

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791116

研究課題名(和文)核内受容体ERR を介した神経回路形成と内分泌攪乱物質による破綻メカニズムの解明

研究課題名(英文)Neural circuite formation through nuclear receptor ERRgamma and its disturbing mechanism by endocrine disruptor

研究代表者

谷田 任司(Tanida, Takashi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30589453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：近年増加している神経発達障害の原因の1つが、環境中/食物・飲料中の微量な合成化学物質であることが明らかとなりつつある。本研究では、それら微量化学物質の標的分子の1つである核内受容体ERR(α, β, γ)の神経/内分泌機能を解析した。生殖機能を制御する視床下部領域にはエストロゲン受容体ERαが豊富に存在するが、ERRαの全てが当領域に発現していた。また、ERRβはERαの可動性を低下させ、転写を抑制することが分かった。ERRγは新生仔期の視床網様核や黒質網様部に特に強く発現していた。以上より、ERRは生殖内分泌機能の調節や感覚・運動制御に関わる神経機能の発達に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent epidemiological studies suggest that the environmental concomitants such as phenols, dioxins, or organochloride pesticides are associated with neurodevelopmental disability including LD, ADHD and autism. The present study tried to elucidate the neurological and endocrinological function of ERR (alpha, beta, gamma) that is one of target molecules for those compounds. It was revealed that all the subtypes of ERRs were expressed in several hypothalamic areas (AVPV, MPOA, VMH) which are crucial for reproductive endocrine function under the control of estrogen receptor (ER) alpha. Molecular studies indicated that ERRbeta reduces the subnuclear mobility of ERalpha and represses its transactivity on the estrogen-response element. ERRgamma was strongly expressed in reticular thalamic nucleus and substantia nigra reticular part of neonatal rat. These results suggest that ERRs contribute to the regulation of neuroendocrine function and the development of sensorimotor control in the brain.

研究分野：胎児・新生児医学

科研費の分科・細目：先天異常学

キーワード：エストロゲン関連受容体(ERR) エストロゲン受容体(ER) 内分泌攪乱物質 微量化学物質 神経発達

1. 研究開始当初の背景

近年、学習障害 (LD)、注意欠陥多動性障害 (ADHD)、自閉症といった神経発達障害を疑われる児童が急増している^{1,2)}。原因として、環境中に放出あるいは食品・飲料中に溶出された合成化学物質の胎児・新生児期暴露が疑われている。近年の疫学的調査からも、環境中の微量化学物質の血中濃度と神経発達障害との相関性が明らかにされている²⁾。胎児・新生児期は血液脳関門が未発達であるため、母体や母乳に含まれる外来化学物質が胎児・新生児の脳にまで達する。加えて、胎児・新生児は生理活性物質に対する感受性が非常に高く、成体における無毒性量あるいは最小毒性量以下の曝露量であっても正常な発達が影響され、更に、その影響が成長後まで不可逆的に残存することが明らかとなっている³⁻⁵⁾。神経発達期の影響が成長後の長期にまで及ぶメカニズムとして、ヒストンのアセチル化/脱アセチル化を介した遺伝子サイレンシング機構が挙げられる。フェノール類、ダイオキシン類、PCB類、有機塩素系農薬など、内分泌攪乱作用を有する化学物質のうちいくつかは、エストロゲン関連受容体 (estrogen-related receptor: ERR) と強く結合する。ERR は 3 つのサブタイプ α , β , γ を有するリガンド非依存的な転写調節因子であり、p300/CBP と協働したヒストン修飾を介して遺伝子発現の調節を行うことから、胎児・新生児期に ERR の転写調節が攪乱されるとその影響が成長後にも及ぶ可能性がある。しかしながら、現在の所、ERR の脳機能やその神経発達障害との関連性は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

ERR の脳機能について、神経内分泌学的な観点から明らかにすると共に、発達神経障害との関連性について検証することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 脳における ERR の発現 / 局在解析

ERR の脳機能について基礎的知見を得るため、ラット脳を用いたおよび RT-PCR 法および免疫組織化学法により、ERR の各サブタイプの発現および局在を解析した。また、新生仔ラットと成熟ラットで発現状態を比較した。

2) ERR のライブセル・イメージング

ERR との結合が知られる化学物質に対する ERR の反応を解析するため、ラット組織よりクローニングした各サブタイプの ERR を蛍光標識し、COS-1 細胞に発現させ、化学物質を添加した際の細胞内動態を解析した。また、ERR の神経内分泌機能について基礎的知見を得るため、エストロゲン受容体 ($ER\alpha$) と ERR を共発現させた際の動態についても解析した。

3) 相互作用ドメインの同定

方法(2) により $ER\alpha$ と $ERR\beta$ が細胞内で相互作用を起こすことが示されたため、相互作用ドメインを同定するため、 $ERR\beta$ の各ドメインを欠失させた変異体を作製し、ライブセル・イメージングおよび共免疫沈降法 (coIP) を行った。

4) ERR のエストロゲンシグナルへの関与

$ERR(\alpha, \beta, \gamma)$ のエストロゲンシグナルへの作用を明らかにするため、各サブタイプの ERR と $ER\alpha$ を共発現させ、エストロゲン応答配列 (estrogen response element: ERE) に対する転写活性を Luciferase Assay により解析した。更に、エストロゲン感受性の MCF-7 細胞株に ERR を発現させた際の増殖活性の変化を解析した。

4. 研究成果

1) 脳における ERR の発現 / 局在解析

RT-PCR

8 - 10 週齢ラットの大脳皮質、視索前野、および間脳より抽出した Total RNA より RT-PCR を行い、ERR の発現を確認した所、全てのサブタイプの発現が認められた。いずれの部位においても、 $ERR\gamma$ は、 α や β 型よりも比較的強く発現する傾向が見られた。続いて、ERR のエストロゲンシグナルへの関与を想定し、8 - 10 週齢雌雄ラットを用いて $ER\alpha$ リッチな脳領域 (AVPV, MPOA, BNST, Arc, VMH) のパンチアウト組織を用いて RT-PCR を行った。その結果、いずれのサブタイプの ERR も全ての領域で発現が認められた。 $ERR\gamma$ は α や β 型と比べ比較的強い発現が認められた。出生翌日の新生仔ラットにおいても、同様にパンチアウトを行い、ERR の発現状態を RT-PCR により確認した。その結果、成ラットと同様全てのサブタイプの ERR がいずれの領域においても発現していたが、 $ERR\beta$ については AVPV において雄の方が雌よりも強く発現する傾向が認められた。MPOA, BNST, Arc, VMH については、 $ERR\beta$ 発現は雌雄共に比較的弱かった。 $ERR\alpha$ および γ については、部位間あるいは雌雄間に明瞭な差は認められなかった。以上より、いずれのサブタイプの ERR もエストロゲン依存的な脳機能に関与する可能性が考えられたが、特に、 $ERR\beta$ は $ER\alpha$ と協働して脳の性差形成や生殖内分泌系の形成に関与していることが示唆された。

免疫組織化学

RT-PCR により $ERR\gamma$ の脳における発現が比較的豊富に認められたため、抗 $ERR\gamma$ 抗体を用いた免疫組織化学法により、雄の新生仔および成熟ラット脳を用いて $ERR\gamma$ の局在を解析した。その結果、上記 $ER\alpha$ リッチな脳領域の他、線条体、淡蒼球、内側中隔核、視床網様核、不確帯、乳頭体核、脚間核、黒質網

様部などに発現が認められた。特に、視床網様核には強い染色性を示す細胞体が高い密度で確認された。また、黒質網様部や視床網様核などの領域では、成熟個体よりも新生仔の方が強く発現していた。

ERR γ は ER α を発現する領域としない領域の両方に認められたことから、ERR γ はエストロゲン依存的な機能とエストロゲン非依存的な機能の両方に関与する可能性が考えられた。また、視床網様核や黒質網様部といった感覚/運動制御に関与する領域においては、新生児期において顕著な発現を示したことから、ERR γ は感覚や運動制御の神経機能発達に関与していることが示唆された。更に、発達期の曝露により多動が誘発されるビスフェノール A などは ERR γ と強く結合することから、ビスフェノール A による成長後の行動変調が上記の ERR γ 発現部位の機能発達不全に起因する可能性が考えられた。

2) ERR のライブセル・イメージング

合成エストロゲンである diethylstilbestrol (DES) は ERR と結合し、その転写機能を抑制する。DES の ERR を介した作用機構を明らかにするため、蛍光標識した各サブタイプの ERR (YFP-ERR) を COS-1 細胞に発現させ、ライブセル・イメージングを行った。その結果、DES を加えるといずれのサブタイプの ERR も核内で顆粒状の発現様式を呈し、中でも γ 型は核外への移行が認められた。また、FRAP 解析により、いずれのサブタイプの ERR も DES 添加後に核内における可動性が減少することが明らかとなった。以上より、DES は ERR と核内構造体 (核マトリクス) への結合を促進し、可動性を低下させることでその転写を抑制することが示唆された。

続いて、ERR のエストロゲン作用について分子機構を明らかにするため、蛍光標識した ER α (CFP-ER α) と各サブタイプの YFP-ERR を用い、ライブセル・イメージングを行った。各サブタイプの YFP-ERR を単独で発現させた場合、17 β -estradiol (E2) を添加しても発現様式に変化は認められなかった。一方、CFP-ER α と YFP-ERR を共発現させた場合、ERR のうち β 型のみが E2 添加後に核内で ER α と重なる顆粒状の蛍光像を示した。更に、FRAP 解析および coIP により、ERR β は ER α と相互作用を起こして ER α の可動性を低下させることが明らかとなった。

3) 相互作用ドメインの同定

方法 2) より、ERR β が ER α と相互作用することが示されたので、相互作用するドメインの同定を行った。ERR β の N-terminal domain (NTD)、DNA-binding domain (DBD)、または Ligand-binding domain (LBD) の欠失させた変異体を YFP の下流に連結した融合タンパクを COS-1 細胞に ER α と共発現させた後、ライブセル・イメージングおよび coIP を行った。その結果、ERR β の ER α との相互作用ドメイ

ンは NTD であることが明らかとなった。

4) ERR のエストロゲンシグナルへの関与

ERE-driven Luciferase reporter construct を用い、ER α による転写機能への ERR の関与を解析した所、ERR のうち β 型のみが ER α による転写活性を有意に低下させた。また、ERR β を ER α 陽性乳癌細胞株 MCF-7 に発現させると、発現させなかった場合と比較して増殖が有意に抑制された。

以上 2 - 4) の解析より、ERR β は ER α の可動性を低下させることでその転写を抑制し、エストロゲン依存的な細胞機能を調節することが示された。

[参考文献]

- 1) Akinbami LJ, et al., NCHS Data Brief, 2011.
- 2) Landrigan PJ, et al., EHP, 2012.
- 3) Tanida T., et al., Toxicol. Lett., 2009.
- 4) Tanida T., et al., J. Appl. Toxicol., 2014.
- 5) Warita K, et al., Life Sci., 2010.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 3 件, 全て査読有り)

1. **Tanida T.**, Tasaka K, Akahoshi E, Ishihara-Sugano M, Saito M, Kawata S, Danjo M, Tokumoto J, Mantani Y, Nagahara D, Tabuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Kawata M, Hoshi N. Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin transactivates aryl hydrocarbon receptor-responsive element III in the tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons of the mouse midbrain. **Journal of Applied Toxicology** (2014) 34: 117-126. doi: 10.1002/jat.2839.
2. Takanami K, Sakamoto H, Matsuda KI, Satoh K, **Tanida T.**, Yamada S, Inoue K, Oti T, Sakamoto T, Kawata M. Distribution of gastrin-releasing peptide in the rat trigeminal and spinal somatosensory systems. **Journal of Comparative Neurology** (2014) 522: 1858-1873. doi: 10.1002/cne.23506.
3. Takahara E, Mantani Y, Udayanga KG, Qi WM, **Tanida T.**, Takeuchi T, Yokoyama T, Hoshi N, Kitagawa H. Ultrastructural demonstration of the absorption and transportation of minute chylomicrons by subepithelial blood capillaries in rat jejunal villi. **Journal of Veterinary Medical Science** (2013) 75: 1563-1569. doi: 10.1292/jvms.13-0310

(学会発表)(計 12 件)

1. **谷田任司** 松田賢一, 山田俊児, 高浪景子, 河田光博. エストロゲン関連受容体 ERR β によるエストロゲン応答性調節機構. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会

- (抄録集 P173, 3P-098) 2014年3月27日~29日, 自治医科大学.
2. 高浪景子, 坂本浩隆, 松田賢一, 佐藤慧太, **谷田任司**, 山田俊児, 井上海平, 越智拓海, 坂本竜哉, 河田光博. ラット三叉神経節および脊髄後根神経節における gastrin-releasing peptide の発現と回路. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会 (抄録集 P97, 10m-E2-2) 2014年3月27日~29日, 自治医科大学.
 3. **谷田任司**, 松田賢一, 山田俊児, 高浪景子, 河田光博. エストロゲン関連受容体 ERR β はエストロゲン受容体 ER α の可動性を減ずることでその転写活性を抑制する. 第40回日本神経内分泌学会学術集会 (抄録集 P54, #37, 日本内分泌学会雑誌 89: 595) 2013年10月25日~26日, 宮崎市民プラザ.
 4. Keiko Takanami, Hirotaka Sakamoto, Ken-Ichi Matsuda, Keita Satoh, Kaihei Inoue, Shunji Yamada, **Takashi Tanida**, Takumi Oti, Tatsuya Sakamoto, Mitsuhiko Kawata. Histological analysis of gastrin-releasing peptide in the rat sensory system. 23rd International Symposium of Itch (プログラム集 P3,3-5) 2013年10月26日, 千里ライフサイエンスセンター [招待講演].
 5. **Takashi Tanida**, Ken Ichi Matsuda, Shunji Yamada, Keiko Takanami, Mitsuhiko Kawata. The co-localization of nuclear estrogen-related receptor (ERR) γ and estrogen receptor (ER) α in the rat brain. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (program p259, P2-1-151) June 20-23, 2013, Kyoto International Conference Center.
 6. Keiko Takanami, Hirotaka Sakamoto, Ken-Ichi Matsuda, Keita Satoh, Kaihei Inoue, Shunji Yamada, **Takashi Tanida**, Takumi Oti, Tatsuya Sakamoto, Mitsuhiko Kawata. Distribution of gastrin-releasing peptide in the trigeminal sensory system. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (program P291, P2-2-132) June 20-23, 2013, Kyoto International Conference Center.
 7. 高浪景子, 坂本浩隆, 松田賢一, 佐藤慧太, 井上海平, 山田俊児, **谷田任司**, 越智拓海, 坂本竜哉, 河田光博. かゆみの伝達に関わる一次感覚神経の組織学的解析. 日本行動神経内分泌研究会 第3回関西支部勉強会 (要旨集 p2, JSBN-K3-1) 2013年3月8日, 岡山大学理学部附属牛窓臨海実験所.
 8. **谷田任司**, 松田賢一, 山田俊児, 河田光博. エストロゲン関連受容体 ERR とエストロゲン受容体 ER α のライブセル・イメージング. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 (抄録集 p178, 3P-H114) 2013年3月28日~30日, サンポートホール高松・かがわ国際会議場.
 9. 段上めぐみ, 田阪 健, 須谷 真巳, 木下今日子, 徳本順子, 表原拓也, 小林泰文, 辰巳敬哉, **谷田任司**, 菅野美津子, 赤星英一, 横山俊史, 北川 浩, 星 信彦. The molecular basis of neurodevelopmental disability by the fetal and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) during the developmental period. 環境ホルモン学会第15回研究発表会 (要旨集 p59, 2-D-5) 2012年12月18日~19日, 東京大学.
 10. **谷田任司**, 松田賢一, 山田俊児, 河田光博. エストロゲン関連受容体 ERR の形態・分子イメージング. 第88回日本解剖学会近畿支部学術集会 (講演プログラム #16) 2012年12月1日, 神戸大学.
 11. 段上めぐみ, 田阪健, 木下今日子, 徳本順子, 表原拓也, 小林泰文, 辰巳敬哉, **谷田任司**, 横山俊史, 菅野美津子, 赤星英一, 北川浩, 星信彦. 生後発達期における TCDD による神経発達障害の分子基盤. 第88回日本解剖学会近畿支部学術集会 (講演プログラム #17) 2012年12月1日, 神戸大学.
 12. **Takashi Tanida**, Shunji Yamada, Ken Ichi Matsuda, Mitsuhiko Kawata. The distribution of nuclear estrogen-related receptor (ERR) γ in rat brain. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (program P269, P4-i08) September 18-21, 2012, Nagoya Congress Center.
- 〔その他〕
 京都府立医科大学 大学院医学研究科
 解剖学・生体構造科学 ホームページ:
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anat1/>
6. 研究組織
 研究代表者
 谷田 任司 (TANIDA, Takashi)
 京都府立医科大学 大学院医学研究科
 解剖学・生体構造科学 助教
 研究者番号: 30589453