

—— 研究助成報告 ——

抗てんかん薬胎内曝露による 大脳皮質発生障害メカニズムの解明とその予防戦略の模索

Cerebral cortical dysgenesis due to *in utero* exposure to antiepileptic drugs:
its mechanisms and prevention strategies

三 橋 隆 行¹⁾, 藤 村 公 乃¹⁾, 芝 田 晋 介²⁾, 高 橋 孝 雄¹⁾

要旨：近年、妊娠中に抗てんかん薬、特にバルプロ酸ナトリウム（sodium valproate；VPA）を内服することにより出生児の先天奇形発症リスクが増加する点や、生後の高次脳機能発達を障害する、といった中枢神経系の発生・発達に悪影響を及ぼす可能性が指摘されている。VPAは抗てんかん作用のみならずヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を有し、様々な組織の幹細胞・前駆細胞の増殖/分化誘導を修飾することが先行研究より報告されている。そこで本研究では、薬物への胎内曝露が大脳皮質構築を障害するメカニズムについて特に胎仔の神経前駆細胞の細胞分裂動態に着目し、広く処方されているVPAを胎内曝露して解析した。大脳皮質発生の数学モデルを用いた解析の結果、VPA胎内曝露はマウス胎仔脳において大脳皮質発生初期に神経前駆細胞の分化誘導を抑制し、その結果大脳皮質表層の投射神経細胞の産生数を増加させることを明らかにした。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2016；27：65-70

Key Words : Neocortex, neural progenitor cell, differentiation, neurogenesis, sodium valproate

序論

高次脳機能の獲得はヒト中枢神経発達の中でも最重要項目である。高次脳機能の中核である大脳皮質の発生は、遺伝情報により規定されたシナリオに従って進行しつつ、遺伝要因や環境因子により直接的・間接的に影響を受けることが想定されている。神経幹細胞から前駆細胞を経て幼若な神経細胞が産生される過程は、大脳皮質を構成する興奮性投射神経細胞、抑制性介在神経細胞、グリア細胞について、それぞれ数のバランスや分布パターンがおおかた決定される極めて重要なステップである。この時期の正

常発生メカニズムを解明し、さらに発生異常の原因となりうる環境因子（汚染物質、薬物、栄養等）やてんかん発作などの関与様式について検討することは、小児における高次脳機能障害の病態解明、予防・治療法開発に不可欠と考えられる。

近年ゲノムDNA情報のみでは説明困難な生命現象を説明しうるメカニズムとして、DNA塩基配列に依存しない遺伝子発現機構（エピジェネティクス機構）の関与が重要視されている。具体的には、DNAのシトシン塩基へのメチル基付加によるDNAメチル化、DNAの核内収納に重要な働きを持つヒストン蛋白のリン酸

¹⁾慶應義塾大学医学部小児科学教室, ²⁾慶應義塾大学医学部生理学教室

[〒160-8582 東京都新宿区信濃町35]

Takayuki Mitsuhashi¹⁾, Kimino Fujimura¹⁾, Shinsuke Shibata²⁾, Takao Takahashi¹⁾

Departments of ¹⁾Pediatrics and ²⁾Physiology, Keio University School of Medicine

[35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan]

化・アセチル化・糖鎖付与によるクロマチン構造の修飾などが知られている。

抗てんかん薬として広く用いられているバルプロ酸ナトリウム (sodium valproate ; VPA) は抗てんかん作用に加え、細胞核内のクロマチン構造を構成するヒストン蛋白の脱アセチル化酵素 (histone deacetylase ; HDAC) を阻害する作用を持ち¹⁾、特に哺乳類の胎仔組織においては、VPA曝露が細胞周期調節に関与する遺伝子群の発現量をエピジェネティックに変化させ、幹細胞・前駆細胞の増殖/分化誘導を変化させることが報告されている²⁾。さらにVPAを妊娠中に内服することで児の中脳神経奇形を含む先天奇形³⁾や自閉症⁴⁾、知能指数低下⁵⁾のリスクを増加させる点が指摘されている。以上から、妊娠可能な女性てんかん患者に対しては可能な限りVPA投与を避けることが国際抗てんかん連盟より勧告されている⁶⁾。

これまでに当研究室では大脳皮質内に分布する神経細胞の大半を占める投射神経細胞が神経前駆細胞から形成される過程をマウスで解析し、神経前駆細胞が神経細胞産生期間中に最大11回分裂し、その間細胞周期が主にG1期長が変動することで延長すること、同時に一回の細胞分裂における分化誘導の確率 (Q値) が規則正しく増加することを明らかにした^{7,8)}。加えて、各細胞分裂から産生された幼弱神経細胞が大脳皮質の各層に特定の法則に従って分布する点も明らかにし、大脳皮質発生の数学モデルを確立した⁹⁾。さらに、細胞周期のG1期進行を抑制する蛋白質p27^{Kip1}が、神経前駆細胞の増殖・分化誘導に極めて重要な役割を果たしていることを、p27^{Kip1}ノックアウトマウスや神経前駆細胞特異的・時期特異的p27^{Kip1}強制発現マウス、ダイオキシン胎内曝露マウスを使った研究で明らかにしてきた¹⁰⁾。

以上の知見を踏まえ本研究では、VPA胎内曝露がHDAC阻害作用により神経前駆細胞 (neural progenitor cells ; NPC) の細胞分裂動態を変動させ、大脳皮質構築に異常を生じさせる可能性が高いと仮説を立て、VPAに曝露したマウス胎仔におけるNPCの細胞分裂・分化誘導の動態を計測、前述の大脳皮質発生の数学

モデル^{7,8)}を用いて大脳皮質構造異常の発生メカニズムを定量解析した。

方法

VPA投与・血中濃度測定

先行研究によるマウスのVPA血中濃度半減期が1時間以下との報告に基づき¹¹⁾、血中濃度を維持する目的で0.4% VPA (Sigma-Aldrich) または対照としての蒸留水を妊娠CD1マウスに妊娠1日から仔の出生まで飲料水として投与した。投与中のVPA血中濃度を確認するため、胎生13日目の胎児を孕むマウス母体の血清VPA濃度を測定した。

生後大脳皮質の構造の解析

生後21日のマウスをペントバルビタールで深麻酔し、0.5%グルタルアルデヒド (関東化学)・4% PF含有PBSで経心臓的に灌流固定した。大脳を摘出後同固定液で一晩浸潤固定し、パラフィンに包埋した。一次体性感覚野を含む冠状断切片を4 μ mの厚さで作成し、脱パラフィンの上、抗gamma-amino-butyric acid (GABA) 抗体 (1:1000, A2052, Sigma-Aldrich) を一次抗体、蛍光標識抗ウサギIgG抗体 (1:600, A-31572, Thermo Scientific) を二次抗体、細胞核染色試薬 (bisBenzimide trihydrochloride H33342, Sigma-Aldrich) 対比染色としてGABAに対する蛍光免疫組織染色を行った。切片を正立蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus) に設置したデジタルカメラ (D700, Nikon) で撮影し、ZEN lite 2011 (Carl Zeiss Microscopy) を用いてGABA陽性の介在神経細胞、GABA陰性の投射神経細胞、グリア細胞それぞれの数を大脳皮質内で計測した¹⁰⁾。

脳室帯内NPCの細胞周期長の推定

累積5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) ラベル法により胎生10, 11, 12, 14, 16日の脳室帯 (ventricular zone ; VZ) 内NPCの細胞周期長を既報に従い推定した⁷⁾。具体的には、S期トレーサーであるBrdU (Sigma-Aldrich, 体重gあたり50 μ g) を午前9:00から3時間ごとに母マウスに腹腔内投与し、複数時点でペントバル

ビタールで深麻酔した母体から胎児を摘出、4% PF含有PBSで浸潤固定した。脱水後パラフィン包埋し、将来一次体性感覚野を形成する部位を含んだ冠状断切片を作成し、抗BrdU抗体 (1:50, MCA2060, AbD Serotec) を一次抗体、蛍光標識抗ラットIgG抗体 (1:300, A-21434, Life Technologies) を二次抗体、対比染色にH33342を使用してBrdUに対する蛍光免疫組織染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700, Carl Zeiss Microscopy) で撮影後、画像をZEN lite 2011で解析し、大脳壁VZ内の核の総数に対するBrdU陽性核の割合 (BrdU labeling index, LI) を計算、LIを縦軸、BrdU曝露時間を横軸にとりVZ内のLIをプロットした。最小二乗法によって回帰直線を得、細胞周期全長 (T_C)、S期長 (T_S) を算出した。

分化誘導の確率の解析

VZ内NPCの分化誘導の確率 (quiescentまたはQ値) を解析するため、胎生10, 11, 12, 14, 16日 に5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU) とBrdUを組み合わせたQ値を解析するための実験を行った^{8,10)}。具体的には、まず午前7:00にIdU (Sigma-Aldrich, 体重gあたり50 μ g) を妊娠マウスに腹腔内投与し、午前9:00にBrdU (体重gあたり50 μ g) を腹腔内投与した。以後マウスを次の2群に分けた: 1) BrdUを3時間ごとに追加投与する群 (Q実験), 2) BrdUの追加投与を行わない群 (P + Q実験)。初回のBrdU投与から T_C - T_S 時間以上の時間が経過したのちに深麻酔した母体から胎児を摘出し、4% PF含有PBSで浸潤固定した。脱水後パラフィン包埋し、将来一次体性感覚野を形成する部位を含んだ冠状断切片を作成の上、IdUとBrdUについて二重蛍光免疫組織染色を行った。具体的には前述の抗BrdU抗体 (1:50, MCA2060, AbD Serotec) に加えて抗IdU/BrdU抗体 (1:25, 347580, Becton-Dickinson) を一次抗体として、蛍光標識抗ラットIgG抗体と蛍光標識抗マウスIgG抗体 (1:300, A-11029, Life Technologies) を二次抗体に使用した。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700) で撮影後、ZEN lite 2011を用いてQ細胞数とP + Q細胞数を測定、Q細胞数をP + Q細胞数で割

ることでQ値を算出した。

Q細胞の生後大脳皮質内分布の解析

胎生16日の胎仔を孕む母体にQ実験と同様の方法でIdUとBrdUを腹腔投与し、出産させたうえ生後21日まで飼育し、一次体性感覚野の冠状断切片を作製した。Q値の解析時に使用した抗体に加えて抗calbindin抗体 (1:500, AB1778, Chemicon) を一次抗体、蛍光標識抗ウサギIgG抗体 (1:300, A-21245, Life Technologies) を二次抗体に使用し、大脳皮質II層の指標とした。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700) で撮影後、ZEN lite 2011を用いてIdU陽性/BrdU陰性核をもつ神経細胞 (胎生16日に産生されたQ細胞) 数を大脳皮質内において計測した。

総アセチル化ヒストンH3蛋白量の測定

胎生12日の胎仔大脳壁を以下の方法で回収した。ペントバルビタールで深麻酔した母マウスから胎児を摘出し、頭部を切断、氷冷下PBS内で胎児前脳を摘出した。前脳の大脳壁を実体顕微鏡 (SZX9, Olympus) 下で眼科用鉗をつかって切断して回収した。体積比10倍量の融解緩衝液 (10 mM HEPES-KOH, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 M HCl, プロテアーゼ阻害剤 [Complete Mini, Roche] 混合液) を加え、塩酸を加えた酸性条件下で蛋白を抽出して氷冷アセトンで精製後、EpiQuik total histone H3 acetylation detection fast kit (Epigentek) で総アセチル化ヒストンH3蛋白量を測定した。

イムノプロット解析

前述と同様の方法で分離した胎生12日の胎仔大脳壁に体積比10倍量の低浸透圧融解緩衝液 (0.5 M HEPES-KOH pH 7.8, 1 M KCl, 0.5 M EDTA, 1 mM DTT, プロテアーゼ阻害剤 [Complete Mini] 混合液) を加えベレットベッスルで細胞膜を破壊した。遠心分離で細胞核成分を沈降後、10倍量の高浸透圧融解緩衝液 (0.5 M HEPES-KOH pH 7.8, 1 M KCl, 1 M $MgCl_2$, 68% glycerol, 1 mM DTT, プロテアーゼ阻害剤混合液) を加え、超音波破碎することで核内蛋白を抽出した。cyclin D1, cyclin

dependent kinase (cdk) 2, cdk4, p27^{Kip1}について以下の抗体を使用し免疫ブロット解析を行った: 抗cyclin D1抗体 (1:250, RM-9104, Thermo Scientific), 抗cdk2抗体 (1:250, sc-163, Santa Cruz Biotechnology), 抗cdk4抗体 (1:250, sc-260, Santa Cruz Biotechnology), 抗p27^{Kip1}抗体 (1:500, 610241, Becton-Dickinson)。

結果

VPA胎内曝露は生後21日大脳皮質表層の厚さを増加させる

VPAを投与した胎生13日目の胎児を孕む母体の血清VPA濃度は $23.8 \pm 3.4 \mu\text{g/ml}$ であった (平均 $\pm$ SEM, $n = 4$)。VPA曝露仔マウスについては二分脊椎などの肉眼的外表奇形を認めず, 大脳皮質一次体性感覚野は対照群と同様に6層の層構造を形成した。大脳皮質一次体性感覚野の厚さは皮質表層 (II-IV層) が15%増加 ($p = 0.001$, $n = 6$) したことで皮質全層 (I-VI層) が10%増加した ($p = 0.004$, $n = 6$)。一方, 皮質深層 (V-VI層) では皮質厚に差を認めなかった。

VPA胎内曝露は生後21日の大脳皮質表層に分布するGABA陰性投射神経細胞数を増加させる

生後21日のVPA曝露群では対照群と比較して一次体性感覚野に分布するGABA陰性投射神経細胞数が14%増加した ($p < 0.001$, $n = 6$)。GABA陰性投射神経細胞数は大脳皮質表層 (II-IV層) で21%増加した一方 ($p = 0.004$, $n = 6$), 皮質深層 (V-VI層) では差を認めなかった ($p = 0.074$, $n = 6$)。GABA陽性介在神経細胞・グリア細胞の数と密度については両群間で差を認めなかった。

VPA胎内曝露はQ値を減少させることで最大NPC数を増加させ神経細胞の総数を増加させる

NPCの細胞周期長については対照群とVPA曝露群間に差を認めなかった。VPA曝露群のQ値は対照群と比して胎生11, 12, 14日には低値であったが, 胎生16日にはほぼ同等だった。す

なわち, VPA曝露により, Q値が0.5に達するまでに要するNPC分裂回数が増加したことが示唆された。これはNPC数のピーク値が増加することを意味し, 結果的に大脳皮質発生の最終フェイズに産生される表層神経細胞数が増加することを意味する^{8,11)}。実際, VPA曝露群では胎生16日に産生された神経細胞数が生後21日の大脳皮質内で対照群と比較して約2倍に増加し ($p = 0.003$, $n = 4$), それらの神経細胞は対照群と同様大脳皮質第II層に分布した。

VPA胎内曝露はヒストンアセチル化状態を亢進させ, NPC核内の細胞周期調節蛋白量を増加させる

VPA胎内曝露は胎生12日目大脳壁NPCから抽出された総アセチル化ヒストンH3蛋白量 ($n = 4$, $p = 0.044$), 核から抽出された蛋白に含まれる細胞周期調節蛋白cyclinD1, cdk2, cdk4およびp27^{Kip1}量 ($n = 3$) を増加させた。

考察

本研究よりVPA胎内曝露が神経細胞産生過程の前半から中期にかけてNPCの分化誘導を抑制したことでNPCの最大数を増加させ, その結果神経細胞産生過程の後半にNPCから産生された投射神経細胞が大脳皮質表層で増加したと結論した。以上は1) VPA胎内曝露がヒトにおいて児の大脳皮質厚を増加させたとの報告¹²⁾, 2) VPA胎内曝露がラットにおいて仔の前頭葉の大脳皮質厚と神経細胞数を増加させたとの報告¹³⁾, 3) VPA曝露が培養マウス胚性幹細胞から産生される大脳皮質表層神経細胞の数を増加させたとの報告¹⁴⁾, といった一連の先行研究結果と一致するものである。加えて, 本研究のVPA曝露方法によって得られるVPA血中濃度はマウスのけいれん誘発閾値を50%増加させる濃度 ($120\text{--}150 \mu\text{g/ml}$ ¹⁵⁾) と比較し低値であり, 妊娠中のヒトてんかん患者における曝露状態 (低用量のVPAを妊娠全期間にわたり投与) に近似されていると考えられることから, 本研究で得られた結果がヒト胎児で生じている可能性が高い。

さらに, 本研究の結果, VPA胎内曝露がG1期調節蛋白の発現を非特異的に増加させること

が判明し、そのメカニズムにヒストン蛋白アセチル化状態の異常亢進が関与した可能性が考えられた。ヒストン蛋白のアセチル化状態を正常化させることが可能となれば、病態特異的な治療戦略になり得る可能性がある。

結語

本研究はHDAC阻害作用をもつVPA胎内曝露が胎仔NPCの細胞分裂動態を障害する結果、生後大脳皮質内の投射神経細胞数を増加させることを明らかにした。NPCの細胞分裂動態に対するエピジェネティックな修飾機構についての理解がさらに深まることにより、神経発生が原因となる病態の解明、治療法の開発が格段に進展することが期待される。本研究の成果については、さらに知見を加え、投稿中である。

参考文献

- 1) Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001 ; **20** : 6969-6978.
- 2) Tou L, Liu Q, Shivdasani RA. Regulation of mammalian epithelial differentiation and intestine development by class I histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 2004 ; **24** : 3132-3139.
- 3) Jentink J, Loane MA, Dolk H, Barisic I, Garne E, Morris JK, et al. Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *N Engl J Med* 2010 ; **362** : 2185-2193.
- 4) Bromley RL, Mawer GE, Briggs M, Cheyne C, Clayton-Smith J, Garcia-Finana M, et al. The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013 ; **84** : 637-643.
- 5) Meador KJ, Baker GA, Browning N, Cohen MJ, Bromley RL, Clayton-Smith J, et al. Fetal antiepileptic drug exposure and cognitive outcomes at age 6 years (NEAD study): a prospective observational study. *Lancet Neurol* 2013 ; **12** : 244-252.
- 6) Tomson T, Marson A, Boon P, Canevini MP, Covanis A, Gaily E, et al. Valproate in the treatment of epilepsy in girls and women of childbearing potential. *Epilepsia* 2015 ; **56** : 1006-1019.
- 7) Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci* 1995 ; **15** : 6046-6057.
- 8) Takahashi T, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neurogenesis. *J Neurosci* 1996 ; **16** : 6183-6196.
- 9) Takahashi T, Goto T, Miyama S, Nowakowski RS, Caviness VS, Jr. Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *J Neurosci* 1999 ; **19** : 10357-10371.
- 10) Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K, Takahashi T. In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ; **107** : 16331-16335.
- 11) Nau H. Teratogenic valproic acid concentrations: infusion by implanted minipumps vs conventional injection regimen in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985 ; **80** : 243-250.
- 12) Wood AG, Chen J, Barton S, Nadebaum C, Anderson VA, Catroppa C, et al. Altered cortical thickness following prenatal sodium valproate exposure. *Ann Clin Transl Neurol* 2014 ; **1** : 497-501.
- 13) Sabers A, Bertelsen FC, Scheel-Kruger J, Nyengaard JR, Møller A. Long-term valproic acid exposure increases the number of neocortical neurons in the developing rat brain. A possible new animal model of autism. *Neurosci Lett* 2014 ; **580C** : 12-16.
- 14) Juliandi B, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Smith A, Nakashima K. Induction of superficial cortical layer neurons from mouse

embryonic stem cells by valproic acid. Neurosci
Res 2012 ; **72** : 23-31.

pharmacodynamic properties and mechanisms
of action. Prog Neurobiol 1999 ; **58** : 31-59.

15) Loscher W. Valproate: a reappraisal of its

Summary

Cerebral cortical dysgenesis due to *in utero* exposure to antiepileptic drugs: its mechanisms and prevention strategies

Takayuki Mitsuhashi, Kimino Fujimura, Shinsuke Shibata, Takao Takahashi

In this study, we analyzed the mechanisms of how *in utero* exposure to antiepileptic drug affects the generation of neurons in mice embryos, using a widely prescribed antiepileptic drug sodium valproate (VPA). Recent researches have repeatedly reported that *in utero* exposure to VPA negatively affects the development of central nervous system in human children, such as increased risks of congenital malformation and impaired higher brain functions. VPA has also been reported to modify cell proliferation/differentiation characteristics of neural stem/progenitor cells, through its action as an inhibitor of histone deacetylases. We showed that VPA exposure *in utero* inhibits the cell cycle exit of neural progenitor cells during the early phase of neocortical histogenesis, which resulted in the increased number of projection neurons that were distributed in the superficial neocortical layers in the adult murine brains.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2016 ; 27 : 65-70