

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510061

研究課題名（和文） 甲状腺ホルモン受容体とオーファン受容体相互作用への環境化学物質の影響

研究課題名（英文） The effect of environmental chemicals on the interaction of thyroid hormone receptor and retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR).

## 研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：(1) ROR による TR 作用活性化機構の解明：thyroid hormone receptor (TR) と retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) の相互作用を ROR 応答配列 (RORE) 及び甲状腺ホルモン応答配列 (TRE) を用いて解析した。

(2) 臭素化合物の TR-TRE 系への影響をレポーター遺伝子アッセイ, Liquid Chemiluminescent DNA pull down 法 (LCDPA), ラット Purkinje 初代培養細胞, ラット顆粒細胞系を用いて環境化学物質の TR への影響の解析を行った。

研究成果の概要（英文）：(1) We investigated the effect of interaction between thyroid hormone receptor (TR) and retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR).

(2) We investigated the effects of Brominated Organic Chemicals (BOCs) such as polybrominated diphenylethers (PBDEs) on TR-related signaling using newly developed primary culture-based assays.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：環境化学物質

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：小脳初代培養細胞, Purkinje 細胞, 顆粒細胞, 環境化学物質, 甲状腺ホルモン, 脳発達抑制, ROR

## 1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモン (TH) は中枢神経系の正常発達に重要であるが, TH は発達の限られた期間 (臨界期) にのみ作用することが知られるが, その形成機構は明らかとなっていない。一方, 環境化学物質のひとつである polychlorinated biphenyl (PCB) は地球上に普遍的に存在し, 環境中で安定で母体から胎

児に移行し脳に蓄積する傾向がある。このとき脳は甲状腺ホルモン感受性に対する臨界期にあり, TH による転写調節を受ける脳内因子は PCB により発現が阻害されることが予想された。そこで, 我々は, PCB の TH 受容体 (TR) を介する転写系に対する作用を解析し, 低濃度 ( $10^{-10}$  M) で T3 により活性化された転写を抑制することを明らかとし (BBRC, 2002), そ

の機序について報告した(JBC, 2003) (これらの成果は WHO の資料として使われた)。次いで、PCB よりはるかに毒性が強いとされるダイオキシンの TR に対する影響を解析したところ、ほとんど影響がないことが明らかとなり、それまで Toxic Equivalency Factor (TEF)により一元的に決められていた毒性に疑問を投げかけ、脳発達期の TR に対する抑制効果が新しい毒性の評価に用いることができることを報告した(ENDO2006)。一方、PCB には 209 種類に及ぶコンジェナーが存在するが、これらを効率的にスクリーニングするアッセイ系の開発が望まれていた。そこで、我々は PCB による転写抑制は、TR が制御遺伝子のプロモーター領域から部分的に解離することにより起こるという我々のデータを基に、発光物質で標識した DNA と人工的に作ったタンパクを用いた新たな検査法を開発した(Liquid chemiluminescent DNA pull down 法; LCDPA: 特許第 4631058 号, 特願 2006-064876, 特開 2007-236312.)。

## 2. 研究の目的

脳は脂肪組織を除いて全身で最も脂肪濃度の高い組織である。脂質代謝が正常に行なわれることが脳発達には不可欠である。コレステロールをリガンドとする retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)・は TR とともに脳に発現する。一方、環境化学物質は脂溶性で脂肪分画に多く存在する。ROR・は ROR-response element (RORE)を介して直接遺伝子発現を制御する。ROR はさらに甲状腺ホルモン受容体(TR)/thyroid hormone response element (TRE)を介する転写も活性化し、この二つの経路を介して脳発達に重要な機能を果たしている。TR と ROR は多くの神経細胞で共発現しており、脳における TR の正常機能には ROR が不可欠である。すなわち、TR の転写経路において ROR の存在を加味した系の方がより正常脳発達に対する影響を考える上で自然に近い状態と考えられる。そこで、我々は次の目的で環境化学物質の脳発達期への影響を解析する計画を立てた。

目的 1 : 脳細胞を用いて環境化学物質の TR/ROR/TRE, ROR/RORE 等に対する影響を解析する。

目的 2 : 正常脳発達に近い環境で環境化学物質の TR を介するシグナリングに対する影響を解析するため新たなアッセイ系を樹立し、解析を行う。

目的 3 : 胎児期に発現するコファクターの解析 : 以前同定した brain-derived repressive molecule (B-ReM) の機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) TR-ROR の相互作用 :

(i) レポーターアッセイを用いて環境化学物

質 TR 及び ROR を介する転写に対する影響を解析した。

(ii) TR と ROR の相互作用の機序を解明した。  
(iii) *in vivo* 結合実験を用いて TR-ROR の相互作用を解析した。

(iv) 我々の開発した LCDPA を用いて(iii)の検証を行った。

(v) リアルタイム PCR 法を用いて *in vivo* での RNA レベルの発現に対する環境化学物質の影響を解析した。また、ウエスタンブロット法や ELISA 法を用いて、タンパクレベルでの発現に対する環境化学物質の影響を解析した。

(2) (i) レポーター遺伝子アッセイを用いて環境化学物質特に臭素化合物の TR に対する影響を解析した。脳細胞を用いて PCB や臭素化芳香族化合物の TR/ROR/TRE, ROR/RORE に対する影響を解析した。

(ii) LCDPA, 核内ホルモン受容体とコファクターの相互作用に対する影響を解析した。

(iii) TR と glucocorticoid receptor (GR) から作成したキメラ蛋白を用いて環境化学物質の作用点を解明した。

(iv) ラット小脳 Purkinje 初代培養細胞を用いて PCB, 臭素化合物の影響を解析した。

(v) ラット小脳顆粒細胞系を用いて環境化学物質の神経突起の進展に対する影響について解析した。

(3) 抗 B-ReM ポリクローナル抗体を作成し免疫組織化学法を行った。

## 4. 研究成果

(1) コレステロールシグナリングに関連した核内ホルモン受容体 ROR のホルモン応答配列に対する影響及び、環境化学物質の影響を解析した。環境化学物質の脂質代謝や脂質シグナルへの影響を解析することで、環境化学物質の脳発達に対する影響が解明されることが期待される。この目的のために、多くの神経細胞で共発現している TR と ROR の相互作用を RORE 及び甲状腺ホルモン応答配列(TRE)を用いて解析した。レポーター遺伝子アッセイでは TR/TRE の系に対して ROR はコアクチベーター的に作用し、一般の核内ホルモン受容体に見られるドミナント・ネガティブ効果ではなかった。転写活性は full length TR (fTR) は fROR と相加的に活性化するが、RORsg (スタグラータイプの変異)では活性化を示さなかった。*In vitro* 結合アッセイでは、fTR は fROR とともに RORsg とともにリガンドに関係なく直接結合した。TR-ligand binding domain (LBD) は ROR と結合しなかった。また、ROR-LBD も TR とは結合しなかった。以上から TR と ROR は直接結合し、転写活性には LBD ではなく比較的長い領域が必要であることが示唆された。ROR のホルモン応答配列に対する影響及び、環境化学物質の影響を解析し、転写活性は野生型 TR は ROR と相加的に活性化されたが、RORsg (スタグラータイプの変

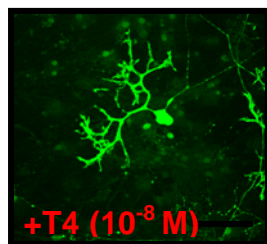
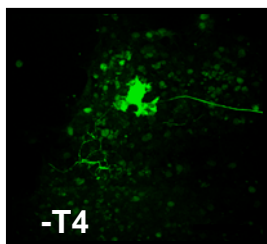
異)では活性化しなかった。ここに環境化学物質を添加すると TR 単独の時と同様の結果を得た。リアルタイム PCR 法で発現を解析し、in vivo でも相応する結果を得た。

(2) ①臭素化合物である、Polybrominated Diphenylethers (PBDEs), Hexa bromo-cyclododecane (HBCD), polybrominated biphenyl mixture (PBB)である BP-6 を添加すると一部のPBDEs及びHBCD, BP-6でTR-TRE転写が抑制された。一方多数の化合物の転写及び、TR-TRE 結合を解析したところ、転写を活性化する物質も存在した。

②この機序を解析するため、mammalian-two hybrid assay (MTH), LCDPAを行ったところ、TR-コファクターの結合に対する影響を解析する MTH では影響はなく、TR-TRE の結合に対する影響を解析する LCDPA では転写抑制の程度に応じて解離した。

③PBDE についてはさらに TR と GR のキメラ蛋白を作り作用の責任領域を解析した。GR-DNA 結合領域(DBD)を含む蛋白では抑制は起こらず、TR-DBD を含む蛋白では抑制が認められたことから TR-DBD が責任領域であることが分かった。

④TR-TRE 系の : 転写への影響の解析から、脳発達毒性の評価を行う新たなスクリーニング系として Purkinje 初代培養細胞を用いた系を樹立した。



#### Purkinje 初代培養細胞系

この系では生後 1 日目のラット小脳を取り出し、17 日間リガンドを加えて培養し、抗原抗体反応を行い蛍光物質の FITC 融合-抗体で Purkinje 細胞を標識しレーザー共焦点顕微鏡で観察する。

⑤PBDEs, HBCD, BP-6 を添加すると転写抑制によく一致した樹状突起の進展抑制反応が認められた。一方、TR を介する転写を活性化する化合物では T4 が低用量のとき進展促進反応を認めた。

⑥抑制作用は過剰量の T4 により完全には回復しなかったことから TR 系以外の機構が関与することが示唆された。

⑦そこで、小脳顆粒細胞における環境化学物質の影響を解析するため、新規アッセイ系を樹立した。



+T3 ( $10^{-8}$  M)

#### ラット小脳顆粒細胞初代培養系

この系では生後 7 日のラットから顆粒細胞のみをパーコール密度勾配法を用いて分離し培養するため、顆粒細胞への影響を評価することができる。

⑧TR を介した転写を抑制する物質では神経突起の進展が抑制された。この抑制は過剰量の T3 では回復しなかったが brain-derived neurotrophic factor (BDNF)により完全に回復した。

⑨また、T3 では神経突起の長さや太さを増進させたが、BDNF では網目状の進展を呈した。

(3) 胎児期に発現するコファクターの解析：胎児期に多く発現し、胎児期脳のライブラリーから同定した B-ReM に対する抗体を作成し正常脳発達における局在を免疫組織化学法で解析し、核に存在することが分かった。

#### 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 13 件)

- ① Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Kimura-Kuroda 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. 査読有, 119, 2011, 168-175. (申請者が corresponding author)
- ② Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N. 1, 2, 5, 6, 9, 10- $\alpha$  Hexabromo-cyclododecane (HBCD) Impairs Thyroid Hormone-Induced Dendrite Arborization of Purkinje Cells and Suppresses Thyroid Hormone Receptor-Mediated Transcription. Cerebellum. 査読有, 10, 2011, 22-31. (申請者が corresponding author)
- 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.* 査読有, 93(1-2), 2011, 1-7.
- ④ 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.* 査読有, 32, 2011, 400-409.
- ⑤ Amano I, Miyazaki W, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N. The effect of hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB) on thyroid hormone receptor (TR)-mediated transcription through native-thyroid hormone response element (TRE). *Ind Health.* 査読有, 48, 2010, 115-118. (申請者が corresponding author)
- ⑥ Londoño M, Shimokawa N, Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. Hydroxylated PCB induces  $Ca^{2+}$  oscillations and alterations of membrane potential in cultured cortical cells. *J Appl Toxicol.* 査読有, 30, 2010, 334-342.
- ⑦ 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) alpha in breast cancer cells: identification of a novel ROR response element. *J Biol Chem.* 査読有, 284, 2009, 17711-17719. (申請者が corresponding author)
- ⑧ Qiu CH, Miyazaki W, Iwasaki T, Londoño M, Ibhazehiebo K, Shimokawa N, Koibuchi N. Interaction of full length ROR $\alpha$  to augment TR-mediated transcription. *Thyroid.* 査読有, 19, 2009, 893-898. (申請者が corresponding author)
- ⑨ Rokutanda N, Iwasaki T, Odawara H, Nagaoka R, Miyazaki W, Takeshita A, Koibuchi Y, Horiguchi J, Shimokawa N, Iino Y, Morishita Y, Koibuchi N. Augmentation of estrogen receptor-mediated transcription by steroid and xenobiotic receptor. *Endocrine.* 査読有, 33, 2008, 305-316. (申請者が corresponding author)
- ⑩ Iwasaki T, Miyazaki W, Rokutanda N, Koibuchi N. Liquid chemiluminescent DNA pull-down assay to measure nuclear receptor-DNA binding in solution. *BioTechniques.* 査読有, 45, 2008, 445-448. (申請者が corresponding author)
- ⑪ Miyazaki W, Iwasaki T, Takeshita A, Tohyama C, Koibuchi N. Identification of the functional domain of thyroid hormone receptor responsible for polychlorinated biphenyl-mediated suppression of its action in vitro. *Environ Health Perspect.* 査読有, 116, 2008, 1231-1236. (申請者が corresponding author)
- ⑫ Koibuchi N, Qiu CH, Miyazaki W, Iwasaki T, Shimokawa N. The role of thyroid hormone in developing cerebellum. *Cerebellum.* 査読有, 7, 2008, 499-500.
- ⑬ 甲状腺ホルモンを介する PCB 類の作用機構. 鯉淵典之, 岩崎俊晴. *Biophilia.* 査読有, 4, 2008, 26-29.

[学会発表] (計 30 件)

- ① 岩崎俊晴, Yu Xiong, 原口瑞樹, 大澤 祥, Rony, Ming Xu, Kingsley Ibhazehiebo, 鯉淵典之. 4-Nonylphenol による甲状腺ホルモン受容体を介する転写の活性化と脳発達に対する影響. 第13回 環境ホルモン学会研究発表会 2010.12.17. 東京
- ② 招待講演: 岩崎俊晴. 臭化物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) EXTEND2010 公開セミナー、2010.12.15. 東京
- ③ 招待講演: 岩崎俊晴, 下川哲昭, 鯉淵典之. 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. 第23回環境ホルモン学会講演会, 2010.6.14. 東京
- ④ Iwasaki T, Osawa S, Yu X, Ibhazehiebo K, Koibuchi N. Augmentation of thyroid hormone receptor-mediated transcription by 4-nonyl phenol; its mechanism and physiological role. 第

- 87回日本生理学会大会 2010. 5. 20. 盛岡
- ⑤ 公募シンポジウム：岩崎俊晴. 甲状腺ホルモン受容体における環境化学物質の影響. 第82回 日本内分泌学会学術総会 2009. 4. 25. 前橋

他多数

〔図書〕(計4件)

著書

- ① 岩崎俊晴, 鯉淵典之. ヒトの最新医療. 生物の事典, 朝倉書店. 2010, pp. 346-357.
- ② 岩崎俊晴他(石川 統 他編集), 生物学辞典, 東京化学同人, 2010
- ③ 岩崎俊晴, 鯉淵典之(寺内康夫他編集), Principle and Practice, 内分泌・代謝, 文光堂, pp. 22-33.

他1件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (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