

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16486

研究課題名(和文) 中枢神経系における甲状腺ホルモンを介した転写調節機構の解明

研究課題名(英文) Corepressor Regulation of Thyroid Hormone Action in central nervous system

研究代表者

天野 出月 (Amano, Izuki)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10765275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抑制型転写共役因子として、甲状腺ホルモン受容体を介した遺伝子発現調節に関与しているNCoR1及びSMRTの中枢神経系における生理学的役割の解明を目的とした。モデルとして神経細胞特異的NCoR1/SMRTノックアウトマウスを作成した。その結果、ダブルノックアウトマウスは生後2週間以内に致死であることを見出した。また各単一ノックアウトでは、情動や社会行動性に異常を認め、自閉症スペクトラム障害に類似した変化を来すことを見出した。正常な脳発達にNCoR1/SMRTが重要な役割を果たすことを明らかにし、新たな自閉症スペクトラム障害の発症メカニズム解明に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、抑制型転写共役因子であるNCoR1/SMRTの中枢神経系における役割をマウスモデルを用いて明らかにするものである。近年、NCoRsの遺伝子異常が自閉症スペクトラム障害の原因であることを示唆する症例が報告されており、その社会的ニーズは大きい。本研究では神経細胞特異的にNCoR1/SMRTを欠損するマウスを作成した。その結果、遺伝子改変動物においても情動、社会性行動の異常や日内活動量の変化が観察されるなど、自閉症スペクトラム障害に類似した表現型を呈することを明らかにした。本モデルマウスが自閉症スペクトラム障害の解明の一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：NCoR1 and SMRT are critical coregulators of the thyroid hormone receptor (TR), mediating transcriptional repression via histone deacetylation. How the corepressors regulate TR signaling is not fully understood, especially in central nervous system. To determine the role of NCoR1 and SMRT in the CNS, we used mice with neuronal specific NCoR1/SMRT knock-out mice. We found that neuronal specific NCoR1 or SMRT knock-out mice survive without obvious impairment of neuronal development. However, NCoR1/SMRT double knock-out mice die within postnatal 1-2 weeks and have impaired body growth. In addition, adult single NCoR1/SMRT knock-out mice showed impaired social functioning and emotion similar to some autism spectrum disorder (ASD) symptoms. Thus, both NCoR1/SMRT have important roles in maintaining normal neuronal function. Also, these mice have potentials to reveal the mechanism of ASD.

研究分野：内分泌生理

キーワード：抑制型転写共役因子 脳発達 甲状腺ホルモン NCoR1 SMRT 自閉症スペクトラム障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲状腺より産生される甲状腺ホルモン(TH)は周産期の神経発達に必要な不可欠なホルモンの一つであり、成体期では神経機能の維持に必須である。THは標的臓器細胞に取り込まれ、標的遺伝子のTH応答領域に結合するTH受容体(TR)に結合し、標的遺伝子の発現を転写レベルで制御する。TH非結合時には、抑制型転写共役因子であるnuclear receptor corepressor (NCoR)からなるコリプレッサー複合体により転写が抑制され、TH結合時には活性型共役因子により転写が活性化される。しかし、THによる神経系への作用機序、特に転写共役因子による制御機構は未だ不明である。

抑制型転写共役因子であるNCoR1/SMRTの役割は標的臓器によって異なることが知られている。例えば肝臓ではNCoR1は主にTRシグナリングに関与するが、SMRTは主にレチノイン酸受容体(RAR)と結合しレチノイン酸シグナリングを制御する。また、脂質代謝に関わる遺伝子発現調節にはNCoR1/SMRTが共に関与することが知られている(Shimizu et al., 2015)。その一方で、中枢神経系においてもNCoR1/SMRTはそれぞれ発現していることが知られているが、その作用機序、生理学的役割は未だ不明である。

2. 研究の目的

THは中枢神経系に重要な役割を果たすことが知られており、これまで様々なモデル動物が作出され、その研究が行われてきた。しかしTHの中枢神経系における詳細な作用機序は未だ不明な点が多く、特に転写抑制型共役因子NCoR1/SMRTを介したTHシグナリングの作用機序は未解明である。そこで、新たなマウスモデルを確立することにより、中枢神経系における転写共役因子の役割を解明することが目的である。

3. 研究の方法

Cre/loxPシステムを用いて神経特異的なNCoR1/SMRTコンディショナルノックアウトマウスを作成した。神経細胞特異的に遺伝子発現を抑制するため、神経細胞特異的にCreを発現するSnap25-IRES2-Cre-D(Snap25-Cre^{+/+})マウスとNCoR1^{loxP/loxP}、SMRT^{loxP/loxP}マウスを交配させることによりNCoR1ノックアウトマウス(S-NKO)、SMRTノックアウトマウス(S-SKO)、及びNCoR1/SMRTダブルノックアウトマウス(S-DKO)の各コンディショナルノックアウトマウスを作製した。対照群(control)としてNCoR1^{loxP/loxP}またはSMRT^{loxP/loxP}マウスを用いた。

作出した本モデルマウスを用いて行動テストバッテリーを行った。活動量、日内リズムの評価としてホームケージアクティビティの観察を、不安情動の評価としてオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、毛繕い試験、社会性行動の評価として三部屋式社会性行動試験、記憶学習試験として視覚弁別課題を行った。行動試験後に組織を回収し、甲状腺ホルモンの測定及び遺伝子発現レベルの解析を行った。

4. 研究成果

1) NCoR1/SMRTは神経機能維持に必要な不可欠な因子である

神経細胞特異的(Snap25-Cre)なNCoR1/SMRTコンディショナルノックアウトマウスを作成した。NCoR1/SMRTの単一遺伝子ノックアウトマウスは成獣まで明らかな異常なしに発育したが、S-DKOマウスは生後より体重増加不良を認め、生後2週間以内に全例が死亡することを見出した(図1A-D)。このことからNCoRsは神経発達に必要な不可欠であることが分かった。

先行研究ではNCoR1/SMRTの各全身のノックアウトマウスモデルは胎生致死となることが知られている(Jepsen et al. 2000,2007&2008)。また我々の研究グループでも、成獣で全身のNCoR1/SMRTをダブルノックアウトさせたところ1週間以内に死亡することを報告した(Ritter, Amano et al, Mol Metab. 2021)。しかし、これまでその原因は明らかにされてこなかった。本結果からNCoRsの中枢神経系における欠損がその要因の一つであることが示唆された。

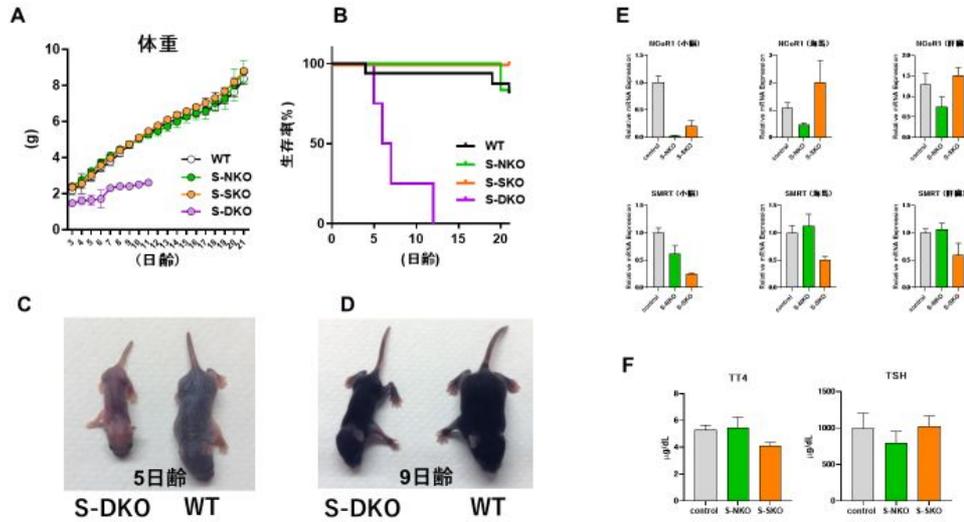
また、本マウスモデルがNCoR1/SMRTの発現が制御されていることを確認するためにリアルタイムPCR法を用いて小脳、海馬および非中枢神経系臓器である肝臓のmRNAを用いて解析を行った(図1E)。

さらに、本モデルマウスにおける甲状腺機能評価として血中の甲状腺ホルモン値(total thyroxine(TT4)および甲状腺刺激ホルモン(TSH))の測定を行ったが、群間で有意差は認めず、甲状腺ホルモンへの影響は認めなかった(図1F)。

2) NCoR1/SMRT単一ノックアウトマウスの行動テストバッテリーによる解析

ダブルノックアウトマウスが生後まもなく死亡することから、単一ノックアウトマウスを用いて行動テストバッテリーを施行した。

S-SKO マウス、S-NKO マウスともに control マウスと比較して、概日リズムの異常は認めなかったが、ホームケージ内での特に暗期の活動量の低下を認めた(図 2 A,B)。

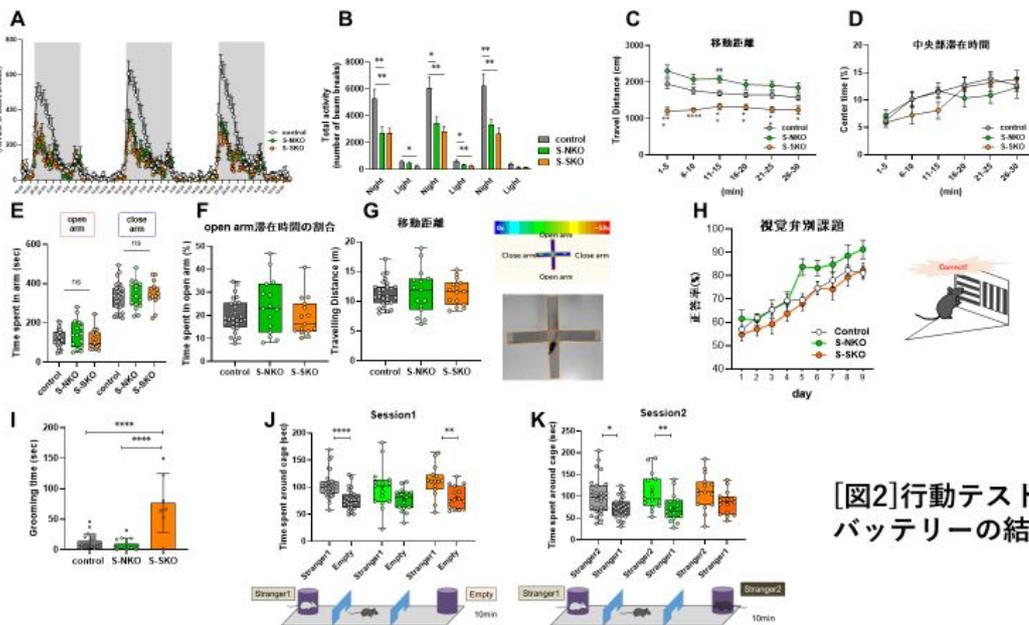


【図1】

新奇環境下での自発活動量、不安・恐怖様行動の評価としてオープンフィールド試験を行った。S-SKO マウスでは 30 分間の新奇環境下の活動量は、ホームケージ内での活動量と同様に低下した一方で S-NKO では認めなかった(図 2C)。また中央エリアへの侵入頻度に関しては各群間で差を認めなかった(図 2D)。

続いて、不安・情動を高架式十字迷路試験を用いて評価した。不安の多いマウスは close arm の滞在時間が長くなる傾向が知られていることから、open arm、close arm それぞれの滞在時間の評価を行った。その結果、探索移動距離も含めて群間で差は認めなかった(図 2E,F,G)。また、異なる不安様行動の評価試験として毛繕い試験も行った。新奇環境下で不安水準が高くなると毛繕い行動が増えるというマウスの特性を利用した試験であるが、S-SKO マウスでのみ有意に毛繕い行動(不安様行動)が増加していることを明らかにした(図 2I)。

また、記憶学習試験としてタッチパネル式オペラント装置を使用して視覚弁別課題を行った。いずれの群も、テスト第 1 日目にはチャンスレベル(50%)の正答率であったが、日を迫うごとに学習しテスト第 8 日目には 80%を超える正答率をマークした。S-NKO,S-SKO ともに記憶学習の獲得能に異常は認めなかった。



【図2】行動テスト
バッテリーの結果

最後に、社会的相互作用(社会性 (Session1, 図 2J)及び社会的新奇性 (Session2, 図 2K))を評価するために三部屋式社会性行動試験を行った。Control、S-SKO マウスでは新奇マウス(Stranger1)に対して有意な嗜好を示したのに対し、S-NKO マウスは新奇マウスへの嗜好性を示さなかった(図 2J)。一方、Session2 では、Control、S-NKO が顔見知りのマウス(Stranger1)よりも新奇マウス (Stranger2) に対して嗜好性を有意に示したのに対し、S-SKO は社会的新奇性

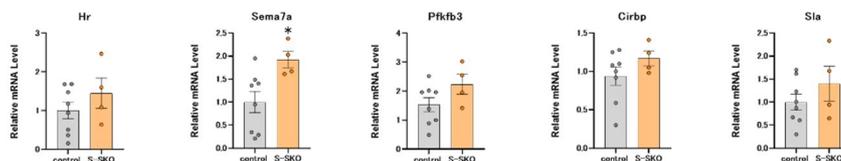
に嗜好性を示さなかった。

以上のことから、S-SKO、S-NKO 共にホームケージ内での活動量の低下を認めた。それに加えて S-NKO マウスでは社会性の嗜好性に対する障害を認めた。さらに、S-SKO では新奇環境下における活動量の低下、軽度の不安様行動の増加、社会的新奇性の嗜好性に対する障害を認めた。これらの表現型の一部は自閉症スペクトラム障害(ASD)に類似した変化を来したことから、新たな ASD モデルとして有用であり、新たな知見の発見の可能性を有していることが分かった。また近年、NCoRs における遺伝子異常が神経発達異常、特に自閉症スペクトラムを引き起こす症例が複数報告がされている (Zhou et al., Nat Neurosci. 2019, Iwama et al., J Med Genet. 2019)。さらに NCoRs の中枢神経系における生理学的意義を明らかにすることが求められている。

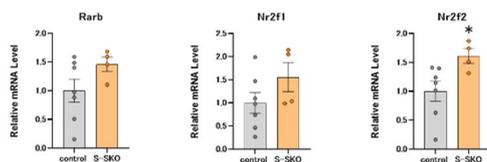
3) 中枢神経系(扁桃体)における抑制型転写共役因子の調節機構の解析

続いて、SMRT によってどのような遺伝子群が転写調節を受けているのかを調べるために、リアルタイム PCR 法により扁桃体における各遺伝子の mRNA 発現量を調べた。その結果、SMRT は甲状腺ホルモン系、レチノイン酸の各調節遺伝子群に対して軽度にかかわっていることが示唆された(図3)。肝臓では SMRT は甲状腺ホルモン系よりもレチノイン酸受容体を介した転写調節を強く受けていることから(Shimizu et al., 2015)、臓器によってその調節機構に差があることが示唆された。しかし、詳細な抑制型転写共役因子の調節メカニズムは網羅的に解析する必要がある。今後は NCoR1, SMRT が中枢神経系においてそれぞれどのような遺伝子発現調節に関わっているのかを、異なる日齢、脳領域で調べていく予定である。

A: 甲状腺ホルモン標的遺伝子



B: レチノイン酸標的遺伝子



[図3]扁桃体における遺伝子発現量の変化

4) まとめ

中枢神経系における転写抑制型共役因子 NCoR1/SMRT の役割を明らかにするために、神経細胞特異的に NCoR1/SMRT をノックアウトしたマウスを作成した。ダブルノックアウトマウス(S-DKO)マウスでは生後まもなく死亡することを発見し、単一ノックアウトマウス(S-NKO, S-SKO)ではそれぞれ表現型は異なるが、いずれも軽度の自閉症スペクトラム障害を示唆する表現型を明らかにした。これらの表現型の違いは類似した転写抑制型共役因子でありながら、他臓器と同様に中枢神経系においても NCoR1/SMRT が異なる役割を有していることに起因することが示唆された。今後は網羅的遺伝子発現解析などを行いその生理学的意義を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yajima Hiroyuki, Amano Izuki, Ishii Sumiyasu, Sadakata Tetsushi, Miyazaki Wataru, Takatsuru Yusuke, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Absence of Thyroid Hormone Induced Delayed Dendritic Arborization in Mouse Primary Hippocampal Neurons Through Insufficient Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2021.629100	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 Shimizu H, Lu Y, Vella KR, Damilano F, Astapova I, Amano I, Ritter M, Gallop MR, Rosenzweig AN, Cohen RN, Hollenberg AN.	4. 巻 12
2. 論文標題 Nuclear corepressor SMRT is a strong regulator of body weight independently of its ability to regulate thyroid hormone action.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0220717.	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 該当する
1. 著者名 Ritter MJ, Amano I, Hollenberg AN.	4. 巻 -
2. 論文標題 Thyroid Hormone Signaling and the Liver.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep.31296.	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 該当する
1. 著者名 Ishii Sumiyasu, Amano Izuki, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 The Role of Thyroid Hormone in the Regulation of Cerebellar Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 703 ~ 716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3803/EnM.2021.1150	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12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 天野 出月、鯉淵 典之
2. 発表標題 マウスモデルを用いた中枢神経系における転写共役因子の役割の解明
3. 学会等名 第67回北関東医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Izuki Amano, Ayane Ninomiya, Megan Ritter, Kristen R. Vella, Anthony N. Hollenberg, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 The role of thyroid hormone and nuclear corepressors on brain development and function
3. 学会等名 第63回日本甲状腺学会学術総会国際分子甲状腺シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Izuki Amano, Ayane Ninomiya, Megan Ritter, Kristen R. Vella, Anthony N. Hollenberg, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 Nuclear receptor corepressors NCoR1 and SMRT plays unique roles in central nervous system
3. 学会等名 ENDO 2021 annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izuki Amano, Ayane Ninomiya, Megan Ritter, Kristen R. Vella, Anthony N. Hollenberg, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 The effects of nuclear corepressors in thyroid hormone action on brain development
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izuki Amano, Yusuke Takatsuru, Asahi Haijima, Shogo Haraguchi, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 The Impact of Chronic Excess Iodine Intake in Adult Mice Behavior
3. 学会等名 ENDO annual meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Shimizu, Yasuhiro Horibata, Chieko Aoyama, Izuki Amano, Megan Ritter, Hiromi Ando, Hiroyuki Sugimoto, Anthony Neil Hollenberg
2. 発表標題 Nuclear Corepressor; SMRT Acts as an Important Regulator for Both Beta-Oxidation and the Maturation of Myogenesis in Mouse C2C12 Cell
3. 学会等名 ENDO annual meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Izuki Amano, Yusuke Takatsuru, Shogo Haraguchi, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 Effects of chronic iodine excess on brain function
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天野出月, 高鶴裕介, 配島旭, 亀尾聡美, 原口省吾, 鯉淵典之
2. 発表標題 マウスモデルを用いた慢性ヨウ素摂取過剰による脳発達への影響の解明
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 小久保倫文 ¹ , 天野出月, 宮崎航, 高鶴裕介, 配島旭, 原口省吾, 鯉淵典之
2. 発表標題 周産期中等度甲状腺機能低下が協調運動機能に与える影響
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 天野出月, 高鶴裕介, 配島旭, 亀尾聡美, 原口省吾, 鯉淵典之
2. 発表標題 慢性的なヨウ素摂取過剰による脳高次機能への影響
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野出月、二ノ宮彩音、Megan Ritter、Kristen R. Vella、Anthony N. Hollenberg
2. 発表標題 脳発達における核内受容体コリプレッサー (SMRT) の役割
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野出月、二ノ宮彩音、Megan Ritter、Kristen R. Vella、Anthony N. Hollenberg
2. 発表標題 抑制型転写共役因子SMRTの脳発達における役割の解明
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------