

博士論文

マウス産褥子宮に存在する老化細胞の除去機構と
次回妊娠に及ぼす影響の解析

江頭 真宏

目次

	ページ
論文要旨	3
背景・導入	4
材料・方法	10
結果	16
討論・総括	25
図表	38
謝辞	66
参考文献	67

論文要旨

老化細胞は不可逆的に細胞周期を停止した細胞と定義され、活発にサイトカインやプロテアーゼを分泌することで周囲組織の炎症や腫瘍化を促進する。老化細胞は生理的に妊娠子宮に出現することが知られており、分娩後も子宮に存在することが考えられる。老化細胞の独特の性質を考えると、老化細胞の除去は産褥子宮の機能回復に重要であることが推測される。しかし、産褥子宮における老化細胞の動態や、それが過剰に蓄積した際の子宮機能障害の詳細、また過剰な蓄積をもたらす子宮内微小環境については明らかになっていない。

本研究では、産褥子宮における老化細胞の挙動とその除去機構を検討した。老化細胞は産褥子宮間質に存在し、徐々に減少して分娩後約1か月で消失した。また、Cd11b陽性細胞、NK細胞、T細胞、及び好中球は産褥子宮に認められなかった一方で、F4/80陽性マクロファージが老化細胞周囲に集積し、老化細胞のクリアランスを促進していることが示された。さらに、産褥子宮に老化細胞が過剰に蓄積するマウスモデルを用いて、老化細胞の過剰な蓄積を引き起こす子宮内微小環境の詳細を解析した。LPS誘導性早産 *Trp53^{loxp/loxp}-Pgr^{cre/+}* (p53^{d/d}) マウスでは老化細胞のクリアランスの遅延と F4/80陽性マクロファージの減少、分娩直後の妊娠率の顕著な低下が認められた。また、LPS誘導性早産 p53^{d/d} マウスの産褥子宮においては向炎症因子の発現が増加していること、またプロゲステロンシグナリングの亢進とエストロゲンシグナリングの減弱が認められた。

以上をまとめると、本研究では産褥子宮には老化細胞が存在し、F4/80陽性マクロファージによって除去されること、加えて子宮内に老化細胞が過剰に蓄積することにより妊娠障害が誘起されるほか、子宮内の炎症やエストロゲンシグナリングの増強によって老化細胞除去機構の障害が引き起こされることが示唆された。

背景・導入

子宮は妊娠過程が進行する場として雌性生殖における重要な器官である。しかし近年、医学領域・畜産領域の双方における問題として妊娠障害が台頭してきた。これらは出産を望む家族や畜産動物の経済性の低下による農家の負担を増大させ、我が国の少子高齢化や畜産界の縮小に繋がる問題であり、医学的・獣医学的に早期の解明と治療法の確立が期待される。例えば医学においては不妊が大きな問題となっている。産婦人科領域の急速な学術的・技術的な進歩にも関わらず、原因不明不妊は 20%近く存在するとされ、その原因の解明と治療法の確立が期待される。また畜産領域においては、ウシにおける人工授精受胎率の低下、ウマにおける早期胚死滅などが大きな問題となっており、そのメカニズムや原因は未解明の部分が多い。子宮疾患は卵巣疾患と異なり診断が難しいものが多く、原因不明として扱われている症例が数多く存在することが考えられる。また妊娠過程においてはブラックボックスとなっているプロセスが多く残されていることから、子宮において妊娠障害を引き起こす未知の要因が存在することが考えられる。

老化細胞とは「不可逆的に細胞周期を停止した細胞」と定義される (Campisi J, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007)。古典的には培養細胞の増殖限界である「ヘイフリック限界」として発見され (Hayflick L, *Exp Cell Res* 1961)、細胞分裂により生じるテロメアの短縮によって細胞増殖が停止することで引き起こされる (d'Adda F, *Nature* 2003; Herbig U, *Mol Cell* 2004)。この一連の細胞現象を細胞老化 (replicative senescence) と呼び、狭義の細胞老化として定義されている (Kuilman T, *Genes Dev* 2010)。一方近年では、DNA 損傷や酸化ストレス、癌遺伝子の発現など、様々な細胞ストレスによって不可逆的な細胞周期の停止が誘導されることがわかってきた (Di Leonardo A, *Genes Dev* 1994; Parrinello S, *Nat Cell Biol* 2003; Serrano M, *Cell* 1997; Lin AW, *Genes Dev* 1998)。このようなストレス誘導性の細胞老化を premature senescence と呼び、広義の細胞老化として認められるようになっている (Kuilman T, *Genes Dev* 2010)。

細胞老化を誘導する主な経路として、p16 を介する経路と、p21 を介する経路が知られている (Fig.1; Campisi J, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007)。p16^{INK4a} は *Cdkn2a* 遺伝子にコードされた CDKi (cyclin dependent kinase inhibitor) の 1 つであり、CDK4 及び CDK6 を阻害することにより Rb のリン酸化を抑制し、細胞周期の停止 (G1 arrest) を誘導する (Shapiro G, *Mol Cell Biol* 1998)。Rb は S 期進入において重要な転写因子 E2F に結合する抑制因子であり、E2F 結合領域のヘテロクロマチン化に関与することで細胞老化状態の安定化に寄与している (Narita M, *Cell* 2003)。一方、癌抑制因子として知られる p53 は様々な細胞ストレスで活性化される転写因子であり (Jin S, *J Cell Sci* 2001)、Cip/Kip ファミリーに属する CDKi である p21^{Cip1/Waf1} を転写促進によって誘導する。p21 は *Cdkn1a* 遺伝子にコードされた CDKi の一つであり、CDK2 複合体に作用することで G1 arrest を誘導し、細胞老化を促進する (Harper JW, *Cell* 1993; el-Deiry WS, *Cell* 1993; Brown JP, *Science* 1997)。p53 の調節因子である Mdm-2 はユビキチンリガーゼの一種であり、p53 をユビキチン化することによってその分解を促進するが、p19^{ARF} (Human; p14^{ARF}) は Mdm-2 に結合することによりその活性を抑制し、p53 の分解を阻害する (Honda R, *EMBO J.* 1999)。これらの 2 つの経路の関与の程度は、細胞・組織ごとに様々であり (Serrano M, *Cell* 1997)、例えば子宮においては p21 依存的に細胞老化が促進されることが示されている (Hirota Y, *PNAS* 2011)。

細胞老化関連βガラクトシダーゼ染色 (senescence-associated β-galactosidase; SA-β-gal 染色) は最もよく用いられる老化細胞の検出方法であり、これは老化細胞におけるライソゾームの増大とガラクトシダーゼ活性の増加を反映している (Dimri GP, *PNAS* 1995; Lee BY, *Aging Cell* 2006)。

細胞老化については古くから腫瘍領域で研究されており、一般的には腫瘍の増殖と悪性化を抑制している一方で (Sharpless NE, *Nature* 2001; Braig M, *Nature* 2005; Chen Z, *Nature* 2005; Xue W, *Nature* 2007; Lin HK, *Nature* 2010; Kang TW, *Nature* 2011)、近年では逆に様々な疾患を増悪させる要因としての報告が多い。例えば肝線維症においては、細胞老化が誘導されることにより過剰な線維化を抑制している一方で、老化細胞の除去の遅延は肝線維症の回復の遅れと慢性肝障害

を続発する (Krizhanovsky V, *Cell* 2008)。また、細胞老化自体が病態の形成に関与している例も存在し、例えば脂肪組織における老化細胞は炎症性アディポカインを分泌し糖尿病の原因になるほか、動脈硬化病変においては細胞老化を生じた血管内皮細胞が存在する (Minamino T, *Nature Med.* 2009; Minamino T, *Circulation.* 2002)。さらに、人為的に老化細胞を除去したマウスでは白内障をはじめとする老化関連疾患が防止できることが示されている (Baker DJ, *Nature* 2011)。老化細胞は様々な正常組織にも存在し、個体の加齢に従って多くの組織で増加することが知られている (Dimri GP, *PNAS* 1995; Paradis V, *Hum. Pathol* 2001; Erusalimsky JD, *Exp Gerontol* 2005; Jeyapalan JC, *Mech Ageing Dev* 2007)。細胞老化が細胞に備わった生理的なストレス応答反応であることを考えると、生理的に出現した老化細胞を組織中から除去することは、組織の恒常性維持において重要な機構であると考えられる。

老化細胞はサイトカインやプロテアーゼを含む老化関連の液性因子の分泌が亢進しており、周囲微小環境に様々な影響を与える (Fig.2; Campisi J, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; Coppe JP, *PLoS Biol* 2008)。この特性を SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) と呼び、その分泌物の中には周囲の細胞に対して腫瘍化促進作用を持つものも存在するほか (Krtolica A, *PNAS* 2001)、IL-6、IL-8、PAI-1、CXCL1 など、周囲の細胞の細胞老化を促進するものも存在する (Tsai HH, *Cell* 2002; Acosta JC, *Cell* 2008; Elzi DJ, *PNAS* 2012; Lesina M, *J Clin Invest* 2016)。このように、組織中での老化細胞の蓄積は周囲の組織障害をもたらし、老化細胞の除去は加齢に伴う組織傷害を防止する上で重要であると考えられている (Baker DJ, *Nature* 2011)。そのため、組織の機能維持には適切な老化細胞の除去機構の存在が必須であると考えられるが、そのような機構の詳細は未だよく分かっていない。例えば、Bakerらは老化細胞をマウス体内から除去する手法を用いて老化細胞の蓄積と老化関連疾患の関連を示しているが (Baker DJ, *Nature* 2011)、その除去手法は細胞老化誘導因子 p16^{INK4a} 発現に伴いミリストイル化された Fkbp-Casp8 が発現し、AP20187 の投与によって Casp8 が重合、細胞にアポトーシスを誘導するという人為的な遺伝子

操作によるものである。肝線維症モデルにおいては NK 細胞による老化細胞除去機構が示唆されているが (Krizhanovsky V, *Cell* 2008; Kang TW, *Nature* 2011)、抗 NK 細胞中和抗体を投与した際の老化細胞の残存や線維症エリアの拡大はわずかであり、NK 細胞以外の免疫細胞の関与が推測される。マウス肝癌のモデルにおいては、p53 依存的に人工的に癌細胞が細胞老化を生じた際に急速に除去される機構が存在することがわかっているが (Xue W, *Nature* 2007)、この機構には自然免疫系が関わると結論付けている。自然免疫系の関与に関しては、細胞老化を誘導した肝星細胞は NF- κ B 依存的に SASP を呈し、培養系においてマクロファージによって除去される可能性を示している (Lujambio A, *Cell* 2013)。また、発生段階において中腎小管や内リンパ嚢において生理的に細胞老化が生じ、老化細胞はやがて除去されることが示されているが、その老化細胞の周囲には F4/80 陽性マクロファージが存在することがわかっている (Muñoz-Espín D, *Cell* 2013)。しかし、マクロファージを介した老化細胞除去機構の詳細は未だ明らかになっていない。

妊娠子宮には老化細胞が存在することがわかっている。マウスは妊娠日齢 4 日目 (Day4、膈栓を認めた日を Day1 とカウントする) の夜に着床反応を開始し、Day5 の朝には着床部位の血管透過性の亢進による Blue Dye Reaction が確認できる。Day5 の夜には Entosis による子宮内膜上皮の消失、Day6 から子宮内膜間質細胞の脱落膜化が進行する (Li Y, *Cell Rep.* 2015)。SA- β -gal 陽性反応は Day8 の脱落膜から認められる (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010)。胎盤の完成後は子宮間膜三角 (mesometrial triangle) 付近に間質細胞の細胞老化が認められ、分娩が近づくとしたがって SA- β -gal 活性の増強が観察される (Hirota Y, *PNAS* 2011)。自然発症早産マウスモデル (*Trp53^{loxp/loxp}Pgr^{cre/+}; p53^{d/d}*) においては、着床部位の子宮間膜三角付近の間質細胞に異常な細胞老化の亢進が生じ、COX2 増加、プロスタグランジン増加、mTOR1 シグナリングを介して血中プロゲステロン濃度の低下を認めることなく早産をきたす (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010; Hirota Y, *PNAS* 2011; Deng W, *J Clin Invest* 2016)。p53・p21 ダブルノックアウトマウスである *Cdkn1a^{-/-}*

*Trp53^{loxp/loxp}Pgr^{cre/+}*マウスでは *p53^{d/d}*マウスで認められた異常が救済される (Hirota Y, *PNAS* 2011)。このことから、妊娠子宮には p21 依存的に細胞老化を起こした老化細胞が生理的に出現することが考えられる (Hirota Y, *PNAS* 2011)。また、妊娠子宮における過剰な細胞老化は早産を誘導し、ヒト早産子宮においても老化細胞が過剰に蓄積することが示されていることから (Cha J, *J Clin Invest* 2013)、子宮においても老化細胞の過剰な蓄積は何らかの子宮機能異常を引き起こすことが示唆される。妊娠子宮の老化細胞の一部は、脱落膜として分娩時に子宮から脱落し除去されることがわかっているが (Cha J, *J Clin Invest* 2013)、mesometrial triangle の間質細胞すべてが胎盤と共に脱落するわけではないため、一部は分娩後の子宮に残存することが推測される。一方でマウスは分娩直後に排卵し、交配を行った際は妊娠・出産に至ることが知られている (Bingel AS, *J Reprod Fertil* 1969)。妊娠の成立においては胚と子宮のサイトカイン相互作用やホルモンによる子宮の胚受容能獲得など、様々なプロセスが同時並行で行われる必要があり (Egashira M, *Reprod Med Biol* 2013; Haraguchi H, *Mol Endocrinol.* 2014)、老化細胞による活発なサイトカイン分泌がこれらの着床現象の一連の過程を障害する可能性が考えられる。しかし、産褥子宮においてこれらの老化細胞が子宮の着床痕にとどまり続けるのか、あるいは消失するのか、という分娩後の動態については明らかでない。

ヒト子宮内膜は分泌期において子宮内膜の肥厚と間質細胞の脱落膜化が生じるが、マウス妊娠子宮間質では脱落膜化に際して老化細胞が出現することがわかっている (Hirota Y, *PNAS* 2011)。このことから、ヒト子宮内膜には性周期毎に老化細胞が出現し、月経に伴い子宮から排出・除去されることが考えられる。老化細胞の過剰な蓄積が組織機能障害を引き起こす可能性を考えると、子宮内膜における老化細胞の異常な残存は妊娠障害を引き起こすことが推測される。しかし、老化細胞の蓄積が妊娠過程に及ぼす影響は明らかでない。子宮とは常に増殖・脱落を繰り返す組織であることを考えると、老化細胞による妊娠障害を調べるための臨床検体の収集には、性周期を揃えた特定の背景を持つ不妊患者の子宮内膜が必要であり、臨床サンプル

の収集は非常に難しい。このことから、特定の背景を持つ不妊患者の臨床サンプルの収集のためには、子宮に老化細胞が蓄積する子宮内環境を誘発する病態を推定することが必要である。

しかし、老化細胞の異常な蓄積を引き起こす子宮内微小環境は未だ明らかでない。

そこで本研究では、妊娠障害を引き起こす新規の子宮因子として老化細胞の可能性を検討するため、マウス産褥子宮における老化細胞の除去機構を明らかにすること、また老化細胞の異常な残存を引き起こす子宮内微小環境を明らかにすること、の2点を目的として研究を行った。まず、マウス産褥子宮をサンプルとして、SA- β -gal 染色によって老化細胞の検出と産褥子宮内における動態の観察を試みた。さらに、細胞老化関連因子の発現を免疫染色法で調べた。また、細胞老化関連因子 (p16、p21) ノックアウトマウスを用いて産褥子宮の細胞老化の調節因子の同定を試みた。次に、産褥子宮における老化細胞除去に関与する白血球分画を調べ、特定の白血球分画を分娩後マウスにおいて人為的に除去した際の老化細胞のクリアランス変化と分娩直後の妊娠への影響を観察した。さらに、老化細胞が過剰に子宮に蓄積する早産マウスモデルを用い、このマウスの産褥子宮における老化細胞蓄積と分娩後の次回妊娠の転帰を観察した。最後に、老化細胞蓄積の背景となる微小環境の詳細を明らかにし、この変化を改善する方法を検討した。

方法・材料

実験動物

マウスは温度・湿度・照明が管理された動物施設で、自由給餌、自由給水の環境で飼育した。6週齢以上の野生型 (ICR, 日本 SLC) の未経産雌マウスを実験に使用した。雌マウスの交配には生殖能を確認した野生型の雄マウス (ICR, 日本 SLC) を用い、交配は 17:00-19:00 の間に開始した。膣栓は交配を開始した翌日の 9:00-11:00 にチェックした。膣栓を認めた日を妊娠 1 日目 (day1) とすると、通常 ICR 野生型雌マウスは day19 の深夜から day20 早朝に出産が認められる。全ての妊娠雌は単頭飼育とし、day17 の朝から毎日出産をチェックした (9:00-11:00)。出産を認めた日を分娩後 1 日目 (Postpartum day 1; PPD1) と定義した。全ての動物実験は、東京大学動物実験委員会の承認のもと、そのガイドラインに基づいて行った。

Cdkn1a ノックアウトマウス、*Cdkn2a* ノックアウトマウスは次のように作成した。National Cancer Institute (NCI) Mouse Repository より FVB.129-*Cdkn2a*^{tm2.1Rdp}/Nci マウス (Sharpless NE, *Nature* 2001) を入手した。また、The Jackson Laboratory より 129S/Sv-*Cdkn1a*^{tm1Tyj}/J マウス (Brugarolas J, *Nature* 1995) を入手した。この両系統のマウスを掛け合わせ、*Cdkn1a*^{+/+}*Cdkn2a*^{+/+} (WT)、*Cdkn1a*^{-/-}*Cdkn2a*^{+/+} (*Cdkn1a*KO)、*Cdkn1a*^{+/+}*Cdkn2a*^{-/-} (*Cdkn2a*KO)、*Cdkn1a*^{-/-}*Cdkn2a*^{-/-} (dKO) の 4 系統を確立した。ジェノタイプングプロトコルは全て元の論文に準拠した (Brugarolas J, *Nature* 1995; Sharpless NE, *Nature* 2001)。交配等は上述の野生型雄マウスを導入し、同様にして行った。

Trp53^{loxp/loxp}-*Pgr*^{cre/+} マウスは次のように作成した。Mouse Models of Human Cancers Consortium より *Trp53*^{loxp/loxp} マウス (Jonkers J, *Nat Genet.* 2001) を入手、これと J.B. Lydon and F.J. DeMayo (Baylor College of Medicine, Houston, Texas) より供与された *Pgr*^{cre/+} マウス (Soyal, *Genesis* 2005) を交配させ、*Trp53*^{loxp/loxp}-*Pgr*^{cre/+} (p53^{d/d}) マウス及び *Trp53*^{loxp/loxp}-*Pgr*^{+/+} (p53^{f/f}) マウスを作出し

た。ジェノタイピングプロトコルは全て元の論文に準拠した (Jonkers, *Nat Genet.* 2001; Soyal SM, *Genesis* 2005)。交配等は上述の野生型雄マウスを導入し、同様にして行った。

野生型マウスへの抗 F4/80 中和抗体投与によるマクロファージ除去

ATCC (American Type Culture Collection) より入手した抗 F4/80 抗体産生ハイブリドーマを 5% ウシ胎子血清入り RPMI 1640 培地で培養し、得られた培養液から MabTrap Kit (GE Healthcare) を用いて抗 F4/80 中和抗体を精製した。分娩後の野生型マウス (ICR) に対して、PPD1 より PPD7 まで 24 時間おきに 1 日 1 回 250 μ g/マウスの抗 F4/80 中和抗体を腹腔内投与した。マウスは PPD8 に安楽死させ、子宮を回収した。抗体の濃度は Bio-RAD Quick Start Bradford 1xDye reagent (Bio-RAD) を用いて測定した。

LPS 誘導性早産モデルの確立

野生型マウス及び *Trp53^{loxp/loxp}-Pgr^{cre/+}*マウスと *Trp53^{loxp/loxp}-Pgr^{+/+}*マウスを用いた。交配には野生型雄マウスを使用し、同様に行った。

野生型マウス (ICR) における LPS 誘導性早産モデルは Huang H, *Placenta* 2011 の手法に準じた。Day16 の 9:00-11:00 に LPS を 100 μ g/マウス腹腔内投与した。Day17 の 9:00-11:00 にマウスを観察し、早産を起こしていることを確認した。

*p53^{fl}*マウスと *p53^{d/d}*マウスを用いた LPS 誘導性早産モデルは Cha J, *J Clin Invest.* 2013 に準じた。Day16 の 9:00-11:00 に LPS を 10 μ g/マウス腹腔内投与した。妊娠雌は Day17-22 まで毎日 9:00-11:00 に観察し、分娩の有無を確認した。Day17 に分娩を認めたものを早産と取扱い、Day19-20 に分娩を認めたものを正常産と取り扱って以後の実験に用いた。

LPS 誘導性早産モデルに対するプロゲステロン投与

Day16の9:00-11:00にLPSを10 μ g/マウス腹腔内投与しDay17に早産を生じたp53^{dd}マウスに対して、PPD1、PPD2の9:00-11:00においてプロゲステロン（2mg/マウス in 0.1ml sesame oil）皮下投与した。マウスはPPD3に安楽殺し、子宮を採取した。

マクロファージ除去と分娩直後の妊娠転帰の観察

6週齢以上のp53^{fl}マウス、p53^{dd}マウスを用いた。交配には生殖能を確認した野生型の雄マウス（ICR, 日本 SLC）を用いた。交配は17:00-19:00の間に開始し、膣栓は交配を開始した翌日の9:00-11:00に確認した。膣栓を認めた日を妊娠1日目（day1）と定義し、妊娠雌は単頭飼育とした。Day16の9:00-11:00にLPSを10 μ g/マウス腹腔内投与した。その後の妊娠の転帰は9:00-11:00に毎日確認した。分娩を認めた日をPPD1と定義した。PPD1において生殖能を確認した野生型の雄マウス（ICR, 日本 SLC）と交配し、PPD2に膣栓を認めた場合は雄マウスを引き離し、認めなかった場合はPPD7まで交配を行った。PPD1の時点で胎子は全て安楽殺した。その後の妊娠の転帰は9:00-11:00に毎日確認し、交配を行った日から数えて22日目まで観察した。マクロファージ除去には6週齢以上の正期産p53^{fl}マウスを用い、PPD1よりPPD7まで48時間おきに1日1回250 μ g/マウスの抗F4/80中和抗体を腹腔内投与した。分娩直後の妊娠転帰は同様に観察した。

胎子安楽殺モデル

野生型マウス（ICR）を用いた。PPD1において全ての胎子の娩出を確認、直後に胎子を全て安楽殺した。PPD8にマウスを安楽殺し、子宮を採材した。

組織の準備

分娩後マウスもしくは分娩前マウスを安楽死させ、子宮組織を回収した。マウス産褥子宮は

着床痕の間で切断した。組織は一部を液体窒素で瞬間凍結し、一部を 10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。凍結した組織は-80℃にて保管した。凍結切片の作成にはクリオスタット (Leica CM1950) を用い、16 μm 厚で作成し各種組織染色に使用した。ホルマリン固定した組織はパラフィン包埋ののち、マイクロトーム (Leica RM2235) で 6 μm 厚の薄切を作成し各種染色に用いた。スライドガラスは MAS-GP コートスライドガラス (MATSUNAMI) を使用した。サンプルは異なる 3 匹以上の個体から一個体につき複数個ランダムに選択し使用した。

SA- β -gal 染色

Krizhanovsky V, *Cell* 2008 の手法にしたがって、凍結切片を 0.5%グルタルアルデヒドで固定後、発色液の pH を 5.5 に設定して lacZ 染色を施行した。37℃で遮光にて 6 時間発色した。対比染色にはエオジンを用いた。複数の実験群で染色領域の比較を行う際は、対象となる実験群の全てのサンプルを同時に染色した。

免疫染色法

免疫染色には Dako EnVision System 免疫染色キットを用いた。一次抗体として、抗 p21 抗体 (Abcam)、抗 p16 抗体 (Santa Cruz)、抗 p19 抗体 (Santa Cruz)、抗 γ H2AX 抗体 (Upstate)、抗 α SMA (Dako)、抗 cytokeratin 抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank)、抗 F4/80 抗体 (Serotec)、NIMP-R14 抗体 (Santa Cruz)、抗 CD3 (Dako)、抗 Perforin 抗体 (Torrey Pines Biolabs)、抗 Cd11b 抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank) を用いた。発色には ImmPACT NovaRED (Vector Laboratory、染色陽性細胞は赤紫色に発色) を使用し、対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。抗 Ki67 抗体 (Thermo) を用いた検出にはヒストファイン SAB-PO(M) キット (陽性細胞は黄土色に発色) を使用した。

TUNEL 法

In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) を用いた。陽性コントロールにはキット付属の DNase で処理した肝臓の組織を用いた。発色には ImmPACT NovaRED (Vector Laboratory、染色陽性細胞は赤紫色に発色) を用いた。

RNA 抽出と逆転写

凍結組織から Isogen (ニッポンジーン) もしくは TRI Reagent (MRC) を用いて RNA を抽出し、逆転写反応 (RT) には ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いた。マウス産褥子宮は着床痕の間で切断し、子宮 RNA は少なくとも 2 つ以上の断片から独立して抽出した。

マイクロアレイと GO 解析

PPD3 の産褥子宮の RNA を用いた。正期産の p53^{fl} (n=3) マウスと早産 p53^{dd} (n=7) マウスの RNA をそれぞれ混ぜ合わせ、マイクロアレイ及び GO 解析を行った。全ての解析は Toray Industries, Inc. に委託した。全 RNA 増幅は Ambion Amino Allyl aRNA kit を用い、aRNA のラベリングには Amersham Cy5 Mono-Reactive Dye was utilized for CyDye を使用した。3D-gene[®] DNA chip によってハイブリダイゼーションを行った。p53^{fl} に対して p53^{dd} で 2 倍以上の発現が認められたものを増加した遺伝子 (up-regulated)、0.5 倍以下の発現を認めたものを減少した遺伝子 (down-regulated) とした。GO 解析はマイクロアレイのデータを用い、Up-regulated、Down-regulated に関してそれぞれ解析を行った。GO クラスタのデータベースは AmiGO 2 を用いた。

定量的 PCR

定量的 PCR 試薬として SYBR Premix Ex TaqII Tli RNaseH Plus (TaKaRa) を用いて、Thermal

Cycler Dice Real Time System Lite (TaKaRa) の機器を用いて検討した。PCR 反応は 3 step で行い、95°C・5 秒、60°C・30 秒、72°C・30 秒で 40 サイクルの反応を行った。内部コントロールとして *Actb* を使用した。プライマー配列の一覧は Table 1 に示す。

染色組織像の定量化

SA- β -gal 染色陽性面積、F4/80 陽性面積の算出には GIMP2 2.8.18 (GNU Image Manipulation Program)を用いた。3 階調のポスタリゼーション処理を行った後、陽性領域を特定色選択によって抽出、対象ピクセル数を算出した。Cd11b 陽性細胞数は同一面積の画像から複数回カウントし、その平均を用いた。各々コントロール群の平均値を 1 と置き換え、相対値を計算した。

統計解析

統計処理は Microsoft Office Excel を用いた。2 群の検定に Student の t 検定、Fisher 正確確率検定、 χ^2 乗検定を使用した。 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

結果

産褥子宮間質に老化細胞が存在する

正常な野生型マウス妊娠子宮の子宮間膜三角 (mesometrial triangle) において SA- β -gal 陽性の老化細胞が存在することがわかっている (Hirota Y, *PNAS* 2011)。また、ヒト脱落膜には SA- β -gal 染色で陽性を示す老化細胞が存在することがわかっていることから (Cha J, *J Clin Invest.* 2013)、産褥子宮には老化細胞が残存していることが推測される。そこで、分娩 1 か月後までのマウス産褥子宮に対して、代表的な細胞老化検出法である SA- β -gal 染色を行った。Day17 の 9:00-11:00 から毎日同時刻に妊娠マウスを観察し、分娩が認められた日を Postpartum Day1 (PPD1) と定義した。その結果、PPD2 (分娩後 2 日目)、PPD4、PPD8 の子宮には老化細胞が存在し、その面積は PPD2 に比べて PPD4 と PPD8 にて有意に減少していた (Fig.3A, B)。また、PPD31 の子宮においては SA- β -gal 陽性を示す細胞は観察されず、着床痕 (胎盤が付着していた部位) において分娩時の出血を反映したと考えられるヘモジデリン沈着が散見された (Fig.3A)。さらに、老化細胞の組織学的な位置を確認するため、上皮細胞マーカーであるサイトケラチン及び筋層細胞マーカーである α SMA に対して免疫染色を行った。その結果、いずれのマーカーに対しても老化細胞領域は陰性を示し、老化細胞領域は子宮間質に存在することが考えられた (Fig.4)。このことから、マウス産褥子宮には妊娠子宮の子宮間膜三角において存在していた老化細胞が残存し、徐々に減少し、分娩から約 1 か月には消失していることが推測された。

産褥子宮に存在する老化細胞は p21 を発現する

細胞老化を誘導する主な経路として、p16 を介する経路と、p21 を介する経路が知られている (Fig.1; Campisi J, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007)。また、これらの 2 つの経路の関与の程度は、細胞・組織ごとに様々であり (Serrano M, *Cell* 1997)、妊娠子宮においては p21 依存的に細胞老化が促進されることが示されていることから (Hirota Y, *PNAS* 2011)、妊娠子宮に存在する老化細胞

胞が残存した産褥子宮の老化細胞では、p21 依存的に細胞老化が引き起こされている可能性が考えられる。この仮説を立証するため、p21 をはじめとする細胞老化因子に対する免疫染色法を実施した。その結果、産褥子宮における老化細胞領域では p21 を発現していた一方で (Fig.5)、各陽性コントロール組織と比して p16、p19 の発現は認められなかった (Fig.6; Zhang K, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2014; Churchman ML, *PLoS Genet.* 2011)。DNA 損傷マーカー γ H2AX もまた細胞老化の補助的マーカーとして用いられることが多いが (Campisi J, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007)、陽性コントロール組織と比して γ H2AX の発現は認められなかった (Fig.6; Cordelli E, *Methods Mol Biol.* 2013)。これらの p21 の発現は過去の文献とも一致し (Hirota Y, *PNAS* 2011)、産褥子宮における老化細胞は p21 依存的に細胞老化を誘導していることが考えられた。

そこで、更にこの仮説を検証するため、既に確立された全身性ノックアウトマウスを用いて *Cdkn1a*^{+/+}*Cdkn2a*^{+/+} (WT)、*Cdkn1a*^{-/-}*Cdkn2a*^{+/+} (*Cdkn1a*KO)、*Cdkn1a*^{+/+}*Cdkn2a*^{-/-} (*Cdkn2a*KO)、*Cdkn1a*^{-/-}*Cdkn2a*^{-/-} (dKO) の 4 系統を確立し、産褥子宮における老化細胞の局在を調べた。その結果、いずれのノックアウトマウスにおいても特徴的な老化細胞の局在の変化は認められなかった (Fig.7)。

産褥子宮に F4/80 陽性マクロファージが存在する

PPD4 の産褥子宮に存在する老化細胞が PPD8 にはその領域を縮小させ、PPD31 には消失していたことから (Fig.3A)、産褥子宮における老化細胞除去機構の存在が推測される。肝線維症モデルにおいて NK 細胞が老化細胞の除去に関わっていることや (Krizhanovsky V, *Cell* 2008)、培養系において老化細胞がマクロファージによって貪食されること (Lujambio A, *Cell* 2013) から、何らかの白血球分画が産褥子宮に存在する老化細胞の除去に関わっていることが考えられる。そこで、産褥子宮における各白血球分画の局在を各々に対して特異的な抗体を用いた免疫染色法によって調べた。その結果、PPD8 の産褥子宮において F4/80 陽性のマクロファージが老化細

胞領域の周囲に存在していた一方で (Fig.8A, 8B)、Cd11b 陽性細胞は認められなかった。F4/80 陽性細胞は一部老化細胞領域内に浸潤している像も散見された (Fig. 8A)。また、強拡大においては F4/80 陽性細胞が周囲の細胞を貪食していることを疑わせる像も散見された (Fig.8C)。これは中腎小管や内リンパ囊において生理的に細胞老化が生じ、老化細胞はやがて除去され、その老化細胞の周囲には F4/80 陽性マクロファージが存在することがわかっているという過去の報告とも一致する (Muñoz-Espín D, *Cell* 2013)。

マクロファージはアポトーシス細胞に表出されたホスファチジルセリンを認識する MEG-E8 を通じてアポトーシス細胞の貪食に関わっていることが知られている (Hanayama R, *Science* 2004)。そこで、老化細胞のクリアランス機構におけるアポトーシスの関与を調べるため、マウス産褥子宮を用いてアポトーシス細胞を検出する TUNEL 染色を行った。その結果、TUNEL 染色において陽性を示す細胞は検出されなかった (Fig.8D, 8E)。

さらに、NK 細胞 (Perforin)、好中球 (NIMP-R14)、T 細胞 (CD3) の局在も同様に免疫染色で調べた。その結果、いずれの細胞においても PPD8 の産褥子宮には局在が認められなかった (Fig.9)。これは妊娠後期の子宮において NK 細胞が認められないという過去の文献とも一致する (Delgado SR, *J Leukoc Biol* 1996)。以上の結果から、産褥子宮においては老化細胞周囲に F4/80 陽性マクロファージが集積し、老化細胞の除去に関与していることが推測された。

産褥子宮に存在する老化細胞のクリアランスは F4/80 陽性マクロファージ依存的である

老化細胞周囲に F4/80 陽性マクロファージが集積していることから (Fig.8A)、F4/80 陽性マクロファージが老化細胞の除去に関与していることが考えられる。そこで、産褥マウスに対して抗 F4/80 中和抗体を用いて体内のマクロファージを除去し、その際の老化細胞領域の変化を観察した。マクロファージは抗 F4/80 中和抗体の投与によって体内から除去することが出来る (Bedoret D, *J Clin Invest* 2009)。その結果、中和抗体投与群ではコントロール群に比べて顕著に

老化細胞領域が増加していた (Fig.10A, B)。これは F4/80 陽性マクロファージが産褥子宮における老化細胞の除去に関与している可能性を示すものである。

老化細胞は SASP (Senescence-associated secretory phenotype) という特徴を有し、活発なサイトカイン・プロテアーゼ分泌により周囲微小環境に影響を与える (Fig.2; Campisi J, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; Coppe JP, *PLoS Biol* 2008)。従って、産褥子宮に存在する老化細胞の異常な残存はその後の子宮機能に悪影響を与えることが考えられる。マウスは分娩時におけるプロゲステロンシグナリングの減少とエストロゲンシグナリングの増加に伴い排卵を行い、分娩直後に交配が成立した場合には妊娠・出産に至ることが知られている (Bingel AS, *J Reprod Fertil* 1969)。すなわち、産褥子宮における老化細胞除去機構の障害はマウス分娩直後妊娠を阻害することが推測される。この仮説を検証するため、体内からマクロファージを除去し、老化細胞除去機構を障害した際の分娩直後の妊娠を観察した。 *Trp53^{loxp/loxp}-Pgr^{+/+}* (p53^{fl/fl}) マウスは day16 に少量の LPS を投与した場合でも 100%の割合で正常に分娩に至ることが知られている (Cha J, *J Clin Invest*. 2013)。そこで、LPS を投与した p53^{fl/fl} マウスが正期産に至ったことを確認の上、PPD1-7 に F4/80 中和抗体を投与、雌マウスを PPD1 から交配をかけ、妊娠の転帰を観察した。マウスは搾乳刺激によって着床遅延が生じることが知られているため、胎子は PPD1 の時点で全て安楽殺した (Bergstrom S, *Fertil Steril*. 1972)。その結果、コントロールマウスでは 92%の割合で分娩に至ったのに対し、マクロファージを除去したマウスでは分娩に至った割合が 50%と、若干の低下傾向を示したが、Fisher の正確性検定では $P=0.1357$ と有意差は認められなかった (Fig.11)。

LPS 誘導性早産マウスの産褥子宮では老化細胞のクリアランスが遅延する

p53 全身性ノックアウトマウスは不妊を示すが、発育不良などの理由で妊娠実験には適さないことが知られている (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010)。これを解決するため、プロゲステロン受容体プロモーター制御下で発現する Cre タンパクを用いた Cre-loxp システムを利用したコンディ

シヨナルノックアウトマウス (*Trp53^{loxp/loxp}-Pgr^{cre/+}* ; *p53^{d/d}*) が開発された。プロゲステロン受容体は卵巣及び子宮内膜で発現するため (Haraguchi H, *Mol Endocrinol.* 2014)、*p53^{d/d}* マウスにおいて *p53* はこれらの組織にて特異的にノックアウトされる (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010; Hirota Y, *PNAS* 2011)。*p53^{d/d}* マウスの妊娠子宮では *p21* 依存的な細胞老化が亢進し、血中プロゲステロン濃度の低下を認めることなく自然発症的に早産を呈することが知られている (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010; Hirota Y, *PNAS* 2011; Deng W, *J Clin Invest* 2016)。ただし、このマウスの早産率は約 52%と確実なものではなく、これを改良するために day16 の *p53^{d/d}* マウスに少量 (10 μ g/マウス) の LPS を腹腔内投与する早産モデルが開発された。この早産モデルにおいては、*p53^{d/d}* マウスでは 100%の割合で早産を引き起こすのに対し、コントロールマウス (*Trp53^{loxp/loxp}-Pgr^{+/+}* ; *p53^{fl/fl}*) では全てのマウスが正期産となる (Cha J, *J Clin Invest.* 2013)。また、早産モデルにおいては脱落膜のマクロファージの性質が M2 から M1 に傾いていることが示唆されている (Xu Y, *J Immunol.* 2016)。老化細胞除去機構に関与する F4/80 陽性マクロファージは M2 様の性質を持つことから、*p53^{d/d}* マウスを用いた LPS 誘導性早産モデルの産褥子宮では過剰に細胞老化が亢進していることが考えられる。従って、このモデルは産褥子宮における細胞老化の亢進と続発する妊娠障害を生じ、過剰な老化細胞残存の背景となる子宮内微小環境の解明に有用であることが予想される。

この仮説を検証するため、LPS 誘導性早産マウスの PPD3、PPD8 の産褥子宮において老化細胞を検出する SA- β -gal 染色を行った。その結果、PPD3 では *p53^{fl/fl}* と *p53^{d/d}* にて老化細胞領域に変化は認められなかった一方で、PPD8 の *p53^{d/d}* マウスにおいては顕著に老化細胞領域が拡大していた (Fig.12A, B)。同様の傾向は ICR における LPS 誘導性早産モデル (Huang H, *Placenta* 2011) においても認められた (Fig.13)。*p53^{fl/fl}* マウスでは day16 における LPS (10 μ g/マウス) の投与は早産を引き起こさないことが知られており (Cha J, *J Clin Invest.* 2013)、LPS の投与が老化細胞領域の変化を誘導していないことを確かめるため、day16 に LPS (10 μ g/マウス) を投与した正期

産 p53^{fl}マウスとコントロール産 p53^{fl}マウスにおいて、PPD8 の産褥子宮に対して SA-β-gal 染色を行った。その結果、LPS 投与産 p53^{fl}マウスではコントロールと比較して老化細胞領域の変化は認められなかった (Fig.14)。このことから、少量の LPS の投与では産褥子宮における老化細胞領域の拡大は起こらず、早産マウスにおいて産褥子宮に顕著な老化細胞領域の増大が生じる可能性が示唆された。

LPS 誘導性早産マウスの分娩直後の妊娠率は有意に低下する

マウスは分娩直後に排卵し、交配が成立した場合は妊娠・出産に至ることが知られている (Bingel AS, *J Reprod Fertil* 1969)。老化細胞は SASP (Senescence-associated secretory phenotype) という特徴を有し、活発なサイトカイン・プロテアーゼ分泌により周囲微小環境に影響を与える (Fig.2; Campisi J, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; Coppe JP, *PLoS Biol* 2008)。従って、産褥子宮に存在する老化細胞の異常な残存はその後の子宮機能に悪影響を与えることが考えられる。そのため、老化細胞のクリアランスが遅延する LPS 誘導性早産モデルマウスでは分娩直後の妊娠が障害される可能性が考えられる。この仮説を検証するため、p53^{fl} と p53^{dd} マウスの双方を生殖能が確認された ICR 雄と分娩直後に交配を行い、その後の妊娠の転帰を観察した。マウスは搾乳刺激によって着床遅延が生じることが知られているため、胎子は PPD1 の時点で全て安楽殺した (Bergstrom S, *Fertil Steril.* 1972)。その結果、コントロールマウスではほぼ 100%の割合で出産が認められたのに対して、LPS 誘導性早産 p53^{dd}マウスにおいては分娩直後の妊娠が有意に障害されていることが観察された (Fig.15)。これは産褥子宮における老化細胞の異常な残存が分娩直後の妊娠を阻害する可能性を示すものである。

LPS 誘導性早産マウスにおいて F4/80 陽性マクロファージの集積が減少する

産褥子宮に存在する老化細胞領域周囲には F4/80 陽性マクロファージが集積し、老化細胞の

クリアランスの促進に関与していた (Fig.8, 10)。LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスにおいては、PPD3 における老化細胞領域には変化はないものの、PPD8 の老化細胞領域はコントロールと比較すると顕著に拡大しており、産褥子宮の老化細胞クリアランス機構に何らかの異常を生じていることが考えられた (Fig.12A, B)。そこで、p53^{ff} と p53^{dd} マウスにおける産褥子宮の F4/80 陽性マクロファージ及び Cd11b 陽性マクロファージの局在を免疫染色法によって調べた。その結果、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの PPD8 の産褥子宮においては顕著に F4/80 陽性マクロファージの集積が減少していた一方で、Cd11b 陽性マクロファージの集積は増加していた (Fig.16A, B, C)。一方で、LPS を投与した p53^{ff} マウスではコントロールマウスと比較して、それぞれのマクロファージの集積に変化は認められなかった (Fig.17)。これは LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスにおいて、F4/80 陽性マクロファージ依存的な老化細胞除去機構に障害が生じていることを示唆している。

LPS 誘導性早産マウスでは産褥子宮微小環境が向炎症性・エストロゲン優位に変化する

F4/80 陽性マクロファージは産褥子宮に存在する老化細胞のクリアランスを促進する一方で (Fig.8, 10)、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスでは F4/80 陽性マクロファージの集積が減少し (Fig.16)、老化細胞が異常に残存した (Fig.12)。そこで、この異常を引き起こす子宮内微小環境を解析するため、コントロールと比較して老化細胞領域自体には変化が認められない PPD3 の産褥子宮を用いてマイクロアレイと GO 解析を行った (Supplemental Table.1)。23474 の遺伝子を解析し、約 3%にあたる 719 の遺伝子が 2 倍以上発現増加していた一方で、約 1.5%にあたる 348 の遺伝子が半分以下に発現が低下していた (Rate = p53^{dd} / p53^{ff})。GO 解析においては、p53^{dd} では炎症亢進性遺伝子 (inflammatory promoting)、自然免疫関連遺伝子 (innate immune response)、炎症反応遺伝子 (inflammatory response)、及び免疫反応関連遺伝子 (immune response) のクラスターが有意に増加していた (Supplemental Table.2)。この結果は各 GO クラスター

において代表的な遺伝子に関する qPCR でも確かめられた (Fig.18)。

マウスは分娩直後に排卵し、交配が成立した場合は妊娠・出産に至ることが知られている (Bingel AS, *J Reprod Fertil* 1969)。妊娠においては卵巣からのプロゲステロン・エストロゲンが重要な役割を持ち、これらの卵巣ホルモンは子宮内膜リモデリングに関与していることが知られている (Haraguchi H, *Mol Endocrinol.* 2014)。p53^{dd}マウスにおいては卵巣からのプロゲステロンの低下を認めることなく早産が自然発症することから (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010)、LPS 誘導性早産マウスの産褥子宮ではこれらのシグナル下流の応答が異なっている可能性がある。そこで、LPS 誘導性早産 p53^{dd}マウスの産褥子宮におけるプロゲステロン・エストロゲンシグナリングの働きを、それぞれに応答する代表的な遺伝子の発現によって調べた。その結果、LPS 誘導性早産 p53^{dd}マウスにおいては有意にプロゲステロン応答性遺伝子の発現が低下していた一方で、エストロゲン応答性遺伝子の発現は顕著に増加していた (Fig.19)。また、LPS 誘導性早産 p53^{dd}マウスの産褥子宮では有意にプロゲステロン受容体遺伝子の発現が低下していた (Fig.19)。これはコントロールマウスに比べ、LPS 誘導性早産 p53^{dd}マウスの産褥子宮ではエストロゲンシグナリング優位に働いていることを示唆する。

老化細胞は SASP (Senescence-associated secretory phenotype) という特徴を有し、活発なサイトカイン・プロテアーゼ分泌能を有する (Fig.2; Campisi J, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; Coppe JP, *PLoS Biol* 2008)。LPS 誘導性早産 p53^{dd}マウスにおいて、PPD3 では老化細胞領域に顕著な拡大は認められなかった (Fig.12)。マイクロアレイにおいても SASP 関連遺伝子に有意な増加は認められず、この結果は PPD3 の産褥子宮を用いた qPCR でも確かめられた (Fig.20)。一方で、PPD4 の産褥子宮を用いた qPCR では、LPS 誘導性早産モデルにおいて SASP 関連遺伝子の顕著な増加を認めた (Fig.21)。これは PPD3 に LPS 誘導性早産 p53^{dd}マウスの産褥子宮に存在する向炎症性・エストロゲン優位な微小環境の変化に続発して、SASP 関連遺伝子の発現が増加するという連続的な微小環境の変化が生じている可能性を示唆する。

そこで、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスにおける微小環境の変化を救済するため、day16 に LPS を投与し day17 (=PPD1) に早産を生じた p53^{dd} マウスに対して、PPD1 から連日プロゲステロン (2mg/マウス) を皮下投与し、PPD3 における LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの子宮内微小環境を、炎症性遺伝子や卵巣ホルモン応答性遺伝子の qPCR 法を用いて調べた。その結果、PPD3 において向炎症性遺伝子の発現が一部抑制された (Fig.22)。また、プロゲステロン応答性遺伝子には変化を認めなかったものの、エストロゲン応答性遺伝子の一部の発現は抑制され (Fig.23)、プロゲステロン投与により LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの産褥子宮の微小環境が部分的に改善される可能性が示唆された。

野生型マウスにおいて搾乳刺激の除去により老化細胞領域が拡大する

LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスでは早産と同時に胎子は死亡することがわかっている (Cha J, *J Clin Invest.* 2013)。搾乳刺激により子宮復古が促進されることが知られており、すなわち LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスにおいては早産に伴う胎子死亡によりその後の搾乳刺激の消失、子宮復古の遅れが生じていることが考えられる。そこで、この仮説を検証するため、野生型マウス (ICR) において分娩直後に胎子を安楽殺、PPD8 における老化細胞領域を SA-β-gal 染色を用いて観察した。その結果、胎子安楽殺群ではコントロール群と比較して顕著に老化細胞が拡大していた (Fig.24)。また、子宮内膜リモデリングを調べるため細胞増殖マーカーである Ki67 の染色を行ったところ、胎子安楽殺群ではコントロール群には存在しない管腔上皮の増殖が認められた (Fig.25)。

討論・総括

正常な野生型マウス妊娠子宮において、子宮間膜三角に老化細胞が存在することがわかっている (Hirota Y, *PNAS* 2011)。ヒト胎盤に付着した脱落膜組織に老化細胞が存在することから (Cha J, *J Clin Invest.* 2013)、産褥子宮には妊娠子宮に存在した老化細胞が残存することが予想される。老化細胞は産褥子宮間質に存在し、徐々に減少してやがて消失したという老化細胞を検出する SA- β -gal 染色の結果は (Fig.3, 4)、この仮説を裏付けるものである。また、過去の知見において妊娠子宮に存在する老化細胞は p21 依存的に細胞老化を生じていることもわかっており (Hirota Y, *PNAS* 2011)、これは産褥子宮に存在する老化細胞は p21 を発現するという結果 (Fig.5, 6) と一致する。従って、妊娠子宮の子宮間膜三角に存在した老化細胞が分娩後も子宮に残存し、やがて消失するという老化細胞の一連の動態が推測される。

一方で、*Cdkn1a*^{-/-}*Cdkn2a*^{+/+} (Cdkn1aKO)、*Cdkn1a*^{+/+}*Cdkn2a*^{-/-} (Cdkn2aKO)、*Cdkn1a*^{-/-}*Cdkn2a*^{-/-} (dKO) のマウスともに野生型マウス (WT) と比較して分娩後子宮の老化細胞領域に変化は認められなかった (Fig.7)。通常 p53 は p21 の転写を促進することで細胞老化を誘導することが知られているが (Jin S, *J Cell Sci* 2001)、妊娠子宮に存在する老化細胞は p53 のコンディショナルノックアウトマウス (*Trp53*^{loxp/loxp-Pgr^{cre}/+}; p53^{d/d}) において増加することがわかっており、この異常は p21 を同時にノックアウトすることで救済される (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010; Hirota Y, *PNAS* 2011; Deng W, *J Clin Invest* 2016)。このことは妊娠子宮の老化細胞において p53 と p21 の関連が通常とは逆方向であることを示唆している。また、細胞老化を誘導する因子は p16 や p21 以外にも多数存在し、例えば Cip/Kip ファミリーに属する CDKi である p27 は CDK2 を抑制することで細胞老化を誘導する (Al Sorkhy M, *Cell Cycle* 2016)。すなわち、これらは細胞老化を誘導する経路は複数かつ冗長に存在し、また妊娠子宮老化細胞では未知の細胞老化誘導経路が働いている可能性を示唆している。このように、生理的な細胞老化は p21 非依存的な経路や、他の

細胞老化誘導因子も関与した冗長的な経路によって誘導されている可能性も存在する。

なお、細胞老化領域においてサイトケラチンは陰性を示したが (Fig.4)、サイトケラチンは栄養膜細胞のマーカーとしても用いられるため (Konno T, *Biol Reprod* 2007)、この結果から老化細胞領域には栄養膜細胞が存在しないことが示唆される。一方で栄養膜細胞の一部は **Invasive Trophoblast Cell** などとして子宮内膜まで浸潤し、これらの細胞はサイトケラチン陰性であることが考えられる。このため、老化細胞領域にこれらの胎子由来細胞が混在している可能性は否めない。Cdkn1aKO、Cdkn2aKO、dKO マウスともに交配には野生型雄マウスを用いており、胎子の遺伝子系はヘテロになっていることから、これらのマウスにおいて老化細胞領域に変化が認められなかった可能性もある。これらの可能性を検討するには、Prl5a1 などのより分化した栄養膜細胞特異的なマーカーや、CAG-GFP マウスを用いた解析が有用となるだろう。

細胞老化マーカーとして補助的に用いられる γ H2AX は産褥子宮において陰性を示した (Fig.6)。 γ H2AX は DNA 損傷マーカーとしても用いられ、細胞老化を誘導する DNA 損傷を検出する (Campisi J, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007)。妊娠子宮着床部位のトランスクリプトーム解析において、妊娠子宮の細胞老化が異常に亢進する p53^{dd} マウスでは抗酸化ストレス応答が障害されていることが示されている (Burnum KE, *Endocrinology* 2012)。酸化ストレスは細胞老化の一因であり (Parrinello S, *Nat Cell Biol* 2003)、脱落膜反応では急激な細胞増殖と DNA 合成が起きることから、抗酸化ストレス応答の一環として脱落膜細胞の細胞老化が起きることが予想される。

妊娠子宮に存在する細胞老化は p53 を欠損することで p21 依存的に増強することがわかっているが (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010; Hirota Y, *PNAS* 2011)、この結果からは p53 の欠損という異常状態の子宮においてのみ p21 依存的な細胞老化が生じていることも考えられる。すなわち、p21 依存的な細胞老化は p53 の欠損という異常状態によってのみ引き起こされている可能性である。マウス妊娠子宮における細胞老化は脱落膜化と同時に生じることがわかっており、妊娠子

宮における細胞老化機序の解明には脱落膜化に障害を生じる遺伝子改変マウスの解析が有用となるだろう。

RbはS期進入において重要な転写因子E2Fに結合する抑制因子であり、E2F結合領域のヘテロクロマチン化に関与することで細胞老化状態の安定化に寄与している (Narita M, *Cell* 2003)。マウス着床前子宮において、着床前期において特徴的な子宮管腔上皮の増殖は着床期においてプロゲステロン依存的にその増殖を静止することがわかっている (Haraguchi H, *Mol Endocrinol*. 2014)。この変化が認められないマウスは不妊を呈する 경우가多く、例えば Msx1 コンディショナルノックアウトマウスは着床期における管腔形成に異常を来し、妊娠障害を生じる (Daikoku T, *Dev Cell*. 2011)。プロゲステロン依存的な子宮内膜上皮の増殖停止は Rb1 が寄与していることもわかっていることから (Yuan DZ, *Horm Metab Res*. 2014)、着床期に認められるプロゲステロン依存的な子宮内膜変化において Rb が重要な働きをしている可能性が考えられる。着床期の異常はその後の脱落膜形成に関与することがわかっており (Daikoku T, *Dev Cell*. 2011)、Rb の全身性ノックアウトマウスは胎生致死を生じるため (Jacks T, *Nature* 1992)、Rb タンパクの妊娠における生理的役割の解明には適さないが、Rb のコンディショナルノックアウトは着床からの脱落膜化異常を生じ、妊娠子宮における細胞老化機序の解明に有用であることが考えられる。

老化細胞は活発にサイトカインやプロテアーゼを分泌し周囲微小環境に変化を及ぼす性質を持つことから (Campisi J, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; Coppe JP, *PLoS Biol* 2008)、子宮における老化細胞の除去は分娩後の子宮機能の回復において重要であることが考えられる。一方で、組織中から老化細胞を除去する機構の詳細は未だ明らかではない。産褥子宮において、F4/80 陽性マクロファージが老化細胞領域周囲に集積していた一方で、Cd11b 陽性マクロファージ、及びNK細胞、T細胞、好中球は認められなかった (Fig.8, 9)。また、抗 F4/80 中和抗体による産褥マウス体内のマクロファージの除去は、産褥子宮における老化細胞領域の減少を著しく障害した

(Fig.10)。これは F4/80 陽性マクロファージが老化細胞のクリアランスに関与していることを示唆している。マクロファージは大きく 2 つのサブセットに分かれ、classically activated macrophages (M1) と alternatively activated macrophages (M2) とが知られている (Sica A, *J Clin Invest* 2012)。M1 マクロファージは活発に炎症性サイトカインを分泌することで Th1 反応を促進し、細菌やウイルスから宿主を保護する役割を担う。一方で M2 マクロファージは免疫抑制機能や高い貪食能を有し、創傷治癒や組織の再構築といった役割を担う (Murray PJ, *Nat Rev Immunol* 2011)。F4/80 は EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1 (*Emr1*) 遺伝子にエンコードされた細胞表面タンパクであり、主に M2 様の形質を持つ組織マクロファージに発現していることが知られている (Satoh T, *Nature* 2013)。一方で Cd11b は全ての単球系細胞に発現するが、一部の F4/80 陽性の組織マクロファージでは Cd11b を発現しないことが知られている (Ikarashi M, *J Leukoc Biol.* 2013)。このことから、老化細胞の除去に関わっているのは F4/80 陽性の M2 様の性質を持つ子宮に存在する組織マクロファージであることが考えられる。このマクロファージの性質の解明には、FACS やより代表的な M1/M2 マーカーを用いたマクロファージ表面抗原の解析が必要となるだろう。

また、本研究ではマクロファージが周囲の細胞を貪食していることを示唆する像が散見されたが (Fig. 8C)、直接マクロファージが老化細胞を貪食している像の観察に成功したわけではない。これには p21 をはじめとする老化細胞マーカーと F4/80 の二重染色や、電子顕微鏡を用いた微細な細胞構造の観察が有用であると考えられる。

さらに、本研究においてはマクロファージ依存的な細胞老化の除去機構を示したが、老化細胞が除去される機構としては様々なものが考えられる。例えば肝線維症モデルにおいては NK 細胞による老化細胞除去機構が示唆されており (Krizhanovsky V, *Cell* 2008; Kang TW, *Nature* 2011)、マウス肝癌のモデルにおいては自然免疫系が関与する老化細胞の除去機構の存在が示されている (Xue W, *Nature* 2007)。また、本研究においてマウス産褥子宮にアポトーシス細胞は

認められなかったが (Fig. 8D, 8E)、TUNEL 染色は DNA 二重鎖切断を検出する染色法であり、比較的アポトーシス後期の細胞を検出する。すなわち、アポトーシス過程を経ているが、TUNEL 染色で陽性を示す前段階で免疫細胞等によって除去されている可能性が考えられる。老化細胞除去機構におけるアポトーシスの関与を否定するためには Cleaved Caspase-3 の検出など、よりアポトーシス早期の段階の細胞を検出する手法が必要である。また、体内からマクロファージを除去した産褥マウスの長期の観察は、マクロファージ以外の細胞老化除去機構を検討するのに有用であると考えられる。

マウスは分娩直後に排卵し、交配が成立した場合は妊娠・出産に至ることが知られている (Bingel AS, *J Reprod Fertil* 1969)。正常産の p53^{fl}マウスにおいて、分娩直後の妊娠は 92%の割合で成立したのに対し、抗 F4/80 中和抗体を投与してマクロファージを除去したマウスでの分娩直後の妊娠率は 50%と減少傾向を示した (Fig.11)。本研究ではサンプル数が少ないため有意差は検出されなかったが、F4/80 陽性マクロファージによる老化細胞除去機構の障害と続発する老化細胞の著しい増加は、分娩直後の妊娠障害という子宮機能異常を引き起こす可能性が考えられる。マクロファージ除去マウスでは PPD8 での著しい老化細胞領域の増加を認めた (Fig.11)、妊娠日齢 day8 とは着床が成立し、脱落膜化が生じる時期である。従って、分娩直後の妊娠においては妊娠の初期、特に着床現象において異常が生じる可能性が高い。着床現象は胚と子宮のサイトカイン相互作用やホルモンによる子宮の胚受容能獲得など、様々なプロセスが同時並行で起こる現象である (Egashira M, *Reprod Med Biol* 2013; Haraguchi H, *Mol Endocrinol*. 2014)。すなわち、老化細胞による活発なサイトカイン分泌がこれらの着床現象の一連の過程を障害する可能性が考えられる。ただし、Cd11b-DTR マウスを用いた解析で、Cd11b+F4/80+マクロファージがマウス着床期の黄体形成に関与していることが示唆されている (Care AS, *J Clin Invest*. 2013)。すなわち、抗 F4/80 中和抗体によるマクロファージの除去が分娩直後の妊娠における黄体形成を障害する可能性も考えられる。老化細胞による妊娠障害の詳細を明らかにする

には、黄体形成には異常を認めずに老化細胞が過剰に蓄積するモデルが必要である。

また、子宮は繰り返し妊娠を行う組織であるが、本研究では二回目の着床が成立する分娩後4日目には着床痕に老化細胞が存在することを示した (Fig. 3A)。1回目の着床部位と2回目の着床部位との位置関係は不明であり、今後の観察が必要である。この解析は老化細胞の残存と2回目の妊娠との関連を示唆するとともに、子宮という組織の機能再生機構の一端の解明に寄与することが考えられる。

p53^{dd}マウスの妊娠子宮では p21 依存的な細胞老化が亢進する一方で、生理的に細胞老化は分娩が近づくにつれて増強する (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010; Hirota Y, *PNAS* 2011)。LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの産褥子宮では比較的分娩直後に近い PPD3 においてコントロールマウスと比べて老化細胞領域の顕著な変化は認められなかったこと、また PPD8 では老化細胞領域が顕著に拡大していたことから (Fig.12)、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスでは正期産コントロールマウスと比べて分娩直後の老化細胞領域には変化はないものの、その後の老化細胞除去過程が障害されることにより老化細胞の過剰な残存が生じることが考えられる。この推論は LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの産褥子宮において、F4/80 陽性マクロファージの集積が顕著に減少していることから推測できる (Fig.16)。F4/80 陽性マクロファージは高い貪食能や免疫抑制能といった M2 様の性質を持ち、組織修復や創傷治癒に関与する (Murray PJ, *Nat Rev Immunol* 2011; Satoh T, *Nature* 2013)。F4/80 陽性マクロファージが産褥子宮に残存する老化細胞のクリアランスに関与していることを示しており (Fig.8, 10)、すなわち LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスでは F4/80 陽性マクロファージの減少という老化細胞除去機構の障害が生じ、その結果として老化細胞の過剰な蓄積が生じていることが考えられる。また、培養系において老化細胞は単球系細胞を M1 様の性質にシフトさせることが知られており (Lujambio A, *Cell* 2013)、老化細胞の過剰な蓄積と M2 マクロファージの減少との正のフィードバックが存在していることも推測される。

マウスは分娩直後に排卵し、交配が成立した場合は妊娠・出産に至ることが知られており

(Bingel AS, *J Reprod Fertil* 1969)、抗 F4/80 中和抗体を投与して体内からマクロファージを除去したマウスでは過剰な老化細胞の蓄積が生じることを示した (Fig.10)。さらに、F4/80 マクロファージの集積の減少により老化細胞の過剰な蓄積が生じた LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスでは、分娩直後の妊娠率はコントロールマウスと比べて著しく低下していた (Fig.15)。マウスにおいては血中プロゲステロン濃度の低下を認めることなく分娩が開始するが、p53^{dd} マウスにおいても生理的な分娩と同様に卵巣からのプロゲステロンの低下を認めることなく早産が自然発症することから (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010)、子宮における老化細胞の過剰な蓄積が妊娠障害を誘発することが強く疑われる。一方で、本研究ではあくまで LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスにおいて、老化細胞の過剰な蓄積と次回妊娠の障害が併発するというを示したに過ぎない。F4/80 陽性マクロファージの減少による老化細胞の過剰な蓄積が分娩直後の妊娠を傷害するという仮説を更に検証するためには、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスにおけるマクロファージを M2 様に分化させることによって、老化細胞の局在と分娩直後の妊娠率が改善されることを観察することが必要である。M2 マクロファージへの分化誘導には α 7nAChR のアゴニストである PNU-282987 や PGE2 シグナリングなどが有用であることが知られており (Pinheiro NM, *FASEB J.* 2016; Hosono K, *PLoS One.* 2016)、これらの投与による LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの妊娠障害の改善が期待される。

LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの産褥子宮では、比較的分娩直後に近い PPD3 においてコントロールマウスと比べて老化細胞領域の顕著な変化は認められなかった (Fig.12)。この結果は PPD3 の産褥子宮では SASP 関連遺伝子の発現がコントロールマウスと比較して変化がなかったことと一致する (Supplemental Table1, Fig.20)。一方で、炎症亢進性 GO クラスタに属する遺伝子発現が有意に増加しており (Supplemental Table1, 2, Fig.18)、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの産褥子宮ではコントロールマウスと比較して微小環境が向炎症性に変化していることが示唆される。

リポカリン 2 (*Lcn2*) は Neutrophil gelatinase-associated lipocalin と呼ばれ、ミクログリアの性

質を M1 様に変化させる作用を持っている (Jang E, *FASEB. J.* 2013)。すなわち、リポカリン 2 は LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスにおいて M2 様性質を持つマクロファージの減少に関与している可能性が考えられる。リポカリン 2 の発現はプロゲステロン投与によって有意に減少しており (Fig.22)、プロゲステロン投与が LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスにおける M2 マクロファージの減少を改善している可能性がある。CD14 は PPD3 で大きく増加している傾向が認められた (Fig.18)。CD14 はマクロファージに発現しており、TLR4 とともに LPS を認識する (Prakash H, *Sci Rep.* 2016)。CD14/TLR4 シグナリングはマウスすい臓がんモデルにおいて腫瘍随伴性マクロファージ (Tumor Associated Macrophage ; TAM) を減少させることが知られており、TAM は M2 様性質を持つマクロファージとして腫瘍組織の形成と成長に関連している (Prakash H, *Sci Rep.* 2016)。すなわち、CD14 はマクロファージ表面に発現し、炎症性サイトカインを認識することで M2 マクロファージの減少に関与している可能性が考えられる。C3、Cfb と Cfi は補体系の一部であり、C3 と Cfb は M1 マクロファージにて発現が増加していることが示されている (Luo C, *Inflammation* 2012)。C3 はエストロゲン応答性遺伝子としても知られており (Fig. 19; Haraguchi H, *Mol Endocrinol.* 2014)、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの産褥子宮におけるエストロゲン優位性を示している。Elf3 は ETS domain transcription factor として知られ、LPS 刺激に応じて COX2 の発現を誘導することが知られている (Grall FT, *FASEB J.* 2005)。このように、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの産褥子宮では PPD3 から炎症促進性遺伝子が発現しており、これらが PPD8 における M2 様性質を持つマクロファージの減少を続発し、SASP 関連遺伝子の発現の増加と老化細胞の残存を誘導している可能性が考えられる。

LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスでは PPD3 において、子宮内微小環境がエストロゲン優位に傾いていた (Fig.19)。LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスでは早産と同時に胎子は死亡することがわかっており (Cha J, *J Clin Invest.* 2013)、すなわち LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスではコントロールマウスに対して搾乳刺激が存在しない。搾乳刺激の有無は老化細胞除去と関連しており (Fig.24)、交

配を行わなかった LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスでは搾乳刺激の消失により老化細胞除去が遅れていた可能性が考えられる。一方で、マウスは搾乳刺激によって着床遅延が生じることが知られており (Bergstrom S, *Fertil Steril.* 1972)、着床遅延は着床前期の卵巣除去とプロゲステロン投与によっても引き起こされる (Cha J, *Nat Med.* 2012)。すなわちこれは搾乳刺激により、産褥子宮復古に対して一部プロゲステロンと同様のシグナリングが働いていることを示唆する。これは胎子安楽殺群において、プロゲステロンシグナリングで抑制される子宮内膜上皮の増殖が認められたことも支持する (Fig.25; Haraguchi H, *Mol Endocrinol.* 2014)。一方、本研究で用いた分娩直後の妊娠観察モデルでは着床遅延を防ぐため分娩直後に胎子を全て安楽殺しているが、交尾刺激の存在により分娩と同時に排卵・形成された黄体が活性化、プロゲステロンが分泌されていることが考えられる。プロゲステロンは着床前期から分泌され、着床に必要な子宮内膜の分化である子宮内膜上皮の増殖停止と子宮内膜間質の増殖を誘導することが知られている (Haraguchi H, *Mol Endocrinol.* 2014)。また、着床期子宮においてプロゲステロンシグナリングが低下するマウスは着床障害を呈することが知られており、例えば Gp130 や Stat3 コンディショナルノックアウトマウスはプロゲステロンシグナリングの低下とエストロゲンシグナリングの増強により着床障害を示す (Sun X, *Mol Endocrinol.* 2013)。LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの PPD3 ではプロゲステロン受容体の発現もまた有意に低下していたことから (Fig.19)、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスではプロゲステロン受容体の発現低下によるプロゲステロンシグナリングの低下も妊娠障害を続発している可能性が考えられる。子宮頸部においては MicroRNA-200a が直接プロゲステロン受容体プロモーターに結合し、プロゲステロン受容体の発現を低下させているメカニズムが示されており (Haraguchi H, *Mol Endocrinol.* 2014)、同様の機構が LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスに存在している可能性も考えられる。しかし、本研究で行ったマイクロアレイではマイクロ RNA の解析は行っていないため、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスにおけるプロゲステロンシグナリングの低下機構の解明には更なる検討が必要である。

ただし、プロゲステロンの投与により子宮内微小環境の改善を試みたが、炎症性遺伝子やエストロゲンシグナリングの低下こそ認められたものの、プロゲステロン応答性遺伝子の改善は認められなかった (Fig.22)。妊娠の維持にはプロゲステロンが必須であることに加え、着床過程においてはエストロゲンシグナリングの存在が不可欠である (Cha J, *Nat Med.* 2012)。また、本研究において分娩後の妊娠障害を呈した LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスではすでに交尾刺激により黄体形成とプロゲステロン分泌が起きていた可能性を考えると、プロゲステロン単独による直接の妊娠障害の改善は難しい可能性が推測される。一方で、老化細胞の過剰な蓄積を引き起こす背景としてプロゲステロンシグナリングの低下は考えられるため、その改善の布石としてプロゲステロンを投与した際の老化細胞の局在の変化や子宮内膜復古に関しての観察が必要である。

以上をまとめると、産褥子宮には p21 を発現する老化細胞が存在し、F4/80 陽性マクロファージによって除去されることが推測される。また、子宮内に老化細胞が過剰に蓄積することにより妊娠障害が誘起されるほか、子宮内の炎症やエストロゲンシグナリングの増強によって老化細胞除去機構の減弱が引き起こされるという一連の機序が推測される (Fig.26)。

加齢は重要な不妊因子として知られている。本研究では PPD31 において老化細胞が消失することを示したが (Fig.3A)、本研究で用いているのは全て若齢の未経産マウスであり、老化細胞が加齢とともに生体内に蓄積することを考えても、妊娠・出産を繰り返したマウスや加齢マウスでは子宮に老化細胞が過剰に存在している可能性も考えられる。一方でマウスはヒトと異なり寿命が短く、ヒトと比べて十分な老化細胞を蓄積しないまま寿命に至る可能性もまた否めない。従って、このような経産マウスや加齢マウスの解析は、加齢に伴う不妊を説明する新たなモデルを提示する可能性がある有用な研究となるだろう。

本研究では、子宮内の炎症が老化細胞の残存を誘発する可能性を示した。老化細胞は周囲組織の炎症を惹起する性質を持ち、子宮内微小環境の炎症亢進と老化細胞の存在とは正のフィー

ドバックの関係にあることが推測される。実際に、慢性炎症と老化細胞は密接に関連していることが知られている (Jurk D, *Nat Commun.* 2014)。慢性子宮内膜炎は着床障害や原因不明不妊、反復性流産と関連していることが知られており (Kitaya K, *Fertil Steril.* 2011; McQueen DB, *Fertil Steril.* 2014; Bouet PE, *Fertil Steril.* 2016)、慢性子宮内膜炎の治療により妊娠率が改善した報告も存在する (Johnston-MacAnanny EB, *Fertil Steril.* 2010)。また、慢性子宮内膜炎ではセクレチン E、CXCL1、CXCL13 といったサイトカインが過剰に発現していることが知られている (Kitaya K, *Mod Pathol.* 2010)。CXCL1 は SASP 遺伝子の一つであり、CXCR2 を通じて周囲組織の細胞老化を増強するほか (Lesina M, *J Clin Invest* 2016; Tsai HH, *Cell* 2002)、好中球の集積などを通じて炎症惹起に寄与する (Parknun SM, *J Leukoc Biol.* 2016)。LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスの産褥子宮では有意に Cxcl1 の発現が上昇していることを示しており、すなわち LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスでは子宮内炎症惹起と細胞老化が正のフィードバックを成している可能性を示唆する。マウス妊娠子宮の脱落膜化では細胞分化の過程として生理的に細胞老化が生じる一方で (Hirota Y, *J Clin Invest* 2010; Hirota Y, *PNAS* 2011)、ヒト子宮では排卵とともに脱落膜化が生じることから、ヒト子宮には生理的に老化細胞が存在することが考えられる。従って、性周期ごとに形成される老化細胞はその度に除去される必要があるが、子宮内慢性炎症が生じた際にはこの除去機構が障害される可能性が推測される。すなわち、ヒト慢性子宮内膜炎をはじめとする子宮内炎症と老化細胞の異常な残存は密接に関連し、着床障害や習慣流産をはじめとする不妊症・不育症と関連している可能性が考えられる。この可能性を検討するには、LPS 誘導性早産 p53^{dd} マウスにおいて生じる分娩直後の妊娠障害の詳細を明らかにするとともに、ヒト不妊患者の子宮における細胞老化の局在の変化を調べる必要があるだろう。

子宮内炎症が不妊の原因となるのはヒトに留まらない。3 回以上の交配でいずれも妊娠に至らず、その原因が不明であるウシをリピートブリーダー (低受胎雌畜) と呼ぶが、リピートブリーダーのうち約 13% が潜在性子宮内膜炎を発症しているという報告がある (Pothmann H,

Theriogenology 2015)。子宮疾患は卵巣疾患と異なり、臨床症状がない限り診断や発見が難しい。特に分娩後の子宮内膜炎の発症リスクは高く、子宮内膜炎の罹患は人工授精の成績を有意に低下させることが示されている (Toni F, *Theriogenology* 2015)。また、ウマ子宮内膜炎は雌馬の繁殖において不妊に繋がる大きな要因となっている (LeBlanc MM, *Reprod Domest Anim.* 2009)。これらの畜産動物では繰り返し繁殖を行う必要があり、分娩後の子宮内膜リモデリングと子宮機能回復が重要である。分娩後に胎子遺残物や炎症性滲出物の排泄が必要であるが、これらの排泄の失敗は子宮内膜炎のリスク要因である。従って、子宮内炎症が雌性繁殖障害に関与しているリスクは非常に高いことが考えられる。一方、これらの動物においては血絨毛膜胎盤を持つマウスやヒトと異なり、子宮内膜の脱落膜化を生じない。そのため、これらの動物の子宮における老化細胞の存在は全くの未解明である。しかし、細胞老化が広く動物種に保存されたメカニズムであること、慢性炎症と老化細胞が密接に関連することを考えると、これらの動物の子宮においても老化細胞の蓄積が新規の雌性不妊因子として寄与している可能性が考えられる。そのため、不妊雌畜における子宮内膜微小環境の解明は今後の課題であると考えられる。

子宮は新たな命を育む場であり、雌性生殖において最も重要な器官の一つである。しかしながら近年では医学的・獣医学的な問題として妊娠関連障害が台頭してきた。ヒトにおいては不妊症や反復早産といった子宮関連疾患が増加し、これは妊娠・出産に関わる家族の負担を増加させ、我が国の出産率の低下と少子高齢化を促進させる重要な問題である。ウシ人工授精においてはその技術の向上にも関わらず受胎率は年々低下を続けており、原因の究明と改善策の施行が急務となっている。ウマにおいては早期胚死滅が大きな問題となっている。これらの繁殖障害は生産性の著しい低下と農家の経済的負担の増加を引き起こし、日本の畜産界の縮小に繋がる重要な問題である。本研究では、マウス産褥子宮に老化細胞が存在し、子宮内炎症の亢進による老化細胞除去機構の破綻と老化細胞の異常な蓄積が分娩直後の妊娠を阻害することを示した。すなわち、新たな妊娠障害となる子宮因子としての老化細胞の可能性を始めて示唆する

ものである。今後は、老化細胞が関与する妊娠障害に対する治療法と予防法の確立を目指して、マウスモデルを用いて老化細胞が引き起こす妊娠障害の詳細を明らかにするとともに、畜産や医学における細胞老化の病理的な意義を解明することが次なる目標となるだろう。

図表

Figure 1

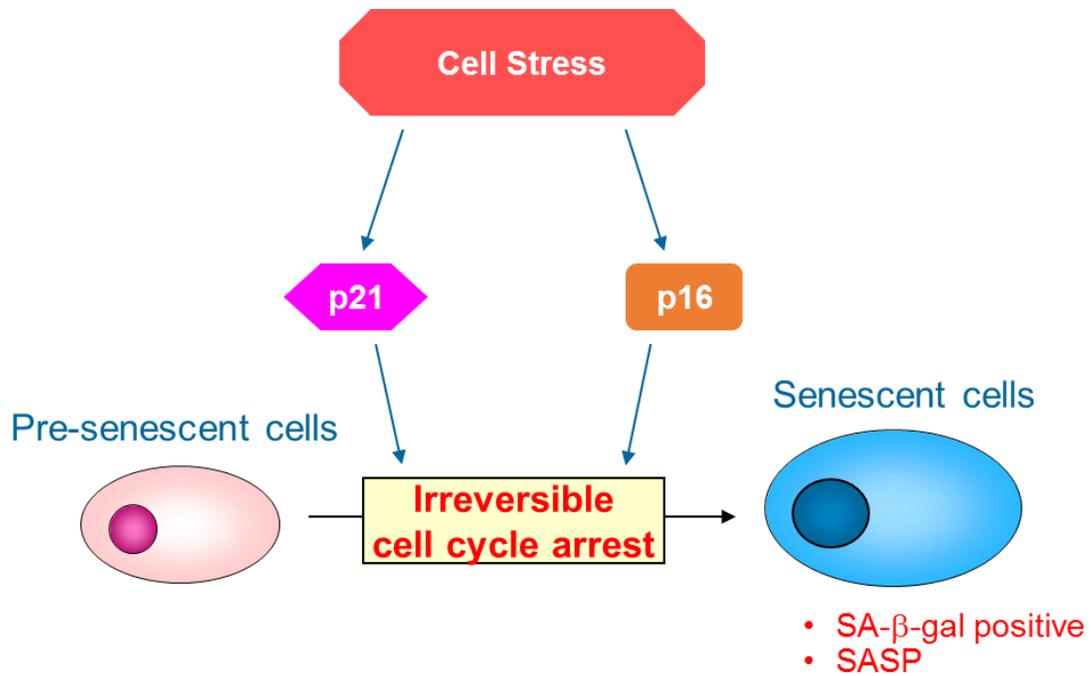


Figure 1 細胞老化の誘導模式図。各種ストレスに応じて、不可逆的な細胞周期の停止、すなわち細胞老化が誘導される。p16 経路と p21 経路が関与している。老化細胞の特徴としては SA-β-gal 染色陽性、SASP (Senescence associated secretory phenotype) などが挙げられる。

Figure 2

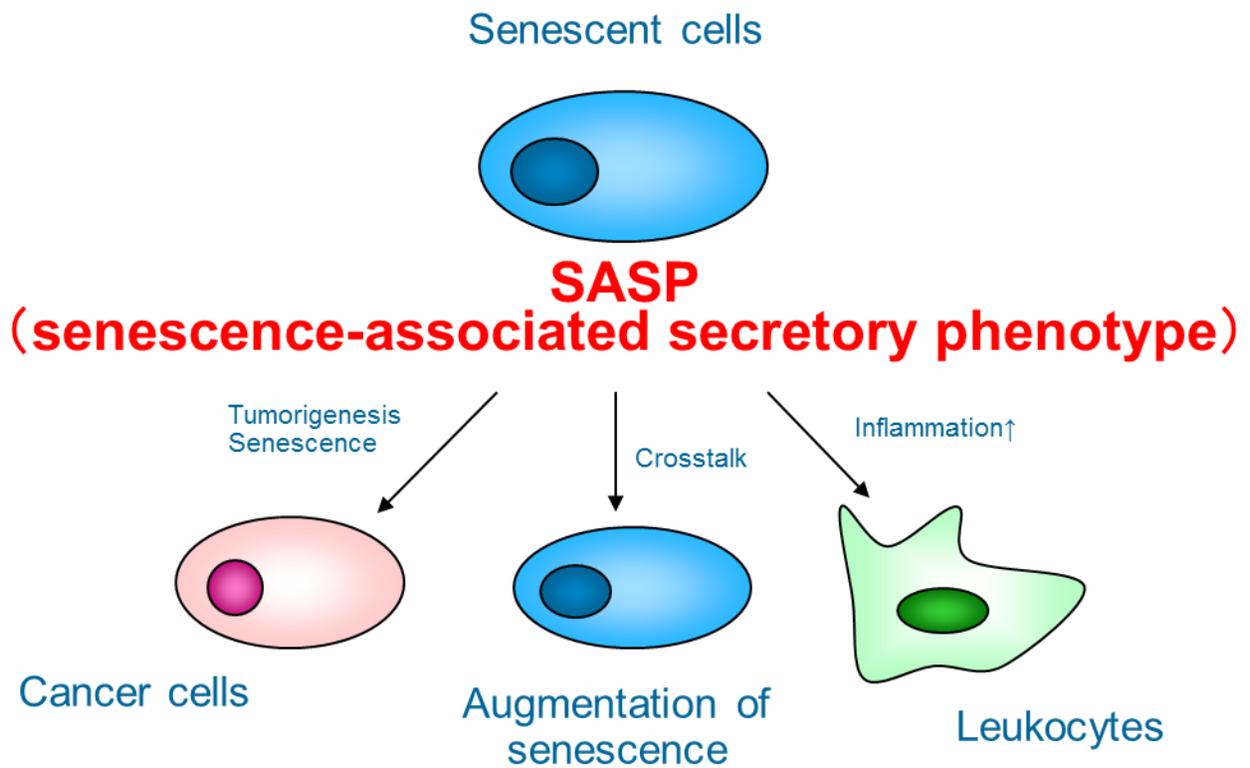


Figure 2 SASP による周囲細胞への影響の模式図。老化細胞は他の細胞の腫瘍化、細胞老化のさらなる誘導、炎症の増悪（白血球の誘導など）に作用し、周囲微小環境に影響を与える。

Figure 3

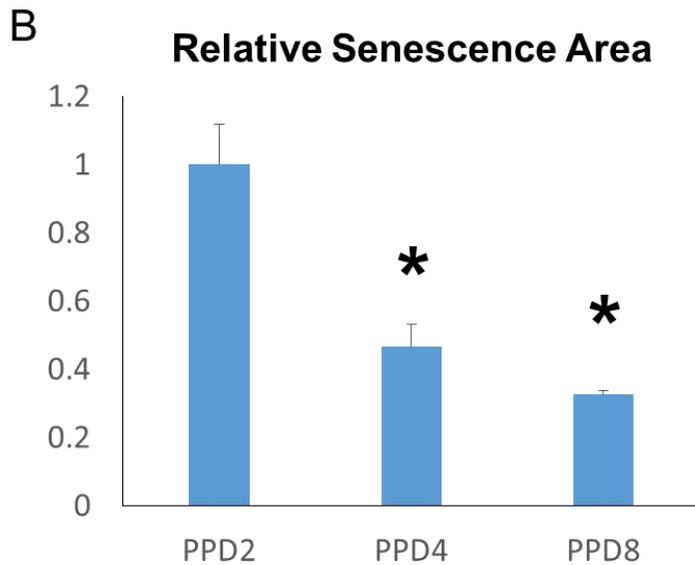
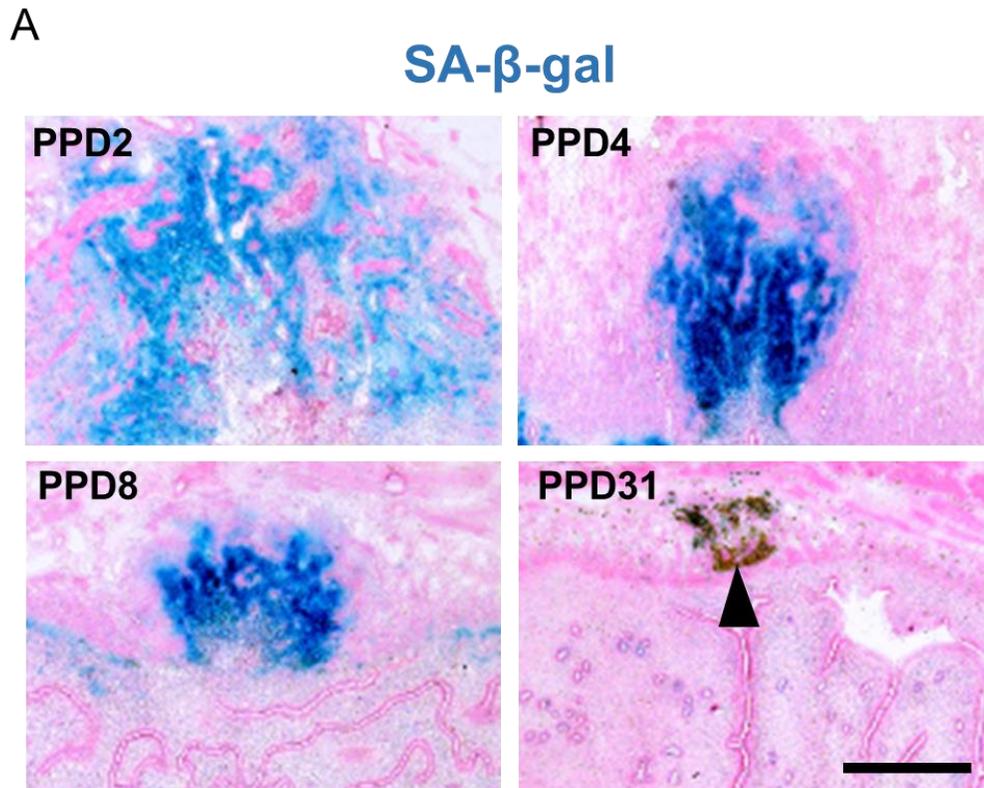


Figure 3 (A) 野生型マウス産褥子宮の SA- β -gal 染色。青く染まっている部位が陽性領域となる。分娩を認めた日を分娩後 1 日目 (Postpartum Day 1 = PPD1) と定義した。矢頭はヘモジデリン沈着を示す。対比染色はエオジンを用いた。Bar = 500 μ m。 (B) SA- β -gal 染色陽性領域の定量化面積。各々 n=3。PPD2 の平均面積を 1 とした。2 群の検定に Student の t 検定を使用した。* $p < 0.05$

Figure 4

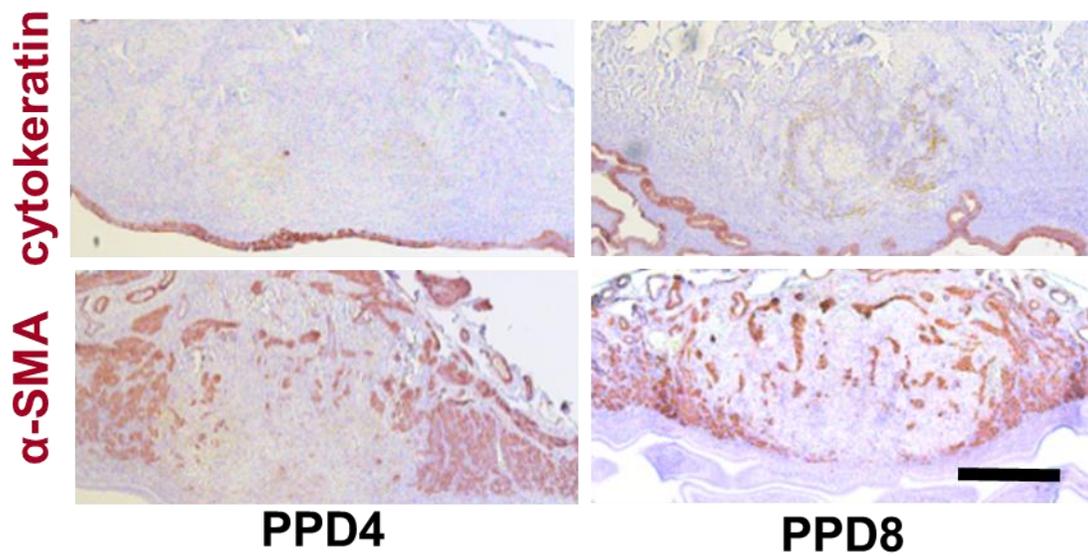


Figure 4 野生型マウス産褥子宮の Cytokeratin / α SMA 免疫染色。赤く染まっている部位が陽性領域となる。対比染色はヘマトキシリンを用いた。Bar = 500 μ m。

Figure 5

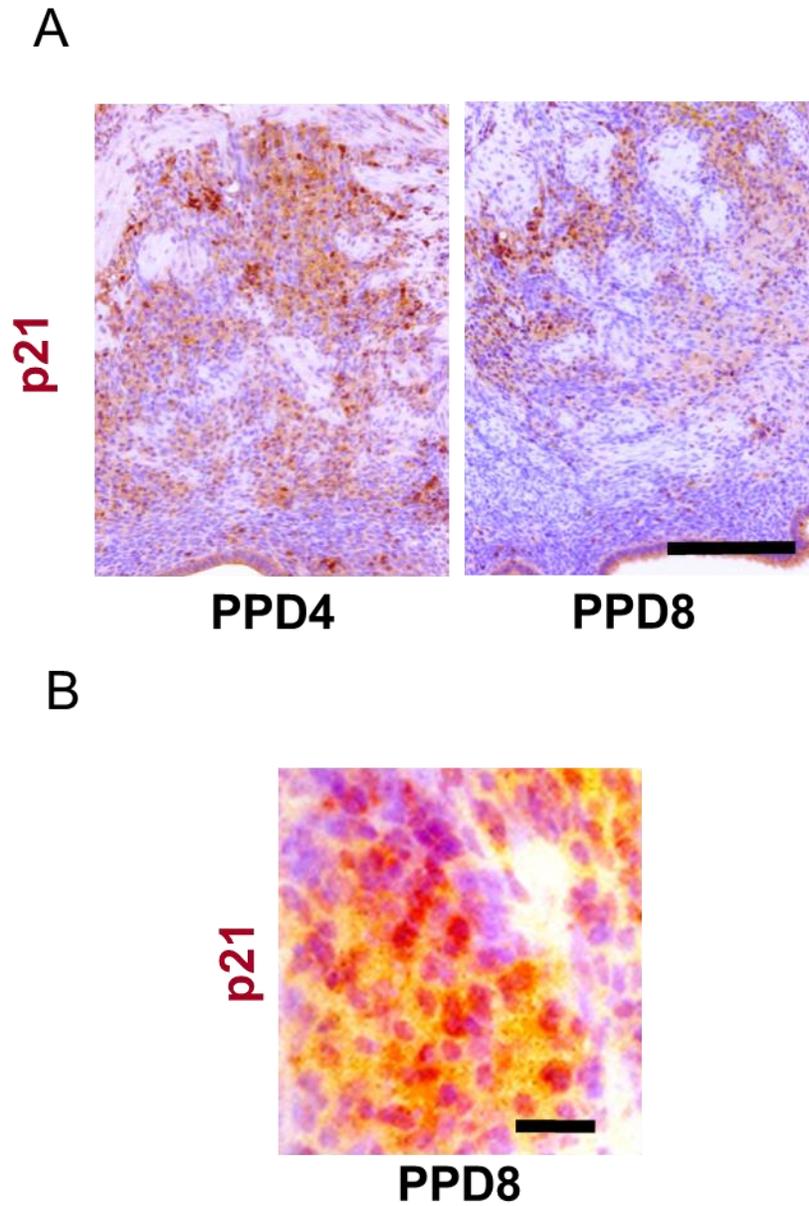


Figure 5 野生型マウス産褥子宮の p21 免疫染色。赤く染まっている部位が陽性細胞となる。対比染色はヘマトキシリンを用いた。(B) は (A) の強拡大。(A) Bar = 100 μ m。(B) Bar = 20 μ m。

Figure 6

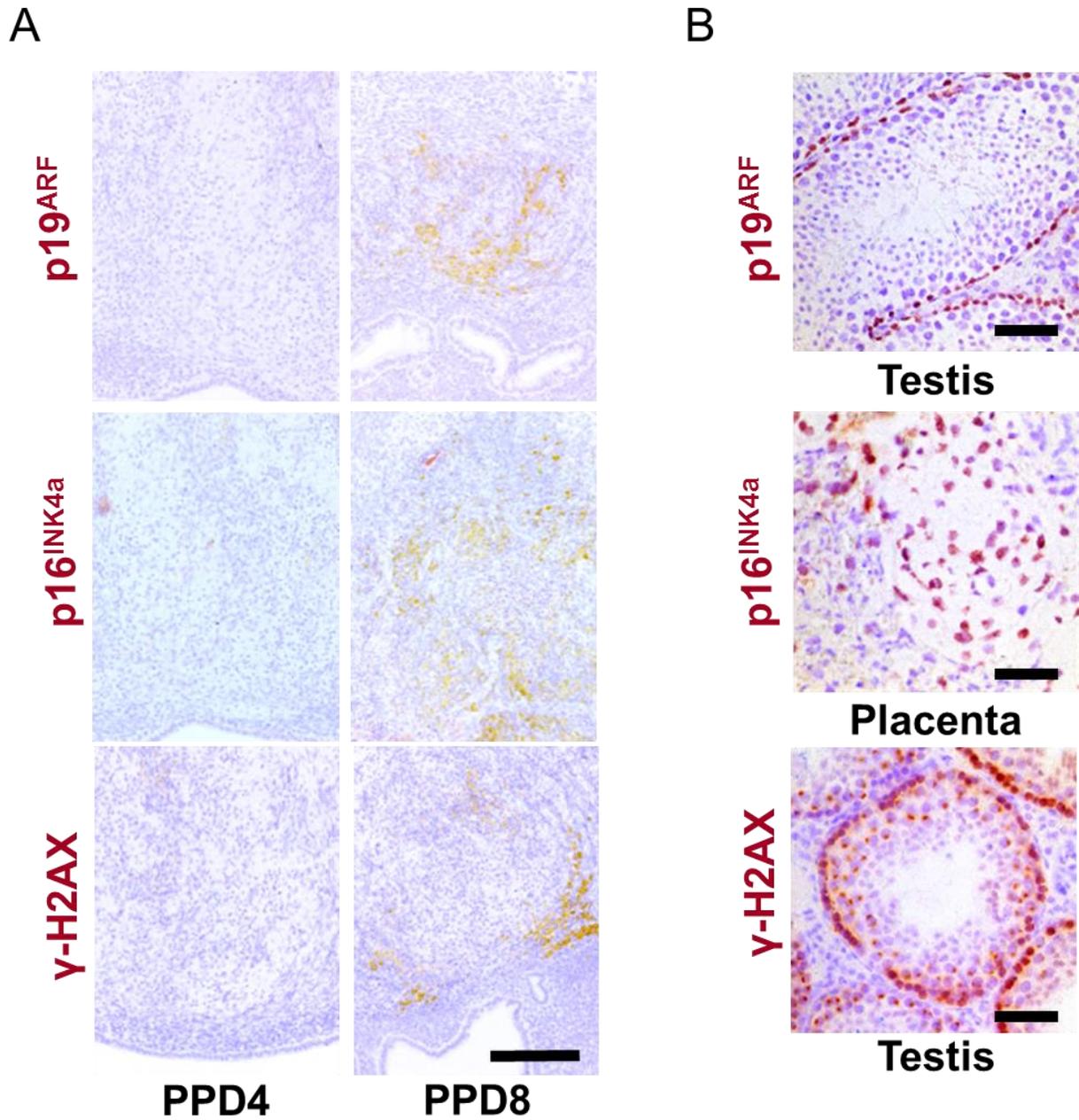


Figure 6 野生型マウスの p19^{ARF} / p16^{INK4a} / γH2AX 免疫染色。赤く染まっている部位が陽性細胞となる。対比染色はヘマトキシリンを用いた。(B) は (A) の陽性コントロール。(A) マウス産褥子宮 Bar = 200μm。(B) p19 ; 精巣、p16 ; 胎盤、γH2AX ; 精巣。Bar = 20μm。

Figure 7

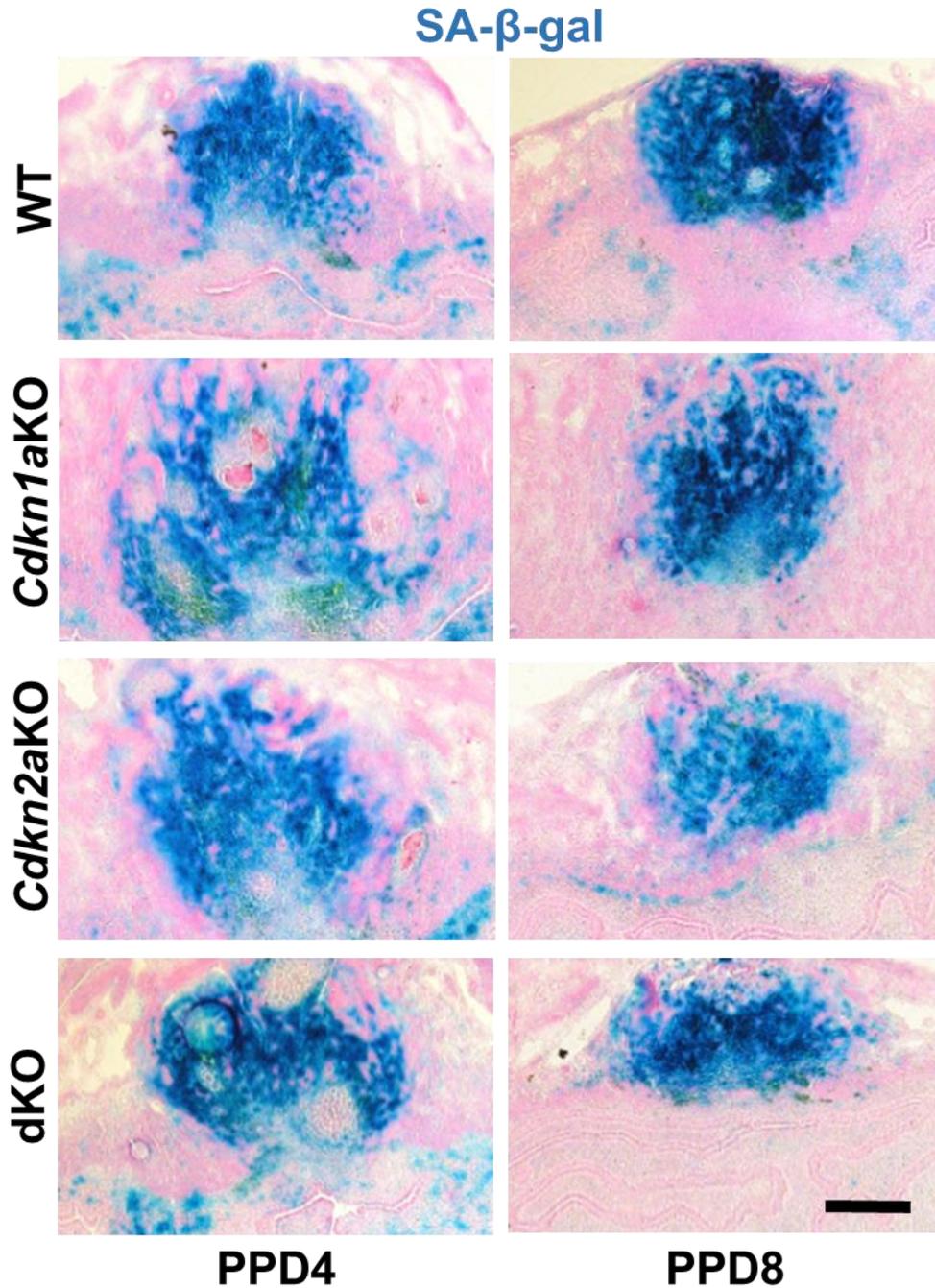


Figure 7 マウス産褥子宮の SA-β-gal 染色。青く染まっている部位が陽性領域となる。それぞれ遺伝子型は野生型 (*Cdkn1a*^{+/+}*Cdkn2a*^{+/+}; WT)、*Cdkn1a*^{-/-}*Cdkn2a*^{+/+} (*Cdkn1a*KO)、*Cdkn1a*^{+/+}*Cdkn2a*^{-/-} (*Cdkn2a*KO)、*Cdkn1a*^{-/-}*Cdkn2a*^{-/-} (dKO) となる。対比染色はエオジンを用いた。Bar = 500μm。

Figure 8

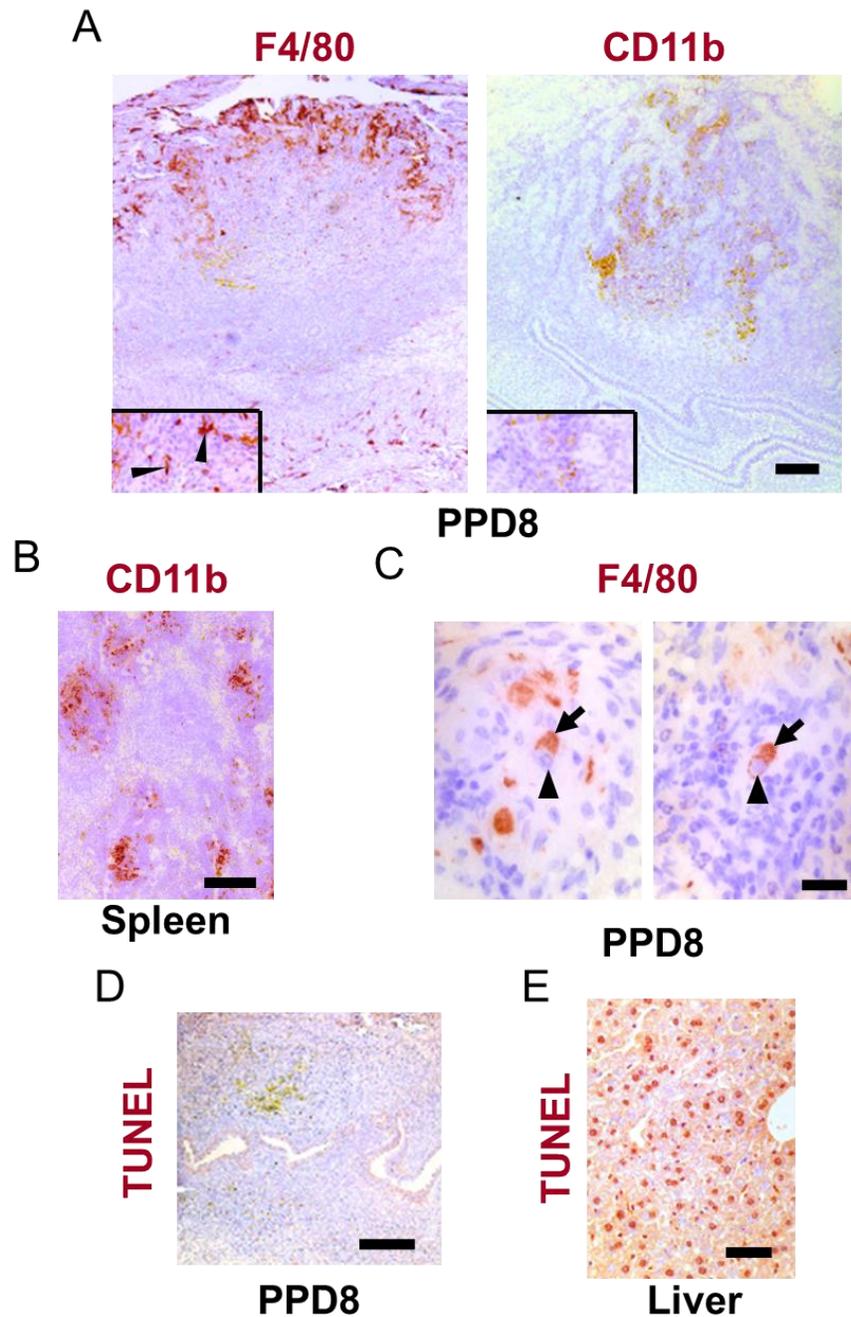


Figure 8 野生型マウス産褥子宮におけるマクロファージの局在。対比染色はヘマトキシリンを用いた。(A) 野生型マウス産褥子宮 (PPD8) における F4/80 及び Cd11b の免疫染色。赤色の細胞が陽性を示す。左下に強拡大図、矢頭は陽性細胞。Bar = 100 μ m。(B) Cd11b の陽性コントロール (野生型マウス脾臓)。赤色の細胞が陽性を示す。Bar = 100 μ m。(C) (A) の強拡大図。Bar = 20 μ m。(D) 野生型マウス産褥子宮 (PPD8) における TUNEL 染色。Bar = 200 μ m。(E) 野生型マウス肝臓を用いた TUNEL 染色の陽性コントロール。Bar = 50 μ m。赤色の細胞が陽性を示す。

Figure 9

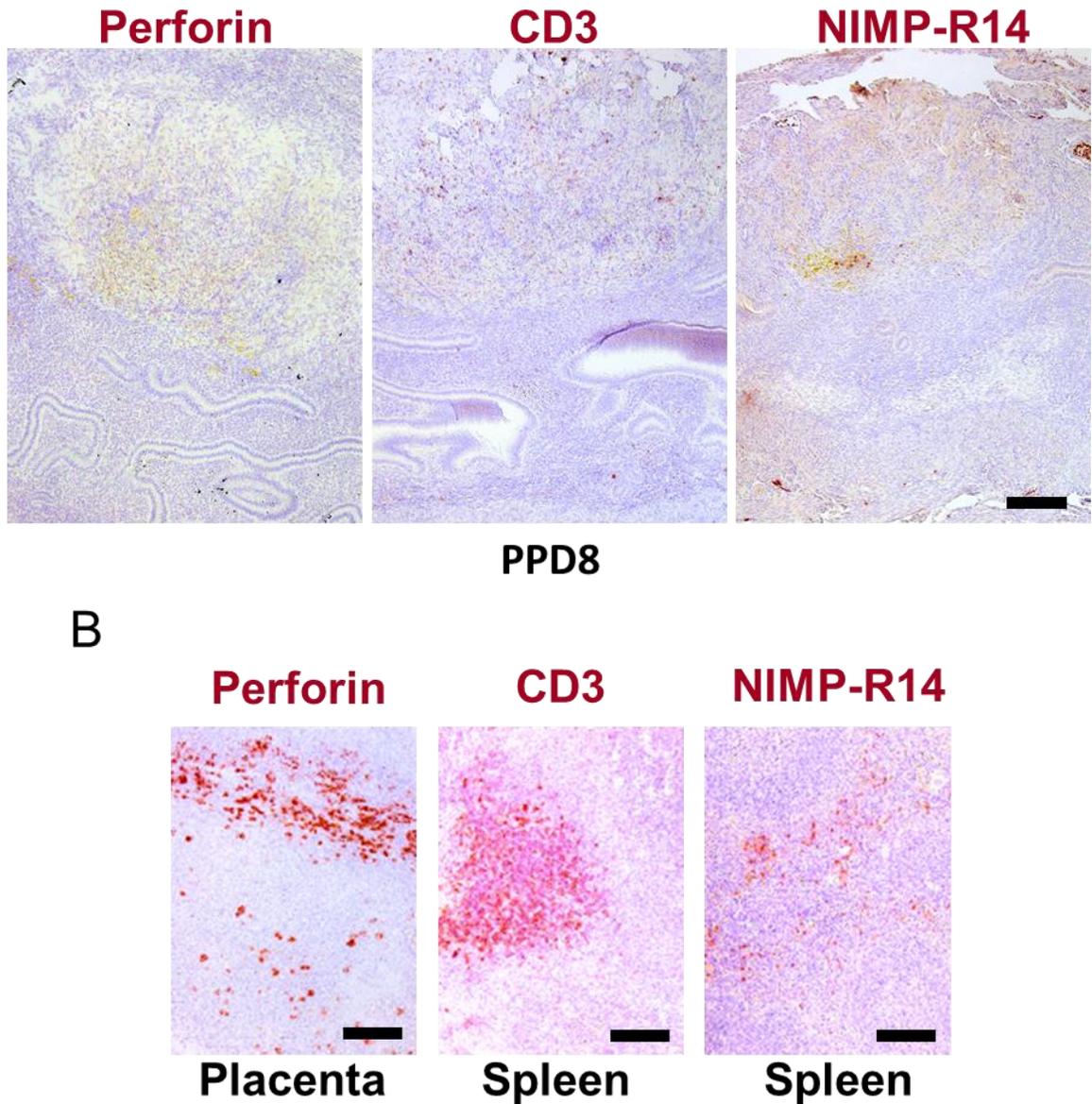
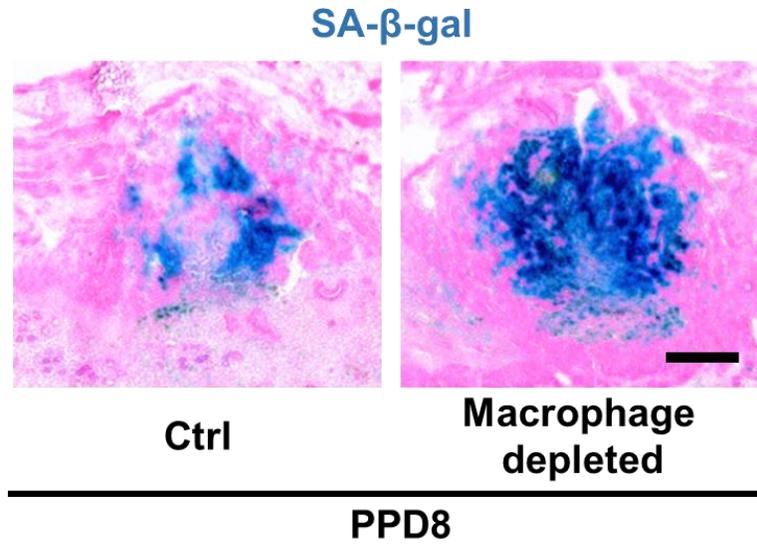


Figure 9 (A) 野生型マウス産褥子宮 (PPD8) における Perforin (NK 細胞)、CD3 (T 細胞)、NIMP-R14 (好中球) の免疫染色。赤色の細胞が陽性を示す。Bar = 200 μ m。対比染色はヘマトキシリンを用いた。(B) 各々の陽性コントロール。Perforin (マウス胎盤)、CD3・NIMP-R14 (脾臓)。Bar = 100 μ m。対比染色はヘマトキシリンを用いた。

Figure 10

A



B

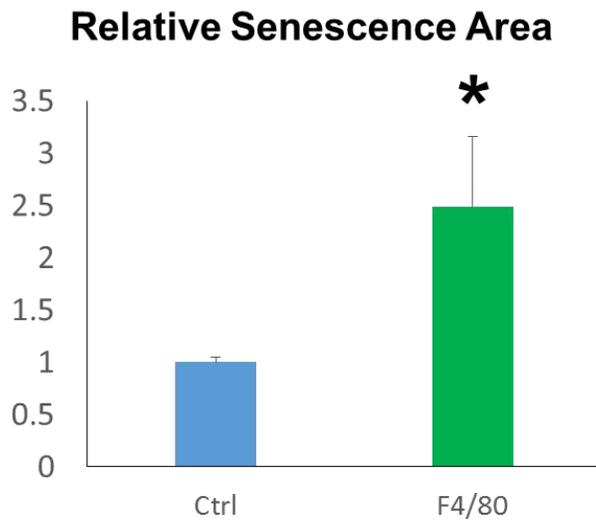


Figure 10 (A) マクロファージ除去処理をした野生型マウス産褥子宮における SA-β-gal 染色 (PPD8)。青く染まっている部位が陽性領域となる。対比染色はエオジンを用いた。Bar = 500μm。 (B) SA-β-gal 染色陽性領域の定量化面積。各々n=3。コントロールの平均面積を 1 とした。2 群の検定に Student の t 検定を使用した。* $p < 0.05$

Figure 11

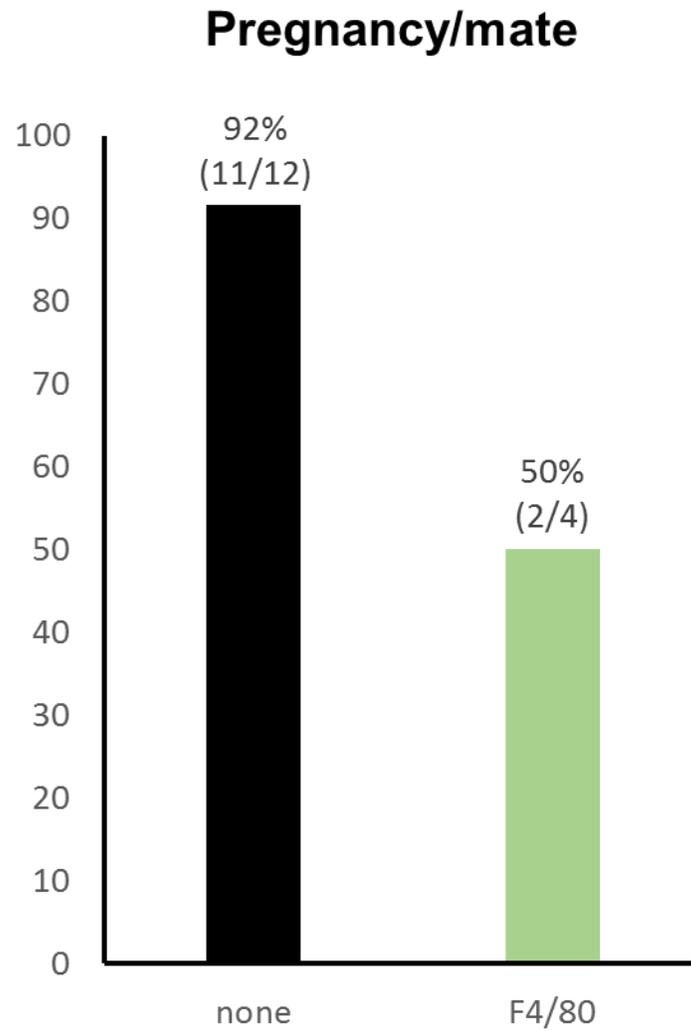


Figure 11 マクロファージ除去処理をした正常産 $p53^{flf}$ ($Trp53^{loxp/loxp}-Pgr^{+/+}$) マウスにおける分娩直後の妊娠率。分娩に至ったものを妊娠の成功とみなした。なおコントロールのデータは Figure 15 と同じものである。2群の検定には Fisher の正確確率検定を用いた。

Figure 12

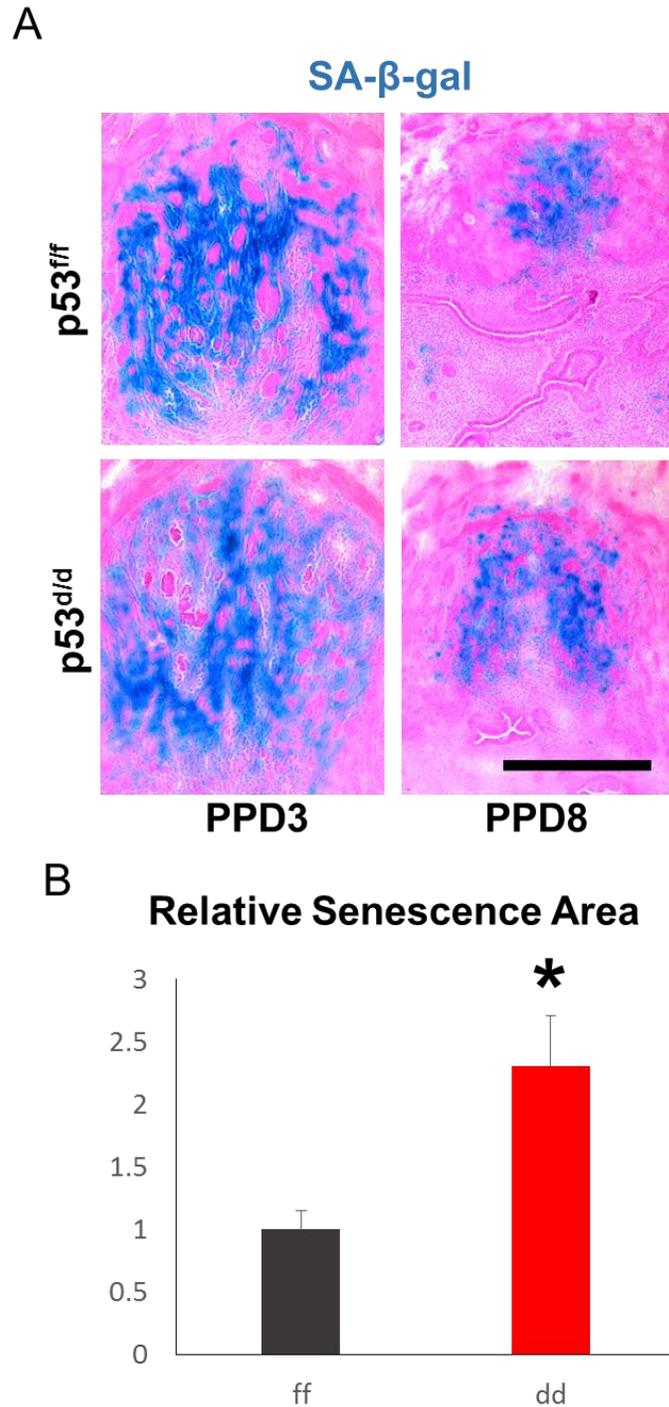


Figure 12 (A) LPS 誘導性早産 p53^{d/d} (*Trp53^{loxp/loxp}-Pgr^{cre/+}*) マウスと LPS 投与正常産 p53^{ff/ff} (*Trp^{loxp/loxp}-Pgr^{+/+}*) マウス産褥子宮における SA- β -gal 染色 (PPD3、PPD8)。青く染まっている部位が陽性領域となる。対比染色はエオジンを用いた。Bar = 500 μ m。 (B) PPD8 における SA- β -gal 染色陽性領域の定量化面積。各々n=3。コントロールの平均面積を1とした。2群の検定に Student の t 検定を使用した。* $p < 0.05$

Figure 13

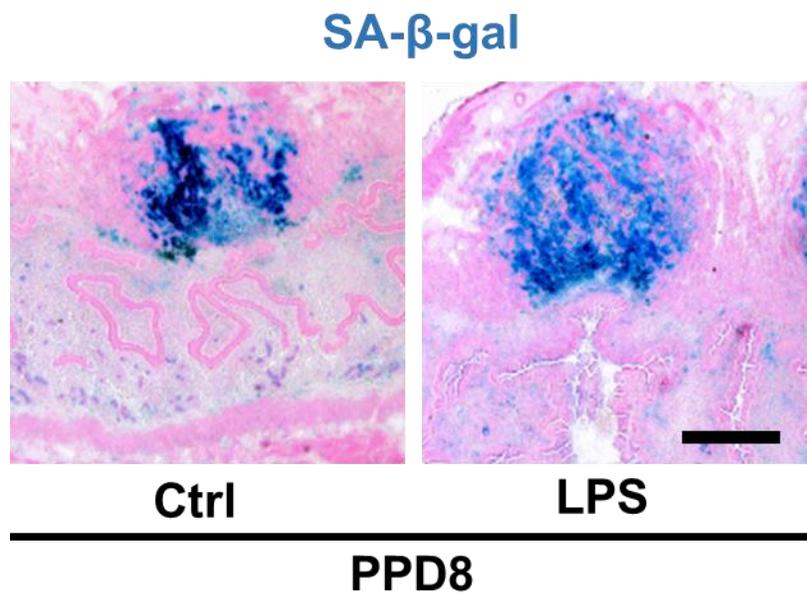


Figure 13 LPS 誘導性早産野生型マウスと正期産マウス産褥子宮における SA-β-gal 染色 (PPD8)。青く染まっている部位が陽性領域となる。対比染色はエオジンを用いた。Bar = 500μm。

Figure 14

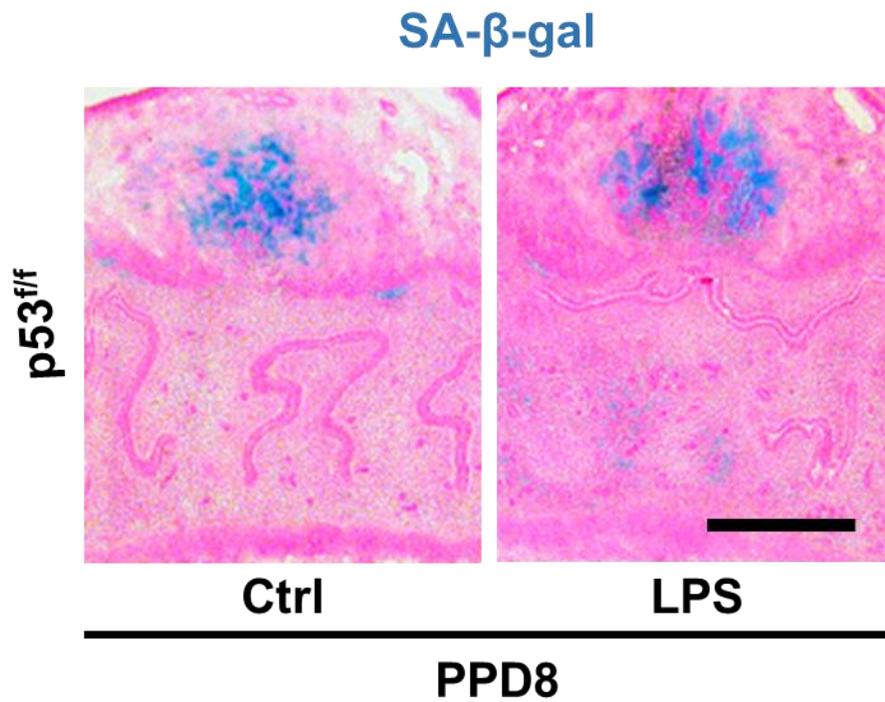


Figure 14 LPS 投与正期産 p53^{fl/fl} (*Trp^{loxP/loxP}-Pgr^{+/+}*) マウスとコントロール正期産 p53^{fl/fl} (*Trp^{loxP/loxP}-Pgr^{+/+}*) 産褥子宮における SA-β-gal 染色 (PPD8)。青く染まっている部位が陽性領域となる。対比染色はエオジンを用いた。Bar = 500μm。

Figure 15

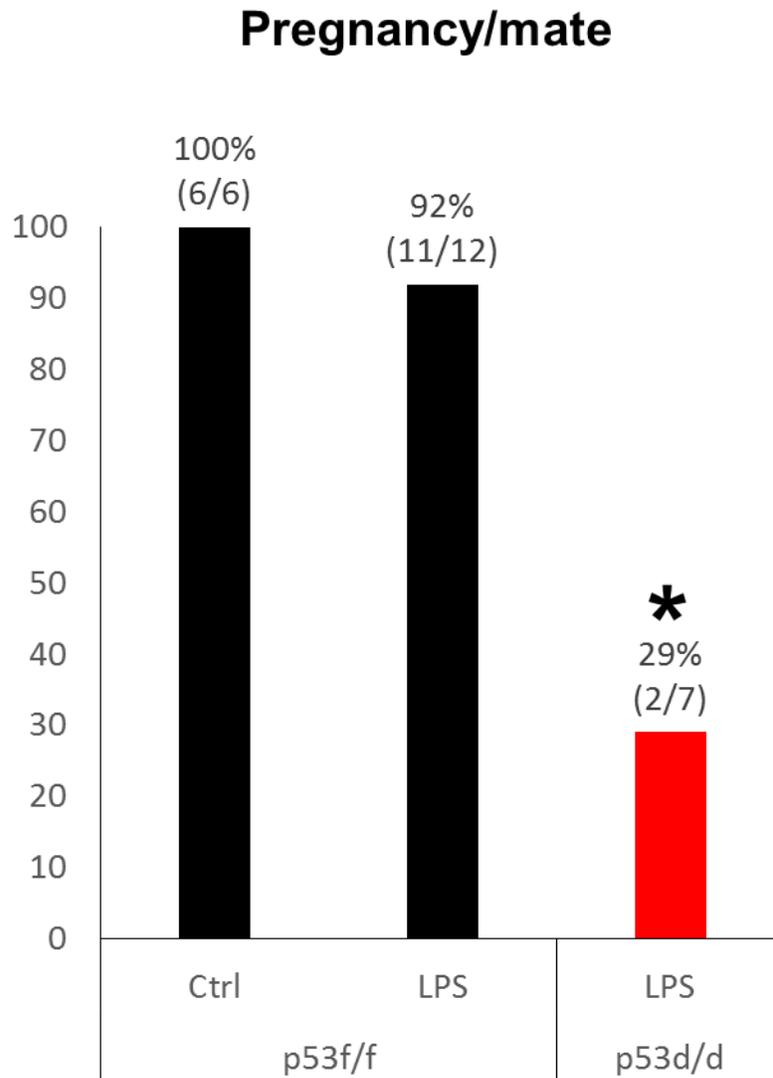


Figure 15 コントロール正期産 p53^{f/f}マウス・LPS 投与正期産 p53^{f/f}マウス・LPS 誘導性早産 p53^{d/d}マウスの分娩直後の妊娠率。Day16 に LPS を 10 μ g/mouse 腹腔内投与 PPD1 の夕方から野生型マウス (ICR) 雄と交配をかけ、その後の妊娠の転帰を観察した。分娩に至ったものを妊娠の成功とみなした。なおLPS投与正期産p53^{f/f}マウスのデータはFigure 11と同じものである。LPS投与正期産p53^{f/f}マウス・LPS 誘導性早産 p53^{d/d}マウスの2群の検定にカイ 2乗検定を使用した。* $p < 0.05$

Figure 16

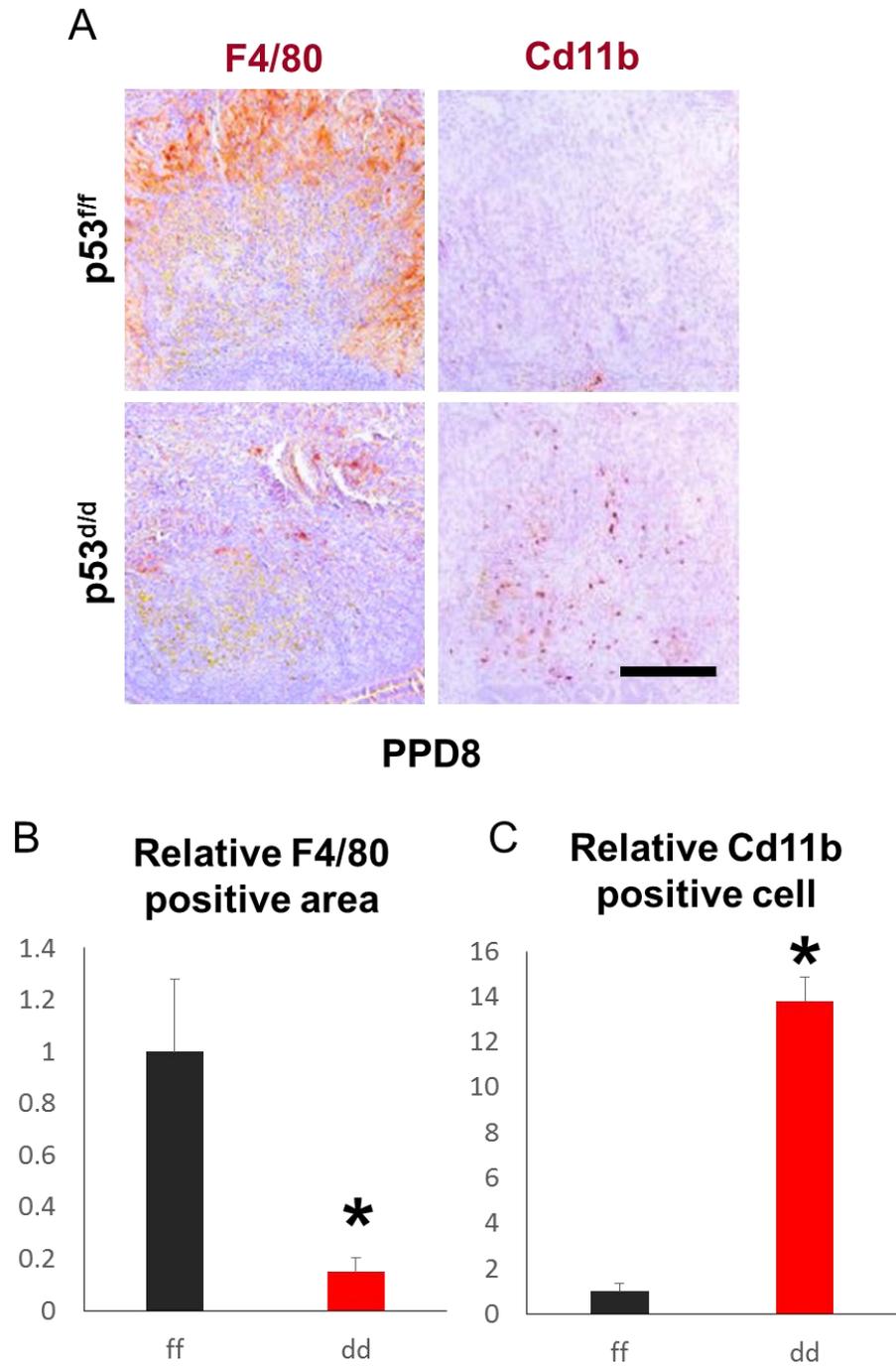


Figure 16 (A) 正期産 p53^{ff}マウス・LPS 誘導性早産 p53^{dd}マウス産褥子宮 (PPD8) における F4/80 及び Cd11b の免疫染色。赤色の細胞が陽性を示す。対比染色はヘマトキシリンを用いた。Bar = 200 μ m。 (B) PPD8 における Cd11b 陽性細胞の相対数。各々n=3。コントロールの平均細胞数を 1 とした。2 群の検定に Student の t 検定を使用した。* $p < 0.05$ (C) F4/80 陽性面積の相対値。各々n=3。コントロールの平均面積を 1 とした。2 群の検定に Student の t 検定を使用した。* $p < 0.05$

Figure 17

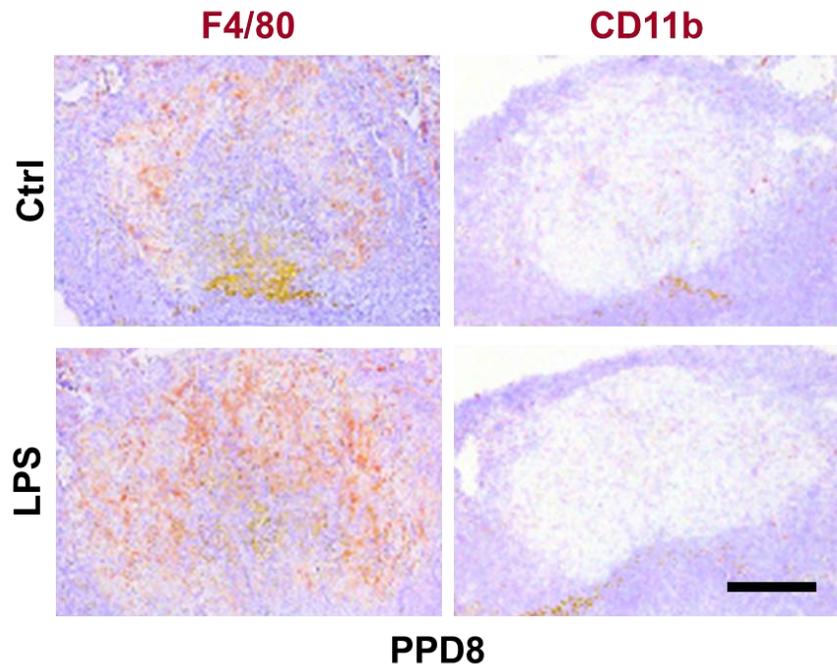


Figure 17 コントロール正常産 $p53^{fl}$ マウス・LPS 投与正常産 $p53^{fl}$ マウス産褥子宮 (PPD8) における F4/80 及び Cd11b の免疫染色。赤色の細胞が陽性を示す。対比染色はヘマトキシリンを用いた。Bar = 200 μ m。

Figure 18

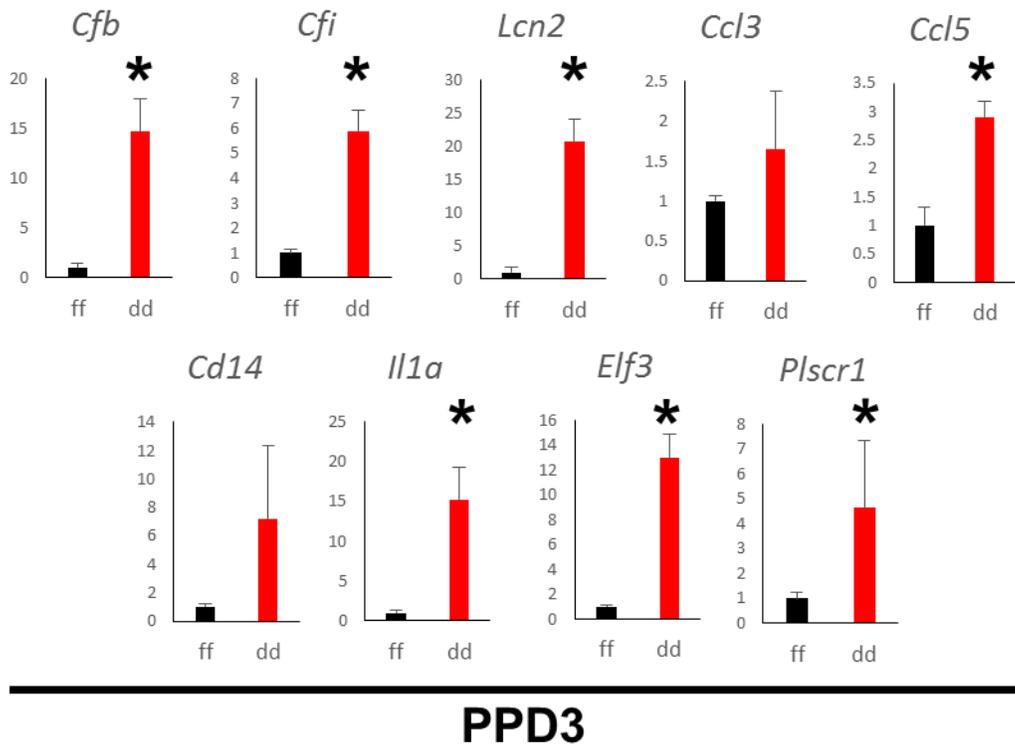


Figure 18 正期産 $p53^{ff}$ マウス (n=3)・LPS 誘導性早産 $p53^{dd}$ マウス (n=7) 産褥子宮 (PPD3) における炎症性遺伝子の発現 (qPCR 法)。正期産 $p53^{ff}$ マウスの発現を 1 とし、内部コントロールには *Actb* を用いた。2 群の検定に Student の t 検定を使用した。* $p < 0.05$

Figure 19

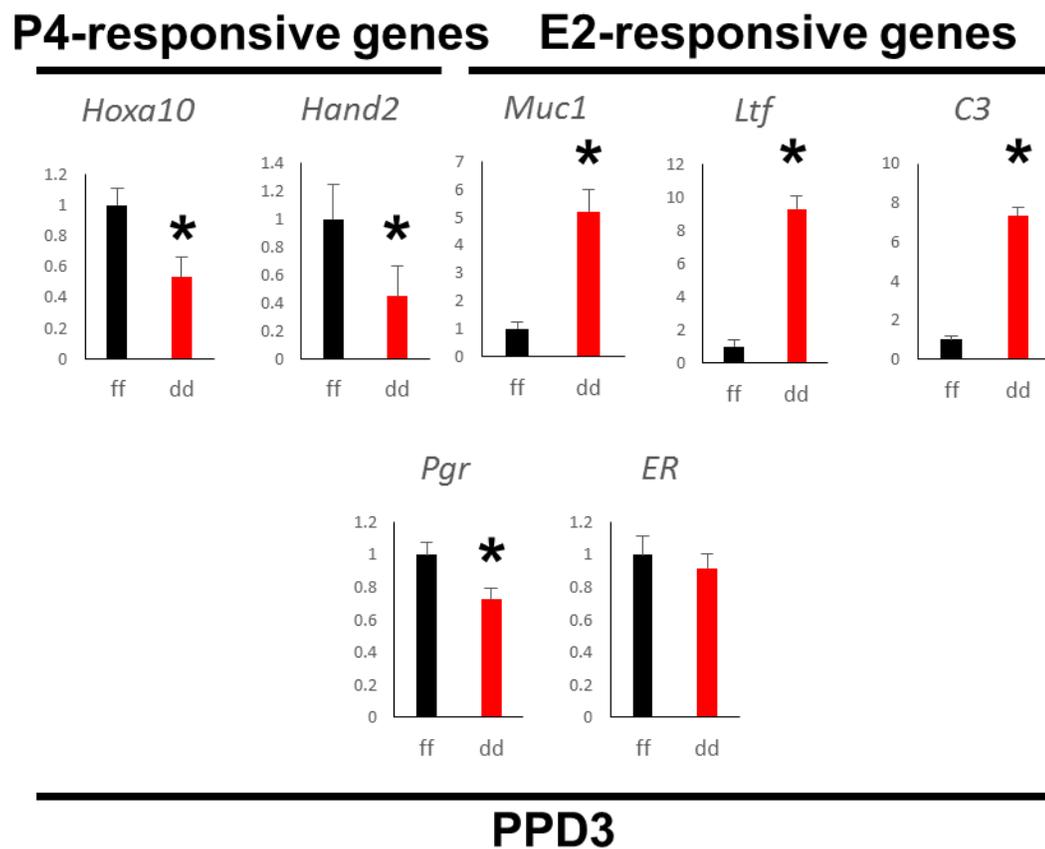


Figure 19 正期産 $p53^{ff}$ マウス (n=3)・LPS 誘導性早産 $p53^{dd}$ マウス (n=7) 産褥子宮 (PPD3) におけるプロゲステロン応答性遺伝子・エストロゲン応答性遺伝子の発現 (qPCR 法)。正期産 $p53^{ff}$ マウスの発現を 1 とし、内部コントロールには *Actb* を用いた。2 群の検定に Student の t 検定を使用した。
* $p < 0.05$

Figure 20

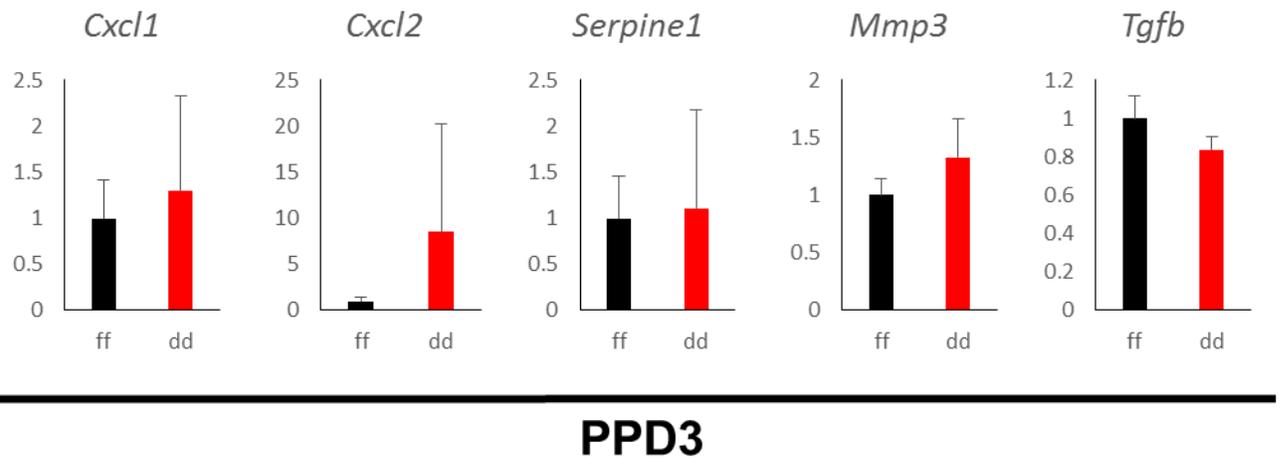


Figure 20 正期産 $p53^{ff}$ マウス (n=3) ・ LPS 誘導性早産 $p53^{dd}$ マウス (n=7) 産褥子宮 (PPD3) における SASP (Senescence associated secretory phenotype) 遺伝子の発現 (qPCR 法)。正期産 $p53^{ff}$ マウスの発現を 1 とし、内部コントロールには *Actb* を用いた。2 群の検定に Student の t 検定を使用した。* $p < 0.05$

Figure 21

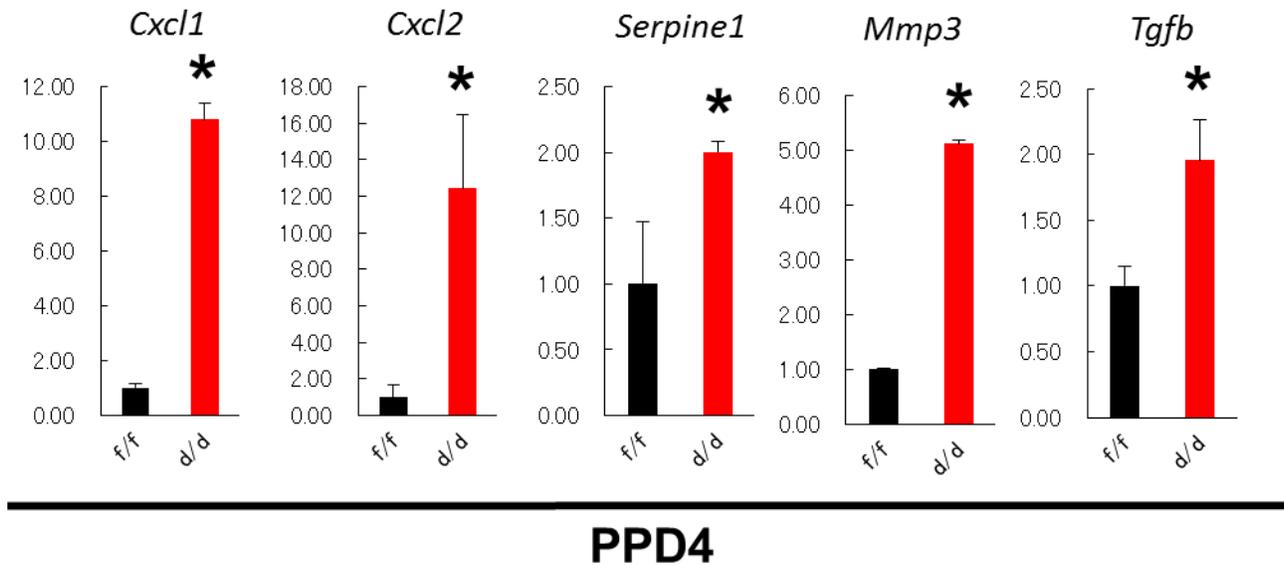


Figure 21 正期産 $p53^{f/f}$ マウス ($n=3$)・LPS 誘導性早産 $p53^{d/d}$ マウス ($n=3$) 産褥子宮 (PPD4) における SASP (Senescence associated secretory phenotype) 遺伝子の発現 (qPCR 法)。正期産 $p53^{f/f}$ マウスの発現を 1 とし、内部コントロールには *Actb* を用いた。2 群の検定に Student の t 検定を使用した。* $p < 0.05$

Figure 22

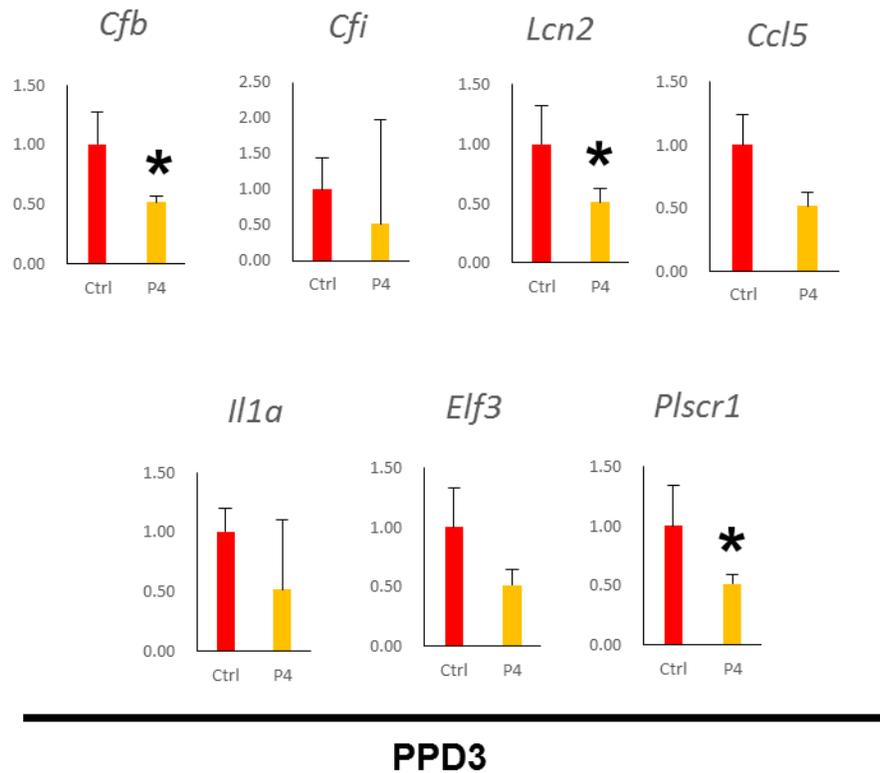


Figure 22 LPS 誘導性早産 p53^{d/d} マウス (n=7) ・プロゲステロン投与 LPS 誘導性早産 p53^{d/d} マウス (n=4) 産褥子宮 (PPD3) における炎症性遺伝子の発現 (qPCR 法)。LPS 誘導性早産 p53^{d/d} マウスの発現を 1 とし、内部コントロールには *Actb* を用いた。2 群の検定に Student の t 検定を使用した。**p* < 0.05

Figure 23

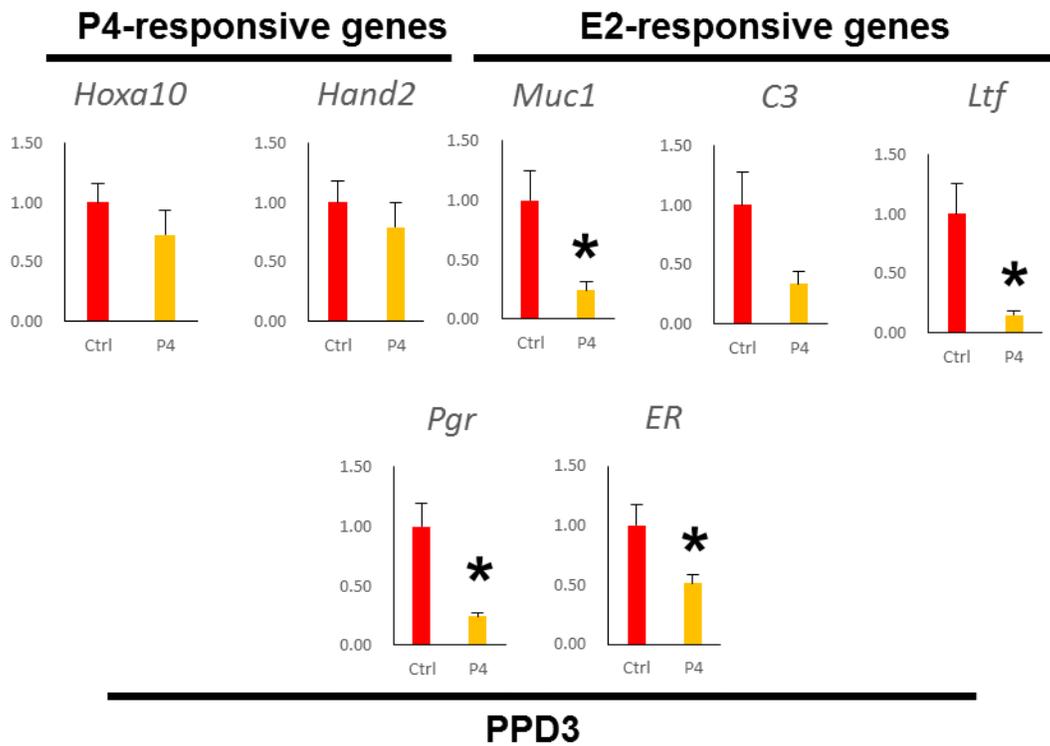


Figure 23 LPS 誘導性早産 p53^{d/d} マウス (n=7)・プロゲステロン投与 LPS 誘導性早産 p53^{d/d} マウス (n=4) 産褥子宮 (PPD3) におけるプロゲステロン応答性遺伝子・エストロゲン応答性遺伝子の発現 (qPCR法)。LPS 誘導性早産 p53^{d/d}マウスの発現を 1 とし、内部コントロールには *Actb* を用いた。2 群の検定に Student の t 検定を使用した。* $p < 0.05$

Figure 24

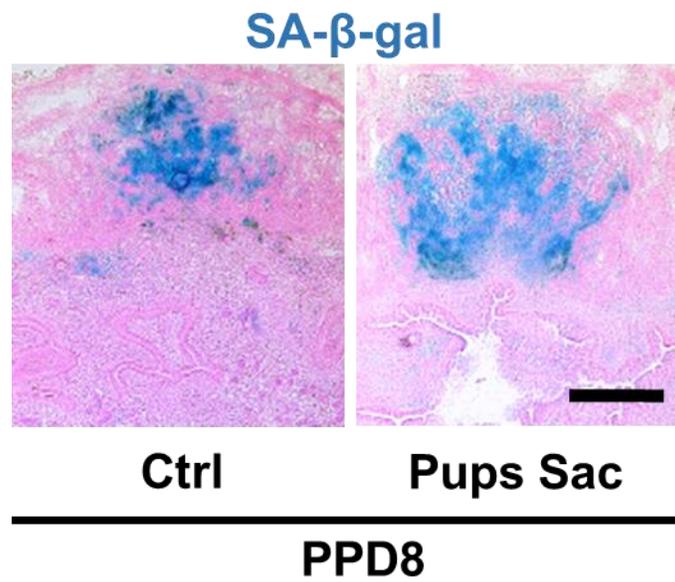


Figure 24 胎子安楽殺野生型マウス・コントロール野生型マウス産褥子宮における SA- β -gal 染色 (PPD8)。青く染まっている部位が陽性領域となる。対比染色はエオジンを用いた。Bar = 500 μ m。

Figure 25

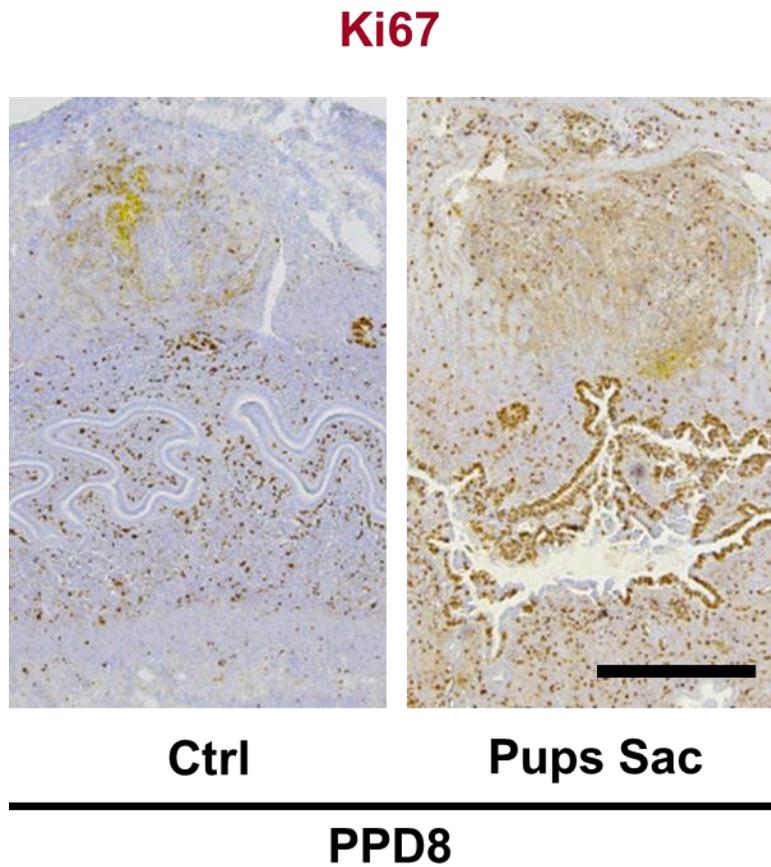


Figure 25 胎子安楽殺野生型マウス・コントロール野生型マウス産褥子宮における Ki67 免疫染色 (PPD8)。茶色く染まっているものが陽性細胞となる。対比染色はヘマトキシリンを用いた。Bar = 500 μ m。

Figure 26

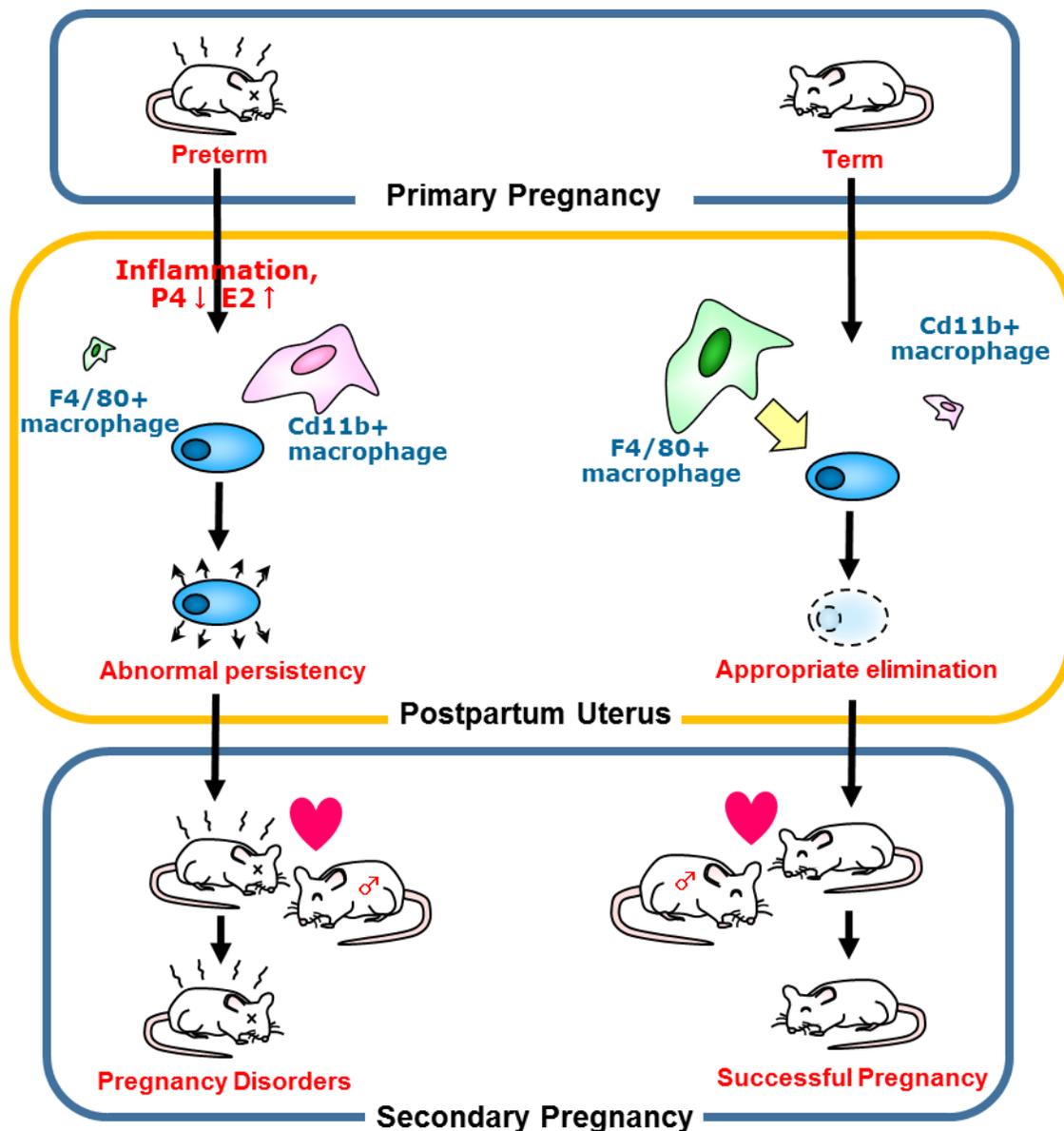


Figure 26 本研究で提示する産褥子宮における老化細胞除去機構と老化細胞の過剰な蓄積が生じる機構の模式図。正期産マウスにおいては F4/80 陽性マクロファージによって老化細胞のクリアランスが生じる。早産マウスにおいては子宮内微小環境の炎症亢進とエストロゲンシグナリングの優位性によって F4/80 陽性マクロファージの減少が生じ、結果的に老化細胞の過剰な蓄積と分娩直後の妊娠の障害が引き起こされる。

Table 1

Target gene	GeneBank accession No.	Forward primers (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>mCxcl1</i>	NM_008176	AAACCGAAGTCATAGCCACACT	TGTTGTCAGAAGCCAGCGTT
<i>mCxcl2</i>	NM_009140	CCAGACAGAAGTCATAGCCACT	CGAGGCACATCAGGTACGAT
<i>mSerpine1</i>	NM_008871	ACAACCCGACAGAGACAATCC	GTCTGGGATGCTGGTTGGAA
<i>mMmp3</i>	NM_010809	GGACAAATACTGGAGGTTTGATGAG	GGATGCCTTCCTTGGATCTCTT
<i>mTgfb</i>	NM_011577	ACCGCAACAACGCCATCTAT	GTATCAGTGGGGGTCAGCAG
<i>mCfb</i>	NM_008198	CAAGGGAAGAGCCTGACTCG	CCCCGGAATCTCCTTTGCAT
<i>mCfi</i>	NM_007686	TCAGGAGAAAGCCTGCAACG	CAGCTTCTCCTTGAGCTGACC
<i>mLcn2</i>	NM_008491	TACCCTGTATGGAAGAACCAAGG	CCACACTCACCACCCATTCA
<i>mCcl3</i>	NM_011337	TCCCAGCCAGGTGTCATTTTC	CTCAAGCCCCTGCTCTACAC
<i>mCcl5</i>	NM_013653	GCAGTCGTGTTTGTCACTCG	AGAGCAAGCAATGACAGGGA
<i>mCd14</i>	NM_009841	AGAGGAAGGGACAGGGTGAC	ACACGCTCCATGGTCGGTA
<i>mIlla</i>	NM_010554	GCTTGAGTCGGCAAAGAAATCA	CTTCCCGTTGCTTGACGTTG
<i>mElf3</i>	NM_001163131	CAGGACTGATCCTCTGGCTG	CATCAGAAGAGTTGGAGGTGAGG
<i>mPlscr1</i>	NM_011636	AGAAGGAGCCTCAGAACTGT	CTGGCTGATTTTGGACAGGAAA
<i>mHoxa10</i>	NM_008263	TAACCTAGCCGGAGCCTTAGGTC	CCTGATTAAACACAGCCCAGCA
<i>mHand2</i>	NM_010402	CCAGCCCAAGAGAACCGCCG	CCGTCCTCGCTCCTCAGGCT
<i>mMuc1</i>	NM_013605	GTGCCAGTGCCGCCGAAAGA	CCGCCAAAGCTGCCCCAAGT
<i>mLtf</i>	NM_008522	GGAGCCTTGAGGTGTCTGAG	CCAGGTGGCACTCCTTGTAT
<i>mC3</i>	NM_009778	CCCCTGCCCCTTACCCCTTCA	TGGCTGGAATCTTGATGGAGACG
<i>mPgr</i>	NM_008829	AGGGCAATGGAAGGGCAGCAT	CCACCGACTGGGGGAGAGCAA
<i>mEsr1</i>	NM_007956	CGGCCCTCCCGCCTTCTACA	CGGTCTTCCGTATGCCGCCT
<i>mActb</i>	NM_007393	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA

Table 1 本研究で使用したプライマー配列一覧。

Supplemental Table 1 (Excel File) 正期産 p53^{fl/fl} マウス (n=3) ・ LPS 誘導性早産 p53^{d/d} マウス (n=7) 産褥子宮 (PPD3) を用いたマイクロアレイ解析。p53^{fl/fl} に対して p53^{d/d} で 2 倍以上の発現が認められたものを増加した遺伝子 (up-regulated)、0.5 倍以下の発現を認めたものを減少した遺伝子 (down-regulated) とした。

Supplemental Table 2 (Excel File) 正期産 p53^{fl/fl} マウス (n=3) ・ LPS 誘導性早産 p53^{d/d} マウス (n=7) 産褥子宮 (PPD3) を用いた GO 解析。p53^{fl/fl} に対して p53^{d/d} で 2 倍以上の発現が認められたものを増加した遺伝子 (up-regulated)、0.5 倍以下の発現を認めたものを減少した遺伝子 (down-regulated) を用いた。

謝辞

研究遂行および論文作成にあたり、医学部産婦人科学教室の廣田泰講師、大須賀穰教授、藤井知行教授、獣医繁殖育種学教室の前多敬一郎教授にご指導頂きました。心より深謝申し上げます。

参考文献

Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F, Bernard D, Hernando E, Gil J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1006-18

Al Sorkhy M, Fifield BA, Myers D, Porter LA. Direct interactions with both p27 and Cdk2 regulate Spyl-mediated proliferation in vivo and in vitro. *Cell Cycle*. 2016;15(1):128-36.

Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011 Nov 2;479(7372):232-6.

Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, Henry E, Closset R, Dewals B, Thielen C, Gustin P, de Leval L, Van Rooijen N, Le Moine A, Vanderplasschen A, Cataldo D, Drion PV, Moser M, Lekeux P, Bureau F. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest*. 2009 Dec;119(12):3723-38.

Bergstrom S. Delay of blastocyst implantation in the mouse by ovariectomy of lactation. A scanning electron microscope study. *Fertil Steril*. 1972 Aug;23(8):548-61.

Bingel AS, Schwartz NB. Pituitary LH content and reproductive tract changes during the mouse oestrous cycle. *J Reprod Fertil*. 1969 Jul;19(2):215-22.

Bouet PE, El Hachem H, Monceau E, Gariépy G, Kadoch IJ, Sylvestre C. Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy

and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertil Steril*. 2016 Jan;105(1):106-10.

Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):660-5.

Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*. 1997 Aug 8;277(5327):831-4.

Brugarolas J; Chandrasekaran C; Gordon JI; Beach D; Jacks T; Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*. 1995 Oct 12;377(6549):552-7.

Burnum KE, Hirota Y, Baker ES, Yoshie M, Ibrahim YM, Monroe ME, Anderson GA, Smith RD, Daikoku T, Dey SK. Uterine deletion of Trp53 compromises antioxidant responses in the mouse decidua. *Endocrinology*. 2012 Sep;153(9):4568-79.

Campisi J, d'Adda di Fagnana F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):729-40.

Care AS, Diener KR, Jasper MJ, Brown HM, Ingman WV, Robertson SA. Macrophages regulate corpus luteum development during embryo implantation in mice. *J Clin Invest*. 2013 Aug;123(8):3472-87.

Cha J, Bartos A, Egashira M, Haraguchi H, Saito-Fujita T, Leishman E, Bradshaw H, Dey SK, Hirota Y. Combinatory approaches prevent preterm birth profoundly exacerbated by gene-environment interactions. *J Clin Invest*. 2013 Sep;123(9):4063-75.

Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*. 2012 Dec;18(12):1754-67.

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):725-30.

Churchman ML1, Roig I, Jasin M, Keeney S, Sherr CJ. Expression of arf tumor suppressor in spermatogonia facilitates meiotic progression in male germ cells. *PLoS Genet*. 2011 Jul;7(7):e1002157.

Coppé JP1, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008 Dec 2;6(12):2853-68. doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.

Cordelli E, Paris L. γ -H2AX detection in somatic and germ cells of mice. *Methods Mol Biol*. 2013;1044:293-310.

d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003 Nov 13;426(6963):194-8.

Daikoku T, Cha J, Sun X, Tranguch S, Xie H, Fujita T, Hirota Y, Lydon J, DeMayo F, Maxson R, Dey SK. Conditional deletion of *Msx* homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. *Dev Cell*. 2011 Dec 13;21(6):1014-25.

Delgado SR, McBey BA, Yamashiro S, Fujita J, Kiso Y, Croy BA. Accounting for the peripartum loss of

granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J Leukoc Biol.* 1996 Feb;59(2):262-9.

Deng W, Cha J, Yuan J, Haraguchi H, Bartos A, Leishman E, Viollet B, Bradshaw HB, Hirota Y, Dey SK. p53 coordinates decidual sestrin 2/AMPK/mTORC1 signaling to govern parturition timing. *J Clin Invest.* 2016 Aug 1;126(8):2941-54.

Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 1994 Nov 1;8(21):2540-51.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 26;92(20):9363-7.

Egashira M, Hirota Y. Uterine receptivity and embryo–uterine interactions in embryo implantation: lessons from mice. *Reprod Med Biol* (2013) 12: 127.

el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol.* 1998;8(5):345-57.

Elzi DJ, Lai Y, Song M, Hakala K, Weintraub ST, Shiio Y. Plasminogen activator inhibitor 1--insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jul 24;109(30):12052-7.

Erusalimsky JD, Kurz DJ. Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol.* 2005 Aug-Sep;40(8-9):634-42.

Grall FT, Prall WC, Wei W, Gu X, Cho JY, Choy BK, Zerbini LF, Inan MS, Goldring SR, Gravallesse EM, Goldring MB, Oettgen P, Libermann TA. The Ets transcription factor ESE-1 mediates induction of the COX-2 gene by LPS in monocytes. *FEBS J.* 2005 Apr;272(7):1676-87.

Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S. *Science.* 2004 May 21;304(5674):1147-50.

Haraguchi H, Saito-Fujita T, Hirota Y, Egashira M, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T, Koga K, Yamauchi N, Fukayama M, Bartos A, Cha J, Dey SK, Fujii T, Osuga Y. MicroRNA-200a locally attenuates progesterone signaling in the cervix, preventing embryo implantation. *Mol Endocrinol.* 2014 Jul;28(7):1108-17.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* 1993 Nov 19;75(4):805-16.

Hayflick L. The Limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1965 Mar;37:614-36.

Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell.* 2004 May 21;14(4):501-13.

Hirota Y, Daikoku T, Tranguch S, Xie H, Bradshaw HB, Dey SK. Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. *J Clin Invest.* 2010 Mar;120(3):803-15.

Hirota Y, Cha J, Yoshie M, Daikoku T, Dey SK. Heightened uterine mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling provokes preterm birth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 1;108(44):18073-8.

Honda R, Yasuda H. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J*. 1999 Jan 4;18(1):22-7.

Hosono K, Isonaka R, Kawakami T, Narumiya S, Majima M. Signaling of Prostaglandin E Receptors, EP3 and EP4 Facilitates Wound Healing and Lymphangiogenesis with Enhanced Recruitment of M2 Macrophages in Mice. *PLoS One*. 2016 Oct 6;11(10):e0162532.

Huang H, Li L, Wang Y, Tang LY, Wang CC, Leung LK. Genistein upregulates placental corticotropin-releasing hormone expression in lipopolysaccharide-sensitized mice. *Placenta*. 2011 Oct;32(10):757-62.

Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, Sato A, Nakashima M, Miyazaki H, Nishiyama K, Yamamoto J, Seki S. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. *J Leukoc Biol*. 2013 Dec;94(6):1325-36.

Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*. 1992 Sep 24;359(6393):295-300.

Jang E, Lee S, Kim JH, Kim JH, Seo JW, Lee WH, Mori K, Nakao K, Suk K. Secreted protein lipocalin-2 promotes microglial M1 polarization. *FASEB J*. 2013 Mar;27(3):1176-90.

Jeyapalan JC, Ferreira M, Sedivy JM, Herbig U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev*. 2007 Jan;128(1):36-44.

Jin S, Levine AJ. The p53 functional circuit. *J Cell Sci.* 2001 Dec;114(Pt 23):4139-40.

Johnston-MacAnanny EB, Hartnett J, Engmann LL, Nulsen JC, Sanders MM, Benadiva CA. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2010 Feb;93(2):437-41.

Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, Peterse H, van der Valk M, Berns A. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet.* 2001 Dec;29(4):418-25.

Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, Saretzki G, Fox C, Lawless C, Anderson R, Hewitt G, Pender SL, Fullard N, Nelson G, Mann J, van de Sluis B, Mann DA, von Zglinicki T. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Commun.* 2014 Jun 24;2:4172.

Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, Iken M, Vucur M, Weiss S, Heikenwalder M, Khan S, Gil J, Bruder D, Manns M, Schirmacher P, Tacke F, Ott M, Luedde T, Longerich T, Kubicka S, Zender L. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature.* 2011 Nov 9;479(7374):547-51.

Kitaya K. Prevalence of chronic endometritis in recurrent miscarriages. *Fertil Steril.* 2011 Mar 1;95(3):1156-8.

Kitaya K, Yasuo T. Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis. *Mod Pathol.* 2010 Aug;23(8):1136-46.

Konno T, Rempel LA, Arroyo JA, Soares MJ. Pregnancy in the brown Norway rat: a model for investigating the genetics of placentation. *Biol Reprod.* 2007 Apr;76(4):709-18.

Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell.* 2008 Aug 22;134(4):657-67.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 9;98(21):12072-7.

Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010 Nov 15;24(22):2463-79.

LeBlanc MM, Causey RC. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reprod Domest Anim.* 2009 Sep;44 Suppl 3:10-22.

Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell.* 2006 Apr;5(2):187-95.

Lesina M, Wörmann SM, Morton J, Diakopoulos KN, Korneeva O, Wimmer M, Einwächter H, Sperveslage J, Demir IE, Kehl T, Saur D, Sipos B, Heikenwälder M, Steiner JM, Wang TC, Sansom OJ, Schmid RM, Algül H. RelA regulates CXCL1/CXCR2-dependent oncogene-induced senescence in murine Kras-driven pancreatic carcinogenesis. *J Clin Invest.* 2016 Aug 1;126(8):2919-32.

Li SN, Wang W, Fu SP, Wang JF, Liu HM, Xie SS, Liu BR, Li Y, Lv QK, Li ZQ, Xue WJ, Huang BX, Chen W, Liu JX. IL-21 modulates release of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:548073.

Li Y, Sun X, Dey SK. Entosis allows timely elimination of the luminal epithelial barrier for embryo implantation. *Cell Rep.* 2015 Apr 21;11(3):358-65.

Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* 1998 Oct 1;12(19):3008-19.

Lin HK, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee SW, Chan CH, Yang WL, Wang J, Egia A, Nakayama KI, Cordon-Cardo C, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP. Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature.* 2010 Mar 18;464(7287):374-9.

Lujambio A, Akkari L, Simon J, Grace D, Tschaharganeh DF, Bolden JE, Zhao Z, Thapar V, Joyce JA, Krizhanovskiy V, Lowe SW. Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell.* 2013 Apr 11;153(2):449-60.

Luo C, Chen M, Madden A, Xu H. Expression of complement components and regulators by different subtypes of bone marrow-derived macrophages. *Inflammation.* 2012 Aug;35(4):1448-61.

McQueen DB, Bernardi LA, Stephenson MD. Chronic endometritis in women with recurrent early pregnancy loss and/or fetal demise. *Fertil Steril.* 2014 Apr;101(4):1026-30.

Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in

human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002 Apr 2;105(13):1541-4.

Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*. 2009 Sep;15(9):1082-7.

Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, Rodríguez-Baeza A, Varela-Nieto I, Ruberte J, Collado M, Serrano M. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*. 2013 Nov 21;155(5):1104-18.

Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011 Oct 14;11(11):723-37.

Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):703-16.

Paradis V, Youssef N, Dargère D, Bâ N, Bonvoust F, Deschatrette J, Bedossa P. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol*. 2001 Mar;32(3):327-32.

Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol*. 2003 Aug;5(8):741-7.

Pinheiro NM, Santana FP, Almeida RR, Guerreiro M, Martins MA, Caperuto LC, Câmara NO, Wensing LA, Prado VF, Tibério IF, Prado MA, Prado CM. Acute lung injury is reduced by the $\alpha 7$ nAChR agonist

PNU-282987 through changes in the macrophage profile. *FASEB J.* 2016 Oct 11. pii: fj.201600431R.

Pothmann H, Prunner I, Wagener K, Jaureguiberry M, de la Sota RL, Erber R, Aurich C, Ehling-Schulz M, Drillich M. The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. *Theriogenology.* 2015 May;83(8):1249-53.

Prakash H, Nadella V, Singh S, Schmitz-Winnenthal H. CD14/TLR4 priming potentially recalibrates and exerts anti-tumor efficacy in tumor associated macrophages in a mouse model of pancreatic carcinoma. *Sci Rep.* 2016 Aug 11;6:31490.

Satoh T, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M, Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O, Akira S. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature.* 2013 Mar 28;495(7442):524-8.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997 Mar 7;88(5):593-602.

Shapiro GI, Edwards CD, Ewen ME, Rollins BJ. p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 1998 Jan;18(1):378-87.

Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, Carrasco D, Castrillon DH, Aguirre AJ, Wu EA, Horner JW, DePinho RA. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature.* 2001 Sep 6;413(6851):86-91.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012 Mar;122(3):787-95.

Soyal SM, Mukherjee A, Lee KY, Li J, Li H, DeMayo FJ, Lydon JP. Cre-mediated recombination in cell lineages that express the progesterone receptor. *Genesis*. 2005 Feb;41(2):58-66.

Sun X, Bartos A, Whitsett JA, Dey SK. Uterine deletion of Gp130 or Stat3 shows implantation failure with increased estrogenic responses. *Mol Endocrinol*. 2013 Sep;27(9):1492-501.

Toni F, Vincenti L, Ricci A, Schukken YH. Postpartum uterine diseases and their impacts on conception and days open in dairy herds in Italy. *Theriogenology*. 2015 Oct 15;84(7):1206-14.

Tsai HH, Frost E, To V, Robinson S, Ffrench-Constant C, Geertman R, Ransohoff RM, Miller RH. The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell*. 2002 Aug 9;110(3):373-83.

Xu Y, Romero R, Miller D, Kadam L, Mial TN, Plazyo O, Garcia-Flores V, Hassan SS, Xu Z, Tarca AL, Drewlo S, Gomez-Lopez N. An M1-like Macrophage Polarization in Decidual Tissue during Spontaneous Preterm Labor That Is Attenuated by Rosiglitazone Treatment. *J Immunol*. 2016 Mar 15;196(6):2476-91.

Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007 Feb 8;445(7128):656-60.

Yuan DZ, Ding XL, Yu HL, Cheng Z, Tang XR, He YP, Zhang JH, Blok LJ, Hanifi-Moghaddam P, Burger CW, Yue LM. Progesterone-induced cyclin G1 inhibits the proliferation of endometrial epithelial cell and its possible molecular mechanism. *Horm Metab Res*. 2014 Oct;46(11):761-7.

Zhang K, Chen C, Liu Y, Chen H, Liu JP. Cellular senescence occurred widespread to multiple selective sites in the fetal tissues and organs of mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014 Dec;41(12):965-75.