

氏名（本籍）	なが お ひで のり 長 尾 英 則（福岡県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	乙第 351 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	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

論文審査委員	（主査）教授 東 達也
	教授 鍛冶 利幸      教授 廣田 孝司
	教授 樋上 賀一      教授 山下 親正

## 論文内容の要旨

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、発育の促進及び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。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、主にチロキシン（ $T_4$ ）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、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、機序の異なる甲状腺機能低下症モデル動物 2 種を用いた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、以下の研究結果をまとめたものである。

第 1 章では、まず、外科的に甲状腺を摘除したラット（Tx ラット）の血清中甲状腺ホルモン動態を検討するため、トレーサーとして安定同位体標識  $T_4$

( $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$ ) を合成し、オンライン固相抽出-液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (online SPE LC/MS/MS 法) による血清中  $\text{T}_4$ 、トリヨードサイロニン ( $\text{T}_3$ ) 及びリバーストリヨードサイロニン ( $\text{rT}_3$ )、並びに  $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  濃度測定法を確立した。次に、本法を用いて正常及び Tx ラットの血清中甲状腺ホルモン濃度推移、並びに血清中  $\text{T}_4$  動態について検討した。その結果、Tx によりラット血清中  $\text{T}_4$  及び  $\text{T}_3$  濃度は急速に減少したが、その後の  $\text{T}_4$  及び  $\text{T}_3$  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。さらに、この機序を明らかにするため、正常及び Tx ラットにトレーサーとして  $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  を静脈内投与したときの血清中  $\text{T}_4$  及び  $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  濃度について検討した。その結果、正常及び Tx ラットの血清中  $\text{T}_4$  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 (定常状態) を示したものの、 $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  濃度は正常及び Tx ラットで投与後 6 日及び 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  $\text{T}_4$  濃度は一定に維持されるのに対し、 $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  濃度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  $\text{T}_4$  濃度が維持される機序の 1 つとして、甲状腺以外の組織からの  $\text{T}_4$  の供給が示唆された。加えて、Tx ラットの血清中  $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  の消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は、正常ラットの  $t_{1/2}$  より約 2 倍長いことも明らかとなった。すなわち、Tx ラットの血清中  $\text{T}_4$  濃度は、上記機序に加え、血中からの消失が抑制されることでも恒常性が維持されていることを明らかにした。

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  $\text{T}_4$  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  $\text{T}_4$  濃度は緩やかに減少した。しかし、血清中  $\text{T}_3$  濃度は正常ラットの  $\text{T}_3$  濃度と同等の推移を示した。この要因として、ID ラットでは甲状腺のオートレギュレーション機能により  $\text{T}_3$  の生合成が  $\text{T}_4$  より優先されたものと推察された。また、 $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  を静脈内投与したときの血清中  $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  濃度は速やかに減少し、ID ラットの血清中  $[^{13}\text{C}_9]\text{T}_4$  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  $\text{T}_4$  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  $\text{T}_4$  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 $T_3$ 濃度低下が血清中 $T_4$ 消失抑制の誘因であることを検証するため、Txラットに $T_3$ を浸透圧ポンプで補充し、静脈内投与した $[^{13}C_9]T_4$ の血清中動態を検討した。その結果、Txラットの血清中 $[^{13}C_9]T_4$ の $t_{1/2}$ は、 $T_3$ を補充することで正常ラットの $t_{1/2}$ と同等の値にまで回復した。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、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Txによる血清中 $T_4$ の消失抑制の主な機序の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 $T_4$ を保存型代謝物としてグルクロン酸抱合体にすることでその機序に間接的に関与している可能性が推察された。一方、大脳、褐色脂肪（BAT）及び骨格筋のD2はTxにより減少した細胞内 $T_3$ 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。

ところで現在、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、将来における疾病発症、今後の病態の変動、予後、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。そこで第4章では、甲状腺機能低下症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目的とし、超高速液体クロマトグラフ/四重極飛行時間型-質量分析計（UPLC/QTOF-MS）を用いて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（TCDC）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 $T_3$ 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 $T_3$ 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、Txにより血清中濃度が上昇した胆汁酸のうち、CA、CDCA及びTCDCを含めた6種の胆汁酸の血清中構成比についても $T_3$ 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。このときの血清中  $T_3$  濃度はほぼ生理的濃度にまで回復したが、血清中甲状腺刺激ホルモン (TSH) 濃度は高値を維持していた。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、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 G-タンパク質共役型受容体の 1 種である membrane-bile acid receptor / TGR5 (TGR5) に結合し cAMP を上昇させ、D2 を活性化することで細胞内において  $T_4$  から  $T_3$  への変換を促進させる。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- $T_3$  経路を亢進することで細胞内  $T_3$  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。また、 $T_3$  補充により血清中  $T_3$  濃度が生理的濃度に回復しても局所組織の  $T_3$  濃度が回復しないため上記機序が維持されたものと推察された。すなわち、血清中 CA、CDCA 及び TCDCA 濃度と組織中  $T_3$  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。

以上、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  $T_4$  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  $T_3$  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。本研究は、甲状腺機能低下症患者の病態解析、並びにその甲状腺ホルモン補充療法の用法・用量の最適化に寄与するものとする。

## 論文審査の結果の要旨

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、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、甲状腺機能低下症の発症機序は様々であり、多くの調節機構が関連している。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た。本論文は、機序の異なる甲状腺機能低下症モデル動物 2 種を用いた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、以下の研究結果をまとめたものである。

第1章では、まず、血清中甲状腺ホルモン及び $^{13}\text{C}_9\text{T}_4$ 濃度測定法を確立した。次に、本測定法を用い、甲状腺を摘除したラット (Tx ラット) の血清中甲状腺ホルモン濃度推移及び血清中チロキシン ( $\text{T}_4$ ) 動態について検討した。Tx により血清中  $\text{T}_4$  及びトリヨードサイロニン ( $\text{T}_3$ ) 濃度は急速に減少したが、その後の  $\text{T}_4$  及び  $\text{T}_3$  濃度は一定の値を維持していたことから、Tx により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を示唆した。また、Tx ラットに $^{13}\text{C}_9\text{T}_4$ を静脈内投与したときの内因性  $\text{T}_4$ 濃度は一定に維持されたのに対し、 $^{13}\text{C}_9\text{T}_4$ 濃度は急速に減少した。さらに、Tx により血清中 $^{13}\text{C}_9\text{T}_4$ の消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) が延長したことから、Tx ラットの血清中  $\text{T}_4$ 濃度は甲状腺以外の組織からの  $\text{T}_4$ の供給と血中からの消失抑制により恒常性が維持されていることを明らかにした。

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濃度推移及び血清中  $\text{T}_4$ 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  $\text{T}_4$ 濃度は減少したが、血清中  $\text{T}_3$ 濃度は生理的濃度を維持した。この要因として、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  $\text{T}_3$ の生合成が  $\text{T}_4$ より優先されたものと推察した。また、 $^{13}\text{C}_9\text{T}_4$ を静脈内投与したときの血清中 $^{13}\text{C}_9\text{T}_4$ 濃度は速やかに減少し、ID ラットの血清中 $^{13}\text{C}_9\text{T}_4$ 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  $\text{T}_4$ 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  $\text{T}_4$ の消失は抑制されないことが示唆され、甲状腺機能低下症の発症機序の違いによってそれぞれ異なる恒常性維持機構が働くことを明らかにした。

第3章では、Tx ラットに  $\text{T}_3$ を補充したときの血清中  $\text{T}_4$ 動態を検討し、Tx による血清中  $\text{T}_3$ 濃度低下が血清中  $\text{T}_4$ 消失抑制の要因であることを明らかにした。また、肝臓及び腎臓の脱ヨード酵素タイプ1 (D1) 活性の低下による  $\text{T}_4$ の脱ヨード化抑制が Tx による血清中  $\text{T}_4$ の消失抑制の主な機序の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可能性が推察された。一方、脳、褐色脂肪及び筋肉の脱ヨード酵素タイプ2 (D2) は Tx により減少した組織中  $\text{T}_3$ 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甲状腺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て血清中メタボローム解析を行い、コール酸 (CA)、ケノデオキシコール酸 (CDCA) などの胆汁酸がバイオマーカーとなる可能性が示唆された。さらに、Tx による血清中各種胆汁酸濃度の経時的変動を検討した結果、CA、CDCA 及びタウロケノデオキシコール酸 (TCDCA) の血清中濃度推移が Tx 後の血清中甲状腺ホルモンの濃度推移と同調していることを明らかにした。胆汁酸は脳や褐色脂肪などの細胞膜表面に発現した TGR5 に結合し cAMP を上昇させ、D2 を活性化することで細胞内において  $\text{T}_4$ から  $\text{T}_3$ への変換を促進させる。すなわち、CA、CDCA 及び TCDCA は、これら組織において上記経路を亢進することで細胞内  $\text{T}_3$ 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、これら胆汁酸の血清中濃度は  $\text{T}_3$ を補充しても高値を維持した。これは  $\text{T}_3$ 補充により血清中  $\text{T}_3$ 濃度を正常値に戻しても、組織中  $\text{T}_3$ 濃度は生理的濃度にまで回復

しないことに起因するものと考えられた。すなわち、血清中 CA、CDCA 及び TCDCA 濃度と組織中  $T_3$  濃度との間に負の相関を示す可能性が考えられ、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推察した。

以上、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を明らかにした。さらに、血清中 CA、CDCA 及び TCDCA 濃度と組織中  $T_3$  濃度との間に負の相関を示す可能性が推察され、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た。

本論文は、甲状腺機能低下症の病態解析、並びにその甲状腺ホルモン補充療法の用法・用量の最適化に寄与する研究成果であり、著者に博士（薬学）の学位を与えるのに十分な価値を有すると判断する。