

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：23101
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K08569
研究課題名（和文）HDAC3の甲状腺機能低下症における機能解明と新規手法開発によるゲノム区画化検討

研究課題名（英文）Functional analysis of HDAC3 in hypothyroidism and study of genome compartmentalization by a new method.

研究代表者
石井 角保（Sumiyasu, Ishii）
新潟県立看護大学・看護学部・教授

研究者番号：60638112
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）：周産期甲状腺機能低下症によって誘発される小脳の発達障害が、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）3の阻害剤によって改善されるか検討した。甲状腺機能低下症マウスに対する阻害剤投与は、小脳の形態学的異常と運動協調障害を軽減した。さらに、小脳甲状腺ホルモン応答遺伝子のmRNAレベルとヒストンアセチル化レベルが上昇した。これらの結果は、HDAC3が周産期甲状腺機能低下症による小脳発達障害に重要な役割を果たしていることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、周産期甲状腺機能低下症において、HDAC3が甲状腺ホルモン応答遺伝子のヒストンを脱アセチル化して転写を抑制することにより小脳発達障害に重要な役割を果たしているという病態が明らかになった。そのため、HDAC3阻害剤は、甲状腺ホルモン応答遺伝子のヒストンをアセチル化と転写を刺激することにより、甲状腺機能低下症に起因する小脳障害に対する新規治療薬として応用できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to study whether the cerebellar developmental defects induced by perinatal hypothyroidism can be rescued by treatment with a specific inhibitor of histone deacetylase (HDAC) 3. The treatment with the HDAC3 inhibitor alleviated the cerebellar morphological defects and motor coordination defects in hypothyroid mice. In addition, the administration of the inhibitor increased the levels of mRNA and histone acetylation of cerebellar thyroid hormone-responsive genes. These findings indicate that HDAC3 plays an important role in the cerebellar developmental defects induced by perinatal hypothyroidism.

研究分野：内分泌代謝分野

キーワード：HDAC3 甲状腺ホルモン 小脳

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモン欠乏状態では、核内ホルモン受容体である甲状腺ホルモン受容体 (TR) がヒストン脱アセチル化酵素 3 (HDAC3) を含む複合体と結合し、標的遺伝子のヒストンを脱アセチル化して転写を抑制する。しかし、既報の多くは培養細胞を用いており、生体内における解析はあまり行われていない。また、甲状腺ホルモンは小脳の発達に必須であり、発達期に不足すると運動協調障害などを生じるが、HDAC3 やヒストン修飾の関与は明らかではない。

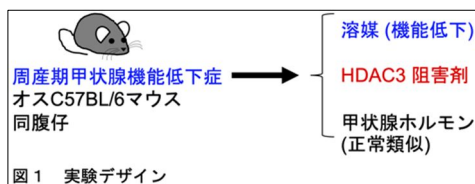
2. 研究の目的

本研究では、マウス小脳発達をモデルとして、甲状腺機能低下症の生体内における HDAC3 の役割を解明することを目的とする。具体的には、HDAC3 は甲状腺機能低下症状態の小脳において発達を障害しているのか。HDAC3 が TR を介して転写制御している小脳の標的遺伝子は何か。

HDAC3 は TR を介して標的遺伝子のヒストンアセチル化をどのように制御しているか。といった点を明らかにする。それによって、甲状腺機能低下症の生体内における諸症状の病態解明や、発達期を過ぎた小脳発達障害などホルモン補充無効の甲状腺機能低下症例に対する HDAC3 機能阻害投与という新たな治療法につなげる。

3. 研究の方法

(1) 齧歯類において小脳は出生後に大きく発達することが知られている。まず、小脳発達障害をきたすことが報告されている、抗甲状腺薬プロピルチオウラシル投与による周産期甲状腺機能低下症マウスを作成する。出生後の本マウスに対し、HDAC3 阻害剤である RGFP966 を投与して、小脳発達障害が改善するかを解析する。比較対象として溶媒のみを投与した群、正の対照として甲状腺ホルモンを投与して正常の状態に近づけた群を用いる (図 1)。



(2) 上記三群のマウスについて、体重および小脳重量を検討する。

(3) マウス小脳を摘出して、形態学的観察を行う。

(4) マウス小脳障害による運動協調障害を評価する、正向反射、背地走性テスト、ロータロッド試験を用いて、甲状腺機能低下症マウスの運動協調障害に対する HDAC3 阻害剤の影響を検討する。

(5) 摘出したマウス小脳において、遺伝子発現における HDAC3 阻害剤の影響を検討する。

(6) 上記(5)で検討した遺伝子について、ヒストンのアセチル化レベルを検討する。

4. 研究成果

(1) 抗甲状腺薬と溶媒のみを投与された群では、既報と同様に、甲状腺ホルモン補充により正常に近づけた群に比べ体重が軽かった。抗甲状腺薬に加えて HDAC3 阻害剤を投与すると、ホルモン補充群には及ばないが、溶媒のみの群よりも体重が重くなることが確認された。

(2) 抗甲状腺薬と溶媒のみを投与された群では、既報と同様に、甲状腺ホルモン補充により正常に近づけた群に比べ小脳の重量が軽かった。抗甲状腺薬に加えて HDAC3 阻害剤を投与すると、ホルモン補充群には及ばないが、溶媒のみの群よりも小脳の重量が重くなることが確認された。これは、出生後の小脳発達期間における HDAC3 阻害剤投与が、小脳の発達障害を軽減していることを示している。一方で、大きさという観点で発達が生体前にある程度終了している「小脳以外の脳」の重量は三群間でほとんど差がなかった。

(3) 7日齢と14日齢の二つの時点で小脳の形態学的検討を行った。低倍率の観察では、溶媒のみの群で甲状腺ホルモン補充群に比べて、大きさが小さいほか、小葉間の溝が浅く、小葉構造も

未成熟であった。HDAC3 阻害剤を投与すると、これらの異常所見の部分的改善が認められた。高倍率では、顆粒細胞の移動に焦点を当てて観察を行った。小脳の発達過程において、顆粒細胞は外顆粒層から内顆粒層に移動することが知られている。そのため、移動している途中の7日齢で観察すると、発達遅延の小脳では外顆粒層の厚さが厚くなる。ホルモン補充群に比べ、溶媒のみの群では厚い外顆粒層が観察された。HDAC3 阻害剤群では、溶媒群と比較して外顆粒層が薄く、小脳発達遅延の部分的改善が認められた。一方、14日齢では全ての群で外顆粒層がほぼ消失し、移動が完了したことが示された。そのため、甲状腺機能低下症マウスの顆粒細胞移動に関しては、異動の完全な障害ではなく遅延であることが示唆された。

(4) 小脳発達の機能的側面について三種類の行動解析を用いて検討した。

まず、正向反射は、マウスを仰臥位の状態にして、正常な体位に戻るまでに要した時間を測定する実験であり、生後まもない時期から評価が可能となる。溶媒のみの群では甲状腺ホルモン補充群に比べ、正常な体位に戻るまでに時間を要した。HDAC3 阻害剤を投与すると、溶媒のみの群に比べ、早く正常な体位に戻った。

次に、背地走性テストは、マウスを斜面に下向きに置くと、斜面の高い方を向こうとする性質を利用している。溶媒のみの群ではホルモン補充群に比べ、斜面の高い方を向くまでに長い時間を要した。HDAC3 阻害剤投与群では、溶媒のみの群に比べ、短時間で高い方を向いた。

ロータロッド試験は、マウスを回転する棒の上に乗せ、どれだけ落ちずに棒上にとどまっていたかを測定する試験で、小脳障害を検討する代表的な方法であるが、ある程度体が大きくなるとできないという特徴がある。溶媒のみの群ではホルモン補充群に比べ短時間で回転する棒から落下した。HDAC3 阻害剤を投与すると、溶媒のみの群に比べ長時間棒上にとどまることができ、小脳発達障害による運動協調障害が軽減していることが明らかになった(図2)。

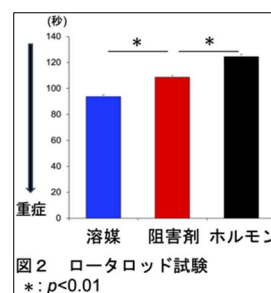


図2 ロータロッド試験
*: $p < 0.01$

(5) 摘出したマウス小脳において代表的な遺伝子のmRNAレベルを解析した。*Pcp2* など甲状腺ホルモンによって発現が誘導される遺伝子については、溶媒のみの群ではホルモン補充群に比べ mRNA レベルが低下しており、HDAC3 阻害剤投与によって部分的に改善が認められた(図3)。一方で、甲状腺ホルモンによる制御が確立されていない遺伝子では、三群間に優位な差は認められなかった。

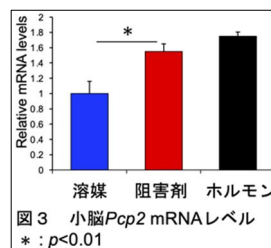


図3 小脳*Pcp2* mRNAレベル
*: $p < 0.01$

(6) 上記(5)で検討した遺伝子について、小脳を用いたクロマチン免疫沈降法によって、ヒストンのアセチル化レベルを検討した。*Pcp2* など(5)で甲状腺ホルモンおよびHDAC3によって発現が調節されていた遺伝子について、溶媒のみの群ではホルモン補充群に比べヒストンのアセチル化レベルが低下しており、HDAC3 阻害剤投与によってアセチル化が促進された(図4)。図2、3に示した阻害剤による mRNA レベルや行動実験における改善の程度がヒストンアセチル化促進の程度に見合っていないが、ヒストンメチル化など他のヒストン修飾が関与している可能性などが考えられた。

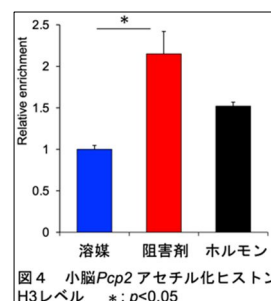


図4 小脳*Pcp2* アセチル化ヒストンH3レベル
*: $p < 0.05$

これらの結果から、甲状腺機能低下症マウスの小脳において、HDAC3 がヒストンの脱アセチル化によって甲状腺ホルモン標的遺伝子の転写を抑制し、小脳の発達を障害していることが示唆された。これに対して HDAC3 阻害剤はヒストンアセチル化と転写活性化を介して甲状腺機能低下症マウスの小脳発達障害を軽減することが示され、治療薬に応用できる可能性が示唆された。

参考文献 Susetyo, A.; Ishii, S.; Fujiwara, Y.; Amano, I.; Koibuchi, N. Histone Deacetylase 3 Inhibitor Alleviates Cerebellar Defects in Perinatal Hypothyroid Mice by Stimulating Histone Acetylation and Transcription at Thyroid Hormone-Responsive Gene Loci. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 7869.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Susetyo Alvin, Ishii Sumiyasu, Fujiwara Yuki, Amano Izuki, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Histone Deacetylase 3 Inhibitor Alleviates Cerebellar Defects in Perinatal Hypothyroid Mice by Stimulating Histone Acetylation and Transcription at Thyroid Hormone-Responsive Gene Loci	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7869 ~ 7869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147869	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 Ninomiya Ayane, Amano Izuki, Kokubo Michifumi, Takatsuru Yusuke, Ishii Sumiyasu, Hirai Hirokazu, Hosoi Nobutake, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Long-term depression?inductive stimulation causes long-term potentiation in mouse Purkinje cells with a mutant thyroid hormone receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2210645119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2210645119	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 Ishii Sumiyasu, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 COUP-TFII in Kidneys, from Embryos to Sick Adults	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1181 ~ 1181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics12051181	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 Ninomiya Ayane, Mshaty Abdallah, Haijima Asahi, Yajima Hiroyuki, Kokubo Michifumi, Khairinisa Miski Aghnia, Ariyani Winda, Fujiwara Yuki, Ishii Sumiyasu, Hosoi Nobutake, Hirai Hirokazu, Amano Izuki, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 159
2. 論文標題 The neurotoxic effect of lactational PFOS exposure on cerebellar functional development in male mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 112751 ~ 112751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2021.112751	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 Ishii Sumiyasu	4. 巻 22
2. 論文標題 The Role of Histone Deacetylase 3 Complex in Nuclear Hormone Receptor Action	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9138 ~ 9138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22179138	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 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 -

1. 著者名 石井角保	4. 巻 39
2. 論文標題 甲状腺ホルモン不応症の診断と治療	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Practice	6. 最初と最後の頁 61-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石井角保、Alvin Susetyo、天野出月、鯉淵典之
2. 発表標題 ヒストン脱アセチル化酵素 3 阻害剤による周産期甲状腺機能低下症マウスの治療研究
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井角保、Alvin Susetyo、天野出月、鯉淵典之
2. 発表標題 ヒストン脱アセチル化酵素3阻害剤は生体内で標的遺伝子のヒストンをアセチル化し甲状腺機能低下症による小脳発達障害を軽減する
3. 学会等名 第65回日本甲状腺学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井角保、山田正信
2. 発表標題 甲状腺ホルモン不応症診療の手引きの作成
3. 学会等名 第65回日本甲状腺学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Alvin Susetyo, Sumiyasu Ishii, Izuki Amano, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 The role of histone deacetylase 3 in motor coordination defects induced by perinatal hypothyroidism
3. 学会等名 11th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井角保、山田正信
2. 発表標題 臨床重要課題 甲状腺ホルモン不応症の診断基準ならびに治療指針の作成
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Alvin Susetyo, Sumiyasu Ishii, Izuki Amano, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 Histone deacetylase 3 inhibition mitigates hypothyroidism-induced cerebellar developmental defects in mice
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 石井角保、鯉淵典之
2. 発表標題 Functional analysis of a lncRNA THRB-AS2
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 石井角保、Alvin Susetyo、天野出月、鯉淵典之
2. 発表標題 ヒストン脱アセチル化酵素3阻害剤投与により周産期甲状腺機能低下症マウスの運動協調障害が軽減される
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Alvin Susetyo, Sumiyasu Ishii, Izuki Amano, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 The role of histone deacetylase 3 (HDAC3) in cerebellar developmental defects induced by hypothyroidism
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井角保、堀口和彦、中島康代、小澤厚志、渋谷信行、佐藤哲郎、天野出月、宮崎航、山田正信、鯉淵典之
2. 発表標題 ベータ型甲状腺ホルモン受容体遺伝子逆鎖由来 long non-coding RNA の THP-1 細胞における機能解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 日本生理学会用語委員会	4. 発行年 2024年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 324
3. 書名 生理学用語ハンドブック	

1. 著者名 日本甲状腺学会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 96
3. 書名 甲状腺ホルモン不応症診療の手引き	

1. 著者名 平田 結喜緒	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 346
3. 書名 下垂体疾患診療マニュアル 改訂第3版	

〔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
---------	---------