



KR9700235

KAERI/RR-1654/96

사람 갑상선자극호르몬-황체호르몬
수용체 키메라 수용체를 이용한 갑상선
자극 차단 항체의 측정

Assay of Thyrotropin Receptor Antibodies with
TSH/LH-CG Chimeric Receptor Expressed on
Chinese Hamster Ovary Cells

研究機關

原子力病院

韓國原子力研究所

29-01

dc

KAERI/RR-1654/96

사람 갑상선자극호르몬-황체호르몬
수용체 키메라 수용체를 이용한 갑상선
자극 차단 항체의 측정

Assay of Thyrotropin Receptor Antibodies with
TSH/LH-CG Chimeric Receptor Expressed on
Chinese Hamster Ovary Cells

研究機關

原子力病院

韓國原子力研究所

제 출 문

소장 귀하

본 보고서를 “ 사람 갑상선자극호르몬-황체호르몬 수용체 키메라 수용체를 이용한 갑상선 자극 차단 항체의 측정 ” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1996년 12월 31일

연구실명 : 내 과

연구책임자 : 이가희

연구원 : 김창민

감수위원 : 류성열

요 약 문

I. 제 목 : 사람 갑상선자극호르몬-황체호르몬 수용체 키메라 수용체를 이용한 갑상선 자극 차단 항체의 측정

II. 연구의 목적 및 중요성

갑상선기능항진증 및 미만성 갑상선종을 특징으로 하는 그레이브스병 환자의 혈청내에는 갑상선세포의 TSH 수용체에 대한 자가항체가 존재함이 알려져 있는데 이 자가항체는 방사성 동위원소로 표지된 TSH의 TSH수용체에 대한 결합을 억제하고, 배양된 갑상선세포에 작용하여 cAMP를 증가시키므로 그레이브스병의 원인 물질일 것으로 생각되고 있다. 이러한 TSH 수용체 항체는 모든 환자에 있어 같은 성질을 가지는 동일한 항체가 아니라 환자에 따라 작용이 다양한 항체가 존재하는 것으로 생각되고 있다. 즉 어떤 항체는 TSH 수용체에 결합 후 갑상선세포를 자극하는 기능을 나타내는 반면에 TSH 수용체에 결합 후 아무런 기능을 나타내지 않는 항체도 있고 심지어 갑상선세포에 결합 후 갑상선세포의 기능을 차단하는 차단형 항체도 있음이 밝혀져 있다. 이런 이유로 어느 항체의 기능이 우세하게 나타나느냐에 따라 한 환자에서 갑상선기능항진증과 갑상선기능저하증이 번갈아가며 나타나는 예가 있음이 보고되어 있다. 그러나 이러한 사실이 증명된 바는 없고 단지 추론될 뿐인데 그 이유는 현재의 기술로는 자극형 항체 또는 차단형 항체를 분리하여 측정할 방법이 없기 때문이다. 즉 현재의 측정기술로는 두가지 항체

의 기능의 합(sum)의 측정만이 가능하다. 최근 사람의 TSH수용체의 유전자 구조가 밝혀짐에 따라 각기 다른 기능을 가진 항체가 결합하는 부위에 대해 많은 연구자들이 관심을 가지고 연구를 진행한 바 자극형 TSH 수용체 항체는 TSH 수용체 세포의 부위의 N-terminal 부위에 주로 결합하고 차단형 항체는 C-terminal 부위에 결합함이 알려졌다. 또한 이렇게 TSH 수용체 항체들이 결합하는 부위는 TSH 수용체와 유사한 구조를 갖는 LH/CG 수용체에는 존재하지 않고 TSH 수용체에만 특이하게 존재하는 부위로 밝혀졌다. 이러한 사실을 이용하여 연구자는 자극형 또는 차단형 항체가 결합하는 것으로 생각되는 부위를 각각 이에 해당되는 LH-CG 수용체의 세포의 부위로 치환하여 차단형 또는 자극형 항체의 활성화도를 측정할 수 있는 돌연변이된 수용체 유전자를 CHO 세포에 transfection시키고 이렇게하여 발현된 키메라 수용체를 이용하여 그레이브스병 환자들의 혈청에 존재하는 TSH 수용체 항체를 측정하여 기존의 측정방법인 FRTL5 세포 및 1차년도에 시행한 wild type 의 TSH 수용체를 가진 CHO-TSHR 세포로 측정한 결과와 비교함으로써 이들 환자들의 혈청내에 존재하는 TSH 수용체 항체의 이질성을 보고자 한다.

III. 연구의 내용 및 범위

사람의 TSH 수용체 유전을 site directed mutagenesis 방법으로 자극형 또는 차단형 항체가 결합하는 것으로 생각되는 부위를 각각 이에 해당되는 LH-CG 수용체의 세포의 부위로 치환하여 차단형 또는 자극형 항체의 활성화도를 측정할 수 있는 돌연변이된 수용체

유전자를 CHO 세포에 transfection시키고 이렇게하여 발현된 키메라 수용체를 이용하여 그레이브스병 환자들의 혈청에 존재하는 TSH 수용체 항체를 측정하여 기존의 측정방법인 FRTL5 세포 및 1차년도에 시행한 wild type 의 TSH 수용체를 가진 CHO-TSHR 세포로 측정한 결과와 비교한다.

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

사람의 TSH 수용체 유전자의 일부를 site directed mutagenesis 방법으로 자극형 또는 차단형 항체가 결합하는 것으로 생각되는 부위를 각각 이에 해당되는 LH-CG 수용체의 세포의 부위로 치환하여 차단형 또는 자극형 항체의 활성도만을 측정할 수 있는 돌연변이된 수용체 유전자를 기증받아 CHO 세포에 transfection시키는 과정을 진행하고 있다. transfection에 성공하여 돌연변이된 TSH수용체 유전자를 발현하고 있는 안정된 세포주를 얻으면 이를 이용하여 그레이브스병 환자의 혈청에 존재하는 항 TSH수용체 자가항체의 이질성을 입증할 수 있을 것으로 기대된다.

SUMMARY

I. Project Title : Assay of Thyrotropin Receptor Antibodies with TSH/LH-CG Chimeric Receptor Expressed on Chinese Hamster Ovary Cells

II. Objective and Importance of the Project

Hyperthyroidism and diffuse goiter in Graves' disease arise through the action of autoantibody directed to the TSH receptor (TSH receptor antibody). In clinical practice, detection of this antibody is essential to define the cause of hyperthyroidism and to predict the prognosis of the Graves' hyperthyroidism after medical treatment. These antibodies are known as heterogeneous in function; stimulating and blocking antibodies are detected and antibodies only binding to TSH receptor without function are reported. After cloning of TSH receptor gene in 1988, relation of binding site with function of these antibodies were known; stimulating antibodies are thought to bind to the N-terminal portion of the TSH receptor and blocking antibodies to C-terminal portion. I tried to assay the TSH receptor antibodies using chimeric receptor in which portions of TSH receptor were replaced by corresponding rat LH/CG receptor for the measurement of net stimulating or blocking activity of Graves' IgG to elucidate the heterogeneity of TSH receptor antibodies.

III. Scope and Contents of the Project

TSH/LH-CG chimera cDNA is transfected to CHO-K1 cells to obtain the chimeric receptor expressed on the cell surface. The optimal conditions for TSAb and TSBAb measurements are determined using chimeric receptors and under these conditions activity of TSAb and TSBAb in the sera of the Graves' patients. The results obtained are compared to those of TSAb assays using FRTL5 cells CHO-TSHR cells which have wild type human TSH receptor.

IV. Results and Proposal for Applications

The transfection procedure of chimeric receptor gene to CHO-K1 cells are on going. The optimal conditions for TSAb and TSBAb measurement using chimeric receptor will be determined after success of transfection procedure. If this study is successfully completed, not only the heterogeneity of Graves, IgG but also pathogenesis of Graves' disease will be elucidated.

CONTENTS

Chapter 1	Introduction	1
Chapter 2	Present status of development	3
Chapter 3	Scope and results of project	4
Chapter 4	Degree of achievement and contribution of project	9
Chapter 5	Plan for the application of the result	10
Chapter 6	References	11

목 차

제 1 장 서론	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	3
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	4
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	9
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	10
제 6 장 참고문헌	11

제 1 장 서 론

갑상선기능항진증 및 미만성 갑상선종을 특징으로 하는 그레이브스병은 처음에는 과다하게 분비되는 TSH에 기인하는 것으로 생각되었으나 1956년 Adams등에 의해 이 병을 가진 환자의 혈청내에 뇌하수체에서 분비되는 TSH보다 긴 시간동안 갑상선을 자극하는 물질이 있음이 발표되면서 이 물질이 LATS (Long-acting thyroid stimulator)라 명명되어 불리다가 그 후 이것이 IgG임이 밝혀졌고 약 10년 후 이것이 TSH 수용체에 대한 자가항체임이 밝혀지게 되었고, 그레이브스병의 원인 물질일 것으로 생각되고 있다. 실제로 치료받지 않은 그레이브스병 환자의 90%이상에서 TSH 수용체 항체가 검출되며 항갑상선제제로 치료시 치료경과에 따라 항체의 역가가 점차 감소되다가 관해상태에 들어가면 항체가 소실된다. 이에 비해 항갑상선제제 치료종료시 TSH 수용체 항체가 지속적으로 남아 있는 경우 약을 끊으면 거의 모든 예에서 그레이브스병이 재발함이 알려져 있다. 따라서 그레이브스병의 진단 및 치료 경과의 판단, 예후의 예측(재발여부)등을 위해서는 TSH 수용체 항체의 측정이 필수적이라 하겠다. 이러한 TSH 수용체 항체는 모든 환자에 있어 같은 성질을 가지는 동일한 항체가 아니라 환자에 따라 작용이 다양한 항체가 존재하는 것으로 생각되고 있다. 즉 어떤 항체는 TSH 수용체에 결합 후 갑상선세포를 자극하는 기능을 나타내는 반면에 TSH 수용체에 결합 후 아무런 기능을 나타내지 않는 항체도 있고 심지어 갑상선세포에 결합 후 갑상선세포의 기능을 차단하는 차단형 항체도 있음이 밝혀져 있다. 이런 이유로 어느 항체의 기능이 우세하게 나타나느냐에 따라 한 환자에서 갑상선기능항진증과 갑상선기능저하증이 번갈아가며 나타나는 예가 있음이 보고되어 있

다. 그러나 이러한 사실이 증명된 바는 없고 단지 추론될 뿐인데 그 이유는 현재의 기술로는 자극형 항체 또는 차단형 항체를 분리하여 측정할 방법이 없기 때문이다. 즉 현재의 측정기술로는 두가지 항체의 기능의 합(sum)의 측정만이 가능하다. 최근 사람의 TSH수용체의 유전자 구조가 밝혀짐에 따라 각기 다른 기능을 가진 항체가 결합하는 부위에 대해 많은 연구자들이 관심을 가지고 연구를 진행한 바 자극형 TSH 수용체 항체는 TSH 수용체 세포의 부위의 N-terminal 부위에 주로 결합하고 차단형 항체는 C-terminal 부위에 결합함이 알려졌다. 또한 이렇게 TSH 수용체 항체들이 결합하는 부위는 TSH 수용체와 유사한 구조를 갖는 LH/CG 수용체에는 존재하지 않고 TSH 수용체에만 특이하게 존재하는 부위로 밝혀졌다. 이러한 사실을 이용하여 연구자는 자극형 또는 차단형 항체가 결합하는 것으로 생각되는 부위를 각각 이에 해당되는 LH-CG 수용체의 세포의 부위로 치환하여 차단형 또는 자극형 항체의 활성도만을 측정할 수 있는 돌연변이된 수용체 유전자를 CHO 세포에 transfection시키고 이렇게하여 발현된 키메라 수용체를 이용하여 그레이브스병 환자들의 혈청에 존재하는 TSH 수용체 항체를 측정하여 기존의 측정방법인 FRTL5 세포 및 1차년도에 시행한 wild type 의 TSH 수용체를 가진 CHO-TSHR 세포로 측정한 결과와 비교함으로써 이들 환자들의 혈청내에 존재하는 TSH 수용체 항체의 이질성을 보고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국외에서는 이 분야의 연구는 초기 단계로서 몇몇 실험실에서 시도되고 있고 국내에서는 아직 연구된 바가 없다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 내용

1. 연구재료

내과에서 그레이브스병으로 진단받은 후 환자들 중 치료 전의 환자 87명, 항갑상선제제로 치료 중이나 아직 갑상선기능항진증을 보이는 환자 16명, 항갑상선제제로 치료 받아 정상 갑상선기능을 보이는 환자 21명, 치료 후 관해 상태에 있는 환자 30명의 혈청으로부터 IgG를 분리하여 TSAb 측정에 이용하였다. 이들로부터 얻은 결과와 비교하기위해 갑상선질환의 현병력, 과거력 및 가족력이 없는 건강한 정상인 33명, 하시모토 갑상선염 환자 25명, 갑상선 결절 환자 18명, 일차성 점액수종 환자 15명에서도 혈청 IgG를 분리하여 TSAb를 측정하였다.

TSAb의 측정에 사용된 CHO-TSHR 세포는 클론된 사람 TSH 수용체 cDNA를 EcoRI 효소로 성숙 핵세포 발현 플라스미드인 pSV₂-NEO-ECE 에 연결한 pSV₂-NEO-ECE-hTSHR 플라스미드를 미국 NIH의 Dr. Kohn으로부터 기증받아 일본 Chiba대학의 Dr. Tahara가 CHO-K1세포에 transfection시켜 TSH 수용체를 안정되게 발현하도록 만든 세포주를 기증받아 사용하였다. FRTL5 세포는 미국 NIH의 Dr. Kohn으로부터 기증받아 사용하였다.

2. 연구 방법

가. 혈청 IgG의 분리

혈청 IgG의 분리는 Protein A-Sepharose CL-4B column을 이용한 affinity chromatography 법(Karulff et al., 1984)을 이용하였다.

나. CHO-TSHR 세포를 이용한 TSAb의 측정

bTSH에 대한 cAMP의 반응이 좋아 선택된 CHO-TSHR 세포

들은 2일 간격으로 배지를 갈아주며 배양하고 4-5일 간격으로 분주하였다. TSAb 측정을 위해 분주할 때에는 24 우물용기에 우물당 $3-4 \times 10^4$ 개의 세포를 분주하고 48시간 후 신선한 배지로 갈아 주었다. 분주한지 60-72시간 후 세포가 증식하여 우물용기에 꽉 찼을 때(100% confluency, 평균 세포수 $5-6 \times 10^5$ 개) 환자의 IgG를 가하여 생성되는 cAMP를 측정하였다. 환자의 IgG는 0.5 mmol/L 3-isobutyl-methylxanthine(IBMx), 20 mmol/L HEPES, 1% bovine serum albumin 을 포함 하고 NaCl은 함유되어 있지 않으나 222 mM sucrose을 가하여 등장성으로 만든 HBSS에 녹여 사용하였다. IgG를 원하는 농도로 희석하여 가하고 37°C에서 2시간동안 반응시킨 후 상층액을 분리하여 sodium acetate 완충액으로 희석한 후 세포로부터 방출된 cAMP를 시판되고 있는 kit를 이용하여 방사면역 측정법으로 측정하고 이 값을 정상 혼합 IgG에 대한 백분율로 나타내어 TSAb 활성도로 하였다. 그 식은 아래와 같다.

$$\text{TSAb(\%)} = \frac{\text{실험 IgG의 cAMP 방출량}}{\text{정상혼합 IgG의 cAMP 방출량}} \times 100$$

다. FRTL5 세포를 이용한 TSAb의 측정

FRTL5 세포는 5% calf serum 및 6가지 호르몬(TSH 10 U/L, insulin 10 mg/L, hydrocortisone 1 nmol/L, somatostatin 10 umol/L, transferrin 5 mg/L, L-glycyl-L-histidyl-L-lysine 10 ug/L)이 포함된 Coon's modified Ham F-12 배지(6H 배지)에 penicillin 100 U/ml, streptomycin 10 g/ml, HEPES 15 mM/L, NaHCO₃ 1.18 g/L을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 의 항온, 항습 배양기

에서 배양하였다. 3일마다 배지를 갈아주면서 6-9일에 한번씩 계대 배양하였다. TSAb의 측정을 위해서는 배양한 FRTL-5 세포를 24 우물 용기에 우물당 10^5 개씩 분주하여 6H 배지에서 7일간 배양하여 바닥 면적의 50% 정도를 채울 정도로 자라면 TSH를 뺀 5H 배지에서 7일간 더 배양한 후 환자의 혈청에서 추출해낸 IgG를 NaCl 이 포함되어 있지 않은 HBSS에 20 mM HEPES, 0.5 mM IBMX, 1% BSA를 가한 저장성 (hypotonic) HBSS에 10 mg/ml의 농도로 녹인 후 한 우물당 이 용액 300 μ l씩 가하고 37°C, 5% CO₂ 에서 2 시간 동안 반응시킨 후 상층액을 분리하여 세포외 배양액으로 방출된 cAMP의 양을 방사면역 측정법으로 측정하여, 정상 혼합 IgG에 대한 환자 IgG의 cAMP 생성 정도를 백분율로 나타내어 TSAb 활성도로 하였다. 식은 CHO-TSHR 세포로 측정하였을때 사용한 식과 같다.

라. 플라스미드 DNA의 분리 및 정제

사람 TSH/LH-CG 수용체 유전자가 포함된 플라스미드 DNA를 갖고 있는 E.coli를 agar plate에서 배양한 후 한개의 군락 (colony)를 따서 50 μ g/ml의 ampicillin을 함유한 LB(Luria-Bertani) 배양액 5 ml에 가하여 37°C에서 흔들면서 하룻밤 동안 배양하였다. E.coli로부터 플라스미드 cDNA를 분리 및 정제는 Qiagen사의 kit를 이용하였다. 이렇게 얻은 플라스미드 cDNA를 TE 완충액 500 μ l로 재부유시키고 이 용액 5 μ l를 증류수 1 ml에 넣어 260 nm에서 O.D.를 측정하여 DNA농도를 측정하고 -20°C에 보관하였다.

마. CHO세포의 배양

CHO-K1 세포(American type Culture Collection)는 25 cm² 배양 플라스크에다가 Ham's F12 배양액에 1 mM sodium pyruvate, 50 U/ml penicillin, 500 ug/ml streptomycin, 125 ug/ml amphotericin-B 및 10% fetal calf serum을 첨가하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

바. Lipofectin/DNA 혼합용액 제조

Lipofectin 10 ug 을 Opti-MEM1 배양액 750 ul에 가하여 희석하고 DNA 5 ug과 pMAMneo 5 ug을 역시 Opti-MEM1 배양액 750 ul에 가하여 희석한 후 두 가지 용액을 합하여 혼합용액을 만들었다.

사. Transfection (Lipofectin법)

배양한 CHO-K1 세포를 트립신으로 처리하여 떼어낸 후 60 mm 배양접시에 0.5x10⁶씩 분주하고 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. transfection하기 직전에 PBS로 세번 세척한 후 만들어 놓은 Lipofectin/DNA 혼합액을 세척된 배양접시내의 세포에 가하였다. 5% CO₂, 37°C에서 5시간 동안 배양한 후 20% fetal calf serum이 함유된 배양액을 가하고 5% CO₂, 37°C에서 24-48 시간 동안 더 배양하였다. 다시 배양액을 갈아준 후 48시간 배양하고 transfection 된 세포들을 selection 하였다.

아. Transfection 된 세포의 선별(selection)

클론된 돌연변이된 TSH수용체 cDNA와 함께 플라스미드에 포함되어 있는 marker 유전자(NEO)는 플라스미드가 CHO세포에 안정되게 transfection 되었을 경우 phosphotransferase를 합성하여

aminoglycoside 계열의 항생제인 geneticin(G418)에 내성을 나타내게 되는데, 포유류에서 G418에 대한 내성의 자연 발생율은 $1/10^7$ 이하인 것으로 알려져 있다. 이러한 특성을 이용하여 위에서 배양한 세포들 중 플라스미드가 안정되게 transfection된 세포들만을 살리기 위해 배양액을 geneticin(400 ug/ml)을 넣은 배양액으로 바꾸어 주고, 24 시간마다 배양액을 교환하면서 배양하여 transfection 되지 않은 세포가 죽은 다음 (약 10일 후) 트립신으로 처리하여 세포를 얻었다.

자. 클론된 세포주의 분리 배양(limiting dilution)

transfection 된 세포들을 연속적으로 희석하여 96 우물용기에 분주하여 배양하면서 현미경으로 관찰하여 한개의 세포만을 가진 우물들만 선택하여 충분히 자라도록한 후 트립신으로 처리하여 분리한 후 증폭배양시켰다.

차. 사람 TSH수용체를 발현한 CHO세포(CHO-TSHR)의 특성규명과 세포주 (cell line)의 개발

limiting dilution으로 분리하여 증폭시킨 각 세포주들에 대하여 bTSH를 가하고 cAMP 반응 등을 측정하여 TSH 수용체를 많이 발현하는 세포주들을 골라내었다.

제 2 절 결과

사람 TSH/LH-CG 수용체 유전자가 포함된 플라스미드 DNA를 갖고 있는 E.coli를 배양하여 이로부터 DNA를 정제해낸 후 CHOK1세포에 transfection 시키는 과정을 현재 진행중 이다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

구분 연구내용	연구기간												진도율 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
사람 TSH/ LH 키메라 수용체 유전 자를 CHO세 포에 tras- fection시킴 CHO-TSH/LH 세포를 이용 한 TSBAb측 정 기존의 방법 에 의한 측 정 결과와 비교														
총진도율													30	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

사람의 TSH수용체 유전자의 일부를 해당 부위의 쥐 LH-CG수용체 유전자로 치환하여 돌연변이된 TSH수용체 유전자를 transfection시켜 자극형 또는 차단형 TSH 수용체 항체만을 측정할 수 있는 영구 세포주를 얻으면 이를 이용하여 그레이브스병 환자의 경과 및 치료 예후를 예측하는데에 큰 도움이 될 뿐만 아니라 그레이브스 병의 병인을 밝히는 데도 도움이 될 것으로 생각된다. 또한 임상에서 쉽게 사용할 수 있도록 세포주를 상품화하는 것도 가능할 것으로 생각된다.

제 6 장 참고문헌

문대혁, 서교일, 조보연, 고창순, 민헌기, 이문호. Graves' 병 환자에서 항갑상선제 투여에 따른 TSH 수용체 항체의 변동에 관한 연구-치료용량 및 기간에 따른 차이 및 임상상과의 관계-. 대한내과학회지 1986, 30:300

임성희, 조보연, 이홍규, 고창순, 민헌기, 이문호. Graves' 병에서 항갑상선제 장기치료후 예후인자로서의 TSH 수용체 항체와 TRH 자극시험. 대한내과학회지 1987, 33:44

Adams DD, Purves HD. Abnormal responses in the assay of thyrotropins. Proc Univ Otago Sch Med 1956, 34:11-12

Ambesi-Impiohato FS, Villone G. The FRTL-5 thyroid cell strain as a model for studies on thyroid cell growth. Acta Endocrinol (Copenh) 115 Suppl 281:242-245, 1987

Ascoli M, Segaloff DL. On the structure of the lutenizing hormone/choriogonadotropin receptor. Endocr Rev 1989,10:27-44

Cho BY, Shong YK, Lee HK, Koh CS, Min HK. Graves' hyperthyroidism following primary hypothyroidism: sequential changes in various activities of thyrotropin receptor antibodies. Acta Endocrinol 1989, 120:447-450

Creagh F, Teece M, Williams S, Didcote S, Perkins W, Hashim F, Rees Smith B. An analysis of thyrotropin receptor binding and thyroid stimulating activities in a series of Graves' sera. Clin Endocrinol(Oxf) 23:395-404, 1985

Fenzi G, hashizume K, Roudebush CP, Degroot LJ. Changes in thyroid-stimulating immunoglobulins during antithyroid therapy. J Clin Endocrinol Metab 48:572, 1979

Kasagi K, Takeda K, Goshi J et al. Presence of both stimulating and blocking types of TSH receptor antibodies in sera from 3 patients with primary myxedema. Clin Endocrinol 1990, 32:253-260

Kohn LD, Kosughi S, Ban T, Saji M, Ikuyama S, Akamizu T, Tahara K, Moriarty J, Prabhakar BS, Singer DS. Molecular basis for the autoreactivity against thyroid stimulating hormone receptor. Intern Rev Immunol 9:135-165,1992

Kosugi S, ban T, Akamizu T, Valente W, Kohn LD. Use of thyrotropin receptor(TSHR) mutants to detect stimulating antibodies in hypothyroid patients with idiopathic myxedema, who have blocking TSHR antibodies. J Clin Endocrinol Metab 1993, 77:19-24

Kriss JP, Pleshakov V, Chien JR. Isolation and identification of

the long-acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema. *J Clin Endocrinol Metab* 24:1005-1028, 1964

Kuzuya N, Chiu SC, Ikeda H, Uchimura H, Ito K, Nagataki S. Correlation between thyroid stimulators and 3,5,3'-triiodothyronine suppressibility in patients during treatment for hyperthyroidism with thionamide drugs: Comparison of assays by thyroid-stimulating and thyroid-displacing activities. *J Clin Endocrinol Metab* 1979, 48:706-711

Laurent E, Mockel J, Van Sande J, Graff I, Dumont JE. Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 52:273-278, 1987

Libert F, Lefort A, Gerard C, Perret J, Ludgate M, Dumont JE, Vassart G. Cloning, sequencing and expression of the human thyrotropin(TSH) receptor: evidence for binding of autoantibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 165:1250-1255, 1989

Ludgate M, Costagliola S, Danguy D, Perret J, Vassart G. Recombinant TSH-receptor for determination of TSH-receptor antibodies. *Exp Clin Endocrinol* 1992, 100:73-74

Meek JC, Jones Ae, Lewis UJ, Vanderlaan WP. Characterization of the long-acting thyroid stimulator of Graves' disease. *Poc*

Natl Acad Sci USA 52:342-349, 1964

Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P, Rapoport B. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. Biochem Biophys Res Commun 165:1250-1255, 1989

Nagayama Y, Rapoport B. The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insight after its molecular cloning. Mol Endocrinol 6:145-156, 1992
:106-121, 1988

Perret J, Ludgate M, Libert F, Gerard C, Dumont JE, Vassart G, Parmentier M. Stable expression of the human TSH receptor in CHO cells and characterization of differentially expressing clones. Biochem Biophys Res Commun 171:1044-1050, 1990

Rees Smith B, Hall R. thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease. Lancet 427-431, 1974

Volpe R. Pathogenesis of autoimmune thyroid disease. In: Ingbar SH, Braverman LE eds. The Thyroid. JB Lippincott, Philadelphia. pp747-767, 1986

Zakarija M, McKenzie JM. Clinical significance of assay of the thyroid stimulating antibody of Graves' disease. Ann Int Med

1980, 93:28-32

Zakarija M, Mckenzie JM, Munro DS. Immunoglobulin G inhibitor of thyroid stimulating antibody is cause of delay in onset of neonatal Graves' disease. J Clin Invest 1983, 72:1352-1356

Zakarija M, Mckenzie JM, Clafin A. Humoral aspect of Graves' disease. In: Walfish PG, Wall JR, Volpe R eds. Autoimmunity and the thyroid. Academic press, Orlando. 1985 pp 109-124

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org Report No.	Sponsoring Org Report No.	Standard Report No.	INIS Subject Code
KAERI/RR-1654/96			
Title/Subtitle	The assay of thyrotropin receptor antibodies with human TSH/LH-CG chimeric receptor expressed on chinese hamster ovary cells		
Project Manager and Dept.	Ka-Hee Yi (Department of Internal Medicine)		
Researcher and Dept.	Ka-Hee Yi (Department of Internal Medicine), Chang-Min Kim (-)		
Pub. Place	Seoul	Pub. Org	KOCH, KAERI
			Pub. Date
			Dec. 1996
Page	46 P.	Tab	Yes(0), No()
			Size
			26 cm
Note			
Classified	Open(0), Outside()	Class	Report Type
			Research Report
Sponsoring Org.	MOST	Contract No.	No
Abstract (About 300 Words)	<p>TSH/LH-CG chimera cDNA is transfected to CHO-K1 cells to obtain the chimeric receptor expressed on the cell surface. The optimal conditions for TSAb and TSBAb measurements are determined using chimeric receptors and under these conditions activity of TSAb and TSBAb in the sera of the Graves' patients. The results obtained are compared to those of TSAb assays using FRTL5 cells CHO-TSHR cells which have wild type human TSH receptor.</p> <p>The transfection procedure of chimeric receptor gene to CHO-K1 cells are on going. The optimal conditions for TSAb and TSBAb measurement using chimeric receptor will be determined after success of transfection procedure. If this study is successfully completed, not only the heterogeneity of Graves. IgG but also pathogenesis of Graves' disease will be elucidated.</p>		
Subject Keywords (About 10 Words)	<p>TSH/LH-CG chimeric receptor, stimulating antibody, blocking antibody, optimal condition, heterogenous antibody population</p>		

서 지 정 보 양 식

수행기관 보고서번호	위탁기관 보고서 번호	표준보고서 번호	INIS 주제코드
KAERI/RR- 1654/96			
제목 / 부제 사람 TSH/LH-CG 키메라 수용체를 이용한 감상선 자극호르몬 수용체 항체의 측정			
연구책임자 및 부서명		이 가 희 (내분비 내과)	
연구자 및 부서명		이 가 희 (내분비 내과), 김 창 민 (소화기 내과)	
발행지	서울	발행기관	한국원자력연구소 부설 원자력병원
페이지	P. 46	도표	유(0), 무()
		발행인	1996. 12. 크 기 26 cm
참고사항			
비밀여부	공개(0), 대외비(), ___급 비밀	보고서 종류	연구보고서
연구위탁기관	과학기술처	계약 번호	없음
초록(300단어 내외) 본 연구는 사람의 TSH 수용체 유전자의 일부를 해당부위의 쥐 LH-CG 수용체로 치환하여 얻은 chimera 수용체 유전자를 CHO-K1 세포에 transfection 시켜 얻은 chimera 수용체를 이용하여 그레이브스병 환자의 혈청으로부터 분리한 IgG의 TSAb 및 TSBAb의 net activity 를 측정하기에 가장 적절한 조건을 확립하고 이에 따라 하여 TSAb 및 TSBAb를 측정하고 그 결과를 FRTL5 세포를 이용하여 측정한 결과와 비교하여 항 TSH 수용체 항체의 이질성을 보려 하였다. 현재 사람의 TSH 수용체 유전자의 일부를 해당부위의 쥐 LH-CG 수용체로 치환하여 얻은 chimera 수용체 유전자를 CHO-K1 세포에 transfection 시키는 과정을 진행중이며 이 과정이 성공하면 키메라 수용체를 안정적으로 발현하고 있는 영구 세포주를 얻게 되는 것으로 향후 이를 이용하여 TSAb 및 TSBAb 를 측정하면 그레이브스병 환자의 경과 및 치료시 예후 예측에 도움이 될 것으로 생각된다.			
주제명 키워드 (10단어 내외) 키메라 수용체, 감상선자극항체, 감상선차단항체, 측정 조건, 감상선자극호르몬수용체 항체의 이질성			

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 기관고유사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

사람 갑상선자극호르몬-황체호르몬 수용체 키메라
수용체를 이용한 갑상선 자극 차단 항체의 측정

1996年 12月 26日 印刷

1996年 12月 30日 發行

發行人 김 성 년

發行處 韓國 原子力 研究所

大田廣域市 儒城區 德津洞 150

印刷所 東 和 社

믿는마음 지킨약속 다져가는 신뢰사회