

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25281024

研究課題名(和文) 低分子脂溶性ホルモンを介する脳の機能的発達調節に及ぼす環境因子の影響

研究課題名(英文) Effects of environmental factors on small lipophilic hormone-mediated development of brain function

研究代表者

鯉淵 典之(Koibuchi, Noriyuki)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80234681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核内受容体を介する遺伝子発現変化による脳発達への影響を調べた。in vivo実験では、先天性甲状腺機能低下ラットやマウスに小脳失調が生じ、平行線維-プルキンエ細胞のシナプスでpaired pulse facilitationの異常が生じることを明らかにした。また、周産期にPCBを投与したマウスに類似の小脳失調が生じることも報告した。In vitroの解析では甲状腺ホルモン作用を調べるための海馬の初代培養系を確立した。また、ガドリニウムキレート剤について甲状腺ホルモン系への影響をレポーターアッセイと小脳初代培養系で調べ、甲状腺ホルモン作用が攪乱されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to examine the effect of the alteration of nuclear receptor-mediated gene expression on brain development. Using in vivo preparation, we found that congenital hypothyroid mouse and rat showed cerebellar ataxia. Electrophysiological study showed that such alteration may be induced by an aberrant synaptic function between parallel fiber and Purkinje cell. Perinatal PCB treatment induced the similar phenotype. Using in vitro preparation, we established the primary culture system of the hippocampus to study the effect of thyroid hormone. In addition, we examined the affect of gadolinium-based contrast agents (GBCA) on thyroid hormone action and found that linear GBCA disrupted thyroid hormone receptor action and thyroid hormone-mediated cerebellar dendritogenesis of Purkinje cell.

研究分野：内分泌生理学, 環境生理学

キーワード：核内受容体 脳発達 脂溶性ホルモン 内分泌攪乱化学物質

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系発達において、胎生初期には神経細胞の分化、移動、軸索伸展などにより基本的な神経回路が構築される。この経路は遺伝的プログラムや細胞相互作用など、主に脳内の環境により調節される。この時期に経路に異常が生じると、致命的となるか、形態形成異常となる。一方、中枢神経系が機能的に成熟するには胎生後期から新生児期の適切な時期(臨界期)に環境から適切な刺激を受ける事が重要である。刺激によりシナプスの形態・動態・機能が変化し、神経回路の再編が生じ、脳が機能的に成熟し高次脳機能が確立する。環境刺激に脆弱なこの時期の不適切な刺激や、必要な刺激の欠損により、高次脳機能が障害される。この際、形態学的な異常は時に明らかでない。環境刺激は痛覚や視覚など感覚神経を介するか、ステロイドや甲状腺ホルモンなど低分子脂溶性ホルモンを介して伝達される。感覚刺激を介する回路再編は研究が進んでいるが、ホルモンによる再編機構は不明点が多い。しかし、ストレス時のコルチゾール過剰分泌や、化学物質によるホルモン作用のかく乱により高次脳機能障害が生じることが知られている。また、自閉症や学習障害発症におけるホルモン系を介した環境因子の関与も示唆されている。ホルモンの脳発達への影響や環境化学物質の修飾作用は、遺伝子発現、形態変化、行動解析など各システムでの解析が独立して進んでいるが、分子レベルの異常により、神経細胞の生理機能(活動性や伝達物質放出等)がいつどのような障害を受け、高次脳機能障害を生じるのかは不明である。

低分子脂溶性ホルモンは、核内受容体(NR)と結合する。NRは標的遺伝子のホルモン応答配列と結合し転写を調節する。そして発現したタンパクが細胞機能を調節する。NRは多数の核内因子と複合体を作り、ヒストンアセチル化やDNAメチル化などエピジェネティック経路を介し遺伝子発現を調節する。エピジェネティック経路は環境化学物質により修飾される。加えて、神経細胞では、膜の脱分極や細胞内遊離Ca²⁺上昇などもエピジェネティック経路を修飾する。従って、脳発達への環境因子の影響を解析するには、NRによる遺伝子発現調節と、細胞膜興奮性・シナプス伝達・神経回路形成など神経特異的な機能との関係を念頭に統合的研究を進めない限り、高次脳機能への影響の解明は難しい。しかし、現在、断片的な研究は散見されるが、全体像を見据えた研究プロジェクトはない。

2. 研究の目的

背景を踏まえ、NRを介する遺伝子発現変化によるシナプス再編や神経伝達への影響を調べるため、in vitroの分子生物学的実験を、モデル動物を用いた2光子励起顕微鏡によるシナプス動態の長期的観察、電気生理学的

解析、および行動解析実験と組み合わせ、統合的に解析する。

3. 研究の方法

課題1 モデル動物を用いた研究

- 1) 周産期にホルモン環境を変化させたり、環境化学物質を投与した動物での行動解析。
- 2) 行動が変化した動物を用いて、2光子励起顕微鏡による、in vivoでシナプス動態の長期的観察、およびin vivo microdialysisによる神経伝達物質分泌動態の長期的観察。
- 3) パッチクランプ法や顕微測光による神経細胞興奮性解析。
- 4) パッチから採取したmRNAを用いて、Single cell PCRにより電気生理学的に変化した単一細胞における遺伝子発現の解析。結果は課題3のin vitro解析につなげる。

課題2 初代培養神経細胞を用いた研究

- 1) ホルモンや環境化学物質投与による形態変化と顕微測光による細胞興奮性を解析。
- 2) Laser capture microdissectionにより形態変化した細胞のRNA採取し、遺伝子発現解析。課題3のin vitro解析につなげるとともに、課題1でのin vivo解析を行う。

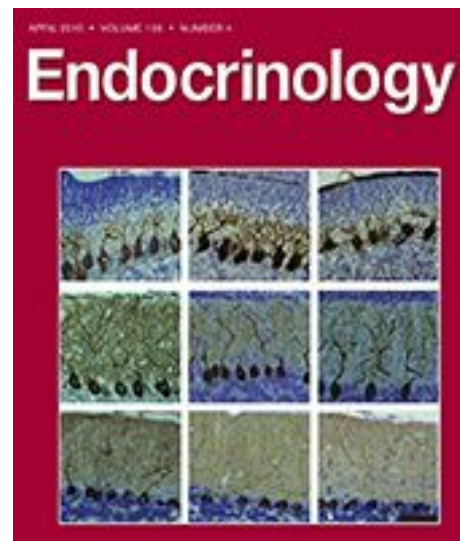
課題3 in vitroでの分子生物学的研究

- 1) 変化した遺伝子が実際にNRを介して作用しているのか、プロモーターのクローニングとレポーターアッセイにより解析する。
- 2) 現在使用していない化学物質の影響を課題2で同定後、NRへの作用点をレポーターアッセイなどで解析し、課題1のin vivo解析へとつなげる。

4. 研究成果

課題1 モデル動物を用いた研究

- 1) 先天性甲状腺機能低下ラット(rdw)やマウス(DUOX KO)を用いて、行動解析を行い、小脳失調が生じていることを明らかにした。この変化は、小脳プルキンエ細胞のみで甲状腺ホルモン作用を抑制するようなマウスで

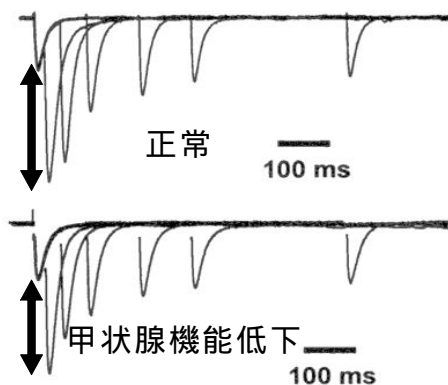


小脳プルキンエ細胞特異的に甲状腺ホルモン作用を阻害した遺伝子改変マウスに見られた小脳発達異常

も生じた。また、胎生期と授乳期に分けて PCB を投与したマウスに異なる行動異常が生じることを明らかにした。

3) 先天性甲状腺機能低下マウスを用いて小脳スライス標本を作成し、パッチクランプを行い、平行線維-プルキンエ細胞のシナプスにおいて特異的に paired pulse facilitation の異常が生じていることを明らかにした。

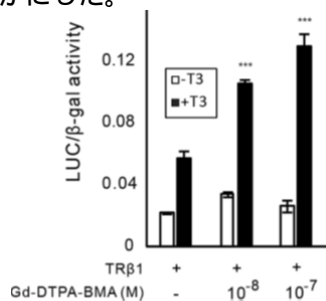
4) 小脳組織全体を採取し、マイクロアレイにより甲状腺ホルモンによる小脳遺伝子発現の変化の網羅的解析を行った。また Laser capture microdissection によりプルキンエ細胞における遺伝子発現の網羅的解析のための準備を開始した。



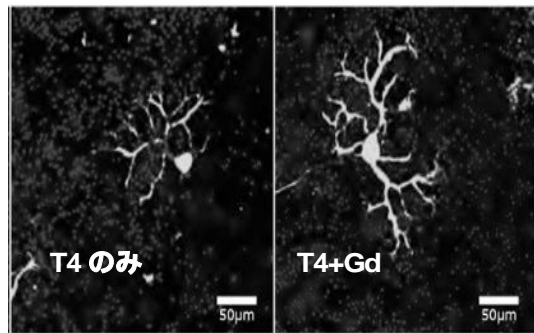
小脳プルキンエ細胞パッチクランプによる Paired pulse facilitation (連続刺激で2回目の脱分極が促進する現象)の甲状腺機能低下による抑制

課題2 初代培養神経細胞を用いた研究
甲状腺ホルモン作用を調べるための海馬の初代培養系を確立(従来の培地は甲状腺ホルモンが入ったものしかなかった)し、神経発達の形態的解析と遺伝子発現の解析を行った。

課題3 in vitro での分子生物学的研究
新規環境化学物質、ガドリニウムキレートについて甲状腺ホルモン系への影響をレポーターアッセイと初代培養系で調べ、甲状腺ホルモン作用が攪乱されることを明らかにした。またイソフラボンについても解析し、甲状腺ホルモン作用を増強させることを明らかにした。



ガドリニウムキレートによるTRを介する転写の促進



ガドリニウムキレート剤による小脳プルキンエ細胞の形態変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計31件)

Ariyani W, Iwasaki T, Miyazaki W, Khongorzul E, Nakajima T, Kameo S, Koyama H, Tsushima Y, Koibuchi N. 2016. Effects of gadolinium-based contrast agents on thyroid hormone receptor action and thyroid hormone-induced cerebellar Purkinje cell morphogenesis. *Front Endocrinol* 7: Article 115 (1-11). doi: 10.3389/fendo.2016.00115

Amano I, Takatsuru Y, Toya S, Haijima A, Iwasaki T, Grasberger H, Refetoff S, Koibuchi N. 2016. Aberrant cerebellar development in mice lacking dual oxidase maturation factors. *Thyroid* 26: 741-752. doi: 10.1089/thy.2015.0034.

Yu L, Iwasaki T, Xu M, Lesmana R, Xiong Y, Shimokawa N, Chin WW, Koibuchi N. 2015. Aberrant cerebellar development of transgenic mice expressing dominant-negative thyroid hormone receptor in cerebellar Purkinje cells. *Endocrinology* 156: 1565-1576. doi: 10.1210/en.2014-1079.

Lesmana R, Shimokawa N, Takatsuru Y, Iwasaki T, Koibuchi N. 2014. Lactational exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCB 106) causes hyperactivity in male rat pups by aberrant increase in dopamine and its receptor. *Environ Toxicol* 29: 876-883. DOI 10.1002/fox. 21815

Shimokawa N, Yousefi B, Morioka S, Yamaguchi S, Ohsawa A, Hayashi H, Azuma A, Mizuno H, Kasagi M, Masuda H, Jingu H, Furudate SI, Haijima A, Takatsuru Y, Iwasaki T, Umezumi M, Koibuchi N. 2014. Altered cerebellum development and dopamine distribution in a rat genetic model with congenital hypothyroidism. *J Neuroendocrinol* 26: 164-175. doi:

10.1111/jne.12135.

Xu M, Iwasaki T, Shimokawa N, Sajdel-Sulkowska EM, Koibuchi N. 2013. The effect of low dose lipopolysaccharide on thyroid hormone-regulated actin cytoskeleton modulation and type 2 Iodothyronine deiodinase activity in astrocytes. *Endocrine J* 60: 1221-1230

Hirooka-Masui K, Lesmana R, Iwasaki T, Xu M, Hayasaka K, Haraguchi M, Takeshita A, Shimokawa N, Yamamoto K, Koibuchi N. 2013 Interaction of silencing mediator for retinoid and thyroid receptors with steroid and xenobiotic receptor on multidrug resistance 1 promoter. *Life Sci* 92: 911-915, doi: 10.1016/j.lfs.2013.03.007.

〔学会発表〕(計 101 件)

Koibuchi N. Endocrine disruptors and brain development. The 12th Asia and Oceania Thyroid Association Congress. March 16-19, 2017, Busan, Korea. (Symposium speaker)

Koibuchi N. Molecular mechanisms of thyroid hormone action on brain development. 3rd IBRO-APRC Advanced School of Neuroscience. Nov. 1-30, 2016. Sunway, Malaysia (Invited speaker).

Koibuchi N. Molecular mechanisms of thyroid hormone action in developing cerebellum. 4th Bandung International Biomelecular Medicine Conferene. Oct. 4-6, 2016. Bandung, Indonesia (invited speaker).

Koibuchi N. Multiple actions of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone-mediated brain development. The 8th Congress Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies. Nov. 22-25, 2015. Bangkok, Thailand. (Symposium Speaker)

Koibuchi N. The effect of thyroid hormone on functional organization of brain and its modulation by environmental chemicals. 1st international and 22nd Iranian Congress of Physiology and Pharmacology. Sept. 7-11, 2015. Kashan, Iran (Plenary Speaker).

〔図書〕(計 14 件)

Gruol DL, Koibuchi N, Manto M, Molianni M, Schmahmann JD, Shen Y (eds). *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*.

Springer, New York, 656 pages. 2016 ISBN 978-3-319-24549-2

Koibuchi N, Yen PM (eds). *Thyroid Hormone Disruption and Neurodevelopment* (209 pages). Springer, New York, pp. 33-49. 2016 ISBN 978-1-4939-3735-6.

岡野栄之, 鯉淵典之, 植村慶一(監訳)(全 874 ページ) 2016 オックスフォード生理学丸善出版 ISBN 978-4-621-30008-4

鯉淵典之, 栗原敏(監訳)(全 629 ページ) 2014 リッピンコットイラストレイテッド生理学丸善出版

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等:

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)
(財) 冲中記念成人病研究所・研究員
研究者番号: 20322646

高鶴 裕介 (TAKARTSURU Yusuke)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30446265

齋島 旭 (HAIJIMA Asahi)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 70555672

(3) 連携研究者

鍋倉 淳一 (NABWKURA Junichi)
生理学研究所・教授
研究者番号: 50237583