

氏 名	にし お なお き 西 尾 直 樹
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 628 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	薬 学 研 究 科 医 療 薬 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	甲状腺ホルモンによる P 糖蛋白質の発現調節機構に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 乾 賢 一	教 授 橋 田 充	教 授 高 倉 喜 信
--------	--------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

P 糖蛋白質 (Pgp) は、生体異物を細胞内から細胞外へと排出する ATP 依存性の薬物トランスポーターであり、ヒトでは *MDR1*、ラットでは *mdr1a* および *mdr1b* とそれぞれ異なった遺伝子にコードされている。Pgp は多くの正常組織に分布しており、生体防御機構並びに薬物の吸収障壁として重要な役割を果たしている。また、Pgp が幅広い基質認識特性を有すること、リファンピシンやステロイドホルモンによる発現誘導を受けることがこれまで明らかにされてきた。一方、病態時など様々な生理的条件下における Pgp の発現変動については、その分子機構も含めて未解明な点が多い。

甲状腺機能亢進症や低下症は、甲状腺ホルモンの血中濃度変化を伴う内分泌疾患である。Pgp の基質であるジゴキシンの血中濃度は、甲状腺機能亢進時には正常時に比べて低値を示すこと、甲状腺機能低下時には高値を示すことが報告されている。この薬物動態の変動に関する分子機構は不明であるが、甲状腺ホルモンによる Pgp の発現変動がその一要因として考えられる。そこで著者は、甲状腺ホルモンによるラット *mdr1a/1b* およびヒト *MDR1* の発現変動とその分子機構に関する系統的な解析を行い、以下の新知見を得た。

I. 甲状腺ホルモンによる P 糖蛋白質の発現・機能変動

まず、甲状腺疾患が Pgp の発現に及ぼす影響を個体レベルで調べるために、チロキシン (T_4) を連続経口投与して作成した甲状腺機能亢進モデルラットを用いて、腎臓、肝臓、空腸並びに回腸における Pgp および *mdr1a/1b* mRNA の発現量変動について検討を行った。甲状腺機能亢進モデルラットではそれぞれの臓器において Pgp の発現亢進が認められたが、一方で *mdr1a/1b* mRNA は腎臓、空腸および回腸において発現上昇が認められた。以上の結果より、甲状腺機能亢進ラットの各臓器における Pgp の発現が亢進することが明らかとなり、ラット Pgp および *mdr1a/1b* mRNA の発現誘導には臓器によって異なるメカニズムが関与していることが示唆された。

次にヒト Pgp および *MDR1* mRNA の発現に及ぼす甲状腺ホルモンの影響について詳細に調べるために、Pgp を内因性に発現しているヒト培養腸上皮細胞 Caco-2 を用いて Pgp 並びに *MDR1* mRNA の発現量変動、および Pgp の輸送活性について検討を行った。トリヨードチロニン (T_3) で処理を行った Caco-2 細胞において頂側膜画分における Pgp の発現量は顕著に上昇し、*MDR1* mRNA も T_3 濃度依存的な発現上昇が認められた。一方で、 T_3 を除去することで Pgp の発現低下が認められた。Caco-2 細胞における [3H] ジゴキシンの取り込みは、 T_3 処理することで顕著に低下した。さらに、多孔性フィルター上に培養した Caco-2 細胞を用いて [3H] ジゴキシンの経細胞輸送を調べたところ、 T_3 処理による側底膜側から頂側膜側への分泌方向に対応するジゴキシンの輸送の亢進が認められた。従って、甲状腺ホルモン処理による Pgp の発現増加に起因して分泌方向へのジゴキシンの輸送能が上昇することが示された。これらの結果から、ラット *mdr1a/1b* およびヒト *MDR1* は甲状腺ホルモンによる発現誘導を受けることが明らかとなった。

II. 甲状腺ホルモンによる *MDR1* の転写調節機構

甲状腺ホルモンは、発達・成長過程や基礎代謝の維持に重要な役割を担う必須のホルモンであり、その作用は主に核内受

容体である甲状腺ホルモン受容体（TR）を介して発現し、遺伝子の転写を調節することで発現量を変動させることが示されている。Caco-2細胞を用いた結果から、甲状腺ホルモンは核内受容体を介してMDR1 mRNAの転写を亢進させることが推察された。そこでTRを介したMDR1の発現誘導に関わる転写調節機構を解明するため、Caco-2細胞を用いたプロモーター解析を行った。MDR1転写開始部位の上流約10 kbまでのプロモーター領域をクローニングし、様々な長さのレポーターコンストラクトを作成した。種々のレポーターコンストラクトを用いた検討から、甲状腺ホルモンによるMDR1の発現誘導には近位プロモーター領域ではなく、転写開始部位の上流約8.2～7.7 kbの領域が関与することが明らかとなった。この領域には甲状腺ホルモン受容体応答配列（TRE）に類似した配列が複数存在しており、これらTRE類似配列への変異導入によって、転写開始部位の上流7,868位から7,852位の領域が甲状腺ホルモンによるMDR1の発現誘導に重要な部位であることが判明した。またCaco-2細胞の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイによって、この領域にTRが結合することを明らかにした。これらの結果より、甲状腺ホルモンによるMDR1の発現誘導はTRを介して行われ、遠位プロモーター領域が関与することが明らかとなった。

以上、著者は甲状腺ホルモンによるPgpの発現調節について系統的解析を試み、TRを介した遠位プロモーター領域における発現調節によってPgpの発現が誘導されることを明らかにした。本研究成果は、病態時における薬物体内動態の変動因子の解明に資するものであると共に、Pgpの基質による薬物治療を行う上で有用な基礎的知見になるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

P糖蛋白質（Pgp）は多くの正常組織に発現し、生体防御並びに薬物の吸収障壁として重要な役割を果たしている。しかし、病態時など様々な生理的条件下におけるPgpの発現変動については、その分子機構も含めて未解明な点が多い。Pgpの基質であるジゴキシンの血中濃度は、甲状腺機能亢進時には正常時に比べて低値を示すこと、甲状腺機能低下時には高値を示すことが報告されている。この薬物動態の変動に関する分子機構は不明であるが、甲状腺ホルモンによるPgpの発現変動がその一要因として考えられる。そこで申請者は、甲状腺ホルモンによるラットmdr1a/1bおよびヒトMDR1の発現変動とその分子機構に関する系統的な解析を行い、以下の新知見を得た。

まず、甲状腺疾患がPgpの発現に及ぼす影響を個体レベルで調べるために、甲状腺機能亢進モデルラットを用いて腎臓、肝臓、空腸並びに回腸におけるPgpおよびmdr1a/1b mRNAの発現量変動について検討を行った。その結果、甲状腺機能亢進モデルラットではそれぞれの臓器においてPgpの発現亢進が認められたが、一方でmdr1a/1b mRNAは腎臓、空腸および回腸においてのみその発現が上昇することが明らかとなった。

次にヒトPgpおよびMDR1 mRNAの発現に及ぼす甲状腺ホルモンの影響について精査した。Pgpを内因性に発現しているヒト培養腸上皮細胞Caco-2を用いてPgp並びにMDR1 mRNAの発現量変動、およびPgpの輸送活性について検討を行ったところ、トリヨードチロニン（T₃）で処理を行ったCaco-2細胞において頂側膜画分におけるPgpの発現量は顕著に上昇し、MDR1 mRNAもT₃濃度依存的な発現上昇が認められた。さらに、Caco-2細胞における[³H]ジゴキシン取り込みは、T₃処理することで顕著に低下することが示された。これらの結果から、ラットmdr1a/1bおよびヒトMDR1は甲状腺ホルモンによる発現誘導を受けることが判明した。

甲状腺ホルモンの作用は、主に核内受容体である甲状腺ホルモン受容体（TR）を介して発現し、標的遺伝子の転写を調節することで発現量を変動させることが示されている。そこでTRを介したMDR1の発現誘導に関わる転写調節機構を解明するため、Caco-2細胞を用いたプロモーター解析を行った。その結果、甲状腺ホルモンによるMDR1の発現誘導には近位プロモーター領域ではなく、転写開始部位の上流7,868位から7,852位の領域が甲状腺ホルモンによるMDR1の発現誘導に重要な部位であることが判明した。またCaco-2細胞の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイによって、この領域にTRが結合することを明らかにした。これらの結果より、甲状腺ホルモンによるMDR1の発現誘導はTRを介して行われ、遠位プロモーター領域が関与することが示された。

以上の研究成果は、甲状腺ホルモンによるPgpの発現調節機構について明らかにしたものであり、病態時における薬物体内動態の変動因子の解明に貢献するところ大であり、薬物動態学の発展に寄与するものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に，平成19年 2 月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。