

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

かたやま けいいち

申請者氏名 片山 圭一

胎仔の中枢神経組織には神経上皮細胞と呼ばれる神経幹細胞が存在している。この神経上皮細胞は様々な外的刺激に対して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種々の程度の脳奇形が誘発される。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がを目的として、アルキル化剤の ethylnitrosourea (ENU) を妊娠動物に投与して胎仔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、それらに關係する各種因子の発現の動態について検索を行った。

まず、ENU 投与後の胎仔中枢神経組織の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 bromodeoxyuridine (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 陽性細胞は 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。

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 を用いて行った。ENU 投与直後より S 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 投与後に BrdU 陽性細胞が減少したが、flow cytometry による細胞周期解析では逆に細胞周期の 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。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 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 期への移行が亢進したためというよりはむしろ DNA 複製の抑制または停止により誘発されていることが示唆された。

さらに、ENU 投与後 3 時間目に BrdU を投与し、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陥ることを

示す結果が得られた。この結果を神経上皮細胞に特徴的な核の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おこすと考えられた。

また、本実験系における p53 の役割を調べるため、p53 およびその転写標的遺伝子の発現に関する検索を行った。p53 の免疫組織化学では ENU 投与後 1 時間目より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、多くの p53 の転写標的遺伝子の発現が投与後 6 時間目をピークとして観察された。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。実際に p53 ノックアウトマウス (KO) 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、KO ではアポトーシス細胞の増加も細胞周期の変動も認められなかった。

本研究により、ENU は S 期の胎仔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することが示唆された。そしてこの過程には p53 の発現が必須であることが示された。本研究の成果は ENU の胎仔神経毒性発現機構を明らかにし、毒性病理学的に極めて重要である。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位を授与するに値するものと認めた。