

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591356

研究課題名(和文) GABAインターニューロンの分化・成熟を制御する甲状腺ホルモンの分子基盤の解明

研究課題名(英文) A study on Molecular basis of thyroid hormones on GABAergic interneuron development of the mice

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳発達期の甲状腺ホルモン(TH)欠乏は知的障害を引き起こすが、その成因のひとつがパルブアルブミン(PV)陽性細胞の成熟遅延にある可能性が示唆された。人為的にTH不全を誘発するとPV発現が著しく阻害されるが、外因性にTHを補充するとPV発現が回復することから、THは間接・直接的にPV遺伝子発現を制御していると推察された。生後2週目までの間にTH不全を経験した成体マウスのPV発現細胞はその数が正常個体と同程度になったが、自発運動量の異常が表出するようになった。TH不全そしてPV発現の遅延が、その後の個体の行動発現にどのような影響を及ぼすのか、現在、その因果関係を精査している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of parvalbumin (PV)-positive neurons in the brain of hypothyroid mice. The number of PV neurons and mRNA expression levels markedly decreased in hypothyroid mice brain. Treatment of exogenous thyroxin from PD 0 to 14 rescued the decrease in the PV neuron number and mRNA expression in the hypothyroid mice, but the treatment over P14 had no effect. A pulse-chase analysis showed that PV neurons already terminated cell proliferation stage during P0 to P14. Therefore thyroid hormone may regulate PV gene expression directly or indirectly. By removing anti-thyroid agents after P14, PV expression in adulthood almost caught up with normal level. In order to know the effect of a retardation of PV expression on behavior in hypothyroid mice, we measured the spontaneous motor activity in hypothyroid mice. The spontaneous motor activity on dark period increased in hypothyroid mice, and the disappearance of the evening peak before the light period observed in these mice.

研究分野：神経科学、神経内分泌学

キーワード：甲状腺ホルモン 発達障害 パルブアルブミン

1. 研究開始当初の背景

胎生期から幼少期にかけての生体をとりにくく環境は、個体成熟後の脳機能に影響を与える。甲状腺ホルモンの欠乏は臨床的にはクレチン症として、精神遅滞などの知的障害を引き起こすことが古くから知られているが、その成因は未解明な点が多い。従来からミエリン形成不全や神経突起形成の異常が精神遅滞の主たる原因とされている。

これまで、我々は硫酸基転移酵素異常による甲状腺刺激ホルモン受容体機能不全を呈する突然変異マウス (*grt*) を用いた内分泌学的研究に加え、海馬ニューロン新生における甲状腺ホルモンの役割について調査をしてきた。幼若 *grt* マウスにみられる海馬ニューロン新生の頻度低下は、外因性に甲状腺ホルモンを補充することで回復することが明らかとなり、海馬ニューロン新生における甲状腺ホルモンの関与を明らかにした。一方、海馬におけるニューロン新生は、NMDA 受容体阻害薬によって促進されること、また、新生した神経前駆細胞は GABA 入力を受けて成熟した神経細胞へと分化することが明らかになっている。このため我々は、甲状腺ホルモンの欠乏によるニューロン新生の頻度低下に、海馬における GABA インターニューロンの関与を疑い研究を開始した。

2. 研究の目的

脳の発生・発達過程における甲状腺のホルモン欠乏が、幼若期の GABA 作動性インターニューロン (以後、GABA ニューロン) の亜集団構成比を変化させる事実を見いだした。この現象は甲状腺ホルモンの補充によって回復するが、生後数週間を経過するとその効力は失われることから、ホルモン感受性の臨界期が GABA ニューロンの分化終了時期とほぼ一致することも明らかになった。本研究では、どの亜集団が影響を受けるのか、またそれは脳の全体で見られる現象であるのか。そこにはいかなる分子が関与するのか。分子組織学的解析を行い GABA 作動性インターニューロン形成における甲状腺ホルモンの役割を明らかにしたい。

3. 研究の方法

< 甲状腺機能低下症モデル動物の作成 >
マウスはラットと比べて、抗甲状腺剤だけでは血中 T3/T4 レベルは顕著に低下しない。低ヨード飼料とメチマゾール (MMI, 飲水) の併用で完全な甲状腺機能低下を示すモデル動物の作製が可能になる。そこで、低ヨード飼料は日本クレアに特別作成依頼を行った。ただ、かなり厳しい甲状腺機能低下をもたらすため、メチマゾールと過塩素酸

カリウムの併用を行い、低ヨード食を使用しない条件も検討した。

< 血中甲状腺ホルモン測定 >

脳標品回収時に断首または心採血によって得た血液を遠心分離し血清を回収。EIA 法により血中 T4 レベルの測定を行った。

< 免疫染色法 >

組織標本上のパルプアルブミンならびに BrdU を免疫組織化学的に検出した。二重免疫染色においては 2 次抗体に蛍光抗体を使用し共存率を計測した。

< in situ ハイブリッド形成法 >

組織標本上のパルプアルブミン mRNA 発現を観察するために DIG 標識 cRNA プローブを用いた in situ ハイブリッド形成法をおこなった。

< 定量的 PCR 法 >

パルプアルブミン遺伝子発現ならびに各種転写因子発現を、比較 Ct 法 (Ct 法) を用いて解析した。

< 自発運動量の計測 >

動物体温による放出赤外線検出型の自発運動量センサーを用いて、1 2 時間明期 1 2 時間暗期におけるマウスの活動量を計測。

4. 研究成果

我々はマウスを用い脳形成期の TH 欠乏によりパルプアルブミン (PV) ニューロンの発達が阻害されることを明らかにしたが、今回はこの研究を発展させ、一定期間のみ甲状腺機能を低下させる実験群を用意し、脳発達期の一時的な内部環境の攪乱が、その後の脳発達にどのような影響を及ぼすかを形態・行動学的に検討した。

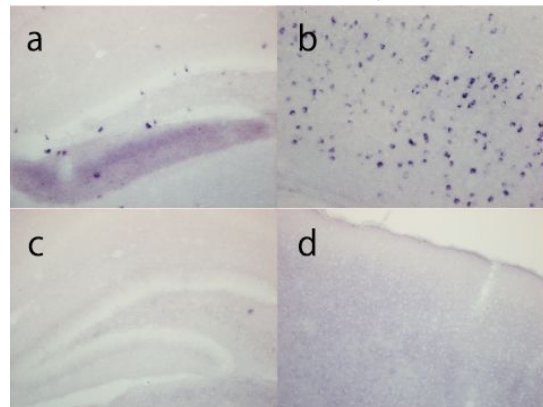


図 1 PV mRNA 発現
a (海馬歯状回) および b (大脳皮質) は正常個体における PV mRNA 発現。c および d は hypothyroid 群。hypothyroid 群では PV mRNA 発現の著しい低下が認められる。

まず抗甲状腺剤によって誘導された先天性甲状腺機能低下症マウスに出生直後からT4を補充した。補充を行わない群ではPVニューロン数は顕著に減少したが、出生直後からのT4補充によってこれが回避できたためPVニューロンの発現には甲状腺ホルモンが必要であることが明らかになった。次にE17.5からP14までに限って甲状腺ホルモンを欠乏させた後、甲状腺機能を正常に回復させると幼少期には顕著であったPVニューロン数の減少が成体では観察されず、その細胞数は甲状腺ホルモンを一度も欠乏させない対照群と同程度であった。したがって甲状腺機能の回復に伴いPVニューロン発現が追従するものと推察された。

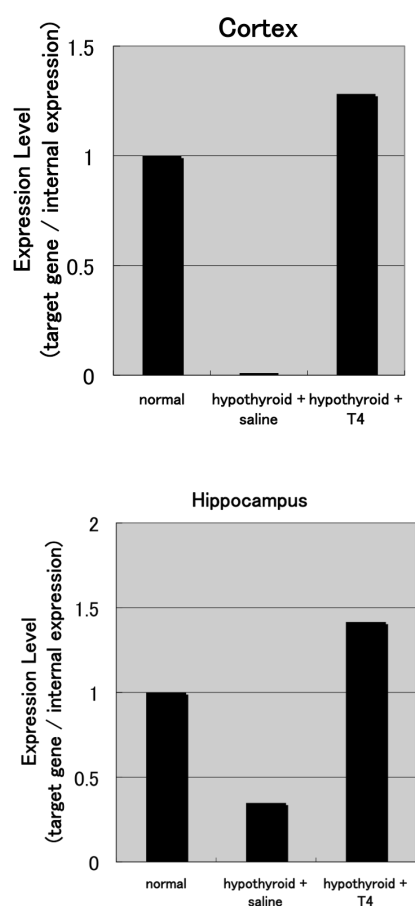


図2 qPCR法によるPV mRNA発現
生後14日齢マウスの大脳皮質および海馬におけるPV mRNA発現をqPCR法によって解析した。hypothyroid群のPV発現は、正常個体と比べて、著しく低下したが、出生直後から1日1回のチロキシン(T4)投与によって有意に回復する。

一方、我々はBrdU投与によるパルスチェイス試験を行い、出生直後から生後14日までの間に誕生する細胞を追跡し、甲状腺ホルモンの欠乏にともなうPV発現の減少に関する組織学的なヒントを得ることを試みた。その結果、出生直後から生後14日ま

での間に誕生した細胞のすべてがPV陰性であったことから、甲状腺ホルモンはPVニューロンの細胞系譜に影響するのではなく、PV遺伝子発現そのものを、間接的もしくは直接的に制御しているものと推察された。実際、甲状腺ホルモン不全は、Lhx6やSOX6, SHHなどの細胞系譜に関わる転写因子発現に影響を与えなかった。そこで次に、PV遺伝子上流における甲状腺ホルモン応答配列の存在を調査したが応答配列を確認できなかった。それゆえ、甲状腺ホルモンはPV遺伝子発現を間接的に制御するものと推察された。

PVニューロンは大脳皮質、海馬、視床網様核、小脳プルキンエ細胞など、広範に発現が認められるが、免疫染色法やin situハイブリッド形成法により正常個体とhypothyroid群間の発現の差異を観察したところ、大脳皮質や海馬においては顕著な減少を示すものの(図1、図2)その他の領域ではわずかな減少をしめすのみで、大脳皮質や海馬のような劇的な差は認められなかった。それゆえ、PV発現は領域によって異なる発現制御を受けている可能性が示唆された。hypothyroid群では大脳皮質および海馬においてPVの劇的な発現減少が認められることから、高次脳機能への影響が強く示唆され、実際、過去に甲状腺機能低下症は空間記憶へ影響するとの報告されている。我々は、高次機能を調べる以前に、より基本的な行動発現への影響を調べるために、生後14日齢までの期間に甲状腺ホルモン不全を経験した成体マウスの自発運動量を計測した。その結果、C57BL/6系マウスでは、LDサイクルにおいて暗期開始直後と明期直前に活動亢進が観察されるが、甲状腺ホルモン不全を経験した成体マウスでは、これらのピークが消失していた(図3)。PVニューロン発現の一時的な遅延が、どのようなメカニズムのもと、このような自発運動量の変化をもたらすのか。現在、継続して解析を進めている。



図3 赤外線センサーによるLD周期における活動量
赤外線センサーを用いて正常個体(左)とhypothyroid個体(右)の自発運動量を計測した。正常個体においては暗期開始時と暗期終了時に活動の亢進が観察されるが、hypothyroid個体では2つのピークが認められず、かつ明期においてはほとんど活動しないことがわかる。

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1件)

Uchida K, Taguchi Y, Sato C, Miyazaki H, Kobayashi K, Kobayashi T, Itoi K.
Amelioration of improper differentiation of somatostatin-positive interneurons by triiodothyronine in a growth-retarded hypothyroid mouse strain.
Neurosci Lett. 2014 Jan 24;559:111-6.
(査読あり)

[学会発表](計1件)

内田克哉、小林健一、布施俊光、井樋慶一。
脳発達期の甲状腺ホルモン欠乏はマウスの大脳皮質および海馬歯状回におけるバルブアルブミン陽性 GABA ニューロンの発達を遅延させる。
日本甲状腺学会(2015年11月福島県文化センター)

[図書](計0件)

[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0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田 克哉 (UCHIDA Katsuya)
東北大学・大学院情報科学研究科・助教
研究者番号：40344709

(2)研究分担者

小林 健一 (KOBAYASHI Kenichi)
独)労働安全衛生総合研究所・健康障害予防研究グループ 常勤研究員

研究者番号：00332396

(3)連携研究者

大隅 典子 (OSUMI Noriko)
東北大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：00220343