

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15340

研究課題名（和文）小脳における甲状腺ホルモンを介した抑制型転写共役因子の機能解析

研究課題名（英文）The role of nuclear corepressors in cerebellum and thyroid hormone action

研究代表者

天野 出月（Amano, Izuki）

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10765275

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）：甲状腺ホルモン受容体をはじめとする核内受容体の作用に重要である、抑制型転写共役因子SMRT(NCoR2)の異常が、神経発達障害の一因であることが近年報告されている。しかし、その作用機序は不明である。そこで本研究では、神経発達障害の関連脳領域の一つとされる小脳に着目した。小脳プルキンエ細胞特異的にSMRTを欠失させたマウスは、協調運動異常を認めなかった一方で、社会性行動の異常を認めた。さらに電気生理学的実験ではSMRT欠失がプルキンエ細胞の過活動とスパインの増加を引き起こすことを明らかにした。本研究はSMRTがプルキンエ細胞の電気生理学的特性の調節に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症スペクトラム障害(ASD)をはじめとする神経発達障害は、発症率の増加に伴い世界的に深刻な社会問題となっている。多因子疾患である一方で、遺伝的素因が大きな要因の一つであるとされる。本研究で注目したSMRT(NCoR2)の変異は、ヒトでASD症状を呈することが報告されているが、本研究で作出したマウスモデルでも同様の症状を呈することを明らかにした。また、その行動変容の細胞基盤が小脳プルキンエ細胞の電気生理学的特性の変化に起因していることが明らかとなった。本知見が、現在は有効な治療手段に乏しい神経発達障害の治療アプローチに大きく寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Recent reports have indicated that abnormalities in the nuclear corepressor, SMRT (NCoR2), which is crucial for the function of nuclear receptors including thyroid hormone receptors, are a contributing factor to neurodevelopmental disorders. However, the underlying mechanisms remain unclear. In this study, we focused on the cerebellum, which is considered one of the brain regions associated with neurodevelopmental disorders. Mice with a cerebellar Purkinje cell-specific deletion of SMRT did not exhibit any abnormalities in motor coordination but did show abnormalities in social behavior. Furthermore, electrophysiological experiments revealed that SMRT deletion increased spontaneous firing activity and spine density of Purkinje cells. These results indicate that deletion of SMRT in Purkinje cells causes various cerebellar dysfunction by inducing neurophysiological abnormalities.

研究分野：内分泌生理

キーワード：NCoR 甲状腺ホルモン 神経発達障害 抑制型転写共役因子 SMRT 小脳プルキンエ細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性甲状腺機能低下症で知られるように、甲状腺ホルモン(TH)は周産期の神経発達に必要不可欠なホルモンの一つである。THは神経新生、神経細胞の発達に伴う移動、樹状突起の発達や分枝、シナプス形成、5)髄鞘化などに異常を来すことが報告されており¹⁾、早期の治療介入がないと不可逆的な身体的な発育障害や神経発達障害を引き起こす。しかし、THが神経細胞においてどのように標的遺伝子の発現調節を行うのか、また各発達段階においてTHの影響がどのように変化していくかは未だ詳細は不明である。

甲状腺で産生されるTHは血中に分泌された後、標的臓器細胞において細胞膜輸送体を介して能動的に取り込まれ、脱ヨウ素酵素により活性型THであるトリイオドサイロニン(T₃)に変換される。T₃は核内に拡散し、標的遺伝子のTH応答領域に結合するTH受容体(TR)に結合することにより、標的遺伝子の発現調節を行う。T₃がTRと結合していない状態では、TRはレチノイドX受容体(RXR)とヘテロダイマーを形成し、転写抑制型共役因子(NCoRs)であるnuclear corepressor 1(NCoR1)もしくはsilencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors(SMRTもしくはNCoR2)のコリプレッサー複合体と結合し、ヒストン脱アセチル化をすることによってクロマチン構造を凝集して転写を抑制している。またT₃がTRに結合することにより、コリプレッサー複合体は解離し、転写活性型共役因子が結合することにより、ヒストンアセチル化が活性化されて転写が促進される。近年、NCoRsにおける遺伝子異常が神経発達異常、特に自閉症スペクトラムを引き起こす症例報告がされている。²⁾³⁾ NCoRsの中樞神経系における生理学的意義が注目されつつあるが、未だにそのメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

NCoR1/SMRTに遺伝子異常を来した症例の多くで、自閉症スペクトラム障害を引き起こすことが報告されている⁴⁾。そこで近年、自閉症スペクトラム障害の一つの責任領域である小脳に注目し、小脳の中でも主たる役割を果たすプルキンエ細胞特異的なNCoRsノックアウトマウスを作製・解析を行うことにより、抑制型転写共役因子の中樞神経系における生理学的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 小脳プルキンエ細胞特異的 SMRT ノックアウトマウスの作製

Cre/loxPシステムを用いて小脳プルキンエ細胞特異的なSMRTコンディショナルノックアウトマウスを作成した。小脳プルキンエ細胞特異的に遺伝子発現を抑制するため、小脳プルキンエ細胞特異的にCreを発現するL7-Pcp2-CreマウスとSMRT^{loxP/loxP}マウスを交配させることによりSMRTノックアウトマウス(SMRT^{L7})を作製した。

(2) 行動学的解析

小脳機能である協調運動機能・運動学習能の評価としてロータロッド試験を行った。また自閉症スペクトラム障害などを念頭とした学習・社会性行動の評価のためにオープンフィールドテスト・三部屋式社会性行動試験・学習試験等を行った。

(3) 電気生理学的解析・形態学的解析

電気生理学的実験(パッチクランプ法)により神経回路レベルでの分析を行ない、同時にニューロントレーシングを行いプルキンエ細胞の形態解析を行った。

4. 研究成果

(1) 小脳プルキンエ細胞特異的 SMRT ノックアウトマウス(SMRT^{L7})の評価

小脳プルキンエ細胞特異的 SMRT ノックアウトマウス(SMRT^{L7})においてSMRTの発現が小脳プルキンエ細胞特異的に制御されていることを確認するためにリアルタイムPCR法を用いて小脳、大脳皮質およびプルキンエ細胞のみからのmRNAを用いて解析を行った(図1A)。小脳全体ではSMRTの発現低下を認めなかったものの、小脳プルキンエ細胞のみからの検体ではSMRTの発現低下を認めた。また、このマウスは発育に異常は認めず(図1B)肉眼的に明らかな発達異常や行動学的変化は認めなかった。

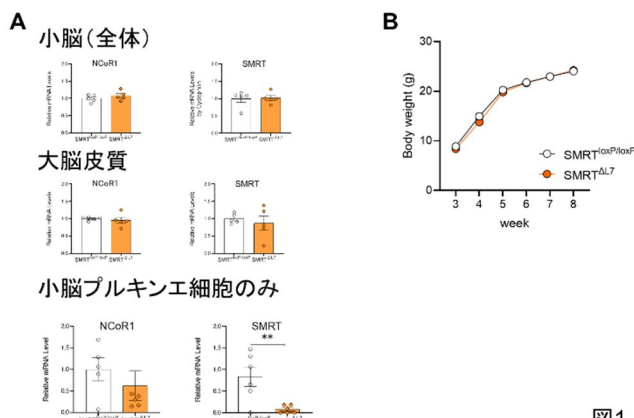


図1

(2) SMRT^{L7} は神経発達障害様の行動異常を示す

SMRT^{L7} の神経行動学的評価を行うため生後 8 週齢からテストバッテリーを行った。協調運動・運動学習を評価するため、ロータロッド試験を行った。協調運動・運動学習に差は認めず、神経細胞特異的に SMRT を欠失させたマウスと同様の傾向であった (未発表データ) (図 2A)。また、ホームケージ内での活動性・サーカディアンリズムに変化は認めなかった (図 2B)。新奇環境下での自発活動量、不安・恐怖様行動の評価としてオープンフィールド試験を行った (図 2C)。30 分間の新奇環境下の活動量は差を認めず、中央エリアへの侵入頻度に関しても差を認めなかった。続いて、社会性行動における影響を解析するため、三部屋式社会性試験を行ったところ、社会性行動 (社会的な新奇性への嗜好の低下) に異常が認められた (図 2D)。さらに、記憶学習試験としてタッチパネル式オペラント装置を使用して視覚弁別課題を行った。いずれの群も、テスト第 1 日目にはチャンスレベル (50%) の正答率であったが、日を追うごとに学習していることを確認した。SMRT^{L7} では記憶学習の獲得能に異常は認めなかった。 (図 2E)

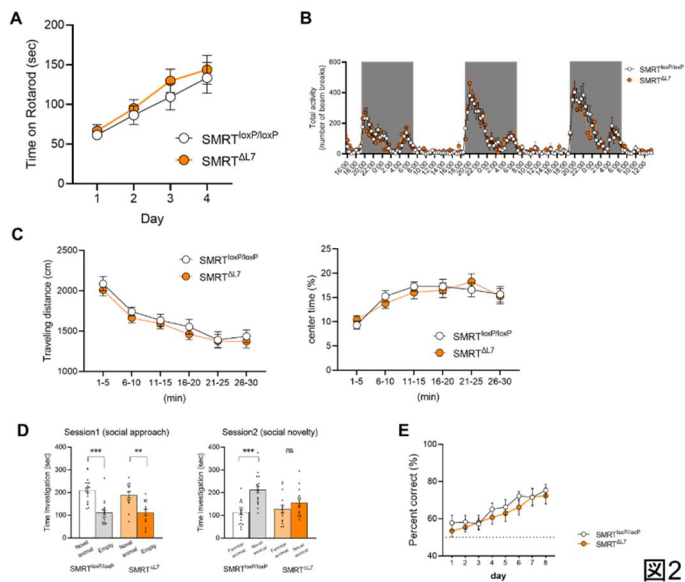


図 2

(3) SMRT^{L7} プルキンエ細胞では樹状突起スパイン数増加に伴う自発発火の過活動を認める

行動テストバッテリーで認められた行動変容の細胞基盤を解析するため、パッチクランプ法を用い、SMRT を欠損したプルキンエ細胞の電気生理学的特性を記録した。その結果、SMRT を欠失したプルキンエ細胞では、自発発火頻度が有意に増加していた (図 3A)。さらに、プルキンエ細胞の樹状突起におけるスパインの有意な増加を認めた (図 3DE)。一方で、プルキンエ細胞の樹状突起分岐には変化は見られなかった (図 3BC)。これらの結果より、SMRT 欠失がプルキンエ細胞の過活動を引き起こし、小脳機能に異常をもたらしていることが示唆された。本研究は SMRT が小脳プルキンエ細胞の電気生理学的特性調節に重要な役割を担っていることを明らかにし、この変化が神経発達障害様の行動を示す細胞基盤であることが示唆された。今後は、SMRT が抑制型転写共役因子であることから、どのような遺伝子発現調節を担っているのか。また甲状腺ホルモン受容体を介した遺伝子発現調節にもかかわっていることから、両者にどのような関係があるのかを明らかにしていく。

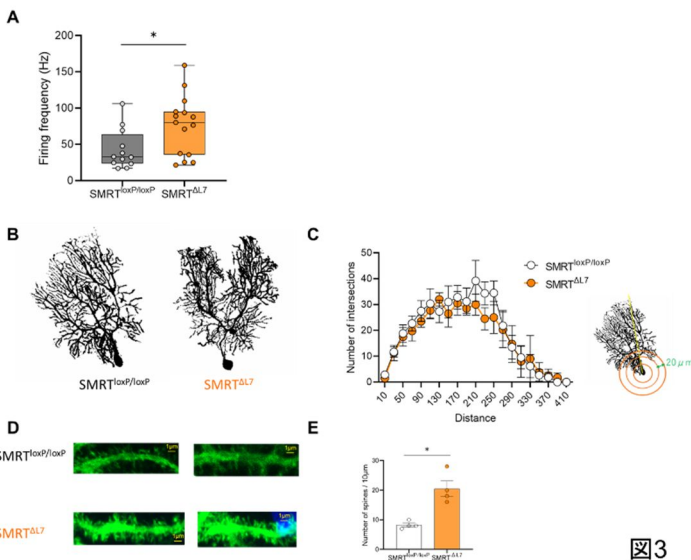


図 3

5 . 引用文献

- 1) Koibuchi N. et al. *Trends Endocrinol Metab* 2000
- 2) Zhou et al., *Nat Neurosci.* 2019
- 3) Iwama et al., *J Med Genet.* 2019
- 4) Sun Z. and Xu Y. *Endocrinology* 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ritter Megan J., Amano Izuki, Imai Norihiro, Soares De Oliveira Lorraine, Vella Kristen R., Hollenberg Anthony N.	4. 巻 53
2. 論文標題 Nuclear Receptor CoRepressors, NCOR1 and SMRT, are required for maintaining systemic metabolic homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101315 ~ 101315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishii Sumiyasu, Amano Izuki, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 36
2. 論文標題 The Role of Thyroid Hormone in the Regulation of Cerebellar Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 703 ~ 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3803/EnM.2021.1150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yajima Hiroyuki, Amano Izuki, Ishii Sumiyasu, Sadakata Tetsushi, Miyazaki Wataru, Takatsuru Yusuke, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Absence of Thyroid Hormone Induced Delayed Dendritic Arborization in Mouse Primary Hippocampal Neurons Through Insufficient Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2021.629100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ninomiya Ayane, Amano Izuki, Suzuki Hiraku, Fujiwara Yuki, Haijima Asahi, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 74
2. 論文標題 Lactational exposure to perfluorooctane sulfonate remains a potential risk in brain function of middle-aged male mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-024-00907-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ninomiya Ayane, Amano Izuki, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 A Versatile, Behavioral Method to Investigate Thyroid Hormone Effects on Cerebellar Function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/65940	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Yuki, Miyasaka Yuhei, Ninomiya Ayane, Miyazaki Wataru, Iwasaki Toshiharu, Ariyani Winda, Amano Izuki, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Effects of Perfluorooctane Sulfonate on Cerebellar Cells via Inhibition of Type 2 Iodothyronine Deiodinase Activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12765 ~ 12765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241612765	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Hiroaki, Horibata Yasuhiro, Amano Izuki, Ritter Megan J., Domae Mariko, Ando Hiromi, Sugimoto Hiroyuki, Cohen Ronald N., Hollenberg Anthony N.	4. 巻 17
2. 論文標題 Nuclear corepressor SMRT acts as a strong regulator of both -oxidation and suppressor of fibrosis in the differentiation process of mouse skeletal muscle cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0277830-0277830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0277830	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ninomiya Ayane, Amano Izuki, Kokubo Michifumi, Takatsuru Yusuke, Ishii Sumiyasu, Hirai Hirokazu, Hosoi Nobutake, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Long-term depression?inductive stimulation causes long-term potentiation in mouse Purkinje cells with a mutant thyroid hormone receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2210645119	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Susetyo Alvin, Ishii Sumiyasu, Fujiwara Yuki, Amano Izuki, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Histone Deacetylase 3 Inhibitor Alleviates Cerebellar Defects in Perinatal Hypothyroid Mice by Stimulating Histone Acetylation and Transcription at Thyroid Hormone-Responsive Gene Loci	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7869 ~ 7869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147869	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 天野 出月、二ノ宮 彩音、Megan Ritter, Kristen R. Vella, Anthony Hollenberg、鯉淵 典之
2. 発表標題 抑制型転写共役因子Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptorの脳発達における役割の解明
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野出月、二ノ宮彩音、鯉淵典之
2. 発表標題 抑制型転写共役因子NCoR1/SMRTの中樞神経系における役割の解明
3. 学会等名 第69回北関東医学総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Izuki Amano, Ayane Ninomiya, Reika Kawabata-Iwakawa, Megan J. Ritter , Anthony N. Hollenberg, and Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 Role of the nuclear receptor corepressor 1 (NCoR1) and the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT) on central nervous system
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天野 出月、二ノ宮 彩音、Megan Ritter, Kristen R. Vella, Anthony Hollenberg、鯉淵 典之
2. 発表標題 中枢神経系における抑制型転写共役因子Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptorの生理的機能の解明
3. 学会等名 第64回日本甲状腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野 出月、二ノ宮 彩音、Megan Ritter, Kristen R. Vella, Anthony Hollenberg、鯉淵 典之
2. 発表標題 マウスモデルを用いた中枢神経系における抑制型転写共役因子の役割の解明
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izuki Amano , Ayane Ninomiya , Megan Ritter , Kristen R. Vella , Anthony N. Hollenberg, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 The role of silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors in the Purkinje cells
3. 学会等名 The 11th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izuki Amano Ayane Ninomiya , Megan Ritter , Kristen Vella , Anthony N. Hollenberg , Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 Nuclear receptor corepressors NCoR1 and SMRT plays unique roles in central nervous system
3. 学会等名 END02021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izuki Amano Ayane Ninomiya , Megan Ritter , Kristen Vella , Anthony N. Hollenberg , Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 脳発達における核内受容体コリプレッサー (SMRT) の役割
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Ayane Ninomiya, Abdallah Mshaty, Asahi Haijima, Hiroyuki Yajima, Michifumi Kokubo, Miski Aghnia Khairinisa, Winda Ariyani, Yuki Fujiwara, Sumiyasu Ishii, Nobutake Hosoi, Hirokazu Hirai, Izuki Amano, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 The neurotoxic effect of lactational PFOS exposure on cerebellar functional development in adult male mice
3. 学会等名 The 11th International Symposium of the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayane Ninomiya, Abdallah Mshaty, Asahi Haijima, Hiroyuki Yajima, Michifumi Kokubo, Miski Aghnia Khairinisa, Winda Ariyani, Yuki Fujiwara, Sumiyasu Ishii, Nobutake Hosoi, Hirokazu Hirai, Izuki Amano, Noriyuki Koibuchi
2. 発表標題 The effect of lactational PFOS exposure on cerebellar function and motor coordination
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 二ノ宮彩音、天野出月、小久保倫文、高鶴裕介、平井宏和、細井延武、鯉淵典之
2. 発表標題 小脳機能維持における甲状腺ホルモンの新規役割の解明：プルキンエ細胞小胞体からのカルシウム放出の調節における重要性
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野 出月、二ノ宮 彩音、Megan Ritter, Kristen R. Vella, Anthony Hollenberg、鯉淵 典之
2. 発表標題 中枢神経系における抑制型転写共役因子NCoR1/SMRTの役割の解明
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天野 出月、二ノ宮 彩音、小尾 紀翔、Megan Ritter、 Anthony Hollenberg、鯉淵 典之
2. 発表標題 The nuclear receptor corepressor, silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT), play unique roles in cerebellar Purkinje cells
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Boston University			
米国	Weill Cornell Medicine			