

## 論文の内容の要旨

論文題目 Mechanisms of 6-Mercaptopurine (6-MP)-induced fetal neurotoxicity in the developing rodent brain  
げっ歯類の脳における 6-Mercaptopurine (6-MP)  
誘発胎子神経毒性の発現機序

氏名 金光弘幸

6-Mercaptopurine (6-MP)は、thioguanine 誘導体で、azathioprine の活性型代謝物である。azathioprine は、肝臓および消化管内の様々な酵素によって 6-MP に変換される。現在、医療現場で、6-MP は急性白血病の治療薬および潰瘍性大腸炎・クローン病などの炎症性腸疾患や臓器移植の際の免疫抑制剤として幅広く利用されている。

6-MP には DNA 傷害作用があり、それによる細胞死が報告されている。6-MP は細胞内で、thioinosine monophosphate (TIMP) になり、purine 合成経路で働く酵素に対して阻害作用を示す。さらに、TIMP は thioguanosine monophosphate (TGMP)になった後に、高リン酸化されて核酸内に入り、細胞毒性を引き起こす。これらの過程は進行速度が遅いことから、遅延性細胞毒性と呼ばれている。

近年、晩婚化に伴う高齢妊娠が増加し、炎症性腸疾患や癌に罹患した妊婦が多数報告されている。これらの場合にも、しばしば 6-MP が処方されるが、この薬剤による胎児神経毒性が知られている。また、6-MP を妊娠ラットに投与すると、胎子に小頭症が誘発されることが報告されている。さらに、5-azacytidine、ethylnitrosourea、etoposide、hydroxyurea、1-β-D-arabinofuranosylcytosine、T-2 toxin、5-fluorouracil など 6-MP 以外の DNA 傷害性物質を妊娠ラットおよびマウスに投与した際にも、胎子に神経毒性が惹起されることが知られている。また、妊娠 12 日のマウスに 5-azacytidine を単回腹腔内投与すると、神経前駆細胞に p53 を

介したアポトーシスと G2/M 期での細胞周期停止が起こることが報告されている。同様の実験系を用いて ethylnitrosourea、etoposide または hydroxyurea を投与したマウス胎子の神経前駆細胞でも、同様に p53 を介したアポトーシスおよび G2/M 期の停止、加えて S 期細胞の蓄積が確認されている。しかしながら、6-MP を投与した胎子神経前駆細胞の細胞死および細胞周期についての研究はこれまで行われていない。本研究では、6-MP 投与によって生じるラットおよびマウスの胎子神経毒性のメカニズムを明らかにすることを目的として以下の実験を行った。

## 1. 6-MP による神経前駆細胞アポトーシスの経時的変化

妊娠 13 日のラットに 6-MP 50 mg/kg を単回腹腔内投与し、投与後 12~96 時間に胎子終脳を採材、病理組織学的検索を行った。その結果、終脳、間脳、中脳、後脳そして脊髄で投与後 24~72 時間にアポトーシス細胞数の有意な増加がみられ、特に終脳で顕著であった。さらに、投与後 96 時間には、終脳の著しい低形成がみられた。終脳では、投与後 36 時間をピークに TUNEL 法陽性神経前駆細胞数の増加が確認された。さらに、アポトーシス実行因子である cleaved caspase-3 陽性の神経前駆細胞数の著しい増加と電子顕微鏡観察による核の断片化も確認された。また、この実験系で解剖前 1 時間に BrdU を単回腹腔内投与したところ、6-MP 投与後 36~72 時間に BrdU を取り込んだ神経前駆細胞数の減少を認めた。

以上の結果から、6-MP は、投与後 3~24 時間に神経前駆細胞のアポトーシスを誘導する 5-azacytidine、ethylnitrosourea、etoposide、hydroxyurea、1-β-D-arabinofuranosylcytosine とは異なり、投与 24~72 時間後に神経前駆細胞アポトーシスを惹起することがわかった。これは、6-MP の遅延性の神経細胞毒性を強く示唆している。また、6-MP は神経前駆細胞の細胞周期停止を誘導する可能性も示唆された。

## 2. 6-MP の神経前駆細胞の細胞周期への影響

続いて、6-MP 投与による神経前駆細胞の細胞周期変化について詳細な検索を行った。前章と同様の実験を行って終脳神経前駆細胞を採取し、フローサイトメーターによる解析を行ったところ、6-MP 投与後 24~36 時間に G2/M 期、投与後 36~48 時間に S 期、投与後 36~72 時間に sub-G1 期(アポトーシス細胞)の細胞数の増加を認めた。さらに、投与後 36~72 時間には M 期細胞のマーカーであるリン酸化ヒストン H3 陽性細胞数の減少がみられた。G2/M 期の神経前駆細胞数は、投与後 48 時間に著しく減少したが、それと同時期に sub-G1 期の神経前駆細胞数が顕著に増加した。このことから、G2/M 期で停止した神経前駆

細胞が、優先的にアポトーシス誘導を受けたと考えられた。さらに、胎子終脳を用いた Western blot 解析を行ったところ、6-MP 投与後 36~48 時間に S 期遅延に関与する cdc25A タンパク質の著しい減少が、投与後 24~48 時間には G2/M 期の停止に関連するリン酸化 cdc2 およびサイクリン B1 タンパク質の増加が確認された。

以上の結果から 6-MP は、神経前駆細胞の S 期遅延および G2/M 期での細胞周期停止を誘導し、G2/M 期で停止した細胞にアポトーシスを引き起こすことが示された。

### 3. 6-MP による神経前駆細胞アポトーシスのメカニズム

次に、DNA 傷害時にアポトーシス誘導に関与する癌抑制遺伝子 *p53* を中心に、6-MP による胎子の終脳神経前駆細胞のアポトーシス経路について検討した。妊娠 13 日のラットに 6-MP 50 mg/kg を単回腹腔内投与し、投与後 12~72 時間に胎子終脳を採材、病理組織学的および分子生物学的検索を行った。Reverse transcription-PCR (RT-PCR) 解析では、実験期間を通じて 6-MP による終脳での *p53* mRNA の発現上昇は認められなかったが、Western blot 解析および免疫染色では投与後 24~48 時間に *p53* タンパク質およびリン酸化 *p53* タンパク質の増加が認められた。また、Western blot および免疫染色によって、6-MP 投与後 24~72 時間に、内因系経路における *p53* の転写標的因子である *puma* および *cleaved caspase-9* タンパク質の著しい増加を認めた。これに対し、外因系因子である *fas* タンパク質は、実験期間を通じて発現増加しなかった。

このアポトーシスの内因系経路を明らかにするために、妊娠 12 日の *p53* 遺伝子欠損マウスおよび *fas* 遺伝子変異マウスに 6-MP 50mg/kg を単回腹腔内投与し、投与後 36 時間に胎子終脳を採材、組織学的検索を行った。その結果、*p53* 遺伝子欠損マウスでは終脳神経前駆細胞のアポトーシス誘導が顕著に抑制されたが、*fas* 遺伝子変異マウスの終脳では、アポトーシス細胞数に変化はみられなかった。

以上の結果から、6-MP による終脳神経前駆細胞アポトーシスは、*p53* を介した内因系経路であることが確認された。

以上の結果をまとめると、6-MP に暴露されたげっ歯類の胎子では、終脳神経前駆細胞の S 期遅延および G2/M 期細胞周期停止が起こり、G2/M 期で停止した細胞が優先的にアポトーシス誘導を受けることが示唆された。さらに、そのアポトーシス誘導経路は、主として活性化 *p53* による内因系経路が担っていると考えられた。