

令和 元 年 6 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19783

研究課題名（和文）胎児におけるVPA副作用軽減のための服薬方法の開発

研究課題名（英文）Development of a medication method to reduce VPA side effects on the fetus

研究代表者

金城 智也（Kinjo, Tomoya）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：80750364

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：バルプロ酸ナトリウム（VPA）は、抗てんかん薬として治療に頻用されているが、妊娠中の服薬において、出生児への悪影響が指摘されている。そこで本研究では、安全なVPA服薬方法の追求とその作用機序の解明を目的として、妊娠ラットにVPA投与し、その出生児に対して様々な解析を行った。解析の結果、VPAは、出生児に対して注意力の欠如及び自発性を誘発し、ADHDのような行動特徴を起こさせることが分かった。さらにその作用機序として、神経細胞新生とヒストンテールのアセチル化の関与を示した。安全にVPAを服薬するためには、投与量が重要であり、年齢を重ねる毎にVPAの副作用は減少する可能性もあることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、使用頻度が高く、且つ催奇形成のリスクも高いVPAに着目した研究であり、てんかん患者あるいはVPA適応疾患である躁うつ病患者が安心して妊娠・出産するための基礎となる研究である。この研究成果をきっかけにVPAの安全限界が解明されれば、多大な福祉医療費を必要とする自閉症や知的障害のリスクを下げるができる可能性がある。それにより女性の社会進出も可能となり、大きな経済効果も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Sodium valproate (VPA) is frequently used for treatment as an antiepileptic drug, but it has been pointed out that medication during pregnancy has an adverse effect on offspring. Therefore, in this study, in order to pursue safe VPA medication and to elucidate its mechanism of action, VPA was administered to pregnant rats and various analyzes were performed on their offspring. As a result of analysis, it has been found that VPA induces attention deficit and spontaneity in offspring and causes behavioral features such as attention deficit / hyperactivity disorder (ADHD). Furthermore, as the mechanism of action, the involvement of neurogenesis and histone tail acetylation was shown. In order to safely take VPA, it is suggested that the dosage is important, and that the side effects of VPA may decrease with the age.

研究分野：精神薬理学

キーワード：バルプロ酸ナトリウム(VPA) 神経細胞新生 アセチル化 BrdU HDACi ADHD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

少子高齢化の進行している日本では、女性の安全な妊娠・出産は重要な課題となる一方で、女性の社会進出も推進されている。しかし児に知的障害や自閉症を伴うと、育児にかかる時間と労力は増大し、実質女性の社会進出を困難なものとするが、自閉症の総患者数は年々増加している。自閉症は、社会性の障害、言語障害、コミュニケーション障害の3大障害によって特徴付けられる。療育により児童の適応を高めることはできても、独特な感覚過敏や社会生活での適応の低さは大きくは改善しないのが現実である。以上から自閉症は予防できることが望ましいが、自閉症の発症機序は未だ不明な点が多く、予防方法は明らかではない。これまでの研究では、単一遺伝子による発症の割合は少なく、妊娠中の胎児発達での異常が注目されている。このような「予防」の観点から注目されるのは、薬剤誘発性の自閉症である。Samren ら（1997, 1999）によると、抗てんかん薬であるVPAの場合、一日の服用量が1000mgを超えるとその危険性は一層高まることを指摘している。しかしながら、日本の薬剤添付文書では「妊娠中の服薬について安全性は確立していない」というあいまいな記載がほとんどであり、臨床において有益な情報となっていない。妊娠中服薬せずに済むことが望ましいが、VPAの服薬を中断すれば発作の再発を誘発し、母体が危険にさらされるか流産の可能性も高まり、中断は容易ではない。一方、ラットにおいては妊娠中12.5日目にVPAを投与することで、出生仔が自閉症に特徴的な行動異常を示すことが明らかとなっている（Schneider et. al 2005）。これは、Rodier ら（1997）が、thalidomide 誘発性の自閉症児を研究し、外転神経に異常をきたしてきていることから、ラットにおける外転神経核確立の時期にVPA投与を行えば、自閉症モデルができるはずであるという根拠に基づいて確立したモデルである。しかし、外転神経異常を伴わない自閉症児の方が圧倒的に多数であり、外転神経核発生時点のみが自閉症の発症点とは考えにくい。外転神経核形成後の神経状態の変化として近年、VPAは神経細胞新生を促進することが報告されている（Fessler et. al 2013）。当時は脳の神経細胞は再生しないと考えられていたが、現代の研究において、脳は新しい神経を新生していることが明らかとなっている。神経疾患を伴った妊婦にとってVPA投与による神経新生促進作用効果は治療として有効であると考えられるが、成長段階における胎仔にとって無理に神経新生を促進させることはむしろアポトーシスを引き起こす可能性も考えられる。さらにVPAは一般的に、ヒストンの脱アセチル化酵素阻害剤（HDACi）としても知られている。VPAのポジティブな作用機序として脱アセチル化酵素（HDAC）阻害による神経保護効果や抗うつ効果は数多く報告されている（Foley et. al 2012, Kazantsev et. al 2008, Chuang et. al 2009）が近年、妊娠中のVPA投与による胎児の自閉症発症機序としてもHDAC阻害によるアセチル化亢進の影響が注目されている（Gurvich et. al 2005, Kataoka et. al 2011）。以上の背景から、本研究では、外転神経核形成後のVPAによって生じる自閉症の発症に注目し、行動実験、神経病理学的解析、アセチル化解析、さらに脳神経構造の変化を詳細に解析することによって、臨床性の高いVPA少量複数回投与における安全服薬領域を追求する計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目標である自閉症予防に向けて、抗てんかん薬であるバルプロ酸ナトリウム（VPA）に着目する。ゴールは妊娠中のVPA投与が仔に与える影響を解明し、自閉症発症の機序を明らかにすることによって安全に服薬できるVPA投与方法を確立することである。そのため、まずは、行動解析として仔に行動実験を行い、自閉症症状の特徴を捉える。次に神経病理解析として、自閉症モデルラットの脳の中でも特に脆弱な海馬歯状回に着目する。海馬歯状回は成体になっても神経細胞新生が継続する部位であり、神経細胞新生の数は、細胞新生のマーカーであるBrdUにより定量化する。新生した細胞が神経に正常に発達するかどうか、軸索がどのように回路を形成する

のかを形態的に明らかにする。さらにエピジェネティクス解析として、ヒストンテールのアセチル化がどのように変化するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 投与方法・投与量の確立

催奇形性過敏期における最良の VPA 投与方法の確立を行うために、投与量 100 mg/kg ~ 600 mg/kg で実験を行った。さらに、より臨床に近い条件にする為に、連日投与を行った。出産後、4 週齢及び 21 週齢に対し、行動試験及び神経病理学的解析を行った。

(2) 行動実験

記憶力の指標として、Y-maze、活動性の指標として自発運動量、不安・危険回避能力の指標として Elevated plus maze を行った。

(3) 神経病理学的解析、エピジェネティクス解析

細胞分裂に伴い BrdU が分裂細胞に取り込まれることを応用して、海馬歯状回における新生細胞数を測定した。行動試験前に BrdU は腹腔内に投与し、行動試験後に灌流固定及び脳の取り出しを行った。凍結組織は 30 μ m の厚さでスライスし、海馬が見え始める個所から海馬が見えなくなるまで順に 10 スライス毎に切片を回収した。その後、BrdU 抗体と NeuN 抗体もしくは DCX 抗体を用いて免疫蛍光組織染色を行い、BrdU 陽性細胞数及び幼弱神経細胞数をカウントした。さらにエピジェネティクスな変化を観察するために、H3-K56-AC 抗体を用いてヒストンテールのアセチル化を測定した。

4. 研究成果

(1) 投与方法・投与量の確立

Schneider (2009) における既存の VPA 投与方法を参考に、催奇形性過敏期における最良の VPA 投与方法の確立を行ってきた。具体的には投与量を 100 ~ 600mg/kg で比較して行動実験で異常が認められ、かつ死産が少なく臨床に即した条件を追求した。よりヒトに近い投与条件にするために出産まで VPA を連日投与した。結果として、VPA (100mg/kg) で行動と脳神経構造の異常が見え始め、VPA (200mg/kg) においては行動と脳神経構造の異常が顕著に見られるようになり、さらに尾に奇形が見え始めた。しかし、VPA (300mg/kg) 以上においては流産や死産が認められた。以上の条件検討により以降の VPA 研究は妊娠 12.5 日目から出産までの 9 日間 VPA (100 ~ 200mg/kg) を連日投与するという土台のもと行われた。

(2) 奇形率・行動実験

図 1 . A : げっ歯類において、VPA 暴露と関係があると報告されている尾の奇形率を調べた結果、コントロール群及び VPA (100mg/kg) 群において、尾の奇形は観察されなかった、しかし、VPA (200mg/kg) 群の 12 匹のラットのうち 8 匹 (66.6%) は屈曲した尾を示した。

図 1 . B : オープンフィールド試験中の自発運動活性の時間経過を示した。自発的活動の大きさは最初の 30 分で減少する傾向があり、その後はすべての群で安定していた。VPA (200mg/kg) 群のラットは、コントロール及び VPA (100mg/kg) 群よりも高いレベルの自発運動活性を示した。

図 1 . C : オープンフィールド試験において 60 分間にわたる自発運動量の大きさを棒グラフで示した。VPA (200mg/kg) 群のみが高いレベルの自発運動活性を示した。

図 1 . D : 記憶力の評価として、Y 字型迷路評価の結果をグラフに示したが有意な差は得られなかった。VPA は記憶力に影響しないという結果になった。

図 1 . E : 不安や危険回避能力の指標として高架式十字迷路テストを行った。VPA 群はコントロール群よりもオープンアームでの滞在時間が長いという結果になった。

以上の結果をまとめると、VPA 投与群は自発性が高く危険回避能力の欠如が認められたため、ADHD のような行動特徴を示すことが分かった。

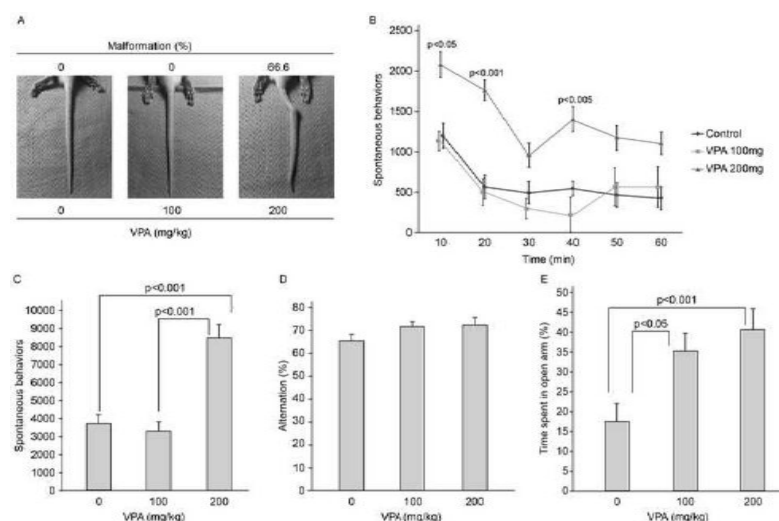


図 1: 奇形率と行動実験

(3)神経病理学的解析、エビジェネティクス解析

図2 . A : 各グループの BrdU 陽性細胞数を示した。VPA 容量依存的に BrdU 陽性細胞数の増加が認められた。

図2 . B : 歯状回(DG)中の BrdU 陽性細胞数の分布を示した。海馬前部 DG と後部 DG に細分し、グラフ化した。コントロール群では、前部より後部の BrdU 陽性細胞数が多かったが、VPA 濃度依存的にその差は縮まり、逆転する傾向となった。

図2 . C : BrdU 陽性細胞数及び自発運動活性の分布図で示した。分布図は、前部 DG の BrdU 陽性細胞数と自発運動量の大きさの関係をj示している。三角はコントロール、丸は VPA(100mg/kg)群、四角は VPA(200mg/kg)群を示す。前部 DG における BrdU 陽性細胞の数は、全群にわたる自発運動量の大きさと正に相関していた。

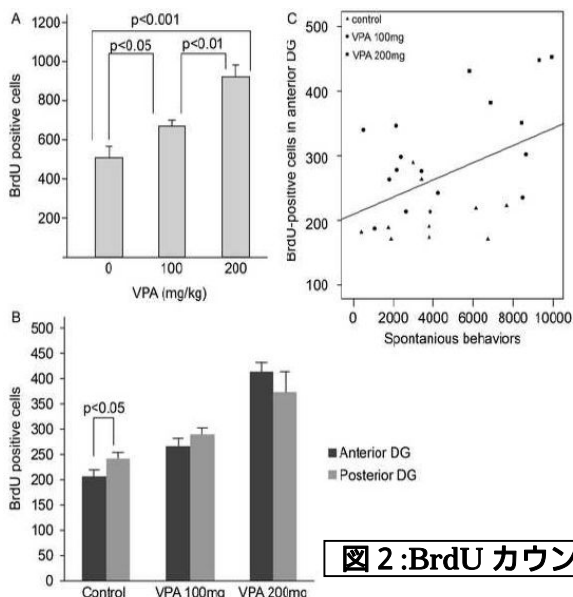


図2 :BrdU カウント実験

図3 . A 1 ~ C 3 : 海馬歯状回を BrdU 及び DCX で二重染色した。赤 : BrdU、緑 : DCX、VPA 曝露群において、DCX の蛍光強度が強く観察された。

図3 . D 1 ~ D 3 : 白い三角形は BrdU + / DCX +、白い矢印は BrdU + / DCX -、白いスケールバーは 20 μ m を示す。

図3 . E 1 : BrdU + / DCX +細胞の数は用量依存的に増加を示した。

図3 . E 2 : BrdU 陽性細胞の約 80%が DCX で二重染色され、コントロール群と VPA 群との間に有意差は認められなかった。

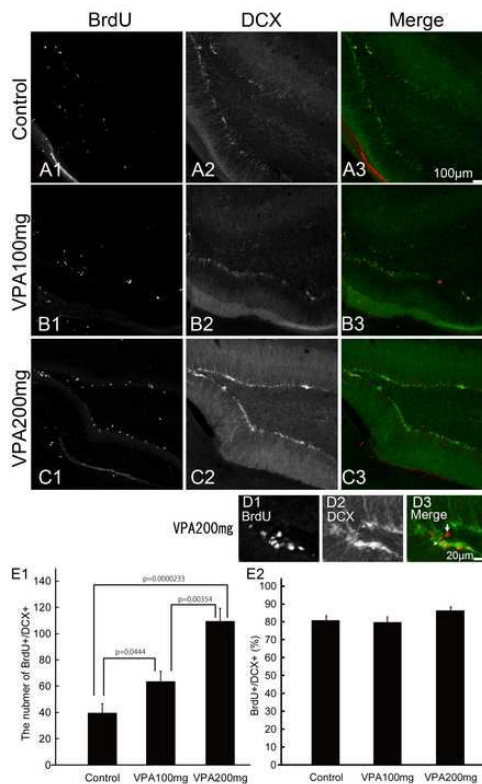


図3 :海馬細胞の分化実験

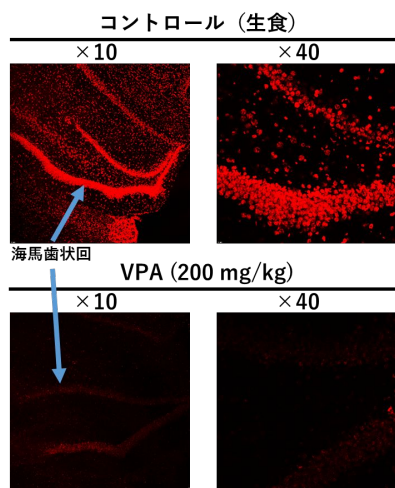


図4 :海馬のアセチル化
VPA 投与群の仔において
Acetyl H3K56 の蛍光強度
が有意に減少した。

図4 .ヒストン H3 のヒストンテールにあるリジン残基 K56 のアセチル化に対する抗体を用いて海馬における免疫蛍光組織染色を行った結果、VPA 投与群の仔において有意なアセチル化の減少が認められた。これは胎児期に VPA の影響を受けることで、外部から過剰に HDAC が抑えられすぎた結果、内在性の HDAC 遺伝子発現レベルが恒常性維持のために上昇してしまった結果起こりえたのではないかと推測した。

(4)研究結果のまとめ

VPA 濃度依存的に注意力が欠如し自発性の高い ADHD のような行動特徴がみられ、BrdU 陽性細胞数は増加、いずれの濃度においても BrdU 陽性細胞に対する DCX 陽性細胞数の割合は約 80%を示した。さらに、VPA200mg/kg 投与群における H3-K56-AC (ヒストンテール H3-K56 のアセチル化)は有意に減少した。外表奇形については、VPA200mg/kg 投与群のほとんどの仔において、尻尾の先端に奇形が観察された。さらに、結果の図には示していないが、21 週齢の仔において同様な実験を行ったところ、行動異常は消失、BrdU 陽性細胞数と H3-K56-AC に関しては 4 週齢と比較して急激に減少しており、4 週齢とは異なる結果となった。

本研究では、安全な VPA の服薬において、投与量が重要であることを示し、その作用機序に、神経細胞新生とヒストンテールのアセチル化が関与する事を示した。さらに年齢を重ねる毎に VPA の副作用は減少する可能性も示唆した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

金城智也、Evaluation of animals induced by prenatal exposure to valproic acid in behaviours and neurogenesis、第 13 回世界生物学的精神医学会議、2017

金城智也、妊娠中のバルプロ酸投与は出生仔ラットの歯状回において、認知機能と神経新生の変化に影響する、第 28 回日本臨床精神神経薬理学会第 48 回日本神経精神薬理学会合同年会、2018

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。