

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 松尾 沙織里

題 目 Ptch1 ヘテロマウスを用いた小児腫瘍モデルの確立と化学物質の  
発達期曝露影響評価系としての有用性に関する研究

環境中の化学物質や放射線の発達期曝露は腫瘍発生の原因となりうると考えられてきたが、小児腫瘍発生の機序はほとんど明らかにされてはいない。また、化学物質による小児腫瘍発生への修飾作用を評価する系も十分構築されていない。近年、ヒトの代表的な小児脳腫瘍である Sonic hedgehog (Shh) サブタイプの髄芽腫と類似した髄芽腫を好発する Ptch1 ヘテロノックアウトマウス (Ptch1 マウス) が注目されているが、本マウスの髄芽腫発生過程に関する詳細は不明である。一方、本マウスは新生児期の放射線照射や他の遺伝子の欠損により髄芽腫の発生頻度が変動することから、本マウスの髄芽腫発生過程が様々な要因によって修飾される可能性が示唆される。そこで、本マウスを用いることにより化学物質の発達期曝露による小児腫瘍への修飾作用を検出する系を確立できると考え、本研究を行った。

第1章では、生後0日齢 (PND0) から10週齢 (W10) までの Wild 及び Ptch1 マウスの小脳を検索し、髄芽腫及びその発がん修飾作用を短期に検索する上で重要な Preneoplastic lesion の特徴の解析を行った。Ptch1 マウスの小脳において、小脳発達期の PND10 から14に外顆粒層 (EGL) の肥厚部、PND16以降に Ki-67 陽性巣、PND12以降に髄芽腫の発生が認められた。EGL の形態学的特徴、BrdU 標識細胞の経時的な観察、増殖や神経分化関連マーカーの免疫組織化学的染色結果から、EGL の肥厚部、Ki-67 陽性巣、髄芽腫は EGL 外層に存在する Granular cell precursor (GCP) に由来することが示唆された。同時に、形態学的特徴や増殖活性、神経組織への未分化性、小脳における好発部位の類似性から、EGL の肥厚部や Ki-67 陽性巣は髄芽腫の Preneoplastic lesion であると推察された。特に Ki-67 陽性巣は小脳発達後期に高頻度に認められることから、これらの Preneoplastic lesion を評価指標の一つとすることにより、化学物質の発達期曝露による本マウスの髄芽腫発生への修飾作用について、より短期間で評価できる可能性が示唆された。

第2章では、Shh 阻害剤である Cyclopamine を生後2週間マウスに投与し、その髄芽腫発生及び小脳発達に与える影響について検索し、第1章で解析した髄芽腫やその Preneoplastic lesion の評価指標としての有用性について検討した。Cyclopamine 群の Ptch1 マウスでは、PND14 及び PND21 において髄芽腫の Preneoplastic lesion である EGL の肥厚部、Ki-67 陽性巣、Small MB の発生率が有意に減少した。また、PND21 では増殖性病変の面積が有意に減少した。PND7 では、Cyclopamine による GCP の増殖抑制作用が認められ、このことが Preneoplastic lesion の発生や髄芽腫への進展に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。また、Cyclopamine による髄芽腫やその Preneoplastic lesion の抑制効果は、有意ではないものの W12 まで持続していた。以上から、髄芽腫やその Preneoplastic lesion の発生状況を評価指標の一つとすることにより、Ptch1 マウスの小脳発達期に化学物質を曝露し、髄芽腫発生への影響を短期間で評価する系の確立が可能であることが示唆された。

第3章では、p53 阻害剤である Pifithrin- $\alpha$  を生後2週間マウスに投与した。Pifithrin- $\alpha$  群の Ptch1 マウスでは、PND21 において Small MB の発生率及び増殖性病変の面積が有意に増加した。PND7 では、Pifithrin- $\alpha$  がアポトーシス誘導を阻害するという仮説に反して、GCP に対して p53 活性化を介したアポトーシス誘導及び増殖停止作用を有する可能性が示唆された。この原因は不明であるが、

Pifithrin- $\alpha$  投与により、GCP に何等かの遺伝子異常が起こり、アポトーシスに陥らず生き残った遺伝子異常を有する Preneoplastic lesion が PND21 までに髄芽腫へ進展した可能性が示唆された。

第 4 章では、抗甲状腺剤である Methimazole を生後 3 週間マウスに投与した。Methimazole 投与群では、甲状腺機能低下との関連が示唆される甲状腺の組織学的変化及び体重減少が認められた。Methimazole 群の W12 の Ptch1 マウスにおいて Ki-67 陽性巢の発生頻度のみに有意な減少が認められたものの、PND14 及び PND21 における増殖性病変の発生頻度、PND21 及び W12 における増殖性病変の面積には有意な減少は認められなかった。以上から、W12 の Ki-67 陽性巢の発生頻度の低下は、非特異的な変動である可能性が示唆された。また、Methimazole が小脳発達に及ぼす影響については、両マウス共に明らかではなかった。今回の実験条件下において、Methimazole 投与が小脳発達や髄芽腫発生に影響を及ぼすことを示す明らかな結果は得られなかった。

以上から、Ptch1 マウスにおける髄芽腫やその Preneoplastic lesion の発生状況を指標として、化学物質の発達期曝露の影響を短期間で評価することが可能であることが示唆された。今後更に実験を重ね、この評価系の有用性や限界を確認することが重要である。

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 MATSUO, Saori

題 目 Studies on Establishment of Pediatric Tumor Model with Ptch1 Heterozygous Mice and Usability of Evaluation Method to Assess Modifying Effects of Exposure to Chemicals during Developmental Period Using Ptch1 Mice

(Ptch1 ヘテロマウスを用いた小児腫瘍モデルの確立と化学物質の発達期曝露影響評価系としての有用性に関する研究)

Although exposure to environmental chemicals and radiation has been associated with the risk of tumor development, mechanisms related to pediatric tumors have not been completely understood. Furthermore, evaluative methods to assess the modifying effects of chemical exposure on pediatric tumors have not been established. Recently, heterozygous Ptch1 knockout mice (Ptch1 mice) have been used as a valuable model for human medulloblastoma of the Sonic hedgehog subtype, which is the most common malignant brain tumor in children. However, the detailed process of medulloblastoma development in Ptch1 mice remains unknown. On the other hand, medulloblastoma tumorigenesis in Ptch1 mice is thought to be modified by a variety of factors because changes in its incidence have been observed by postnatal exposure to radiation and additional gene mutations in Ptch1 mice. This study was conducted to establish an evaluative method to assess the modifying effects of chemical exposure on pediatric tumors using Ptch1 mice.

In Chapter 1, I examined the cerebella of wild and Ptch1 mice sequentially from postnatal day 0 (PND0) to postnatal week 10 (W10) to clarify the characteristics of medulloblastoma preneoplastic lesions, which are thought to be a promising endpoint for detecting the modifying effect on medulloblastoma development in a short term. In Ptch1 mice, proliferative lesions were detected during PND10 to PND14 as focal thickened areas of the external granular layer (EGL). After PND16, Ki-67-positive foci were detected. The earliest occurrence of medulloblastoma was observed at PND12. The morphological characteristics, migration process of BrdU-labeled cells, and immunohistochemistry of proliferation cell markers and neural differentiation markers revealed that the thickened areas of EGL, Ki-67-positive foci, and medulloblastoma were derived from granular precursor cells (GCP) located in EGL. In addition, the similarities of morphological characteristics and immunohistochemistry of proliferative cells and neuronal differentiation markers indicated that the thickened areas of EGL and Ki-67-positive foci were possibly preneoplastic lesions of medulloblastoma. Because the Ki-67-positive focus was observed frequently during the later period of cerebellar development, it was considered to be a promising preneoplastic medulloblastoma lesion to investigate the modifying effects of exposure to chemicals during the developmental period in Ptch1 mice.

In Chapter 2, Ptch1 mice were treated with Cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor, from

PND1 to PND14 in order to clarify the modifying effects of postnatal exposure to Cyclopamine on medulloblastoma development in *Ptch1* mice and confirm the value of medulloblastoma and its preneoplastic lesions investigated in Chapter 1 as an evaluation endpoint. Cyclopamine treatment resulted in a statistically significant reduction in the incidence of proliferation of thickened area in EGL, Ki-67-positive foci, and small medulloblastoma (Small MB) at PND14 and PND21. In addition, significant reduction in the total area of proliferative lesions was noted at PND21 in the Cyclopamine group. At PND7, Cyclopamine treatment reduced the proliferation of GCP in EGL, indicating that Cyclopamine inhibited not only the development of preneoplastic lesions but also the expansion of these lesions into medulloblastomas. Furthermore, the inhibitory potential persisted for 2 months after the treatment. These results indicated that postnatal exposure to Cyclopamine has an inhibitory effect on medulloblastoma development in *Ptch1* mice. In addition, these results indicated that preneoplastic lesions of medulloblastoma, thickened areas of EGL, and Ki-67-positive foci were good endpoints for the detection of the modifying effects of chemical exposure on medulloblastoma development during the developmental period.

In Chapter 3, *Ptch1* mice were treated with Pifithrin- $\alpha$ , a p53 inhibitor, from PND1 to PND14 in order to clarify the modifying effects of postnatal exposure to Pifithrin- $\alpha$  on medulloblastoma development in *Ptch1* mice and confirm the value of medulloblastoma and its preneoplastic lesions as evaluation endpoints. Pifithrin- $\alpha$  treatment resulted in a statistically significant increase in the incidence and total area of proliferative lesions of Small MB at PND21. At PND7, Pifithrin- $\alpha$  treatment induced apoptosis and senescence of GCP in EGL with the activation of p53, in contrast with the hypotheses that Pifithrin- $\alpha$  treatment inhibits apoptosis. Although the cause of the activation of p53 by Pifithrin- $\alpha$  treatment remains unknown, it is suggested that some preneoplastic lesions with additional gene mutations escaped apoptosis by Pifithrin- $\alpha$  treatment and expanded to medulloblastomas by PND21.

In Chapter 4, *Ptch1* mice were treated with Methimazole, an anti-thyroid agent, from PND1 to PND21. In the Methimazole-treated animals, histopathological changes in the thyroid glands and a decrease in body weight were observed, which were thought to be related to hypothyroidism. Methimazole treatment resulted in a statistically significant decrease in the incidence of Ki-67-positive foci in *Ptch1* mice at W12. However, there was no change in the incidence of proliferative lesions at PND14 and PND21, as well as in the total area of proliferative lesions at PND21 and W12. These results indicated that a decrease in the incidence of Ki-67-positive foci at W12 was a non-specific change. In addition, Methimazole treatment had no effect on cerebellar development in wild and *Ptch1* mice. We concluded that, under the conditions of this study, Methimazole treatment did not affect cerebellar and medulloblastoma development.

In summary, in addition to medulloblastoma, its preneoplastic lesions in mice are considered to be promising early endpoints of medulloblastoma development in *Ptch1* mice. Examination of these lesions is valuable for the detection of the modifying effects of postnatal exposure to chemicals on medulloblastoma development in short-term studies. Further experiments using other chemicals are needed to confirm the usability and limitations of these endpoints.