

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08969

研究課題名(和文) 統合的脳機能を支える甲状腺ホルモンの精神基盤構築への接点

研究課題名(英文) Involvement of thyroid hormone in mental function-related molecules

研究代表者

内田 克哉 (Uchida, Katsuya)

東北大学・情報科学研究科・助教

研究者番号：40344709

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)：甲状腺ホルモン不足が脳の発達にどのような変化をもたらすかを調べるために、マウスを用いて先天性甲状腺機能低下症を実験的に再現しました。その結果、パルブアルブミン発現の減少、レット症候群の責任分子であるMeCP2や神経細胞の突起などの形態を制御するCUX1の転写物が脳皮質で減少していることも明らかになりました。これらの分子はいずれも正常な脳機能維持には重要であることから、先天性甲状腺機能低下症に診られる知能障害は、我々が想像する以上に、複数の分子の機能不全によって生じる可能性が示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周産期における甲状腺ホルモン不全によって生じる知能障害は、今日では、適切な時期に治療を開始することで回避できるが、どのような分子メカニズムによって高次の脳機能が攪乱されるかはわかっていない。本研究では、脳の機能発現に重要とされるいくつかの分子が、甲状腺ホルモンの不足によって、その発現レベルが低下することを明らかにした。これらの分子の挙動を精査することで、精神機能発現の基盤メカニズムの解明に寄与できるものと推察される。

研究成果の概要(英文)：To determine how thyroid hormone deficiency negatively alters brain development, we experimentally replicated congenital hypothyroidism in mice. The results revealed an decreased in parvalbumin expression and a decreased transcripts MeCP2, the molecule responsible for Rett syndrome. Furthermore, CUX1, which regulates dendritic spine and other morphology also downregulate in the cortex. All of these molecules are important for the maintenance of normal brain function, suggesting that the intellectual impairment seen in congenital hypothyroidism may be caused, beyond our imagination, by multiple molecules.

研究分野：神経科学 内分泌学

キーワード：甲状腺機能低下症 甲状腺ホルモン 神経発達障害 パルブアルブミン

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモンはかつてより、脳神経系の発達に重要であることが知られており、それゆえ、周産期の甲状腺ホルモン不足は適切な治療が施されないと重篤な知的障害を生じることが報告されている。今日では、出生後のマススクリーニングにより、早期に甲状腺機能低下症(クレチン症)を発見・診断し、ホルモン剤の適用により、クレチン症を回避することが可能となっている。周産期の甲状腺ホルモン不足によって神経突起やミエリン形成の不全が観察報告されてきたが、我々はこれらに加えて、甲状腺刺激ホルモン受容体突然変異マウスにて海馬におけるニューロン新生が減弱することを見出した。海馬ニューロン新生は、歯状回における神経前駆細胞から成熟顆粒細胞ニューロンへと成長する過程で GABA 入力を必要とすることが報告されていたため、GABA 作動性抑制性ニューロンの挙動に注目した組織学的解析を実施することとした。ラットにおいては GABA ニューロンの亜集団の一つであるパルブアルブミンニューロンが甲状腺ホルモンの不足によって減少することが報告されていたため、抗甲状腺剤によって人為的に甲状腺機能を低下させたマウスを用いて同様の分子に着目したところ、確かにパルブアルブミンニューロンの減少が観察された。また、近年、統合失調症や自閉スペクトラム症の死後脳において、このパルブアルブミンニューロンの減少が報告されており、正常な精神機能発現にパルブアルブミンニューロンが重要な役割を演じていることが示唆されている。

2. 研究の目的

周産期における甲状腺ホルモン不足によって、脳内パルブアルブミンはどのような発現変化を生じるのか、また、その他の精神疾患関連分子の挙動を探り、甲状腺機能不全による知的障害と統合失調症や自閉スペクトラム症発症の分子基盤の共通性を見出すことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

甲状腺機能低下症モデルマウスの作成にあたっては 0.05%過塩素酸カリウムと 1%メチマゾールを飲水に溶解し、妊娠マウスに与え、甲状腺ホルモン合成を阻害させた。出産後、仔の血液中の甲状腺ホルモンの一過性上昇が認められる 14 日目までこれを継続した (hypothyroid 群)。また hypothyroid 群に加えて、出生直後よりサイロキシシン (甲状腺ホルモン: T4) を投与した実験群 (T4 投与群) を用意し、ホルモン補充によるレスキュー効果を検討した。なお、各個体の血中ホルモン量は酵素免疫測定法により解析した。パルブアルブミンの発現量を測定するために、抗体を用いた免疫染色法に加えてリアルタイム PCR 法により遺伝子発現レベルを測定した。またパルブアルブミンニューロンの細胞系譜を追跡するためにチミジンアナログであるブロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与しパルスチェイス実験を行なった。投与後 1 ヶ月目に脳標本を回収し、パルブアルブミンと BrdU 陽性核の共局在を観察した。また、MeCP2 ならびに CUX1 の免疫染色を行い、周産期に甲状腺ホルモン不足を経験した個体の神経組織学的な変化を観察した。加えてニッスル染色を行い、体性感覚野の組織形成を吻側から尾側へと詳細に検討した。

4. 研究成果

抗甲状腺剤による甲状腺機能低下症を誘導した母マウスより出生した生後 14 日目の仔マウス脳におけるパルブアルブミン mRNA 発現は著しく低下した (図 1)。これらの仔マウスの血中 T4 濃度は有意に低下しており検出限界値であった。パルブアルブミン発現は出生直後より行なった T4 投与により対照群と同程度に回復することから、甲状腺ホルモンはパルブアルブミン発現に対して重要な役割を演じているものと推察された。一方、生後 14 日目に抗甲状腺剤を除去すると血中 T4 濃度は経日的に回復し 10 日ほどで対照群のそれと遜色のないほどまでに回復した。これに伴いパルブアルブミン発現も徐々に回復する傾向にあった。かつて我々は、甲状腺刺激ホルモン受容体遺伝子突然変異マウス (成長遅延症マウス) を用いて、パルブアルブミン陽性細胞の減少を見出しているが (文献 1)、これに伴い、ソマトスタチン陽性細胞の増加を確認している。パルブアルブミ

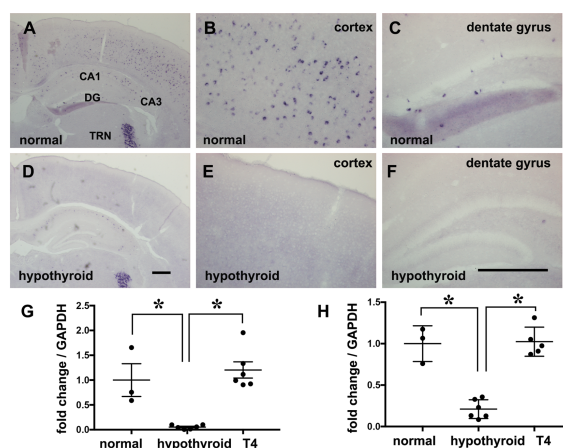


図 1 大脳皮質および海馬におけるパルブアルブミン発現
正常マウス (A-C) ならびに甲状腺機能低下症マウス (D-E)
脳におけるパルブアルブミン mRNA を in situ
ハイブリッド形成法により観察。またリアルタイム PCR 法
による定量解析結果を示す。G は大脳皮質を H は海馬にお
ける結果を示している。

ンやソマトスタチン陽性細胞は同じ神経前駆細胞から生じるため、甲状腺ホルモンが細胞系譜に影響をもたらすとも考えられたが、一般にこれらの事象は胎生期に終了する。しかし脳の一部においては生後も GABA ニューロンの増殖が続くとの報告もあるため、BrdU を用いたパルスチェイス試験を実施した。出生直後 (postnatal day 0, P0)、7 日 (P7)、14 日 (p14) に BrdU を単回投与し、1 ヶ月後にパルプアルブミンとの共局在を観察したが、いずれも共局在を認めなかったため、少なくとも細胞系譜に影響することはないと考えられた。ここで、遺伝子発現解析の結果を考慮すれば、甲状腺ホルモンはパルプアルブミン遺伝子発現を調節する一因子とするのが妥当であると思われる。直接あるいは間接作用かを確認するために、現在、パルプアルブミン遺伝子上流に甲状腺ホルモン受容体結合サイトの有無を調査中である。一方、マウス脳のパルプアルブミンニューロン選択的に methyle-CpG binding protein2 (MeCP2) を選択的にノックダウンすることでレット症候群様の行動発現を呈すること (文献 2)、ならびにレット症候群の患者の一部で甲状腺機能障害が観察されることから (文献 3)、甲状腺機能低下症モデルマウス的大脑皮質ならびに海馬における MeCP2 発現を観察した。甲状腺機能低下症マウスにおける MeCP2 染色性は有意に低下していたが海馬におけるそれに差は認められなかった。また、大脑皮質における MeCP2 mRNA 発現を確認したが、対照群との差は認められなかった (図 2)。染色像を詳細に検鏡すると、異所性に MeCP2 染色性が高く高密度になる領域が認められた。この領域は実験個体間で共通性はなく領域特異性はなかった。パルプアルブミンと同様に、甲状腺機能の回復に伴い MeCP2 染色性の低下は回復した。大脑皮質の層構造を確認するために CUX1 を用いて第 II-IV 層の染色を試みた。甲状腺機能低下症マウスにおける大脑皮質では、対照群と比較して CUX1 の染色性は低く、また層の厚みが薄かった (図 3)。層形成の不全は、甲状腺機能低下症を呈する齧歯類等によく知られているが、大脑皮質感覚野を吻側-尾側にわたってチオニン染色を用いて詳細に再解析を試みた。大脑皮質感覚野の層形成不全に領域選択性はなく、吻側-尾側全てにおいてその厚みが減少していた。なお CUX1 発現は、甲状腺ホルモンが回復しても正常レベルに戻ることはなかった。

周産期の甲状腺ホルモン不足は、大脑皮質ならびに海馬におけるパルプアルブミン遺伝子発現を顕著に低下させるが、ホルモンの補充または抗甲状腺剤の抜去後の甲状腺機能の改善に伴い発現レベルは回復するため、甲状腺ホルモンはパルプアルブミン遺伝子発現に重要な役割を演じていると推察された。甲状腺ホルモンを細胞内へ輸送するトランポーターである MCT8 の欠損は Allan-Herndon-Dudley 症候群として知られ、その死後脳においてパルプアルブミン発現の減少が認められる (文献 4)。この、死後脳におけるパルプアルブミン発現の減少は、先にも示した通り、統合失調症や自閉スペクトラム症においても観察される共通した現象である (文献 4)。正常な精神機能発現にはパルプアルブミンの存在が欠かせないとも考えられるが、現時点ではこれ以上のことに言及するデータを有してはいない。レット症候群は MeCP2 を責任分子とし、この遺伝子の変異によって発症するが、症状の一部に自閉スペクトラム症と類似点を有する。パルプアルブミン遺伝子によって関連づけられるこれらの障害等は、甲状腺機能との関連性も少なくはなく、妊娠中の母親の甲状腺機能低下は自閉スペクトラム症のリスクファクターとして知られ、また統合失調症患者の中には甲状腺機能障害を呈することも稀ではない。こうした病態の比較解析や実験動物を介した分子基盤のさらなる解析が精神機能発現への理解に繋がるものと思われる。

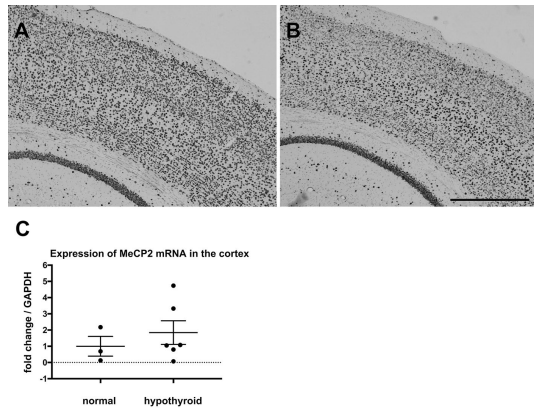


図 2 大脑皮質における MeCP2 発現

正常マウス (A) に比べて甲状腺機能低下症マウス (B) では MeCP2 染色性が低下する。A および B は免疫染色。C はリアルタイム PCR による MeCP2 遺伝子発現レベル。染色性は低下するものの遺伝子発現に差異はない。

MeCP2) を選択的にノックダウンすることでレット症候群様の行動発現を呈すること (文献 2)、ならびにレット症候群の患者の一部で甲状腺機能障害が観察されることから (文献 3)、甲状腺機能低下症モデルマウス的大脑皮質ならびに海馬における MeCP2 発現を観察した。甲状腺機能低下症マウスにおける MeCP2 染色性は有意に低下していたが海馬におけるそれに差は認められなかった。また、大脑皮質における MeCP2 mRNA 発現を確認したが、対照群との差は認められなかった (図 2)。染色像を詳細に検鏡すると、異所性に MeCP2 染色性が高く高密度になる領域が認められた。この領域は実験個体間で共通性はなく領域特異性はなかった。パルプアルブミンと同様に、甲状腺機能の回復に伴い MeCP2 染色性の低下は回復した。大脑皮質の層構造を確認するために CUX1 を用いて第 II-IV 層の染色を試みた。甲状腺機能低下症マウスにおける大脑皮質では、対照群と比較して CUX1 の染色性は低く、また層の厚みが薄かった (図 3)。層形成の不全は、甲状腺機能低下症を呈する齧歯類等によく知られているが、大脑皮質感覚野を吻側-尾側にわたってチオニン染色を用いて詳細に再解析を試みた。大脑皮質感覚野の層形成不全に領域選択性はなく、吻側-尾側全てにおいてその厚みが減少していた。なお CUX1 発現は、甲状腺ホルモンが回復しても正常レベルに戻ることはなかった。

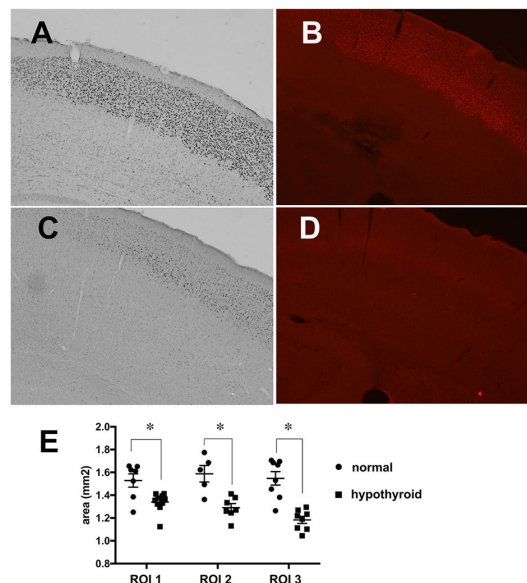


図 3 大脑皮質における CUX1 発現

正常マウス (A, C) に比べて甲状腺機能低下症マウス (B, D) では皮質 II-IV 層における CUX1 発現が低下する。A, C は生後 14 日目を、B, D は 3 ヶ月齢の大脑皮質を示している。

文献

- 1 : Uchida et al., Amelioration of improper differentiation of somatostatin-positive interneurons by triiodothyronine in a growth-retarded hypothyroid mouse strain, *Neuroscience letters* (2014).
- 2 : Ito-Ishida et al., Loss of MeCP2 in Parvalbumin-and Somatostatin-Expressing Neurons in Mice Leads to Distinct Rett Syndrome-like Phenotypes, *Neuron* (2015).
- 3 : Uchida and Suzuki, Congenital hypothyroidism and brain development: association with other psychiatric disorders, *Frontiers in Neuroscience* (2021)
- 4 : Barez-Lopez et al., Adult Mice Lacking Mct8 and Dio2 Proteins Present Alterations in Peripheral Thyroid Hormone Levels and Severe Brain and Motor Skill Impairments, *Thyroid* (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Uchida Katsuya, Hasuoka Kentaro, Fuse Toshimitsu, Kobayashi Kenichi, Moriya Takahiro, Suzuki Mao, Katayama Norihiro, Itoi Keiichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Thyroid hormone insufficiency alters the expression of psychiatric disorder-related molecules in the hypothyroid mouse brain during the early postnatal period	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86237-8	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 Kawatani Masahiro, Itoi Keiichi, Talukder Ashraf Hossain, Uchida Katsuya, Sakimura Kenji, Kawatani Masahito	4. 巻 124
2. 論文標題 Cholinergic modulation of CRH and non-CRH neurons in Barrington's nucleus of the mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurophysiology	6. 最初と最後の頁 443 ~ 457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jn.00342.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Katsuya, Suzuki Mao	4. 巻 15
2. 論文標題 Congenital Hypothyroidism and Brain Development: Association With Other Psychiatric Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.772382	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mao Suzuki, Katsuya Uchida, Ryusei Uchida, Mitsuyuki Nakao, Keiichi Itoi, Norihiro Katayama
2. 発表標題 Decreased behavioral activity and abnormal cortical EEG profiles of methimazole-induced transient hypothyroidism mice
3. 学会等名 Neuroscience2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木真生, 内田克哉, 内田竜生, 中尾光之, 井樋慶一, 片山統裕
2. 発表標題 一過性甲状腺機能低下症マウスの大脳皮質局所脳波解析
3. 学会等名 日本生体医工学会生体信号計測・解釈研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田 克哉, 蓮岡 健太郎, 守屋 孝洋, 小林 健一, 井樋 慶一.
2. 発表標題 幼若期の一過性甲状腺ホルモン欠乏はマウス大脳皮質形成を攪乱し成熟個体の行動発現に変化をもたらす
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 真生, 内田 克哉, 内田 竜生, 中尾 光之, 井樋 慶一, 片山 統裕.
2. 発表標題 一過性甲状腺機能低下症マウスの局所脳波解析
3. 学会等名 東北生理談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山 統裕, 吉田 侑冬, 内田 竜生, 鈴木 真生, 外川 龍之介, 中尾 光之, 井樋 慶一, 内田 克哉.
2. 発表標題 Behavioral, electroencephalographic, and cerebral hemodynamic analyses of methimazole-induced transient hypothyroidism mice
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田克哉、蓮岡健太郎、布施俊光、小林健一、守屋孝洋、井樋慶一
2. 発表標題 Thyroid hormone insufficiency alters the expression of psychiatric disorder-related molecules in the hypothyroid mouse brain during the early postnatal period.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田克哉、蓮岡健太郎、布施俊光、小林健一、守屋孝洋、井樋慶一
2. 発表標題 周産期の甲状腺ホルモン欠乏は大脳皮質・海馬における精神疾患関連分子の発現を変化させる
3. 学会等名 日本甲状腺学会
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
研究分担者	井樋 慶一 (Itoi Keiichi) (60232427)	東北福祉大学・健康科学部・教授 (31304)	
研究分担者	片山 統裕 (Katayama Norihiro) (20282030)	尚絅学院大学・総合人間科学系・准教授 (31311)	
研究分担者	佐藤 達也 (Sato Tatsuya) (00568222)	東北福祉大学・健康科学部・准教授 (31304)	

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
---------	---------