

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

やまうち ひろふみ

申請者氏名 山内 啓史

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。また、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。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。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、etoposide、 $\gamma$ 線、cytosine arabinoside (Ara-C) の胎盤への影響をそれぞれ調べた。

【Chapter 1】

etoposide、 $\gamma$ 線の両者とも 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 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 免疫染色により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 $\gamma$ 線照射 6 時間後に、分裂像数の減少が認められた。

## 【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。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 $\alpha$ 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、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。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。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。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。

本研究により胎盤組織における DNA 傷害のメカニズムの一端が明らかになった。この結果は、胎児胎盤での毒性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。