

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 上野 将紀

胎児中枢神経系は広範囲の環境因子に対して感受性が高く、母体に暴露された環境化学物質が脳発生に重大な影響を及ぼす危険性を秘めている。脳は他臓器に比べ長い器官形成期を有し、増殖・移動・分化といった複雑な過程を経ることから、外的因子の影響を受けやすいと考えられている。しかしながら、胎児中枢神経毒性の発現機構に関する詳細な研究は未だごく少ないのが現状である。

5-Azacytidine (5AzC) は、DNA 脱メチル化・DNA 傷害を引き起こす化学物質であり、妊娠ラットやマウスに投与すると胎仔脳に毒性を示し、新生仔に脳奇形を生じることが知られている。本研究では 5AzC による胎仔脳での毒性発現機構および傷害後の修復機構を明らかにする目的で、下記の解析を行った。

### 1 . 胎仔脳における 5AzC による毒性発現：細胞死と細胞周期停止

妊娠 13 日目のラットに 5AzC (10mg/kg) を腹腔内投与し、1~24 時間後にかけて胎仔を採取し、脳における変化を経時的に検索した。投与後 12 時間目をピークに ventricular zone (VZ) 内にアポトーシス細胞が出現した。6 時間目には、脳室に沿って異常な形態を有する分裂細胞の集簇が観察された。また BrdU 標識により 12 時間目に S 期の顕著な減少が観察された。これらの変化は中枢神経系の多くの部位で同様だった。Flow cytometry を用い細胞周期変動を検索したところ、6~9 時間目に G2/M 期細胞の増数が観察された。これらの結果から、6 時間目に M 期、9 時間目に G2 期停止が引き起こされると考えられた。VZ では神経系前駆細胞の核が細胞周期に依存して上下に移動することから、BrdU 標識細胞の細胞周期内での推移および核移動の推移を経時的に観察したところ、6~9 時間目に G2/M 期での停滞に伴い VZ での内側への核移動が阻害された。また、一部の細胞は脳室側から外側へと核移動しアポトーシスに至った。これら細胞は、主に G0/G1 期で細胞死に至ることが確認された。

### 2 . 胎仔脳における 5AzC による毒性発現の分子機構

アポトーシスおよび細胞周期停止の分子機構を探るため DNA microarray 解析を行った。DNA 傷害時にアポトーシスや細胞周期停止に中心的な役割を担う p53 の転写標的因子や G2/M 期制御因子の発現変動が観察された。p53 およびその転写標的因子の経時的な発現変

化を検索したところ、p53 陽性細胞の増数および転写標的因子mRNAの発現上昇が確認された。そこで、妊娠 12 日目のp53 ノックアウトマウスに 5AzCを投与し解析した。p53<sup>-/-</sup>胎仔脳でのみアポトーシスは起こらず、G2/M期細胞はいずれの遺伝子型でも増加した。従って、5AzCのDNA傷害作用により、p53 を介したアポトーシスおよびp53 非依存性のG2/M期停止が起こることが示された。そこで、G2/M期制御因子に着目したところ、不活性型Cdc2 の減少およびcyclin B1 の増加が観察された。このことは、G2 期からの過剰な流入により異常なM期細胞が増加したことを示唆している。また、一部の細胞死は、分裂異常により引き起こされるMitotic catastropheに分類される可能性が示唆された。

### 3 . 5AzC による胎仔脳傷害後の修復機構

胎仔脳傷害後に起こると考えられる修復過程に着目するため、5AzC 暴露後 24 ~ 60 時間目にかけて解析を行った。アポトーシス細胞は 60 時間目には消失し、増殖動態もほぼ対照群と同様の状態に回復した。従って、この時期には組織修復が完了し発生が継続していくと考えられた。しかし、投与群では終脳壁のひ薄化が観察され、こうした変化が出生後に見られる小脳症などの中枢神経障害に結びつくと考えられた。修復期にはアポトーシス細胞を貪食するミクログリアの浸潤・増数が観察され、胎仔脳組織の修復にはミクログリアが主に働くことが示された。また、DNA microarray 解析により、炎症誘導因子の発現増加、細胞外基質、解糖系酵素、神経発生関連因子の発現変動が観察された。このことから、胎仔脳組織は他の組織と同様に組織傷害に対する応答性を有しており、炎症誘導、組織のリモデリング、傷害組織に対する適応、といった反応を示し得ることが示唆された。

本研究により神経系前駆細胞を中心とした胎仔脳組織は、DNA 傷害など外因性の刺激に対し、多様な細胞周期制御やアポトーシスによる異常細胞の排除を行い、脳発生の恒常性の維持に努め、組織傷害に対して一定の修復作用を有することが明確に示された。本研究の結果は、胎児中枢神経毒性の発現機構の解明に極めて有用な情報を提供すると考えられる。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。