

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 25 年度博士課程入学

江頭 真宏

指導教員 前多 敬一郎

論文題目：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

医学領域・畜産領域の双方において妊娠障害が大きな問題となっている。その中でも子宮性疾患は診断が難しいものや原因不明となっている症例が多いことが知られており、特に子宮における妊娠過程には未解明な部分が多く残されている。そのため、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 SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) と呼ばれる形質を持ち、周囲組織の炎症や腫瘍化を促進する。この性質に起因し、老化細胞は糖尿病や肝障害、加齢性疾患など多様な疾患と関連することが知られている。マウス妊娠子宮においても同様に、老化細胞の過剰な蓄積は早産に繋がること明らかとなっており、実際にヒト早産症例の脱落膜には老化細胞の過剰な蓄積が認められている。一方で、マウス妊娠子宮には生理的に老化細胞が出現することが知られており、その組織学的な部位から老化細胞は分娩後も子宮に残存することが推測される。老化細胞の持つ性質を考えると、産褥子宮における老化細胞の過剰な蓄積や異常な残存は子宮機能異常に繋がることが考えられる。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。そこで、本研究では妊娠障害を引き起こす新たな要因としての老化細胞に着目し、産褥子宮にお

る老化細胞の動態とその除去機構、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明らかにすることを試みた。

まず、マウス産褥子宮における老化細胞の動態と、細胞老化誘導経路を明らかにすることを試みた。老化細胞を特異的に検出する細胞老化関連βガラクトシダーゼ染色（senescence-associated β-galactosidase; SA-β-gal 染色）の結果、老化細胞は産褥子宮に存在し、徐々に減少して分娩後約1か月で消失していた。また、老化細胞領域は上皮マーカー（サイトケラチン）・筋層マーカー（αSMA）のいずれも陰性であった。このことから、産褥子宮には残存した老化細胞を除去する何らかの機構が存在することが示唆された。加えて、この老化細胞は細胞老化誘導因子として知られる p21 を発現していた一方で、細胞老化誘導因子として知られる p16、p21 をノックアウトした *Cdkn1a*^{-/-}、*Cdkn2a*^{-/-}、*Cdkn1a*^{-/-}*Cdkn2a*^{-/-}マウスのいずれにおいても、産褥子宮における老化細胞の局在に変化は認められなかった。

続いて、過去の文献において老化細胞の除去に関与していることが推測されている白血球画面に着目して、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を試みた。免疫染色法の結果、Cd11b 陽性細胞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ていることが認められた。NK 細胞（perforin）、T 細胞（CD3）、及び好中球（NIMP-R14）は認められなかった。さらに抗 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産褥マウスでは、老化細胞のクリアランスの遅延が認められた。このことから、F4/80 陽性マクロファージが産褥子宮に存在する老化細胞のクリアランスを促進していることが示唆された。一方で、マクロファージを除去した産褥マウスでは分娩直後の妊娠率の低下傾向が見られたものの、有意な妊娠率の低下は認められなかった。

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明らかにすることを試みた。*Trp53*^{loxp/loxp}-*Pgr*^{cre/+} (*p53*^{d/d})

マウスの妊娠子宮には過剰な老化細胞が蓄積し、これが卵巣からのプロゲステロン低下を併発することなく自然発症的な早産を引き起こすことが知られている。また、 $p53^{d/d}$ マウスに対する少量の LPS 投与は早産を誘発する一方で、 $Trp53^{loxp/loxp}-Pgr^{+/+}$ ($p53^{lf}$) マウスに対する少量 LPS 投与は早産を引き起こさない。そこで本研究では、産褥子宮に老化細胞が過剰に蓄積している可能性のある LPS 誘導性早産 $p53^{d/d}$ マウスモデルに着目して検討を行った。老化細胞を検出する SA- β -gal 染色の結果、LPS 誘導性早産 $p53^{d/d}$ マウスでは、分娩直後の老化細胞の局在はコントロールマウスと比べて変化しないものの、その後の老化細胞のクリアランスの遅延が生じることが観察された。また、老化細胞のクリアランスに関与する可能性のある F4/80 陽性マクロファージの減少と、分娩直後の妊娠率の顕著な低下が認められた。このような異常を引き起こす子宮内微小環境の解析のため、LPS 誘導性早産 $p53^{d/d}$ マウスの産褥子宮を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、LPS 誘導性早産 $p53^{d/d}$ マウスの産褥子宮においては炎症亢進性遺伝子の発現が顕著に増加していること、また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加が認められた。SASP 関連遺伝子の発現は分娩直後こそコントロールマウスと比べて変わらないものの、老化細胞除去の遅延に伴って発現に有意差が認められた。この微小環境を改善するため LPS 誘導性早産 $p53^{d/d}$ マウスに分娩後からプロゲステロンを投与したところ、炎症亢進性遺伝子の一部とエストロゲンシグナリングの低下が認められた。以上から、LPS 誘導性早産 $p53^{d/d}$ マウスの産褥子宮では、子宮内炎症の亢進とエストロゲン-プロゲステロンシグナリングの異常バランスが F4/80 陽性マクロファージの減少を引き起こし、その結果として老化細胞の過剰な蓄積と分娩直後の妊娠率の低下を生じていることが考えられた。

以上をまとめると、本研究では産褥子宮には 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、加えて子宮内に老化細胞が過剰に蓄積することにより分娩直後の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。この結果は新たな子宮性不

妊因子としての老化細胞の可能性を示唆するとともに、子宮内微小環境の変化によって子宮における老化細胞の過剰な蓄積の可能性を示すものである。今後の課題としては、LPS 誘導性早産 p53^{dd}マウスを用いて老化細胞による妊娠障害の詳細を明らかにするとともに、ヒト不妊検体やウシリピートブリーダー子宮を用いて、医療現場や畜産現場で生じている妊娠障害と老化細胞の存在との関連を調べることが考えられる。