

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18006

研究課題名(和文) 甲状腺ホルモン脱ヨード酵素を軸とした新たな疾患概念と治療法の探索

研究課題名(英文) Exploring new disease concepts and treatments based on iodothyronine deiodinases

研究代表者

坂根 依利子 (Sakane, Yoriko)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70781342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺ホルモン脱ヨード酵素(D1、D2、D3)は甲状腺ホルモン作用の調節を行う重要な分子である。しかし調節経路は未だ不明な点が多いため、本研究で我々は化合物スクリーニングを行い、正に制御するヒット化合物(D1：6個、D2：34個、D3：5個)と負に制御するヒット化合物(D1：7個、D2：なし、D3：2個)を得た。このヒット化合物の多くが臨床使用されていることを活かし、当院の患者データを用いたコホート研究と統合させる手法により、アドレナリン受容体作動薬であるリトドリンはD2を正に制御、チロシンキナーゼ阻害薬はD3を正に制御することにより、甲状腺機能を変化させることを明らかにした(論文投稿中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺機能低下症は患者数が非常に多い疾患であるが、現在行われている合成T4製剤単独の補充療法では、投与量を調節しても、甲状腺ホルモン作用不足が残存するというアンメット・ニーズがある。本研究では甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の視点からこの問題に取り組んだ。今回検証した化合物は得られた全ヒット化合物の一部であるが、特にD2を正に制御するヒット化合物は今後治療開発への可能性を秘めるものである。甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の調節経路について新たな知見を提供した学術的意義に加え、未検証のヒット化合物も含めたさらなる研究への基盤を構築したという点で社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Thyroid hormone actions are mainly regulated by iodothyronine deiodinases classified into 3 types: D1, D2, and D3. As the regulatory mechanisms were largely unknown, we performed chemical screening. Of the hit compounds, 6 and 7 compounds up- and downregulated D1, respectively; 34 upregulated D2; and 5 and 2 compounds up- and downregulated D3, respectively. We could make a breakthrough in that our chemical screening was combined with a clinical study because we applied a chemical library that included a number of compounds that were clinically used. We verified through examinations that an adrenergic receptor agonist, ritodrine, upregulated D2 and tyrosine kinase inhibitors upregulated D3, and that they altered thyroid function in clinical settings.

研究分野：内分泌学、甲状腺学

キーワード：甲状腺ホルモン脱ヨード酵素 甲状腺機能低下症 化合物ライブラリー ハイスループットスクリーニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモンは高コレステロール血症や肥満症の治療薬としての開発が試みられてきたが、動悸などの有害事象が問題となっており、標的臓器へ特異的に作用させることが必要とされている。甲状腺ホルモン脱ヨード酵素（以下、脱ヨード酵素）は、発現分布と代謝様式の異なる1~3型（D1、D2、D3）があり、プロホルモンであるT4を活性型であるT3や不活性型であるreverseT3に代謝することにより甲状腺ホルモン作用の調節を行う重要な分子である。しかし、ヒトにおける制御機構や臨床における意義についての報告はほとんどない。

甲状腺機能低下症は、橋本病や甲状腺手術を主な原因とし、甲状腺ホルモンの補充を要する。特に橋本病は成人女性の1割が有する非常に頻度の高い疾患である。長い半減期を有するT4製剤を単独で治療に用いるが、これはT4を投与すれば脱ヨード酵素により体内でT3へ代謝されるという前提による。しかし、T4製剤の投与量を調節して甲状腺ホルモン血中濃度を正常に保っても、甲状腺ホルモン作用不足を示唆する自覚症状、脂質異常症、メタボリックシンドロームが12%程度の患者に見られるというアンメット・ニーズが存在する。我々は脱ヨード酵素が臓器特異的な甲状腺ホルモン作用調節を行っていることに着目し、甲状腺機能低下症の新たな治療のターゲットとして期待できると考えた。

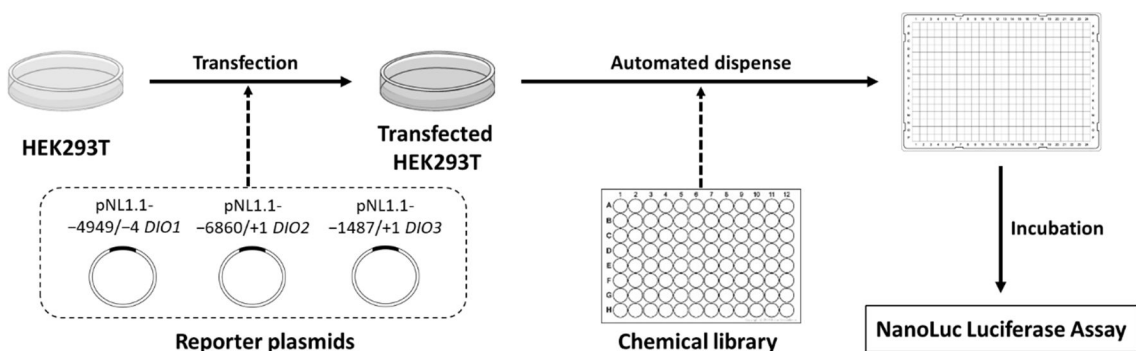
本研究では、全く新規のヒト脱ヨード酵素の制御因子の同定を目指し、臨床応用されている小分子化合物からなる化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング（HTS）を行うこととした。脱ヨード酵素に関連する知見が乏しいのは、評価するアッセイ系の障壁が大きい。特異性の高い抗体がなく、酵素活性を測定するにはラジオアイソトープやカラム処理を要する。我々は後述する新規アッセイを開発することでこの課題を乗り越え、本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

脱ヨード酵素は臓器特異的な甲状腺ホルモン作用調節という重要な役割を担い、甲状腺機能低下症の新たな治療のターゲットとして期待できる。上記に述べたHTSによる脱ヨード酵素の新規制御因子の同定により、新規治療薬のシーズを獲得することを目的とし、さらには脱ヨード酵素が関与する甲状腺領域における新たな病態・疾患概念の確立も目指した。

3. 研究の方法

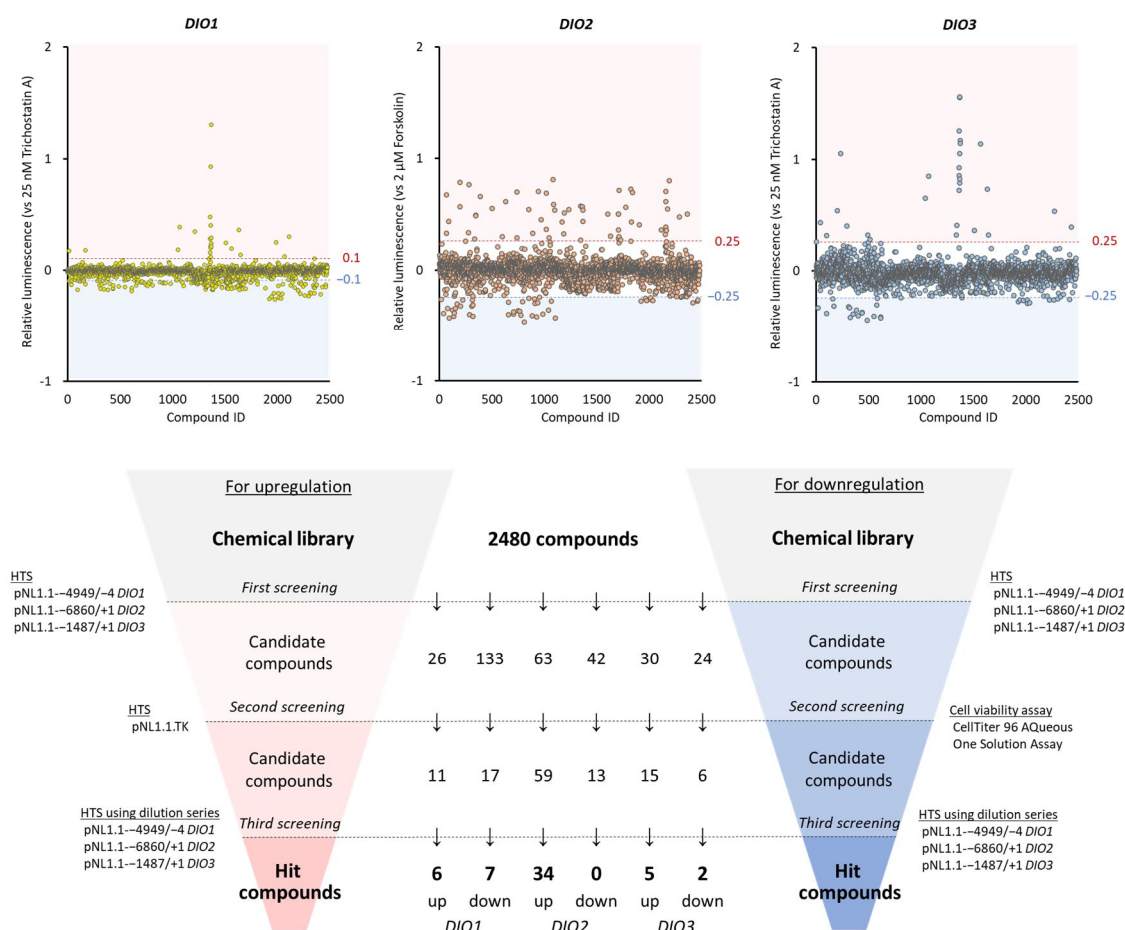
HTSを可能にするアッセイとして、レポーターとして高い発光強度と安定性を有するNanoLuc®ルシフェラーゼを用い、384ウェルプレートと少ない試薬量で十分に検出できる、ランニングコストと安定性に優れたプロモーターアッセイを構築した(下図)。これを用いて臨床応用されている化合物ライブラリー(2480種類)をスクリーニングした。



ヒット化合物の検証にあたっては、当院の患者データを用いたコホート研究にてヒット化合物の内服前後における甲状腺機能の変化を評価した。また、C57BL/6Jマウスへの投与実験も行い、臓器において実際に脱ヨード酵素発現変化が生じているかも確認した。

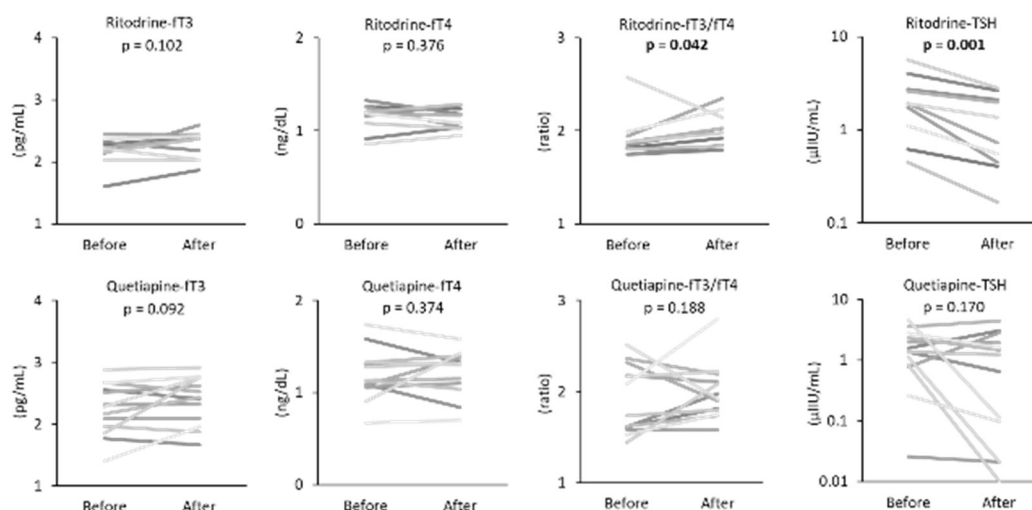
4. 研究成果

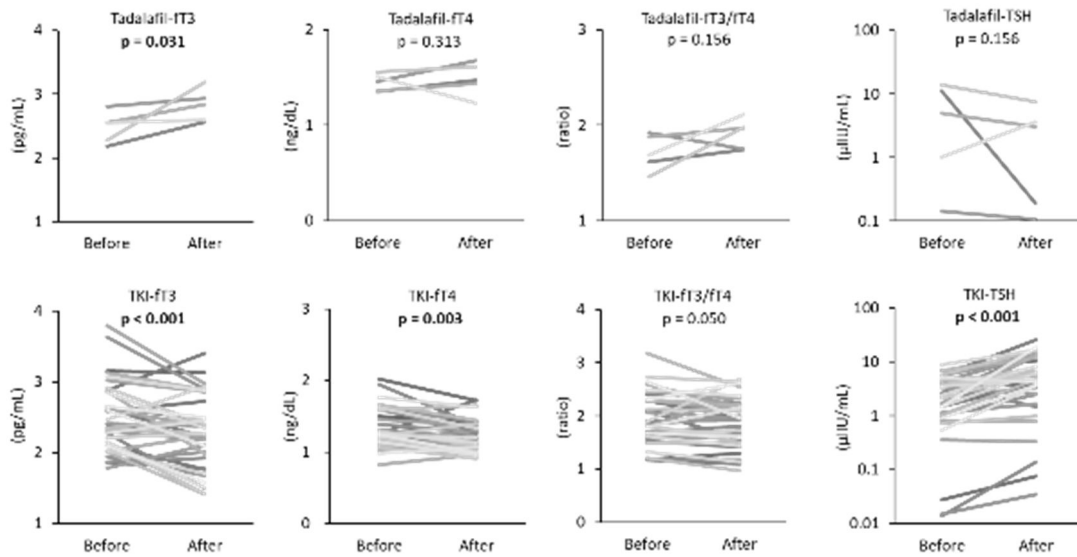
実施した HTS の概略を下図に示す。



ライブラリー中の全 2480 種類の化合物に対し、まず一次スクリーニングを行った。その後、D1、D2、D3 それぞれについて任意のカットオフ値を超える候補化合物を選択し、正に制御する化合物については恒常発現プロモーターのレポータープラスミドを用いたプロモーター非特異的反応の除外、負に制御する化合物については細胞毒性の除外を行う二次スクリーニングを実施した。さらに、再現性および用量依存性を確認する三次スクリーニングを経て、ヒット化合物を確定した。正に制御するヒット化合物は D1 : 6 個、D2 : 34 個、D3 : 5 個、負に制御するヒット化合物は D1 : 7 個、D2 : なし、D3 : 2 個であった。

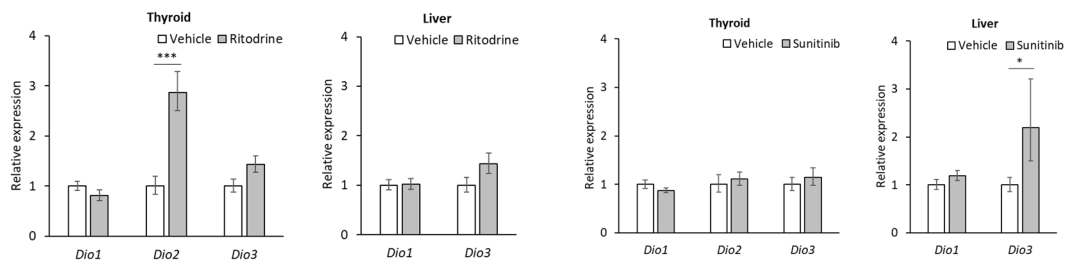
これらのヒット化合物が生体へ有意な影響を及ぼすかを検証するため、当院の患者データを用いたコホート研究と統合させ、ヒット化合物の内服前後における甲状腺機能の変化を評価した。これはヒット化合物の中に臨床応用されているものが複数含まれていたことに基づく新機軸の手法である。結果を下図に示す。





検証可能なデータ数は、アドレナリン受容体作動薬(HTS では D2 を正に制御)であるリトドリン、セロクエル(HTS では D2 を正に制御)、タダラフィル(HTS では D2 を正に制御)、チロシンキナーゼ阻害薬(HTS では D3 を正に制御)で確保することができた。甲状腺機能に有意な変化が見られたのは、リトドリン、タダラフィル、チロシンキナーゼ阻害薬であった。

この甲状腺機能の変化が脱ヨード酵素の発現調節を介しているかを検証するため、マウスへの投与実験を行った。リトドリン投与により甲状腺における D2 遺伝子発現の増加、チロシンキナーゼ阻害薬であるスニチニブ投与により肝臓における D3 遺伝子発現の増加が認められた。いずれも HTS と一致する結果であった。



一連の研究から、アドレナリン受容体作動薬であるリトドリンは D2 を正に制御、チロシンキナーゼ阻害薬は D3 を正に制御することにより、甲状腺機能を変化させることを明らかにした(論文投稿中)。今回検証した化合物は得られた全ヒット化合物の一部であり、特に D2 を正に制御するヒット化合物は今後治療開発への可能性を秘めるものである。甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の調節経路について新たな知見を提供し、未検証のヒット化合物も含めたさらなる研究への基盤を構築する成果を挙げる事ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamauchi I, Yamashita T, Sugawa T, Tagami T, Hanaoka I, Usui T, Hirota K, Hakata T, Ueda Y, Fujii T, Sakane Y, Yasoda A, Inagaki N.	4. 巻 96
2. 論文標題 Bezafibrate induces hypothyroidism in a patient with resistance to thyroid hormone due to a G347R variant.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Endocrinol (Oxf)	6. 最初と最後の頁 236-245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamauchi I, Sakane Y, Yamashita T, Hakata T, Sugawa T, Fujita H, Okamoto K, Taura D, Hirota K, Ueda Y, Fujii T, Yasoda A, Inagaki N.	4. 巻 36
2. 論文標題 Thyroid hormone economy in mice overexpressing iodothyronine deiodinases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 e22141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内 一郎、坂根 依利子、伯田 琢郎、山下 貴史、植田 洋平、藤井 寿人、八十田 明宏、稲垣 暢也
2. 発表標題 化合物スクリーニングを用いた甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の新規調節因子の探索
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ichiro Yamauchi
2. 発表標題 Iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: Insights from the overexpressing mice
3. 学会等名 第63回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内一郎
2. 発表標題 化合物スクリーニングから迫る甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の臨床的意義
3. 学会等名 第62回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内一郎
2. 発表標題 ヒト甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の強制発現系による検討
3. 学会等名 第62回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内一郎
2. 発表標題 ヒト甲状腺ホルモン脱ヨード酵素の強制発現系の構築
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内 一郎、坂根 依利子、山下 貴史、伯田 琢郎、藤田 晴香、岡本 健太郎、田浦 大輔、廣田 圭昭、植田 洋平、藤井 寿人、八十田 明宏、稲垣 暢也
2. 発表標題 甲状腺ホルモン脱ヨード酵素過剰発現マウスにおける甲状腺機能の解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内 一郎, 坂根 依利子, 山下 貴史, 伯田 琢郎, 藤田 晴香, 岡本 健太郎, 田浦 大輔, 廣田 圭昭, 植田 洋平, 藤井 寿人, 八十田 明宏, 稲垣 暢也
2. 発表標題 甲状腺ホルモン脱ヨード酵素過剰発現マウスのフェノタイプ解析
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内 一郎, 坂根 依利子, 伯田 琢郎, 藤田 晴香, 岡本 健太郎, 植田 洋平, 藤井 寿人, 田浦 大輔, 八十田 明宏, 稲垣 暢也
2. 発表標題 ケミカルバイオロジーを基盤とした甲状腺ホルモン脱ヨード酵素調節因子の研究
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関