

63年度文部省科学研究成果報告

内分泌細胞の増殖と機能の制御における各種成長因子の役割についての研究

(研究課題番号 21480254)

昭和63年度科学研究費補助金(一般B)

研究成果報告書

平成元年3月1日

研究代表者 對馬敏夫

(東京女子医科大学 内科2)

目 次

I はじめに	1
II 研究組織	3
III 研究発表	4
IV 培養甲状腺細胞に対するインスリン様 成長因子の作用に関する研究	9
V 培養甲状腺細胞のDNA合成ヨード代謝に 対する transforming growth factor (TGF)- β の効果について	27

【はしがき】

細胞の増殖，その分化機能の調節機構の解明は現代の生物学に課せられた最大の課題の一つである。臨床的にも悪性腫瘍の発生やその増殖とも関連した重要な問題である。内分泌組織を構成する細胞の増殖，分化，発達を調節する因子については古くから各種ホルモンの役割を中心に研究が進められてきた。副腎の肥大や分化機能発現における ACTH，性腺におけるゴナドトロピン，あるいは甲状腺細胞の増殖と機能における TSH などの重要性はよく知られた事実である。しかしながらこれらの古典的ホルモン以外にも多数の因子が内分泌細胞の増殖や機能に関することが示唆されている。特に成長因子 (growth factor) と呼ばれる一群のペプチドの役割は注目される。成長因子には insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF)- α , TGF- β など多数のものが存在する。これらの成長因子は当初培養細胞の増殖を促進する因子として発見された。しかしその後，培養細胞の種類や培養条件によっては細胞の増殖を抑制し，あるいは分化機構の発現に対しても正負 2 方向の作用を示すものも存在することが明らかにされた。古典的なホルモンと異なり，多くの成長因子は局所的に作用すると考えられる。すなわち，組織で産生された成長因子が近傍の組織に作用する paracrine factor あるいは産生された成長因子が産生細胞自体に作用する autocrine factor としての作用が示唆されている。他の組織と同様に内分泌組織においても肥大，過形成，腺腫，悪性腺腫が存在し，これに付随して内分泌機能の変動する。しかし，現在のところ内分泌組織の増殖，肥大，機能発現，腫瘍化などにおける成長因子の役割についての知見は乏しいのが現状である。そこで我々は甲状腺組織を中心に内分泌細胞の増殖と機能に関する研究をおこなうこととした。研究の主たる目的は以下のとおりである。

- (1) 正常内分泌細胞の増殖と機能に対する各種成長因子の作用を明らかにする。またこの際に癌遺伝子，その他その内分泌細胞に特有な機能と関連した物質の遺伝子発現との関連を追求する。

- (2) 内分泌腫瘍細胞の増殖に関与する成長因子を明らかにする。特に autocrine factor としての成長因子の役割の有無を検討する。
- (3) 内分泌腫瘍及び過形成組織における組織中の成長因子，およびその受容体のレベルを検討する。またこれらの組織における癌遺伝子，成長因子遺伝子の発現と増殖との関連を明らかにする。
- (4) 各種内分泌疾患あるいは癌患者における血中及び尿中の成長因子の測定が病態の理解，疾患の診断，あるいは予後の判定に有益か否かを明らかにする。
我々は文部省科学研究費の援助によりこれらについての研究を行ない，以下にのべる成績をあげることができたので報告する。

【研究組織】

研究代表者

對馬敏夫（東京女子医科大学内科2 教授）

研究分担者

大村栄治（東京女子医科大学内科2 助手）

佐治元康（東京女子医科大学内科2 助手）

大庭義人（東京女子医科大学内科2 助手）

【研究経費】

昭和61年 2,700 千円

昭和62年 1,500 千円

昭和63年 1,500 千円

合計 5,700 千円

【研究発表】

1. Isozaki O, Tsushima T, Shizume K, Saji M, Ohba Y, Emoto N, Sato K, Sato Y and Kusakabe K: Thyroid stimulating antibody bioassay using porcine thyroid cells cultured in follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 61:1105, 1985
2. Ohmura E, Tsushima T, Emoto N, Obuchi E and Shizume K: Effects of tumor promoters (Merein, Teleocidin and palytoxin) on growth hormone secretion from rat anterior pituitary cell in monolayers. *Life Sci* 41:691, 1987
3. Saji M, Tsushima T, Isozaki O, Murakami H, Ohba Y, Sato K, Arai M and Shizume K: Interaction of insulin-like growth factor I with porcine thyroid cells cultured in monolayer. *Endocrinology* 121:749, 1987
4. Emoto N, Tsushima T, Shizume K, Tanaka T, Saji M, Ohba Y, Wakai K, Arai M and Ohmura E: Biological activities of human growth hormone and its derivatives estimated by measuring DNA synthesis in Nb2 node rat lymphoma cells. *Acta Endocrinol* 114:283, 1987
5. Hizuka N, Sukegaw I, Takano K, Asakawa K, Horikawa R, Tsushima T and Shizume K: Characterization of insulin-like growth factor I receptors on human erythro-leukemia cell line (K-562 cells). *Endocrinol Jap* 34:81, 1987
6. Ohmura E, Emoto N, Tsushima T, Watanabe S, Takeuchi T, Kawamura M, Shigemoto M, and Shizume K: Salivary immunoreactive human epidermal growth factor (IR-hGH) in patients with peptic ulcer disease. *Hepatogastroenterology* 34:160, 1987
7. Ozawa M, Sato K, Han DC, Kawakami M, Tsushima T and Shizume K: Effects of tumor necrosis factor- α /cachectin on thyroid hormone metabolism in mice. *Endocrinology* 123:1461, 1988
8. Saji M, Isozaki O, Tsushima T, Arai M, Miyakawa M, Ohba Y, Tsuchiya Y, Sano T and Shizume K: The inhibitory effect of iodide on growth of rat thyroid (FRTL-5) cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 119:145, 1988
9. Tsushima T, Arai M, Saji M, Ohba Y, Murakami H, Ohmura E and Shizume K: Effects of transforming growth factor- β on deoxyribonucleic acid synthesis and iodine metabolism in porcine thyroid cells in culture. *Endocrinology* 123:1187, 1988
10. Miyakawa M, Saji M, Tsushima T, Wakai K and Shizume K: Thyroid volume and serum thyroglobulin levels in patients with acromegaly: Correlation with plasma insulin-like growth factor I levels. *J Clin Endocrinol Metab* 67:973, 1988
11. Ohmura E, Okada M, Ohba Y, Onoda N, Sano T, Tsushima T and Shizume K: Phorbol ester pretreatment attenuates the growth hormone (GH) response to GH-releasing factor in cultured rat pituitary cells. *J Endocrinol* 118:423, 1988

【国内学会発表】

【第59回日本内分泌学会総会】

1. 佐治元康, 磯崎 収, 對馬敏夫, 江本直也, 鎮目和夫, 小淵恵美子, 村上ひとみ, 若井加恵「甲状腺細胞増殖機構についての検討」
日本内分泌学会誌 62(4): 364, 1986
2. 木村葉子, 村上ひとみ, 佐治元康, 江本直也, 鎮目和夫「甲状腺細胞 IGF-I受容体の調節に関する研究」日本内分泌学会誌 62(4): 500, 1986
3. 八代 亨, 大庭義人, 對馬敏夫, 藤本吉秀, 鎮目和夫「ヒト甲状腺細胞膜における IGF-I 受容体の研究」日本内分泌学会誌 62(4): 501, 1986

【第59回日本内分泌学会秋期大会】

4. 村上ひとみ, 新井真理子, 對馬敏夫, 佐治元康, 鎮目和夫「培養ブタ甲状腺細胞に対する TGF の効果」日本内分泌学会誌 62(9): 982, 1986

【第60回日本内分泌学会学術総会】

5. 對馬敏夫, 大庭義人, 若井加恵, 小淵恵美子, 村上ひとみ, 鎮目和夫「ヒト下垂体 TGF 様成長因子についての研究」日本内分泌学会雑誌 63(4): 374, 1987
6. 村上ひとみ, 若井加恵, 大庭義人, 佐藤幹二, 對馬敏夫, 鎮目和夫「骨芽細胞 (MC3T3-E1) 細胞の増殖と分化に対する IGF-I の作用について」日本内分泌学会雑誌 63(4): 410, 1987

7. 小淵恵美子, 大庭義人, 對馬敏夫, 大村栄治, 若井加恵, 佐野智英, 佐野典子, 鎮目和夫「合成ヒトTGF- α の生物活性についての研究」日本内分泌学会雑誌 63(4): 412, 1987
8. 佐治元康, 新井真理子, 小淵恵美子, 對馬敏夫, 鎮目和夫, 村上ひとみ, 若井加恵「無機ヨードの甲状腺細胞(FRTL-5)の細胞増殖に及ぼす影響」日本内分泌学会雑誌 63(4): 427, 1987
9. 新井真理子, 佐治元康, 大庭義人, 村上ひとみ, 鎮目和夫, 對馬敏夫「培養ブタ甲状腺細胞機能に対する β -TGFの効果について」日本内分泌学会雑誌 63(4): 429, 1987

[第60回日本内分泌学会秋期大会]

10. 八代 亨, 大庭義人, 大村栄治, 佐治元康, 村上ひとみ, 岡田政喜, 小淵恵美子, 對馬敏夫, 藤本吉秀, 鎮目和夫「ヒト甲状腺腫瘍組織内のIGF-I様活性について」日本内分泌学会雑誌 63(9): 1035, 1987
11. 小沢 稔, 佐藤幹二, 韓斗 詰, 鎮目和夫, 川上正叙「Tumor necrosis factor (TNF- α)の甲状腺機能に及ぼす効果」日本内分泌学会雑誌 63(9): 1050, 1987

[第8回甲状腺カンファランス] 大津

12. 對馬敏夫, 佐治元康, 鎮目和夫, 新井真理子, 村上ひとみ「甲状腺細胞と成長因子受容体—主としてインスリン様成長因子受容体について」

[第61回日本内分泌学会秋期学術大会]

13. 大村栄治, 岡田政喜, 小野田教高, 大庭義人, 神谷吉宜, 對馬敏夫, 鎮目和夫「腭癌株細胞におけるIGF-I様物質および α TGF様物質の産生とその増殖に及ぼす影響」日本内分泌学会雑誌 64(9): 800, 1988

[第31回日本内分泌学会甲状腺分科会]

14. 新井真理子, 土屋由美, 對馬敏夫, 佐治元康, 磯崎 収, 宮川めぐみ,
佐藤幹二, 鎮目和夫「培養ブタ甲状腺細胞のヨード取り込みおよび有機ヨ
ード合成放出に関する基礎的検討」日本内分泌学会雑誌 64(9): 939, 1988

【国際学会】

1. Saji M, Ohba Y, Kimura Y, Ohmura E, Sato K and Tsushima T: Interaction of insulin-like growth factor-I with porcine thyroid cells cultured in monolayer. Program and Abstracts of the 68th Annual Meeting of the Endocrine Society. P 170 (Abst 557), 1986
2. Tsushima T, Saji M, Murakami H, Arai M, Sato K, Isozaki O and Shizume K: Regulation of thyroid cell growth in vitro. Abstracts of the 3rd Japan-Korea Thyroid Symposium (Tokyo). pp 16-18, 1986
3. Tsushima T, Arai M, Murakami H, Saji M, Ohba Y, and Shizume K: Effect of transforming growth factors (TGFs) on DNA synthesis and iodine metabolism in porcine thyroid cells cultured in monolayer. Abstracts of the 62nd Congress of American Thyroid Association. T-60 (Abst No. 117), 1987
4. Sato K, Han DH, Ozawa M and Tsushima T: Dimethylsulfoxide maintains human thyroid cells in suspension culture, facilitating synthesis and release of thyroid hormone: A new bioassay for thyroid stimulating antibody in Graves' disease. Abstracts of the 62nd Congress of American Thyroid Association. T-46 (Abst No. 92), 1987
5. Sato K, Han DC, Ozawa M, Imamura H, Fujimoto Y, Tsushima T and Shizume K: Inhibition of ^{125}I organification and thyroid hormone release by interleukin 1, tumor necrosis factor α and interferon γ in human thyrocytes in suspension culture (Abst No. 12-18-014). Abstracts of 8th international Congress of Endocrinology (Kyoto). P 268, 1988
6. Tsuchiya Y, Saji M, Arai M, Isozaki O, Tsushima T, Miyakawa M and Shizume K: The effects of inorganic iodide and lithium on cell proliferation in cultured rat thyroid cells (Abst No. 12-22-273). Abstracts of 8th International Congress of Endocrinology (Kyoto). P 332, 1988
7. Saji M, Arai M, Isozaki O, Tsushima T, Miyakawa M, Tsuchiya Y, and Shizume K: 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate synergistically enhanced thymidine incorporation induced by insulin-like growth factor-I in cultured rat thyroid cells (Abst No. 12-22-274). Abstracts of 8th International Congress of Endocrinology (Kyoto). P332, 1988

8. Arai M, Saji M, Tsushima T, Ohba Y, Onoda N and Shizume K: Effect of TGF α on DNA synthesis and iodine metabolism in porcine thyroid cells in culture. (Abst No. 12-22-276). Abstracts of 8th International Congress of Endocrinology (Kyoto) P 333, 1988
9. Miyakawa M, Saji M, Wakai K, Tsushima T and Shizume K: Elevated serum thyroglobulin levels in acromegalic patients: The relationship between plasma IGF-I levels and the thyroid volume (Abst No. 12-22-280). Abstracts of 8th International Congress of Endocrinology (Kyoto). P 334, 1988
10. Tsushima T, Obuchi E, Shizume K and Ohba Y: Mitogenic activity of physiological concentrations of insulin in human fibroblast. (Abst No. 23-19-085). Abstracts of International Congress of Endocrinology (Kyoto). P 619, 1988
11. Murakami H, Tsushima T, Ohmura E, Sato K and Shizume K: Interaction of insulin-like growth factor-I with mouse osteoblasts (MC3T3-E1) in culture. (Abst No. 23-19-086). Abstracts of International Congress of Endocrinology (Kyoto). p 619, 1988
12. Yashiro T, Tsushima T, Ohba Y, Onoda N, Murakami H, Shizume K and Fujimoto Y: IGF-I like immunoreactivity in thyroid tumor tissues (Abst No. V-1-2). Program and Abstracts of International Thyroid Symposium. P 101, 1988
13. Saji M, Tsushima T, Arai M, Tsuchiya Y, Miyagawa M, Isozaki O, Sato K and Shizume K: Thyroid stimulating antibody assayed by iodothyronine release into medium using porcine thyroid cells (Abst No. V1-0-5). Program and Abstracts of International Thyroid Symposium. p 112, 1988

I 培養甲状腺細胞に対するインスリン様成長因子の作用に関する研究

【緒言】

甲状腺の機能の調節に下垂体 TSH が主要な役割を果たしていることは周知の事実である。TSH は甲状腺細胞の膜受容体に結合し cAMP 産生を介してヨードの取り込み、有機化、甲状腺ホルモンの合成分泌を促進する。またインビボでは TSH が甲状腺腫大を惹起することもよく知られている。しかしながら培養甲状腺細胞の増殖に対する TSH の作用は動物種によって異なり、ラットやイヌでは増殖を促進するがヒツジやブタでは無効である⁽⁴⁻⁶⁾。ヒト甲状腺細胞については多くの報告は TSH の細胞増殖作用がないとしているが、条件によってはあるとするものがある。ヒト、ブタ、ヒツジなどで TSH が甲状腺細胞増殖を促進しないのは種差によるものか、あるいは培養条件がなお適切でないのか、あるいはインビボにおける TSH の甲状腺腫大作用は TSH が甲状腺濾胞細胞に作用するのではなく他の細胞にはたらくことによる 2 次的なものであるのかについてはなお明らかではない。一方培養甲状腺細胞を用いた最近の成績から TSH 以外に多数の成長因子が甲状腺細胞の増殖や機能に影響をあたえることが明らかにされてきた。代表的なものは epidermal growth factor (EGF) である。EGF は各種培養甲状腺細胞の増殖を強く促進するとともに TSH のヨード代謝促進作用を強く抑制することが報告されている⁽⁷⁻¹⁰⁾。また高濃度のインスリンも甲状腺細胞増殖作用が存在する⁽⁸⁾。高濃度のインスリンの細胞増殖作用は線維芽細胞など多数の組織で認められる現象であるが、これは一般に IGF- (insulin-like growth factor) 受容体を介する作用と考えている。インスリンは IGF-I に対して弱いながら親和性を有し、高濃度では IGF-I 受容体と結合しうるからである。高濃度のインスリンが甲状腺細胞の増殖を促進する事実から IGF-I が甲状腺細胞の増殖に関与することが推測された。そこで我々はまず甲状腺細胞の増殖と機能に対する IGF-I の作用を検討した。IGF は成長ホルモン依存性の成長因子で IGF-I, II の 2 種類が存在し、それぞ

れタイプ1, タイプ2の受容体と結合する。^(12,13)

【方法】

(1) 材料, 試薬

リコンビナント IGF-I⁽¹⁴⁾は藤沢製薬中央研究所(大阪)丹羽博士より提供された。ラット IGF-II (multiplication stimulating activity; MSA)は米国 NIH (Bethesda, MD)のM.M. Rechler及びS.P. Nissley博士より提供を受けた。いずれも chloramine T法を用いて標識し, その specific activityはそれぞれ $150 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, $50 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 前後であった。monocomponent ブタインスリン ($25 \text{U}/\text{mg}$)はEli Lilly (Indianapolis社)より購入し, 同様に chloramine T法で標識した (specific activity $180-200 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)。標識したこれらのペプチドはセファデックス G50カラムで純化し実験に用いた。Platelet-derived growth factor (PDGF)はC.H. Heldin 博士(ウプサラ大学)より提供されたものを用いた。またマウス EGF (mEGF)及び下垂体由来の fibroblast growth factor (FGF)はCollaborative Res Inc (San Fransisco, CA)より, 胎児ウシ血清 (fetal calf serum, FCS)はGibco社 (Grand Island, NY)より購入した。IGF-I 欠乏血清 (IGF-I deficient serum)としては下垂体性小人性の血清 (RIAによる血中 IGF-I濃度は $10 \text{ng}/\text{ml}$ 以下)を用いた。

(2) ブタ甲状腺細胞の単層培養

新鮮なブタ甲状腺組織を屠殺場より無菌的に入手し, ハサミで結合織を除去したのち氷冷したCa-Mg-free Hank's Balanced Salt Soution (HBSS)でよく洗浄した。ついで $5 \text{g}/\text{L}$ の濃度にDispase (合同酒精, 東京)を含むHBSSに組織を移し既に報告した方法⁽¹⁵⁾で 30°C , 1時間処理した。酵素処理した組織片をナイロンメッシュ (100mesh)で濾過し, 未消化の組織を再び上記の如く処理した。濾液を集め $100 \times \text{g}$ で5分間遠沈し沈渣をHBSSで2回洗浄した。単離された甲状腺上皮細胞と濾胞断片を含む沈渣を10% FCSを含むHam F-12培地に $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{10}/\text{ml}$ の細胞密度で懸濁し multi-well plate (Coster,

Cambridge, MA) に 0.5 ml ずつ分注した。細胞は 5% CO₂ を含む空气中で 37°C で培養した。通常細胞は 24 時間までに培養皿底面に接着し単層を形成した。

(3) 結合実験

培養 1 ないし 2 日に培地を除去し 1 ml の Hank's solution で細胞を洗浄した。ついで 1 ml の HEPES binding buffer (100 mM HEPES, 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 10 mM glucose, 10 mM CaCl₂, 50 mM NaCl, 5 mM KCl 及び 0.1% BSA を含む) を用いて細胞と標識 IGF-I, IGF-II あるいはインスリンとの結合実験を行なった。反応終了後に細胞に未結合の radioactivity を吸引除去し、ついで細胞を氷冷した phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 で 2 回洗浄した。ついで細胞を 1 N の NaOH で溶解しその一部をとって radioactivity を計測した。実験に際して過剰量 (10 µg/ml) の非標識ペプチド (IGF-I, IGF-II あるいはインスリン) を添加して得られた結合を非特異的結合 (non-specific binding) とし、全結合量 (非標識リガンドを含まない場合に得られた結合量) から差し引いた値を特異的結合 (specific binding) とした。結合実験は全て 2 ないし 3 重量測定した。

(4) クロスリンキング実験

単層培養した甲状腺細胞を [¹²⁵I]-IGF-I (10 ng/ml) と 4°C で 18 時間反応させた。上清を除去し細胞の受容体と受容体に結合した [¹²⁵I]-IGF-I とを最終濃度 0.5 mM の disuccinimidyl suberate (DSS) を用いてクロスリンクした。⁽¹²⁾ 反応条件は 20°C, 20 分とし、1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) の添加により反応を終了させた。上清を除去し細胞を 10% (vol/vol) glycerol, 1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 及び 100 mM dithiothreitol を含む 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) で可溶化した。これを 10,000×g で 20 分遠沈し上清の 50 µl を 7.5% polyacrilamide slab gel を用いて電気泳動した。stacking gel には 3% gel を使い、また buffer system は Laemmli の方法⁽¹⁶⁾ を用いた。電気泳動終了後にゲルを乾燥しオートラジオグラ

フィーを行なった。電気泳動における marker protein としては filamin (分子) 量 250,000), myosin (200,000), RNA polymerase β 1-及び β 2-subunit (165,000 及び 155,000), phosphorylase b (94,000), BSA (68,000), 及び ovalbumin (43,000) を用いた。

(5) IGF-I 受容体の調節

ブタ甲状腺細胞 (2×10^5 cells/well) を 10% FCS を含む F-12 培地で培養した。3 日後に培地を 1% IGF-I deficient serum を含む F-12 に変更しこれに種々の濃度の成長因子 (IGF-I, insulin, PDGF, FGF) を添加し更に培養した。一定期間ののち培地を吸引除去し細胞を HBSS で 2 回洗浄したのち、前述した方法で [125 I]-IGF-I と反応させ結合率をみた。

(6) DNA 合成実験

まず細胞 (5×10^5 cells/well) を 10% FCS を含む F-12 培地で培養した。培養 3 日目に培地を 0.5% IGF-I deficient serum を含む F-12 に変更して 24 時間後に各種成長因子を添加し 72 時間培養した。最後の 48 時間は $0.2 \mu\text{Ci/ml}$ の [^3H]-Thymidine (20 Ci/mmol ; New England Nuclear, Boston) でラベルした。培養終了後、上清を除去し細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄しついで氷冷した 10% TCA (Trichloroacetic acid) で処理した。甲状腺細胞の DNA 合成は細胞にとりこまれた TCA 不溶性 [^3H]-thymidine の量で判定した。甲状腺細胞の DNA 量は Morgan の方法⁽¹⁷⁾で測定した。

(7) 細胞増殖

甲状腺細胞を 2×10^4 /well の濃度で播き 10% FCS を含む F-12 培地で培養した。24 時間後に培地を 1% IGF-I deficient serum を含む F-12 に交換しこれに各種濃度の IGF-I を添加し更に 5 日間培養した。培養終了ののち、単層を 0.25% のトリプシンで処理して細胞を遊離させ、Coulter Counter (Coulter Electronics, Hialeah, FL) を用いて細胞数を計測した。

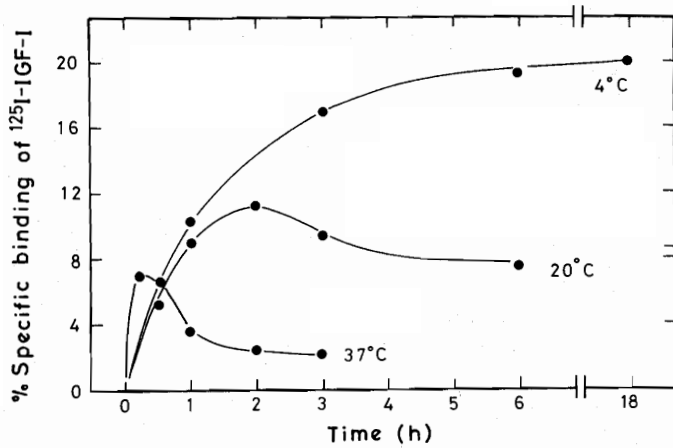
(8) サイクリックAMP測定

甲状腺細胞 (2×10^5 /well) を 0.5% IGF-I deficient serum 及び種々の濃度の IGF-I を含む F-12 培地で 24 時間培養した。培地を除去し 300 μ l の modified HBSS (5.4 mM KCl, 0.3 mM Na_2HPO_4 , 0.4 mM KH_2PO_3 , 1.3 mM CaCl_2 , 0.8 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% glucose, 0.1% BSA, 20 mM HEPES, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine を組成とする。pH は NaOH により 7.4 に調整) を添加した。ウシ TSH (Sigma Chemical; St Louis, MO) の存在下あるいは非存在下で細胞を 37°C, 2 時間インキュベートしたのち 700 μ l の氷冷 10% TCA で抽出した。TCA を水飽和したエチルエーテルで除去したのち抽出液の cAMP 含量を cAMP RIA キット (New England Nuclear) で測定した。

【結果】

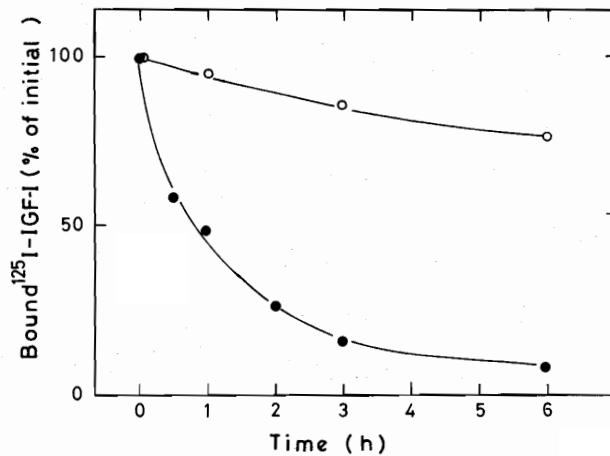
(1) 結合実験

$[^{125}\text{I}]$ -IGF-I と単層培養したブタ甲状腺細胞の結合はインキュベーションの時間及び温度に依存した (図 1)。37°C の条件下では特異的結合は 1 時間で頂値に達した以後は減少した。一方 4°C では結合はインキュベーションの時間とともに増加し 18-24 時間で最大に達した。4°C における最大結合率は $14.2 \pm 2.0\%$ (mean \pm SD, N=6) で 37°C における結合率 ($3.2 \pm 0.2\%$) より有意に高値を示した。37°C における結合率の低下が $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I の分解によるものか否かについて検討した。標識 IGF-I を 37°C で単層培養の甲状腺細胞と 6 時間インキュベートしたのちメジウムに残る $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I の分解の程度をヒト胎盤膜受容体との結合性を指標として検討した。その結果胎盤への結合率は対照の $75.9 \pm 3\%$ に低下していた。またこの系に 0.5 mM クロロキンを添加すると $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I の分解はほぼ完全に抑制された。4°C および 20°C の条件下では標識 IGF-I の分解は認められなかった。従って 37°C での結合率の低下の一部は $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I の分解によると思われる。細胞に結合した $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I の解離もまた温度に依存する過程であった。図 2 に示す



図(1) 単層培養ブタ甲状腺細胞と $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I 結合に対する温度の影響

10個の細胞を図に示す条件下で 50,000 cpm の $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I と反応させる。

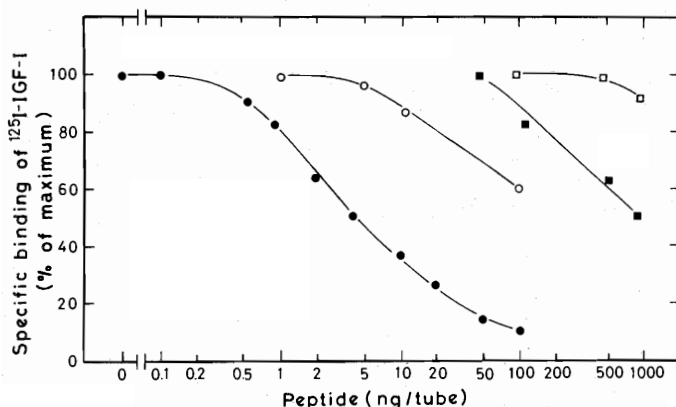


図(2) 甲状腺細胞に結合した $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I 解離

2×10^5 個の細胞を $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I と 20°C , 6 時間インキュベートし, 培地を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ IGF-I を含む 2 ml の HEPES binding buffer に変更した。ついでデイッシュを 4°C (○), あるいは 37°C (●) でインキュベートし図に示した時間で反応を終了させ, 細胞に結合している $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I を測定した。図では反応時間 0 の場合のカウントを 100% として示した。

ごとく、37℃では細胞に結合した $[^{125}\text{I}]$ -IGF-Iは3時間までに90%以上が解離する。またこの際メジウム中に存在するradioactivityを検討するとその40%が10% TCAに可溶性であった。従って細胞から解離する放射活性の一部は $[^{125}\text{I}]$ -IGF-Iの分解産物によると思われる。なお4℃においては解離は6時間でも22%程度であり培地中での $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I分解産物も殆ど検出できなかった。

インスリンについても同様に結合実験を行なった。標識インスリンと甲状腺細胞の結合はIGF-Iの場合と同様に温度依存性の過程でありやはり4℃18hでの結合率が最大であった。しかしその値は $2.02 \pm 0.3\%$ per 10^6 cells とIGF-Iのそれに比して低値であった。なおMSAを用いた検討では結合率は1%以下の低値であった(しかしrecombinant IGF-IIを用いた最近の成績ではIGF-Iと同様の結合率が得られている)。図3にブタ甲状腺細胞におけるIGF-I受容体の特異性を示す。標識IGF-Iの結合は非標識IGF-Iにより濃度依存性に抑制され50%阻害は2-5ng/mlの範囲で認められた。

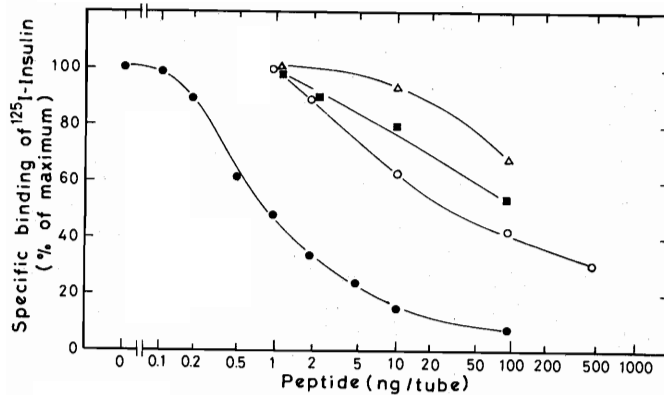


図(3) ブタ甲状腺細胞 IGF-I 受容体の特異性

単層培養した甲状腺細胞 $[^{125}\text{I}]$ -IGF-Iと非標識IGF-I(●), MSA(○), 猪インスリン(■)あるいはプロインスリン(□)の依存下で反応させた。

MSA(IGF-II)やインスリンも結合を抑制したがその力価は弱く、IGF-I

のそれぞれ5%, 0.3% にすぎなかった。Scatchard plot による解析ではブタ甲状腺細胞におけるIGF-I受容体の親和恒数(K_a)は 4.3×10^{10} L/M, 受容体の数は約50,000/cell程度であった。インスリン受容体における特異性を図4に示した。標識インスリンの結合は非標識インスリンによって濃度依存性に抑制され2-3 ng/mlで50%阻害が認められた。IGF-I, MSAの力価はインスリンの1%以下であった。

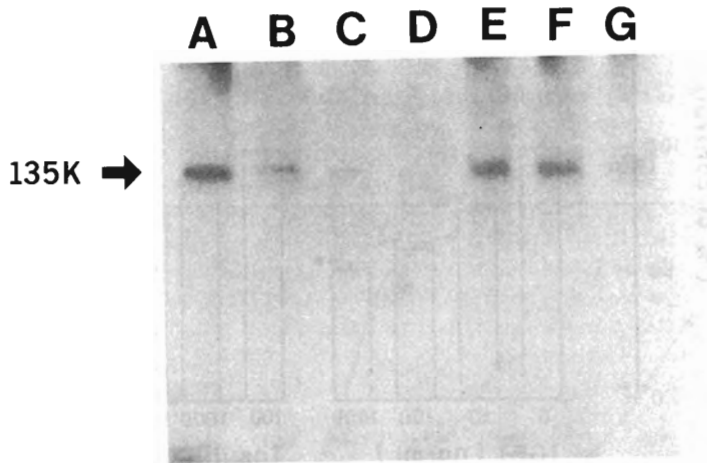


図(4) ブタ甲状腺細胞インスリン受容体の特異性

単層培養した甲状腺を [125 I]-insulinと非標識インスリン(●), プロインスリン(○), IGF-I(■), あるいはMSA(△)の存在下で反応させた。

(2) クロスリンクによる受容体解析

[125 I]-IGF-Iを細胞膜IGF-I受容体と化学的にクロスリンクしSDS-PAGE(SDS-polyacrilamide electrophoresis)とオートラジオグラフィーで解析した。図5(lane A)に示すごとく、還元剤存在下では135Kに相当する部分にバンドが認められた。このバンドの強さは甲状腺細胞を [125 I]-IGF-Iと反応させる際に非標識IGF-Iを添加すると濃度に応じて減少した(lane B-D)。しかし低濃度のインスリンは影響を与えず、一方MSAは僅



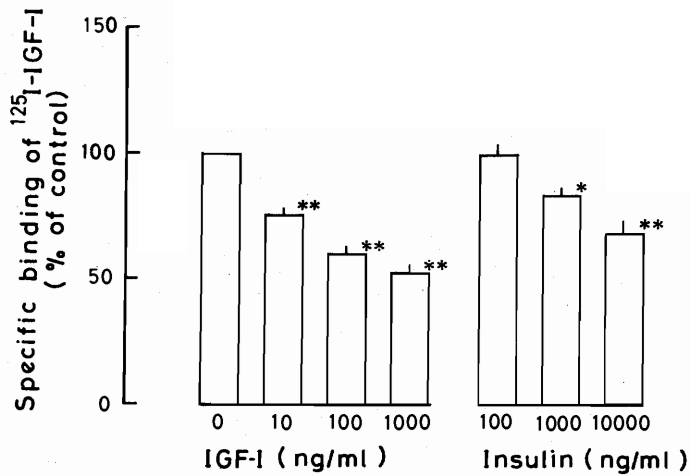
図(5) $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I をクロスリンクした甲状腺細胞のオートラジオグラム標識

IGF-I を非標識 IGF-I 非存在下 (レーン A), IGF-I 存在下 (B : 5 ng/ml : C 50 ng/ml : D : 500 ng/ml), インスリン存在下 (E : 10 ng/ml ; F : 100 ng/ml) あるいは MSA 存在下 (G : 100 ng/ml) で反応させ $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I をクロスリンクした。ついでこの膜分画を還元剤存在下で SDS-PAGE にかけて、オートラジオグラフィーを行なった。

かにバンドを減少させた (lane G)。いわゆるタイプ 2 の IGF 受容体に相当する 260K のバンドは見られなかった。なお還元剤非存在下で SDS-PAGE を行なった場合には $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I : 受容体複合体は分子量 $300,000$ 以上の大分子として泳動された。

(3) IGF-I 受容体の調節

単層培養した甲状腺細胞の培地を 1% IGF-I deficient serum を含む F-12 培地に変更し各種成長因子を添加して 24 時間培養したのち $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I 結合率の変化を観察した。図 6 に示すように IGF-I とプレインキュベーションした場合には結合率は濃度依存性に減少し、 10 , 100 , 1000 ng/ml の IGF-I



図(6) IGF-I 受容体の down-regulation

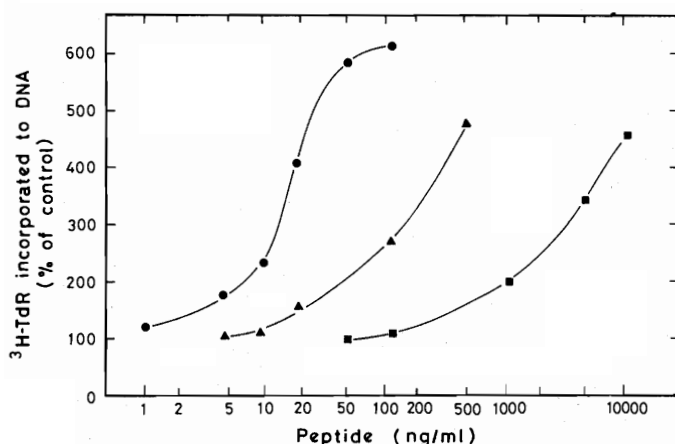
甲状腺細胞 (5×10^5 cells/dish) を図示した濃度の IGF-I, あるいはインスリンと24時間培養した。ついで $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I と 4°C , 18時間反応させて特異的結合の変化を観察した。図では対照細胞 (IGF-I, insulin を含まない培地で培養した細胞) における $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I 結合率を 100% として示した。カラムとバーはそれぞれ平均値と SD を示す ($N=3$)。

* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$

により結合率は対照のそれぞれ82, 57, 48%に低下した。インスリンも同様に結合率を低下させたがその力価は IGF-I の 100 倍以下であった。Scatchard plot による解析により IGF-I による結合率は細胞一個あたりの受容体数の減少によるものであり, 親和性の変化によるものではなかった。IGF-I による IGF-I 受容体の down-regulation は IGF-I との反応期間に影響され, 18-24時間後で最大の効果が認められた。PDGF (1-10 ng/ml), FGF (1-20 ng/ml), EGF (1-20 ng/ml), TSH (0.1-1.0 mU/ml) の存在下で甲状腺細胞を24時間培養した場合には $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I の結合率に変化は認められなかった。

(4) DNA合成

単層培養した甲状腺細胞のDNA合成に対するIGF-I, IGF-II, およびインスリンの効果を図7に示す。図のごとく1-100ng/mlのIGF-Iは濃度依存性

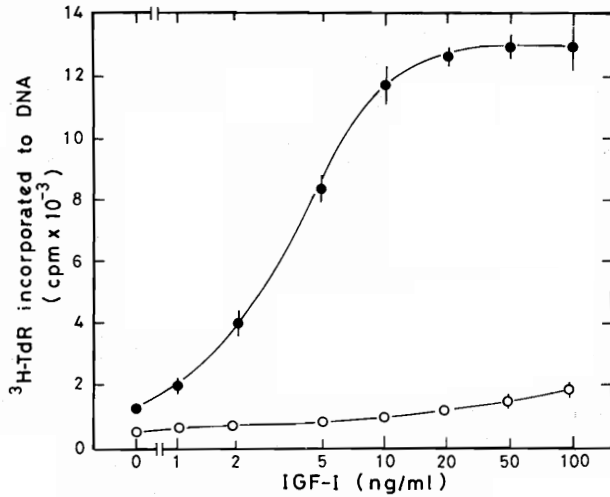


図(7) IGF-I, MSA及びインスリンによるDNA合成

0.5% ヒト血清 (IGF-I deficient serum) を含む Ham's F-12 培地で甲状腺細胞 (5×10^5 /dish) を24時間培養し次いで IGF-I (●), MSA (▲), あるいは insulin (■), を添加し DNA 合成を観察した。値は基礎値 (1200 cpm/ μ g DNA) に対する%で示した (mean value of 3 experiments)。

にDNA合成を促進した。通常最大刺激は25-50 ng/mlの濃度で得られ、基礎値の数倍の増加が観察された。IGF-II(MSA)やインスリンも同様な効果を示したが力価はそれぞれIGF-Iの5%, 0.4%にすぎなかった。既に報告されているごとくEGF(2 ng/ml)は単独で甲状腺細胞に対して強い増殖促進作用を示した。しかしながらEGFの存在はIGF-IのDNA合成促進作用を著明に増強することが判明した。すなわちIGF-I単独では最大刺激が基礎値の数倍にすぎなかったものが、EGFの存在下では20倍以上に達した(図8)。

PDGF, FGF, TSHは単独でもDNA合成に影響を与えず、またIGF-Iの作用も増強しなかった。



図(8) DNA合成に対する IGF-I と EGF の相乗作用

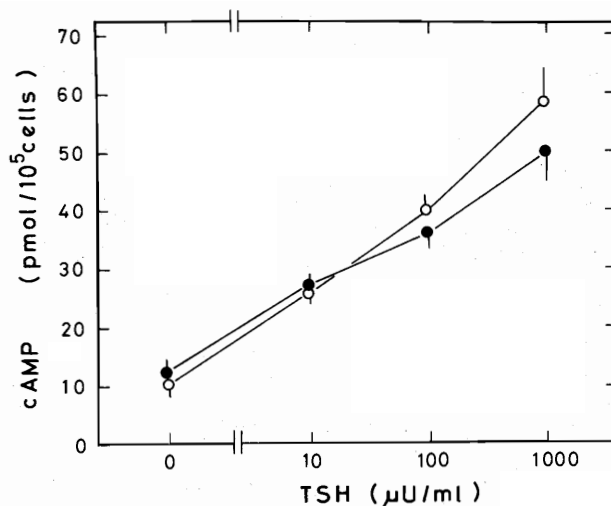
甲状腺細胞を図示した濃度の IGF-I と EGF (2 ng/ml) の存在下(●)あるいは非存在下(○)で培養し ^3H -thymidine (^3H -TdR) の DNA への取り込みを比較した。値は μg DNA あたりの ^3H -TdR カウントで示した。(mean \pm SD; N=3)

(5) 細胞増殖

IGF-I による DNA 合成促進が真に mitogenic activity を反映しているかを検討した。細胞を 1% IGF-I deficient serum を含む F-12 培地を用い、IGF-I 存在下、あるいは非存在下で 5 日間培養した。IGF-I それぞれ 2, 10, 50, 100 ng/ml の存在下で培養したのちの細胞数は対照のそれぞれ 115 ± 2 , 142 ± 5 , 160 ± 6 , 176 ± 6 % (mean \pm SD; N=4) であり IGF-I は実際に細胞増殖を促進した。

(6) サイクリック AMP 産生への効果

単層培養した甲状腺細胞を 50 ng/ml IGF-I と 24 時間培養し TSH によるサイクリック AMP 産生を観察した(図 9)。図のごとく IGF-I による前処置によって TSH による cAMP 産生は変化しなかった。



図(9) TSHによるcAMP産生に対するIGF-Iの効果

単層甲状腺細胞をIGF-I (50 ng/ml)の存在下(○)あるいは非存在下(●)で24時間培養した。培地を交換しTSHを添加してcAMP産生をみた。値はmean±SD (N=3)で示した。

【考案】

今回の成績によりブタ甲状腺細胞がIGF-I, インスリンに各々特異的な受容体が存在することが判明した。標識したIGF-I, insulinの細胞受容体に対する特異的結合は反応温度および反応時間に依存する過程であり, 4℃での結合率は37℃における結合率を常に上回った。この原因の一つは37℃においては標識リガンドの分解がおこるためと考えられた。ライソゾーム酵素阻害剤であるクロロキンは結合率を増加させるが, これはクロロキニンが内部化(internalization)された標識リガンドの分解を阻害するためであろう。細胞に結合した^[125 I]-IGF-Iの解離実験から明らかのように, 37℃では解離した物質の約50%がTCA可溶性の分解産物であった。

^[125 I]-IGF-Iの結合における特異性はいわゆるタイプ1のIGF受容体のそれに一致するものであった。^(12,13)すなわちIGF-Iに強い結合親和性をもち, また高濃度のIGF-IIやインスリンが弱い親和性で交差を示した。また^[125 I]

- IGF-I をクロスリンクした細胞膜の SDS-PAGE による解析では 135 K に相当するサブユニットが証明されこれもタイプ 1 IGF 受容体の性質に一致した。なお甲状腺細胞における IGF-I 受容体の特異性は他の細胞や組織, 例えは IM-9 細胞,⁽¹⁸⁾ ヒト線維芽細胞,⁽¹⁹⁾ ヒト胎盤膜,⁽²⁰⁾ 赤血球⁽²¹⁾ などの IGF-I 受容体の特異性と類似していた。ヒヨコ線維芽細胞,⁽²²⁾ ラット肝,⁽²³⁾ マウス筋原細胞⁽²⁴⁾ などは標識 IGF-I の結合は IGF-I, IGF-II によりほぼ同程度に抑制される。この差は IGF-I, II 受容体の相対的濃度の差によるものであろう。

甲状腺細胞における IGF-I 受容体は IM-9,^(18, 25) ヒト線維芽細胞,⁽¹⁹⁾ あるいはマウス筋細胞⁽²⁴⁾ の場合と同様に IGF-I 自体によって down-regulation される。この過程は反応期間に依存し最大の反応は 18-24 時間で得られた。したがって down-regulation は IGF-I 結合 (37°C における平衡状態は 1 時間以内に認められる) よりもはるかに遅延した反応である。IGF-I と同様にインスリンも IGF-I 受容体を down-regulate するが線維芽細胞での成績と同じ⁽²⁵⁾ その力価は低く, 高濃度のインスリンは IGF-I 受容体を介して作用すると考えられる。IGF-I による IGF-I 受容体の down-regulation の機序については不明な点が多い。ラット軟骨細胞においては受容体と結合した [¹²⁵I]-IGF-I は細胞内に取り込まれ (internalization) ると報告されている。⁽²⁶⁾ 甲状腺細胞において internalization の機構が存在するか否かについては明確ではない。しかしクロロキン存在下での [¹²⁵I]-IGF-I 結合が増加する事実は [¹²⁵I]-IGF-I : 受容体複合体が細胞内に取り込まれるという仮説と矛盾しない。これにより細胞膜の IGF-I 受容体が一過性に減少する可能性がある。

次に我々は IGF-I 受容体に対応した反応について検討した。この結果 IGF-I はラット甲状腺株細胞 FRTL-5⁽²⁷⁾ と同様にブタ甲状腺細胞に対して mitogen として作用することが判明した。IGF-II, インスリンも同様な効果を示したがその力価は弱く, IGF-I 受容体への結合親和性と平行しいずれのペプチドも IGF-I 受容体への結合を介してその作用を発揮することが示唆された。既に他種の甲状腺細胞で報告されているごとく, EGF はブタ甲状腺細胞の DNA 合成を促進したがその作用と IGF-I の作用の間には強い相乗作用が認められ

た。甲状腺細胞をEGF と培養しても IGF-I 受容体の数には変化はなく、また IGF-I の処理によってEGF 受容体にも変化がおきなかった。したがって両者の相乗作用は受容体以降の部位でおこるものと考えられる。IGF-I と EGF の相乗作用は他の細胞系でも報告されている^(28,29)。LeofらはBALB/c-3T3細胞でEGFは細胞周期G₁前半に必要であり、一方IGF-IはG₁後半に必要であることを報告しIGF-I, EGF両者が存在することにより細胞周期が回転してS期にいたることを報告している⁽²⁹⁾。これによれば両者の相乗作用の説明が可能であるがこれが甲状腺細胞に当てはまるか否かは今後の問題である。

以上のIGF, EGFのほか我々は他の成長因子についてもその効果を検討した。線維芽細胞や血管平滑筋細胞ではPDGFとIGF-IのDNA合成における相乗作用が報告されているが^(30,31)、今回の成績ではPDGFは効果を示さなかった。甲状腺細胞にはPDGF受容体が存在しないのかもしれない。またイヌ甲状腺細胞で報告されている⁽¹¹⁾のと異なり、FGFも細胞増殖効果を示さなかった。TSHの甲状腺細胞に対するDNA合成作用については幾つかの異なった成績があるが、我々の成績はFayet及びHovespianの成績⁽⁴⁾に一致してTSHは細胞増殖やDNA合成に対してはむしろ抑制的に作用した。Rogerらは高濃度のインスリン存在下ではTSHがイヌ甲状腺細胞のDNA合成を促進すると報告し⁽³⁾、またTraumontanoらはFRTL-5細胞ではTSHのDNA合成促進作用がIGF-Iによって増強されることを見出している⁽²⁷⁾。しかしブタ甲状腺細胞ではインスリンあるいはIGF-Iの存在下でもTSHのDNA合成を促進しなかった。最後に我々はIGF-IがTSHによる分化機能に影響を与えるか否かを検討した。結果の項で示した如く、IGF-Iによる処理はTSHによるcAMP産生に影響を与えなかった。ただし予備的検討によればIGF-IはTSHによるヨード取り込みを増強するようである(投稿中)。一般にはEGFやフォルボールエステルのように細胞増殖を促進する因子は分化機能に対して抑制的に作用するが、IGF-Iはこれと異なり細胞増殖、分化機能発現ともに促進すると思われる。以上我々はブタ甲状腺細胞にIGF-I受容体が存在し、これに対応してIGF-IがDNA合成を促進することを明らかにした。我々はヒト甲状腺細胞にも

IGF-I 受容体が存在することを見いだしている（投稿中）。この所見は血中 IGF-I 濃度の高い末端肥大症では高頻度に甲状腺腫が認められる事実と対応するものと考えられる。

【文 献】

1. Nitsch L, Wollman SH 1980 Thyrotropin preparations are mitogenic for thyroid epithelial cells in follicles in suspension culture. Proc Natl Acad Sci USA 77:2743
2. Ambesi-Impiombato FS, Parks LAM, Coon HG 1980 Culture of Hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. Proc Natl Acad Sci USA 77:3455
3. Roger PP, Servais P, Dumont JE 1983 Stimulation by thyrotropin and cyclic AMP of the proliferation of quiescent canine thyroid cells cultured in a defined medium containing insulin. FEBS Lett 157:323
4. Fayet G, Hovespian S 1979 Demonstration of growth in porcine thyroid cell culture. Biochimie 61:923
5. Nilson JH, Orlicky DJ, Kerkof PR 1980 *In vitro* effects of thyroid-stimulating hormone on total and polysomal ribonucleic acid synthesis in monolayer cultures of sheep thyroid cells. Endocrinology 107:262
6. Westermark B, Karlsson FA, Walinder O 1979 Thyrotropin is not a growth factor for human thyroid cells in culture. Proc Natl Acad Sci USA 76:2022
7. Westermark K, Westermark B 1982 Mitogenic effect of epidermal growth factor on sheep thyroid cells in culture. Exp Cell Res 138:47
8. Eggo MC, Bachrach LK, Fayet G, Erick J, Kudlow JE, Cohen MF, Burrow GN 1984 The effects of growth factors and serum on DNA synthesis and differentiation in thyroid cells in culture. Mol Cell Endocrinol-38:141
9. Westermark K, Karlsson FA, Westermark B 1983 Epidermal growth factor modulates thyroid growth and function in culture. Endocrinology 112:1680
10. Roger PP, Reuse S, Servais P, Van Helverswyn BW, Dumont JE 1986 Stimulation of cell proliferation and inhibition of differentiation expression by tumor-promoting phorbol esters in dog thyroid cells in primary culture. Cancer Res 46:898
11. Roger PP, Dumont JE 1984 Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cyclic AMP, and growth factors. Mol Cell Endocrinol 36:79

12. Kasuga M, Van Obberghen E, Nissley SP, Rechler MM 1981 Demonstration of two subtypes of insulin-like growth factor receptors by affinity crosslinking. *J Biol Chem* 256:5305
13. Massague J, Czech MP 1982 The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factor I and II and their relationships to the insulin receptors. *J Biol Chem* 257:5038
14. Niwa M, Sato S, Saito Y, Uchiyama F, Ono H, Yamashita Y, Kitaguchi T, Shiga Y, Notani J, Yamada H, Ishii Y, Ueda I, Takagi Y 1986 Chemical synthesis, cloning and expression of genes for human somatomedin C. *Ann NY Acad Sci* 469:31
15. Isozaki O, Tsushima T, Shizume K, Saji M, Ohba Y, Emoto N, Sato K, Sato Y, Kusakabe K 1985 Thyroid-stimulating antibody bioassay using porcine thyroid cells cultured in follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 61:1105
16. Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680
17. Morgan AR, Lee JS, Pulleyblank DEF, Murray NL, Evans DH 1979 Ethidium fluorescence assays. I. Physicochemical studies. *Nucleic Acids Res* 7:547
18. Rosenfeld RG, Hintz RL 1980 Characterization of a specific receptor for somatomedin C (SM-C) on cultured lymphocytes: evidence that SM-C modulates homologous receptor concentration. *Endocrinology* 107:1841
19. Rosenfeld RG, Dollar LA 1982 Characterization of the somatomedin C/insulin-like growth factor I (SM-C/IGF-I) receptor on cultured human fibroblast monolayer: regulation of receptor concentrations by SM-C/IGF-I and insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 55:434
20. Daughaday WH, Maritz IK, Trivedi B 1981 A preferential binding site for insulin-like growth factor II in human and rat placental membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 53:282
21. Hizuka N, Takano K, Tanaka I, Honda N, Tsushima T, Shizume K 1985 Characterization of insulin-like growth factor I receptor on human erythrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 61:1066
22. Rechler MM, Zapf J, Nissley SP, Froesch ER, Moses AC, Podskalny JM, Schilling EE, Humbel RE 1980 Interactions of insulin-like growth factors I and II and multiplication-stimulating activity with receptors and serum carrier proteins. *Endocrinology* 107:1451
23. Kasuga M, Van Obberghen E, Nissley SP, Rechler MM 1982 Structure of the insulin-like growth factor receptor in chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1864

24. De Vroede MA, Roumanus JA, Standaert ML, Pollet RJ, Nissley Sp, Rechler MM 1984 Interaction of insulin-like growth factors with a nonfusing mouse muscle cell line: binding, action, and receptor down-regulation. *Endocrinology* 114:1917
25. Rosenfeld RG, Hintz LR, Dollar LA 1982 Insulin-induced loss of insulin-like growth factor-I receptors on IM-9 lymphocytes. *Diabetes* 31:375
26. Schalch DS, Sessions CM, Farley AC, Masaka A, Emier CA, Dills DG 1986 Interaction of insulin-like growth factor I/somatomedin-C with cultured rat chondrocytes: receptor binding and internalization. *Endocrinology* 118:1590
27. Tramontano D, Cushing GW, Moses AC, Ingbar SH 1986 Insulin-like growth factor-I stimulates the growth of rat thyroid cells in culture and synergizes the stimulation of DNA synthesis induced by TSH and Graves'-IgG. *Endocrinology* 119:940
28. Balk SD, Morisi A, Gunther HS, Svoboda MF, Van Wyk JJ, Nissley SP, Scanes CG 1984 Somatomedins (insulin-like growth factors), but not growth hormone, are mitogenic for chicken heart mesenchymal cells and act synergistically with epidermal growth factor and brain fibroblast growth factor. *Life Sci* 35:335
29. Leof EB, Van Wyk JJ, O'Keefe EJ, Pledger WJ 1983 Epidermal growth factor (EGF) is required only during the traverse of early G₁ in PDGF stimulated density-arrested BALB/c-3T3 cells. *Exp Cell Res* 147:202
30. Clemmons DR, Van Wyk JJ 1981 Somatomedin-C and platelet derived growth factor stimulate human fibroblast replication. *J Cell Physiol* 106:361
31. Clemmons DR 1984 Interaction of circulating cell-derived and plasma growth factors in stimulating cultured smooth muscle replication. *J Cell Physiol* 121:425

II 培養甲状腺細胞の DNA 合成とヨード代謝に対する Transforming growth factor (TGF)- β の効果についての研究

【 緒 言 】

甲状腺組織の増殖や機能の調節において TSH が主要な調節因子であることはよく知られた事実である。しかし最近のインビトロの研究によって多数のペプチド性成長因子が甲状腺細胞の増殖や分化機能に対して影響を与えることが判明しつつある。EGF は甲状腺細胞の増殖刺激因子であるとともに TSH によるヨード代謝を強く抑制する⁽¹⁻⁴⁾。また我々あるいは Tramontano らはインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor; IGF) が甲状腺細胞の増殖因子のひとつであることを明らかにした^(5,6)。

Transforming growth factor (TGF) は正常細胞に可逆的に作用して腫瘍細胞の表現型を与える成長因子である⁽⁷⁾。一般的には正常細胞 (NRK 49F 細胞など) の軟寒天培地におけるコロニー形成, すなわち anchorage-independent growth を指標としてその活性が測定される。現在のところ少なくとも 2 種類の TGF が知られている。TGF- α はその構造が epidermal growth factor (EGF) と類似しておりその作用も EGF 受容体との結合によって惹起される。従ってその作用は EGF と本質的に同一である。一方 TGF- β は 12,500 のサブユニットからなるホモダイマーでその構造は TGF- α とは全く異なり, 独自の受容体を有する⁽⁸⁾。TGF- β は TGF- α (あるいは EGF) と共同して NRK 細胞の軟寒天培地でのコロニー形成を促進する物質として発見された。しかし最近の研究により TGF- β はある種の腫瘍細胞や上皮系細胞の細胞の増殖に対しては抑制作用を示すこと, 種々の細胞の機能に対して多様な作用を示すことが明らかにされた^(10,11)。最近我々は甲状腺組織抽出物中に TGF 活性の存在することを見いだした。そこで甲状腺細胞の増殖とヨード代謝に対する TGF- β の効果を検討した。

【方法】

(1) 材料

ヒト TGF- β は米国 National Cancer Institute (Bethesda, MD) の Dr. M. B. Sporn より提供された。また recombinant IGF-I⁽¹²⁾ は藤沢製薬研究所の丹羽博士より提供された。マウス EGF は Collaborative Research (San Francisco, CA) より購入した。

(2) 細胞培養

新鮮な甲状腺組織を前論文⁽¹³⁾に記載した方法で処理し、得られた遊離細胞及び濾胞断片を 5% 胎児ウシ血清 (Filtron PTY, Ltd., Victoria, Australia) を含む F-12 培地に懸濁した。細胞数は $2 \times 10^5 / ml$ に調整しその 0.5ml を multiwell ($3.8cm^2$ well; Costar, Cambridge, MA) に播き 5% CO₂ in air, 37°C で培養した。24 時間以内に細胞は培養皿底面に接着し単層を形成した。その後実験目的により培地を 0.5% 胎児ウシ血清 (FCS) あるいは 0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む F-12 に変更した。

(3) DNA, RNA 合成実験

甲状腺細胞を 0.1% BSA を含む F-12 培地でまず 48 時間培養した。ついで培地に各種の成長因子を添加し更に 72 時間培養した。最後の 48 時間に $0.5 \mu Ci / ml$ の [³H]-thymidine ($20.0 Ci / mmol$; New England Nuclear, Boston, MA) でパルスした。培養終了後、上清を除去し細胞を 10% TCA で処理した。DNA 合成は [³H]-Thymidine の TCA 不溶分画への取り込みの程度を指標として測定した。甲状腺細胞の DNA 合成は Morgan らの方法⁽¹⁴⁾で測定した。RNA 合成速度の測定には [³H]-Thymidine に替えて $0.1 \mu Ci / ml$ の [³H]-uridine ($30.0 Ci / mmol$) を用い、またパルス時間は 6 時間とした。細胞数は細胞をトリプシン処理したのち Coulter counter (Coulter Electronics, Hialeah, FL) で測定した。

(4) Autoradiography

甲状腺細胞約 10^4 個を Lab Tek 2 chamber (Miles Scientific, Naperville, IL) にまき, 5% FCS を含む F-12 培地で24時間培養した。培地を 0.5% FCS を含む F-12 に変更し更に48時間培養した。次に各種成長因子及び $1 \mu\text{Ci/ml}$ の $[^3\text{H}]\text{-thymidine}$ を添加し一定時間培養した。培養終了後, 細胞を PBS で洗浄しカルノア試薬 (メタノール, クロロフォルム, 酢酸 6:3:1) で固定した。スライドを nuclear emulsion (NRM-2; Konishiroku Co., Tokyo) に浸し乾燥後にオートラジオグラムを作成した。この際 Kodak D19 及び Kodak Rapid Fix (Eastman-Kodak, Rochester, NY)。更にスライドを洗浄し, ヘマトキシリンエオシンで染色した。 $[^3\text{H}]\text{-thymidine}$ で標識された細胞核の割合 (%) を顕微鏡下で測定した。スライドあたり最低 1000 個の細胞を算定した。

(5) ヨード取り込みと有機化

甲状腺細胞 (1×10^5 cell/well) を 0.5% FCS, ウシ TSH (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO) あるいは forskolin, 8-bromo-cAMP を含む F-12 培地で TGF- β 存在下, 非存在下で 3 日間培養した。培地を新鮮な 0.1% BSA を含む F-12 培地に変更し次いで $0.2 \mu\text{Ci/ml}$ の $\text{Na } [^{125}\text{I}]$ と 2 時間インキュベートした。培地を除去し細胞を氷冷した Hank's 液で洗浄したあと 0.1 N NaOH で可溶化し, その一部をとり放射能を測定した。有機化ヨードの測定に際しては 0.1 N NaOH で可溶化した溶液を 10% TCA で処理し沈渣の放射能を測定した。

(6) サイクリック AMP 産生

甲状腺細胞を TGF- β の存在下, 非存在下で 0.5% FCS を含む F-12 培地で 72 時間培養した。細胞を種々の濃度の TSH, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine を含む $300 \mu\text{l}$ の modified Hank's solution⁽¹⁵⁾ に移し 37°C で 2 時間培養した。細胞と培地を共に $700 \mu\text{l}$ の氷冷 10% TCA で処理した。TCA を除去したのち上清の cAMP を RIA キット (New England Nuclear, Boston, MA) を用いて測定した。

(7) 結合実験

^{125}I -IGF-Iと単層甲状腺細胞との結合実験は前述の方法⁽⁶⁾で行なった。すなわち培養細胞をHank's液で洗浄したあと1mlのHEPES binding buffer(100 mM HEPES, 50 mM Tris, 10 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA, 10 mM glucose, 10 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 0.1% BSA)を加え, ^{125}I -IGF-Iと18時間, 4℃でインキュベートした。反応終了後, 未結合 ^{125}I -IGF-Iを除去し, 細胞を氷冷したPBS(phosphate-buffered saline)で洗浄した。ついで細胞を1 N NaOHで溶解し, その一部の放射能をガンマカウンターで測定した。 ^{125}I -EGFとの結合実験も同様に施行した。IGF-I, EGFともクロラミンT法でヨード化しその比活性はそれぞれ200, 150 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 程度であった。

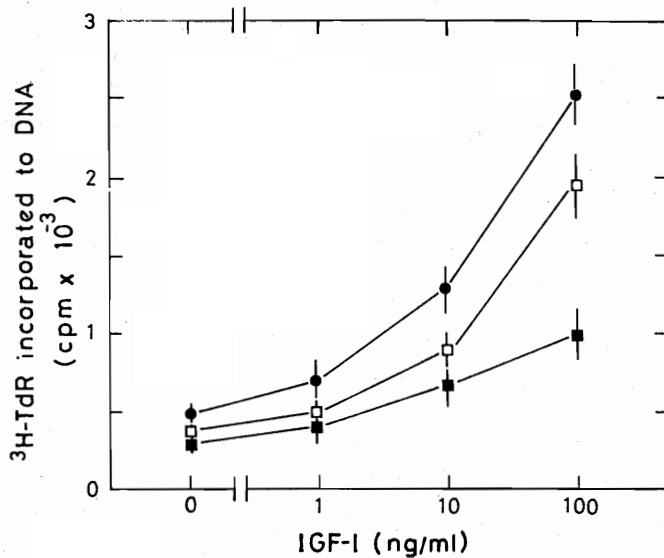
(8) 統計処理

グループ間の有意差の検定にはStudent t testを用い, P値が0.05以下の場合には有意差ありとした。

【結果】

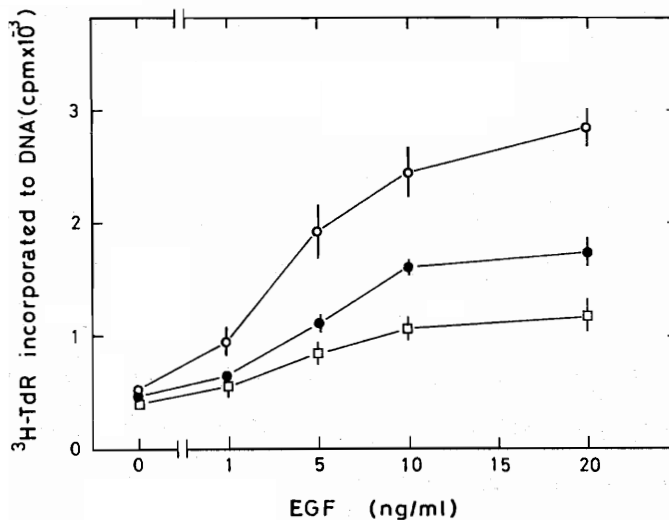
(1) DNA合成と細胞増殖に対するTGF- β の作用

既に我々が報告した如く⁽⁶⁾IGF-Iは培養ブタ甲状腺細胞のDNA合成を促進するが, この系にTGF- β を添加した場合にはDNA合成は有意($p < 0.01$)に抑制された(図1)。TGF- β の作用は濃度依存性で100 ng/ml IGF-IによるDNA合成は500 pg/ml及び5 ng/mlのTGF- β によってそれぞれ 70 ± 8 , 42 ± 8 %に抑制された(mean \pm SD; N=4)。図2はTGF- β がEGFによるDNA合成をも抑制することを示したものである。5 ng/mlのTGF- β は5 ng/ml EGFによるDNA合成を約85%抑制した。TGF- β によるDNA合成抑制はTGF- β による非特異的なcytotoxic effectによるものとは考え難い。まず, TGF- β とともに4日間培養した細胞のviabilityはトリパンプルー法でみる限り変化しなかった。第2に, TGF- β による抑制作用は可逆的であった。更にRNA合成はTGF- β の処理により変化しなかった。すなわち500 pg/ml TGF- β と3日



図(1) IGF-IのDNA合成促進作用に対するTGF-βの効果

単層甲状腺細胞 (10^5 cell/dish) を 0.1% BSA を含む F-12 培地で 48 時間培養したあと TGF-β 非存在下 (●), あるいは TGF-β 500 pg/ml (□), 5 ng/ml (■) の存在下で IGF-I と 3 日間培養して [3 H]-thymidine ([3 H]-TdR) の DNA への取り込みをみた。値 (mean ± SD; N=3) は μ g DNA あたりの [3 H]-TdR のカウントで示した。



図(2) EGFのDNA合成促進作用に対するTGF-βの効果

甲状腺細胞を EGF 単独 (○), EGF + 500 pg/ml TGF-β (●) あるいは EGF + 5 ng/ml TGF-β (□) の条件で培養し DNA 合成を見た。他は図(1)に同じ。

間培養した細胞 $[^3\text{H}]$ -uridine 取り込みは $23,500 \pm 690$ cpm/ 10^5 cell であるのに対し, 対照細胞での取り込みは $23,000 \pm 1020$ cpm で両者に有意差は認められなかった。

オートラジオグラフによる成績も $[^3\text{H}]$ -thymidine 取り込みによる DNA 合成実験の成績と一致するものであった(表1)。表に示す如く, IGF-I 単独

表(1) IGF-I による DNA 合成促進 (labeling index) に対する TGF- β の作用

	培 養 日 数			
	1	2	3	5
対照	4.9 ± 0.2	7.2 ± 0.1	13.6 ± 2.0	24.3 ± 2.3
IGF-I	22.5 ± 2.9	40.5 ± 5.0	52.3 ± 4.6	65.0 ± 2.0
IGF-I+TGF- β	$16.5 \pm 1.3^*$	$27.5 \pm 5.2^*$	$32.9 \pm 2.0^*$	60.0 ± 5.0 NS

甲状腺細胞を IGF-I (100 ng/ml) 単独あるいは IGF-I + TGF- β (500 pg/ml) を含む F-12 培地 ($[^3\text{H}]$ -thymidine を含む) で 5 日まで Lab-Tek chamber で培養し, オートラジオグラフィを行なった。値 (mean \pm SD; N=3) は標識された核の % である。

* : IGF-I 単独処理の場合と比較して有意 ($p < 0.01$) に低値;

NS : 有意差なし ($p > 0.05$)

で 3 日間処理した細胞における標識核のパーセントは TGF- β を添加することにより有意に ($p < 0.01$) 低下した。しかしながら培養期間を 5 日まで延長した場合には両者の差は認められなかった。別の実験で 100 ng/ml IGF-I と TGF- β 500 pg/ml とともに 3 日間培養した細胞の数は $59,000 \pm 2,300$ であるに対し, IGF-I 単独での処理の場合には $72,000 \pm 1,400$ と有意に低下していたが, 培養 6 日目には 2 者間で差が認められなかった ($86,000 \pm 2,200$ vs $85,000 \pm 3,300$)。これらの成績は TGF- β は甲状腺細胞の prereplicative period を延長させることを示唆する。

(2) 結合実験

TGF- β が甲状腺細胞の DNA 合成を抑制する機序を解明するために TGF- β が IGF-I, EGF 受容体におよぼす効果について検討した。細胞を 3 日間 TGF- β (500 pg/ml) と培養したのちの [125 I]-IGF-I 結合率は $22.3 \pm 2.4\%$ per 10^6 cells (mean \pm SD; N=3) であり, 対照細胞の $21 \pm 2.3\%$ と差が認められなかった。Scatchard plot による解析によっても IGF-I 受容体の親和性や細胞あたりの受容体数は TGF- β によって変化しなかった。線維芽細胞では TGF- β が EGF 受容体の数を変化させることが知られている。しかし甲状腺細胞においては TGF- β 処理細胞での [125 I]-EGF 結合率 ($6.5 \pm 1.2\%$ per 10^6 cells (mean \pm SD; N=3)) と差がなかった。

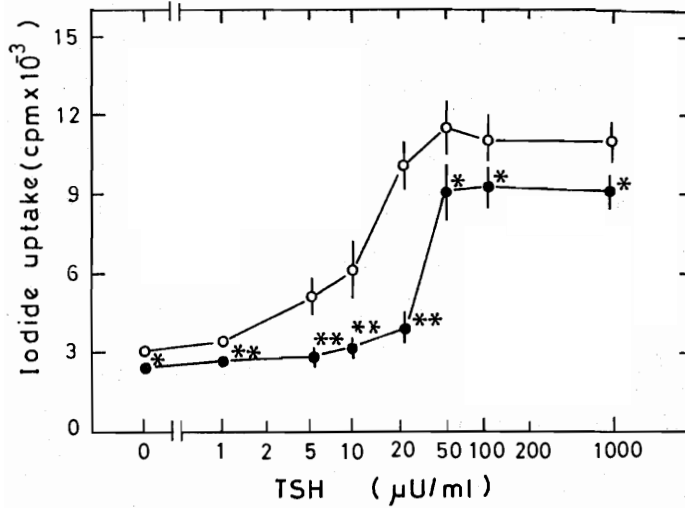
(3) ヨード代謝に対する効果

甲状腺細胞を TSH の存在下で培養すると細胞は濾胞様の立体構造を有する構造に再構築され, TSH の濃度に応じてヨードを取り込みこれを有機化する⁽¹⁸⁾。濾胞様構造の構築は TSH との培養開始後 24 時間で既に最大となり 7 日以上維持される。図 3 は TSH によるヨード取り込みが同時に添加した TGF- β (500 pg/ml) によって有意に抑制されることを示したものである。図に示す如く, TGF- β の抑制効果は高濃度の TSH によって阻害されるが完全には解除出来ない。TGF- β は同時にヨード有機化をも濃度依存性に抑制した。その効果は 50 pg/ml の濃度で明らかに認められ, 1 ng/ml ではヨード取り込みとその有機化は完全に抑制される (図 4)。50% 抑制は通常 100-200 pg/ml の濃度で認められた。TGF- β のヨード代謝に対する抑制効果は甲状腺細胞との接触時間によって影響された (図 5)。図の如く甲状腺細胞と僅か 6 時間培養するだけでヨード代謝は有意に抑制され 48 時間で最大に抑制される。

(4) サイクリック AMP 反応

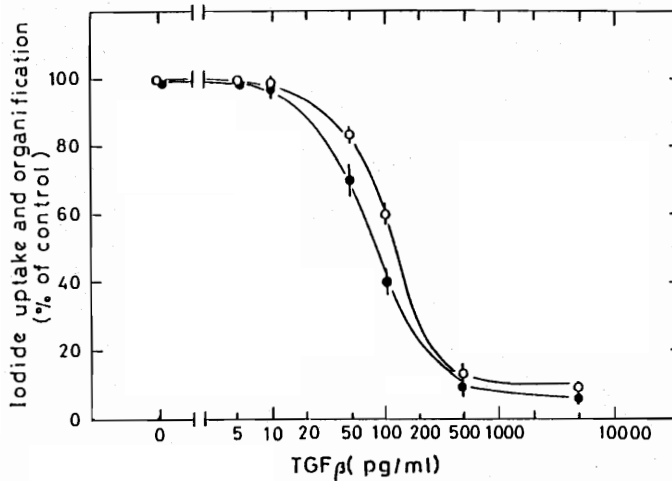
TSH によってヨード取り込み, あるいはヨード有機化が cAMP 産生を介するものであることはよく知られた事実である。^(19,20) そこで次に TGF- β によるヨ-

ド代謝抑制に cAMP が関与しているか否かについて検討した。



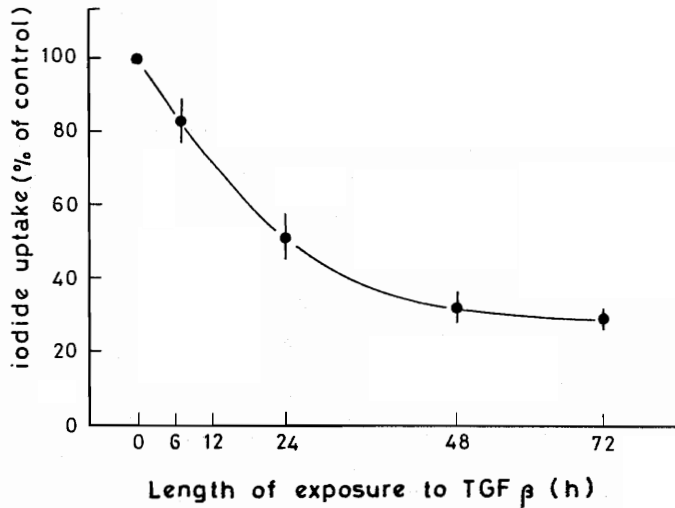
図(3) TSH によるヨード取り込みに対する TGF- β の抑制作用

甲状腺細胞 (10^6 /dish) を 5% FCS を含む F-12 培地ですみ 48 時間培養した。次いで培地を 0.5% FCS 及び TSH を含む培地に変更し TGF- β 存在下(●)あるいは非存在下(○)で 3 日間培養し Na [125 I] 取り込みを見た。値は mean \pm SD (N=3) で示した。(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ で TGF- β 処理群と非処理群で有意差あり)。



図(4) ヨード代謝に対する TGF- β の濃度依存性抑制効果

甲状腺細胞を $50 \mu\text{U/ml}$ の TSH と各種濃度の TGF- β 存在下及び非存在下で 3 日間培養しヨード取り込み(○)とヨード有機化(●)をみた (mean \pm SD; N=3)。



図(5)ヨード代謝に対する TGF- β の抑制効果(反応時間の影響)

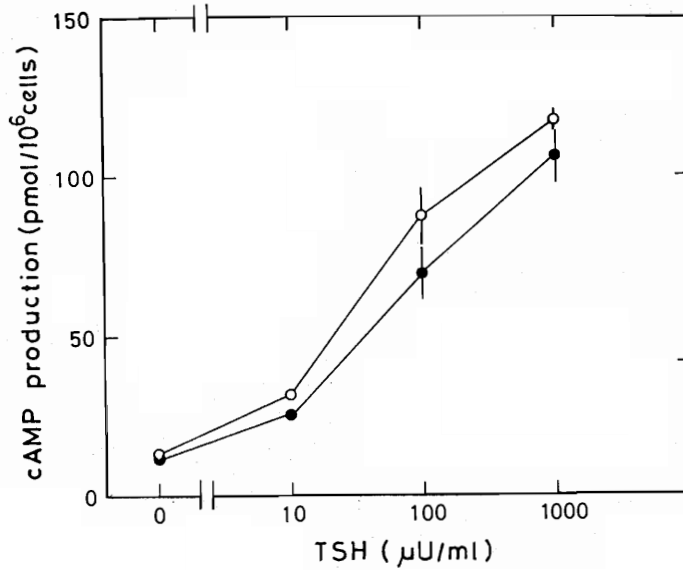
甲状腺細胞を $50 \mu\text{U/ml}$ TSHと共に3日間培養しヨード取り込みをみた。ヨード取り込み実験に先立つ6-48時間(横軸)の間 TGF- β 500 pg/ml と接触させた。値は TGF- β を添加しない(TSHのみ)場合を100%とし mean \pm SD (N=3)で示した。

まず甲状腺細胞を 500 pg/ml の TGF- β 存在下で3日間培養し, TSH に対する cAMP 反応を観察した(図6)。その結果 TGF- β は TSH による急性刺激に影響を与えないことが判明した。次に TSH $50 \mu\text{U/ml}$ 単独, あるいは TSH + TGF- β 500 pg/ml とともに甲状腺細胞を3日間培養し, 細胞内及び培地中の cAMP を測定した。表2に示す如く, この場合にも TGF- β は cAMP 産生に影響を与えなかった。

(5) フォルスコリンの影響

最後に forskolin 及び 8-Bromo-cAMP によるヨード代謝促進に対する TGF- β の効果を検討した(図7)。これらの薬剤は TSH と同様に甲状腺細胞の濾胞形成, ヨード代謝を促進する(データ省略)。図に示す如く TGF- β は forskolin ($0.5 \mu\text{g/ml}$), 8-Bromo-cAMP (1 mg/ml) いずれによるヨード代謝も濃度依存性に抑制することが判明した。その用量反応曲線は TSH 作用抑制の場合

と極めて類似していた。



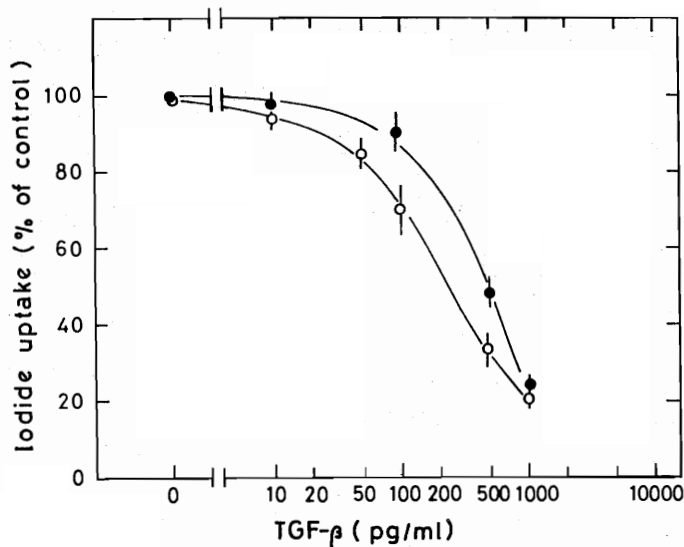
図(6) TSHによるcAMP産生に対するTGF- β の効果

甲状腺細胞を500 pg/ml TGF- β の非存在下(○)あるいは存在下(●)で0.5% FCSを含むF-12培地で3日間培養した。培地をHBSSに変更しTSHを添加してcAMP産生量を測定した(mean \pm SD)。

表(2) TSHによるcAMP産生に対するTGF- β の効果

処 理	培養時間	細胞内 cAMP (pmol / μ g DNA)	細胞外 cAMP (pmol / μ g DNA)
TSH	24h	1.01 \pm 0.07	0.88 \pm 0.013
TSH+TGF- β	24h	1.26 \pm 0.15	0.76 \pm 0.130
TSH	48h	1.68 \pm 0.07	2.56 \pm 0.005
TSH+TGF- β	48h	1.43 \pm 0.18	2.61 \pm 0.180

甲状腺細胞を50 μ U/mlのTSHとTGF- β 存在下あるいは非存在下で24及び72時間培養し、細胞内及び細胞外(培地)のcAMPを測定した。結果はmean \pm SD(N=3)で示した。TSH処理群とTSH+TGF- β 処理群の値には有意差は認められなかった。



図(7) Forskolin 及び 8-bromo-cAMP のヨード代謝促進に対する TGF- β の作用

甲状腺細胞を $0.5 \mu\text{g/ml}$ の forskolin (○), あるいは 1 mM の 8-bromo-cAMP (●) と共に種々の濃度の TGF- β の存在下で 3 日間培養し, ヨード取り込みに対する TGF- β の効果を観察した。値 (mean \pm SD; N=3) は TGF- β 非存在下でのヨード取り込みを 100% として表現した。

【考 察】

TGF- β が多数の上皮系細胞の増殖を抑制することが明らかにされている。その作用の特徴のひとつとして他の成長因子の増殖促進作用を抑制することが挙げられよう。たとえば TGF- β はラット胎児線維芽細胞に対する PDGF (platelet-derived growth factor) の作用⁽²¹⁾, 血管内皮細胞に対する FGF の作用⁽²²⁾, ラット肝細胞に対する EGF の作用⁽²³⁾ を抑制する。今回我々は TGF- β が IGF-I や EGF による甲状腺細胞増殖を抑制することを明らかにした。TGF- β による処理により甲状腺細胞の IGF-I, あるいは EGF 受容体の親和性や細胞あたりの数は変化せず, 従って TGF- β の抑制効果は IGF-I や EGF の受容体以降に作用する結果と思われる。TGF- β は細胞膜の Na influx に関与することが報告されている⁽²⁴⁾。この結果細胞増殖を抑制する可能性もあるが現在のところ作用機

序や作用部位は不明である。TGF- β 受容体自体はチロシンキナーゼ活性をもっていない。⁽²⁵⁾ いずれにせよ TGF- β は多数の成長因子による細胞増殖、DNA合成を抑制することから細胞増殖に至る受容体以降の機構に作用するものであろう。細胞増殖に対する作用以外に TGF- β が各種の細胞機能に影響を与えることが明らかにされている。⁽¹¹⁾ 例えば、TGF- β は卵巣における FSH の LH 受容体誘導作用やステロイド産生を増強する。^(26,27) 一方 ACTH による副腎ステロイド産生に対しては抑制的に作用する。⁽²⁸⁾ 今回の実験では TGF- β が TSH によるヨード代謝を強く抑制することが明らかとなった。この作用は極めて強力で 2 pM の低濃度でもその作用が観察される。従来から甲状腺細胞の培養系に血清を添加するとヨード代謝が抑制されることが知られている。⁽³⁾ Masui⁽²⁹⁾ らによればウシ血清中の TGF- β 濃度は 5 ng/ml に達するという。従って通常培養に使用する 10% の血清濃度でもヨード代謝を強く抑制することが予想される。EGF によるヨード代謝抑制⁽¹⁻⁴⁾ も既によく知られた事実である。ただし TGF- β と異なり EGF は甲状腺細胞の増殖を強く刺激する。我々は IGF-I は細胞増殖を促進するがヨード代謝を抑制しないことを報告している。⁽⁶⁾ これらの事実を考えると成長因子の細胞増殖作用と分化機能発現に対する作用は必ずしも関連したものではなさそうである。

TSH によるヨード代謝促進作用は主として cAMP 産生を介するものである。⁽¹⁹⁾ しかし TSH による cAMP 産生に対して TGF- β は影響を与えなかった。したがって TGF- β のヨード代謝抑制作用を cAMP 産生の減少を介するものではない。報告されている他の細胞系においても TGF- β の作用における cAMP の関与は少ない。Igotz 及び Massague によれば⁽³⁰⁾ 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化に対して TGF- β は抑制作用を示すが、この際細胞内 cAMP 濃度に変化は認められない。また TGF- β は FSH による卵巣の刺激⁽²⁷⁾、あるいは ACTH による副腎刺激における cAMP 産生にも影響を与えない。⁽²⁸⁾ 従って TGF- β の抑制効果は cAMP 産生以降の機構に作用するためと思われる。実際に甲状腺細胞では adenylate cyclase stimulator である forskolin、あるいは 8-bromo-cAMP によるヨード代謝が TGF- β によって抑制された。しかしその最終的な作用機序はなお

不明である。Ignatz 及び Massaue⁽³¹⁾ は TGF- β が各種の細胞系において fibronectin や collagen の合成を促進しかつこれらのマトリックスへの取り込みを促進することを報告し、TGF- β の作用がこれらの物質を介して発現することを示唆した。しかしながら我々の予備検討によれば培養甲状腺細胞の培地に fibronectin や collagen を添加しても TSH によるヨード代謝には影響が認められなかった。現在のところ甲状腺細胞における TGF- β の生理的意義も不明である。我々は甲状腺組織の酸アルコール抽出液中に TGF 活性を認めているがその産生細胞の種類や分布は決定されていない。しかし極めて低濃度で甲状腺細胞の機能に影響を与えることから、TGF- β が autocrine あるいは paracrine factor として甲状腺細胞の増殖や機能の調節因子である可能性がある。

【文 献】

1. Roger PP, Dumont JE 1982 Epidermal growth factor controls the proliferation and the expression of differentiation of canine thyroid cells in primary culture. *FEBS Lett* 144:209
2. Westermark K, Karlsson FA, Westermark B 1983 Epidermal growth factor modulates thyroid growth and function in culture. *Endocrinology* 112:1680
3. Eggo MC, Bacharach LK, Fayet G, Errick J, Kudlow JE, Cohen MF, Burrow GN 1984 The effects of growth factors and serum on DNA synthesis and differentiation in thyroid cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 38:141
4. Bacharach LK, Eggo MC, Mak WW, Burrow GN 1985 Phorbol esters stimulates growth and inhibits differentiation in cultured thyroid cells. *Endocrinology* 116:1603
5. Toramontano D, Cushing GW, Moses AC, Ingbar SH 1986 Insulin-like growth factor-I stimulates the growth of rat thyroid cells in culture and synergizes the stimulation of DNA synthesis induced by TSH and Graves'-igG. *Endocrinology* 119:940
6. Saji M, Tsushima T, Isozaki O, Murakami H, Ohba Y, Sato K, Shizume K 1987 Interaction of insulin-like growth factor I with porcine thyroid cells cultured in monolayer. *Endocrinology* 121:749
7. Roberts AB, Frolik CA, Anzano MA, Sporn MA 1983 Transforming growth factors from neoplastic and non-neoplastic tissues. *Fed Proc* 42:2621
8. Derynck R, Jarret JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoican RK, Roberts AB, Sporn MB 1985 Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316:701

9. Massague J, Like B 1985 Cellular receptors for the type beta transforming growth factor. *J. Biol Chem* 260:2636
10. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB 1985 Type β transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:119
11. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK 1986 Transforming growth factor- β biological function and chemical structure. *Science* 233:532
12. Niwa M, Sato S, Saito Y, Uchiyama F, Ono H, Yamashita Y, Kitaguchi T, Shiga Y, Notani J, Yamada H, Ishii Y, Ueda I, Tagagi Y 1986 Chemical synthesis, cloning and expression of genes for human somatomedin C. *Ann NY Acad Sci* 469:31
13. Isozaki O, Tsushima T, Shizume K, Saji M, Emoto N, Sato K, Sato Y, Kusakabe K 1985 Thyroid stimulating antibody bioassay using porcine thyroid cells cultured in follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 61:1105
14. Morgan AR, Lee JS, Pulleyblank DEF, Murray NL, Evans DH 1979 Ethidium fluorescence assays. I. Physiocochemical studies. *Nucleic Acids Res* 7: 547
15. Kasagi K, Konishi J, Iida Y, Ikekubo K, Mori T, Kuma K, Torizuka K 1982 A new *in vitro* assay for human thyroid stimulator using cultured thyroid cells: effect of sodium chloride on adenosine 3',5'-monophosphate increase. *J Clin Endocrinol Metab* 54:108
16. Massague J 1985 Transforming growth factor- β modulates the high affinity receptors for epidermal growth factor and transforming growth factor- α . *J Cell Biol* 100:1508
17. Assoian RK, Frolik CA, Roberts AM, Miller DM, Sporn MB 1984 Transforming growth factor- β controls receptor levels for epidermal growth factor in NRK fibroblasts. *Cell* 36:35
18. Mak WW, Errick JE, Chan RC, Eggo MC, Burrow GN 1986 Thyrotropin-induced formation of functional follicles in primary cultures of ovine thyroid cells. *Exp Cell Res* 164:311
19. Roger PP, Dumont JE 1984 Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cyclic AMP and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 36:387
20. Takasu N, Sato A, Yamada T, Shimizu Y 1982 Refractoriness of TSH- and PGE-stimulated iodine metabolism in cultured porcine thyroid cells, evidence for refractoriness at the level of cAMP action. *Acta Endocrinol (Copenh)* 99:530
21. Anzano MA, Roberts AB, Sporn MB 1986 Anchorage-independent growth of primary rat embryo cells is induced by platelet-derived growth factor and inhibited by type-beta transforming growth factor. *J Cell Physiol* 126:312

22. Frator-Schroder M, Muller G, Bircheier W, Bohlen P 1986 Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 137:295
23. Barr BI, Hayashi I, Branum EL, Moses HL 1986 Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type β transforming growth factor. *Cancer Res* 46:2330
24. Fine LG, Holley RW, Nasri H, Badie-Dezfooly B 1985 BSC-1 growth inhibitor transforms a mitogenic stimulus into a hypertrophic stimulus for renal proximal tubular cells: relationship to Na/H antiport activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6163
25. Fanger BO, Wakefield LM, Sporn MB 1986 Structure and properties of the cellular receptor for transforming growth factor type β . *Biochemistry* 25:3083
26. Adashi EY, Resnick CE 1986 Antagonistic interaction of transforming growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 119:1879
27. Dodson WC, Schomberg DW 1987 The effect of transforming growth factor- β on follicle stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 120:512
28. Hotta M, Baird A 1986 Differential effects of transforming growth factor type β on the growth and function of adrenocortical cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7795
29. Masui RA, Wakefield LM, Lechner JF, LaVeck MA, Sporn MB, Harris CC 1986 Type beta transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor for normal human bronchial epithelial cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2438
30. Igotz RA, Massague J 1985 Type β transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8530
31. Igotz RA, Massague J 1986 Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:4337