

論文審査の結果の要旨

かねみつ ひろゆき

申請者氏名 金光 弘幸

6-mercaptopurine (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。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。しかしながら、6-MPによる胎子神経毒性のメカニズムについての研究はこれまで行われていない。従って、本研究は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3章から構成される実験を行った。

第1章 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。以上の結果から、6-MPは、胎子の終脳神経前駆細胞にアポトーシス誘導を促すことが分かった。

第2章 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、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。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誘導を引き起こすことが示された。

第 3 章 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、病理組織学および分子生物学的検索を行った。Western blot 解析および免疫染色では、投与後 24~72 時間に内因系経路の因子である *p53*、*puma*、*cleaved caspase-9* タンパク質の増加が認められた。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。

以上の一連の結果より、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 *p53* を介した内因系経路が担っていると考えられた。

今回の一連の研究結果より 6-MP によるげっ歯類、特にラットの胎子神経前駆細胞の傷害機構が明らかにされた。本研究結果は、6-MP はじめ類似の化学構造と作用を有する薬剤の副作用の理解に貴重な情報を提供するとともに、発生期の神経組織の傷害や修復機構の研究にも役立つ知見ものと判断される。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。