

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591421

研究課題名（和文）：バルプロ酸投与による胎児脳のヒストン修飾と新生児期神経回路へ及ぼす影響

研究課題名（英文）：Histone modification in a rat fetal brain an neuronal network formation in a rat neonate after prenatal valproic acid treatment.

研究代表者：桑形麻樹子（KUWAGATA MAKIKO）

昭和大学・医学部・客員教授

研究者番号：70398684

研究成果の概要（和文）：

妊娠初期バルプロ酸(VPA)服用により出生児に見られる自閉症の発現機序を解明するために、VPA の薬理作用の一つであるヒストン脱アセチル化酵素阻害作用に注目し、VPA 投与後の胎児脳におけるヒストン修飾と VPA 投与後に胎児脳に発現する形態異常との関連性を調べた。SD、F344、WK ラットを用いて検討した結果、胎児脳に認められる大脳皮質における細胞移動障害には系統差はなかったが、中脳の神経走行異常発現には系統差がみられたことから、VPA 投与による一部の胎児脳への影響には遺伝的要因が関与するものと関与しないものがあることが明らかになった。また、胎生期 VPA 投与後のラット新生児期の神経回路を調べた結果、生後 11 日齢で既に恐怖性が高まっていることが明らかになった。なお、本研究では VPA の HDAC 阻害作用と胎児脳に発現する形態異常との関連性の有無を明らかにすることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

Clinical reports revealed that VPA exposure during early pregnancy increases the risk of a child having an autistic disorder. In this study, focusing on VPA pharmacological action, inhibition of histone deacetylase, the relationship between histone modification and morphological changes in the rat fetal brain after VPA treatment was examined. Disruption of neuronal migration in the cortex was detected in SD, F344 as well as Wistar Kyoto (WK) rat fetus at the gestational day (GD)16 after VPA treatment at GD11. However, abnormal neural running tract in the midbrain was observed in SD rat fetal brain, but not in F344 or WK rat fetal brain, indicating that "some" morphological changes in the fetal brain are partly due to genetic factors. In the functional observation of neonates on postnatal day 11, an abnormal brain function, such as an increase in fear response, was identified on analyzing the distribution of c-Fos immunoreactive cells after maternal derivation in neonate treated prenatally with VPA. The study could not go to schedule in order to different sensitivity for VPA among rat strains. Therefore, effects of histone modification by VPA on morphological changes in a rat fetal brain have not revealed in this study period.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：胎児医学、脳発達障害

1. 研究開始当初の背景

環境化学物質あるいは一部の医薬品の子宮内曝露により、脳発達障害が子どもに誘発されることが疫学調査により報告されているが、発現機序については未だ不明な点が多い。実験動物を用いた多くの脳発達障害の研究は、性成熟後の動物の行動観察および脳の形態学的観察といった生後観察に重点がおかれてきた。これに対し、我々は、化学物質曝露直後の胎児脳や出生児脳に注目して、神経発生への直接的な影響を検出し、新生児期の神経回路の評価法の検討を行ってきた。近年のエピジェネティクスの研究から、胚・胎児の発生・分化の過程においても、時期・組織特異的な DNA のメチル化やヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化などの化学修飾による転写誘導とその後の HDAC や脱メチル化酵素などによるクロマチン構造の形成が、遺伝子発現記憶に重要な役割を担っていることが明らかになってきた。すなわち、胎生期の化学物質によるエピジェネティクスの破綻が、生後に発現する脳発達障害の発症の一因となりうると考えられる。したがって抗痙攣作用のほかに HDAC 阻害作用がある VPA も、子宮内曝露により胎児の制御系を乱している可能性はある。

我々は、既に SD ラットを用いて、妊娠 11 日（膣栓確認日=妊娠 0 日）に 800 mg/kg のバルプロ酸 (VPA) を経口投与した後、妊娠 16 日の胎児脳を形態学的に観察し、大脳皮質における神経細胞移動障害 (大脳皮質皮質板; CP の低形成)、峽窩遺残部 (中脳-後脳境界部) の神経軸索突起の走行異常、カテコールアミン神経 (tyrosine hydroxylase; TH 陽性細胞) およびセロトニン神経 (5-HT 陽性細胞) の分布異常を検出している。

こうした背景のもと、VPA 投与による胎児脳の HDAC 阻害作用が、我々が検出した胎児脳の形態学的変化に関与しているのではないかと、中脳-後脳境界部のモノアミン神経の分布を統御している転写因子自体が VPA 投与により HDAC 阻害を受け、転写誘導をかく乱させることで機能形態学的変化を起こさせ、さらに生後の機能障害の発現につながっているのではないかと仮説を立てた。VPA 投与後の胎児脳の形態学的変化は、将来、欠損といった器質的な奇形となる形態異常ではなく、機能障害を誘発しうる変化と考えられる。しかし、形態学的変化が認められなくても胎生期に受けたエピジェネティクスな

変化が、新生児期に機能的変化として発現している可能性は高い。我々は、ヒトの新生児に相当する生後 11 日齢の正常ラット新生児を用いて、親子隔離刺激後の神経活動領域を c-Fos 蛋白を指標として検討し、新生児期には嗅覚、ストレス系神経回路が確立していることを既に確認している。そこで、この手法を用いて、胎生期 VPA 投与後の新生児期の神経回路異常を調べることで、VPA 投与後の胎児脳のコグニティブ機能と生後の機能障害の関係性を明らかにすることが可能であると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

妊娠初期 VPA 服用により出生児にみられる自閉症の発現機序を解明するために、VPA の薬理作用の 1 つであるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害作用に注目し、VPA 投与後の胎児脳におけるヒストン修飾と我々が検出した形態学的変化 (前述) との関連性を解明することを試みる。さらに、我々が確立した出生児脳のネットワーク検出法を用いて、胎生期 VPA 投与後のラット新生児期の神経回路への影響を検討し、胎生期 VPA 投与による胎児脳のコグニティブ機能と生後の機能障害の発現を、胎児脳および新生児脳観察から解明することを試みる。

本研究では、胎生期 VPA 投与による胎児脳のコグニティブ機能が形態学的変化を誘発し、生後の機能障害発現の一因となりうることを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

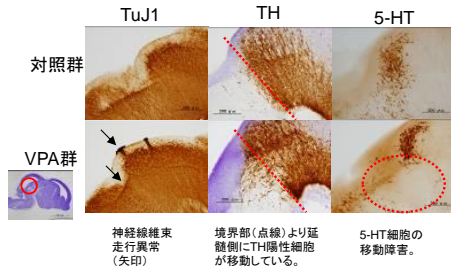
(1) 胎生期 VPA 投与により胎児脳に発現するヒストン修飾の分布・局在、発現量の解析

ラット妊娠 11 日に VPA を経口投与し、妊娠 16 日の胎児脳全領域のヒストン修飾の有無および分布を HDAC1 酵素、アセチル化ヒストン 3 およびアセチル化ヒストン 4 蛋白を指標として免疫組織染色で検出する。

(2) 胎生期 VPA 投与による胎児脳転写因子のヒストン修飾と形態学変化発現との関連性の解明

我々が実施した胎児脳観察において、中脳-後脳境界部のドーパミン (DA) 合成酵素 (Tyrosine hydroxylase, TH) およびセロトニン (5-HT) 陽性細胞の境界が不明瞭になっていたことから (下図)、この境界部の TH および 5-HT 分布

を統御している代表的な転写因子である *Gbx2* および *Otx2* の遺伝子発現を調べる。



VPA投与後に胎児中脳領域に認められた形態学的変化(胎齢16日)
(Ku wagata et al., 2009)

なお、これらの転写因子発現にVPA投与による影響はないと考えられた場合には、胎児脳のDNA arrayを実施して、他の候補因子を選択する。

(3) 胎生期VPA投与による新生児期の神経回路異常の検出

胎生期に受けた脳のヒストン修飾が新生児期の神経回路形成へ影響を及ぼしているかを確認するために、母子隔離刺激により新生児脳を刺激した後、神経活動領域を対照児と比較し、生後の機能異常を新生児期に検出する。

(1)-(3)の結果から、胎生期VPA投与により胎児脳に発現したヒストン修飾、胎児脳に認められた形態異常および新生児脳の神経回路への影響との関連性を明らかにする。

4. 研究成果

本研究は、分子生物学的手法による検索を行うために、inbredラットを用いて、SDラット(outbred)で検出された形態異常が再現されるかを確認した。

(1) 使用動物および用量設定

将来、性成熟後の行動試験の再現性が確認できるようにF344(F344/DuCr1Cr1j)ラットを選択した。Outbred動物に比較してinbred動物は化学物質に対する感受性が高いことがあることから、最初にVPAの投与量を検討した。既報に準じ、各用量のVPAを蒸留水に溶解し、妊娠11日にVPAを経口投与(5mL/kg)して妊娠16日に帝王切開した。その結果(表1)、SDラットで評価した800mg/kg投与群では全胎児が死亡する例がみられ、胎児毒性が強く発現した。600mg/kg投与群では対照群に比較して胎児死亡率が増加しVPAの生殖毒性が認められる用量であったことから、VPAの投与量を600mg/kgに設定し胎児脳を評価した。

表1. 帝王切開所見(妊娠16日、F344ラット)

Treatment	mg/kg	Dams	Implants	No. Live fetus	Fetal mortality
VPA	1200	1	9	0	100
	800	2	9.5 ± 0.7	2.5 ± 3.5	75 ± 35.4
	600	7	9.5 ± 0.7	7.6 ± 3.5	17.2 ± 36.8
	400	2	8 ± 1.4	8 ± 1.4	0
	200	1	8	9.5	0
Cont	0	6	8.7 ± 0.8	8 ± 0.6	7.4 ± 5.7

(2) VPA投与後に観察された胎児脳の形態学的変化

SDラットを用いた我々の既報で報告しているVPA投与後の妊娠16日の胎児脳での形態異常(大脳皮質・中脳)がF344ラットでも観察されるかを確認した。その結果、CPの低形成は600mg/kg投与群により観察された。しかし、中脳の神経束の走行異常は認められなかった(図1)。

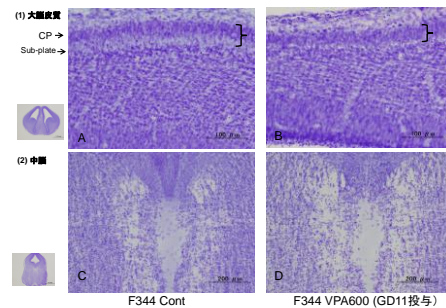


Fig.1 F344ラットにおけるVPA投与後の胎児脳の形態学的変化
VPA投与群の大脳皮質領域ではCPの低形成が認められた。中脳領域には、VPA投与による変化はなかった。

そこで、アウトブリードではあるが、遺伝子解析データが豊富にあるWistar Kyoto(WK)ラットについても同様に検討した。妊娠11日に400、600、800mg/kgのVPAを経口投与し、妊娠16日に帝王切開した結果、800mg/kgにおいて重篤な胎児毒性が認められなかったことから、SDラットと同様にVPAの投与量を800mg/kgに設定し、胎児脳を評価した。その結果、CPの低形成は600mg/kg投与群により観察された。しかし、中脳の神経束の走行異常は認められなかった(図2)。

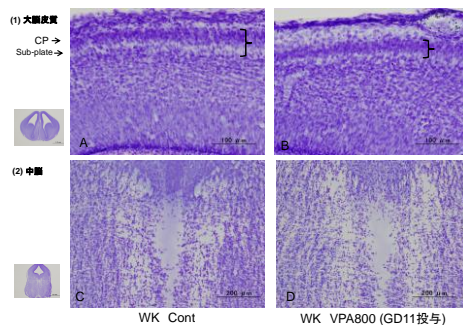


Fig.2 Wistar KyotoラットにおけるVPA投与後の胎児脳の形態学的変化
VPA投与群の大脳皮質領域ではCPの低形成が認められた。中脳領域には、VPA投与による変化はなかった。

これらのことから、中脳の異常発現には系統差が存在することが明らかになった。他系統での検討が課題として残されたが、大脳皮質の形態異常はSDラットと同様に

観察されていることから、F344 ラットを用いて本課題を続行することとした。

SD ラットでは 800 mg/kg のみの検討であったために、400 mg/kg 投与群を新たに設定し、胎児脳の評価を行った(表 2)。

表 2. 帝王切開所見(妊娠 16 日、SD ラット)

Treatment	mg/kg	Dams	Implants	No. Live fetus	Fetal mortality
VPA	800	6	14.5 ± 1.5	11.2 ± 4.8	23.0 ± 32.6
	400	5	16.2 ± 1.8	15.6 ± 2.1	5.1 ± 2.8
Cont	0	4	13.7 ± 1.2	13.3 ± 1.5	2.6 ± 4.4

400 mg/kg の VPA 投与により、着床数および胚死亡率には対照群との間に差はなかった。800 mg/kg 投与群に観察された CP の低形成およびは中脳の神経束の走行異常は 400 mg/kg 投与群においても観察された。発現頻度は 800 mg/kg 投与群と同等であったが、程度は軽度であった(図 3)。

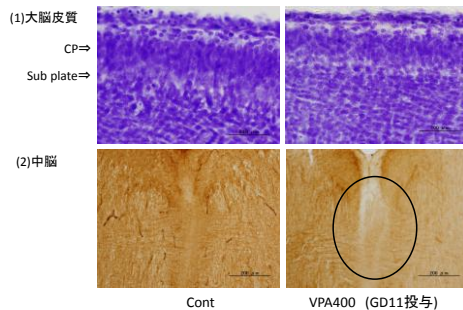


Fig.3 SDラットにおける VPA 投与後のGD16胎児脳の形態学的変化
400 mg/kgのVPA投与においても、CPの低形成および中脳領域の神経束の走行異常が観察された。

SD ラットでは VPA の投与用量を 800 から 400 mg/kg に下げても、程度は軽減したが同様に形態異常が検出されたことから、大脳皮質および中脳に観察された形態学的異常は VPA 投与による影響である。なお、中脳の異常は F344 および WK ラットでは認められなかったことから、この領域の形態異常発現には遺伝的影響を受けると考えられた。

(3) 胎生期 VPA 投与により胎児脳に発現するヒストン修飾の分布・局在

アセチル化ヒストン 3 (H3)、アセチル化ヒストン 4 (H4) 蛋白、HDAC1 酵素を指標として、F344 ラットの妊娠 16 日の胎児脳の全領域の免疫組織染色を行い、VPA 投与によるヒストン修飾の発現・分布を調べた。妊娠 11 日に 200-600 mg/kg の VPA を経口投与し、妊娠 16 日に胎児脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド・0.1M リン酸緩衝液固定液に 2 日間固定した。その後、ゼラチンにて包埋し、ビブラトームにて 45µm の厚さの全頭断切片を連続的に作製した。免疫組織染色は浮遊法にて実施した。

使用抗体:

Acetyl-Histone H3: Cell Signaling

Acetyl-Histone H4: Cell Signaling

HDAC1: abcam

その結果、H3 および H4 の発現は、胎児脳全領域に認められた。しかし、血球および脳膜には陽性細胞は観察されなかった。また、VPA 群と対照群とでは顕著な差は形態学的観察では差は認められなかった(図 4)。H3 と H4 では、H3 の発現は H4 よりも強く観察された。HDAC1 については入手した抗体にてシグナルが検出できなかった。

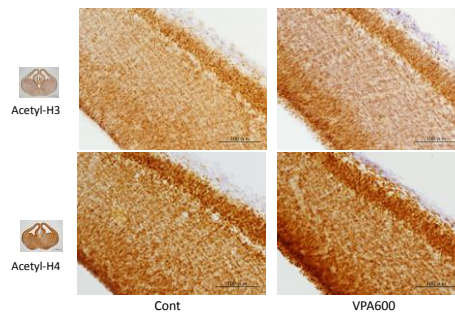


Fig.4 F344ラットにおける VPA 投与後のGD16胎児脳のヒストン修飾
アセチル化H3およびH4は胎児脳全領域に観察された。対照群とVPA600 mg/kg投与群との間に差はなかった。

IHC 法では VPA 投与によるヒストン修飾への影響を検出することは困難と判断し、他の抗体にての試みは実施しなかった。

(2) 転写酵素の関与(RT-PCRによる確認)

中脳-後脳境界部の TH および 5-HT 分布を統御している代表的な転写因子である *Gbx2* および *Otx2* に注目し(Li J. and Joyner A. 2001; Brodski *et al.*, 2003)、上記の既報を参考に、Gbx2 および Otx2 の PCR 用のプライマーを作製した(図 5)。

Primer sets:

otx2F 5'-ATGATGTCTTATCTAAAGCA-3'
otx2R 5'-TCACAAAACCTGGAATTTCC-3'
gbx2F 5'-TGGATAAGGATGGCAAGAAG-3'
gbx2R 5'-AACCTCTGAACCAATGTGC-3'

図5 作製したプライマー設計図

VPA 投与後の妊娠 16 日の胎児脳から TRIzol 試薬を用いて全 RNA を抽出した。2µg 全 RNA を d(N)6 ランダムプライマーと逆転写酵素 (SuperScript VILO) を用いて cDNA を作製後、上記プライマーを用いて RT-PCR を行い、1.5%アガロースゲルで電気泳動した。PCR 産物は otx2 は 870 bp、gbx2 は 793 bp である。

その結果、gbx2 および otx2 とともに GD16 胎児脳では発現がみられたが、VPA の 600 mg/kg 投与群と対照群では両者の発現量に差は認められなかった(図 6-1、6-2)。

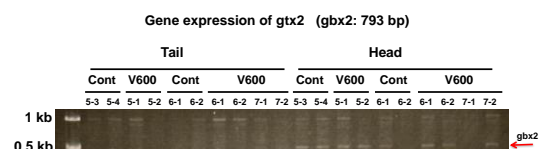


図6-1 VPA投与後の妊娠16日胎児脳におけるgbx2の発現



図6-2 VPA投与後の妊娠16日胎児脳におけるotx2の発現

今回の結果から、F344 ラットでは、VPA 暴露後の胎児脳の gbx2 および otx2 の発現に対して VPA の影響は少ないと考えられた。しかし、F344 では中脳領域に形態異常が観察されていないことが一因と考えられる。一方、RT-PCR のサンプルは脳組織全体の評価であるため、局所の変化はわからない。そこで、遺伝子の局在を検討するために in situ ハイブリダイゼーション法の条件設定を試みた。

(3) 転写酵素の胎児脳組織中の局在 (in situ ハイブリダイゼーション法による確認)

gbx2 と otx2 の cRNA のプローブ作製を作製するために Wistar ラット全脳より TRIzol 試薬を用いて全 RNA を調製した。4µg 全 RNA を d(N)6 ランダムプライマーと逆転写酵素 (SuperScriptIII) を用いて cDNA を作製した。上記の otx2 プライマーおよび gbx2 プライマーを用いて PCR を行い otx2 および gbx2 cDNA を得た。これら cDNA を TA Cloning によって RNA ポリメラーゼ認識部位のあるベクターに挿入した。制限酵素 NotI または SpeI で一カ所を切断し、T7 RNA ポリメラーゼまたは SP6 RNA ポリメラーゼでジゴキシングニン (DIG) 標識した cRNA アンチセンスまたはセンスプローブを作製した。挿入された otx2 および gbx2 cDNA はキャピラリー式自動シーケンサーで確認した。

妊娠 16 日の胎児を摘出後、OTC コンパウンドで包埋し、凍結切片を作製した。4%パラホルムアルデヒド含有 0.1M リン酸緩衝液 (PBS) で後固定を行い、47 度のハイブリダイゼーション液中で (4xSSC、1 x Denhard' s buffer、10% dextran sulfate、2 mM EDTA、50% formamide、500 µg/ml サケ精子 DNA) プレハイブリダイゼーションを行った。その後、アンチセンスまたはセンス cRNA プローブ含を加え、45 度で 16 時間ハイブリダイゼーション反応を行った。50 度の 0.2 x SSC 含有 60%ホルムアミド溶液で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗 DIG 抗体で免疫反応を行った。チラミド増感法でシグナルを増強した後、フルオレセ

イン標識ストレプトアビジンで発光させ、蛍光顕微鏡で観察した。組織浸漬固定群と切片にしてから固定を行う後固定群で in situ hybridization 法を試みた。その結果、図 7 に示すとおり、神経層に強いシグナルが検出された。このプローブを用いた本条件下により、組織内分布の確認を確認する予定である。

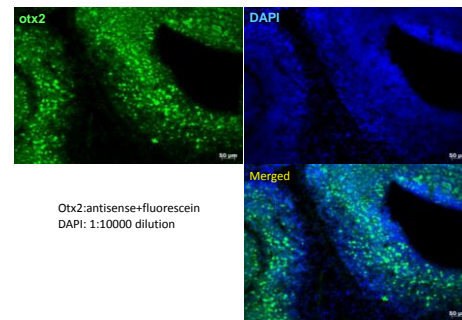


図7 VPA投与後の妊娠16日胎児脳におけるotx2の局在 (ISH法)

(4) VPA 暴露後の胎児脳における遺伝子発現 (DNA マイクロアレー解析)

研究計画当初に候補とあげた 2 種の遺伝子の発現は、F344 および WK ラットにおいては VPA 投与による影響が低い可能性があるため、Wistar rat (全脳) および F344 rat (前頭部のみ) を用いて、VPA 暴露後の妊娠 16 日胎児脳から mRNA を抽出後、Dye-Swap 法にて DNA マイクロアレイ解析を実施し、遺伝子発現について対照群と VPA 投与群との比較をした。妊娠 16 日胎児脳では遺伝子量が少なかったために、遺伝子発現量のみで標的遺伝子を選択するのではなく、増減率が顕著なものを選択することにした。現在、これらの遺伝子情報を解析中である。

(5) 胎生期投与による新生児期神経回路への影響

新生児脳の神経回路の検討では、胎児脳観察と同様に SD 雌ラットの妊娠 11 日に 800 mg/kg の VPA を暴露し、母動物は自然分娩させた (出産日 = 生後 0 日)。生後 11 日に、新生児を 20 分間親子隔離し、その後 4%PFA にて灌流固定して脳を摘出し、胎児脳観察時と同様にビブラトームによる全頭断連続切片を作製し、新生児脳の c-Fos 蛋白の分布を免疫組織染色法により調べた。

その結果、室傍核、分界条床核、海馬および青斑核の c-Fos 陽性細胞数を調べた結果、青斑核でのみ VPA 群での有意な陽性細胞数の増加が認められた (図 8)。この結果は、胎生期 VPA 暴露により新生児期に既に恐怖性の亢進が起こっていることを示唆している。

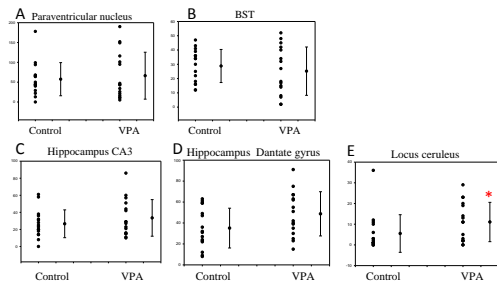


Fig.8 生後11日1時間親子隔離後における室傍核(A)、分界条床核(B)、海馬CA3領域(C)及び歯状回(D)、青斑核(E)のc-Fos陽性細胞数 *、 $p < 0.05$ vs control

さらに、各神経核間の相関性についても解析する予定である。神経核間の相関性を評価することで、染色性による影響あるいは個体間における陽性細胞発現率の影響を除去できるのではないかと考えている。

今回、母子隔離処理というストレスを新生児に与えて評価をしたが、各神経核間の相関性を評価するには、新生児へ与えるストレスの方法についてはさらなる検討が必要であるという課題が残された。現在、腹腔内投与ストレスを考え、検討を開始した。

(6) 今後の課題

本研究では、胎生期 VPA 投与により出生児に発現する自閉症（脳発達障害）の発現機序に VPA の HADC 作用が関与しているのではないかという観点から研究を実施した。

VPA に対する感受性が動物系統により異なることは、マウスを用いた研究から報告されていたが、本研究の結果、ラットにおいても系統差があることが明らかになった。しかし、SD、F344、WK ラットともに大脳皮質の形態異常は観察されていることから、VPA 誘発性の脳発達障害は一部の形態（機能）異常には遺伝的影響が関与するが、すべてが遺伝的要因ではないと考えられた。これは、臨床における自閉症発現の機序解明において有用な情報である。

また、新たな 2 種の系統を用いても中脳領域の異常を検出することができなかったことは、本研究の進行に影響を及ぼし、方向性の修正も必要となった。分子生物学的手法を用いる上では inbred 系を用いることが条件の 1 つであるが、新たなラット inbred 系にて検討をするかあるいはマウスを用いるかは系統選択に時間を要する。C57BL マウス (inbred) では、胎生期 VPA 投与により胎児には外脳症が発現するために、使用する系統は慎重に選択する必要性が残されている。

一方、既報に準じて Gbx2 および Otx2 の PR-PCR 用のプライマーの設計および in situ ハイブリダイゼーション用のプローブの作製をし、胎児脳をサンプルとしたプロトコルを確立した。本研究では、VPA 投与とこれらの遺伝子発現との関連性が明らかにはならなかった。しかし、現在、胎

生期暴露により、生後に脳発達障害を発現する懸念のある重金属や VPA とは異なる機序をもつ抗癌薬を用いて胎児脳評価を行っており、中脳領域は重要な標的領域である結果を得ている。従って、本研究にて設計したプライマー、プローブおよびプロトコルは、他の化学物質投与による脳発達障害実験において応用ができる。

また、本研究終了時には結果が間に合わなかったが、F344 および WK ラットの胎児脳を用いて、DNA-array 解析を実施し、現在解析を実施中である。変動した遺伝子数は少なかったために、次のステップへ期待できる。

生後 11 日の新生児を用いたネットワーク形成異常検出の検討では、生後 11 日において VPA 投与群では恐怖性の亢進を示唆する結果を得た。ラットの生後 11 日はヒトの新生児期に相当するために、今回の結果は、臨床における早期発見に応用できると考えられる。

当初の予定から実験計画を変更する必要性がでてきたために、全体的に研究の進行がやや遅れ、本研究の 1 つの課題であった VPA 投与による脳発達障害の発現機序とヒストン修飾との関連性を明らかにすることはできなかった。しかし、本研究にて得られた結果は、次へのステップに重要な情報源である。現在、メチル化をターゲットとした遺伝子解析の解析条件も確立したことから、近いうちに有用な情報が得られることは十分期待できる。

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 15 件)

- 1) Orito K., Morishima A., Ogawa T., Muneoka K., Kuwagata M., Takata J., Mishima K., Fujiwara M.: Characteristic behavioral anomalies in rats prenatally exposed to 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Int J Dev Neurosci.* 27, 81-6, 2009.
- 2) Imai K., Kusakawa S., Tanoe A., Kuwagata M., Senuma M., Furuya M., Takashima H.: An Attempt to Cell Recovery Factor in the Cell differentiation culture with the embryonic stem cell test (EST). *J. Oral Tissue. Engin.* 6, 152-158, 2009.
- 3) Kuwagata M., Ogawa T., Shioda S., Nagata T.: Observation of fetal brain in a rat valproate-induced autism model; a developmental neurotoxicity study. *Int J Dev Neurosci.* 27; 399-405, 2009.
- 4) Muneoka K., Kuwagata M., Shirayama Y,

- Ogawa T, Shioda S :Biphasic effects of neonatal allopregnanolone on striatal dopamine metabolism. *Neuroreport*. 20; 860-863, 2009.
- 5) Muneoka K, Kuwagata M, Ogawa T, Shioda S : Sex-specific effects of early neonatal progesterone treatment on dopamine and serotonin metabolism in rat striatum and frontal cortex. *Life Sci*. 18: 738-42, 2010.
- 6) Ogawa T, Rakwal R, Shibato J, Sawa C, Saito T, Murayama A, Kuwagata M, Kageyama H, Yagi M, Satoh K, Shioda S: Seeking Gene Candidates Responsible for Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *Congenit. Anom. (Kyoto)* 51; 70-79, 2011.
- 7) Kuwagata M, Muneoka K, Ogawa T, Shioda S: Effects of the genotoxic agent 5-bromo-2'-deoxyuridine with or without pre-pubertal gonadectomy on brain monoamines and their metabolites in female rats. *Brain Res Bull*. 85; 207-11, 2011.
- 8) Ogawa T, Wakai C, Saito T, Murayama A, Mimura Y, Youfu S, Nakamachi T, Kuwagata M, Satoh K, Shioda S: Distribution of the longevity gene product, SIRT1, in developing mouse organs. *Congenit Anom.(Kyoto)* 51:70-79, 2011.
- 9) Yakabe T, Takashima H, Kuwagata M, Fukao M, Kikuchi S, Yajima N.: Teratogenicity and maternal effects of *Lactobacillus brevis* KB290 in rats and rabbits. *Food Chem Toxicol*. 49:722-726 , 2011
- 10)Ogawa T, Rakwal R, Shibato J, Sawa C, Saito T, Murayama A, Kuwagata M, Kageyama H, Yagi M, Satoh K, Shioda S: Seeking gene candidates responsible for developmental origins of health and disease. *Congenit Anom (Kyoto)*. 51:110-25, 2011
- 11)Kuwagata M, Ogawa T, Muneoka K, Shioda S: Hyperactivity induced by prenatal BrdU exposure across several experimental conditions. *Congenit Anom (Kyoto)*. 51:177-182, 2011
- 12)Toyoizumi T, Ohta R, Nakagawa Y, Tazura Y, Kuwagata M, Noguchi S, Yamakage K. : Use of the in vivo skin comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin. *Mutation research*. 726: 175-180, 2011
- 13)Toyoizumi T, Ohta R, Nakagawa Y, Tazura Y, Kuwagata M, Noguchi S, Yamakage K. : Use of the in vivo skin comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin. *Mutation research*, 743: 42-51, 2012.
- 14)Ogawa T, Kuwagata M, Muneoka M, Wakai C, Senuma M, Shioda S : Abnormal brain function of the rat neonate in a prenatal 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-induced developmental disorder model. *Inter. J. Dev. Neurosci.(2012) in press*
- 15)Kuwagata M: Current problems of *in vivo* developmental neurotoxicity tests and a new *in vivo* approach focusing on each step of the developing central nervous system *Congenit Anom (Kyoto) in press*
- [学会発表] (計 33 件)
- 1) 高島宏昌、吉田由香、瀬沼美華、桑形麻樹子、丸茂秀樹、井上雪乃、佐藤 旭、太田 亮、小島幸一、青山博明 : Br1Han:WIST@Jc1 (GALAS) 由来甲状腺腫大ラットの遺伝性矮小児におけるレボチロキシナトリウム製剤投与効果、実験動物学会 (大宮、2009. 5)
- 2) 桑形麻樹子、小川哲郎、塩田清二、永田伴子:ラット胎生期バルプロ酸曝露の胎児脳発達への影響、第 49 回日本先天異常学会学術集会(鹿児島、2009. 7)
- 3) 小川哲郎、桑形麻樹子、永田伴子、塩田清二:ラット胎生期 BrdU 曝露脳発達障害モデルにおける新生児脳の機能形態学的異常の検出、第 49 回日本先天異常学会学術集会(鹿児島、2009. 7)
- 4) 小川哲郎・養父佐知子・齋藤智美・三村雄一・桑形麻樹子・中町智哉・若井千鶴・佐藤和恵・塩田清二: マウスの胎児および新生児期における主要臓器での SIRT1 発現の免疫組織学的観察. 第 9 回日本抗加齢医学会 (東京、2009. 6)
- 5) 小川哲郎・養父佐知子・齋藤智美・村山綾・三村雄一・中町智哉・桑形麻樹子・佐藤和恵・宇住晃 治・塩田清二: 低核酸餌曝露が生体に及ぼす影響について:ヤングアダルトマウス(13 週齢)を用いた研究. 核酸・核タンパク機能性研究会第 4 回学術集会(恵庭、2009. 7)
- 6) Ogawa T, Wakai C, Saito T, Murayama A, Mimura Y, Youfu S, Kuwagata M, Nakamachi T, Sato K, Shioda S: Observation of the longevity gene product, SIRT1 immunoreactivity in the developing mouse nervous system. The 39th

- Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Chicago, IL, 2009. 10)
- 7) 桑形麻樹子、小川哲郎、臼見憲司、熊谷文明、塩田清二、斉藤義明、永田伴子：胎生期バルプロ酸曝露動物における新生児評価：胎児脳観察と生後脳観察の比較第 26 回日本毒性病理学会（金沢、2010. 2）
 - 8) M. Kuwagata, T. Ogawa, S. Shioda, T. Nagata.: Valproate-induced abnormal development neurotoxicity: fetal brain observation versus postnatal brain observations. 49th Society of Toxicology, (Salt Lake City, 2010, 03.)
 - 9) T. Ogawa,M. Kuwagata, T. Nagata, S. Shioda.: Detection of BrdU-induced developmental neurotoxicity by immunohistochemical observation of parvalbumin.. 49th Society of Toxicology, (Salt Lake City, 2010, 03.)
 - 10) 桑形麻樹子、小川哲郎、影山晴秋、永田半子、塩田清二：ラット胎生期バルプロ酸曝露による自閉症モデルの胎児および新生児脳の観察. 第 115 回日本解剖学会（盛岡、2010.3）
 - 11) 小川哲郎、桑形麻樹子、永田伴子、塩田清二：ラット胎生期 BrdU 曝露脳発達障害モデルにおける新生児(生後 11 日)脳の形態学的観察 第 50 回日本先天異常学会学術集会(淡路、2010. 7)
 - 12) 小川哲郎、若井千鶴、村山綾、斉藤智美、桑形麻樹子、塩田清二：胎生および新生児期の神経系における長寿遺伝子 SIRT1 の免疫組織学的観察 第 50 回日本先天異常学会学術集会(淡路、2010. 7)
 - 13) 桑形麻樹子、小川哲郎、塩田清二、永田伴子：ラット胎生期バルプロ酸曝露の出生児脳の発達への影響 第 50 回日本先天異常学会学術集会(淡路、2010. 7)
 - 14) 高島宏昌、瀬沼美華、桑形麻樹子、古川賢、古谷真美、吉田由香、丸茂秀樹、小島幸一、今井弘一：N,N'-ジフェニル-p-フェニレンジアミン(DPPD)により引き起こされたラット妊娠期間延長に関する検討 第 50 回日本先天異常学会学術集会(淡路、2010. 7)
 - 15) 小川哲郎、養父佐知子、澤智華、Randeep Rakwal、桑形麻樹子、斎藤智美、村山綾、中町智哉、佐藤和恵、宇住晃治、塩田清二：Lipopolysaccharide (LPS) 反復投与によるマウス肝臓障害モデルに対する核酸・核タンパク撮
- 取の効果 -病理組織学的検討-. 第 5 回核酸・核タンパク機能性研究会(恵庭、2010.8.6)
- 16) Ogawa T, Kuwagata M., Muneoka K., Wakai C., Senuma, M., Nagata T., Shioda S.: Abnormal brain function of neonates in a rat prenatal 5-bromo-2'-deoxyuridine-induced developmental disorder model. 40th Neuroscience annual meeting, (2010, 12, San Diego,(USA)
 - 17) 桑形麻樹子、小川哲郎、塩田清二、永田伴子：ラット胎生期 BrdU 曝露脳発達障害モデルにおける嗅球の発生について. 第 27 回日本毒性病理学会(大阪、2011. 01. 27-28)
 - 18) 熊谷文明、臼見憲司、丸茂秀樹、斉藤義明、永田伴子、桑形麻樹子：バルプロ酸曝露後のラット胎児大脳皮質の微細構造 第 27 回日本毒性病理学会(大阪、2011. 01)
 - 19)Kuwagata M, Ogawa T, Nagata T, Shioda S: Unraveling the effects of development on the olfactory system in a BrdU-induced developmental disorder model rat. 50th Society of Toxicology (Washington DC, 2011.3)
 - 20)Ogawa T, Rakwal R, Shibato J, Sawa C, Saito T, Murayama A, Kuwagata M, Shioda S: Global gene expression profiling analysis of food deprived maternal and fetal mice livers. 50th Society of Toxicology (Washington DC, 2011.3)
 - 21)Sawa C, Rakwal R, Ogawa T, Yofu S, Kuwagata M, Saito T, Murayama A, Usumi K, Matsunaga M, Satoh K, Shida S: Functional analysis of nucleoprotein diet from via intestinal IgA secretion. J.Physiol.Sci. 2011; 61(Suppl 1): S211. (第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、誌面開催)
 - 22)Kuwagata M, Yofu S, Ogawa T, Murayama A, Saito T, Sawa C, Rakwal R, Usumi K, Matsunaga M, Satoh K, Shioda S: Anti-inflammatory effect of nucleoprotein diet in LPS-induced liver injury model in mice - A histopathological examination. J.Physiol.Sci. 2011; 61(Suppl 1): S208. (第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、誌面開催、2011)
 - 23)Murayama A, Ogawa T, Saito T, Sawa C, Rakwal R, Kuwagata M, Shioda S: Histological observation of fetal organs

- following prenatal undernutrition. J.Physiol.Sci. 2011; 61(Suppl 1): S141. (第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、誌面開催, 2011)
- 24) Ogawa T, Rakwal R, Shibato J, Sawa C, Saito T, Murayama A, Kuwagata M, Shioda S: Searching for gene candidates responsible for developmental origins of health and disease (DOHaD). J.Physiol.Sci. 2011; 61(Suppl 1): S136. (第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、誌面開催, 2011)
- 25) 小川哲郎、Rakwal, Randeep、柴藤淳子、澤智華、影山晴秋、齋藤智美、村山 綾、桑形麻樹子、佐藤和恵、塩田清二: 生活習慣病胎児期起因説に基づく生活習慣病関連遺伝子の網羅的検索. 第 11 回日本抗加齢医学会 (京都、2011.05)
- 26) 小川哲郎、Rakwal, Randeep、柴藤淳子、澤智華、影山晴秋、齋藤智美、村山 綾、桑形麻樹子、佐藤和恵、塩田清二: Developmental Origins of Health and Disease 説の責任遺伝子の網羅的検索. 第 38 回日本トキシコロジー学会(横浜、2011.07)
- 27) 桑形麻樹子: Current problems of in vivo study and new in vivo approach focusing on each step of the developing CNS. DNT シンポジウム 第 51 回日本先天異常学会 (東京、2011.07)
- 28) 小川哲郎、Rakwal, Randeep、柴藤淳子、澤智華、齋藤智美、村山 綾、桑形麻樹子、塩田清二: 妊娠マウスを用いた DOHaD 責任遺伝子の網羅的検索 第 51 回日本先天異常学会 (東京、2011.07)
- 29) 瀬沼美華、古谷真美、高島宏昌、太田亮、小川哲郎、桑形麻樹子: ラット胎生期ヒ素曝露の胎児脳発達への影響 第 51 回日本先天異常学会 (東京、2011.07)
- 30) 金高有里、小川哲郎、和田亘弘、中川咲、齋藤智美、村山 綾、桑形麻樹子、塩田清二: 低栄養環境に曝露されたマウス胎児の組織学的観察 第 51 回日本先天異常学会 (東京、2011.07)
- 31) 小川哲郎・Rakwal, Randeep・柴藤淳子・齋藤智美・村山 綾、宗岡克政・桑形麻樹子・塩田清二: Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 説に基づいた精神疾患のリスクに関与する遺伝子の検索. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (甲府、2012. 3)
- 32) Ogawa T, Kuwagata M, Shioda S:. Searching gene candidates responsible for risk of mental disorders in the mouse intrauterine undernutrition model.51th SOT (2012, 3 San Francisco, USA)
- 33) Kuwagata M, Senuma M, Furuya M, Takashima H, Shioda S : Sodium (meta) arsenite exposure effects on the early developing rat fetal brain: A morpho-histopathological examination.51th SOT (2012, 3 San Francisco, USA)
- [図書] (計 1 件)
Ogawa T, Kuwagata M, Shioda S: The search for a fetal origin for autism: evidence of aberrant brain development in a rat model of autism produced by prenatal exposure to valproate. Transmitters and Modulators in Health and Disease - New Frontiers in Neuroscience -, 2009, pp83-88, Springer (Tokyo)
- [産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)
- [その他]
ホームページ等
昭和大学医学部 HP にて業績公開(第一解剖、アンチエイジング医学)
6. 研究組織
(1) 研究代表者
桑形 麻樹子 (KUWAGATA MAKIKO)
昭和大学・医学部・客員教授
研究者番号: 70398684
- (2) 研究分担者
影山 晴秋 (KAGEYAMA HARUAKI)
昭和大学・医学部・助教
研究者番号: 00433839
- (3) 連携研究者
塩田清二 (SHIODA SEIJI)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号: 80102375