

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 小 島 崇 史

### 学位論文題名

妊娠高血圧腎症モデルマウスにおけるオートファジーの意義と  
*ATG9* の役割の解明  
(Studies on the role of *ATG9* gene and autophagy in preeclampsia model mice)

【背景と目的】本研究の目的は妊娠の約5%に発症し母児の生命に関わる重大な周産期疾患である妊娠高血圧症候群( Pregnancy Induced Hypertension; PIH ) と妊娠高血圧腎症(Preeclampsia; PE)におけるオートファジーの意義と *ATG9* の役割について明らかにすることである。

オートファジーとは高度に保存された細胞内自己食・リサイクル機構である。本機構は飢餓状態などのストレス環境において重要なことが知られている一方、発生における分化、発達や組織再生などにも重要と考えられている。近年、酵母からヒトまで保存されているオートファジー関連遺伝子が多く発見され、哺乳類におけるオートファジーの生理学的、病理学的重要性が注目されている。オートファジーは神経筋疾患、悪性腫瘍、プログラム細胞死、あるいは感染症などと密接な関連があるが、その発生における重要性にもかかわらず胎盤や妊娠における役割については不明な点が多い。

以前、当研究グループにおいて PE や虚血性心疾患との関連が指摘されている一酸化窒素合成酵素遺伝子 *NOS3* のアンチセンス代謝物である *NOS3AS(ATG9B)* を同定し、その胎盤特異的発現と *NOS3* の転写後調節機構を明らかにしてきた。さらに *ATG9B* がコードする蛋白 *ATG9B* と、そのパラログであり全身に発現する *ATG9A* の機能を解析し、両蛋白がともにオートファジー関連蛋白であることが証明された。特に *ATG9B* は哺乳類特異的であり PE との関連が指摘されている *NOS3* のアンチセンス代謝物であることから、PE におけるオートファジーの役割の解析が進められてきた。これまでヒトの PIH/PE 胎盤において *ATG9B* は増加して *NOS3AS* として *NOS3* を抑制しており、また PIH/PE 胎盤においてオートファジーが活性化されていることが明らかになっている。近年、連携研究者によって *ATG9A* のノックアウトマウス(*Atg9a-KO*)が樹立された。*Atg9a* はオートファジーに必須の蛋白であり、*Atg9a-KO* はオートファジー不能マウスである。過去に報告されているオートファジー不能マウス(*Atg3-KO*, *Atg5-KO* など)は在胎中は生存できるものの出生後の授乳開始までの一過性飢餓状態に適応できずに新生仔死亡となることが知られており、*Atg9a-KO* も同様の特徴を持つ。また正常新生仔が出生後に突然胎盤からの栄養供給が断たれることへの反応として大規模なオートファジーが一過性に誘導されていることも分かっている。

PE をはじめとするヒト妊婦の高血圧は胎児発育制限 (FGR) や子宮内胎児死亡 (IUFD) をきたしうる妊娠中の有害事象として広く知られているが、これは子宮動脈からの血流不全により胎盤機能不全をきたすことで、胎児が子宮内で飢餓状態に陥っていることが原因として考えられている。これに関連しヒトの PE では胎盤におけるオートファジーが活性化していることが当研究グループによって報告されている。それ故マウスにおいても子宮内環境悪化への反応として同様のことが起こっており、オートファジー不能マウスでは子宮内環境の悪化に対応できずに FGR や IUFD といった有害事象を生じているかもしれない。そこでわれわれはこれまでに確立されてきた PE モデルマウス(*p57<sup>Kip2+/+</sup>*)と *Atg9a-KO* を使用し、次のような仮説をたてて妊娠高血圧腎症におけるオートファジーの意義と *Atg9a/Atg9b* の役割を解析することを計画した。1. オートファジー不能胎仔では発育不全や胎仔死亡になりやすい。2. 生存オートファジー不能胎仔では *Atg9a* を相補する *Atg9b* の存在が重要である。3. マウス胎盤においても *Atg9b* は *Nos3* のアンチセンス遺伝子

(*Nos3as*)として作用している。4. PEモデルマウスにおいてオートファジーの活性化はヒト同様重要であり、オートファジー不能状態とした場合に定常状態と比較して胎仔死亡になりやすい。

本研究では、上記の仮説を生理学的小よび生化学的手法により解析し、妊娠高血圧腎症におけるオートファジーの意義と *Atg9a* / *Atg9b* の役割を検討した。

【材料と方法】正常コントロールとしての Wild type(WT)マウス(n=8), *p57<sup>Kip2</sup>*<sup>+/-</sup>マウス(n=11), *Atg9a* ヘテロ欠損マウス (*Atg9a*<sup>+/-</sup>) (n=13), 同マウスに PE モデルマウスを掛け合わせた *Atg9a*<sup>+/-</sup>/*P57<sup>Kip2</sup>*<sup>+/-</sup>マウス(n=13)の4系統の雌マウスを準備し、前2者はWT雄と、後2者は *Atg9a*<sup>+/-</sup>雄マウスと一晚交配して妊娠させ、以下の実験に用いた。1. *Atg9a*<sup>+/-</sup>マウスおよび *Atg9a*<sup>+/-</sup>/*p57<sup>Kip2</sup>*<sup>+/-</sup>マウスの体重、血圧、尿蛋白を妊娠前、5.5dpc(days post coitum),9.5dpc, 13.5dpc, 15.5dpc, 17.5dpc にそれぞれ測定した。あらかじめ設定した妊娠週数 (13.5dpc, 15.5dpc, 17.5dpc) にマウスを sacrifice し、胎仔および胎盤を採取し、胎仔の体重をそれぞれ測定した。2. オートファジー関連遺伝子として、*Atg9a*, *Atg9b*, *Nos3* について、それぞれ定量 RT-PCR を用いて解析を行った。またオートファジー関連蛋白 (*Atg9b*, およびオートファジー活性化のマーカーである LC3-II, p62) についてウェスタンブロット法を用いて解析を行った。

【結果】*Atg9a*<sup>+/-</sup>/*P57<sup>Kip2</sup>*<sup>+/-</sup>マウスが妊娠中に高血圧を呈することを確認した。また IUFD の発生頻度は胎仔マウスの遺伝子型が *Atg9a*<sup>+/+</sup>および *Atg9a*<sup>+/-</sup>であった場合と比べ、*Atg9a*<sup>-/-</sup>の場合において有意に高かった (26%[10/39] vs. 9.4%[18/192], *P*<0.05)。また *Atg9a*<sup>-/-</sup>胎仔では *Atg9a*<sup>+/+</sup>および *Atg9a*<sup>+/-</sup>胎仔と比べ体重が小さくなり (0.97±0.22 vs. 0.65±0.15g, 17.5dpc, *P*<0.05), さらに母マウスが妊娠中に高血圧を呈した場合より顕著であった (0.92±0.17, vs. 0.59±0.10g, 17.5dpc, *P*<0.05)。胎盤におけるオートファジー関連遺伝子 mRNA 発現の検討では、すべての群の胎盤において妊娠の進行とともに *Atg9b* の発現量が増加し、逆に *Nos3* の発現量の低下を認めた。オートファジー関連蛋白の検討では、WT および *Atg9a*<sup>-/-</sup>マウス胎盤では妊娠日齢による LC3 と p62 の変化を認めなかったが、*p57<sup>Kip2</sup>*<sup>+/-</sup>マウスおよび *Atg9a*<sup>+/-</sup>/*p57<sup>Kip2</sup>*<sup>+/-</sup>マウス胎盤では妊娠進行に伴う LC3 発現量の増加と p62 発現量の減少を認めた。一方 *Atg9a*<sup>+/-</sup>/*p57<sup>Kip2</sup>*<sup>+/-</sup>マウス胎盤では他の群と比べ 17.5dpc における p62 の蓄積が顕著であった。

【考察】①妊娠中に母マウスが高血圧を発症すると、オートファジーの誘導が起こる。

②*Atg9a* 欠損下においては胎盤特異的に発現する *Atg9b* 蛋白が相補的に働く結果、オートファジーは失われておらず、基底状態のレベルを維持しようとする。③しかし母マウスが高血圧を発症し大規模なオートファジーが必要とされると、*Atg9a* 欠損下においても *Atg9b* によって代償的にオートファジーの誘導が始まりオートファゴソームの形成が進むが、*Atg9a* 正常発現下と比較するとその後の過程が滞り不完全となる。結果として子宮内環境の悪化に対応できず、FGR や IUFD をきたすと考えられた。

【結論】オートファジー不能胎仔では発育不全や胎仔死亡が起こりやすく、生存オートファジー不能胎仔では *Atg9a* を相補する *Atg9b* の存在が重要である。またマウス胎盤においても *Atg9b* が *Nos3* のアンチセンス遺伝子として抑制的に作用している。さらに PE モデルマウスにおいてオートファジーはヒト同様重要であり、オートファジー不能状態では定常状態と比べ発育不全や胎児死亡をきたしやすいことが確認された。