

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02387

研究課題名(和文)母体環境と分娩発来システムの in vivo 解析と横断的検討

研究課題名(英文)In vivo study of the maternal environment and delivery system.

研究代表者

金井 正美 (Kanai, Masami)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：70321883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤形態は動物種によって大きく異なり、ヒトをはじめとした霊長類とマウスなど齧歯類は類似した進化系の血絨毛性胎盤を有し、母体血に接する栄養膜合胞体細胞はバリア機能と選択的物質交換に特化した形状を示す。我々がオリジナルに単離したNr_k(NIK-related kinase)遺伝子のKOマウスは、胎盤肥大と分娩遅延を呈する。このNr_k KOマウスの表現系とRNA-seq解析から、分娩発来時母体内P4が急速に低下するものの、Nr_k KO個体ではP4低下しないことが原因で分娩遅延することを明らかにし、得られたNr_k下位遺伝子候補から、正常な妊娠から分娩発来シグナルについてのスイッチ機構を検索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NRK KOによって分娩遅延が引き起こされる。本研究から、マウス胎盤がヒト胎盤の疾患モデルとしてカウンターパートであること、NRKが分娩誘導因子である可能性を示す結果が得られた。今後、マウスNRKとその下位因子と、ヒト早産の共通因子を、in silicoと病理切片を用いて更に検索することで、将来、早産の原因探索が可能となり、治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The morphology of the placenta varies significantly among animal species. Primates, including humans, and rodents such as mice possess a hemomonochorial placenta, which has evolved similarly. In these placentas, the syncytiotrophoblast cells, which are in contact with maternal blood, are specialized for barrier functions and selective material exchange. The KO mice for the Nr_k (NIK-related kinase) gene, which we originally isolated, exhibit placental hypertrophy and delayed parturition. From the phenotypes and RNA-seq analysis of these Nr_k KO mice, we revealed that parturition is delayed because the rapid decline in maternal P4 (progesterone) levels typically observed at the onset of labor does not occur in Nr_k KO individuals. Additionally, by investigating the candidate downstream genes of Nr_k, we explored the switch mechanisms for signaling the transition from normal pregnancy to the onset of labor.

研究分野：実験動物学

キーワード：胎盤 NRK 分娩遅延

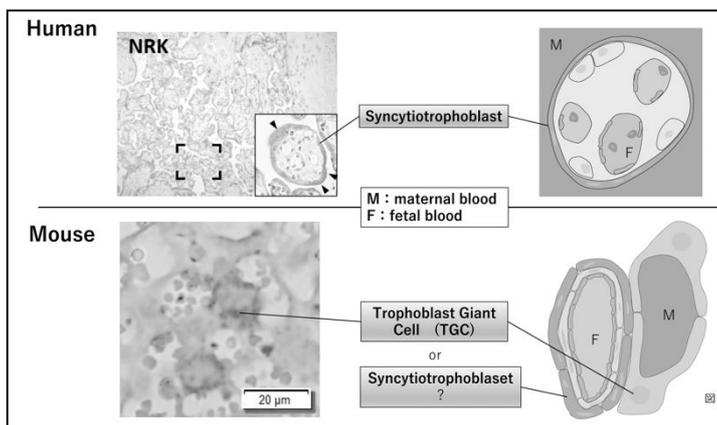
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胎盤形態は動物種によって大きく異なることが報告されている (Frukawa *et al.*, *J Toxicol Pathol.* 2014)。ヒトをはじめとした霊長類とマウスなど齧歯類は、類似した進化型の血絨毛性胎盤を有し、胎盤構成細胞である胎児由来栄養膜細胞は、直接母体血液に接するために合胞化することでバリア機能を獲得し、選択的物質交換に特化した形態を示す。*Nrk* は、X 染色体上に位置する Germinal Center Kinase (GCK) ファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼ遺伝子である。申請者らは、7.5 日胚の胎盤原基である胎盤外円錐 (ecroplacental cones; EPCs) cDNA から *Nrk* 遺伝子をクローニングし、発生過程の発現パターンや生化学的特性を発表してきた (Kanai-Azuma *et al.*, *Mec Dev* 1999, Nakano, Kanai-Azuma *et al.*, *Exp Cell Res* 2003)。その後、Denda らによって *Nrk* が胎盤の海綿体層に発現しており、ノックアウトマウスの表現系として、胎児シグナルによる分娩遅延が報告された (*J Biol Chem* 2011, Morioka *et al.*, *PLoS One* 2017)。加えて、*Nrk* ノックアウトマウスでは妊娠経験のあるメスのみが乳がんが発生すること、がん細胞増殖がホルモン依存性であることも報告された (Yanawaga *et al.*, *Am J Pathol* 2016)。申請者らはマウスとヒト胎盤を用いて、*Nrk* 遺伝子は既存の報告にあるマウス胎盤特有の海綿体層のみならず、母体血液と接するヒト合胞体栄養膜細胞のカウンターパートである迷路層栄養膜細胞 (Trophoblastic giant cells; TGCs, Syncytiotrophoblast; Syn-T) にも存在することを最近発見し、ヒトとマウスで保存された妊娠維持機能を担う可能性を見出した。妊娠維持から分娩への切り替えには、プロジェステロン値の急速なホルモン変化などの全身性、あるいはオキシトシンやプロスタグランなどが子宮への局所的反応の両側面が観察される。*Nrk* 遺伝子の KO マウス個体を用いて分娩遅延の表現系を解析し、ヒトとマウスの共通性、具体的にはヒト早産・出産遅延胎盤との比較を行い、妊娠維持機構の破綻により引き起こされる胎児発育不全 (FGR; fetal growth restriction) と早産の原因を追求するに至った。

2. 研究の目的

女性の社会進出が望まれる一方、適齢期に望む妊娠がなされない女性が増え、母体年齢高齢化に伴う早産や低体重児分娩などが問題となっている。この母体の妊娠維持など生殖研究は、倫理的な問題を鑑みてマウスなど実験動物を用いた *in vivo* 研究が必要不可欠であるため、モデル動物作出は実験動物分野において重要なミッションである。1978 年に世界初の試験管ベビーが誕生して 40 年、我が国の生殖補助医療 (ART) の発展は目覚ましく、2018 年には累計 65 万の体外受精児が誕生している。その数は世界一で、ART により誕生した子供は同年 5 万 7000 人で 15 人に一人となった。一方、体外受精技術の発達に対して、優良な受精胚を母体に戻しても出産成功率は未だ低く、母体の妊娠維持と分娩の仕組みに関しては不明な点が多い。また現代の社会問題である母体年齢高齢化に伴う胎児発育不全 (FGR; fetal growth restriction) については、母



体・胎盤の影響が考えられるが、その発症機構の多くも未解明である。我々がオリジナルに単離した *Nrk* (NIK ; Nck-interacting kinase-related kinase) 遺伝子の KO マウスは、胎盤肥大と分娩遅延を呈し新生仔数が極端に少ないことが報告されている。本申請では、*Nrk* KO マウス

表現系を手掛かりに、正常な妊娠維持から分娩発来への切り替え調整機構を解明する。即ち、マウスとヒト胎盤の NRK 機能を比較検討し、**妊娠から分娩へのスイッチング因子**を探索し、母体環境に焦点を当てた研究を展開する。具体的には、*Nrk* 下位分娩発来関連因子の同定 (胎盤に発現する遺伝子のプロファイリングと *Nrk* 下位候補因子の同定)、実際のヒト胎盤における定量化 (早産、正常出産、出産遅延の比較)、上記で同定した候補因子の抑制剤などを用いることで *Nrk* 欠損個体の分娩遅延に対して治療介入実験を行う。以上のように、ヒトとマウス共通の分娩誘発因子を決定し、ヒトの早産や分娩遅延の治療モデルマウスを確立することを目標とした。

3. 研究の方法

実験 1) *Nrk* 下位関連因子のトランスクリプトーム解析; (i) 18.5dpc の胎盤の迷路層 (ヒトのカウンターパート層) を用いて、*Nrk* KO・wild type の組織から RNA を単離し RNA seq によるトランスクリプトーム解析データを得ているので、その中で特に胎盤の胎児由来細胞から母体への恒常性維持に関与するペプチドホルモン (プロラクチンファミリー) にターゲットを絞り、それらの発現について詳細を検討した。即ち、*Nrk* KO 個体で 2 倍以上の発現が認められた Prolactin family 4a1, 5a1, 7a2, 7b1, 7c1, 8a1 について、8.5dpc から 18.5dpc の胎盤を用いて qPCR 並びに免疫組織化学的にその変化を確認した。(ii) 母体血液との 選択的物質交換に関与するトランスポーターや、栄養膜細胞の細胞形態変化 (細胞サイズに関与する遺伝子群) に焦点を絞り、得られたデータから GO 解析を実施した。(iii) *Nrk* KO 個体で 1/2 に減少した遺伝子のうち、Prostaglandin 関連遺伝子とその受容体に着目することで、母体側の分娩シグナル低下の可能性についても検討した。(iv) *Nrk* KO 胎盤の TGCs は組織学的に検討すると細胞レベルで明らかに発現のばらつきが観察された。また、我々はすでに子宮内膜上皮一層を分離することに成功している (Hirate *et al.*, *Sci Rep* 2016) ので、変法を用いて Trypsin-EDTA、pancreatin 酵素処理し単細胞化した細胞に関して、ナノウエルを用いたシングルセル解析を実施した (ICELL8)。 *Nrk* 発現の有無と細胞の分化レベル、局所における影響の関連性についても RNAseq と同様に詳細を明らかにした。

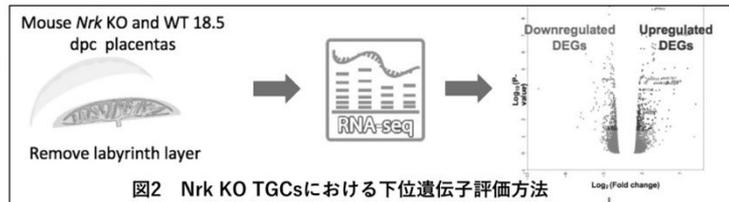
実験 2) *Nrk* 下位候補因子の動態解析; (i) *Nrk* KO 胎盤迷路層構成細胞をマーカー染色し、胎盤肥大の原因を追求した。すなわち、母体血液から TGCs (Proliferin)、Syn-T (cytokeratin 7) 2 層、胎児血液に接する血管内皮細胞 (CD31) を免疫組織化学に同定し、3 種類の二次蛍光抗体 (FITC, Cy3, Cy5) で識別し ImageJ を用いて細胞質量変化を定量化した。TGCs については、preliminary なデータであるが、*Nrk* KO では核の大きさは大きく変わらず、細胞質が膨大している像が抗 NRK 抗体染色で観察されているので、次に細胞質内の分泌顆粒の分泌や数の変化を電顕 (TEM) にて詳細に観察し定量化した。

実験 3) 実際のヒト胎盤における同システムの定量化; 国内の早産は妊娠全体の約 5% を占めると言われている。本学病理部の合併症を伴った早産胎盤の病理切片コレクションより (本学医学部倫理審査承認済) *Nrk* と実験 2), 3) で同定された候補因子について、正常、出産遅延 3 ステージとの比較検討を行う。病理部で使用されている固定方法 (4% PFA-PBS) と同様の正常サンプルを得るためにインフォームドコンセントを取得後の合併症の無い帝王切開術胎盤をコントロールとして対比した。

4. 研究成果

1) *Nrk* 下位因子トランスクリプトーム解析から得られた候補遺伝子の抽出

18.5 日齢 (dpc) の胎盤の迷路層 (ヒト Syn-T のカウンターパート) を用いた *Nrk* KO の RNA seq 解析データを実施し 258 遺伝子を抽出した。そのうち、*Nrk* キナーゼ

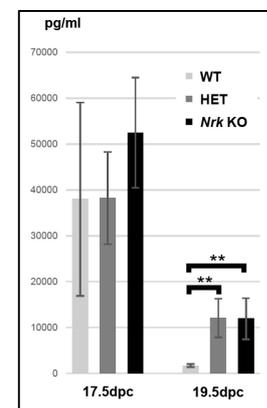


ーゼ下位遺伝子として報告されている AKT (Protein Kinase B)、PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chr10) や、妊娠高血圧症候群 (HDP)、妊娠期糖尿病 (GDM) などのキーワードで Mouse Genome Informatics (MGI; <https://www.informatics.jax.org/>) 上で関連候補遺伝子を絞り込み、特異抗体並びに RNA *in situ* hybridization など検索した。

2) マウス *Nrk* KO における分娩遅延原因因子の治療観察

Nrk 遺伝子 KO 個体では分娩直前の 19.5 dpc の血清中のプロジェステロンが十分に下がり切らないことが原因で分娩遅延となることを明らかにした (Yomogita *et al.*, *J Rep Fert* 2023; より引用右図)。

P4 antagonist である RU486 を分娩直前の 19.0 dpc で腹腔内投与し 24 時間後の 20.0 dpc に分娩遅延が改善し、正常分娩するかどうか治療を試したところ、300 µg/mouse 皮下注射にて WT 分娩が母体に影響を与えず正常分娩した。*Nrk* KO 個体 69.1% が 20.5 dpc で分娩遅延が観察されているので、その回復率を確認し、P4 が分娩遅延の直接的な原因であることを証明した。



3) 妊娠高血圧症候群 (Hypertensive Disorders of Pregnancy; HDP) ・妊娠糖尿病 (Gestational Diabetes Mellitus; GDM) のヒト胎盤における定量化

同定された候補因子について、合併症を伴った早産胎盤の本学病理部のヒト病理切片コレクションより、HDP や GDM と併発する早産と、正常ステージ胎盤における発現比較を行った (本学医学部倫理審査承認済)。病理部で使用されている固定方法 (10% 中性緩衝ホルマリン) と同様の正常サンプルを得るために合併症の無い帝王切開術胎盤をコントロールとして対比させた。現在、ヒトデータについては定量化解析を実施しており、本年度中に投稿予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroshi Yomogita, Hikaru Ito, Kento Hashimoto, Akihiko Kudo, Toshiaki Fukushima, Tsutomu Endo, Yoshikazu Hirate, Yoshihiro Akimoto, Masayuki Komada, Yoshiakira Kanai, Naoyuki Miyasaka, Masami Kanai-Azuma	4. 巻 69(巻)
2. 論文標題 A possible function of Nrk-related kinase in the labyrinth layer of delayed delivery mouse placentas.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Reprod Dev	6. 最初と最後の頁 32-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Yomogita, Naoyuki Miyasaka, Masami Kanai-Azuma	4. 巻 10(巻)
2. 論文標題 A Review of Delayed Delivery Models and the Analysis Method in Mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Dev Biol	6. 最初と最後の頁 20-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jdb10020020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蓬田裕、高峰愛幸、伊藤日加瑠、平手良和、福嶋俊明、駒田雅之、金井克晃、宮坂尚幸、金井正美
2. 発表標題 マウス、ヒト胎盤におけるNrk下流遺伝子群と分娩遅延の関連について
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平手良和、早川佳那、中野有紀、熊澤菜、三浦健人、金井克晃、金井正美
2. 発表標題 SOX17による着床初期の陰窩形成とSOX9およびAmphiregulinの発現制御
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学 疾患モデル動物解析学分野 HP
<https://www.tmd-cea.jp/eam/>

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
研究分担者	伊藤 日加瑠 (Itoh Hikaru) (50587392)	香川大学・医学部・准教授 (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------