

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09872

研究課題名(和文) エネルギー代謝調節に関わる視床下部-下垂体-甲状腺系の中枢制御機構の解明

研究課題名(英文) Importance of Thyrotropin-releasing hormone of hypothalamic paraventricular nucleus for the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and the leptin-induced thyroid hormone regulation in mice

研究代表者

渋沢 信行 (SHIBUSAWA, NOBUYUKI)

群馬大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：90396622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部-下垂体-甲状腺系H-P-T axisによる甲状腺ホルモン調節は絶食や環境変化に対してエネルギー消費を調節する代謝の恒常性に重要であり、特に視床下部室傍核のTRHがその中心とされる。しかしTRHは中枢神経系に広く存在し直接的な証明がなされていない。視床下部特異的TRHノックアウトマウスSim1-Cre;TRHflox/floxを作製した。このモデルでは免疫組織で室傍核のTRHが検出されず、室傍核preproTRH mRNA発現は低下した。下垂体TSH mRNA発現低下を伴う中枢性甲状腺機能低下症を呈した。生体において視床下部室傍核のTRHがH-P-T axisの中枢であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TRHは視床下部ホルモンとして主にH-P-T axisのフィードバック機構と、さらにいくつかの神経ネットワークによって分泌調整され、甲状腺ホルモン分泌を介して絶食や環境変化に対するエネルギー消費を調節し代謝のホメオスタシスに重要な役割を持つと考えられる。生体内に広く存在するTRHの機能や役割はまだ全ては解明されていない。今回のモデルマウス解析によりこれまで言及されてきた作用を検証できると考える。さらに肥満、糖尿病、摂食障害などの疾患の克服は現代社会において重要な課題の一つといえる。本研究により得られるTRH作用の証明は、これら疾患の発症病理の解明や治療のヒントを得ることに繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the hypothalamic paraventricular nucleus has been reported to be crucial for the hypothalamic (TRH)-pituitary (TSH)-thyroid axis and the leptin-induced stimulation of blood thyroid hormone in mice. However, TRH is known to be distributed not only hypothalamic paraventricular nucleus but also whole hypothalamus as well as whole brain and body. To gain further insight into significance of paraventricular nucleus (PVN) we established paraventricular specific TRH knock out mice by mating floxed TRH gene mice and Sim1-Cre mice showing deletion of preproTRH gene in paraventricular region. These Sim1-Cre;TRHflox/flox mice showed tertiary hypothyroidism just like null TRH deficient mice, showing mild hypothyroidism with slightly elevated serum TSH levels. These findings further support evidence of TRH in PVN was crucial for H-P-T axis.

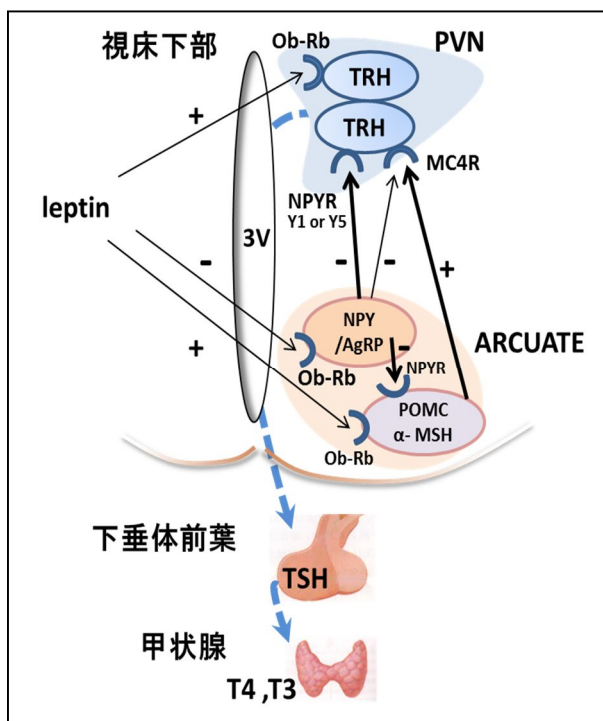
研究分野：内分泌学

キーワード：内分泌代謝 視床下部 甲状腺

1. 研究開始当初の背景

甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (Thyrotropin-releasing hormone : TRH) は、1969年に単離、構造決定された最初の視床下部ホルモンである。TRHは主に下垂体門脈系を介して下垂体前葉の甲状腺刺激ホルモン(TSH)産生細胞を刺激しTSHの合成放出を促進し、またプロラクチンの合成放出も促進している。血中甲状腺ホルモンレベルは、主に視床下部-下垂体-甲状腺系 (Hypothalamic-Pituitary-Thyroid axis) におけるフィードバック機構により巧妙に制御されている。H-P-T axisは絶食や環境変化に対してエネルギー消費を調節する代謝のホメオスタシスに非常に重要であり、特に視床下部TRHがその中心的な役割を果たしている。

これまでH-P-T axisに関わるのは視床下部の中でも室傍核のTRHニューロンと考えられ、この室傍核TRHは主に3つの神経系からの入力制御を受けてとされている。(Nilini EA, *Frontiers in Neuroendocrinology* 31: 2010) 視床下部におけるTRH合成分泌調節には甲状腺ホルモンに加えて、ストレスや寒冷刺激、摂食、栄養状態などが



影響している。ところがTRHは視床下部室傍核だけでなく視床下部内の視交叉上核や背内側核などにも存在し、さらに大脳～脊髄を含む中枢神経系に広く存在することが知られ神経伝達物質として作用すると考えられている。以前からの報告にある室傍核TRHだけで全ての作用を説明できるのか？この神経ネットワークの詳細については直接的な証明がなされていない。

これまでに我々のグループではTRHノックアウトマウス(TRHKO)を樹立しその研究によりTRHKOは中枢性甲状腺機能低下症の病態を示すこと、TRHは生後のTSH産生細胞の維持に必須であること、下垂体TSH遺伝子発現を転写レベルで

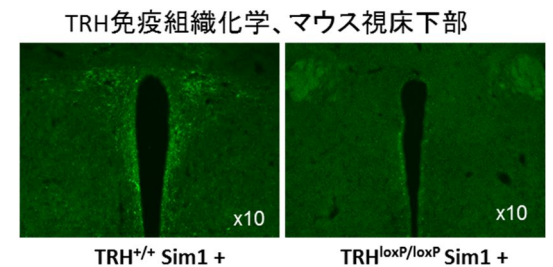
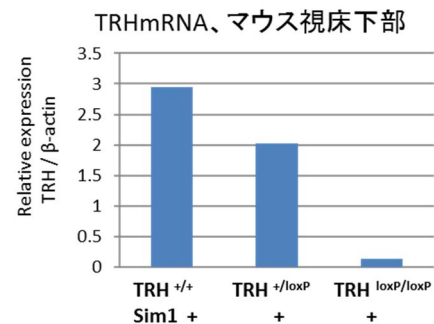
調節することなどを報告してきた。(Yamada M, et al. *PNAS*.94: 1997、Shibusawa N, et al. *Mol Endocrinol*.14: 2000、Yamada M, Shibusawa N, et al. *Endocrinology*.147: 2006) TRHKOの実験からレプチンのH-P-T axisへの作用についてはほぼ了解できるものの一部TRHを介さないホルモン調節の可能性や、寒冷刺激に対してこれまでの神経回路では説明できないTRHの直接的な作用などを観察している。

2. 研究の目的

視床下部各部位のTRHの役割を証明するため、我々はTRH遺伝子floxコンディショナルノックアウトマウスを作製し、特定のCre発現マウスとの組み合わせによって、視床下部の特定の神経核やシグナル特異的にTRHの欠失したマウスを作製し、これが摂食行動や体重制御に与える影響を解析し、絶食や寒冷刺激によりH-P-T axisをコントロールするTRHの存在部位と意義を証明し、TRHによるエネルギー代謝調節機構を解明していくことを目的とした。

3. 研究の方法

TRH コンディショナルノックアウトマウス：TRH flox マウス($TRHKO^{loxP/loxP}$) の作製を行い、まず視床下部特異的発現を示す Sim1-Cre トランスジェニックマウスとの交配により、視床下部特異的 TRH ノックアウトマウス $Sim1-Cre;TRH^{flox/flox}$ を作製し解析した。TRH ノックアウトマウス($TRHKO$)の表現型と同じような表現型が得られるか、視床下部 TRH の欠失により中枢性甲状腺機能低下症が引き起こされるかを証明していく。成長、発達の異常の有無を観察、体重測定。体長測定などを行う。血清 TSH、FT4、FT3 の測定、Radioimmunoassay あるいは ELISA。血液生化学検査、血糖値の測定を行った。視床下部における TRH の発現が mRNA、蛋白レベルで欠失していることを定量的 RT-PCR と免疫組織化学にて確認し、視床下部室傍核の TRH が H-P-T axis の中枢であることの直接的証明を行う。その後 $Sim1-Cre;TRH^{flox/flox}$ について絶食時と絶食時レプチン投与による甲状腺機能への影響を調べ、エネルギー代謝における甲状腺機能調整機能の中枢としての視床下部 TRH の関与を明らかにする。



4. 研究成果

- 1) $Sim1-Cre;TRH^{flox/flox}$ の大脳の免疫組織学的解析では視床下部 PVN で TRH が検出されなかった。
- 2) 脳より PVN のみを摘出し、preproTRH mRNA 発現量を検討し著明な低下を確認した。 $9 \pm 5\%$ ($p < 0.01$)。
- 3) 血清 FT4 値は対照群 1.44 ± 0.06 ng/dL に対して $Sim1-Cre;TRH^{flox/flox}$ では 0.75 ± 0.07 ng/dl ($p < 0.01$) と有意に低下していた。血清 TSH 値は対照群 0.92 ± 0.07 ng/ml に対して $Sim1-Cre;TRH^{flox/flox}$ で 1.57 ± 0.07 ng/ml ($p < 0.05$) と増加していた。
- 4) 下垂体 TSH mRNA 発現量は対象マウスの $65 \pm 15\%$ ($p < 0.05$) に低下しており、prolactin mRNA レベルも $55 \pm 9\%$ ($p < 0.01$) に低下していたが、他の前葉ホルモン遺伝子群の発現量に 2 群間で有意差は認めなかった。
- 5) 下垂体を摘出し、抗 TSH 抗体、抗プロラクチン抗体にて免疫染色を施行したところ、TSH 産生細胞、PRL 産生細胞の染色性低下を確認した。

これらの成果は第 62 回日本甲状腺学会にて共同実験者の大学院生が発表し Young Investigator award を受賞した。さらに発展させ、第 93 回日本内分泌学会学術総会においても「TRH-TSH-甲状腺系制御機構の視床下部 TRH ニューロンの責任領域は視床下部室傍核である～PVN 特異的 TRH ノックアウトマウスの作製と解析」の演題名にて発表予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤 友里, 小澤 厚志, 渋谷 信行, 渡邊 琢也, 中島 康代, 河野 大輔, 山田 正信
2. 発表標題 視床下部室傍核特異的TRHノックアウトマウスの作成と解析
3. 学会等名 第62回 日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----