

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 南春子

指導教員名 中山裕之

論文題目 Studies on the mechanisms of etoposide (VP-16)-induced neurotoxicity in the fetal mouse

(マウス胎仔における Etoposide(VP-16)神経毒性発現の機構に関する研究)

Etoposide (VP-16) は American may apple の根から抽出され、常備薬として広く用いられてきた podophyllotoxin の半合成化合物で、DNA トポイソメラーゼ 2 を抑制し、DNA を損傷する。このため抗癌剤として肺癌、睾丸癌、リンパ腫などの治療に使用されてきた。一方、実験動物では妊娠初期の母体に VP-16 を投与すると小脳症、脳水腫、骨格形成異常などの胎仔奇形を誘発することが報告されている。本研究では VP-16 を妊娠 12 日齢 (GD12) のマウスに投与し、胎仔の終脳について、細胞分裂周期およびアポトーシスに関する検索を行なった。

第1章 VP-16 投与が胎仔期と出生後の脳に及ぼす影響

VP-16 投与 ICR マウス胎仔の脳における組織学的変化をしらべた。GD12 妊娠マウスに VP-16 を腹腔内投与したところ、投与 2~4 時間後 (2~4HAT) に胎仔終脳脳室帯の神経上皮細胞で有糸分裂像の減少が認められた。また 4HAT から神経上皮細胞の核濃縮像が出現し始め、GD12 にピークに達した後、GD48 にほぼ消失した。核濃縮細胞は TUNEL 陽性、活性化 Caspase-3 陽性であり、電子顕微鏡で核クロマチンの凝集、周囲細胞によるアポトーシス小体の貪食像などが確認され、アポトーシス細胞であることが確認された。さらに GD12 に増殖性細胞核抗原 (PCNA) 陽性細胞数が顕著に減少した。これらのことから、VP-16 は分裂期以前の神経上皮細胞を損傷し、アポトーシスおよび細胞分裂抑制を引き起こすことが示された。また、VP-16 投与により、出生後の新生仔には大脳皮質の低形成が高率に観察された。投与直後の胎仔神経上皮細胞アポトーシスの増加が、このような発育異常の重要な原因であると考えられた。

第2章 VP-16 投与胎仔脳における *p53* とその標的遺伝子の発現上昇

VP-16 の細胞毒性が DNA 損傷作用によることに着目し、アポトーシス誘導や細胞周期停止を媒介する *p53* およびその転写標的因子である *p21*, *bax*, *cyclin G*, *fas* およびの *puma* 発現について解析した。GD12 の妊娠マウスに VP-16 を投与し、胎仔の終脳について TUNEL 法および免疫染色を行ったところ、神経上皮細胞のアポトーシスが 12HAT をピークとしてみとめられた。これに対し、*p53* 陽性細胞数および *p21* 陽性細胞数は 4HAT にピークとなり、二者は同一の部位で観察された。また RT-PCR による検索では 4~8HAT に *p21*、2~12HAT に *fas*、1~48HAT に *puma* の発現が顕著に上昇した。*p21* および *fas* の発現ピークは 4HAT であった。以上のことから、胎仔中枢神経では、VP-16 によるアポトーシス誘導に先立って、*p53* タンパクが安定化、発現上昇し、その標的因子の発現上昇することが明らかになった。すなわち VP-16 による細胞傷害では *p53* がその毒性発現を媒介していることが示された。

次に、VP-16 投与による胎仔終脳の遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイとリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。DNA マイクロアレイの結果、VP-16 投与により胎仔の終脳で 4 HAT に DNA 損傷・修復・増殖関連 13 遺伝子と細胞周期調節・アポトーシス関連 9 遺伝子の発現が増加した。リアルタイム RT-PCR による検索では、4~12HAT に *topoisomerase 2 alphah*, *puma*, *bax* および *cyclin G1* の発現が顕著に上昇した。また 4、12HAT には *noxa* の mRNA 発現も顕著に上昇した。これらの遺伝子発現のピークは 4HAT であった。以上の結果から、VP-16 投与により *topoisomerase 2 alphah*, *puma* の発現が増加、続いて *p53* および *puma-alpha* のタンパク質量の増加、さらにミトコンドリアに存在するアポトーシス促進因子が活性化され、アポトーシスが生じた可能性が示された。

第3章 VP-16 投与胎仔脳における細胞分裂周期の変化とそのメカニズム

VP-16 投与後の胎仔神経上皮細胞の細胞分裂周期およびアポトーシス細胞の変動に関して Flow Cytometry を用いて検索した。VP-16 投与後 4~8HAT まで S 期および G2/M 期の細胞が有意に増加し、4~24HAT にアポトーシス細胞が顕著に増加した。次に VP-16 と BrdU を同時に投与して Flow Cytometry および免疫組織学的検査を行なった。その結果、VP-16 投与 4~24HAT における BrdU 陽性細胞の多くはアポトーシス細胞と一致した。また BrdU 陽性神経上皮細胞の終脳での移動は対照群より顕著に遅延していた。以上のことから、VP-16 は主に S 期細胞を損傷し G2 期から M 期の移行を抑制、その後一部の細胞にアポトーシスを誘導するものと考えられた。

次いで、ウェスタンブロッティング解析を行なった。VP-16 投与 2~8HAT の神経上皮細胞で、ATM キナーゼのセリン 1981 がリン酸化され、自己リン酸化を介して ATM キナーゼ経路が活性化された。これに伴い 4~12HAT にヒストン H2AX のセリン 139 がリン酸化された。2~8HAT には c-Abl の Tyr245 がリン酸化され、8HAT には DNA-PK が解裂したが、これは Caspase-3 の活性化によるものと考えられた。Chk 1 のリン酸化はみとめられなかった。2~24HAT に p53 およびリン酸化 p53 (セリン 15) が増加し、8HAT にはピークに達した。また、8HAT にリン酸化 p53 (セリン 20) の増加もみられた。p53 の増加に伴い、p21 も 2~24HAT に増加し、8HAT にピークに達した。サイクリン G1 は 8HAT に少々増加した。Cdc25A は 4~12HAT に少々減少した。リン酸化 Rb (セリン 608) は 2HAT に減少し、4~8HAT に増加したが、12HAT には再び減少した。サイクリン A は 4~8HAT に増加し、12HAT に減少した。サイクリン B1 は 2~12HAT に増加し、4~8HAT にピークに達した。2~8HAT にリン酸化 cdc2 (Tyr 15) は少々増加した。以上のことから p53 のリン酸化が p21、さらに cyclin A/cdc2 複合体および cyclin B/cdc2 複合体を不活性化し、G2/M 期停止を引き起こさせたものと考えられる。また、リン酸化 Chk1/2 により cyclin A および Cdc25A がリン酸化・分解され、Cdk2 の減少を抑制し、S 期遅延を惹起したと考えられた。さらに Cdk2/cyclin A 複合体もリン酸化され G1 期から S 期への移行が亢進することが推測された。

第4章 VP-16 投与 p53 欠損マウス胎仔脳における細胞分裂周期の解析

C57BL/6 をバックグラウンドとする p53 欠損マウスを用いて VP-16 投与の影響をしらべた。GD12 の妊娠 p53 欠損マウスに VP-16 を投与すると、胎仔の神経上皮細胞では、4HAT で G2/M 期停止がみとめられず、アポトーシスも引き起こされなかった。また p53 欠損マウス胎仔では 4HAT で S 期細胞が顕著に増加することも示された。これらの結果から、VP-16 による神経上皮細胞の G2/M 期停止およびアポトーシスに p53 が必要不可欠であることが示唆された。

本研究の成果から VP-16 で誘発される胎仔の終脳神経上皮細胞アポトーシスは G2/M 期停止が誘因となること、G2/M 期停止には ATM-p53-p21 経路が主な役割を果たしていることが示唆された。これに加えて VP-16 は S 期細胞増加によるアポトーシスも誘発し、この場合は ATM-CHK1/2-Cdc25A 経路が関与すると考えられた。