に低下していた。T<sub>3</sub>投与ではコントロールの2倍以上に増加していた。T<sub>4</sub>投与でも2倍以上の増加を認めたが、この効果はIOPの同時投与にて完全に消失した。

Fig.1 (Next Page) Effect of hypothyroidism and thyroid hormone treatment on rat renal Na/K ATPase estimated by ouabain binding assay. Hypothyroidism was induced by giving 0.03% methimazole as drinking water for 3 weeks. T<sub>3</sub> (50 $\mu$ g/day) or T<sub>4</sub> (250 $\mu$ g/day) was injected s.c. for 3 days. Intraperitoneal injection of iopanoic acid (IOP), which is a competitive inhibitor of 5'-deiodinase, was



started 12 hours before thyroid hormone treatment.

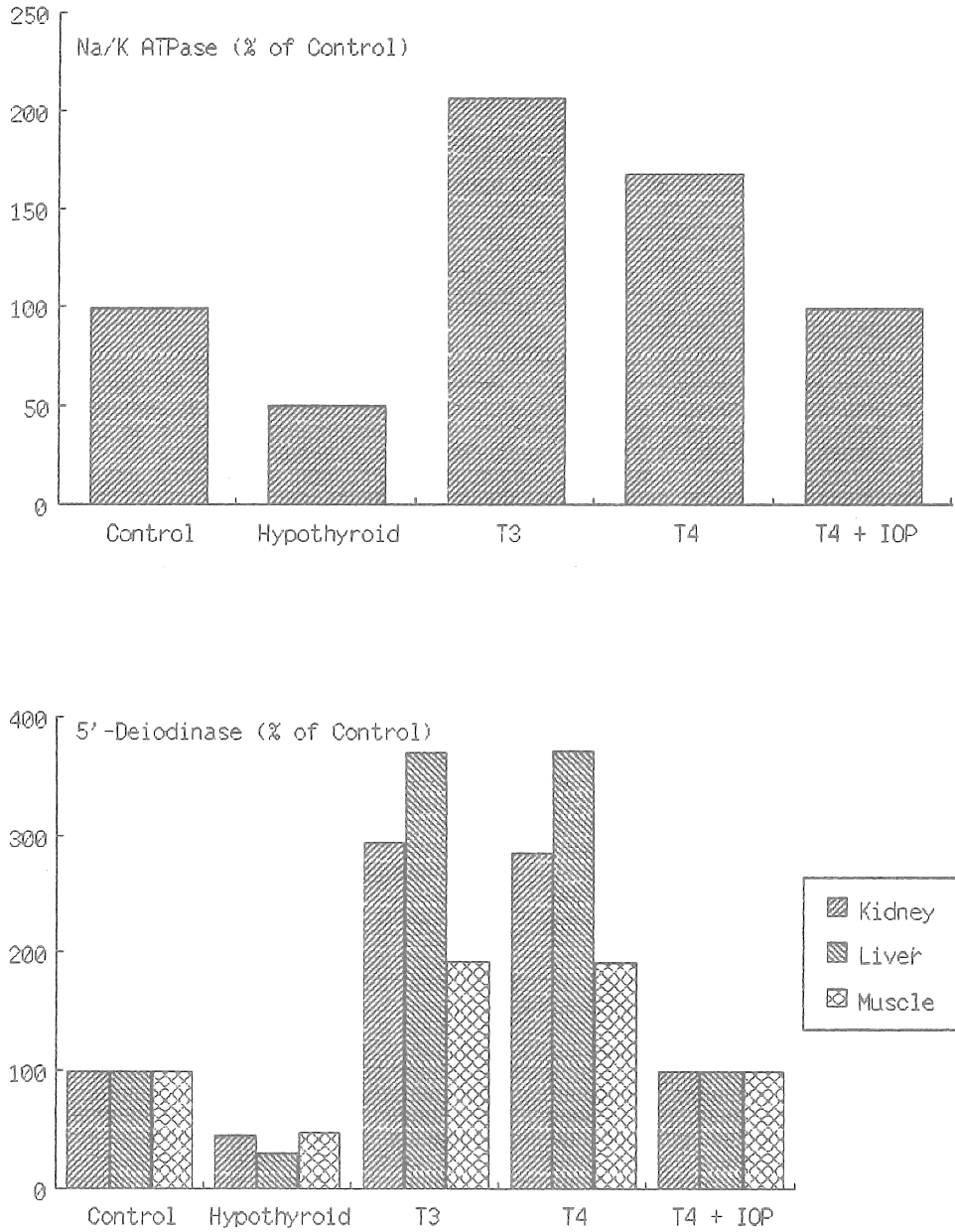


Fig.2 Effect of hypothyroidism and thyroid hormone treatment on 5'-deiodinase in rat kidney, liver and muscle. See text and legend for fig.1 for detail.

(3) 経口Na負荷及び長期Furosemide投与の5'-Dに対する影響

いずれの処置にても、血清Naは有意の変化を示さなかった。体重はコントロールラットの260gに対し、Na負荷ラットでは200gであった。Furosemide群はコントロールと有意の差を示さなかった。腎5'-Dは、Na負荷にて $79.4 \pm 5.3\%$ と低下し、Furosemide負荷にて $112.3 \pm 8.1\%$ と増加したが、肝5'-Dはいずれの負荷にても変動を示さなかった。筋5'-DはNa負荷にて $69.8 \pm 13.1\%$ と低下したが、Furosemideでは $95.2 \pm 30.9\%$ と有意の変動は示さなかった(図3)。

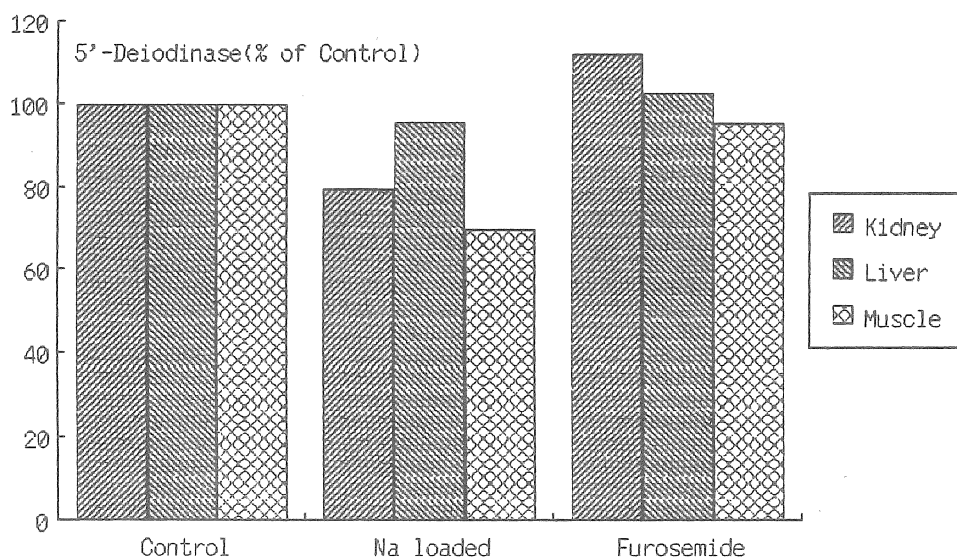


Fig.3 Effect of chronic sodium loading (1.7% NaCl for 12 days) and furosemide treatment (10mg/100g BW for 7 days) on 5'-deiodinase in rat tissues.

(4) 3日間完全絶食の5'-Dに対する影響

3日間絶食ラットでは体重200gで、コントロールラットに比して有意に低体重であった。図4に示すように、3日間完全絶食にて、肝5'-Dは約20%の低下を示したが筋、腎5'-Dは変化を示さなかった。

(5) カテコラミン投与の5'-Dに対する影響

図5に示すようにカテコラミン投与にて5'-D活性は変動を示したがデータのばらつきが大きく有意の変動は観察されなかった。

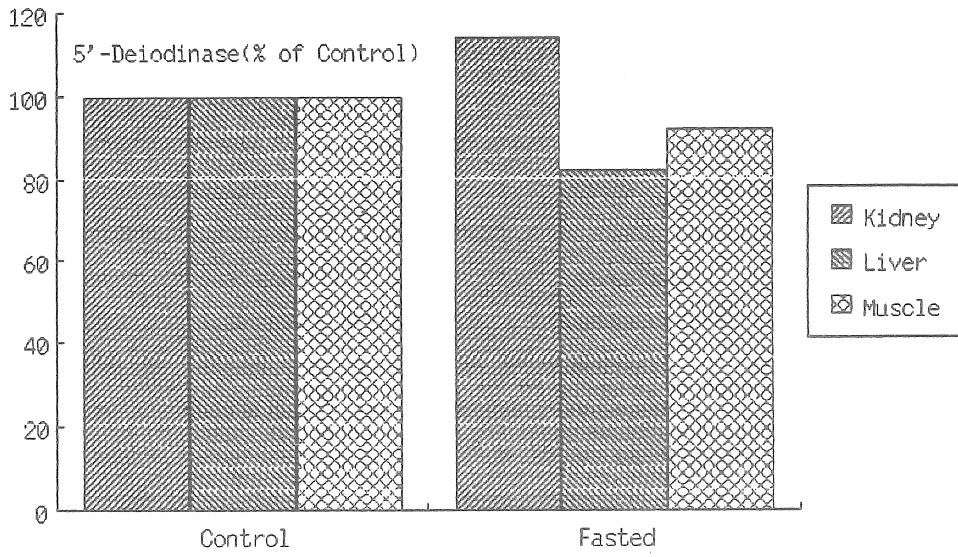


Fig.4 Effect of 3 days complete fasting on 5'-deiodinase in rat tissues.

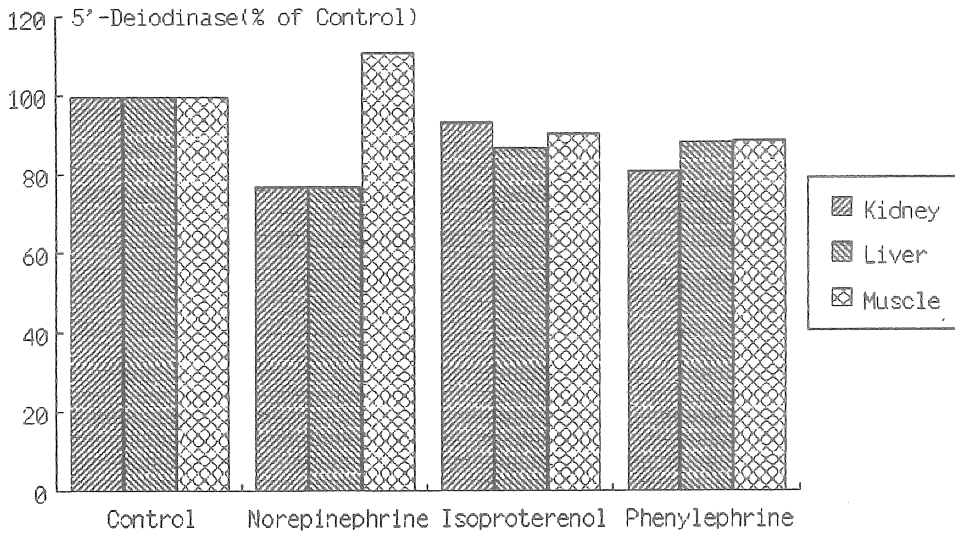


Fig.5 Effect of catecholamine treatment (1mg/kg BW, s.c. injection 3 hours before sacrifice) on 5'-deiodinase in rat tissues.

#### 4. 考察

甲状腺ホルモンは全身の代謝を調節するが、電解質代謝を論じた論文は比較的少ない。とりわけナトリウムとの関係に関する研究は少ない。しかし臨床的に甲状腺機能低下症の際に低Na血症の起こることが知られていることを考えると(2)、やはりNa濃度の調節因子としての意義を検討する必要があると思われる。そこで本研究を計画した訳であるが、昨年本研究では下垂体後葉の抗利尿ホルモン(ADH)との関係を主に研究し、甲状腺機能低下症にて、種々の刺激に対してADH分泌が過大反応を示すことを報告した(1)。しかし甲状腺機能異常における血清Na異常の発生機序としては下垂体後葉ADH分泌異常という説以外に、腎尿管異常を重視する説もある(3)。そこで本年度の研究においては甲状腺ホルモンの腎作用に重点をおいて研究し、昨年度の研究と相補って、甲状腺ホルモンのナトリウム調節というテーマを論ずることとした。

Na/K ATPaseはいうまでもなく、あらゆる細胞に存在し、細胞内からNaを汲み出し、Kを細胞内に入れ、細胞内外の電氣的勾配を維持する。腎においては尿管細胞からNaを汲み出し、細胞内Na濃度を調節することによって尿管腔からのcotransportに関与する(5)。Na/K ATPaseは多くの細胞に於いて甲状腺ホルモンによって促進的に調節されている(6)が、腎でも例外ではなく、従来から甲状腺ホルモン投与にて増加し、甲状腺機能低下症で減少することは報告されている(3)。しかし従来の研究では、 $T_4(T_3)$ 投与の効果をもって甲状腺ホルモンの効果としているが、以下に述べるような甲状腺ホルモンの代謝、作用の特殊性が考慮されておらず、その点を検討しておく必要があるものと考えた。

甲状腺ホルモンは、甲状腺から $T_4$ の形で分泌されるが、 $T_4$ はprohormoneであってホルモン作用を持たない。実際にホルモン活性を有するのは $T_3$ であるが、甲状腺から分泌されるものはわずかであって、大半は末梢で $T_4$ から代謝されて生ずる。この代謝を触媒する酵素5'-Deiodinaseは多くの細胞に存在し、未だその調節機構の全貌が明らかにはなっていないが各臓器毎に異なった調節機構が存在するようで、Brown Adipose Tissueにおける $\alpha$ -adrenergicな調節、松果体における $\beta$ -adrenergicに調節されたリズムの存在等が顕著なものである。従来、脳、下垂体などにおいては5'-Deiodinaseは細胞内 $T_3$ を微調整し甲状腺ホルモンの作用をprereceptorレベルで調節しているが、肝、腎は血中 $T_3$ の維持が主な役割とされていたが、最近の研究ではやはり肝、腎においても5'-Deiodinaseによる $T_3$ の産生が局所におけるホルモン作用の調節因子であることが認められてきた(7)。肝についてはInsulin、Somatostatin、Glucagon等消化管ホルモンやカテコラミンによる影響について報告があるものの、不可解なことに腎の5'-Deiodinaseの調節についてはほとんど報告がなかった。

まずNa/K ATPaseに対する甲状腺ホルモンの影響を検討したところ、従来の報告の如く甲状腺機能低下症で低下、甲状腺ホルモン投与で増加していた。しかし $T_4$ を単独で投与した場合、 $T_3$ 投与と同様の増加を示したものの、 $T_4$ と同時にIopanoic acid(IOP)を投与したところ $T_4$ の効果は全く消失した。IOPは5'-Deiodinaseの阻害剤であり、このことは甲状腺ホ

ルモンによるNa/K ATPase誘導にも $T_4$ から $T_3$ への代謝が不可欠であることを示す。

次にNa過剰投与と、利尿剤の効果を検討した。Na過剰投与にて腎5'-Deiodinaseは有意の低下を示した。Na負荷ラットは摂食量の低下、低体重を認めたが、この5'-Deiodinaseの低下は、3日間の完全絶食にて同等の低体重をきたしたが腎5'-Deiodinaseは低下を示さなかったことから摂食量低下によるものではないと考えられる。これに対し肝5'-Deiodinaseは絶食で低下を示したが、Na負荷では低下しなかった。すなわち肝5'-Deiodinaseは栄養状態や消化管ホルモンに調節されていることが示唆されるのに対し、腎5'-Deiodinaseはこれらには影響されず、腎尿管Naという腎局所の状態に左右されていることが窺われた。

以上の結果は、甲状腺ホルモンが腎Na/K ATPaseを調節するのは勿論であるが、 $T_4$ から $T_3$ への活性化が不可欠であり、その活性化酵素たる5'-Deiodinaseは尿細管内Naのような腎固有の要因によって調節されることを示している。すなわち甲状腺ホルモンによるNa/K ATPaseの調節、それによるNa濃度の調節を考える際には5'-Deiodinaseによるprereceptorレベルでの調節を考慮しておかねばならないことを示す。

## 5. 今後の課題

今回のカテコラミンのデータのバラツキにみられるように、in vivoのみでは限界があり培養細胞系を用いても検討中である。また甲状腺ホルモンによりNa/K ATPaseが誘導されるが、甲状腺機能高進症実際血清電解質濃度の異常を伴うことは稀で、他の因子の関与を考えざるを得ない。今後更に他のホルモンとの相互関係など広く研究を進めていきたいと考える。

## 6. 引用文献

- (1) 田中清: 甲状腺ホルモンによる抗利尿ホルモン(ADH)及び血清ナトリウム濃度の調節に関する研究 ソルトサイエンス財団1989年度研究報告書(助成番号8918)
- (2) Tolis G., Lerman S.: Organ System Manifestations II The Pituitary. In: The Thyroid 5th ed. (Eds. Ingbar S.H., Braverman L.E.) Lippincott (Philadelphia, USA) pp1181-1187, 1986
- (3) Lin M.H., Akera T.: Increased (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase concentrations in various tissues of rats caused by thyroid hormone treatment. J. Biol. Chem. 253:723-726, 1978
- (4) Leonard J.L., Rosenberg I.N.: Thyroxine 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and the 5'-deiodination of reverse triiodothyronine. Endocrinology 107:1376-1383, 1980

(5) Lechene C.: Physiological role of the Na-K pump. In: The Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-pump, part B : Cellular Aspects (Progress in Clinical and Biological Research vol.268B)(Eds. Skou J.C.,Norby J.G.,Maunsbach A.B.,Esmann M) pp.171-194 Alan R.Liss, New York 1988

(6) Glick G.G.,Imail-Beigi F.,Edelman I.S.: Hormonal regulation of Na,K-ATPase. *ibid.* pp277-295

(7) Rosenberg I.N.: An overview of thyroid hormone deiodinases. In: Thyroid Hormone Metabolism (Ed. Wu S-Y) pp.29-39, Blackwell Scientific Publications, Cambridge, MA, USA) 1991

A Study on the Role of Thyroid Hormone in Regulating Serum Sodium Concentrations

Kiyoshi Tanaka, M.D.

Radioisotope Research Center, Kyoto University

Summary

Thyroid hormone regulates the metabolic activity of almost all body tissues. However, studies on its effect on electrolyte balance has been far less compared to reports on energy metabolism. Clinically some patients with hypothyroidism presents hyponatremia. Thus I attempted to study the role of thyroid hormone in electrolyte regulation with emphasis on sodium. Last year I reported an exaggerated response of antidiuretic hormone (ADH) to various stimuli in experimental hypothyroidism(#8918). In this paper I studied the role of thyroid hormone in the regulation of Na/K ATPase in kidney.

Thyroxine(T4) or 3,5,3'-L-triiodothyronine(T3) treatment increased and hypothyroidism decreased rat renal Na/K ATPase. Simultaneous injection of iopanoic acid completely abolished the effect of T4. Iopanoic acid is a competitive inhibitor of 5'-deiodinase, which converts T4 to T3. Current concepts hold that T4 is merely a prohormone and T3 is the active form. Most of circulating T3 is derived from conversion from T4 rather than secretion from thyroid gland. Thus above data shows the importance of 5'-deiodinase in inducing Na/K ATPase.

Activity of 5'-deiodinase seems to be under the control of other hormones and neural tones, which differ from one tissue to another. Curiously regulatory mechanism of renal 5'-deiodinase has been little studied.

Chronic sodium loading decreased and furosemide administration increased renal 5'-deiodinase. This decreased enzyme activity is not due to accompanied decreased food intake, because 3 days complete fasting decreased hepatic 5'-deiodinase but had no effect on renal 5'-deiodinase and sodium overload had no effect on 5'-deiodinase in liver.

Previous studies on the role of thyroid hormone in regulating Na/K ATPase activity does not take into account the importance of 5'-deiodination in expressing the hormone action. Current data, although a preliminary one, clearly demonstrates that renal 5'-deiodinase is controlled by a kidney-specific mechanism. Further study on the regulatory mechanism of 5'-deiodinase will give us better understanding of how thyroid hormone regulates Na/K ATPase and serum sodium concentrations.