

甲状腺ホルモン、脳の発達、および環境

R. トーマス ゴラー

米国 マサチューセッツ大学

ご紹介ありがとうございます。最初に、お招き下さった主催者に感謝したいと思います。このシンポジウムに参加することは私にとって喜びであり名誉であります。

最初のトピックは、3つのかなり大きな学問分野、もしくは3つの異なる実験文献群が共有する領域についてです。その3つとは、甲状腺機能、脳の発達、そして環境の問題です。ここで言う、環境とは環境毒性を意味します。

甲状腺ホルモンと脳の発達に関する我々の考え方は、両生類の変態とヒトのクレチン病という2つの顕著な事例により影響を受け、形成されています。

両生類の変態とは、動物に水生から陸生への完全な形質転換をもたらす非常に顕著で劇的な一連の変化です。甲状腺ホルモンがなければ変態は起こりません。甲状腺ホルモンが ON/OFF スイッチの役割を果たしていると言いたいのではなく、変態は甲状腺ホルモンが必須である顕著な一連の過程であるということです。同様に、クレチン病は、発達段階における非常に顕著で劇的な甲状腺ホルモンの欠如の結果です。これらの2つの事例は何れも脳の発達における甲状腺ホルモンの重要性を我々に気付かせるものでした。また、そのことから母親の甲状腺ホルモンの軽度な変化の脳の発達に及ぼす作用の研究を開始することになりました。これらの影響は顕著ではなく、我々の子供たちにははっきりと劇的に起こるものではありませんが、集団を用いた研究では明らかにされています。

例えば、1999年に“New England Journal of Medicine”で Haddow が発表した研究は、正常範囲より低い甲状腺機能を示す女性たちの出生子のIQ値が7から10ポイント低く、多動症の発現率が高いと報告しています。

これらの知見や他の同じような研究の多くは、甲状腺ホルモンが出生の前で重要であることを示唆しています。しかし、我々は胎児の脳の発達における甲状腺ホルモンの役割については事実上何も分かっていません。

そこで、私の研究室では胎児の脳の発達における甲状腺ホルモンに関する研究を開始し、最初の焦点は胎児の大脳皮質の甲状腺ホルモン感受性遺伝子を同定することとしました。そして胎児が自分自身で甲状腺ホルモンを生成することができない時期の胎児の発達に焦点を合わせました。この方法により、母親の甲状腺ホルモンと胎児の脳の発達の関係を明らかにしようとしたわけです。

我々は甲状腺ホルモンにより制御される遺伝子の同定を試みました。なぜなら、そのような遺伝子の発現部位を特定できれば、脳のどの部分が甲状腺ホルモンに応答するのかを理解できると考えたからです。さらに、これらの遺伝子によってコード化されるタンパク質の種類が分かれば、特定の発達上の段階で甲状腺ホルモンが果たす役割をある程度知ることができるかもしれないと思ったからです。

この戦略は、現在までわかっている甲状腺ホルモン作用メカニズムに基づいて設計しました。従って、私がここでまずお話ししたいのは、甲状腺ホルモン作用を制御するいくつかの機序の簡単な説明です。

最初に、甲状腺ホルモン受容体は他の受容体と連係して作用します。甲状腺ホルモン受容体とその他の受容体の2つがひと組のダイマーを形成します。リガンドが結合していない状態では、このダイマーはコリプレッサーと呼ばれるタンパク質に結合しています。このコリプレッサーは、甲状腺ホルモン受容体と基本転写因子を連動させ、ターゲット遺伝子転写の抑制を生じさせます。

甲状腺ホルモンは標的細胞中に活発に送られ、それが調節段階となります。次に、 T_4 が脱ヨウ素酵素により T_3 に変換されます。その T_3 は甲状腺ホルモン受容体に結合し、それによりコリプレッサーが放出し、コアクティベータと甲状腺ホルモン受容体が結合します。このタンパク質は甲状腺ホルモン受容体と基本転写因子を連動させて、遺伝子発現または標的遺伝子発現の制御を生じさせます。これは単純そうに聞こえますが、考慮すべき重要な問題がいくつかあります。

まず、甲状腺ホルモン作用は非常に幅広いことです。すなわち、甲状腺ホルモンで制御される遺伝子には、甲状腺ホルモン受容体の存在が必須ですが、それだけでは十分ではありません。つまり、受容体の存在がその標的遺伝子に対する甲状腺ホルモンの制御を単独で司っているわけではないことが分かっています。

ホルモン作用に不均質性が存在すると我々が考えているその理由のいくつかをここに示しています。まず、甲状腺ホルモン受容体には複数のタイプ、 α と β があります。また、これらの受容体はレチノイン酸受容体および他のステロイド受容体スーパーファミリーの一部とヘテロダイマーを形成することができます。また、受容体を介する甲状腺ホルモン作用の影響を左右する可能性がある大きな要因は、多くのコファクターが種々の異なった組合せを形成することです。

従って、これらの知見は、発達の特定の時期における1個の細胞または1種類の細胞種における甲状腺ホルモンの作用を一般的な現象として解釈できないことを意味します。そのため、我々は実験をすすめるにあたり、経験的にならざるを得ませんでした。

これは我々の最初のアプローチ法を示しています。この方法は、甲状腺ホルモンによって促進又は抑制的に調節される遺伝子の同定を可能にする mRNA ディファレンシャルディスプレイを利用した法で、これが我々の最初のアプローチです。私がここで指摘したい点とは、我々がこれまでのところ同定したすべての遺伝子が胎生16日目の大脳皮質の脳室層に選択的に発現していたということです。

皮質脳室層で起っているプロセスは2種類あるので、この場所は重要です。1つは増殖、もう1つは分化です。我々はこれらの遺伝子の分布地図を作成し、ここに1つの例を示していますが、詳細はあまり重要ではありません。いずれの場合も、遺伝子の発現はこの脳室層に限定され、その層が消失するとこの遺伝子も消失します。

この図はこの増殖過程を表しております。細胞はこの脳室層で増殖し、一旦増殖を停止して分化し始めると、脳室層から消失します。従って、我々の最初の仮説は、甲状腺ホルモンが増殖を制御しているということでした。

しかし、プロモデオキシウリジン (BrdU) を使用した研究で我々が発見したのは、細胞増殖に対する甲状腺ホルモンの作用を示す証拠はないということです。我々はこの実験を繰り返し確認しただけではなく、別の細胞増殖の測定法も使用しましたが、甲状腺ホルモンの作用を確認することがまったくできませんでした。この図を見ると、神経幹細胞が分化し始めたときに、その細胞が神経細胞の幹細胞になるかグリア細胞の幹細胞になるかを定めることとなるのが分かります。それを制御していると思われるスイッチは、「ノッチ」と称される伝達系と関連しています。

我々の最初のスクリーニングの1つで、我々が甲状腺ホルモン感受性と同定した遺伝子の1つは「HES」と称される遺伝子です。HESはノッチシグナルで制御される転写因子です。「ノッチ」は細胞膜内に局在する受容体です。ノッチはリガンドに結合しますが、複数のノッチリガンドが存在します。これらのリガンド自身も細胞膜中に局在するため、このシステムは細胞間の接触依存的な信号伝達システムです。

ノッチ受容体が結合すると、細胞内ノッチドメインが分割され、細胞核内に自由に移動できるようになり、そこで別の1つ以上の因子と結合してHESの発現を制御します。研究で分かったことは、HES発現がグリア形成を促進するという事です。すなわち、HES発現がグリアの生産の基点になります。

我々が発見したのは、甲状腺ホルモンがHES発現を促進するという事です。甲状腺ホルモン合成を低下させるプロピルチオウラシルと称される薬剤を動物に投与するとHESの発現が低下します。甲状腺ホルモンを補充すると、すなわち、一時的に甲状腺ホルモンを急性投与すると、HES発現が促進し、この*in situ*ハイブリダイゼーション実験で見られるように、HES発現に対するPTUの作用を観察することができます。

興味深い点は、HESに対する甲状腺ホルモンの作用に類型があることです。ここに示しているのは、2つの観察に基づいた我々の作業仮説です。脳の前部では、甲状腺ホルモンに感受性を示すのは皮質部の腹外側部です。脳の尾側部では、背外側部です。それで私はここで推定して、感受性が高い部位が実際にこのように見えるかを疑いましたが、それが我々の仮説です。

ですからまず、甲状腺ホルモン作用に類型があります。

これらの研究は、母親由来の甲状腺ホルモンが胎児の脳における遺伝子発現に特異的な影響を及ぼしていることを示唆しています。胎児の大脳皮質の脳室層が選択的標的であると思われます。甲状腺ホルモンが生まれ

る細胞数に影響を及ぼしているようには思われません。甲状腺ホルモンは恐らくノッチ信号を増加させて HES 発現を促進しています。また、甲状腺ホルモンは増殖に影響を及ぼしていないため、我々は甲状腺ホルモンが作り出されるニューロンとグリアの比率を変化させるまたは調整しているのではないかと考えています。

このことの内分泌攪乱に関する第一の意味は、母親の甲状腺ホルモンまたは甲状腺機能に影響を与える因子が胎児の脳皮質の発達に影響を及ぼす可能性があるということです。胎児の甲状腺機能が発現する前に、母親の甲状腺機能を抑制するいずれの因子も胎児の脳発達に影響を及ぼす可能性があり、また、甲状腺ホルモン作用を直接遮ったり修飾したりするあらゆる因子が胎児の発達に影響を及ぼす可能性があります。以上の点から、特に脳の発達という事例における甲状腺機能や甲状腺ホルモン作用を遮る環境内化学物質の試験方法に関する私の考えは直ちにまとまらなくなりました。

この図に示している通り、視床下部は脳下垂体を制御し、脳下垂体は TSH と称されるホルモンを分泌し、TSH は甲状腺を活性化して甲状腺ホルモン T_3 と T_4 を生産します。血液中に入ると、 T_3 と T_4 は視床下部と脳下垂体の機能に負のフィードバック作用を生じさせます。

毒物学的研究では一般に実施されている測定は、 T_3 、 T_4 、および TSH であり、時にある種の異常の測定として甲状腺病理組織を検査します。しかし、これには2つの問題があります。

第一に、ある組織の甲状腺ホルモン作用を阻害する化学物質は、必ずしも血中の甲状腺ホルモン濃度や甲状腺組織に影響を与えないかもしれません。たとえ甲状腺組織に病理学的な変化を認めてもその事が生体に対する有害作用という観点から意味のある事なのか、またこの組織変化が上記のホルモン分泌の変化を生じさせているのか、正しく説明する事が困難な時があります。従って一般的な考え方は、甲状腺が過形成を生じ、それが癌化するようであれば有害作用であるという事だけで、脳の発達とは関係がありません。

従って、我々は環境因子が甲状腺ホルモン作用に直接影響を及ぼす可能性があるという考えを検証し始めました。我々は、ポリ塩化ビフェニール類、すなわち PCB 類に焦点を置くことに決めました。PCB 類は甲状腺ホルモンに似た構造をしています。このことが重要であること示す複数の実験観察があります。

第一に、PCB 類同族体の混合物や単体の PCB は、血液中の T_3 と T_4 の総量を減少させる事が良く知られています。また、あまり一般的ではありませんが、時として TSH にも影響を及ぼすことがあることが知られています。また、ヒトでは、甲状腺機能の測定値と PCB 濃度との間に関連性があります。

それで我々の最初の実験では、小脳の出生後の時点に注目しました。これがこの研究を行った理由です。これは2つの異なるグループにおける甲状腺ホルモン感受性遺伝子の例です。この青色は正常グループで、甲状腺機能低下症のグループは赤色です。

この限られた期間に、甲状腺機能低下症の動物には遺伝子発現の減少が見られます。これは一過性です。この時期よりも発達の初期または後期に観察すると、このような甲状腺ホルモンの作用を見ることはできません。そこで我々はこの遺伝子の発現を観察するため、この出生後15日目に焦点を置きました。どの遺伝子を用いるかはそれほど重要ではなく、単に甲状腺ホルモン感受性遺伝子であればかまいません。

我々は胎生6日目から母親に与えた0から8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ までの4種の用量の PCB 類の作用を評価しました。我々が発見したのは、出生仔の T_4 および T_3 の血中濃度が PCB の用量依存的に減少したことです。ここに示す通り、最大用量の PCB では T_4 濃度は実際に検出不可能ですが、体重への影響はありません。

プロピルチオウラシルで T_4 濃度を低下させていたならば、体重の低下があったでしょうから、(甲状腺ホルモン低下が体重減少につながらないという) 解離現象がはじめて観察されました。

出生後15日目の脳の RC3 mRNA を観察した際に、PCB によりこの遺伝子の発現に著しい上昇を認めました。このシステムでは PCB 類が甲状腺ホルモンのような作用をしていることを疑わせる2つの観察があります。

1つは、RC3 発現に対し甲状腺ホルモンが作用を及ぼす脳の部位は非常に特異的です。歯状回と皮質部には特異的な影響が見られますが、海馬または皮質部の他の部分には影響は見られませんでした。それが PCB 類で実際に我々が観察したことです。従って、このような RC3 の発現増加は歯状回と皮質部のみに観察されました。

第二に、脳皮質の1つ1つの細胞の分析を行ったとき、PCB 処置が RC3/ニューログラニン mRNA の細胞内濃度を上昇をさせました。したがって転写作用に影響を及ぼしている事が考えられます。

次に、胎児を観察することとしました。我々が最初に発見したのは、PCB 類を追加しても母親の甲状腺ホルモン濃度に影響を及ぼさなかったことです。従って、この時期、すなわち胎生16日目では母親の T_4 、 T_3 、また

は TSH には全く影響がありません。しかし、我々は HES の発現増加を観察しました。ここに HES-1 と HES-5 がありますが、それについては取り上げません。

また、我々は PCB が HES 発現に甲状腺ホルモンと同じ脳の部位特異的変化パターンを生じさせることを観察しました。また、胎児において複数の他の甲状腺ホルモン感受性遺伝子を観察したところ、すべての遺伝子が PCB 類により制御されていることが示され、PCB 類が甲状腺ホルモン様の作用をしているという仮説と一致するものでした。

これが意味することは、PCB 類が信号伝達ではなく、恐らく、甲状腺ホルモン依存型の機序を介して、脳の特定の部分で生産されるニューロンとグリアの比率を変化させているまたは調整しているということです。

結論として、甲状腺ホルモン感受性遺伝子の発現に対する PCB 類の混合物の作用は、PCB 類による甲状腺ホルモンの血中濃度の変化とは関係がありません。私は混合物中の特異的な同族体または PCB 同族体のなかの特異的代謝産物が甲状腺システムに異なる影響を及ぼす可能性を提唱します。すなわち、いくつかの PCB 同族体が T_4 の血中濃度の低下に関与している可能性がある一方、他の物質が直接受容体と相互作用している可能性があるということです。

ある特異的同族体が直接甲状腺ホルモン受容体と相互作用している可能性があるということは、その同族体が甲状腺ホルモン受容体 α および β の各アイソフォームに特異的な形で異なった相互作用をしているか、または甲状腺ホルモンの受容体に他の薬理学的作用を及ぼしている可能性があることも示唆しています。しかし、これらの可能性は従来のスクリーニングプログラムでは検出できないかもしれません。ご清聴ありがとうございました。

質疑応答

鯉淵：どうもありがとうございます。ディスカッションの時間を取りたいと思います。聴衆の皆さんからご質問はありませんか？はい、どうぞ。

質問：非常に素晴らしいお話しでした。私の質問は、PCB 類のような甲状腺作用薬の作用は従来の試験方法では検出できない可能性が高いというあなたのお考えについてです。というのは、我々は従来の試験方法への追加的手法を開発中であるため、我々が行っていることが正しいのかどうかを確認したいのです。

あなたの研究では、基本的に、あなたが使用している PCB 同族体は、PTU とは異なり、直接的な甲状腺ホルモン受容体作用薬として作用するように私には思えました。また、脳下垂体レベルでもそのように作用し、血中の T_3/T_4 濃度が低下したことを観察されたようですね。では、血中のホルモン濃度を測定することで、それを検出することはできないでしょうか？

ゾラー：私もそれについてかなり考えました。結論を言うと、少なくとも私の考えですが、甲状腺ホルモンの低下を有害作用であると見なす場合は、低下を防ぐ何らかの対策を講じる事ができます。しかし、私は一度たりとも甲状腺ホルモン濃度の低下自体を本質的な有害作用とみなす例を見たことがありません。

私が考えている最も大きな問題は、甲状腺ホルモン濃度自体の変化を観察していない時の問題です。来年くらいには、甲状腺ホルモンの濃度には影響を及ぼさずに脳の甲状腺ホルモン作用に影響を及ぼす同族体 — 個別の PCB 同族体または代謝産物 — を私は発見できると思います。

血中甲状腺ホルモン濃度に何の影響も及ぼさない化学物質の構造が十分に分かるまでは、我々はこのような危険を抱え続けるでしょう。現時点では甲状腺ホルモン濃度は試験方法の選択肢の 1 つとして残ると思いますが、甲状腺ホルモン濃度に過度に頼ることには注意する必要があると思います。このことは甲状腺ホルモン濃度の低下が有害作用と解釈されない場合には特に重要です。

鯉淵：ありがとうございます。次の質問はありませんか？何か質問はありませんか？はい、どうぞ。

質問：甲状腺ホルモンにより制御される HES mRNA の発現に関して 1 つ質問があります。あなたは、HES mRNA の発現は甲状腺ホルモンによって制御されるとおっしゃいましたが、HES mRNA の発現はノッチ信号によっても制御されます。

私はノッチメッセンジャーの発現自体が甲状腺ホルモンによって制御されているかどうかを疑問に思っています。

ゾラー：それは非常に良い質問であると共に非常に興味深いことです。私は、HES 自体が直接甲状腺ホルモンによって調節されているとは思いません。むしろ、甲状腺ホルモンは HES 発現調節経路の要素の 1 つに影響を及ぼしていると思います。甲状腺ホルモンがリガンドの発現を調節しているのかもしれませんが。この時期の脳室領域には 3 種のノッチ受容体が存在し、さらに受容体の分割を生じるガンマセクレターゼ活性も見られます。

我々は、連続的にそれぞれを精査するための反復実験を進めていますが、現在のところは答えを見つけていません。しかし、それは非常に重要な問題です。

質問：ノッチまたは HES 遺伝子のプロモーター上における甲状腺ホルモン反応性因子を扱った研究を調査されたことはありますか？

ゾラー：それも本当に良い質問です。そして恐らくここにいらっしゃる他の方々はこのについて異なる意見があるかと思います。TRE、すなわち遺伝子上の甲状腺ホルモンの応答配列は非常に多種類です。培養実験に使用する標準的な配列がありますが、その標準配列は実のところ人工的な配列であり、既知の甲状腺ホルモン反応性遺伝子の応答配列を代表するものではありません。実際、そのことが、我々がこのような経験的方法で研究を開始した理由です。

我々は、実際に様々な遺伝子で標準的な TRE 配列を探しましたが、それらを発見しておりませんが、その事から甲状腺ホルモンによって直接的に制御されていないと言うことはできません。

質問：どうもありがとうございます。

鯉淵：他に質問はありませんか？

質問：素晴らしいお話でした。短い質問をします。どの PCB またはアロクロルをあなたが使用されているか聞き逃したのですが。

ゾラー：アロクロル 1254 です。

質問：分かりました。それでは、あなたは実際に特定の代謝産物を観察されたどうか、あるいは、どのような方法で観察しようと考えておられるかお聞かせ下さい。というのは、あなたとすでに議論しましたが、実際に甲状腺受容体と直接結合することが分かっている化合物はまだ明らかになっていないからです。私が知っているところでは、血中の甲状腺ホルモン濃度を変化させていることが示唆されているだけです。従って、PCB 類に関して、我々が進むべき方向を示した何らかの研究所見は持っておられますか。

ゾラー：決定的な答えは得ていません。我々は 2 つの方向から考察する方法を取っています。

1 つは、*in vivo* で、このアロクロル混合物を、甲状腺ホルモン系に影響を及ぼすと考えられる 3 種類のクラスを代表する 6 つの同族体に減らしたことです。それら *in vivo* 研究は現在進行中です。

同時に、我々は親化合物と同族体を観察するための甲状腺ホルモン受容体結合アッセイを確立しました。従って、これら両方の方法を用いて、直接結合することがあるとすれば、どの PCB が直接結合するかを判断します。

質問：ポリ臭化ビフェニールについては観察されたことはありますか？

ゾラー：ありませんが、それは本当に重要視されるようになると思います。受容体にとっては、ポリ臭化ジフェニルエーテルは、PCB 類よりも結合し易いと思います。

質問：そのとおりです。ありがとうございます。

鯉淵：次の質問はありませんか？

質問：優れたプレゼンテーションをありがとうございます。私は、これらの環境中の内分泌攪乱化学物質が、レセプターに直接結合したり、ホルモン濃度を変調させたりするだけでなく、異なる核受容体の作用に強い影響を及ぼすことができるために、コアクティベーターやコリプレッサーなどの経路中に一

般に見られるタンパク質に影響を及ぼして作用しているという機序に興味を覚えました。また、あなたの研究室や他の研究室で、コアクティベータータンパクやコレギュレータータンパクに対する内分泌攪乱化学物質の影響について調査したことがあるかどうか興味があります。

ゾラー：我々は実際にそれを行いました。我々は、SRC-1 と N-CoR の甲状腺ホルモンによる制御を観察しました。なぜなら、この 2 つは、甲状腺ホルモン受容体と相互作用することが知られており、実際に生後 15 日の脳で SRC-1 と N-CoR の双方に対する甲状腺ホルモンの強力な影響を観察しました。PCB は、この 2 つの遺伝子の発現に影響を及ぼすことができませんでした。

すなわち、甲状腺ホルモンと PCB 作用に解離がみられました。しかし、あなたのご指摘は良く分かります。つまり、RU486 と黄体ホルモン受容体の場合のように、発現濃度だけではなく、受容体がそれらコアクティベーターとどのように相互作用するかが、黄体ホルモン受容体とコリプレッサーやコアクティベーターとの相互作用を変調させることがあるということでした。

従って、我々の *in vitro* 研究では、それが作用物質、拮抗物質、または混合した作用物質のどの働きをするかを調査しています。

質問：ありがとうございます。

鯉淵：甲状腺ホルモンによって制御される SRC-1 とコリプレッサーの発現について短い質問をさせてください。あなたは脳のどの部分を使用しましたか？というのは、我々のグループでも、RNase プロテクションアッセイを行いました。小脳では甲状腺ホルモンの影響が確認できませんでした。

ゾラー：分かりました。我々はレビューでそれについて取り上げる必要がありますね。我々の実験方法に若干の差があります。それがまず一つです。

次に、あなたは小脳を観察されましたが、我々は大脳皮質に注目しました。我々はごく僅かな影響を CA — 何だったか間違えそうですが — 海馬の特定領域なのですが、CA1 と CA3 のどちらだったか思い出せませんが、そこで確認しました。それは非常に局所的影響でしたが、高い再現性がありました。

鯉淵：ありがとうございます。他に質問はありませんか？ゾラー博士ありがとうございます。