

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：22702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340036

研究課題名(和文) 脳発達における甲状腺ホルモンの部位別役割と環境化学物質に対する新規試験法の開発

研究課題名(英文) The role of thyroid hormone function in different brain regions during brain development and the development of novel methods to measure the effect of environmental chemicals.

研究代表者

岩崎 俊晴 (IWASAKI, Toshiharu)

神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：80375576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、脳発達における甲状腺ホルモン(TH)及びTH受容体(TR)の機能を解析し、近年疾患概念として注目されてきたdevelopmental origins of health and disease (DOHaD)を含めた予防及び、治療に利用するための基礎研究を行うことを目的とする。甲状腺機能低下モデル動物を用いたTH機能の解析及び、環境化学物質の感受性、及び性差に関わる解析を行った。環境化学物質のほか、大豆ポリフェノール及び造影剤のガドリニウムに関する研究を行い、それぞれ異なる機序でTHに関する生理現象に影響を与えることが分かった。

研究成果の概要(英文)：To study the effect of thyroid hormone (TH) and its receptor (TR) during brain development, we analyzed the hypo-thyroid model animals including transgenic mice expressing a mutant human TR specifically in cerebellar Purkinje cells. These mice showed abnormal cerebellar morphogenesis and motor coordination defect. We also investigated the effect of environmental chemicals during brain development including developmental origins of health and disease (DOHaD). We analyzed not only environmental chemicals but also soy bean polyphenols and gadolinium-based contrast agents. We found that each chemical showed different effects through different pathways to the brain function. We found that PFOS may disrupt dendrite arborization through a system other than genomic pathway.

研究分野： 複合新領域 内分泌生理学

キーワード： 甲状腺ホルモン 環境化学物質 脳発達

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモン(TH)は脳発達に必須でその不足はヒトではクレチン症を起こすことが知られ、新生児マスキングのひとつとなっている。THは脳発達において一定の時期に作用する(臨界期)が、この臨界期を形成する機序は明らかとなっていない。環境化学物質がこの臨界期に作用することにより、甲状腺系と密接に関連した脳発達に対する影響が危惧されてきた。そこで、この両者を相補的に解析することにより、両者に対する深い理解が得られることが期待される。我々は、この方針のもと、小脳に対する影響、黒質・線条体への影響として多動に対する影響を報告してきた。また、環境化学物質の脳発達に対する影響は種類により異なることが分かり、また、脳の領域によっても異なることが分かってきた。そこで、この環境化学物質の脳発達に対する影響の多様性に対応するため、効率の良いスクリーニング系の開発が必要となってきた。さらに、環境化学物質の影響としては形態学的変化や遺伝子発現に対する影響が起こることもあるが、発達期の微細な影響、環境因子が成長後の健康や種々の疾病発症リスクに影響を及ぼすという概念である Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)の影響も考慮に入れなければならない。DOHaDについては諸外国では様々なコホート研究あるいは動物実験が行われている。この概念には、甲状腺機能低下症のほか、糖尿病を含めた生活習慣病、アルツハイマー病、attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)を含めた一部の発達障害が含まれると推測されている。一方、環境化学物質の影響が個体により異なることは容易に想像でき、影響の雌雄差が存在することも認識されてきている。そこで、脳発達に対する影響が類似している、各種甲状腺機能低下モデル動物を用いることにより、環境化学物質の感受性の個体差や雌雄差についても解析を行うことにより、環境化学物質と脳発達の影響を総合的に解析することが期待できる。

2. 研究の目的

脳発達における甲状腺ホルモン(TH)及びTH受容体(TR)の機能を解析し、近年疾患概念として注目されてきた developmental origins of health and disease (DOHaD)を含めた予防及び、治療に利用するための基礎研究を行うことを目的とする。THは協調運動・多動・認知・記憶・学習といった脳機能と密接に関連した脳部位の発達に重要で、(1)甲状腺機能低下モデル動物を用いたTH機能の解析及び、環境化学物質の感受性、及び性差に関わる解析を行う。(2)環境化学物質及び、

大豆ポリフェノール、ガドリニウム含有造影剤の脳、及び脳発達期への影響を DOHaD 解析、及びスクリーニング系の構築を含めて解析する。(3)近年同定した新規 cofactors の解析を中心に臨界期形成機序の解析を行う。

3. 研究の方法

1: 既に構築されている、プルキンエ細胞特異的に変異 TRβ1 を発現する Mf-1 マウスを用いて、TH 及び、TRβの脳発達期への影響を解析する。

2-1: 環境化学物質 Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS)を胎生期に母親より投与し仔の脳機能発達を解析する。成獣になった後の行動解析を行い、因果関係を解明する。この他、4-Nonylphenol (4-NP)、大豆由来ポリフェノール、ガドリニウムを含む造影剤の影響を小脳初代培養系を中心に解析した。

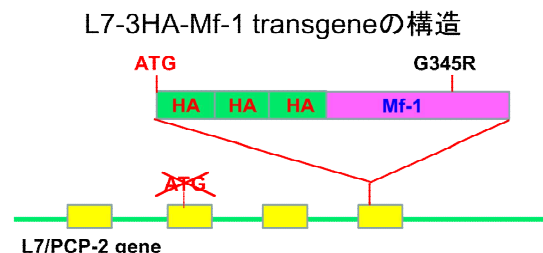
2-2: TH に対するかく乱機序を解析し、明らかとなった機序をもとにスクリーニング系の構築を行う。

2-3: 脳の領域別に行動解析を行い、影響を解析する。異常の認められた領域についてその機序を解析する。網羅的に初代培養系を構築する段階では、あらかじめ行動実験を行って変化の現れた化学物質を用いて初代培養系における影響を解析する。初代培養細胞系の樹立: まずは野生型の脳から線条体及び海馬における初代培養を行い、TR の関わるマーカーを選定する。初代培養系を用いて細胞免疫化学法を行い定量することを目標とする。

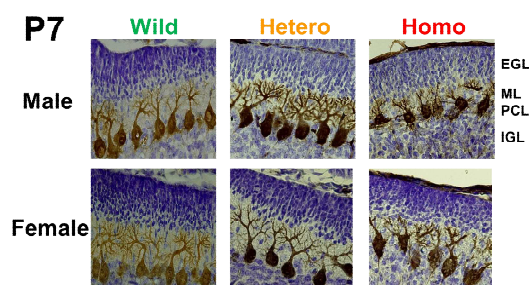
3. 近年同定した新規 cofactors (B-ReM, CoAA, CoAM)の in vivo 及び in vitro の解析を行う。発現解析及び、機能解析を行う。

4. 研究成果

1. 甲状腺ホルモン(TH)は組織の分化、発育に不可欠であり、発達期の TH 欠乏により様々な不可逆的な異常が起こることが知られる。TR の knock-in マウスを用いた研究では、TH 及び変異 TR の全身的影響を除外できない。そこで、我々はプルキンエ細胞特異的に変異 TRβ (G345R; Mf-1)を発現するトランスジェニック(Tg)マウスを樹立し、報告してきた。この Tg マウスの解析の結果、以下のことが分かった。



①野生型に比べ一般発育及び小脳重量に有意差はない、②小脳における免疫組織化学法から、顆粒細胞の外顆粒層から内顆粒層への移動の遅延が認められた、③小脳初代培養においてプルキンエ細胞の樹状突起の伸展不良、及び、④Rotarod 試験により、運動調整能の異常が存在した。この機序を解明するためリアルタイム RT-PCR 法により TH 標的遺伝子の mRNA 発現を解析したところ、主にプルキンエ細胞に発現する inositol trisphosphate 3 receptor type 1 と retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) α 、主にプルキンエ細胞及び顆粒細胞に発現する brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、及び主に顆粒細胞に発現する Neurotrophin (NT)-3 mRNA 発現が野生型に比べ有意に減少することが分かった。主に稀突起膠細胞に発現する myelin basic protein (MBP) mRNA 発現に有意差はなかった。



以上からプルキンエ細胞において TH が TR β 1 に結合し機能することが、プルキンエ細胞のみならず顆粒細胞他の部位を含む、小脳全体の発達に重要であることが分かった。

2. 環境化学物質他の脳発達への影響

2.1-3 (1). PFOS の影響 : Perfluorooctane sulfonate (PFOS)及び perfluorooctanoic acid (PFOA)はフッ素テロマーアルコールの分解により生成され、撥水・界面活性・防汚目的で衣類、食品容器、洗剤、家具などに使われてきた。近年、難分解性で、環境中への流出・残留が認められたこと、げっ歯類において脳発達のかく乱が疑われたことなどから環境化学物質として認識されるようになった。①ラット小脳初代培養細胞の Purkinje 細胞樹状突起の TH 依存性の伸展に対する影響を解析したところ、PFOA では明らかな影響は認められなかったが、PFOS で thyroxine (T4) による樹状突起の伸展の抑制が認められた。②周産期に PFOS を経口投与した母親から生まれた仔は、成獣期に Rotarod 試験により協調運動の抑制が認められ、周産期の影響が成獣期に残存することが分かった。③これらの機序を調べるため、レポータージーンアッセイを用いて腎線維芽細胞由来の CV-1 細胞における転写活性への影響を調べたところ、PFOS

により TR α 1 及び TR β 1 を介する転写に明らかな影響は認められず、転写による機序ではないことが示された。④小脳初代培養の iodothyronine deiodinase (D2)の mRNA 発現を見たところ PFOS により有意に抑制されていた。さらに、脳細胞由来の C6 細胞において D2 活性を解析したところ、PFOS により明らかに抑制されることが分かった。(結論)以上から、PFOS に小脳プルキンエ細胞樹状突起の伸展抑制作用があること、周産期における影響は成獣期になっても残存すること、PFOS はアストロサイトにおける D2 活性を抑制することにより TH シグナルをかく乱する可能性があることが分かった。

2.1-3 (2). 4-Nonylphenol (4-NP)の影響 : ①レポータージーンアッセイから 4-NP が TR を介する転写に対し 10^{-10} M から作用し、約 3 倍に活性化することをよって見出した。②この機序は 4-NP により T3 存在下における TR-steroid receptor coactivator (SRC) -1 の結合が増強されるためであることが mammalian two-hybrid assay から明らかとなった。③4-NP の細胞レベルへの影響を観察するため、小脳初代培養細胞を用いて 4-NP のプルキンエ細胞樹状突起の伸長及び分枝に対する影響を解析したところ、4-NP は濃度依存性に T4 による伸長作用をさらに増強した。④甲状腺機能低下ラットから生まれた仔に T4 及び、4-NP を 15 日間投与した後、小脳を抗カルビンジン抗体で免疫染色すると 4-NP 非投与ラットに比べて分子層が肥厚していることが分かった。(結論)本研究から、4-NP に TR を介する転写に対して活性化作用があること、また、甲状腺機能低下状態の生体に対して TH 系のかく乱作用がある可能性が示唆された。

2.1-3 (3). 大豆由来ポリフェノールの影響 : Genistein 及び Daidzein が用量依存性に TR α 1, β 1 及び SXR を介する転写を活性化することが分かった。この機序として steroid receptor coactivator (SRC)-1 が TR に誘導されることが分かった。

2.1-3 (4). ガドリニウムを含む造影剤の影響 : ガドリニウムを含む造影剤は核磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging, MRI) の造影剤に用いられている。投与後、ガドリニウムを含む造影剤は脳に蓄積することが知られている。線状のもの (Gd-diethylene triamine pentaacetic acid-bis methyl acid, Gd-DTPA-BMA)と大環状のもの (macrocylic, Gd-tetraazacyclododecane tetraacetic acid, Gd-DOTA) は細胞死を促進することなく蓄積した。一方、Gd chloride (GdCl₃) は高度に蓄積し、細胞数が著しく減少した。Gd-DTPA-BMA は低濃度 (10^{-8} to 10^{-6} M) で TR を介する転写を活性化したが、高濃度で

は抑制されたため、細胞毒性があると考えられた。Gd-DOTA or GdCl₃ではTRを介する転写は変わらなかったが、高濃度でβ-galactosidase活性が抑制された。小脳細胞におけるT4による樹状突起の伸展作用は低濃度のGd-DTPA-BMA (10⁻⁷ Mにより、促進されたが、高濃度で抑制された。このような作用は造影剤の種類により異なることが分かった。

2.2-3. 以前より小脳の初代培養は樹立していた。海馬における初代培養法を樹立した。

3. コファクターの脳発達への影響

近年同定した, brain-derived repressive molecule (B-ReM)及び, coactivator activator (CoAA)/coactivator modulator (CoAM)を用いた解析を行った。B-ReMは転写抑制因子として機能する。

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 4 件)

① Ariyani W, Iwasaki T, Miyazaki W, Khongorzul E, Nakajima T, Kameo S, Koyama H, Tsushima Y, Koibuchi N. Effects of Gadolinium-Based Contrast Agents on Thyroid Hormone Receptor Action and Thyroid Hormone-Induced Cerebellar Purkinje Cell Morphogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:115. DOI: 10.3389/fendo.2016.00115. 査読有

② Lesmana R, Iwasaki T, Iizuka Y, Amano I, Shimokawa N, Koibuchi N. The change in thyroid hormone signaling by altered training intensity in male rat skeletal muscle. *Endocrine Journal* Endocr J. 2016;63:727-738. DOI: 10.1507/endocrj.EJ16-0126. 査読有

③ Amano I, Takatsuru Y, Toya S, Haijima A, Iwasaki T, Grasberger H, Refetoff S, Koibuchi N. Aberrant Cerebellar Development in Mice Lacking Dual Oxidase Maturation Factors. *Thyroid* 2016;26:741-52. DOI: 10.1089/thy.2015.0034. Epub 2016 Mar 23. 査読有

④ Yu L, Iwasaki T, Xu M, Lesmana R, Xiong Y, Shimokawa N, Chin WW, Koibuchi N. Aberrant cerebellar development of transgenic mice expressing dominant-negative thyroid hormone receptor in cerebellar Purkinje cells. *Endocrinology*. 2015 156:1565-76. DOI: 10.1210/en.2014-1079. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

① Iwasaki T, Kuribara H, Haijima A, Miyasaka Y, Araki O, Lu Yu, Amano I, Takatsuru Y,

Shimokawa N, Murakami M, Koibuchi N. Early life exposure of perfluorooctane sulfonate causes cerebellar dysfunction possibly through suppression of iodothyronin deiodinase 2 activity.

第 94 回日本生理学会大会 (浜松, アクトシティ浜松) 2017.3.28-30

② 岩崎俊晴, 原口瑞樹, 大澤 祥, 宮坂祐平, 鯉淵典之「甲状腺ホルモン受容体機能を活性化する環境化学物質の解析」環境ホルモン学会第 19 回研究発表会 (つくば)

2016.12.8-9

③ Iwasaki T. Function of Thyroid Hormone Receptor in Cerebellar Development ~ Study of Transgenic Mice Expressing Mutant TR in Cerebellar Purkinje Cells. Bandung International Biomolecular Medicine Conference (BIBMC)

(Bandung, Indonesia) 2016.10.4-10.6

④ Iwasaki T, Kuribara H, Haijima A, Miyasaka Y, Araki O, Yu L, Amano I, Takatsuru Y, Shimokawa N, Murakami M, Koibuchi N. Early life exposure of perfluorooctane sulfonate causes cerebellar dysfunction possibly through suppression of iodothyronin deiodinase 2 activity. 第 93 回 日本生理学会大会 (札幌、札幌コンベンションセンター) 2016.3.22~24

⑤ Ariyani W, Iwasaki T, Lu Y, Amano I, Miyazaki W, Takatsuru Y, Koibuchi N. Augmentation of thyroid hormone receptor-mediated transcription and thyroid hormone-induced cerebellar morphogenesis. 第 93 回 日本生理学会大会 (札幌、札幌コンベンションセンター) 2016.3.22~24

⑥ Haijima A, Amano I, Takatsuru Y, Iwasaki T, Koibuchi N. Developmental neurotoxicity of perfluorooctanesulfonate exposure in different lactational periods in adult male mouse. 第 93 回 日本生理学会大会 (札幌、札幌コンベンションセンター) 2016.3.22~24

⑦ Sato T, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N. EID1 suppresses fat accumulation of adipocytes through expression of UCP-1. 第 93 回 日本生理学会大会 (札幌、札幌コンベンションセンター) 2016.3.22~24.

⑧ 岩崎俊晴, Winda Ariyani, 栗原光累, Lu Yu, 宮崎 航, 靛島 旭, 鯉淵典之「天然植物イソフラボンによる脳発達に対する影響」第 18 回 環境ホルモン学会 (下野, 自治医科大学地域医療情報研修センター) 2015.12.10~11

⑨ 栗原光累, 岩崎俊晴, 靛島 旭, 宮坂勇平, 荒木 修, Lu Yu, 高鶴裕介, 宮崎 航, 下川 哲昭, 村上正巳, 鯉淵典之「Perfluorooctane sulfonate (PFOS)による甲状腺ホルモン系に対する新たな機序による脳発達への影響」第 18 回 環境ホルモン学会(下野, 自治医科大学地域医療情報研修センタ

一) 2015.12.10~11

⑩ 齧島 旭, 天野出月, 高鶴裕介, 岩崎俊晴, 鯉淵典之 「授乳期の異なる時期のパーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) 曝露が成熟後仔マウスの協調運動機能および学習機能へ及ぼす影響の比較」第 18 回 環境ホルモン学会 (下野, 自治医科大学地域医療情報研修センター) 2015.12.10~11

⑪ 岩崎俊晴, 鯉淵典之 「脳発達期に発現するコファクターの解析」基礎甲状腺学セミナー, 第 58 回 日本甲状腺学会学術集会 (福島, 福島県文化センター), 2015.11.5~7

⑫ Amano I, Takatsuru Y, Toya S, Haijima A, Iwasaki T, Grasberger H, Refetoff S, Koibuchi N. Aberrant Cerebellar Development of Mice in Dual Oxidase Maturation Factors. 15 th Interanational Thyroid Congress. (招待講演) (Orland, FL, USA) 2015.10.18-23

⑬ 岩崎俊晴 「脳発達と核内ホルモン受容体研究」同窓会推薦講演, 第 62 回 北関東医学会総会 (招待講演) (前橋) 2015.10.1~2

⑭ Iwasaki T, Yu L, Shimokawa N, Koibuchi N. Effect of dominant negative thyroid hormone receptor in Purkinje cells on the cerebellar development. 第 92 回 日本生理学会大会 (神戸, 神戸国際会議場) 2015.3.21~23

⑮ Iizuka Y, Kuribara H, Iwasaki T, Lesmana R, Shimokawa N, Koibuchi N. The change in thyroid hormone signaling by altered training intensity in male rat skeletal muscle. 第 92 回 日本生理学会大会 (神戸, 神戸国際会議場) 2015.3.21~23

⑯ 岩崎俊晴, Ariyani W, 早坂香保里, 栗原光累, 飯塚祐基, Lesmana R, 下川哲昭, 鯉淵典之 「天然植物イソフラボンのステロイド生体異物受容体 (SXR) とシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (CYP3A4) を介する薬物代謝機構. 環境ホルモン学会第 17 回研究発表会 (東京) 2014.12.9-10

⑰ 岩崎俊晴, Ibhazehiebo K, 鯉淵典之 「Polybrominated biphenyl mixture, BP-6 による甲状腺ホルモンを介する脳発達の抑制」第 57 回 日本甲状腺学会学術集会 (大阪) 2014.11.13-15

⑱ 鯉淵典之, Lesmana R, 岩崎俊晴 「有酸素運動によるラット骨格筋における甲状腺ホルモン感受性の変化」第 57 回 日本糖尿病学会年次学術集会 (大阪) 2014.5.22-24

⑲ 岩崎俊晴, 齧島 旭, 宮坂勇平, Lu Y, 原口瑞樹, 高鶴裕介, 下川哲昭, 鯉淵典之 「脳発達における Perfluooctane sulfonate (PFOS) と Perfluorooctanoic acid (PFOA) の影響」第 87 回 日本内分泌学会学術 (福岡) 2014.4.24- 26

[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

岩崎 俊晴 (IWASAKI, Toshiharu)
神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・教授
研究者番号: 80375575

(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

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()

[図書] (計 0 件)