

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

中枢性甲状腺ホルモン応答における血液脳関門を介した甲状腺ホルモン輸送機構の役割

氏名 遠山 季美夫

### 【序文】

脳は生理的な重要性から、血液脳関門および血液脳脊髄液関門という 2 つの関門により循環血から隔てられている。循環血から脳内への物質輸送には経細胞輸送が主要な経路となり、トランスポーターが選択的な物質輸送に重要な役割を果たす。当教室の杉山らは肝臓に発現する有機アニオントランスポーターのホモログである Oatp1c1 が血液脳関門特異的に発現しており、有機アニオンよりも甲状腺ホルモン(TH)である thyroxine (T4)に対して高い輸送活性を示すことを明らかにした(1)。

TH は脳の発達・分化・機能維持に重要な働きをしており、胎児期・新生児期での TH の不足は精神遅滞を引き起こすことが知られている。また、血中の TH レベルは甲状腺(T4, 3,3',5-triiodothyronine (T3)の分泌)―視床下部(TRH の分泌)―下垂体(TSH の分泌)からなる feedback 機構により厳密に制御されている。血中での TH の主要成分であるプレホルモン T4 は、脳内に取り込まれた後、活性化及び不活性化を行う脱ヨード化酵素(deiodinase;D2, D3)により制御を受けている。私は修士課程において、血液脳関門における T4 輸送が飽和性を示すこと、また、阻害実験により少なくともその一部には Oatp1c1 が関与していることを示唆する結果を得た(2)。本研究では、Oatp1c1 および同じく血液脳関門に発現している Oatp1a4

のノックアウトマウス(KO マウス)を用いて両トランスポーターの血液脳関門での TH 輸送における働きについて解析を行った。また、神経細胞に発現している TH トランスポーターである MCT8 が血液脳関門に発現していることを見だし、TH 輸送における寄与率の推定をした。

## 【方法と結果】

### 1. KO マウスを用いた *Oatp1c1*, *Oatp1a4* の血液脳関門における TH 輸送の解析

#### *Oatp1c1* および *Oatp1a4* KO マウスにおける TH の脳内への取り込みの評価

成体マウスにおいて *in situ* 脳灌流法により  $^{125}\text{I}$ -T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> の脳内への初期取り込みクリアランスを測定した。*Oatp1c1*, *Oatp1a4* の両 KO マウスにおいて、T<sub>4</sub> の初期取り込みクリアランスは野生型の 60%程度に低下していた。一方、同じく *Oatp1c1* を含めた *Oatp* の典型基質である estradiol-17- $\beta$ -glucuronide の初期取り込みクリアランスは変動していなかった。*Oatp* の阻害剤である estrone-3-sulfate (E-sul)存在下で、野生型、KO マウスともに同程度まで初期取り込みが低下した。このことから、E-sul 非感受性のトランスポーターの発現には影響はなく、E-sul 感受性のトランスポーターとして *Oatp1c1*, *Oatp1a4* はともに T<sub>4</sub> の脳内への取り込みに関与していることが示唆された。一方で T<sub>3</sub> の初期取り込みクリアランスは野生型と比べ若干減少したものの有意な差は見られなかった(図 1)。

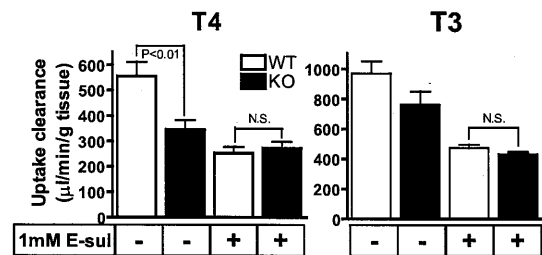


図1 *Oatp1c1* KOと野生型マウスでの甲状腺ホルモンの脳内への初期取り込みクリアランスの比較

更に、*in vivo* における重要性を評価するために単回 i.v.投与後 8 時間における [ $^{125}\text{I}$ ]-T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> の脳内濃度/血漿中濃度比( $K_{p, \text{brain}}$ )を測定した。成体の *Oatp1c1* KO マウスにおいて T<sub>4</sub> の  $K_{p, \text{brain}}$  が野生型の 64%に低下していた(図 3)。一方、*Oatp1a4* KO マウスでは  $K_{p, \text{brain}}$  に野生型との有意な差は見られなかった。T<sub>3</sub> の  $K_{p, \text{brain}}$  は、両 KO マウスともに野生型と比べて有意な差は見られなかった。

#### 発達過程における *Oatp1c1*, *Oatp1a4* の発現プロファイル

脳において TH の重要性が明らかになっている胎児期・新生児期での両トランスポーターの影響を調べるために、脳内での *Oatp1c1*, *Oatp1a4* の経時的な発現変動を定量的 PCR 法により測定した。*Oatp1c1* は E17 から発現が見られ、生後一過的に発現が上昇していた。一方、*Oatp1a4* は生後経時的に発現が上昇していた(図 2)。

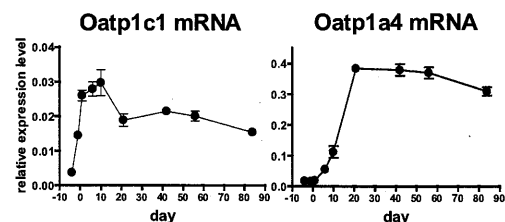


図2 大脳での *Oatp1c1*, *Oatp1a4* の経時的な発現変動

Oatp1c1 における新生児期での発現変動の影響をみるために Oatp1c1 KO マウスにおいて胎児期(E17)および新生児期(P10)での 125I-T4 の  $K_{p,brain}$  の測定を行ったところ、E17 においては KO マウスの  $K_{p,brain}$  に変化はなかったものの、P10 においては KO マウスにおいて  $K_{p,brain}$  が野生型の 45% に低下していた。これらのことから Oatp1c1 は新生児期、成熟期において T4 の脳内への分布に関与していることが明らかとなった(図 3)。

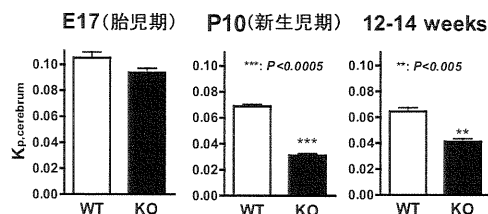


図3 Oatp1c1 KOと野生型マウスでのT4の脳内分布の比較

### 脳内の TH レベルの評価

脳内への T4 の取り込みの低下による脳内の TH 応答性遺伝子への影響を調べるために、脳内の TH 活性化酵素 D2 と不活性化酵素 D3 の mRNA 量および酵素活性を測定した。D2 は TH により負の制御されており、D3 は正に制御されていることが知られている。両 KO マウスにおいて D2, D3 の mRNA 量に変化はなかった。脳ホモジネートを調製し、in vitro で酵素活性を測定したところ、Oatp1c1 KO マウスにおいて D2 の酵素活性が 2.7 倍に増加し、D3 の酵素活性に若干の低下がみられた。Oatp1a4 KO マウスにおいては、D2, D3 とも酵素活性に野生型との有意な差はみられなかった。このことから、Oatp1c1 KO マウスでは脳内の TH 濃度が低下していることが示唆された。

### Oatp1c1, Oatp1a4 の機能欠損による TH の恒常性への影響

両 KO マウスにおける末梢での TH 作用への影響をみるために血清中 T4 および TSH 濃度を RIA により測定を行った。いずれの KO マウスにおいても血清中 T4 濃度および TSH 濃度に野生型との有意な差は見られなかった。T4 による TSH 応答性への影響を見るために Oatp1c1 KO マウスにおいて T4 負荷試験を行った。野生型および Oatp1c1 KO マウスに 0.15%PTU を添加した低ヨード飼料を 2 週間与え、血清中 TSH の上昇を惹起した(WT, KO:72, 77 ng/ml)後、T4(10, 100 $\mu$ g/kg/day)を低用量から順次 5 日間ずつ i.p.投与し、TSH の応答性を測定した。野生型、Oatp1c1 KO マウスはそれぞれ血清中 TSH が 51, 1.3 および 54, 1.1 (ng/ml)と低下し、同程度の応答性を示した。Oatp1c1 の機能欠損による脳内への T4 の取り込みの低下は D2 の酵素誘導により代償され脳内の T3 レベルには影響がみられないものと考えられた(図 4)。また、Oatp1a4 の TH 輸送への関与は小さいかもしくはないものと考えられる。

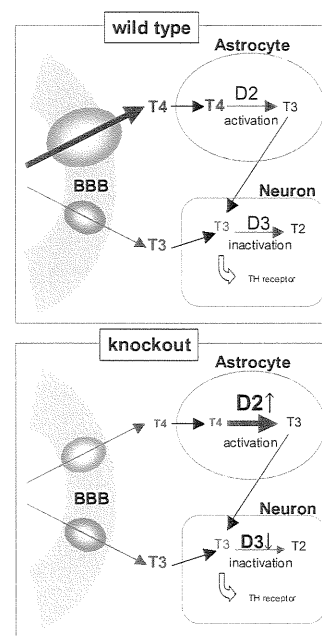


図4 Oatp1c1の機能欠損による脳内変動の模式図

## 2. 血液脳関門での TH の取り込みにおける MCT8 の関与

Oatp1c1, Oatp1a4 だけでは脳内への TH の取り込み機構を説明することは出来なかった。そこで、神経細胞において発現している TH トランスポーター MCT8 の血液脳関門での発現および TH の取り込みへの関与について解析を行った。

### 発達過程における MCT8 の発現プロファイル

Oatp1c1 KO マウスにおいて E17 での  $K_{p,brain}$  が野生型において変化していないことから、E17 において他の TH トランスポーターの発現上昇が考えられた。そこで、MCT8 の発達段階での脳内での発現量を定量的 PCR 法により測定し比較した。MCT8 は胎児期に一過的に発現が上昇していた(図 5)。

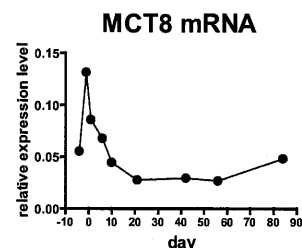


図5 大脳でのMCT8の経時的な発現変動

### 血液脳関門での MCT8 の発現

血液脳関門での MCT8 の発現を調べるために、成体マウスの脳凍結切片を用いてマウス MCT8 抗体による免疫染色を行った。脳毛細血管内皮細胞のマーカー蛋白として P-gp との共染を行った。MCT8 のシグナルは P-gp のシグナルと一致した。また、抗原部位を含む C 末端 41 アミノ酸融合 GST 蛋白を用いたところ、脳毛細血管内皮細胞での MCT8 のシグナルが消失した。このことから、MCT8 は脳毛細血管内皮細胞に発現していることが明らかとなった。

### 血液脳関門における TH 輸送における MCT8 の寄与の推定

Oatp1c1, Oatp1a4, MCT8 の cDNA を哺乳類発現ベクターに組み込み、それぞれを HEK293(Oatp1c1, Oatp1a4), MDCK2(MCT8)に遺伝子導入し、安定発現系の構築を行った。各発現系において T4, T3 の取り込みクリアランスを測定した(表 1)。発現系より算出された各クリアランスを *in vivo* に外挿するために、発現系および脳毛細血管での各トランスポーターの単位蛋白あたりの発現量をウエスタンブロット法により半定量的に測定した。発現系に対する脳毛細血管での各トランスポーターの発現量比を発現系より算出したクリアランスに乗じることで、各トランスポーター脳毛細血管での相対クリアランスを算出し、各トランスポーターの T4, T3 の輸送における寄与率を評価した。その結果を表 1 に示す。血液脳関門における T4 の輸送比は Oatp1c1, Oatp1a4, MCT8 はそれぞれ、30, 12, 58%、T3 の輸送比はそれぞれ、6, 7, 88% であることが明らかとなった。

表1 発現系からの血液脳関門での甲状腺ホルモン輸送における各種トランスポーターの寄与率の推定

T4 transport	uptake clearance ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$ )	scaling factor	relative uptake ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$ )	比率 (%)
mOatp1c1	145 $\pm$ 34	0.393 $\pm$ 0.119	57.0 $\pm$ 21.8	29.7
mOatp1a4	12.6 $\pm$ 9.1	1.83 $\pm$ 0.53	23.1 $\pm$ 17.9	12.0
mMCT8	255 $\pm$ 25	0.438 $\pm$ 0.232	112 $\pm$ 60	58.2
T3 transport	uptake clearance ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$ )	scaling factor	relative uptake ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$ )	比率 (%)
mOatp1c1	17.8 $\pm$ 11.1	0.393 $\pm$ 0.119	7.00 $\pm$ 4.85	5.5
mOatp1a4	4.9 $\pm$ 6.5	1.83 $\pm$ 0.53	8.97 $\pm$ 12.16	7.0
mMCT8	255 $\pm$ 18	0.438 $\pm$ 0.232	112 $\pm$ 60	87.5

### 【考察・結論】

本研究により、Oatp1c1 は脳内への T4 の取り込みに関与していることが明らかとなった。KO マウスにおいて脳内濃度の低下が示唆されたが、T4 の濃度低下は D2 の酵素誘導による局所での T3 の産生の増加により代償されているため、TSH の negative feedback といった脳内での TH の作用には影響が見られなかったと考えられる。Oatp1a4 は初期取り込みには関与しているものの  $K_{p,brain}$  に変化が無かったことから、実際の輸送に占める寄与は小さいものと考えられる。Oatp1c1, Oatp1a4 に加え MCT8 が血液脳関門での T4 の取り込みに関与していることが示唆された。また、T3 についてはその大部分が MCT8 によって担われていることが示唆された。このように脳内への TH の輸送は Oatp1c1, Oatp1a4, MCT8 により行われていることが明らかとなった。ヒト血液脳関門においてもこれらトランスポーターのホモログの発現が観察されたことから、ヒトにおける TH 輸送においても同様にこれらが関与しているものと考えられる。MCT8 はすでに精神遅滞を引き起こす原因遺伝子として報告されており、MCT8 による血液の関門を介した TH の輸送低下がその一因となっていることが推察された。

### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたりご協力をいただきました油谷先生、水口先生、田中先生に感謝いたします。

### 【参考文献】

1. Sugiyama D, Kusunohara H, Taniguchi H, et al. 2003 Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem* 278:43489-95
2. Tohyama K, Kusunohara H, Sugiyama Y 2004 Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology* 145:4384-91