

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18591219
 研究課題名 (和文) 神経管閉鎖異常における葉酸による予防効果の分子遺伝学的解析
 研究課題名 (英文) Prevention of the neural tube defects by folic acid in the genetic polydactyly/rhinencephaly mouse, *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：

神経管閉鎖障害 (NTDs) のモデルマウスを用いて、その発症メカニズムや葉酸摂取による NTDs の予防効果について検討した。神経管閉鎖期における母獣の血中葉酸濃度の減少が、NTDs 発症頻度の増加要因の 1 つであることが示唆された。脳形態形成時胎仔の *Fgf8*、*Emx2* 遺伝子の前脳部の発現異常が神経管閉鎖障害誘発の一因となっており、葉酸前処理により発現異常が改善されたことから葉酸による NTDs 予防機序の一端が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

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

ヒトの神経管閉鎖異常 (Neural Tube Defect; NTD) には、二分脊椎、脊髄髄膜瘤、無脳症などの重篤な先天異常が含まれる。1974～1998 年の発症推定数の年次推移をみると、日本での NTD の発症率は低下してきているものの、欧米に比較すれば高くなっており、二分脊椎の発症率だけに注目すると反対に増加している。NTD は染色体異常、突然変異、環境因子などの多くの発症要因が複雑に関与して発症していると考えられている。二分脊椎発症率の増加原因として、環境要因や食生活の多様化など外因の関与が指摘されてはいる

が、発症機序を含めて、増加原因は依然不明のままである。

ヒトにおける葉酸 (FA) 摂取による NTD 予防の有用性に関する研究では、欧米 7 カ国による臨床試験の結果 (Lancet 338: 131-137, 1991) や、アジアで NTD 発症率の高い中国北部と低い南部での FA 投与による発症率の減少の報告 (Robert et al, 2000) 等があり、これらの疫学研究により、FA 摂取は NTD 発症リスクを低減させる効果を持つことが認められている。米国では 1991 年から疾病管理センター (CDC) が NTD 予防のため、妊娠を予定している婦人への FA の摂取 (1 日

0.4mg) を呼びかけており、日本でも平成 12 年から厚生省の指導によって FA 摂取による神経管閉鎖異常発症リスクの低減対策がとられるようになった。

しかし FA 摂取の NTD 発症予防効果に関する研究は主に疫学研究が中心で、発症機序や FA 摂取がどのようにして発症を低減させるのかという予防メカニズムの解明は遅れている。

2. 研究の目的

我々が系統維持している遺伝性多指症/無嗅脳症マウス(*Pdn*)のホモ型 (*Pdn/Pdn*) は、多彩な脳発生異常を現わし、その約 20% は NTD である外脳症を発症する。*Pdn* マウスの責任遺伝子は、他の遺伝子発現を調節する転写調節因子 *Gli3* で、*Pdn/Pdn* では極端な発現抑制が認められる。この *Gli3* 発現抑制が、NTD の分子機構に重要な役割を果たしていると推察できる。そこで神経管閉鎖異常の遺伝素因を持つ *Pdn* マウスを用いて、外脳症の発症メカニズムや FA 投与による発症予防効果を分子遺伝学的に調べることにした。

これまでの研究で、カビ毒の一種であるオクラトキシン A (OTA) を *Pdn* マウス母体に投与すると NTD が 45% まで増加した。一方あらかじめ FA を投与した *Pdn* マウス母体では、OTA 投与しても NTD を含む奇形発症率が高くならず、FA 投与は *Gli3* 発現抑制および外的要因による NTD 発症に対しても、予防効果があると考えられた。しかし、FA 投与が *Gli3* や環境因子にどのような影響を及ぼして、外脳症発症を予防しているかは解っておらず、その解明が重要と考えた。ヒト NTD の FA による予防効果のメカニズムを解明する意味で、マウスを使って分子遺伝学的に調べる意義は大きいと考えられる。

そこで、マウスの NTD のひとつである外脳症に焦点を当て、外脳症の遺伝素因を持つ *Pdn* マウスを用いて FA 投与の有無が、外脳症発症にどのような影響をもたらすのか、OTA や FA の投与の有無や遺伝子型の違いによる遺伝子発現の差異を調べ、外脳症発症に影響を及ぼす遺伝子と、FA が神経管閉鎖時期の胚の遺伝子発現にどのように関与するのか検討することにした。

3. 研究の方法

ヘテロ型である *Pdn/+* マウスどうしを交配し、母体をそれぞれ無処理対照群、FA 投与群、OTA 投与群、FA+OTA 投与群に分けた。妊娠 7 日の母体にそれぞれ FA、OTA、FA+OTA を腹腔投与した。

各群の胎生 18 日の胎仔を摘出し、吸収胚、死胚、生存胚の外形異常観察、体重測定を行い、奇形発症率、外脳症を含む NTD の発症率を調べた。

次に、妊娠 8.5 日の各投与群のマウス母体血清中の FA 濃度を FA あるいは OTA 投与 1 時間後に化学発光酵素免疫測定法で測定した。

神経管閉鎖期である胎生 9 日胚を PCR 法を用いて *Gli3* 遺伝子型の識別をし、FA や OTA 投与の有無、また *Gli3* 遺伝子型の違いで分類し、遺伝子発現解析を行った。

9 日胚の頭部における、葉酸代謝関連の folate receptor 1 (*Folbp1*)、5,10-methylene-tetrahydrofolate reductase (*Mthfr*) および脳形態形成関連の *Fgf8*、*Emx2* 遺伝子の発現を、リアルタイム PCR 法で測定し、発現量の増減を確認した。発現量に変化が認められた遺伝子は whole mount in situ hybridization (WISH) 法で異所性の変化を調べた。

一方、NTD を発症するマウスの研究から、NTD 発症原因となる遺伝子がいくつか存在することが知られているが、*Pdn/Pdn* では、多彩な脳形態形成異常を発症することから、*Gli3* 発現抑制や OTA や FA 投与が組織内の遺伝子発現ネットワークにおいて、多数の遺伝子に影響を及ぼすことが予測される。*Pdn/Pdn* の組織内でどの遺伝子に発現変動がおきているのかを調べるため、DNA マイクロアレイ解析を検討した。まず無処理の+/+胚と、*Pdn/Pdn* 胚の mRNA 発現状態を、DNA マイクロアレイによって網羅的に比較し、異なる発現様式を示す遺伝子群を探索した。

4. 研究成果

まず胎生 18 日の胎仔を摘出し、NTD 発症等を観察した。*Pdn/Pdn* の無処理群では 13.2% の NTD 発症率であったのに対し、OTA を曝露した群では 51.6% と有意に増加したが、あらかじめ FA 処理した群では 20.8% まで発症率が低下した。また、FA のみでは無処理群の *Pdn/Pdn* における NTD 発症率と差が無いことから、FA は *Gli3* 発現抑制による NTD を防御できないことが示唆された (Table.1)。

Table 1. Prevention of NTDs by folic acid in the *Pdn* mouse embryos.

	No. of anomalies (%) (except for polydactyly and arhinencephaly)			No. of NTDs (%)		
	+/+	<i>Pdn/+</i>	<i>Pdn/Pdn</i>	+/+	<i>Pdn/+</i>	<i>Pdn/Pdn</i>
Non-treated control	1/31 (3.2)	2/52 (3.8)	9/38 (23.7)	0/31 (0)	0/52 (0)	5/38 (13.2)
FA	0/24 (0)	1/41 (2.4)	6/26 (23.0)	0/24 (0)	0/41 (0)	3/26 (11.5)
OTA	6/35 (17.1)	7/52 ^c (13.5)	18/31 ^{b,d} (58.1)	3/35 (8.6)	5/52 ^a (9.6)	16/31 ^{b,d} (51.6)
FA+OTA	0/28 ^e (0)	1/49 ^e (2.0)	6/24 ^e (25.0)	0/28 (0)	0/49 (0)	5/24 ^e (20.8)

OTA and/or FA were treated on day 7.5 and/or 7 of gestation.

Pdn mouse embryos were observed on day 18 of gestation.

a, b : Significant difference compared with corresponding non-treated control group by χ^2 or Fisher's test ($P < 0.05, 0.01$).

c, d : Significant difference compared with corresponding FA-treated group by χ^2 or Fisher's test ($P < 0.05, 0.01$).

e : Significant difference compared with corresponding OTA-treated group by χ^2 or Fisher's test ($P < 0.05$).

次に、妊娠 8.5 日の各投与群のマウス母体血清中の FA 濃度を化学発光酵素免疫測定法により測定した。OTA 曝露群では血中葉酸濃度が有意に減少したが、FA 前処理しておくことで血中葉酸濃度に改善が見られた(Fig.1)。OTA 処理により神経管閉鎖期に母獣の血中葉酸濃度が減少することが、NTD 発症頻度の増加要因の 1 つと考えられた。

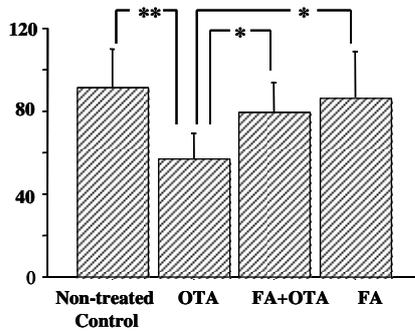


Fig.1. Folic acid level in the serum of 5 pregnant *Pdn/+* mice was analyzed 24 hrs after treatment in each group. Folic acid level in the OTA-treated group was lower than those in non-treated and FA-treated groups. By the pre-treatment with FA before OTA-treatment, folic acid level remained at a normal level.
*, **: Significant difference by t-test ($P < 0.05, 0.01$).

胎生 9 日胚の頭部における、葉酸代謝関連の *Folbp1*、*Mthfr* および脳形態形成関連の *Fgf8*、*Emx2* 遺伝子の発現を、リアルタイム PCR 法で測定した(Fig.2)。 *Folbp1* と *Mthfr* の発現量は、遺伝子型間や OTA、FA 投与による有意な差が認められなかった。 *Fgf8*、*Emx2* では OTA 曝露による発現量の変化が認められた。

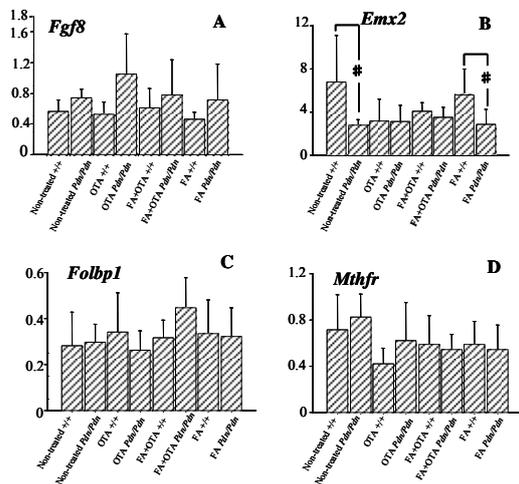


Fig. 2. Total RNA was extracted from the head region of 6 embryos in each group on day 9 of gestation for real-time PCR. *Fgf8* (A), *Emx2* (B), *OTX2* (C), *Folbp1* (C) and *Mthfr* (D) gene expression amounts were analyzed by real-time PCR.
#: Significant difference by one-way ANOVA ($P < 0.05$).

FA 投与や *Gli3* 発現量の違いが神経管閉鎖時期の胚の遺伝子発現にどのように関与し、NTD 発症にどのような影響を及ぼすのかをホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法 (WISH) を用いて検討した(Fig.3)。

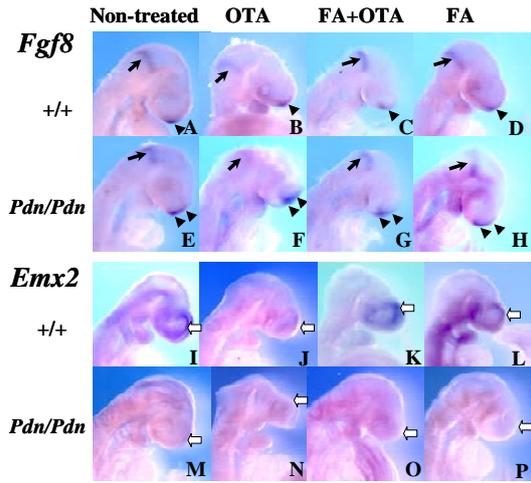


Fig. 3. Whole-mount in situ hybridization specimens on day 9 embryos stained with *Fgf8* and *Emx2* riboprobes. A and I are non-treated *+/+* embryos. E and M are non-treated *Pdn/Pdn* embryos. B and J are OTA-treated *+/+* embryos. F and N are OTA-treated *Pdn/Pdn* embryos. C and K are FA+OTA-treated *+/+* embryos. G and O are FA+OTA-treated *Pdn/Pdn*. D and L are FA-treated *+/+*. H and P are FA-treated *Pdn/Pdn*. *Fgf8* (A-H) and *Emx2* (I-P) *Otx2* signals were investigated in the *+/+* and *Pdn/Pdn*. Anterior neural ridge (ANR) was indicated by arrow heads, dorsoventral isthmal neuroepithelium was indicated by arrows (A-H). Dorsal forebrain was indicated by white arrows (I-P).

Fgf8 では、*Pdn/Pdn* の anterior neural ridge (ANR) で *+/+* と比べ背側に伸びており、*Gli3* は *Fgf8* の発現を抑制していることが示唆された。OTA 処理された *Pdn/Pdn* の ANR は、さらに広範囲に発現していた。FA で前処理すると、抑制されていた。OTA は *Gli3* と *Fgf8* の遺伝子発現カスケードに何らかの影響を及ぼしているが、FA は OTA による影響を防御していることが示唆された。*Emx2* では、無処理 *+/+* では dosal forebrain に発現が認められ、OTA 処理群ではそのシグナルが弱く、FA を投与すると改善がみられた。一方、*Pdn/Pdn* では無処理でもシグナルは弱く、OTA 曝露や FA 前処理により変化することはなかった。これらのことから、*Fgf8* の ANR での発現増加と *Emx2* の前脳背側での発現低下が NTD 誘発の一因となっている可能性が示唆された。

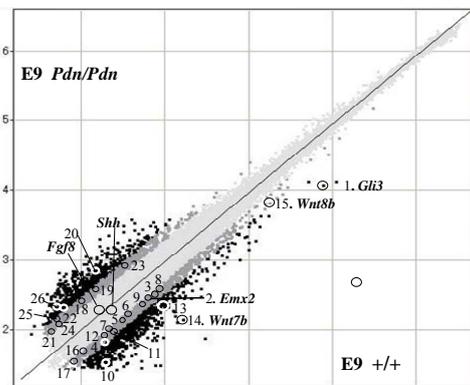


Fig. 4 Fig. 4 Comparison of gene expressions between *+/+* and *Pdn/Pdn* embryos on day 9 of gestation using DNA microarray. *Gli3*, *Wnt8b*, *Wnt7b* and *Emx2* showed lower expressions in the *Pdn/Pdn* than that in the *+/+* embryos, but *Shh* and *Fgf8* showed almost the same expressions as *+/+*.

形態形成期である胎生 9 日胚の頭部から mRNA を抽出し、野生型 (+/+) と *Pdn/Pdn* の発現パターンを約 3 万種類の遺伝子が搭載されている DNA チップを用いて発現解析を行い、シグナル強度を比較した(Fig.4)。

Pdn/Pdn で 2 倍以上発現量が高い値を示した遺伝子は 425 で、1/2 以下の低い発現量を示したものは 368 であった。そのうち脳形態形成に関連のある *Gli3*、*Emx2*、*Wnt8b*、*Wnt7b* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により確認した。さらに WISH 法で発現領域を調べた。その結果、*Pdn/Pdn* で *Wnt8b*、*Wnt7b*、*Emx2* の前脳での発現抑制を認めた (Fig.5)。Wnt シグナルや *Emx2* は *Gli3* 発現抑制の影響を受けていることが示唆された。



Fig. 5. Gene expressions were investigated in the +/+ and *Pdn/Pdn* embryos on day 9 of gestation by whole-mount in situ hybridization. *Gli3* expression was observed in the neuroectoderm (open arrows) in the +/+ (A), but pale in the *Pdn/Pdn* (G) embryos. *Shh* expression was observed in the prechordal mesoderm (green arrows) and floor plate (green arrowheads) both in the +/+ and *Pdn/Pdn* embryos (B, H). *Fgf8* expression was observed in the anterior neural ridge (arrowheads) and dorso-ventral isthmal neuroepithelium (arrows) in the +/+ and *Pdn/Pdn* embryos. *Fgf8* positive anterior neural ridge is elongated in the *Pdn/Pdn* (I) than +/+ (C) embryo. *Emx2* expression was observed in the dorsal forebrain (asterisks) in the +/+ (D), but very slight in the *Pdn/Pdn* embryo (J). *Wnt8b* expression was observed in the dorso-medial forebrain (stars) in the +/+ (E), but not in the *Pdn/Pdn* embryo (K). *Wnt7b* expression was observed in the dorsal forebrain (open stars) in the +/+ (F), but not in the *Pdn/Pdn* embryo (L).

今後は、FA を投与した野生型 (+/+) と *Pdn/Pdn*、さらに OTA 曝露されたサンプルでも比較を行い、データベースとして構築していく予定である。

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 3 件)

- ① Ueta E., Kurome M, Teshima Y, Kodama M, Otsuka Y, and Naruse I. Altered signaling pathway in the dysmorphogenesis of telencephalon in the *Gli3* depressed mouse embryo, *Pdn/Pdn*, *Congenital Anomalies* 48(2), 74-80, 2008、査読有
- ② Katagiri R, Kurome M, Teshima Y, Ueta E., and Naruse I.: Prevention of ochratoxin A-induced neural tube defects by folic acid in the genetic polydactyly/arhinencephaly mouse, *Pdn/Pdn*. *Congenital Anomalies* 47(3), 90-96, 2007、査読有
- ③ Ohta K, Maekawa M, Katagiri R, Ueta E., and Naruse I. Genetic susceptibility in the neural tube defects induced by ochratoxin A

in the genetic arhinencephaly mouse, *Pdn/Pdn*. *Congenital Anomalies* 46(3), 144-148, 2007、査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 上田悦子、児玉真実、黒目万帆、手嶋優子、大塚譲、成瀬一郎、遺伝性多指症/無嗅脳症マウスにおいてGli3発現抑制を受ける遺伝子群の探索日本先天異常学会学術集会、2008年6月29日、東京
- ② 児玉真実、上田悦子、成瀬一郎、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2報—日本先天異常学会学術集会、2008年6月29日、東京
- ③ 上田悦子、片桐龍一、黒目万帆、手嶋優子、成瀬一郎、遺伝性多指症/無嗅脳症マウスにおいてオクラトキシンA処理で起きる神経管閉鎖異常を葉酸で防御する試み、日本先天異常学会学術集会、2007年7月8日、名古屋
- ④ 黒目万帆、手嶋優子、上田悦子、成瀬一郎、遺伝性多指症/無嗅脳症マウスにおけるOchratoxin Aによる神経管閉鎖異常発症の性差、日本先天異常学会学術集会、2007年7月8日、名古屋

- ⑤ 手嶋優子、黒目万帆、上田悦子、成瀬一郎 バルプロ酸に対する遺伝性多指症/無嗅脳症マウスの感受性の差、日本先天異常学会学術集会、2007年7月8日、名古屋

- ⑥ 上田悦子、片桐龍一、難波栄二、成瀬一郎、遺伝性多指症/無嗅脳症マウス (Pdn) の責任遺伝子Gli3 へのトランスポゾン挿入、日本先天異常学会学術集会、2006年6月30日、山形

- ⑦ 片桐龍一、太田健一、上田悦子、成瀬一郎、遺伝性多指症/無嗅脳症マウス (Pdn/Pdn) においてOchratoxinAで惹起される神経管閉鎖異常の葉酸による防御、日本先天異常学会学術集会、2006年6月30日、山形

[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

http://www.med.tottori-u.ac.jp/p/igaku/gakka/hoken/kensa/seitai_home/lab/naruse/

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