様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：１２６０２

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：２６４６１３７６

研究課題名（和文）母体の甲状腺機能低下による子の中枢神経系遺伝子のエピゲノム解析

研究課題名（英文）Epigenetic analysis of gene expression in central nervous system of offspring derived from dam with hypothyroxinemia during pregnancy

研究代表者

橋本　貢士（Hashimoto, Koshi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：３０３９６６４２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：妊娠期の母体の軽度甲状腺機能低下が、児の学習・認知能力低下をもたらすことが知られており、その分子機構の解明を試みた。妊娠2週間前より出産時までマウス母獣にチアマゾール（MMI）を投与し、その産仔(M群)と対照群(C群)を解析した。M群ではC群と比較して、生後70日において水迷路試験の潜時延長を認め、生後28日、70日において海馬におけるBrain-derived neurotrophic factor（BDNF）遺伝子（Bdnf）の発現が低下し、DNAメチル化が増加していた。妊娠期の母獣の軽度甲状腺機能低下が、DNAメチル化を介して仔の海馬における長期のBdnf発現低下をもたらすと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Experimental rodents have shown that maternal hypothyroxinemia during pregnancy may adversely affect neurodevelopment in offspring, resulting in irreversible cognitive deficits. This could be due to persistent reduced expression of hippocampal brain derived neurotrophic factor gene (Bdnf), which plays a crucial role in the central nervous system (CNS) development. However, the underlying molecular mechanism remains unclear. In the current study, we showed that mild maternal hypothyroxinemia during pregnancy induced impaired learning capacity of mouse offspring in adulthood. We also demonstrated that prolonged reduction in hippocampal Bdnf expression of the offspring in according to persistent DNA hypermethylation in the promoter region of Bdnf exon IV. Thus, we provide the first evidence that mild maternal hypothyroixinemia induces persistent DNA hypermethylation in Bdnf in the offspring, which could confer long-term cognitive disorder.

研究分野：内分泌学

キーワード：甲状腺機能低下　妊娠期　BDNF　海馬　学習・認知能力低下　水迷路試験　DNAメチル化　DOHaD

１．研究開始当初の背景

(1) 甲状腺ホルモンは生体の恒常性の維持に不可欠であり、中枢神経系の形成、発達とその機能維持に大きな役割を果たしている。とくに妊娠中の母体の甲状腺機能は胎児・新生児の発育、発達に重大な影響を及ぼすため、妊娠中の潜在性を含む母体の甲状腺機能低下症により、出生児は乳幼児期以後の発達障害、行動認知障害、知能低下などを呈することが知られている。さらに妊娠期間中でもとくに妊娠初期の母体の甲状腺機能低下状態は幼児期の行動認知機能を有意に低下させることが知られている。また妊娠前からレボサイロキシン（L-T_4）を補充されている甲状腺機能低下症の女性が妊娠を予定する場合は、妊娠早期からの T_4 の需要増大に備えて、L-T_4 の増量投与が勧められているが、児の中枢神経系への効果は実験的にはいまだ検証されていない。しかし母親への L-T_4 補充治療が不十分で、母児ともに甲状腺ホルモンが不足した場合には、脳の発達への悪影響は不可避であり、臨床医学的にも妊婦の甲状腺機能低下状態が胎児の中枢神経系にどのように影響するかについての分子メカニズムの解明は急務である。

(2) 一方、多くの疫学調査や動物モデルを用いた研究により、胎生期の環境が成人期における疾患の罹患性を規定する可能性が指摘されている（Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD 仮説）。この DOHaD 仮説の分子基盤の一つとして DNA やヒストンの後天的な修飾による遺伝子発現制御（エピジェネティクス）の機序が関与すると考えられている。

(3) われわれの研究グループは生直後から離乳期にかけてのマウス肝臓で、脂質代謝関連遺伝子プロモーターの DNA メチル化状態が大きく変化することを報告し、(Diabetes 61: 2442-2450, 2012) さらにその DNA メチル化変化は核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor α（PPAR α）を介し、長期に DNA メチル化変化が維持される（「エピジェネティックメモリー」）という先行データを得た。これらの知見から胎生期から乳児期にいたる全身の臓器の可塑性が高い時期では、劇的な DNA メチル化変化（エピゲノム変化）が起こりうること、さらにそのエピゲノム変化が核内受容体を介することが示唆された。

(4)Brain-derived neurotrophic factor（BDNF）は、神経系の発生や学習・認知機能に関連する神経伝達分子である。BDNF 遺伝子発現は甲状腺ホルモンにより正に制御されるが、軽度甲状腺機能低下の母獣の産仔では成長後に甲状腺ホルモン値は正常であっても海馬の BDNF 発現が低下することが報告されている。

２．研究の目的

本研究計画では長期の遺伝子発現制御機構としての DNA メチル化に着目し、妊婦の甲状腺機能低下状態が児の BDNF 遺伝子の DNA メチル化を亢進させることで、長期に発現を低下させるという仮説を立て、検証した。

３．研究の方法

(1)妊娠 2 週間前から出産時にかけてマウス母獣に甲状腺ホルモン合成阻害薬であるチアマゾール（MMI）を投与し（0.025% w/w)、母獣の交配時と出産時に、遊離トリヨードサイロニン（FT_3)、遊離サイロキシン（FT_4）および甲状腺刺激ホルモン（TSH）の血清濃度を測定した。

(2)産仔の生後 28 日（d28)、70 日(d70)の体重、脳組織重量と FT_3 と FT_4 の血清濃度を測定した。産仔の学習・認知機能を d70 に各種行動試験により評価した。

(3) マウス BDNF（***Bdnf***）ゲノムには 9 つの exon が存在するが、特に exon Ⅳを含む転写産物（***Bdnf*** exon Ⅳ）が神経活動時に重要とされる。本研究では、定量的 PCR 法により d28 における産仔の海馬および小脳における ***Bdnf*** exon Ⅳの遺伝子発現を検討した。また、***Bdnf*** exon Ⅳの転写開始点近傍（転写開始点より-148～216 塩基の CpG 部位）の DNA メチル化を Bisulfite Sequence 法により解析した。

(4) d28 および d70 において、海馬での DNA メチル化に関与する分子の遺伝子発現（DNA メチルトランスフェラーゼ（***Dnmt1, 3a*** および ***3b***）、Ten-Eleven Translocations（***Tet1-3***)）を評価した。

４．研究成果

(1) 交配時・出産時ともに MMI 投与群母獣（dam M）の血清 FT_4 値は非投与群(dam C)に比較して有意に減少していたが、血清 FT_3 および TSH 値は両群で有意差はなく、母獣の軽度の甲状腺機能低下状態の誘導を確認した。

(2) MMI を投与した母獣の産仔（M 群）を解析し、対照群（C 群）と比較検討した。d28 および d70 の産仔の体重、全脳重量、血清 FT_3 および FT_4 値は両群間で有意差を認めなかった。また甲状腺ホルモンによって正に発現が制御されている 1 型脱ヨード酵素遺伝子（***Dio1***）の肝臓での発現にも両群で有意差を認めなかった。

(3)各種行動試験を d70 に施行した。小脳、平衡機能を評価する Rota rod test では C 群および M 群で有意差を認めなかった。一方、Morris Water Maze Test では、実験 4 日および 5 日目において、C 群と比較して、M 群で潜時が有意に延長しており、海馬の機能異常

が示唆された。

(4) d28 および d70 の産仔の海馬における ***Bdnf*** の DNA メチル化解析では、転写開始点近傍の各 CpG 部位において M 群の DNA メチル化の亢進が認められた（DNA メチル化率、C 群 vs. M 群、d28：6.4% vs. 9.7%、d70：7.8% vs. 9.9%）。また ***Bdnf*** exon IVの mRNA 発現量は M 群において低下していた。

(5) d28 および d70 の産仔の小脳における ***Bdnf*** の DNA メチル化解析と遺伝子発現には、C 群と M 群の間に有意な差を認めなかった。

(6) d28 および d70 の産仔の海馬における DNA メチルトランスフェラーゼ（***Dnmt1***, ***3a*** および ***3b***）、Ten-Eleven Translocations (***Tet1-3***)）の遺伝子発現には両群で有意差を認めなかった。

(7) 以上の結果から、妊娠期の母獣の甲状腺機能低下が、産仔の海馬における BDNF 遺伝子の DNA メチル化亢進を誘導し、その状態が成獣期まで長期に維持されることで、BDNF 遺伝子発現低下をもたらし、成長後の高次脳機能障害を引き起こす可能性が、初めて示唆された。

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 Hashimoto K, Ota M, Irie T, Takata D, Nakajima T, Kaneko Y, Tanaka Y, Matsumoto S, Nakajima Y, Kurabayashi M, Oyama T, Takeyoshi I, Mori M, Yamada M. A Case of Type 2 Amiodarone-Induced Thyrotoxicosis That Underwent Total Thyroidectomy under High-Dose Steroid Administration. Case Rep Endocrinol, 査読有, 2015, p416145, doi: 10.1155/2015/416145.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25664188

② 橋本 貢士、小川 佳宏 DOHaD 仮説とエピゲノム医療の可能性、医学のあゆみ、査読無、Vol.250、2014、pp859-862

③ 橋本 貢士 甲状腺ホルモンによる遺伝子制御機構 Update、ホルモンと臨床、査読無、Vol.61、2014、pp81-86

④ Hashimoto K, Tagami T, Yamakage H, Muranaka K, Tanaka M, Odori S, Kono S, Shimatsu A, Ogawa Y, Satoh-Asahara N. Serum free thyroxine levels are associated with the efficacy of weight reduction therapy in obese female patients. Endocr J. 査読有, 2016, Vol.63, pp221-229, doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0498.

⑤ 辻本 和峰、橋本 貢士、小川 佳宏 DOHaD の動物モデル、HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY、査読無、Vol. 22、2015、pp281-286

⑥ 橋本 貢士 TSH 測定に関する問題点と潜在性甲状腺機能低下症、医学のあゆみ、査読無、Vol.260、2017、pp735-740

〔学会発表〕（計 5 件）

① 橋本 貢士 新規バイオマーカー Siglec1 によるバセドウ病の再燃、再発予測の確立、第 57 回日本甲状腺学会、2014 年 11 月 13 日、ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター（大阪）

② 橋本 貢士 新規バイオマーカー Siglec1 によるバセドウ病の再燃、再発予測、第 29 回甲状腺眼症研究会、2016 年 3 月 19 日、ステーションコンファレンス東京（東京）

③ 川堀 健一、橋本 貢士、袁 勲梅、辻本 和峰、加瀬 早織、藤田 慶大、田川 一彦、岡澤 均、小川 佳宏 妊娠期甲状腺機能低下マウスにおける産仔の行動異常の DNA メチル化制御、第 53 回日本臨床分子医学会学術総会、2016 年 4 月 15 日、東京国際フォーラム（東京）

④ 川堀 健一、橋本 貢士、袁 勲梅、加瀬 早織、辻本 和峰、藤田 慶大、田川 一彦、岡澤 均、小川 佳宏 妊娠期甲状腺機能低下マウスにおける仔の行動異常とその分子機構の解明、第 89 回日本内分泌学会学術総会、2016 年 4 月 23 日、国立京都国際会館（京都）

⑤ 川堀 健一、橋本 貢士、袁 勲梅、辻本 和峰、加瀬 早織、藤田 慶大、田川 一彦、岡澤 均、小川 佳宏 軽度甲状腺機能低下母獣マウスの産仔における学習・認知機能と Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 遺伝子の DNA メチル化制御の解析、第 59 回日本甲状腺学会学術集会、2016 年 11 月 4 日、虎ノ門ヒルズフォーラム（東京）

〔図書〕（計 1 件）

① 橋本 貢士 他、診断と治療社、甲状腺専門医ガイドブック、2016, 341

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/member/personal/hashimoto.html

６．研究組織
(1)研究代表者
橋本　貢士（HASHIMOTO, Koshi）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授
研究者番号：30396642

(2) 連携研究者
小川　佳宏（OGAWA, Yoshihiro）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70291424

(3) 連携研究者
亀井　康富（KAMEI, Yasutomi）
京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：70300829

(4) 研究協力者
川堀　健一（KAWAHORI, Kenichi）