

論文要約データ（最終版）学位論文全文が公表できない場合のみ

論文題目：トロホブラスト特異的オートファジー欠損は妊娠高血圧症発症に寄与する

医学薬学教育部（博士課程）東西統合医学専攻 青木 藍子

〔目的〕

妊娠高血圧症候群は妊娠 20 週以降に高血圧を発症する症候群で、タンパク尿を合併する場合、妊娠高血圧腎症と診断される。母体の多臓器不全のみならず、胎盤機能不全による胎児発育不全、胎児機能不全ならびに胎児・新生児死亡の大きな要因となっている。その病態として胎盤形成過程におけるトロホブラストの母体脱落膜への浸潤の低下（血管リモデリング不全）が重要であることはコンセンサスが得られてきているものの、血管リモデリング不全の要因については血管新生障害、酸化ストレス、炎症因子など諸説があり、未解明な部分も多い。オートファジーは、真核生物に高度に保存された生体内分解機構の 1 つで、生態のホメオスタシス維持に関与している。隔離膜は、細胞内の不要なタンパク、オルガネラ、病原菌を包み込み、リソソームと融合し、それらを分解する。われわれはヒトオートファジーを欠損させた胎盤トロホブラストの培養細胞を用いて、*in vitro* でオートファジーが正常な血管リモデリングに関わるということを過去に報告した。さらに妊娠高血圧腎症のヒト胎盤において、オートファジーが低下している知見も得ている。しかしながら、胎盤のオートファジー欠損が妊娠高血圧症候群による結果であるか、もしくは原因であるかは直接的に評価できていなかった。今回申請者は、マウス胎盤特異的にオートファジーに必須のタンパクの 1 つである Atg7 を欠損させたマウスを独自に確立し、その母体マウスの血圧、タンパク尿、胎児の発育不全を評価し、胎盤の病理所見を観察することで、胎盤のオートファジーが妊娠高血圧症候群発症にどのように寄与するのかを明らかにすることを目的とした。

〔方法〕

大阪大学微生物病研究所の伊川研究室で確立された、レンチウイルスベクターを用いたトロホブラスト特異的な遺伝子ノックアウト系を利用し、オートファジー関連遺伝子の 1 つ、Atg7 を胎盤特異的にノックアウトした。過排卵させたメス Atg7^{flox/flox} マウスをオス Atg7^{flox/flox} マウスと交配し、受精卵を採取した。その受精卵を *in vitro* で培養し、胚盤胞まで発生させたところで、酸性タイロイドで透明帯を処置し、cre リコンビナーゼ発現レンチウイルスベクター、またはenhanced green fluorescent protein (EGFP) 発現ウイルスベクターを感染させ、妊娠 2.5 日の偽妊娠野生型 ICR マウスに移植した。前者では胎盤でのみ Atg7 をノックアウトすることができ、後者では胎盤でのみ EGFP を発現させることができた。このようにして得られた胎盤をそれぞれ cKO 胎盤、EGFP 胎盤、それぞれの胎盤を持つ母体を cKO 群、EGFP 群と呼ぶことにする。胎生 7.5 から胎生 19.5 まで cKO 群、EGFP 群の母体血圧を経時的に測定し、胎生 17.5 から胎生 19.5 の間に採尿し、尿タンパク量をブラッドフォード法で測定した。胎児、胎盤重量についてはそれぞれのレンチウイル

スペクターを感染させたのちに両者を混ぜて、それらを同じ偽妊娠マウスに移植することにより、母体の個体差による影響を除外したうえで、同様に胎生 19.5 で帝王切開を行い、重量測定を行った。得られた胎盤および胎児において、Atg7 およびオートファジー活性の指標である LC3-II、p62 タンパクを、ウェスタンブロット法で検出した。また、胎盤の組織学的解析を行った。P62 免疫染色を行い、胎盤のどの部分でオートファジー不全が起きているかを検討した。血管リモデリングについて評価するため、トロホブラストの指標であるサイトケラチン免疫染色を行い、トロホブラストの母体脱落膜への浸潤度を評価した。

〔成績〕

cKO 胎盤では Atg7 タンパクは EGFP 胎盤と比較して有意に発現が低下した ($p<0.01$)。LC3-II タンパクの発現量には有意差はなかった ($p=0.16$) もの、cKO 胎盤で発現の低下を認めた。Atg7 はオートファジーカスケードにおいて LC3-I の LC3-II への変換を触媒するため、LC3-II/LC3-I 比を計算したところ、cKO 胎盤において LC3-II/LC3-I 比の有意な低下を認めた ($p<0.001$)。P62 は cKO 胎盤において有意な上昇を認めた ($p<0.001$)。同様に得られた胎児のタンパクも同様に検討したが、Atg7、LC3-II、p62 タンパクの発現、LC3-II/LC3-I 比いずれにおいても EGFP 発現胎盤の胎児、cKO 胎盤の胎児の間に有意差は認められなかった。これらのタンパク発現の結果から、cre リコンビナーゼ発現レンチウイルスベクターを感染させた場合には、胎盤特異的にオートファジー活性が抑制されていることが確認できた。cKO 群では胎生 16.5 から胎生 19.5 で有意に母体血圧上昇が認められた。尿タンパクは cKO 群で上昇する傾向は見られたものの、有意差は認められなかった ($p=0.20$)。出生時の胎児重量に差は認められなかったものの ($p=0.64$)、胎盤重量では cKO 胎盤が有意に減少した ($p<0.01$)。

次に胎盤を組織学的に解析した。cKO 胎盤を p62 免疫染色すると、ジャイアントトロホブラストおよびスポンジオトロホブラストで明らかな p62 の蓄積を認めた。サイトケラチン免疫染色では、トロホブラストの母体脱落膜への浸潤が cKO 胎盤において有意に減少しており ($p<0.05$)、ラセン動脈リモデリング不全が示唆された。

〔総括〕

トロホブラストのみにオートファジーを *in vivo* で欠損させると妊娠後期に妊娠高血圧を発症することが初めて明らかとなった。尿タンパクは有意な増加は認められず、胎児発育不全も認められないものの、胎盤重量は有意に減少していた。オートファジー欠損胎盤においてはトロホブラストの母体脱落膜への浸潤も障害されており、それによる胎盤形成不全が妊娠高血圧を発症させたと考えられた。以上の結果は、オートファジー欠損が妊娠高血圧の原因因子である可能性を示唆しているが、妊娠高血圧腎症にはさらなる要因が関与していることを示唆した。本研究は妊娠高血圧腎症の病態解明の一つとしての重要な知見を提供した。