



Title	ラットにおける甲状腺腫瘍の発生機序における薬物代謝酵素の誘導と排出型トランスポーターの役割に関する研究：抗てんかん薬クロバザムを用いた検討
Author(s)	宮脇, 出
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61692
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (宮脇 出)

論文題名

ラットにおける甲状腺腫瘍の発生機序における薬物代謝酵素の誘導と排出型トランスポーターの役割に関する研究—抗てんかん薬クロバザムを用いた検討

論文内容の要旨

医薬品開発において、臨床投与期間として6か月以上の場合にはラットとマウスでの2年間のがん原性試験が必要とされている。その中でもラットの甲状腺がんは比較的多く認められ、その多くは甲状腺の濾胞型のがんである。一方、ヒトにおける甲状腺がんの多くは乳頭型で全体の70%以上を占め、濾胞型の発生頻度は10%程度と少ない。ヒトでの甲状腺がんは罹患率及び死亡率が低く予後も良好であることから他のがん種に比べて臨床や非臨床での研究は少なく、発生原因の解明には至っていない。医薬品開発において上記がん原性試験で甲状腺の増殖性病変が現れた場合、たとえがんに至らない良性腫瘍であったとしても、ヒトへの安全性担保に関わる考察が十分できない場合には認可が下りず、有望な新薬の創出機会を逸する原因ともなっている。

本研究は代表的な非遺伝毒性発がん物質である抗てんかん薬クロバザム (CLB) を用いてラットの甲状腺の代謝排泄に関わる酵素やトランスポーターに注目することで、甲状腺腫瘍形成への重要な因子を明らかにし、ヒトとの種差を明確にする上で重要な知見を得ることを目的とした。

本論文は6章までの章立てで構成し、第1章では前述の研究の背景を述べている。

第2章ではラットの甲状腺腫瘍の発生機序を検討するにあたり、まず実験的な甲状腺腫瘍モデルを作製する目的から短期間投与で腫瘍に代わる適切なエンドポイントの設定とそれに必要な投与期間の決定を試みた。さらに甲状腺の代謝排泄に関わる酵素やトランスポーターに注目するため、CLBの甲状腺への作用が直接的ではなく、甲状腺ホルモンのクリアランスの亢進を介した間接作用であることも確認した。結果、CLBの1日1回400 mg/kgを最低2週間反復経口投与することにより甲状腺濾胞腺腫の前段階である甲状腺濾胞細胞の過形成が生じることを示した。さらに放射性同元素でラベルした甲状腺ホルモンを一定量投与し、その消失を経時的に追跡することで、CLB投与により血中甲状腺ホルモンのクリアランスが亢進していることを示した。

第3章では甲状腺ホルモンの代謝に重要な肝臓に注目しCLB投与による病理組織学的な影響を確認するとともに、代謝酵素関連遺伝子に絞ったDNAカスタムアレイを用いて、網羅的にその経時的な遺伝子発現変動を確認した。その結果、CLB投与後の肝臓では小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、さらにCyp2b、Cyp3a及びUgt1a、Ugt2b遺伝子が強く誘導されていることを明らかにした。このことはCLB投与で核内受容体CAR及びPXRの活性化とその下流のCyp及びUgt遺伝子の誘導が血中甲状腺ホルモンのクリアランスに重要である可能性を見出した。

第4章では肝臓内の甲状腺ホルモンの代謝に肝臓内外への輸送が重要であることから、肝臓における甲状腺ホルモンの取り込みに関与するOATP1、OATP2、OATP4及びNTCPならびに胆汁排泄に関与するMRP2及びBCRPの遺伝子発現変化を検討した。その結果、肝臓中Oatp2及びMrp2の発現上昇が確認され、それらのトランスポーターが血中甲状腺ホルモンのクリアランスに重要な役割を果たしている可能性を見出した。

第5章ではMrp2を欠損したEHBRラット及びUgt1Aを欠損したGunnラットを用いて、CLB投与後のラットの甲状腺腫瘍形成におけるMRP2及びUGT1Aの直接的な寄与について検討した。その結果、EHBRラットでは甲状腺刺激ホルモン (TSH) の増加を伴わずに甲状腺濾胞細胞過形成も発現しなかった。このことは血中甲状腺ホルモンのクリアランスにMRP2の寄与が大きいことを示唆している。一方、GunnラットではTSHの増加を伴った甲状腺濾胞細胞過形成が発現した。ウェスタンブロットの結果からGunnラットではUGT1Aタンパクは発現していないもののUGT2Bタンパクの発現は強く、このことはUGTがそのサブファミリーにおいて1Aと2Bが補完的に甲状腺ホルモンの代謝に関与している可能性を示した。

第6章では上記2~5章の一連の検討結果を総括し、総合的に考察した。すなわちCLBによる甲状腺腫瘍形成機序はCLB投与により肝臓中の核内受容体CAR及びPXRが活性化が起り、その下流遺伝子であるUgt1a、Ugt2bが誘導され、肝臓内の甲状腺ホルモンのグルクロン酸抱合が亢進し、増加した抱合体は同様に発現誘導されたMRP2により積極的に胆汁中に排泄される。これら甲状腺ホルモンの肝臓内フローにはOATP2が重要な役割を果たし、血中からの甲状腺ホル

モンの肝臓内へ取り込みを担うことで効率的な甲状腺ホルモン取り込み—代謝—胆汁排泄といったクリアランスサイクルが形成しているものと考えられた。CLBの慢性投与期間中は上記サイクルが継続し、生体では血中で減少する甲状腺ホルモンを補うべく下垂体へのネガティブフィードバックが起こり過剰なTSHの継続的な放出が起こる。この過剰なTSHの慢性刺激により甲状腺は機能肥大を起こし、病理組織学的には甲状腺濾胞細胞の過形成が観察されると考えられた。本研究により甲状腺ホルモンのグルクロン酸抱合においてはUGT1Aと2Bが補完的にあるいは協調しながら代謝を進めるのに対し、抱合された甲状腺ホルモンの胆汁中への排泄にはMRP2が責任因子として重要であり、MRP2の発現の程度がラットにおける甲状腺の腫瘍形成を決定づけている可能性が高いことを提唱した。一方、ヒトとの種差について、MRP2の基質となる物質の胆汁排泄率やタンパク発現量はラットが他の種に比較して最も高いという報告を踏まえ、MRP2の生理学的な違いがラットとヒトとの甲状腺腫瘍形成における種差の大きな原因であると考察した。

本研究ではラットにおける間接作用による甲状腺腫瘍形成における重要な因子の推定に成功し、今後のヒトとラットの甲状腺発がん機序の種差を明らかにする上での重要な知見となると考えられた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (宮 脇 出)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 八木清仁
	副 査	教授 辻川和丈
	副 査	教授 橋本 均

論文審査の結果の要旨

本研究はラットにおける非遺伝毒性甲状腺腫瘍誘発物質として抗てんかん薬クロバザムを用い、その腫瘍形成に係る因子の解明を目的として行われた。

第一にクロバザムの短期投与により甲状腺濾胞腺腫の前段階である甲状腺濾胞細胞の過形成が起こることを示し、その機序として血中甲状腺ホルモンのクリアランスの増加が重要であることを明らかにしている。この結果により本研究の目的にかなった甲状腺過形成モデルを構築できることが示された。次に肝臓に注目し、クロバザム投与による病理組織学的な影響を確認するとともに甲状腺ホルモン代謝関連遺伝子群の発現変動を網羅的に解析した。その結果、クロバザム投与後の肝薬物代謝酵素のmRNAの発現変動より核内受容体CARおよびPXRの活性化に引き続くCYP2B、CYP3AおよびUGTの発現上昇が血中甲状腺ホルモンのクリアランスに重要な役割を果たしている可能性を見出した。また肝臓内の甲状腺ホルモンを効率よく代謝する上で甲状腺ホルモンの肝臓内外への輸送も重要であることから、肝臓における甲状腺ホルモンの取り込みや胆汁排泄に寄与するトランスポーターの関与について解析を行っている。その結果、肝臓の取り込みおよび排泄型トランスポーターのmRNAの変化からOATP2およびMRP2の発現上昇が血中甲状腺ホルモンのクリアランスに重要な役割を果たしている可能性を見出した。続いてMrp2を欠損したEHBRラットおよびUgt1Aを欠損したGunnラットを用いて実際にラット甲状腺腫瘍形成におけるMRP2およびUGT1Aの直接的な寄与について検討し、Gunnラットでは甲状腺濾胞細胞過形成が発現し、UGTはそのサブファミリーにおいて1Aと2Bが補完的に甲状腺ホルモンの代謝に関与していることを明らかにした。一方EHBRラットでは甲状腺濾胞細胞過形成が発現せず、血中甲状腺ホルモンの排泄にMRP2の寄与が大きいことを明らかにした。

本研究により甲状腺ホルモン代謝におけるグルクロン酸抱合においてはUGT1Aと2Bが補完的にあるいは協調しながら代謝を進めるのに対し、抱合された甲状腺ホルモンの胆汁中への排泄にはMRP2が単独で働いている可能性が示唆され、MRP2の発現の程度がラットにおける甲状腺の腫瘍形成において最も重要な役割を果たしている可能性が高いことが提唱された。

本研究では今後のヒトとラットの甲状腺発がんの種差を明らかにする上での重要な知見が得られており、博士論文にふさわしい内容であると判断した。