

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670713

研究課題名(和文)細胞老化のクリアランス機構とその破綻による疾患発生のメカニズム解明

研究課題名(英文)Physiological clearance of senescent cells in the postpartum uterus.

研究代表者

廣田 泰 (HIROTA, YASUSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40598653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：老化細胞の蓄積が組織や個体に悪影響を及ぼす可能性があるため、恒常性維持のために老化細胞が除去される機構の存在が示唆される。しかし正常組織中の老化細胞の除去機構、またその仕組みの破綻と疾患との関連は不明である。マウス妊娠子宮への老化細胞の蓄積が早産の発症と関連することから、マウス妊娠子宮に着目して本研究を行った。その結果、妊娠子宮に生理的に存在する老化細胞は分娩後も子宮に残存し徐々に消失すること、そのクリアランスの機構にマクロファージが関与すること、分娩後子宮における老化細胞のクリアランスが子宮機能回復と密接に関連しその残存が子宮機能障害を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cellular senescence, defined as an irreversible cell cycle arrest, affects the tissue microenvironment. Our previous study demonstrated the presence of uterine cellular senescence in preterm delivery, suggesting its involvement in uterine dysfunction. In the current study, we showed abundant senescent cells in the postpartum uterus and their gradual disappearance. Macrophages were present specifically around the area rich in senescent cells. The depletion of macrophages in the puerperal mice after normal parturition using anti-F4/80 antibody enlarged the area with senescent cells in the uterus. In addition, excessive senescent cells were observed in the uterus after preterm birth in p53 conditional knockout mice, and their second pregnancy rate immediately after the first delivery was significantly decreased. These findings indicate that there is a physiological system for removal of senescent cells after parturition, and its disruption is associated with uterine pathology.

研究分野：産婦人科学、生殖医学、生殖生物学

キーワード：細胞老化 組織恒常性 マクロファージ 子宮 分娩 組織リモデリング

1. 研究開始当初の背景

細胞老化 (cellular senescence) とは不可逆的な細胞周期の停止として定義される。繰り返される細胞分裂の果てに起こるテロメアの短縮によって生じる古典的な細胞老化の他に、酸化ストレスやDNA損傷など、様々な細胞ストレスによって生じる細胞老化が存在する (Kuilman, Genes Dev 2010)。このように細胞老化は細胞の正常なストレス応答の1つであると考えられる。老化細胞は正常な組織中にも存在するほか、加齢に伴って増加することが知られており、近年では老化細胞の存在自体が、糖尿病や動脈硬化をはじめとする病態形成や、周囲細胞の腫瘍化を促進していることが分かってきている。このように、老化細胞の蓄積が組織や個体に悪影響を及ぼす可能性があるため、組織や個体のホメオスタシスの維持において老化細胞が除去される必要があることが強く示唆される。

生理的な老化細胞の除去機構についてはこれまでほとんど報告されておらず、またその破綻と病態形成との関連についても全く不明のままである。さらには、生理的に出現する老化細胞を観察することが可能なモデルはほとんど確立しておらず、方法論的にも困難な状況がある。このように、利用可能なモデルの少なさも相まって、老化細胞の生理的な除去機構は解明されていない。非常に興味深いことに、本研究者の報告により、正常なマウス妊娠子宮において着床部位の子宮内膜間質 (脱落膜) に p21 依存的な細胞老化が生じること、分娩に近づくにつれて老化細胞が増加すること、さらに細胞老化の増強により早産が誘発されることがわかってきた (図1, Hirota Y, et al. JCI 2010; Hirota Y, et al. PNAS 2011)。しかしこのモデルで、分娩が近づくにつれ増強する細胞老化の調節機構と、分娩後に老化細胞の転帰は不明であった。

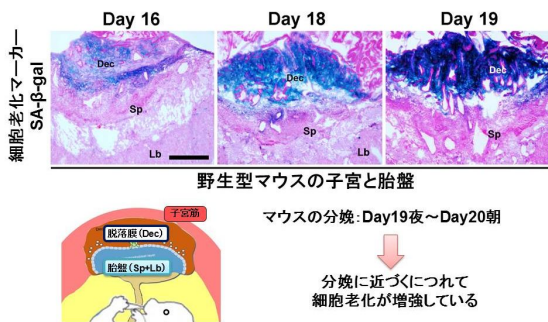


図1. 分娩前に子宮内膜の細胞老化は増強する

2. 研究の目的

本研究者は、分娩前後のマウス子宮という系が、正常な組織中において生理的に老化細胞が出現し、かつその動態を観察できる有用なモデルとして使用できると考えた。本研究では、生理的に存在する細胞老化との調節・除去機構と、その破綻による病態形成につい

て明らかにすることを目的とし、分娩後マウス子宮の検体を用いて研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) 生理的な条件下 (妊娠子宮) での除去機構を解明するために、野生型マウスの分娩後子宮を用いて、老化細胞の除去に関わる白血球分画を検索し、老化細胞に与える影響を検討した。各白血球のマーカーを用いて免疫染色を行い、細胞老化部位に特異的な白血球サブセット同定した。また抗体を用いて該当する白血球分画を一時的に除去する方法を用いて、子宮の細胞老化領域の変化を評価した。
- (2) 老化細胞の除去機構の破綻と病態との関連を検討するために、本研究者が既に確立し報告している子宮特異的な p53 欠損マウスの早産モデルを用いて、子宮の細胞老化とその除去機構への影響を調べた。

4. 研究成果

- (1) 細胞老化マーカー SA-β-gal 染色では、分娩後のマウス子宮の胎盤剝離部位に老化細胞が残存しており、その後徐々に細胞老化領域が減少し、分娩後約 1 か月で消失することを確認した (図2)。分娩後子宮における白血球の局在を免疫染色法にて観察すると、F4/80 陽性マクロファージが細胞老化領域周囲に集積していた。分娩後マウス子宮に対する抗 F4/80 抗体投与によるマクロファージ除去を行うと、分娩後子宮の細胞老化領域の増大が認められた。

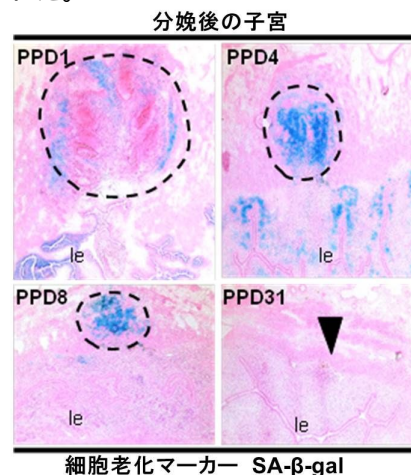


図2. 分娩後子宮における細胞老化
出産日を分娩後1日目 (PPD1) とした。染色部分が老化細胞、点線部および矢頭は着床していた部位 (着床痕) を表す。le: luminal epithelium.

- (2) p53 欠損早産マウスにおいて、分娩後子宮の老化細胞の増加と分娩直後の交配による妊娠率の低下が認められた。p53 欠損早産マウスにおいて、老化細胞周囲に集積する F4/80 陽性細胞の減少、および、老化細胞領域内における M1 マクロファ

ージのマーカーである CD11b 陽性細胞の増加が認められた。

以上の結果から、分娩後子宮における F4/80 陽性マクロファージを介した老化細胞の除去機構が存在すること、M1 優位のマクロファージ極性変化に由来する老化細胞の蓄積によって子宮機能障害が起こること、が明らかとなった。分娩後子宮において、老化細胞の過剰な残存が子宮機能回復へ影響している可能性が示唆された。本研究では、生理的な細胞老化をきたすマウスの妊娠・分娩子宮を用い、「恒常性維持のために老化細胞が除去される」という新しい概念の構築に繋がる結果が得られた。生理的な細胞老化の新たな意義づけという点で分子細胞生物学的に意義深く、さらに、細胞老化関連疾患の病態解明につながる可能性をもっている点で、将来的に臨床医学への応用に寄与すると考える。加齢によって頻度が増加し病態に細胞老化が関与する癌や動脈硬化、糖尿病などの疾患においても、細胞老化除去に関わる生理的な機構の破綻の病態を明らかにすることで、細胞老化が関与する多様な病態形成の解明の一助になる可能性が考えられる。妊娠という観点からは、細胞老化が不妊症や早流産などの妊娠関連疾患の原因になっている可能性が示唆されるため、これらの疾患と細胞老化の関連をさらに追及することで、各疾患の新規診断法や予防法の開発に繋がっていく可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Santoso EG, Yoshida K, Hirota Y, Aizawa M, Yoshino O, Kishida A, Osuga Y, Saito S, Ushida T, Furukawa KS. Application of detergents or high hydrostatic pressure as decellularization processes in uterine tissues and their subsequent effects on in vivo uterine regeneration in murine models. PLoS One. 査読有, Vol.9, 2014, pp. e103201. DOI: 10.1371/journal.pone.0103201.
2. Urata Y, Koga K, Hirota Y, Akiyama I, Izumi G, Takamura M, Nagai M, Harada M, Hirata T, Yoshino O, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. IL-1 β increases expression of tryptophan 2,3-dioxygenase and stimulates tryptophan catabolism in endometrioma stromal cells. Am J Reprod Immunol. 査読有, Vol.72, 2014, pp.496-503. DOI: 10.1111/aji.12282.
3. 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. Mol Endocrinol. 査読有, Vol.28, 2014, pp.1108-1117, DOI: 10.1210/me.2014-1097.
4. Hirata T, Izumi G, Takamura M, Saito A, Nakazawa A, Harada M, Hirota Y, Koga K, Fujii T, Osuga Y. Efficacy of dienogest in the treatment of symptomatic adenomyosis: a pilot study. Gynecol Endocrinol. 査読有, Vol.30, 2014, pp.726-729, DOI: 10.3109/09513590.2014.926882.
5. Miyashita M, Koga K, Takamura M, Izumi G, Nagai M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Fujii T, Osuga Y. Dienogest reduces proliferation, aromatase expression and angiogenesis, and increases apoptosis in human endometriosis. Gynecol Endocrinol. 査読有, 2014 Vol.30, pp.644-648, DOI: 10.3109/09513590.2014.911279.
6. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Takamura M, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S. The role of bone morphogenetic protein 6 in accumulation and regulation of neutrophils in the human ovary. Reprod Sci. 査読有, Vol.21, 2014, pp.772-777, DOI: 10.1177/1933719113518988.
7. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S. Bone morphogenetic protein 7 increased vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression in human granulosa cells and VEGF receptor expression in endothelial cells. Reprod Sci. 査読有, Vol.21, 2014, pp. 477-482, DOI: 10.1177/1933719113503411.
8. 松尾光徳, 廣田泰. プロテオミクスを用いた妊娠成立・維持機構の研究. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY. 査読無, Vol.22, 2015, pp. 11-17, DOI: なし
9. 藤田知子, 廣田泰. 着床における黄体ホルモン(プロゲステロン)の作用. 医学のあゆみ. 査読無, Vol.248, 2014, pp. 914-915, DOI: なし
10. 廣田泰, 藤田知子, 大須賀穰, 藤井知行. 着床期子宮におけるプロゲステロンの作用機構. 日本生殖免疫学会誌. 査読無, Vol.29, 2014, pp. 6-11, DOI: なし

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 廣田泰. Decidual cellular senescence contributes to preterm delivery. 46th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy / 35th Japan Society for the Study of Hypertension in Pregnancy. (招待講演). 2014 年 9 月 19 日, 新宿京王プラザホテル (東京).
2. 江頭真宏, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲央奈, 松尾光徳, 平岡毅大, 大須賀穰, 藤井知行. 分娩後子宮に存在する老化細胞の除去機構と次回妊娠への影響. 第 29 回日本生殖免疫学会. 2014 年 12 月 13 日, 東京大学伊藤謝恩ホール (東京).
3. 江頭真宏, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲央奈, 松尾光徳, 平岡毅大, 大須賀穰, 藤井知行. 分娩後子宮に存在する老化細胞のクリアランス機構と子宮機能への影響. 第 35 回日本炎症・再生医学会. 2014 年 7 月 2 日, 万国津梁館 (名護).
4. 江頭真宏, 廣田泰, 藤田知子, 原口広史, 松本玲央奈, 松尾光徳, 大須賀穰, 藤井知行. マウス妊娠子宮に出現する老化細胞のクリアランス機構. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 2014 年 4 月 26 日, 福岡国際会議場 (福岡).
5. 廣田泰. 妊娠成立に関わるプロゲステロン・シグナルの意義とその調節機構. 第 87 回日本内分泌学会学術総会 (招待講演). 2014 年 4 月 24 日, 福岡国際会議場 (福岡).
6. 廣田泰. 黄体ホルモンによる子宮内膜の機能調節と着床. 第 29 回日本生殖免疫学会 (招待講演). 2014 年 12 月 12 日, 東京大学伊藤謝恩ホール (東京).
7. Hirota Y. MicroRNA-200a confers progesterone signaling deficiency making the cervix unfavorable to embryo implantation. Gordon Research Conference on Mammalian Reproduction (招待講演). 2014 年 8 月 13 日, New London (USA).

〔その他〕

1. ホームページ : <http://square.umin.ac.jp/tkyobgyn/>
2. Haraguchi H, et al. Mol Endocrinol 論文が、Nature Reviews Endocrinology の Research Highlight で紹介された (Nature Reviews Endocrinology 10, 445, 2014)。
3. 第 29 回日本生殖免疫学会での江頭真宏らの演題が学会賞および最高得点演題賞を受賞した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 泰 (HIROTA, Yasushi)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 40598653