

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390065

研究課題名（和文） 核内受容体—転写共役因子相互作用による脳発達調節機構と環境化学物質による修飾作用

研究課題名（英文） Crosstalk between nuclear receptor and transcription cofactor on brain development and its modulation by environmental chemicals.

研究代表者

鯉淵 典之 (KOIBUCHI NORIYUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80234681

研究成果の概要（和文）：標記課題について甲状腺ホルモン（TH）-TH受容体（TR）系をモデルに解析した。先天性甲状腺機能低下ラットは新奇環境下で多動を示した。原因はTH低下で生じたβ tubulin発現抑制による黒質から線条体へのdopamine輸送低下だった。小脳細胞の初代培養系では、THにより突起伸長が生じ、この作用は環境化学物質（ポリ臭素化ジフェニルエーテルPBDEなど）により抑制された。この際、PBDEは受容体-転写共役因子結合を変化させずTR自体をDNAから解離させることで転写を抑制した。

研究成果の概要（英文）：Above-referenced theme was analyzed using thyroid hormone (TH) - TH receptor (TR) system as a model system. Congenital hypothyroid rat showed hyperactivity under novel environment. We found that the effect is induced by disruption of dopamine transport due to a decreased tubulin expression, which is regulated by TH. In primary cerebellar culture, TH induced an increase in dendrite and neurite elongation, which was inhibited by environmental chemicals such as polybrominated diphenylether (PBDE). PBDE did not alter TR-cofactor binding. Instead, it dissociated TR from DNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：ホルモン，核内受容体，転写因子，脳発達，環境化学物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 核内受容体と脳の発達

甲状腺ホルモン（TH）受容体（TR）などの核内受容体（NR）は、標的遺伝子の転写調節を介し脳発達を調節する。標的遺伝子のリガンド応

答性には細胞種や発達時期による特異性があり、限られた臨界期にNRによる発現調節を強くうける。しかし、NRを介するホルモン感受性の変化機構には不明点が多い。さらに、NR機能はポリ塩化ジフェニル（PCB）な

ど環境化学物質により影響を受けるが作用機構には不明点が多い。

(2) 研究代表者のこれまでの研究実績

応募者は、発達期げっ歯類小脳をモデルに TR の作用機構と PCB による修飾作用を研究してきた。そして Purkinje 細胞に発現する retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) α が TR 作用を修飾し、TH 感受性を調節することや、転写共役因子 (SRC-1 など) 発現変化が TR の TH 感受性に関与することを明らかにした。また、これらの修飾作用が低用量 PCB で影響をうけ、TR が DNA から解離することや複数の NR に同時に作用することなどを報告した。

(3) 本研究課題に関する研究の現状

これらの研究を通じ、NR や転写共役因子間の相互作用により、ホルモン感受性や遺伝子発現特異性が調節されることがわかってきている。転写因子研究は、分子生物学的には解析がすすんでいるが、生理機能との関連は明らかではない。また、環境化学物質や外因性薬物の多くが NR に作用し機能を修飾することが明らかになりつつあるが作用機構には不明点が多い。

2. 研究の目的

(1) 全体的な目的

上記の研究背景をもとに、本研究では TR を中心に、他の NR や共役因子も研究対象とし、中枢神経系発達におけるリガンド-NR-転写共役因子相互作用による調節機構の解析を目的とする。実験は動物実験、細胞生理学的実験および分子レベルの実験を並行して行う。

(1) 動物実験

動物実験ではデータの蓄積しているげっ歯類発達期小脳をモデルに、転写因子や共役因子の発現を詳細に解析し、実際に標的遺伝子 DNA に結合している受容体や共役因子の同定を目指す。そして遺伝子改変動物を用いてこれらの因子の変異による小脳発達や遺伝子発現変化を調べる。また、また、in vivo microdialysis 法を用いて GABA やグルタミン酸受容体関連物質の変動を調べる。

(2) in vitro 実験

In vitro 実験では、細胞の形態や NR の局在が内因性・外因性物質でどのように変化するか、その際、どのような共役因子が関与するのかを経時的に解析する。NR は TR を中心に用いるが、それ以外に脳発達に重要なオファン受容体として ROR α やステロイドや外因性薬物の代謝に大きく関与する SXR にも注目して実験を進める。またリガンドとしては、

TH、ステロイドなどの内因性ホルモン、コレステロール、環境化学物質 (PCB および臭素化ビフェニルなど) などを用いる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子変異動物を用いて受容体・共役因子機能変化に伴う行動や遺伝子発現変化を解析

先天性甲状腺機能低下症を示す rdw ラットや ROR α が変異した staggerer マウス小脳を用いて、標的遺伝子における発現変化や TH 応答配列 (TRE) の同定と受容体-共役因子タンパク複合体の結合を解析する。また、in vivo microdialysis などによりホルモン環境変化における神経伝達物質の変化を協調運動や学習行動の変化と共に解析した。

(2) 培養神経細胞におけるリガンド・受容体・転写共役因子相互作用による細胞機能変化の解析

神経細胞では発達段階に応じに NR や共役因子の発現が変化するが、相互作用機構は明らかではない。また、発達期には神経活動依存性に DNA の脱メチル化が起こり、遺伝子発現が変化するが、NR 作用との関連は不明である。そこで小脳培養細胞を用いて、リガンド・受容体・共役因子発現を変化させ、標的遺伝子の発現、樹状突起の発達や、細胞内 Ca²⁺の動態、細胞膜興奮性の変化などを調べる。

4. 研究成果

(1) 動物実験

先天性甲状腺機能低下 rdw ラットは、ホームケージ内では寡動を示し、ほとんど動かない一方、新奇環境下では多動となった。線条体のドーパミンを測定したところ、低下していた。その一方で黒質のドーパミンは上昇していたため、ドーパミンの輸送障害が生じている可能性が示唆された。TR の標的遺伝子として、 β tubulin があるため、発現を解析したところ、タンパクレベルでも発現が低下しており、そのためにドーパミン輸送が低下している事が明らかになった。

また、我々は、水酸化 PCB の一部が TR を介する転写を抑制し、神経発達を低下させる事を分子生物学的実験で既に明らかにしたが、動物レベルでの実験は行っていなかったため、ラットを用いてこの点を調べた。すると、ホームケージにおいても、新奇環境下でも多動となる事が判り、甲状腺機能低下とは異なる表現型となった。

興味ある事に、D2 ドーパミン受容体のユビキチン化が障害されている CIN85 マウスも甲状腺系とはことなる経路で多動を誘発する事も明らかとなった。

また、TH の代表的は標的遺伝子である BDNF、

NT3 およびこれらの受容体の中樞神経系における発現変化についても種々の環境刺激を与えながら解析を進めた（発表論文参照）

（2）in vitro 実験

① NR 間およびNR-共役因子相互作用に関する実験

動物実験により TR との相互作用により小脳発達を促進する事を明らかにした ROR について、分子生物学的手法を用いて、結合部位を同定する試みをおこなった。その結果、ROR は DNA と直接結合せずに TR と複合体を形成する事が明らかになった。その際、ROR のリガンド結合領域が重要であるが、ある特定の領域ではなく、広い領域が結合に関わっている事がわかった。

一方、脳発達期に脳の性分化に関与するアロマターゼ遺伝子のプロモーター領域に ROR 応答配列が存在する事を同定した。この配列により、乳癌細胞では ROR 依存性にアロマターゼの発現が増加する事が明らかになった。現在、脳におけるアロマターゼ発現と ROR との関係を解析している。

また、環境化学物質と NR との相互作用についても解析を進めた。TR においては、臭素化芳香族化合物を中心に解析を進め、ポリ臭素化ジフェニルエーテルの一部が TR を介する転写を抑制する事、PBDE は水酸化 PCB と同様に TR の DNA 結合領域に作用し、TR を DNA から解離させて転写を抑制している事明らかにした。また、薬物代謝に関与する SXR において Acetyl tributyl citrate が SRC-1 や TIF2 と SXR との結合を促進し、標的遺伝子 CYP3A4 の転写を促進する事も明らかとした。

② 小脳初代培養細胞を用いた研究

新生仔ラットおよびマウス小脳を用いた初代培養系を確立した。確立した培養系は3種類で、通常の分散培養系、顆粒細胞の凝集培養系、およびアストロサイトの初代培養系である。これらを用いて甲状腺ホルモンの作用や環境化学物質の作用を解析した。プルキンエ細胞や顆粒細胞には TR および共役因子の SRC-1 が発現しているが、アストロサイトには TR がほとんど発現していなかった。

TH により、プルキンエ細胞の樹状突起の濃度依存性伸展が生じた。この作用は時期特的で、P0 ラットを用いた場合、培養後初期に TH を加えれば突起伸展が生じるが、7日目以降だと TH の効果が著明に限弱する事が明らかになった。一方、顆粒細胞の凝集培養系においても TH により神経突起の伸展が生じた。アストロサイトは TR は発現していないが、TH によりアクチンの重合や2型脱ヨウ素酵素の発現抑制が生じた。

一方、PBDE など臭素化芳香族化合物の一部は、プルキンエ細胞樹状突起伸展や顆粒細胞

神経突起伸展を抑制した。また、グラム陰性菌感染により分泌されるリポ多糖がアストロサイトに作用し、甲状腺ホルモン作用に拮抗する事が明らかとなった。興味ある事に、アストロサイトの甲状腺ホルモン作用は TR を介せずに生じている可能性が高い事もわかった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 30 件）

1. Xiong Y, Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Koibuchi N. 2012 An in vitro method to study the effects of thyroid hormone-disrupting chemicals on neuronal development. *Neurotoxicology* 33: 753-757. (査読有)
2. Ibhazehiebo K, Koibuchi N. 2012 Temporal effects of thyroid hormone (TH) and decabrominated diphenyl ether (BDE209) on Purkinje cell dendrite arborization. *Niger J Physiol Sci.* 27: 11-17. (査読有)
3. Koibuchi N. 2012 Cerebellar function and dysfunction. *Cerebellum* 11: 411-413. (査読有)
4. Gilbert M, Rovet J, Chen Z, Koibuchi N. 2012 Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology* 33: 842-852. (査読有)
5. 鯉淵典之 2012 甲状腺ホルモン合成・分泌の分子機構 日本臨床 70(11): 1844-1848. (査読無)
6. Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Kimura-Kuroda J, Miyazaki W, Shimokawa N, Koibuchi N. 2011 Disruption of thyroid hormone receptor-mediated transcription and thyroid hormone-induced Purkinje cell dendrite arborization by polybrominated diphenyl ethers. *Env Health Perspect* 119: 168-175. (査読有)
7. Koibuchi N. 2011 Cytochrome P450 1A1: is it involved in disruption of thyroid hormone action by polychlorinated biphenyl (PCB)? *Expert Rev Endocrinol Metab* 6: 657-659. (査読有)
8. Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N. 2011 1, 2, 5, 6, 9, 10- α Hexabromocyclododecane (HBCD) impairs thyroid hormone-induced dendrite arborization of Purkinje cells and suppresses thyroid hormone receptor-mediated transcription.

- Cerebellum 10: 22-31. (査読有)
9. Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, McGinnis W, Koibuchi N. 2011 Brain region-specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD). *Cerebellum* 10: 43-48. (査読有)
 10. Takatsuru Y, Koibuchi N, Nabekura J. 2011 Unilateral infarction of the visual cortex (VC) induced an increase in dendritic spine turnover in contralateral VC. *Neurosci Lett* 488: 97-100. (査読有)
 11. Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N. 2011 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ameliorates the suppression of thyroid hormone-induced granule cell neurite extension by hexabromocyclododecane (HBCD). *Neurosci Lett* 493: 1-7. (査読有)
 12. Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Okano-Uchida T, Shimokawa N, Ishizaki Y, Koibuchi N. 2011 Suppression of thyroid hormone receptor-mediated transcription and disruption of thyroid hormone-induced cerebellar morphogenesis by the polybrominated biphenyl mixture, BP-6. *Neurotoxicology* 32: 400-409. (査読有)
 13. Takahashi Y, Shimokawa N, Esmaeili-Mahani S, Morita A, Masuda H, Tamura J, Haglund K, Koibuchi N. 2011 Ligand-induced downregulation of TrkA is partly regulated through ubiquitination by Cbl. *FEBS Lett* 585: 1741-1747. (査読有)
 14. Takeshita A, Igarashi-Migitaka J, Nishiyama K, Takahashi H, Takeuchi Y, Koibuchi N. 2011 Acetyl tributyl citrate, the most widely used phthalate substitute plasticizer, induces cytochrome P450 3A through steroid and xenobiotic receptor. *Toxicol Sci* 123(2): 460-470. (査読有)
 15. Ibhazehiebo K, Koibuchi N. 2011 Thyroid hormone receptor-mediated transcription is suppressed by low dose Phthalate. *Niger J Physiol Sci.* 26: 143-149. (査読有)
 16. 鯉淵典之 2011 内分泌かく乱化学物質研究の現状 ホルモンと臨床 59: 1-2. (査読無)
 17. 岩崎俊晴, 鯉淵典之 2011 甲状腺ホルモン受容体に及ぼす内分泌かく乱物質の新たな作用 ホルモンと臨床 59: 37-44. (査読無)
 18. 鯉淵典之, 小山徹也 2011 甲状腺の解剖と病理 *Modern Physician* 31 (4): 377-381. (査読無)
 19. 鯉淵典之 2011 甲状腺ホルモン作用のかく乱による環境化学物質の発達神経毒性動物心理学研究 61: 15-21. (査読無)
 20. 六反田奈和, 堀口淳, 岩崎俊晴, 鯉淵幸生, 高他大輔, 長岡りん, 小田原宏樹, 時庭秀彰, 戸塚勝理, 竹吉泉, 鯉淵典之 2011 乳癌における steroid and xenobiotic receptor (SXR)の発現と ERとの相互作用について 乳癌基礎研究 20: 7-10. (査読無)
 21. 小田原宏樹, 堀口淳, 岩崎俊晴, 高他大輔, 六反田奈和, 長岡りん, 時庭英彰, 戸塚勝理, 竹吉泉, 鯉淵典之 2011 乳癌組織のアロマターゼ発現における ROR α と GRの相互関係 乳癌基礎研究 20: 11-15. (査読無)
 22. Amano I, Miyazaki W, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N. 2010 The effect of hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB) on thyroid hormone receptor (TR)-mediated transcription through native-thyroid hormone response element (TRE). *Industrial Health* 48: 115-118. (査読有)
 23. Londoño M, Shimokawa N, Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. 2010 Hydroxylated PCB induces Ca²⁺ oscillations and alteration of membrane potential in cultured cortical cells. *J Appl Toxicol* 30: 334-342. (査読有)
 24. Shimokawa N, Haglund K, Hölter SM, Grabbe C, Kirkin V, Koibuchi N, Schulz C, Rozman J, Hoeller D, Qiu CH, Londoño MB, Ikezawa J, Jedlicka P, Stein B, Schwarzacher SW, Wolfer DP, Ehrhardt N, Heuchel R, Nezis I, Brech A, Schmidt MH, Fuchs H, Gailus-Durner V, Klingenspor M, Bogler O, Wurst W, Deller T, de Angelis MH, Dikic I. 2010. CIN85 regulates dopamine receptor endocytosis and governs behavior in mice. *EMBO J* 29: 2421-2432. (査読有)
 25. 小田原宏樹, 岩崎俊晴, 堀口淳, 鯉淵幸生, 六反田奈和, 時庭英彰, 飯野佑一, 竹吉泉, 鯉淵典之 2010 核内ホルモン受容体 ROR α によるアロマターゼ遺伝子の新たな活性化機序 乳癌基礎研究 19:19-23. (査読有)
 26. Koibuchi N. 2010. Mechanism of chemical disruptors of thyroid function. *Hot Thyroidology* HT 12/10 (epub). (査読有)
 27. Odawara H, Iwasaki T, Horiguchi J, Rokutanda N, Hirooka K, Miyazaki W, Koibuchi Y, Shimokawa N, Iino Y, Takeyoishi I, Koibuchi N. 2009

- Activation of aromatase expression by retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) α in breast cancer cells: Identification of a novel ROR response element. *J Biol Chem* 284: 17711-17719. (査読有)
28. Qiu CH, Miyazaki W, Iwasaki T, Londoño M, Ibhazehiebo K, Shimokawa N, Koibuchi N. 2009. Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha-enhanced thyroid hormone receptor-mediated transcription requires its ligand binding domain which is not, by itself, sufficient: possible direct interaction of two receptors. *Thyroid* 19: 893-898. (査読有)
29. Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, Koibuchi N. 2009. Increase in cerebellar neurotrophin-3 and oxidative stress markers in autism. *Cerebellum* 8: 366-372. (査読有)
30. Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, Koibuchi N. 2009. Cerebellar brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 expression in male and female rats is differentially affected by hypergravity exposure during discrete developmental periods. *Cerebellum* 8: 454-462. (査読有)
- [学会発表] (計 112 件)
- * 招待講演, シンポジスト, 受賞講演など, 特筆すべき発表のみ記載した。
1. Koibuchi N. The role of thyroid hormone on functional organization in the cerebellum. 5th Annual Meeting of the Society for Research on the Cerebellum. Sept. 22-24, 2012. Hangzhou, China (Invited Speaker)
2. Xu M, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N. Abnormal cerebellar neurotrophin expression in autism patients and LPS-treated rat model. 5th Annual Meeting of the Society for Research on the Cerebellum. Sept. 22-24, 2012. Hangzhou, China (Masao Ito award)
3. Koibuchi N. The effect of perinatal hypothyroidism on neuronal development and plasticity. International Neuroscience Symposium 2012. July 23-25, 2012. Kota Kinabaru, Malaysia. (Invited Speaker)
4. Ronny, 岩崎俊晴, 下川哲昭, 鯉淵典之. Aerobic exercise potentiates thyroid hormone (TH) responsiveness to several genes in rat skeletal muscle. 第 54 回日本甲状腺学会 2011 年 11 月 21-23 日 大阪 (若手研究奨励賞受賞)
5. Koibuchi N. Cellular and molecular mechanisms of environmental chemical action on brain development. 7th FAOPS Congress Symposium "Impact of Environmental Chemicals on Brain Development" Sept 11-14, 2011. Taipei, Taiwan. (Symposium organizer)
6. Koibuchi N. PCBs and PBDEs bind to the nuclear thyroid hormone receptor and disrupt cerebellar development. 13th International Neurotoxicology Association Meeting & 11th International Symposium on Neurobehavioral Methods and Effects in Occupational and Environmental Health. June 5-10, 2011. Xian, China (Symposiast).
7. Koibuchi N. The role of thyroid hormone in fetal/neonatal development 11th Congress of Colombian Association of Endocrinology. May 26-29, 2011. Cali, Colombia (Plenary Speaker).
8. Koibuchi N. Disrupter of thyroid hormone action. 14th International Thyroid congress. Sept. 11-16, 2010, Paris.
9. 鯉淵典之. 甲状腺ホルモン作用のかく乱による環境化学物質の発達神経毒性 日本動物心理学会第 70 回大会 シンポジウム「環境化学物質の発達神経毒性研究における動物心理学の役割」 2010 年 8 月 27-29 日 八王子 (シンポジスト)
10. 鯉淵典之. 環境化学物質による発達神経毒性 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 シンポジウム「発達神経毒性の新たな評価方法の展開」 2010 年 6 月 16-18 日 宜野湾市 (沖縄) (シンポジスト)
11. 岩崎俊晴, 下川哲昭, 鯉淵典之. 臭素化合物による甲状腺ホルモン受容体を介する正常脳発達への影響 (核内ホルモン受容体による転写調節における環境化学物質の作用機構) 環境ホルモン学会第 23 回講演会「環境化学物質のホルモン作用の最新研究」 2010 年 6 月 14 日 東京 (シンポジスト)
12. Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Shimokawa N, Kimura-Kuroda J, Koibuchi N. Polybrominated diphenylethers (PBDEs) suppress thyroid hormone receptor (TR)-mediated transcription and impairs thyroid hormone (TH)-dependent dendrite arborization of Purkinje cells. 9th Asia and Oceania Thyroid Association Congress Nov 1-4, 2009,

Nagoya (Young Investigator's Award

13. 鯉淵典之 周産期における甲状腺ホルモンの作用機構-脳発達を中心に一 第 43 回日本小児内分泌学会学術集会シンポジウム「早産児における低サイロキシン血症の問題点」 2009 年 10 月 1-3 日 宇都宮 (シンポジスト)
14. Koibuchi N. The role of orphan nuclear receptor ROR α on aromatase gene expression. 2nd IBRO-APRC Neuroscience Associate School. Nov 30-Dec 4, 2009 Penang, Malaysia (invited Speaker).

[図書] (計 1 件)

1. Sajdel-Sulkowska EM, Koibuchi N. 2012 The sexually dimorphic nature of the effects of polychlorinated biphenyls on the central nervous system in the developing animal. In: Lewis M, Kestler M (eds) Gender Differences in Prenatal Substance Exposure. American Psychological Association, Washington. pp207-215.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 1 件)

名称：タンパク質-標的物質の結合検出方法
発明者：岩崎俊晴, 鯉淵典之
権利者：国立大学法人群馬大学
種類：特許
番号：特許第 4631058 号
取得年月日：2010 年 11 月 26 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

<http://nori3.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鯉淵 典之 (KOIBUCHI NORIYUKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80234681

(2) 研究分担者

竹下 章 (TAKESHITA AKIRA)
(財) 冲中記念成人病研究所・研究員
研究者番号：20322646

高鶴 裕介 (TAKATSURU YUSUKE)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30446265

岩崎 俊晴 (IWASAKI TOSHIHARU)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80375576

下川 哲昭 (SIMOKAWA NORIAKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90235680