

論文内容の要旨

獣医学専攻

平成12年度博士課程入学

氏名 片山 圭一

指導教官名 土井 邦雄

論文題目 Studies on the mechanisms of ethylnitrosourea-induced neural stem cell apoptosis and cell cycle arrest

(エチルニトロソウレアによる胎仔神経幹細胞のアポトーシスおよび細胞周期停止の発現機序に関する研究)

胎仔の中枢神経組織には神経上皮細胞と呼ばれる多分化能および自己複製能を有する神経幹細胞が **ventricular zone** と呼ばれる一層の多列上皮を形成している。この神経上皮細胞の核は **ventricular zone** の中をエレベーター運動と呼ばれる特異な上下運動をしながら増殖している。すなわち、脳室側（内側部）で有糸分裂を行い、分裂を終えた娘細胞は **ventricular zone** の外側部に移動してそこで DNA 合成を行い、また脳室側（内側部）に移動して有糸分裂を行うというサイクルをとりながら増殖している。そうして細胞増殖を終えた神経上皮細胞は神経芽細胞へと分化し、**ventricular zone** のさらに外側へと移動して神経細胞・グリア細胞などへと分化していく。中枢神経組織の発生過程においてアポトーシスは様々なシグナルによって制御されており、その厳密な制御は正常な発生に必要不可欠である。しかしながら、神経上皮細胞は様々な外的刺激、とりわけ遺伝子傷害性の刺激に対しては非常に高い感受性を示し、容易にアポトーシスに陥り、その結果として新生仔に神経細胞の減少と構築異常を示す無脳症〜小脳症といった種々の程度の

脳奇形が誘発される。

EthylNitrosourea (ENU)は有名なアルキル化剤であり、強力な遺伝子傷害作用を有することが知られている。特に妊娠ラットに投与されると出生後一定期間後に仔ラットに glioma などの脳腫瘍を高頻度に誘発することが知られており、脳腫瘍の病理発生に関する数多くの研究に用いられてきた。また、ENU は投与直後には胎仔の中枢神経組織の神経上皮細胞、前顔面部・肢芽・尾芽などの間葉系細胞および生殖巣の始原生殖細胞さらには胎盤の栄養膜細胞などにアポトーシスを誘発し、その結果として出生後の新生仔に成長遅延、小脳症、欠指症、尾の湾曲および生殖臓器の低形成といった先天異常が高頻度に観察される。

本研究では、胎仔中枢神経組織のアポトーシスおよび細胞周期の制御機構を知ることを目的として、ENU を妊娠ラットおよびマウスに投与して胎仔の中枢神経組織の神経上皮細胞にアポトーシスを誘導し、その際のアポトーシスと細胞周期の動態との関連、および、それらに関する各種因子の発現の動態について検索を行った。

まず最初に、ENU 投与後の胎仔神経上皮細胞におけるアポトーシス細胞数および有糸分裂細胞数、ならびに bromodeoxyuridine (BrdU)を用いて DNA 複製を行っている細胞数の経時的推移に関する組織学的検索を行った。ENU 投与後 3 時間目からアポトーシス細胞の増加と有糸分裂細胞および BrdU 陽性細胞の減少がみられた。アポトーシス細胞は ENU 投与後 1 2 時間目に最も多くなり、BrdU に陽性を示す DNA 複製を行っている細胞は 6 時間目に、有糸分裂細胞数はそれより少し遅れて 1 2 時間目にそれぞれ最低値を示した。このことから ENU は胎仔中枢神経組織の神経上皮細胞にアポトーシスのみでなく細胞周期停止も誘発することが示唆された。さらに、アポトーシス像を示す核は細胞周期の S 期の細胞の核が存在すると言われている ventricular zone の外側部に集中して認められたことから、ENU は主に細胞周期の S 期の細胞に対して作用し、アポトーシスを誘発することが示唆された。また、ENU の投与を受けた母動物から産まれた新生仔の脳は非常に低形成性で、この変化は胎仔期に誘導されたアポトーシスおよび細胞周期停止によって誘発されたものと考えられた。

次に、ENU 投与後の胎仔中枢神経組織の各細胞周期およびアポトーシス細胞数の変動に関する検索を、flow cytometry を用いて DNA 含量を測定することにより行った。ENU 投与後 1 時間目より S 期の特に初期の細胞が増加し、この傾向は 6 時間目に最も顕著になったが、逆にその後の 9-12 時間目にかけて S 期の細胞は減少したにもかかわらず、S 期に引き続く G2/M 期の細胞も減少し、それと呼応するようにアポトーシス細胞が増加した。

前述の組織学的検索においては ENU 投与後 6 時間目を中心に BrdU の取り込みを行う DNA 複製中の細胞が減少したが、flow cytometry による細胞周期検索では逆に同時期に細胞周期の S 期の細胞の増加が認められた。そこで、ENU 投与後 6 時間目において BrdU の取り込みを flow cytometry を用いて解析したところ、ENU 投与群では BrdU の取り込みが著しく減少しており、

さらに、S 期に相当する DNA 量を含有していながら BrdU を全く取り込んでいない細胞も多数認められた。従って、S 期の細胞の蓄積は DNA 複製の抑制または停止によってもたらされていることが示唆された。

また、Western blot 解析では S 期細胞が増加した時期において G1/S 期移行を司る cyclin D1, cyclin dependent kinase (CDK) 4 の発現は増加しておらず、むしろ細胞周期を停止する方向に働く CDK インヒビターの p21^{waf1/cip1} や、その転写活性化因子の p53 の発現が増加していた。従って、ENU 投与後にみられた S 期の細胞の蓄積は G1 期から S 期への移行が充進したために誘発されたものではないことが示唆された。

さらに、細胞周期の S 期の細胞が増加し始めた ENU 投与後 3 時間目に BrdU を母動物に腹腔内投与し、BrdU を取り込んだ神経上皮細胞の核の移動の様子を組織学的に観察したところ、ENU 投与群では BrdU に陽性を示す核は長時間 ventricular zone の外側部に停滞し、その多くはその後脳室側に移動することなくアポトーシスにより死んでいることを示す結果が得られた。すなわち、この結果をエレベーター運動に照らし合わせると、ENU 投与により神経上皮細胞は S 期において停滞し、その後 S 期にとどまったままでアポトーシスにより死んでいるものと考えられた。

以上の細胞周期に関する検索結果をまとめると、ENU は S 期の神経上皮細胞に作用して、その DNA 複製を著しく抑制または停止させ、その後これら細胞が G2 期を迎える前にアポトーシスを誘導しているものと考えられた。

ENU 誘発胎仔中枢神経組織のアポトーシスおよび細胞周期停止における p53 の役割を調べるため、p53 およびその転写標的遺伝子の mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて経時的に検索した。p53 に対する抗体を用いた免疫組織化学では ENU 投与後 1 ～ 12 時間目の神経上皮細胞の核に陽性像がみられ、その数は投与後 3 時間目に最も多くなった。また、p53 の転写標的遺伝子の RT-PCR 解析ではほとんどの遺伝子 (p21^{waf1/cip1}, cyclin G1, fas/CD95, bax) の発現が投与後 6 時間目をピークとして観察された。また、それらの中でも最も発現の上昇した p21^{waf1/cip1} について蛋白レベルでの発現を免疫組織化学で確認したところ、p21^{waf1/cip1} に陽性を示す神経上皮細胞も ENU 投与後 6 時間目に最も多くなった。アポトーシスの増加および細胞周期停止の誘導に先行して p53 の発現が増加し、それに伴ってその転写標的遺伝子の mRNA の発現も増加したことから、ENU は p53 依存性にアポトーシスおよび細胞周期停止を誘発するものと推察された。

また、実際に p53 ノックアウトマウスを用いて ENU 投与後の胎仔中枢神経組織の組織学的検索および細胞周期解析を行ったところ、p53 ノックアウトマウスではアポトーシス細胞の増加のみならず、細胞周期の変動も認められなかった。従って、胎仔中枢神経組織では ENU によるアポトーシスの誘導のみならず、細胞周期の S 期での停滞あるいは停止についても p53 依存性に誘発されていることが確認された。また、p53 の転写標的遺伝子として知られており、その下流でアポトーシスの誘導に作用すると言われていた Fas/CD95 が欠損している *lpr/lpr* マウスを用いて

同様の検索を行ってみたが、*lpr/lpr* マウスではそのワイルドタイプである C57BL/6J マウスと比べてアポトーシスの発現および細胞周期の変化ともに同様の傾向を示し、2 系統間には特に差は認められなかった。従って、ENU 誘発胎仔神経上皮細胞のアポトーシスおよび細胞周期停止に Fas/CD95 が関与している可能性は非常に低いものと考えられた。

本研究により、ENU は S 期の神経上皮細胞に作用して、その DNA 複製を著しく抑制または停止させ(S 期における細胞周期の停滞あるいは停止)、その後これら細胞が G2 期を迎える前にアポトーシスを誘導していることが示唆された。さらに、アポトーシスのみならず DNA 複製の抑制あるいは停止の誘導にも p53 が必須であることが示された。

胎仔の神経上皮細胞のアポトーシスの発現過程におけるシグナル伝達経路等に関する研究は世界的に見ても非常に稀で、まだ明らかにされていない点が多々ある。神経上皮細胞は自己複製能および多分化能を有する神経系の幹細胞で、そのアポトーシスおよび細胞周期の制御機構を理解することは発生生物学上および再生医学上非常に重要で、今後のより詳細な検索が切に望まれる。