

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860852

研究課題名(和文) 成長後の神経可塑性を左右する発達脳での転写制御と微量化学物質による破綻機構の解明

研究課題名(英文) Transcriptional regulation in the developing brain that influences on the neural plasticity after maturation and its disruption mechanisms by environmental chemicals

研究代表者

谷田 任司 (Tanida, Takashi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30589453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン受容体(ER) は、正常な脳発達や神経可塑性、社会行動の獲得等に重要な役割を果たす転写因子である。本研究では、ER と高い相同性を持つオーファン受容体であるエストロゲン関連受容体(ERR)の ER に対する作用とラット脳における局在を解析した。また、ERRの転写共役因子PGC-1 の新規バリエーションフォームをラット視床下部より同定し、そのERRの転写活性に対する作用と神経突起伸長作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Estrogen receptor (ER) plays pivotal roles in normal brain development, postsynaptic plasticity, and the pathology of neuropsychiatric disorders. In this study, the roles of estrogen-related receptor (ERR), which has strong homology with ER, in the function of ER was analyzed. The distribution of ERR in the rat brain was also shown. Furthermore, the investigator identified the novel variant form of PGC-1, the transcriptional coactivator of ERR from the rat hypothalamus. The function of this variant form on the ERR transactivity and its effect on the neurite outgrowth were demonstrated.

研究分野：神経解剖学、内分泌・代謝学、胎児・新生児医学

キーワード：エストロゲン関連受容体(ERR) 生細胞イメージング FRAP FRET 神経突起伸長 PGC-1 エストロゲン受容体(ER)

1. 研究開始当初の背景

ADHD や自閉症などの広汎性発達障害の発症に至るメカニズムの1つとして、脳における可塑性の低下が指摘されている。一方、胎児・新生児脳における適切な遺伝子発現により正常な神経回路形成がなされ、ホルモン様作用を有する微量な化学物質の曝露により発達期の転写が攪乱されると、成長後の脳機能に変容を来すことが動物を用いた種々の検討から明らかとなっている。

エストロゲン関連受容体 (estrogen-related receptor: ERR) は、エストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) α と高い相同性を持ち、 α 、 β 、および γ の3つのサブタイプからなる核内受容体である。現在のところ生体内リガンドは見付かっていないが、ホルモンシグナルにクロストークする内分泌学的作用と、好氣的なエネルギー代謝の亢進作用を併せ持つ転写因子として知られている。ERR はビスフェノールや合成エストロゲン、有機塩素系農薬などの環境中微量化学物質との結合能を有することから、これら化学物質が脳発達に影響する際の標的因子としても指摘されている。しかしながら、ERR を介した転写制御が神経可塑性に関与するか否かは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

胎児・新生児脳における ERR を介した転写制御が、成長後の神経可塑性に関与するか否か、また、その転写制御が微量化学物質によって攪乱され得るか否かを、神経可塑性の構造的基盤であるスパインの成長と退縮を指標として評価・検証することを目的として、研究を開始した。

3. 研究の方法

- ・免疫組織化学法および蛍光抗体法による脳における局在解析
- ・GFP およびそのカラーバリエーションを用いた生細胞イメージングと ERR の核内動態解析
- ・海馬由来初代培養細胞を用いた形態学的解析
- ・その他分子生物学的手法

4. 研究成果

ERR の ER α に対する作用

ER α は、正常な脳発達や神経可塑性、情動、社会行動等に重要な役割を果たすことから、ERR の ER α に対する作用について調べた。COS-1 細胞に蛍光標識した各サブタイプの ERR (α 、 β 、 γ) と ER α を共発現させ、エストロゲンを添加すると、核内において β 型のみで ER α と共同在するドットを示した。また、ER α を介した転写活性は各サブタイプの ERR の中でも β 型でのみ抑制されることが示された。

FRAP 解析により、ER α の選択的アゴニスト PPT の存在下で ERR β は ER α の可動性を減少させるが、抗エストロゲン剤である OHT

の存在下では ERR β は ER α の可動性に影響を与えないことが判明した。また、FRET 法により、エストロゲンの存在下で ERR β は ER α と直接的に相互作用を起こすことを示した。

ER α 陽性の MCF-7 細胞に ERR β 発現ベクターを導入すると、細胞増殖は有意に抑制された。また、ER α 標的遺伝子のうち *Bcl-2* の発現は有意に低下したが、*c-Myc* の発現は変化しなかった。以上より、ER α の標的遺伝子には ERR β によって影響されるものとされないものが存在することが明らかとなった。

これらの結果より、ERR β はアゴニストによって活性化した ER α と直接的に相互作用を起こし、その可動性を低下させることでエストロゲンシグナルを調節することが示された。(Tanida et al, J Biol Chem 2015)

ERR α および γ の ER α に対する作用については現在解析中である。

脳における発現と局在

ラット大脳皮質、間脳、脳幹、および小脳において、全てのサブタイプの ERR が発現していることを RT-PCR により確認した。また、脳スライスのパunchアウト片を用いて、ER α リッチな視床下部領域 (MPO, AVPV, VMH, ARC) の全てにおいて ERR (α 、 β 、 γ) が発現していることを確認した。

ラット脳における各サブタイプの ERR の局在については、 γ 型でのみ免疫組織化学法を用いた詳細なデータが得られているので報告する。NeuroTrace を用いた対比染色により、脳における ERR γ 陽性 (-ir) 細胞がニューロンであることを確認した。単位面積当たりの ERR γ -ir ニューロン数を計測した結果、circular 核、視床網様核、不確帯、脚間核、橋核、傍孤束核においては特に顕著に ERR γ -ir ニューロンが認められた。また、前庭聴覚機能に深く関与する前庭神経核、下丘、内耳神経核、台形体核においても、強い陽性を示す ERR γ -ir ニューロンが認められた。

視索前野の代表的な ER α 陽性部位である AVPV と MPO について、ERR γ -ir、ER α -ir、および ERR γ /ER α doubly-ir ニューロンの密度を解析し定量化したところ、全 ERR γ -ir ニューロン数に占める ER α -ir ニューロン数の割合は AVPV よりも MPO の方が有意に高く、全ニューロン数に占める ERR γ -ir ニューロン数の割合は AVPV-MPO 間で有意な差は無かった。

以上より、ERR γ は ER α 陽性および陰性の両方のニューロンに発現し、その割合は部位によって異なっていたことから、ERR γ の脳における機能は部位特異的にエストロゲンの影響を受けることが示唆された。(Tanida et al, Brain Res 2017)

海馬由来初代培養細胞を用いた解析

初年度確立した Thy1-GFP 系マウス胎児の海馬初代培養系は、GFP 発現神経細胞の少な

さ、交配頻度の低さ、産仔数の少なさより取りやめ、Wistar系ラット胎児の海馬初代培養系を確立し、GFPあるいはそのカラーバリエーションを導入して使用することとした。神経可塑性の構造的基盤であるスパインの形態変化については、現在解析中である。神経突起の伸長に関して知見を得たので後述する。

PGC-1 α 新規バリエーションフォームとERR

ERR α および γ の機能を解析するため、これら各サブタイプの転写共役因子であるPGC-1 α との相互作用に着目し、ラット脳よりPGC-1 α をクローニングした。その過程で、視床下部よりPGC-1 α の新規バリエーションフォームを同定した(DDBJ登録済み、2018年度公開予定)。

当バリエーションのラット全身における分布をRT-PCRにより解析したところ、脳においては大脳皮質、脳幹、視床下部、小脳等の複数の領域で強い発現を示した。末梢組織では肝臓、胃、腎臓においては強い発現が認められたが、PGC-1 α を豊富に発現する心筋では当バリエーションの発現は比較的弱く、骨格筋においてはほとんど発現は認められなかった。*In silico*での解析より、当バリエーションはヒトおよびマウスでも保存されていることが分かった。

当バリエーションはPGC-1 α と同様、転写活性化領域と核内受容体との相互作用領域を有することから、各サブタイプのERRの、応答配列(ERRE)を介した転写活性に対する作用を解析した。その結果、当バリエーションはいずれのサブタイプの転写活性も促進したが、中でもERR γ の転写活性を特に顕著に亢進した。更に、ラット胎児の海馬由来初代培養細胞に当バリエーションを発現させると、神経突起の伸長が有意に促進された。

胎児・新生児期においてERR γ は海馬を含めた脳領域で強く発現することから、本研究で見出されたPGC-1 α の新規バリエーションフォームはERR γ の標的遺伝子の発現を亢進させることで、幼弱期の神経突起伸長に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- 1) **Tanida T**, Matsuda KI, Yamada S, Kawata M, Tanaka M. Immunohistochemical profiling of estrogen-related receptor gamma in rat brain and colocalization with estrogen receptor alpha in the preoptic area. **Brain Research** 2017, 1659: 71-80 (査読有り)
- 2) Ishibashi H, Tonomura H, Ikeda T, Nagae M, Sakata M, Fujiwara H, **Tanida T**, Mastuda KI, Kawata M, Kubo T. Hepatocyte growth factor/c-Met promotes proliferation, suppresses apoptosis, and improves matrix metabolism in rabbit nucleus pulposus cells in vitro. **Journal of Orthopaedic Research** 2016, 34: 709-716 (査読有り)

有り)

- 3) **Tanida T**, Matsuda KI, Yamada S, Hashimoto T, Kawata M. Estrogen-related receptor β reduces the subnuclear mobility of estrogen receptor α and suppresses estrogen-dependent cellular function. **The Journal of Biological Chemistry** 2015, 290: 12332-12345 (査読有り)
- 4) **Tanida T**, Tasaka K, Akahoshi EI, Ishihara-Sugano M, Saito M, Kawata S, Danjo M, Tokumoto J, Mantani Y, Nagahara D, Tabuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Kawata M, Hoshi N. Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin transactivates aryl hydrocarbon receptor-responsive element III in the tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons of the mouse midbrain. **Journal of Applied Toxicology** 2014, 34: 117-126 (査読有り)
- 5) Takanami K, Sakamoto H, Matsuda KI, Satoh K, **Tanida T**, Yamada S, Inoue K, Oti T, Sakamoto T, Kawata M. Distribution of gastrin-releasing peptide in the rat trigeminal and spinal somatosensory systems. **Journal of Comparative Neurology** 2014, 522: 1858-1873 (査読有り)
- 6) Hoshi N, Hirano T, Omotehara T, Tokumoto J, Umemura Y, Mantani Y, **Tanida T**, Warita K, Tabuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H. Insight into the mechanism of reproductive dysfunction caused by neonicotinoid pesticides. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2014, 37: 1439-1443 (査読有り)

〔学会発表〕(計18件)

○**谷田任司**, 松田賢一, 山田俊児, 河田光博, 田中雅樹. 好気性代謝制御因子 PGC-1 α のスプライシングバリエーション PGCvf の細胞内動態と転写調節機構. 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017年3月28日~30日, 長崎大学

○**谷田任司**, 松田賢一, 山田俊児, 河田光博, 田中雅樹. 好気性代謝制御因子 PGC-1 α のスプライシングバリエーション PGCvf の細胞内動態と乳酸応答性. 第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日~12月2日, パシフィコ横浜

○**谷田任司**, 松田賢一, 山田俊児, 河田光博, 田中雅樹. エストロゲン関連受容体 ERR γ のラット脳における局在とその視索前野におけるエストロゲン受容体 ER α との共局在. 第92回日本解剖学会近畿支部学術集会, 2016年11月27日, 近畿大学

○山田俊児, 杉本有沙, 上野山賀久, **谷田任司**, 松田賢一, 河田光博, 束村博子, 田中雅樹. 授乳期における弓状核 Kiss1 遺伝子制御メカニズムの解明. 第 43 回日本神経内分泌学会学術集会, 2016 年 10 月 14 日~15 日, アクトシティ浜松コンベンションセンター

○ Hidenobu Ishibashi, Hitoshi Tonomura, Takumi Ikeda, Masateru Nagae, Ryota Takatori, Munehiro Sakata, **Takashi Tanida**, Ken-Ichi Mastuda, Toshikazu Kubo. Hepatocyte Growth Factor / c-Met Suppresses Apoptosis and Matrix Degradation Induced By TNF- α In Rabbit Nucleus Pulposus Cells In Vitro. THE ORS 2016 ANNUAL MEETING (Orthopaedic Research Society) Mar 5-8, 2016, Disney's Coronado Springs Resort Orlando, FL

○**谷田任司**, 松田賢一, 山田俊児, 河田光博. 好気性エネルギー代謝制御因子 PGC-1 α /ERR γ の細胞内動態. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2016 年 3 月 28 日~30 日, ビッグパレットふくしま

○**Takashi Tanida**, Ken Ichi Matsuda, Shunji Yamada, Takashi Hashimoto, Mitsuhiro Kawata. Estrogen-related receptor β affects subnuclear dynamics of estrogen receptor α and estrogen-dependent cellular function. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015), 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸国際会議場・展示場 [selected speaker]

○**Takashi Tanida**, Ken Ichi Matsuda, Shunji Yamada, Takashi Hashimoto, Mitsuhiro Kawata. Co-regulation of estrogen signaling by estrogen receptor α and estrogen-related receptor β . 第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (JSHC), 2015 年 10 月 3 日~4 日, 関西医科大学

○山田俊児, **谷田任司**, 松田賢一, 河田光博. 片側乳頭結紮による神経伝達阻害が授乳ラットの脳に及ぼす影響. 第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (JSHC), 2015 年 10 月 3 日~4 日, 関西医科大学

○**谷田任司**, 松田賢一, 山田俊児, 橋本 隆, 河田光博. エストロゲン受容体 ER α とエストロゲン関連受容体 ERR β によるエストロゲンシグナル共調節機構. 第 42 回日本神経内分泌学会 第 23 回日本行動神経内分泌研究会 合同学術集会, 2015 年 9 月 18 日~19 日, 仙台市戦災復興記念館

Hidenobu Ishibashi, Takumi Ikeda, Hitoshi Tonomura, Munehiro Sakata, Masateru Nagae, Yasuo Mikami, Hiroyoshi Fujiwara, **Takashi Tanida**, Ken-ichi Matsuda, Mitsuhiro Kawata,

Toshikazu Kubo. Hepatocyte Growth Factor/c-Met Has Proliferation Promoting And Anti-apoptosis Effects on Rabbit Nucleus Pulposus Cells In Vitro. The Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting, Mar 28-31, 2015, MGM Grand Hotel, LAS VEGAS, NV

○**谷田任司**, 松田賢一, 山田俊児, 橋本 隆, 河田光博. エストロゲン受容体 ER α とエストロゲン関連受容体 ERR β によるエストロゲンシグナルの共調節. 第 22 回日本行動神経内分泌研究会 (JSBN) 学術集会 [解剖学会・生理学会合同大会サテライトミーティング] 2015 年 3 月 24 日, 神戸大学統合研究拠点コンベンションホール

○Taisuke Uemura, **Takashi Tanida**, Ken Ichi Matsuda, Yu Sakaue, Yuki Takeda, Shunji Yamada, Mitsuhiro Kawata. Intracellular dynamics of estrogen-related receptors. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回日本生理学会大会 合同大会, 2015 年 3 月 21 日~23 日, 神戸国際会議場・展示場

○**谷田任司**, 松田賢一, 橋本 隆, 山田俊児, 河田光博. エストロゲン関連受容体 ERR β によるエストロゲンシグナル調節機構. 第 22 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 (内分泌ウィーク 2014), 2014 年 11 月 3 日, 都道府県会館 (東京)

○高浪景子, 坂本浩隆, 宮崎直幸, 村田和義, 佐藤慧太, 坂本竜哉, **谷田任司**, 山田俊児, 松田賢一, 河田光博. かゆみを伝える神経ネットワーク. 第 41 回日本神経内分泌学会学術集会 (内分泌ウィーク 2014), 2014 年 10 月 31 日~11 月 2 日, 都道府県会館 (東京)

○**Takashi Tanida**, Ken Ichi Matsuda, Takashi Hashimoto, Shunji Yamada, Mitsuhiro Kawata. Estrogen-related receptor β reduces subnuclear mobility of estrogen receptor α and suppresses estrogen-dependent cellular function. The International Congress of Neuroendocrinology 2014 including the 18th Annual Meeting of the Society for Behavioural Neuroendocrinology (ICN2014), Aug 17-20, 2014, Hilton Sydney, Australia

○Keiko Takanami, Hirotaka Sakamoto, Ken Ichi Matsuda, Keita Satoh, **Takashi Tanida**, Shunji Yamada, Kaihei Inoue, Takumi Oti, Tatsuya Sakamoto, Mitsuhiro Kawata. Neural circuit of the itch to consider from the expression of gastrin-releasing peptide in the rat somatosensory systems. 18th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (IFAA2014), Aug 8-10, 2014, Beijing, China

○石橋秀信,池田 巧,外村 仁,長江将耀,
三上靖夫,水野健太郎,野々村卓,阪田宗弘,
谷田任司,松田賢一,河田光博,久保俊一.
肝細胞増殖因子の培養髄核細胞に対する効果の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014 年 10 月 9 ~ 10 日, 鹿児島市城山観光ホテル

〔その他〕

京都府立医科大学 解剖学・生体構造科学
ホームページ
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anatomy1/>

6. 研究組織

研究代表者

谷田 任司 (TANIDA, Takashi)

京都府立医科大学 大学院医学研究科 助教

研究者番号：30589453