

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450423

研究課題名(和文) 葉酸代謝拮抗剤methotrexateによる胎盤毒性の発現機構に関する研究

研究課題名(英文) Study on mechanism of placental toxicity of folic acid antagonist, methotrexate

研究代表者

杉山 晶彦 (Akihiko, Sugiyama)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00432609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はラットの妊娠11-12日におけるMethotrexate (MTX)曝露が胎盤基底層の低形成を誘発することを明らかにした。本研究では当該病変の病理発生機序を解明することを目的とし、病理組織学的および分子生物学的解析を実施した。その結果、(1) MTXによって誘発された胎盤基底層の低形成病変において認められた細胞死の発生機序に、extrinsic pathway/intrinsic pathway、蛋白質および不飽和脂肪酸の酸化損傷、JNK pathway活性化が関与していること、(2)胎盤構成細胞のMTXに対する感受性とジヒドロ葉酸還元酵素の発現量とは無関係であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We clarified that Methotrexate (MTX) exposure during gestation day (GD) 11-12 induced hypoplasia of placental basal cell layer in rats. In the present study, the histopathological and molecular biological examinations were performed to clarify the pathogenesis of MTX-induced hypoplasia of placental basal cell layer. The suggestions of the present study were as follows: (1) Apoptosis in hypoplasia of placental basal cell layer was induced by both extrinsic and intrinsic pathways, oxidative damage of protein and unsaturated fatty acid, and activation of JNK(c-Jun N-terminal kinase) pathway, (2) There were no relation between sensibility to MTX of component cells in placenta and expression levels of dihydrofolate reductase.

研究分野：毒性病理学

キーワード：胎盤毒性

### 1. 研究開始当初の背景

葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate (MTX)は、葉酸代謝過程におけるジヒドロ葉酸還元酵素を拮抗阻害することにより DNA 合成阻害ならびに細胞死・細胞周期停止を惹起する。MTX は当該機序を介し、抗腫瘍効果・免疫抑制効果を示すため、腫瘍性疾患および免疫介在性疾患の医療において広く用いられているが、強い胎児毒性を示すため、妊娠患者への投薬は禁忌となっている。MTX が胎児・新生児へ及ぼす有害作用に関しては多数の研究がなされ詳細なデータが存在するが、胎盤に及ぼす影響や胎児への有害作用機序における胎盤毒性の意義は明らかにされていない。

申請者は、低用量 MTX (0.2mg/kg)の妊娠 11-12 日または 13-14 日のラットへの曝露実験を実施し、以下の結果を得た (第 154 回 日本獣医学会にて発表)。

(1) 妊娠 11-12 日における MTX 曝露は、胎児致死率の増加、胎児・胎盤の矮小化を誘発したことに対し、妊娠 13-14 日の曝露では著変は認められなかった。

(2) 妊娠 11-12 日における MTX 曝露は基底層および迷路層に低形成を誘発したが、基底層における病変がより重度であった。一方、妊娠 13-14 日における曝露では両層ともに著変をきたさなかった。妊娠 11-12 日における胎盤基底層の当該病変領域では細胞死の増加や細胞増殖の抑制が認められた。当該結果より、低用量の MTX は 妊娠 13-14 日よりも妊娠 11-12 日においてより強く作用すること、迷路層よりも基底層の構成細胞に対しより強く作用することが示された。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate (MTX)の胎盤毒性の発現機構を解明することにより、MTX の胎児への有害作用機序における胎盤毒性の意義を明確にし、MTX を用いた医療の安全性をより向上させることにある。具体的には アポトーシス、細胞周期停止および酸化ストレスに着眼した MTX の胎盤毒性の発現機構の解明、妊娠 11-12 日の胎盤基底層が MTX に高感受性を示した理由の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)アポトーシスおよび細胞周期停止に着眼した MTX の胎盤毒性発現機構の解明：MTX による胎盤基底層低形成の誘発に、p53 活性化、アポトーシス (Fas が関与する extrinsic pathway/Bax が関与する intrinsic pathway)、細胞周期停止が関与するか否かを分子生物学的手法を用いて解析した。具体的には胎盤基底層構成細胞における Fas および Bax 蛋白の発現率の経時的

変化 (免疫組織化学法および Western blot 法による)、胎盤基底層組織における Fas および Bax mRNA 量の経時的変化 (リアルタイム PCR 法による)、TUNEL 陽性細胞の存在率の経時的変化を検索した。

(2)酸化ストレスに着眼した MTX の胎盤毒性発現機構の解明：MTX の作用機序に活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS)の産生が関与していることが知られている。MTX によって誘発された胎盤基底層構成細胞の細胞死の発生機序に酸化ストレスおよびそれによる JNK (c-Jun N-terminal kinase)経路の活性化が関与するか否かを免疫組織化学的手法、Western blot 法を用いて解析した。

(3)妊娠 11-12 日の胎盤基底層が MTX に高感受性を示した理由の解明：妊娠 11-12 日の胎盤基底層が MTX に高感受性を示した理由の一つとして、当該時期の胎盤基底層における葉酸代謝がより活発であることが考えられる。本研究では、妊娠 11-12 日および妊娠 13-14 日における胎盤の迷路層、基底層、脱落膜におけるジヒドロ葉酸還元酵素蛋白および mRNA をリアルタイム PCR 法および LC-MS/MS 法にて定量解析した。

### 4. 研究成果

(1) 妊娠 11-12 日の MTX 曝露によって誘発された胎盤基底層の低形成病変において認められた細胞死の発生機序に、Fas が作用する extrinsic pathway (デスレセプター径路)、

Bax が作用する intrinsic pathway (ミトコンドリア径路)が関与するか否かを検索した。その結果、胎盤基底層における TUNEL 陽性細胞 (アポトーシス細胞)の増加に先立って、Fas および Bax 蛋白・遺伝子の発現が上昇していることが確認された。すなわち、妊娠 11-12 日の MTX 曝露によって誘発された胎盤基底層の低形成病変において認められた細胞死の発生機序に、Fas が作用する extrinsic pathway (デスレセプター径路)、Bax が作用する intrinsic pathway (ミトコンドリア径路)が関与していることが明らかとなった。

(2) 妊娠 11, 12 日における MTX 曝露によって誘発された胎盤基底層の細胞死の病理発生機序に酸化ストレスおよび JNK(c-Jun N-terminal kinase)pathway 活性化が関与しているか否かを明らかにするための解析を実施したところ、下記の結果を得た。(1)MTX 曝露によって誘発された胎盤基底層では、蛋白質の酸化修飾物である dityrosine 発現細胞存在率、不飽和脂肪酸の酸化修飾物である hexanoyl-lysine 発現細胞および Acrolein 発現細胞存在率が有意に増加した。両因子発現細胞の有意な増加は TUNEL 陽性細胞の有意な増加に先立って認められた。(2)MTX 曝露によ

って誘発された胎盤基底層では、JNK 関連因子である JNK1 発現細胞、JNK2 発現細胞、リン酸化 JNK 蛋白発現細胞の存在率が有意に増加した。JNK1, JNK2, リン酸化 JNK 蛋白発現細胞の有意な増加は TUNEL 陽性細胞の有意な増加に先立って認められた。

以上の結果より、妊娠 11, 12 日における MTX 曝露によって誘発された胎盤基底層の細胞死の病理発生機序には蛋白質の酸化障害、不飽和脂肪酸の酸化障害および JNK(c-Jun N-terminal kinase) pathway 活性化が大きく関与していることが示唆された。

(3) Methotrexate への感受性と葉酸代謝の活発性との関連を明らかにするために、妊娠 11, 12 日および妊娠 13, 14 日におけるラット胎盤の迷路層、基底層、脱落膜におけるジヒドロ葉酸還元酵素 m-RNA および蛋白発現量をリアルタイム PCR 法および LC-MS/MS 法にて定量解析した。その結果、妊娠 11, 12 日および妊娠 13, 14 日におけるラット胎盤の迷路層、基底層、脱落膜におけるジヒドロ葉酸還元酵素 m-RNA および蛋白発現量には有意差は認められず、Methotrexate への感受性とジヒドロ葉酸還元酵素の発現量とは無関係である可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

(1) C. Z. Zu, M. Kuroki, A. Hirako, T. Takeuchi, S. Furukawa, A. Sugiyama. Effect of methotrexate exposure at middle gestation on inner plate of ocular cup and lens in rat fetus. Journal of Toxicologic Pathology, In print. 2016.

(2) A. Hirako, S. Furukawa, T. Takeuchi, A. Sugiyama. Effect of methotrexate exposure at late gestation on development of telencephalon in rat fetal brain. Journal of Veterinary Medical Science, 78:213-220. 2016.

(3) A. Hirako, J. Sun, S. Furukawa, T. Takeuchi, A. Sugiyama. Effect of methotrexate on rostral migratory stream in newborn rats. Journal of Veterinary Medical Science, 77, 1565-1571, 2016.

(4) A. Sugiyama, J. Sun, K. Ueda, S. Furukawa, T. Takeuchi. Effect of methotrexate on cerebellar development in infant rats. Journal of Veterinary Medical Science, 77, 789-797, 2015.

(5) J. Sun, A. Sugiyama, S. Inoue, T. Takeuchi, S. Furukawa. Effect of methotrexate on neuroepithelium in the rat fetal brain. Journal of Veterinary Medical Science 76:347-354, 2014.

(6) J. Sun, A. Sugiyama, S. Inoue, T. Takeuchi, T. Takeuchi, S. Furukawa. Effect

of methotrexate on rat placenta development. Experimental and Toxicologic Pathology, 65:995-1002, 2013.

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 杉山晶彦, 祖承哲, 黒木雅人, 平光彩乃, 竹内 崇, 古川賢. 葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate のラット妊娠期曝露が胎児眼球の発達に及ぼす影響. 第 3 回日本獣医病理学専門家協会 (JCVP) 学術集会 (三鷹市公会堂、三鷹市), 2016. 3. 30.

(2) 平光彩乃, 古川 賢, 竹内 崇, 杉山晶彦. 葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate のラット妊娠後期曝露が胎児終脳の発達に及ぼす影響. 第 158 回日本獣医学会 (北里大学、十和田市), 2015. 9. 9.

(3) 平光彩乃, 孫 敬, 古川 賢, 竹内 崇, 杉山晶彦. 葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate のラット新生児期曝露が吻側細胞移動流に及ぼす影響. 第 157 回日本獣医学会 (北海道大学、札幌市), 2014. 9. 10.

(4) 杉山晶彦, 孫 敬, 上田剛太, 竹内 崇, 古川 賢. 葉酸代謝拮抗剤 Methotrexate のラット新生児期曝露が小脳の発達に及ぼす影響. 第 30 回日本毒性病理学会 (あわぎんホール、徳島市), 2014. 1. 30.

(5) 孫 敬, 杉山晶彦, 井上翔太, 竹内 崇, 古川 賢. Methotrexate の胎生期曝露がラット胎児脳の神経上皮細胞に及ぼす影響. 第 156 回日本獣医学会 (岐阜大学、岐阜市), 2013. 9. 21.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：  
0

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

杉山 晶彦 (Sugiyama, Akihiko) 鳥取大学  
農学部共同獣医学科 准教授

研究者番号：00432609

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：