

平成30年5月31日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19659

研究課題名(和文) バルプロ酸の胎仔マウスの心臓に及ぼす影響とその分子生物学的メカニズムの解明

研究課題名(英文) Effect of valproic acid on murine embryonic heart and explication of molecular biology mechanism

研究代表者

金井 祐二 (Kanai, Yuji)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：60448628

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)：本研究では、心臓形態形成期にあたる妊娠初期の胎児がバルプロ酸ナトリウム(valproic acid:以下VPA)投与において示す心臓血行動態を、小動物用超音波高感度イメージングシステムを用いて評価した。妊娠マウスにVPAを投与することで、胎仔マウスの徐脈と内頸動脈血流量の減少が観察され、出生した仔マウスの体重は生後6週まで有意に低いことが示された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effect of valproic acid on developing murine embryonic heart function using high-resolution echocardiography in utero. By making an embryo model by VPA administration to the pregnant murine, we assessed the fetal bradycardia and reduction of carotid artery flow volume.

研究分野：小児科学

キーワード：バルプロ酸ナトリウム 胎児催奇形性 心行動態 先天性心疾患 ヒストン脱アセチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

バルプロ酸 (valproic acid:以下 VPA) は抑制性シナプスにおいて GABA (gamma aminobutyric acid) 作用を増強することにより抗痙攣作用を発揮すると考えられている。広い抗てんかん作用のため種々の発作型で第1選択薬として用いられる他、双極性障害や片頭痛などにも適応があり、妊娠可能な女性への使用機会は多い。VPA を長期投与する場合に生じる胎児催奇形性や出生した児の神経発達障害が問題になっており、FDA (Food and drug administration) は2013年にVPAの胎児危険度分類をDからXに引き上げた。催奇形性にはヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase:以下 HDAC) 阻害作用が関与していると報告されており (J Biomed Sci.17:16 , 2010)、VPA は HDAC1 を阻害し in vivo と in vitro とともに心筋細胞の成長停止やアポトーシスを引き起こすことや、胎児の心筋細胞の遺伝子発現への影響も報告されている (J Biol Chem.278:28930-7, 2003)。ヒトにおいてVPAの胎児暴露は、先天性心疾患などの先天異常の発生率を増加させ (N Engl J Med.362:2185-93, 2010)、用量依存性に先天異常の発生率が増加させることが、大規模な疫学調査から明らかになっている (Am J Med Genet.98:168-75, 2001)。また、Wuらは、マウスにおいて、VPAを心臓発生初期に投与した場合に、用量依存性に心奇形が発生することを確認し、VPA700mg/kgを妊娠7日目のマウスに腹腔内投与し、胎仔マウスの20%が、心奇形を起こしたと報告している (J Biomed Sci.17:16, 2010)。しかし、その発生時期の心行動態を観察した報告はない。また、脳や心臓の先天異常の発症原因としては臓器形成期の胎児への HDAC 阻害作用の影響が疑われているが、その分子生物学的メカニズムの詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は妊娠マウスを用い、VPAが胎仔心臓に与える影響を検討することを目的とした。生理学的評価に小動物用超音波高感度イメージングシステムを用いて胎仔心行動態を観察した。分子生物学的評価にVPAが阻害するHDACの発現とそれに関わる標的マイクロRNA (以下 miRNA) を同定し、標的miRNAが発生段階における胎仔心臓への影響の検討を計画した。生体内におけるHDAC1とmiRNAの胎仔心臓への影響を解明することは、VPAの催奇形性の機序解明のみならず、心臓発生におけるmiRNAの働きについて解明できる糸口になるとと思われる。

3. 研究の方法

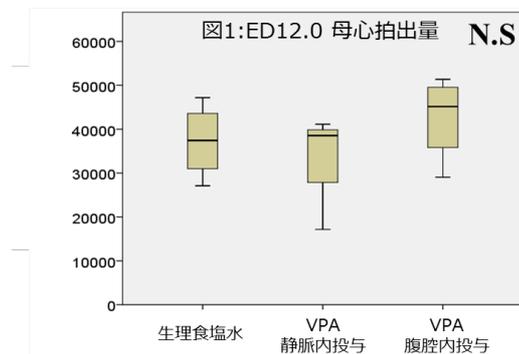
本研究では、生後10-12週齢のCD-1マウス雌雄の交配により作成した妊娠マウスを用いた。交配は雄1匹に対して未経産の雌4-5匹を用いて夜間を通して行い、翌朝に膣栓が認められた日を在胎日齢 (embryonic day : ED) 0.5とした。ED7.0の母マウスにコ

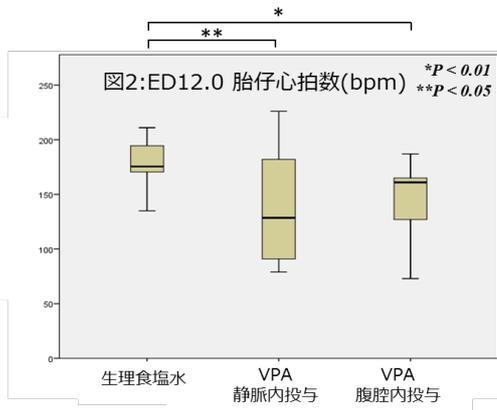
ントロール群として生理食塩水を投与し、VPA(700mg/kg)投与群は腹腔内または経静脈内投与した。小動物用超音波高感度イメージングシステム (Vevo 2100、visualsonics、Canada) を用いて心臓形態形成初期のED9.5から心臓内構造がほぼ完成するED13.5までの母体および胎仔の心行動態を検討した。心行動態の測定は1.6-1.8%濃度のイソフルレン吸入による全身麻酔下に加温ベッドおよび加温用ランプを用いて妊娠マウスの体温を36-37に保ちながら行った。Mモード法により母体の心室壁運動を計測し、次にドプラ法にて母体の心拍出量および胎仔の心拍数・背側大動脈血流量・内頸動脈血流量・臍帯動静脈血流量を測定した。血流量は速度時間積分法 (velocity-time integral : VTI) によるVTI×心拍数を指標として計測した。体温および心電図はVevo2100に内蔵されている計測システムを用いて、胎仔の超音波イメージングと一緒にVevo2100内のハードディスクに記録した。心行動態測定後は、胎仔を出産させ、生後1週、2週、3週、6週でそれぞれ仔マウスの体重を測定した。心臓の形態が観察可能になる生後3週以降にBモード法を用いて仔の心臓形態の異常の有無を1週毎に生後8週まで観察した。生後8週以降に仔の心臓を採取してホルマリン固定しヘマトキシリン・エオジン染色を行い心臓形態の異常を組織学的に検索した。また生後8週以降の仔の心臓を採取し、HDACの蛋白発現やmRNAの発現解析目的にそれぞれ、蛋白の抽出とRNAの抽出作業を行った。統計処理にはSSPEを用いた。比率の検定はPearsonの2検定し、平均値の差はKruskal-Wallis検定を用いて検討し、P値0.05未満を有意差ありとした。

4. 研究成果

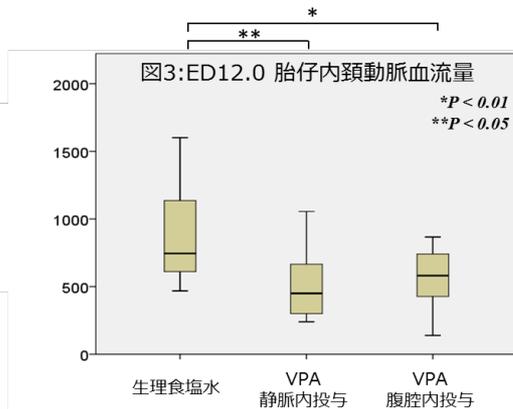
(1) 母体VPA投与後の心行動態

ED7.0に母体VPA経静脈内投与 (N=2)、母体VPA経腹腔内投与 (N=4)、母体生理食塩水投与 (N=4) し、3群間のED12の心行動態の比較を行った。母体の心拍室量は3群間では有意差は認めなかった (図1)。胎仔心拍数 (図2) は、生理食塩水群と比べ、VPA静脈内投与群 (P=0.011) とVPA腹腔内投与群 (P=0.005) はそれぞれ有意に心拍数が低かった。VPA投与群では両群間では胎仔心拍数の差はなかった (P=0.963)。

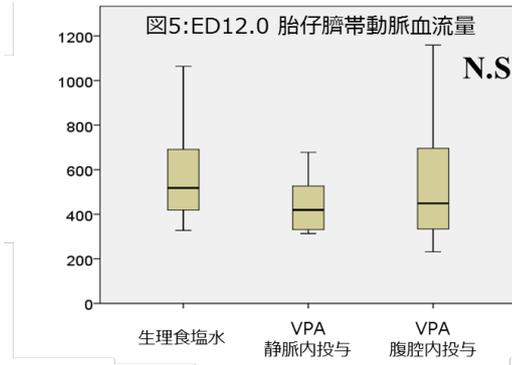
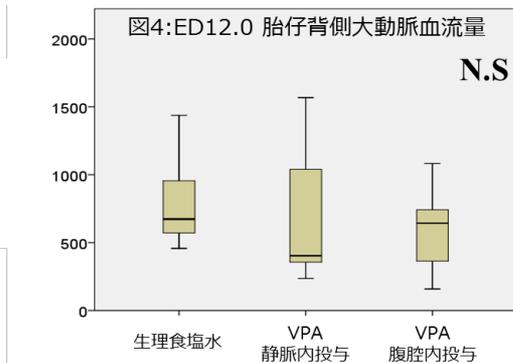




胎仔内頸動脈血流量 (図 3) において、生理食塩水群と比べ、VPA 静脈内投与群 ($P=0.014$) と VPA 腹腔内投与群 ($P=0.008$) はそれぞれ有意に血流量が減少していた。VPA 投与群では両群間では内頸動脈血流量に差はなかった ($P=0.836$)。



胎仔背側大動脈血流量 (図 4) と胎仔臍帯動脈血流量 (図 5) においては、3 群間で血流量の差はなかった。



(2) 分娩後の仔マウスの体重の推移

心行動態測定後に胎仔を自然に出産させた。母体生理食塩水投与から産まれた仔マウスは計 47 匹、母体 VPA 経静脈内投与から産まれた仔マウスは計 11 匹、母体 VPA 経腹腔内投与から産まれた仔マウスは計 38 匹であった。母体 VPA 経静脈内投与群では仔マウスが胎児死亡または出産後に死亡することが多く観察されたが、明らかな外表奇形は認めなかった。生後 1 週、2 週、3 週、6 週でそれぞれ仔マウスの体重を測定したがいずれの週数においても生理食塩水群と比べて VPA 静脈内投与群と VPA 腹腔内投与群はそれぞれ有意に体重が減少していた (図 6)。VPA 投与群では生後 1 週と 3 週では VPA 静脈内投与群の体重が有意に減少しており、生後 2 週では VPA 腹腔内投与群の体重が有意に減少していた (図 6)。生後 6 週では VPA 投与群では体重に差はなかった (図 6)。

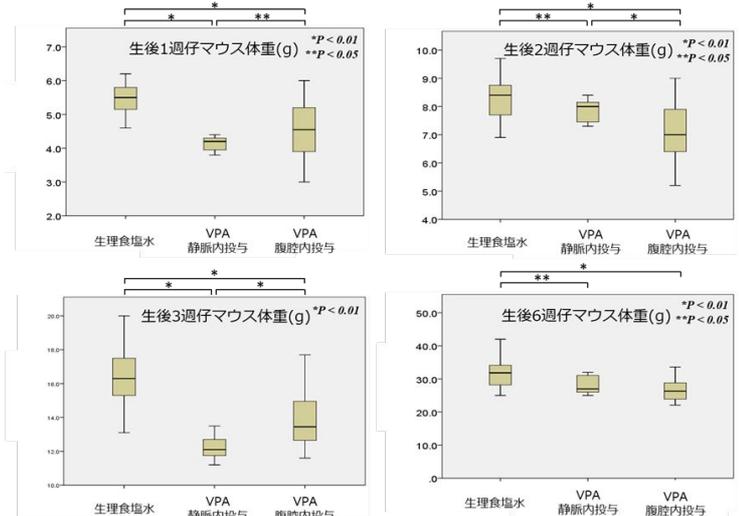


図6: 仔マウスの体重の推移

(3) 仔マウスの心臓形態異常

B モードで観察可能になる生後 3 週以降に仔マウスの心臓形態の異常の有無を 1 週毎に生後 8 週まで検索した。3 群間とも明らかな形態異常を呈する所見は認められなかった。そのため、生後 8 週以降に仔の心臓の採取を行い、ホルマリン固定して組織学的評価を今

後行うこととした。

(4) 仔マウスの心臓における分子生物学的評価

Bモードで仔マウスの心臓形態異常の観察後に仔の心臓を採取し HDAC の蛋白発現や mRNA の発現解析目的にそれぞれ、蛋白の抽出と RNA の抽出作業を行った。mRNA の抽出には RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用い、RNA の品質の客観的評価に 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies) の RNA Integrity Number (RIN) を用いた。品質の高い mRNA の抽出手技を獲得した。miRNA の抽出には、miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて行った。miRNA の品質の客観的評価に 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies) の RNA Integrity Number (RIN) を用いたが、国際基準となる 7 点以上の品質の高い miRNA の抽出作業手技を獲得した。今回は仔マウスの心臓形態異常の有無が B モード法では確認することができなかった。そのため組織学的な評価を行い、異常の有無が評価可能になった後に定量 PCR で 3 群間の HDAC の mRNA 発現を評価する予定である。

(5) まとめ

妊娠初期母マウスへの VPA 投与により、心臓形態形成期の胎仔心行動態に影響を与え、出生仔マウスの体重増加不良の原因となることが今回の研究で示された。

胎仔心行動態の中で胎仔心拍数と胎仔内頸動脈血流量の減少が確認された。胎仔内頸動脈の血流量の減少は、胎仔脳の発達において影響を与えることが予想されるが、詳細なメカニズムについては今回の研究では明らかにすることはできなかった。ヒトにおいては、妊娠中の VPA 内服により中枢神経の先天奇形である神経管閉鎖障害や生後の知能低下、自閉症などの発達障害を発症する危険性が増し、マウスにおいては VPA の胎仔への曝露が脳皮質形成を障害する (J Neurosci. 36:42;10908-19.2016) との報告もあり、今回の胎児心拍数と胎仔内頸動脈血流の減少がそれらの報告との関連性があるのかどうか、今後の検討課題としてあげられた。

Wu らは VPA 投与により、胎仔マウスの 20% が、心奇形を起こしたと報告している (J Biomed Sci. 17:16, 2010) が、今回我々が用いた小動物用超音波高感度イメージングシステムの B モード法での評価では心臓形態異常を確認することができなかった。Wu らと同様に組織学的に心臓形態異常の有無の評価を行い、その結果を B モード法で判別することが可能かどうかの検討を重ねる必要がある。B モード法で心臓形態異常の評価が可能となり心奇形を起こした仔マウスを判別後に、分子生物学的な評価をそれぞれ検討し、VPA の胎仔心臓への影響を検討する予定である。

臨床においては心臓形態形成期に当たる妊娠初期の胎児心行動態が測定されることはなく、妊娠初期に母体に使用された薬剤の

影響が胎児に与える影響を評価することができない。そのために薬剤の副作用などが正確に評価されていないと考えられる。今回の研究では VPA の妊娠初期母マウスへの投与が胎仔心行動態に何らかの影響を与えることが示唆されたが、その影響については明確にすることはできなかった。しかし妊娠可能な女性への VPA 投与に関しては、胎児への何らかの影響も考慮して妊娠前より計画的に他の薬剤に変更するなどの適切な使用方法を検討することと、VPA を使用せざるを得ない妊娠可能な女性に関しては胎児への影響を考慮し妊娠初期からより慎重な観察をすることが望ましいと考えた。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井祐二 (KANAI YUJI)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：60448628

(2) 研究分担者

桃井伸緒 (MOMOI NOBUO)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10285033

青柳良倫 (AOYAGI YOSHIMICHI)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：30509469