

博士課程用 (甲)

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

天野 出月 印

(学位論文のタイトル)

Aberrant cerebellar development in mice lacking dual oxidase maturation factors  
(Dual oxidase maturation factors (DUOXA) 欠損マウスにおける小脳発達異常)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

## 【背景と目的】

甲状腺ホルモンは脳発達において重要な役割を果たしており、欠如によりクレチン病（先天性甲状腺機能低下症）などが生じることが知られている。我が国では新生児マススクリーニングの導入により、多くの先天性甲状腺機能低下症の早期発見・治療ができるようになった。一方、近年、食生活の変化や環境化学物質により母子共に甲状腺機能低下を来すリスクが増加している。しかし、神経発達における甲状腺ホルモンの作用機序は未だ明らかではない。そこで、先天性甲状腺機能低下症の原因の一つとして知られるdual oxidase maturation factor (DUOXA) 欠損マウスを用い、周産期甲状腺機能低下の脳発達への影響を調べることにした。

## 【方法】

DUOXAヘテロマウス (*Duoxa*<sup>+/-</sup>) を交配して得られた野生型 (*Wt*) およびノックアウト型 (*Duoxa*<sup>-/-</sup>) を用いて実験を行った。行動試験として25日齢で協調運動機能を調べるためのロータロッド試験や、新奇環境下での移動活動量を調べるためのオープンフィールドテストを施行した。小脳の形態異常の有無を調べるために10, 15, 25日齢でクレシルバイオレット染色や、15日齢で抗カルビンディン抗体染色を行った。また神経回路の機能異常を調べるために電気生理学的実験（スライスパッチクランプ法）を行った。さらに、ウェスタンブロット法によりシナプス機能に関連するタンパク質の発現変化を調べた。

## 【結果】

*Duoxa*<sup>-/-</sup> は *Wt* と比較して体重増加不良を認めた。25日齢で行ったオープンフィールド試験では活動性の差異は認めなかったが、ロータロッド試験では *Duoxa*<sup>-/-</sup> 群で有意な回転棒上での滞在時間の低下を認めた。クレシルバイオレット染色では、10日齢で有意な形態学的な差を認めなかったが、15日齢では *Duoxa*<sup>-/-</sup> 群でのみ外顆粒層の残存を認めた。しかし、25日齢では *Duoxa*<sup>-/-</sup> 群でも外顆粒層が消失しており、キャッチアップが起こることが確認できた。その一方で15日齢においてプルキンエ細胞の形態学的変化は認めなかった。電気生理学的実験では、平行線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス後電流におけるpaired-pulse facilitationが *Duoxa*<sup>-/-</sup> 群で有意に低下していたが、登上線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプス後電流におけるpaired-pulse depressionに有意な差を認めなかった。一方、ウェスタンブロット法により小脳膜分画タンパクに含まれる神経伝達物質放出関連タンパクの発現量を調べたところ、両群に有意な差を認めなかった。

## 【考察】

これまでの甲状腺機能低下マウスモデルでの報告と同様に *Duoxa*<sup>-/-</sup> は小脳失調症状を示し、形態学的には小脳顆粒細胞の発達に伴う移動が遅延していることがわかった。しかし、過去に報告のあ

る薬剤誘発性の甲状腺機能低下マウスモデルで見られたプルキンエ細胞の形態学的変化は認めなかった。この結果から、*Duoxa*<sup>-/-</sup>においてみられた小脳機能の異常は甲状腺機能低下によるものだけではなく、活性酸素を生成する酵素系であるNOX/DUOXファミリーに属するDUOX/DUOXAによる直接影響がある可能性が示唆された。電気生理学的な解析からは平行線維-プルキンエ細胞間のpaired-pulse facilitationの低下を認めたため、シナプス前膜からの神経伝達物質の放出の異常が示唆された。しかし、神経伝達物質の放出に関連するタンパク質の発現量に有意な差は認められなかった。また25日齢の小脳では形態学的変化のキャッチアップ現象を認めているにもかかわらず、協調運動機能障害が認められたことから、顆粒細胞の細胞移動遅延に伴い、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス形成不全が起こっている可能性が示唆された。

#### 【まとめ】

本研究ではDUOXA欠損による遺伝的な甲状腺機能低下モデルを用いて、周産期における甲状腺機能低下による小脳発達への影響を解析した。その結果、DUOXA欠損の行動異常への影響は、平行線維-プルキンエ細胞シナプス形成異常による回路異常を起因としたものであることが示唆された。また、周産期における甲状腺ホルモンの低下は中枢神経系の発達に不可逆的な影響を及ぼすこともわかった。一方、本研究で用いたDUOXA欠損マウスで見られた変化と過去の甲状腺機能低下症モデルマウスで見られた変化に差があったことから、小脳発達においてDUOX/DUOXA系による活性酸素生成が発達異常に関与する可能性が示唆された。