

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 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590251

研究課題名（和文）多動性や哺育行動の欠如を示す CIN85 欠損マウスの行動異常の解析とその欠損修復

研究課題名（英文）Analysis of behavior disorder and the deficient rescue of CIN85 knockout mouse that shows hyperactivity and rearing neglect to newborns

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：CIN85（Cbl-interacting protein of 85 kDa）は受容体輸送や細胞分化に関与するアダプター蛋白質である。CIN85 欠損マウス（CIN85 KO）は多動の表現型を示した。この多動性はドーパミン受容体の細胞内へのインターナリゼーションの減少による。本研究結果は CIN85 という膜受容体の発現を制御する遺伝子の機能欠損がドーパミン受容体のエンドサイトーシスの異常を誘起し多動症を引き起こすという新たな発症メカニズムを示している。

研究成果の概要（英文）：Cbl-interacting protein of 85 kDa (CIN85) is an adaptor protein implicated in the regulation of receptor trafficking and cell division. CIN85 knockout (CIN85 KO) mice displayed a hyperactivity phenotype. In CIN85 KO, the recruitment of the endocytic machinery required for D2DR endocytosis is diminished. Our findings indicate an important role of CIN85 in the regulation of dopamine receptor functions and provide new insight into a molecular explanation for hyperactive behavior.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：CIN85, 多動性、ドーパミン受容体、エンドサイトーシス、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

本申請者の下川らは上皮増殖因子 (epidermal growth factor; EGF) の刺激後、上皮増殖因子受容体 (EGF receptor) が細胞

膜上から細胞内へと取り込まれ、エンドサイトーシスに至る機構に CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa) が関与している新しいメカニズムを報告した。

(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002)。

この機構の個体における意義を明らかにする目的でCIN85ノックアウト(KO)マウスを作製した。このKOマウスは行動学的解析(総移動量、移動速度、回転数、新規環境探索度等)の全項目において野生型に比べて明らかな行動量の増加を示し表現型が「多動」であると認められた。

2. 研究の目的

本研究の目的はCIN85の機能欠損による多動性や子育て放棄など様々な行動異常の発生メカニズムを解析し、受容体の情報伝達機構と行動様式の発現との関連を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) CIN85ノックアウトマウスと野生型マウスからそれぞれ、脳切片を作製し、ドーパミン受容体抗体を使って免疫組織化学的手法によりドーパミン受容体の分布と存在の差を検討する。

(2) [³H]-スペピロン ([³H]-spiperone)はドーパミン受容体(D2受容体)のアンタゴニストとしてD2受容体と特異的に結合することが知られている。この放射性リガンドと脳切片を反応させ、得られたオートラジオグラムからリガンドとの結合量を解析する。

(3) CIN85ノックアウトマウスおよび野生型マウスの黒質緻密部の神経細胞を培養する。この培養細胞をドーパミンで刺激後、細胞膜と細胞質に分離する。それぞれのフラクションに存在するドーパミン受容体を測定し、インターナリゼーション及び分解能を解析することでCIN85の機能を評価する。

4. 研究成果

(1) CIN85ノックアウトマウスと野生型マウスの線条体初代培養においてドーパミン刺激後、細胞膜表面に存在する2型ドーパミン受容体を同定した。ドーパミン受容体の細胞内へのインターナリゼーションは野生型に比べノックアウトマウスでは有意に減少していた。しかし1型ドーパミン受容体のインターナリゼーションは野生型と比べて変化はなかった。CIN85の機能は2型ドーパミン受容体に特異的であることが分かった。

(2) CIN85はSynaptosomeでエンドサイトーシスに関する制御タンパク質であるEndophilinと結合している。CIN85の欠損によりEndophilinがリクルートされずドーパミン受容体の細胞内へのインターナリゼーションが減少することが明らかになった。

(3) トリチウム標識したドーパミン受容体アンタゴニストである[³H]Spiperoneを用いた

解析においてもドーパミン受容体の細胞内へのインターナリゼーションは野生型に比べCIN85ノックアウトマウスでは有意に減少していた。

以上から、CIN85ノックアウトマウスの多動は脳内線条体のドーパミン受容体の分解系の異常による事が示された。この研究成果は従来示されて来た多動症の発症機序とは異なる新しい発症メカニズムである。

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10件)

1. Takahashi Y, Shimokawa N, Esmaeili-Mahani S, Morita A, Masuda H, Iwasaki T, Tamura J, Haglund K, Koibuchi N. Ligand-induced downregulation of TrkA is partly regulated through ubiquitination by Cbl. FEBS Lett 585, 査読有、1741-1747, 2011.

2. Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Okano-Uchida T, Shimokawa N, Ishizaki Y, Koibuchi N. Suppression of thyroid hormone receptor-mediated transcription and disruption of thyroid hormone-induced cerebellar morphogenesis by the polybrominated biphenyl mixture, BP-6. Neurotoxicology 32, 査読有、400-409, 2011.

3. Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Xu M, Shimokawa N, Koibuchi N. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ameliorates the suppression of thyroid hormone-induced granule cell neurite extension by hexabromocyclododecane (HBCD). Neurosci Lett 493, 査読有、1-7, 2011.

4. Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N. 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, 査読有、22-31, 2011.

5. Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Kimura-Kurods J, Miyazaki W, Shimokawa N, Koibuchi N. Disruption of thyroid hormone receptor-mediated transcription and thyroid hormone-induced Purkinje cell dendrite arborization by polybrominated

diphenylethers. Environ Health Perspect 119, 査読有、168-75, 2011.

6. Shimokawa N, Haglund K, Hölter SM, Grabbe C, Kirkin V, Koibuchi N, Schultz C, Rozman J, Hoeller D, Qiu CH, Londoño MB, Ikezawa J, Jedlicka P, Stein B, Schwarzacher WS, Wolfer PD, Ehrhardt N, Heuchel R, Nezis I, Brech A, Schmidt MH, Fuchs H, Gailus-Durner V, Klingenspor M, Bogler O, Wurst W, Deller T, Harbé de Angelis M, Dikic I. CIN85 regulates dopamine receptor endocytosis and governs behavior in mice. EMBO J, 29, 査読有、2421-2432, 2010.

7. Londoño MB, Shimokawa N, Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. Hydroxylated PCB induces Ca²⁺ oscillations and alterations of membrane potential in cultured cortical cells. J. Appl. Toxicol. 30, 査読有、334-342, 2010.

8. Amano I, Miyazaki W, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N. The effect of hydroxylated PCB metabolites on TR-mediated transcription through native-TRE. Ind. Health 48, 査読有、115-118, 2010

9. Odawara H, Iwasaki T, Horiguchi J, Rokutanda N, Hirooka K, Miyazaki W, Koibuchi Y, Shimokawa N, Iino Y, Takeyoshi I, Koibuchi N. Activation of aromatase expression by retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) α in breast cancer cells: identification of a novel for response element. J. Biol. Chem. 284, 査読有、17711-17719, 2009.

10. Qiu CH, Miyazaki W, Iwasaki T, Londoño M, Ibhazehiebo K, Shimokawa N, Koibuchi N. 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, 査読有、893-898, 2009.

[学会発表] (計 29 件)

①国際学会

1. Iwasaki T., Ibhazehiebo K., Haraguchi M.,

Kimura-Kuroda J., Miyazaki W., Shimokawa N, Koibuchi N. Disruption of cerebellar development by brominated organic chemicals possibly through suppression of TR-mediated transcription. 4th International Symposium Society for Research on the Cerebellum. September 18, 2011, Tokyo, Japan.

2. Yamaguchi S., Ohsawa A., Yousefi B., Morioka S., Masuda H., Ronny, Hayashi H., Takatsuru Y., Iwasaki T., Shimokawa N, Umezu M., Koibuchi N. Cerebellar dysfunction and behavioral disorder in congenital hypothyroid (rdw) rat. 4th International Symposium Society for Research on the Cerebellum. September 18, 2011, Tokyo, Japan

3. Shimokawa N, Haglund K., Koibuchi N, Dikic I. Lack of CIN85 in brain leads to impaired dopamine receptor endocytosis and hyperactivity in mice. EMBO meeting September 10-13, 2011, Vienna, Austria.

4. Shimokawa N, Haglund K., Grabbe C, Koibuchi N, Dikic I. Lack of CIN85 in brain leads to impaired DRD2 endocytosis and hyperactivity. EMBO Conference on Cellular Signaling & Molecular Medicine. May 21-26, 2010, Cavtat/Dubrovnik, Croatia.

5. Ikezawa J., Shimokawa N, Haglund K., Dikic I., Koibuchi N. Defect of CIN85 suppresses mother's parenting behavior through dopamine-prolactin system. 14th International Congress of Endocrinology. March 26-30, 2010, Kyoto, Japan.

6. Ibhazehiebo K., Iwasaki T., Shimokawa N, Kimura-Kuroda J., Koibuchi N. Polybrominated diphenylethers (PBDEs) suppresses thyroid hormonereceptor (TR)-mediated transcription and impairs thyroid hormone (TH)-dependent dendrite arborization of Purkinje cells. 9th Asia and Oceania Thyroid Association Congress. November 1-4, 2009, Nagoya, Japan.

7. Londono B.M., Iwasaki T., Ibhazehiebo K., Lizcano F., Shimokawa N, Koibuchi N. Dynamics of the interaction of GR or TR

with the general coactivator SYT. 39th Annual Meeting, Society for Neuroscience October 17-21, 2009, Chicago, IL, USA.

8. Koibuchi N., Ibhazehiebo K., Shimokawa N., Iwasaki T. Suppression of thyroid hormone-induced dendrite arborization of Purkinje cells by polybrominated diphenyl ethers. 39th Annual Meeting, Society for Neuroscience. October 17-21, 2009, Chicago, IL, USA.

9. Shimokawa N., Haglund K., Dikic I., Koibuchi N. CIN85 knockout mice are hyperactive due to defective dopamine receptor endocytosis in the brain. 36th International Congress of Physiological Science. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan.

10. Koibuchi N., Iwasaki T., Shimokawa N. Student laboratory practice through MD-PhD course. 36th International Congress of Physiological Science. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan

11. Ikezawa J., Aotsuka N., Sayama K., Shimokawa N., Koibuchi N. Analysis of nursing ability and lactational function of CIN85 deficient mice. 36th International Congress of Physiological Science. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan.

12. Morioka S., Yamaguchi S., Kasagi M., Shimokawa N., Koibuchi N. Behavioral differences between congenital hypothyroid (rdw) and euthyroid rats. 36th International Congress of Physiological Science. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan

13. Ibhazehiebo K., Iwasaki T., Londono B.M., Hirooka K., Kimura-Kuroda J., Shimokawa N., Koibuchi N. Low dose polybrominated diphenylethers (PBDEs) suppresses thyroid hormone receptor (TR)-mediated transcription via DNA binding domain. 36th International Congress of Physiological Science. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan

14. Itoh M., Shimokawa N., Tajika Y., Murakami T., Yorifuji H., Koibuchi N.

Ischemia-reperfusion changes in skeletal muscle morphology. 36th International Congress of Physiological Science. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan.

15. Londono B.M., Iwasaki T., Ibhazehiebo K., Shimokawa N., Koibuchi N. Intracellular trafficking of the general coactivator SYT. 36th International Congress of Physiological Science. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan.

16. Ogawa A., Iwasaki T., Kikuchi T., Ibhazehiebo K., Hirooka K., Shimokawa N., Sajdel-Sulkowska E.M., Koibuchi N. The mechanism of the gender difference of PCB action of thyroid hormone receptor interaction. 36th International Congress of Physiological Science. July 27-August 1, 2009, Kyoto, Japan.

②国内学会

17. 下川哲昭, 池澤淳, 増田寛子, 鯉淵典之
「Lack of CIN85 in brain leads to impaired dopamine receptor endocytosis and hyperactivity in mice」第 89 回 日本生理学会大会、2012. 3. 31, 松本

18. 岩崎俊晴, イブハゼヒエボ キングスレイ, 原口瑞樹, 徐 明, 下川哲昭, 鯉淵典之
「Recent progress of the effect of Bromo-related environmental chemicals on thyroid hormone-related normal brain development」第 89 回 日本生理学会大会、2012. 3. 31, 松本

19. レスマナ ロニー, 岩崎俊晴, 下川哲昭, 鯉淵典之
「Effect of chronic aerobic exercise on thyroid hormone target genes in rat skeletal muscle」第 89 回 日本生理学会大会、2012. 3. 30, 松本

20. 下川哲昭, レスマナ ロニー, 高鶴裕介, 岩崎俊晴, 鯉淵典之
「母乳を介した水酸化 PCB の曝露は新生仔ラットで多動を引き起こす」第 14 回 環境ホルモン学会研究発表会、2011. 12. 1, 東京

21. 下川哲昭, 鯉淵典之
「CIN85 の機能欠損はドーパミン受容体のエンドサイトーシスを抑制し多動を引き起こす」第 58 回 北関東医学会総会、2011. 9. 29, 前橋

22. 下川哲昭, 池澤淳, 増田寛子, 鯉淵典之
「受容体エンドサイトーシスにおけるCIN85
の生理機能」第87回日本生理学会大会、
2010. 5. 21, 盛岡

23. イブハゼヒエボ キングスレイ, 岩崎俊晴,
下川哲昭, 木村-黒田純子, 鯉淵典之
「Suppression of cerebellar Purkinje cell
dendrite arborization by alpha-
hexabromocyclododecane」第87回日本生理
学会大会、2010. 5. 20, 盛岡

24. ロニー, 下川哲昭, フェレニア レニー,
岩崎俊晴, 鯉淵典之 「Excise intensity
influences plasma concentration of
thyroid hormone and expression of thyroid
hormone receptor in muscles in rats」第
87回日本生理学会大会、2010. 5. 20, 盛岡

25. 徐明, 岩崎俊晴, 下川哲昭, 鯉淵典之
「The effect of lipopolysaccharide on
astrocyte plasticity」第87回日本生理
学会大会、2010. 5. 20, 盛岡

26. 下川哲昭 「CIN85 機能欠失による受容体
エンドサイトーシスの解析」シンポジウム
「エンドサイトーシスによる細胞機能の制
御」第82回日本生化学会大会、2009年10月
21日、神戸

27. 岩崎俊晴, Marina B. Londono, Kingsley
Ibhazehiebo, 下川哲昭, 鯉淵典之 「Synovial
sarcoma translocation (SYT)と核内ホルモン
受容体のリガンド存在下における細胞内の動
態」第56回北関東医学会総会、2009. 10. 8,
前橋

28. イブハゼヒエボ キングスレイ, 岩崎俊晴,
ロンドニョ マリーナ, 広岡和美, 下川
哲昭, 鯉淵典之 「Low dose
hexabromocyclododecane suppress thyroid
hormone receptor-mediated transcription」
第82回日本内分泌学会学術総会、2009. 4.
25, 前橋

29. ロンドニョ マリーナ, 岩崎俊晴, イブ
ハゼヒエボ キングスレイ, 下川哲昭, 鯉淵
典之 「Imaging analysis of the general
coactivator SYT in living cells」第82回
日本内分泌学会学術総会、2009. 4. 25, 前
橋

〔図書〕(計3件)

1. 下川哲昭

「インテグレートドシリーズ 生理学」:
14章、15章 (鯉淵典之 監訳), 2011, 249
頁(pp. 189-208), 東京化学同人, 東京.

2. 下川哲昭

「内分泌・栄養・代謝系 コア・カリキュラ
ムテキスト」: 性ホルモンの合成・代謝経路
と作用 (寺内、鯉淵、後藤 編集), 2011, 343
頁(pp. 48-53), 文光堂, 東京.

3. 下川哲昭

「症例問題から学ぶ生理学・原著3版」: 細
胞および自律生理学 (鯉淵典之 監訳), 2009,
392頁(pp. 1-54), 丸善株式会社, 東京.

〔その他〕

ホームページ等

<http://nori3.dept.med.gunma-u.ac.jp/index.php?イベント>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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