

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16304

研究課題名（和文）甲状腺ホルモン低下状態胎児の神経分化におけるBag3の役割の解明

研究課題名（英文）Role of Bag3 in neural differentiation of hypothyroid fetuses

研究代表者

手塚 優 (YU, TEZUKA)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：70453321

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：甲状腺ホルモン低下状態の胎児ではアポトーシス陽性細胞が脳内で増加していた。神経組織でBAG3が低下していたマウスでは、大脑海馬周辺におけるアポトーシス陽性細胞の割合が増大していた。培養細胞を用いた実験においてBAG3はアポトーシス誘導因子であるBakと相互作用することで、アポトーシスからの細胞保護作用が認められたことから生体内でも神経細胞のBAG3がアポトーシスから保護していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺ホルモンは脳発達に重要な調節因子の一つであり、胎児の発育中、甲状腺ホルモン低下状態に曝されると不可逆的な神経発達障害が生じることが知られている。妊娠初期の胎児は母親由来の甲状腺ホルモンのみを利用するが、妊娠後期では胎児が産生する甲状腺ホルモンが重要となる。本研究では、甲状腺ホルモン低下状態の胎児でアポトーシス陽性細胞の増加が脳内で認められた。BAG3はアポトーシス誘導因子であるBakと相互作用することで、細胞保護をおこなっている。、甲状腺ホルモン低下状態の胎児における神経発達障害においてBAG3が治療の標的となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Apoptosis-positive cells increased in the brain of hypothyroid fetuses. A genetically modified mouse in which BAG3 was deleted in a nerve-specific manner was prepared. In this mouse, the proportion of apoptosis-positive cells around the hippocampus was increased. In cell experiments, BAG3 interacted with the apoptosis-inducing factor Bak to protect it from apoptosis. BAG3 was considered to suppress the apoptosis of nerve cells in vivo.

研究分野：薬理学

キーワード：神経分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

甲状腺機能亢進症は、20～30歳代の女性で発症例が多い疾患である。甲状腺機能亢進症の患者が妊娠した場合、妊娠中の甲状腺機能コントロールが不十分だと、母体への影響だけでなく胎児に対しても早流産、先天性奇形、発育不全などが起きやすい。そのため、妊娠中も抗甲状腺薬による抗甲状腺治療が継続される。甲状腺ホルモンは脳の発達に重要な調節因子の一つである。胎児の発育中に甲状腺ホルモンが不足した状態に曝されると不可逆的な脳障害が生じることが知られている¹⁾。妊娠初期の胎児は母親由来の甲状腺ホルモンのみを利用するが、妊娠後期になると胎児甲状腺が産生する甲状腺ホルモンが重要となる。そのため、胎児の脳発達への有害な影響を回避するためには、妊娠女性と胎児の双方の甲状腺機能が適正な状態で維持されなければならない。現在、甲状腺機能亢進症の妊婦に対する抗甲状腺薬の使用により、奇形発現率が有意に高くなるという明確なデータはない。しかしながら、先天性甲状腺機能低下症(クレチン症)の小児では、甲状腺ホルモンの低下を原因とする発育不全(低身長)や精神発達障害および知能低下を起こすことが報告されているため、抗甲状腺薬による胚発生中の甲状腺機能低下、甲状腺ホルモン低下状態はその後の神経組織発達に影響を与えられられる。

申請者らのグループはまず、母体の影響を受けることなく、胎児の環境を変えることが可能である受精鶏卵-鶏胚モデルを用い、甲状腺機能低下状態が神経細胞発達に与える影響について研究をおこなった。本研究で用いた受精鶏卵-鶏胚は、マウスやラットなどの胎生動物に比べ、母体を介することなく直接的に胎児への薬物の影響を検証することが可能である。また、ヒトの胎児の発生過程とヒヨコの発生過程は類似点が多く、ヒトの胎児あるいは妊娠・出産に対する薬物の影響を検討するのに適していると考えられる²⁻⁴⁾。そこで、甲状腺機能低下状態における胎児神経組織形成の変化を直接評価するために、鶏胚発育時に甲状腺機能抑制薬としてメチマゾール(MMI)を投与し、胎児の神経組織の形態変化や細胞死の有無を検討した。その結果、孵化前の鶏卵にMMIを投与した鶏胚において、孵化の遅延と孵化後の刷り込み学習能の低下およびアポトーシスによる小脳神経細胞死が認められた²⁻⁴⁾。さらに、これら観察されたヒヨコの学習行動異常およびアポトーシスによる小脳神経細胞死の機序を解明するために、小脳でのBCL-2ファミリーおよびBCL-2関連タンパク質の遺伝子発現レベルを解析した。BCL-2ファミリーはミトコンドリア誘発アポトーシスを制御している一連のタンパク質群であり、BCL-2やBCL-XLなどのアポトーシス抑制因子とBAXやBAKなどのアポトーシス誘導因子に分けられる。さらに申請者は、BCL-2と直接結合し、アポトーシスを制御しているとされているBCL-2関連athanogeneファミリーの遺伝子発現レベルを解析した。その結果、甲状腺ホルモン低下状態での小脳では、BCL-2やBAXなどのBCL-2ファミリーよりもBCL-2関連athanogene(BAG)3の遺伝子発現が著しく低下していることを見いだした。BAG3は、骨格筋、心筋および神経などの組織で高く遺伝子発現しているが、神経細胞内での役割については不明な点が多い。そこで本研究では、神経系の発達および神経細胞の細胞分化におけるBAG3の機能的役割を解明し、低甲状腺ホルモン状態が神経系の組織形成に及ぼす影響の機序解明を試みる。

2. 研究の目的

甲状腺機能亢進症は、若い女性で発症例が多い疾患である。甲状腺機能亢進症の患者が妊娠した場合、妊娠中の甲状腺機能コントロールが不十分だと、母体への影響だけでなく胎児に対しても重篤な影響がでる。そのため、妊娠中も抗甲状腺薬による抗甲状腺治療が継続される。甲状腺ホルモンは脳の発達に重要な調節因子の一つであり、胎児の発育中、甲状腺ホルモン低下状態に曝されると不可逆的な脳障害が生じることが知られている。妊娠初期の胎児は母親由来の甲状腺ホルモンのみを利用するが、妊娠後期になると胎児が産生する甲状腺ホルモンが重要となる。そのため、胎児の脳発達への有害な影響を回避するためには、妊娠女性と胎児の双方の甲状腺機能が適正な状態で維持される必要がある。現在、甲状腺機能亢進症の妊婦に対する抗甲状腺薬の使用により、奇形発現率が有意に高くなるという明確なデータはない。しかしながら、先天性甲状腺機能低下症(クレチン症)の小児では、甲状腺ホルモンの低下が発育不全(低身長)や精神発達障害および知能低下を起こすことが報告されているため、抗甲状腺薬による胚発生中の甲状腺機能低下、甲状腺ホルモン低下状態は、その後の神経組織発達に影響を与えられられる。そこで申請者は、母体の影響を受けることなく、胎児の環境を変えることが可能である受精鶏卵-鶏胚モデルを用い、甲状腺機能低下状態が神経発達に与える影響について研究をおこなった。その結果、甲状腺ホルモン低下状態での鶏胚小脳では、BCL-2関連athanogene(BAG)3の遺伝子発現が著しく低下していることを見いだした。BAG3は、骨格筋、心筋および神経などの組織で高く遺伝子発現しているが、神経細胞内での役割については不明な点が多い。そこで本申請研究では、神経系の発達および神経細胞の細胞分化におけるBAG3の機能的役割を解明し、低甲状腺ホルモン状態が神経系の発達に及ぼす影響の機序解明を試みる。

現在、BAG3はBCL-2と結合するタンパク質として解析されている。また、それだけではなく、近年話題になっているオートファジーの調節タンパク質の1つである可能性が示唆されている。しかし、ほとんどの研究は、上皮細胞であるNIH3T3細胞を用いて解析している。そのため、神経細胞での解析はほとんど無い。本研究は、単にBAG3の機能を解析するだけではなく、甲状腺ホルモン低下状態での神経発達障害のメカニズムの解明の一端としてBAG3の機能を解析する。そのため、本研究により、抗甲状腺薬による胎児の神経系発達への影響の詳細な機

序が明らかになると共に、抗甲状腺薬による胎児発達障害を予防する方法を見いだせる可能性があると思われる。

3. 研究の方法

甲状腺ホルモン低下状態での鶏胚小脳における BAG3 の機能的役割の検討

マウス神経芽腫由来細胞 (N1E115 細胞) を神経細胞のモデルとして、神経細胞の分化誘導に対する BAG3 の影響について検討を行う。この N1E115 細胞は無血清培地で培養すると、神経突起が伸張する性質があり、この伸張した神経突起の形態を神経細胞分化の指標として観察を行う。BAG3 を特異的に阻害する siRNA (siBAG3) を N1E115 細胞に加え、BAG3 をノックダウンした時の N1E115 細胞の神経細胞様分化を検討する。また、このときの N1E115 細胞での BAG3 の細胞内局在を Western blot 法、および免疫染色法にて確認し、そのときの細胞死の有無およびアポトーシスによる細胞死か、ネクローシスによる細胞死かを各種解析法にて詳細に検討する (TUNEL 法、Anexin V 染色法、Caspase3 活性、エバンスブルー染色など)。さらに、BAG3 に結合しているタンパク質の検討や、オートファジーに対する役割も検討していく。N1E115 細胞での BAG3 の役割を基にして、ラット神経細胞における BAG3 の役割も検討する。本研究室では、培養神経細胞でのノックダウンあるいは過剰発現システムはすでに確立しており、N1E115 細胞での結果を基に、神経細胞でも同様の実験を行っていく。さらに、BAG3 の低下による神経細胞分化への影響や神経細胞死の発生機序も分子生物学的手法を用いて詳細に解析していく。

神経細胞および生体 (マウス) 神経組織での BAG3 の役割の検討

この BAG3 遺伝子改変マウスは、BAG3 の第 2 エクソンを跨ぐ形で flox 配列が導入しており、Jackson Laboratory から入手している神経細胞特異的プロモーターの下流に Cre リコンビナーゼを挿入してあるトランスジェニック (TG) マウス (Nestin-Cre TG マウス) と掛け合わせる。Nestin プロモーターは、比較的発生初期に神経細胞特異的に遺伝子発現を開始するので、Nestin-Cre TG x Bag3tm1c (EUCOMM) Hmgu マウスは、神経特異的に BAG3 を欠損していると考えられる。この遺伝子改変マウスの解析により、小脳を含む神経組織の発達段階での BAG3 の生理学的役割が明らかとなると考えられる。さらに、BAG3 のプロモーター領域も既にクローニング済みであり、甲状腺ホルモン低下状態での BAG3 の遺伝子発現低下のメカニズムも今後検討する。また、培養細胞および遺伝子改変マウスで確認された結果が甲状腺ホルモン低下状態での鶏胚小脳でも起こっているか否かも必ず確認し、甲状腺ホルモン低下状態における神経系の発達障害の機序解明を試みる。

4. 研究成果

マウス神経芽腫由来細胞株 (N1E115) を神経細胞のモデルとして、神経細胞死に対する BAG3 の役割について検討を行った。BAG3 を特異的に低下させる siRNA (siBAG3) および BAG3 を過剰発現させることができる BAG3 遺伝子含有アデノウイルスベクターを N1E115 細胞に加え、BAG3 をノックダウンおよび過剰発現させた時の細胞死およびミトコンドリア分画における Bak タンパク質量について検討した。その結果、BAG3 を特異的にノックダウンした N1E115 細胞では、TUNEL 法で検出されるアポトーシスと考えられる細胞死が増加し、ミトコンドリア分画での Bak タンパク質量が増大していた。一方、BAG3 を過剰発現した細胞では細胞死は起こらず、Bak のタンパク質量が低下していた。その時、N1E115 細胞の Bak 遺伝子発現量には変化が見られなかった。すなわち、BAG3 は遺伝子発現を介すること無く、ミトコンドリア Bak タンパク質量を制御していた。

神経特異的に BAG3 を欠損させた遺伝子改変マウスを作製し、その表現型を解析した。実験では、神経特異的遺伝子発現プロモーター (マウス Nestin プロモーター) に Cre リコンビナーゼを挿入させた遺伝子コンストラクトを用いて作製された TG マウスと BAG3 遺伝子のエクソン 3 領域を挟む形で loxp サイトを挿入したマウス (BAG3f/f) を掛け合わせ、得られた Nestin-Cre TG x BAG3f/f マウスを用いた。Nestin-Cre TG x BAG3f/f マウス的大脑および小脳では、BAG3f/f マウス、Nestin-Cre TG マウスあるいは野生型 (WT) マウスと比較して BAG3 のタンパク質レベルが著しく低下していた。そのため、Cre リコンビナーゼを神経細胞特異的に発現させることにより、神経特異的に BAG3 遺伝子欠損が起こり、その結果として神経特異的に BAG3 を欠損しているマウスを作製することができたと考えられた。神経組織で BAG3 が低下していたマウスでは、大脳海馬周辺におけるアポトーシス陽性細胞の割合が増大していた。また、Nestin-Cre TG x Bag3tm1c (EUCOMM) Hmgu マウスを用いて、マウスの記憶行動について Morris の水迷路を用いて討を行った。その結果、Nestin-Cre TG x Bag3tm1c (EUCOMM) Hmgu マウスでは、NTG マウスと比較して記憶の定着が曖昧である可能性が示唆された。

BAG3 はアポトーシス誘導因子である Bak と相互作用し、細胞をアポトーシスから保護していると N1E115 細胞を用いた実験で示されたため、生体内でも神経細胞の BAG3 がアポトーシスを抑制していると考えられる。今後、BAG3 の低下によるアポトーシスの意義およびその機序を解明していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----