

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 胚・母体相互作用変化期における 母体肝臓代謝変化の分子的解明

氏名 齋藤 奈央子

#### 【序論】

妊娠期の母体では、成体で通常見られない変化が様々な組織において生じる。これら妊娠期特異的な母体変化の研究は、妊娠の理解だけでなく、成体組織の潜在的な能力・機能に迫れる可能性がある。肝臓は妊娠期母体で体積が大きく増加することが知られる。この母体肝臓肥大化は妊娠初期に始まり分娩後の授乳が終了すると解消する。また、マウスでは胎児の数と相関があることから、胎児への栄養供給のための母体適応変化の一環と考えられている。妊娠は肝臓の代謝機能にも影響する。妊娠後期には、肝臓での糖新生によるグルコース産生が増加し、胎児・胎盤のグルコース利用の増加を満たすとされる。これら妊娠中期以降の母体代謝変化の機構として、胎盤性 lactogen の産生など胎盤を介した胎児-母体相互作用が知られる。しかし、胎児-母体相互作用がまさに始まる妊娠初期から母体肝臓がどのように変化しだすのかについては不明な点が多い。当研究室のマウスを用いた先行研究で、この相互作用様式が変化する妊娠初期から中期にかけて胎生期 8~10 日に胚側のエネルギー代謝経路が再編成されることが示されており、栄養供給側の母体でも既に何らかの代謝変化が生じると予想された。そこで本研究では、胎児・母体相互作用様式が変化する妊娠初期から中期にかけて、胚発生に応じて生じる母体肝臓変化の全体像を把握することを目指した。

#### 【方法・結果】

##### 1. 妊娠と偽妊娠では母体肝臓の肥大状態は異なっていた

母体肝臓肥大化は齧歯類では交配によって生じ、妊娠継続により維持される。実際に非妊娠、妊娠 8 日、妊娠 12 日のマウス母体の組織重量を測定したところ、妊娠 8 日で母体肝臓の肥大化が見られ、妊娠 12 日ではさらに肥大化が進行し非妊娠の約 2 倍の重量になっていた (Fig. 1)。同様に脾臓も肥大化が認められたが、腎臓は重量が変化しなかった。一方、精管結紮した雄マウスと交配することで偽妊娠状態を誘導した雌マウスでは、妊娠 8 日ほどの肥大化はみられなかった。このように、肝臓肥大化は交配で誘導されるが、胎児が実際に存在するか否かで母体肝臓の状態は異なることが示唆された。

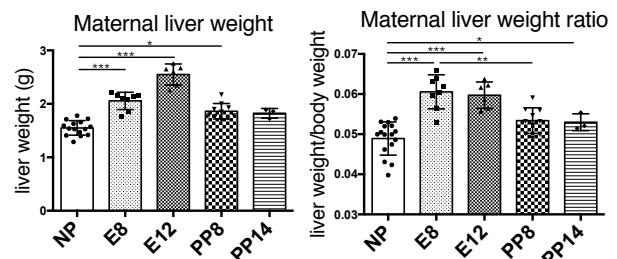


Fig. 1 母体肝臓重量, 体重量に対する母体肝臓重量比 NP: 非妊娠, E8: 妊娠 8.5 日, E12: 妊娠 12.5 日, PP8: 偽妊娠 8.5 日, PP14: 偽妊娠 14.5 日, NP, n = 15; E8, n = 8; E12, n = 6; PP8, n = 10; PP14, n = 3; means  $\pm$  SD,  $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.001$ ,  $p^{***} < 0.0001$ , One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test.

##### 2. 非妊娠、妊娠 8 日、偽妊娠 8 日の母体肝臓は遺伝子発現パターンが異なっていた

妊娠による母体肝臓状態の変化を解明するために、網羅的遺伝子発現解析を RNA-seq を用いて行なった。非妊娠、妊娠 8 日、偽妊娠 8 日での発現遺伝子についてクラスタリング解析を行った結果、妊娠により発現が上昇または低下する遺伝子が多数同定された(Fig. 2)。KEGG PATHWAY 解析の結果、非妊娠と比べて妊娠中に 2 倍以上発現上昇した遺伝子群には細胞増殖、炎症応答に関わる遺伝子が多く含まれていた(Fig. 2)。炎症応答関連遺伝子群の発現は障害肝の再生時の細胞増殖に必要であることが知られており、妊娠期の母体肝臓でも炎症応答の亢進により細胞増殖が促進され、肥大化が生じる可能性が示唆された。一方、非妊娠と比べて妊娠中に 2 倍以上発現低下が見られた遺伝子には物質代謝経路に関する遺伝子が多く見られた。KEGG PATHWAY 解析では Bile secretion, Tryptophan metabolism, PPAR signaling pathway, Fatty acid metabolism, Vitamin digestion and absorption 等に位置する遺伝子の発現が低下していた(Fig. 2)。Bile secretion では、肝細胞に発現している胆汁酸やコレステロールの輸送体である ABC transporters や organic anion transporting polypeptide の発現が低下し、妊娠期母体肝細胞では胆汁やコレステロールの取込・排泄が共に抑制されている可能性が示唆された。また、脂質代謝の観点では脂肪酸不飽和化に関わるステアシル CoA 不飽和化酵素 *Scd1*、糖新生の律速酵素 *Pck1*, *G6pc* の発現低下が見られた。

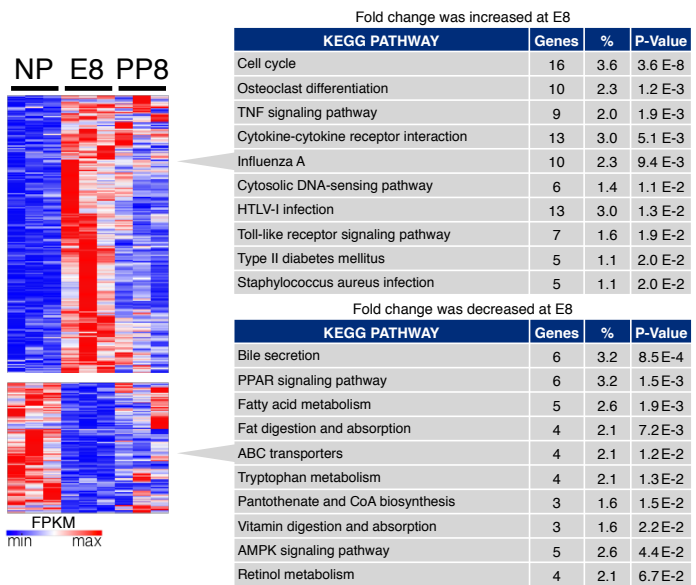


Fig. 2 RNA-seq 結果のクラスタリングと KEGG PATHWAY 解析 NP: 非妊娠, E8: 妊娠 8 日, PP8: 偽妊娠 8 日, n = 3.

### 3. *Ascl1* の過剰発現により肝臓細胞で *Klk1b4*, *Slc16a6* が発現上昇した

以上の解析で明らかとなった妊娠初期の母体肝臓の状態を作り出す機構に迫るために、非妊娠期と比べ妊娠中に母体肝臓で発現変動が大きい遺伝子に着目した。非妊娠と比べて、妊娠 8 日のみで有意に 2 倍以上発現上昇する一方、偽妊娠 8 日では発現変化しない遺伝子の中で、神経系発生に重要な転写因子として知られる *Ascl1* が発現変動の最も大きい遺伝子として同定された(Fig. 3)。そこで、ASCL1 が妊娠期母体肝臓と胎児発生の協調に関わる転写因子である否かの検証を試みた。そのために、肝細胞特異的に外来遺伝子を導入できる、HDI(Hydrodynamic injection)法を用いた系を適用した(Fig. 3)。

HDI によって *Ascl1* 過剰発現ベクターを非妊娠状態の雌マウス肝臓に導入し、8 日後に肝臓における *Ascl1* mRNA 量を定量 PCR によって測定した。その結果、妊娠 8 日と同程度またはそれ以上に *Ascl1* が過

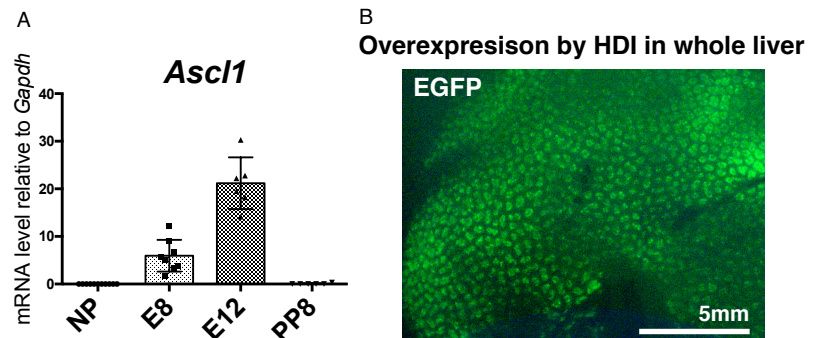


Fig. 3 (A) qRT-PCR, means  $\pm$  SD, (B) HDI によって肝臓全体で過剰発現した EGFP, NP: 非妊娠, E8: 妊娠 8.5 日, E12: 妊娠 12.5 日, PP8: 偽妊娠 8.5 日

剰発現されていた。このとき、肝臓のサイズに変化は見られなかった。一方、*Ascl1* の既知ターゲット遺伝子 *Tead2* は発現上昇傾向がみられた。転写因子 *Ascl1* のターゲット遺伝子は神経系細胞での報告が殆どであり、肝臓でのターゲット遺伝子は報告されていない。その探索のため、RNA-seq の階層的クラスタリング解析を利用した。階層的クラスタリングでは、サンプル間の発現パターンが類似した遺伝子が隣接して配置されクラスターを作る。そこで、*Ascl1* のターゲット遺伝子は階層的クラスタリングにおいて *Ascl1* と近接した位置に配置されていると予想し、*Ascl1* と近接した遺伝子群を中心に肝臓で *Ascl1* によって発現誘導される遺伝子を定量 PCR により探索した。その結果、*Ascl1* を 8 日間過剰発現した肝臓では、*Klk1b4* と *Slc16a6* の発現上昇が確認された (Fig. 4)。*Ascl1* の過剰発現により妊娠中に高発現する遺伝子が誘導されたことから、ASCL1 は妊娠期の母体肝臓遺伝子発現特性を一部誘導し得る制御因子であると示唆された。

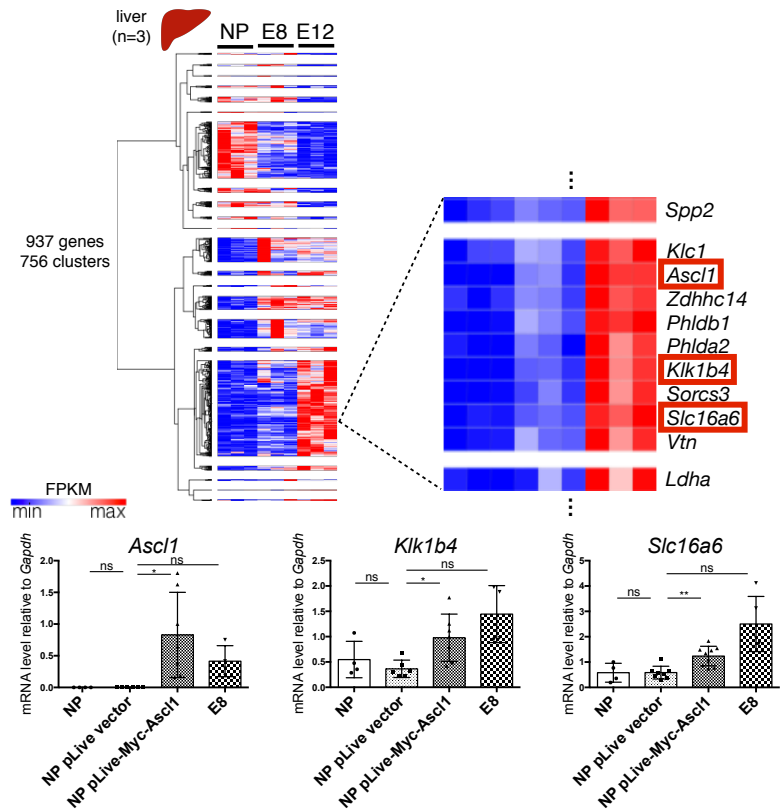


Fig. 4 階層的クラスタリングと qRT-PCR NP : 非妊娠, E8 : 妊娠 8.5 日, E12 : 妊娠 12.5 日, NP, n = 4; NP pLive vector, n = 8; NP pLive-Myc-Ascl1, n = 9; E8, n = 4; means  $\pm$  SD,  $p < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.001$ , Welch's t-test.

#### 4. 妊娠 8 日母体肝臓では Trp-K 代謝経路の抑制が示唆されたが偽妊娠 8 日では見られなかった

妊娠初期の母体ではどのような代謝産物が変化しているのかを調べるため、母体血清における代謝産物を LC-MS によって測定した。約 90 物質が測定でき、妊娠 8 日の母体血清中代謝産物濃度を非妊娠に対する割合で表すと、ほとんどの物質は非妊娠と比べて変化がなかった。妊娠 8 日で非妊娠より 2 倍以上濃度が上昇した物質は Kynurenine (Kyn, K), Thymine, Thymidine のみであった。Kyn は妊娠期の母体血中で増加し、胚の拒絶反応を抑制するために必要であると報告されている。Kyn は Trp から代謝酵素 *Tdo2* によって合成されるが、肝臓の RNA-seq 解析で妊娠 8 日のみで発現低下した上位 10 遺伝子に *Tdo2* が含まれていた。そこで Trp 代謝経路に着目した。生体内の Trp は約 95% が Trp-K 経路によって代謝される。*Tdo2* は Trp-K 代謝の律速酵素で主な発現部位は肝臓である。妊娠 8 日の母体肝臓では Trp-K 代謝経路関連遺伝子が複数発現低下しており、*Tdo2* mRNA 量は非妊娠と比べて約 5 分の 1 に低下していた。また、偽妊娠 8 日の mRNA 量の低下は小さかった。この変化の意義を考えるため、肝臓及び血中における Trp 代謝産物量を LC-MS で測定したところ、妊娠 8 日の肝臓中 Trp 量は増加していた (Fig. 5)。一方で、母体血清中 Trp 濃度は変化しておらず Kyn 濃度の増加が見られた。先行研究でマウス妊娠初期の子宮脱落

膜で *Tdo2* が発現上昇することが報告されていたため、母体肝臓と子宮脱落膜における *Tdo2* 発現量及び Trp 代謝産物濃度を非妊娠と妊娠 8 日で比較した。その結果、*Tdo2* mRNA 量は肝臓と脱落膜で同程度だった。このとき、Trp 濃度は妊娠 8 日の肝臓で増加し、子宮脱落膜では低下した。しかし、血清中 Trp 濃度は非妊娠、妊娠、偽妊娠の間で一定に保たれていた (Fig. 5)。肝臓と脱落膜での代謝産物変化総量は、血清中の変化総量に相当していた (Fig. 5)。従って、妊娠 8 日母体では胚発生依存的に、肝臓での Trp 分解を抑制する一方、子宮脱落膜では Kyn 産生のための多くの Trp が分配されていると考えられた。

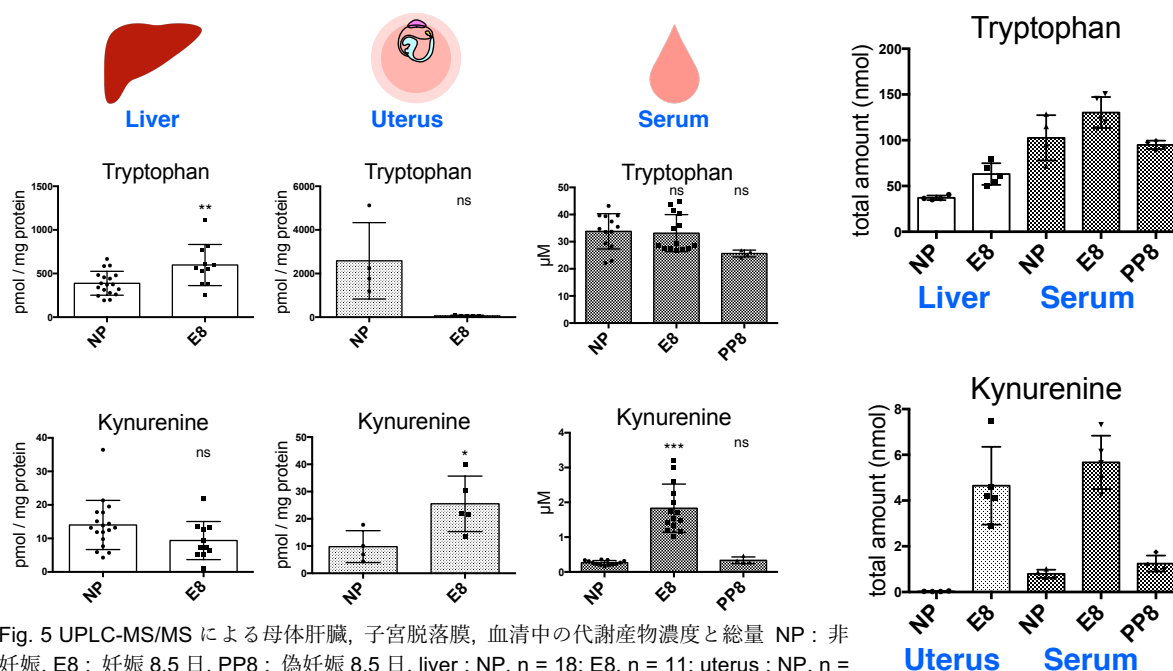


Fig. 5 UPLC-MS/MS による母体肝臓、子宮脱落膜、血清中の代謝産物濃度と総量 NP：非妊娠，E8：妊娠 8.5 日，PP8：偽妊娠 8.5 日，liver：NP，n = 18；E8，n = 11；uterus：NP，n = 4；E8，n = 5；serum：NP，n = 13；E8，n = 14；PP8，n = 4；means  $\pm$  SD， $p^* < 0.05$ ， $p^{**} < 0.001$ ， $p^{***} < 0.0001$ ，Welch's t-test or One-way ANOVA，Tukey's multiple comparison test.

### 【総括・考察】

本研究では、胚のエネルギー代謝様式が変化すると共に胎盤からの栄養供給が高まる妊娠初期から中期にかけて母体肝臓で生じる変化を、マウスをモデルとして明らかにした。漿尿膜胎盤が形成され始める妊娠8日の母体肝臓では、アミノ酸、脂質、ビタミン等の分解酵素の発現抑制傾向が見出された。また、*Ascl1*をはじめ、通常状態の肝臓では発現しない遺伝子発現を検出した。これらの遺伝子群が、母体肝臓の妊娠特異的な性質の発現に関わる可能性が本研究により示唆される。妊娠8日のマウス母体肝臓で見られた顕著な *Tdo2* 発現低下は、Trp-K代謝の抑制及び肝臓中Trp量の保存につながると考えられる。Kyn代謝産物は抗炎症作用や胎盤での免疫抑制作用を有し、胎児に対する免疫寛容に働くとされる。これらの事実から、妊娠8日の母体では胚・胎盤発生を支えるため、肝臓でのTrp分解が抑制され、子宮で多くのTrpを代謝する機構が働いている可能性が示唆された。妊娠期母体肝臓でのTrp代謝調節と子宮脱落膜及び血清中の代謝産物濃度との連動性、意義は未だ不明であるが、今後肝臓や子宮脱落膜でのTrp代謝を遺伝学的に操作した時の他の組織、血清中の代謝産物濃度変化、胚発生への影響等を詳細に解析することで、母体血清中の栄養物質濃度を一定に維持する制御の解明につながることが期待される。