慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	バルプロ酸ナトリウム胎内曝露が大脳皮質発生に与える影響に関する研究
Sub Title	Effect of in utero exposure to valproic acid on cerebral cortical histogenesis
Author	下郷, 幸子(Shimozato, Sachiko)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、抗てんかん薬バルプロ酸の胎内曝露が大脳皮質構築に与える影響について、皮質の厚さや皮質内の投射神経細胞の数・分布を中心に解析した。バルプロ酸ナトリウムを胎内曝露された大脳皮質は対照群と比較して肥厚化し、投射神経細胞数が増加すること、神経前駆細胞の細胞分裂動態に変動を生じることを明らかにした。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2010～2012 課題番号：22791038 研究分野：神経発生学、小児神経学 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_22791038seika

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.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2010～2012
課題番号：22791038

研究課題名（和文）

バルプロ酸ナトリウム胎内曝露が大脳皮質発生に与える影響に関する研究

研究課題名（英文）

Effect of in utero exposure to valproic acid on cerebral cortical histogenesis

研究代表者
下郷　幸子（SHIMOZATO SACHIKO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60348696

研究成果の概要（和文）：
本研究では、抗てんかん薬バルプロ酸の胎内曝露が大脳皮質構築に与える影響について、皮質の厚さや皮質内の投射神経細胞の数・分布を中心に解析した。バルプロ酸ナトリウムを胎内曝露された大脳皮質は対照群と比較して肥厚化し、投射神経細胞数が増加すること、神経前駆細胞の細胞分裂動態に変動を生じることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：
Valproic acid (VPA), an antiepileptic drug, is known to act as an inhibitor against histone deacetylases (HDACs). A purpose of this research was to evaluate effects of in utero exposure to VPA on cerebral cortical histogenesis using mouse model. We found that in utero exposure to VPA increased the thickness of the cerebral cortex compared to that of the controls. This increased thickness of the cerebral cortex was due to the increased number of projection neurons in the specific layers of the cerebral cortex. Moreover, the cell cycle kinetics of the neuronal progenitor cells were altered in the VPA-exposed embryos compared to that of the controls.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総　計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：神経発生学、小児神経学
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：神経発生、ヒストン、脱アセチル化、神経幹細胞、大脳皮質

１．研究開始当初の背景

てんかん症候群は小児神経疾患の最多数を占め、約 7-8 割が自然治癒する予後良好な疾患群である。一方、患児の一部においてはけいれん発作が持続するため、生涯にわたって抗けいれん薬を内服する必要がある。特に女性患児においては、成人期に妊娠・出産を経ることを想定し、抗けいれん薬の胎内曝露による奇形発症を念頭においた治療計画をたてることが必須である。近年、日本国内で処方可能な抗けいれん薬の種類が増加したが、てんかんに対する第一選択薬はバルプロ酸ナトリウム（以下バルプロ酸）が現在でも中心を占めている。

バルプロ酸は、１）神経細胞の電位依存性 Na チャネルの再活性化を抑制すること、２）大脳皮質内にある抑制性神経細胞のシナプスにおいて、抑制性神経伝達物質であるγアミノ酪酸（GABA）量を増加させることにより、抗けいれん作用を発揮すると考えられている（Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Edition)。一方抗けいれん作用とは別に、近年バルプロ酸に細胞核内クロマチン構造を構成するヒストン蛋白の脱アセチル化酵素を阻害する作用があることが判明してきた（Gottlicher ら、EMBO J、2001)。

ヒストンのアセチル化は、ヒストン高次構造に変化を生じさせることによりヒストンに巻きつく状態で格納されている DNA を物理的に弛緩させ、転写活性を増加させることが知られている。ヒストンアセチル化の調節メカニズムとして、ヒストンアセチル化酵素（HAT）と、ヒストン脱アセチル化酵素とのバランスが重要であることから、バルプロ酸が神経前駆細胞のヒストン脱アセチル化酵素機能を阻害すると、大脳皮質発生が影響を受ける可能性がある。バルプロ酸胎内曝露でよく知られている障害として神経管閉鎖障害が挙げられるが、ごく最近の米国・英国の研究によれば、抗けいれん薬内服中の妊婦から出生した子供の 3 歳時の発達を評価した結果、バルプロ酸を内服した母親から生まれた子供の発達指数（DQ）がカルバマゼピン、フェニトイン、ラモトリジン胎内曝露群と比較して有意に低い結果となった（Meador ら、NEJM、2009)。以上は、バルプロ酸胎内曝露が神経管閉鎖障害のみならず、大脳皮質の神経細胞産生過程を障害している可能性を強く示唆する。

以上を鑑みると、バルプロ酸胎内曝露によりヒストン脱アセチル化酵素の活性が阻害されると、神経前駆細胞の細胞周期調節機構に異常をきたし、分化誘導の確率に異常をきたす可能性が想定される。特に、分化誘導の確率が異常に増加すると、早期の神経前駆細胞が枯渇して神経細胞産生数が減少すること、さらに神経管を閉鎖させるのに不可欠である上衣細胞数が減少する可能性がある。

２．研究の目的

本研究ではバルプロ酸の胎内曝露が大脳皮質構築異常を生じるか否か、生じた場合はそのメカニズムについて特に神経前駆細胞の細胞分裂動態に着目した解析を実施した。

３．研究の方法

（１）バルプロ酸投与量の検討と大脳皮質構築異常の解析

妊娠 10-16 日目の母マウスにバルプロ酸を経口投与した。バルプロ酸血中濃度測定の上可能な限り臨床的な投与量に近い量を用いて解析した。

バルプロ酸胎内曝露により大脳皮質層構造に生じる異常と、神経前駆細胞より産生された投射神経細胞数を解析した。具体的には、IrdU および BrdU を 2 時間の時間差をもって腹注し、BrdU をさらに胎生時期に応じて

10-16 時間、3 時間おきに投与した。出生 21 日目の仔マウス大脳を 4%パラフォルムアルデヒドで還流固定後、4 μm の連続冠状断切片を作製し、IrdU および BrdU に対する二重免疫組織染色を行った。以上より IrdU と初回 BrdU 投与との間の 2 時間に分化を開始した細胞群（2 時間コホート）を、IrdU のみで標識された細胞として大脳皮質内に同定することが可能となる。

（2）Cumulative Labeling 法による細胞周期各相の測定と 2 時間コホート法による Q 値の測定

母マウスに、午前 9 時から DNA 合成期（S 期）のトレーサーである BrdU を胎生時期に応じて 10-16 時間、3 時間おきに腹腔内投与した。ペントバルビタールで深麻酔された母マウスより胎児前脳を摘出、4%パラフォルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋し、厚さ 4 μm の連続冠状断切片を作成した。抗 BrdU 抗体（Beckton Dickinson 社）を用いた免疫組織化学染色後、神経前駆細胞のうち BrdU 陽性細胞の割合（Labeling Index、LI）を BrdU 曝露 2、4、8、12、16 時間後に計測した。LI の増加率から神経前駆細胞の細胞周期長を計算し、バルプロ酸が神経前駆細胞の細胞周期調節に与える影響を解析した。

S 期トレーサーである IrdU と BrdU を 2 時間の時間差をもって母マウスに腹注し、その後 BrdU を連続投与する群と、BrdU の追加投与を行わない群とに分けた。2 時間の間に S 期を終了した神経前駆細胞群が IrdU のみで標識され、この細胞群を 2 時間コホートとした。BrdU 連続投与群と非投与群との間の 2 時間コホート細胞数の比から Q 値を算出した。具体的には胎仔頭部を 4%パラフォルムアルデヒドで固定後パラフィン包埋し、4 μm の連続冠状断切片を作製した。IrdU および BrdU に対する二重免疫組織染色を行い、IrdU 陽性細胞の数、分布パターンを顕微鏡下で計測した。細胞分裂を終了し分化を開始した神経細胞の実数、分布パターンを計測することにより、Q 値を算定した。

（3）ヒストンアセチル化状態に、バルプロ酸曝露が与える影響の解析

バルプロ酸曝露がヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を介して与える影響について、アセチル化ヒストン特異的抗体によるウエスタンブロット法により確認した。

具体的には、マウスを交配、翌朝膣栓の存在で受胎を確認し、胎生 0 日とした。バルプロ酸またはコントロールを経口投与された妊娠 10-16 日目の母マウスをペントバルビタールで深麻酔し、胎仔を摘出した。実体顕微鏡下で胎児前脳の頭頂部を眼科用剪刀で切断、神経前駆細胞が存在する脳室層を分離した。ヒストンを強酸性条件下で抽出し、サンプルを SDS-PAGE により分離、その後 supported nitrocellurose 膜にブロットした。アセチル化ヒストン抗体（Upstate 社）を用いてウエスタンブロット解析を行い、バルプロ酸がリジン残基特異的なアセチル化状態に与える影響を、各大脳皮質発生時期において解析した。

４．研究成果

（1）生後 21 日目マウスの一次体性感覚野の大脳皮質の厚さは、正常コントロールに比較して VPA 曝露群で有意に肥厚化することが判明した。また、大脳皮質内の投射神経細胞数を、GABA 抗体による免疫組織染色により計測した結果、VPA 曝露群において有意に増加すること、増加した細胞は主に表層に分布することがわかった。

（2）神経前駆細胞から分化した幼弱神経細胞（Q 細胞）の数を S 期特異的トレーサーである IdU と BrdU による 2 時間コホート法で解析した。胎生 14 日の VPA 胎内曝露群胎児

では、Q 細胞数が正常コントロールと比較し減少した。一方、胎生 16 日では変動パターンが異なることを明らかにした。

神経前駆細胞の細胞周期長の変化を BrdU による Cumulative Labeling 法で解析した。胎生 14 日のマウス胎児において解析した結果、VPA 胎内曝露群では正常コントロールと比較して G1 期が短縮することが判明した。

（3）クロマチンを構成するヒストン蛋白質のリジン残基特異的アセチル化状態に VPA 曝露がヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を介して与える影響について、アセチル化ヒストン特異的抗体によるウエスタンブロット法により確認した。その結果、VPA を曝露された胎生 16 日胎児の神経前駆細胞のアセチル化ヒストン H3 量が VPA 曝露群でコントロール曝露群と比較し有意に増加することを明らかにした。

５．主な発表論文等

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.keio.ac.jp/rdb/med/view.php?i=32

６．研究組織
研究代表者
下郷　幸子（SHIMOZATO SACHIKO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60348696