

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 檜山 雅人

題 目：マウス母子境界領域における子宮 NK 細胞の分化とオートファジーの関与

論文要旨：哺乳類の生殖戦略において、胎盤形成はもっとも重要なもののひとつである。母体にとって半異物である胎子胎盤系の母体組織への侵入を母体が許容し、母体体内での胎子の成長が可能となることは高度な免疫応答を介した免疫寛容、また、胎子—母体間でのクロストークに因って実現する。

妊娠中の胎子—母体間での免疫応答は、受精卵の着床から胎盤形成、分娩に至るまで、全ての過程で重要な役割を果たす。子宮 NK 細胞は骨髄を由来とする、着床から胎盤形成期に見られる大型顆粒リンパ球であり、胎盤形成、維持においてとくに重要な免疫担当細胞である。

第一章では子宮 NK 細胞の動態に関わる因子として T 細胞と B 細胞に着目し、C.B-17/Icr-scid/scid マウスを用いて①子宮 NK 細胞の動態、②子宮 NK 細胞の分化型の割合、③子宮 NK 細胞の微細構造をコントロールである C.B-17/Icr-+/+マウスと比較することで、T 細胞と B 細胞との関係を検討した。その結果、胎子数や子宮 NK 細胞の微細構造においては SCID マウスと+/+マウスの両者において差は見られなかったが、光学顕微鏡観察により、SCID マウスでは、胎盤形成初期における子宮 NK 細胞の細胞密度が+/+マウスよりも有意に低いことが明らかとなった(DBA 染色)。この結果を受けて、子宮 NK 細胞の分化の程度に応じた Paffaro らの分類法を用い、未熟な子宮 NK 細胞から成熟した子宮 NK 細胞までを I~IV型に分類したところ、成熟型へと分化途中である II型の子宮 NK 細胞が SCID マウスでは有意に少なかった。このことから、T 細胞と B 細胞の存在により、子宮 NK 細胞の I 型から II 型への分化が促進されていることが分かった。また、胎盤形成期により多くの子宮 NK 細胞を子宮へ遊走させる走化因子の関与も考えられる。一方で、妊娠 12 日目の子宮 NK 細胞密度に両マウス群で差がなかったことは、子宮 NK 細胞自身の産生する EGF(上皮成長因子)の脱落膜細胞への作用により、脱落膜細胞から子宮 NK 細胞の増殖を促進する IL-15 の産生が十分になされることを意味しているかもしれない。

一方で、免疫応答の他に胎盤の形成において重要な機構として、栄養膜侵入制御機構が挙げられる。胎盤はある意味腫瘍のように母体側組織へと侵入、増殖して増大するが、正常胎盤は適切な時期での適切な大きさを維持し、母体へ浸潤しすぎたりはしない。胎盤成長、侵入を制御する機構の存在が疑われるが、その全容はいまだ明らかになっていない。

第二章では、腫瘍抑制因子 p53 と、その機能の一つであるオートファジーに注目して、胎盤形成期から完成期における p53、MAP1LC3 ファミリーの発現の変化を追跡した。妊娠 12 日(D12)、14 日(D14)、16 日(D16)にあたる胎盤を採材し、胎盤迷路部、基底脱落膜部、間膜腺部の 3 つの部位に分離して p53,LC3 ファミリーの蛋白発現量、オートファジー関連因子の mRNA 量を測定した。結果、p53 は各部位間、各日齢間での変動は見られなかったが、胎盤完成期である D14 に

(別紙様式第 3 号)

において LC3B が増加する傾向にあり、逆に LC3C では減少する傾向にあった。LC3A については全日齢で基底脱着膜部での発現が有意に高かった。このことから、D14 における栄養膜侵入制御に LC3B を介するオートファジーが関与していること、脱着膜の恒常性維持に LC3A が関与していることが分かった。p53 については変動が見られないため、他の経路からのオートファジー誘導が胎盤において働いていることが疑われる。栄養欠乏により誘導され、オートファジーを引き起こす LKB1、AMPK 経路の上昇が D14 の基底脱着膜部で見られたため、胎子栄養要求量の増加が栄養膜侵入制御機構の一端を担っているかもしれない。

この結果を受けて、第三章では絶食したマウスを用いて第二章で得られた結果と比較することで栄養欠乏状態の胎盤における LC3 ファミリー、オートファジー関連因子の変動を調査した。その結果、LC3 ファミリーの中で、LC3B が絶食により誘導されたオートファジーに関連して特異的に増加した。栄養欠乏により誘導されるオートファジーには LC3B が関与していることが分かった。また、D12,14,16 において絶食により変動したオートファジー関連因子に差が見られた。これは胎盤血管系の構築、胎盤完成度の違いや胎子栄養要求量の違いなどでグルコース不足の程度に差があったためと考えられる。

まとめると、本研究から、哺乳類の胎盤形成、妊娠維持、栄養膜侵入制御に免疫学的機構とオートファジーの両方が関与していることが示唆された。これは哺乳類が進化の過程で得た高度な免疫機構と、太古より保存されたオートファジーという機構が協力して妊娠を成立させているということを提起する。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	檜山 雅人
審査委員	主査：山口大学 教授 木曾 康郎
	副査：山口大学 准教授 日下部 健
	副査：鹿児島大学 准教授 矢吹 映
	副査：山口大学 教授 佐藤 晃一
	副査：山口大学 教授 奥田 優
題目	マウス母子境界領域における子宮NK細胞の分化とオートファジーの関与

審査結果の要旨：哺乳類の生殖戦略において、胎盤形成はもっとも重要なもののひとつである。母体にとって半異物である胎子胎盤系の母体組織への侵入を母体が許容し、母体体内での胎子の成長が可能となることは高度な免疫応答を介した免疫寛容、また、胎子—母体間でのクロストークによって実現する。

妊娠中の胎子—母体間での免疫応答は、妊娠中の全ての過程で重要な役割を果たす。子宮 NK 細胞は骨髄を由来とする、着床から胎盤形成期に見られる大型顆粒リンパ球であり、胎盤形成、維持においてとくに重要な免疫担当細胞である。

申請者は第一章において子宮 NK 細胞の動態に関わる因子として T 細胞と B 細胞に着目し、C.B-17/Icr-scid/scid マウスを用いて①子宮 NK 細胞の動態、②子宮 NK 細胞の分化型の割合、③子宮 NK 細胞の微細構造をコントロールである C.B-17/Icr+/+マウスと比較することで、T 細胞と B 細胞との関係を検討した。その結果、胎子数や子宮 NK 細胞の微細構造においては SCID マウスと+/+マウスの両者において差は見られなかったが、光学顕微鏡観察により、SCID マウスでは、胎盤形成初期における子宮 NK 細胞の細胞密度が+/+マウスよりも有意に低いことが明らかとなった(DBA 染色)。この結果を受けて、子宮 NK 細胞の分化の程度に応じた Paffaro らの分類法を用い、未熟な子宮 NK 細胞から成熟した子宮 NK 細胞までを I~IV型に分類したところ、成熟型へと分化途中である II型の子宮NK細胞が SCID マウスでは有意に少なかった。このことから、T 細胞と B 細胞の存在により、子宮 NK 細胞の I 型から II型への分化が促進されていることが分かった。一方で、妊娠 12 日目の子宮 NK 細胞密度に両マウス群で差がなかったことは、子宮 NK 細胞自身の産生する EGF(上皮成長因子)の脱落膜細胞への作用により、脱落膜細胞から子宮 NK 細胞の増殖を促進する IL-15 の産生が十分になされることを示唆すると考察した。

一方で、免疫応答の他に胎盤の形成において重要な機構として、栄養膜侵入制御機構にも着目し、研究を行っている。胎盤はある意味腫瘍のように母体側組織へと侵入、増殖して増大するが、

(別紙様式第 10 号)

正常胎盤は適切な時期での適切な大きさを維持し、母体へ浸潤しすぎたりはしない。胎盤成長、侵入を制御する機構の存在が疑われるが、その全容はいまだ明らかになっていない。

申請者は第二章として、腫瘍抑制因子 p53 と、その機能の一つであるオートファジーに注目し、胎盤形成期から完成期における p53、MAP1LC3 ファミリーの発現の変化を追跡した。妊娠 12 日(D12)、14 日(D14)、16 日(D16)にあたる胎盤を採材し、胎盤迷路部、基底脱落膜部、間膜腺部の 3 つの部位に分離して p53,LC3 ファミリーの蛋白発現量、オートファジー関連因子の mRNA 量を測定した。結果、p53 は各部位間、各日齢間での変動は見られなかったが、胎盤完成期である D14 において LC3B が増加する傾向にあり、逆に LC3C では減少する傾向にあることを明らかとした。LC3A については全日齢で基底脱落膜部での発現が有意に高い。このことから、D14 における栄養膜侵入制御に LC3B を介するオートファジーが関与していること、脱落膜の恒常性維持に LC3A が関与していることを示した。p53 については変動が見られないため、他の経路からのオートファジー誘導が胎盤において働いていることが疑われる。栄養欠乏により誘導され、オートファジーを引き起こす LKB1、AMPK 経路の上昇が D14 の基底脱落膜部で見られたため、胎子栄養要求量の増加が栄養膜侵入制御機構の一端を担っているかもしれないと考察した。

この結果を受けて、申請者は第三章として、絶食したマウスを用いて第二章で得られた結果と比較することで栄養欠乏状態の胎盤における LC3 ファミリー、オートファジー関連因子の変動を調査している。その結果、LC3 ファミリーの中で、LC3B が絶食により誘導されたオートファジーに関連して特異的に増加することを明らかとした。栄養欠乏により誘導されるオートファジーには LC3B が関与していることが分かった。また、D12,14,16 において絶食により変動したオートファジー関連因子に差が見られたことから、胎盤血管系の構築、胎盤完成度の違いや胎子栄養要求量の違いなどでグルコース不足の程度に差があったのではと考察している。

申請者は哺乳類の胎盤形成、妊娠維持、栄養膜侵入制御に免疫学的機構とオートファジーの両方が関与していることを示した。本論文は妊娠成立における免疫機構とオートファジーの重要性を提起し、当該領域の全容解明への一助となり得る結果を示した。以上により、本論文は博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしいと判断した。