

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12187

研究課題名(和文)葉酸代謝拮抗剤メトトレキサートのラット新生児期曝露が小脳の発達に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文)Effect of neonatal exposure of methotrexate on cerebellum development in rats

研究代表者

杉山 晶彦(Akihiko, Sugiyama)

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：00432609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：葉酸代謝拮抗剤メトトレキサート(MTX)のラット新生児期曝露により誘発された小脳外顆粒細胞のアポトーシスの誘導にはミトコンドリア経路、Fas経路が、細胞増殖抑制には細胞周期停止が関与している可能性が示唆された。また、当該小脳では、外顆粒細胞移動、プルキンエ細胞樹状突起形成、シナプス形成・伝達に関連した遺伝子群の発現抑制が惹起された。生後6日目におけるMTX曝露は21日齢のラットに小脳低形成および小脳プルキンエ細胞樹状突起の発達不全を惹起したが、当該所見は70日齢に到達した時点においても認められ、MTXの新生児期曝露により惹起された小脳組織傷害の影響は成熟期まで及ぶ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

葉酸代謝拮抗剤メトトレキサート(MTX)による治療を受けたヒト小児急性白血病患者に小脳低形成の発症が認められているにも関わらず、MTXが小脳の発達に及ぼす詳細な有害作用機序は未解明であった。本研究成果はMTXのラット新生児期曝露による小脳傷害の発症機構のみならず、その後の小脳の発達への影響の全貌解明に迫る有意義なものである。また、MTXは生体内における葉酸代謝を拮抗する作用を有することから、本研究成果は一薬剤の小脳の発達へ及ぼす有害作用機構の解明にとどまらず、葉酸代謝異常という病態が小脳の発達に及ぼす影響の解明にも大きく貢献しているといえる。

研究成果の概要(英文)：Apoptosis of external granular cells induced by methotrexate (MTX) administration in infant rats was associated with mitochondrial pathway and Fas - Fas ligand pathway, and cell proliferation inhibition of them was associated with cell cycle arrest. Expression of Genes related to external granular cells migration, development of Purkinje cell dendrites and synaptogenesis, were regressed in the cerebellum of MTX-exposed infant rats. MTX exposure in six-day-old rats induced cerebellar hypoplasia and incomplete development of Purkinje cell dendrites in 21-day-old rats, and these histopathological changes were also observed in 70-day-old rats. This result suggests that the effects on cerebellum of MTX exposure in the infant period may continue until the maturation period.

研究分野：獣医病理学

キーワード：メトトレキサート ラット新生児 小脳外顆粒細胞 アポトーシス 細胞増殖抑制 細胞周期停止 プルキンエ細胞樹状突起 葉酸拮抗剤

1. 研究開始当初の背景

葉酸代謝拮抗剤メトトレキサート (MTX)はジヒドロ葉酸還元酵素を拮抗阻害することによりDNA合成を阻害し、その結果、細胞増殖抑制およびアポトーシスを誘発する。MTXは小児白血病やリンパ腫の治療薬として用いられており (Arch. Neurol. 55, 1561-1568, 1998/J. Pharmacokinet. Pharmacodyn. 41, 159-171, 2014)、特に小児急性リンパ芽球性白血病に対する主要な治療薬として認識されている (Arch. Neurol. 55, 1561-1568, 1998)。しかしながら、MTXによる治療を受けたヒト小児急性白血病患者に小脳低形成の発症が認められたことが報告されている (Arch. Neurol. 51, 985-993, 1994/ Arch. Neurol. 55, 1561-1568, 1998)。それにもかかわらず、MTX曝露が小脳の発達に及ぼす影響に関する報告は少なく、詳細な有害作用機序は未だ明らかにされていない現状にある。研究代表者は先行研究において、6日齢の新生児ラットにMTX 1.0mg/kgの単回皮下投与を実施したところ、小脳外顆粒細胞にアポトーシス、細胞増殖抑制、皮質深部への移動遅延が誘発され、21日齢となった当該ラットにおける小脳は著しい低形成を呈することが明らかとなった (J. Vet. Med. Sci. 77, 789-797, 2015)。しかしながら、これらの小脳外顆粒細胞の病理組織学変化における詳細な分子生物学的機序およびMTXの新生児期曝露が成長期・成熟期の小脳に及ぼす影響は未解明な状況にある。

2. 研究の目的

本研究では、MTXの新生児期曝露によって小脳外顆粒細胞に誘発されたアポトーシス、細胞増殖抑制および皮質深部への移動遅延の分子生物学的機序に関する解析を実施するとともに、新生児期にMTX曝露を受けたラットの成長期・成熟期における小脳の病理組織学的解析および分子生物学的解析を実施する。本研究の目的は、MTXが発達期小脳に及ぼす有害作用機構を解明すること、MTXの新生児期曝露が成長期・成熟期の小脳に及ぼす影響を解明することにある。MTXの新生児期曝露または新生児期における葉酸代謝拮抗状態が小脳の発達に及ぼす詳細な有害作用機序の解明を目的とした研究はこれまでなされておらず、本研究には学術的独自性および創造性が存在しているといえる。

3. 研究の方法

(1) MTX曝露新生児ラットの脳外顆粒細胞におけるアポトーシス促進性因子の発現状況の解明

6日齢の新生児ラットへのMTXの曝露後、小脳外顆粒細胞におけるアポトーシス促進性因子 (Bax、Bak、Bad、Bid、Bim、Fas、Fas-ligand)の発現状況を免疫組織化学法およびリアルタイムPCR法を用いて解析することにより、MTX曝露によって誘発された小脳外顆粒細胞のアポトーシスの発現における内部経路 (ミトコンドリア経路)および外部経路 (Fas経路)の関与を検討した。

(2) MTX曝露新生児ラットの脳外顆粒細胞におけるCyclin dependent kinase (CDK)阻害因子の発現状況の解明

CDK阻害因子は細胞周期チェックポイントにおいて細胞周期の進行を抑制する機能を有する。

研究代表者による先行研究により、MTX 曝露を受けた新生児ラットの小脳外顆粒細胞では、CDK 阻害因子である p21 の過剰発現が誘発されることが既に明らかとされている (J. Vet. Med. Sci. 77, 789-797, 2015)。本研究においては、p21 以外の CDK 阻害因子である p15、p16、p18、p19、p27、p57 の発現状況を免疫組織化学法およびリアルタイム PCR 法を用いて解析することにより、MTX 曝露を受けたラット新生児の小脳外顆粒細胞の細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導における細胞周期チェックポイントを介した細胞周期停止の関与を検討した。

(3) MTX 曝露新生児ラットの小脳外顆粒細胞における DNA 傷害マーカー γ H2AX の発現状況の解明

リン酸化ヒストン H2AX (γ H2AX)は DNA 二重鎖切断の鋭敏なマーカーである (In Vivo. 22, 305-309, 2008)。MTX が DNA 合成阻害を誘発することは知られているが、DNA 二重鎖切断を惹起するか否かは未だ明らかにされていない。本研究では、MTX による小脳外顆粒細胞の核酸に対する有害作用機序に DNA 二重鎖切断が関与しているか否かを明らかにすることを目的として、MTX 曝露新生児ラットの小脳外顆粒細胞における γ H2AX の発現状況を免疫組織化学法を用いて解析した。

(4) MTX 曝露新生児ラットの小脳外顆粒細胞のアポトーシス発現および細胞増殖抑制における p53 発現の関与の解明

MTX の新生児期曝露が誘発した小脳外顆粒細胞のアポトーシスの発現および細胞増殖抑制(細胞周期停止)において、p53 の発現が関与しているか否かを明らかにする目的により、MTX 曝露後の小脳外顆粒細胞における p53 m-RNA の発現状況をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。

(5) MTX 曝露新生児ラットの小脳外顆粒細胞のアポトーシス発現における酸化損傷の関与の解明

MTX 曝露新生児ラットの小脳外顆粒細胞のアポトーシスの誘導機序における酸化損傷およびそれによって惹起された JNK (c-JUN N-terminal kinase)経路の活性化の関与を明らかにすることを目的として、小脳外顆粒細胞のアポトーシス誘導に先行して、多価不飽和脂肪酸の酸化損傷マーカー (ヘキサノイルリジン)、蛋白質の酸化損傷マーカー (ジチロシン、蛋白質過酸化物質 (Advanced oxidation product))、DNA の酸化損傷マーカー (8-OhdG)および JNK pathway 関連遺伝子の発現増大が起こるか否かを免疫組織化学法、リアルタイム PCR 法および比色定量法を用いて解析した。

(6) MTX 曝露が新生児ラットの小脳プルキンエ細胞樹状突起の発達へ及ぼす影響の解明

小脳プルキンエ細胞の樹状突起の健全な発達には外顆粒細胞との相互作用が必要であることから、MTX 投与による外顆粒細胞の傷害は小脳プルキンエ細胞樹状突起の発達不全・形成異常を惹起する可能性がある。あるいは MTX 曝露がプルキンエ細胞樹状突起の発達に直接的な影響を及ぼす可能性も存在する。ゴルジ-コックス染色法および抗 Calbindin 抗体を用いた免疫組織化学法により、小脳プルキンエ細胞の樹状突起の形状を解析し、MTX 曝露が新生児ラットの小脳プルキンエ細胞樹状突起の発達へ及ぼす影響を検討した。

(7) DNA マイクロアレイ法を用いた MTX 曝露ラットの発育期小脳における小脳発達関連遺伝子の発現状況に関する網羅的解析

6 日齢に MTX 曝露を受けた新生児ラットが 9、14、21 日齢に到達した時点における小脳の外顆粒細胞移動関連遺伝子群、プルキンエ細胞樹状突起形成関連遺伝子群、シナプス形成・伝達関連遺伝子群、ミエリン形成関連遺伝子群の発現状況を DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析することにより、MTX の新生児期曝露が小脳発達の分子機構に及ぼす影響を検討した。

(8) MTX の新生児期曝露が成長期・成熟期のラットの小脳に及ぼす影響の解明

研究代表者による先行研究では、6日齢にMTXを曝露した後、21日齢までにおける小脳の病理組織学的所見を明らかにした (J. Vet. Med. Sci. 77, 789-797, 2015)。本研究においては、6日齢にMTX曝露を受けたラットの21日齢以降 (28、42、56、70日齢)の小脳の病理組織学的解析 (ヘマトキシリン・エオジン染色法)、ゴルジ-コックス染色法および抗 Calbindin 抗体を用いた免疫組織化学法によるプルキンエ細胞樹状突起の発達に関する病理組織形態学的解析を実施し、MTX の新生児期曝露が成長期・成熟期のラットの小脳に及ぼす影響を検討した。

(9) 葉酸投与による MTX 誘発性小脳病変の改善に関する検討

MTX 曝露を受けた新生児ラットにおいて惹起された小脳病変が葉酸製剤の投与により緩和されるか否かを明らかにする目的により、MTX 曝露日より葉酸製剤の投与を開始する群、MTX 曝露日の翌日より葉酸製剤の投与を開始する群、MTX 曝露日の2日後より葉酸製剤の投与を開始する群を設定し、病理組織形態学的解析を用いて葉酸製剤の有用性を評価した。いずれの群においても葉酸製剤は1日1回、7日間の皮下投与とした。

4. 研究成果

(1) MTX 曝露新生児ラットの脳外顆粒細胞におけるアポトーシス促進性因子の発現状況の解明

MTX 曝露後の新生児ラットにおける脳外顆粒細胞では、Bax、Bid および Fas の有意な発現増大が認められた。当該結果より、MTX 曝露によって誘発された脳外顆粒細胞のアポトーシスの誘導には、内部経路 (ミトコンドリア経路) および外部経路 (Fas 経路) の双方が関与している可能性が示唆された。

(2) MTX 曝露新生児ラットの脳外顆粒細胞における Cyclin dependent kinase (CDK) 阻害因子の発現状況の解明

MTX 曝露後の新生児ラットにおける脳外顆粒細胞では、p19 および p27 の有意な発現増大が認められた。当該結果より、MTX 曝露を受けた脳外顆粒細胞の細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導において、細胞周期チェックポイントを介した細胞周期停止が関与している可能性が示唆された。

(3) MTX 曝露新生児ラットの脳外顆粒細胞における DNA 傷害マーカー γ H2AX の発現状況の解明

MTX 曝露後の新生児ラットにおける脳外顆粒細胞では γ H2AX の発現は認められなかった。以上の結果より、MTX 曝露を受けた新生児ラットの脳外顆粒細胞では DNA 二重鎖切断は惹起されていない可能性が高いことが明らかとなった。

(4) MTX 曝露新生児ラットの脳外顆粒細胞のアポトーシス発現および細胞増殖抑制における p53 発現の関与の解明

MTX 曝露後のラット新生児の小脳では p53 m-RNA の発現増大傾向が認められることが明らかとなった。当該結果より、MTX による脳外顆粒細胞のアポトーシスの発現および細胞増殖抑制 (細胞周期停止) において、p53 の発現増大が関与している可能性が示唆された。

(5) MTX 曝露新生児ラットの脳外顆粒細胞のアポトーシス発現における酸化損傷の関与の解明

MTX 曝露後のラット新生児の小脳組織に対し、ヘキサノイルリジン、ジチロシン、8-OhdG を一次抗体とした免疫組織化学染色、蛋白質過酸化物の比色定量および JNK pathway 関連遺伝

子を標的としたリアルタイム PCR 法による遺伝子解析を実施したが、いずれの解析においても有意な変化は認められなかった。

(6) MTX 曝露が新生児ラットの小脳プルキンエ細胞樹状突起の発達へ及ぼす影響の解明

MTX 曝露新生児ラットの小脳プルキンエ細胞樹状突起では発達不全傾向が認められた。当該結果より、MTX 曝露が新生児ラットの小脳プルキンエ細胞樹状突起の発達を抑制する可能性が示唆された。

(7) DNA マイクロアレイ法を用いた MTX 曝露ラットの発育期小脳における小脳発達関連遺伝子の発現状況に関する網羅的解析

MTX 曝露ラットの小脳では、外顆粒細胞移動関連遺伝子群、プルキンエ細胞樹状突起形成関連遺伝子群およびシナプス形成・伝達関連遺伝子群の発現は抑制される傾向を示すことが明らかとなった。

(8) MTX の新生児期曝露が成長期・成熟期のラットの小脳に及ぼす影響の解明

28、42、56、70 日齢のいずれの MTX 曝露ラットにおいても、小脳の矮小化および小脳プルキンエ細胞樹状突起の発達不全を呈する傾向が認められた。MTX の新生児期曝露によって惹起された小脳組織傷害の影響は成熟期まで及ぶ可能性が示唆された。

(9) 葉酸投与による MTX 誘発性小脳病変の改善に関する検討

MTX 曝露日から 7 日間にわたり葉酸製剤の投与を受けた MTX 曝露ラットでは小脳病変は緩和される傾向を示したことに對し、MTX 曝露日の翌日または 2 日後より 7 日間にわたって葉酸製剤の投与を受けた MTX 曝露ラットでは明らかな緩和効果は認められなかった。MTX 曝露による新生児ラットの小脳病変の緩和には、MTX 曝露と同じタイミングで葉酸製剤の投与を開始する必要がある可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野原 正勝 (Nohara Masakatsu) (70649996)	岡山理科大学・獣医学部・助教 (35302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関