

## 審査の結果の要旨

氏名 遠山 季美夫

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。血液と脳細胞外液との間の物質の交換には、トランスポーターが重要な役割を果たす。当教室の杉山大介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 Organic anion transporting polypeptide 1c1 (Oatp1c1)が血液脳関門特異的に発現していること、*in vitro* 輸送実験から有機アニオンよりも甲状腺ホルモンである thyroxine (T4)に対して高い輸送活性を示すことを明らかにした。申請者の遠山は、修士課程において、血液脳関門における T4 の脳取り込み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 が関与している可能性があることを明らかにしている。

甲状腺ホルモンは脳の発達・分化・機能維持に重要な働きをしており、胎児期・新生児期での甲状腺ホルモン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、血中の甲状腺ホルモンレベルは甲状腺(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。血中での甲状腺ホルモン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、活性体である T3 へと変換される。T3 の脳内濃度は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おり、さらに D2, D3 も T3 により制御されている。脱ヨード化酵素と同様に、血液脳関門を介した甲状腺ホルモンの輸送機構は脳内の甲状腺ホルモンの供給および濃度維持を行っていると考えられ、血液脳関門に発現するトランスポーターに関する研究は注目されつつある。

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を用いて両トランスポーターの血液脳関門での甲状腺ホルモン輸送における働きについて解析を行い、Oatp1c1 が T4 の脳取り込みに一部関与していることを明らかにした。また、神経細胞に発現している甲状腺ホルモントランスポーターである Monocarboxylate transporter 8 (MCT8)が血液脳関門に発現していることを見いだした。更に *in vitro* 評価系を用いた解析から血液脳関門を介した甲状腺ホルモンの脳取り込みにおける各トランスポーターの寄与率の推定を行い、血液脳関門における T4 輸送については Oatp1c1 と MCT8 が、T3 輸送についてはほぼ MCT8 が関与していることを報告し、甲状腺ホルモン輸送機構の全貌を明らかにした。

#### 1. 血液脳関門を介した甲状腺ホルモン輸送における有機アニオントランスポーター (Oatp1c1, Oatp1a4)の役割

申請者は Oatp1c1<sup>-/-</sup>および Oatp1a4<sup>-/-</sup>マウスの作成を行い、表現系解析として、甲状腺ホルモンの脳内への輸送系および脳内での甲状腺ホルモン応答における両遺伝子の機能欠損の影響を解析した。Oatp1c1<sup>-/-</sup>マウスでは血清中の内因性 T4 濃度に変化はないものの、T4 の

脳取り込みが 30-40%低下していることから、脳内の内因性 T4 濃度の低下が示唆された。*Oatp1c1*<sup>-/-</sup>マウス脳内で T4 から T3 への変換に関わる甲状腺ホルモン活性化酵素 D2 の酵素活性が増加していることを見出した。しかし、脳内の T3 応答性遺伝子の T3 と TR を介した転写制御に起因するに発現変動、feedback 機構の異常、脳組織の形態異常は観察されなかった。これら結果から、*Oatp1c1* の機能欠損による T4 の脳取り込みの減少は脳内の D2 酵素の活性増加に代償され、脳内の T3 濃度は維持されていると考察している。さらに、発達の各段階での *Oatp1c1* の機能欠損の影響を調べたところ、*Oatp1c1* は出生後、特に新生児期以降では、T4 の脳取り込みに関与しているものの、胎児期での関与はほとんどなく、別のトランスポーターが T4 の脳取り込みに関わっていることを明らかにした。また、*Oatp1c1* とは異なり、*Oatp1a4* は T4, T3 いずれの脳取り込みにおいて重要な役割を果たしていないことが明らかにした。

さらに、申請者は甲状腺ホルモン機能亢進症および甲状腺ホルモン機能低下症モデルマウスの作成を行い、血液脳関門を介した甲状腺ホルモンの脳取り込みが甲状腺ホルモン応答性を示さないことを明らかにした。

## 2. 血液脳関門におけるその他の甲状腺ホルモントランスポーターの探索および寄与率の評価

*Oatp1c1* 以外の甲状腺ホルモントランスポーターとして、申請者は MCT8 に焦点を置き、研究を行った。免疫染色の結果から、マウスおよびヒトにおいて MCT8 が脳毛細血管内皮細胞においても発現していることを明らかにした。更に *In vitro* 評価系を構築し、成体マウスの血液脳関門において、MCT8 は T4 の脳取り込みに 60%、T3 の脳取り込みに 90%程度関与していることを推定した。この結果は、*Oatp1c1*<sup>-/-</sup>および *Oatp1a4*<sup>-/-</sup>マウスの結果から推定される *Oatp1c1*, *Oatp1a4* 以外のトランスポーターの寄与率と一致している。発達段階での脳内の MCT8 の mRNA レベルでの発現量を定量的 PCR 法により測定し、MCT8 は胎児期に発現量が一過的に増加していることから、MCT8 は、特に胎児期での T4 の脳取り込みに関与していることが示唆された。

以上のように、申請者は血液脳関門における甲状腺ホルモンの脳取り込み機構を *in vitro*, *in vivo* の実験により解析し、T4 の脳取り込みに *Oatp1c1* が関与していることを明らかにし、MCT8 が関与していることを示唆した。*Oatp1c1*, MCT8 のヒトホモログはヒト血液脳関門に発現しているおり甲状腺ホルモンを基質とすることから、ヒトでも両トランスポーターが甲状腺ホルモンの脳取り込みに関与していることが期待される。さらに、両トランスポーターは胎児期、新生児期、成熟後といった各段階で発現変動していることを明らかにした。D2, D3 も発達段階において発現変動し、D2 の発現が低い胎児期において、脳内での T4 から T3 への変換経路の割合は低く、逆に新生児期以降ではその割合が高くなることが報告されている。また、*Oatp1c1* は T4 を特異的に輸送し、MCT8 は T4, T3 を共に輸送することが

報告されている。本研究結果とこれら知見をまとめると、脳内での T4 からの T3 産生が出生後、新生児期において増加するのに併せて、Oatp1c1, MCT8 の発現変動により甲状腺ホルモンの脳取り込みが T3 優位から T4 優位に切り替わることが示唆された。甲状腺ホルモンは中枢神経系の発達に不可欠なため、このように脳内の甲状腺ホルモン濃度は各時期において厳密に維持されているのではないかと考察している。血液脳関門を介した脳内への甲状腺ホルモンの取り込み機構がそのロバストネスの一翼を担っていることが示唆された。

更に申請者は、厳密な甲状腺ホルモンの維持機構において、血液脳関門を介した甲状腺ホルモンの輸送系は甲状腺ホルモン応答性を示さないことを明らかとした。このことは、脳内への甲状腺ホルモンの取り込み機能が低下した場合、輸送能を制御することで対応できないという脆弱性を有していることを示唆する。甲状腺ホルモン機能異常患者を対象とした linkage analysis の結果、その原因遺伝子として核内受容体である TR $\beta$ に加え、甲状腺ホルモントランスポーターMCT8 が同定されている。Oatp1c1 はそのホモログ OATP1C1 がヒト脳毛細血管においても発現している。OATP1C1 について、これまでのところ健常人においてアミノ酸置換を伴う変異は報告されていない。Oatp1c1<sup>-/-</sup>マウスにおいて中枢機能異常に起因する表現型は見られなかったが、重篤な精神遅滞を引き起こす AHDS の原因遺伝子である MCT8<sup>-/-</sup>マウスにおいても中枢機能異常に起因する表現型は見られていない。本結果は OATP1C1 の機能欠損が疾患と結びつかないと結論づけることは出来ない。今後、TR $\beta$ や MCT8 といった既存の遺伝子とともに OATP1C1 についても甲状腺ホルモン機能異常患者を小児科医等と共同してゲノムスクリーニングを行うことで、ヒトにおける OATP1C1 の重要性について検証する必要があると結んでいる。

本研究では、これまで肝臓や脳での有機アニオン系化合物の排出に関わっていること考えられてきた OATP の 1 つである Oatp1c1 がむしろ T4 輸送に重要な役割を果たし、内因性基質の動態に深く関わっていることを初めて示した。さらに、血液脳関門における甲状腺ホルモン輸送機構の分子基盤を明らかにし、その研究意義は甲状腺ホルモン機能異常疾患のメカニズムの端緒を開く研究であると考えられる。よって、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。