

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

なむ ちゅんじゃ
申請者氏名 南 春子

Etoposide (VP-16) は American may apple の根から抽出された 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広く使用されているが、実験動物で催奇形性が報告されている。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。

VP-16 投与 ICR マウス胎仔の脳における組織学的変化を調べた。VP-16 の投与 2~4 時間後 (2~4HAT) に神経上皮細胞の分裂像が減少した。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認められ、VP-16 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低形成の重要な原因であると考えられた。

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の発現について解析した。RT-PCR とリアルタイム RT-PCR による検索では、4~12HAT に *p53* の転写標的因子 *p21*, *fas*, *puma*, *noxa*, *bax* および *cyclin G1* の発現の上昇が認められた。このことから 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。

VP-16 投与後の胎仔神経上皮細胞の細胞分裂周期の変動について検索した。そ

の結果 VP-16 投与 4~8HAT に 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 を同時に投与したところ、BrdU 陽性細胞の多くはアポトーシス細胞と一致し、BrdU 陽性神経上皮細胞の移動が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/M 期停止を引き起こし、その後、細胞がアポトーシスに至ると考えられた。ウエスタンブロッティング解析では、VP-16 投与により ATM の自己リン酸化、c-Abl (Tyr245) リン酸化タンパクの減少がみられた。p53 リン酸化による p53 タンパクの増加し、それに伴い p21 も増加した。Cdc25A は少々減少した。サイクリン A とサイクリン B1 は著しく増加した。不活性化型であるリン酸化 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 B/cdc2 複合体を不活性化し、G2/M 期停止を惹起されると考えられた。また、Cdc25A の減少が Cdk2 の活性化を抑制して S 期遅延を惹起し、さらに cyclin A 増加して G1 期から S 期への移行が亢進することが推測された。

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 投与の影響を調べた。妊娠 p53 欠損マウスに GD12 に VP-16 を投与したところ、4 HAT で胎仔神経上皮細胞の G2/M 期停止とアポトーシスは起こらなかったが、S 期細胞増加が起こった。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。

本研究により VP-16 の胎仔脳毒性のメカニズムの一端が明らかになった。この結果は、胎仔における化合物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。