

平成25年度厚生労働科学研究補助金(化学物質リスク研究事業、H23-化学-一般-004)

神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく  
統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究

### 分担研究課題名

## 情動認知行動異常発現メカニズムの解明

-エストロゲン受容体 $\beta$ 欠失マウスの脳における  
遺伝子発現プロファイル-

北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部

1

## 平成25年度本分担研究

### 情動認知行動異常発現メカニズムの解明

—エストロゲン受容体 $\beta$ 欠失マウスの脳における  
遺伝子発現プロファイル—

#### 本分担研究の目的

網羅的遺伝子発現変動解析によって  
「情動認知行動異常に至る分子メカニズム」を明らかにする事



・Percellome法による網羅的遺伝子発現変動解析

・本研究班では、情動認知行動異常の客観的評価指標の為の基準点として、特徴的な異常を示す遺伝子改変マウス等が位置付けられている

⇒特に、情動認知行動異常等を同定済みである複数のエストロゲン受容体(ER)関連遺伝子改変マウスに着目、また被験物質としては、ER結合性化学物質に着目

2

## 平成25年度本分担研究

網羅的遺伝子発現変動解析:

成熟期の雄性ER $\beta$ 欠失マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)

⇔野生型マウスと比較

⇔ 情動・認知行動解析の結果との比較検討

・ER $\beta$ 欠失マウス: Pierre Chambon教授(フランス、ルイパスツール大学)より供与  
(野生型マウスとER $\beta$ 欠失マウスは同腹のものを使用)

・15週齢の成熟期マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)(午前10時)(各n=4)

3

先行研究(平成24年度)

## 平成24年度本分担研究

網羅的遺伝子発現変動解析:

成熟期の雄性ER $\alpha$ 欠失マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)

⇔野生型マウスと比較・検討

⇔ 情動・認知行動解析の結果との比較検討

・ER $\alpha$ 欠失マウス: Pierre Chambon教授(フランス、ルイパスツール大学)より供与  
(野生型マウスとER $\alpha$ 欠失マウスは同腹のものを使用)

・遺伝子発現変動解析に際しては、15週齢の成熟期マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹)(午前10時)(各n=4)を採取

4

先行研究(平成24年度)

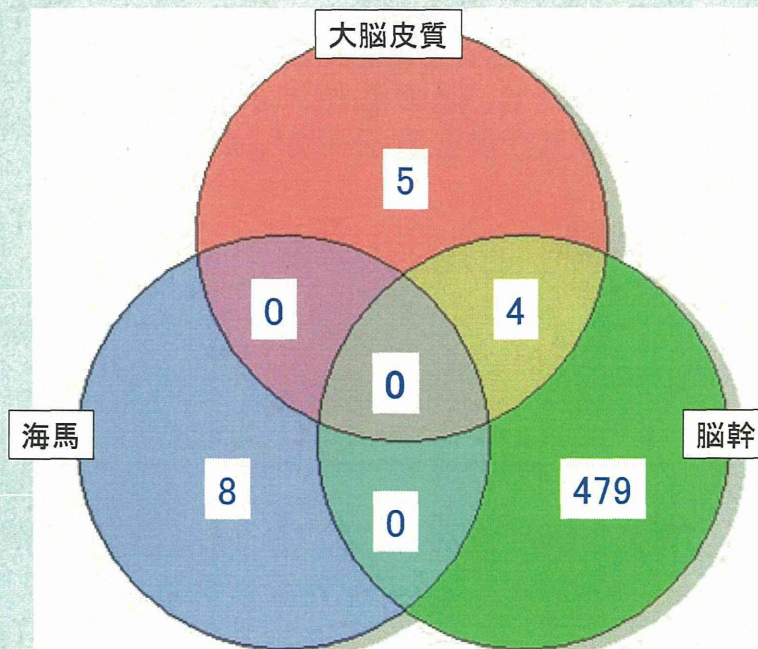
- ・脳3部位における、野生型及びER $\alpha$ 欠失マウスの遺伝子発現の比較  
細胞一個あたりの発現コピー数条件:  
大脳皮質、海馬及び脳幹につき、それぞれ1.0、0.7及び0.8コピー以上

大脳皮質:	9 ps (増加)	767 ps (減少)
海馬:	8 ps (増加)	13 ps (減少)
脳幹:	483 ps (増加)	642 ps (減少)

先行研究(平成24年度)

脳3部位の比較

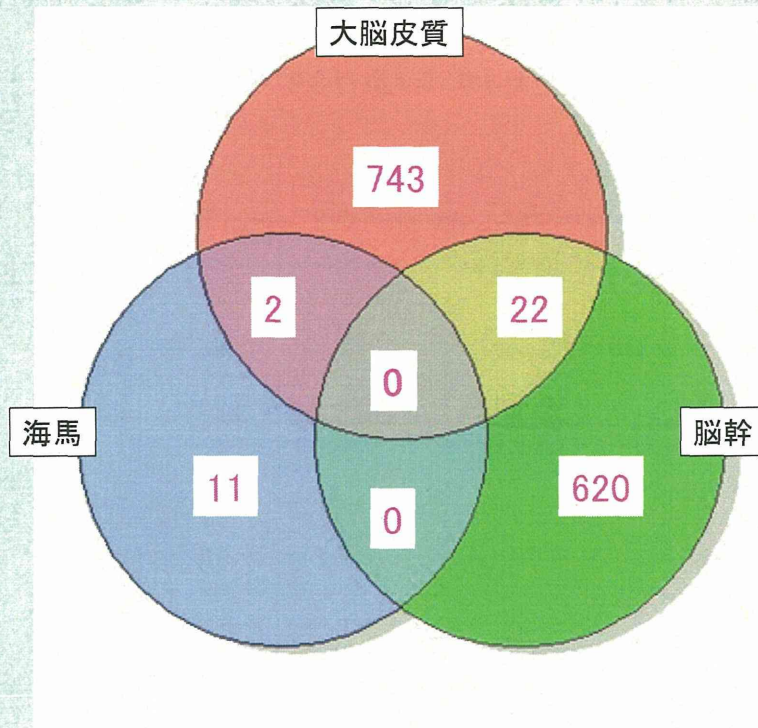
野生型と比較し、ER $\alpha$ 欠失マウスの場合に、発現が有意に増加する遺伝子数



先行研究(平成24年度)

脳3部位の比較

野生型と比較し、ER $\alpha$ 欠失マウスの場合に、発現が有意に減少する遺伝子数



・3部位に共通して減少した遺伝子は認められなかった

・Esr1遺伝子が抽出されてくるべき  
→海馬におけるEsr1遺伝子の発現が、野生型とER $\alpha$ 欠失マウス間で、有意差がなかった為  
→Esr1遺伝子は、大脳皮質と脳幹で、有意に発現減少

先行研究(平成24年度)

野生型とER $\alpha$ 欠失マウス間で、脳の部位により、有意に発現変動(増加・減少)する遺伝子が、かなり異なる

→ 部位ごとに分けて解析

- ・大脳皮質
- ・海馬
- ・脳幹

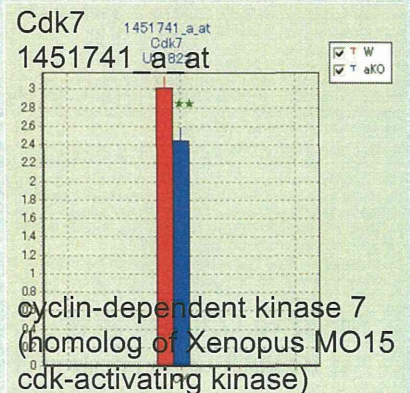
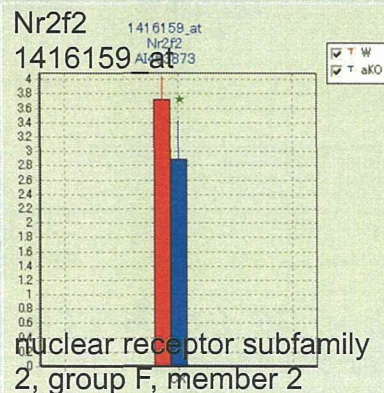
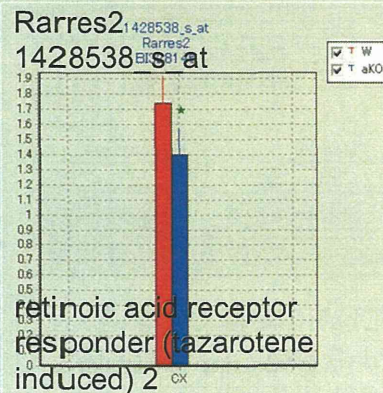
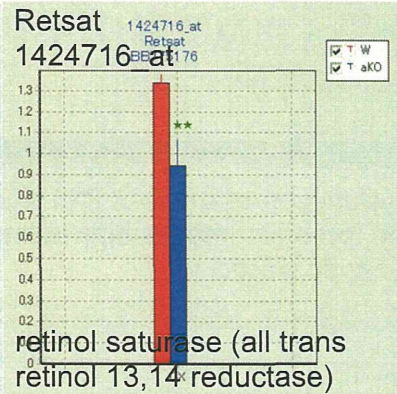
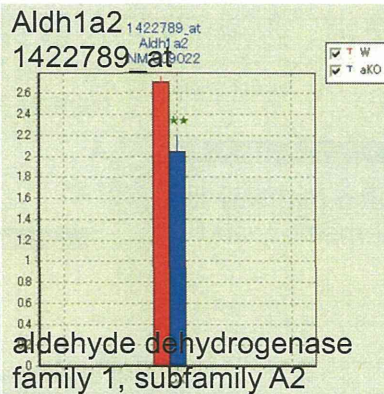
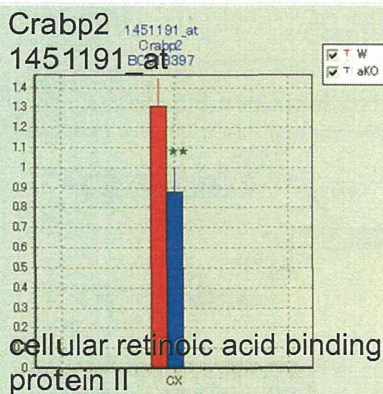
先行研究(平成24年度)

まとめ: 成熟期の雄性ER $\alpha$ 欠失マウスの脳3部位(大脳皮質、海馬、脳幹) $\Rightarrow$ 野生型

- 大脳皮質** (>細胞一個あたり1.0コピー)  
 ER $\alpha$ 欠失マウス: 776 (増加:9、減少:767) psの有意な発現変動  
**RARシグナル伝達が低下し記憶障害が誘発する可能性、神経活動の活性化及び概日リズムが乱れる可能性を示唆**  
 (RAR関連遺伝子、カリウムチャンネル、グルタミン酸受容体、セロトニン受容体、概日リズム関連遺伝子、アンドロゲン受容体、メチルCpG結合タンパク(MBD)関連遺伝子)
- 海馬** (>細胞一個あたり0.7コピー)  
 ER $\alpha$ 欠失マウス: 21 (増加:8、減少:13) psの有意な発現変動  
 野生型マウスとER $\alpha$ 欠失マウスとの間に違いは、現時点では認められない
- 脳幹** (>細胞一個あたり0.8コピー)  
 ER $\alpha$ 欠失マウス: 1,125 (増加:483、減少:642) psの有意な発現変動  
**概日リズムが乱れる可能性及び、神経活動が活性化している可能性を示唆**  
 (概日リズム関連遺伝子、セロトニン受容体、カリウムチャンネル、グルタミン酸受容体、GABA受容体、アンドロゲン受容体)
- アンドロゲン受容体の発現: 大脳皮質及び脳幹において低下**

先行研究(平成24年度)

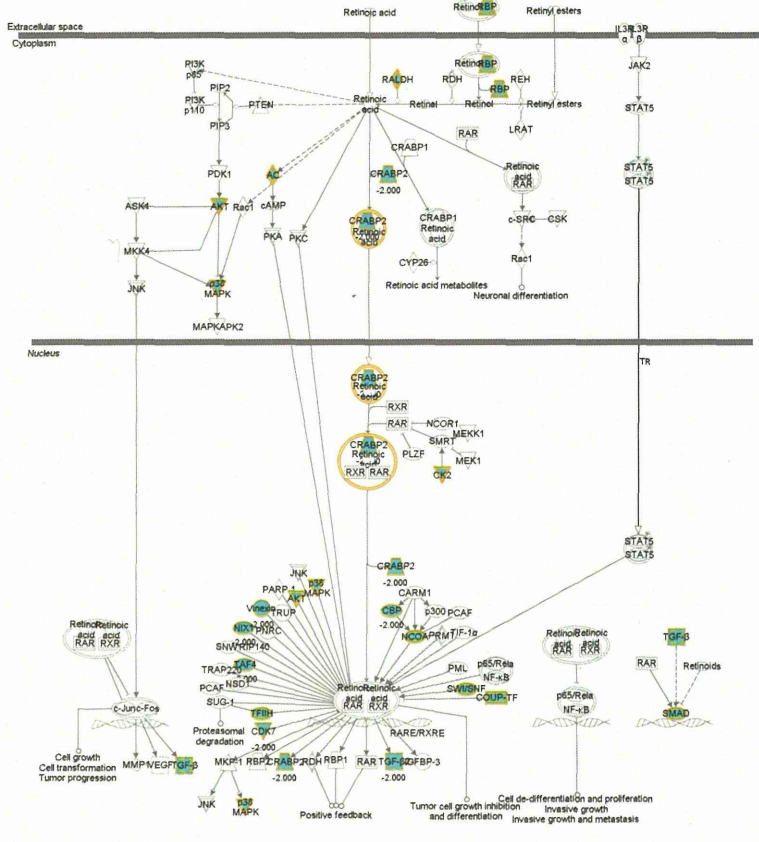
大脳皮質において、ER $\alpha$ 欠失マウスで有意に発現減少を示すRARシグナル関連遺伝子



先行研究(平成24年度)

Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc.)

RAR Activation



先行研究(平成24年度)

dominant negativeなRAR $\alpha$ を前脳特異的に発現させると、記憶障害(社会的記憶、空間記憶)が誘発される

Nomoto et al. Molecular Brain 2012, 5:8  
http://www.molecularbrain.com/content/5/1/8

Molecular Brain

RESEARCH

Open Access

Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity

Masanori Nomoto<sup>1,2</sup>, Yohei Takeda<sup>1</sup>, Shusaku Uchida<sup>1</sup>, Koji Mitsuuda<sup>1</sup>, Hatsune Enomoto<sup>1</sup>, Kaori Saito<sup>1</sup>, Tesu Choi<sup>1</sup>, Ayako M Watabe<sup>3,4</sup>, Shizuka Kobayashi<sup>5</sup>, Shoichi Masushige<sup>1</sup>, Toshiya Manabe<sup>2</sup> and Satoshi Kida<sup>1,2\*</sup>

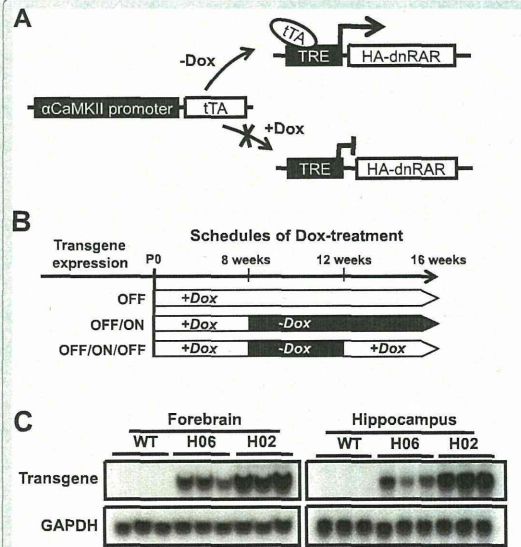
Abstract

**Background:** Retinoid signaling pathways mediated by retinoic acid receptor (RAR)/retinoid x receptor (RXR) mediated transcription play critical roles in hippocampal synaptic plasticity. Furthermore, recent studies have shown that treatment with retinoic acid alleviates age-related deficits in hippocampal long-term potentiation (LTP) and memory performance and, furthermore, memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. However, the roles of the RAR/RXR signaling pathway in learning and memory at the behavioral level have still not been well characterized in the adult brain. We here show essential roles for RAR/RXR in hippocampus-dependent learning and memory. In the current study, we generated transgenic mice in which the expression of dominant-negative RAR (dnRAR) could be induced in the mature brain using a tetracycline-dependent transcription factor and examined the effects of RAR/RXR loss.

**Results:** The expression of dnRAR in the forebrain down-regulated the expression of RAR $\beta$ , a target gene of RAR/RXR, indicating that dnRAR mice exhibit dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway. Similar with previous findings, dnRAR mice displayed impaired LTP and AMPA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. More importantly, these mutant mice displayed impaired hippocampus-dependent social recognition and spatial memory. However, these deficits of LTP and memory performance were rescued by stronger conditioning stimulation and spaced training, respectively. Finally, we found that pharmacological blockade of RAR $\alpha$  in the hippocampus impairs social recognition memory.

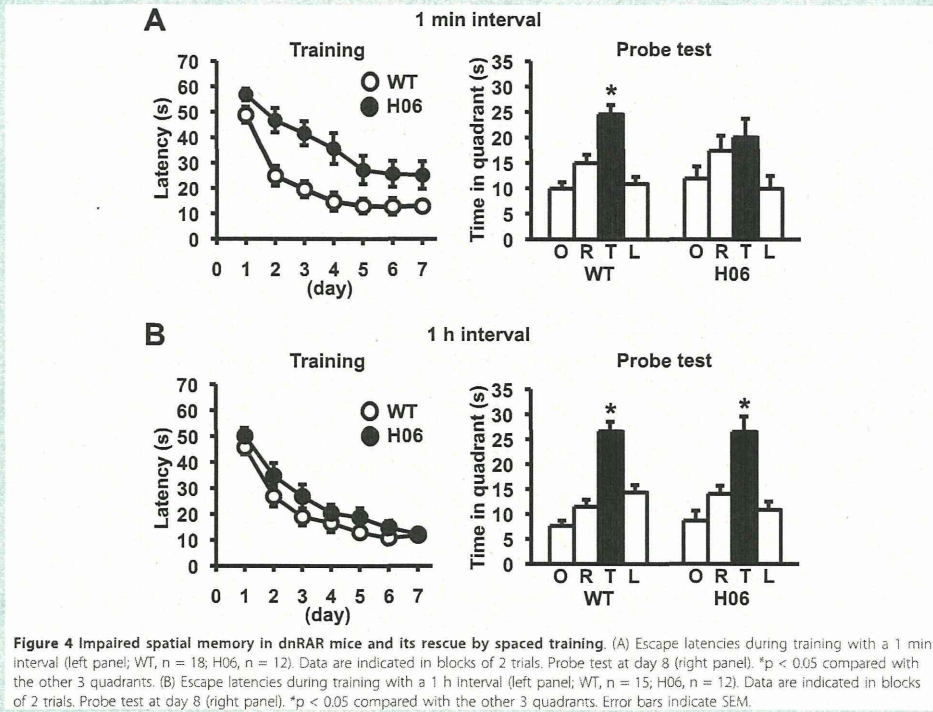
**Conclusions:** From these observations, we concluded that the RAR/RXR signaling pathway greatly contributes to learning and memory, and LTP in the hippocampus in the adult brain.

Nomoto M et al, Mol Brain 5:8-, 2012



- dnRAR: C末端を欠き、RXRとヘテロダイマー形成できるがDNAに結合できない
- $\alpha$  CaMKII プロモーター下、テトラサイクリンプロモーターとdnRARをつなぎTg作製

## Morris water maze test



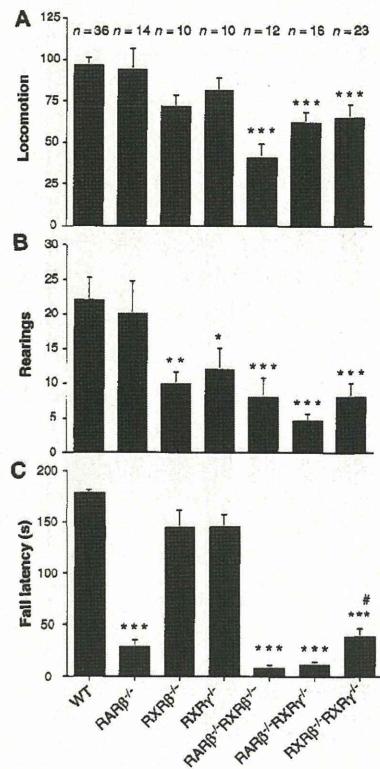
## RAR $\beta$ -RXR $\beta$ , RAR $\beta$ -RXR $\gamma$ , RXR $\beta$ -RXR $\gamma$ ダブル mutantマウス: 自発運動能低下

### Impaired Locomotion and Dopamine Signaling in Retinoid Receptor Mutant Mice

Wojciech Krężel, Norbert Ghyselinck,\* Tarek A. Samad,\*  
Valérie Dupé, Philippe Kastner, Emiliana Borrelli,  
Pierre Chambon†

Science. 279: 863-7, 1998

**Fig. 1.** Locomotor activity of RAR $\beta^{-/-}$ , RXR $\beta^{-/-}$ , RXR $\gamma^{-/-}$ , RAR $\beta^{-/-}$ RXR $\beta^{-/-}$ , RAR $\beta^{-/-}$ RXR $\gamma^{-/-}$ , and RXR $\beta^{-/-}$ RXR $\gamma^{-/-}$  null mutant animals. In the open field test forward locomotion (A) (measured as the number of squares crossed) and the number of rearings (B) were scored during a 5-min test period. Rotarod performance (C) was determined as the time spent on the rotating rod. To avoid the possible effects of a mixed genetic background, we used large numbers (n) of animals in these tests. Data are expressed as means  $\pm$  SEM, and groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with Welch correction [ $F_{\text{locomotion}}(6,37) = 8.36$ ;  $F_{\text{rearing}}(6,39) = 12.92$ ;  $F_{\text{latency}}(6,59) = 12.62$ ]. Post hoc analysis was performed with the Bonferroni multiple t test with all possible 21 comparisons (BMDP) (25); \*\*\*P < 0.001, \*\*P < 0.01, \*P < 0.05 relative to wild-type (WT) littermates; #P < 0.1, relative to the RAR $\beta^{-/-}$ RXR $\gamma^{-/-}$  group.



# 細胞性レチノール結合タンパク質タイプ II (CRBP2) の発現制御は？

## Upstream Regulator (IPA検索) → Retinoic acid-RAR-RXR

© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Upstream F Other	Molecule T, Predicted A Activation 2 Notes	p-value of c Target molecules in dataset
HNF4A	transcriptio bias 0.055	3.76E-08 AAR2, ABCB9, AGPAT1, AGXT2L1, AMACR, ANAPC15, ANKRA2, ARG2, ARHGEF19, ASB7, AVP11, BOLA1, C2, C2orf29, C2orf43, CAP1, CD3EAP, CDI
ABCB6	transporter bias 0.633	6.90E-05 CAT, HAGH, SLC25A37, SLC25A39, SLC25A51, TXNRD2
HTT	transcriptio	8.27E-04 AKT2, AMACR, ARNTL, ATP2B3, BCAP31, CASP3, CBX1, CIT, CLOCK, COX6B2, CREBBP, DNAJC3, DUSP6, FKBP4, GLO1, HSPA9, ITGB1, MGPM, MFM

Retinoic ac	complex	p-value	CRBP2, TGFβ2
		2.80E-02	

## CRBP2の発現は、直接エストロゲンにより制御される

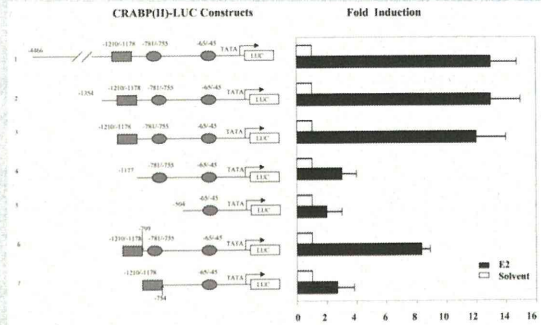
The Journal of Biological Chemistry  
© 2003 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Vol. 278, No. 37, Issue of September 12, pp. 35219-35225, 2003  
Printed in U.S.A.

### Cellular Retinoic Acid-binding Protein II Gene Expression Is Directly Induced by Estrogen, but Not Retinoic Acid, in Rat Uterus\*

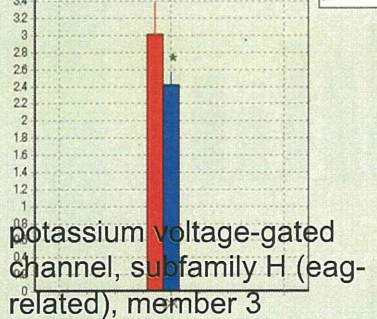
Received for publication, March 12, 2003, and in revised form, June 2, 2003  
Published, JBC Papers in Press, July 3, 2003, DOI 10.1074/jbc.M302551200

Xiao-Hong Li and David E. Ong†  
From the Department of Biochemistry, School of Medicine, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee 37232

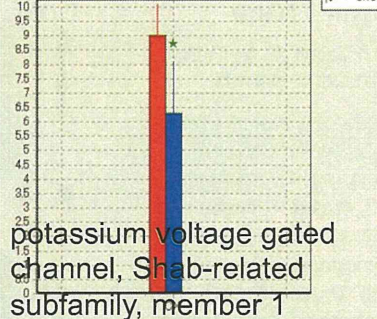


## 大脳皮質において、発現が有意に減少するカリウムチャネル遺伝子

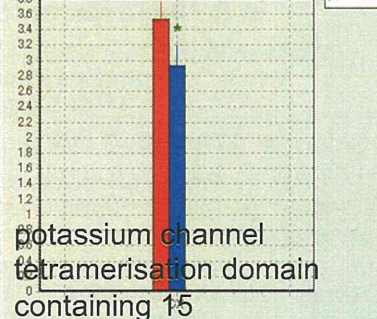
Kcnh3 1421619\_at  
Kcnh3 NM\_0601



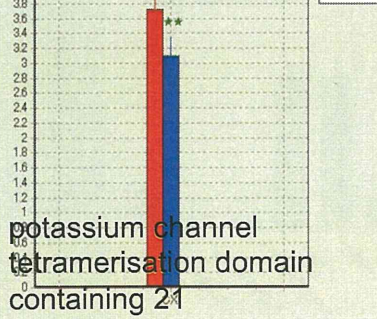
Kcnb1 1423180\_at  
Kcnb1 BE\_01482



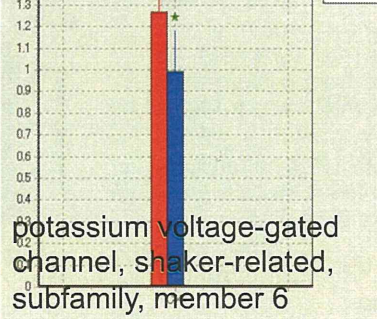
Kctd15 1435339\_at  
Kctd15 BE\_03366



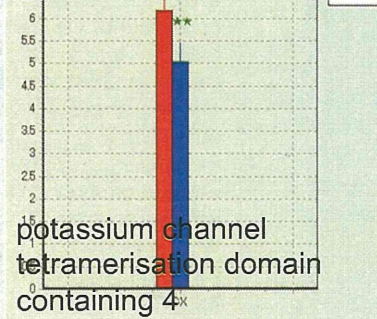
Kctd21 1435692\_at  
Kctd21 BC\_01086



Kcna6 1441049\_at  
Kcna6 AV\_01356



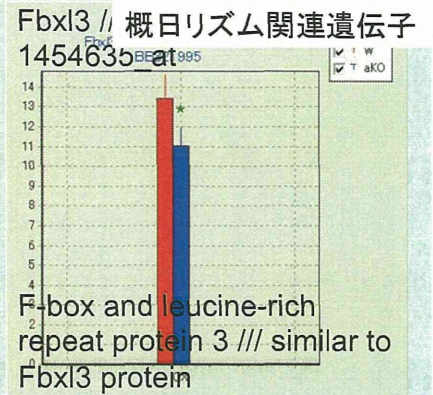
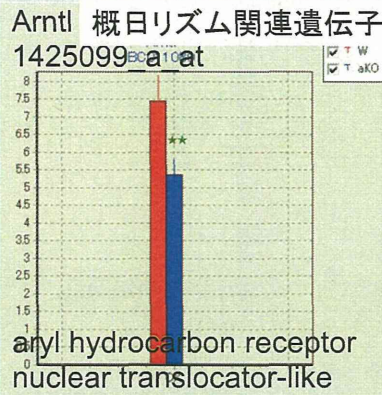
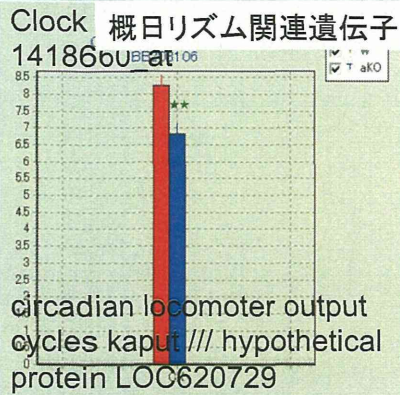
Kctd4 1441801\_at  
Kctd4 AL\_01843





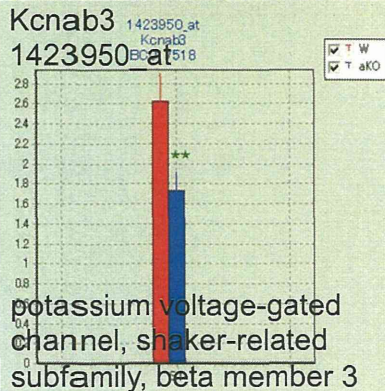
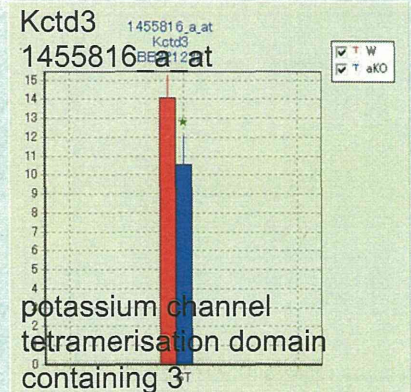
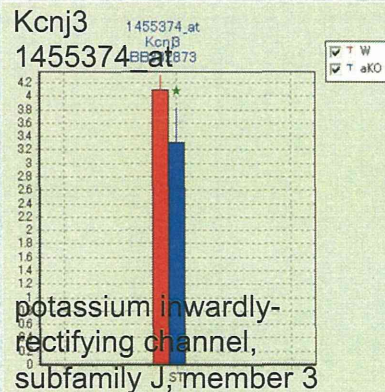
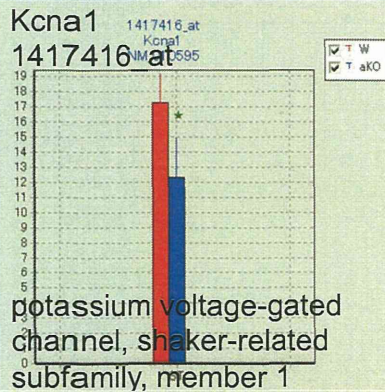
先行研究(平成24年度)

大脳皮質において、発現が有意に減少する概日リズム関連遺伝子



先行研究(平成24年度)

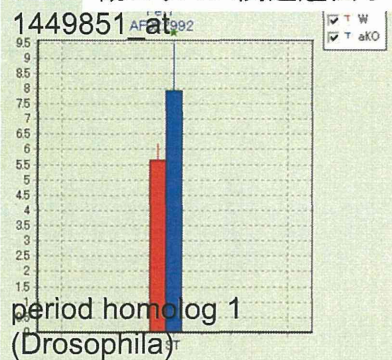
脳幹において、発現が有意に減少するカリウムチャネル遺伝子



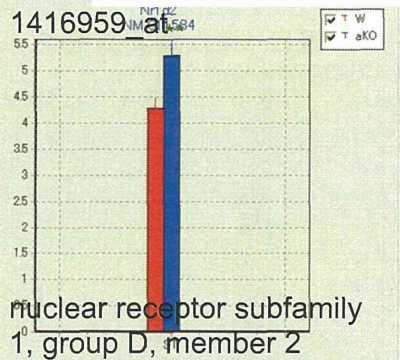
先行研究(平成24年度)

脳幹において、発現が有意に増加する概日リズム関連遺伝子

Per1 概日リズム関連遺伝子



Nr1d2 概日リズム関連遺伝子



先行研究(平成24年度)

Circadian Rhythm 関連遺伝子の、野生型とER $\alpha$  欠失マウスとの発現変動比較 成熟期・肝

TTG183L  
BisA Wild

TTG184L  
BisA ER $\alpha$  KO

TTG185L  
EE Wild

TTG186L  
EE ER $\alpha$  KO