

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15591

研究課題名(和文)新規プロテインキナーゼ欠損がもたらす周産期障害の解明と克服

研究課題名(英文) Analysis of a novel protein kinase-deficient mice that indicate perinatal disorders.

研究代表者

森岡 裕香 (Morioka, Yuka)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：00360264

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)：申請者が独自に作製したNrk (Nik related kinase) 欠損マウスは、分娩前後の母仔において、胎盤肥大、新生仔期貧血、新生仔期高死亡率、分娩不全という複数の興味深い表現型を示し、新しい周産期障害モデルマウスとして有用であることが明らかになった。胎盤栄養膜細胞を用いた解析から、Nrk欠損細胞ではAKTリン酸化の増強に伴う細胞増殖の亢進が生じていることが明らかとなった。リン酸化AKTの発現上昇はNrk欠損胎盤でも確認され、胎盤肥大の一因となっている可能性が強く示唆された。胎盤肥大以外の表現型のメカニズムについては本研究期間内には解明に至らず、解析を継続中である。

研究成果の概要(英文)：Nrk is a Ser/Thr kinase and our recent study using Nrk-deficient mice suggested the importance of Nrk in perinatal period including placental development. We demonstrated that differentiated trophoblasts from murine embryonic stem cells endogenously expressed Nrk and that Nrk disruption led to the enhanced proliferation of differentiated trophoblasts. Furthermore, we demonstrated that AKT phosphorylation was upregulated in Nrk-null trophoblasts and that inhibition of AKT phosphorylation cancelled the enhanced proliferation observed in differentiated Nrk-null trophoblasts. These results indicated that the upregulation of AKT phosphorylation was the possible cause of enhanced proliferation observed in Nrk-null trophoblasts. The upregulation of AKT phosphorylation was also confirmed in enlarged Nrk-null placentas in vivo, suggesting that proper regulation of AKT by Nrk was important for normal placental development.

研究分野：発生工学、遺伝子工学、生殖生理学

キーワード：周産期障害 胎盤 プロテインキナーゼ 遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

妊娠時や分娩前後の周産期には母児ともに劇的な変化に直面し、様々な障害が起こりやすい。近年では母児の安全性と健康を担保することを目的として、産科と新生児科を組み合わせた「周産期母子医療センター」が各都道府県に設置され、出産年齢の高齢化や不妊治療の普及に伴って増加傾向にある「ハイリスク出産」にも対応可能な医療体制が整いつつある。一方で、多くの要因が関与していると考えられる周産期障害の分子メカニズムについては未解明な点が多く、現在の周産期医療のほとんどは対症療法として実施されている状況であり、早期の診断や根治的な治療法が確立されていない疾患が数多く残されている。さらに最近になって、胎内環境が出生児の長期にわたる発育や、さらには成人後の生活習慣病等の発症リスクにも影響を及ぼす可能性が報告されるようになったことから、周産期障害の病因病態解明と適切な診断法の開発を目指した基礎研究への注目度が高まっている。

母児間の相互作用が重要な周産期の研究においては *in vivo* 解析が必須と言えるが、これまでに有用な解析技術や病態モデル動物の報告は少なく、遺伝子レベル、分子レベルでの研究は立ち遅れているのが現状である。このような状況下で申請者は近年、予備的な結果ではあるが、独自に作製したプロテインキナーゼ遺伝子 (Nr<sub>k</sub>: Nik related kinase) 欠損マウスが、「胎盤肥大」、「分娩不全」、「新生仔貧血」、「新生仔期高死亡率」といった複数の興味深い表現型を呈することを明らかとし、新しい周産期障害モデルマウスとなり得る可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

(1) Nr<sub>k</sub> 欠損マウスの表現型解析

申請者が作製した Nr<sub>k</sub> 欠損マウスの表現型解析は緒に就いたばかりであるため、例数を増やして個々の表現型についてさらに詳細な検討を加え、周産期障害モデルマウスとしての有用性を評価することを目的とする。

(2) Nr<sub>k</sub> が関わるシグナル伝達経路の解明

Nr<sub>k</sub> は、妊娠後期の胎盤ならびに胎児骨格筋で高発現することが知られているものの、生理的な機能について確定的な報告は存在しない。本研究では、周産期障害を引き起こす分子機構を知る手がかりを得ることを目的として、Nr<sub>k</sub> と相互作用するタンパク質を同定し、未知の細胞内シグナル伝達経路の解明を試みる。

(3) *in vitro* 培養系を利用した胎盤における Nr<sub>k</sub> の機能解析

Nr<sub>k</sub> が胎盤に高発現している事実に着目し、Nr<sub>k</sub> 欠損マウスが呈する一連の表現型のうち、

胎盤肥大の原因究明を第一の目的とする。詳細な解析を行うためにマウス胎盤由来細胞の培養系を確立し、Nr<sub>k</sub> 欠損細胞と野生型細胞との比較から胎盤における Nr<sub>k</sub> の機能解明を目指す。

## (4) 周産期障害関連因子の網羅的探索

周産期障害発症メカニズムの解明や診断マーカーの探索、予防・治療法開発に繋がる情報の収集を目的として、野生型マウスと Nr<sub>k</sub> 欠損マウスをマイクロアレイ解析で網羅的に比較し、得られた情報の有用性を、Nr<sub>k</sub> 欠損マウスを利用して検証する。

## 3. 研究の方法

(1) Nr<sub>k</sub> 欠損マウスの表現型解析

Nr<sub>k</sub> は X 染色体上の遺伝子であるため、Nr<sub>k</sub> 欠損アリルを有する X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>Y 雄は全てヌル欠損となる。予備検討で明らかになった通り、Nr<sub>k</sub> 欠損マウスは新生仔期に多くが死亡するため、実験に十分な数を確保することが難しい。そこで、ヘテロ欠損の X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>X 雌と野生型の XY 雄の組合せで常に大規模な交配を行い、X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>X 雌を維持するとともにヌル欠損の X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>Y 雄を得た。ヌル欠損の X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>Y 雌は、ヘテロ欠損の X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>X 雌とヌル欠損の X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>Y 雄の交配により実験に必要な数を確保することとした。

## ① 新生仔貧血の解析

X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>X 雌と XY 雄または X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>X 雌と X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>Y 雄を交配した雌マウスを妊娠 18.5 日目に解剖し、仔の体色の白化と赤血球数、血液塗抹標本の解析から貧血症状を検討した。

## ② 新生仔期高死亡率の解析

X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>X 雌と XY 雄または X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>X 雌と X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>Y 雄の交配により産まれた仔の離乳率を調べた。

## ③ 胎盤肥大の解析

X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>X 雌と XY 雄または X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>X 雌と X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>Y 雄を交配した雌マウスを妊娠 18.5 日目に解剖し、胎仔・胎盤重量を測定した。さらに、胎盤の組織切片を作製して Periodic acid-Schiff 染色を行い、病理学的な解析を実施した。

## ④ 分娩不全の解析

X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>X<sup>Nr<sub>k</sub></sup> 雌マウスを XY 雄または X<sup>Nr<sub>k</sub></sup>Y 雄と交配し、正常に分娩可能かを解析した。

(2) Nr<sub>k</sub> と相互作用するタンパク質の同定

Halo Tag 融合 Nr<sub>k</sub> を 293 細胞に過剰発現させたサンプルを用いてプルダウンアッセイを行った。コントロールとしては、Halo Tag のみを発現させたサンプルを使用した。Nr<sub>k</sub> と相互作用するタンパク質を分離・回収して質量分析により同定した後、イムノブロットで確認を行うとともに、リン酸化の有無についても検証した。さらに、同定したタンパク質の発現が Nr<sub>k</sub> 欠損によりどのような影響を受けるかについて、Nr<sub>k</sub> 欠損胎盤を用いてイムノブロットで解析した。

(3) in vitro 培養系を利用した胎盤における Nrk の機能解析

まず始めに、胎盤における Nrk 機能解析のための in vitro 培養系として、マウスの胚性幹細胞 (ES) から胎盤栄養膜細胞 (TB) を分化誘導する系の有用性を評価し、次に、この培養系を利用して Nrk 欠損胎盤の肥大をもたらす因子の同定を試みた。具体的には、Nrk によりリン酸化されることが報告されている JNK や、これまでに胎盤機能や細胞増殖への影響が報告されている ERK2 や AKT といったシグナル伝達因子に着目し、Nrk 欠損に伴うリン酸化レベルの変化をイムノブロットで解析した。野生型 ES ならびに Nrk 欠損 ES は、Nrk 欠損マウス作製に用いた株を使用した。培養細胞から得られた結果については、in vivo 胎盤組織における検証も実施した。

(4) 周産期障害関連因子の網羅的探索

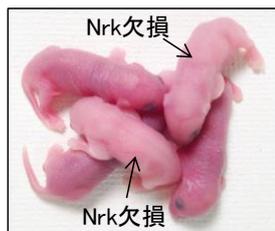
Nrk が高発現している胎盤は母仔間相互作用に重要な働きを担う臓器であることから、胎盤における Nrk 欠損が、胎盤肥大のみならず一連の周産期障害発現の引き金となっている可能性が考えられた。そこで、 $X^{Nrk}X$  雌と XY 雄の交配から得られた、 $X^{Nrk}Y$  の Nrk 欠損胎盤と XY の野生型胎盤における遺伝子発現を、マイクロアレイ解析で網羅的に比較した。個体差の影響を回避するために、それぞれ6個ずつの胎盤から調製した RNA を等量ずつ混合して解析用サンプルとした。

4. 研究成果

(1) Nrk 欠損マウスの表現型解析

① 新生仔貧血の解析

$X^{Nrk}X$  雌と XY 雄または  $X^{Nrk}X$  雌と  $X^{Nrk}Y$  雄を交配した雌を妊娠 18.5 日目解剖したところ、仔の一部は著しく白い体色を示し、その全てが Nrk 欠損個体であった【図 1】。



【図1】 生後2日目の体色

しかしながら、Nrk 欠損でも体色の白化を示さない個体も少数ながら存在し、この違いが離乳まで育つか否かを決定している可能性が示唆された。仔の赤血球数や血液塗抹標本の解析結果については、Nrk の有無や体色の白化に関わらず同等であり、明確な貧血症状を見出すことは出来なかった。体色の白化をもたらすメカニズムやその後の生育との関係については今後の検討課題である。

② 新生仔期高死亡率の解析

理論上は、 $X^{Nrk}X$  雌と XY 雄の交配で得られる産仔は  $X^{Nrk}X : XX : X^{Nrk}Y : XY = 1:1:1:1$ 、 $X^{Nrk}X$  雌と  $X^{Nrk}Y$  雄の交配で得られる産仔は  $X^{Nrk}X^{Nrk} : XX^{Nrk} : X^{Nrk}Y : XY = 1:1:1:1$  となるはずである。野生型の雌雄ならびに Nrk ヘテ

ロ欠損の雌は理論値通りにほぼ同数が離乳したが、Nrk 欠損の雌雄は 9 割近くが離乳前に死亡した。

③ 胎盤肥大の解析

$X^{Nrk}X$  雌と XY 雄または  $X^{Nrk}X$  雌と  $X^{Nrk}Y$  雄を交配した雌を妊娠 18.5 日目に解剖し、胎仔と胎盤の重量を測定した。野生型と Nrk 欠損を比較したところ、雌雄とも胎仔重量については有意な差は認められなかったが、胎盤については、Nrk 欠損が野生型と比較して著しく肥大し【図 2 左】、2 倍以上の重量を示した。さらに、野生型と Nrk 欠損胎盤の組織切片を作製して病理学的な解析を実施した結果、Nrk 欠損胎盤ではサイズが大きくなるのみならず構造の乱れも生じており、海綿状栄養膜細胞が迷路層に向けて異常に浸潤している様子が観察された【図 2 右】。



【図2】 胎生18.5日目の胎仔・胎盤(左)と胎盤切片のPAS染色(右)

④ 分娩不全の解析

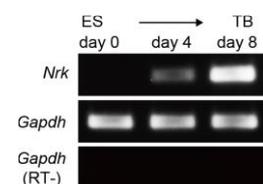
6 匹ずつの  $X^{Nrk}X^{Nrk}$  雌を XY 雄または  $X^{Nrk}Y$  雄と交配し、正常に分娩可能かを解析した。 $X^{Nrk}Y$  雄と交配した全ての雌は時期がきても分娩出来ずに死亡した。XY 雄と交配した雌は 1 匹が正常に分娩し、1 匹が分娩中に死亡、残りの 4 匹は分娩出来ずに死亡した。例数は少ないものの、XY 雄との交配では  $X^{Nrk}Y$  雄との交配と比較して、 $X^{Nrk}X^{Nrk}$  雌の分娩不全が改善される傾向が観察された。この結果は、母体の遺伝子型ではなく妊娠した胚の遺伝子型が分娩に影響を与えている可能性を示唆するものであった。

(2) Nrk と相互作用するタンパク質の同定

Nrk と相互作用するタンパク質を 1 種類同定することに成功した。しかしながら、このタンパク質にはリン酸化部位があるものの Nrk によって直接リン酸化されるわけではなく、また、胎盤での発現量は Nrk の有無による影響を受けなかった。

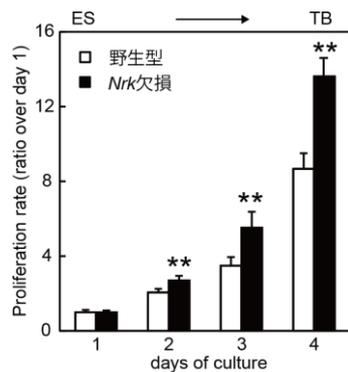
(3) 胎盤における Nrk 機能解析のための in vitro 培養系の確立

マウス ES から TB を分化誘導する培養系において RT-PCR 解析を行った結果、分化の進行に伴って Nrk 発現が強く誘導される事を見出した【図 3】。



【図3】 Nrk の発現誘導

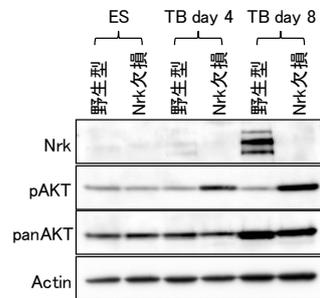
さらに、NrK 欠損ESから分化誘導したTBを野生型TBと比較したところ、形態変化や分化マーカーの発現は同等であったが、増殖に著しい亢進が認められ【図4】、NrK 欠損マウスで観察される胎盤肥大を反映し得る有用な培養系であると考えられた。



【図4】NrK欠損細胞の増殖亢進

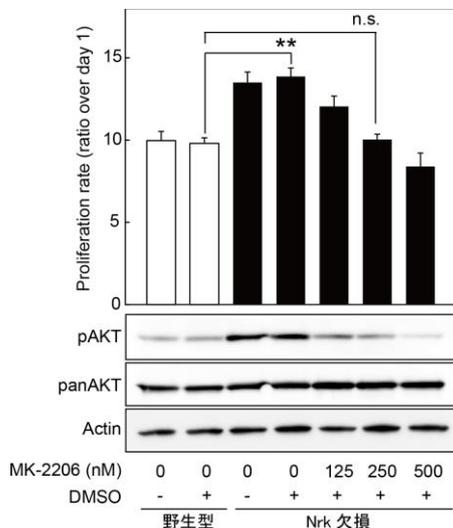
#### (4) NrK 欠損胎盤が肥大する原因の探索

(3)で確立した培養系を利用して、TBにおける各種シグナル伝達因子の発現をイムノブロットで解析したところ、NrK 欠損TBではAKTのリン酸化が著しく増強していることが明らかになった【図5】。

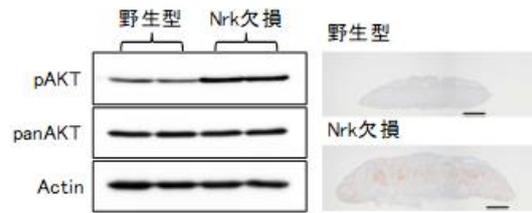


【図5】NrK欠損TBにおけるAKTリン酸化の亢進

NrK 欠損TBの過剰なAKTリン酸化を、特異的な阻害剤であるMK-2206の添加により抑制すると、細胞の増殖速度は野生型と同程度にまで低下し【図6】、AKTリン酸化の増強がNrK 欠損細胞の増殖亢進をもたらしていることが示された。さらに、イムノブロットならびに免疫染色による解析から、リン酸化AKTの発現上昇はNrK 欠損胎盤でも確認され【図7】、AKTリン酸化の増強が、NrK 欠損胎盤が肥大する一因となっている可能性が強く示唆された。



【図6】AKT阻害剤添加によるNrK欠損細胞の増殖抑制



【図7】NrK欠損胎盤におけるAKTリン酸化の亢進

NrK 欠損によりAKTのリン酸化が増強される事実から、NrKが直接的にAKTをリン酸化しているわけではないと言える。AKTのシグナル伝達経路には、PI3KならびにmTORC2によるリン酸化や、PTEN、PP2A、PHLPPなどによる脱リン酸化が関与していることが知られているため、今後は、NrKがこれらの因子の活性に与える影響を解析することでAKTリン酸化制御機構の解明を目指す予定である。

#### (5) 周産期障害関連因子の網羅的探索

マイクロアレイ解析により野生型胎盤とNrK 欠損胎盤における遺伝子発現を網羅的に比較したが、予想に反してあまり大幅な変動は認められず、NrK 欠損マウスで観察された周産期障害の病態発現に直接関連しそうな因子を見出すことはできなかった。そこで、予定していた周産期障害関連候補因子の有用性評価は中止した。NrKはプロテインキナーゼであることから、新たに野生型胎盤とNrK 欠損胎盤におけるリン酸化タンパク質の発現比較に着手し、解析を進行中である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

① [Yuka Morioka, Jin-Min Nam, Takashi Ohashi](#)  
Nik-related kinase regulates trophoblast proliferation and placental development by modulating AKT phosphorylation.  
PLoS ONE 12 (2): e0171503 (2017) 査読有  
DOI : 10.1371/journal.pone.0171503

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森岡 裕香 (MORIOKA, Yuka)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：00360264