

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 16 年度博士課程入学
氏名 山内啓史
指導教員名 中山裕之

論文題目

Mechanisms of DNA damage-induced toxicity in the developing rodent placenta

(げっ歯類を用いた DNA 傷害による胎盤毒性の発現機序に関する研究)

【序論】

胎盤は、胎児を子宮内で物理的に支えるのみならず、母体と胎児の間に位置して栄養交換を行い、胎児組織を母体の免疫反応から保護し、さらには妊娠維持に不可欠なホルモンも産生している。正常な胎児発育に必須の存在である胎盤の障害・機能不全は、胎児発育と妊娠に重篤な悪影響を及ぼすと考えられる。これまでに種々の物理的・化学的刺激が胎児発育を阻害することが見出され、胎児への影響とその機序が詳細に研究されてきた。最近の実験動物を用いた研究により、胎児毒性物質が胎児組織のみならず、胎盤においても細胞・組織レベルで様々な異常を引き起こすことがわかってきた。また、ヒト症例の研究から、胎盤の細胞・組織における異常が種々の妊娠障害・胎児発育異常と密接に関連していることを示唆する知見も増えてきている。

DNA 傷害は、発生毒性の機序因子として最も重要なものの一つである。実際、高線量放射線への暴露や抗がん剤投与は、明らかに胎児発育を阻害する。一方、生体の全ての細胞は常に一定レベルの DNA 傷害に曝されている。すなわち、自然界には微量ながら放射線が存在し、また細胞の正常な代謝や増殖過程でも活性酸素が生成され、DNA 複製においても確率的にエラーが生じる。こういった低レベルの DNA 傷害の影響は通常ではごくわずかであるが、ヒトの妊娠において胎盤や胎児の発育障害の要因となっている可能性が考えられる。活発に細胞増殖が行われている胎盤は DNA 傷害に対して感受性が高いと考えられているにもかかわらず、胎盤における DNA 傷害機序に関する研究はこれまでほとんど行われていない。

このような背景から、本研究では胎盤における DNA 傷害の影響とその機序を明らかにすることを目的として、【Chapter 1】では DNA 二本鎖切断作用を持つ化合物 etoposide と放射線の一種 γ 線の、【Chapter 2】では DNA 複製阻害作用を持つ化合物 cytosine

arabinoside (Ara-C) の胎盤への影響をそれぞれ調べた。【Chapter 3】では Ara-C による胎盤アポトーシスの機序解明を目的として各種の検討を行った。Ara-C、etoposide、および γ 線は、胎児組織にアポトーシスを誘導し、胎児発育を阻害することが知られている。

【Chapter 1】

etoposide は、DNA topoisomerase II の阻害剤であり、DNA と DNA topoisomerase II の結合を安定化する作用を持つ。また、 γ 線は、水分子を分解してヒドロキシラジカルを生成する作用を持つ。両者とも、結果として DNA に二本鎖切断を生じる。本実験では、妊娠 12 日目のマウスに、etoposide 10 mg/kg を腹腔内投与、または γ 線 5 Gy を全身照射し、それぞれ 8 および 24 時間後、6 および 24 時間後に胎盤を採材した。

その結果、etoposide、または γ 線処置により、処置 6~24 時間後に胎盤迷路部栄養膜細胞においてアポトーシスマーカーである TUNEL 染色に陽性を示す細胞数が増加した。また、いずれの処置によっても、6 または 8 時間後に p53 タンパク質の発現上昇およびリン酸化の亢進が Western blotting (WB) および免疫染色によって確認された。さらに、p53 欠損マウスの胎盤では、etoposide 投与によるアポトーシス誘導が顕著に抑制されていた。これらの結果から、p53 が DNA 二本鎖切断による胎盤アポトーシスに関与していることが示された。

リン酸化 Histone H3 免疫染色陽性の分裂像数をカウントすることで胎盤栄養膜細胞の増殖活性を評価したところ、etoposide 投与 8 時間後および γ 線照射 6 時間後に、分裂像数の減少が認められた。そこで、細胞周期の変動を調べるために Cyclin A, B, D, E のタンパク質発現量を WB で調べたところ、etoposide 投与および γ 線照射の後に Cyclin B1 の発現上昇が認められた。Cyclin B1 は、細胞分裂を開始させる働きがあり、M 期中期にその働きを終えるとすみやかに分解される。栄養膜細胞の分裂像数が減少しているにもかかわらず Cyclin B1 の発現が上昇したことにより、細胞周期が G2/M 期境界で停止していることが考えられた。

Cyclin B1 は Cdk1 と複合体を形成し細胞分裂を実行するが、DNA 傷害時には Cdk1 がリン酸化されて複合体の機能が抑制され、細胞分裂前に細胞周期が停止すると考えられている。WB で Cdk1 のリン酸化状態を調べたところ、etoposide 投与 8 時間後、 γ 線照射 6 時間後ともにリン酸化が上昇しており、DNA 二本鎖切断に反応して細胞周期停止が誘導されていることが示された。

【Chapter 2】

Ara-C は、シチジンアナログであり DNA 複製を阻害することから、抗がん剤として白血病などの治療に広く用いられている。

妊娠 13 日齢のラットに Ara-C 250 mg/kg を単回腹腔内投与して、投与 1~48 時間後に胎盤を採材した。その結果、胎盤迷路部の栄養膜細胞において、投与 6 時間後をピークとして TUNEL 染色に陽性を示す細胞数の著しい増加が確認された。アポトーシスの誘導は、caspase 3 (アポトーシス実行因子) 免疫染色、電子顕微鏡観察などによっても確認された。また、胎盤迷路部の細胞増殖活性について検索したところ、分裂細胞数、topoisomerase II α 免疫染色陽性細胞 (増殖細胞) 数、bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込み細胞 (DNA 合成細胞) 数とも、Ara-C 投与直後から著しく減少することがわかり、細胞周期停止が誘導されていることが示唆された。

【Chapter 3】

続いて、DNA 傷害に際して細胞周期停止やアポトーシスを誘導を媒介する癌抑制遺伝子 *p53* を中心に、Ara-C による胎盤細胞のアポトーシスと増殖障害の誘導因子・経路を検討した。WB および免疫染色の結果から、Ara-C 投与 1~24 時間後に *p53* タンパク質およびリン酸化 *p53* タンパク質の発現上昇が示された。*p53* は、リン酸化されることで安定なタンパク質となり細胞内に蓄積、同時に転写因子としての機能が活性化すると考えられている。そこで、*p53* 転写標的遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR または半定量 RT-PCR で解析したところ、*p21*, *cyclin g1*, *fas*, *bax*, *noxa* および *puma* の発現上昇が認められた。これらの遺伝子は、アポトーシスや細胞周期停止を誘導することが知られており、Ara-C 暴露後の胎盤で *p53* の転写機能が活性化、下流の標的遺伝子の発現を上昇させることで上述の細胞反応を実行することが示唆された。また、DNA 傷害に際してリン酸化を受ける事が知られているタンパク質、Chk1 および Histone H2AX のリン酸化も認められた。*p53*、Chk1 および Histone H2AX は、DNA 傷害を検知するキナーゼ ATR/ATM によってリン酸化されると考えられており、Ara-C によって ATR/ATM を始点とする反応経路が活性化されている事が示唆された。さらに *p53* の役割を明確にするために、妊娠 12 日齢の *p53* ノックアウトマウスに Ara-C 100mg/kg を単回腹腔内投与し、6 時間後に胎盤を検索する実験を行った。この結果、*p53* 欠損マウスの胎盤で Ara-C 投与によるアポトーシス誘導が顕著に抑制されることが示され、*p53* がこの反応に必須であることが明らかになった。さらに、Ara-C 投与後に胎盤で cleaved caspase-9 の上昇、および cytochrome C のミ

トコンドリアからの放出というミトコンドリア経路の関与を示唆する結果が得られた。一方、デスレセプターのひとつである Fas を欠損した変異マウスを用いた実験では、Ara-C 投与により変異マウスにも野生型マウスと同様に胎盤にアポトーシスが誘導された。したがって、Fas/Fas リガンドはこの反応に必須の因子ではないと考えられた。

これらの結果から、Ara-C に暴露された胎盤において、p53 のリン酸化による活性化、活性化した p53 によるアポトーシス誘導遺伝子の発現上昇、ミトコンドリア経路によるアポトーシス誘導という一連の DNA 傷害後の反応経路の動員が示された。加えて、細胞周期停止誘導因子として重要視されている Chk1 の Ara-C による増殖抑制への関与も示唆された。

【結論】

本研究では、胎盤が DNA 傷害性の刺激に対して感受性の高い組織であり、迷路部でアポトーシスや細胞増殖抑制が誘導される事を示した。迷路部は、栄養膜細胞を介した胎児母体血液間の物質交換という胎盤の最も重要な機能を担っており、ヒト胎盤の絨毛に相当する部位である。また、様々な妊娠関連疾患において、絨毛栄養膜細胞のアポトーシスが増加することが報告されている。本研究の結果は、胎盤に対する DNA 傷害がアポトーシス誘導を介してその機能を阻害し、妊娠関連疾患の発症に関与している可能性を示唆するものである。

また、本研究では、DNA 傷害によって細胞周期停止が誘導されることも示された。妊娠中期の胎盤は成長する胎児の要求を満たすために急速に発育しており、栄養膜細胞の増殖抑制は胎盤機能に重大な影響を及ぼすものと考えられた。

さらに、胎盤に置いて DNA 傷害によるアポトーシス誘導には p53 が必須であり、p53 が細胞周期停止にも関与している可能性が本研究によって示された。いくつかの妊娠関連疾患において、胎盤で p53 のタンパク質発現量が上昇している事が報告されており、本研究の結果と合わせて、p53 は胎盤の病態発生に関与する重要な因子のひとつである事が示唆された。