

# 学位論文

甲状腺機能低下における血清中甲状腺ホルモンの恒常性メカニズムと  
新規バイオマーカー探索に関する研究

2015年（平成27年）度

長尾 英則

## 略字・略号一覧

本研究では以下の略字・略号を使用した。

BA	: bile acid
BAT	: brown adipose tissue
C <sub>s</sub>	: serum concentration
CA	: cholic acid
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
CDCA	: chenodeoxycholic acid
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
C <sub>ss</sub>	: steady state serum concentration
C <sub>0</sub>	: serum concentration at time zero
DIT	: di-iodinated tyrosine
D1	: deiodinase type1
D2	: deiodinase type2
D3	: deiodinase type3
ER	: elimination rate
ER <sub>ent</sub>	: elimination rate in controls, which was calculated using the kinetic parameters of control rats
ER <sub>tx</sub>	: elimination rate in Tx rats
ESI	: electrospray ionization
FXR	: farnesoid X receptor
GABP	: GA-binding protein
GCA	: glycocholic acid
GCDCA	: glycochenodeoxycholic acid
HPLC	: high performance liquid chromatography
ID	: iodine deficiency
IS	: internal standard
k <sub>el</sub>	: elimination rate constant
LC	: liquid chromatography
LC/MS/MS	: liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LLOQ	: lower limit of quantification
MCT	: monocarboxylate transporter
MIT	: mono-iodinated tyrosine
M-BAR	: membrane-bile acid receptor
mRNA	: messenger ribonucleic acid

MS	: mass spectrometry
$m/z$	: mass-to-charge ratio
NIH	: National Institutes of Health
NIS	: sodium-iodide symporter
OATP	: organic anion transporter
OPLS-DA	: orthogonal partial least squares discriminant analysis
rT <sub>3</sub>	: 3,3',5'-triiodothyronine
$r^2$	: coefficient of determination
S <sub>deg</sub>	: suppression degree for elimination, $ER_{\text{cnt}} - ER_{\text{tx}}$
SD	: standard deviation
SPE	: solid-phase extraction
SR	: supplying rate
SRM	: selected reaction monitoring
SULT	: sulfotransferase
TCA	: taurocholic acid
TCDCa	: taurochenodeoxycholic acid
TDCA	: taurodeoxycholic acid
Tg	: thyroglobulin
THDCA	: taurohyodeoxycholic acid
TPO	: thyroid peroxidase
TR	: thyroid hormone receptor
TRH	: thyrotropin-releasing hormone
TSH	: thyroid-stimulating hormone
TUDCA	: tauroursodeoxycholic acid
Tx	: thyroidectomy
Tyr	: tyrosine
$t_{1/2}$	: half-life
T <sub>3</sub>	: 3,3',5'-triiodothyronine
T <sub>4</sub>	: thyroxine
T <sub>4</sub> -G	: thyroxine-glucuronide
UGT	: uridine diphosphate glucuronosyltransferase
UPLC/QTOF-MS	: ultra-performance liquid chromatography / quadrupole time-of-flight mass spectrometry
USFDA	: United States Food and Drug Administration
V <sub>d</sub>	: volume of distribution
X <sub>0</sub>	: dosage at administered

$\beta$ TMCA	: $\beta$ tauromuricholic acid
$^1\text{H-NMR}$	: proton nuclear magnetic resonance
$[\text{M} + \text{H}]^+$	: protonated molecule
$[\text{M} - \text{H}]^-$	: deprotonated molecule
$^{13}\text{C}_9\text{T}_4$	: $^{13}\text{C}$ -labelled thyroxine
$^2\text{H}_5\text{T}_4$	: $^2\text{H}$ -labelled thyroxine

# 目次

序論.....	1
<b>第 1 章 血清中甲状腺ホルモン及び安定同位体標識 T<sub>4</sub> ([<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub>) 濃度測定法の確立と Tx</b>	
<b>ラットの血清中甲状腺ホルモン動態</b>	
第 1 節 序.....	8
第 2 節 安定同位体標識 T <sub>4</sub> ([ <sup>13</sup> C <sub>9</sub> ]T <sub>4</sub> ) の合成と血清中甲状腺ホルモン測定法の確立	10
第 3 節 Tx ラットの血清中甲状腺ホルモン動態.....	18
第 4 節 小括 .....	28
<b>第 2 章 ヨード欠乏ラットの血清中甲状腺ホルモン動態</b>	
第 1 節 序.....	29
第 2 節 ヨード欠乏ラットの血清中甲状腺ホルモン濃度 .....	31
第 3 節 ヨード欠乏ラットの血清中 T <sub>4</sub> 動態 .....	35
第 4 節 小括 .....	40
<b>第 3 章 Tx によるラット血清中 T<sub>4</sub> の消失抑制メカニズム</b>	
第 1 節 序.....	41
第 2 節 Tx による血清中 T <sub>4</sub> 消失抑制に対する T <sub>3</sub> 補充効果.....	43
第 3 節 Tx による血清中 T <sub>4</sub> 消失抑制における脱ヨード酵素の関与.....	48
第 4 節 Tx による血清中 T <sub>4</sub> 消失抑制における抱合代謝酵素の関与.....	52
第 5 節 小括 .....	59

## 第4章 甲状腺機能低下症における新規バイオマーカー探索

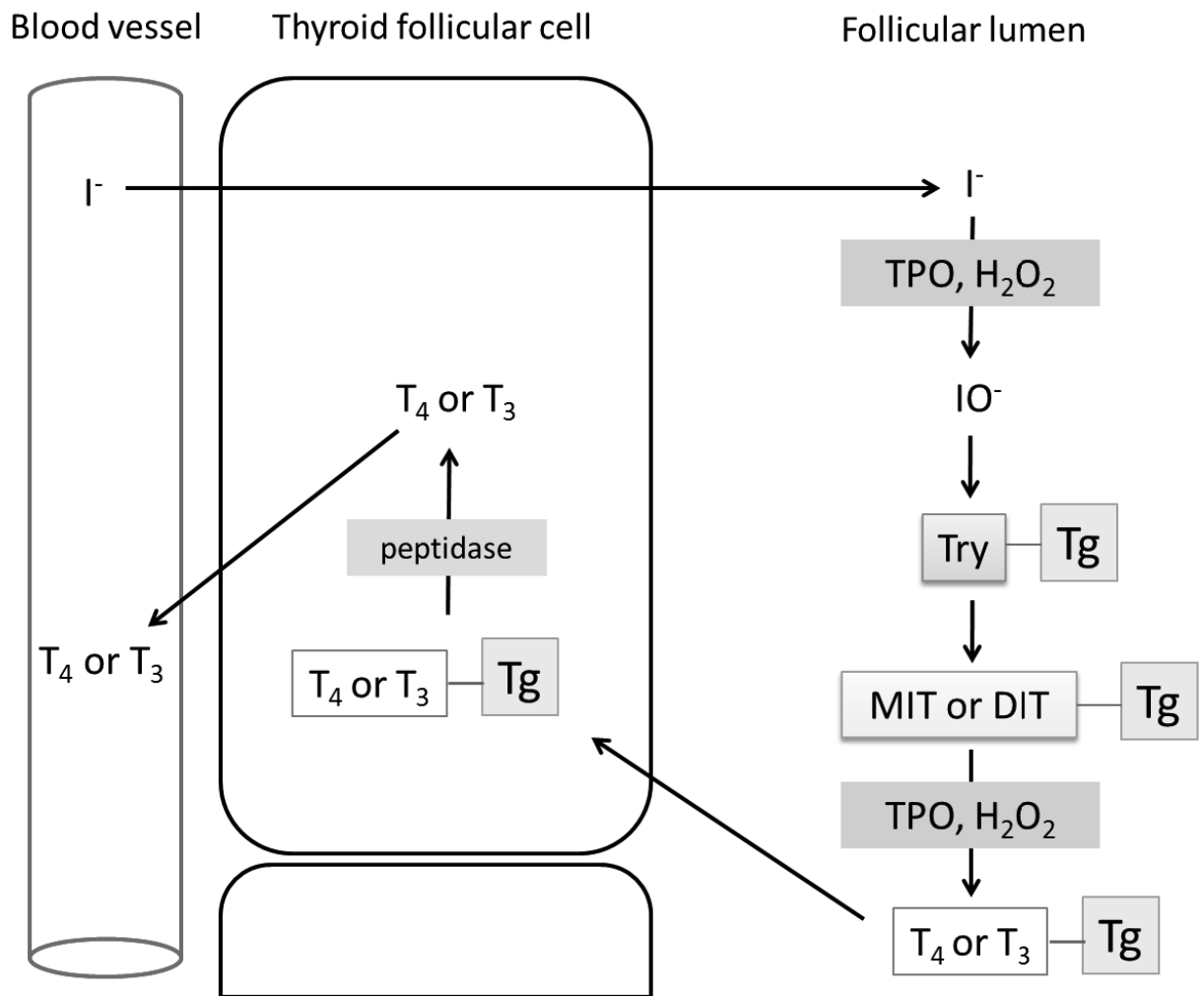
第1節 序.....	61
第2節 Txラットにおける血清中メタボローム解析.....	64
第3節 甲状腺機能低下における血清中バイオマーカーとしての胆汁酸の可能性.....	70
第4節 小括.....	79
結語.....	81
謝辞.....	84
実験の部	
第1章から第4章の実験で共通の事項.....	86
第1章の実験.....	90
第2章の実験.....	92
第3章の実験.....	93
第4章の実験.....	99
引用文献.....	103

## 序論

生体は多種のホルモンによって恒常性が維持されている。その中でも特に甲状腺ホルモンは発生や分化といった生命の起源から、基礎代謝の亢進、発育の促進、知能の発達などの成育段階まで幅広く作用することが知られている<sup>1-3)</sup>。そのため、生体内の甲状腺ホルモン量は、生合成、代謝及び作用の各過程で幾重もの機構により調節されている。

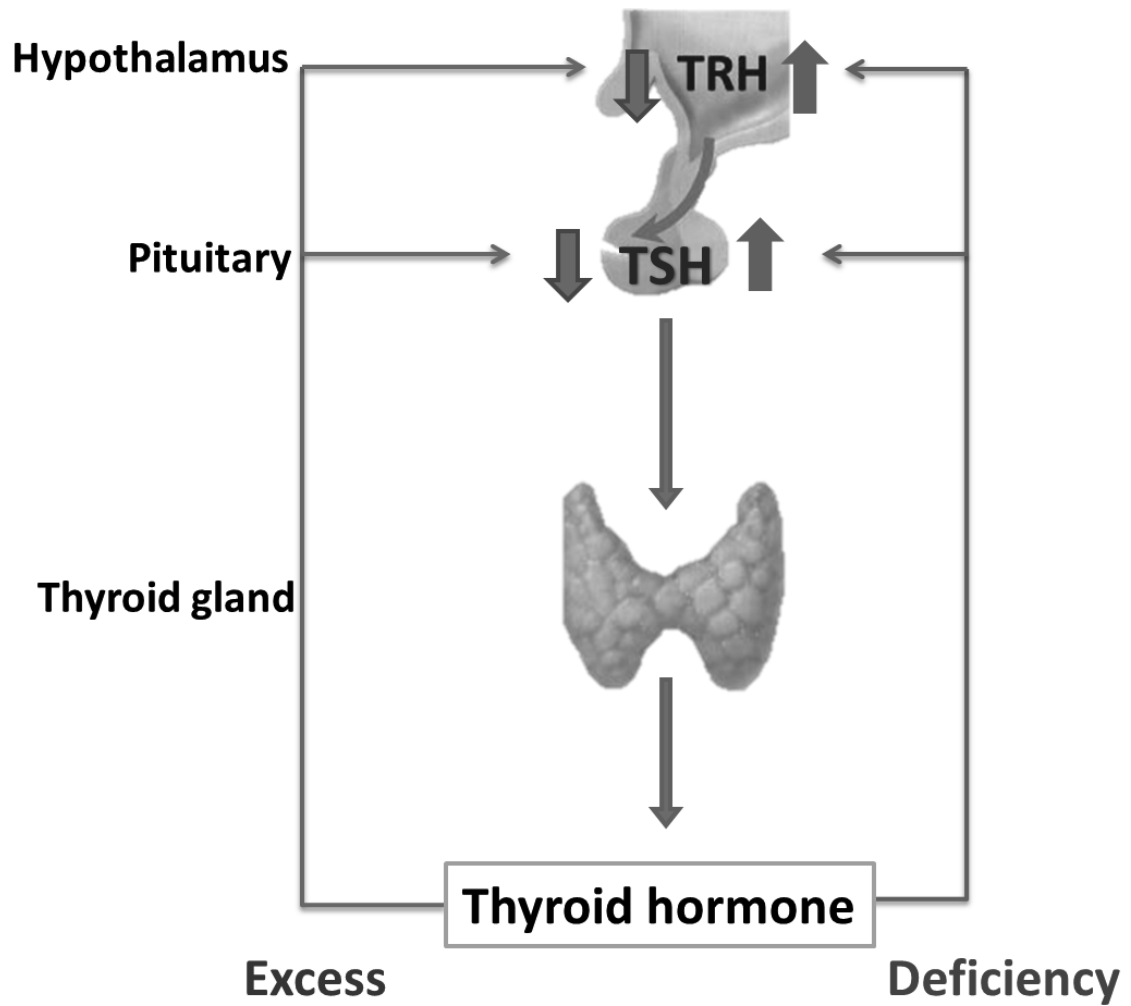
甲状腺ホルモンの生合成は、まず、甲状腺濾胞細胞において血中から取り込まれたヨード ( $I^-$ ) が甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) により有機化されることから始まる (Fig. 1)。有機化されたヨード ( $IO^-$ ) は、濾胞の内腔にコロイドとして蓄積されているサイログロブリン (Tg) を構成するチロシン残基 (Tyr) に 1 あるいは 2 個付加され、モノヨードチロシン (MIT) あるいはジヨードチロシン (DIT) が生成する。次いで、デュアルオキシダーゼ (DUOX) によって生成した  $H_2O_2$  及び TPO により、これらヨード化されたチロシン残基どうしがエーテル重合することで、Tg 分子内にチロキシン ( $T_4$ ) もしくは 3,3',5-トリヨードサイロニン ( $T_3$ ) の構造が出来上がる。これらタンパク質は濾胞細胞へ再び吸収され、リソソーム中のペプチダーゼにより消化を受け、Tg から甲状腺ホルモン ( $T_4$  もしくは  $T_3$ ) が解離する。解離した甲状腺ホルモンは、甲状腺濾胞細胞の基底膜側に発現しているトランスポーターによって血中に分泌される。これら甲状腺ホルモンの分泌は、主として視床下部の甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) と下垂体の甲状腺刺激ホルモン (TSH) により甲状腺に刺激が伝達されることで促進される (Fig. 2)。また、これらの過程は、血中に増加した甲状腺ホルモンによりネガティブフィードバックを受けることでも制御されている。

生理活性を有する甲状腺ホルモンには  $T_4$  と  $T_3$  の 2 種類があり、ともに甲状腺で産生されるものの、血中の  $T_3$  の約 80% は、甲状腺以外の組織 (脳、肝臓、腎臓、筋肉、褐色脂肪など) において脱ヨード酵素により  $T_4$  から生成する。また、生理活性は  $T_3$  の方が 10-20 倍強いことが知られており<sup>4,7)</sup>、 $T_4$  は活性型である  $T_3$  の前駆体 (プロホルモン) とも呼ばれている<sup>8)</sup>。この脱ヨード酵素には、脱ヨード酵素タイプ 1 (D1)、タイプ 2 (D2) 及びタ

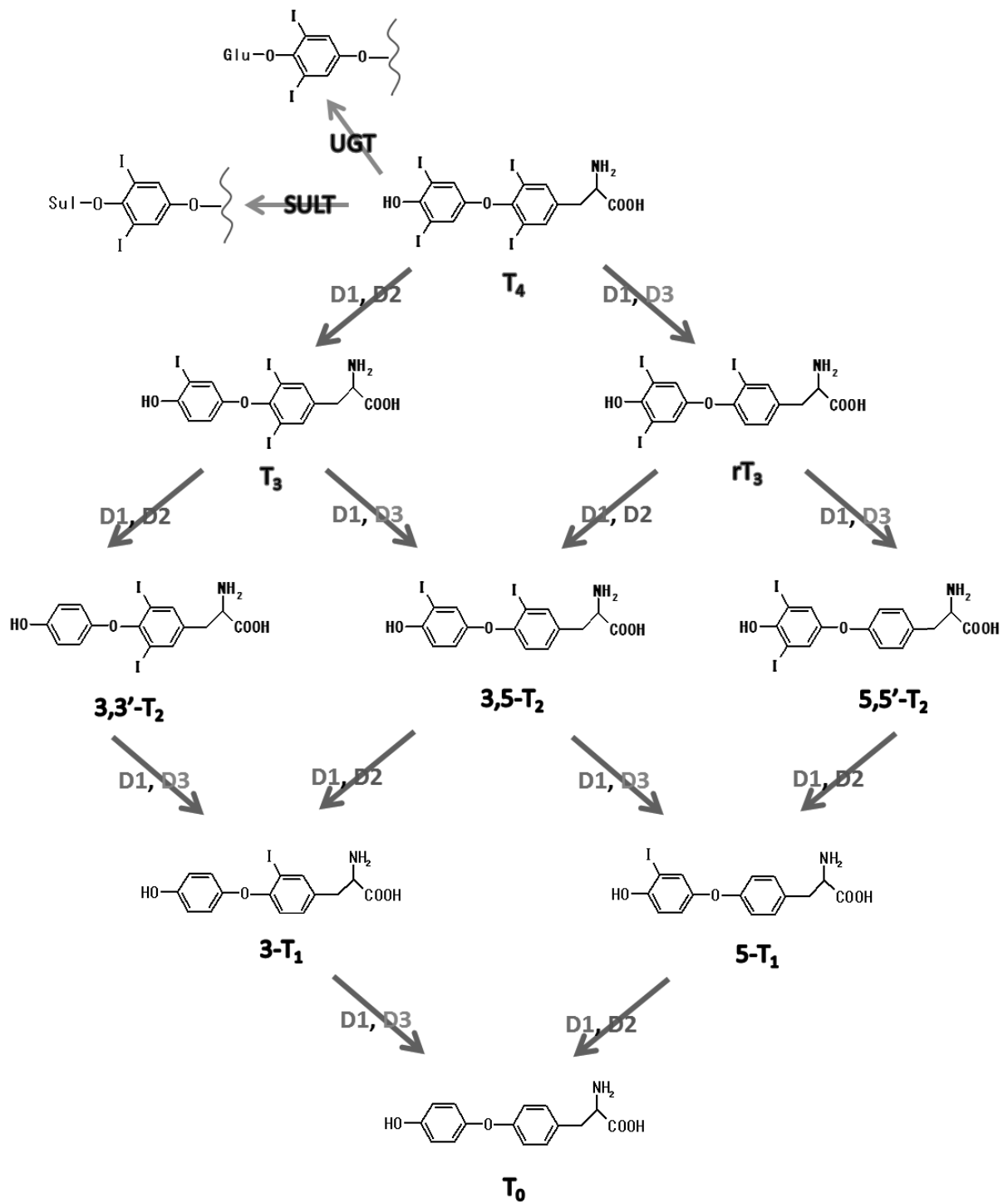


**Fig. 1. Biosynthetic pathway of thyroid hormones**





**Fig. 2. Control of thyroid hormone secretion**



**Fig. 3. Metabolic pathway of  $T_4$**

イプ 3 (D3) の 3 種のサブタイプが存在する (Fig. 3)。D1 は肝臓、腎臓及び甲状腺に存在し、 $T_4$  分子中の 4 つのヨードのうち、外環又は内環のいずれかのヨードを脱離することで  $T_4$  をそれぞれ活性型の  $T_3$  あるいは不活性型の 3,3',5'-トリヨードサイロニン ( $rT_3$ ) に変換する<sup>9,10)</sup>。D2 は脳、下垂体、褐色脂肪などに存在し、外環のヨードを特異的に脱離することで  $T_4$  から  $T_3$  のみを産生する<sup>11,12)</sup>。D3 は脳、皮膚及び胎盤に存在しており、内環の特異的な脱ヨード化により、 $T_4$  から  $rT_3$  のみを産生する<sup>13,14)</sup>。さらに、 $T_3$  及び  $rT_3$  はこれら酵素によりさらに脱ヨード化を受け、ホルモン活性を持たない  $T_2$ 、 $T_1$  及び  $T_0$  へと代謝される。また、甲状腺ホルモンはウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素 (UGT) や硫酸転移酵素 (SULT) によっても代謝される<sup>15,16)</sup>。すなわち、甲状腺において合成された  $T_4$  や  $T_3$  は、甲状腺外組織に存在するこれら様々な酵素により代謝され、血中及び組織中のホルモンの恒常性が維持されている。

甲状腺ホルモンの作用は、血中の甲状腺ホルモン輸送タンパク質 (甲状腺ホルモン結合グロブリン、トランスサイレチン、アルブミン)、細胞内へ甲状腺ホルモンを取り込むトランスポーター (有機アニオン輸送ポリペプチド、モノカルボン酸トランスポーターなど) 及び核内受容体である甲状腺ホルモン受容体を介して発現する<sup>17)</sup>。これらタンパク質分子に加え、上述した様々な制御機構 (生合成及び代謝) における遺伝子変異や機能不全により甲状腺機能異常 (低下や亢進) を生じ、種々の甲状腺疾患を惹起する。

甲状腺疾患の一つである甲状腺機能低下症には、先天性機能低下、慢性甲状腺炎 (橋本病)、外科的治療やヨード過剰摂取及びヨード欠乏を原因とした原発性甲状腺機能低下症、視床下部及び下垂体疾患による TRH や TSH の分泌不足によって引き起こされる中枢性甲状腺機能低下症、並びに甲状腺ホルモン分泌量は十分でありながら受容体の異常によって作用が減弱する甲状腺ホルモン不応症がある。さらに、肝疾患や腎不全など消耗性疾患による低甲状腺ホルモン血症 (nonthyroidal illness) も本病態に含まれる。これら様々な要因により、甲状腺ホルモンの生合成や分泌が減少することで神経系、心臓及び代謝などを司る各種器官の働きが低下し、倦怠感、除脈、皮膚の乾燥、発汗減少、便秘などの症状をきたす。さらに、代謝が低下することで皮下に粘液状の物質が沈着し、浮腫 (粘液水腫)

を発症する。このような甲状腺機能低下症の患者には、主に甲状腺ホルモン補充療法が適用されるが、その治療方針は血清中ホルモン値に基づいている。しかし、一言に甲状腺機能低下症といってもその機序は様々であり、前述したような多くの調節機構が複雑に関連し合っていることが予想される。そのため、各種甲状腺機能低下症において詳細な甲状腺ホルモン動態を検討することが重要であり、この知見に則った用法・用量の設定が有用であると考えられる。

現在、一般的な疾患の診療や治療では、バイタルサインや血液を用いた各種臨床検査値が利用されている。しかし、近年、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどのいわゆるオミックス研究の発展に伴い、現在の疾病罹患や病態診断のみならず、将来における疾病罹患、今後の病態の変動、並びに治療の反応性をも予測することを目標とするバイオマーカー探索研究が活発に行われている。その中でもメタボロミクスは、血清、尿、組織中の内因性の低分子代謝物を対象としており、これら低分子代謝物はタンパク質とは違い、種差がほとんどなく、ゲノム情報の最終的な表現型であるため疾患実態を反映すると言われている。先に述べたように、甲状腺ホルモンは様々な調節を受け恒常性を維持していることから、著者は、甲状腺機能低下症患者のホルモン補充療法における診断基準が血清中ホルモン値のみでは不十分であると考え、これを補完する新規バイオマーカー探索にメタボローム解析が有用であると考えた。

以上の背景を基に、本研究では、機序の異なる甲状腺機能低下症モデル動物 2 種を用いて血清中甲状腺ホルモンの恒常性メカニズムの解明、並びに甲状腺機能低下及びその甲状腺ホルモン補充療法における新規バイオマーカーの探索を課題とした。まず、第 1 章では、液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法 (LC/MS/MS 法) による血清中の内因性甲状腺ホルモン及び安定同位体標識  $T_4$  ( $[^{13}C_9]T_4$ ) の同時測定法の確立及び本法を用いた甲状腺を外科的に摘除したラット (Tx ラット) の血清中  $T_4$  動態について検討した。次に第 2 章では、ヨード欠乏飼料を摂餌させたラット (ID ラット) の血清中甲状腺ホルモン動態を検討し、機序の違い (Tx と ID) による甲状腺機能低下の差異について検証した。第 3 章では、Tx による血清中  $T_4$  動態の変動メカニズムを明らかにするため、 $T_4$  の主要代

謝酵素である D1、D2、UGT 及び SULT に着目し、これら酵素の組織中 mRNA 発現及び酵素活性の変動を検証した。最後に第 4 章では、Tx ラットの血清メタボローム解析によりバイオマーカー候補として見出された胆汁酸が甲状腺機能低下症のホルモン補充療法のバイオマーカーに成りうる可能性について言及した。

# 第1章 血清中甲状腺ホルモン及び安定同位体標識 T<sub>4</sub> ([<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub>) 濃度測定法の確立と Tx ラットの血清中甲状腺ホルモン動態

## 第1節 序

甲状腺疾患の一つである甲状腺機能低下症は様々な要因によって惹起されるが、これら甲状腺機能低下症の患者には主にホルモン補充療法が適用される。この補充療法における用量設定は血清中甲状腺ホルモン値が基準とされており、現在、生体試料中の甲状腺ホルモン測定には免疫アッセイが用いられている。しかし、同法は、交差反応性や試料中の共存物質による非特異的反応などの問題により、アッセイ間及びロット間のバラツキを考慮しなければならず、必ずしも高精度な分析法とは言い難い。加えて、このような内分泌疾患の場合、関連する複数のホルモン値を測定することで病態が診断されるが、免疫アッセイでは複数のホルモンの同時測定は基本的に不可能である。

LC/MS/MS 法は、混合物の分離に優れる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と、化合物から生じたイオンを  $m/z$  ごとに検出する質量分析法 (MS) を組み合わせた分析手法である。さらに、選択反応モニタリング (SRM) 測定では特定の  $m/z$  のイオンのみを選択し、フラグメント化させ、そのフラグメントイオンを MS で検出する。これにより、試料中の夾雑物の影響を小さくし、同じ質量を持つ類縁化合物が存在しても部分構造の違いにより目的化合物のみを選択的に検出することが可能となる。また、ステロイドホルモンの測定では既に臨床使用がなされており、免疫アッセイと比べ、選択性及び再現性に優れているとの報告もある<sup>18)</sup>。さらに、LC/MS/MS 法を用いることで複数のホルモンの同時測定が可能となり、臨床検査における省力化にも繋がると考えられ、同法は今後の臨床診断や臨床研究に有用と期待される。

甲状腺機能低下症のモデル動物として甲状腺を外科的に摘除した Tx ラットが多くの研究において使用されており、甲状腺機能低下症患者と同様に成長、心拍数及び代謝率の抑制、並びに性腺、副腎などの各種臓器の発達及び機能の抑制が引き起こされる。これ

らの主因は、言うまでもなく循環血中の甲状腺ホルモン濃度の低下である。しかし、甲状腺機能低下症の機序は様々であり、多くの調節機構が複雑に関連し合っ変動していることが予想される。そのため、甲状腺疾患の診断及び甲状腺ホルモン補充療法の最適化においては、血清中ホルモン値のみでなく、血清中ホルモン動態を検討することが重要である。これまで、ホルモンなどの内因性物質の動態研究には、放射性同位元素で標識したホルモンが使用されてきた。しかし、放射性標識体を用いた実験は煩雑であり、加えて安全性の面からもヒトでの使用は不可能である。近年、LC/MS/MS 装置の発展により、安定同位体で標識したホルモンをトレーサーとして利用するホルモン動態研究が多く報告されている<sup>19,20</sup>。すなわち、その分子量の違いからトレーサーとして投与した外因性甲状腺ホルモンと内因性甲状腺ホルモンを区別して測定することができ、安全に、且つ血清中濃度とホルモン動態の情報を同時に得ることが可能になる。

以上の背景を基に本章では、まず、トレーサーとして安定同位体である  $^{13}\text{C}$  で標識した  $\text{T}_4$  ( $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$ ) を化学合成した。次いで、血清中内因性及び外因性甲状腺ホルモンを同時定量でき、且つ煩雑な抽出操作を必要としない online solid-phase extraction (SPE) LC/MS/MS 法を確立した。さらに、本測定法を用い、Tx ラットの血清中甲状腺ホルモン濃度の変動、並びに血清中  $\text{T}_4$  動態について検討した。

## 第2節 安定同位体標識 T<sub>4</sub> ([<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub>) の合成と血清中甲状腺ホルモン測定法の確立

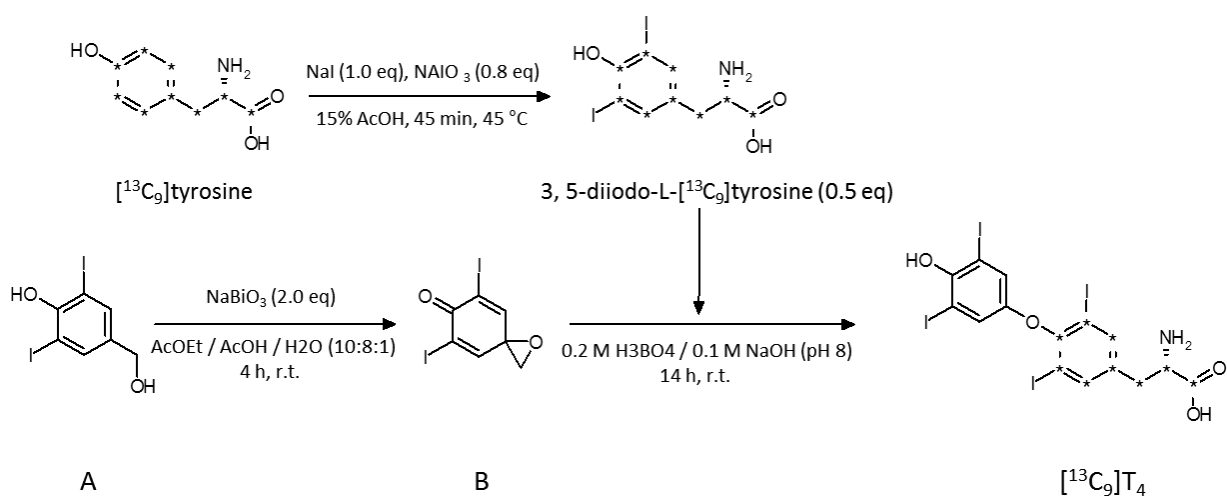
### 2.1 [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> の合成

<sup>13</sup>C で標識した [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> をトレーサーとして用いるため、 [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]tyrosine を出発材料として Salamonczyk らの方法<sup>21)</sup>を参考とし、Fig. 4 に示すスキームにより合成した。まず始めに、 [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]tyrosine をヨウ化ナトリウム及びヨウ素酸ナトリウムによるヨード化反応により 3,5-diiodo-L-[<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]tyrosine を合成した。次いで、 4-hydroxy-3,5-diiodo-phenyl-methanol (A) を NaBiO<sub>3</sub> により酸化し、エポキシ体である 5,7-diiodo-1-oxaspiro[2,5]bicycloocta-4,7-dien-6-one (B) を合成した。この化合物 B と先の 3,5-diiodo-L-[<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]tyrosine を pH 8.0 の水溶液中で反応させることで [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> を合成した。合成した [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> の構造は、<sup>1</sup>H-NMR 及び MS により同定した。また、純度検定の結果、 [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> の化学的純度は 96.8%、同位体純度は 96.4% であり、高純度のトレーサーを得ることができた。

### 2.2 血清中甲状腺ホルモン測定法の確立

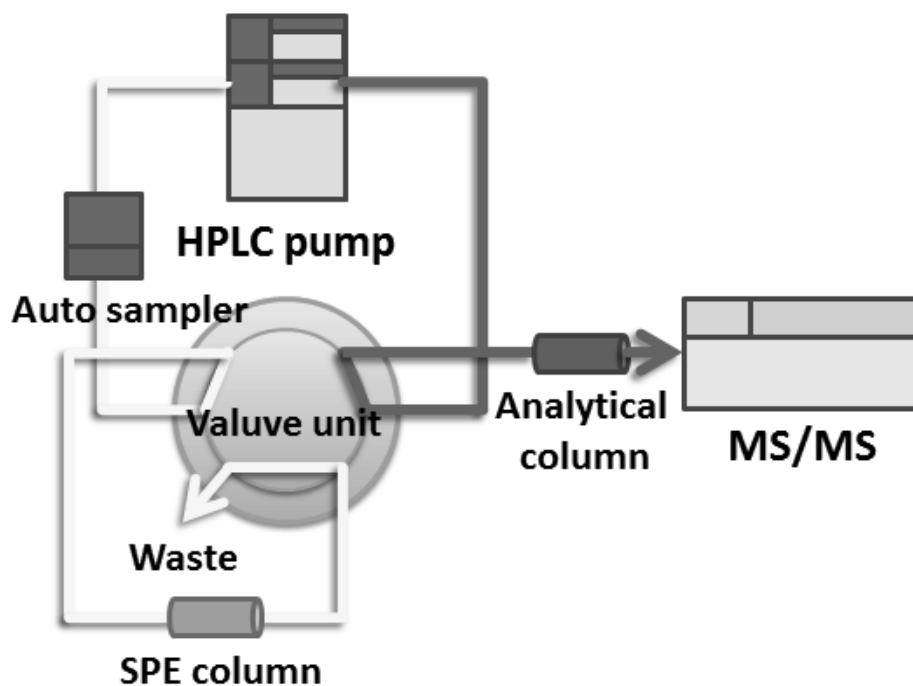
甲状腺機能低下時における血清中甲状腺ホルモン濃度の変動、並びに T<sub>4</sub> の血中動態を検討するため、LC/MS/MS 測定法の確立を検討した。従来法<sup>22)</sup>では LC に先立ち、除タンパク質や抽出、濃縮など多くの煩雑な前処理操作が必要とされる。また、これら操作のため、抽出回収率や再現性、選択性などをそれぞれの測定対象物ごとに確認しなければならない。そこで著者はこれら操作を自動化した online SPE LC/MS/MS 法の開発を計画した (Fig. 5)。Online SPE による自動操作では、まず、注入及び洗浄過程の流路に移動相を送液し、オートサンプラからサンプルを直接注入した (Fig. 5A)。その後、測定対象物を SPE カラムに保持させ、同時に共存物質を洗浄した。次いで、溶出及び分析過程の流路に移動相の送液を切り替え、SPE カラムに保持された測定対象物を分析カラム及び MS/MS に導入した (Fig. 5B)。これにより、従来法と比べ、手動操作に伴う測定間誤差がなくな



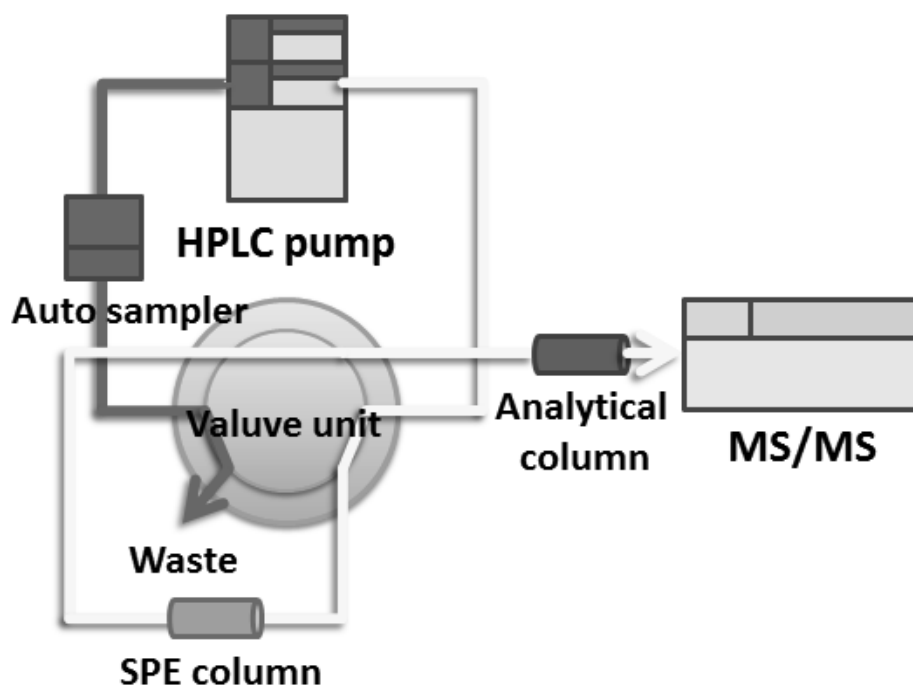


**Fig. 4. Chemical synthesis of  $[\text{C}_9]$ T<sub>4</sub>**

### (A) Sample injection and washing



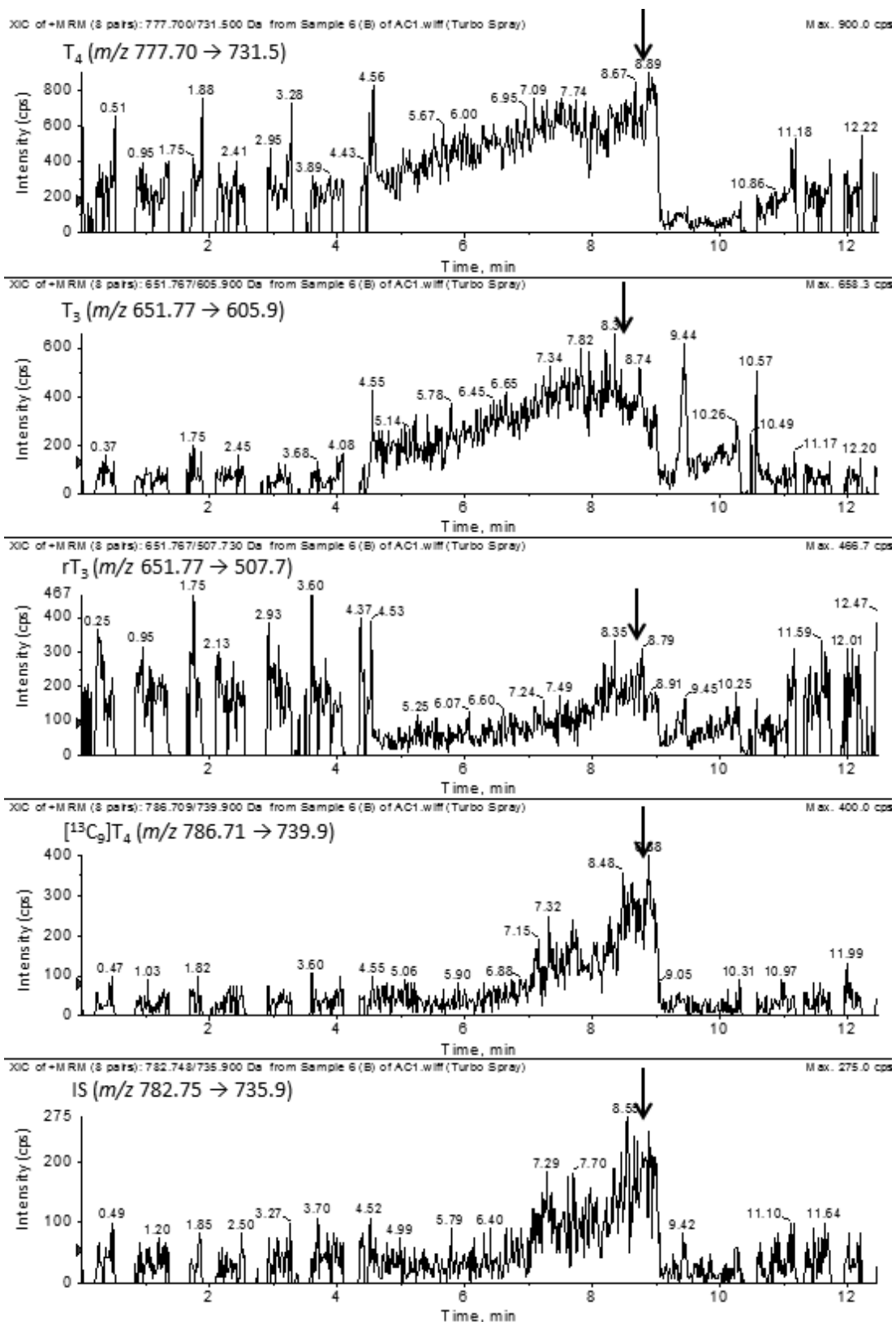
### (B) Sample elution and analysis



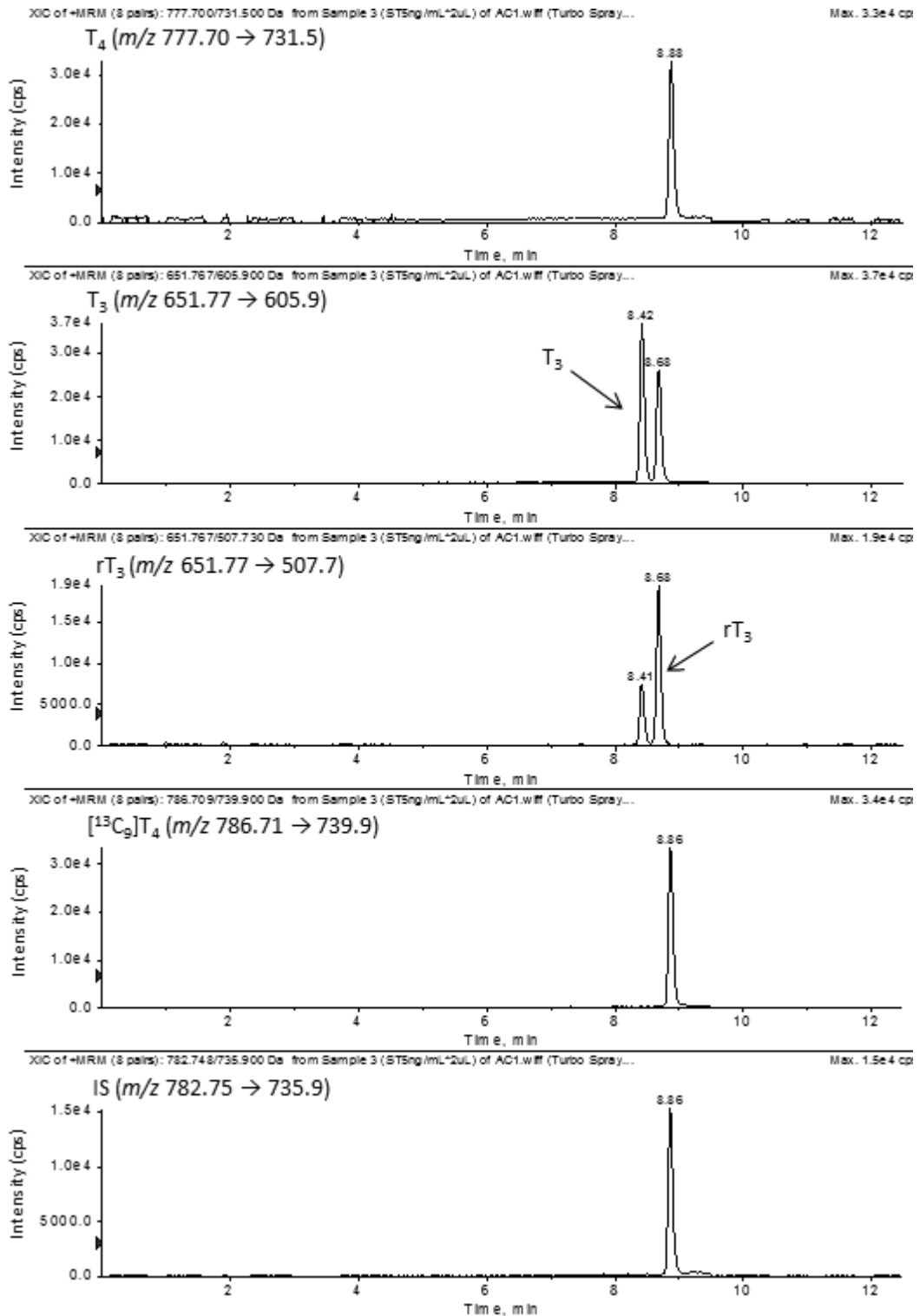
**Fig. 5. Flow scheme of online SPE LC/MS/MS**

り、再現性の高い測定が可能となるばかりか、省力化及びスループット性の向上にも繋がる。

各測定対象物の LC/MS/MS 挙動を精査した。イオン化法として正イオン検出エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いたところ、すべての測定対象物についてプロトン付加分子  $[M+H]^+$  が観測された ( $T_4$ :  $m/z$  777.70、 $T_3$  及び  $rT_3$ :  $m/z$  651.77、 $[^{13}C_9]T_4$ :  $m/z$  786.71、 $[^2H_5]T_4$  (内部標準物質 (IS)):  $m/z$  782.75)。これら  $[M+H]^+$  をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、いずれの測定対象物においても  $[M+H-HCOOH]^+$  ( $T_4$ :  $m/z$  731.5、 $T_3$  及び  $rT_3$ :  $m/z$  605.9、 $[^{13}C_9]T_4$ :  $m/z$  739.9、 $[^2H_5]T_4$ :  $m/z$  735.9) が基準ピークとして得られた。また、 $rT_3$  については、HIO もしくは  $H_3IN$  の脱離が推定されるプロダクトイオン  $m/z$  507.7 も前述のイオンと同程度の強度を示した。以上の結果を基に、SRM のトランジションとして、 $T_4$  は  $m/z$  777.70  $\rightarrow$  731.5、 $T_3$  は  $m/z$  651.77  $\rightarrow$  605.9、 $rT_3$  は  $m/z$  651.77  $\rightarrow$  507.7、 $[^{13}C_9]T_4$  は  $m/z$  786.71  $\rightarrow$  739.9、 $[^2H_5]T_4$  は  $m/z$  782.75  $\rightarrow$  735.9 を設定した。これらトランジションを用い、各測定対象物のクロマトグラムにおける選択性について検討した。Fig. 6 に示すように、活性炭処理して得られたブランク血清において測定対象物である  $T_4$ 、 $T_3$ 、 $rT_3$ 、 $[^{13}C_9]T_4$ 、並びに IS の溶出位置 (図中矢印) に妨害ピークは認められなかった。次に、Fig. 7 に上記血清に各測定対象物の標準溶液 (5 ng/mL、2  $\mu$ L) を添加したクロマトグラムを示した。 $T_4$ 、 $[^{13}C_9]T_4$  及び IS の保持時間は同じであったが、SRM トランジションの違いによりそれぞれのピークを分別することができた。また、 $T_3$  と  $rT_3$  は互いにそれぞれの SRM トランジションにおいても検出されるが、保持時間の違いによりピークを分離することが可能であった。以上、本法は血清中共存物質による妨害を受けることなく、高い選択性を有し、各測定対象物質の一斉分析が可能なが示された。



**Fig. 6. Chromatograms of  $T_4$ ,  $T_3$ ,  $rT_3$ ,  $[^{13}C_9]T_4$  and  $IS$  in charcoal-treated serum**



**Fig. 7. Chromatograms of  $T_4$ ,  $T_3$ ,  $rT_3$ ,  $[^{13}C_9]T_4$  and IS in charcoal-treated serum spiked with each standard (5 ng/mL, 2  $\mu$ L)**

次に、検量線の直線性について検討した。検量線試料は、活性炭処理ラット血清（活性炭により甲状腺ホルモンを除去した血清）に  $T_4$ 、 $T_3$ 、 $rT_3$  及び  $[^{13}C_9]T_4$  の標準溶液（0.1 ~ 100 ng/mL）及び IS（2 ng/mL）を添加して調製した。定量範囲における回帰直線の決定係数 ( $r^2$ ) は、それぞれ 0.9994 ( $T_4$ )、0.9990 ( $T_3$ )、0.9972 ( $rT_3$ ) 及び 0.9958 ( $[^{13}C_9]T_4$ ) であり良好な直線性を示した。また、検量線の最小濃度（0.1 ng/mL）の理論値に対する偏差は、それぞれ -1.0%、2.0%、-5.0% 及び -1.0% であり、検量線下限の判定基準である  $\pm 20\%$  以内を満たしたことから、本法における定量下限値（LLOQ）を 0.1 ng/mL に設定した。

最後に、本法における精度及び真度を吟味した（Table 1）。日内再現性（ $n = 5$ ）における  $T_4$ 、 $T_3$ 、 $rT_3$  及び  $[^{13}C_9]T_4$  の精度は、それぞれ 5.2%、5.9%、4.8% 及び 5.9% 以下と良好な結果を示した。また、真度もそれぞれ 97.6 - 105.5%、94.0 - 99.4%、93.0 - 98.0% 及び 98.2 - 104.2% と良好であった。以上の結果は、精度及び真度ともに判定基準（それぞれ 15% 及び 85 - 115% 以内）を満たしており、本法は信頼性の高い測定法であることが示された。

**Table 1. Accuracy and precision of the intra-day assay**

Concentration (ng/mL)	T <sub>4</sub>	T <sub>3</sub>	rT <sub>3</sub>	[ <sup>13</sup> C <sub>9</sub> ]T <sub>4</sub>
0.1	103.0 ± 4.0 <sup>a</sup> (3.9) <sup>b</sup>	95.0 ± 4.0 (4.2)	96.0 ± 2.0 (2.1)	101.0 ± 6.0 (5.9)
0.2	106 ± 5.5 (5.2)	94.0 ± 5.5 (5.9)	93.0 ± 4.5 (4.8)	104.0 ± 4.5 (4.3)
4.0	104 ± 2.0 (1.9)	99.4 ± 2.8 (2.8)	98.0 ± 2.6 (2.7)	104.2 ± 1.9 (1.8)
80	97.6 ± 2.0 (2.1)	95.1 ± 2.1 (2.2)	97.6 ± 1.4 (1.4)	98.2 ± 1.3 (1.4)

<sup>a</sup> Accuracy (mean ±SD, %, n=5).

<sup>b</sup> Precision (coefficient of variation, %, n=5).

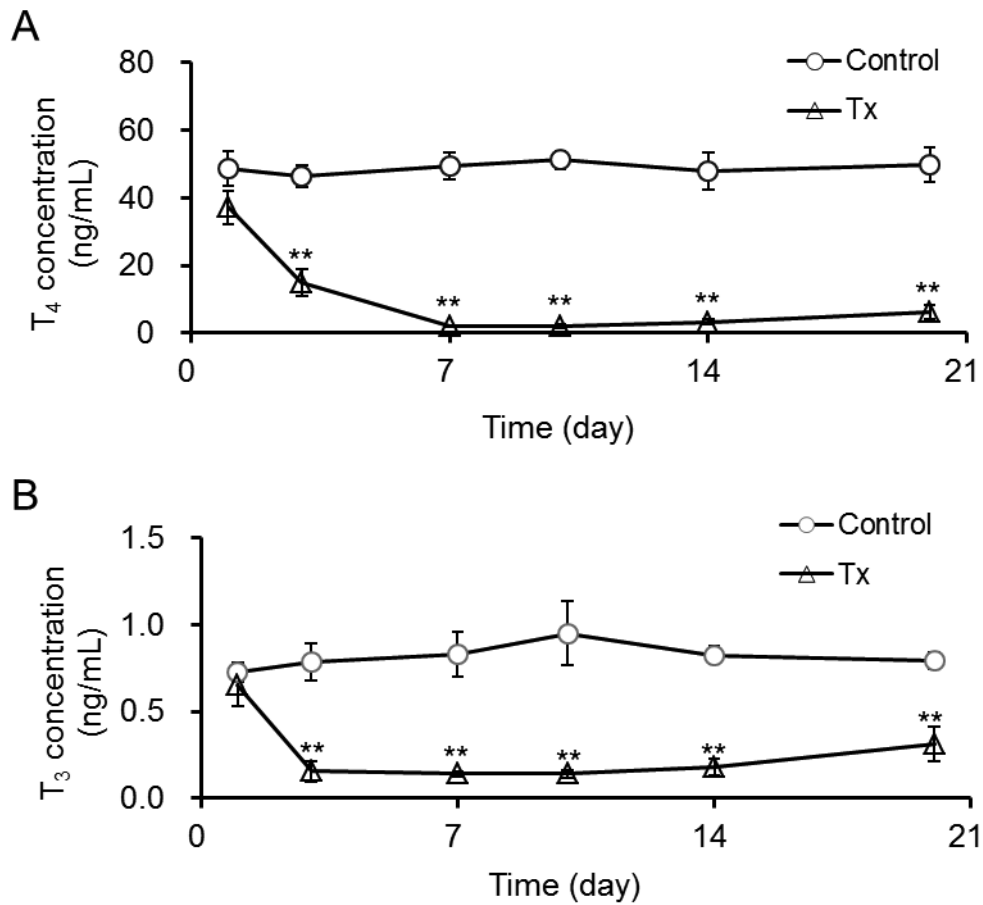
### 第3節 Tx ラットの血清中甲状腺ホルモン動態

血清中甲状腺ホルモン濃度は、TRH 及び TSH により甲状腺が刺激を受けることで上昇し、これらの過程は、血中に増加した甲状腺ホルモンによりネガティブフィードバックを受けることで制御されている。甲状腺より分泌される甲状腺ホルモンの大部分は T<sub>4</sub> である。よって、甲状腺機能低下症の患者にはチラージン（合成 T<sub>4</sub> 剤）の経口投与による補充が適用されており、その投与設定の判断として血清中ホルモン濃度の正常化及び維持が基準とされている。また、血清中甲状腺ホルモン濃度の測定は様々な甲状腺疾患の診断に有用であるが、著者は、甲状腺ホルモンの血清中動態もこれら疾患の診断に有用な情報に成り得ると考えた。そこで、前節において確立した online SPE LC/MS/MS 法を用い、正常及び Tx ラットの血清中甲状腺ホルモン濃度推移、並びに T<sub>4</sub> の血清中動態について検討した。

血清中 T<sub>4</sub> 及び T<sub>3</sub> 濃度は、甲状腺を外科的に摘除することで急速に低下し、Tx 後 7 日目では正常ラットの T<sub>4</sub> 及び T<sub>3</sub> 濃度のそれぞれ約 5% 及び 20% にまで低下した (Fig. 8)。また、rT<sub>3</sub> 濃度も T<sub>4</sub> 及び T<sub>3</sub> と同様、Tx 後急速に減少し、定量下限値 (0.1 ng/mL) 未満となった。加えて、血清中 TSH 濃度は Tx 後顕著に上昇し (Fig. 9)、甲状腺ホルモンの推移と負の相関が認められ、ヒトの甲状腺機能低下症と同様なホルモン変動を示した。しかし、上述したように血清中 T<sub>4</sub> 及び T<sub>3</sub> 濃度は Tx 処置により顕著に減少するものの、その後、完全に消失することはなく、低値ではあるが一定の濃度（定常状態）を維持することが明らかとなった (T<sub>4</sub>; 2 ng/mL、T<sub>3</sub>; 0.1 ng/mL 程度)。これは、当初、Tx により血清中甲状腺ホルモン濃度は経時的に低下し続け、最終的にゼロになるとの推測に反した結果であり、甲状腺ホルモンの調節機構が変動している可能性が考えられた。

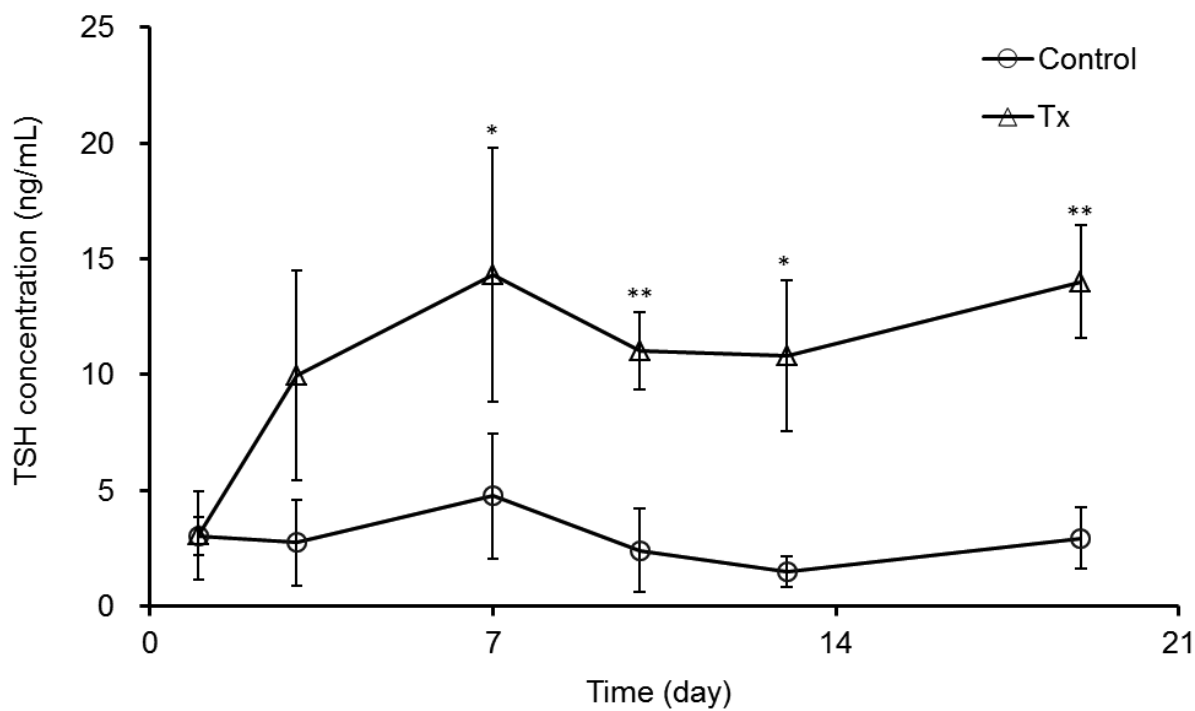
血中の甲状腺ホルモン濃度が低値ではあるが定常状態にあるということは、甲状腺ホルモンの産生（供給）と消失が平衡状態にあるということを示している (Fig. 10)。また、安定同位体で標識した T<sub>4</sub> ([<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub>) をトレーサーとして用いることで内因性 T<sub>4</sub> の血中動態を評価することが可能となる<sup>23)</sup>。そこで、正常及び Tx ラットに [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> (1.5 µg/kg)





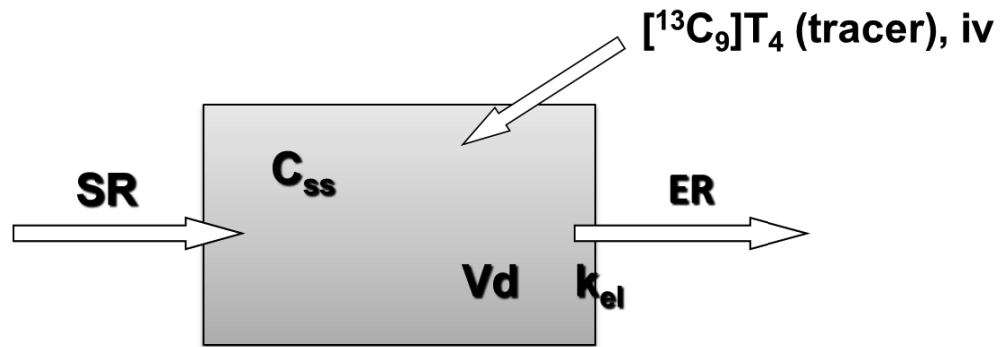
**Fig. 8. Changes of serum thyroid hormone concentrations in control and Tx rats**

A; T<sub>4</sub> and B; T<sub>3</sub>, mean ± SD (n=5), \*\**p* < 0.01 compared with the controls



**Fig. 9. Changes of serum TSH concentration in control and Tx rats**

mean  $\pm$  SD (n=5), \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 compared with the controls



**SR = ER (in steady state)**

$$SR = C_{ss} \times Vd \times k_{el}$$

$$C = C_0 e^{-k_{el} \times t}, Vd = X_0 / C_0$$

SR : supplying rate of  $T_4$  (ng/day) 、 ER : elimination rate of  $T_4$  (ng/day)

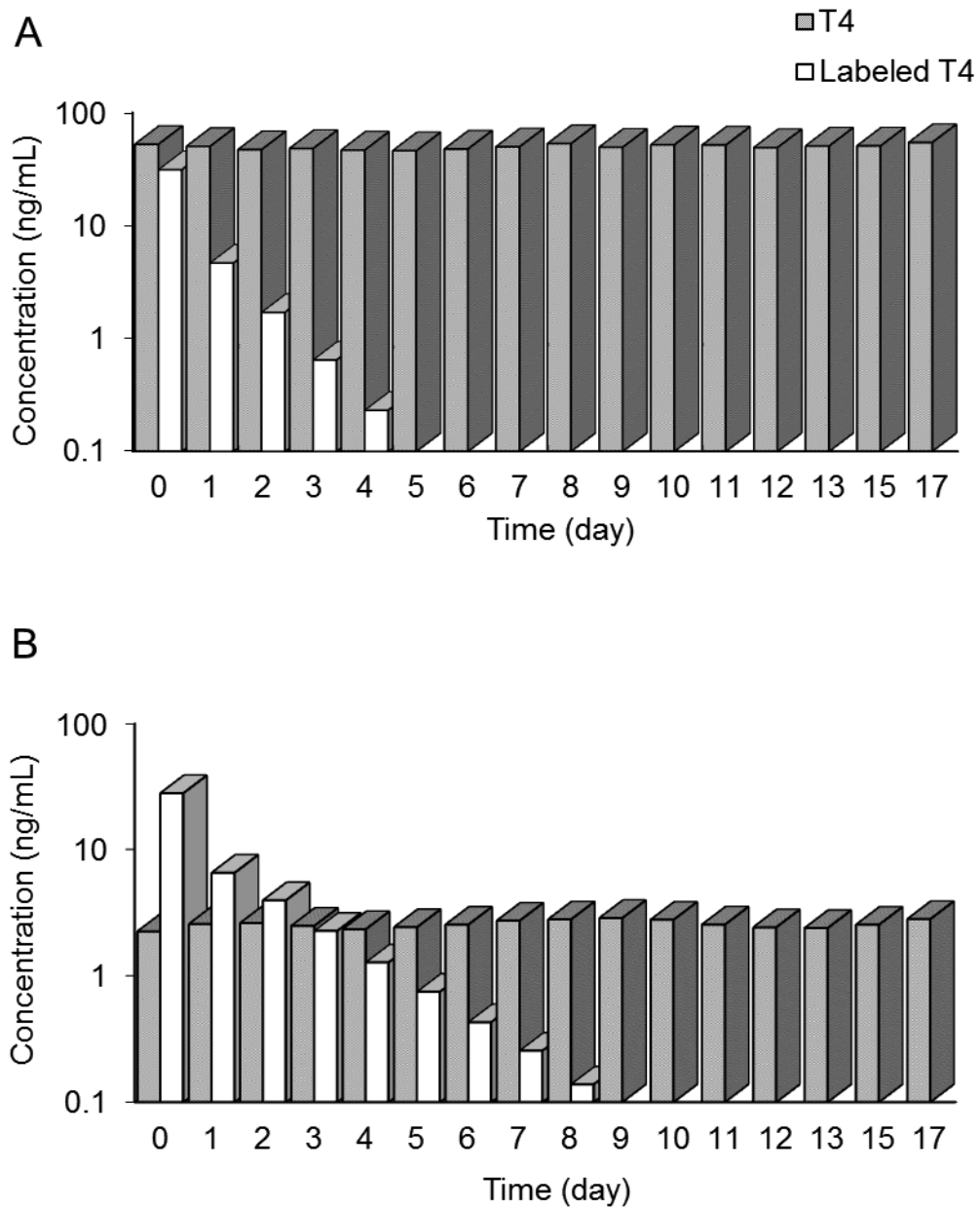
$C_{ss}$  : steady state serum  $T_4$  concentration (ng/mL) 、 Vd = volume of distribution (mL)

$k_{el}$  : elimination rate constant of  $[^{13}C_9]T_4$  (Day<sup>-1</sup>) 、 C : serum concentration of  $[^{13}C_9]T_4$  at time (ng/mL) 、  $C_0$  : serum concentration of  $[^{13}C_9]T_4$  at time zero (ng/mL) 、  $X_0$  : dosage of  $[^{13}C_9]T_4$  (ng)

**Fig. 10. Calculation of kinetic parameters of serum  $T_4$**

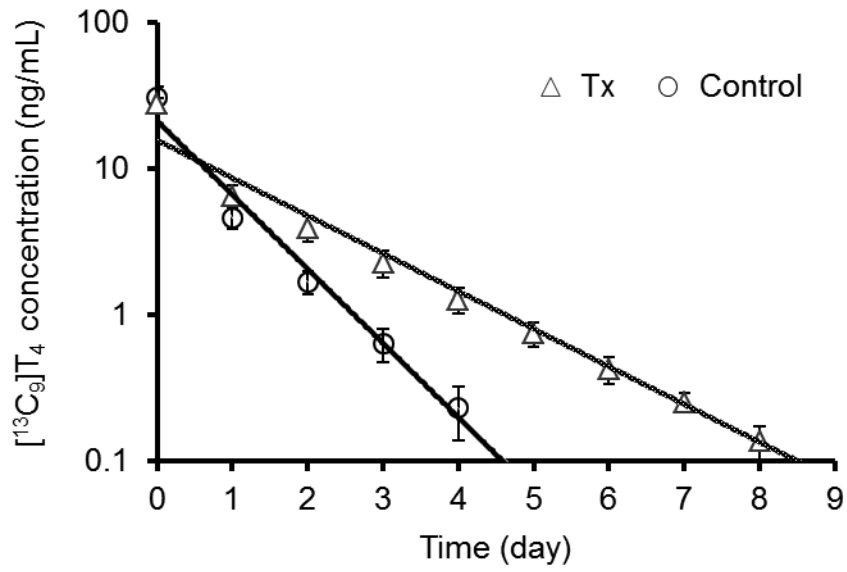
を単回静脈内投与したときの血清中  $T_4$  及び  $[^{13}C_9]T_4$  濃度推移について検討した (Fig. 11)。正常及び Tx ラットの血清中  $T_4$  濃度は、それぞれ約 50 ng/mL 及び 2.6 ng/mL と試験期間を通して一定の値を維持した。しかし、 $[^{13}C_9]T_4$  濃度はともに投与後急速に減少し、投与後 9 日までに定量下限値 (0.1 ng/mL) 未満となった。このように、内因性の甲状腺ホルモンは一定に維持されるのに対し、 $[^{13}C_9]T_4$  は血清中に保たれることなく消失した。すなわち、Tx ラットの血清中  $T_4$  濃度が維持される要因として、甲状腺以外の組織からの  $T_4$  の供給 (甲状腺以外の貯蔵組織からの分泌や腸肝循環など) が示唆された (Tx ラット  $T_4$  供給速度 (SR) : 39.9 ng/day、Table 2)。近年、Meischl ら<sup>24)</sup>により、ラット心筋細胞における  $T_4$  及び  $T_3$  の生成、並びに甲状腺ホルモン合成に必要な Tg、TPO、ナトリウム・ヨウ素シンポーター (NIS) 及びペンドリンの mRNA の発現が報告されている。さらに、甲状腺ホルモン分泌に関与するトランスポーターの mRNA が甲状腺以外の組織に発現していることも確認されており<sup>25-27)</sup>、甲状腺外組織による代償的な甲状腺ホルモン生成の可能性も考えられる。

次に、正常及び Tx ラットの血清中  $[^{13}C_9]T_4$  濃度を 1-コンパートメントモデル式に当てはめ、血清中  $T_4$  動態学的パラメータを算出した (Fig. 12、Table 2)。血清中  $[^{13}C_9]T_4$  の消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は、正常ラットが 0.59 day であるのに対し、Tx ラットの  $t_{1/2}$  は 1.16 day と約 2 倍長いことが明らかとなった。すなわち、Tx により体内からの  $T_4$  の消失が抑制されていることが示唆された。さらに、Tx による血清中  $T_4$  の消失抑制の程度を評価するため、正常及び Tx ラットの血清中  $T_4$  の動態学的パラメータ ( $k_{el}$  及び Vd) を用い、Tx 後に低値を維持したときの平均血清中  $T_4$  濃度 (2.6 ng/mL) における  $T_4$  の消失速度 (ER) をそれぞれ算出した (Table 3)。正常ラットの  $k_{el}$  及び Vd から算出した  $ER_{ent}$  (正常ラットにおける消失速度) は 90.2 ng/day であり、Tx ラットの消失速度 ( $ER_{tx}$  : 39.9 ng/day) より約 2.3 倍大きかった。これにより、Tx による  $T_4$  の消失抑制の程度は約 50.3 ng/day と見積もられ、前述した  $T_4$  供給速度とほぼ同等であることが示唆された。また、 $T_4$  の血中からの消失は、肝臓及び肝外組織における代謝、並びに胆汁や尿中への排泄過程によって主に制御されている。このことから、Tx による血清中  $T_4$  の消失抑制の機序は、これら制御機



**Fig. 11. Serum concentrations of T<sub>4</sub> and [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> after an intravenous administration of [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> to control (A) and Tx (B) rats**

Mean, n=5



**Fig. 12. Turnover of serum T<sub>4</sub> in control and Tx rats**

mean ± SD (n=5)

**Table 2. Supplying and turnover rates of serum T<sub>4</sub> in control and Tx rats**

Group	Vd (mL)	k <sub>el</sub> (day <sup>-1</sup> )	SR (ng/day)	t <sub>1/2</sub> (day)
Cnt	29.8 ± 4.8	1.19 ± 0.10	1723.4 ± 87.7	0.59 ± 0.05
Tx	26.4 ± 3.8	0.60 ± 0.02	39.9 ± 5.9	1.16 ± 0.05

mean ± SD (n=5)

Vd, distribution volume; k<sub>el</sub>, elimination rate constant; SR, supplying rate; t<sub>1/2</sub>, half-life

**Table 3. Suppression degree of elimination of serum T<sub>4</sub> in Tx rats**

ER <sup>a</sup> (ng/day)		S <sub>deg</sub> <sup>d</sup> (ng/day)
ER <sub>tx</sub> <sup>b</sup>	ER <sub>cnt</sub> <sup>c</sup>	
39.9 ± 5.9	90.2 ± 13.3	50.3

mean ± SD (n=5)

<sup>a</sup> ER: Elimination Rate, ER = SR (in steady state)

<sup>b</sup> ER<sub>tx</sub> = SR for Tx rats.

<sup>c</sup> ER<sub>cnt</sub> = C<sub>ss</sub> × Vd × k<sub>el</sub>. where C<sub>ss</sub> is 2.6 ng/mL for Tx rats, k<sub>el</sub> and Vd are each value for control rats.

<sup>d</sup> S<sub>deg</sub>: Suppression degree for elimination of T<sub>4</sub>, S = ER<sub>cnt</sub> - ER<sub>tx</sub>.



構の変動が主要因である可能性が考えられる。加えて、血中で  $T_4$  と結合している血漿タンパク質の発現が  $T_x$  により変動するとの報告<sup>28)</sup>もあり、これら様々な恒常性維持機構により  $T_x$  後の血中甲状腺ホルモンの濃度が維持されているものと推察された。

## 第4節 小括

本章では、甲状腺機能低下ラットの甲状腺ホルモンの血清中動態を検討するため、まず、安定同位体標識  $T_4$  ( $[^{13}C_9]T_4$ ) を合成した。次いで、online SPE LC/MS/MS による血清中  $T_4$ 、 $T_3$ 、 $rT_3$  及び  $[^{13}C_9]T_4$  濃度測定法を確立した。本法は選択性、精度及び再現性に優れ、且つ煩雑な抽出操作を必要としない測定法であった。次に、本法を用いて正常及び  $T_x$  ラットの血清中甲状腺ホルモン濃度推移、並びに  $T_4$  の血清中動態について検討した。甲状腺摘除後、ラット血清中  $T_4$  及び  $T_3$  濃度は急速に減少し、摘除後 7 日で正常ラットの  $T_4$  及び  $T_3$  濃度のそれぞれ約 5% 及び 20% にまで低下した。また、その後の  $T_4$  及び  $T_3$  濃度は一定の値を維持していたことから、甲状腺ホルモンの調節機構が変動している可能性が考えられた。 $T_x$  ラットに  $[^{13}C_9]T_4$  濃度を静脈内投与したときの血清中  $[^{13}C_9]T_4$  濃度は、速やかに減少し投与後 9 日目で定量下限値未満となった。また、 $T_x$  ラットにおける血清中  $[^{13}C_9]T_4$  の消失半減期は、正常ラットより約 2 倍長いことが明らかとなった。すなわち、甲状腺摘除によりラット血清中  $T_4$  濃度は、甲状腺以外の組織からの供給、並びに消失が抑制されることによって恒常性が維持されていることが示唆された。また、この時の  $T_x$  ラットの  $T_4$  供給速度は 39.5 ng/day、消失抑制の程度は 50.3 ng/day であった。

以上、 $T_x$  ラットの血清中  $T_4$  濃度は、甲状腺以外の組織からの  $T_4$  の供給及び消失の抑制により維持されることを定量的に明らかにし、本測定法が甲状腺疾患の病因診断に有用なツールと成り得ることが示唆された。

## 第2章 ヨード欠乏ラットの血清中甲状腺ホルモン動態

### 第1節 序

ヨードは甲状腺ホルモンの生合成に不可欠な構成成分であり、天然のヨードの多くは海水中に存在する。そのため、一般的には海藻類や魚介類を食すことで甲状腺ホルモン産生に十分量のヨードを摂取することができる。甲状腺機能低下症の一つであるヨード欠乏症は、食事からのヨウ素摂取量の不足によって引き起こされる疾患である<sup>29)</sup>。本疾患では、血中甲状腺ホルモン濃度が低下することにより中枢への負のフィードバック機構が働かず、下垂体から TSH が過剰に分泌されるため、多くの場合、甲状腺腫（甲状腺肥大）を発症する。さらに、成人では記憶力及び受精能の低下<sup>30)</sup>、乳児から小児期においては脳機能障害及び精神身体発達遅延が生じる<sup>31)</sup>。また、妊娠女性の場合、死産や流産のリスクが増大すること、胎児においては身体及び脳の発達遅延など先天性異常を引き起こすことがあり、クレチン症（先天性甲状腺機能低下症）及び聾啞症を来すとの報告がある<sup>29,32)</sup>。ヨード欠乏症は、風土病とも呼ばれ、アフリカ及びアジアの発展途上国、並びに北米などの土壤中にヨウ素が常に欠乏しているような地域において発症頻度が高い<sup>29,33)</sup>。そのため、1990年代初期よりカナダや米国をはじめ多数の国でヨウ素添加塩プログラムが実施され、現在、世界におけるヨード欠乏症の発症率は減少している<sup>34,35)</sup>。

食品及びヨウ素添加塩中のヨードは、ナトリウム塩やカリウム塩、無機ヨード、ヨウ素酸塩、ヨウ化物など様々な化学形態で存在しており<sup>36)</sup>、摂取したヨードは胃と小腸でほぼ完全に吸収され、そのほとんどは甲状腺に取り込まれる<sup>37,38)</sup>。この甲状腺へのヨード取り込みには2つの輸送担体が存在する。1つは、甲状腺濾胞細胞の基底膜に発現する NIS であり<sup>39)</sup>、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ イオンポンプと共役してヨウ素イオンを血中から細胞内へ送り込む。もう1つは、頂端細胞膜に発現するペンドリンであり<sup>40)</sup>、NISにより血流中から細胞へ取り込まれたヨードイオンを細胞質から濾胞腔へ放出する。これら2種の輸送機構により、甲状腺全容量当たりのヨードイオン量は正常血清に比べて20~50倍の高値となり<sup>41)</sup>、甲状

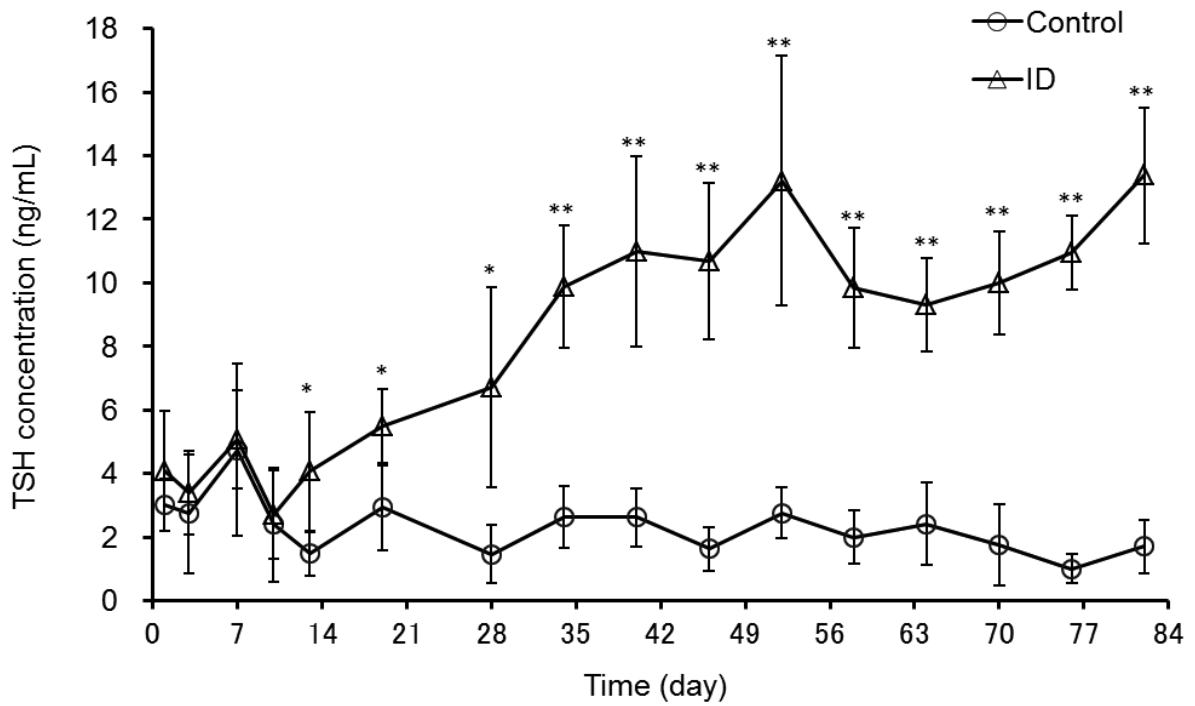
腺濾胞内腔にて甲状腺ホルモンの生合成に使用される。しかしながら、これら輸送担体が先天性異常などで機能しない場合、甲状腺機能低下症となる。NIS 遺伝子は 1996 年にクローニング<sup>42)</sup>されて以降、多くの変異型が報告されている。これらの遺伝子変異患者では血清中 T<sub>4</sub>濃度の重度の減少とそれに伴う TSH 刺激及び Tg の増大による甲状腺腫が認められることが知られている<sup>43-45)</sup>。特に新生児期から乳幼児期にかけて、甲状腺ホルモンは脳の発育に必須であることから、できるだけ早期に甲状腺ホルモンを補充することが重要となる。ペンドリンについては 1997 年にその遺伝子が明らかになり、その突然変異がペンドレッド症候群の発症原因であることが報告されている<sup>46)</sup>。ペンドレッド症候群には主に高度感音難聴、甲状腺腫及びヨード有機化障害の 3 つの症状がある<sup>47,48)</sup>。しかし、血清中 T<sub>4</sub>濃度の低下を含め甲状腺機能低下症の発症は緩徐である。これはペンドリンが無くてもヨードを甲状腺濾胞細胞に低率ではあるが輸送できるためである<sup>49)</sup>。そのため、多くの場合、ペンドレッド症候群の患者には過剰量のヨード摂取が適用されるが、重度の患者においては甲状腺ホルモンの補充が必要となる。

以上の背景を基に本章では、ヨード取込み機能障害に起因した甲状腺機能低下における血清中甲状腺ホルモン動態を検証するため、ヨード欠乏飼料を摂餌させたラット (ID ラット) の血清中甲状腺ホルモン濃度推移、並びに血清中 T<sub>4</sub>動態について検討した。また、機序の違い (Tx と ID) による甲状腺機能低下の差異について明らかにした。

## 第 2 節 ヨード欠乏ラットの血清中甲状腺ホルモン濃度

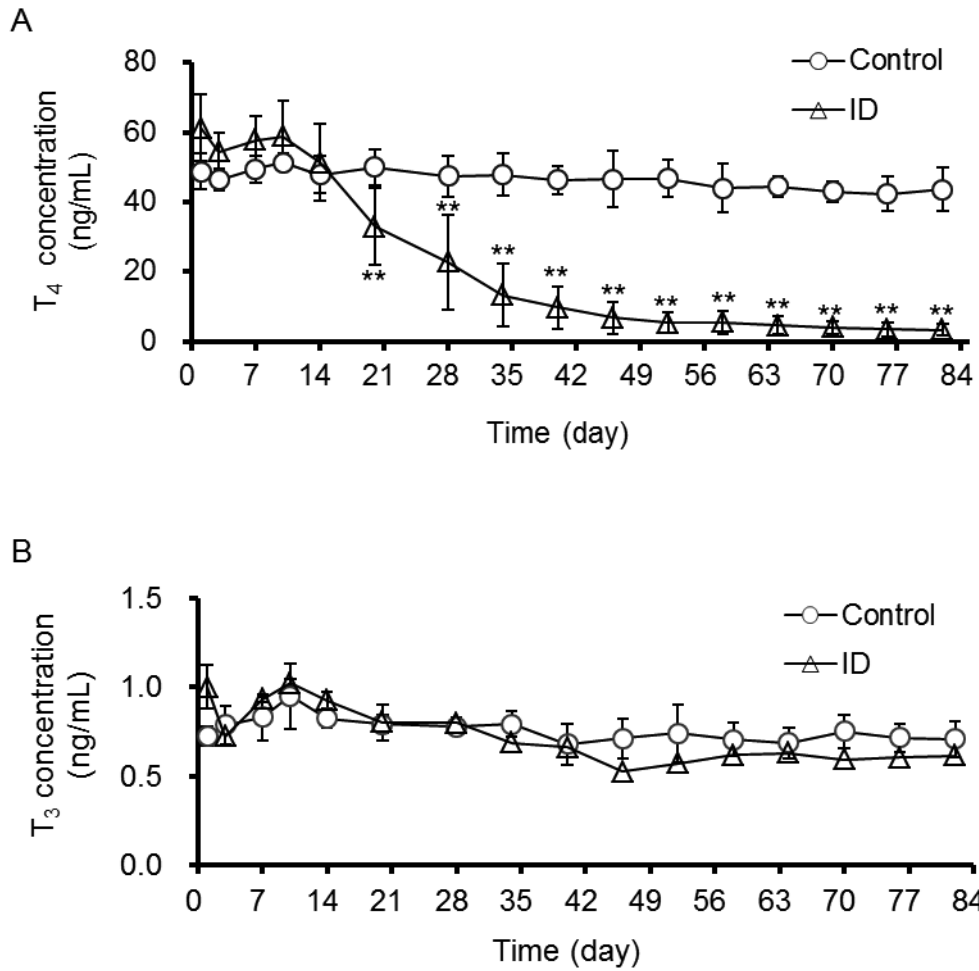
第 1 章において、血清中甲状腺ホルモン濃度は、甲状腺を摘除することによって急速に減少し、それに伴い TSH 濃度が増大すること、さらに、その時の血清中  $T_4$  濃度は、甲状腺以外の組織からの供給、並びに消失抑制によって恒常性が維持されている可能性が示唆された。これは、甲状腺摘除により甲状腺におけるホルモン生合成の全過程で機能を失った結果を表わしている。そこで本節では、甲状腺機能低下症の発症機序の違いによる血清中甲状腺ホルモン動態の差異を検証するため、ID ラットを用い、甲状腺へのヨードの取込み機能が阻害されたときの血清中甲状腺ホルモン濃度について検討した。

血清中 TSH 濃度は、正常ラットでは約 2.2 ng/mL と試験期間を通しほぼ一定であったのに対し、ID ラットでは試験開始 14 日目以降から顕著に増大し始め、82 日後では正常ラットの約 8 倍に上昇した (Fig. 13、正常 : 1.7 ng/mL、ID : 13.4 ng/mL)。また、ID ラットの甲状腺重量は、試験開始後 82 日で正常ラットの約 5.4 倍に増大し (正常 : 27.2 mg、ID : 146.4 mg)、ヒトと同様、ヨード欠乏による甲状腺腫の形成が認められた。ID ラットの血清中  $T_4$  濃度は、試験開始 21 日目以降、緩やかに減少を始め、82 日目では正常ラットの約 8 % にまで減少した (Fig. 14A、正常 : 43.65 ng/mL、ID : 3.34 ng/mL)。これらの結果から、ID ラットの血清中  $T_4$  濃度は、Tx ラットと比べ緩徐に減少するものの、その程度は Tx ラットと同等であることが示された。また、試験開始 60 日以降の  $T_4$  濃度は、低値であるが一定の値を維持したことから、ID ラットにおいても甲状腺ホルモンの血清中動態が変動している可能性が考えられた。一方、血清中  $T_3$  濃度は、試験期間を通して顕著な変動はなく、正常ラットと同等の推移を示し、Tx ラットとは明らかに異なる結果が得られた (Fig. 14B、正常 : 0.76 ng/mL、ID : 0.73 ng/mL)。この要因として、これまで血清中の  $T_3$  は、肝臓や腎臓などの甲状腺外組織において D1 酵素により  $T_4$  が脱ヨード化されることで主に産生されたものと考えられてきた<sup>50,51)</sup>。しかし、Galton ら<sup>52)</sup>は、 $T_4$  から  $T_3$  への脱ヨード化を行う D1 及び D2 を欠損させたマウスの実験において、血清中  $T_3$  は正常レベルを維持すること、並びに甲状腺中の Tg による直接的な生合成が血清中  $T_3$  の主要な供給源



**Fig. 13. Changes of serum TSH concentration in control and ID rats**

mean  $\pm$  SD (n=5), \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 compared with the controls



**Fig. 14. Changes of serum thyroid hormone concentrations in control and ID rats**

A; T<sub>4</sub> and B; T<sub>3</sub>, mean ± SD (n=5), \*\**p* < 0.01 compared with the controls

であると報告している。また、ヨード欠乏下では、血清中の  $T_3$  濃度が低下する前に血清中の  $T_4$  濃度が正常値の 25~5%にまで低下するとの報告もあり<sup>53)</sup>、これは甲状腺ホルモンが生合成される際、Tg を構成するチロシン残基のヨード化においてヨードの消費を抑えるため、DIT より MIT の方が多く生成することに起因していることが考えられる。さらに、ヨード不足を補完するために甲状腺及び全身のヨードのリサイクルを亢進させることで全身的な  $T_3$  欠乏を回避することが報告されている<sup>54)</sup>。すなわち、甲状腺には、ヨード欠乏に起因した甲状腺機能低下による甲状腺ホルモンの減少を防ぐため、 $T_4$  より活性型である  $T_3$  を優先的に生合成するオートレギュレーション機能が存在し、今回の結果はその機能が働いたことを示唆するものである。

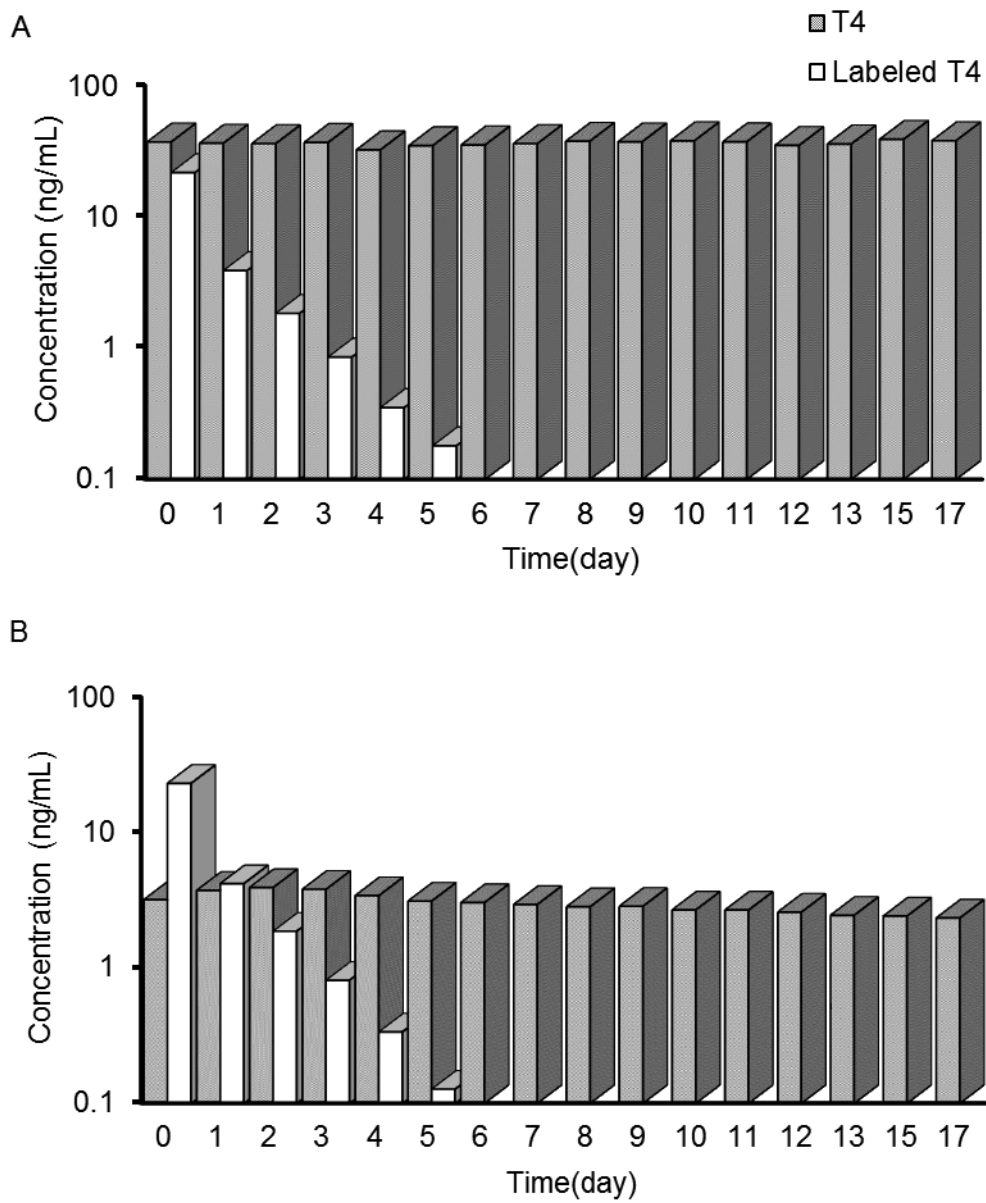


### 第 3 節 ヨード欠乏ラットの血清中 T<sub>4</sub> 動態

ID ラットの血清中 T<sub>4</sub> 濃度は、正常ラットの約 8% まで低下するものの、それ以後の T<sub>4</sub> 濃度は一定の値を維持した。すなわち、ヨード欠乏により甲状腺ホルモンの血清中動態が変動している可能性が考えられた。そこで、ID ラットに [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> を静脈内投与したときの血清中内因性 T<sub>4</sub> と [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> 濃度から血清中 T<sub>4</sub> 動態パラメータを算出し、正常ラットと比較することで血清中 T<sub>4</sub> 濃度が維持される要因について検討した。加えて、甲状腺機能低下の機序の違いによる内因性甲状腺ホルモン (T<sub>4</sub> 及び T<sub>3</sub>) と [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> 濃度の変動の差異について検証した。

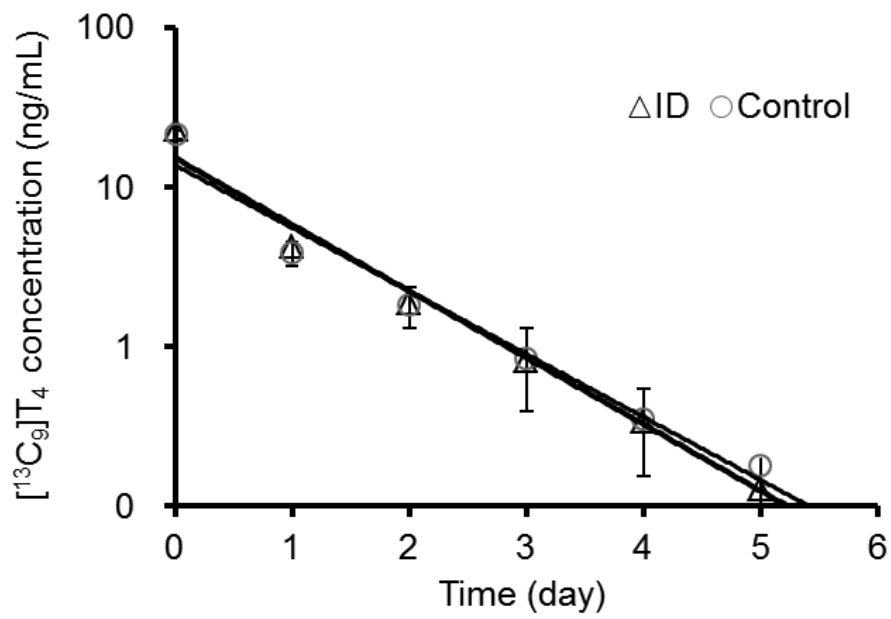
通常試料あるいはヨード欠乏飼料を 9 週間摂餌させたラットに [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> (1.5 µg/kg) を静脈内投与し、投与後 3 週間の血清中 T<sub>4</sub> 及び [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> 濃度推移について検討した (Fig. 15)。正常及び ID ラットの血清中 T<sub>4</sub> 濃度は、それぞれ 36.2 ng/mL 及び 3.0 ng/mL で試験期間中ほぼ一定の値を示した。しかし、血清中 [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> 濃度は、正常及び ID ラットともに静脈内投与後速やかに減少し、投与後 6 日目で定量下限値未満となった。すなわち、内因性の T<sub>4</sub> は一定に維持されるのに対し、トレーサーである [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> は血中に保たれることなく消失した。次に、正常及び ID ラットの血清中 [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> 濃度を 1-コンパートメントモデル式に当てはめ、血清中 T<sub>4</sub> 動態パラメータを算出した (Fig. 16、Table 4)。正常ラットの血清中 T<sub>4</sub> の k<sub>el</sub>、t<sub>1/2</sub> 及び Vd は、それぞれ 0.97 day<sup>-1</sup>、0.74 day 及び 51.3 mL であった。それに対し、ID ラットの k<sub>el</sub>、t<sub>1/2</sub> 及び Vd は、それぞれ 1.00 day<sup>-1</sup>、0.7 day 及び 43.7 mL であり、正常ラットのパラメータと同等であることが明らかとなった。これらの結果から、ID ラットの血清中 T<sub>4</sub> 濃度は、甲状腺を含め他の組織から供給されることにより低濃度で維持されるが、血中からの T<sub>4</sub> の消失は抑制されていないことが示唆された。

第 1 章において、甲状腺摘除により血清中 T<sub>4</sub> 及び T<sub>3</sub> 濃度がともに減少したことによる恒常性維持反応として、甲状腺外組織からの T<sub>4</sub> の供給及び消失抑制が働くことが示唆された。この時の Tx ラットにおける T<sub>4</sub> の供給速度は 39.9 ng/day であり、これは甲状腺以外の組織からの供給を示すものである。ID ラットの T<sub>4</sub> の供給速度は、130.4 ng/day で



**Fig. 15. Serum concentrations of T<sub>4</sub> and [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> after an intravenous administration of [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> to (A) control and (B) ID rats**

Mean, n=5



**Fig. 16. Turnover of serum T<sub>4</sub> in control and ID rats**

mean ± SD (n=5)

あり (Table 4)、これは甲状腺及びそれ以外の組織からの供給を表している。すなわち、Tx 及び ID ラットの甲状腺外組織による供給速度が等しいと仮定した場合、ID ラットの甲状腺における T<sub>4</sub> 供給速度は約 90 ng/day となり、正常ラットの供給速度の 5%程度にまで減少したことが示唆された。これは前述した Pedraza らの報告<sup>53)</sup>と一致する結果であった。また、Tx ラットでは血清中 T<sub>4</sub> の消失抑制が認められたが、ID ラットでは認められなかった。これは、第 2 節で述べたように、Tx ラットでは甲状腺が存在しないため T<sub>4</sub> 及び T<sub>3</sub> の産生が大幅に減少し、その恒常性維持反応として血清中 T<sub>4</sub> の消失抑制が働き、ID ラットでは甲状腺のオートレギュレーション機能により T<sub>3</sub> の生合成が優先されることで血清中 T<sub>3</sub> 濃度が維持されたためと考えられた。すなわち、甲状腺機能低下症の発症機序の違いによって異なる恒常性維持機構が働くこと、並びに血清中 T<sub>4</sub> 動態は T<sub>3</sub> 濃度により制御されている可能性が推察された。

**Table 4. Supplying and turnover rates of serum T<sub>4</sub> in control and ID rats**

Group	Vd (mL)	k <sub>el</sub> (day <sup>-1</sup> )	SR (ng/day)	t <sub>1/2</sub> (day)
Control	51.3 ± 7.0	0.97 ± 0.18	1783.7 ± 265.4	0.74 ± 0.15
ID	43.7 ± 4.7	1.00 ± 0.11	130.4 ± 20.6	0.70 ± 0.09

mean ± SD (n=5)

Vd, distribution volume; k<sub>el</sub>, elimination rate constant; SR, supplying rate; t<sub>1/2</sub>, half-life

## 第4節 小括

本章では、ヨード取込み機能障害に起因した甲状腺機能低下における血清中甲状腺ホルモン動態を検証するため、ヨード欠乏飼料を摂餌させたラット（IDラット）の血清中甲状腺ホルモン濃度推移、並びに血清中  $T_4$  動態について検討した。また、これにより機序の違い（TxとID）による甲状腺機能低下の差異について検証した。

ヨード欠乏飼料を摂餌させることで血清中  $T_4$  濃度は緩やかに減少し、試験終了時（82日目）には正常ラットの約8%にまで低下した。しかし、試験開始60日目以降の  $T_4$  濃度は一定の値を維持したことから、IDラットにおいても甲状腺ホルモンの血清中動態が変化している可能性が考えられた。一方、血清中  $T_3$  濃度は、試験期間を通して顕著な変動はなく、正常ラットの  $T_3$  濃度と同等の推移を示し、Txラットとは明らかに異なる結果であった。また、 $[^{13}C_9]T_4$  を静脈内投与したときの血清中  $[^{13}C_9]T_4$  濃度は、正常及びIDラットともに投与後速やかに減少し、投与後6日目で定量下限値未満となった。さらに、IDラットの血清中  $T_4$  動態パラメータは正常ラットのものとほぼ同等であった。これらのことから、IDラットの血清中  $T_4$  濃度は、甲状腺を含め他の組織から供給されることにより低濃度で維持されるが、Txラットのように血中からの  $T_4$  の消失は抑制されないことが示唆された。この要因として、Txラットでは甲状腺摘除により血清中  $T_4$  及び  $T_3$  がともに減少したため、その恒常性維持反応として血清中からの  $T_4$  消失が抑制されたのに対し、IDラットではヨード欠乏に起因した甲状腺ホルモンの減少を防ぐため、甲状腺において  $T_4$  より活性型である  $T_3$  を優先的に生合成するオートレギュレーション機能、並びにヨード不足を補完するために甲状腺及び全身のヨードのリサイクルを亢進させることで血清中  $T_3$  濃度が維持されたためと考えられた。すなわち、血清中  $T_4$  動態は  $T_3$  により制御されており、Txによる血清中  $T_4$  消失抑制は血清中  $T_3$  濃度の低下が要因である可能性が示唆された。

以上、甲状腺機能低下症の発症機序の違いによって甲状腺ホルモンの血清中動態に顕著な差が認められ、それぞれ異なる恒常性維持機構が働くことが示唆された。

## 第3章 Txによるラット血清中T<sub>4</sub>の消失抑制メカニズム

### 第1節 序

甲状腺機能低下症は、最も一般的な甲状腺機能の臨床的障害であり、先天性甲状腺機能障害、慢性自己免疫疾患、外科手術、放射線治療、ヨード欠乏などによる原発的な甲状腺障害、並びに視床下部や下垂体の疾患による中枢性機能障害などにより引き起こされる。これら様々な要因により、甲状腺ホルモンの生合成や分泌が減少することで神経系、心臓及び代謝など各種器官の働きが低下し、倦怠感、除脈及び粘液水腫など多様な症状が現れる。

これまでに著者は、2種のモデル動物を作製し、それぞれの血清中甲状腺ホルモン動態について検討した。1つは甲状腺摘除により甲状腺におけるホルモン生合成の全過程で機能を失ったTxモデルであり、もう1つはヨード欠乏食を摂餌させることで甲状腺ホルモン生合成に必要な原料であるヨードの供給を断ったIDモデルである。その結果、甲状腺機能低下を惹起する機序の違いにより血清中甲状腺ホルモン動態が異なることが示唆された。すなわち、①Txにより血清中T<sub>4</sub>及びT<sub>3</sub>濃度は顕著に低下するのに対し、IDではT<sub>4</sub>のみ顕著に低下すること、②血清中からのT<sub>4</sub>の消失は、Txにより抑制されるが、IDでは変化しないことである。また、これらの機序として、Txラットでは甲状腺によるT<sub>4</sub>及びT<sub>3</sub>の生合成機能障害により恒常性維持反応として血清中T<sub>4</sub>の消失が抑制されること、IDラットでは甲状腺のオートレギュレーション機能によりT<sub>3</sub>の生合成が優先されることで血清中T<sub>3</sub>濃度が維持されることが推察された。さらに、これらのことから、血清中T<sub>4</sub>動態はT<sub>3</sub>により制御されており、Txによる血清中T<sub>4</sub>消失抑制は血清中T<sub>3</sub>濃度の低下が要因である可能性が考えられた。

血中に分泌された甲状腺ホルモンは、多くの制御機構により恒常性が維持されている。すなわち、血漿タンパク質による血中での甲状腺ホルモンの保持、肝臓及び肝外組織中の酵素による代謝、肝臓及び腎臓から胆汁及び尿中への排泄、肝臓から胆汁とともに十

二指腸内に分泌されたのち再吸収される腸肝循環、並びに腎臓の尿細管からの再吸収などの制御機構が挙げられる。甲状腺で生合成された  $T_4$  は、約 3 分の 2 が脱ヨード酵素により  $T_3$  及び  $rT_3$  に代謝され<sup>55-58)</sup>、残りの 3 分の 1 の大部分が抱合代謝酵素である UGT 及び SULT により抱合代謝を受け体外に排泄される<sup>59,60)</sup>。さらに一部のグルクロン酸抱合体は腸管内に存在する  $\beta$ -グルクロニダーゼにより脱抱合されて腸肝循環することが知られている<sup>59,60)</sup>。すなわち、上述した制御機構の中でも、肝臓等に発現している各種代謝酵素による構造変換が血清中  $T_4$  の恒常性維持に大きな役割を果たしているものと考えられた。

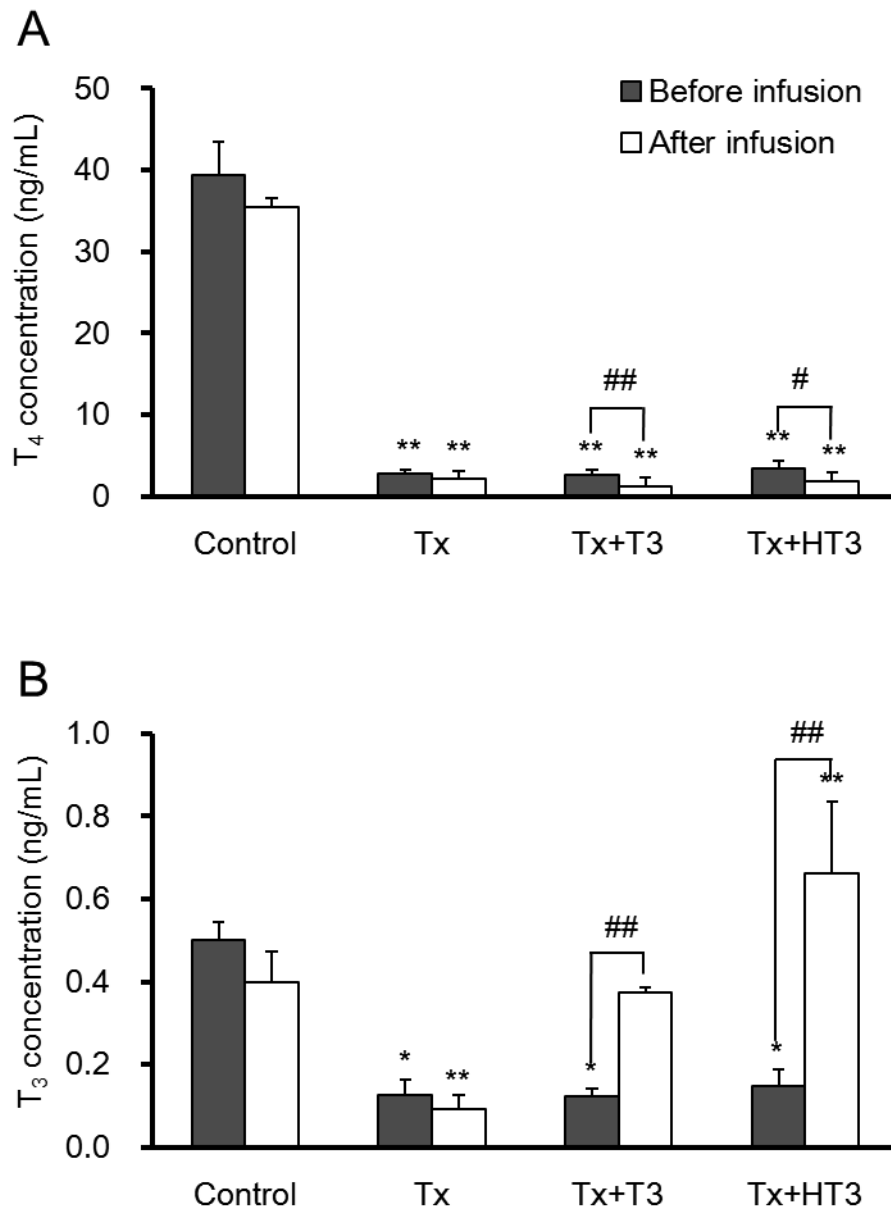
以上の背景を基に本章では、まず、Tx による血清中  $T_4$  消失抑制が血清中  $T_3$  濃度の低下が要因であることを検証するため、Tx ラットに  $T_3$  を補充したときの血清中  $T_4$  動態を精査した。次いで、Tx による血清中  $T_4$  消失抑制のメカニズムを明らかにするため、 $T_4$  の主要代謝酵素である脱ヨード酵素、UGT 及び SULT の組織中酵素活性及び mRNA 発現について検討した。加えて、 $T_3$  を補充したときのこれら代謝酵素の酵素活性及び mRNA 発現の変動についても検証した。



## 第2節 Txによる血清中T<sub>4</sub>消失抑制に対するT<sub>3</sub>補充効果

Txラットの血清中T<sub>4</sub>のt<sub>1/2</sub>は正常ラットのそれと比べ約2倍延長した。しかし、IDラットの血清中T<sub>4</sub>のt<sub>1/2</sub>は正常ラットのt<sub>1/2</sub>と同等であった。この要因として、Txラットでは血清中のT<sub>3</sub>濃度が低下したことによる恒常性維持反応として血中からのT<sub>4</sub>の消失が抑制された可能性が考えられた。そこで本節では、本仮説を検証するため、TxラットにT<sub>3</sub>を補充した後、<sup>[13C<sub>9</sub>]</sup>T<sub>4</sub>を静脈内投与したときの血清中T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>及び<sup>[13C<sub>9</sub>]</sup>T<sub>4</sub>濃度推移を検討した。また、血清中T<sub>4</sub>の動態パラメータを算出し、甲状腺摘除による血清中T<sub>4</sub>の消失抑制作用に対するT<sub>3</sub>の補充効果について検討した。

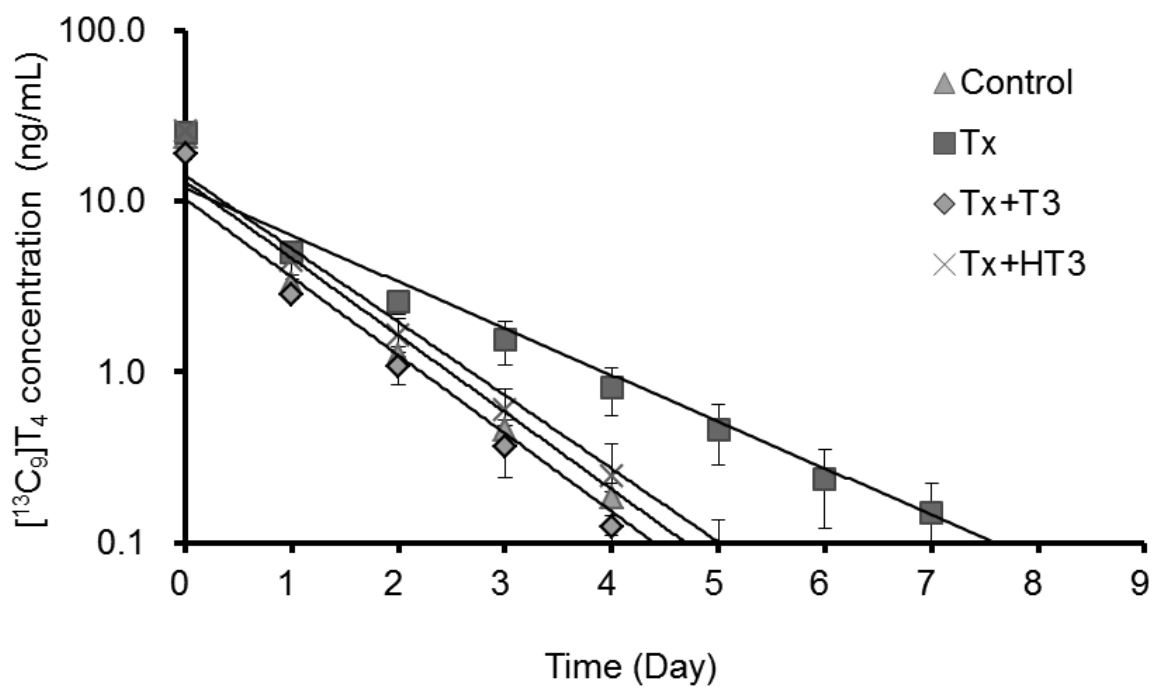
浸透圧ポンプを用い、正常ラットに投与媒体 (Control群)、並びにTxラットにそれぞれ投与媒体 (Tx群)、T<sub>3</sub> (1.5 µg/head/day (Tx+T<sub>3</sub>群)、7.5 µg/head/day (Tx+HT<sub>3</sub>群)) を持続的に補充したときの投与前及び投与2週間後の血清中T<sub>4</sub>及びT<sub>3</sub>濃度を測定した (Fig. 17)。正常ラットの血清中T<sub>4</sub>及びT<sub>3</sub>濃度は、投与媒体を補充した前後で変動はなく、それぞれ35.5 - 39.3及び0.4 - 0.5 ng/mLであった。Txラットの血清中T<sub>4</sub>及びT<sub>3</sub>濃度は、正常ラットのT<sub>4</sub>及びT<sub>3</sub>濃度と比べ有意に減少したものの投与媒体を補充した前後で差はなかった (T<sub>4</sub>: 2.1 - 2.7 ng/mL、T<sub>3</sub>: 0.09 - 0.12 ng/mL)。Tx+T<sub>3</sub>及びTx+HT<sub>3</sub>ラットの血清中T<sub>3</sub>濃度は、T<sub>3</sub>補充前ではそれぞれ0.12及び0.15 ng/mLであったのに対し、補充後はそれぞれ0.37及び0.66 ng/mLと有意な上昇が認められた。また、これらのT<sub>3</sub>濃度は、正常ラットの投与媒体補充後のT<sub>3</sub>濃度のそれぞれ約94及び170%であり、ともにT<sub>3</sub>濃度は生理的レベルもしくはそれ以上にまで回復していた。加えて、Tx+T<sub>3</sub>及びTx+HT<sub>3</sub>ラットの血清中T<sub>4</sub>濃度は、T<sub>3</sub>補充前ではそれぞれ2.6及び3.4 ng/mLであったのに対し、補充後はそれぞれ1.3及び1.9 ng/mLと有意な低下 (約50及び44%) が認められた。次に、これらのラットに<sup>[13C<sub>9</sub>]</sup>T<sub>4</sub>を単回静脈内投与した時の血清中<sup>[13C<sub>9</sub>]</sup>T<sub>4</sub>濃度及び動態パラメータを検討した (Fig. 18、Table 5)。投与媒体を補充した正常及びTxラットの血清中T<sub>4</sub>のt<sub>1/2</sub>はそれぞれ0.60及び1.05 dayであり、これらの結果は第1章の結果と一致するものであった。しかし、血清中T<sub>3</sub>濃度を生理的レベルに回復させたTx+T<sub>3</sub>ラ



**Fig. 17. Serum (A) T<sub>4</sub> and (B) T<sub>3</sub> concentrations before and after subcutaneous infusion of vehicle or T<sub>3</sub> (1.5 or 7.5 µg/head/day) in control and Tx rats**

mean ± SD (n=5), \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 compared with the controls.

#*p* < 0.05 and ##*p* < 0.01 compared with the before infusions.



**Fig. 18. Serum  $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  concentrations after an intravenous administration of  $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  ( $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) to control and Tx rats with infused vehicle or  $\text{T}_3$  ( $1.5$  or  $7.5 \mu\text{g}/\text{head}/\text{day}$ )**

mean  $\pm$  SD (n=5)

**Table 5. Turnover rate and half-life of serum T<sub>4</sub> in control and Tx rats with infused vehicle or T<sub>3</sub> (1.5 or 7.5 µg/head/day)**

T <sub>3</sub> dose <sup>a</sup>	Control	Tx	Tx+T3	Tx+HT3
	0	0	1.5	7.5
k <sub>el</sub> (day <sup>-1</sup> )	1.16 ± 0.11	0.67 ± 0.07**	1.27 ± 0.18 <sup>##</sup>	1.15 ± 0.14 <sup>##</sup>
t <sub>1/2</sub> (day)	0.60 ± 0.06	1.05 ± 0.11**	0.56 ± 0.08 <sup>##</sup>	0.61 ± 0.08 <sup>##</sup>

mean ± SD (n=5)

\*\**p* < 0.01 compared with the controls.

<sup>##</sup>*p* < 0.01 compared with the Txs. k<sub>el</sub>, elimination rate constant; t<sub>1/2</sub>, half-life.

<sup>a</sup> The dose are in micrograms per head/day.

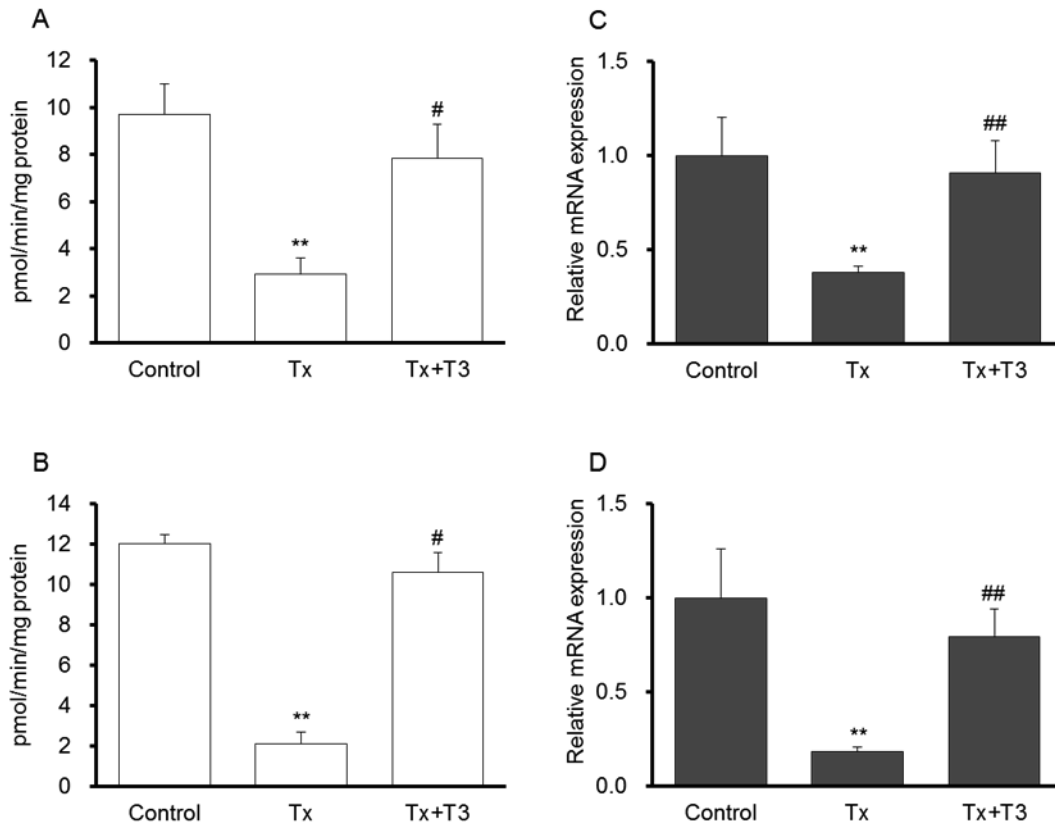
ットの血清中  $T_4$  の  $t_{1/2}$  は 0.56 day であり、正常ラットの  $t_{1/2}$  と同等にまで回復することが示された。すなわち、これらの結果から、Tx による血清中  $T_4$  の消失抑制は、血清中  $T_3$  濃度が低下したことによる恒常性維持反応であることが示唆された。加えて、Fig. 17 に示すように Tx+T3 群の  $T_3$  補充前後の血清中  $T_4$  濃度差の結果から、この恒常性維持反応によって血清中からの  $T_4$  消失量の約 50% が抑制されていることが明らかとなった。一方、 $T_3$  を過剰に補充することで血清中  $T_4$  の消失が亢進されると予想したものの、Tx+T3 ラットの 5 倍量の  $T_3$  を補充させた Tx+HT3 ラットの血清中  $T_4$  の  $t_{1/2}$  は 0.61 day であり、正常ラットの  $t_{1/2}$  と同等であった。さらに、その時の血清中  $T_3$  濃度は、前述したように正常ラットの  $T_3$  濃度の 2 倍にも満たなかった。これらの要因として、 $T_3$  欠乏状態にある標的組織への  $T_3$  の取込み、並びに血中からの  $T_3$  の消失亢進の 2 つの機序の可能性が考えられる。上記現象におけるこれら 2 つの機序の寄与を明らかにするには更なる検証が必要である。しかし、前者については、組織中への甲状腺ホルモンの取込みを担う有機アニオン輸送ポリペプチド 1C1 (OATP1C1)<sup>61)</sup> 及びモノカルボン酸トランスポーター 8 (MCT8)、MCT10<sup>62)</sup> の発現や組織中  $T_3$  濃度を検討することで検証が可能であると考えられる。また、後者については、安定同位体で標識した  $T_3$  を用いた血中動態試験によりその関与を明らかにすることが可能であると推察される。

### 第3節 Txによる血清中T<sub>4</sub>消失抑制における脱ヨード酵素の関与

血中に分泌された甲状腺ホルモンは、多くの機構により制御されている。その中でも肝臓等に発現している各種甲状腺ホルモン代謝酵素による構造変換が血清中T<sub>4</sub>の恒常性維持に大きな役割を果たしているものと考えられた。そこで本節では、Txによる血清中T<sub>4</sub>消失抑制のメカニズムの一端を明らかにするため、T<sub>4</sub>の主要代謝酵素である脱ヨード酵素の組織中酵素活性及びmRNA発現について検討した。加えて、TxラットにT<sub>3</sub> (1.5 µg/head/day)を補充したときの脱ヨード酵素の酵素活性及びmRNA発現の変動についても検証した。

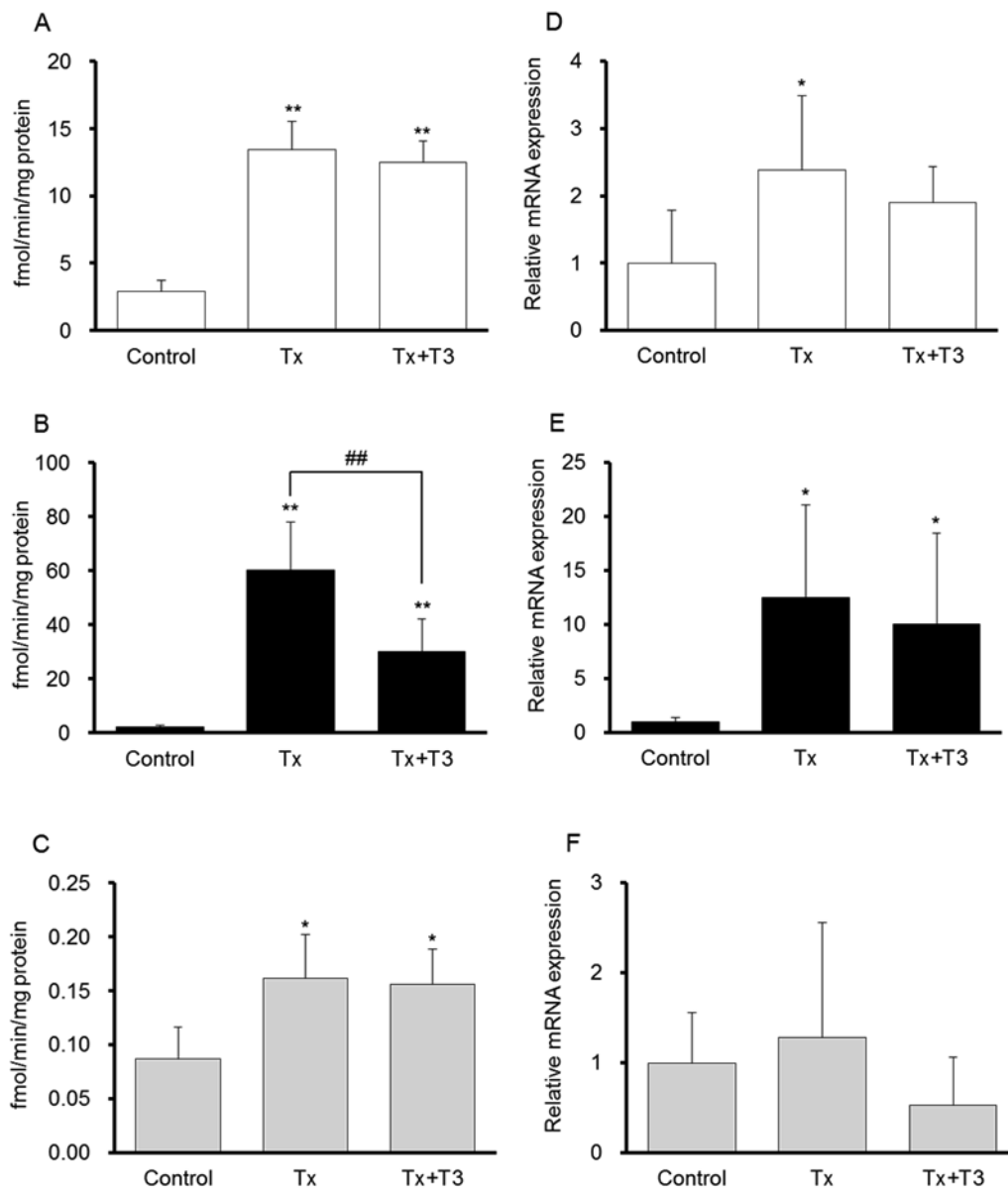
脱ヨード酵素には3つのサブタイプ(D1、D2及びD3)が存在し、それぞれ異なる組織に発現している。これら3種のうち、T<sub>4</sub>から活性型であるT<sub>3</sub>への変換を担うD1及びD2について酵素活性及びmRNA発現を検討した。Fig. 19に示すように、Txラットの肝臓及び腎臓のD1活性は、正常ラットの活性のそれぞれ30%及び18%であり、Txによる有意な活性の低下が認められた。また、この時の両組織におけるD1 mRNAの発現量もTxにより有意に減少し、正常ラットのD1 mRNA発現量のそれぞれ38%及び18%であった。さらに、TxラットにT<sub>3</sub>を補充することにより両組織のD1活性及びmRNAの発現量は、Txラットの値と比べ有意に上昇し、正常ラットの値とほぼ同等にまで回復した。すなわち、Txによる血清中T<sub>4</sub>の消失抑制は、肝臓及び腎臓のD1活性の低下によるT<sub>4</sub>の脱ヨード化の抑制が主な機序の1つであることが明らかとなった。さらに、これら組織のD1活性は、血清中T<sub>3</sub>濃度によって転写レベルで制御されていることが示唆された。

次に、大脳、褐色脂肪(BAT)及び骨格筋におけるD2の酵素活性及びmRNA発現について検討した(Fig. 20)。大脳、BAT及び骨格筋におけるD2活性は、正常ラットのD2活性のそれぞれ462%、3055%及び186%であり、Txによる有意な活性の上昇が認められた。大脳及びBATのD2 mRNA発現量もTxにより有意に上昇し、正常ラットのD2発現量のそれぞれ239%及び1252%であった。また、骨格筋のD2のmRNA発現量もわずかではあるがTxによる上昇が認められた。これら組織中のT<sub>3</sub>濃度は、甲状腺機能低下に



**Fig. 19. D1 activity and mRNA expression in liver and kidneys of control and Tx rats with infused vehicle or T<sub>3</sub> (1.5 µg/head/day)**

Activity in (A) liver and (B) kidneys. mRNA expression in (C) liver and (D) kidneys. mean ± SD (n=6), \*\*p < 0.01 compared with the controls. #p < 0.05 and ##p < 0.01 compared with the Tx.



**Fig. 20. D2 activity and mRNA expression in brain, BAT and skeletal muscles of control and Tx rats with infused vehicle or T<sub>3</sub> (1.5 µg/head/day)**

Activity in (A) brain, (B) BAT, and (C) skeletal muscles. mRNA expression in (D) brain, (E) BAT, and (F) skeletal muscles.

mean ± SD (n=6), \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 compared with the controls.

##*p* < 0.01 compared with the Tx.

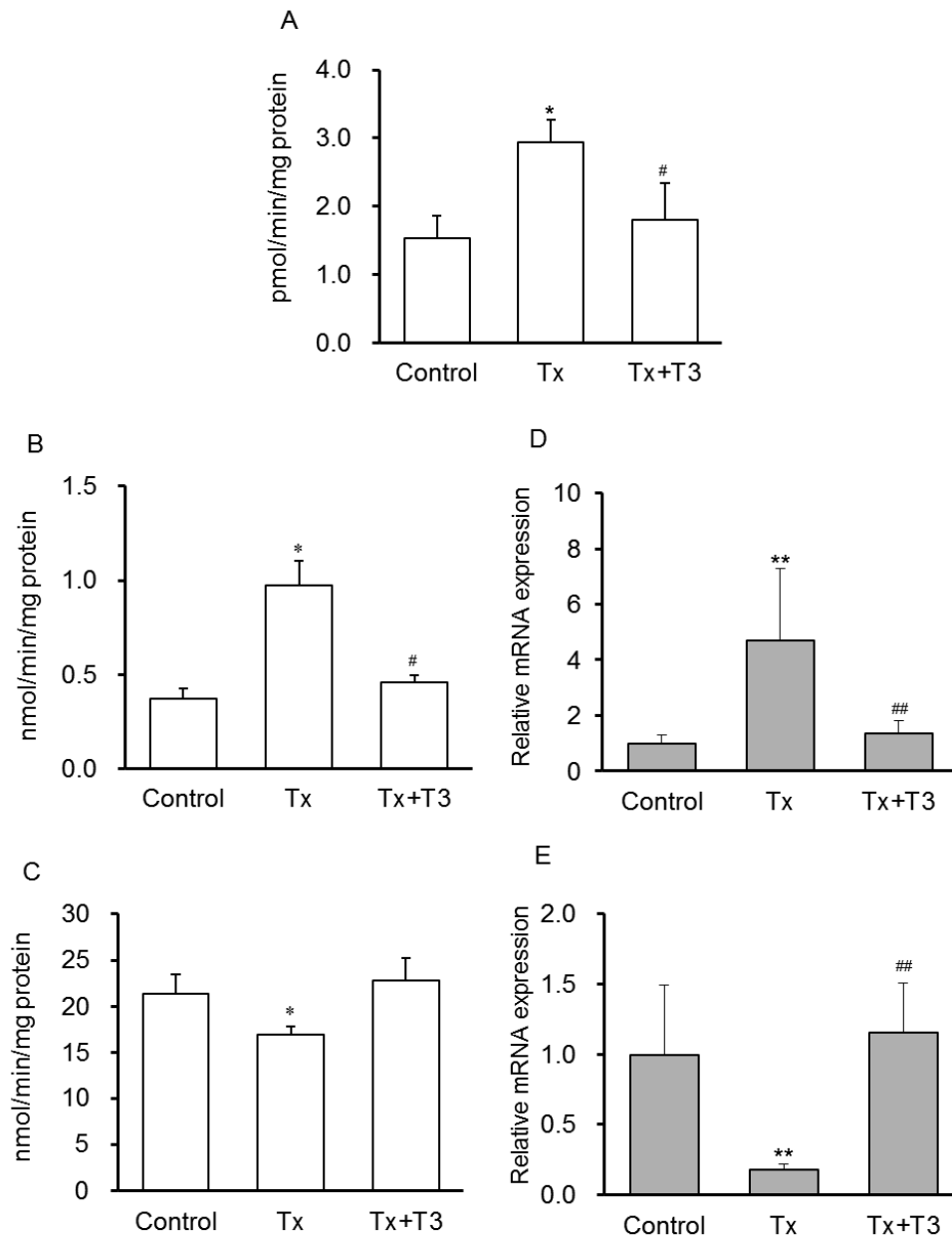


より顕著に減少することから<sup>63)</sup>、TxによるD2活性の上昇は、減少した組織中T<sub>3</sub>濃度を増大させるための代償反応であることが示唆された。しかし、TxラットにT<sub>3</sub>を補充したBATのD2活性は、Txラットの値と比べ約50%にまで低下したものの正常ラットの値までは回復しなかった。さらに、大脳及び骨格筋のD2活性はほとんど変動せず、組織によりT<sub>3</sub>の補充効果に差があることが示された。これらのことより、T<sub>3</sub>補充によりTxラットの血清中T<sub>3</sub>濃度を正常レベルに回復させても、組織中のT<sub>3</sub>濃度は正常レベルにまで回復しない可能性が推察された。すなわち、これらD2活性は、組織中T<sub>3</sub>濃度により制御されており、TxラットにT<sub>3</sub>を補充しても組織中のT<sub>3</sub>濃度が正常レベルにまで回復していないため高値を維持したものと推察された。D2は、熱産生に重要な組織である脳、BAT、骨格筋、甲状腺及び胎盤の小胞体に存在する。これらの組織中のT<sub>3</sub>は、血中から取込まれたT<sub>4</sub>をD2によって選択的にT<sub>3</sub>に変換する経路と<sup>13,56,64)</sup>、MCT8、MCT10及びOATP1C1などの輸送担体により血中T<sub>3</sub>を直接細胞内に取込む経路によって供給されることが知られている<sup>65)</sup>。さらに、BATと脳の細胞内で消費されるT<sub>3</sub>の供給率は、前者と後者の経路でそれぞれ50:50及び80:20であるとの報告もある<sup>63,66)</sup>。すなわち、上述した2つの経路の寄与率が異なるため、BATではT<sub>3</sub>を補充することでTxラットのD2活性が50%に低下したのに対し、大脳と骨格筋ではD2活性が変動しなかったものと推察された。

## 第 4 節 Tx による血清中 T<sub>4</sub> 消失抑制における抱合代謝酵素の関与

前節において Tx による血清中 T<sub>4</sub> の消失抑制の機序として、肝臓及び腎臓における T<sub>4</sub> の脱ヨード化の抑制が関与していると示唆された。しかし、T<sub>4</sub> は肝臓及び腎臓においてグルクロン酸や硫酸との抱合代謝により胆汁や尿中に排泄される<sup>15,16)</sup>。これら抱合代謝を担う分子種としてグルクロン酸抱合では Ugt1a1 及び Ugt1a6、硫酸抱合では phenol SULTs (Sult1a1 及び 1c1) が報告されている<sup>67-69)</sup>。そこで本節では、Tx による血清中 T<sub>4</sub> の消失抑制における抱合代謝の寄与を明らかにするため、肝臓及び腎臓における UGTs 及び SULTs の酵素活性及び mRNA 発現について検討した。また、酵素活性については、それぞれ T<sub>4</sub> を含めた 3 種の基質 (bilirubin (Ugt1a1) 及び *p*-nitrophenol (Ugt1a6)、estradiol 及び 1-naphthol (phenol Sult)) を用いて検討した。

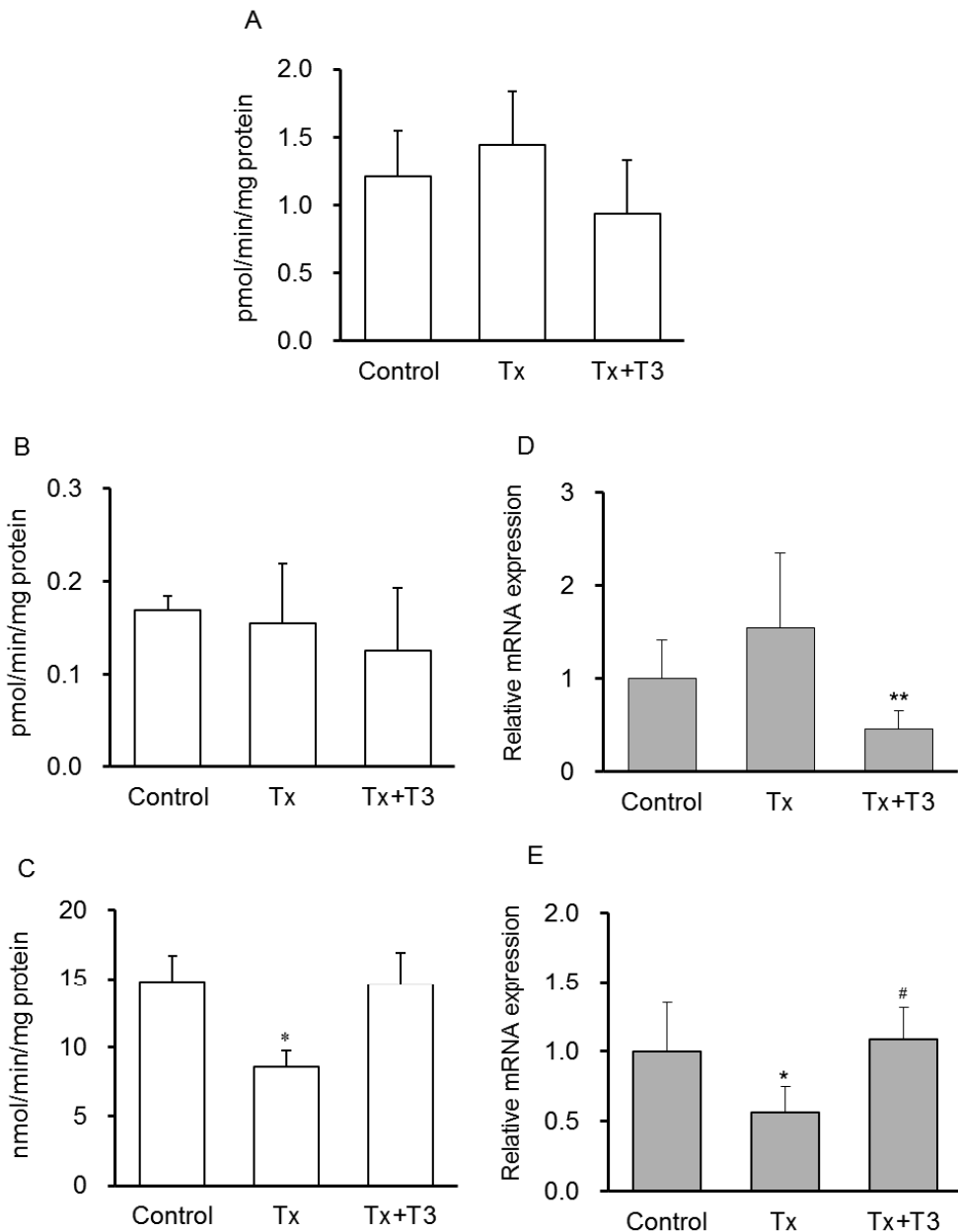
肝臓における UGT の酵素活性及び mRNA 発現について検討した結果を Fig. 21 に示した。肝臓の T<sub>4</sub> における UGT 活性は、Tx により正常ラットの約 2 倍と有意な上昇を示し、T<sub>3</sub> を補充することでその活性は正常値とほぼ同等となった。また、Ugt1a1 の基質である bilirubin に対する UGT の酵素活性及び Ugt1a1 mRNA の発現量も Tx により正常ラットのそれぞれ約 2.6 倍及び 4.7 倍に増大し、T<sub>3</sub> を補充することでその活性は正常値とほぼ同等となった。しかし、Ugt1a6 の基質である *p*-nitrophenol に対する UGT の酵素活性及び Ugt1a6 mRNA の発現量は、上述した 2 種の基質の結果と正反対の結果を示し、Tx により有意に減少し、T<sub>3</sub> を補充することで正常値と同等レベルにまで回復した。一方、腎臓においては Ugt1a1 及び 1a6 mRNA の発現量が Tx や T<sub>3</sub> 補充により変動したものの、T<sub>4</sub> 及び bilirubin に対する UGT 活性は、すべての群間で有意な差は認められなかった (Fig. 22)。また、*p*-nitrophenol に対する UGT 活性は、肝臓の結果と同様、Tx により有意に減少し、T<sub>3</sub> を補充することで正常値と同等レベルにまで回復した。これらの結果から、肝臓における T<sub>4</sub>-UGT 活性は Tx 処置により変動するものの、その効果は Tx 処置による血清中 T<sub>4</sub> の消失抑制とは相反することが明らかとなった。一方、腎臓の T<sub>4</sub>-UGT 活性は甲状腺を摘除しても変動が認められなかったことから、Tx 処置による T<sub>4</sub> の血中動態に関与しない



**Fig. 21. UGT activity and mRNA expression in liver of control and Tx rats with infused vehicle or T<sub>3</sub> (1.5 µg/head/day)**

(A) T<sub>4</sub>, (B) bilirubin (C) *p*-nitrophenol, (D) *Ugt1a1* mRNA, and (E) *Ugt1a6* mRNA.

mean ± SD (n=6), \**p* < 0.05 compared with the controls. #*p* < 0.05 compared with the Tx.



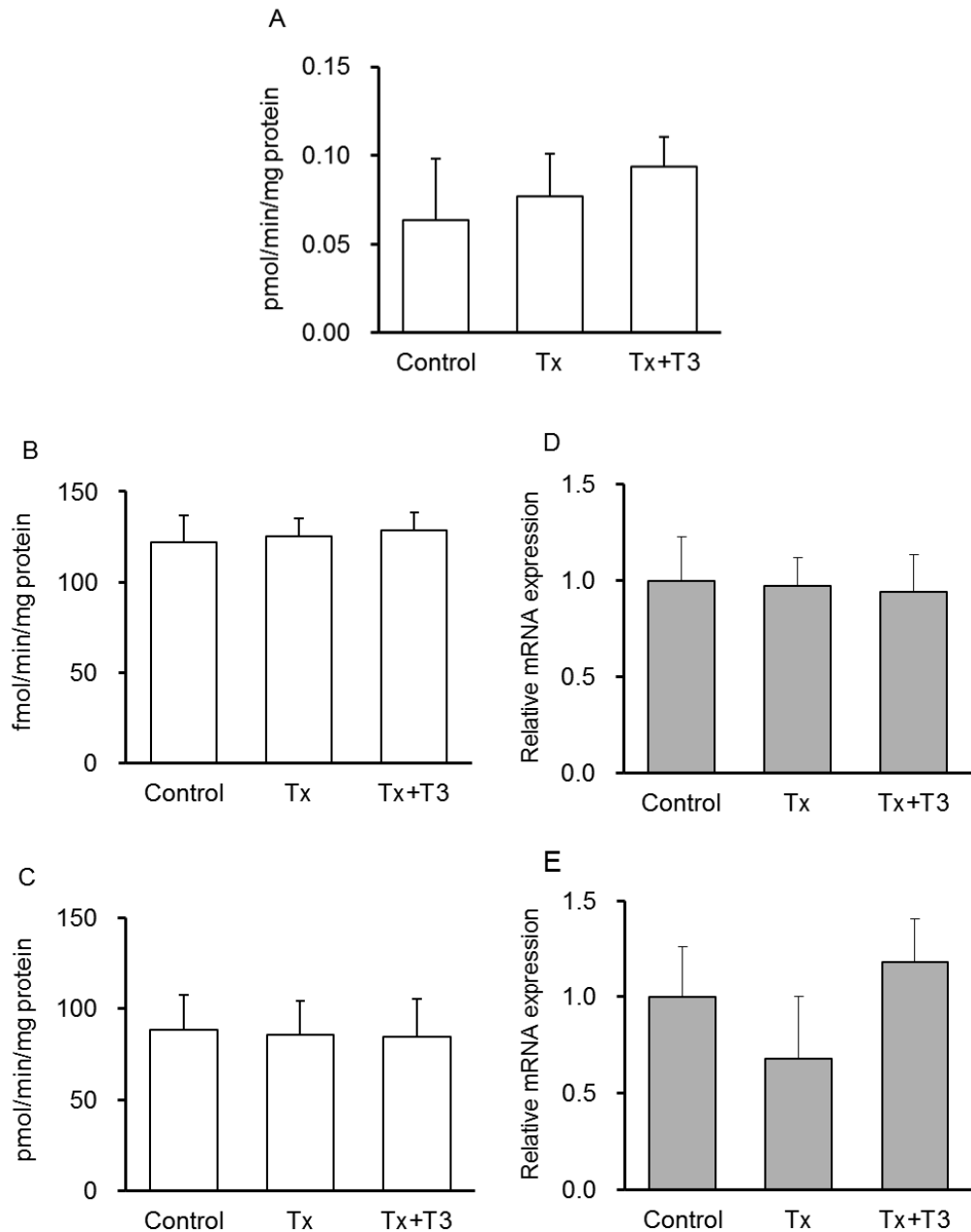
**Fig. 22. UGT activity and mRNA expression in kidneys of control and Tx rats with infused vehicle or T<sub>3</sub> (1.5 µg/head/day)**

(A) T<sub>4</sub>, (B) bilirubin, (C) p-nitrophenol, (D) Ugt1a1 mRNA, and (E) Ugt1a6 mRNA.

mean ± SD (n=6), \**p* < 0.05 compared with the controls. #*p* < 0.05 compared with the Txs.

ことが推察された。また、肝臓及び腎臓ともに T<sub>4</sub>-UGT 活性は、Ugt1a1 の酵素活性及び mRNA の発現量と同等の変動を示した。肝臓及び腎臓における Ugt1a1 mRNA の発現量は Ugt1a6 より約 3~5 倍大きいことが知られている<sup>70)</sup>。すなわち、Ugt1a1 が肝臓及び腎臓における T<sub>4</sub> グルクロン酸抱合の主要な分子種であることが推察されたが、上述したように肝臓の T<sub>4</sub>-UGT 活性の結果は、Tx による血清中 T<sub>4</sub> の消失抑制の予想機序と相反した。一般的にグルクロン酸抱合反応は基質の水溶性を増大させ、尿や胆汁中への基質の排泄を容易にさせると考えられる。しかし、肝臓において生成した T<sub>4</sub> グルクロナイド (T<sub>4</sub>-G) は胆汁中に排泄された後、小腸において脱抱合され腸肝循環により再吸収されることが知られている<sup>59,71)</sup>。さらに、T<sub>4</sub>-G が腎臓で貯蔵され、脱抱合されることで血清中 T<sub>4</sub> の恒常性維持に寄与することが示唆されている<sup>72,73)</sup>。これと同様な機序が卵胞ホルモンであるエストロゲンにも存在し、estrone の硫酸抱合体が保存型代謝物として体内に蓄えられ、脱抱合の後、活性型である estradiol に代謝されることで血中 estradiol の恒常性維持の一部を担っているとの報告がある<sup>74)</sup>。すなわち、T<sub>4</sub>-G は保存型代謝物であり、Tx により減少した活性型の T<sub>3</sub> を維持するため肝臓の T<sub>4</sub>-UGT 活性が亢進した可能性が推察された。

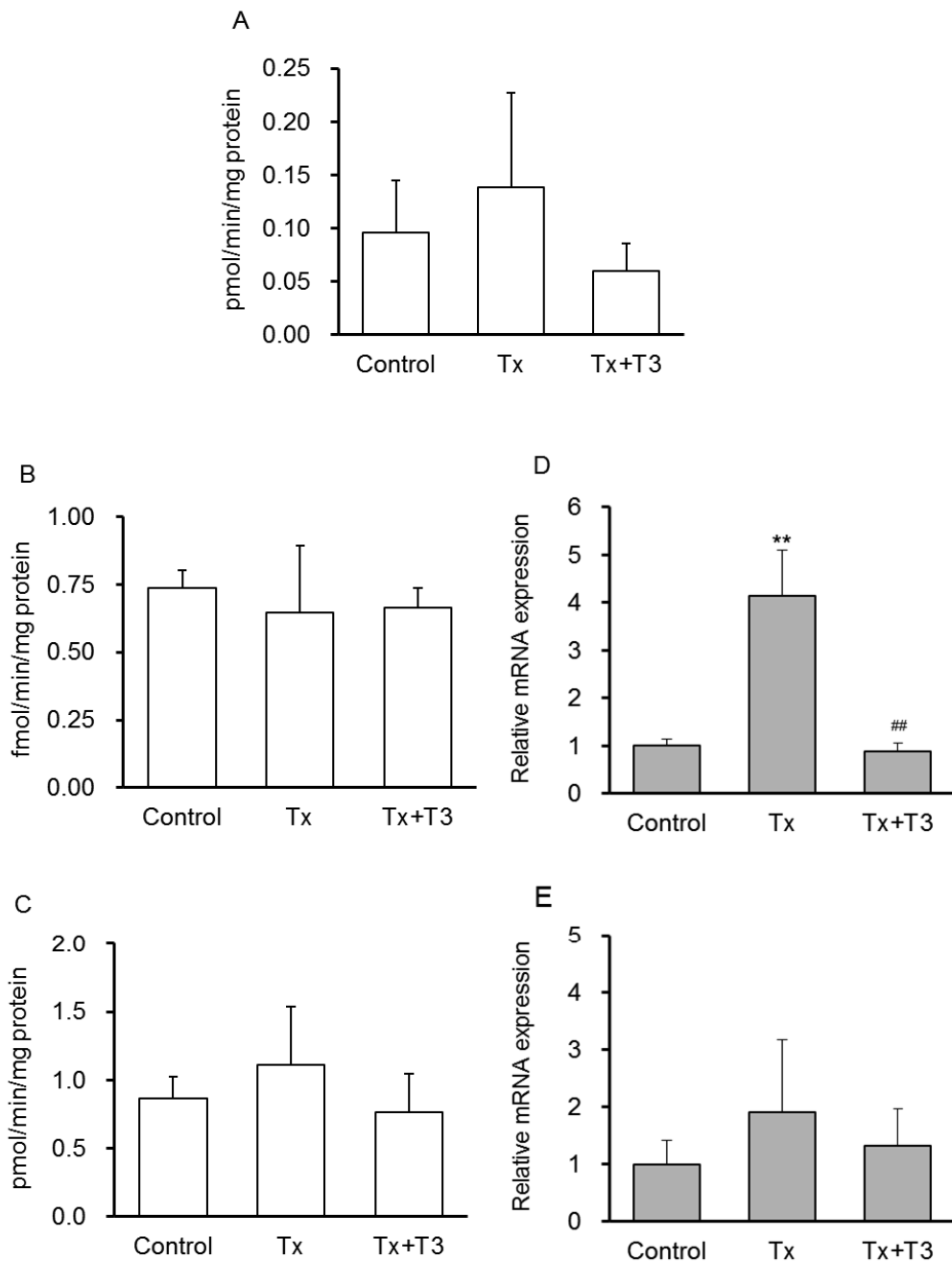
次に、肝臓及び腎臓の SULT の酵素活性及び mRNA 発現について検討した結果を Fig. 23 及び 24 に示した。肝臓及び腎臓の T<sub>4</sub>-SULT 活性は、甲状腺を摘除しても正常ラットと比べ有意な差は認められず、T<sub>3</sub> を補充してもこれら組織中の活性は変動しなかった。また、T<sub>4</sub> の硫酸抱合を担う分子種である phenol SULTs (Sult1a1 及び 1c1) の基質として estradiol 及び 1-naphthol を用いたときの肝臓及び腎臓の SULT 活性についても Tx による有意な変動は認められず、T<sub>3</sub> を補充してもこれら活性は変動しなかった。加えて、腎臓の Sult1a1 mRNA の発現量において Tx や T<sub>3</sub> 補充による変動が認められたものの、肝臓の Sult1a1 及び 1c1 mRNA の発現量は Tx や T<sub>3</sub> 補充により変動しなかった。これは Dunn らの報告<sup>70)</sup>と一致する結果であった。ラット Sult1 family は他の臓器と比べ肝臓に最も発現していることが知られている<sup>69)</sup>。Sult1a1 の発現は、転写因子の 1 つである E-twenty-six family の GA 結合タンパク質 (GABP) により制御されており<sup>75)</sup>、Rodriguez-Pena ら<sup>76)</sup>は、肝臓中の GABP は Tx により変動しないと報告している。すなわち、これらの知見は



**Fig. 23. SULT activity and mRNA expression in liver of control and Tx rats with infused vehicle or T<sub>3</sub> (1.5 µg/head/day)**

(A) T<sub>4</sub>, (B) estradiol (C) 1-naphthol, (D) Sult1a1 mRNA, and (E) Sult1c1 mRNA.

mean ± SD (n=6), \**p* < 0.05 compared with the controls. #*p* < 0.05 compared with the Txs.



**Fig. 24. SULT activity and mRNA expression in kidneys of control and Tx rats with infused vehicle or T<sub>3</sub> (1.5 µg/head/day)**

(A) T<sub>4</sub>, (B) estradiol (C) 1-naphthol, (D) Sult1a1 mRNA, and (E) Sult1c1 mRNA.

mean ± SD (n=6), \**p* < 0.05 compared with the controls. #*p* < 0.05 compared with the Tx.

本研究の結果を支持するものであり、SULTsによるT<sub>4</sub>の硫酸抱合代謝は、Txによる血清中T<sub>4</sub>の消失抑制にほとんど関与しないことが示唆された。しかし、Sult1a1及び1c1の発現は、成長ホルモン<sup>77)</sup>やグルココルチコイド<sup>78)</sup>などの内因性ホルモンや構成的アンドロスタンレセプター<sup>79)</sup>のような核内受容体によっても制御されている。これらホルモンや核内受容体は甲状腺ホルモンとも密接に関係していることが知られており、これら制御因子に対するTxの影響についても大変興味深いところである。



## 第5節 小括

本章では、Txによる血清中T<sub>4</sub>の消失抑制は血清中T<sub>3</sub>濃度の低下が要因であることを検証するため、TxラットにT<sub>3</sub>を補充したときの血清中T<sub>4</sub>動態について検討した。また、Txによる血清中T<sub>4</sub>消失抑制の機序解明の一端として、T<sub>4</sub>の主要代謝酵素である脱ヨード酵素、UGT及びSULTの組織中酵素活性及びmRNA発現について検討した。

T<sub>3</sub>補充によりTxラットの血清中T<sub>3</sub>濃度を生理的レベルにすることで、血清中T<sub>4</sub>のt<sub>1/2</sub>は正常ラットのt<sub>1/2</sub>と同等にまで回復した。これにより、Txによる血清中T<sub>4</sub>の消失抑制は、血清中T<sub>3</sub>濃度が低下したことによる恒常性維持反応であることが示唆された。また、この恒常性維持反応によってTxラットの血清中からのT<sub>4</sub>消失量の約50%が抑制されていることが明らかとなった。肝臓及び腎臓のD1の酵素活性及びmRNAの発現量は、Txにより有意に低下し、TxラットにT<sub>3</sub>を補充することにより正常ラットの値とほぼ同等にまで回復した。すなわち、Txによる血清中T<sub>4</sub>の消失抑制は、肝臓及び腎臓のD1活性の低下によるT<sub>4</sub>の脱ヨード化の抑制が主な機序の1つであることが明らかとなった。また、T<sub>4</sub>のグルクロン酸抱合反応はUgt1a1によって制御され、その活性は、肝臓においてTxにより有意な上昇を示し、T<sub>3</sub>を補充することで正常値にまで回復することが示唆された。この現象について著者は、Txにより減少した活性型のT<sub>3</sub>を維持するため、肝臓のT<sub>4</sub>-UGT活性が亢進したものと推察した。すなわち、T<sub>4</sub>-Gは保存型代謝物として体内に貯蔵され、脱抱合の後、T<sub>4</sub>から活性型であるT<sub>3</sub>に代謝されることで血清中甲状腺ホルモンの恒常性維持に寄与している可能性が考えられた。一方、大脳、BAT及び骨格筋におけるD2の酵素活性及びmRNAの発現量はTxにより上昇した。また、TxラットにT<sub>3</sub>を補充してもこれら組織のD2の酵素活性及びmRNAの発現量は、正常ラットのレベルまでは回復しなかった。本研究において組織中T<sub>3</sub>濃度測定は未検討ではあるが、これはT<sub>3</sub>補充によりTxラットの血清中T<sub>3</sub>濃度を正常レベルに回復させても、組織中のT<sub>3</sub>濃度は正常レベルにまで回復しないことが要因と考えられる。すなわち、D2は、組織中のT<sub>3</sub>濃度によって制御されており、Txラットでは減少した組織中T<sub>3</sub>濃度を増大させるための代償反応としてその活

性及び mRNA 発現量が増大したことが示唆された。最後に、肝臓及び腎臓の T<sub>4</sub>-SULT 活性は、甲状腺を摘除しても正常ラットと比べ有意な差は認められず、T<sub>3</sub>を補充してもこれら組織の活性は変動しなかった。また、T<sub>4</sub>の硫酸抱合を担う分子種である Sult1a1 及び 1c1 の基質として estradiol 及び 1-naphthol を用いたときの肝臓及び腎臓の活性についても Tx による有意な変動は認められず、T<sub>3</sub>を補充してもこれら酵素の活性は変動しなかった。これらのことから、SULTs による T<sub>4</sub>の硫酸抱合代謝は、Tx による血清中 T<sub>4</sub>の消失抑制にほとんど関与しないことが示唆された。

以上、Tx によるラット血清中 T<sub>4</sub>の消失抑制は、血中 T<sub>3</sub>濃度が低下したことによる恒常性維持反応であることを明らかにした。また、肝臓及び腎臓における D1 による T<sub>4</sub>の脱ヨード化活性の抑制がその機序の主因の 1 つであることが示唆された。加えて、肝臓の UGT 活性もその機序に間接的に関与していることが推察された。さらに、T<sub>3</sub>補充により血中 T<sub>3</sub>濃度を生理的レベルに回復させてもすべての組織において甲状腺ホルモンの恒常性機能を完全に正常化することはできない可能性が考えられた。

## 第4章 甲状腺機能低下症における新規バイオマーカー探索

### 第1節 序

近年、新薬の申請が世界的に減少しており、その理由として、医薬品開発にかかる費用の増大、並びに臨床試験の失敗が挙げられる。臨床試験の失敗の要因は、副作用の発現と有効性の欠如であり、前臨床または臨床試験初期にこれらの要因を予測できないことが費用の増大に繋がっている。米国食品医薬品局（USFDA）は、2006年にクリティカル・パス計画報告書を発出し<sup>80)</sup>、その中で、医薬品・医療機器の開発を向上させるために最も重要な分野の1つとしてバイオマーカーの開発が挙げられている。また、その開発においては、「オミクス」技術（ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクス）が非常に有望であると記載されている。

バイオマーカーとは、米国の国立衛生研究所（NIH）ワーキンググループにおいて、「通常の生物学的過程、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理的応答の指標（マーカー）として、客観的に測定され評価される特性」と定義されている<sup>81)</sup>。これにより、広義においては、バイタルサインや、生化学検査、血液検査及び腫瘍マーカーなどの各種臨床検査値も含まれる。また、バイオマーカーはその目的に応じて様々な種類に分類されている。すなわち、疾患を診断するための診断マーカー、疾患の経過を予測する予後マーカー、薬剤の作用を診る薬力学マーカー、治療の効果を予測する予測マーカー、臨床試験の効果を測る代替マーカー、治療への反応を診るモニタリングマーカー、薬物の安全性や毒性を判断するための安全性・毒性マーカーである。これらバイオマーカーは、血液や尿中、あるいは身体の組織の中に含まれる物質を対象としており、遺伝子、たんぱく質、ペプチドに加え、脂肪や糖質などの低分子代謝物などが挙げられる。近年、科学技術の発展、特に質量分析技術が格段に向上したことにより、様々な分野において新規バイオマーカーの探索研究が盛んに行われている。

メタボロミクスは、MS/MS や NMR を用いて生体内の低分子代謝産物を網羅的に解析する研究手法である。DNA や RNA、タンパク質といった化学的性質の似た巨大分子を測定対象とするゲノミクスやトランスクリプトミクス、プロテオミクスと異なり、低分子代謝物は、種差がほとんどなく、ゲノム情報の最終的な表現型であるため疾患実態を反映すると言われている。そのため、生体機能に関わる生理的変化の総合的評価が可能となる。さらに、疾患や薬物の影響による内因性代謝物の変化を主成分分析などの多変量解析により代謝プロファイルとし、それらを比較することで、疾患や薬効及び毒性に特異的なバイオマーカー候補を検出することも可能である。すでにこの手法により糖尿病や肝障害、急性腎毒性の新規バイオマーカーが見出されている<sup>82-84)</sup>。

甲状腺ホルモンには  $T_4$  及び  $T_3$  が存在するが、甲状腺ホルモン作用は主に  $T_3$  と核内受容体である甲状腺ホルモン受容体 (TR) との結合により発現する。TR には 2 つのサブタイプ (TR $\alpha$  及び TR $\beta$ ) が存在し、5 つの分子種 ( $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$  及び  $\beta 3$ ) の存在が報告されている<sup>85)</sup>。そのうち、 $T_3$  と結合し甲状腺ホルモン作用を示す分子種は TR $\alpha 1$ 、TR $\beta 1$ 、TR $\beta 2$  及び TR $\beta 3$  である<sup>86,87)</sup>。これら受容体は生体において広く分布しており、主に、TR $\alpha 1$  は脳、心臓、骨及び骨格筋、TR $\beta 1$  は心臓、甲状腺、肝臓及び腎臓、TR $\beta 2$  は視床下部、下垂体及び内耳、TR $\beta 3$  は肺、肝臓及び腎臓などに発現している。このように、甲状腺ホルモンは、全身の臓器や組織に作用し、生体の発育、基礎代謝量の維持または促進、細胞の新陳代謝などを担っている。さらに、甲状腺機能が低下することで脂質代謝や糖代謝が低下することも報告されている<sup>88,89)</sup>。すなわち、生体内の甲状腺ホルモンレベルが変動することにより、様々な内因性代謝物のレベルにも変化が生じると推測される。現在、甲状腺機能低下症患者のホルモン補充療法における診断は、一般的に血中甲状腺ホルモンや TSH などの血液検査によって行われる。しかし、著者は、これまでの甲状腺機能低下モデル動物による血中甲状腺ホルモン動態の結果から、甲状腺機能低下症患者のホルモン補充療法における診断基準が血清中ホルモン値のみでは不十分であり、これを補完する新規バイオマーカーの必要性和、その探索にメタボローム解析が有用であると考えた。

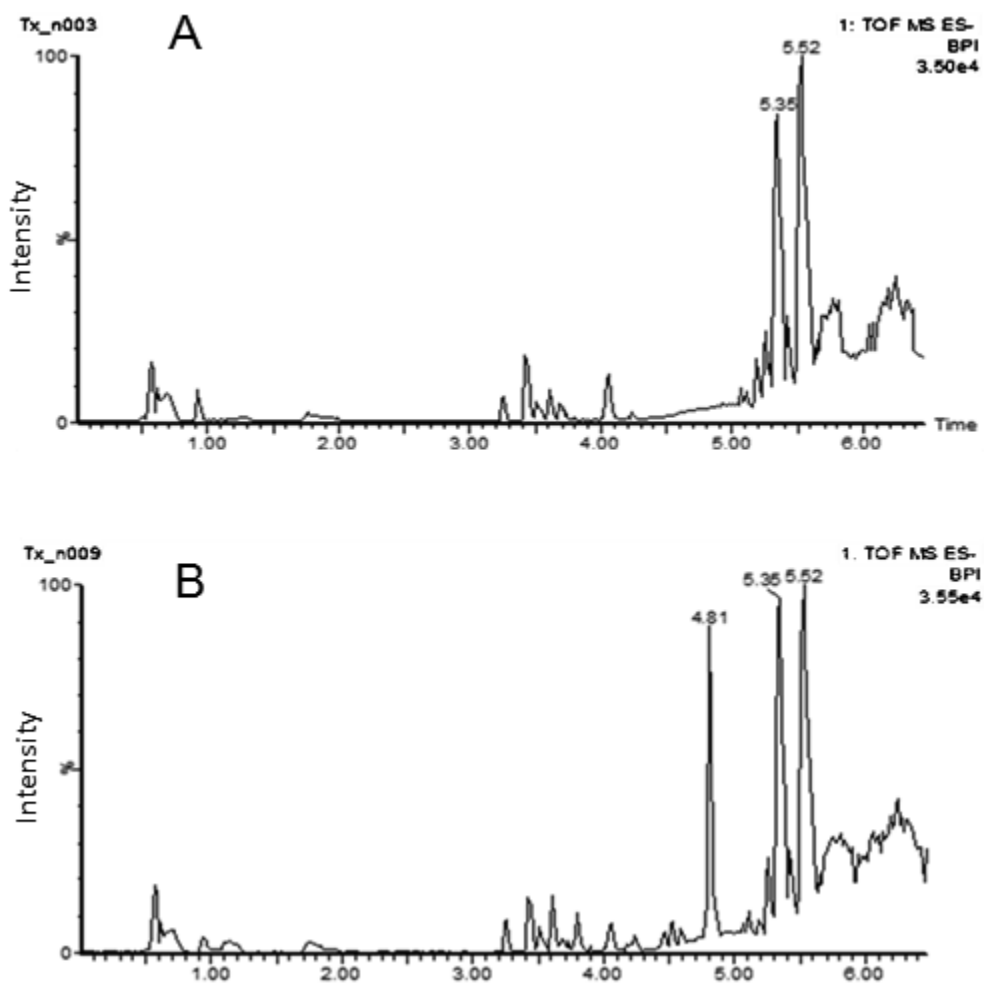
以上の背景を基に本章では、まず、ultra - performance liquid chromatography /

quadrupole time - of - flight mass spectrometry (UPLC/QTOF-MS) を用い正常及び Tx ラットの血清中メタボローム解析を行った。次に、UPLC/QTOF-MS を用い、血清中バイオマーカー候補の Tx 後の経時的な濃度推移を検討した。さらに、Tx ラットに T<sub>3</sub> を持続的に補充したときの血清中バイオマーカー候補への影響についても検証した。

## 第 2 節 Tx ラットにおける血清中メタボローム解析

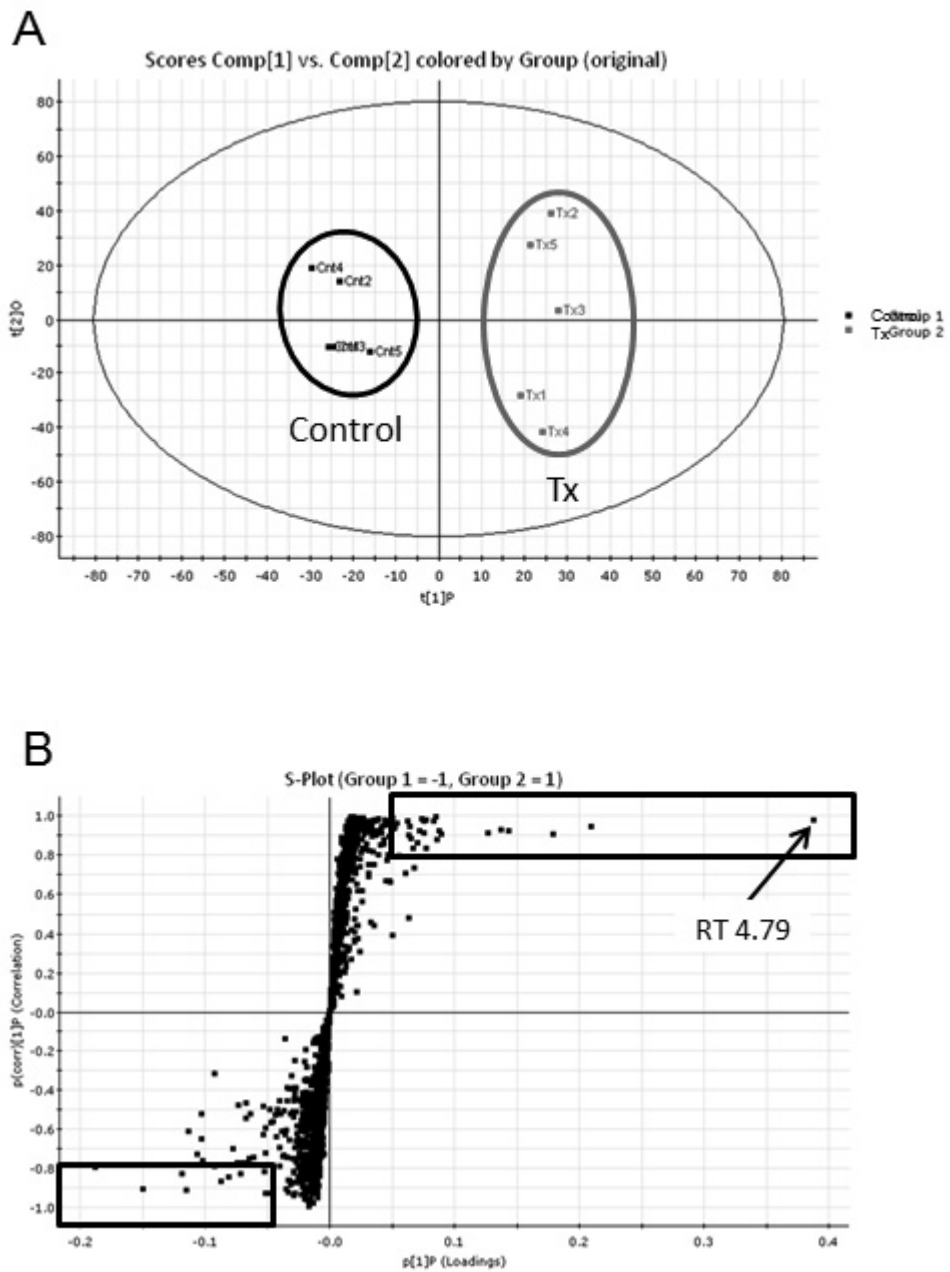
Tx により血清中  $T_4$  及び  $T_3$  濃度は著しく減少し、その恒常性維持反応の 1 つとして血中  $T_4$  の消失が抑制されることが示唆された。その機序として、肝臓や腎臓における D1 の mRNA 発現及び酵素活性の低下、肝臓の Ugt1a1 mRNA 発現及び酵素活性の上昇が推察された。しかし、局所では、組織中の減少した  $T_3$  を補うべく、D2 の mRNA 発現及び酵素活性が亢進している可能性が示された。すなわち、甲状腺機能低下症の診断及びその治療においては血清中甲状腺ホルモンレベルではなく、組織中の甲状腺ホルモンレベルの正常化が重要であると考えられた。また、甲状腺機能の低下により様々な内因性代謝物の変動が予想される。そこで本節では、甲状腺機能低下及びホルモン補充療法における新規バイオマーカー探索を目的とし、正常及び Tx ラットの血清中内因性代謝物の差異について UPLC-QTOF/MS によるメタボローム解析を行った。

正常及び Tx 後 3 週間のラット血清の代表的なベースピークイオンクロマトグラムを Fig. 25 に示した。正常ラットと Tx ラットのクロマトグラムを比較した結果、保持時間 3 分以降に現れるピークに顕著な差が認められた。特に Tx ラットのクロマトグラムの保持時間 4 - 5 分の間に特徴的なピークが検出された。また、得られたデータを MarkerLynx ソフトウェアにより解析したところ 4456 種の代謝物イオンを検出することができた。次に、正常及び Tx ラット間の代謝プロファイリングの差を明らかにするため、得られた代謝物イオンのデータを EZ-info ソフトウェアを用い、直交部分最小二乗法 - 判別分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis、OPLS-DA) による多変量解析を行った (Fig. 26)。多変量解析には複数の手法があるが、本検討では 2 群間の分離に無関係な変動を除去することで 2 群間を最大限分離し、かつ、マーカー探索を容易にすることができる OPLS-DA を採用した。結果、Fig. 26A のスコアプロットに示すように、群間の変動を表す横軸において正常及び Tx 群を明確に分離することができた。また、群内の変動を表す縦軸では両群とも変動は認められなかった。すなわち、本解析は両グループ間の比較をする上で有意に判別可能なモデルであることが示唆された。次に、スコアプロッ



**Fig. 25. Representative base peak ion chromatograms of serum samples by UPLC-QTOF/MS**

(A) the control group; (B) the Tx group; The mass range  $m/z$  50 - 1000.



**Fig. 26. OPLS-DA plots of serum samples in control and Tx group**

(A) scores plot, (B) loadings S-plot.

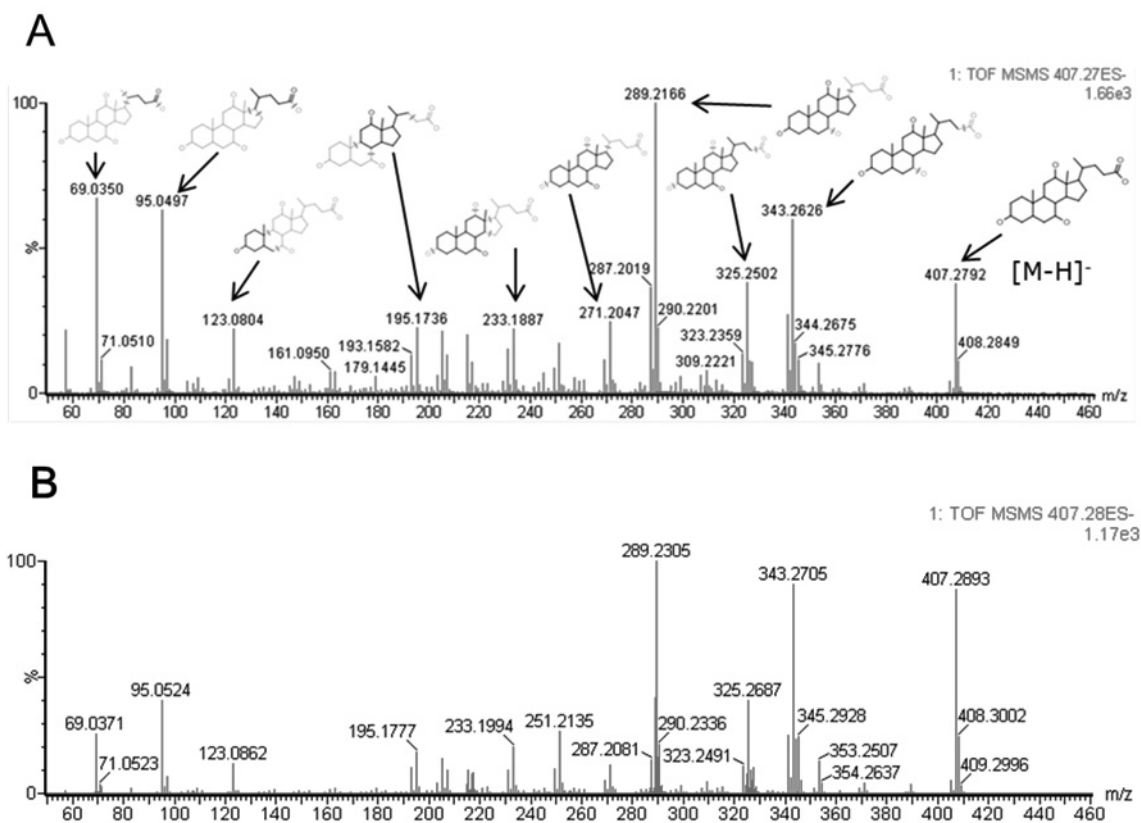


トで群間変動の要因となったイオンを検索するため、2群間の成分についてローディング S プロットを作成した (Fig. 26B)。図中の各プロットは試料中に含まれる 1つのイオンを示し、保持時間と  $m/z$ により特徴づけられたものである。また、これらプロットは 2群間で差が大きいほど左右に位置付けられ、かつ、その変動の精度が高いものほど上下に位置される。すなわち、右上及び左下に配置されたプロットほどマーカー候補となる可能性が高いことを表す。著者はより有力なマーカーを見出すため、成分解析のカットオフ値を  $p \geq |0.05|$  及び  $p(\text{corr}) \geq |0.8|$  に設定した (Fig. 26B の□で囲んだ部分)。これにより 38 種のプロットが選択され、正常群より Tx 群で上昇したものは 28 プロット、低下したものは 10 プロットであった。これら 38 種のマーカー候補の精密質量及び元素組成の予測結果についてオンラインデータベース検索を行った結果、Table 7 に示す代謝物が推定された。これらはすべて胆汁酸とその代謝物であり、1 次胆汁酸であるコール酸 (CA)、ケノデオキシコール酸 (CDCA) とそのグリシン抱合体であるグリコ CA (GCA) 及びグリコ CDCA (GCDCA) は Tx 群で上昇し、逆に代謝物である CA グルクロナイド及び CDCA サルフェートは Tx 群で低下を示した。その中でも特に CA は Fig. 27A に示すように最も変動の大きい代謝物 (保持時間 4.79 分) であり、有力なマーカーと成り得ることから、標準物質を用いて同定をより確実なものとした (Fig. 27)。すなわち、保持時間 4.79 分の代謝物のマススペクトルにおいて脱プロトン分子  $m/z$  407.28  $[M-H]^-$  が検出され、そのプロダクトイオンスペクトルは標準物質のそれとよく一致した。さらに、保持時間も一致したことから、この代謝物は CA であることが同定できた。これらの結果より、胆汁酸 (特に CA) が甲状腺機能低下に関連するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。しかし、メタボロミクスは試料中に含まれる内因性代謝物の網羅的解析には優れているが、定性的な分析法である。そこで、UPLC-QTOF/MS を用い、種々の血清中胆汁酸濃度の Tx による変動について次節で検討した。

**Table 7. Potential biomarkers searched by online metabolite database**

Retention time (min)	Mass (m/z)	Metabolite	Mass accuracy (mDa)	Change <sup>a</sup>
4.79	407.2792	Cholic acid	-0.5	↑
4.84	391.2841	Chenodeoxycholic acid	-0.7	↑
4.47	464.3010	Glycocholic acid	0.1	↑
4.46	448.3052	Glycochenodeoxycholic acid	1.0	↑
4.38	583.3093	Cholic acid glucuronide	2.5	↓
4.50	471.2421	Chenodeoxycholic acid sulfate	-0.5	↓

<sup>a</sup> Relative level in serum of Tx group in comparison to the control group.



**Fig. 27. Identification of cholic acid in negative ESI mode**

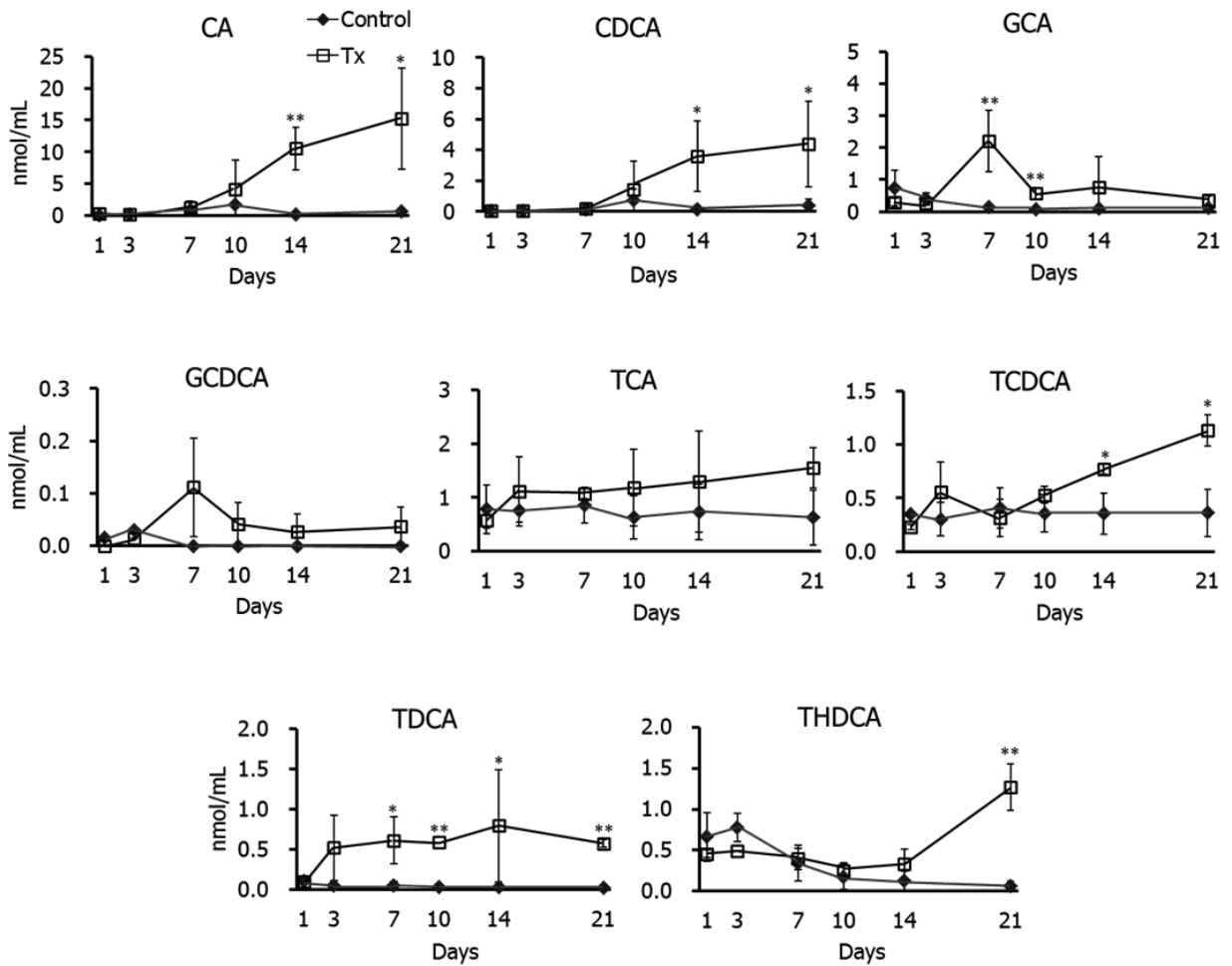
(A) Mass fragment information and MS/MS spectra of the peak at retention time 4.79 min. (B) MS/MS spectra of authentic standard.

### 第3節 甲状腺機能低下における血清中バイオマーカーとしての胆汁酸の可能性

血清中メタボローム解析の結果、TxによりCA、CDCA、GCA及びGCDCAが変動したことが明らかとなった。しかし、メタボローム解析は定性分析であり、Txによる血清中胆汁酸の経時的変化や定量的変動についての情報は得られていない。そこで本節では、上記胆汁酸を含め血清中胆汁酸10種(CA、CDCA、GCA、GCDCA、タウロコール酸(TCA)、タウロケノデオキシコール酸(TCDCA)、タウロデオキシコール酸(TDCA)、タウロヒオデオキシコール酸(THDCA)、タウロウルソデオキシコール酸(TUDCA)及びベータタウロムリコール酸(βTMCA))のUPLC-QTOF/MSを用いた一斉分析法により、正常及びTxラットの血清中胆汁酸濃度を測定した。加えて、TxラットにT<sub>3</sub>を持続的に補充したときの血清中胆汁酸への影響を検討した。

10種の胆汁酸のうち、Txにより血清中濃度が変動した胆汁酸は、メタボローム解析で検出されたCA、CDCA、GCA及びGCDCAに加え、TCDCA、TCA、TDCA及びTHDCAの8種であった(Fig. 28)。その中でも、血清中CA、CDCA及びTCDCA濃度は、Tx後7日以降顕著に上昇し始め、21日後では正常ラットの血清中濃度のそれぞれ約25倍、11倍及び3倍と有意な上昇を示した(CA: 0.6 vs 15.3 nmol/mL (正常 vs Tx)、CDCA: 0.4 vs 4.4 nmol/mL、TCDCA: 0.4 vs 1.1 nmol/mL)。特にCAとCDCAの変動は大きく、2種だけで測定した10種の血清中胆汁酸濃度の約80%を占めた。また、これら3種の血清中胆汁酸濃度の経時的変動は、1章で示したTx後の血清中T<sub>4</sub>及びT<sub>3</sub>濃度の推移(処置後7日目で最低値となる)と同調していた。すなわち、Tx後の血清中CA、CDCA及びTCDCA濃度の上昇は、Txによる血清中甲状腺ホルモンの減少に対する恒常性維持反応の一部であることが推察された。

これまで、胆汁酸の役割は、主に食事により摂取された脂質やコレステロールをミセル化することで消化吸収を促進することと言われてきた。しかし、近年、胆汁酸が細胞や核の表面に発現したmembrane-bile acid receptor (M-BAR) / TGR5やファルネソイド



**Fig. 28. Sequential changes in individual serum BA concentrations of control and Tx rats**

mean  $\pm$  SD (n=5), \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 compared with the controls.

X レセプター (FXR) などの受容体に対し内因性リガンドとして働く、シグナル伝達分子であることが報告されてきている<sup>90)</sup>。TGR5 は G-タンパク質共役型受容体の 1 種であり、脳、内分泌腺、BAT、筋肉、免疫組織及び腸神経系など生体の様々な組織に発現している<sup>91)</sup>。胆汁酸は細胞膜表面の TGR5 に結合することで細胞内の環状アデノシンリン酸 (cAMP) の産生を促進することが知られている<sup>91,92)</sup>。さらに、Watanabe ら<sup>93)</sup>は、胆汁酸が BAT や骨格筋の TGR5 に結合することで cAMP が増大し、これにより D2 酵素が活性化され、T<sub>4</sub> から T<sub>3</sub> への変換が促進されることで細胞内基礎代謝能が亢進されることを報告している。これまでに著者は、Tx により脳や BAT、筋肉の D2 酵素活性及び mRNA 発現量が増大することを明らかにしてきた。加えて、Tx により T<sub>4</sub> 及び T<sub>3</sub> 濃度は血中のみならず、組織中においても減少することが知られている<sup>94)</sup>。すなわち、胆汁酸 (特に CA、CDCA 及び TCDCA) は、局所組織の細胞内において胆汁酸-TGR5-cAMP-D2-T<sub>3</sub> 経路を亢進させ、細胞内 T<sub>3</sub> 濃度を上昇させるシグナル伝達分子であると考えられた。

甲状腺機能低下症患者への治療には、主に T<sub>4</sub> 製剤が使用される。しかし、T<sub>4</sub> は脱ヨード化酵素により活性型である T<sub>3</sub> に変換されることから、T<sub>3</sub> のプロホルモンと考えられる。また、甲状腺ホルモン作用は、主に甲状腺ホルモン受容体に T<sub>3</sub> が結合して発揮される。すなわち、甲状腺機能低下症患者への T<sub>3</sub> 補充療法は T<sub>4</sub> と比べ、より効果的な方法となる可能性が考えられた。そこで正常ラットに投与媒体 (Control 群) を、Tx ラットに投与媒体 (Tx 群) あるいは T<sub>3</sub> (1.5 µg T<sub>3</sub>/head/day、Tx+T<sub>3</sub> 群) を持続的に補充したときの血清中胆汁酸濃度への影響について検討した。Table 8 に示すように正常ラットの血清中胆汁酸濃度は、投与媒体の補充前後でほとんど変化はなく、約 2 nmol/mL 程度であった。また、投与媒体を補充した Tx ラットの血清中胆汁酸濃度も補充前後でほとんど変化は認められず、正常ラットの値より 10 倍以上高い値を示した。しかし、Tx ラットの血清中胆汁酸濃度は、T<sub>3</sub> を補充しても減少せず、補充する前とほぼ同等の値を維持していた。また、血清中胆汁酸の構成比についても T<sub>3</sub> の補充前後でほとんど差は認められず、正常ラットの構成比に戻ることはなかった。(Fig. 29: CA: 67.7 vs. 61.5%、CDCA: 20.3 vs. 20.8%、GCA: 1.2 vs. 7.5%、GCDCA: 0.03 vs. 0.77%、TCA: 6.2 vs. 5.5%、TCDCA: 1.6 vs. 1.4%、TDCA: 1.0

**Table 8. Effects of T<sub>3</sub> replacement on total BA concentrations in serum of Tx rats**

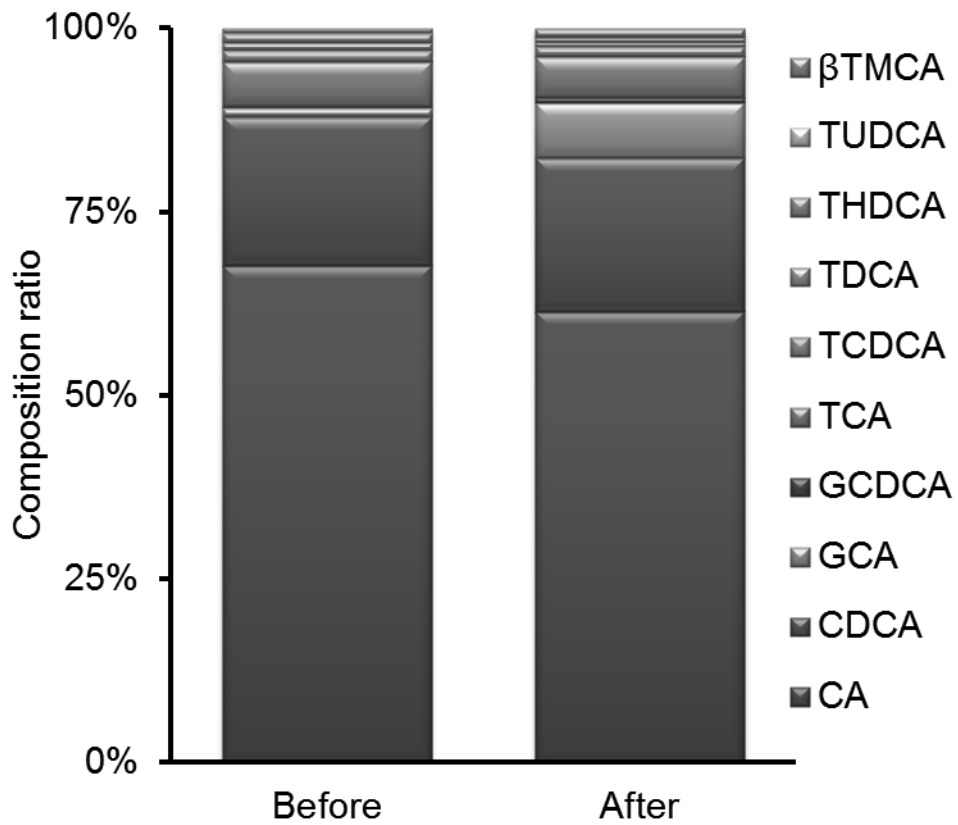
Group	Concentration (nmol/mL)	
	Before <sup>a</sup>	After <sup>b</sup>
Control	1.55 ± 0.365	1.83 ± 0.636
Tx	25.3 ± 14.8**	32.8 ± 20.2**
Tx+T3	20.7 ± 10.7**	20.4 ± 9.27**

mean ± SD (n=6)

\**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 compared with the controls.

<sup>a</sup>, the day before replacement; <sup>b</sup>, 14th day after replacement.

Control, normal rats with vehicle replacement; Tx, Tx rats with vehicle replacement; Tx+T3, Tx rats with T<sub>3</sub> replacement.



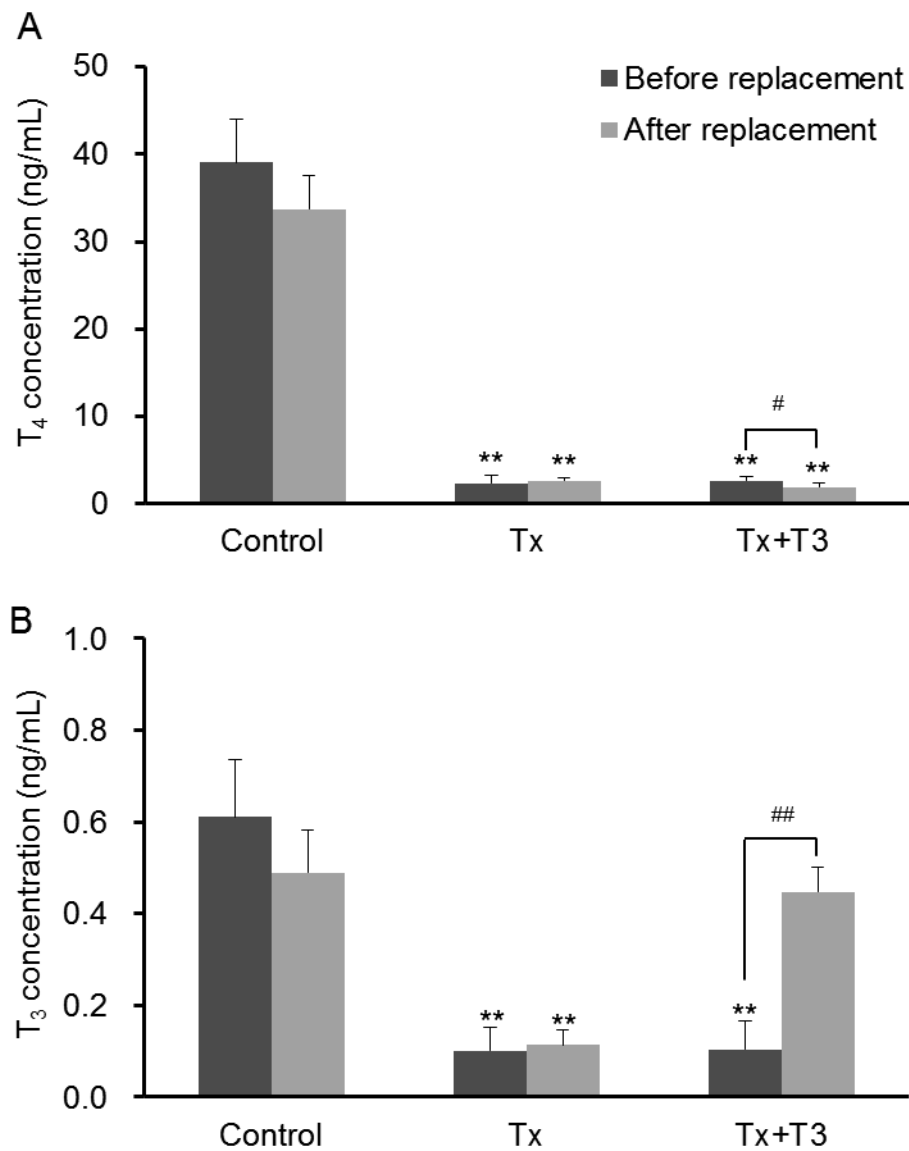
**Fig. 29. Effects of T<sub>3</sub> replacement on serum BA composition in Tx rats**

mean ± SD (n=6)



vs. 0.6%、THDCA: 1.3 vs. 0.6%、TUDCA: 0.04 vs. 0.13%、BTMCA: 0.6 vs 1.2%)。そこで、 $T_3$ を補充する前後の血清中  $T_4$ 、 $T_3$ 及び TSH 濃度を検討した。 $T_x$  ラットの血清中  $T_4$  及び  $T_3$ 濃度は、正常ラットの濃度と比べ有意に減少し、投与媒体を補充してもこれらの血清中濃度は低値を維持していた (Fig. 30)。また、 $T_3$ を補充した  $T_x$  ラットの血清中  $T_3$ 濃度は補充前の値と比べ有意に上昇し、ほぼ生理的濃度にまで回復した。しかし、血清中 TSH 濃度は  $T_x$  により正常ラットの約 7 倍と有意な上昇を示したが、 $T_3$ を補充しても正常値に戻らなかった (Table 9)。これまで、 $T_4$ 及び  $T_3$ 濃度は  $T_x$  により血中のみならず組織中においても著しく減少すること、組織内への  $T_3$ の供給経路には 2 つの経路があり、組織によってその供給率が異なること、並びに  $T_x$  ラットの局所組織 (脳、BAT 及び筋肉) の D2 酵素活性及び mRNA 発現量は  $T_3$ を補充しても高値を維持したことを述べてきた。さらに、 $T_x$  ラットに  $T_3$ を補充することで血清中  $T_3$ 濃度を生理的濃度に回復させても、組織によっては細胞内  $T_3$ 濃度が正常ラットの濃度より低いとの報告がある<sup>95)</sup>。すなわち、 $T_3$ 補充により  $T_x$  ラットの血清中  $T_3$ 濃度を正常値に戻しても、局所組織の細胞内の  $T_3$ 濃度が生理的濃度にまで回復しないため、血清中胆汁酸濃度が高値を維持し、胆汁酸-TGR5-cAMP-D2- $T_3$ 経路の亢進が維持されたものと推察した。

甲状腺機能低下症患者への甲状腺ホルモン補充療法は、血清中甲状腺ホルモン及び TSH 値によって評価される。一般的に血中の甲状腺ホルモンは OATP や MCT などのトランスポーターを介して細胞内へ速やかに取り込まれる。しかし、ヒトやげっ歯類において、これらトランスポーター遺伝子の突然変異が報告されている<sup>96-98)</sup>。この場合、甲状腺ホルモンを補充しても血中から細胞内へ甲状腺ホルモンはほとんど取り込まれず、生物学的機能も回復しない。著者は、甲状腺機能低下症患者における甲状腺ホルモン補充療法には、局所組織中の甲状腺ホルモン濃度の正常化が最も重要であると考え。しかし、甲状腺機能低下症患者の組織中甲状腺ホルモン濃度の測定は侵襲性が高く非常に困難である。先に述べたように、血清中胆汁酸、特に CA、CDCA 及び TCDCA 濃度は、局所組織の細胞内  $T_3$ 濃度と負の相関を示す可能性が推察された。すなわち、これら血清中胆汁酸濃度を測定することで組織中の甲状腺ホルモンの恒常性が予測できるものと考えられ、CA、CDCA 及



**Fig. 30. Serum T<sub>4</sub> (A) and T<sub>3</sub> (B) concentrations before (day -1) and after (day 14) subcutaneous infusion of vehicle in control and vehicle or T<sub>3</sub> (1.5 µg/head/day) in Tx rats**

mean ± SD (n=6), \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 compared with the controls.

#*p* < 0.05 and ##*p* < 0.01 compared with the before replacements.

**Table 9. Serum TSH concentrations in control and Tx rats with infused vehicle or T<sub>3</sub> (1.5 µg/head/day)**

Group	Concentration (ng/mL)	
	Before <sup>a</sup>	After <sup>b</sup>
Control	1.47 ± 0.671	3.91 ± 1.26 <sup>##</sup>
Tx	10.8 ± 3.26 <sup>**</sup>	26.9 ± 10.3 <sup>#</sup>
Tx+T3	11.8 ± 1.03 <sup>**</sup>	16.7 ± 6.50

mean ± SD (n=6)

\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared with the controls.

# $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  compared with the before replacements.

<sup>a</sup>, the day before replacement; <sup>b</sup>, 14th day after replacement.

Control, normal rats with vehicle replacement; Tx, Tx rats with vehicle replacement; Tx+T3, Tx rats with T<sub>3</sub> replacement.

び TCDCA が甲状腺機能低下症及びその甲状腺ホルモン補充療法のバイオマーカーに成り得る可能性が推察された。しかし、本研究では Tx ラットに T<sub>3</sub> を補充したときの組織中甲状腺ホルモン濃度や T<sub>4</sub> 補充時の組織中甲状腺ホルモン濃度と血清中胆汁酸濃度との相関について未検討である。今後、これら胆汁酸が甲状腺機能低下症の有用なバイオマーカーとなるには、上述した動物実験において組織中甲状腺ホルモン濃度と血清中胆汁酸濃度の相関を検証することが重要である。さらに、組織中甲状腺ホルモン減少における血清中胆汁酸濃度上昇の機序や甲状腺機能低下症患者における検討などさらに検証を積み重ねることでこれら胆汁酸が甲状腺機能低下及びその甲状腺ホルモン補充療法の新規バイオマーカーとなることが期待される。

## 第4節 小括

本章では、甲状腺機能低下症及びそのホルモン補充療法における新規バイオマーカーの探索を目的とし、Tx ラットの血清中メタボローム解析を行った。次に、メタボローム解析で検出されたバイオマーカー候補について Tx 後の経時的な濃度推移を検討した。さらに、Tx ラットに活性型である T<sub>3</sub> を持続的に補充したときの血清中バイオマーカー候補への影響についても検証した。

正常及び Tx ラットの血清中内因性代謝物の差異について UPLC-QTOF/MS によるメタボローム解析を行った結果、4000 種以上の代謝物イオンを検出し、その中から有力なマーカーと成り得る 38 種を選定した。これら 38 種のマーカー候補の精密質量及び元素組成から構造を推定したところ、胆汁酸である CA、CDCA、GCA 及び GCDCA が推定された。その中でも CA の変動は最も大きく、胆汁酸（特に CA）が甲状腺機能低下に関連するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。次に、上記 4 種を含めた胆汁酸 10 種（CA、CDCA、GCA、GCDCA、TCA、TCDCA、TDCA、THDCA、TUDCA 及び BTMCA）について、Tx による血清中各種濃度の経時的変動について検討した結果、8 種の胆汁酸で Tx による血清中濃度の上昇が認められた。その中でも、CA、CDCA 及び TCDCA の血清中濃度の経時的推移は Tx 後の血清中甲状腺ホルモンの濃度推移（処置後 7 日目で最低値となる）と同調しており、これら胆汁酸の血清中濃度の上昇は、Tx による血清中甲状腺ホルモンの減少に対する恒常性維持反応の一部であることが推察された。胆汁酸は、局所組織の細胞膜表面に発現した TGR5 に結合し cAMP を上昇させ、これにより D2 酵素を活性化することで細胞内において T<sub>4</sub> から T<sub>3</sub> への変換を促進させる<sup>93)</sup>。すなわち、CA、CDCA 及び TCDCA は、局所組織の細胞内において胆汁酸-TGR5-cAMP-D2-T<sub>3</sub> 経路を亢進することで細胞内 T<sub>3</sub> 濃度を上昇させるシグナル伝達分子であることが考えられた。最後に、甲状腺機能低下症患者への T<sub>3</sub> 補充療法は T<sub>4</sub> と比べ、より効果的な方法であると考えられたことから、Tx ラットに T<sub>3</sub> を補充したときの血清中胆汁酸濃度への影響について検討した。Tx ラットの血清中総胆汁酸濃度は T<sub>3</sub> を補充しても減少せず、補充する前とほぼ同等の値

を維持していた。また、血清中胆汁酸の構成比についても  $T_3$  の補充前後で有意差は認められず、正常ラットの構成比に戻ることはなかった。そこで、 $T_3$  を補充する前後の血清中  $T_4$ 、 $T_3$  及び TSH 濃度を検討した。 $T_3$  を補充した Tx ラットの血清中  $T_3$  濃度は補充前の値と比べ有意に上昇し、ほぼ生理的濃度にまで回復した。しかし、Tx によって上昇した血清中 TSH 濃度は、 $T_3$  を補充しても正常値に戻らなかった。すなわち、 $T_3$  補充により Tx ラットの血清中  $T_3$  濃度を正常値に戻しても、組織中  $T_3$  濃度が生理的濃度にまで回復しないため、血清中胆汁酸濃度が高値となり、胆汁酸-TGR5-cAMP-D2- $T_3$  経路の亢進が維持されたものと推察した。また、本研究の結果から、甲状腺機能低下症患者への甲状腺ホルモン補充療法には、局所組織中の甲状腺ホルモン濃度の正常化が最も重要であることが示唆された。しかし、甲状腺機能低下症患者の組織中甲状腺ホルモン濃度の測定は侵襲性が高く非常に困難である。本研究では組織中甲状腺ホルモン濃度測定は未検討であるが、上述したように CA、CDCA 及び TCDCA 濃度は、局所組織の細胞内  $T_3$  濃度と負の相関を示す可能性が考えられることから、これら血清中胆汁酸濃度を測定することで組織中の甲状腺ホルモンの恒常性が予測できるものと考えられる。今後、Tx ラットに  $T_3$  を補充したときの組織中甲状腺ホルモン濃度や  $T_4$  補充時の組織中甲状腺ホルモン濃度と血清中胆汁酸濃度との相関、さらに、血清中胆汁酸濃度上昇の機序や甲状腺機能低下症患者における検証などを積み重ねることでこれら胆汁酸が甲状腺機能低下及びその甲状腺ホルモン補充療法の新規バイオマーカーとなることが期待される。

## 結語

甲状腺機能低下症では、甲状腺ホルモンの生合成や分泌が減少することで様々な症状が現れる。甲状腺機能低下症の患者には、主に  $T_4$  補充療法が適用されるが、その診断は血清中ホルモン値に依存している。しかし、甲状腺機能低下症の発症機序は様々であり、多くの調節機構が複雑に関連し合っている。そのため、治療方針決定には詳細な甲状腺ホルモン動態を検討することが重要であると考えられる。本論文は、種々の甲状腺機能低下症モデルラットを用い、血清中甲状腺ホルモンの恒常性メカニズムの解明と新規バイオマーカーの探索を課題とし、以下の研究結果をまとめたものである。

第 1 章では甲状腺を外科的に摘除したラット ( $T_x$  ラット) の血清中甲状腺ホルモン動態を検討するため、まず、トレーサーとして安定同位体標識  $T_4$  ( $[^{13}C_9]T_4$ ) を合成し、次いで、煩雑な抽出操作を必要としない online SPE LC/MS/MS による血清中  $T_4$ 、 $T_3$ 、 $rT_3$  及び  $[^{13}C_9]T_4$  濃度測定法を確立した。本測定法は従来のイムノアッセイと比べ、交差反応性や試料中の共存物質による非特異的反応などの問題がないこと、且つ複数の測定対象物を一回の測定ですべて分析できる点で優れている。次に、本法を用いて正常及び  $T_x$  ラットの血清中甲状腺ホルモン濃度推移、並びに血清中  $T_4$  動態について検討した。その結果、 $T_x$  により、ラット血清中  $T_4$  及び  $T_3$  濃度は急速に減少したが、その後の  $T_4$  及び  $T_3$  濃度は一定の値を維持していたことから、甲状腺ホルモンの恒常性調節機構が変化している可能性が考えられた。また、 $T_x$  ラットに  $[^{13}C_9]T_4$  濃度を静脈内投与したときの血清中  $[^{13}C_9]T_4$  濃度は速やかに減少し、 $T_x$  ラットの血清中  $[^{13}C_9]T_4$  の消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は、正常ラットより約 2 倍長いことが明らかとなった。以上のことから、 $T_x$  ラットの血清中  $T_4$  濃度は、甲状腺以外の組織からの供給、並びに消失の抑制により恒常性が維持されていることが示唆された。

第 2 章では、ヨード取込み機能障害に起因した甲状腺機能低下における血清中甲状腺ホルモン動態を検証するため、ヨード欠乏飼料を摂餌させたラット ( $ID$  ラット) の血清中甲状腺ホルモン濃度推移、並びに血清中  $T_4$  動態について検討した。ヨード欠乏飼料を摂

餌させることで血清中  $T_4$  濃度は緩やかに減少した。しかし、血清中  $T_3$  濃度は正常ラットの  $T_3$  濃度と同等の推移を示した。この要因として、ID ラットでは原料のヨードが欠乏したことで甲状腺のオートレギュレーション機能により  $T_3$  の生合成が  $T_4$  より優先されたことが推察された。また、 $[^{13}C_9]T_4$  を静脈内投与したときの血清中  $[^{13}C_9]T_4$  濃度は速やかに減少し、ID ラットの血清中  $[^{13}C_9]T_4$  の  $t_{1/2}$  は正常ラットの値と同等であった。これらのことから、ID ラットの血清中  $T_4$  濃度は、甲状腺を含め他の組織から供給されることにより低濃度で維持されるが、Tx ラットのように血中からの  $T_4$  の消失は抑制されないことが示唆された。すなわち、甲状腺機能低下症の発症機序の違いによって甲状腺ホルモンの血中動態に顕著な差が認められ、それぞれ異なる恒常性維持機構が働くことが明らかとなった。

第 3 章では、Tx による血清中  $T_4$  の消失抑制の要因が血清中  $T_3$  濃度低下であることを検証するため、Tx ラットに  $T_3$  を補充したときの血清中  $T_4$  動態について検討した。また、Tx による血清中  $T_4$  消失抑制の機序解明の一端として、 $T_4$  の主要代謝酵素である脱ヨード酵素 (D1 及び D2) 及び抱合代謝酵素の組織中酵素活性及び mRNA 発現について検討した。その結果、Tx による血清中  $T_4$  の消失抑制は、血清中  $T_3$  濃度が低下したことによる恒常性維持反応であることが示唆された。さらに、この要因として、肝臓及び腎臓の D1 活性の低下による  $T_4$  の脱ヨード化抑制が主な機序の 1 つであることが示唆された。加えて、肝臓のグルクロン酸抱合酵素もその機序に間接的に関与していることが推察された。一方、大脳、褐色脂肪 (BAT) 及び骨格筋の D2 は Tx により減少した組織中  $T_3$  濃度を増大させるための代償反応としてその酵素活性及び mRNA 発現量が増大したことが判明した。

第 4 章では、甲状腺機能低下症及びそのホルモン補充療法における新規バイオマーカーの探索を目的とし、UPLC-QTOF/MS による血清中メタボローム解析を行った。その結果、コール酸 (CA)、ケノデオキシコール酸 (CDCA) などの胆汁酸が甲状腺機能低下に関連するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。次に、上記胆汁酸を含めた胆汁酸 10 種について、Tx による血清中各種濃度の経時的変動について検討した結果、8 種の胆汁酸で Tx による血清中濃度の上昇が認められた。その中でも、CA、CDCA 及びタウロケノデオキシコール酸 (TCDCA) の血清中濃度の経時的推移は Tx 後の血清中甲状腺ホルモン



の濃度推移と同調した。次に、Tx ラットに T<sub>3</sub> を補充したときの血清中胆汁酸濃度への影響について検討した。Tx ラットの血清中総胆汁酸濃度は T<sub>3</sub> を補充しても減少せず、補充する前とほぼ同等の値を維持していた。また、血清中胆汁酸の構成比についても T<sub>3</sub> の補充前後でほとんど差は認められず、正常ラットの構成比に戻ることはなかった。このときの血清中 T<sub>3</sub> 濃度はほぼ生理的濃度にまで回復したが、血清中 TSH 濃度は高値を維持していた。すなわち、T<sub>3</sub> 補充により Tx ラットの血清中 T<sub>3</sub> 濃度を正常値に戻しても、組織中 T<sub>3</sub> 濃度が生理的濃度にまで回復しないため、血清中胆汁酸濃度が高値を維持したと考えられた。胆汁酸は、脳や BAT などの局所組織の細胞膜表面に発現した TGR5 に結合し cAMP を上昇させ、これにより D2 を活性化することで細胞内において T<sub>4</sub> から T<sub>3</sub> への変換を促進させる<sup>93)</sup>。すなわち、CA、CDCA 及び TCDCA は、局所組織の細胞内において胆汁酸-TGR5-cAMP-D2-T<sub>3</sub>経路を亢進することで細胞内 T<sub>3</sub>濃度を上昇させるシグナル伝達分子であることが考えられた。さらに、血清中 CA、CDCA 及び TCDCA 濃度と組織中 T<sub>3</sub>濃度との間に負の相関を示す可能性が推察され、これら血清中胆汁酸濃度を測定することで組織中の甲状腺ホルモンの恒常性が予測できるものと考えられた。

本研究により、甲状腺機能低下の原因の違いにより血清中甲状腺ホルモン動態が異なること、並びに Tx ラットでは血清中 T<sub>4</sub> の恒常性を維持するため、D1 が大きな役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、血清中 CA、CDCA 及び TCDCA 濃度と組織中 T<sub>3</sub>濃度との間に負の相関を示す可能性が推察された。今後更なる研究により、血清中 CA、CDCA 及び TCDCA が、甲状腺機能低下症及びその甲状腺ホルモン補充療法のバイオマーカーとなることが期待される。

## 謝辞

博士論文の作成に際し、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました、東京理科大学薬学部臨床分析科学研究室 東達也教授に心より感謝いたしますとともに、厚く御礼申し上げます。

本論文の審査にあたり、有益な御助言を賜りました東京理科大学薬学部環境健康学教室 鍛冶利幸教授、同生物薬剤学研究室 廣田孝司教授、同分子病理・代謝学研究室 樋上賀一教授、並びに同製剤学・DDS 教室 山下親正教授に御礼申し上げます。

本研究において、終始ご助言、ご指導をいただきました、あすか製薬株式会社代謝研究部 湊宏一博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、甲状腺摘除ラットの病理検査及び投稿論文の査読をご支援いただきました、あすか製薬株式会社薬事監査部 村越正典博士、標識体合成にご協力いただきました、同社合成研究部 林博之博士、甲状腺ホルモン及び標識体測定法の開発にご協力いただきました、同社代謝研究部 今津哲哉氏、酵素活性及び mRNA の測定へのご助言ならびにご協力いただきました、同研究部 佐々木誠博士、甲状腺摘除ラットの作製にご協力いただきました、同社臨床管理部 青木弘訓氏(元代謝研究部)、血中甲状腺ホルモン及び胆汁酸濃度測定にご協力いただきました、株式会社あすか製薬メディカル分析研究部 高橋謙錠氏、並びに鈴木優徳氏に深く感謝いたします。

また多くの実験にご協力いただきました、あすか製薬株式会社代謝研究部 研究員各位に厚く御礼を申し上げます。

本研究を実施する機会を与えてくださいました、あすか製薬株式会社研究開発本部長 蓮見幸市氏、同副本部長 濱寄秀久博士、同社代謝研究部長 藤方明氏に心より御礼申し上げます。

東達也教授にご指導いただける機会をご用意くださいました、本間誠次郎博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、どのような状況においてもいつも応援してくれた妻 純子に心から感謝します。

## 実験の部

### 第 1 章から第 4 章の実験で共通の事項

#### 試薬等

[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]T<sub>4</sub> (IS) は、IsoSciences 社より購入した。T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub> 及び rT<sub>3</sub> は、Sigma-Aldrich 社より購入した。イソフルランはマイラン製薬より購入した。止血用ゼラチンスポンジはアステラス製薬より購入した。硫酸ストレプトマイシンは Meiji Seika ファルマより購入した。生理食塩液は扶桑薬品工業より購入した。乳酸カルシウムは和光純薬工業より購入した。その他の試薬及び溶媒は、特に断らない限り、全て分析用もしくは特級以上のものを使用した。

#### 血清中甲状腺ホルモン及び[<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub>濃度測定

##### 測定条件

LC/MS/MS 装置は、MS/MS に AB SCIEX 社の API5000 三連四重極質量分析計及び LC に online 抽出用 FCV-12AH 六方切り替えバルブを装備した島津製作所の Prominence (SCL-10Avp システムコントローラ、FCV-11AL リザーバー切り替えバルブ、LC-20AD ポンプ、SIL-HTc オートサンプラ、CTO-20A カラムオーブン) を用いた。SPE カラムは、Shim pack MAYIODS (2.0 mm I.D. × 10 mm、50 mm、島津製作所)、分析カラムは、Synergi Polar-RP 80A (2.0 mm I.D. × 50 mm、4 mm、Phenomenex) を使用した。両カラム温度は 45°C に設定した。移動相は、(A-1) 1.0 % (v/v) ギ酸、(A-2) 0.05% (v/v) 酢酸、(B) メタノール及び (C) 0.05% (v/v) 酢酸/メタノール (95 : 5) を用い、表 1 の LC 条件にて分析した。MS 条件は、正イオン検出 ESI 法、カーテンガス 11 psi、イオン源ガス 1 (GS1) 80 psi、GS2 60 psi、コリジョンガス 8.0 psi、イオンスプレー電圧 5000 V、イオン源温度 650°C に設定した。また、SRM 測定条件は表 2 に示した。

表 1 LC 条件

Time (min)	Flow rate (mL/min)	FCV-12AH valve position	Mobile phase		
			Pump A		Pump B
			A-1 (%)	A-2 (%)	B (%)
0.00	3.50	A	95	0	5
0.99	4.00	A	95	0	5
1.00	4.00	A	0	95	5
1.80	0.35	A	0	95	5
2.00	0.35	B	0	95	5
2.50	0.35	B	0	95	5
8.00	0.35	B	0	20	80
9.60	0.35	B	0	20	80
9.61	0.35	B	0	1	99
9.63	0.80	B	0	1	99
11.00	0.80	A	0	1	99
11.02	5.00	A	0	1	99
11.03	5.00	A	1	0	99
12.01	5.00	A	95	0	5
12.04	4.00	A	95	0	5
12.54	4.00	A	95	0	5

Valve position A, sample extraction or washing on the SPE column; valve position B, back-flush onto the analytical column and chromatographic separation; mobile phase A-1, 1.0% formic acid; mobile phase A-2, 0.05% acetic acid; mobile phase B, methanol; the pump C delivered 0.05% acetic acid/methanol (95:5) at 0.35 mL/min to equilibrate the analytical column.

表 2 SRM 測定条件

測定対象物	プリカーサーイオン <i>m/z</i>	プロダクトイオン <i>m/z</i>	DP	CE	CXP
T <sub>4</sub>	777.70	731.5	206	38	29
T <sub>3</sub>	651.77	605.9	146	33	36
rT <sub>3</sub>	651.77	507.7	146	35	30
[ <sup>13</sup> C <sub>9</sub> ]T <sub>4</sub>	786.71	739.9	166	37	42
[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]T <sub>4</sub>	782.75	735.9	206	37	42

DP:Declustering Potential, CE:Colligion Energy, CXP:Collision Cell Exit Potencial

### 標準溶液の調製

T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>、rT<sub>3</sub> 及び [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> は、100 mg/mL のメタノール溶液を調製し、これを活性炭処理血清により段階希釈し、標準混合溶液（100、50、20、10、5、2、1、0.5、0.2、0.1 ng/mL）とした。IS は 2 ng/mL のメタノール溶液に調製した。

## 試料の調製

ラット血清（20  $\mu\text{L}$ ）に IS 標準溶液（60  $\mu\text{L}$ ）を添加し、攪拌した。混合物は遠心分離（16 000  $\times$  g、5 min、10°C）後、上清を分取した。次いで、上清に 0.1%（v/v）ギ酸（40  $\mu\text{L}$ ）を添加し、遠心分離（16 000  $\times$  g、5 min、10°C）後、上清を分取した。分取した上清（80  $\mu\text{L}$ ）を LC/MS/MS に供した。検量線試料は、 $T_4$ 、 $T_3$ 、 $rT_3$  及び  $[^{13}\text{C}_9]T_4$  の標準混合溶液（20  $\mu\text{L}$ ）に IS 標準溶液（60  $\mu\text{L}$ ）を添加して調製した。

## 血清中 $T_4$ 、 $T_3$ 、 $rT_3$ 及び $[^{13}\text{C}_9]T_4$ 濃度の算出

検量線試料の測定対象物調製濃度に対してピーク面積比（測定対象物質のピーク面積/IS のピーク面積）をプロットし、最小二乗法で検量線を作成した。試料中測定対象物のピーク面積比を検量線に当てはめ濃度（ng/mL）を算出した。

## 血清中 $[^{13}\text{C}_9]T_4$ の動態学的パラメータの算出

血清中  $[^{13}\text{C}_9]T_4$  濃度を 1-コンパートメントモデル（式 1）に当てはめ、消失速度定数（ $k_{el}$ ）及び初期血清中濃度（ $C_0$ ）を算出した。また、式 2 及び式 3 より生物学的半減期（ $t_{1/2}$ ）及び分布容積（ $V_d$ ）を算出した。さらに、これらパラメータを用い、式 4 より  $T_4$  供給速度（ $SR$ ）を算出した。

$$C_p = C_0 \times e^{-k_{el} \times t} \quad \dots \text{式 1}$$

$$t_{1/2} = 0.693 / k_{el} \quad \dots \text{式 2}$$

$$V_d = X_0 / C_0 \quad \dots \text{式 3}$$

$$SR = C_{ss} \times V_d \times k_{el} \quad \dots \text{式 4}$$

$X_0$  : 投与量（ng）、 $t$  : 時間（day）、 $C_{ss}$  : 平均血清中  $T_4$  濃度（ng/mL）

## 血清中 TSH 濃度測定

TSH ELISA Test Kit（Endocrine Technology）を購入し、キットに添付されたプロトコルに従い測定した。

## 実験動物

7 週齢の CrI:CD(SD)の雄性ラットを日本チャールスリバーから購入した。順化期間は約 1 週間とし、温度  $23 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 20\%$ 、明暗サイクル 12 時間 (8 時～20 時点灯) の環境で飼育した。食餌 (FR-2、フナバシファーム) 及び飲水 (紫外線流水殺菌装置及び  $3 \mu\text{m}$  フィルターを通した上水道水) は自由摂取とした。

## Tx ラットの作製

麻酔下、ラットを背位に固定し、術部の皮膚を約 1 - 2 cm 切開した。現れた筋層を切開し、気管を露出させた。甲状腺峡部を切り離し、左右の甲状腺を気管から引き剥がした。止血用ゼラチンスポンジを甲状腺の元の位置に挿入した。硫酸ストレプトマイシン注射液を術部に散布し、縫合用クリップで切開部を閉じた。Tx ラットには術後 1 週間、1% (w/v) 乳酸カルシウム水を与えた。試験終了後、剖検にて顕鏡観察により甲状腺組織の遺存がないことを確認した。加えて、第 1 章においては、病理学者により甲状腺組織の遺存及び上皮細胞の過形成が無いことを確認した。

## 血液処理

採取した血液は室温で約 30 分間放置後、遠心分離 ( $16000 \times g$ 、5 min、 $4^{\circ}\text{C}$ ) し、血清を採取した。血清は分析時まで凍結保存した。

## 活性炭処理血清の調製

血漿 10 mL あたり、ノーリット A (未洗浄、100～400 mesh、ナカライテスク) 1 g を加え、室温で 16 時間攪拌した。遠心分離 ( $1500 \times g$ 、10 min、 $4^{\circ}\text{C}$ ) 後、上清を分取し、再度、上清を遠心分離 ( $16000 \times g$ 、30 min、 $4^{\circ}\text{C}$ ) した。採取した上清はフィルター ( $0.45 \mu\text{m}$ ) でろ過した後、使用するまで凍結保存した。

## 第 1 章の実験

### 試薬等

[<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]Tyrosine は ISOTECH 社より購入した。その他の試薬及び溶媒は、特に断らない限り、全て分析用もしくは特級以上のものを使用した。

### [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> の構造確認

[<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> の構造は、<sup>1</sup>H-NMR に日本電子社の JNM-ECP400 及び MS に API5000 を用いて確認した。( <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, <sup>13</sup>C デカップリング) : δ 7.82 (s, 2H), 7.13 (s, 2H), 3.56 - 2.81 (3H, m)、MS (ESI) :  $m/z$  786.7[M+H]<sup>+</sup>, 739.9[M+H-HCOOH]<sup>+</sup>, 642.9, 613.0, 583.8, 457.6, 388.8))

### QC 試料の調製

精度及び真度検討用の QC 試料は、T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>、rT<sub>3</sub> 及び [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> の各種標準溶液 (20 μL、0.1、0.2、4 及び 80 ng/mL) に IS 標準溶液 (60 μL) を添加して調製した。

### 動物実験

#### **実験 1 : Tx ラットの血清中甲状腺ホルモン及び TSH 濃度の検討**

正常及び Tx ラット (各 n = 5) をそれぞれ 3 週間飼育し、甲状腺ホルモン値の変動が最小となるよう、午前 9~12 時の間に無麻酔下尾静脈より採血した。

#### **実験 2 : Tx ラットにおける血清中 T<sub>4</sub> 動態の検討**

[<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> (1.5 mg) を 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 20 μL で溶解した。次いで、生理食塩液で希釈し、3 μg/mL の水溶液とした。正常及び Tx ラット (各 n = 5) に [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T<sub>4</sub> 水溶液 (1.5 μg/500 μL/kg) 単回静脈内投与した。投与後 5 分、以降 2 週間までは約 24 時間ごと、その後 1 週間は約 48 時間ごとに無麻酔下尾静脈より採血した。



## 甲状腺摘除による血清中 T<sub>4</sub> の消失抑制の評価

血清中 T<sub>4</sub> 濃度が定常状態であるとき、T<sub>4</sub> の供給速度は消失速度と平衡にあると仮定できることから、Tx ラットの血清中 T<sub>4</sub> 供給速度 (SR) = 消失速度 (ER<sub>tx</sub>) とした。また、正常ラットの T<sub>4</sub> の動態学的パラメータ (k<sub>el</sub> 及び Vd) を用い、Tx ラットの定常状態時の血清中 T<sub>4</sub> 濃度 (C<sub>ss</sub>) が維持される際の T<sub>4</sub> 供給速度 (= 消失速度 (ER<sub>cnt</sub>)) を下記式より算出した。これら T<sub>4</sub> 消失速度 (ER<sub>tx</sub> 及び ER<sub>cnt</sub>) の差を甲状腺摘除による血清中 T<sub>4</sub> の消失抑制の程度として評価した。

$$ER_{cnt} = C_{ss} \times Vd \times k_{el}$$

## データ解析

データは 5 例の平均値 ± 標準偏差とした。統計学的解析は、Microsoft Excel 2003 を使用し、Student's *t* test により行った。*p* < 0.05 を有意差有りとした。

## 第 2 章の実験

### 試薬等

通常固形飼料 (AIN-93G) 及びヨード欠乏飼料 (AIN-93G 改変) はオリエンタル酵母より購入した。超純水は Milli-Q Labo (Millipore) により製造したものを使用した。その他の試薬及び溶媒は、特に断らない限り、全て分析用もしくは特級以上のものを使用した。

### 動物実験

#### **実験 1 : ID ラットの血清中甲状腺ホルモン及び TSH 濃度の検討**

雄性ラット 10 匹を 2 群 (n = 5) に分け、それぞれ正常群及び ID 群とし、12 週間飼育した。正常群には通常固形飼料及び上水道水 (紫外線流水殺菌装置及び 3  $\mu\text{m}$  フィルターに通した水) を、ID 群にはヨード欠乏飼料及び超純水を自由に摂取させた。甲状腺ホルモン値の変動が最小となるよう午前 9~12 時の間に無麻酔下尾静脈より採血した。

#### **実験 2 : ID ラットにおける血清中 $T_4$ 動態の検討**

$[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  (1.5 mg) を 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 20  $\mu\text{L}$  で溶解した。次いで、生理食塩液で希釈し、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の水溶液とした。試験開始後 9 週 (上記試験と同じ処置) の正常及び ID ラット (各 n = 5) に  $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  水溶液 (1.5  $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}/\text{kg}$ ) を単回静脈内投与した。投与後 5 分、以降 2 週間までは約 24 時間ごと、その後 1 週間は約 48 時間ごとに無麻酔下尾静脈より採血した。

### データ解析

データは 5 例の平均値  $\pm$  標準偏差とした。統計学的解析は、Microsoft Excel 2003 を使用し、Student's *t*-test により行った。  $p < 0.05$  を有意差有りとした。

## 第 3 章の実験

### 試薬等

[<sup>125</sup>I]T<sub>4</sub>、[<sup>125</sup>I]rT<sub>3</sub> 及び [<sup>3</sup>H]estradiol は PerkinElmer より購入した。<sup>125</sup>I 標識体は実験開始前に Sephadex LH-20 (Pharmacia) を用い、Rutgers らの方法<sup>99)</sup>により精製して使用した。[<sup>14</sup>C]1-naphthol は American Radiolabeled Chemicals より購入した。浸透圧ポンプ (model 2ML4) は Alzet より購入した。Dithiothreitol (DTT)、sucrose、bilirubin、*p*-nitrophenol、glycine、ascorbic acid は和光純薬工業より購入した。Propylthiouracil (PTU)、bovine serum albumin (BSA)、UDP-glucuronic acid·3Na (UDPGA)、alamethicin 及び 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate lithium salt hydrate (PAPS) は Sigma より購入した。Ethylenediamine-*N*, *N*, *N*, *N*-tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate (EDTA·2Na) は同仁化学より購入した。Allprotect tissue reagent、RNeasy mini kit、Qiazol lysis reagent 及び QantiTect Reverse Transcription Kit は QIAGEN より購入した。LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I は Roche Diagnostics より購入した。その他の試薬及び溶媒は、特に断らない限り、全て分析用もしくは特級以上のものを使用した。

### 動物実験

#### **実験 1 : Tx による血清中 T<sub>4</sub> 消失抑制に対する T<sub>3</sub> 補充効果**

甲状腺摘除後 3 週間経過した Tx ラット 15 匹を 3 群 (各 n = 5) に分けた。浸透圧ポンプに 0.5 mmol/L 水酸化ナトリウム/生理食塩液 (Tx 群) 及び 2 濃度の T<sub>3</sub> 投与液 (1.5 µg/head/day : Tx+T<sub>3</sub> 群、7.5 µg/head/day : Tx+HT<sub>3</sub> 群) をそれぞれ充填し、イソフルラン麻酔下、Tx ラットの背部皮下に浸透圧ポンプを埋め込んだ。同様に、0.5 mmol/L 水酸化ナトリウム/生理食塩液を充填した浸透圧ポンプを正常ラット (control 群、n = 5) の皮下に埋め込んだ。T<sub>3</sub> 投与液は、T<sub>3</sub> (5 mg) を 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 20 µL で溶解した後、生理食塩液で希釈して調製した。浸透圧ポンプ埋め込み 14 日後、4 群すべてのラット

に $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$ 投与液 (1.5  $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}/\text{kg}$ ) を単回静脈内投与した。浸透圧ポンプ埋め込み前日及び13日後、並びに $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$ 投与後5分、以降10日間まで24時間ごとに無麻酔下尾静脈より採血した。

## 実験2: $\text{T}_x$ による血清中 $\text{T}_4$ 消失抑制における各種代謝酵素の関与

0.5 mmol/L 水酸化ナトリウム/生理食塩液 ( $\text{T}_x$  群) もしくは  $\text{T}_3$  投与液 (1.5  $\mu\text{g}/\text{head}/\text{day}$ :  $\text{T}_x+\text{T}_3$  群) を浸透圧ポンプにそれぞれ充填し、イソフルラン麻酔下、甲状腺摘除後3週間経過した $\text{T}_x$ ラット (各  $n = 6$ ) の背部皮下に浸透圧ポンプを埋め込んだ。同様に、0.5 mmol/L 水酸化ナトリウム/生理食塩液を充填した浸透圧ポンプを正常ラット (control 群、 $n = 6$ ) の皮下に埋め込んだ。浸透圧ポンプ埋め込み14日後、イソフルラン麻酔下、すべてのラットは腹部大動脈より全採血した。次いで、脳、肝臓、腎臓、BAT 及び大腿筋 (骨格筋) を摘出し、すぐに液体窒素で凍結し、酵素活性測定まで $-80^\circ\text{C}$  で保存した。なお、これら組織の一部はRT-PCR分析のためRNA保存液 (Allprotect tissue reagent) に浸漬し、 $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

## 組織調製

凍結した組織は木槌で粉砕後、一部組織を採取し、5倍容の組織調製用バッファー (20 mM Tris-HCl (pH7.6)、0.25 mmol/L sucrose、1.2 mmol/L EDTA、5 mmol/L DDT、プロテアーゼインヒビター) を添加し、氷冷下、テフロン棒のガラスホモジナイザー (BiospecProducts) でホモジネートを調製した。ホモジネートは遠心分離 (1000  $\times$  g、15 min、 $4^\circ\text{C}$ ) 後、上清を採取した。採取した上清は酵素活性測定まで $-80^\circ\text{C}$  で保存した。なお、肝臓、腎臓及び骨格筋の一部ホモジネートは遠心分離 (10000  $\times$  g、20 min、 $4^\circ\text{C}$ ) 後、上清を採取した。採取した上清は遠心分離 (105000  $\times$  g、60 min、 $4^\circ\text{C}$ ) 後、上清 (サイトゾル) と沈殿物に分取した。肝臓及び腎臓の沈殿物は組織調製用バッファーで再懸濁し、ミクロソームを調製した。サイトゾル及びミクロソームは酵素活性測定まで $-80^\circ\text{C}$  で保存した。各組織分画中のタンパク質濃度はBSAを用いてLowryらの方法<sup>100)</sup>に従い測定した。

## 酵素活性測定

### 脱ヨード化酵素

D1 及び D2 活性は、既知の方法<sup>101-103)</sup>を参考にして測定した。すなわち、D1 活性は、インキュベーション溶液 (400 nmol/L (10<sup>5</sup> cpm) [<sup>125</sup>I]rT<sub>3</sub> 及び 10 mmol/L DTT) にそれぞれ肝臓及び腎臓のホモジネート (0.3 mg protein/mL) を添加し、37°C で 60 分間インキュベーションすることで評価した。D2 活性は、インキュベーション溶液 (1 nmol/L (10<sup>5</sup> cpm) [<sup>125</sup>I]T<sub>4</sub>、25 mmol/L DTT、1 mmol/L PTU、1 μmol/L T<sub>3</sub>) にそれぞれ脳及び BAT のホモジネート (1 mg protein/mL)、骨格筋のミクロソーム (2 mg protein/mL) を添加し、37°C で脳及び BAT は 60 分間、骨格筋は 16 時間インキュベーションすることで評価した。氷冷下、上記反応液に 5% (w/v) BSA 水溶液 0.1 mL を添加し反応を停止させた。次いで、10% (v/v) トリクロロ酢酸水溶液 0.5 mL を添加し攪拌した。反応液は遠心分離 (1500 × g、15 min、4°C) 後、上清を採取した。採取した上清は、あらかじめ 0.1 mol/L 塩酸で平衡化した Sephadex LH-20 カラム (bed volume 0.25 mL) に供し、0.1 mol/L 塩酸 2 mL で遊離した <sup>125</sup>I を溶出した。溶出した <sup>125</sup>I の放射活性は、ガンマカウンター (ARC-1000M、日立アロカメディカル) で 1 分間測定した。下記の式より活性を算出した。

$$\text{活性} = (\text{SC} - \text{BC}) \times \text{SA} / (\text{PC} \times \text{SV} / 1000) / \text{T}$$

D1: pmol/min/mg protein、D2: fmol/hr/mg protein (骨格筋: mg microsomal protein)

SC: 反応試料の溶出液中放射能カウント (cpm)、BC: ブランク試料の溶出液中放射能カウント (cpm)、SA: インキュベーション溶液中の基質濃度/インキュベーション溶液中放射能カウント (pmol or fmol/cpm)、SV: サンプル量 (μL)、PC: タンパク質濃度 (mg/mL)、T: インキュベーション時間 (min or hr)

### グルクロン酸抱合酵素

T<sub>4</sub>-UGT 活性は、Beetstra らの方法<sup>104)</sup>を参考にして測定した。すなわち、インキュベーション溶液 (1 μmol/L (10<sup>5</sup> cpm) [<sup>125</sup>I]T<sub>4</sub>、5 mmol/L UDPGA、0.5 mmol/L PTU、7.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、25 μg/mL alamethicin、75 mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 溶液) に肝臓あるいは腎臓

のミクロソームを添加し、37°C で 60 分間インキュベーションすることで評価した。氷冷下、反応液に 0.1 mol/L 塩酸 0.8 mL を添加後、攪拌し、反応を停止した。反応液は、遠心分離 (1000 × g、15 min、4°C) 後、上清を採取した。採取した上清は、あらかじめ 0.1 mol/L 塩酸で平衡化させた Sephadex LH-20 カラム (bed volume 1 mL) に供した。0.1 mol/L 塩酸 3 mL で洗浄した後、20% (v/v) エタノール 5 mL で<sup>[125I]</sup>T<sub>4</sub> 抱合体を溶出した。溶出液の放射活性をガンマカウンターで 1 分間測定した。活性は脱ヨード化酵素と同じ計算式を用いて算出した。

Bilirubin-UGT 活性は、Miyagi らの方法<sup>105)</sup>を参考に測定した。インキュベーション溶液 (125 mmol/L bilirubin、5 mmol/L UDPGA、5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、25 µg/mL alamethicin、400 mmol/L Tris-HCl (pH7.7) 溶液) に肝臓あるいは腎臓のミクロソームを添加し、37°C で 15 分間インキュベーションすることで評価した。氷冷下、glycine/塩酸バッファー (0.4 mol/L、pH2.7) 150 µL を添加後、攪拌し、反応を停止した。Diazo 試薬 150 µL を添加し、暗所にて 25°C で 30 分間インキュベーションした。氷冷下、10% (w/v) ascorbic acid 水溶液 150 µL を添加し、次いで 5 倍容の 2-pentanone/n-butyl acetate (17 : 3、(v/v)) で抽出して -20°C で凍結した。凍結した試料は、解凍後攪拌し、遠心分離 (2000 × g、15 min、4°C) した。再度 -20°C で凍結後、有機層を採取し、分光光度計で吸光度 (530 nm) を測定した。下記の式より活性を算出した。

$$C = A / (\epsilon \times b) \times 10^6$$

$$\text{活性 (nmol/min/mg protein)} = (SC - BC) / 1000 / PC / T$$

C : 試料中濃度 (nmol/L)、A : 試料の吸光度 (abs)、 $\epsilon$  : モル吸光係数、b : セル厚 (cm)、SC : 反応試料中濃度 (nmol/L)、BC : ブランク試料中濃度 (nmol/L)、PC : タンパク質濃度 (mg/mL)、T : インキュベーション時間 (min)

*p*-Nitrophenol-UGT 活性は、Beetstra らの方法<sup>104)</sup>を参考に測定した。インキュベーション溶液 (1 mmol/L *p*-nitrophenol、5 mmol/L UDPGA、7.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、25 µg/mL alamethicin、75 mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 溶液) に肝臓あるいは腎臓のミクロソームを添加し、37°C で 10 分間インキュベーションすることで評価した。氷冷下、0.1 mol/L 水酸

化ナトリウム水溶液 3.8 mL を添加後、攪拌し、反応を停止した。分光光度計で吸光度 (405 nm) を測定し、活性は、bilirubin-UGT と同じ計算式を用いて算出した。

### 硫酸抱合酵素

T<sub>4</sub>-SULT 活性は、Kaptein らの方法<sup>106)</sup>を参考に測定した。インキュベーション溶液 (0.1 μmol/L (10<sup>5</sup> cpm) [<sup>125</sup>I]T<sub>4</sub>、50 μmol/L PAPS、0.5 mmol/L PTU、2 mmol/L EDTA、100 mmol/L phosphate (pH7.2) 溶液) に肝臓及び腎臓のサイトゾルを添加し、37°C で 30 分間インキュベーションすることで評価した。氷冷下、0.1 mol/L 塩酸 0.8 mL 添加後、攪拌し、反応を停止した。遠心分離 (1000 × g、15 min、4°C) 後、上清を採取した。採取した上清は、あらかじめ 0.1 mol/L 塩酸で平衡化させた Sephadex LH-20 カラム (bed volume 1 mL) に供した。0.1 mol/L 塩酸 3 mL で洗浄した後、水 5 mL で [<sup>125</sup>I]T<sub>4</sub> 抱合体を溶出した。溶出液の放射活性をガンマカウンターで 1 分間測定した。活性は脱ヨード化酵素と同じ計算式を用いて算出した。

Estradiol-SULT 活性は、Peeters らの方法<sup>107)</sup>を参考に測定した。インキュベーション溶液 (4 nmol/L (10<sup>5</sup> dpm) [<sup>3</sup>H]estradiol、50 μmol/L PAPS、2 mmol/L EDTA、100 mmol/L phosphate (pH7.2) 溶液) に肝臓あるいは腎臓のサイトゾルを添加し、37°C で 30 分間インキュベーションすることで評価した。氷冷下、水 2 mL 及びジクロロメタン 2 mL を添加後、攪拌し、反応を停止した。水層 1 mL を採取後、液体シンチレーションカウンタ (LSC-5101、日立アロカメディカル) で放射活性を測定した。活性は脱ヨード化酵素と同じ計算式を用いて算出した。

Naphthol-SULT 活性は、Oddy らの方法<sup>108)</sup>を参考に測定した。インキュベーション溶液 (10 μmol/L (10<sup>5</sup> dpm) [<sup>14</sup>C]1-naphthol、200 μmol/L PAPS、15 mmol/L DTT、1 mg/mL BSA、30 mmol/L phosphate (pH5.5) 溶液) に肝臓あるいは腎臓のサイトゾルを添加し、37°C で 30 分間インキュベーションすることで評価した。氷冷下、0.6 mol/L glycine/0.4 mol/L トリクロロ酢酸 200 μL 及びクロロホルム 3 mL を添加後、攪拌し、反応を停止した。遠心分離 (2000 × g、5 min、4°C) 後、水層 200 μL を採取し、液体シンチレーションカウ

ンタで放射活性を測定した。活性は脱ヨード化酵素と同じ計算式を用いて算出した。

## RT-PCR

肝臓、腎臓、脳、BAT 及び骨格筋について、Qiazol lysis reagent 及び RNeasy mini kit を用い total RNA を抽出・精製した。次いで、QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて逆転写反応を行い、total RNA 1 µg から cDNA を合成した。反応液を蒸留水にて 10 倍希釈し、LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I を用い、D1、D2、Ugt1a1、Ugt1a6、Sult1a1、Sult1c1 及び Gapdh (内部標準) を標的とした RT-PCR を行った。測定には LightCycler クイックシステム 350S (Roche) を使用し、データ解析には LightCycler3 Data Analysis Version3.5.28 (Roche) を使用した。プライマーは日本遺伝子研究所において設計されたものを購入した (表 3)。

表 3 RT-PCR に使用した各種プライマー情報

Gene	Sequence	Location <sup>a</sup>	TM (°C)	Accession no. <sup>b</sup>
D1	Forward: TGG TGG ACA CAA TGC AGA	596 – 614	85.0	NM_021653
	Reverse: TCC AAG GGC CAG GTT TAC	671 – 689		
D2	Forward: CTG ACC TCA GAA GGA CTA CG	163 – 183	83.8	NM_031720
	Reverse: GCT TCA GGA TTG GAC ACG	246 – 264		
Ugt1a1	Forward: CTT CCG TGT GGC TCC ATT	482 – 500	86.8	NM_012683
	Reverse: ATG TTC TTC ACC CGC TGC	625 – 643		
Ugt1a6	Forward: TGT GAT CCT GGC TGA GTA	550 – 568	84.7	NM_057105
	Reverse: GGG AAA TGT CAT GTG GTC	665 – 683		
Sult1a1	Forward: GCC ATT GCA GAA CTT CAC AG	152 – 172	83.7	NM_031834
	Reverse: CAC ACT TCT CTA GCT TGC CA	237 – 257		
Sult1c1	Forward: CAA CGG GCC AAC ACC TAT	349 – 367	83.0	NM_031732
	Reverse: GCA TTT TGT TAG CCA GAT CCA	398 – 419		
Gapdh	Forward: TGA CAA CTT TGG CAT CGT	565 – 583	87.2	NM_017008
	Reverse: ATG CAG GGA TGA TGT TCT	663 – 681		

<sup>a</sup> Locations of the primers are based on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) reference sequence.

<sup>b</sup> NCBI reference sequence number.

## 統計解析

データは 5 あるいは 6 例の平均値 ± 標準偏差とした。統計学的解析は、SAS System Release 9.2 (SAS Institute) を使用し、一元配置分散分析法により行った。事後検定は Tukey's test による多重比較検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差有りとした。



## 第 4 章の実験

### 試薬等

CA 及び CDCA は和光純薬工業より購入した。GCA、TUDCA、TCDCA 及び TDCA は Merck より購入した。TCA、βTMCA、GCDCA、TLCA、THDCA 及び THCA は Steraloids より購入した。 $[^2\text{H}_5]\text{CA}$  及び $[^2\text{H}_5]\text{TCA}$  は Toronto Research Chemicals より購入した。 $[^2\text{H}_4]\text{GCA}$  は C/D/N isotopes より購入した。その他の試薬及び溶媒は、特に断らない限り、全て分析用もしくは特級以上のものを使用した。

### 血清試料

メタボローム分析には第 1 章の実験 1 で採取した血清、血清中胆汁酸の一斉分析には第 1 章の実験 1 及び第 3 章の実験 2 で採取した血清をそれぞれ使用した。

### メタボローム分析

#### **測定条件**

LC/MS/MS 装置は、MS に Waters 社の Xevo QTof/MS 及び LC に Waters 社の ACQUITY UPLC system を用いた。分析カラムは、Waters 社の ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm I.D. × 100 mm、1.8 μm) を使用し、カラム温度は 40°C に設定した。移動相は (A) 0.1 %ギ酸 (v/v) 及び (B) アセトニトリルを用い、リニアグラジエント溶離 (0 - 2 min : A 液 99%、2 - 5 min : A 液 99→5%、5 - 9 min : A 液 5%) を行った。流速は 400 μL/min に設定した。MS 条件は、負イオン検出 ESI 法、キャピラリー電圧 2.5 kV、脱溶媒温度 500°C、イオン源温度 150°C、質量測定範囲  $m/z$  50 - 1000、スキャン時間 0.1 sec、コーン電圧 25 V、低コリジョンエネルギー 5.0 eV、高コリジョンエネルギー 20.0 - 35.0 eV に設定した。また、ロックスプレーによる質量補正を行い、リファレンスにはロイシンエンケファリン ( $m/z$  554.2615  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、200 pg/mL : アセトニトリル/0.1% (v/v) ギ酸 (50 : 50)、v/v) を用いた。クロマトグラム及びマススペクトルデータは MassLynx software (v.4.1、

Waters) により取得した。

### 試料の調製

第 1 章の実験 1 で採取した試験最終日 (Tx 後 3 週) の正常及び Tx ラットの血清 40  $\mu$ L に氷冷したアセトニトリル 80  $\mu$ L を添加し、遠心分離 (16 000  $\times$  g、5 min、10°C) した。上清に等量の 0.1% (v/v) ギ酸を添加し、そのうち 2  $\mu$ L を UPLC-QTOF/MS に供した。

### データ処理及び分析

UPLC-TOF/MS 測定により得られたデータは MarkerLynx XS ソフトウェア (Waters) を用いて自動解析した。検出したピークは、クロマトグラム、保持時間及び  $m/z$  値により識別し、ピークリストを作成した。検出されたピークは EZ-info ソフトウェア (Waters) を用い、OPLS-DA 法により多変量解析を行った。次いで、OPLS-DA 分析により得られた結果から S プロットを作成し群間の差に起因するマーカー候補を選択した。

### バイオマーカーの同定

マーカー候補の元素組成は、その精密質量を基に MarkerLynx XS ソフトウェアにより予測した。マーカー候補の構造は、その元素組成及び精密質量を基にオンラインデータベース (KEGG ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)), HMDB ([www.hmdb.ca/](http://www.hmdb.ca/)) 及び ChemSpider ([www.chemspider.com/](http://www.chemspider.com/))) により検索した。マーカー候補の MS/MS フラグメントの帰属には MassFragment application manager (Waters) を使用した。最も変動が大きかったマーカー候補の構造については、標準物質 (CA) を用い保持時間と MS/MS フラグメントの比較により同定した。

### 血清中胆汁酸の一斉分析

#### 測定条件

LC/MS/MS 装置は、MS に Waters 社の Xevo QToF/MS 及び LC に Waters 社の ACQUITY UPLC system を用いた。分析カラムは、Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm I.D. × 100 mm、1.7 μm、Waters) を使用した。カラム温度は 45°C に設定した。移動相は、(A) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム及び (B) アセトニトリルを用い、表 4 の LC 条件にて分析した。MS 条件は、負イオン検出 ESI 法、キャピラリー電圧 2.3 kV、サンプルコーン電圧 70 V、質量測定範囲  $m/z$  50 - 1000、コリジョンエネルギー 5 及び 60 eV、イオン源温度 150°C、脱溶媒温度 500°C に設定した。ロックスプレーによる質量補正を行い、リファレンスにはロイシンエンケファリン ( $m/z$  554.2615 [M-H]<sup>-</sup>、200 pg/mL : アセトニトリル/水 (50 : 50)) を用いた。また、各種胆汁酸の MS 測定条件は表 5 に示した。検量線の濃度範囲は 10 - 25 ng/mL (Min.)、1000 - 10000 ng/mL (Max.) に設定した。

表 4 LC 条件

時間 (min)	A (%)	B (%)	流量 (mL/min)	curve
0.00	76	24	0.40	1
5.00	76	24	0.40	6
15.00	68	32	0.40	6
20.00	60	40	0.40	6
21.50	20	80	0.40	6
21.51	2	98	0.60	11
25.50	76	24	0.40	11
31.00	76	24	0.40	11

A: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム B: アセトニトリル

表 5 MS 測定条件

Bile acid	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Retention time (min)	Internal standard
CA	407.2797	13.17	CA-d <sub>5</sub>
CDCA	391.2849	19.43	CA-d <sub>5</sub>
GCA	464.3012	11.93	GCA-d <sub>4</sub>
GCDCA	448.3063	17.59	GCA-d <sub>4</sub>
TCA	514.2838	13.86	TCA-d <sub>5</sub>
TCDCA	498.2889	18.45	TCA-d <sub>5</sub>
TDCA	498.2889	19.21	TCA-d <sub>5</sub>
THDCA	498.2889	12.77	TCA-d <sub>5</sub>
TUDCA	498.2889	12.16	TCA-d <sub>5</sub>
β-TMCA	514.2838	5.39	TCA-d <sub>5</sub>
[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]CA	412.3107	13.05	—
[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]GCA	468.3260	11.93	—
[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]TCA	519.3148	13.74	—

### 標準溶液の調製

各種胆汁酸は、10 µg/mL のメタノール溶液を調製し、これをメタノールで段階希釈し、標準混合溶液（10、25、50、100、250、500、1000、2500、5000、10000 ng/mL）とした。各種 IS は 2000 ng/mL のメタノール溶液に調製した。

### 試料の調製

氷冷下、第 1 章の実験 1 及び第 3 章の実験 2 で採取した血清（50 µL）にメタノール（50 µL）及び IS 標準溶液（50 µL）を添加し、1 時間攪拌した。−20°C で 20 分間静置後、遠心分離（16 000 × g、10 min、4°C）し、上清を分取した。分取した上清（2 µL）を UPLC-QTOF/MS に供した。検量線試料は、各種胆汁酸の標準混合溶液（50 µL）に活性炭処理血清（50 µL）及び IS 標準溶液（50 µL）を添加して調製した。

### 血清中胆汁酸濃度の算出

検量線試料の血清中濃度に対してピーク面積比（各胆汁酸のピーク面積/IS のピーク面積）をプロットし、最小二乗法で検量線を作成した（重み付け：1/x<sup>2</sup>）。試料中測定対象物ピーク面積比を検量線に当てはめ、分子量で除すことで濃度（nmol/mL）を算出した。

### 統計解析

総胆汁酸濃度は 10 種の胆汁酸濃度の合計とした。データは 5 あるいは 6 例の平均値 ± 標準偏差とした。正常及び Tx ラットの 2 群間の血清中胆汁酸濃度の統計学的解析は Microsoft Excel 2003 を使用し、Student's *t*-test により行った。また、正常、Tx 及び Tx+T3 の 3 群間の血清中胆汁酸濃度の統計学的解析は SAS System Release 9.2 を使用し、一元配置分散分析法により行った。事後検定は Tukey's test による多重比較検定を行った。両解析ともに  $p < 0.05$  を有意差有りとした。

## 引用文献

- 1) Decuypere E., Dewil E., Kühn E.R., In: Tullet, S.C. (Ed.), *Avian Incubation. Butterworths*, London, pp. 239-256 (1990).
- 2) Beckett C.J., Arthur J.R., *Clin. Endocrinol. Metabol.*, **8**, 285-304 (1994).
- 3) De long G.R., In: Braverman, L.E., Utiger, R.D.(Eds.), J.B. Lippincott, New York, pp. 826-835 (1996).
- 4) Kaplan M.M., In: Hennemann G (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 231-253 (1986).
- 5) St Germain D.L., *Trends Endocrinol. Metab.*, **5**, 36-42 (1994).
- 6) Oppenheimer J.H., Schwartz H.L., Mariash C.N., Kinlaw W.B., Feake H.C., *Endocr. Rev.*, **8**, 288-306 (1987).
- 7) Silva J.E., Larsen P.R., In: Hennemann G (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp 441-500 (1986).
- 8) Larsen P.R., Davis T.F., Hay I.D., In: Wilson J.D., Foster D.W., Kronenberg H.M., Larsen P.R. (Eds), W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 389-515 (1998).
- 9) Gereben B., Zeold A., Dentice M., Salvatore D., Bianco A.C., *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 570-590 (2008).
- 10) Green W.L., *Endocrinology*, **103**, 826-37 (1978).
- 11) Silva J.E., Leonard J.L., Crantz F.R., Larsen P.R., *J. Clin. Invest.*, **69**, 1176-1184 (1982).
- 12) Silva J.E., Larsen P.R., *Nature*, **305**, 712-713 (1983).
- 13) Kaplan M.M., Visser T.J., Yaskoski K.A., Leonard J.L., *Endocrinology*, **112**, 35-42 (1983).
- 14) Huang T.S., Chopra I.J., Beredo A., Solomon D.H., Chua Tecogn., *Endocrinology*, **117**, 2106-2113 (1985).

- 15) Visser T.J., In: Greer M.A. (Ed.), Raven, New York, pp. 255-283 (1990).
- 16) Curran P.G., DeGroot L.J., *Endocr. Rev.*, **12**, 135-150 (1991).
- 17) Feldt-Rasmussen U., Rasmussen A.K., In: Krassas G.E., Rivkees S.A., Kiess W (Eds), Kaeger, Basel, pp. 80-103 (2007).
- 18) Wu A.H., French D., *Clin. Chim. Acta*, **420**, 4-10 (2013).
- 19) Blaak E.E., Van Aggel-Leijssen D.P., Wagenmackers A.J., Saris W.H., Van Baak M.A., *Diabetes*, **49**, 2102-2107 (2000).
- 20) Hankard R.G., Haymond M.W., Darnaum D., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **279**, E608-E613 (2000).
- 21) Salamonczyk G.M., Oza V.B., Sih C.J., *Tetrahedron Lett.*, **38**, 6965-6968 (1997).
- 22) Tai S.S., Sniegowski L.T., Welch M.J., *Clin. Chem.*, **48**, 637-642 (2002).
- 23) Kasuya Y., Yokokawa A., Hamura K., Shibasaki H., Furuta T., *Steroids*, **70**, 811-816 (2005).
- 24) Meischl C., Buermans H.P., Hazes T., Zuidwijk M.J., Musters R.J., Boer C., van Lingen A., Simonides W.S., Blankenstein M.A., Duppy C., Paulus W.J., Hack C.E., Ris-Stalpers C., Roos D., Niessen H.W., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **294**, 1227-1233 (2008).
- 25) Visser W.E., Friesema E.C., Jansen J., Visser T.J., *Trends Endocrinol. Metab.*, **19**, 50-56 (2008).
- 26) Cosmo C.D., Liao X.H., Dumitrescu A.M., Philp N.J., Weiss R.E., Refetoff S., *J. Clin. Invest.*, **120**, 3377-3388 (2010).
- 27) de Carvalho F.D., Quick M., *J. Biol. Chem.*, **286**, 131-137 (2011).
- 28) Vranckx R., Rouaze-Romet M., Savu L., Mechighel P., Maya M., Nunez E.A., *J. Endocrinol.*, **142**, 77-84 (1994).
- 29) Zimmermann M.B., *Endocr. Rev.*, **30**, 376-408 (2009).
- 30) Delange F., In: Braverman L.E., Utiger R.D. (Eds), Williams & Wilkins,

- Philadelphia, pp. 295-315 (2000).
- 31) Santiago-Fernandez P., Torres-Barahona R., Muela-Martínez J.A., Rojo-Martínez G., García-Fuentes E., Garriga M.J., León A.G., Soriguer F., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 3851-3857 (2004).
  - 32) Hetzel B.S., In: Shils M. E., Olsen J. A., Shike M., Ross A. C. (Eds), Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 253-264 (1999).
  - 33) Cooper L.F., Barber E.M., Mitchell H.S., Nutrition in Health and Disease, 9th ed. J.B. Lippincott Co, Philadelphia, pp 66 (1943).
  - 34) Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc.: National Academies Press, Washington D.C., pp. 258-289 (2001).
  - 35) World Health Organization/United Nations Children's Fund/International Council for control of Iodine Deficiency Disorders. Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination. A Guide for Programme Managers, 3rd ed. World Health Organization, Geneva, (2007).
  - 36) Patrick L., *Altern. Med. Rev.*, **13**, 116-127 (2008).
  - 37) Aquaron R., Delange F., Marchal P., Lognoné V., Ninane L., *Cell. Mol. Biol.*, **48**, 563-569 (2002).
  - 38) Fisher D.A., Oddie T.H., Epperson D., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **25**, 1580-90 (1965).
  - 39) Dohán O., De la Vieja A., Paroder V., Riedel C., Artani M., Reed M., Ginter C.S., Carrasco N., *Endocr. Rev.*, **24**, 48-77 (2003).
  - 40) Bizhanova A., Kopp P., *Endocrinology*, **150**, 1084-90 (2009).
  - 41) Berson S.A., Yalow R.S., *J. Clin. Invest.*, **34**, 186-204 (1955).
  - 42) Smanik P.A., Liu Q., Furminger T.L., Ryu K., Xing S., Mazzaferri E.L., Jhiang

- S.M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 339-345 (1996).
- 43) Spitzweg C., Morris J.C., *Mol. Cell. Endocrinol.*, **322**, 56-63 (2010).
- 44) Fujiwara H., Tatsumi K., Miki K., Harada T., Miyai K., Takai S., Amino N., *Nat. Genet.*, **16**, 124-125 (1997).
- 45) Levy O., Ginter C.S., De la Vieja A., Levy D., Carrasco N., *FEBS Lett.*, **429**, 36-40 (1998).
- 46) Everett L.A., Glaser B., Beck J.C., Idol J.R., Buchs A., Heyman M., Adawi F., Hazani E., Nassir E., Baxevanis A.D., Sheffield V.C., Green E.D., *Nat. Genet.*, **17**, 411-22 (1997).
- 47) Pendred V. *Lancet*, **ii**, 532 (1896).
- 48) Reardon W., Trembath R.C., *J. Med. Genet.*, **33**, 1037-1040 (1996).
- 49) Arwert L.I., Sepers J.M., *Neth. J. Med.*, **66**, 118-120 (2008).
- 50) Nguyen T.T., Chapa F., DiStefano J.J. 3rd., *Endocrinology*, **139**, 4626-4633 (1998).
- 51) Boelaert K., Franklyn J.A., *J. Endocrinol.*, **187**, 1-15 (2005).
- 52) Galton V.A., Schneider M.J., Clark A.S., St Germain D.L., *Endocrinology*, **150**, 2957-2963 (2009).
- 53) Pedraza P.E., Obregon M.S., Escobar-Morreale H.F., Escobar del Rey F., Morreale de Escobar G., *Endocrinology*, **147**, 2098-2108 (2006).
- 54) Boelaert K., Franklyn J.A., *J. Endocrinol.*, **187**, 1-15 (2005).
- 55) Bianco A.C., Kim B.W., *J. Clin. Invest.*, **116**, 2571-2579 (2006).
- 56) Bianco A.C., Salvatore D., Gereben B., Berry M.J., Larsen P.R., *Endocr. Rev.*, **23**, 38-89 (2002).
- 57) Gereben B., Zavacki A.M., Ribich S., Kim B.W., Huang S.A., Simonides W.S., Zeöld A., Bianco A.C., *Endocr. Rev.*, **29**, 898-938 (2008).
- 58) Larsen P.R., Zavacki A.M., *Eur. Thyroid J.*, **1**, 232-242 (2012).



- 59) Wu S.Y., Green W.L., Huang W.S., Hays M.T., Chopra I.J., *Thyroid*, **15**, 943-958 (2005).
- 60) Visser T.J., *Chem. Biol. Interact.*, **92**, 293-303 (1994).
- 61) Hagenbuch B., *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **21**, 209-221 (2007).
- 62) Visser W.E., Friesema E.C., Jansen J., Visser T.J., *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **21**, 223-236 (2007).
- 63) van Doorn J., Roelfsema F., van der Heide D., *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, **113**, 59-64 (1986).
- 64) Maeda A., Toyoda N., Yasuzawa-Amano S., Iwasaka T., Nishikawa M., *Mol. Cell. Endocrinol.*, **200**, 111-117 (2003).
- 65) Williams G.R., Bassett J.H., *J. Endocrinol.*, **209**, 261-272 (2011).
- 66) Bianco A.C., Silva J.E., *Endocrinology*, **120**, 55-62 (1987).
- 67) Vansell N.R., Klaassen C.D., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 240-246 (2002).
- 68) Dunn R.T. 2nd, Klaassen C.D., *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 598-604 (1998).
- 69) Dunn R.T. 2nd, Klaassen C.D., *Xenobiotica*, **30**, 345-357 (2000).
- 70) Shelby M.K., Cherrington N.J., Vansell N.R., Klaassen C.D., *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 326-333 (2003).
- 71) Visser T.J., *Acta Med. Austriaca*, **23**, 10-16 (1996).
- 72) Galton V.A., Pitt-Rivers R., *Biochem. J.*, **72**, 314-318 (1959).
- 73) Buitendijk M., Galton V.A., *Thyroid*, **22**, 187-191 (2012).
- 74) Purohit A., Woo L.W., Potter B.V., *Mol. Cell. Endocrinol.*, **340**, 154-160 (2011).
- 75) Hempel N., Wang H., LeCluyse E.L., McManus M.E., Negishi M., *Mol. Pharmacol.*, **66**, 1690-1701 (2004).
- 76) Rodriguez-Pena A., Escriva H., Handler A.C., Vallejo C.G., *FEBS Lett.*, **514**, 309-314 (2002).
- 77) Liu L., Klaassen C.D., *Mol. Pharmacol.*, **50**, 565-572 (1996).

- 78) Runge-Morris M., Kocarek T.A., *Curr. Drug Metab.*, **6**, 299-307 (2005).
- 79) Yanagiba Y., Ito Y., Kamijima M., Gonzalez F.J., Nakajima T., *Toxicol. Sci.*, **111**, 19-26 (2009).
- 80) FDA "Innovation or Stagnation-Critical Path Opportunities Report&List", 2006.
- 81) Biomarkers Definitions Working Group, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69**, 89-95 (2001).
- 82) Wang C., Kong H., Guan Y., Yang J., Gu J., Yang S., Xu G., *Anal. Chem.*, **77**, 4108-4116 (2005).
- 83) Soga T., Sugimoto M., Honma M., Mori M., Igarashi K., Kashikura K., Ikeda S., Hirayama A., Yamamoto T., Yoshida H., Otsuka M., Tsuji S., Yatomi Y., Sakuragawa T., Watanabe H., Nihei K., Saito T., Kawata S., Suzuki H., Tomita M., Suematsu M., *J. Hepatol.*, **55**, 896-905 (2011).
- 84) Kim T.H., Ahn M.Y., Lim H.J., Lee Y.J., Shin Y.J., De U., Lee J., Lee B.M., Kim S., Kim H.S., *Arch. Toxicol.*, **86**, 1885-1897 (2012).
- 85) Cheng S.Y., *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **1**, 9-18 (2000)
- 86) Williams G.R., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8329-8342 (2000).
- 87) Mitsuhashi T., Tennyson G.E., Nikodem V.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 5804-5808 (1988).
- 88) Cettour-Rose P., Theander-Carrillo C., Asensio C., Klein M., Visser T.J., Burger A.G., Meier C.A., Rohner-Jeanrenaud F., *Diabetologia*, **48**, 624-633 (2005).
- 89) Redgrave T.G., Elsegood C.L., Mamo J.C., Callow M.J., *Biochem. J.*, **273**, 375-381 (1991).
- 90) Fiorucci S., Cipriani S., Baldelli F., Mencarelli A., *Prog. Lipid Res.*, **49**, 171-185 (2010).
- 91) Kawamata Y., Fujii R., Hosoya M., Harada M., Yoshida H., Miwa M., Fukusumi S., Habata Y., Itoh T., Shintani Y., Hinuma S., Fujisawa Y., Fujino M., *J. Biol.*

- Chem.*, **278**, 9435-9440 (2003).
- 92) Maruyama T., Miyamoto Y., Nakamura T., Tamai Y., Okada H., Sugiyama E., Nakamura T., Itadani H., Tanaka K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **298**, 714-719 (2002).
- 93) Watanabe M., Houten S.M., Matakaki C., Christoffolete M.A., Kim B.W., Sato H., Messaddeq N., Harney J.W., Ezaki O., Kodama T., Schoonjans K., Bianco A.C., Auwerx J., *Nature*, **439**, 484-489 (2006).
- 94) Escobar-Morreale H.F., Obregon M.J., Escobar del Rey F., Morreale de Escobar G., *J. Clin. Invest.*, **96**, 2828-2838 (1995).
- 95) Escobar-Morreale H.F., Obregón M.J., Escobar del Rey F., Morreale de Escobar G., *Biochimie*, **81**, 453-462 (1999).
- 96) Friesema E.C., Grueters A., Biebermann H., Krude H., von Moers A., Reeser M., Barrett T.G., Mancilla E.E., Svensson J., Kester M.H., Kuiper G.G., Balkassmi S., Uitterlinden A.G., Koehrle J., Rodien P., Halestrap A.P., Visser T.J., *Lancet*, **364**, 1435-1437 (2004).
- 97) Roberts L.M., Woodford K., Zhou M., Black D.S., Haggerty J.E., Tate E.H., Grindstaff K.K., Mengesha W., Raman C., Zerangue N., *Endocrinology*, **149**, 6251-6261 (2008).
- 98) Mayerl S., Visser T.J., Darras V.M., Horn S., Heuer H., *Endocrinology*, **153**, 1528-1537 (2012).
- 99) Rutgers M., Pigmans I.G., Bonthuis F., Docter R., Visser T.J., *Endocrinology*, **125**, 2175-2186 (1989).
- 100) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 101) Visser T.J., Kaptein E., Terpstra O.T., Krenning E.P., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **67**, 17-24 (1988).

- 102) Richard K., Hume R., Kaptein E., Sanders J.P., van Toor H., De Herder W.W., Krenning E.P., Visser T.J., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 2868-2874 (1998).
- 103) Marsili A., Ramadan W., Harney J.W., Mulcahey M., Castroneves L.A., Goemann I.M., Wajner S.M., Huang S.A., Zavacki A.M., Maia A.L., Dentice M., Salvatore D., Silva J.E., Larsen P.R., *Endocrinology*, **151**, 5952-5960 (2010).
- 104) Beetstra J.B., van Engelen J.G., Karels P., van der Hoek H.J., de Jong M., Docter R., Krenning E.P., Hennemann G., Brouwer A., Visser T.J., *Endocrinology*, **128**, 741-746 (1991).
- 105) Miyagi S.J., Collier A.C., *Drug Metab. Dispos.*, **39**, 912-919 (2011).
- 106) Kaplan M.M., Visser T.J., Yaskoski K.A., Leonard J.L., *Endocrinology*, **112**, 35-42 (1983).
- 107) Peeters R.P., Kester M.H., Wouters P.J., Kaptein E., van Toor H., Visser T.J., Van den Berghe G., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90**, 6460-6465 (2005).
- 108) Oddy E.A., Manchee G.R., Freeman N.M., Ward M., Coughtrie M.W., *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 1205-1210 (1997)

