

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

檜山 雅人

2015

目次

序論	・・・	1 項
第一章 妊娠 SCID マウスにおける子宮 NK 細胞の動態		
緒論	・・・	5 項
材料と方法	・・・	6 項
・ 実験動物	・・・	7 項
・ 妊娠子宮の形態学的観察	・・・	7 項
・ 免疫組織化学的観察	・・・	8 項
結果		
・ 胎盤形成過程	・・・	10 項
・ 電子顕微鏡観察	・・・	10 項
・ 子宮 NK 細胞密度の計測	・・・	11 項
考察	・・・	11 項
小括	・・・	15 項
付図	・・・	16 項
第二章 胎盤形成期、完成期における LC3 ファミリーの発現		
緒論	・・・	32 項
材料と方法		

・実験動物	・・・ 35 項
・サンプリング	・・・ 35 項
・免疫組織化学染色	・・・ 35 項
・ウェスタンブロッティング	・・・ 36 項
・リアルタイム RT-PCR	・・・ 37 項
・統計学的解析	・・・ 39 項

結果

・ p53, P70S6K, LC3 ファミリー蛋白発現量の変化	・・・ 39 項
・オートファジー関連因子 mRNA 発現量の変化	・・・ 40 項
・ LC3 ファミリーの局在性	・・・ 41 項

考察	・・・ 42 項
----	----------

小括	・・・ 45 項
----	----------

付図	・・・ 46 項
----	----------

第三章 栄養飢餓における胎盤内 LC3 ファミリー発現の動態

緒論	・・・ 60 項
----	----------

材料と方法

・実験動物	・・・ 61 項
・サンプリング	・・・ 62 項

・ 胎子胎盤重量測定	・ ・ ・ 62 項
・ 免疫組織化学染色	・ ・ ・ 62 項
・ ウエスタンブロッティング	・ ・ ・ 62 項
・ リアルタイム RT-PCR	・ ・ ・ 62 項
・ 統計学的解析	・ ・ ・ 63 項
結果	
・ 胎子、胎盤重量の比較	・ ・ ・ 63 項
・ 絶食による LC3A,B,C 発現量の変化	・ ・ ・ 64 項
・ 絶食によるオートファジー関連因子 mRNA 発現量の変化	・ ・ ・ 64 項
・ 絶食による LC3 ファミリーの局在性の変化	・ ・ ・ 65 項
考察	・ ・ ・ 66 項
小括	・ ・ ・ 71 項
付図	・ ・ ・ 73 項
総括	・ ・ ・ 86 項
要約	・ ・ ・ 89 項
謝辞	・ ・ ・ 93 項
文献	・ ・ ・ 94 項

序論

母体にとって胎子胎盤とは異物である。本来であれば非自己として排除されるであろう胎子胎盤系が母体から拒絶されることなく母体組織に侵入、成長することはまさに生命の神秘である。それが可能であることは、哺乳類への進化の過程で手に入れた雌性生殖器系の発達のみならず、高度免疫機能の獲得に因るところが大きい。

免疫学的妊娠維持機構の一つとして提唱されている **immunotrophism** とは胎子—母体間の積極的な免疫応答の結果、分泌亢進した各種サイトカインや成長因子が絨毛組織を発育、増殖させ妊娠成功に関与するというものである。本来生体防御のために使用される免疫機構が異物を容認するために使用されるということは一見矛盾があるように感じるが、それこそが高度動物の発生、成長を可能にする鍵なのであろう。

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。胎盤形成、維持において特に重要な免疫担当細胞として、子宮 NK 細胞が挙げられる。子宮 NK 細胞は着床後から胎盤形成期に見られる大型顆粒リンパ球であり、妊娠子宮の脱落膜、間膜腺に出現し、妊娠の維持に関わっている。多くの免疫担当細胞が生殖に関与し

ているが、欠損することで流産を引き起こすものは子宮 NK 細胞のみであり、さらに胎盤で見られる免疫担当細胞のほとんどが子宮 NK 細胞である。子宮 NK 細胞欠損マウスである TgE26 マウスではらせん動脈形成不全、脱落膜異常などにより胎子死亡が起こることから、血管形成や脱落膜の健全化に関与しているといわれている (Guimond et al., 1997)。また、CSF-1、LIF、EGF など妊娠において重要な非炎症性サイトカインを産生し、免疫的侵襲機構における NK 細胞としての機能とは異なる作用によって、妊娠において中心的な役割を果たしていることが疑われる (Saito et al., 2004; Jokhi et al., 1994)。

また、異物を排除する機構の中で、免疫機構と対をなして重要なものとして腫瘍抑制機構が挙げられる。本来は自らの正常細胞であったものが腫瘍化し、異物と化した腫瘍細胞は、そういった点では半分母体の DNA を持つ胎子、胎子側胎盤と似通った存在であると言えるかもしれない。しかし腫瘍と異なり正常胎盤は母体へ浸潤しすぎることなく正常なサイズを維持する。そのため胎盤侵入を制御する機構の存在が示唆されるが、その全容はいまだ明らかではない。

妊娠の成立は哺乳類の生殖戦略上もっとも重要である。半異物である胎子胎盤系を許容することが重要であることは先に述べたが、単に許容するだけでは足りない。胎子胎盤の過剰な成長、侵略は母体を重篤な危機に陥れる。だからと言って逆に侵入を完全に阻害しては、妊娠は成立しない。このデリケートな

バランスを維持するために胎子胎盤-母体間のクロストークが重要であることは自明である。

腫瘍抑制因子のなかでも p53 は多様な機能を有する。腫瘍抑制の際の機能としてアポトーシスの誘導がよく知られている。もちろん分化の際にミス変異を起こした細胞をアポトーシスにより除外することは他の組織同様に起こっているであろうが、胎盤の成長、侵入を制御するに当たり、短期間で増殖、肥大しなければならない胎盤において、異常と認識されていない細胞にアポトーシスを誘導するのはいささか非効率であるように感じる。そこで栄養膜侵入制御機構への腫瘍抑制因子の関与として、p53 の多様な機能の中でも細胞増殖を制御し、かつ栄養飢餓に対応するオートファジーを疑った。栄養欠乏時、p53 は mTORC1 抑制を介してオートファジー亢進を引き起こす(Feng., 2010)。胎子胎盤の成長は著しいものがあり、マウスであれば着床から数えて僅か 15 日程で分娩まで到達する。特に胎盤形成期から完成期にかけての胎盤の成長は著しく、栄養飢餓状態と非常に近い状態にある可能性がある。そうであれば、胎盤の成長を制御するメカニズムとしてオートファジーが関与するということは有り得る。

本論文では、哺乳類の妊娠成立における母子境界領域でのサイトカインネットワーク、栄養膜侵入制御機構を明らかとすべく実験を行っている。第一章で

は、妊娠成立に母体の主要免疫担当細胞が如何に関与しているのかを明らかにすることを目的に、T 細胞、B 細胞を欠損している SCID マウスを用いて子宮 NK 細胞の分化、増殖を測定した。第二章では胎盤形成期から完成期における p53、LC3 ファミリーとオートファジー関連因子の動態を追うことでこれらの因子の栄養膜侵入制御機構への関与の検討を、第三章では飢餓状態のマウスを用いることで栄養飢餓の妊娠への影響と LC3 ファミリーの発現の変化を追った。

第一章 妊娠 SCID マウスにおける子宮 NK 細胞の動態

緒論

妊娠中の胎子-母体間の免疫応答は、受精卵の着床から胎盤形成、分娩にいたる過程で重要な役割を果たしている。げっ歯類の子宮では、着床後から胎盤形成期の間、大型の顆粒リンパ球である子宮 NK 細胞が増加し、妊娠後期には子宮から消失することが知られている(Manaster et al., 2010; peel., 1989; Tayade et al., 2007; van den Hauvel et al., 2005; Zhang et al., 2005)。子宮 NK 細胞は妊娠子宮において種普遍的に出現し(Bulmer et al., 2010; Croy et al., 2006; Poli et al., 2009; Stewart et al., 1998)、妊娠の維持に重要な役割を果たしている。子宮 NK 細胞欠損マウスである TgE26 マウスではラセン動脈形成不全、脱落膜異常などにより胎子死亡が起こることから、血管形成や脱落膜の健全化への関与が示唆される。また、TgE26 マウスに T 細胞と B 細胞を欠損する重症複合免疫不全(SCID)マウスの骨髄を移植すると、子宮 NK 細胞が出現し、妊娠が正常に進行する(Guimond et al., 1996; Guimond et al., 1997)。このことから分かるように、子宮 NK 細胞は骨髄を由来とし(Ashkar et al., 2000; Lysiak et al., 1992)、着床とともに子宮へ集まり、間膜腺で増殖、脱落膜で分化する(Peel.,

1989)。また、子宮 NK 細胞は PAS 陽性の顆粒を細胞質内に持ち(Peel., 1989)、顆粒には細胞溶解性タンパク質であるパーフォリンなどを含んでいる(Parr et al., 1990; Stallmach et al., 1995)。同じリンパ球である T 細胞や B 細胞が胎生期に胎子組織に分配されるのに対して、子宮 NK 細胞の子宮での出現は生後に起こる。SCID マウスでは、子宮 NK 細胞の子宮内出現が遅れ、春機発動も遅延することが分かっている(Kiso et al., 1992)。また、T 細胞と B 細胞の産生するサイトカインは、NK 細胞の分化・増殖・活性化に関わっているため、これらのリンパ球が子宮 NK 細胞の出現や分化にも影響を与えている可能性がある。本章では、妊娠中の子宮 NK 細胞の分化・増殖に、T 細胞 B 細胞がどのように関与するのかを明らかにするため、SCID マウスを用いて、妊娠 8 日目、12 日目、16 日目における①子宮 NK 細胞密度がどのように推移するのか、②子宮 NK 細胞の分化型、③子宮 NK 細胞の微細構造を観察し、顆粒の状態を明らかにすることで子宮 NK 細胞の活性化が起こっている(Burkhardt et al., 1990)のかを検討した。

材料と方法

1) 実験動物

全ての採材は山口大学動物実験指針に従いアバーチンによる麻酔下で行った。

C.B-17/Icr-scid/scid マウス(日本クレア、東京)の雌の成熟個体(10 週齢以降)を使用した。C.B-17/Icr-+/+マウスを対照として用いた。飼料はフナバシファーム製の 10kGy 放射線滅菌済固形飼料、水はオートクレーブ済の水道水を自由摂取とし、室温 22 °C、明時間 12 時間、暗時間 12 時間で、クリーンラック内で飼育した。同様にクリーンラック内で飼育した ICR マウスの雄の成熟個体との同居後、膣栓の確認された日を D1 とした時の D8,12,16 にあたる妊娠子宮を採材した。

2) 妊娠子宮の形態学的観察

i) 光学顕微鏡観察

採材した妊娠子宮はブアン液で固定し、定法に従いパラフィン包埋した。その後、胎盤を横断する厚さ 4 μ m の切片を作製し、それらの切片に過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色を施した。子宮の間膜側に細胞内顆粒が特徴的な子宮 NK 細胞を観察した。

ii) 透過型電子顕微鏡観察

採材した D8 の子宮は胎盤ごとに切り離した。D8、D16 の子宮は反間膜側子

宮壁を切開し、胎子を摘出した後、間膜側子宮壁をプラスチックシャーレの縁に押し当て、曲ピンセットの背で慎重に脱落膜を剥がしとり、間膜腺を露出して曲バサミにより切り取った。各標本を 2.0%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒドにて前固定した後、1%四酸化オスミウムで後固定した。エタノール上昇系列で脱水し、プロピレンオキサイドで置換後、エポン 812 に包埋し、ウルトラマイクロトーム(Leica Ultracut UCT)を用いてガラスナイフにより 1 μ m の厚切り切片を作製し、トルイジンブルー染色を施し子宮 NK 細胞の存在を確認した後、ダイヤモンドナイフにより 100nm の超薄切片を作製した。超薄切片は酢酸ウラニルとクエン酸鉛による電子二重染色を施した後、透過型電子顕微鏡(Hitachi H-7600)にて観察を行った。

3) 免疫組織化学的観察

i) *Dolichos biflorus* (DBA)染色

上記の光学顕微鏡観察に用いたパラフィン包埋した胎盤を同様に 4 μ m の厚さに切り、キシレンから 100%エタノールまで脱パラした後、100%メタノールに 3 分間浸し、0.3% H_2O_2 /メタノール溶液に 15 分間浸すことで内因性ペルオキシダーゼを除去した。PBS で十分に洗浄し、1%BSA/PBS 溶液を切片に乗せ、30 分後に除去した。ビオチン化した DBA-lectin(愛媛大、下川哲哉博士より供与)

を PBS で 2000 倍希釈した溶液を切片にのせ遮光して 2 時間後、PBS で十分に洗淨した。その後 Avidin-Biotin Complex 溶液を切片にのせ、30 分間放置した後 PBS で十分に洗淨してから、遮光下で DAB 溶液により発色させて蒸留水に浸した。その後封入し、Bio-ZERO(蛍光顕微鏡 キーエンス BZ-8100)にて観察した。

ii) 子宮 NK 細胞密度の計測

両マウス群の各々 3 個体から得た各々 3 胎盤を用い、妊娠 8 日目では脱落膜の左右中央 3 箇所、妊娠 12 日目と 16 日目の胎盤では脱落膜と間膜腺それぞれの左右中央 3 箇所ずつの子宮 NK 細胞を Bio-ZERO にて計測し、計測範囲の面積で割ることにより細胞密度(cells/mm²)を算出した。左右中央の 3 箇所の細胞密度の平均値をとることにより、1 胎盤につき 1 つの細胞密度を求めた。各グループ間の有意差検定には、t 検定を用いた(p<0.05)。

iii) 子宮 NK 細胞の型分類

V.A.Paffaro らの分類方法に従い(Paffaro et al., 2003)、DBA 染色後に子宮 NK 細胞を 4 型に分類した(図.1-1)。細胞の大きさに相関して、約 9 μ m から 30 μ m の小さい順に I、II、III、IV 型とした。I 型は細胞内顆粒が無く、核の形状は丸く、細胞膜表面のみが DBA 陽性となる。II 型は細胞内顆粒がわずかに存在し、クロマチン凝集塊をもち、顆粒と細胞膜表面が DBA 陽性である。III 型は濃密な

顆粒をもち、核は正染色質であり、顆粒は特にゴルジ体囊の周囲に分布する。

IV型は数多くの顆粒が空胞化した細胞質に分散し、クロマチンのまばらな塊をもつアポトーシス様の核を示し、細胞質にはグリコーゲンが多く貯留する。

結果

<胎盤形成過程>

SCID マウスは、T 細胞と B 細胞を欠損するが不妊ではなく、胎子数は+/+マウスと差がなかった(表.1)。両マウス群において、胎盤形成も正常に進行し、妊娠 12 日目には迷路部、基底脱落膜、間膜腺が明瞭に区別できるようになった。妊娠 16 日目の子宮では迷路部が発達し、間膜腺は退行しつつあった(図.1-2)。

<電子顕微鏡観察>

間膜腺における子宮 NK 細胞の微細構造を比較観察した。SCID マウスおよび+/+マウスの妊娠 12 日目の子宮 NK 細胞において、顕著な形態的違いは認められず、核小体、ゴルジ装置、粗面小胞体、ミトコンドリアがみられた。顆粒は少なく、II型の子宮 NK 細胞である(図.1-3a,c)。顆粒には特徴的なキャップ構

造(図.1-3b,d)が観察された。妊娠 16 日目の子宮 NK 細胞においても、両マウス群間で顕著な形態的違いは認められなかった。細胞質にはグリコーゲンが貯留しており、濃密な顆粒が認められたので、Ⅲ型からⅣ型へと分化しつつある子宮 NK 細胞である(図.1-4)。

<子宮 NK 細胞密度の計測>

SCID、+/+各マウス群の妊娠 8 日目、12 日目、16 日目の子宮を採材し、DBA 染色の後、光学顕微鏡観察により子宮 NK 細胞密度を脱落膜、間膜腺それぞれにおいて計測した。妊娠 8 日目 SCID マウス脱落膜での子宮 NK 細胞密度は+/+マウスのそれに比べ有意に低かった。妊娠 12 日目、16 日目での脱落膜部、間膜腺部においては有意な差は認められなかった(図.1-5)。

その後、子宮 NK 細胞を 4 型に分類し、各妊娠日での細胞密度を計測した。妊娠 8 日目の脱落膜において SCID マウス群Ⅱ型子宮 NK 細胞密度が+/+マウスに比べ有意に低かった。両群で、妊娠が進むにつれて未熟型から成熟型が増加していた。その他の型、妊娠日においては有意な差は見られなかった(図.1-6,1-7)。

考察

本章により T 細胞と B 細胞の存在が、妊娠中の子宮 NK 細胞の動態に影響を与えるということが明らかとなった。特に、妊娠 8 日目の脱落膜において II 型子宮 NK 細胞の細胞密度に有意な差があったことから、子宮 NK 細胞が増加し始める胎盤形成初期に T 細胞と B 細胞の働きが関与していることが示唆された。T 細胞が産生する IL-2 と B 細胞が産生する IL-12 は NK 細胞の分化、増殖、活性化を促進し(Trinchieri et al., 1995)、また B 細胞が産生する IL-1 は T 細胞の IL-2 産生を促進する。子宮 NK 細胞にも同様に働きかけていることが示唆されるが、子宮 NK 細胞の分化、増殖には主に脱落膜細胞から産生される IL-15 が働きかけていることが報告されている(Godbole et al., 2010; Tagaya et al., 1996; Ye et al., 1996)。そのため、妊娠子宮では T 細胞と B 細胞から産生されるサイトカインはそれほど重要な因子ではなく、脱落膜細胞の産生するサイトカインが主に子宮 NK 細胞の増加を引き起こしている可能性が高い。また、ヒトでは脱落膜細胞はプロジェステロン刺激に反応して IL-15 を産生することが分かっている。子宮 NK 細胞自身も EGF を産生して子宮内膜の成長と発達に関与している(Kusakabe et al., 1999)ことから、脱落膜細胞と子宮 NK 細胞の相互作用によって、脱落膜の成長と子宮 NK 細胞の増加が起こっているのかもしれない。この子宮 NK 細胞自身の増殖を促す作用によって、妊娠 12 日において

SCID マウスの子宮 NK 細胞密度が+/+マウスと並んだのではないか。

次に、子宮 NK 細胞の前駆細胞は骨髄から発生し、全身循環を経て子宮へ到達することから、血管内皮細胞から子宮内膜への子宮 NK 細胞の移動の際に T 細胞と B 細胞が関与している可能性もある。血管から子宮内膜へ子宮 NK 細胞が遊走する際、血管内皮細胞のもつ E-セレクトインが子宮 NK 細胞のリガンドへ結合し、子宮 NK 細胞にインテグリンが発現すると、血管内皮細胞のインテグリンリガンド(I-CAM1 など)と結合し、遊走が起こる。この接着因子の発現に、T 細胞と B 細胞が関与しているのではないかと考えた。B.A. Croy らの実験により(Hatta et al., 2009; van den Heuvel et al., 2005)、妊娠 8 日目と 9 日目のマウスの脱落膜に T 細胞と B 細胞が存在すると、マウスの子宮 NK 細胞にあたるヒトの CD56⁺CD16⁻NK 細胞が集塊を作り、T 細胞と B 細胞を欠損するマウスの脱落膜組織では子宮 NK 細胞の集塊は作らないことが明らかとなっている。この実験において著者らは子宮内膜では子宮 NK 細胞の SELL、ITGA4 などの細胞接着分子、そしてそれらのカウンターレセプターの増加が起き、輸送リガンドの発現が増加した可能性も示唆している。本研究でマウスの子宮 NK 細胞が妊娠 8 日目で細胞密度に有意差を生じたのは、ヒトの子宮 NK 細胞が集塊を作る現象と同じようにマウスの子宮 NK 細胞も集塊を作るためである可能性が高い。

子宮 NK 細胞の微細構造に関して、妊娠 12 日目、16 日目の間膜腺では、どちらのマウス群においても同じ妊娠日のなかでも色々な型のもが見られた。しかし、ミトコンドリアや小胞体などの細胞内器官の配置や、核小体の有無、顆粒の形やキャップ構造などに顕著な差が見られなかったのは、T 細胞と B 細胞の存在が、子宮 NK 細胞の構造自体には影響を与えなかったためであると思われる。細胞密度に差が出た妊娠 8 日目の子宮 NK 細胞に関しては、分化型の違いが見られる可能性も期待できたが、SCID マウスの組織での子宮 NK 細胞の捕捉が難しかったため、その調査は今後の課題である。

以上のことをふまえて、本研究で明らかとなった妊娠 SCID マウスの子宮 NK 細胞の動態から、T 細胞と B 細胞は胎盤形成初期の脱落膜において、子宮 NK 細胞の増加を引き起こしており、その原因は完全には解明できていないものの、生後の子宮環境の整備と同様に、妊娠中の子宮環境の整備にも差を生じるであろうことが示唆された。また、SCID マウスと+/+マウスのどちらの子宮 NK 細胞も細胞内顆粒は円形で、特有のキャップ構造を有していたことから、末梢血中の NK 細胞が活性化した状態とは異なっており、細胞傷害性を示していないと推察された。これらの結果をまとめると、妊娠 8 日目の胎盤形成初期における II 型子宮 NK 細胞の増加から、T 細胞と B 細胞の存在は、子宮 NK 細胞の I 型から II 型への分化を促進しているか、また、子宮 NK 細胞前駆細胞の子宮へ

の動員を早めている可能性が考えられる。このことを解明するためには、SCID マウスおよび+/+マウスにおける妊娠 8 日目よりも早い段階での子宮 NK 細胞の動態や、前駆細胞の検出などのさらなる研究が必要である。一方で、妊娠 12 日目には両マウス群において子宮 NK 細胞密度の差が見られなかったことから、T 細胞と B 細胞は子宮 NK 細胞の増殖にはあまり関与せず、子宮 NK 細胞自身が出すサイトカインが脱落膜組織と相互作用し、十分に脱落膜の健全化や血管構築の手助けをしようことが分かった。また、子宮 NK 細胞が血管から子宮内膜へと遊走する際に、T 細胞と B 細胞が関与する可能性もある。詳細を明らかにするためにも、脱落膜組織を用いてのさらなる研究が必要である。

小括

本章は T 細胞、B 細胞を欠損した SCID マウスでは、成熟型へと分化途中である II 型の子宮 NK 細胞の減少が原因で胎盤形成初期における子宮 NK 細胞密度が有意に低いこと、また、胎盤形成中期ではその差が見られなくなることを明らかとした。この結果から T 細胞 B 細胞が子宮 NK 細胞の分化、または骨髄からの遊走に関与していること、子宮 NK 細胞と脱落膜とのクロストークによりその増殖、分化の遅延が解消されることが示唆された。

付表・付図

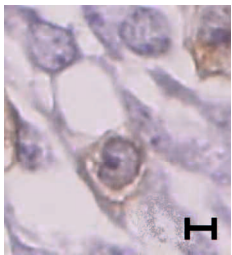
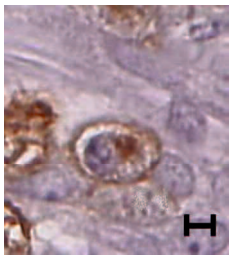


表.1 SCID マウスと+/+マウスの胎子数の比較

	母体数	胎子数
SCID	5	9.6±1.67
+/+	5	10±2.54

図.1 -1 V.A.Paffaro らによる子宮 NK 細胞の 4 分類

DBA 染色した子宮 NK 細胞を細胞の大きさや顆粒の数、核の状態などにより 4 型に分類した。図の細胞は各分類型の典型的なものを掲載した。

図.1-1

	I 型	II 型	III 型	IV 型
				
直径(μm)	9 \pm 3	13 \pm 2	26 \pm 7	30 \pm 4
DBA 陽性	細胞膜のみ	細胞膜と顆粒	細胞膜と顆粒	細胞膜と顆粒
顆粒	なし	わずか	濃密	分散
その他	核にクロマチン 凝集塊をもつ		正染色質 の核	空胞化した 細胞質

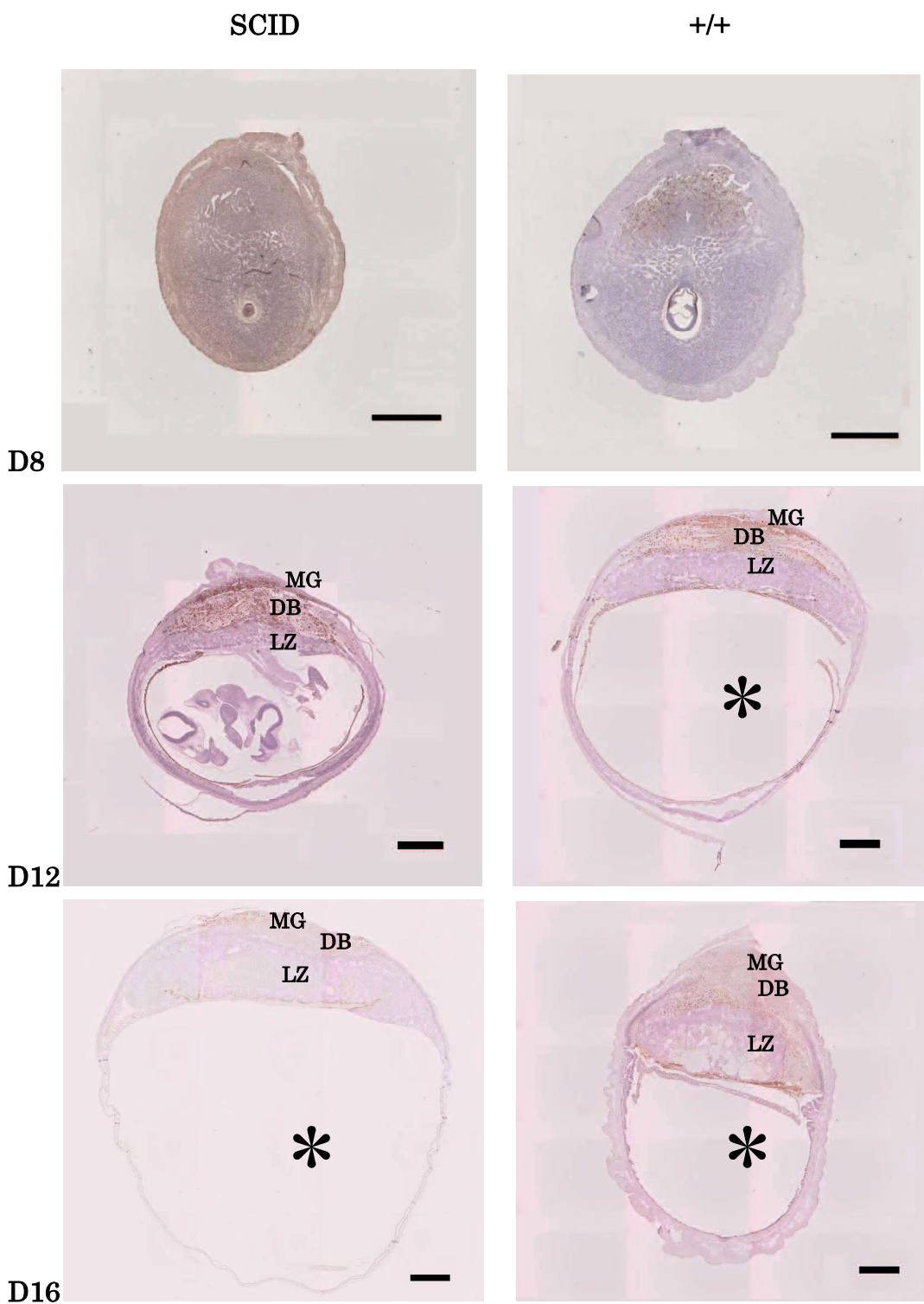
Bar : 5 μm

図.1-2 SCID マウスおよび+/+マウスの胎盤形成過程の比較(DBA 染色)

SCID マウスと+/+マウスどちらの胎盤においても、妊娠 8 日目以降に脱落膜化が進み、妊娠 12 日目には迷路部(LZ)、基底脱落膜(DB)、間膜腺(MG)の形成がみられる。Bar : 1mm

* 胎子は除外してある

図.1-2



Bar : 1mm

図.1-3 TEM 観察による妊娠 12 日目子宮 NK 細胞の微細構造と顆粒

(a) SCID Bar : 2 μ m

(b) SCID の顆粒 Bar : 500nm

(c) +/+ Bar : 2 μ m

(d) +/+の顆粒 Bar : 500nm

SCID マウスおよび+/+マウスの妊娠 12 日目の子宮 NK 細胞において、顕著な形態的違いは認められず、核小体(NC)、ゴルジ装置(GA)、粗面小胞体(rER)、ミトコンドリア(M)が見られる。顆粒は少なく、II型の子宮 NK 細胞であると思われる。顆粒には特徴的なキャップ構造(b,d 矢印)が観察される。

图.1-3

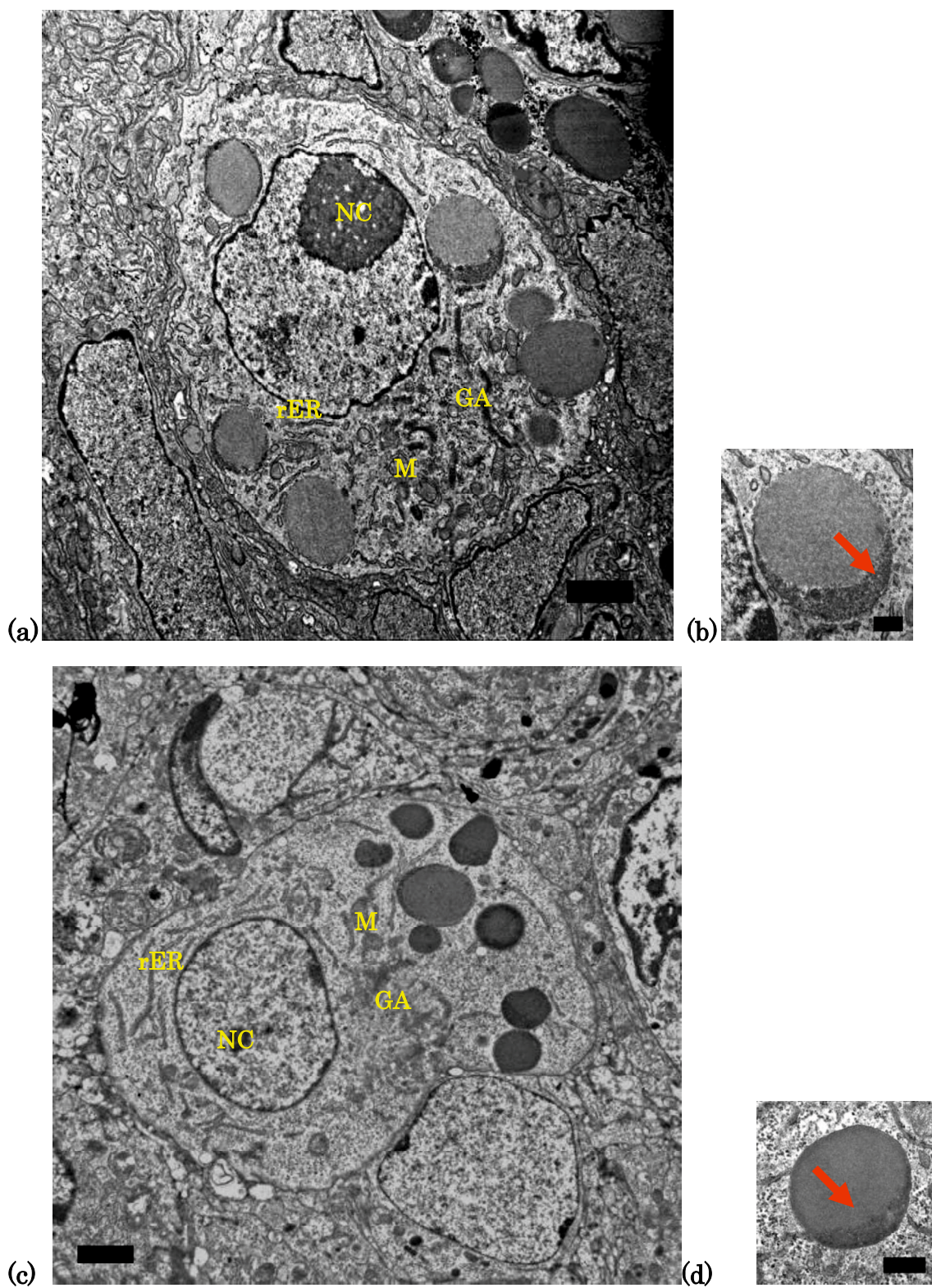


図.1-4 TEM 観察による妊娠 16 日目子宮 NK 細胞の微細構造

(a) SCID

(b) +/+

Bar : 5 μ m

SCID マウスおよび+/+マウスの妊娠 16 日目の子宮 NK 細胞において、顕著な形態的違いは認められない。細胞質にはグリコーゲン(GI)が貯留しており、濃密な顆粒(Gr)が認められる。

图.1-4

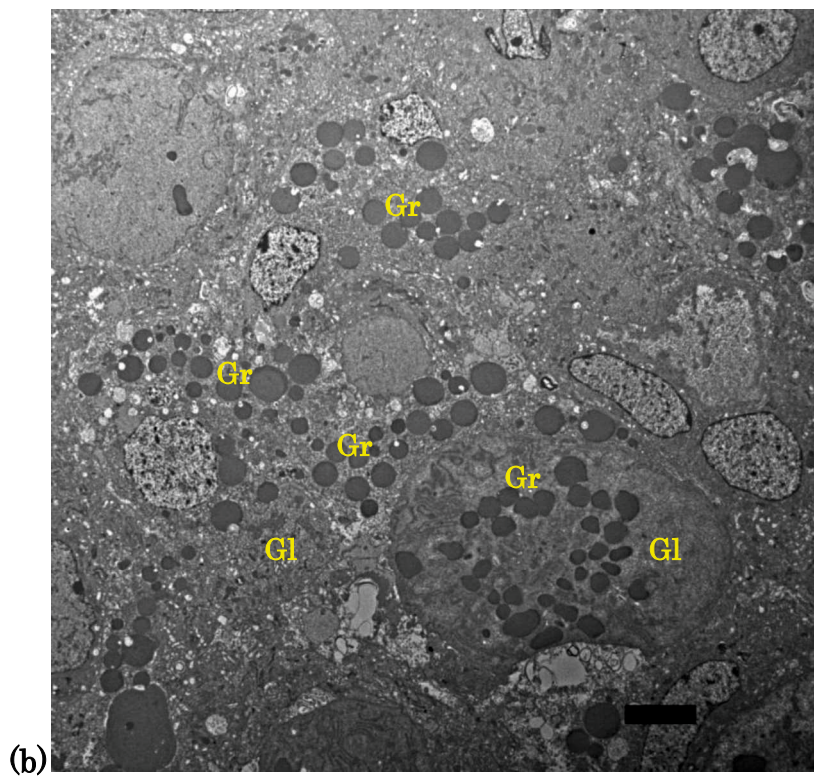
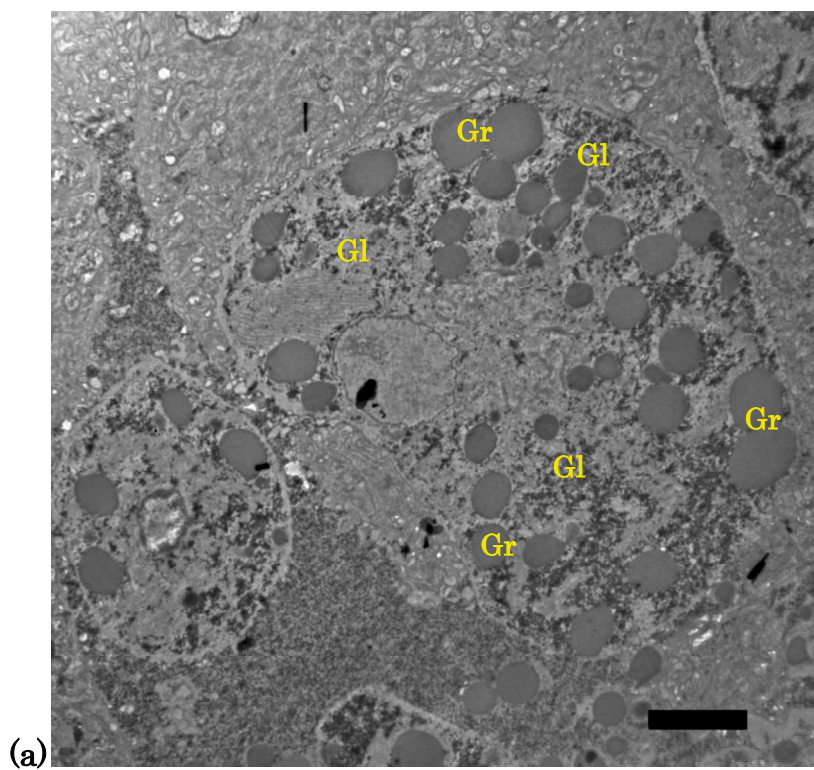
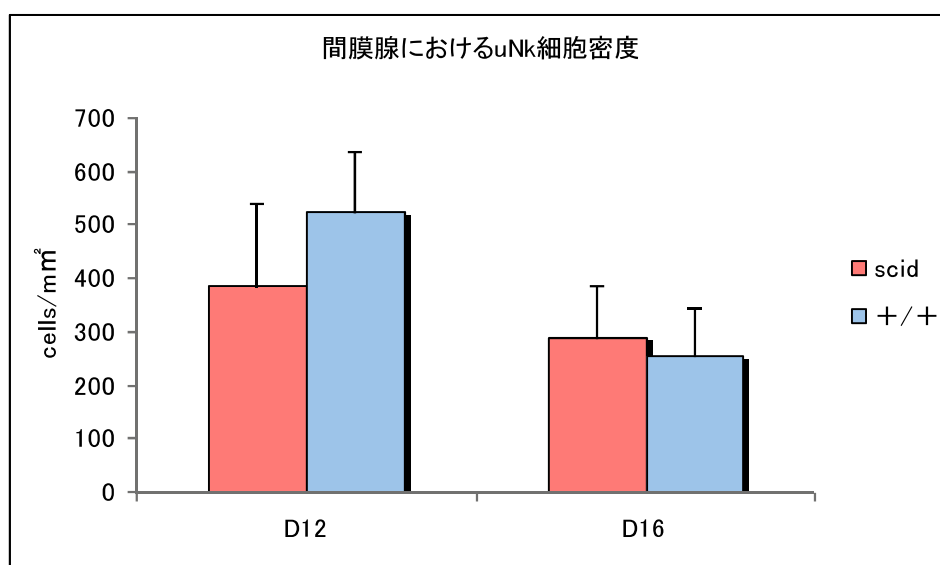
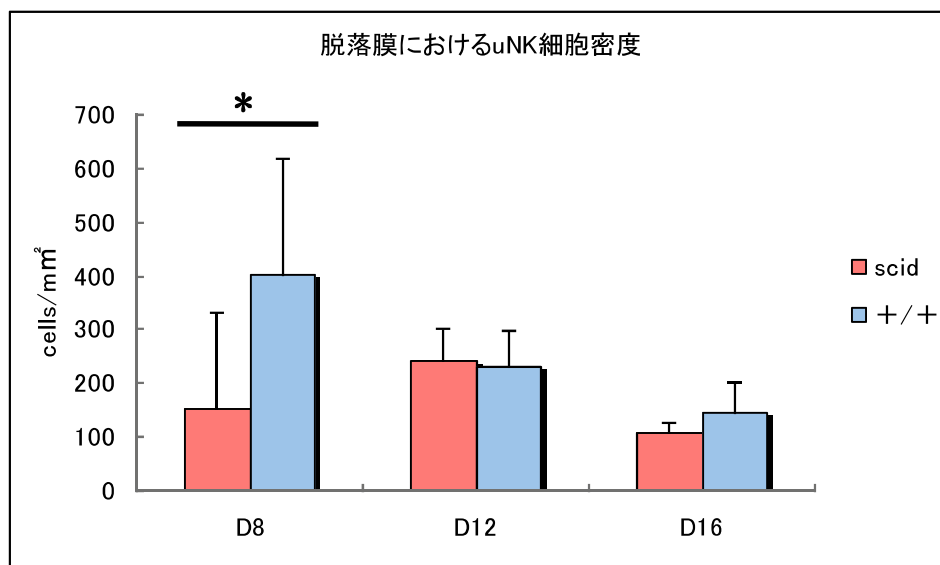


図.1-5 脱落膜および間膜腺における妊娠日ごとの子宮 NK 細胞密度(cells/mm²)

妊娠 8 日目の脱落膜で、SCID マウスの子宮 NK 細胞密度が有意に低いが、妊娠 12 日目、16 日目では+/+マウスの子宮 NK 細胞密度に追いつき、脱落膜間膜腺ともに両群で差がみられない。

図.1-5



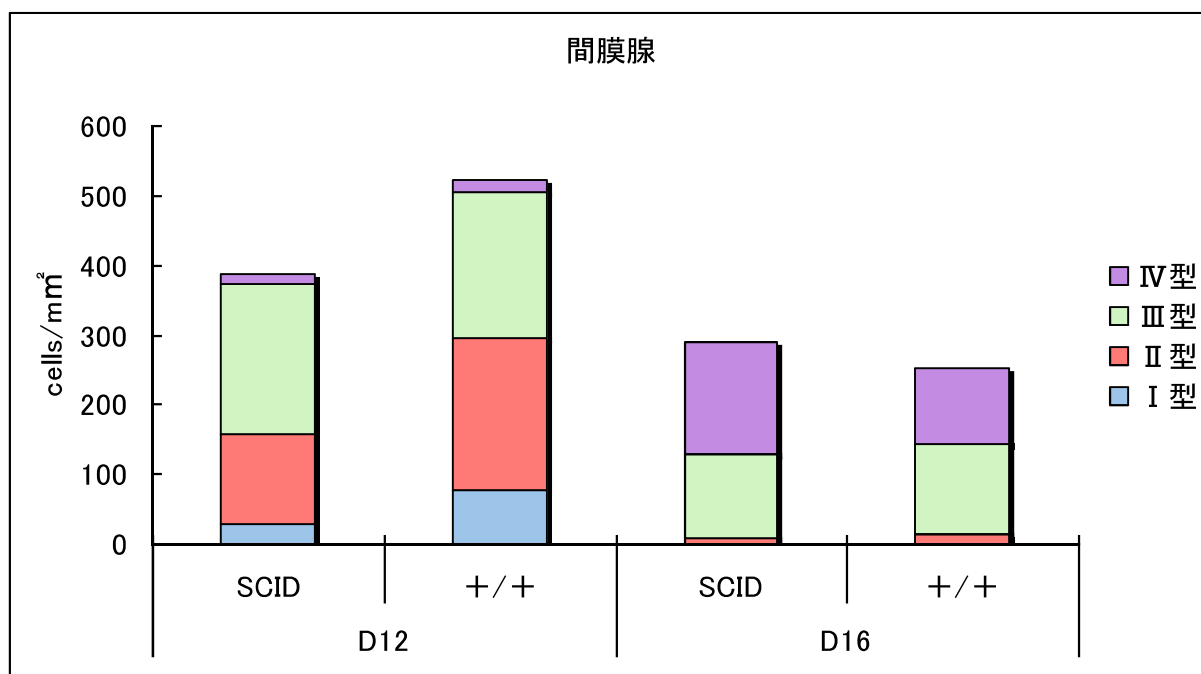
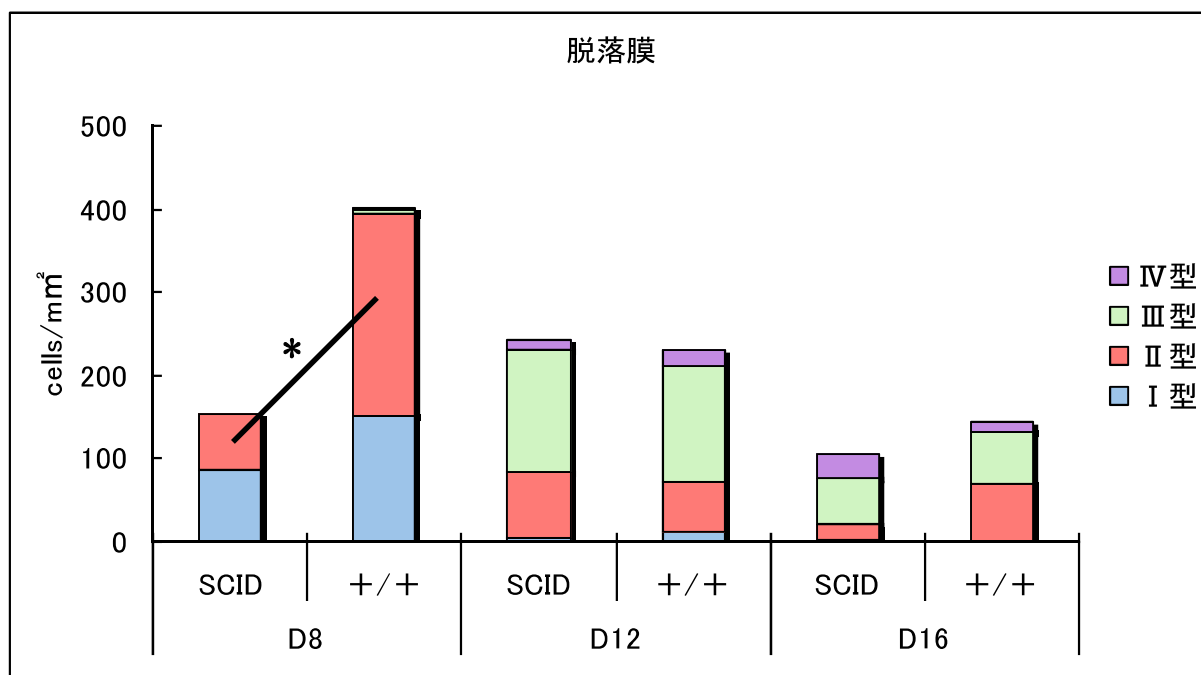
* : $P < 0.05$

mean \pm SD

図.1-6 脱落膜および間膜腺における分類型ごとの子宮 NK 細胞密度(cells/mm²)

妊娠 8 日目の脱落膜で、SCID マウスの II 型子宮 NK 細胞が有意に少ない。脱落膜でのその他の分類型、その他の妊娠日、および間膜腺での両妊娠日、全分類型で有意差は見られないものの、どちらのマウスにおいても妊娠日が進むにつれて I 型から II 型、II 型から III 型の占める割合が推移していく傾向がある。

図.1-6



* : $P < 0.05$

図.1-7 妊娠8日目のSCIDマウスおよび+/+マウスの脱落膜に分布するII型子宮NK細胞の光学顕微鏡観察(DBA染色)

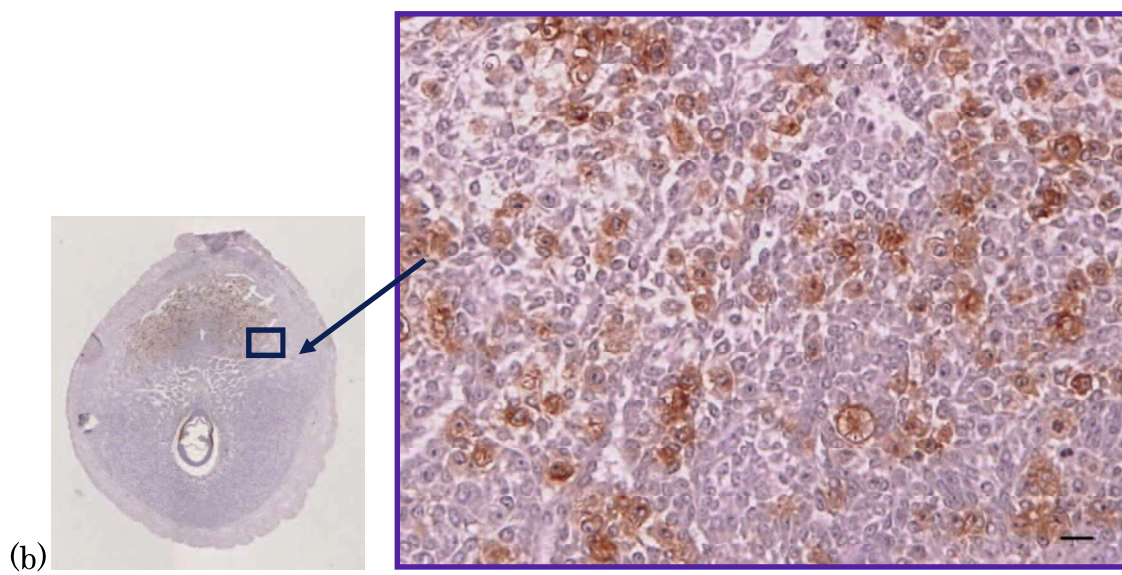
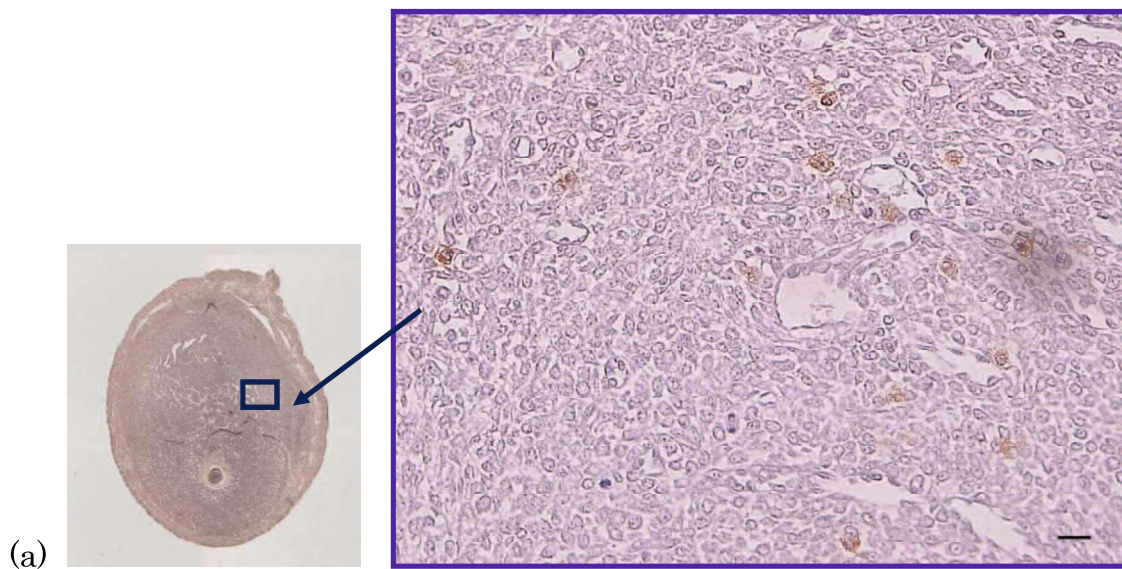
(a)SCID

(b)+/+

Bar : 20 μ m

間膜側の脱落膜全体において、II型子宮NK細胞は+/+マウスでは高密度で分布しているのに対して、SCIDマウスではまばらに分布している。また、+/+マウスではIII型、IV型子宮NK細胞もわずかに認められるが、SCIDマウスでは認められない。

图.1-7



第二章 胎盤形成期、完成期における LC3 ファミリーの発現

緒論

哺乳類の生殖戦略において、胎盤の形成はもっとも重要なプロセスである。胎盤は胎子の成長に応じて増大する栄養要求量に応えられるよう、限られた期間で、急速に増大していく。主にそれは母体側組織に胎子側組織である栄養膜細胞が浸潤し、脱落膜細胞へと侵略していくことで起こる。母体にとって半異物である胎子側組織が母体側組織に浸潤していく様はまさに腫瘍のようであるが、正常胎盤は腫瘍とは異なり適切な時期に適切な大きさへと成長し、母体へ浸潤しすぎるということはない。胎盤の成長、侵入を制御するメカニズムが存在するが、その全容はいまだ明らかになっていない。

腫瘍抑制因子のうちのもっとも有名なものの一つとして、p53 があり、腫瘍のうちの約 50%が p53 変異を起こしているといわれている (Bérout and Soussi., 2003)。p53 は腫瘍抑制以外にも DNA 修復、増殖、アポトーシス、オートファジーや老化といった様々な生理機序に関与し、正常組織でのホメオスタシス維持に貢献している (Crington et al., 2006; Donehower et al., 2009;

Feng et al., 2007)。 p53 は正常細胞において栄養膜細胞で発現していることが知られている(Marzusch et al., 1995)。また、p53 を欠損した子宮では、細胞老化が早まり早産が誘導され、この細胞老化は mTORC1 シグナル上昇によるオートファジーの抑制を介して起こる。(Hirota et al., 2011)

マクロオートファジー(以下オートファジー)は真核細胞内の細胞質内の恒常的なターンオーバーにおいて主要な役割を持つが、栄養欠乏状態での、細胞質内酵素やオルガネラの分解においても必要である。mTORC1 は栄養状態に応じたオートファジーの調節において重要な役割を担っている。mTORC1 はアミノ酸などの栄養シグナルによって活性化されるキナーゼであり、栄養が豊富な条件下におけるオートファジーの抑制に主要な役割を果たしている(Yang and Klionsky., 2010)。mTOR の抑制遺伝子として LKB1、AMPK が、活性化因子として PI3K、AKT が知られている。それとは別に p53 は DRAM を介して mTORC1 を経由することなく直接オートファジーを起こすことが出来る。栄養欠乏時、p53 は mTORC1 抑制を介してオートファジー亢進を引き起こす(Feng., 2010)。それにより栄養を補い、一時的にしのいでいるのであろう。胎盤での細胞成長は先に述べたように非常に活発である。栄養欠乏状態と似た状況になっているのではと我々は考えた。そうであるとするならば胎盤形成期、完成期などでも胎盤自身の栄養要求量の違いから、栄養欠乏の度合いも異なり、それに

よって起こるオートファジーにも違いが見られるかもしれない。

オートファジーの指標として、LC3がよく用いられる。Atg8の哺乳類ホモログであるLC3は、哺乳類で初めて見つかったオートファゴソーム膜結合蛋白質である。他のAtg蛋白質も隔離膜やオートファゴソーム膜に結合するが、LC3の結合は特に安定であるため、広くスタンダードマーカーとして使用されている(Kabeya et al., 2000)。RatLC3のヒトオルソログとして、LC3A,LC3B,LC3Cの3つが同定されている。これら3つのRatLC3のヒトホモログは、異なる組織で異なる発現パターンを示す。LC3AとLC3CはRatLC3と同様に翻訳後修飾を受け蛋白質断片となるが、LC3BはC末端分解をせず一つの形で存在する(He et al., 2003)。この報告はこれらのアイソフォームが重複する、または異なった役割を組織や細胞によって持っているということを示唆する。発現する組織や分子形態が異なることは分かっているが、それらの発現の違いが何を意味するのかは完全にはまだ明らかとなっていない。

本章では胎盤内でのLC3ファミリー、オートファジー関連因子の発現を見ることで、胎盤で働くオートファジーの目的、誘導経路、発現細胞の違いについて調査するとともに、栄養膜侵入制御機構へのオートファジーの関与の可能性についても検討した。

材料と方法

1) 実験動物

全ての実験は山口大学動物実験指針に基づき、アバーチンによる麻酔下で行った。ICR マウス(九動,佐賀)の未経産の成熟個体(8~12 週齢)を使用した。室温 22±2℃、明時間 12 時間、暗時間 12 時間、飼料および水は自由摂取という条件で飼育した。

2) サンプルリング

ICR 雄マウスとの同居後、膣栓が確認された日を妊娠 1 日(D1)とした。D12、D14、D16 にあたるマウスを解剖し、子宮、胎盤を採材した。左子宮角は形態学的解析に用いるため 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従いパラフィン包埋した。右子宮角からはそれぞれの胎盤を採材、胎盤迷路部(LZ)、基底脱落膜部(DB)、間膜腺部(MG)の 3 部位に分離し分子生物学的解析に用いた。

3) 免疫組織化学染色

上記のパラフィンブロックから 4µm の厚さの切片を作成した。その後、

MAP1LC3A (Q9H492, EPITOMICS, CA, U.S.A.)、MAP1LC3B (18725-1-AP, Proteintech, IL, U.S.A.)、MAP1LC3C (AP1804a, ABGENT, CA, U.S.A.)の抗体を用いて免疫染色を行った。LC3A 抗体に用いる切片においては脱パラフィン後 pH6.0 クエン酸バッファーを用いてのオートクレーブ処理によって抗原賦活化を行った。次に、全ての切片は内因性ペルオキシダーゼ処理のため 0.3% H_2O_2 /methanol で 30 分間処理後、10%正常ヤギ血清/PBS にて 30 分間ブロッキング処理を行った。それぞれの上記の抗体を 4°C で一晩、組織切片に結合させ、その後それぞれの切片をシンプルステイン MAX-PO(R) (424141, NICHIREI) に 30 分間反応させた。免疫反応は DAB (D006, DOJINDO, Kumamoto, JAPAN)によって視覚化された。細胞核はヘマトキシリンによって染色された。それぞれの抗体の希釈倍率を以下に示す。LC3A (1:100), LC3B (1:100), LC3C (1:100)

4) ウェスタンブロッティング

それぞれの領域における MAP1LC3A、MAP1LC3B、MAP1LC3C、p53 (sc-6243, Santa Cruz, TX, U.S.A.)の蛋白発現量はウェスタンブロッティングによって測定された。それぞれの領域の蛋白は Laemmli Sample Buffer (161-0737, Bio-RAD, CA, U.S.A.)を用いて抽出した。ウェスタンブロッティングに用いた

抗体は免疫組織化学染色に用いたものと同じである。抽出された蛋白は 8% または 15% ポリアクリルアミドゲルにより各分子量に分離し、Immobilon-P Membrane (ISEQ00010, MiLLipore Corporation, MA, U.S.A.)へと転写された。次に得られたメンブレンを PVDF Blocking reagent for Can Get Signal (NYPBR01, TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて 1 時間室温にてブロッキングを行った。4°C にて一晩上記の一次抗体を反応させ、その後それぞれに適した二次抗体 (Santa Cruz)を反応させた。Actin (sc-1616, Santa cruz)の発現量を内因性コントロールとして用いている。一次抗体と二次抗体はそれぞれ Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 and 2 (NKB-201, NKB301, TOYOBO)にて希釈した。それぞれの希釈倍率を以下に示す。LC3A (1:1500)、LC3B (1:2000)、LC3C (1:1000)、p53 (1:1500)、P70S6K (1:1500)、actin (1:4000)、二次抗体 (1:20000)。抗体に反応した蛋白は LAS3000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan)で ImmunoStar LD (296-69901, WAKO, Osaka, Japan)によって標識されたバンドとして同定された。

5)リアルタイム RT-PCR

それぞれのサンプルからのトータル RNA は ISOGEN II (311-073261, NIPPON GENE, Tokyo, Japan)を用いて抽出した。ReverTra Ace (TRT-101,

TOYOBO)により逆転写反応を行った。リアルタイム RT-PCR は Power SYBR® Green PCR Masater Mix (4267659, applied biosystems, CA, U.S.A.)、the Step One Real-Time PCR Systems (applied biosystems)を用いて行った。GAPDH を内因性コントロールとして用いた。使用したプライマーを以下に記す。

p53	Forward	TGCATGGACGATCTGTTGCT
	Reverse	TTCACTTGGGCCTTCAAAAAA
DRAM	Forward	TTGGATTGGTGGGATGCAT
	Reverse	GCACGGCTAACTCCTGGAAGT
mTOR	Forward	ACAGCCCGTCACAATGCA
	Reverse	GCTACCCGAATCAGCTCTTCA
MDM2	Forward	GGAGGAAACGCAGGACAAAG
	Reverse	CGATGGCATTTCAGGGAGAAG
LKB1	Forward	ACGGCCTGGAATACCTACACA
	Reverse	GTTGCCCGGCTTGATGTC
AMPK	Forward	TCGTGCCGCCCTTT
	Reverse	GGTCAGCATGCCACAAAA
AKT1	Forward	TCACGCCGCCTGATCAA
	Reverse	CGGCCTCCGCTCACTGT

PI3K	Forward	CGAGGGAGCAGGAACATCA
	Reverse	TGCGGCATAGACAGTGAAGTGA
GAPDH	Forward	CATGGCCTTCCGTGTTTCCTA
	Reverse	GCGGCACGTCAGATCCA

6) 統計学的解析

実験に使用したサンプル数はそれぞれ 3 ずつである。日齢間、部位間での三群間の比較において、Kruskall-Wallis 検定を用い p 値が 0.05 未満をもって有意差あり、0.1 未満をもって傾向がある、と判定した。

結果

<p53, LC3 ファミリー蛋白発現量の変化>

日齢間、部位間における蛋白発現量の変化を追った(図.2-1)。p53 について、部位間での比較において有意な差は見られなかったが、D12 においては DB で高い傾向にある。D14,D16 では部位間での差は見られない(図.2-1a)。日齢間ではすべての部位で差が見られなかった(図.2-1b)。

次にLC3ファミリーそれぞれについても同様に発現量の変化を追った。LC3Aについて、全日齢においてDBでの発現が有意に高い(図.2-1c)。日齢間の比較ではLZにおいてD14での発現が有意に高いが、DB, MGでは差が見られなかった(図.2-1f)。

LC3Bは部位間の比較ではD12でのDBが有意に高く、D16のLZでは低い傾向が見られた。D14において差は見られない(図.2-1d)。日齢間の比較ではLZ, DB, MGの全ての部位においてD14で増加する傾向が見られた(図.2-1g)。

LC3Cについては、D14でのMGが有意に低いD12, 16では差が見られない(図.2-1e)。日齢間の比較ではD14において、LZでは有意に低く、MGでは低い傾向にある。DBでは統計では差が見られないが、D14で低くなる傾向があるように見える(図.2-1i)

<オートファジー関連因子 mRNA 発現量の変化>

上述の蛋白発現量の変化と同様に、各オートファジー関連因子の mRNA 発現量についても部位間、日齢間での変化を追った。(図.2-2)

p53について、D16でMGが高い傾向が、DBにおいてはD14で高い傾向が見られた(図.2-2a,c)。DRAMにおいては、部位間の比較においてD12のMGで高い傾向、D14のDBで高い傾向、D16ではD14とは逆にDBで低い傾向が見

られた。日齢間の比較では LZ で日齢が進むにつれ上昇する傾向に、DB では D14 で有意に高くなった(図.2-2b,d)。

LKB1 では D16 で LZ が高い傾向が、DB で D14 が高い傾向が見られた(図.2-2e,g)。AMPK では D16 で DB が低い傾向が見られ、DB では D14 で有意に高いという結果が得られた(図.2-2f,h)。

PI3K では D14 で LZ が高い傾向、D16 では LZ での発現が有意に高い。日齢間の比較では LZ での D12 が低い傾向にある(図.2-2i,k)。AKT1 に関しては、D12,16 で LZ が高い傾向に、DB では D12 で低い傾向が見られた(図.2-2j,l)。

<LC3 ファミリーの局在性>

免疫組織化学染色により、各 LC3 ファミリーの局在性を追った。各細胞、細胞層ごとに染色性を判断し評価した(図.2-3)。細胞質内での染色をもって陽性、陰性を判断している。栄養膜合胞体層では LC3A,B,C すべてで陽性を示した。海綿状栄養膜細胞では LC3A は全日齢を通して染まらないが、LC3B は D14 で陰性の細胞もわずかに見られたが、全日齢で陽性となった。LC3C は D12,16 で陽性、D14 で陰性であった。栄養膜巨細胞においても LC3A は陰性である。LC3B では全体として陰性だが、D14 において陽性の細胞も見られた。LC3C は全日齢を通して陽性である。脱落膜細胞は LC3A,B,C すべてが陽性である。間膜腺

間質については LC3A ではまばらに陽性であり、LC3B では全体的に陽性であった。LC3C に関しては D12,16 では陽性だが、D14 では陰性であった。子宮 NK 細胞については LC3A,B,C すべてで陰性を示した。

考察

p53 について、D12 で DB が高い傾向にあったが、日齢間での比較では差はなかった。このことから、p53 は栄養膜侵入制御機構には関与していないものと思われる。DB での上昇は、後述する脱落膜細胞の腫瘍原性を抑えるために働いていると推測する。

LC3 ファミリーについては、D14 の LZ において A,B で増加、C で減少という、興味深い結果が得られた。HIF-1 α がオートファジーの増加によりトロフォブラストの侵入能を減少させるという報告があり (Choi et al., 2012)、D14 における栄養膜細胞の侵入制御にオートファジーが関わっていることを示唆する。

LC3C で見られた D14 での減少については、ABC 間での代償的な機構が働いた結果なのかも知れない。また、DB, MG でもみられた LC3B の D14 での上昇、LC3C の減少も、D14 にて起こる侵入制御機構に関与している可能性がある。

部位間の比較により、LC3A の発現が DB で強く見られた。LC3A は乳がん組織において乳腺細胞よりも強く発現しているという報告や(Othman et al., 2009)、LC3A の発現が腫瘍抑制に重要であるという報告がある(Bai et al., 2012)。これらのことから、LC3A は腫瘍抑制に関与していることが考えられる。また、脱落膜で LC3A を強く発現することで、栄養膜細胞の過剰な侵入を防いでいるのではないだろうか。また、脱落膜細胞が元来、腫瘍化のリスクが高い細胞で、それを抑えるために LC3A を発現している可能性もある。

今回見られた D14 での LC3 発現量の変化が、どの経路によって誘導されたオートファジーによるものかを明らかにするため、リアルタイム RT-PCR を用いて各因子の mRNA 発現量を測定した。p53,DRAM が D14 での DB において有意に高い、または高い傾向にあることから、p53-DRAM 経路が D14 の DB で見られる LC3 の発現変化に関与していることが示唆された。LKB1,AMPK についても、DB での日齢間比較において D14 で発現が有意に高い、または高い傾向にあるため、LKB1,AMPK 経路によるオートファジーの関与も示唆される。この経路は栄養欠乏により活性化され誘導される経路である。そのため、D14 での栄養膜侵入制御機構について、胎子栄養要求量の増大がトリガーとなっている可能性が高い。D16 で見られる DB 発現の低下傾向は、D14 にて起こしたオートファジーを抑えるために起こったのかもしれない。オートファジーを抑制

する方向に働く経路の因子である AKT1,PI3K については、部位間の比較において両因子ともに LZ にて高い傾向にある。この経路は IGF1 といった成長因子によって誘導される。日齢間での有意な差は見られないため栄養膜侵入制御機構に関与しているとは言い難いが、栄養膜の成長、分化に関与している可能性が高い。

免疫染色組織化学染色によって明らかとなった、細胞による LC3 発現の違いは、それぞれの細胞の代謝、機能、cell cycle を反映した結果であろうと推察する。だが、これら ABC の染色性の違いが具体的に何を意味するのかはまだ明らかではない。ただ、今回免疫染色によって胎盤を構成する各細胞においても LC3 ファミリーによって染色性が大きく異なることが明らかとなった。それぞれの細胞によって起こるオートファジーの目的や誘導経路が異なることが推察される。各栄養膜細胞において染色性に違いが見られたことは、各細胞におけるオートファジーの違いを反映しているのかもしれない。それぞれの栄養膜細胞の機能的違いはまだ不明な部分も多いが、海綿状栄養膜細胞における LC3B,LC3C の D14 での染色性の低下、また栄養膜巨細胞の LC3B の D14 での陽性細胞の存在は、これらの細胞が栄養膜侵入制御においてオートファジーを介した反応を起こしていることを示唆している。栄養膜合胞体層、脱落膜細胞での発現が LC3A,B,C のすべてで全日齢を通して観察されたことは、胎盤においてこれらの

細胞でオートファジーが重要であることを示唆している。栄養膜侵入制御機構において、胎子側胎盤、母体側胎盤の両方でのクロストークの存在が強く示唆される。間膜腺間質でも LC3 ファミリーの発現が見られることから間膜腺の退行にオートファジーが関与していることが伺えるが、子宮 NK 細胞では発現が見られなかった。子宮 NK 細胞の成長、退行にオートファジーはそれほど関与していないのではないだろうか。

小活

本章は胎盤形成期から完成期における LC3 ファミリー発現量の変化を明らかにし、D14 において LC3A,B が増加し、LC3C が減少すること、それらの変動にオートファジー関連因子が関与していること、胎盤を構成する細胞に LC3 ファミリー発現において差があることを明らかにした。栄養膜侵入制御機構にオートファジーが関わっている可能性が考えられる。

付図

図.2-1 各日齢、各部位での p53,LC3A,LC3B,LC3C の蛋白発現量の比較

Western blotting により、p53,LC3A,LC3B,LC3C の蛋白量の発現変化を調べた。

各日齢、各部位における 3 群で Kruskal-Wallis 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差

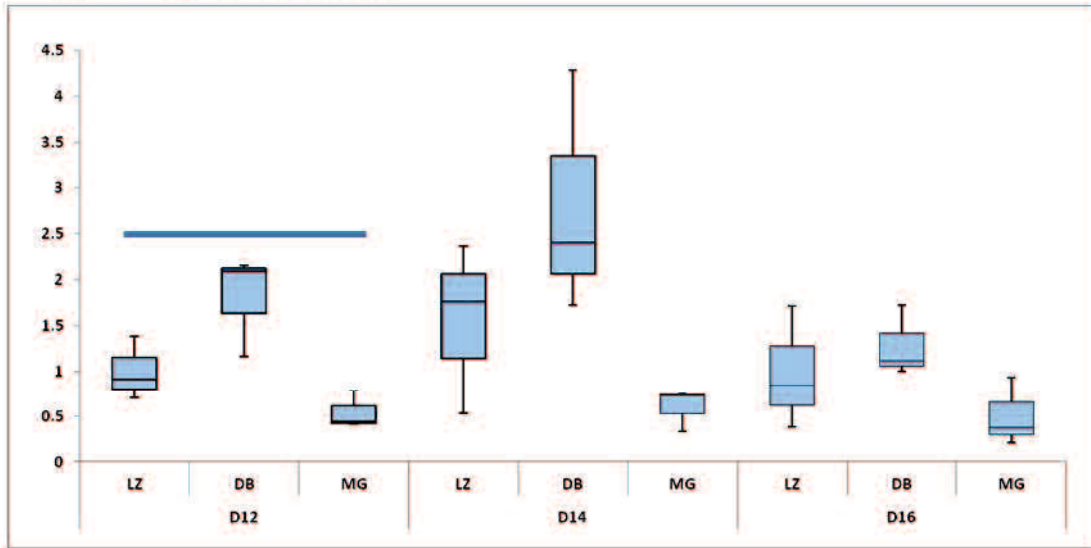
あり(赤線)、 $p < 0.1$ を差がある傾向にある(青線)とした。D12 の LZ での発現量

の平均を 1 として、相対発現量を示した。LZ : 迷路部、DB : 脱落膜部、MG :

間膜腺部 n=3

圖.2-1

a) p53 部位間比較



b) p53 日齡間比較

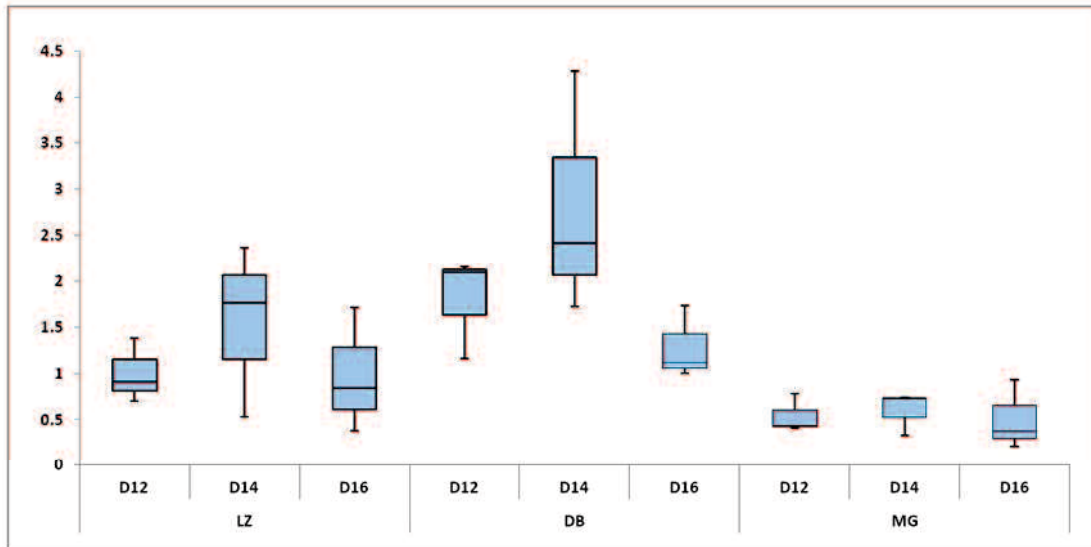
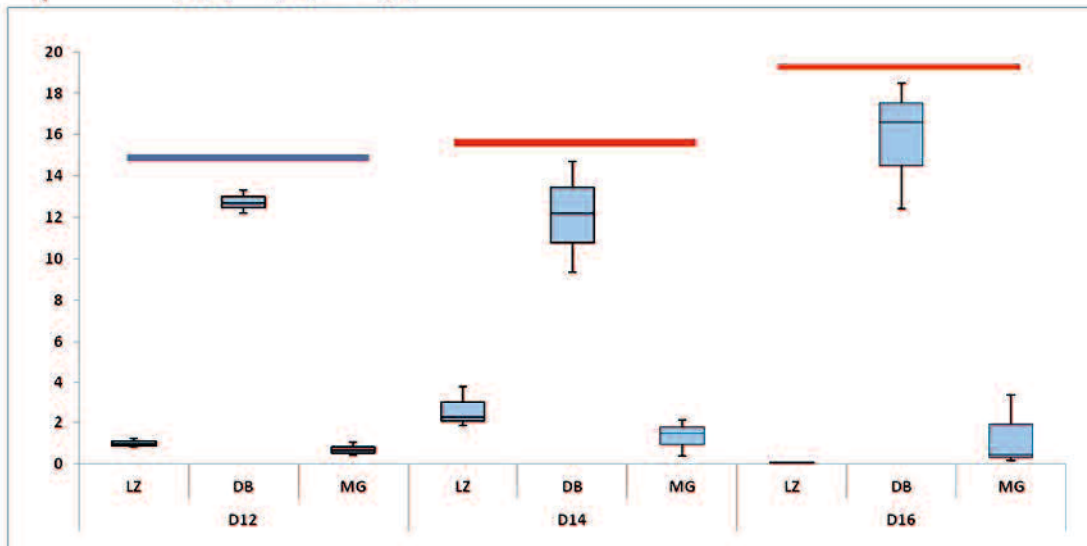
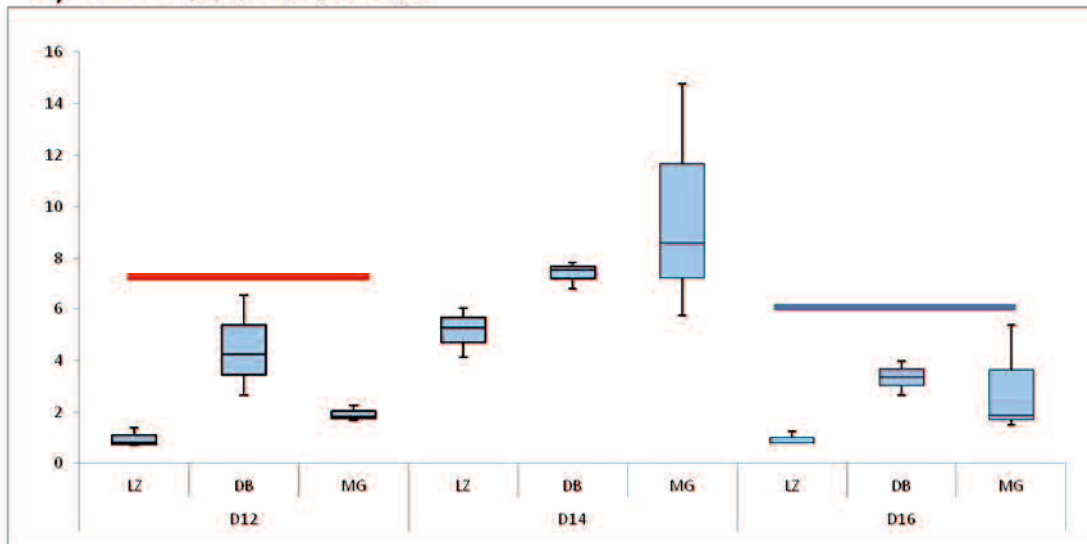


圖.2-1

c) LC3A 部位間比較



d) LC3B 部位間比較



e) LC3C 部位間比較

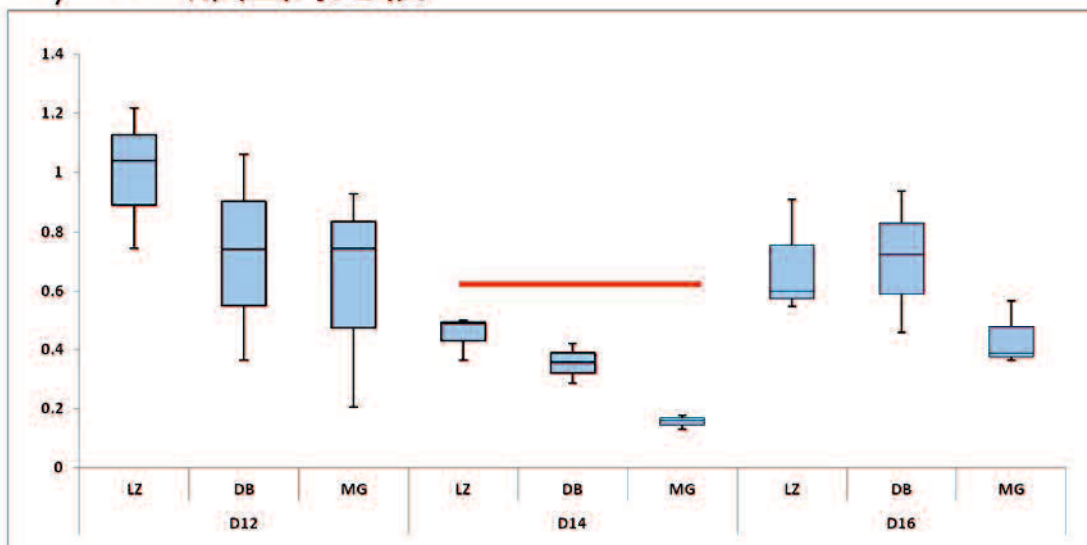
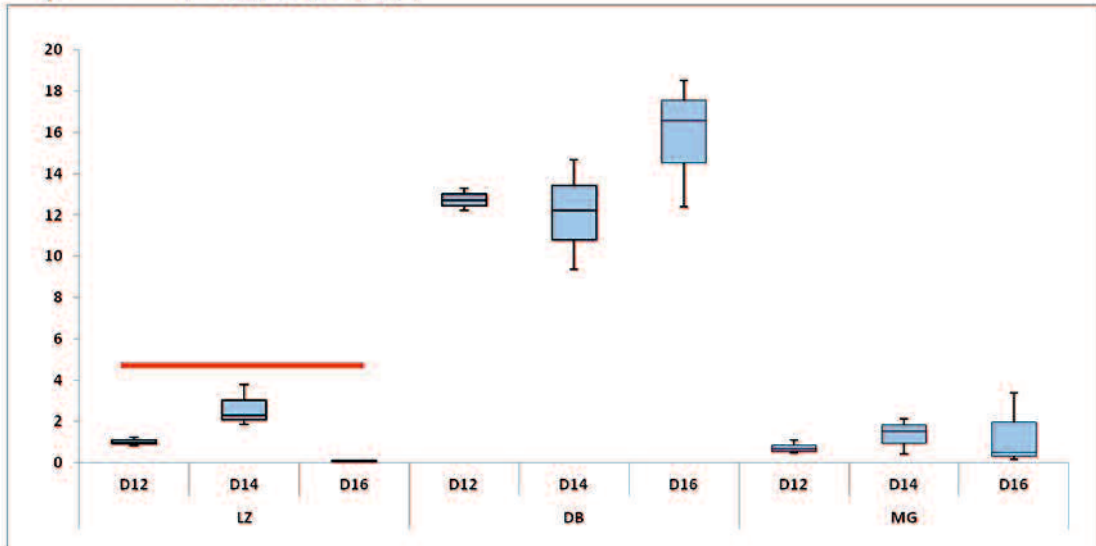
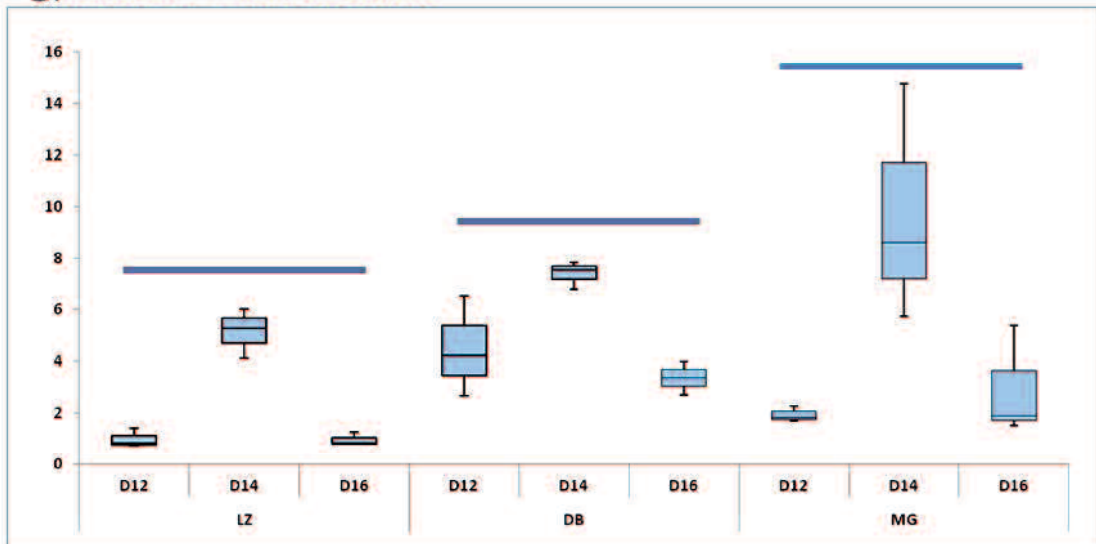


圖.2-1

f) LC3A 日齡間比較



g) LC3B 日齡間比較



h) LC3C 日齡間比較

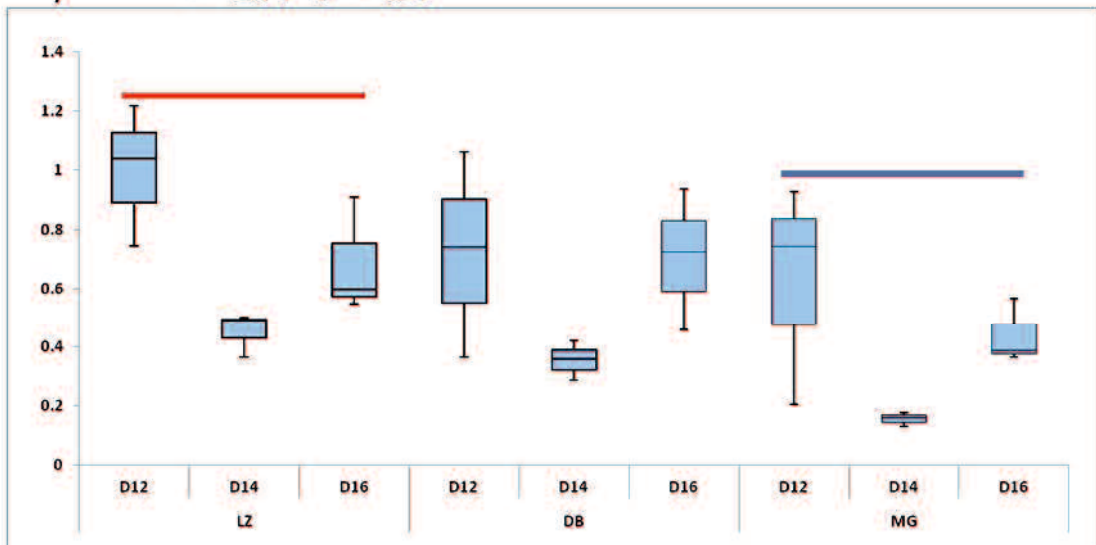
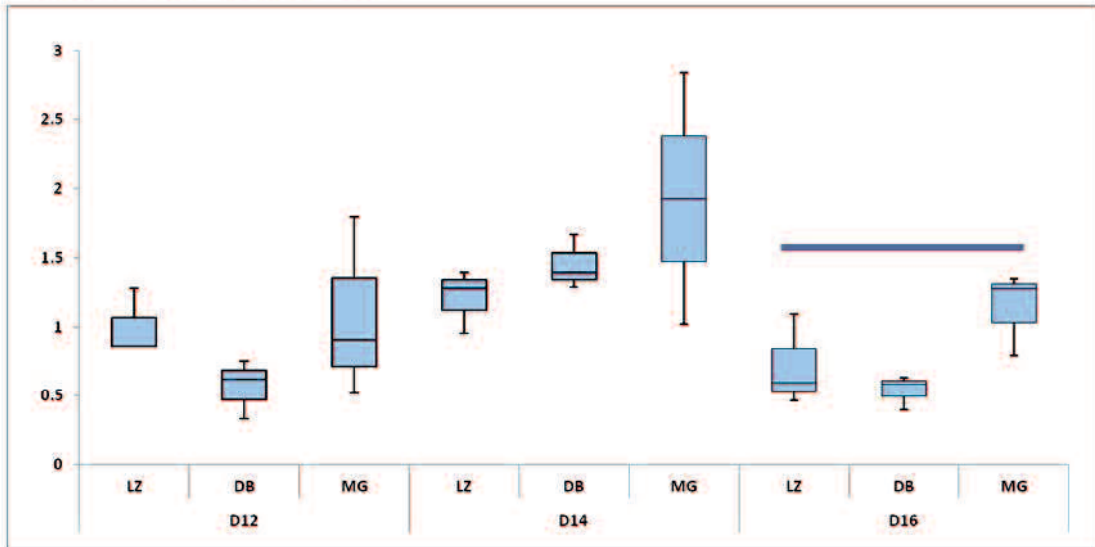


図.2-2 各日齢、各部位でのオートファジー関連因子の mRNA 発現量の比較

Real time RT-PCR により、p53,DRAM,LKB1,AMPK,PI3K,AKT1 の mRNA 量の発現変化を調べた。各日齢、各部位における 3 群で Kruskal-Wallis 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差あり(赤線)、 $p < 0.1$ を差がある傾向にある(青線)とした。D12 の LZ での発現量の平均を 1 として、相対発現量を示した。LZ : 迷路部、DB : 脱落膜部、MG : 間膜腺部 n=3

図.2-2

a) p53 部位間比較



b) DRAM 部位間比較

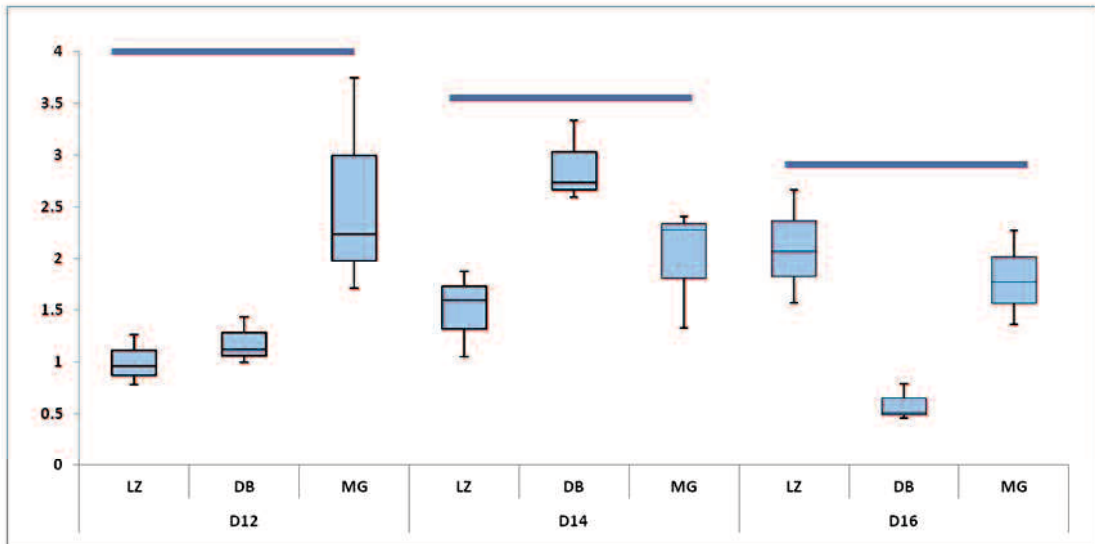
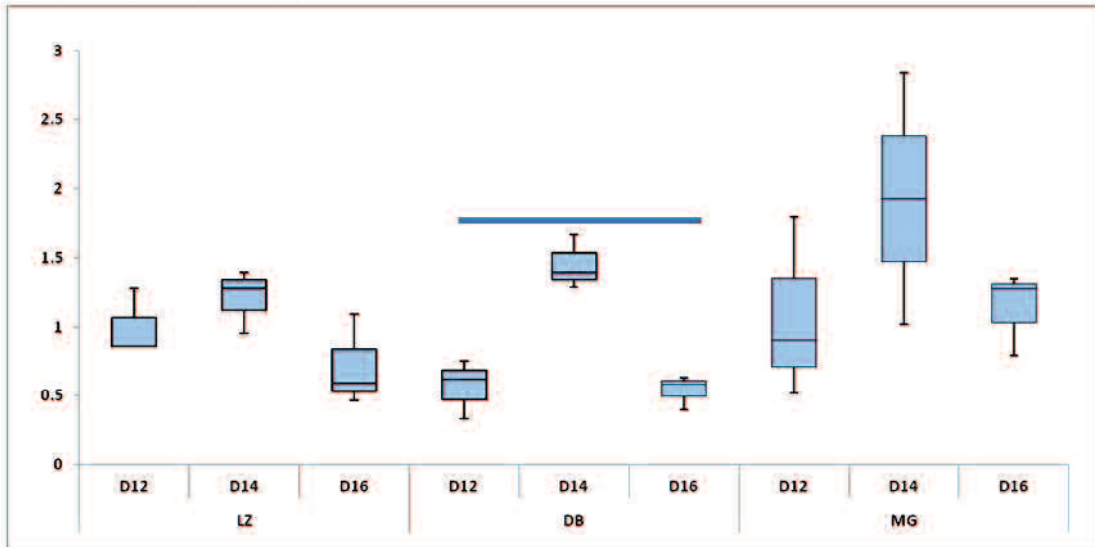


図.2-2

c) p53 日齡間比較



d) DRAM 日齡間比較

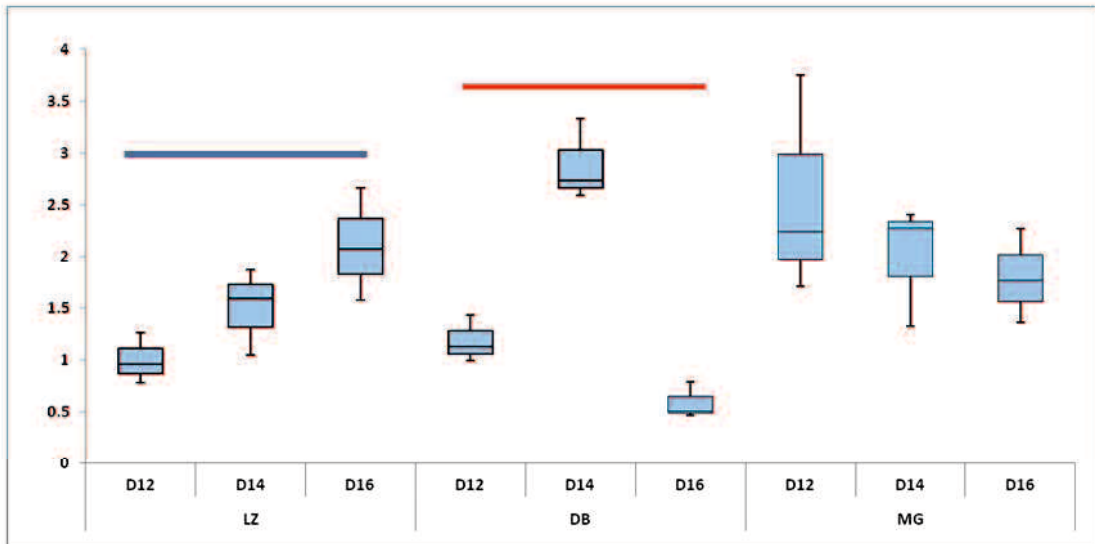
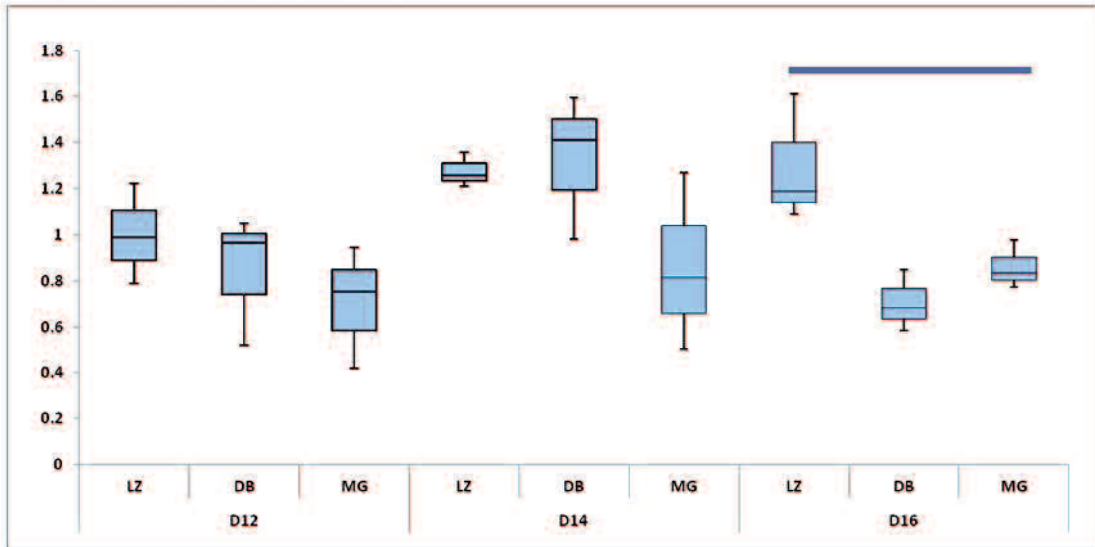


図.2-2

e) LKB1 部位間比較



f) AMPK 部位間比較

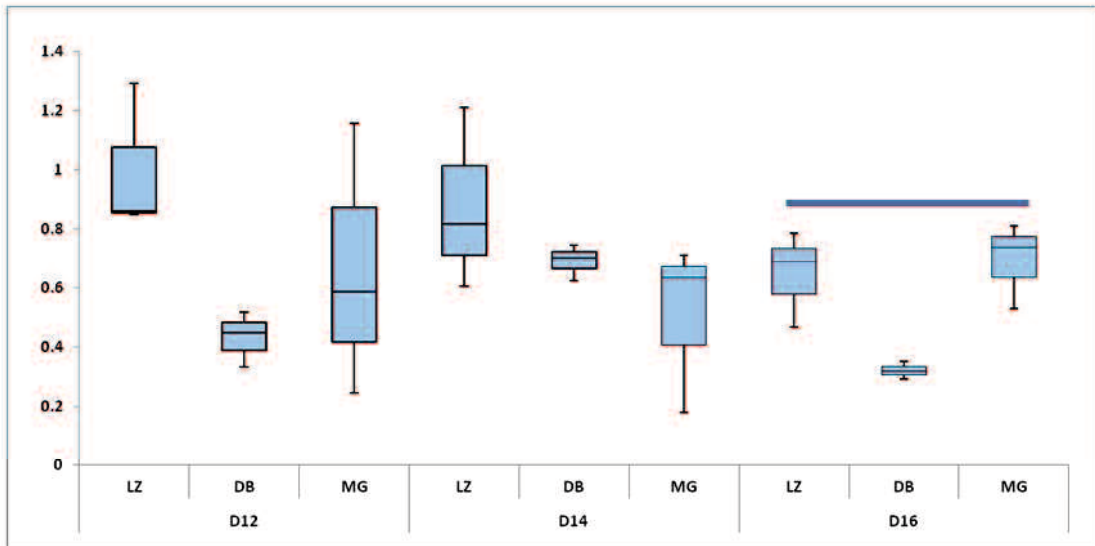
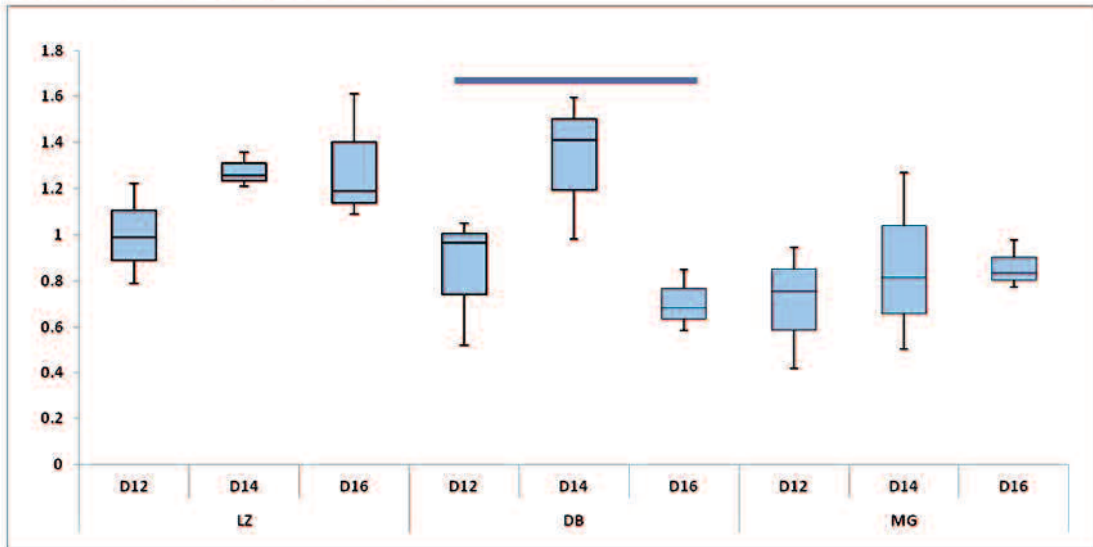


図.2-2

g) LKB1 日齡間比較



h) AMPK 日齡間比較

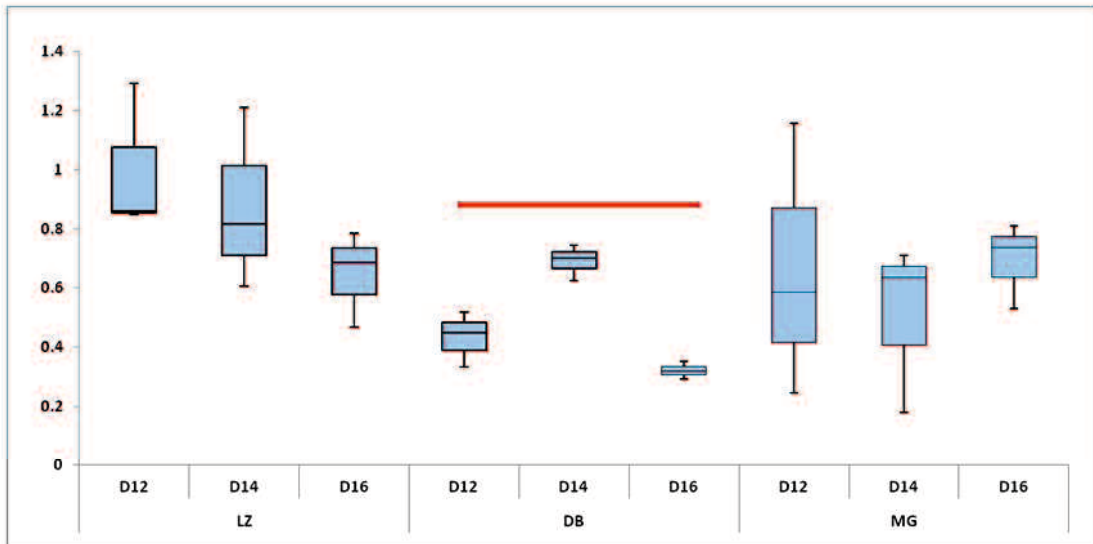
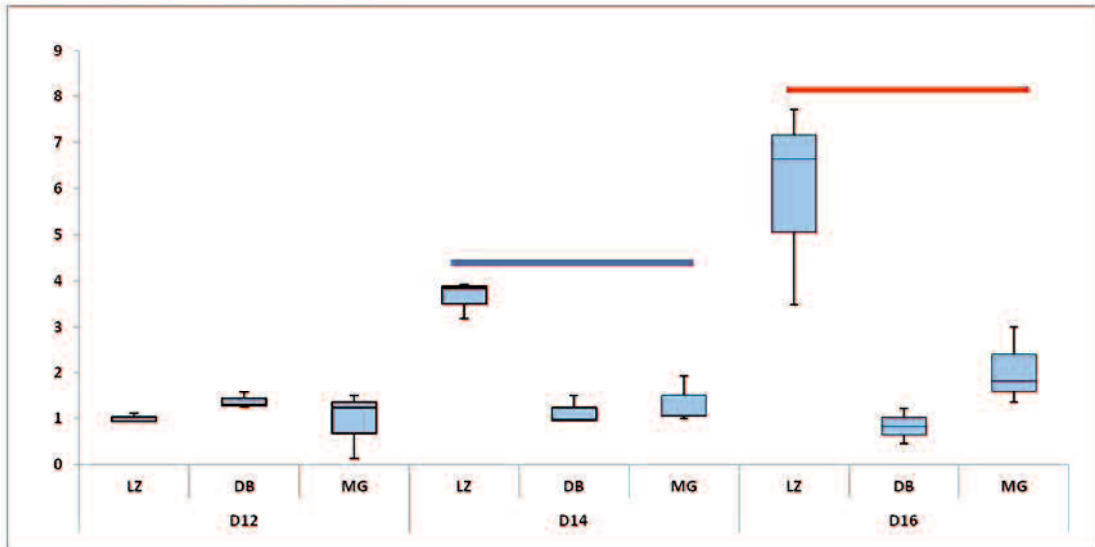


図.2-2

i) PI3K 部位間比較



j) AKT1 部位間比較

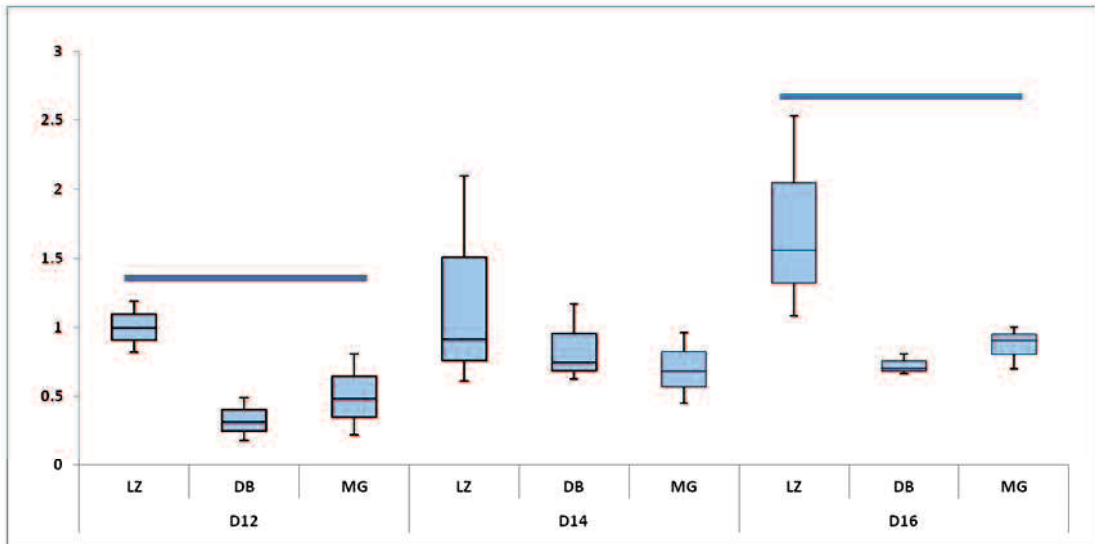
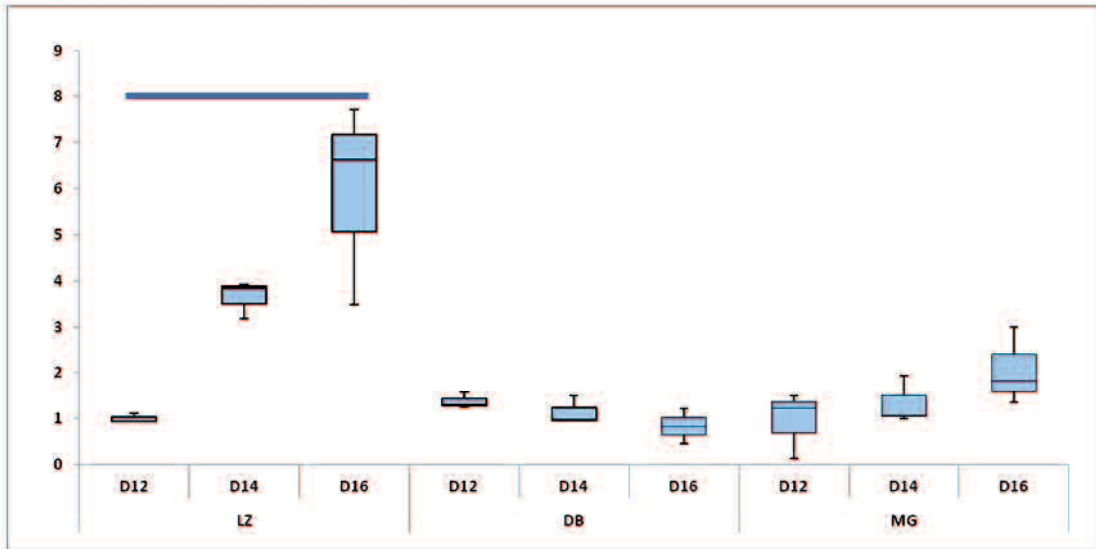


図.2-2

k) PI3K 日齢間比較



l) AKT1 日齢間比較

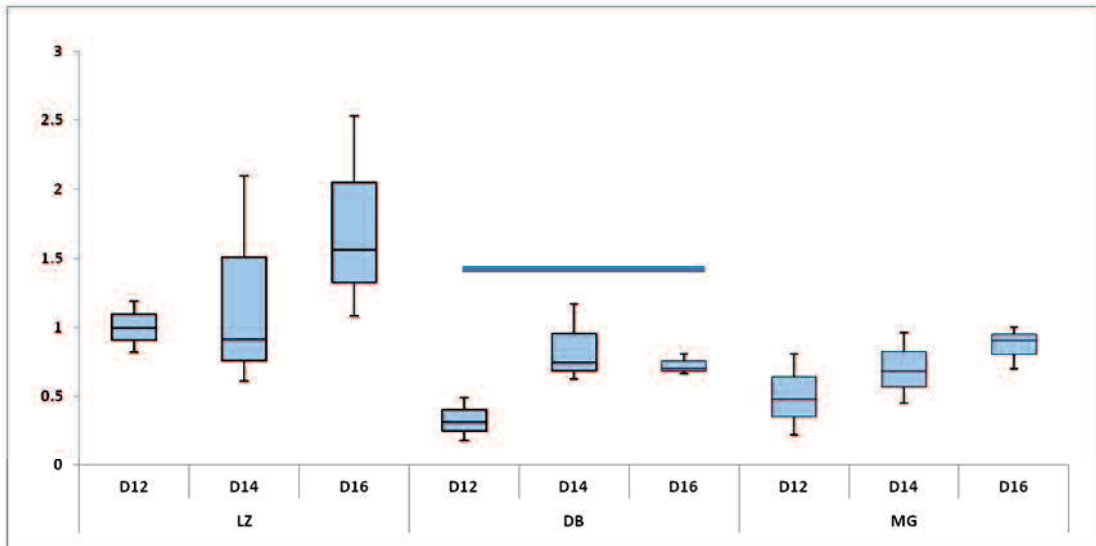
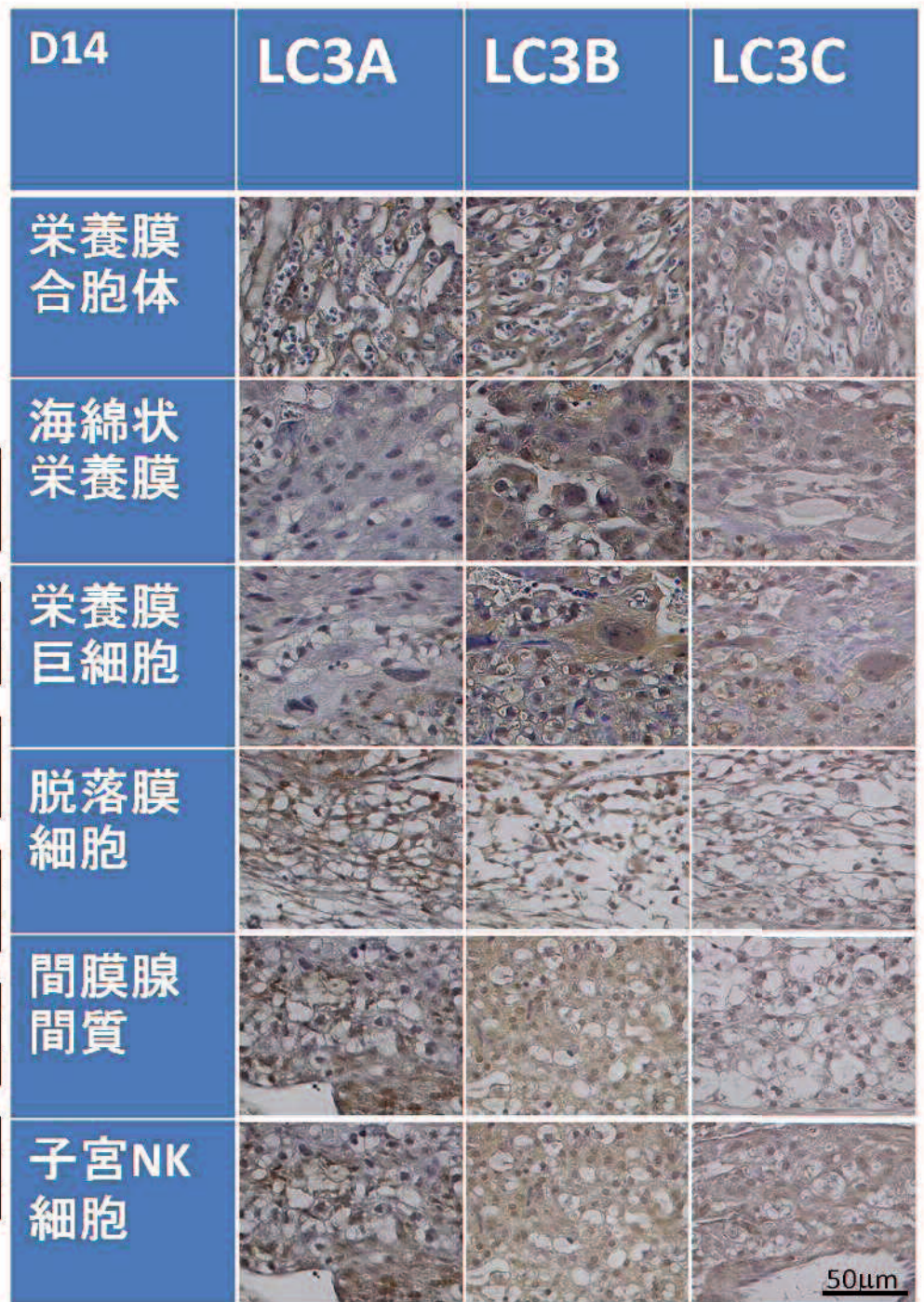


図.2-3 LC3A,LC3B,LC3C 抗体を用いた免疫組織化学染色

免疫組織化学染色により、LC3A,LC3B,LC3C の胎盤内での局在性を調べた。細胞質内に主に発現しているものを陽性と判断し、陽性であるものを+、陽性細胞と陰性細胞の両方が散見して見られるものを+/-、陰性のものを-として表にまとめた。各日齢の中から代表として D14 の切片を示す。

図.2-3

	A	B	C
栄養膜合体層			
D12	+	+	+
D14	+	+	+
D16	+	+	+
海綿状栄養膜細胞			
D12	-	+	+
D14	-	+/-	-
D16	-	+	+
栄養膜巨細胞			
D12	-	-	+
D14	-	+/-	+
D16	-	-	+
脱落膜細胞			
D12	+	+/-	+
D14	+	+	+
D16	+	+/-	+/-
間膜腺間質			
D12	+/-	+	+
D14	+/-	+	-
D16	+/-	+/-	+
子宮NK細胞			
D12	-	-	-
D14	-	-	-
D16	-	-	-



第三章 栄養飢餓における胎盤内 LC3 ファミリー発現の動態

緒論

本論文の二章での我々の研究は LC3A の発現が脱落膜で胎盤形成期、完成期において特に強く見られること、また、D14 で LC3 ファミリーの発現に変化があることを明らかとし、それによりオートファジーの胎盤形成、栄養膜侵入制御機構への関与が示唆された。しかし、LC3 ファミリーの変動があること、ABC それぞれが異なる発現を示すことは明らかとなったものの、それらの違いが何を意味しているのかは明らかとできていない。

オートファジーを引き起こす因子には様々なものがあるが、もっとも主要な経路は栄養飢餓である。哺乳類細胞ではアミノ酸やインスリンの欠乏、酵母では窒素の欠乏がオートファジーを誘導することがよく知られている。これらのシグナルは mTOR の抑制によりオートファジーを誘導する。P70S6K は翻訳を調節するキーレギュレーターであり、mTOR のターゲットとしてもっともよく知られているキナーゼである(Brown et al., 1995)。P70S6K は mTOR の指標として広く実験に用いられている。

マウス個体を絶食させると多くの組織でオートファジーの活性化が観察されるが(Mizushima et al., 2004)、胎盤ではどうだろうか。胎盤において重要な役目である栄養供給が母体の栄養欠乏等で困難になった時、胎盤はオートファジーを起こし栄養を胎子へ供給したりするのであろうか。母体が栄養欠乏状態となっても、可能な限り胎子に栄養を供給しようとすることは考えることである。

本章では mTORC1 経路が抑制されオートファジーが活性化された胎盤ではどのような変化が起こるのかを明らかにすることを目的とする。通常妊娠、または絶食状態のマウス胎盤を用い、両胎盤での MAP1LC3 ファミリーの発現を見ることで、胎盤で働くオートファジーの誘導経路、発現細胞の違いが見られるかどうかを比較検討した。

材料と方法

1) 実験動物

全ての実験は山口大学動物実験指針に基づき、アバーチンによる麻酔下で行った。ICR マウス(九動,佐賀)の未経産の成熟個体(8~12 週齢)を使用した。室温

22±2℃、明時間 12 時間、暗時間 12 時間、飼料および水は自由摂取という条件で飼育した。

2) サンプルング

対照群は第二章にてサンプルングし得られたマウス組織を用いて実験を行った。絶食群は対照群と同様に、ICR 雄マウスとの同居後、膣栓が確認された日を妊娠 1 日(D1)とした時 D12,D14,D16 にあたるマウスを解剖し、子宮、胎盤を採材、サンプルングを行った。絶食群においては、採材 2 日前より食餌を取り上げることで絶食させ、実験を行った。

3) 胎子胎盤重量測定

D12,14,16 にあたるマウスから得られた胎子、胎盤重量を測定した。胎子重量は臍帯を切断し胎子を胎盤から切り離した後、羊膜を除去して測定した。胎盤重量については LZ,DB を分離する前に重量を測定した。

4) 免疫組織化学染色

5) ウェスタンブロッティング

6) リアルタイム RT-PCR

これら 3 つの実験については、第二章で記述した実験方法と同様に実験を行った。ウエスタンブロッティングにおいては第三章で新たに P70S6K (bs-3948R, Bioss, MA, U.S.A)抗体を用いて実験を行った(希釈倍率 1:1500)。

7) 統計学的解析

実験に使用したサンプル数はそれぞれ 3 ずつである。ウエスタンブロッティング、リアルタイム RTPCR の結果における対照群、絶食群の二群間の比較においてのデータの解析は Mann-Whitney U 検定を用いて p 値が 0.05 をもって有意差ありとした。

胎子、胎盤重量の比較検定に用いた例数を図 3-1 に示した。得られた結果は平均値±標準誤差で示し、F 検定を用い母分散の比を検定し、等分散の場合は student-t 検定を、非等分散の場合は Welch の検定を用いて有意差判定を行い、p 値が 0.05 未満をもって有意差ありと判定した。

結果

<胎子、胎盤重量の比較>

対照群、絶食群での胎子、胎盤重量を各日齢において比較した(図.3-1)。D12では、胎子重量、胎盤重量の両方において絶食群の方が有意に低い。D14では胎盤重量は絶食群の方が有意に低いが胎子重量は両群において差はなく、D16では胎子重量も胎盤重量も有意な減少、増加は見られなかった。

<絶食による LC3A,B,C 発現量の変化>

絶食により LC3 ファミリーの蛋白発現量に変化が起こるかどうかを観察した(図.3-2)。絶食により P70S6K の有意な減少が見られ、これにより絶食によって胎盤でも mTOR の抑制を介するオートファジーが起こっていることを確認した。絶食による P70S6K の減少は全日齢、全部位で有意に起こっている(図.3-2a)。

LC3A について、D14 の DB、MG、D16 の LZ で絶食による増加が有意に見られた。それ以外では有意な差は見られなかった(図.3-2b)。LC3B については、P70S6K と同様に全日齢、全部位において絶食による変化が観察され、有意な増加が見られた(図.3-2c)。LC3C では D12 の全部位、D14 の DB、MG では有意な増加が見られるのに対し、D16 では全部位で有意な減少が見られた(図.3-2d)。

<絶食によるオートファジー関連因子 mRNA 発現量の変化>

各オートファジー関連因子の mRNA 発現量の絶食における変化を追った(図.3-3)。

p53 について、D12 の全ての部位、D14 の DB、MG、D16 の DB、MG において絶食による有意な増加が見られた(図.3-3a)。DRAM においては、D12 の全ての部位、D14 の LZ、D16 の DB で有意に増加した(図.3-3b)。

LKB1 では、D12 の DB、MG で有意な増加が、D14 の LZ、D16 のすべての部位で有意な減少が見られた(図.3-3c)。AMPK は D12 の LZ、DB で有意な増加、D16 の LZ、DB で有意な減少が見られた(図.3-3d)。

PI3K については D12 の全ての部位、D14 の LZ、DB で有意な増加が見られた(図.3-3e)。AKT1 では D12 の LZ で有意な増加が見られ、D14 の DB、D16 の MG で有意な減少が見られた。それ以外の部位では有意な変化は見られなかった(図.3-3f)。

<絶食による LC3 ファミリーの局在性の変化>

免疫組織化学染色により、各 LC3 ファミリーの局在性が絶食によって変化したかどうかを追跡した。各細胞、細胞層ごとに染色性を判断した(図.3-4)。栄養膜合胞体層において、LC3B、LC3C は特に変化がみられなかったが、絶食により LC3A の発現が消失した(図.3-5a-f)。また、通常胎盤では見られていた栄養膜

巨細胞の LC3C 発現も絶食により消失した(図.3-5 g,h)。子宮 NK 細胞においては、通常胎盤では LC3A,B,C すべて染まらなかったが、絶食群の D12,16 において LC3B の発現が観察された(図.3-5 i,j)。

考察

絶食により D12 では胎子重量、胎盤重量の両方が減少し、D14 では胎盤のみ、D16 では差が見られなかったことが明らかとなった。この違いは、各日齢による胎盤の栄養要求量の違いにより生じたものと思われる。D10-12 では胎盤の成長が著しく激しいため栄養要求量は高く、それに対し D14-16 では胎盤はほぼ完成しており、胎盤形成期に比べ栄養要求量は低い。胎盤重量が D12、D14 では絶食により有意に減少するのに対し、D16 において差が見られないのは胎盤が栄養欠乏よりも先に完成していたことが原因ではないだろうか。D12 で胎子、胎盤の両方が有意に減少したのは、栄養欠乏により胎盤形成が不完全であり、それにより胎子への栄養供給が不足したことが考えられる。D14 において胎盤は有意な減少を示したものの、胎子重量には有意な差は見られない。もしかすると胎盤の成長と胎子の成長を天秤にかけた結果、胎子への栄養供給を優先し

栄養を胎子に集中することで胎子の成長を維持したのかもしれない。

絶食により D14 の DB, MG で LC3A の発現上昇が起こった。二章でも述べた通り、LC3A は乳がん組織において乳腺細胞よりも強く発現しているという報告や(Othman et al., 2009)、LC3A の発現が腫瘍抑制に重要であるという報告がある(Bai et al., 2012)。これらのことから、LC3A は腫瘍抑制、または腫瘍形成に関与していることが考えられる。オートファジーは腫瘍に関して、腫瘍抑制、腫瘍生存のどちらにも働く(Inami et al., 2011; Yang et al., 2011)。細胞は飢餓に陥ると、緊急的にオートファジーを活性化することで自己の一部を分解しエネルギーを回収する(Mizushima et al., 2008)。このような生存維持装置としてのオートファジーが腫瘍生存に有利に働いていると考えられるが、今回栄養飢餓状態に強く反応したのはLC3BでありLC3Aではない。このことから考えると、LC3A は二章で考察した通り、腫瘍抑制に関わっているのではないだろうか。栄養膜合胞体層で見られた絶食による LC3A の喪失は栄養欠乏により胎盤成長が遅れたため、オートファジーによる栄養膜侵入のブレーキを解いたのかも知れない。

飢餓実験により P70S6K の減少が起こり、これにより mTOR の不活性化が確認された。これと相関して、絶食により LC3 ファミリーの中で LC3B が特異的に発現上昇を見せた。このことより、絶食刺激によって起こる mTORC1 抑制に

よるオートファジーは LC3B を介して起こることが示唆される。グルコース欠乏が初期栄養膜細胞で LC3B の有意な増加を引き起こすことや(Hung et al., 2013)、子宮内胎子発育遅延を起こしている女性は通常妊娠女性と比べて LC3 蛋白レベルが高いことが報告されている(Hung et al., 2012)。これらの報告は栄養欠乏が LC3B を上昇させるという、今回の我々の実験結果を支持する。しかしこれら LC3B 上昇は DRAM 上昇とも関連しており、mTORC1 抑制によるオートファジーを介していない。今回の我々の実験では DRAM は D12 で絶食させた際に強い発現上昇が見られたものの、D14,16 では目立った上昇は見られなかった。DRAM 上昇からのオートファジーに LC3B が関与していることに疑問はないが、我々の結果は mTORC1 の抑制から誘導されるオートファジーは LC3B が仲介するという仮説を支持する。D12, D16 での絶食群で観察された子宮 NK 細胞での LC3B 発現についても、栄養飢餓によるオートファジーの可能性が考えられる。子宮 NK は通常 Fas/Fas リガンドを介するアポトーシスによって退行することが知られているが(Delgado et al, 1996)、栄養飢餓においてはオートファジーも介することが示唆される。

絶食によって、LC3C は D12、D14 で発現上昇を示すが D16 では減少した。オートファジーは細菌などの病原体の侵入を感知して活性化し、それらの分解を行うことが知られており(Sumpter and Levine., 2010)、LC3C は抗細菌性の

オートファジーに不可欠であるという報告がある(Kim et al., 2013; Von Muhleinen et al., 2013)。有意な差ではあるものの、LC3A や LC3B の変化に比べて、LC3C の変化は僅かである。LC3C は主に抗細菌性のオートファジーを仲介するものであり、LC3C は胎盤成長、または栄養欠乏において、重要な役割を持たないのかもしれない。もちろん、LC3C が他の LC3 ファミリーの働きを補うために代償機構として働いていた可能性は十分にある。

栄養飢餓の際に mTORC1 を制御する主要なシグナル経路としてインスリン、アミノ酸、グルコースの 3 つがある(Zoncu et al., 2011)。インスリン受容体が刺激を受けると PI3K を介して AKT が活性化される。AKT は TSC2 をリン酸化し活性を抑制し、結果として mTORC1 の活性を亢進する。今回、D12 の絶食により PI3K、 AKT1 の上昇が確認された。このことから、この経路は絶食条件下の D12 胎盤での mTORC1 発現に関与した可能性が示唆される。しかし全体的な遺伝子発現の結果としては、mTORC1 の抑制へと働いているようである。AKT1 は FOX3 を抑制することで細胞成長を促進するため(Brunet et al., 1999)、胎盤内ではそちらの経路で働いているのかもしれない。または、AKT1 の活性を低下するようなシグナルが働いて機能を阻害した可能性もある。例えば、p53 は PTEN の発現を上昇させ(Feng et al., 2005)、PTEN は PIP3 を PIP2 へと退行させ、機能を消失させる(Maehama and Dixon., 1998)。結果として AKT1 の

活性が低下する(Feng et al., 2007)。

アミノ酸の細胞の感知方法については未だに不明な点が多いため、ここで議論するのは難しい。だが、マウス肝臓で ATG 遺伝子をノックアウトすると絶食時の肝臓におけるアミノ酸濃度が低下すること(Ezaki et al., 2011)、アミノ酸による Rag の活性化が mTORC1 をリソソーム膜へと局在させることが知られており(Sancak et al., 2010)、今回見られた LC3 発現の変化に関与している可能性は否定できない。

オートファジーに関連する因子について、3 つの経路に注目した(図.3-6)。グルコースが枯渇すると、ATP 産生が抑制され、LKB1 を介した AMPK の活性化が起こる。AMPK は TSC2 をリン酸化し mTORC1 を抑制する(Hardie et al., 2004)ほか、mTORC1 の構成因子である Raptor をリン酸化することでも mTORC1 を抑制する(Gwinn et al., 2008)。今回 LKB1,AMPK の上昇が D12 で観察された。D12 絶食条件下においてはこの経路が働いているようである。

AMPK は p53 のリン酸化を起こし(Jones et al., 2005)、p53 は DRAM を介して直接的にオートファジーを起こす(Crighton et al., 2006)。D12 では LKB1、AMPK と同様に p53、DRAM も絶食により上昇するため、グルコース欠乏→LKB1→AMPK→p53→DRAM→オートファジーという経路が働いているかもしれない。だが、D16 では p53、DRAM は僅かに上昇を見せるか変化がないが、

LKB1,AMPK は絶食により有意な減少を見せる。この不一致を考慮すると、p53の上昇は他の因子により引き起こされている可能性が高い。

LKB1,AMPK で見られた D12,16 での絶食に対する反応の違いについては、D12 の時点ではまだ十分に胎盤血管系の構築が成り立っておらず、胎子胎盤間でのクロストークが十分でないことや、また、胎盤の形成も途中であるため、完成された D14,16 での胎盤よりも絶食による影響が強く出たということが考えられる。D12 の時点では胎盤発達の維持のため、または胎子に栄養を供給するため、LKB1,AMPK 経路を介したオートファジーを起こし、D14、D16 の胎盤はすでに完成されているため、胎盤自体が要求するグルコース量は D12 ほどではなく、グルコースの不足は起こらなかったのではないか。D16 での LKB1,AMPK の絶食による減少については、この経路によるオートファジーを抑えることで、過剰なオートファジーを防ぐ意図があったのかもしれない。D16 で見られた LC3C 発現の減少も同様の理由から起こっているのだろう。

小括

本章では、絶食により誘導される mTORC1 低下によるオートファジーに LC3

ファミリーの中でも特に LC3B が関与していること、絶食により LC3 ファミリーの局在性が変化しうること、妊娠期での絶食による影響、また、その時のオートファジー関連因子の変動に差があることが明らかとした。

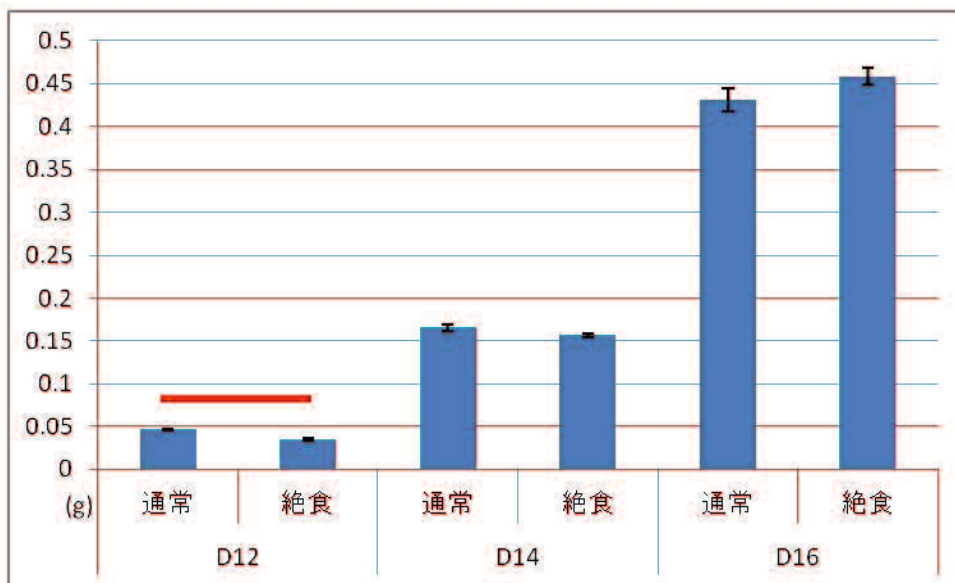
付図

図 3-1 対照群、絶食群での胎子、胎盤重量の比較

各日齢における胎子、胎盤重量を測定し、対照群(control)、絶食群(starving)の2群間で比較した。結果を平均値±標準誤差で示し、F検定を用い母分散の比を検定し、等分散の場合は student-t 検定を、非等分散の場合は Welch の検定を用いて有意差判定を行い、p 値が 0.05 未満をもって有意差あり(赤線)とした。

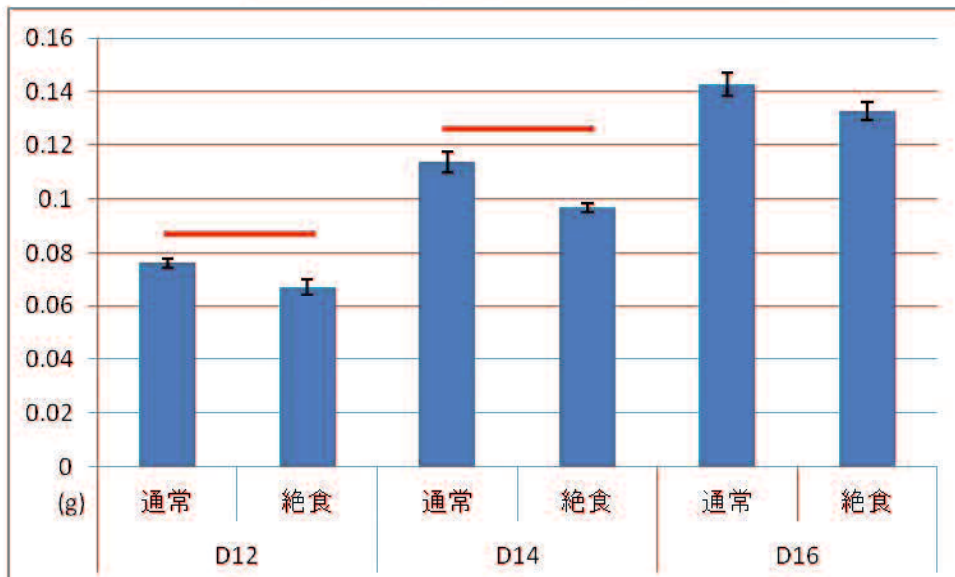
図.3-1

胎仔



		数	平均 (g)	標準誤差
D12	通常	19	0.046	0.00112
	絶食	14	0.0349	0.00181
D14	通常	16	0.1656	0.00414
	絶食	16	0.1568	0.00221
D16	通常	10	0.431	0.01293
	絶食	24	0.4583	0.00991

胎盤



		数	平均 (g)	標準誤差
D12	通常	19	0.0762	0.00164
	絶食	14	0.0674	0.00292
D14	通常	16	0.1137	0.00403
	絶食	16	0.0967	0.00164
D16	通常	10	0.1429	0.00412
	絶食	24	0.1327	0.00342

図 3-2 P70S6K,LC3A,LC3B,LC3C 蛋白発現量の比較

Western blotting により、P70S6K,LC3A,LC3B,LC3C の蛋白発現量を測定し、対照群(control)、絶食群(starving)の 2 群間で比較した。Mann-Whitney U 検定を用い、p 値が 0.05 をもって有意差あり(赤線)とした。対照群の D12,LZ の平均値を 1 とし、相対発現量で示した。LZ : 迷路部、DB : 脱落膜部、MG : 間膜腺部 n=3

图.3-2

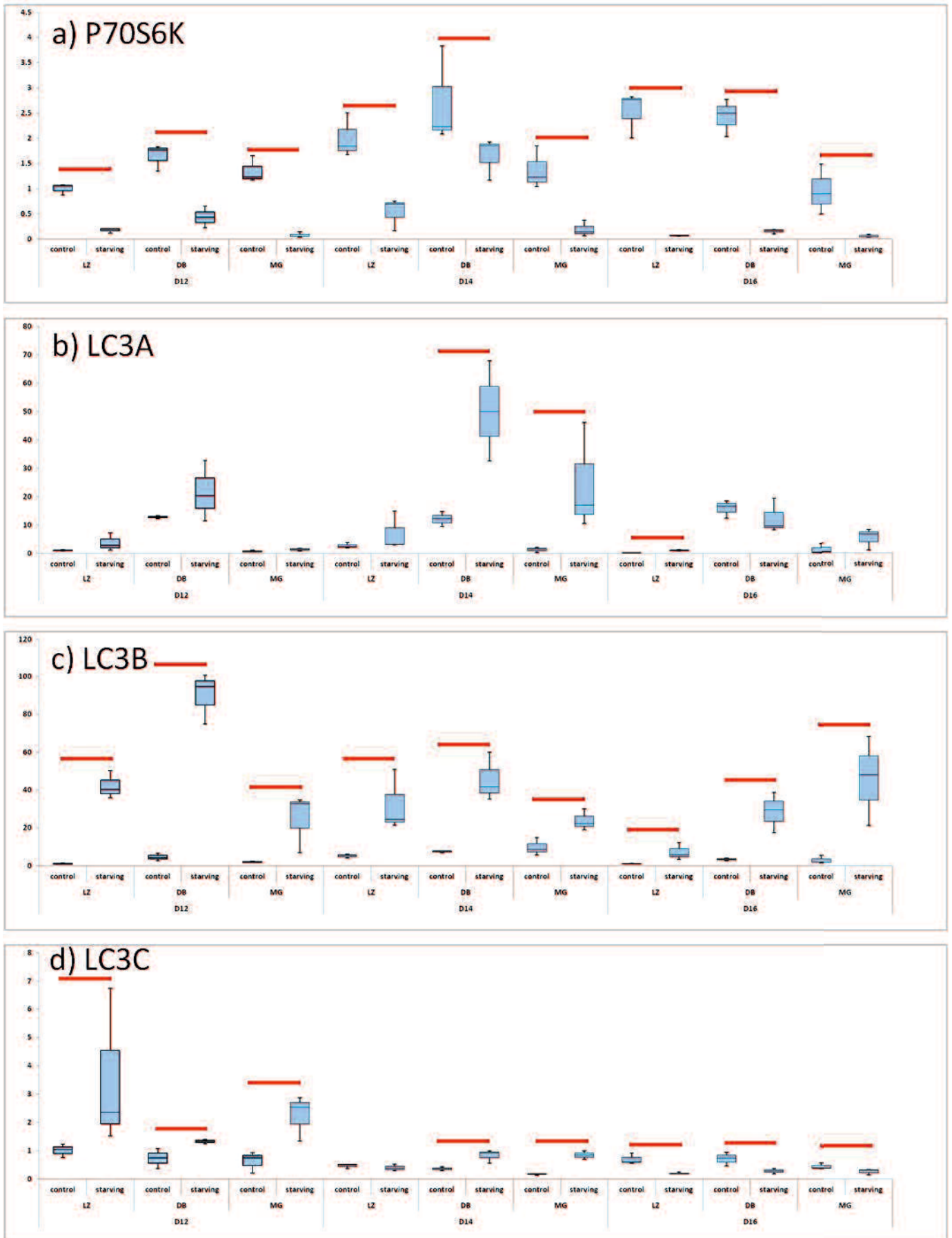


図 3-3 オートファジー関連因子 mRNA 量の比較

Real time RT-PCR により、p53,DRAM,LKB1,AMPK,PI3K,AKT1 の mRNA 量を測定し、対照群(control)、絶食群(starving)の 2 群間で比較した。

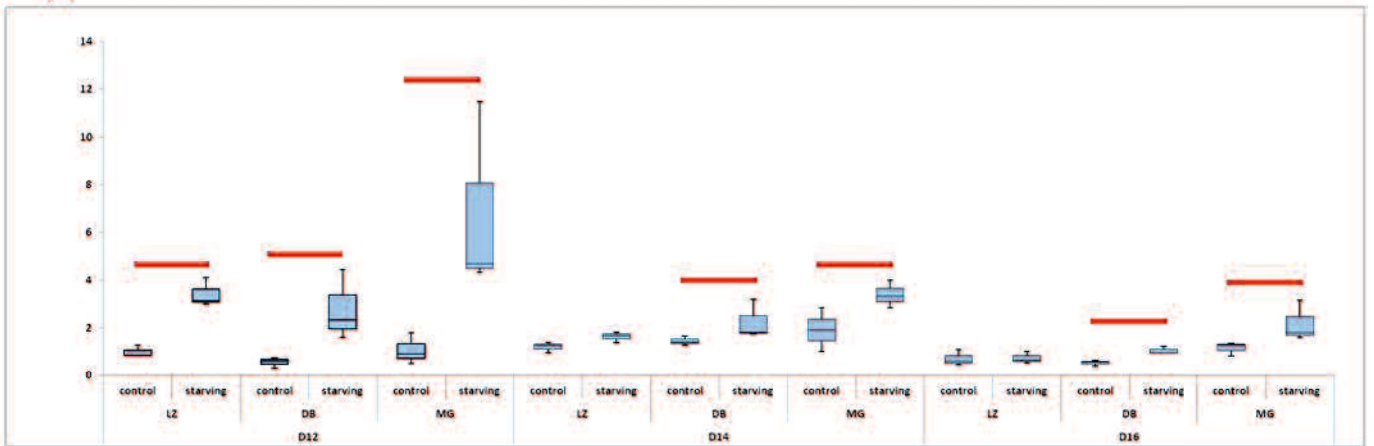
Mann-Whitney U 検定を用い、p 値が 0.05 をもって有意差あり(赤線)とした。

対照群の D12,LZ の平均値を 1 とし、相対発現量で示した。LZ : 迷路部、DB :

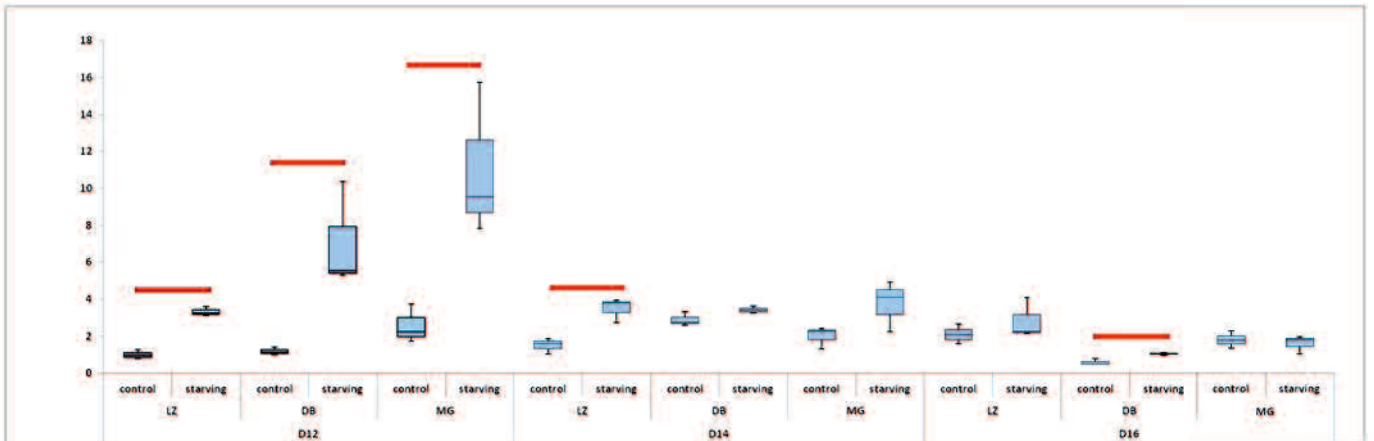
脱落膜部、MG : 間膜腺部 n=3

3-3

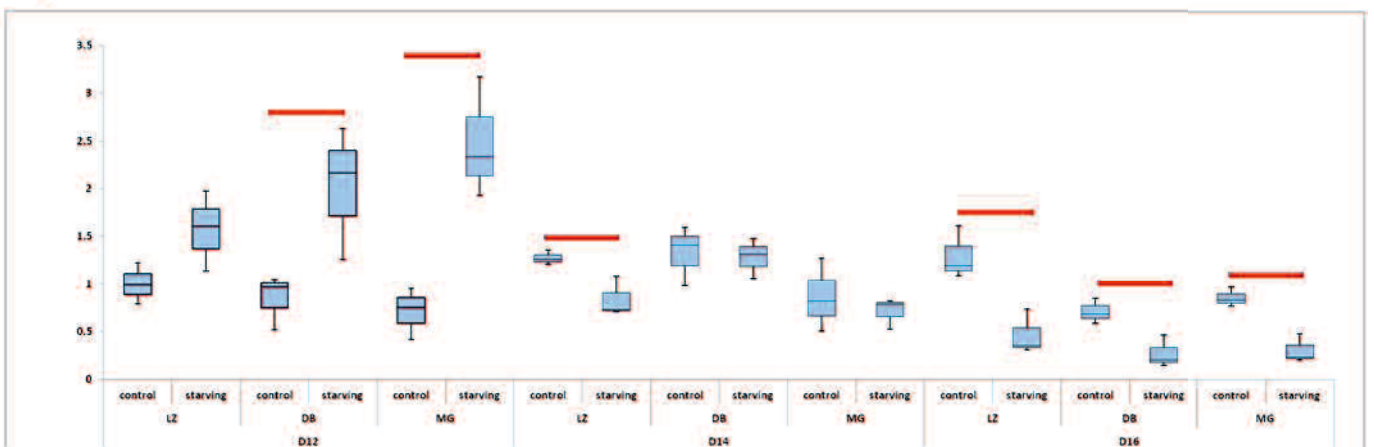
a) p53



b) DRAM

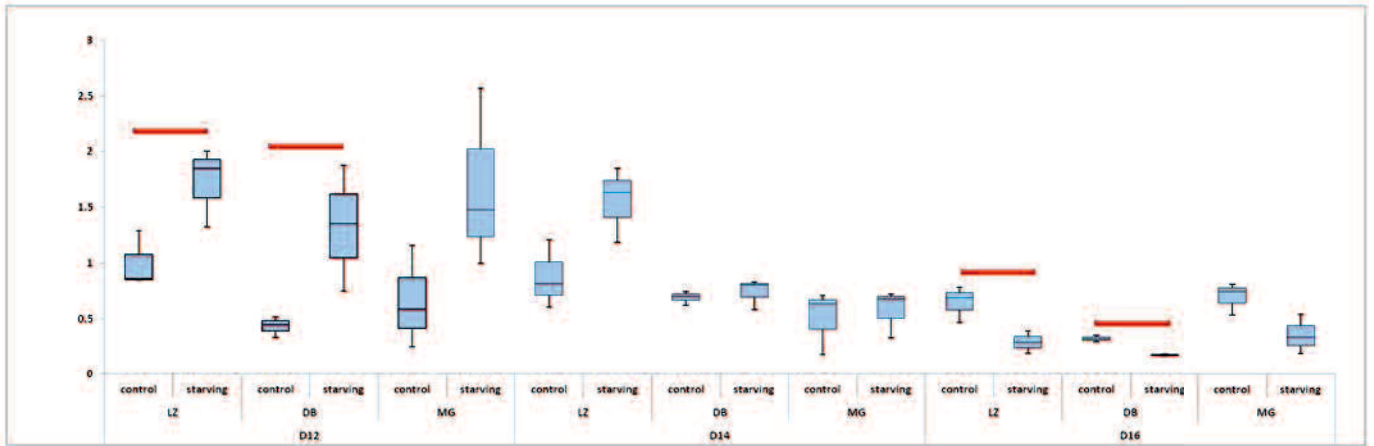


c) LKB1

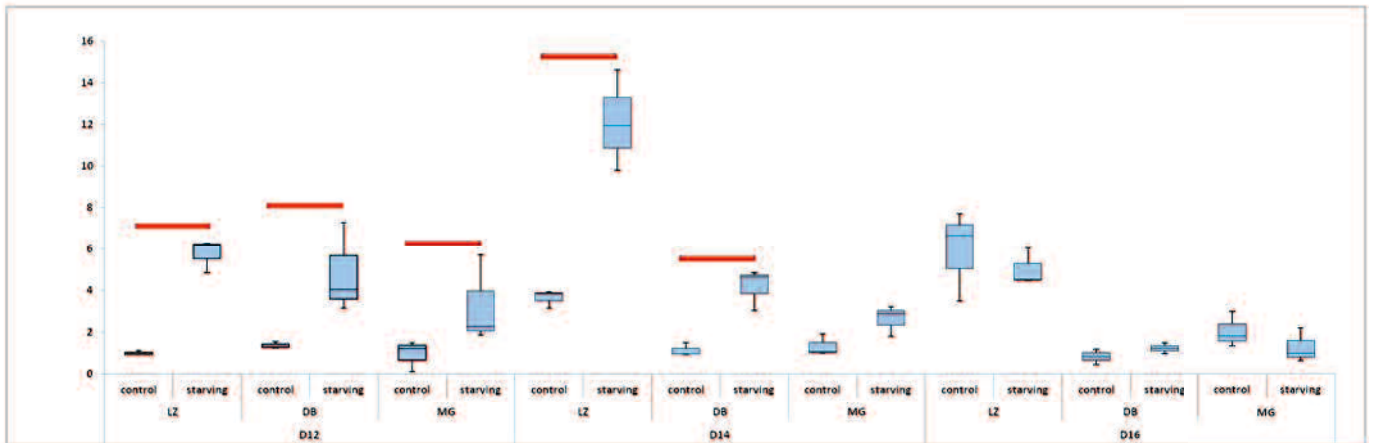


3.3

d) AMPK



e) PI3K



f) AKT1

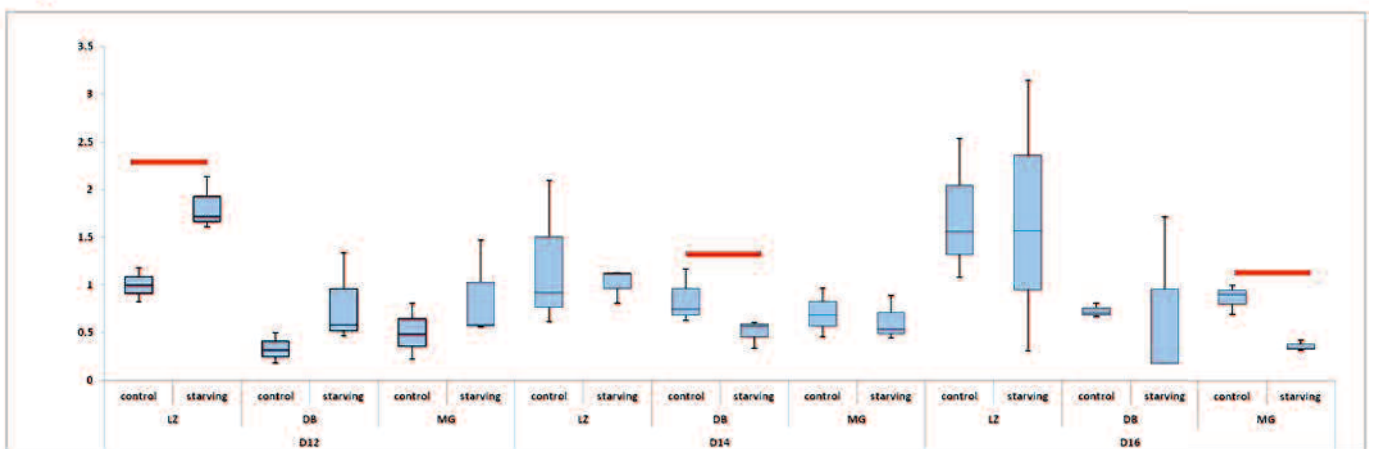


図 3-4 LC3A,LC3B,LC3C 抗体を用いた免疫組織化学染色

免疫組織化学染色により、LC3A,LC3B,LC3C の胎盤内での局在性が栄養飢餓により変化するかどうかを調べた。細胞質内に主に発現しているものを陽性と判断し、陽性であるものを+、陽性細胞と陰性細胞の両方が散見して見られるものを+/-、陰性のものを-として表にまとめた。

図.3-4

対照群

	A	B	C
栄養膜合胞体層			
D12	+	+	+
D14	+	+	+
D16	+	+	+
海綿状栄養膜細胞			
D12	-	+	+
D14	-	+/-	-
D16	-	+	+
栄養膜巨細胞			
D12	-	-	+
D14	-	+/-	+
D16	-	-	+
脱落膜細胞			
D12	+	+/-	+
D14	+	+	+
D16	+	+/-	+/-
間膜腺間質			
D12	+/-	+	+
D14	+/-	+	-
D16	+/-	+/-	+
子宮NK細胞			
D12	-	-	-
D14	-	-	-
D16	-	-	-

絶食群

	A	B	C
栄養膜合胞体層			
D12	-	+	+
D14	-	+	+
D16	-	+	+
海綿状栄養膜細胞			
D12	-	+	+
D14	-	+	-
D16	-	+/-	+
栄養膜巨細胞			
D12	-	+	+
D14	-	+	-
D16	-	-	-
脱落膜細胞			
D12	+	+	+
D14	+	+	+
D16	+/-	-	+
間膜腺間質			
D12	-	+	+
D14	+	+	+
D16	+	+	+
子宮NK細胞			
D12	-	+	-
D14	-	-	-
D16	-	+	-

図 3-5 代表的な染色像

絶食により変化が見られたものとして、栄養膜合胞体層の LC3A (a-f), 栄養膜巨細胞の LC3C (g, h), 子宮 NK 細胞の LC3B (i, j) を代表して染色像を掲載する。

a-c, g, h が対照群であり、d-f, i, j が絶食群の染色像を示す。

图.3-5

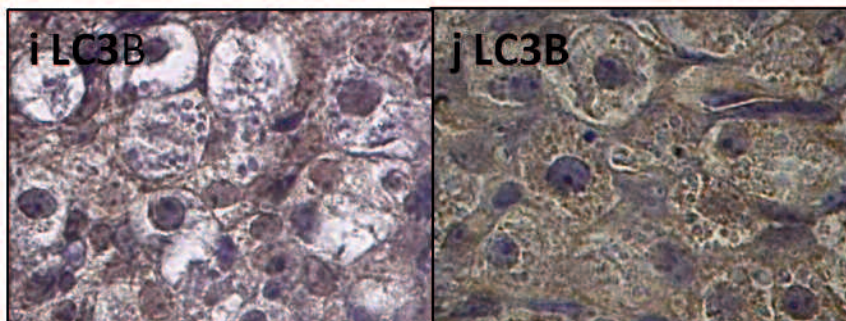
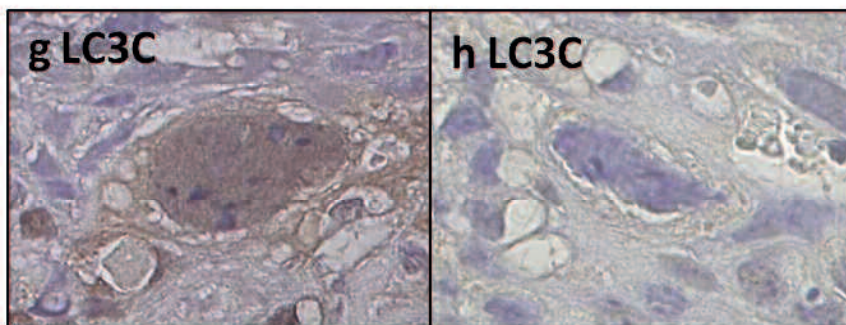
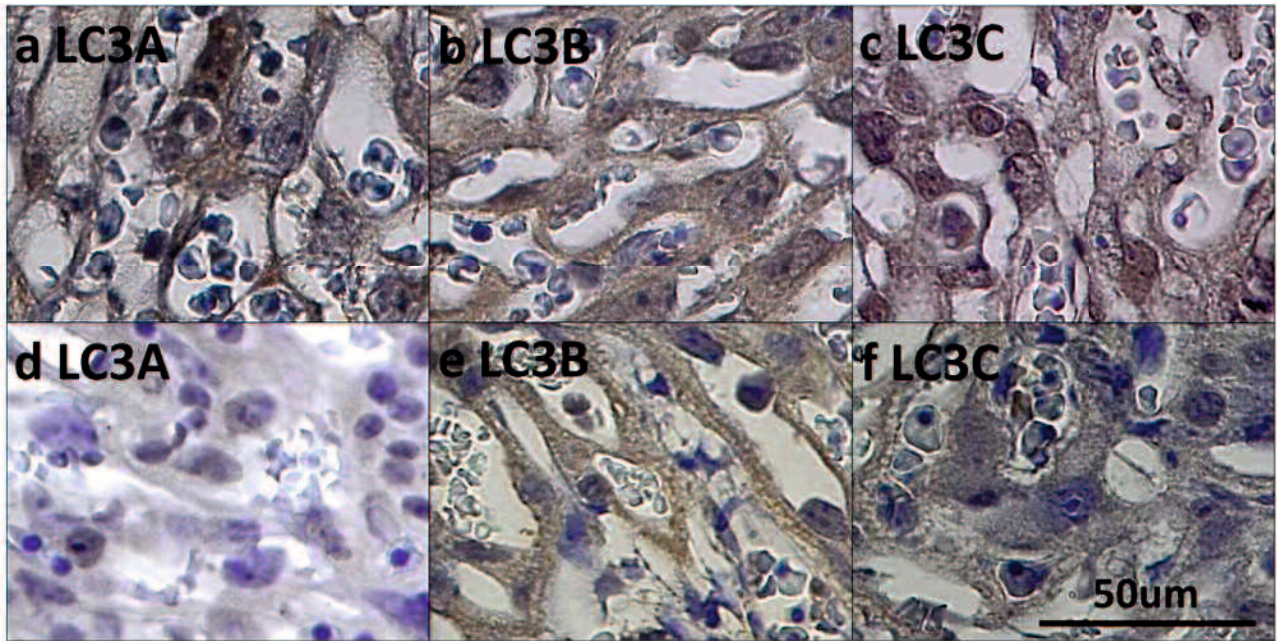
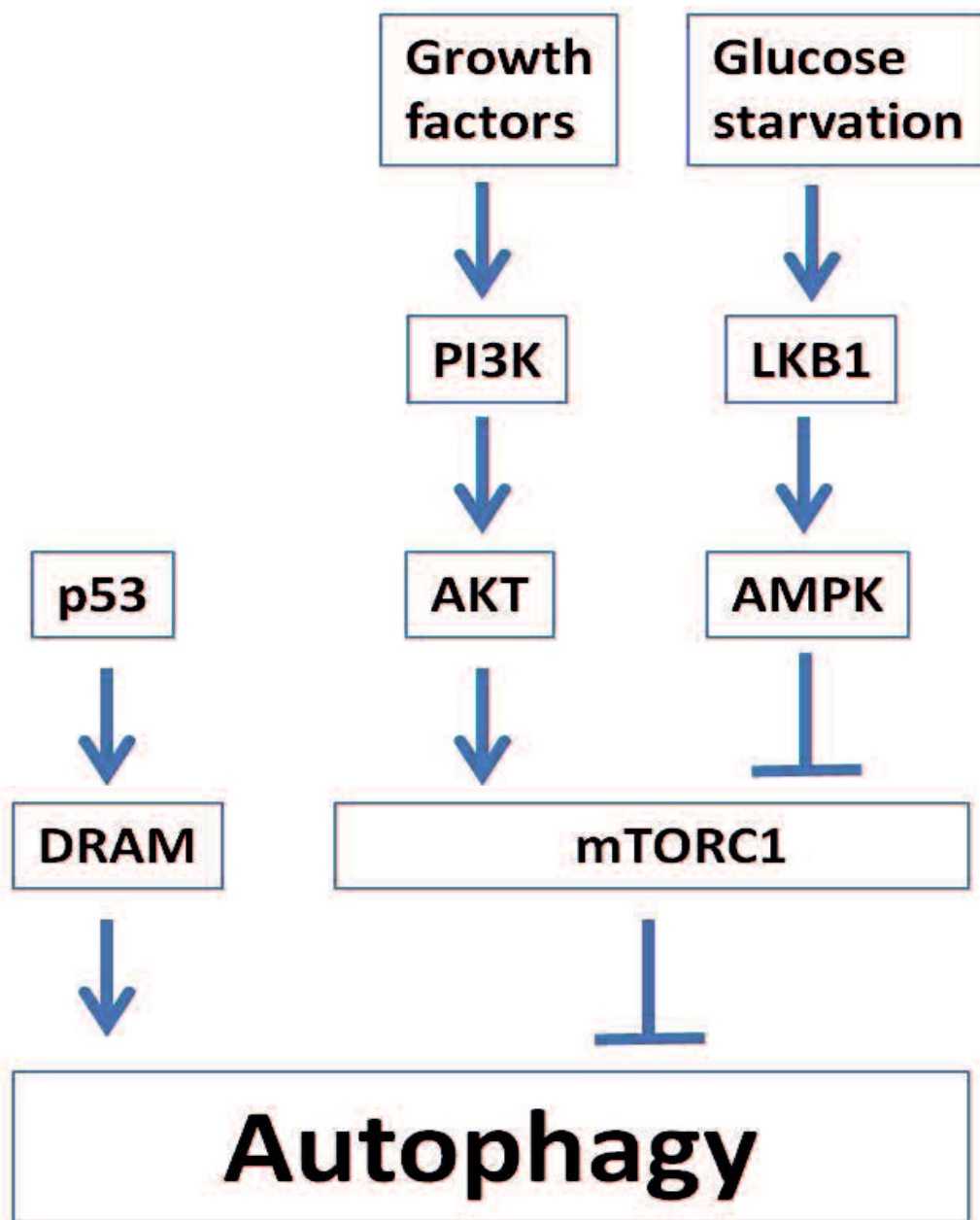


図 3-6 オートファジー関連経路



総括

本論文では免疫学的な視点、また、オートファジーに関する視点の 2 方向からマウス胎盤での母子境界領域におけるせめぎあいの調節を、三章にわたり追跡した。

第一章では、T 細胞、B 細胞を欠損した SCID マウスでは、胎盤形成初期における子宮 NK 細胞密度が有意に低く、これは成熟型へと分化途中である II 型の子宮 NK 細胞が少ないことが原因であること、また、胎盤形成中期ではその差が見られなくなることを明らかとした。この結果は T 細胞 B 細胞が子宮 NK 細胞の分化、または骨髄からの遊走に関与していること、子宮 NK 細胞と脱落膜とのクロストークによりその増殖、分化の遅延が解消されうることを示す。

第二章では胎盤完成期、つまり栄養膜浸潤が停止する時期に LC3B の発現上昇が起こり、栄養膜侵入制御機構へオートファジーが関与していることを明らかとした。また、LC3A においては脱落膜でより高く発現しており、脱落膜の恒常性の維持に貢献しうることを明らかとした。

第三章では絶食による栄養飢餓によって誘導されたオートファジーに、LC3 ファミリーの中でも特に LC3B が強く関与していることを示した。さらに、胎盤形成期、完成期、完成後における栄養飢餓によって与えられる影響が異なる

こと、その際に誘導されるオートファジー経路に違いがあることを示した。

本研究は異物である胎子胎盤系がどのようにして母体に許容され、侵入を起こしているのかを明らかとすべく行った。第三章は少し異なるが、第一章、第二章により異なる視点から胎盤形成のメカニズムを探った。その結果、脱落膜と子宮 NK 細胞の相互作用、オートファジーによる脱落膜の恒常性維持が妊娠維持に重要であることが強く疑われた。脱落膜形成は栄養膜の浸潤性が高い血絨毛膜胎盤で完全に見られ、逆に栄養膜の浸潤性が低い上皮絨毛膜胎盤では脱落膜形成は起こらない。脱落膜化が栄養膜細胞の子宮内膜組織への浸潤を調節することや母子間の免疫応答抑制に関わっていることも知られている。短期間での妊娠による胎子の発育は、栄養膜の浸潤性を高め、より効率の良い物質交換を母体-胎子間で起こし、しかしそれでいて過剰な侵入を制御する繊細な機構を持つことにより実現した。より高度な生物へと進化する為の鍵は、脱落膜が握っているのかもしれない。

一方で、LC3 ファミリーの動態が通常妊娠胎盤でも ABC それぞれが異なる動態、局在を示したことは LC3ABC それぞれが異なる役割を持つことを示唆した。第三章での結果から栄養欠乏においては特に LC3B が関与していることが疑われ、複数の文献からは LC3A が腫瘍抑制に、LC3C が感染防御に関与することが示唆される。LC3 のオルソログそれぞれが持つ役割は未知の部分が多く、オ

オートファジー研究において LC3 ファミリーを区別することは特に重要視されていないようである。今回の結果はオートファジー研究の新たなブレークスルーになりうるものと自負する。しかし今回の知見だけでは足りない部分も多く、さらなる研究が必要であることは言うまでもない。

まとめると、本研究により哺乳類の胎盤形成、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明らかとなった。妊娠の成立に、哺乳類への進化の過程で新たに獲得した高度な免疫機構と、真核生物に広く保存されており、古くから生物が所有しているオートファジーという2つのシステムが関わっているという点は非常に興味深い。胎盤の形成、維持はまさに生命の神秘といっても過言ではない。それだけに未だ不明な点も多く、全容の解明にはまだ多くの研究の蓄積が必要であると思われる。本研究も、その蓄積の一つとなり、微力でも全容解明の一助になりえるのであれば、それに勝る喜びはない。

要約

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落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、脱落膜の恒常性維持に 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。

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。

謝辞

本論文を作成するに当たり、学部生時代より終始懇切なる研究の御指導、御助言ならびに本論文の御校閲を賜りました木曾康郎教授に深く感謝いたします。また本研究に対し、多大なる御指導ならびに貴重な御助言を頂きました日下部健准教授、加納聖准教授に深く感謝いたします。

本稿の御校閲ならびに御助言を賜った鹿児島大学共同獣医学部臨床病理学の矢吹映准教授に深く感謝を申し上げます。

また、共に語らい、共に研究、議論し、研究生活を支えてくださいました解剖学研究室の仲間である、脇谷晶一先輩をはじめとする諸先輩方、同輩、後輩のすべての皆様に深く感謝いたします。

本研究は日本学術振興会特別研究員(DC1) 科研費番号 24・5017 によって支持され行われました。研究費、生活費をサポートしていただいたことに対し、あらためて多大なる感謝を申し上げます。

最後に私を育ててくれた父と母、空と大地、この地球のすべてに心より感謝し、謝辞とさせていただきます。

文献

Ashkar, A.A., Di Santo, J.P., and Croy, B.A. (2000). Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* *192*, 259-270.

Bai, H., Inoue, J., Kawano, T., and Inazawa, J. (2012). A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. *Oncogene* *31*, 4397-4408.

Brown, E.J., Beal, P.A., Keith, C.T., Chen, J., Shin, T.B., and Schreiber, S.L. (1995). Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* *377*, 441-446.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* *96*, 857-868.

Bulmer, J.N., Williams, P.J., and Lash, G.E. (2010). Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol* *54*, 281-294.

- Burkhardt, J.K., Hester, S., Lapham, C.K., and Argon, Y. (1990). The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *J Cell Biol* *111*, 2327-2340.
- Bérout, C., and Soussi, T. (2003). The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat* *21*, 176-181.
- Choi, J.H., Lee, H.J., Yang, T.H., and Kim, G.J. (2012). Effects of hypoxia inducible factors-1 α on autophagy and invasion of trophoblasts. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* *39*, 73-80.
- Crighton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* *126*, 121-134.
- Croy, B.A., van den Heuvel, M.J., Borzychowski, A.M., and Tayade, C. (2006). Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev* *214*, 161-185.
- Delgado, S.R., McBey, B.A., Yamashiro, S., Fujita, J., Kiso, Y., and Croy, B.A. (1996). Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J*

Leukoc Biol *59*, 262-269.

Donehower, L.A. (2009). Using mice to examine p53 functions in cancer, aging, and longevity. Cold Spring Harb Perspect Biol *1*, a001081.

El-Hashash, A.H., Warburton, D., and Kimber, S.J. (2010). Genes and signals regulating murine trophoblast cell development. Mech Dev *127*, 1-20.

Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., Taka, H., Fujimura, T., Takehana, K., Yoshida, M., *et al.* (2011). Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. Autophagy *7*, 727-736.

Feng, Z. (2010). p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment. Cold Spring Harb Perspect Biol *2*, a001057.

Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A.K., Jin, S., Lowe, S., and Levine, A.J. (2007). The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. Cancer Res *67*, 3043-3053.

Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., and Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. Proc Natl Acad Sci U

S A 102, 8204-8209.

Godbole, G., and Modi, D. (2010). Regulation of decidualization, interleukin-11 and interleukin-15 by homeobox A 10 in endometrial stromal cells. *J Reprod Immunol* 85, 130-139.

Guimond, M.J., Luross, J.A., Wang, B., Terhorst, C., Danial, S., and Croy, B.A. (1997). Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol Reprod* 56, 169-179.

Guimond, M.J., Wang, B., Fujita, J., Terhorst, C., and Croy, B.A. (1996). Pregnancy-associated uterine granulated metrial gland cells in mutant and transgenic mice. *Am J Reprod Immunol* 35, 501-509.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30, 214-226.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., *et al.* (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes

- neurodegenerative disease in mice. *Nature* *441*, 885-889.
- Hardie, D.G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* *117*, 5479-5487.
- Hatta, K., van den Heuvel, M.J., and Croy, B.A. (2009). NK cells detect changes in adaptive immunity within mouse decidua from gestation day eight. *Placenta* *30*, 501-506.
- He, H., Dang, Y., Dai, F., Guo, Z., Wu, J., She, X., Pei, Y., Chen, Y., Ling, W., Wu, C., *et al.* (2003). Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J Biol Chem* *278*, 29278-29287.
- Hirota, Y., Cha, J., Yoshie, M., Daikoku, T., and Dey, S.K. (2011). Heightened uterine mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling provokes preterm birth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 18073-18078.
- Hung, T.H., Chen, S.F., Lo, L.M., Li, M.J., Yeh, Y.L., and Hsieh, T.T. (2012). Increased autophagy in placentas of intrauterine growth-restricted pregnancies. *PLoS One* *7*, e40957.
- Hung, T.H., Hsieh, T.T., Chen, S.F., Li, M.J., and Yeh, Y.L. (2013). Autophagy

in the human placenta throughout gestation. *PLoS One* *8*, e83475.

Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., Kouno, T., Nakada, K., Hino, O., Watanabe, S., Ando, J., Iwadate, M., Yamamoto, M., *et al.* (2011). Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* *193*, 275-284.

Jokhi, P.P., King, A., Sharkey, A.M., Smith, S.K., and Loke, Y.W. (1994). Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Immunol* *153*, 4427-4435.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* *18*, 283-293.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* *19*, 5720-5728.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to

- autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* *117*, 2805-2812.
- Kim, B.W., Hong, S.B., Kim, J.H., Kwon, d.H., and Song, H.K. (2013). Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat Commun* *4*, 1613.
- Kiso, Y., McBey, B.A., Mason, L., and Croy, B.A. (1992). Histological assessment of the mouse uterus from birth to puberty for the appearance of LGL-1+ natural killer cells. *Biol Reprod* *47*, 227-232.
- Kusakabe, K., Ohmoto, M., Okada, T., Mukamoto, M., Sasaki, F., and Kiso, Y. (1999). Uterine NK cells produce epidermal growth factor in the murine pregnant uterus. *J Vet Med Sci* *61*, 947-949.
- Lee, H.K., Mattei, L.M., Steinberg, B.E., Alberts, P., Lee, Y.H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S., and Iwasaki, A. (2010). In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* *32*, 227-239.
- Lysiak, J.J., and Lala, P.K. (1992). In situ localization and characterization of bone marrow-derived cells in the decidua of normal murine pregnancy. *Biol Reprod* *47*, 603-613.

- Maehama, T., and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* *273*, 13375-13378.
- Manaster, I., and Mandelboim, O. (2010). The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol* *63*, 434-444.
- Marzusch, K., Ruck, P., Horny, H.P., Dietl, J., and Kaiserling, E. (1995). Expression of the p53 tumour suppressor gene in human placenta: an immunohistochemical study. *Placenta* *16*, 101-104.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069-1075.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* *15*, 1101-1111.
- Mortensen, M., Ferguson, D.J., and Simon, A.K. (2010). Mitochondrial clearance by autophagy in developing erythrocytes: clearly important, but just how much so? *Cell Cycle* *9*, 1901-1906.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* *183*, 795-803.

Othman, E.Q.G., Kaur, G., Mutee, A.F., Muhammad, T.S.T., and Tan, M.L. (2009). Immunohistochemical expression of MAP1LC3A and MAP1LC3B protein in breast carcinoma tissues. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* *23*, 249-258.

Paffaro, V.A., Bizinotto, M.C., Joazeiro, P.P., and Yamada, A.T. (2003). Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta* *24*, 479-488.

Parr, E.L., Young, L.H., Parr, M.B., and Young, J.D. (1990). Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J Immunol* *145*, 2365-2372.

Peel, S. (1989). Granulated metrial gland cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol* *115*, 1-112.

Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., and Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* *126*, 458-465.

- Sagiv, Y., Legesse-Miller, A., Porat, A., and Elazar, Z. (2000). GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J* *19*, 1494-1504.
- Saito, S., Nishikawa, K., Morii, T., Narita, N., Enomoto, M., Ito, A., and Ichijo, M. (1994). A study of CD45RO, CD45RA and CD29 antigen expression on human decidual T cells in an early stage of pregnancy. *Immunol Lett* *40*, 193-197.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* *141*, 290-303.
- Stallmach, T., Ehrenstein, T., Isenmann, S., Müller, C., Hengartner, H., and Kägi, D. (1995). The role of perforin-expression by granular metrial gland cells in pregnancy. *Eur J Immunol* *25*, 3342-3348.
- Stewart, I.J. (1998). Granulated metrial gland cells in 'minor' species. *J Reprod Immunol* *40*, 129-146.
- Sumpter, R., and Levine, B. (2010). Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning. *Semin Cell Dev Biol* *21*, 699-711.

- Tagaya, Y., Bamford, R.N., DeFilippis, A.P., and Waldmann, T.A. (1996).
IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways
whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* *4*, 329-336.
- Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S.,
Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., and Mizushima, N. (2011).
Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* *25*,
795-800.
- Tanida, I., Sou, Y.S., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E.
(2006). Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian
Atg8 conjugation mediated by human Atg4B, Atg7 and Atg3. *FEBS J*
273, 2553-2562.
- Tayade, C., Hilchie, D., He, H., Fang, Y., Moons, L., Carmeliet, P., Foster,
R.A., and Croy, B.A. (2007). Genetic deletion of placenta growth factor in
mice alters uterine NK cells. *J Immunol* *178*, 4267-4275.
- Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with
immunoregulatory functions that bridge innate resistance and
antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* *13*, 251-276.
- Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of

autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* *333*, 169-174.

Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A., and Mizushima, N. (2008). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* *321*, 117-120.

van den Heuvel, M.J., Horrocks, J., Bashar, S., Taylor, S., Burke, S., Hatta, K., Lewis, J.E., and Croy, B.A. (2005a). Menstrual cycle hormones induce changes in functional interactions between lymphocytes and decidual vascular endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* *90*, 2835-2842.

van den Heuvel, M.J., Xie, X., Tayade, C., Peralta, C., Fang, Y., Leonard, S., Paffaro, V.A., Sheikhi, A.K., Murrant, C., and Croy, B.A. (2005b). A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* *54*, 322-331.

von Muhlinen, N., Akutsu, M., Ravenhill, B.J., Foeglein, Á., Bloor, S., Rutherford, T.J., Freund, S.M., Komander, D., and Randow, F. (2013). An essential role for the ATG8 ortholog LC3C in antibacterial autophagy. *Autophagy* *9*, 784-786.

Wang, H., Bedford, F.K., Brandon, N.J., Moss, S.J., and Olsen, R.W. (1999).

- GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* *397*, 69-72.
- Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J.M., Dell'antonio, G., *et al.* (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* *25*, 717-729.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* *22*, 124-131.
- Ye, W., Zheng, L.M., Young, J.D., and Liu, C.C. (1996). The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J Exp Med* *184*, 2405-2410.
- Zhang, C., and Cuervo, A.M. (2008). Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat Med* *14*, 959-965.
- Zhang, J., Croy, B.A., and Tian, Z. (2005). Uterine natural killer cells: their choices, their missions. *Cell Mol Immunol* *2*, 123-129.
- Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D.M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*,

21-35.