

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 22 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591200

研究課題名（和文）

遺伝子変異と環境因子の相乗効果による神経管閉鎖障害の分子メカニズム

研究課題名（英文）

Neural tube defect manifestation due to the interaction of genetic mutation and Ochratoxin A in the genetic polydactyly/ arhinencephaly mouse embryo, *Pdn/Pdn*.

研究代表者

上田 悦子 (UETA ETSUKO)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：40335526

研究成果の概要（和文）：

環境因子であるオクラトキシン A に対する感受性が高く、高頻度に神経管閉鎖障害（NTDs）を発症する *Pdn/Pdn* マウスを用いて、神経管閉鎖時期に影響を受ける遺伝子を分析した。DNA マイクロアレイ分析で網羅的にスクリーニングし、環境要因による NTDs の原因となる遺伝子を探索し、それらの遺伝子の発現変化を解析し、NTDs の発症メカニズムを検討した。その結果、*Pdn/Pdn* マウスにおける OTA 曝露による神経管閉鎖障害は、特に 9 日胚の転写調節因子を含めた複数の遺伝子の変化が NTDs 発症のメカニズムに関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Ochratoxin A (OTA) is a teratogen causing neural tube defects (NTDs) in mice. We analyzed the gene expression by using the genetic polydactyly/arhinencephaly mouse (*Pdn/Pdn*) to examine the pathogenesis of NTDs. After treatment with 2 mg/kg of OTA to *Pdn/+* female mice, mated with *Pdn/+* male, on day 7.5 of gestation, gene expressions in the embryo were analyzed by DNA microarray, real-time PCR and whole mount in situ hybridization (WISH) on day 9 of gestation. From these investigations, it was suggested that NTDs induced by OTA may be the result of altered multiple expressions in *Pdn/Pdn* embryos.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：先天異常学

1. 研究開始当初の背景

NTDsは、我が国では出産1万人に対し約6人の割合で起きると報告されており、最も多

い先天異常のうちの1つである（国際クリアリングハウス ANNUAL REPORT 2000）。その多くは遺伝・環境・栄養・薬剤因子が複合

的に作用して発症すると考えられている。平成12年から厚生省の指導によって葉酸摂取による神経管閉鎖障害発症リスクの低減対策がとられるようになったが、発症機序を含め、増加原因は依然不明のままである。

本研究ではヒトに代わるモデルとして遺伝性多指症/無嗅脳症マウス (*Pdn/Pdn*) を用いた。*Pdn/Pdn*は多指症のほか嗅球欠損、水頭症、脳梁欠損など多彩な脳奇形を現わし、約15%は神経管閉鎖障害である外脳症を発症する。*Pdn*マウスの責任遺伝子は転写調節因子*Gli3* 遺伝子に変異があり、その結果、*Gli3* の発現が抑制され、脳形態形成に関与する遺伝子発現を調節し、上記のような奇形が起きていると推測したが、その発症メカニズムは解明されていない。

神経管閉鎖時期の*Pdn/Pdn*胚に、食品のカビ毒であるオクラトキシンA(OTA)や中枢神経作用薬であるバルプロ酸などを曝露すると、その胎仔にNTDsが激増したことから、外的な要因と*Gli3*の遺伝子変異による発現抑制が相乗効果を起こして、NTDsを発症させていると推定される。そこで、器官形成初期の形態形成異常発症の過程を解析し、*Gli3*発現抑制や環境要因であるOTA曝露により大きく影響を受ける遺伝子発現変動を調べることで、NTDs発症のメカニズムを解析できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

Pdn/Pdn マウスは外脳症を 15%程度自然発症する。また、環境要因に対して感受性が高く、OTA を曝露すると NTDs を高率(51.6%)に発症したので、*Gli3* 発現抑制と OTA の毒性の相乗効果が、感受性の差として現れていると考えた。

そこで、*Pdn/Pdn* マウス胚仔の前神経孔閉鎖時期の胎生 9 日、10 日胚の脳形態形成遺伝子や他の遺伝子が、神経管閉鎖の過程にどのように関わり、NTDs を発症する場合にはどのような発現変化をするのかを調べ、単一遺伝子変異と環境因子の相乗効果が、胎生期の遺伝子発現にどのような影響を与え NTDs を惹起するかを、マウスを用いて分子遺伝学

的に解析する。特に神経管閉鎖時期に焦点を当て、そのメカニズムを解明することを目的とした。

ヒト先天異常の約 65%は原因不明とされ、それらは遺伝子変異と環境因子との相乗効果によるものが多いと想定されている。ヒトにおいては妊娠に気がつくかどうかの時期が、最も異常発生の感受性が高い時期である。しかしながら妊娠初期に実際に胎児の発達と環境要因との関連を調べることは、倫理的な面も含め不可能である。そこで遺伝子変異のために環境因子に対して感受性の高いマウスを使って NTDs 発症のメカニズムを調べる。それをヒトの無脳症をはじめとする神経管閉鎖障害の発症メカニズムや予防効果に外挿し、健全な胎児の発生・発育に寄与することが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

(1) *Pdn* マウスの繁殖および OTA の曝露

Pdn/+ どうしを交配し、妊娠確認後、妊娠 7.5 日にオクラトキシン A (OTA) を腹腔内投与した。

(2) マウス胎仔の採取と遺伝子型、NTDs の判定および前処理

神経管、特に前神経孔閉鎖期の胎生 9 日および 10 日胚を摘出した。採取したマウス胚は、PBS 中で、すばやく胚と卵黄囊膜に分離し、胚は RNA 採取用として頭部のみを摘出して液体窒素中で凍結保存した。WISH 用胚はパラホルムアルデヒド固定した。それぞれの卵黄囊膜から DNA を抽出し、遺伝子型を判定した。NTDs の判定は実体顕微鏡下で胚を観察し、神経管の閉鎖の有無を確認した。

(3) DNA マイクロアレイによるスクリーニング (発現解析)

遺伝子型や雌雄の違い、また OTA 曝露の有無により遺伝子発現に変化が起きるかどうかを調べるため、DNA マイクロアレイによる約 30000 種類の網羅的遺伝子発現解析を行って比較した。凍結保存した 9 日胚の無処理群の+/+と *Pdn/Pdn* の雌・雄、および OTA 曝露された+/+と *Pdn/Pdn* の雌・雄胚頭部より Total RNA を抽出し、Cy3 標識した後、Agilent マイクロアレイキットプロトコルに従い、1 色法にて 44K の遺伝子プローブ

が搭載されたスライドガラス上でそれぞれハイブリダイゼーション反応を行った。得られたシグナルのスポット解析および数値化を行った。また各群の発現の状況を相互比較するために正規化してデータ解析した。

(4) パスウェイ解析

DNA マイクロアレイスクリーニングで変動が認められた遺伝子群の解析を Search Objects in KEGG Pathways を用いて行った。無処理の+/+と *Pdn/Pdn* の発現比が2倍以上、0.5倍以下のものにそれぞれ区切ってそれらの遺伝子が含まれるパスウェイを検索した。また、同様に無処理と OTA 曝露群の発現比が2倍以上、0.67倍以下に区切って解析を行った。

(5) リアルタイム PCR 法による発現量の確認

抽出した Total RNA を逆転写反応にて cDNA を作成し、各群につきサンプル n=7~8 で実験を行った。TaqMan Probe を使用して ABI7900HT で解析を行い、得られた値を β -actin で補正した。

(6) Whole mount in situ hybridization

(WISH) による発現の局在性の確認

cDNA を元にして RT-PCR により目的の遺伝子断片を増幅してプラスミドに組み換え後、DIG 標識した RNA プロブを合成して、9日胚とハイブリダイゼーション反応を行って異所性発現個所を特定した。

4. 研究成果

まず *Gli3* の発現抑制に注目し、OTA 無処理 *Pdn/Pdn* 型の雄・雌と無処理の+/+型の雄・雌と比較し、雄・雌いずれも発現量が2倍以上増加した遺伝子は212個で、1/2以下に減少したものは357個であった。これらを KEGG パスウェイ解析により分類したところ図1のような結果となり、嗅覚伝達・シグナル伝達に分類される遺伝子は増加及び減少の両方に多く認められた。減少したものとして転写調節・代謝に分類される遺伝子の変動が特に多かった。

次に OTA 曝露の影響に注目した。+/+型の雄・雌、*Pdn/Pdn* 型の雄・雌いずれの群でも、OTA 曝露により、発現量が2倍以上増加した遺伝子は565個で、2/3以下に減少した遺伝

子は388個であった。これらの遺伝子を KEGG パスウェイ解析で同様に分類したところ図2の結果となり、嗅覚伝達・シグナル伝達・代謝に関する遺伝子は増加及び減少したものの両方に多く見られた。OTA 曝露で増加したものとしてシグナリング分子との相互作用・転写調節・輸送と異化に分類されるものが多く認められた。

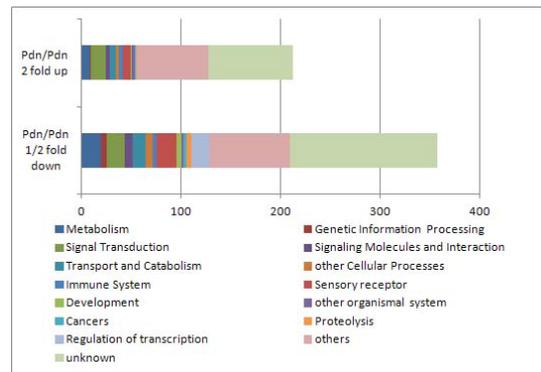


図1. +/+と比較して *Pdn/Pdn* で変化した遺伝子の分類

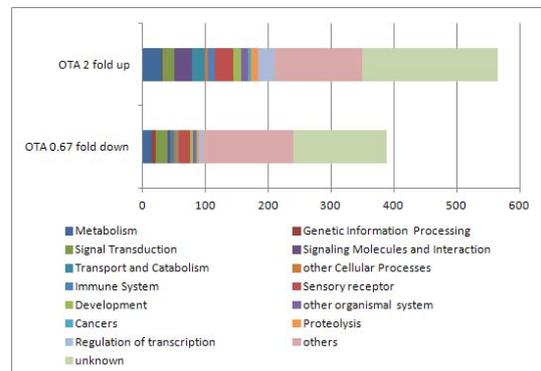


図2. 無処理群と比較して OTA 曝露群で変化した遺伝子の分類

DNA マイクロアレイスクリーニングの結果、発現変化が認められた遺伝子群の中から *Gli3* 関連遺伝子、脳形態形成関連遺伝子、転写調節に関する遺伝子等に注目し、脳形態形成の過程で OTA 曝露によりどのような発現変化が起きているのかを調べるため、リアルタイム PCR 法で9日および10日胚頭部の発現量を測定し、その結果を以下に示した。

Gli3 は OTA 曝露により9日胚の+/+で低下した。*Pdn/Pdn* では9・10日胚共に変化は認められなかった。*Gli3* の下流で働くと考えら

れている *Wnt8b*, *Wnt7b*, *Emx2* では、無処理の *Pdn/Pdn* で 9 日・10 日胚共に発現が低下していた。また OTA 曝露されると *+/+* で発現が低下した。*Pdn/Pdn* では *Gli3* 発現抑制の影響が強く認められたが、OTA 曝露による変動は認められなかった。

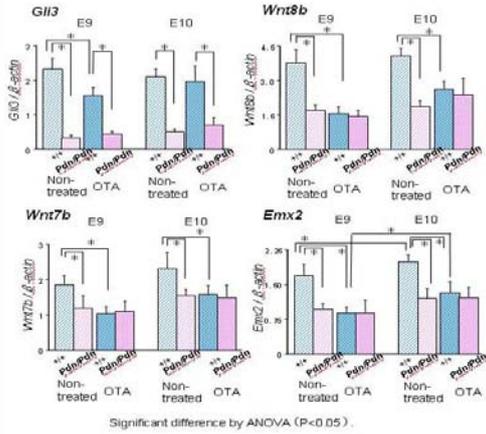


図 3. 9・10 日胚における *Gli3* 関連遺伝子の発現変化

転写調節因子である *Barx1*, *Tbx1*, *Tlx1* は OTA 曝露の影響が強く認められた。特に 9 日胚では遺伝子型に関係なく、発現が増加した。一方 *Barx1* は、9 日胚では OTA 曝露で過剰発現となったにもかかわらず、10 日胚では無処理の *+/+*, *Pdn/Pdn* とも発現が増加し、OTA 曝露によって逆に発現が減少した。*Tbx1*, *Tlx1* は 10 日胚では全体的に発現が増加し大きな変化が認められなかった。これは、胚の発達に伴い頭部でこれらの遺伝子が 10 日に強く発現するようになった可能性が考えられる。

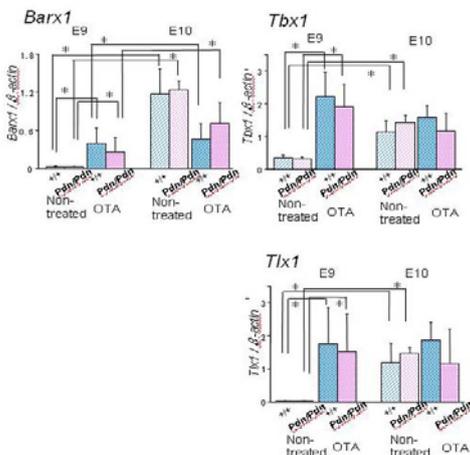


図 4. 転写調整因子の発現変化

Ascl1, *Stmn4*, *Dmbx1*, *Dedd2* は OTA 曝露により 9 日胚では発現量が減少した。また *Ascl1*, *Stmn4*, *Dedd2* は 10 日胚でも *+/+* で発現量が減少した。*Pdn/Pdn* では OTA 曝露による変動は認められなかった。

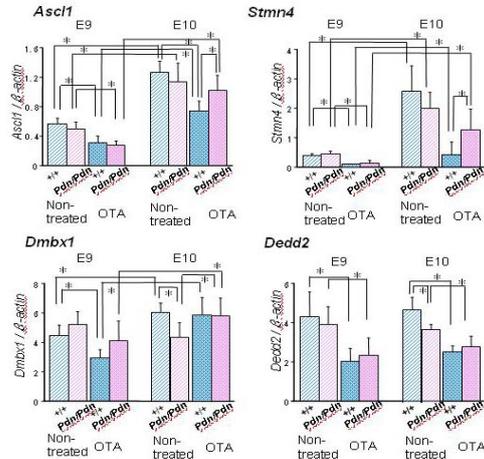
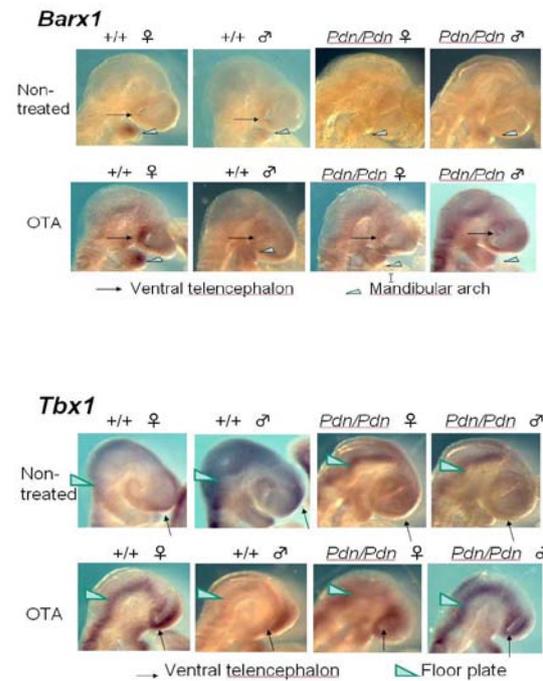


図 5. 転写調節因子等の発現変化

リアルタイム PCR により発現の増加が認められた複数の遺伝子のうち、9 日胚頭部における *Barx1*, *Tbx1*, *Tlx1* 発現の局在性をホールマウント in situ ハイブリダイゼーション (WISH) 法で調べた。



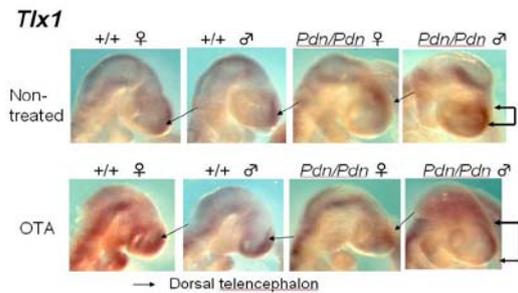


図6. ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションによる発現の局在性

無処理群と比較し、OTA 暴露群では *Barx1* では ventral telencephalon に強く発現が認められ、*Tbx1* では ventral telencephalon と floor plate に強く発現が認められた。また *Tlx1* では dorsal telencephalon において発現が強く認められたが、これらの遺伝子ではいずれも遺伝子型による発現の異所性は認められなかった。

以上の結果から *Pdn/Pdn* マウスにおける OTA 曝露による神経管障害は転写調節因子を含めた複数の遺伝子が複合的な相互作用で発症している可能性が示唆された。

今後 OTA 曝露により発現が抑制された遺伝子や曝露群での *Pdn* マウス遺伝子型による発現の差を詳細に調べることで NTDs の発症メカニズムの解明につながると考えている。

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 6 件)

- ① Naruse L., et al Syndromes Caused by the Mutations in *GLI3* Gene. *Current Pediatric Reviews* 6, 219-225, 2010
- ② Ueta E., et al Gender-dependent differences in the incidence of ochratoxin A-induced neural tube defects in *Pdn/Pdn* mouse. *Congenital Anomalies* 50, 29-39, 2010
- ③ Naruse L., et al Birth defects caused by the mutations in human *GLI3* and mouse *Gli3* genes. *Congenital Anomalies* 50, 1-7, 2010

- ④ Ueta E., et al Altered gene expression induced by ochratoxin A in genetic polydactyly/arhinencephaly mouse embryo, *Pdn/Pdn* *Congenital Anomalies* 51(4), A20-21, 2011

- ⑤ Ueta E., et al Altered gene expression induced by ochratoxin A in genetic polydactyly /arhinencephaly mouse embryo, *Pdn/Pdn* *Congenital Anomalies* 52(4), A8, 2012

- ⑥ Toya Y., Ueta E., et al Alterations of gene expression by ochratoxin A in genetic polydactyly /arhinencephaly mouse embryos *Congenital Anomalies* 52(4), A12, 2012

[学会発表] (計 6 件)

- ① オクラトキシンA曝露による神経管閉鎖障害と性関連遺伝子の変動 上田悦子、角野良紀、小川将也、成瀬一郎
日本先天異常学会学術集会2010年7月8日 淡路市 淡路夢舞台国際会議場
- ② 遺伝性多指症/無嗅脳症マウスにおける Ochratoxin Aによる神経管閉鎖障害発症の性差 -第3報- 角野良紀、上田悦子、小川将也、成瀬一郎 日本先天異常学会学術集会 2010年7月8日 淡路市 淡路夢舞台国際会議場
- ③ *Gli3*変異とオクラトキシンA曝露による神経管閉鎖障害発症における遺伝子発現の変動、上田悦子、鳥谷裕太郎、成瀬一郎 日本先天異常学会学術集会 2011年7月22日 東京都千代田区 シェーンバ ッハサボー
- ④ オクラトキシンAと転写因子 *Gli3*による神経管閉鎖障害発症と脳形態形成関連遺伝子の発現変化 上田悦子、曾根保子、大塚譲、成瀬一郎 日本栄養食糧学会 2011年5月13日 東京都文京区 お茶の

水女子大学

- ⑤ 神経管閉鎖期における Ochratoxin A 曝露による遺伝子の発現変化
上田悦子、鳥谷裕太郎、成瀬一郎、曾根保子、大塚譲 日本先天異常学会学術集会 2012年7月6日 東京都新宿区 東京女子医科大学
- ⑥ 遺伝性多指症/無嗅脳症マウス胚における Ochratoxin A による遺伝子発現の変動
鳥谷裕太郎、上田悦子、成瀬一郎 第52回日本先天異常学会学術集会 2012年7月8日 東京都新宿区 東京女子医科大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 悦子 (UETA ETSUKO)
鳥取大学・医学部・講師
研究者番号：40335526

(2) 研究分担者

成瀬 一郎 (NARUSE ICHIRO)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：20113326