

氏 名	こばやし みうら み き こ 小林(三浦)美樹子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2520 号
学位授与の日付	平 成 14 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Thioredoxin, an Anti - Oxidant Protein, Protects Mouse Embryos from Oxidative Stress-Induced Developmental Anomalies (抗酸化タンパクであるチオレドキシンは酸化ストレスによるマウス胚の発 生異常を防ぐ)
論文調査委員	(主 査) 教 授 西 川 伸 一 教 授 中 辻 憲 夫 教 授 塩 田 浩 平

論 文 内 容 の 要 旨

齧歯類の初期胚は酸素毒性に対して著しく感受性が高く, in vivo または in vitro で高濃度の酸素に曝露されると胚死亡や異常発生が高頻度に誘発される。しかし, 器官形成期に急激に代謝活性が上がり組織の酸素要求量が増加する時期, すなわちマウスでは胎生7.5~8.5日の間に, 胚が酸素に対する抵抗性を獲得する。レドックス制御機構に関わる抗酸化酵素であるチオレドキシン (TRX) のノックアウトマウスが着床直後に死亡することや, TRX が胎生8.5日から組織内に発現し始めることから, 我々は, マウス胚の酸素毒性に対する抵抗性獲得に TRX が関与するのではないかと考えた。そこで, human TRX (hTRX) を強制発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを用いて, 高酸素濃度下 (25%) と低酸素濃度下 (10%) で全胚培養 (whole embryo culture) を行い, 胚の発育, 形態分化, 酸化ストレス産物の蓄積, および TRX の発現パターンなどを調べ, 野生型 (wild-type) マウス胚と比較した。

その結果, 以下のことが明らかになった。

- (1) 野生型マウスの7.5日胚を高酸素濃度下で培養 (25%) すると体軸のローテーション異常 (94.7%), 小頭症 (47.4%), 神経管の閉鎖不全 (100.0%) などの形態形成異常が高頻度に誘発され, それらの頻度は低酸素濃度群に比して有意に高かった ($p < 0.05$)。しかし, TRX Tg 胚では, 高酸素濃度で培養してもこれらの異常の頻度は低く, 低酸素濃度群との間に有意な差は見られなかった。
- (2) 野生型, TRX Tg マウスとも7.5日胚では内在性の mouse TRX (mTRX) は発現していなかったが, Tg 胚には hTRX が発現していた。
- (3) 酸化ストレスにより生成される核酸修飾物 (8-ヒドロキシ-2'-グアノシン, 8-OHdG) とカルボニル化タンパクの量が, 高酸素濃度で培養した野生型胚で明らかに増加し, 高酸素曝露によって酸化ストレスが胚組織に蓄積することが示された。しかし, Tg 胚は高酸素濃度で培養しても胚組織内の 8-OHdG の量が有意に増加しなかった。

以上の結果から, 高酸素負荷による形態形成異常の発生機序の一つとして胚細胞の酸化ストレス蓄積が関与していること, ならびに, 胚組織の TRX 発現が酸化ストレスの蓄積を軽減し胚に酸素抵抗性を付与することが示された。

本研究は, 初期胚におけるレドックス制御の発達が胚の初期発生と形態形成に重要な役割を果たしていること, ならびに TRX などの抗酸化タンパクがその過程に深く関与していることを強く示唆するものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

齧歯類の初期胚は酸素の毒性に対して極めて感受性が高いが, 器官形成期に代謝活性が上昇し組織の酸素要求量が増加するのに伴って, 酸素に対する抵抗性を獲得する。酸素による胚細胞の酸化ストレスと発生に伴う酸素感受性の変化のメカニズムを明らかにするため, 抗酸化タンパクであるチオレドキシン (TRX) の役割をマウス胚を用いて調べた。野生型マウス胚を異なる酸素濃度下で全胚培養し, 胚の発育, 形態分化を調べたところ, 胎齢7.5日のマウス胚では高酸素 (25% O₂)

下培養で高頻度に発生異常が誘発されたが、TRX を強制発現させた TRX トランスジェニック (Tg) 胚は高酸素下でも正常に発育し、発生異常は誘発されなかった。培養胚の組織における酸化ストレス産物 (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine およびカルボニル化蛋白) の蓄積を調べたところ、野生型胚では高酸素下培養後に酸化ストレス産物の増加が見られたが、TRX Tg 胚では増加が見られなかった。個体発生に伴う TRX タンパクの発現を調べたところ、野生型胚では酸素抵抗性を獲得する胎齢8.5日以降に TRX が発現することが明らかになった。

以上の結果から、高酸素下で誘導される発生異常は胚に対する酸化ストレスが原因になっていること、ならびに TRX は初期胚のレドックス制御に重要な役割を果たし酸化ストレスから胚を防御することが示された。

以上の研究は発生におけるレドックスシステムの役割の解明に貢献し、発生学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成14年5月9日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。