

Title	発達段階特異的なアドリアマイシン投与によるVATER連合発症機構の解明
Sub Title	Identifying the mechanism of VATER association by developmental-stage specific administration of adriamycin
Author	内藤, 陽子(Naito, Yoko)
Publisher	
Publication year	2010
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2009.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、ニワトリ胚に発達段階特異的にアドリアマイシン(ADR)を投与することで、VATER連合のニワトリ胚モデルの作成し、ADRの自家蛍光を利用し、これまで検討されてこなかったADRの組織内分布を観察することに成功した。Hamburger Hamilton(HH) stage 10-13ニワトリ胚芽へのADR2-5μg 投与により、尾部退行、食道閉鎖、気管・肺無形成が特異的に誘導され、この時期に主に分裂が盛んな尾部および前腸の未分化細胞が障害されて奇形が誘導された可能性が示唆された。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2008～2009 課題番号：20790773 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20790773seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790773

研究課題名（和文） 発達段階特異的なアドリアマイシン投与による VATER 連合発症機構の解明

研究課題名（英文） Identifying the mechanism of VATER association by developmental stage specific administration of adriamycin

研究代表者

内藤 陽子（NAITO YOKO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80348705

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ニワトリ胚に発達段階特異的にアドリアマイシン（ADR）を投与することで、VATER 連合のニワトリ胚モデルの作成し、ADR の自家蛍光を利用し、これまで検討されてこなかった ADR の組織内分布を観察することに成功した。Hamburger Hamilton(HH) stage 10-13 ニワトリ胚芽への ADR 2-5 μ g 投与により、尾部退行、食道閉鎖、気管・肺無形成が特異的に誘導され、この時期に主に分裂が盛んな尾部および前腸の未分化細胞が障害されて奇形が誘導された可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

VATER association represents a cluster of Vertebral, Anal, Tracheo-Esophageal, Radial and Renal malformations, and caudal regression syndrome is an entity consisting of a spectrum of congenital anomalies of lower spine and hips associated with genitourinary and lower limb defects. The concurrence of various malformations may be explained by a common defect in blastogenesis, but direct evidence is yet to be accumulated. Here, by the use of autofluorescence and the teratogenic effect of adriamycin, we demonstrated that adriamycin administered to eggs of White Leghorns distributes to the caudal portion of the embryo and foregut epithelium and induces caudal regression and tracheal and pulmonary agenesis. The induction of caudal regression syndrome-like anomaly was developmental stage and dose dependent. Embryos with caudal regression demonstrated tracheoesophageal anomalies, one of the defects included in VATER association. The stages at which anomalies were produced corresponded to that of human embryos between days 22 and 26 (Carnegie stages 10-11). In view of the antitumor activity of adriamycin by intercalating to double-stranded DNA of

undifferentiated cells undergoing rapid cell division, it is possible that adriamycin had preferentially attacked cells in the caudal end where pronounced proliferation takes place during this narrow period of greatest susceptibility.

交付決定額

(金額単位：円)			
	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：VATER 連合、アドリアマイシン、ニワトリ胚、caudal eminence、前腸

1．研究開始当初の背景

VATER 連合は脊椎形成異常 (V)、鎖肛 (A)、食道閉鎖および気管食道瘻 (TE)、橈骨および腎 (R) 異形成の組み合わせから成り立つ。尾部退行症候群 (caudal regression syndrome) は、下肢の低形成・下部脊椎の分節異常を主徴とする奇形症候群であり、尾部低形成により発症する。これらの病態に合併する種々の奇形は胚子発生期の障害によるとされている。尾側の外胚葉に覆われた多分化間葉である caudal eminence は脊索、体節、後腸、神経管、下肢の発生に間葉を提供する尾部の発生の中枢であり、同部の障害により尾部退行症候群が発生する。気管食道奇形は、前腸から気管芽が正常に分化しないことで発生する。これらの奇形の組み合わせは、複数の発生原基に対する遺伝的あるいは環境的因子による “hit” が同時に起こることによる結果だとも考えられているが、実験的根拠に乏しい。

妊娠ラットにアントラサイクリン系抗腫瘍性抗生物質であるアドリアマイシン (ADR) を投与すると、胎仔に VATER 連合で認められる奇形の多くが発症することから、VATER 連合の研究では、アドリアマイシン・ラット・モデルが広く用いられている。ADR は、二本鎖 DNA に入り込むことによって増殖腫瘍細胞の核酸合成を阻害する。ラットモデルにはいくつかの欠点がある。すなわち、胎仔における ADR の組織内分布はこれまでに評価されていない、母体の腹腔内に ADR を投与するため、胎盤経由で ADR が実際どれだけ胎仔に取り込まれ、また、催奇形作用の開始時点がいつなのかは不確定である。

アドリアマイシン・ラット・モデルでの上記欠点を克服するため、我々はニワトリ胚を用い、ADR の自家蛍光を利用してその胚内分布を視覚的に確認できるニワトリ胚子発生期障害モデルの作製を試みた。

2. 研究の目的

ニワトリ胚に発達段階特異的にアドリアマイシン (ADR) を投与することで、VATER 連合のニワトリ胚モデルを作成する。また、ADR の自家蛍光を利用し、ADR の組織内分布を観察する。

3. 研究の方法

ニワトリ胚への ADR 投与

孵卵器内で受精卵をニワトリ胚 stage 10-13 まで発生させた後、ADR を 1-5 μ g 卵黄内に注入した。鶏卵を孵卵器に戻して発生を継続させ、24~48 時間後に実体顕微鏡下に ADR 誘導奇形を観察した。また、ADR の胚内分布を蛍光顕微鏡下で ADR 投与 12 時間後まで 3 時間毎観察した。

組織学的検討

ADR 投与後 24 時間のニワトリ胚をパラフィンに包埋後薄切し、蛍光顕微鏡下で ADR からの蛍光シグナルの分布を観察した。核は TO-PRO-3 で蛍光染色した。ADR 投与胚あるいはコントロール胚 (PBS 投与胚) におけるアポトーシス細胞を ssDNA で免疫染色し、解剖顕微鏡下で観察した。また、細胞の増殖応答を確認するため、stage 10-11 まで発生させたニワトリ胚を円環状の濾紙に吸着させて胚を鶏卵から取り出し、プロモデオキシウリジン (BrdU) を添加し、2 時間、鶏卵外で培養 (New 法) した後、解剖顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

ADR の胚内分布

ADR はニワトリ胚の尾部に集積し、ADR 投与 6 時間後に最も強い蛍光発色を認めた。組織内分布の観察では、尾部組織と前腸上皮に集積を認めた。TO-PRO-3 での細胞

核の同時染色で、ADR が核内に取り込まれていることを確認した。

尾部退行症候群

尾部退行症候群の重症度は、wingbud より尾側の構造を欠如した重症型と、低形成な尾側組織を有する軽症型とに分類した。ADR 投与量が少なく、ADR 投与時のニワトリ胚の発生段階が進行しているものほど尾部退行症候群は軽症で発症頻度は低かった。Stage 10-11 に ADR を 2-5 μ g 投与されたニワトリ胚の 90% は尾部退行症候群を発症し、本症の臨界期は stage 10-11 と結論した。

ADR 投与 24 時間後における ADR 投与胚とコントロール胚の組織所見を比較したところ、ADR 投与胚において ssDNA 染色陽性となる壊死細胞を過剰に認めた。壊死細胞は wingbud より尾側の組織、特に神経管、体節に多く認めた。ADR 投与胚では尾部末端の神経管径は狭小化し体節組織は変性していた。脊索構造は保たれていた。背側大動脈の拡大、大動脈出血、尾側血管腫の形成などの血管系の異常は認めなかった。また、増殖応答を示している細胞を確認するために行った BrdU ラベリングでは、頭側組織よりも尾側組織で BrdU の取り込みは相対的に増加していた。前腸上皮においては他の隣接組織と比較して明らかな取り込みの増加は認めなかった。

本研究では、ニワトリ胚に発達段階特異的にアドリアマイシン (ADR) を投与することで、VATER 連合のニワトリ胚モデルの作成し、ADR の自家蛍光を利用し、これまで検討されてこなかった ADR の組織内分布を観察することに成功した。臨界期に ADR が caudal eminence と前腸上皮を同時に傷害した可能性、またその機序として、ADR は分裂中の 2

重鎖 DNA に入り込んで複製を阻害することにより抗腫瘍作用を発揮することから、この時期に主に分裂が盛んな尾部および前腸の未分化細胞が障害されて奇形が誘導された可能性が示唆された。

前腸閉鎖および気管・肺無形成

Stage 10-11 に ADR5 μ g 投与し、組織学的評価をした 12 胚のうち、前腸閉鎖と気管・肺無形成を呈した胚が 8 胚、前腸狭窄と気管・肺無形成を呈した胚が 1 胚、前腸狭窄のみを呈した胚が 1 胚、前腸と気管・肺の形成に異常を認めなかった胚が 2 胚だった。組織学的検討をしたコントロール胚 6 胚では前腸および気管・肺の形成は正常だった。

本研究により、アドリアマイシンによる奇形発症には臨界期および用量依存性が存在すること、VATER 連合で認められる奇形部位に一致してアドリアマイシンが特異的に集積することが確認された。また、アドリアマイシンが未分化細胞の二本鎖 DNA に組み込まれることを考慮すると、細胞分裂の最も盛んな caudal eminence が特異的に影響を受けたことが説明可能である。

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 1 件)

「Yoko Naito, Caudal regression and tracheoesophageal malformation induced by adriamycin: A novel chick model of VATER association, Pediatric Research, 2009, 607-612
査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 陽子 (NAITO YOKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 80348705

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし