

令和元年5月31日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00557

研究課題名(和文) 小脳臨界期における甲状腺ホルモン系の転写制御に対する環境化学物質の毒性機序の解明

研究課題名(英文) The effects of environmental chemicals on thyroid hormone systems during the critical period of developing cerebellum

研究代表者

宮崎 航 (Miyazaki, Wataru)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90512278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳発達における甲状腺ホルモン(TH)系の役割と環境化学物質による毒性発現メカニズムには未だ不明な点が多い。本研究では標的遺伝子発現に關与するTH受容体(TR)およびTH応答配列(TREs)の結合変化を中心に、特に小脳の臨界期における結合の変化を網羅的に検索し、脳発達におけるTH系の役割の解明を目指した。

小脳臨界期に特異的に機能するTREsの特定のため、クロマチン免疫沈降法ならびにマイクロアレイを行い、臨界期にTHに依存して変動する遺伝子群を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、小脳の発達において、甲状腺ホルモン(TH)の刺激によって大きく発現が変動する遺伝子群を明らかにするとともに、その中でも特に化学物質によって異常な変化が引き起こされる可能性のあるものを同定した。

これらの結果はヒトの脳発達に重要な甲状腺ホルモン(TH)系の役割の解明につながり、さらに環境化学物質によるヒトへの影響を防ぐ上で必要不可欠な基礎データである。

研究成果の概要(英文)：Thyroid hormone (TH) and the systems have important roles on brain development including cerebellum. However, the mechanisms of several adverse effects on the development by environmental chemicals are still unclear. In this study, to clarify the mechanisms, we focused on the interaction between TH receptors (TRs) and TH response elements (TREs) during the critical period of developing cerebellum.

To identify the TREs which were responsible for the expression of target genes on cerebellum development, we performed chromatin immune precipitation assay with anti-TR antibodies. In addition, microarray analysis was performed to realize the target genes induced or suppressed by TH stimulation during the critical period.

These results may be one of the important information to clarify the mechanism.

研究分野：衛生学

キーワード：環境化学物質 甲状腺ホルモン 脳発達

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ポリ塩素化ビフェニル(PCB)類やダイオキシン類、ポリ臭素化ジフェニルエーテル(PBDE)類などの環境化学物質の周産期曝露は、低用量の曝露であっても脳発達と機能に影響を及ぼすことが報告されている (Jacobson JL et al N Engl J Med. 335(11):783-739 など)。甲状腺ホルモン(TH)はヒトの脳発達や身体の発達・発育、恒常性の維持に重要な役割を果たしている。特に、脳発達における TH の作用は発達過程に特異的な臨界期に必要な不可欠であることが知られており、臨界期での環境化学物質による TH 系の攪乱が脳発達・機能に影響を及ぼすと考えられている。しかし、毒性発現メカニズムの解明には至っていない。

TH により誘導される標的遺伝子の転写・発現は、TH 受容体(TR)と標的遺伝子の制御領域に存在する TH 応答配列(Thyroid hormone Response Elements: TREs)を介して制御されている。申請者はこれまで、PCB が TH により引き起こされる転写誘導を大きく抑制すること (Iwasaki T, Miyazaki W et al., Biochem Biophys Res Commun. 2002)、また、この抑制は TR-TREs 結合の PCB によるかい離(Miyazaki W et al., J Biol Chem. 2004)によるものであることを報告している。この一連の現象は PCB 曝露のみならず、PBDE 曝露においても観察された (Ibhazehiebo K et al., Environ Health Perspect. 2011)。

以上から臨界期において TH により制御される脳発達に重要な標的遺伝子の発現は、TH による TR の各 TREs への正常な結合が PCB もしくは PBDE の曝露によって変化し、それによって標的遺伝子の発現が攪乱されるであろうことが考えられる。環境化学物質の TR に対する作用メカニズムの全容を明らかにするためには、TH と化学物質によって TR の結合が変化する標的遺伝子の TREs を明らかにし、それをふまえたうえで、標的遺伝子の発現の変化を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

小脳発達における TR を介する TH 系の作用に対する環境化学物質の毒性発現メカニズムを解明することを目的とし、以下を目標に研究を行った。

- ① 小脳発達において不可欠な TH の標的遺伝子ならびに TREs の特定
- ② TREs のノックダウンによる化学物質曝露モデルの創出

3. 研究の方法

- ① TH に関連する表現型の異なるマウスにおける小脳での TREs 検索

マウス小脳の臨界期における TH に依存して変化する TREs の検索を行うため、野生型マウス(WT)、周産期甲状腺機能低下マウス(PTU)、小脳特異的 TH 不応マウス(Dominant Negative: DN)を作成した。生後 14 日目(P14)の雄仔マウスから小脳を採取しクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行った。

- ② CRISPR-Cas9 法を用いた任意 TREs ノックアウト

TH 系依存的に標的遺伝子の制御に関与する TREs をノックダウンするため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いた。まず、培養細胞 (HepG2, HeLa) を用いてターゲットとなる TREs のシーケンスを持つガイド RNA の選定を行い、ガイド RNA を含む導入ベクターを作成し、TREs のノックダウンを解析した。

- ③ 標的遺伝子の発現変化と TREs に関する解析

TREs に発現制御を受けると予想される各標的遺伝子について、PTU 群に P2-P7 まで TH を投与し、最終投与時間から 24 時間後に小脳を採取し、マイクロアレイによる発現解析を行った。また、PTU 群に P7 にのみ投与し 6 もしくは 24 時間後に小脳を採取した群についても同様にマイクロアレイを行った。また、変動した遺伝子について、定量的リアルタイム PCR 法にて発現変化を確認した。その後、これらの発現変化について、各 TREs に対応する標的遺伝子の発現を解析した。

さらに、小脳のうち、細胞種ごと (プルキンエ細胞、顆粒細胞) の標的遺伝子の発現解析をお行うため、レーザーマイクロダイセクション法を用いて、各細胞を分取し、上記により検出された遺伝子の発現解析をおこなった。

4. 研究成果

① THに関連する表現型の異なるマウスにおける小脳での TREs 検索

標的遺伝子のプロモーター上における TREs の検索を行うため、WT マウス、PTU マウス、DN マウスより臨界期に小脳を採取し、抗 TR 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法ならびにゲノムシークエンス法(ChIP-seq 法)を行った。しかし、これまでに ChIP に用いられた報告のある抗体であったにもかかわらず、十分機能しなかったため、biotin 標識した TR プラスミドベクターを作成した。これらのベクターを HepG2 細胞に対して遺伝子導入を行い、ChIP 法を行ったところ、既知の標的遺伝子(LDLR: low density lipoprotein receptor, Arnt: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)の TRE に結合していることが確認できた(図 1)。さらに、小脳プルキンエ細胞に遺伝子導入を試みたが、十分な導入効率ならびに発現を得ることができなかったため、Flag 標識 TR を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を用いた導入を試みた。AAV-Flag-TR は作成できたものの、プルキンエ細胞並びにマウスには導入するに至らなかった。

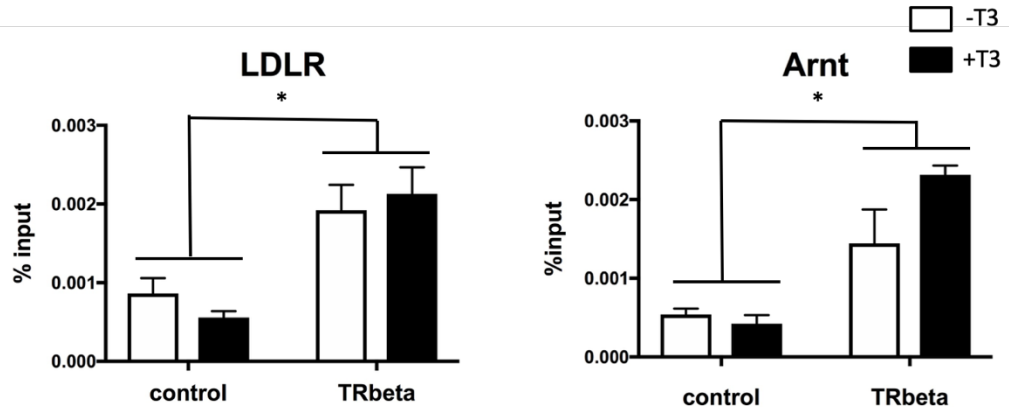


図 1. Biotin 標識 TR を用いた ChIP 法

② CRISPR-Cas9 法を用いた任意 TREs ノックアウト

Dio1 (Iodothyronine deiodinase 1) は TRE をもち、TH の標的遺伝子として知られていることから、CRISPR/Cas9 法の positive control とした。Dio1 TRE に対応し、切断するのに適切な sgRNA を選定するため、Dio1 TRE を含む 2 箇所の sgRNA を作成し、HepG2 細胞を用いて CRISPR/Cas9 法によるゲノムの切断とその効率を確認した (図 2)。作成した 2 種の sgRNA はどちらもゲノム DNA を切断が確認できたが、特に切断効率の高い sgRNA site2 (図 2-③) を Dio1 TRE ノックダウンのための sgRNA とした。

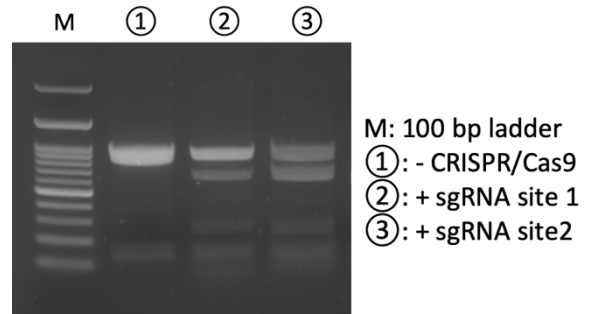


図 2. CRISPR/Cas9 法による Dio1 TRE の切断

sgRNA site2 をプルキンエ細胞ならびにマウスに遺伝子導入を試みたが、①と同じく遺伝子導入が困難であったため、同様に sgRNA を含む AAV の作成を行った。

③ 標的遺伝子の発現変化と TREs に関する解析

TRE の検索と合わせて、臨界期に TH 特異的に変動する標的遺伝子の選定を行うため、を行うため、周産期甲状腺機能低下マウスに対し生後 2~7 日まで TH を投与した群 (T4-5days) を作成し、最終投与から 24 時間後に小脳を採取した。また、7 日目のみに TH を投与した群を作成し、最終投与から 6 (T4-1shot (6h)) もしくは 24 時間(T4-1shot (24h))後に小脳を採取した。これらの試料をマイクロアレイにて遺伝子発現を、TH を投与しない甲状腺機能低下マウス群 (Hypothyroid mice) と比較し、TRE に伴って遺伝子の発現が変化する遺伝子群と TRE によらない遺伝子群の同定を行った。

Hypothyroid mice と比較して、各群で TH に伴って mRNA 発現の変動した遺伝子の数は、T4-5 days において 1007 遺伝子が増加、1009 遺伝子が低下、T4-1 shot(6h) においては 355 遺伝子が増加、977 遺伝子が低下、T4-1 shot(24h) では 365 遺伝子が増加、1121 遺伝子が低下した。また、すべての群に共通して、98 遺伝子が増加、762 遺伝子が低下した。T4-1 shot(6h) と T4-1 shot(24h) で増加した遺伝子の mRNA 量を比較すると、前述の 98 遺伝子を除いて、14 遺伝子のみが共通して増加し、その他の遺伝子は TH の

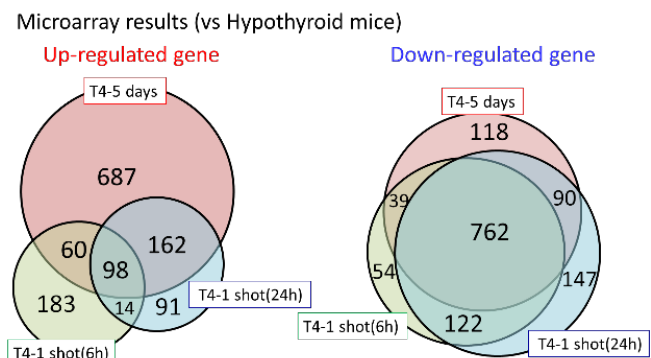


図 3. TH の投与に伴って変動した遺伝子数

曝露時間により、それぞれの群でのみ増加した。

さらに、上記の変動した TH の標的遺伝子のうち、TRE の存在が報告されている遺伝子 (*Pcp2*, *Hr*, *Ntf3*) といまだ TRE の報告されていない遺伝子について、リアルタイム PCR 法にて解析を行った (図 4)。その結果、TRE の有無にかかわらず発現の変化が認められた。

以上の結果から、TH の曝露時間もしくは時期により TH の刺激によって標的遺伝子の発現が大きく変動することが明らかとなった。つまり、小脳の臨界期における TH の作用と脳発達における標的遺伝子の制御は TRE の有無のみならず、TH の作用時間、時期などによって厳密に行われていると考えられる。

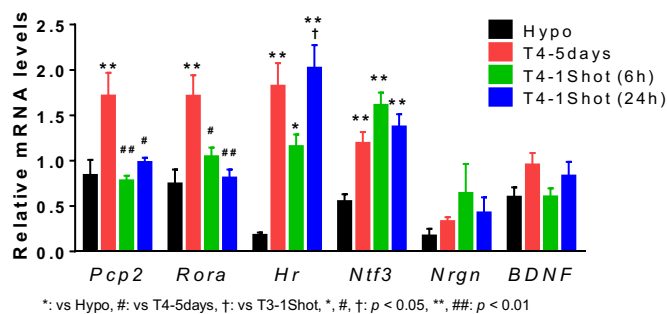


図 4. 標的遺伝子の発現の差異

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ariyani W*, Iwasaki T*, Miyazaki W*, Khongorzul E, Nakajima T, Kameo S, Koyama H, Tsushima Y, Koibuchi N (*contributed equally). Effects of Gadolinium-Based Contrast Agents on Thyroid Hormone Receptor Action and Thyroid Hormone-Induced Cerebellar Purkinje Cell Morphogenesis. *Frontiers in Endocrinology*. 査読有, 2016. 7:115. doi: 10.3389/fendo.2016.00115.
- ② Ariyani W*, Iwasaki T*, Miyazaki W†, Yu L, Takeda S, Koibuchi N. (*contributed equally, †corresponding author). A Possible Novel Mechanism of Action of Genistein and Daidzein for Activating Thyroid Hormone Receptor-Mediated Transcription. *Toxicological Sciences*. 査読有, 2018. 164(2):417-427. doi: 10.1093/toxsci/kfy097.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 宮崎航, 岩崎俊晴, 鯉淵典之, 肝臓における甲状腺ホルモン受容体を介する転写における *Arnt* の関与, 日本内分泌かく乱化学物質学会 第 19 回研究発表会, 2016
- ② 宮崎航, 岩崎俊晴, 鯉淵典之, 甲状腺ホルモン受容体を介する転写に対する *Arnt* の関与, 日本生理学会 第 94 回大会, 2017
- ③ 宮崎航, 岩崎俊晴, 鯉淵典之, *Arnt* の転写発現における甲状腺ホルモン受容体の関与, 日本内分泌かく乱化学物質学会 第 20 回研究発表会, 2017
- ④ Wataru Miyazaki, Winda Ariyani, Toshiharu Iwasaki, Noriyuki Koibuchi, The Changes of Thyroid Hormone Receptors (TRs)-mediated Transcription by Direct Binding of Isoflavones to TRs In Vitro, ENDO 2018, the Endocrine Society's annual meeting, 2018
- ⑤ 宮崎航, 岩崎俊晴, 鯉淵典之, 甲状腺ホルモン受容体を介する *Arnt* の発現制御, 日本生理学会 第 95 回大会, 2018

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 天野 出月

ローマ字氏名: Amano, Izuki

研究協力者氏名: 齋島 旭

ローマ字氏名: Haijima, Asahi

研究協力者氏名: 鯉淵 典之

ローマ字氏名: Koibuchi, Noriyuki

研究協力者氏名: Anthony N Hollenberg

※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、研究者個人に帰属されます。