

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860837

研究課題名(和文)なぜバルプロ酸は神経管欠損症を引き起こすか？-葉酸代謝酵素欠損マウスを用いた解析

研究課題名(英文)The reason why valproic acid leads to neural tube defect: an analysis using folate-associated gene deficient mice

研究代表者

菊池 敦生(Kikuchi, Atsuo)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30447156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経管欠損症は中枢神経系の先天奇形として最も高頻度にみられる。葉酸代謝に関するグリシン酵素開裂系酵素であるAmtノックアウトマウスを用いて、DNAメチル化と発生機序の関連を探索した。妊娠マウスよりノックアウトと野生型のマウス胎仔(胎生9.5日)を得て、微量のDNAサンプルで解析できるPost Bisulfite Adaptor Tagging法により処理し、次世代シーケンサーにて網羅的にDNAメチル化状態を検討した。候補遺伝子については個別にDNAメチル化状態を解析した。神経管閉鎖時期の胎仔の網羅的DNAメチル化解析に成功したが、野生型とノックアウトマウスの間での差異を認めていない。

研究成果の概要(英文)：Neural tube defects are one of the most prevalent congenital anomalies of the central nervous system. We searched the mechanism of pathogenesis of neural tube defects, using Amt knock out mice, defecting glycine cleavage system, which is a component of mitochondrial folate one-carbon metabolism. We obtained Amt+/+ and Amt-/- embryos (E9.5) and DNA was subjected to genome-wide methylome analysis by next generation sequencing. Libraries for next generation sequencing were prepared using post bisulfite adaptor tagging method. We also used bisulfite sequence for CpG methylation analysis of candidate genes. Although we could perform genome-wide methylome of embryos undergoing neural tube closure, we could not identified any differences in DNA methylation between Amt +/+ and Amt -/-.

研究分野：臨床遺伝学、小児神経学

キーワード：神経管欠損症 葉酸代謝異常

1. 研究開始当初の背景

(1) 母体へのパルプロ酸投与や葉酸欠乏は神経管欠損症の確立した環境要因である。

パルプロ酸は繁用される抗けいれん薬だが、胎児に神経管欠損症 (NTD) を生じる副作用のため妊娠可能な女性への投与が制限されており、その機序解明は重要である。しかしながら、パルプロ酸による NTD 発生の機序は未だ確立していない。ヒトでは NTD は出生 1000 人に 1 人発生する中枢神経系で最も高頻度の先天奇形である。NTD の発生には遺伝的要因と環境要因が多因子に関わっているが、中でも**母体の葉酸欠乏やパルプロ酸投与は NTD 発症の確立された環境要因の一つである。**

(2) グリシン開裂酵素系遺伝子 *Amt* のノックアウトマウスは神経管欠損症を高率に起こす。グリシン開裂酵素系は葉酸代謝に関与し、パルプロ酸により抑制される。

グリシン開裂酵素系 (GCS) は *GLDC*、*AMT*、*GCSH*、*DLD* の 4 遺伝子でコードされるタンパクからなり、グリシンを分解してテトラヒドロ葉酸に一炭素単位を付与するミトコンドリア酵素複合体である(図 1、2)。GCS 活性のない *Amt* ノックアウト (*Amt*^{-/-}) マウスを作成すると高率に NTD の発生を認めたと (図 3)。これは**葉酸代謝に関与する酵素欠損により NTD を起こす初めての動物モデル**である (Narisawa, Komatsuzaki, Kikuchi et al. Hum Mol Genet, 2012)。GCS 活性がパルプロ酸により抑制されることと、胎生期神経幹細胞の存在領域である神経上皮で強く発現している事実をあわせ、**パルプロ酸による GCS 活性の抑制により DNA/タンパクメチル化反応を含む葉酸代謝異常を介して NTD を起こしているとの仮説を立てた。**

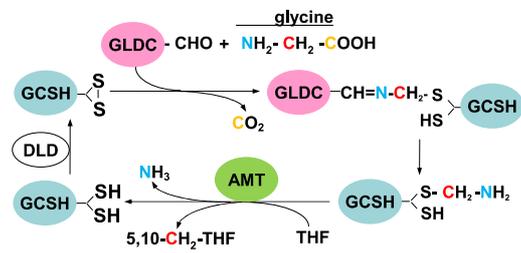
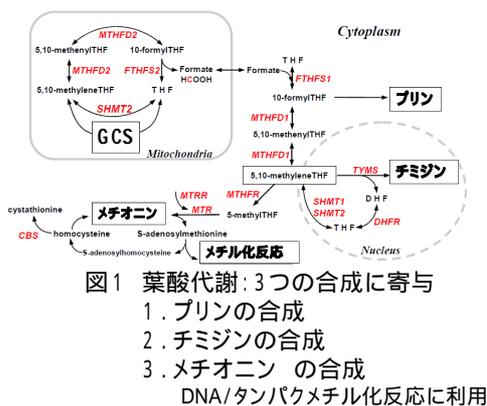


図 2 グリシン開裂酵素系 (GCS)

1. グリシンを分解
2. テトラヒドロ葉酸(THF)に一炭素単位を付与

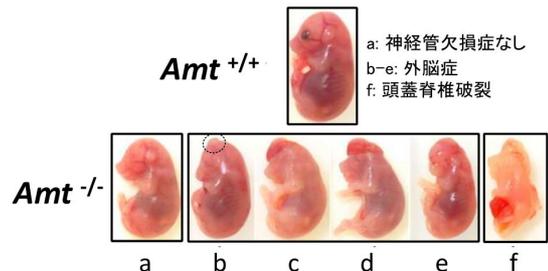


図 3 *Amt*ノックアウト(*Amt*^{-/-})マウスの表現型

(3) 葉酸代謝関連物質の投与により *Amt* ノックアウトマウスの神経管欠損症の発生率は有意に減少する。

Amt ノックアウトマウスにおける神経管欠損症は葉酸代謝と関連があることが予想された。そこで**葉酸代謝関連物質を母体に投与すると、DNA/タンパクメチル化反応に利用されるメチオニン (図 1) の投与で NTD の発生率が有意に減少した (図 4)**。このことから、このノックアウトマウスで NTD が発症する機序として、葉酸代謝のうち、**DNA/タンパクメチル化反応が NTD の発症に関与している可能性があると考えた。**

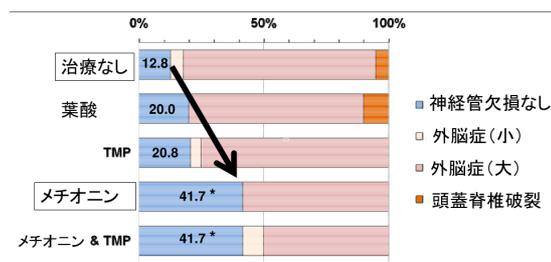


図 4 母体への葉酸関連物質の投与
 メチオニンの投与により、
 神経管欠損症の発生が有意に減少している

(4) GCS 欠損による NTD の発症機序解明のため行った予備的解析では、興味深い遺伝子での発現変動が見られた。

神経管閉鎖時期のマウス胎仔を用いて遺伝子発現解析をマイクロアレイにより網羅的に解析した。**神経管形成・閉鎖に関わる 2 種の遺伝子の発現低下を含む発現変動を見出し、定量的 RT-PCR にて確認した。**

2. 研究の目的

上記の背景とこれまでの研究成果をふまえ、バルプロ酸や GCS が神経管欠損症発症に関わる機序を解明する。

- *Amt* ノックアウトや母体へのバルプロ酸投与によりマウス胎仔での DNA メチル化状態が変化する遺伝子群を見出す。
- 予備実験で得られている遺伝子発現の変動と本研究での DNA メチル化状態の変化をバイオインフォマティクス的手法により解析する。
- 上記で抽出した遺伝子群の変化が検出できた場合、その生物学的意義を考察する。

3. 研究の方法

(1) *Amt* ヘミマウスを掛けあわせ、妊娠マウスより神経管閉鎖時期のノックアウトマウスおよび同腹の野生型胎仔を得る。胎仔より DNA/RNA を抽出して保存した。

(2) ジェノタイプごとにプールした DNA を 1 匹あたり 20 ng、5 匹ずつの計 100 ng ずつ用いて Post Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT)法によりライブラリを作成し、次世代シーケンサー HiSeq2000 により網羅的 DNA メチル化解析を行った。出力されたリードは FASTX toolkit によりクオリティの低いリードをトリミングし、Bismark-Bowtie によりマウスゲノム参照配列にマッピングした。得られた結果は Integrative Genomics Viewer (IGV) により可視化した。

(3) 予備的解析として行った網羅的発現解析にて遺伝子発現の変動が見られている部位について、網羅的 DNA メチル化解析および Bisulfite sequence による個別の DNA メチル化解析により野生型とノックアウトマウスの間での差異を比較した。Bisulfite sequence の解析に際しては、プライマーの設計には Methyl Primer Express Software v1.0 (Life Technologies) を使用した。DNA は Methylcode Bisulfite conversion kit (Life Technologies)にて処理した後 PCR にて増幅した。PCR 産物は TOPO TA クローニングキット(Life Technologies)によりクローニングし、サンガーシーケンスを行って QUMA (QUantification tool for Methylation Analysis, <http://quma.cdb.riken.jp/>) により解析した。

4. 研究成果

(1) PBAT 法による網羅的 DNA メチル化解

析には成功したが DNA メチル化の有意な変動部位は検出されなかった。

PBAT 法により作成したライブラリから HiSeq2000 にて網羅的 DNA メチル化解析を行ったところ、野生型・変異型各々 240 Gb 程度のリードの出力が得られた。これを FASTX toolkit によりクオリティの低いリードをトリミングし(図 5)、Bismark-Bowtie によりマウスゲノム参照配列にマッピングした。このようにして得られた結果を Integrative Genomics Viewer (IGV)上で可視化することに成功した(図 6)。しかしながら、本実験で得られたリードの深度では野生型とノックアウトマウスの間で統計的に有意な変化を検出できなかった。遺伝子の発現制御部位に絞った解析でも同様であった。

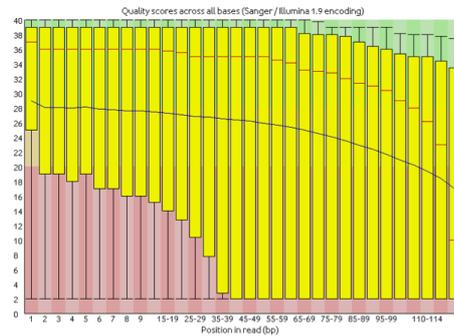


図5a. トリミング前のリード。リードの後半部にかけてクオリティが低下傾向。

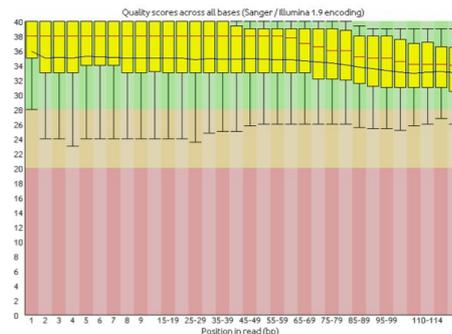


図5b. トリミング後のリード。クオリティの低いリードは排除された。

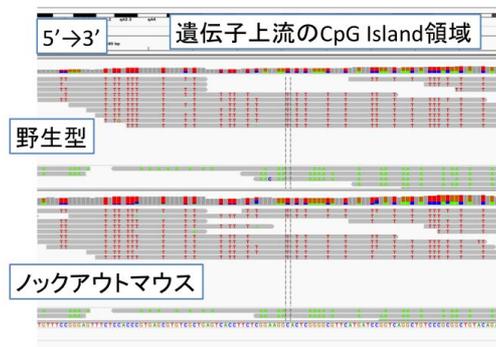


図6. IGV上で可視化されたCpG Islandのメチル化解析

(2) マイクロアレイ・定量的 RT-PCR にて遺伝子発現変動が検出された神経管形成・閉鎖に関わる 2 つの遺伝子の DNA メチル化状態を網羅的 DNA メチル化解析および個別の DNA メチル化解析 (Bisulfite sequencing) (図 7) にて解析したが、有意な差を認めなかった。

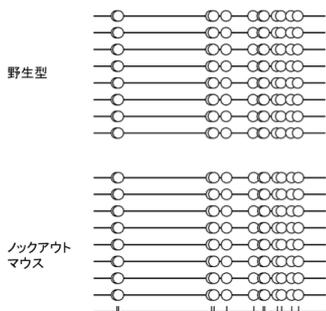


図7. 神経管閉鎖に関わる遺伝子のプロモーター領域でのBisulfite sequencing. 丸はそれぞれのクローンのメチル化状態を示す。白丸は非メチル化CG、黒丸はメチル化CGを表す。野生型とノックアウトマウスともにCpG Islandは非メチル化状態にある。

(3) 本解析の後、ゲノムの一部、すなわち遺伝子領域やそのプロモーター領域のみを濃縮して解析に供せる SureSelect (Agilent) などの製品が PBAT 法に対応を果たした。これにより微量の検体で効率のよい DNA メチル化解析が可能となってきている。胎仔サンプル採取の面においても神経上皮に蛍光マーカーが発現するマウスと掛けあわせた上で FACS により選別するなどの工夫を加えることで、神経管閉鎖に関わる細胞を濃縮して解析を行うことにより、今回同定できなかった DNA メチル化状態の差異を検出し、神経管欠損の本態に迫ることが期待される。

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 8 件)

1. Abe Y, Kikuchi A, et al. (計 9 人、2 番目) Xq26.1-26.2 gain identified on array comparative genomic hybridization in bilateral periventricular nodular heterotopia with overlying polymicrogyria. *Dev Med Child Neurol*. 2014 Jul 23. [Epub ahead of print] (査読有)
2. Kanamori M, Kikuchi A, Kure S, Tominaga T, et al. (計 10 人、2 番目) Rapid and sensitive intraoperative detection of mutations in the isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes during surgery for glioma. *J Neurosurg*. 2014

Jun;120(6):1288-1297. (査読有)

3. Sonobe S, Kikuchi A, Kure S, Tominaga T, et al. (計 10 人、7 番目) Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-T magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking RNF213: a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res*. 2014 Mar 13;1552:64-71. (査読有)
 4. Kimura M, Kikuchi A, Kure S, et al. (計 4 人、2 番目) Novel TBX5 Duplication in a Japanese Family with Holt-Oram Syndrome. *Pediatr Cardiol*. 2014 Oct 2. [Epub ahead of print] (査読有)
 5. Inui T, Kikuchi A, Kato M, Saitsu H, Matsumoto N, Kure S, Haginoya K, et al. (計 14 人、6 番目) Efficacy of long term weekly ACTH therapy for intractable epilepsy. *Brain Dev*. 2014 Aug 19. [Epub ahead of print] (査読有)
 6. Zhang ZH, Kikuchi A, Kure S, Saheki T. (計 10 人、4 番目) Screening for five prevalent mutations of SLC25A13 gene in Guangdong, China: a molecular epidemiologic survey of citrin deficiency. *Tohoku J Exp Med*. 2014;233(4):275-281. (査読有)
 7. Wongkittichote P, Kikuchi A, Kure S, Wattanasirichaigoon D, et al. (計 7 人、3 番目) Screening of SLC25A13 mutation in the Thai population. *World J Gastroenterol*. 2013 Nov 21;19(43):7735-42. (査読有)
 8. Kakisaka Y, Haginoya K, Kikuchi A, Nishino I, et al. (計 12 人、6 番目) Additional evidence that the ryanodine receptor gene (*RYR1*) causes malignant hyperthermia and severe skeletal malformations. *Am J Medical Genet part A*. 2013;161A:234-235. (査読有)
- [学会発表] (計 1 件)
1. 菊池敦生、工藤宏紀、当科における次世代シーケンサーの活用状況、NGS 現場の会第三回研究会、平成 25 年 9 月 4 日、

神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

6．研究組織

(1)研究代表者

菊池 敦生（KIKUCHI, Atsuo）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30447156