

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11213

研究課題名(和文)胎盤異常に着目した独自の周産期障害モデルマウスの解析

研究課題名(英文)Analysis of PKX-deficient mice that indicate placental disorder.

研究代表者

森岡 裕香(MORIOKA, YUKA)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00360264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、PKXの欠損によりAKT1、2、3の全てのアイソフォームのリン酸化が亢進し、胎盤細胞の過増殖に繋がることを明らかにした。この分子メカニズムを解明するために、既知のAKTリン酸化経路への関与を解析したが、PKX欠損により影響を受ける既知因子は見出せなかった。さらに、PKXの直接の基質同定にも至らず、PKXが関わるシグナル伝達経路の解明に繋がる手がかりを得ることは出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AKTのリン酸化メカニズムについては盛んに研究されており、これまでに多くの制御因子が報告されているが、PKXは含まれていない。本研究により、PKXはAKTリン酸化の制御に関与するものの、既知の経路を介していないことが示された。これは、AKTリン酸化に新たな経路が存在する可能性を示唆する結果であり、学術的に高い意義を有する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we confirmed that PKX deficiency resulted in activation of AKT in differentiated trophoblast stem cells (day6-TSC). AKT is known to be comprised three highly homologous isoforms: AKT1, AKT2, and AKT3. All three AKT isoforms were expressed in day6-TSC with almost equivalent levels between wild-type and PKX-null genotypes. However, upregulation of phosphorylation was observed in all three AKT isoforms derived from PKX-null cells compared with wild-type cells. Because PKX deficiency did not influence expression and the activity of the factors which have been already known as a regulation factor of AKT, it was suggested that PKX regulate AKT phosphorylation through unknown mechanism.

研究分野：実験動物学、生殖生理学

キーワード：胎盤異常 周産期障害 プロテインキナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、妊娠や分娩時の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、周産期障害の早期診断法や根治療法は未だ存在せず、これらの確立を目指した基礎研究の進展が望まれている。多くの要因が関与していると考えられ、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我々は近年、独自に同定した新規胎盤関連遺伝子 PKX を欠損したマウスが、胎盤異常を含む複数の連続した周産期障害の表現型を示し、新しい病態モデルマウスとなり得る可能性を見出した。本マウスは、周産期障害の発症メカニズム解明や、予防・診断・治療法の開発に繋がる知見を得るうえで極めて有用であると期待される。さらに、現時点では PKX が関わるシグナル伝達経路や生理機能に関して確定的な報告は存在しないが、我々はこれまでに、PKX が AKT リン酸化の制御に関与する事実を見出しており、それを足掛かりとした解析を進めることで、基礎生命科学の発展に大きく貢献し得ると期待できる。

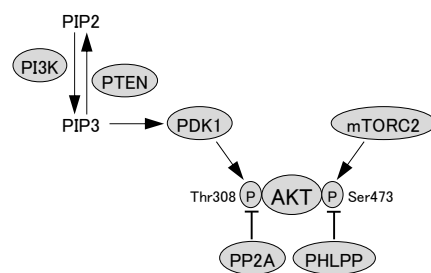
2. 研究の目的

先行研究から、PKX を欠損した胎盤細胞では AKT のリン酸化が亢進して増殖が促進され、その結果として胎盤肥大に陥る可能性が示された。この知見を元に本研究では、*in vitro* メカニズム解析と *in vivo* 機能解析を二本の柱として、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

(1) PKX による AKT リン酸化制御機構の解明

PKX はプロテインキナーゼであるが、これまでの解析では PKX の「欠損」により胎盤細胞における AKT リン酸化が上昇するという結果が得られており、PKX が直接的に AKT をリン酸化す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することが知られているため【図 1】、PKX がこれらの因子の活性や発現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。

また、AKT には 3 つのアイソフォームが存在する。AKT アイソフォームは構造的に極めて相溶性が高いが、それぞれに異なる発現パターンや機能を示す例も報告されているため（引用文献①）、PKX の欠損がどのアイソフォームのリン酸化に関わっているかについても精査する。



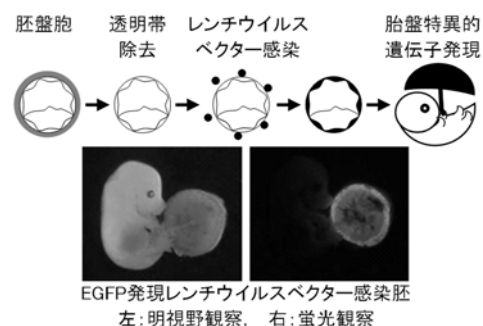
【図 1】既知の AKT リン酸化関連因子

(2) PKX の基質同定と生理機能の解明

PKX の直接の基質となる分子は不明であるため、野生型胎盤と PKX 欠損胎盤に発現するリン酸化タンパク質をプロテオミクス解析で網羅的に比較することで同定を試みる。さらに、得られた結果から、PKX が関わるシグナル伝達経路や生理機能の解明を目指す。

(3) 胎盤における PKX 欠損が周産期障害の引き金になるかの検証

PKX 欠損マウスで観察される胎盤異常とその他の周産期障害の表現型が、独立した機序で起こるのか、それとも何らかの関連があるのかを明らかにするために、申請者が独自に開発した「胎盤特異的な遺伝子操作技術【図 2】」を利用して胎仔または胎盤のみが PKX 欠損になるマウスを作製し、分娩不全や新生仔異常に与える影響を解析する。



【図 2】胎盤特異的な遺伝子操作技術

3. 研究の方法

(1) PKX の機能解析に有用な胎盤細胞培養系の確立

① 栄養膜幹細胞 (TSC) の有用性評価

シグナル伝達の解析には培養細胞が有用なツールとなり得るため、*in vitro* 胎盤研究において広く利用されている栄養膜幹細胞 (TSC) に着目した。TSC は、胚盤胞期胚の最外層を形成する栄養膜外細胞から樹立され、様々な胎盤細胞の元となる幹細胞であり、一定の条件下で 6

日間培養することで分化型 TSC (day6-TSC) を誘導できる。PKX は妊娠後期の胎盤で高発現することから、TSC から day6-TSC への分化に伴って発現が上昇すると予想された。これを検証するため、先行研究にて樹立した野生型マウスの TSC を用いて PKX の発現解析を行った。

② PKX 欠損 TSC の樹立

PKX ヘテロ欠損雌マウスと野生型雄マウスとの交配で得られた胚盤胞期胚から、引用文献②に示された方法に準じて TSC を樹立した。PKX は X 染色体上の遺伝子であり、PKX 欠損アリルを有する $X^{PKX}Y$ 雄は全てヌル欠損となる。樹立できた TSC の遺伝子型を決定し、PKX の欠損が TSC の樹立効率に与える影響を調べるとともに、その後の解析には XY (野生型) と $X^{PKX}Y$ (PKX 欠損) の株を用いた。全ての解析において複数の株を使用し、同様の結果が得られることを確認した。

③ PKX 欠損 TSC の有用性評価

②で樹立した TSC を day6-TSC に分化誘導して AKT のリン酸化状態を解析し、PKX 欠損胎盤における AKT リン酸化の亢進を反映し得る細胞培養系であるかを検証した。

(2) AKT アイソフォームの解析

AKT1、2、3 のアイソフォームを特異的に検出可能な抗体は市販されているが、リン酸化状態については、各アイソフォームを識別可能な抗体は入手出来なかった。そこで、

- ① day6-TSC で発現しているのはどの AKT アイソフォームか？
- ② 野生型と PKX 欠損の day6-TSC で、AKT アイソフォームの発現に差があるか？
- ③ PKX 欠損によりリン酸化が亢進するのは、どの AKT アイソフォームか？

を調べるために、day6-TSC タンパク溶液から直接ウエスタンブロットを行うのに加え、特異抗体を用いて AKT1、2、3 を免疫沈降した後にウエスタンブロットを行い、total AKT、pAKT (Ser473)、pAKT (Thr308) を検出した。

(3) 既知の AKT リン酸化関連因子の解析

代表的な既知の AKT リン酸化関連因子は【図 1】に示す通りである。間接的に AKT リン酸化の亢進をもたらす PKX の欠損が、

- ① PI3K や mTORC2 といった、AKT リン酸化を促進する因子の活性を増強している。
- ② 脱リン酸化酵素 PTEN、PP2A、PHLPP といった、AKT リン酸化を抑制する因子の発現を減少させている。

の 2 つの可能性を検証するために、野生型と PKX 欠損の day6-TSC タンパク溶液を調製し、各因子の発現ならびに活性を、ウエスタンブロットや市販の活性測定キットで比較した。

(4) リン酸化プロテオミクス解析

PKX ヘテロ欠損雌マウスと野生型雄マウスの自然交配で得られた、妊娠 18.5 日目の野生型胎盤と PKX 欠損胎盤に存在するリン酸化タンパク質を、プロテオミクス解析で網羅的に比較した。可能な限り同一の条件で比較するために同腹に存在する胎仔由来の胎盤を使用し、再現性を確認するため 2 腹分の解析を外部企業に委託した。

4. 研究成果

(1) PKX の機能解析に有用な胎盤細胞培養系の確立

① TSC の有用性評価

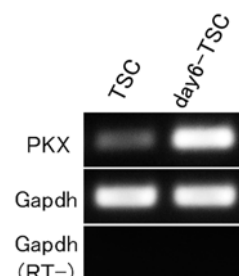
先行研究で樹立した野生型マウスの TSC を day6-TSC へと分化誘導し、RT-PCR 解析を行った結果、分化に伴って PKX 発現の著しい上昇が観察され【図 3】、内因性に PKX を発現する胎盤細胞培養系としての有用性が示された。

② PKX 欠損 TSC の樹立

PKX ヘテロ欠損雌マウス ($X^{PKX}X$) と野生型雄マウスと (XY) との交配で得られた胚盤胞期胚から TSC を樹立した結果、16 クローンが得られた。遺伝子型は、理論的には $X^{PKX}X : XX : X^{PKX}Y : XY = 1 : 1 : 1 : 1$ となるはずであるが、実際の数はいずれも 5 (31%)、4 (25%)、4 (25%)、3 (19%) とほぼ理論値通りの比率であり、PKX が欠損しても TSC の樹立効率に影響を与えないことが明らかとなった。

③ PKX 欠損 TSC の AKT リン酸化解析

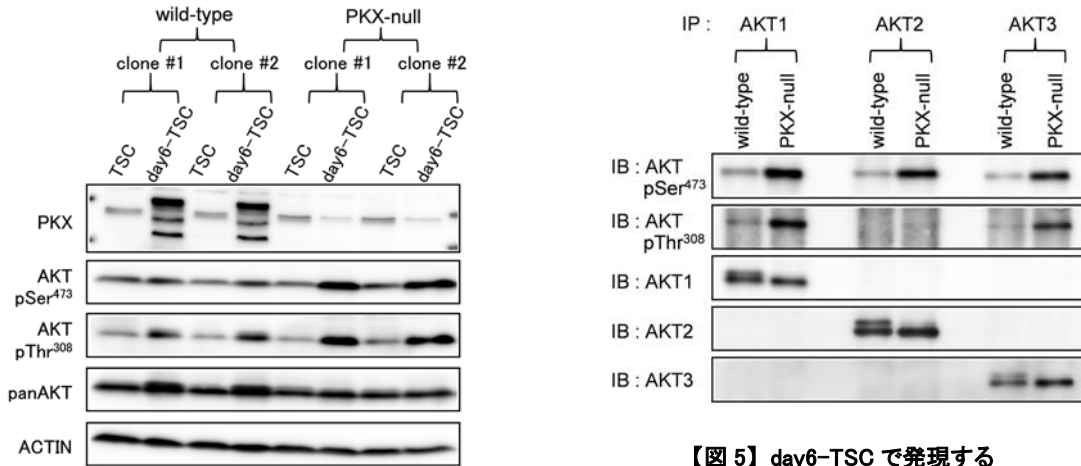
②で樹立した野生型 (XY) ならびに PKX 欠損 ($X^{PKX}Y$) の TSC から day6-TSC を分化誘導し、AKT のリン酸化状態を解析した結果、PKX の欠損により AKT Ser473、Thr308 のいずれのリン酸化も亢進しており【図 4】、PKX 欠損胎盤における AKT リン酸化の亢進を反映し得る細胞培養系であることが確認された。一方で、分化誘導した際の細胞形態や、Essrb、P12、Tpbpa といった胎盤細胞マーカー遺伝子の発現については、野生型と PKX 欠損で差が認められなかった。



【図 3】 PKX の発現誘導

(2) AKT アイソフォームの解析

day6-TSC で発現している AKT が 1、2、3 のうちどのアイソフォームであるかをウエスタンブロットで解析した結果、野生型、PKX 欠損のいずれにおいても全てのアイソフォームが検出され、発現量に差は無かった。さらに、day6-TSC タンパク溶液から AKT1、2、3 の特異抗体で免疫沈降を行い、pAKT (Ser473)、pAKT (Thr308) を検出したところ、pAKT (Ser473) の発現については、PKX 欠損により AKT1 (約 4.7 倍)、AKT2 (約 3.1 倍)、AKT3 (約 3.3 倍) の全てのアイソフォームで上昇していた。一方、pAKT (Thr308) の発現については、PKX 欠損により AKT1 と AKT3 でそれぞれ約 5.4 倍、2.7 倍の上昇が認められたが、AKT2 に関しては、野生型、PKX 欠損ともに発現そのものが検出されなかった【図 5】。



【図 4】リン酸化 AKT の解析

【図 5】 day6-TSC で発現する AKT アイソフォームの解析

(3) 既知の AKT リン酸化関連因子の解析

① PI3K、mTORC2 活性の解析

ウエスタンブロットで day6-TSC タンパク溶液中の PI3K、mTORC2 の発現を解析したところ、いずれの分子も検出されたが、野生型と PKX 欠損で発現量に差は無かった。そこでさらに、day6-TSC タンパク溶液から免疫沈降で PI3K、mTORC2 を分取し、それぞれに対する基質をリン酸化する活性を市販のキットを利用して測定したが、これについても野生型と PKX 欠損で差は認められず、PKX の欠損による AKT リン酸化の亢進は、AKT リン酸化を促進する PI3K や mTORC2 の活性を増強した結果ではないことが示された。

② PTEN、PP2A、PHLPP 発現の解析

PTEN は PIP3 を脱リン酸化することで PI3K による AKT リン酸化を抑制し、PP2A、PHLPP はそれぞれ、AKT の Thr308、Ser473 を直接的に脱リン酸化する。ウエスタンブロットで day6-TSC における PTEN、PP2A、PHLPP の発現を解析したところ、いずれの分子も検出されたが、野生型と PKX 欠損で発現量に差は認められず、PKX の欠損による AKT リン酸化の亢進は、PTEN、PP2A、PHLPP といった脱リン酸化酵素が減少した結果ではないことが示された。

(4) リン酸化プロテオミクス解析

妊娠 18.5 日目の野生型胎盤と PKX 欠損胎盤に存在するリン酸化タンパク質をプロテオミクス解析で網羅的に比較した結果、野生型で 2 倍以上高発現する分子が 28 種類、PKX 欠損胎盤で 2 倍以上高発現する分子が 58 種類得られた。リン酸化 AKT の発現の差が、プロテオミクス解析がうまくワークしているかを検証する指標となるはずであったが、得られた結果に AKT は含まれていなかった。これは、LC-MS/MS での検出感度が、胎盤組織をトリプシン消化して得たリン酸化ペプチド断片の荷電状態によって影響を受けるため、リン酸化 AKT については閾値以下となってしまう可能性が考えられた。一方で、AKT の下流で促進作用を受けるリン酸化 PFKFB2 の発現は (PKX 欠損胎盤 > 野生型胎盤) となり、抑制作用を受けるリン酸化 Bad の発現は (PKX 欠損胎盤 < 野生型胎盤) となる結果が得られており、これは、PKX 欠損胎盤でリン酸化 AKT の発現が亢進する事実を反映していた。このことから、検出感度の問題により見出せていないリン酸化タンパク質が存在すると想定されるものの、得られている結果については信頼性が高いと考えられた。そこで、差があった分子について、胎盤組織や day6-TSC での発現をウエスタンブロットで確認した後に、PKX の直接の基質としての可能性などについて解析を進める予定であったが、休職や研究機関の異動に伴って研究を中断せざるを得ない状況が長く続いたため、本研究期間内に実施することは出来ず、今後も継続予定である。

(5) 胎盤における PKX 欠損が周産期障害の引き金になるかの検証

休職や研究機関の異動に伴って動物実験の遂行が大幅に遅れ、計画を実行出来なかった。

<引用文献>

- ① Fabi F and Asselin E. Expression, Activation, and Role of AKT Isoforms in the Uterus. *Reproduction*. 2014; 148: R85-95.
- ② Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*. 1998; 282: 2072-2075.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----