

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ~ 2012

課題番号：21591173

研究課題名（和文）

精神機能に及ぼす甲状腺ホルモン作用におけるRCAN/カルシニューリン系の役割

研究課題名（英文）

研究代表者

加納 安彦 (Yasuhiko Kanou)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：50252292

研究成果の概要（和文）：

RCAN (regulators of calcineurin) 2 は甲状腺ホルモン ( $T_3$ ) により発現が誘導され、カルシニューリン (CaN) の活性を抑制する。CaN は中枢神経系に豊富に存在するタンパク質脱リン酸化酵素で、そのノックアウトや過剰発現により学習・記憶や精神機能に異常が生じることが報告されている。甲状腺機能低下により脳の RCAN2 の発現が低下することから、私たちは RCAN2 が脳の機能に深く関与し、甲状腺ホルモンの脳機能への作用が RCAN2 の発現調節を介して発揮されていると想定した。本研究では既に樹立した RCAN2 遺伝子改変マウス（ノックアウトマウス）の形態学的ならびに行動学的解析を通して、RCAN2 タンパクが脳機能にどのような役割を果たしているかを検討した。RCAN2 KO マウスは正常に出生し、野生型と比べて大きな奇形は認めない。C57BL/6J 系統へのもどし交配したコンジュニック系統として樹立し、戻し交配世代 10 ないし 11 (N10 or 11) の F2 マウスを作出して行動学的解析に供した。また、理化学研究所バイオリソースセンターへ寄託した。RCAN2 KO マウスは、野生型マウスと比べて発生期、成長期、成獣のいずれにおいても、脳に顕著な形態学適な差異はなく、今後さらに詳細な検討が求められる。RCAN2 KO マウスの行動量を測定した結果、KO マウスと野生型マウス、ヘテロ型マウスの自発性行動量に優位な差は認められなかったものの、新規環境（測定のための新しいケージ）へ移動した直後に KO マウスの行動量が減少していた。高架式十字迷路試験、Y 字迷路試験、強制水泳試験、恐怖条件付け学習試験で見積もられる情動行動や学習能力に差はないものと考えた。現在、理化学研究所バイオリソースセンターが実施する「日本マウスクリニック」による解析を実施中である。

研究成果の概要（英文）：

RCAN (regulators of calcineurin) 2 is induced with a thyroxin ( $T_3$ ) and it controls the activity of a calcineurin (CaN). CaN is a protein phosphatase which exists in a CNS at a rich, and it is reported that unusuallies arise in a learning and a memory, or a mentation by the knock out and overexpression. Since the expression of cerebral RCAN2 reduced due to the hypothyroidism, RCAN2 participated in the cerebral function deeply and we assumed that the effect to the cerebral function of a thyroxin was demonstrated through the regulation of gene expression of RCAN2. This study

examined the role in the cerebral function of RCAN2 protein through the morphological and behavioral analyses of the previously established RCAN2 genetically engineered mouse (knock out mouse). A RCAN2 KO mice is born normally and the abnormality compared with a wild type was not observed. We established as a congenic strain to C57BL/6J line, which carried out the back, cross, and made the backcross generation's 10 to 11 (N10or11) F2 mice, and provided the behavioral analyze. Moreover, we deposited the mice to the Riken bioresource center. In a nascent, a growth period, and an adult, a morphological variation does not have a RCAN2KO mice in a brain compared with a wild type mice, and a future still more detailed investigation is called for. As a result of measuring the amount of behavioural of a RCAN2 KO mice, the difference [superiority / the amount of spontaneous behavioural of KO mice, a wild type mice, and a hetero type mice] was not accepted. However, the amount of behavioral of KO mice was decreasing immediately after moving to a novel situation (novel cage for a measurement). Furthermore, I considered the difference to be an out-of thing to the emotional behavior and learning ability that have been measured by other behavioral trials (an elevated type crux maze trial, Y character maze trial, a forced-swimming trial, phobia conditional learning tests). The analyze by the "Japan mouse clinic" which a Riken bioresource center carry out is under perform.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学、神経科学、脳・神経、遺伝子、タンパク質

#### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺機能の異常が脳の発達や機能に大きな影響を及ぼすことは古くから知られている。先天性甲状腺機能低下症は知的障害や成長障害などを引き起こす。成人の甲状腺機能低下症では抑うつ気分や記憶力の低下などの精神・神経症状をともなう症例もある。一方、甲状腺中毒患者には、落ち着きのなさや情緒不安定などの精神症状が認められることが多い。しかしながら、どのような分子機構でT<sub>3</sub>

が脳の発達や精神機能に影響しているかは十分に解明されていない。近年、マウスの行動学的解析法によって情動や社会性行動などの精神機能を科学的に評価できるようになり、脳の発達や精神機能に対するT<sub>3</sub>作用の分子レベルでの検討が始まっている。たとえば、T<sub>3</sub>受容体αを介するT<sub>3</sub>作用が減弱するとマウスの不安感の増大や記憶障害が生じるなど、ヒトの甲状腺機能低下症に認められる精神異常を引き起こすことが報告されている。

私たちが  $T_3$  応答性遺伝子として報告した RCAN2/ZAKI-4 (以下、RCAN2 と記す) はタンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリン (CaN) の活性を阻害・調節する機能を持ち、同様の機能を持つ RCAN ファミリータンパク (RCAN1~3) の中で脳に最も強く発現する。甲状腺機能低下ラットの大脳皮質では RCAN2 の発現が低下し、甲状腺機能低下マウスの脳では CaN 活性が増加していた。また、われわれが作製した RCAN2 ノックアウトマウス (KO マウス) の脳では CaN 活性が増加し、RCAN2 の発現を介した CaN 活性調節が甲状腺機能低下における脳機能の異常に深く関与している可能性が示唆された。

CaN は脳の発達や機能にきわめて重要な役割を果たすと考えられ、CaN を前脳特異的にノックアウトしたマウスが統合失調症に類似した精神症状を示し、逆に、過剰発現させたマウスでは学習・記憶機能が障害される。さらに、統合失調症患者の死後脳で RCAN2 遺伝子の発現が増加していた、したがって、甲状腺ホルモンが RCAN2/CaN 系を介して精神作用に影響を及ぼしていると考えられる。

## 2. 研究の目的

私たちは RCAN2 の機能を明らかにし、脳の発達や機能における甲状腺ホルモン作用の分子機構を解明する目的で、RCAN2KO マウスと過剰発現するトランスジェニックマウス (TG マウス) を作製した。これら RCAN2 遺伝子改変マウスはともに正常に出生し、野生型と比べて大きな奇形は認めない。これまでの研究より、KO マウスでは野生型に比べて CaN 活性が増加し RCAN2 が *in vivo* でも CaN 活性の抑制作用を持つこと、TG マウスは活動性が亢進し CaN KO マウスと酷似した表現型を示すことが明らかとなっている。すなわち、RCAN2 による CaN 活性抑制が正常な精神機能を発揮するために必須であることが強く示唆された。

本研究では、RCAN2 遺伝子改変マウスの脳機能を以下のような手法で解析する。

(1) 行動学的実験によって、RCAN2 遺伝子改変マウスの自発的な活動性や学習・記憶機

能、情報処理能力を解析する。

(2) RCAN2 遺伝子改変マウスにおける CaN を始めとする脳の機能に重要な役割を果たすタンパク、遺伝子群の活性や発現量を定量し、その行動学的特徴とのかかわりを明らかにする。

(3) ニューロンやグリアのマーカー遺伝子の発現を組織化学的に検討し、RCAN2 遺伝子改変マウスにおける脳機能の異常を細胞レベルで明らかにする。

以上により、内因性 CaN 調節因子である RCAN2 が脳機能にどのようにかかわっているのか、 $T_3$  の脳機能への作用が RCAN2 の発現調節を介してどのように発揮されるのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

樹立した 2 系統の RCAN2 遺伝子改変マウスならびに実験的に作製した甲状腺機能異常マウスを用いて以下の解析を実施し、RCAN2 およびカルシニューリンが脳機能に果たす役割を解明する。

(1) 行動学的解析：自発性活動能力の測定の他、学習・記憶機能の解析、情報処理能力の解析などにより、RCAN2 遺伝子改変マウスの脳機能を評価、野生型と比較する。

(2) 形態学的解析：成獣脳での RCAN2 の発現を検討するとともに、脳機能を考える上で必須なタンパクの発現の変化を RCAN2 遺伝子改変マウスにおいて検討する。

(3) 生化学的・分子生物学的解析：カルシニューリンを始めとする脳機能を考える上で必須な遺伝子群の発現量や酵素群の活性を定量し、その変化を検討する。

## 4. 研究成果

(1) 遺伝子改変マウスの系統維持

RCAN2 KO マウスは 129Sv マウス由来の ES 細胞より作製しており、脳機能を検討するための遺伝的背景としては適当ではない。そこで、脳機能解析に汎用されている C57BL/6J 系統へのもどし交配を進めてほぼコンジェニック系統として樹立できた。行動学的解析に供するために、戻し交配世代 10 ないし 11 (N10 or 11) の F2 マウスを作出し、行動学的解析に供した。また、系統の維

持・管理と遺伝資源としての利用を進めるとともに、網羅的な解析を実施するために理化学研究所バイオリソースセンターへ寄託した。

## (2) 行動学的解析

実験的に作製した甲状腺機能亢進マウスと機能低下マウスの自発性活動をオープンフィールド試験によって測定した結果、機能亢進マウスでは活動性が増加していた。逆に、機能低下マウスでは活動性が低下していた。一方、RCAN2 TG マウスは多動であることが判明しているため、KO マウスの自発行動性を評価した。7日間の行動量を測定した結果、KO マウスと野生型マウス、ヘテロ型マウスの行動量には優位な差は認められなかった。しかし、新規環境（測定のための新しいケージ）へ移動した直後に KO マウスの行動量が減少していた。さらに、KO マウスの行動学的特徴を検討するために、高架式十字迷路試験、Y字迷路試験、強制水泳試験、恐怖条件付け学習試験を行った。KO マウスとヘテロ型マウスの間には優位な差は認められなかった。したがって、これら試験で見積もられる情動行動や学習能力に差はないものと考えた。行動学的な特徴の他、生化学的な性質も含めて RCAN2KO マウスに関する網羅的な解析を実施するために、理化学研究所バイオリソースセンターが実施する「日本マウスクリニック」による解析を実施中である。この網羅的解析は本研究期間中には終了しなかったため、引き続き実施・解析中である。

## (3) 生化学的解析

RCAN2 遺伝子過剰発現 (TG) マウスの脳におけるカルシニューリン活性を測定する予定であったが、研究協力者である宮川教授からのサンプルの供与が受けられなかったために、測定できなかった。

## (4) 発生過程への影響

ヘテロの雌雄同士の交配、または、ホモの雌雄どうしの交配は、野生型の雌雄どうしによる交配を行い、得られた胎児または産仔を解析に供した。ホモ雌雄から得られる産仔数あるいは妊娠（着床）数は野生型雌雄から得られるよりも少ないことがあったが、検討数が少なく統計的な有意差を得られるには至

らなかった。

## (5) 形態学的解析

RCAN2 遺伝子改変マウスの成獣脳で比較・検討するために、ニューロンのマーカータンパクであるニューロン特異チューブリンに対する抗体 TuJ を用いて検討したが違いは見いだせなかった。さらに、RCAN2 遺伝子改変マウスの発生過程における神経系、特に脳の形態学的な解析を行った。ヘテロの雌雄の交配によって得られた胎生 9.5 日以降の胎児の囊の発達状態を比較・検討したが形態学的な差は見いだせなかった。ニューロンのマーカーである TuJ 抗体による免疫組織学的検索を行ったが、差異は見いだせなかった。したがって、RCAN2 遺伝子欠損は脳の形態学的な発生に影響はないと考えられる。

## 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 6 件）

- ① Sun XY, Takagishi Y, Okabe E, Chishima Y, Kanou Y, Murase S, Mizumura K, Inaba M, Komatsu Y, Hayashi Y, Peles E, Oda SI, Murata Y.: A Novel Caspr Mutation Causes the Shambling Mouse Phenotype by Disrupting Axoglial Interactions of Myelinated Nerves.、Journal of Neuropathology and Experimental Neurology、査読あり、Vol. 68、2009、1207-1218
- ② Mizoguchi H, Takuma K, Fukuzaki E, Ibi D, Someya E, Akazawa K, Alkam T, Tsunekawa H, Mouri A, Noda Y, Nabeshima T, and Yamada K.: Matrix metalloprotease-9 inhibition improves amyloid  $\beta$ -mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice.、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.、査読あり、Vol. 331、2009、14-22
- ③ Hayashi Y, Yamamoto M, Mizoguchi H, Watanabe C, Ito R, Yamamoto S, Sun XY, and Murata Y. : Mice Deficient for Glucagon Gene-Derived Peptides Display Normoglycemia and Hyperplasia of Islet  $\alpha$ -Cells But

Not of Intestinal L-Cells., Molecular Endocrinology, 査読あり、Vol. 23、2009、1990-1999

- ④ Sun XY, Hayashi Y, Xu S, Kanou Y, Takagishi Y, Tang YP, Murata Y. : Inactivation of the Rcan2 gene in mice ameliorates the age- and diet-induced obesity by causing a reduction in food intake., Plos One, 査読あり、Vol. 6、2011、doi: 10.1371/journal.pone.0014605.
- ⑤ Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K. : Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4., Journal of Neurochemistry, 査読あり、Vol. 30、2011、5702-5712
- ⑥ Iwata T., Yoshida T., Teranishi M., Murata Y., Hayashi Y., Kanou Y., Griffith AJ., Nakashima T. : Influence of dietary iodine deficiency on the thyroid gland in Slc26a4-null mutant mice., Thyroid Research, 査読あり、Vol. 4、2011、10-15

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加納 安彦 (Kanou Yasuhiko)  
名古屋大学・環境医学研究所・助教  
研究者番号 : 50252292

### (2) 研究分担者

溝口 博之 (Mizoguchi Hiroyuki)  
名古屋大学・環境医学研究所・助教  
研究者番号 : 70402568

### (3) 連携研究者

なし

研究者番号 :