

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860902

研究課題名(和文)先天性小耳症・外耳道閉鎖症を引き起こす発現遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文)Analysis of related gene of congenital microtia/ear canal atresia

研究代表者

船本 聖絵 (Funamoto, Kiyoe)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・技術補佐員

研究者番号：30570030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンA(レチノイン酸)は脂溶性ビタミンであり、哺乳動物にとって成長・免疫・文化と多岐にわたる役割を果たす重要な物質である。胎生初期に母体がレチノイン酸に過剰に暴露された場合、小耳症・心奇形など様々なスペクトラム催奇形を示す事が報告されている。

本研究ではまず妊娠マウスへビタミンAを過剰投与し耳介形態形成を観察した。外耳道は生後10日頃に開通するが、過剰投与群は生後48時間以内に死亡した為、観察が不可能であった。そこで生命維持に関する心機能評価の為、胎仔心電位を計測した所、心電波形に異常があった。また心臓の発現遺伝子解析では、心機能に関する遺伝子発現に差異が見られた。

研究成果の概要(英文)：Teratogenicity of Vitamin A has been studied for many years, and also reported the spectrum such as microtia and heart malformations. In this study, experiments were carried out for the impact of vitamin A overdose of early pregnancy, especially observed the ear developing. Mouse pinna usually develops after the birth and the ear canal opens around day 10. However, new born mouse which observed Pinna abnormalities died all within 48 hours after birth. Therefore, we measured the fetal cardiac potential using mouse fetal electrocardiogram and detected the unusual waveforms. Moreover, gene expression related to heart function was detected. As a result, the presence of genes associated with cardiac and auricle that is the same origin embryogenesis was suggested.

研究分野：胎児発生学

キーワード：ビタミンA(レチノイン酸) 小耳症 胎児心電図

1. 研究開始当初の背景

ビタミンA (レチノイン酸) は脂溶性ビタミンであり、哺乳動物にとって成長・免疫・分化と多岐にわたる役割を果たす重要な物質である^[1]。胎生期初期 (前駆細胞が各組織へと分化するイベント期) に母体がレチノイン酸に過剰暴露された場合、胎児に様々なスペクトラム催奇形 (小耳症・心奇形・骨格形成異常など) が発症することが、これまでの研究において報告されている^[2]。しかし、マウス母獣レチノイン酸過剰摂取による新生仔の耳介形態形成観察の研究例はごく僅かであり、また最もレチノイン酸に対して敏感な器官の一つである心臓は、レチノイン酸が不足しても過剰であっても発生に支障をきたすが、心臓の生理学的な機能評価の研究例は少ない。これまで報告されている研究では、体内におけるレチノイン酸代謝のメカニズムやシグナル伝達が解明されつつあるが^[3]、レチノイン酸は胎児の発生に対して複雑に関与しておりまだまだ未解決の部分が残されている。この課題の解決により、胎児期における様々なスペクトラム催奇形 (小耳症・小顎症・骨格形成異常など) の予防が可能になり、また心臓の発生異常を早くに診断する事で新生児突然死症候群 (SIDS) のような悲劇を無くすことが可能になる。

2. 研究の目的

(1) 雌マウスの体重変化

定期的に体重測定を行う事で、レチノイン酸投与前後の母獣体重変化および胎仔発育の状態を推定する。

(2) フェノタイプの観察

妊娠母獣に、様々な濃度のレチノイン酸を様々なステージで過剰投与し、胎生期マウス胚がレチノイン酸の投与時期および投与量でどのような催奇形性スペクトラムが発症するのか、新生仔のフェノタイプの観察を行う。

(3) 耳介形態形成観察およびサイズ測定

脊椎動物の耳は、神経堤と同様に3つの胚芽からなる複雑に収束した組織から発生する。外耳への主要な寄与は、外胚葉と中胚葉を含む第一鰓弓および第二鰓弓から形成される。マウス耳介は出生後3日頃に起立し、生後10日頃に外耳道が開通する。そこでレチノイン酸過剰投与母獣マウスが出産した新生仔の耳介形態形成の観察、および耳介縦軸/横軸のサイズ測定を行う事で、レチノイン酸と小耳症の関連性について考察する。

(4) 胎仔心機能の生理学的評価観察

マウスの心臓は、E7.5において、体の両側にある一次および二次心臓予定領域が融合し、E8.0に1本の管状形態である原始心筒が形成、そしてE9.0になると心拍動が開始する。後に一次心臓予定領域は主に左室形成に

寄与、E10.5までに、二次心臓予定領域は残り3つの小室(右心室、右心房、左心房)の形成に寄与し^[5]、心臓が成熟、自律神経系が確立する。そこで心臓の生理的機能の評価の為にマウス胎仔心電位測定を行う。

(5) 胎仔心臓の発現遺伝子解析

レチノイン酸過剰投与により、胎仔心臓にどのような遺伝子が関与しているのかを明らかにする為、発現遺伝子解析を行う。これらの結果より、レチノイン酸がもたらす胎生期に直接的に関与するレチノイン酸の代謝活性メカニズムについて考察する事が可能であると考えた。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

全ゲノム解析が完了しヒトとの相同遺伝子が多いC57BL系統マウスを用い、若齢雌マウスを2~4ヶ月齢、中高齢雌マウスを6~8ヶ月齢と定め、それぞれ同系統雄マウスと一晚交配をかけた日を妊娠日のスタート(E0)とした。

(2) ビタミンA (レチノイン酸)

レチノイン酸過剰投与の際、エーザイ(株)チョコラA筋注5万単位(50,000 IU)を用い、投与回数は妊娠期間中に1回のみとした。投与時期は【E7.5 / E9.5 / E11.5】の3条件、濃度は【4,000 IU / 7,500 IU / 15,000 IU / 無処置】の4条件として、それらの条件の組み合わせにより投与を行った。ここで、チョコラA筋注5万単位のヒトに対する急性症状(全身倦怠、悪心、嘔吐、腹痛、めまいなど)は、摂取後数時間から約12時間で現われるが、1~2日後には症状は消失し何ら後遺症は残さないとされる。また急性症状は成人にはまれで、大多数は乳幼児であるとされている^[4]。

(3) 母獣および新生仔体重測定

交配をかけた雌マウスについては、胚日【E0 / E3.5 / E7.5 / E11.5 / E15.5 / E18.5】における体重を測定した。また、コントロール群として、交配を行わなかった雌マウスについても定期的な体重測定を行った。ここで、体重増加率の計算においてはE0または計測開始日を基準とし、各計測日における変化を求めた。

(4) 耳介サイズ測定

通常マウスは出生後に耳介起立および外耳孔が開く事から、新生仔耳介形成観察の為に生後【Day4 / Day7 / Day10】に、耳介の長軸方向を縦サイズ、短軸方向を横サイズと定義して測定した。

(5) 胎仔心電図測定

E7.5にレチノイン酸7,500 IUを投与したマウス母獣に対し、麻酔下でE13.5に開腹手

術を行い、子宮外壁からマウス胎仔心電位計測用針電極を胸部および臀部に接触させ心電位を測定した。測定後、胎仔心電位のみ電気信号を分離し、心電位波形解析を行った。(6)胎仔心臓マイクロアレイ解析

胎仔心電位測定終了後すぐに胎仔心臓を摘出し急速冷凍、後日 RNA 抽出およびマイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) 雌マウスの体重推移および体重増加率

レチノイン酸非処置若齢および中高齢雌マウスの非妊娠時体重推移および体重増加率を図1に示す。若齢マウスの体重は増加する一方(a)、中高齢マウスの体重はほぼ横ばいであった(b)。また若齢マウスの体重増加率は最大で約108%であったのに対し(a)、中高齢マウスの体重の体重増加率は約95%であったことから(b)、若齢マウスは成長途中であると考えられる。

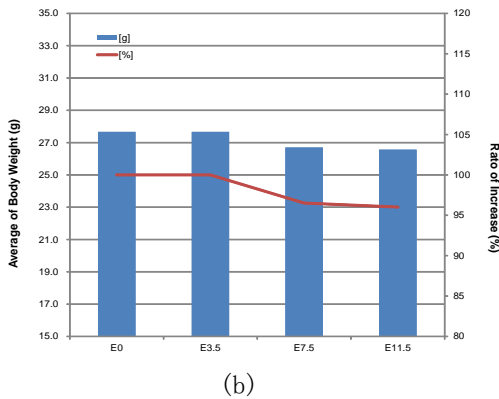
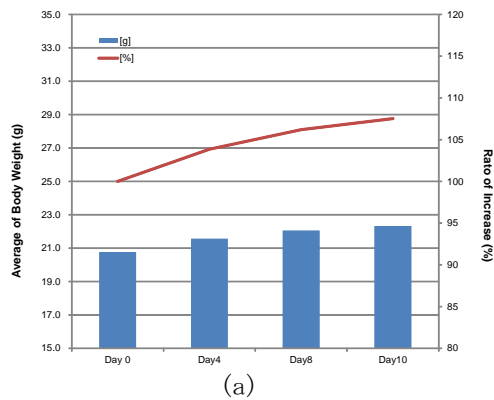
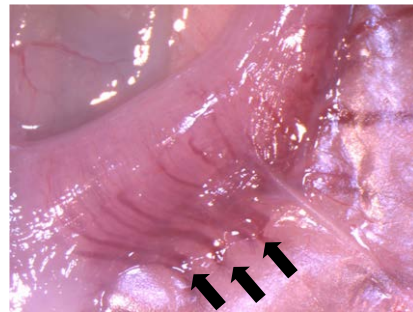
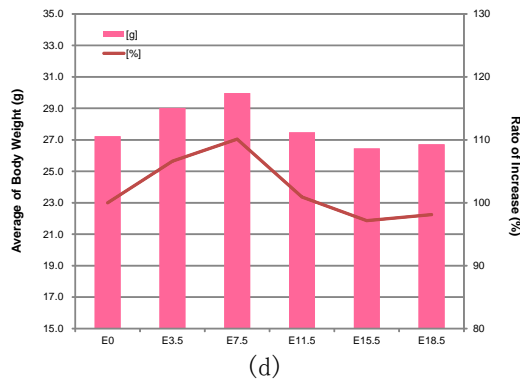
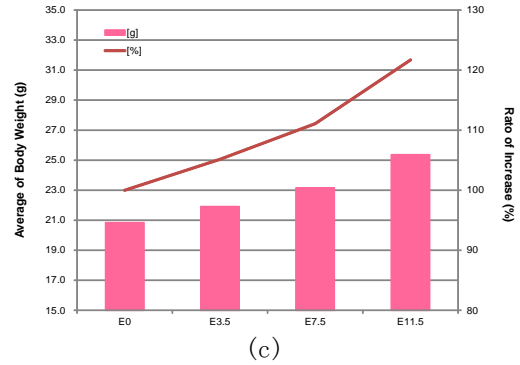


図1. 非妊娠/非レチノイン酸投与の若齢および中高齢雌マウスの非妊娠時体重推移および体重増加率
(a) 非妊娠若齢マウス(2, 3, 4ヶ月齢)の体重推移および体重増加率
(b) 非妊娠中高齢マウス(6, 7, 8ヶ月齢)の体重推移および体重増加率

また交配日をE0とし、E7.5にレチノイン酸7,500 IUを皮下注射した若齢および中高齢マウスの体重推移および体重増加率を図2に示す。若齢マウスの体重は増加し続けたが(c)、中高齢マウスはレチノイン酸を皮下注

射したE7.5を境に、体重が減少した(d)。念のためE18.5まで観察を続けたが、体重の増加は見られなかった。またE18.5に開腹し子宮を観察したところ子宮壁周辺に血管が多く存在(e)、恐らレチノイン酸過剰投与により胎仔の成長が著しく阻害され流産を引き起こしたと考えられる。



(c)

図2. レチノイン酸投与/妊娠母獣マウスの体重推移および体重増加率、子宮観察写真【E18.5】

(a) 妊娠若齢マウス(2, 3, 4ヶ月齢)の体重推移および体重増加率
(b) 妊娠中高齢マウス(6, 7, 8ヶ月齢)の体重推移および体重増加率
(c) E18.5に開腹した際に観察された子宮壁周辺に侵食した血管

(2) フェノタイプの観察

レチノイン酸の母獣過剰投与による耳介形成および耳介形態観察の結果を図3に示す。正常なマウス新生仔の耳介形成は、生後4日頃に耳介が起立し、生後14頃に外耳道が開通した(f)。一方、レチノイン酸を母獣に投

与した群の内、E11.5 に投与した 4,000 IU および 7,500 IU 以外の新生仔は、生後 48 時間以内に全て死亡した (g)。

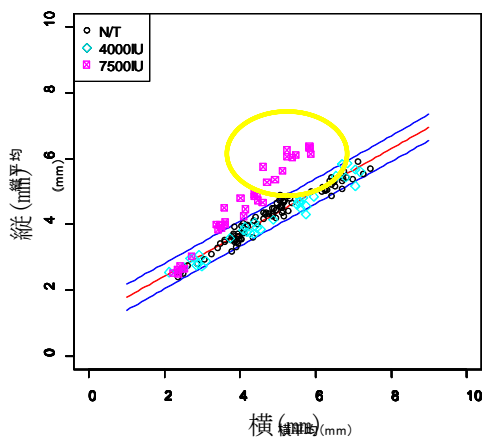


(f)

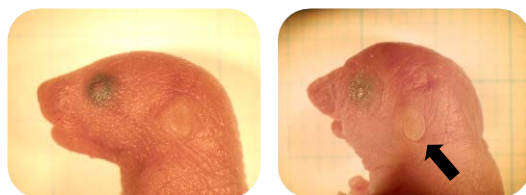
	非処置	4,000 IU	7,500 IU	15,000 IU
E7.5	4.83 (29/6)	NO DATA	0 (0/3)	0 (0/2)
E9.5		0 (0/1)	0 (0/2)	0 (0/2)
E11.5		10 (10/1)	4.5 (18/4)	0 (0/2)

(g)

E11.5 に投与した 4,000 IU および 7,500 IU の新生仔について、耳介形態形成および耳介サイズ測定を行った。その結果、E11.5 に 7,500 IU を投与した母獣より出生した新生仔の耳介は縦に長くなった (h)。この結果より、レチノイン酸による耳介形成位置の後方化が生じたと考えられる (i)。



(h)



(i)

図 3. 新生仔耳介形態形成およびサイズ測定
(f) レチノイン酸非処置マウス新生仔
(g) マウス新生仔の 48 時間生存数

(h) 新生仔耳介の縦・横サイズ相関
(i) 左：正常マウス新生仔/右：レチノイン酸過剰投与母獣マウスが出産した新生仔

(3) 胎仔心機能の生理学的評価

E7.5 にレチノイン酸 7,500 IU を投与したマウス母獣に対し、麻酔下で E13.5 に開腹手術を行い、子宮外壁からマウス胎仔心電位計測用針電極を胸部および臀部に接触させ心電位を測定した結果を図 3 に示す。胎仔心電図は母体電気信号と分離され、心電位波形解析を行った (j)。この結果より、正常な新生仔心臓に対しレチノイン酸が過剰に暴露された心臓では QT 派が遅れて現れた事が確認された。これは心臓発生にレチノイン酸が影響を及ぼしたと考えられる。

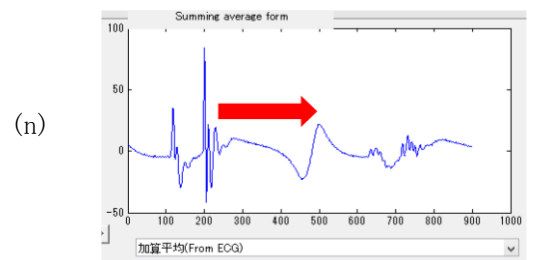
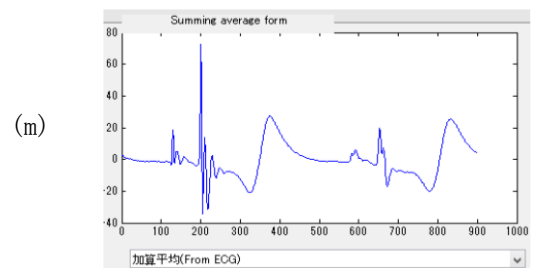
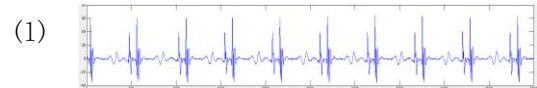
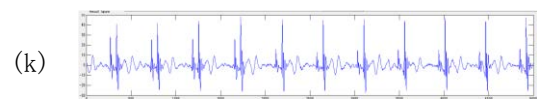


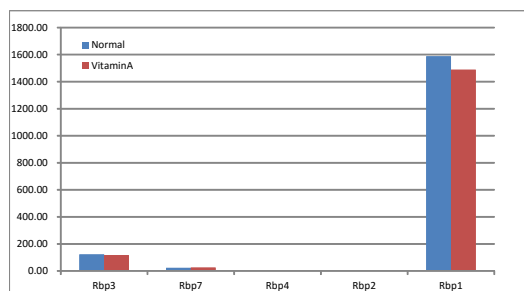
図 3. マウス胎仔心電位解析

(k) 正常マウス胎仔心電位
(l) レチノイン酸暴露マウス胎仔心電位
(m) 正常マウス心電位波形解析
(n) レチノイン酸暴露マウス心電位波形解析

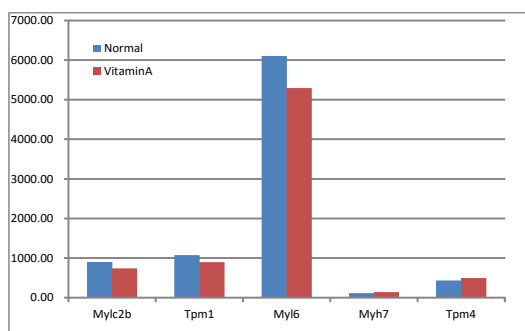
(4) 胎仔心臓発現遺伝子解析

マウス胎仔心電位を測定した後すぐに心臓を摘出し凍結保存を行った。後日 RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った結果を図 4 に示す。その結果、レチノイン酸に関する遺伝子ではレチノイン酸代謝酵素に関する遺伝子 RBP1 の発現率が下がっており (o)、また心臓発生に関する遺伝子ではミオシンに関する遺伝子 Mly6 の発現が下がっていた (p)。これは、心臓の生理的現象を司る心筋機能に関

与する遺伝子であり、心臓の機能が低下する要因となりうるということがわかった。レチノイン酸との関連性については、今後詳しく解析を行う予定である。



(o)



(p)

図 4. レチノイン酸暴露マウス胎仔心臓のマイクロアレイ解析
(o)レチノイン酸代謝酵素に関する遺伝子
(p)心臓収縮に関する遺伝子

以上のまとめとして、マウス母獣へのレチノイン酸過剰投与により、新生仔の耳介形態形成の異常が生じた。しかし出生した新生仔のほとんどが 48 時間以内に死亡してしまった事から耳介形態形成の観察および遺伝子解析が不可能であった。しかし生命維持に関する心臓について異常が疑われた為、胎仔心電位を測定し解析を行った結果、心電波形に異常が見られ、また心臓発現遺伝子にも差異が見られた事から、レチノイン酸暴露による遺伝子発現の影響が示唆された。今後の研究の課題として、心臓と耳介の発生源が近い事から、胎生期におけるレチノイン酸暴露による遺伝子発現異常を統合的に調べる事により原因の究明に近づくと考えられる。先天性奇形を胎児期に治療出来るよう、今後も一層研究に邁進したい。

【参考文献】

[1] “Vitamin A: biomarkers of nutrition for development”, S.A.Tanumihardjo, Am J Clin Nutr, 2011
 [2] “Retinoic acid embryopathy”, E. J. Lammer, et al., NEJM, 1985
 [3] “From carrot to clinic : an overview of the retinoic acid signaling

pathway”, M. Theodosiou, Cell. Mol. Life Sci, 2010

[4]第十五改正日本薬局方解説書「エーザイ(株) チョコラ A 筋注 5 万単位」より

[5]Kelly, 2012

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 件)

〔学会発表〕 (計 件)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
船本聖絵 (KIYOE, Funamoto)
 東北大学・医学系研究科・技術補佐員
 研究者番号：30570030

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：