

# 論文の内容の要旨

獣医学専攻  
平成 13 年度博士課程入学  
禹 桂 炯  
指導教官 土 井 邦 雄

## Studies on the Mechanisms of Hydroxyurea(HU)-induced Fetotoxicity in Mice

(ヒドロキシウレア誘発マウス胎児毒性の発現機構に関する研究)

ヒドロキシウレア(HU)は悪性腫瘍(さまざまな固形癌、原発性脳腫瘍、頭頸部癌、腎細胞癌、乳癌、慢性骨髄増殖性疾患、急性骨髄性白血病)に対する抗癌剤、鎌状赤血球貧血治療薬および HIV ウイルス複製阻害薬として用いられてきた。HU はリボヌクレオチド還元酵素阻害剤であり、主に増殖している S 期細胞で DNA 合成を抑制するが、RNA と蛋白の合成には影響を与えない。HU による副作用としては、過度の色素沈着、落屑、紅斑、顔や手の落屑、部分脱毛、発熱、新生児呼吸不全などが知られている。一方、HU は哺乳動物に強い催奇形性を有し、増殖中の胎仔細胞に影響を及ぼし、DNA 合成を阻害する。HU の催奇形性はこの数十年間に実験動物でよく知られるようになり、HU を妊娠実験動物に投与すると、胎児の中樞神経系(CNS)や頭蓋顔面組織、肢芽などに異常を引き起こし、新生仔の脳、四肢、頭骨などに奇形を生じる。本研究は、HU による胎仔毒性の発現機構の解明を通じ、胎仔毒性と催奇形性の関連を明らかにすることを目的に行なった。本論文は下記の 4 章からなる。

### 第 1 章 HU によるマウス胎仔組織におけるアポトーシスの発現

妊娠 13 日目に 400 mg/kg の HU を妊娠マウスに投与し、胎仔を投与の 1 時間後から 48 時間後まで経時的に調べた。投与の 6 時間後と 12 時間後に、CNS と肺で核濃縮を呈する細胞の中等度から重度の増数が認められた。核濃縮を呈する細胞の軽度の増数は頭蓋顔面組織や肢芽などにおいても観察された。このような核濃縮を呈する細胞の核は核の断片化(アポトーシス)の検出に広く用いら

れている TUNEL 法により陽性の染色性を示し、また、同細胞はアポトーシス細胞に特徴的な電子顕微鏡的所見を示した。本実験の結果から、HU による胎仔毒性は胎仔組織における過剰なアポトーシスによる細胞死を特徴とすることが示され、さらに、胎仔の CNS、肺、頭蓋顔面組織、および肢芽におけるこのような過剰な細胞死が、これまでにこれらの組織で報告されている新生仔の形態学的な異常の発生と関連していることが示唆された。

## 第 2 章 出生前 HU 投与の出生仔マウスへの影響

妊娠 13 日目に 400 mg/kg あるいは 800 mg/kg の HU を投与した妊娠マウスから得た仔マウスを生後 0 日目と 10 週目に調べた。HU を投与された母マウスから産まれた仔マウスはコントロールと比較して成長が遅延したが、400 mg/kg 群と 800 mg/kg 群との間では体重増加に有意差は認められなかった。形態学的な変化として、仔マウスで小脳症、水頭症および尾椎の湾曲が観察された。これらの出現頻度については両投与量群間で差はなかったが、その程度は 400 mg/kg 群よりも 800 mg/kg 群で重度であった。第 1 および第 2 章の結果から、HU 暴露時の組織形成の時期の違いによると考えられる組織間の差はあるものの、胎仔組織におけるアポトーシスによる過剰な細胞死が仔マウスの対応する組織に形態学的異常を引き起こすことが示された。

## 第 3 章 HU によるマウス胎仔中枢神経細胞におけるアポトーシスの発現機構

第 1 および第 2 章の結果から、胎仔の CNS における高度のアポトーシスが出生仔の脳の奇形（小脳症、水頭症）の発現と相関していることが示された。そこで、本章では、妊娠 13 日の妊娠マウスに HU を投与し、胎仔の終脳におけるアポトーシスの発現機構を検索した。TUNEL 陽性神経上皮細胞は HU 投与後 3 時間で増加し始め、12 時間でピークに達し、24 時間で急速に減少した。また、1 時間から 6 時間にかけて、免疫組織化学的に p53 陽性神経上皮細胞が検出され、p53 タンパクの発現は同じ時期に Western blot 解析でも認められた。同時に、p53 の標的遺伝子でアポトーシス関連 (*fas*, *fasL*, および *bax*) および細胞周期関連遺伝子 (*mdm2* および *p21*) の mRNAs の有意な発現の上昇が終脳で検出された。これらの標的遺伝子の発現の程度と推移は、*fas*, *fasL*, *mdm2* および *p21* のタンパク発現のそれと同様であった。フローサイトメーターによる解析結果および細胞周期停止に関係するタンパクの発現動態から、神経上皮細胞は 3 から 6 時間後にかけて S 期で、また、12 時間後に G2/M 期で、それぞれ細胞周期停止を起こしたことが示唆された。上述した結果から、胎仔脳における HU による神経上皮細胞のアポトーシスは p53 によって誘導されることが示された。

#### 第4章 HUによるマウス胎仔肺におけるアポトーシスの発現機構

ヒトでは HU に暴露された母体由来の新生児で呼吸不全や肺炎などの肺の異常が報告されている。一方、第2章の結果からは肺重量の低下以外に明らかな肺の形態学的異常は認められなかったものの、第1章で胎仔肺で CNS につぐ高度のアポトーシスが認められたことから、本章では、妊娠13日目の妊娠マウスに HU を投与し、胎仔の肺でのアポトーシスの発現機構について検索した。胎仔の肺における TUNEL 陽性細胞、すなわちアポトーシス細胞の数は投与の3時間後に増加を始め、6時間後にピークに達し、その後減少した。活性化カスパーゼ3陽性細胞数の変化も TUNEL 陽性細胞のそれと一致していた。TUNEL や活性化カスパーゼ3に対する陽性反応は、主として肺の間葉系細胞で観察された。アポトーシスの誘導に先立ち、胎仔の肺における p53 陽性細胞の数は HU 投与後1時間と3時間で著しく増加し、その後急速に減少した。さらに、リン酸化 p53 タンパクの発現が Western blot 解析により同じ時期に認められた。p53 の転写標的遺伝子の中で、*p21*, *bax*, および *cyclin G* の mRNAs の発現レベルはコントロールに比べて有意に上昇しており、また、*fas* mRNA の発現レベルもコントロールと比較して高い傾向を示した。また、フローサイトメーターによる解析結果から、HU 投与3時間後に S 期で細胞周期停止が起こった可能性が示唆された。こうした結果から、マウス胎仔の肺における HU によるアポトーシスも p53 の誘導と密接に関連していることが示唆された。

上記の結果より、HU によるマウス胎仔組織の毒性発現には、アポトーシス誘導と細胞周期の停止が重要な役割を果たしており、これらの変化は p53 によって媒介されていることが示唆された。また、こうした胎仔組織におけるアポトーシスによる過剰な細胞死は出生仔の対応組織における形態異常の発生と密接に関係しているものと考えられた。