

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790762

研究課題名（和文）

嚥下障害の発生的発症機序の解明：CHARGE 症候群をプロトタイプとして

研究課題名（英文）

Developmental pathogenesis of dysphagia.

研究代表者

荒巻 道彦（ARAMAKI MICHIIHIKO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20338099

研究成果の概要（和文）：

胎児期よりマウスに抗甲状腺薬（methimazole）の投与を行ったところ、非投与群と比べて methimazole (MMI) 投与群で体重増加率が悪かった。また、CHD7 遺伝子の mRNA 発現量を MMI 投与群と非投与群とで定量 PCR 法を用いて比較したところ、MMI 投与群で CHD7 遺伝子の発現の低下が認められた。胎児期のマウス（E13.5）の pallium では、脳室帯に特異的に CHD7 遺伝子の発現が認められた。嚥下機能は脳皮質から脳幹部への投射によっても支配されていると考えられている。抗甲状腺薬の投与による体重増加不良のひとつの原因として哺乳不良が考えられ、本研究によって、そのメカニズムの一端として CHD7 遺伝子発現の低下が関与している可能性が示唆された。

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	390,000	2,990,000

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：発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

CHARGE 症候群の患児では誤嚥や嚥下障害が予後にも関わる重要な臨床症状である。これらの臨床症状は第 5 脳神経の異常と関係があると考えられており、しばしば後鼻孔閉鎖や口蓋裂の存在によって症状が増悪する。研究申請者らを含めた複数の報告者が、ヒト胎児期の抗甲状腺薬の投与によって

CHARGE 症候群様の奇形症状（コロボーマ、後鼻孔閉鎖）が誘発される可能性を指摘している（Aramaki et al, American Journal of Medical Genetics Part A, 139A(2005) 156-158）。

代表的な抗甲状腺薬のひとつに methimazole (MMI) が知られている。FDA の pregnancy category による分類では、MMI は

category “D”に分類されている(Table 1)。一般に category “D”の薬剤は、妊娠中の胎児に何らかの影響を及ぼしうる薬剤と認識されており、使用することによって得られる利益が使用することで被る不利益を上回る際に使用することになっている。しかし、最近になって妊娠中の抗甲状腺薬の使用と先天奇形の発症の関連について複数の論文が報告され、妊娠中の抗甲状腺薬の使用に関して問題を提起している。

Table 1  
US Food and Drug Administration categories

Category

- A Adequate and well-controlled studies in pregnant women have failed to demonstrate a risk to the fetus in the first trimester of pregnancy.
- B Animal reproduction studies have failed to demonstrate a risk to the fetus, but there are no adequate and well-controlled studies of pregnant women. Or animal studies demonstrate a risk, and adequate and well-controlled studies in pregnant women have not been done during the first trimester.
- C Animal reproduction studies have shown an adverse effect on the fetus, but there are no adequate and well-controlled studies of humans. The benefits from the use of the drug in pregnant women might be acceptable despite its potential risks. Or animal studies have not been conducted and there are no adequate and well-controlled studies of humans.
- D There is positive evidence of human fetal risk based on adverse reaction data from investigational or marketing experience or studies of humans, but the potential benefits from the use of the drug in pregnant women might be acceptable despite its potential risks.

Category

- X Studies in animals or humans have demonstrated fetal abnormalities or there is positive evidence of fetal risk based on adverse reaction reports from investigational or marketing experience, or both. The risk involved in the use of the drug in pregnant women clearly outweighs any possible benefits

2. 研究の目的

前述の背景を踏まえて研究申請者は、抗甲状腺薬の投与と先天奇形の出現について検討したいと考えた。抗甲状腺薬の投与によって生じる可能性のある先天奇形には、コロボーマや後鼻孔閉鎖など、CHARGE 症候群様症状が知られている。このことから、抗甲状腺薬の投与と CHARGE 症候群に特徴的な臨床症状の出現（特に後鼻孔閉鎖や口蓋裂）の有無について検討し、さらに抗甲状腺薬の投与による遺伝子発現の微細な変化を検出するために CHARGE 症候群の責任遺伝子である CHD7 の発現量を定量することにした。

3. 研究の方法

- (1) 抗甲状腺薬 (Methimazole) の投与による体重増加率の変化  
Methimazole を 200PPM の濃度で給水瓶に入れて妊娠マウスに投与した群 (MMI 群) と、水道水を与えた群 (コントロール群) とに分け、生後 22 日までの体重増加率を検討した。
- (2) ニワトリ胚およびマウス胎仔に抗甲状腺薬 (Methimazole) を投与し、奇形発生の有無を検討  
ニワトリ胚に MMI を 200PPM の濃度で投与し、Hamburger Hamilton stage 35 (Day9) にコロボーマの発生の有無について調べた。  
また、妊娠マウスに MMI を 200PPM の濃度で投与し、Embryonic day 15.5 に口蓋裂の発生の有無について評価した。
- (3) マウス胎仔に抗甲状腺薬 (Methimazole) を投与し、CHD7 遺伝子発現の変化を定量 PCR 法にて検討  
妊娠マウスに MMI を 200PPM の濃度で Embryonic day8~11 まで投与した。コントロールとして水道水を投与した妊娠マ

ウスを用いた。

Embryonic day 11 にマウス胎仔を取りだし、RNA 抽出を行った。各 RNA 濃度を 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  に合わせた後に、cDNA を作製した。Applied Biosystems 社の ProbeFinder software を用いて CHD7 およびコントロール遺伝子として  $\beta$ -アクチンのプライマー配列を決定した。作製した cDNA を鋳型として、各遺伝子のプライマーを用いて Step One Plus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) による定量 PCR を行った。

(4) 胎児期のマウスにおける CHD7 遺伝子発現の検討

嚙下運動は随意的に開始されるが、その機能は上位中枢神経系によって制御を受けていると考えられている。最近の研究成果から、皮質から脳幹への投射線維による制御が想定されている。

マウス胎仔において、皮質から脳幹部へと伸びる神経線維は、Embryonic day 12 ~ 13 前後に誕生する神経細胞から出される。そこで、Embryonic day 13 のマウス胎仔の大脳凍結切片を用いて CHD7 遺伝子の発現を解析した。

(5) マウス胎仔に抗甲状腺薬 (Methimazole) を投与し、嚙下機能を担う脳神経 (第 5 脳神経) の細胞体における CHD7 遺伝子の発現量の変化の検討

嚙下機能に関わる脳神経 (第 5 脳神経) はその神経線維を第 5 頰弓に伸ばし、そこから派生する器官の神経支配を担う。

妊娠マウスに MMI を 200PPM の濃度で Embryonic day 8 ~ 11 まで投与した。コントロールとして水道水を投与した妊娠マウスを用いた。

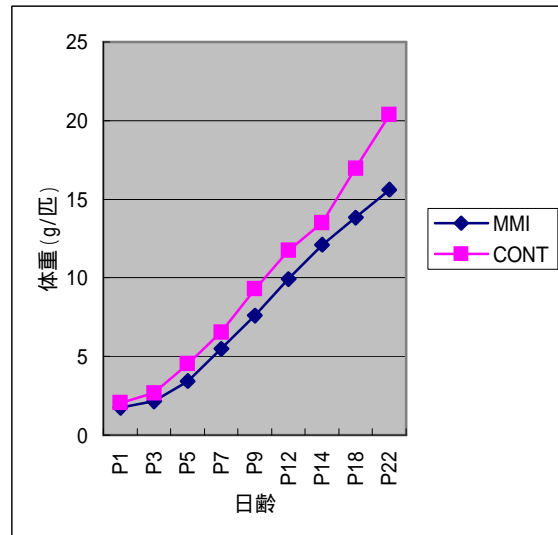
マウスでは第 5 脳神経の神経線維は Embryonic day 11 頃には頰弓に分布していることから、この時期にマウス胎仔を取りだし、各頰弓に lipophilic tracer (Dil) を置いて第 5 脳神経を逆行性にラベルした。ラベルした胎仔から切片を作製し、抗 CHD7 抗体を用いて抗体染色を行った。MMI 投与群とコントロール群で第 5 脳神経の細胞体における CHD7 遺伝子発現の変化を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### 4. 研究成果

(1) 抗甲状腺薬 (Methimazole) の投与による体重増加率の変化

MMI 投与群とコントロール群の出生後の体重増加の変化をグラフに示す。

コントロール群と比較して、明らかに MMI 投与群で体重増加率が低かった。



(2) ニワトリ胚およびマウス胎仔に抗甲状腺薬 (Methimazole) を投与し、奇形発生の有無を検討

ニワトリ胚に MMI を投与してコロボーマの発生について調べたが、コロボーマは認められなかった。

また、マウス胎仔に MMI を投与して口蓋裂の発生についても観察したが、口蓋裂も認められなかった。

(3) マウス胎仔に抗甲状腺薬 (Methimazole) を投与し、CHD7 遺伝子発現の変化を定量 PCR 法にて検討

Embryonic day 11 のマウス胎仔から作製した cDNA を用いて定量 PCR を行ったところ、MMI 群の CHD7 の発現/コントロール群の CHD7 の発現 = 0.91 で、MMI 群で CHD7 遺伝子の発現が低下していた。

(4) 胎児期のマウスにおける CHD7 遺伝子発現の検討

Embryonic day 13 の前額面切片では、pallium において、脳室帯を構成する神経前駆細胞で特異的に CHD7 の発現が確認された。



E13 における CHD7 の発現

- (5) マウス胎仔に抗甲状腺薬 (Methimazole) を投与し、嚥下機能を担う脳神経( 第 Ⅰ 脳神経 )の細胞体における CHD7 遺伝子の発現量の変化の検討

上記の研究の方法に記載した手法で解析を試みたが、解析対象 (脳神経細胞の細胞体)における CHD7 遺伝子の発現の評価が難しく、明確な結論が得られなかった。

以上から抗甲状腺薬の投与による体重増加不良のひとつの原因として哺乳不良が考えられ、そのメカニズムの一端として CHD7 遺伝子発現の低下が関与している可能性が考えられた。

#### 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 )

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

荒巻 道彦 ( ARAMAKI MICHIIHIKO )

慶應義塾大学・医学部 助教

研究者番号 : 20338099

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし