

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17390060

研究課題名（和文）脳発達における甲状腺ホルモン作用の臨界期形成機構と環境化学物質によるかく乱作用

研究課題名（英文）Molecular mechanisms generating a critical period of thyroid hormone action on brain development and its modulation by environmental chemicals

研究代表者

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

研究成果の概要：

本研究は甲状腺ホルモン（TH）による脳発達の調節機構と PCB などの環境化学物質の TH 系への作用解析を目的とした。そして動物実験と生化学的実験により、分子から個体レベルまでの解析を目指した。動物実験では、TH 作用には ROR などの他の核内受容体や転写共役因子の発現が必要である事、生化学的な実験で細胞内で TH 受容体（TR）とそれらの物質が複合体を作っている事を明らかにした。また、PCB が TR に対し、“疑似ホルモン”ではなく、従来とは全く異なった機構で作用している事を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	8,100,000	0	8,100,000
2006年度	2,800,000	0	2,800,000
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	14,400,000	1,050,000	15,450,000

研究分野：環境生理学

科研費の分科・細目：基礎医学、環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：甲状腺ホルモン、甲状腺ホルモン受容体、環境化学物質、転写共役因子

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモン（TH）は脳の発達に不可欠で、周産期の特定の臨界期に強く作用するが、臨界期形成機構は不明である。TH は核受容体（TR）と結合する。TR はさらに TH 依存性にさまざまな転写共役因子と結合し、標的遺伝子転写を調節する。脳の TH 感受性遺伝子の大部分は臨界期のみで TH で発現が調節される。感受性亢進の際、TH 分泌、TR や既知 TR 転写共役因子発現は増加しない。従って、未知の促進型 TR 転写共役因子の臨界期特異的な発

現や、抑制型因子の臨界期以前・以降の発現の可能性もある。また、TR は全身に分布しているため、脳への直接的 TH 作用解析には末梢の TH 低下の影響を排除し、脳特異的に TH 作用を阻害する必要がある。その際、遺伝子改変動物の作製は不可欠である。

一方、ポリ塩化ビフェニル（PCB）は、低濃度暴露でも脳発達に影響する。PCB 作用は TH 系のかく乱であるとされ、TH 分泌低下や血中 TH 結合タンパクと TH の結合阻害等を介し、脳発達を阻害すると考えられてきた。しかし、

我々は PCB の作用はむしろ TR 機能を修飾した結果であることを報告した。また、PCB には膜レベルでの作用もあることも報告した。しかし詳細な作用機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、甲状腺ホルモン (TH) の中枢神経系における作用の解明、特に TH 作用の臨界期形成機構を解明し、さらには中枢神経系における環境化学物質の TH 系に及ぼす作用メカニズムの解析を実施することである。解析のため、以下の4つの具体的目標を設定した。

- (1) 新規 TR 結合蛋白の同定と解析。
- (2) トランスジェニックマウスやミュータントマウス・ラットを用いた TH 作用の解析。
- (3) 培養細胞を用いた TH による転写レベルおよび膜レベルでの作用機構の解析。
- (4) PCB による TR の核内受容体の転写制御、および神経細胞膜への作用機構の解析

3. 研究の方法

(1) 新規TR結合蛋白の同定と解析

現在まで、SYT や OVC0V1 という有力な TR 結合タンパクをクローニングした。これらの物質の機能解析のため、*in vivo* 実験ではラットやマウスの小脳を用い、*in situ* hybridization や免疫組織学的に局在を同定する。また、*in vitro* 実験では転写アッセイや pull down 法を用いて TR やこれらの転写因子とのタンパク結合を調べ、クロマチンの修飾や RNA ポリメラーゼの誘導など、転写プロセスのどの機能と関連しているのか解析する。

(2) トランスジェニックマウスやミュータントマウス・ラットを用いたTH作用の解析

自然発症小脳失調ミュータントマウス (staggerer), 自然発症甲状腺機能低下 (rdw) ラット, トランスジェニックマウス, を用い、遺伝子発現、細胞形態、膜レベルでの変化、行動学的解析等統合的な解析により発達期の TH 作用機構を調べる。具体的には
① 小脳シナプス形成の変化を形態的に調べる。また、TH 感受性遺伝子 (神経栄養因子群等) 発現も RT-PCR 法を用いて調べる。
② 発達期 TH 欠乏の影響を、行動量、情動、運動機能への影響を open field や Rota-rod により行動学的に解析する。

(3) 培養細胞を用いたTHによる転写レベルおよび膜レベルでの作用機構の解析。

レポーター転写アッセイを用いて TR を介する転写に及ぼす脳内の転写共役因子の作用を解析する。さらに TR や転写共役因子と GFP (green fluorescent protein) キメラタンパクを作成し TH に依存した転写因子や共役因子の細胞内局在変化を調べる。

(4) PCBによるTRの核内受容体の転写制御、および神経細胞膜への作用機構の解析

① TR を介した PCB の作用メカニズムを解析するため、TR タンパクの各機能ドメインに変異を加えたタンパクを作製し、PCB との結合を解析すると共に、TR の変異がどのように PCB による転写修飾に影響するのか、さらには PCB 作用の神経細胞選択性に影響するのかを解析する。

② すでに PCB や水酸化 PCB が細胞膜を脱分極させ、L 型カルシウムチャンネルを介して細胞内カルシウムを増加させることを確認したが、実際の細胞膜のどこに結合するのか、脱分極を生ずるメカニズムは何か、更にはどのようなシグナル伝達系を動かしているのか JNK のリン酸化、MAP kinase 系の活性化など、遺伝子発現に至るまでのシグナル伝達系の活性化機構を解析する

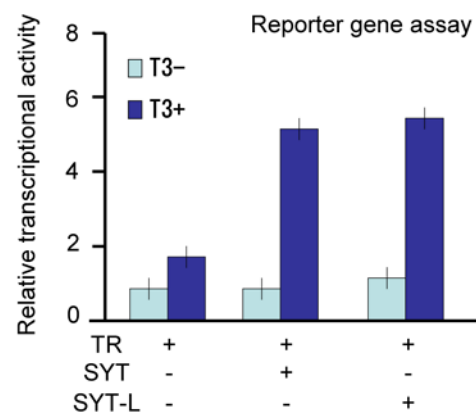
4. 研究成果

(1) 新規甲状腺ホルモン受容体結合蛋白の同定と解析

最も甲状腺ホルモン臨界期形成に関係している可能性の高い SYT について紹介する。

SYT は synovial sarcoma に発現するタンパクとして同定されたが、我々の研究により転写因子である事が明らかになった。

SYT の構造



SYT による TR 作用の増強

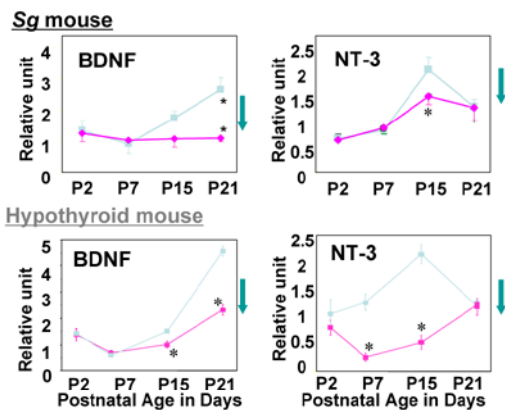
SYT は発達期の脳だけに発現しており、SYT によりこの時期の甲状腺ホルモン感受性が調節されている可能性が明らかになった。

これ以外の新規転写共役因子についても、

OVCOV1 は小脳プルキンエ細胞に発現し、TR を介する転写を抑制する事、また CoAA は広く中枢神経系に発現し、TR を介する転写を促進する事を明らかにした (投稿準備中)。

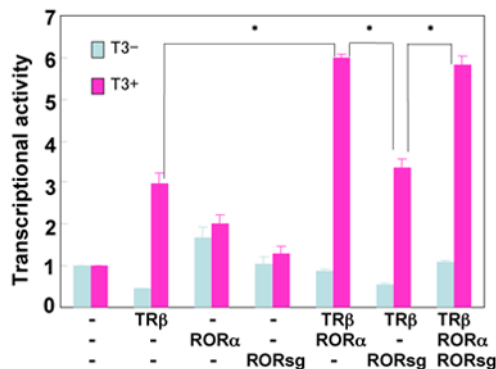
(2) トランスジェニックマウスやミュタントマウス・ラットを用いたTH作用の解析
最も解析の進んだ staggerer (sg) マウスのデータを紹介する。

Sg は核内受容体 ROR \cdot に変異のあるミュタントマウスで、甲状腺機能は正常であるがプルキンエ細胞発達異常など甲状腺機能低下動物に類似した表現型を示す。この原因を解析するため、BDNF や NT3 などの甲状腺ホルモン標的遺伝子の発現パターンを甲状腺機能低下マウスと比較した。



上の図で示したように sg マウスは甲状腺機能が正常であるにも関わらず、甲状腺機能低下ラットと類似の遺伝子発現パターンを示した。

なぜこのような類似性を示したのかさらに解析するため、レポーターアッセイにより TR と ROR の相互作用を解析した。



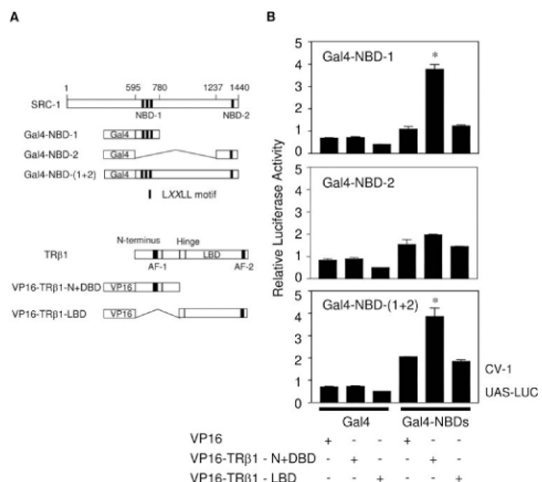
図に示したように、ROR は TR を介する転写を優位に増強した。ROR は多くの神経細胞で TR と共発現しており、ROR が発現していることが TR の脳における作用に関して重要である事が明らかになった。

これ以外の遺伝子改変動物では、サイログロブリン遺伝子に点突然変異のある rdw ラッ

トについて解析を行った。現在まだ解析中であるが、新奇環境下で行動に変化がある事、また、脳内カテコラミン含有量に変化がある事が明らかになりつつある。

(3) 培養細胞を用いたTHによる転写レベルおよび膜レベルでの作用機構の解析

TR と転写共役因子 SRC-1 との新たな結合部位の同定について紹介する。TR と SRC-1 はリガンド依存性に TR の C-末端の AF-2 領域に結合すると考えられてきた。しかし我々の研究によりリガンド非存在下でも TR の N 末端に結合しており、リガンドと結合した際速やかに C 末端に結合できるような準備状態にある事がわかった。Mammalian two hybrid アッセイにより解析した結果を下に示す。



A には用いた SRC-1 及び TR 断片を示した。SRC-1 において核内結合領域を NBD で示している。図 B で示したように甲状腺ホルモン非存在下で SRC-1 の NBD-1 と TR の N 末端が結合している事が明らかになった。

これ以外にも TR や関連する核内受容体の SXR および ROR について他の核内受容体や転写共役因子との相互作用をインビトロ系で解析した。これらの結果から、脳内には核内受容体や転写因子の間のネットワークが存在し、それぞれの受容体の機能を相互に調節している事が明らかになった。

(4) PCBによるTRの核内受容体の転写制御、および神経細胞膜への作用機構の解析

PCB には核内受容体に対する作用と神経細胞膜に対する作用がある。本研究ではこれらをここに解析した。すでに我々は TR の作用が PCB により抑制される事を報告しており、今回はこの抑制のメカニズムを解析した。

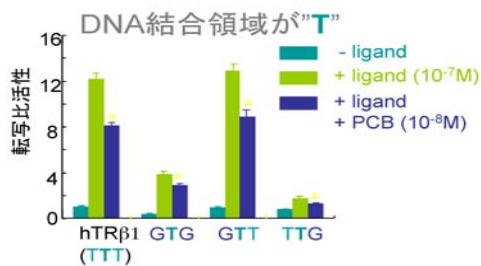
① PCB の TR への作用部位の同定

上記目的のため、PCB により転写が抑制される TR と抑制されないグルココルチコイド受容体を用いてキメラ受容体を作成した。構造を下に示す。

キメラタンパクの構造		リガンド	DNA 応答領域
甲状腺ホルモン受容体 (TR)		OH-PCBIに反応	TRE
DNA	Ligand	T3	TRE
グルココルチコイド受容体 (GR)		OH-PCBIに反応しない	GRE
DNA	Ligand	dex	GRE
DNA	Ligand	TGT	T3
DNA	Ligand	GGT	T3
DNA	Ligand	TGG	dex
DNA	Ligand	TTG	dex
DNA	Ligand	GTG	dex
DNA	Ligand	GTT	T3

dex: dexamethazone, TRE:甲状腺ホルモン応答配列, GRE: グルココルチコイド応答配列

これらを用いてレポーターアッセイを行ったところ、DNA結合領域がTR由来の受容体のみに転写抑制がみられた。結果を下に示す。



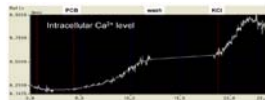
この結果から PCB は従来考えていたような疑似ホルモンではなく、全く異なった機序で TR に作用する事が明らかになった。

この研究に関連し、タンパク-DNA 結合を迅速に測定するためのシステム (Liquid Chemiluminescent DNA Pull Down Assay) を開発し、特許を出願した。現在商品化に向け、関連企業と協議を重ねている。

② 細胞膜における PCB の作用

PCB は神経細胞膜にも作用し、膜の興奮性を変化させる事が先行研究で報告されている。そこで、我々は顕微測光装置を用いて PC12 細胞における PCB による細胞内カルシウム変動を解析した。

カルシウム変動解析はカルシウム感受性色素 Fra2 を使い、浜松ホトニクス社の Aquacosmos を用いて顕微測光を行った。結果を下に示す。



PCB により細胞内カルシウムが増加する事が明らかとなった。さらに、この際カルシウム感受性遺伝子である c-JUN タンパクの発現が像介している事も明らかとなった。現在、どのようなカルシウムチャンネルがこのカルシウム変動に関与しているのか、解析中である。

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 25 件)

主なもののみ記載

- 1) 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 116: 1231-1236, 2008. 査読有
- 2) Iwasaki T, Miyazaki W, Rokutanda N, Koibuchi N. Liquid chemiluminescent DNA pull-down assay to measure nuclear receptor-DNA binding in solution. Bio-Techniques 45: 445-448, 2008. 査読有
- 3) Koibuchi N. The role of thyroid hormone on cerebellar development. Cerebellum 7: 530-533, 2008. 査読有
- 4) Qiu C-H, Shimokawa N, Iwasaki T, Parhar IS, Koibuchi N. Alteration of cerebellar neurotrophin messenger ribonucleic acids and the lack of thyroid hormone receptor augmentation by staggerer-type retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha mutation. Endocrinology 148: 1745-1753, 2007. 査読有
- 5) Koibuchi N, Iwasaki T. Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals. Endocrine J. 53: 295-303, 2006. 査読有
- 6) Iwasaki T, Takeshita A, Miyazaki W, Chin WW, Koibuchi N. The interaction of TR·1-N-terminus with SRC-1 serves a full transcriptional activation function of SRC-1. Endocrinology 147: 1452-1457, 2006. 査読有
- 7) Shimokawa N, Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. Low dose hydroxylated PCB induces c-Jun expression in PC12 cells. Neurotoxicology 27: 176-183, 2006. 査読有
- 8) Takeshita A, Inagaki K, Igarashi-Migitaka J, Ozawa Y, Koibuchi N. The endocrine disrupting chemical, diethylhexyl phthalate, activates MDR1 gene expression in human colon cancer LS174T cells. J Endocrinol 190: 897-902, 2006. 査読有
- 9) Yousefi B, Jingu H, Ohta M, Umezumi M, Koibuchi N. Postnatal changes of steroid receptor coactivator-1 immunoreactivity in rat cerebellar cortex. Thyroid 15: 314-319, 2005. 査読有
- 10) Okada J, Shimokawa N, Koibuchi N. Polychlorinated biphenyl (PCB) alters acid-sensitivity of cultured neurons

derived from the medulla oblongata. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1368-1374, 2005. 査読有

11) Shimokawa N, Kumaki I, Qiu C-H, Ohmiya Y, Takayama K, Koibuchi N. Extracellular acidification enhances DNA binding activity of MafG-FosB heterodimer. *J Cell Physiol* 205: 77-85, 2005. 査読有

12) Iwasaki T, Koibuchi N, Chin WW. Synovial sarcoma translocation (SYT) encodes a nuclear receptor coactivator. *Endocrinology* 146: 3892-3899, 2005. 査読有

[学会発表] (計 98 件)

1) Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Londono MB, Hirooka K, Shimokawa N, Koibuchi N. Mechanism of suppression of thyroid hormone receptor-mediated transcription by low dose brominated compounds. 第 11 回環境ホルモン学会研究発表会 2008 年 12 月 13-14 日 東京

2) Shimokawa N, Londono M, Miyazaki W, Iwasaki T, Koibuchi N. Effect of hydroxylated PCB on Ca^{2+} oscillations and membrane potential in cultured neurons. 第 11 回環境ホルモン学会研究発表会 2008 年 12 月 13-14 日 東京

3) 鯉淵典之 神経細胞発達に及ぼす甲状腺ホルモンの作用と環境化学物質による修飾 第 51 回日本甲状腺学会 2008 年 11 月 21-23 日 宇都宮 (鎮目レクチャー)

4) Koibuchi N The effect of thyroid hormone on brain development and its disruption by environmental factors. XVII Seminar National Ikatan Ahli Ilmu Faal Indonesia Aug. 6-8, 2008, Medan, Indonesia (Plenary Lecture)

5) Koibuchi N, Ibhazehiebo K, Miyazaki W, Iwasaki T. Effects of brominated compound on thyroid hormone receptor-mediated transcription. 6th Forum of European Neuroscience July 12-16, 2008. Geneva, Switzerland

6) Koibuchi N. The role of thyroid hormone on cerebellar development. Inaugural Cerebellar Symposium. July 11, 2008. Geneva, Switzerland

7) Ibhazehiebo Kingsley, 岩崎俊晴, 宮崎航, 鯉淵典之 Differential effects of brominated compound retardant on TR-mediated transcription. 第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008 年 5 月 16-18 日 青森

8) 岩崎俊晴, ロンドーニョマリーナ, 宮崎航, 下川哲昭, 鯉淵典之 TRBP-CoAA/CoAM-SRAによる新たな核内ホルモン受容体転写制御機構 第 85 回日本生理学会大会 2008 年

3 月 25-27 日 東京

9) Kingsley Ibhazehiebo, 岩崎俊晴, 宮崎航, 鯉淵典之 臭素化芳香族化合物による甲状腺ホルモン受容体による転写への影響 環境ホルモン学会第 10 回研究発表会 2007 年 12 月 10-11 日 大宮

10) Koibuchi N. Current trends and perspectives for in vivo/in vitro researches of environmental chemicals. International symposium on the environmental risks of chemicals. Dec 9-10, 2007, Ohmiya, Japan (Invited Speaker).

11) Koibuchi N PCB and thyroid hormone action. 8th International Workshop on Resistance to Thyroid Hormone and Action. Oct 9-11, 2007, Ponta Delgada, S. Miguel, Azores, Portugal

12) 鯉淵典之, 邱春紅, 下川哲昭, 岩崎俊晴 げっ歯類小脳における周産期甲状腺機能低下症による発達異常とその分子機構 第 80 回日本内分泌学会学術総会シンポジウム「甲状腺ホルモンと脳の発達機構」2007 年 6 月 14-16 日 東京

13) 鯉淵典之, 邱春紅, 宮崎航, 岩崎俊晴, 下川哲昭 発達期小脳における甲状腺ホルモンの作用 第 84 回日本生理学会大会シンポジウム「ホルモン標的器官としての小脳」2007 年 3 月 20-22 日 大阪 (シンポジウムオーガナイザー)

14) 宮崎航, 岩崎俊晴, 鯉淵典之 環境化学物質は甲状腺ホルモン受容体の DNA 結合ドメインに影響を及ぼす 第 84 回日本生理学会大会 2007 年 3 月 20-22 日 大阪

15) Koibuchi N Thyroid hormone action in the developing brain and its modulation by environmental chemicals. 8th Congress of Asia and Oceania Thyroid Association. Feb. 4-6, 2007, Manila, Philippine (Symposist)

16) ロンドーニョマリーナ, 下川哲昭, 鯉淵典之 低用量水酸化PCBはPC12細胞において膜電位とCa²⁺動態を変化させる 第 9 回環境ホルモン学会研究発表会 2006 年 11 月 11-12 日 東京

17) 岩崎俊晴, 宮崎航, 鯉淵典之 「タンパク-核酸」結合解析のための新規アッセイ法の樹立 第 9 回環境ホルモン学会研究発表会 2006 年 11 月 11-12 日 東京

18) Koibuchi N, Qiu C-H, Miyazaki W, Shimokawa N, Iwasaki T. Crosstalk between thyroid hormone receptor and retinoid receptor-related orphan receptor (ROR) γ , and its modulation by polychlorinated biphenyl. 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Oct 14-18, 2006, Atlanta, GA

19) 岩崎俊晴, 鯉淵典之 発達期中枢神経系における甲状腺ホルモン作用の分子基盤 第 29 回日本神経科学大会シンポジウム「甲状腺ホルモン系と脳発達-環境影響から気分障害まで」 2006 年 7 月 19-21 日京都

20) Iwasaki T, Takeshita A, Miyazaki W, Koibuchi N. The interaction between TR·1-N-terminus and SRC-1 serves a full transcriptional activation function of SRC-1. 88th Annual Meeting of the Endocrine Society, June 24-27, 2006. Boston.

21) 岩崎俊晴, 竹下彰, 宮崎航, 六反田奈和, 長岡りん, 鯉淵典之 TRβ1N末端とSRC-1 相互作用 第 79 回日本内分泌学会学術総会 2006 年 5 月 19-21 日 神戸

22) 鯉淵典之 PCBによる脳機能発達の修飾作用 第 83 回日本生理学会大会シンポジウム「環境問題における生理学研究 : 外来性化学物質に対する生体機能の脆弱性」 2006 年 3 月 28-30 日 前橋 (シンポジスト)

23) 鯉淵典之 甲状腺ホルモンによる能発達の調節機構と環境化学物質による修飾 第 41 回脳のシンポジウム 2006 年 2 月 18-19 日 (シンポジスト・座長) 前橋

24) Qiu C, Shimokawa N, Koibuchi N. Alteration of mRNA levels of neurotrophins and their receptors in developing cerebellum of Staggerer, an ROR· mutant mouse. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Nov 12-16, 2005, Washington D. C.

25) Iwasaki T, Miyazaki W, Amani I, Rokutanda N, Nagaorka R, Takeshita A, Aoki Y, Tohyama C, Kuroda Y, Koibuchi N. Differential action of PCB and dioxins on TR-mediated transcription: is dioxin more toxic than PCB? 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Nov 12-16, 2005, Washington D. C.

26) Yousefi B, Umezumi M, Jingu H, Koibuchi N. Decrease in circadian locomotor activity in congenital hypothyroid rdw rats. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Nov 12-16, 2005, Washington D. C.

27) Koibuchi N. Endocrine disrupters and thyroid hormone interaction. The 13th International Thyroid Congress. October 30-November 4, 2005. Buenos Aires, Argentina. (Symposist)

28) 鯉淵典之 甲状腺ホルモンによる脳発達の調節機構と環境化学物質による修飾機構 第 78 回日本内分泌学会学術総会 2005 年 7 月 1-3 日 東京 (研究奨励賞受賞講演)

29) 鯉淵典之 環境化学物質の多様性-神経細胞膜への作用と転写の修飾機構 シンポ

ジウム「内分泌攪乱物質脳機能-新たな標的としての可能性」 第 82 回日本生理学会大会 2005 年 5 月 18-20 日 仙台 (オーガナイザー, シンポジスト)

30) 岩崎俊晴, 宮崎航, Chin Willam W., 鯉淵典之 ゼネラルリプレッサー-coactivator modulator (CoAM) による転写抑制機構 第 82 回日本生理学会大会 2005 年 5 月 18-20 日 仙台

[図書] (計 6 件)

1. 鯉淵典之 胎児と新生児の生理学 (訳) In: オックスフォード生理学 (植村慶一 ed.) 丸善 pp493-508, 2005.

2. 鯉淵典之 甲状腺の発達と脳機能-内分泌攪乱の蓋然性- In: 生体統御システムと内分泌攪乱 (井口, 井上編) シュプリンガー・フェアラーク東京 pp105-115, 2005

3. 鯉淵典之 体の内部環境を一定に保つしくみ In: 医学を学ぶ (後藤文雄編) 南江堂 pp13-25, 2006.

4. Koibuchi N Thyroid hormone action in developing brain and its modulation by polyhalogenated aromatic hydrocarbons. In: C. Kubo, T. Kuboki (eds). Psychosomatic Medicine, International Congress Series Vol. 1287, Elsevier, Amsterdam pp 190-194, 2006.

5. 鯉淵典之 内分泌・栄養・代謝系 In: (岡田隆夫編) カラーイラストで学ぶ集中講義生理学 メジカルビュー pp.292-319, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: タンパク質-標的物質の結合検出方法

発明者: 岩崎俊晴, 鯉淵典之

権利者: 岩崎俊晴, 鯉淵典之

種類: 特願

番号: 2006-064876

出願年月日: 2006 年 3 月 9 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

下川 哲昭 (SHIMOKAWA NORIAKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90235680

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

竹下 章 (TAKESHITA AKIRA)

冲中記念成人病研究所・研究員

研究者番号: 20322646