

# 胎盤におけるオートファジー関連遺伝子 *ATG9B* の 発現とその機能の解析

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

Autophagy (AP) とは酵母からヒトまで保存されている細胞内自己食・リサイクル機構である。細胞が飢餓状態に陥った際には細胞内の膜で大規模な蛋白質分解を誘導し、エネルギーを産生すると考えられている。これまでに AP 関連蛋白 Atg が多数同定され、様々な機能を持つことがわかって来た。中でも酵母の Atg9p は最初に同定された完全な膜蛋白であり、AP において必須の蛋白である。ヒトでは *ATG9A* と *ATG9B* が酵母 *Atg9* の機能的オーソログとして同定され、*ATG9A* はヒトの各組織に幅広く発現し、*ATG9B* は胎盤 (trophoblast cell) と下垂体に特異的発現すると報告されている。更に、*ATG9B* は脊椎動物特異的遺伝子であり、哺乳類に限って急速な進化を遂げており、胎盤形成をはじめとする哺乳類特異的な発達において重大な役割を獲得している可能性が示唆されている。また、*ATG9B* は *NOS3* の anti-sense 転写物 *NOS3AS* としての機能を持つ。*NOS3AS* は二つの variant を持ち、long-variant を *ATG9B*、short-variant を *sONE* と呼ぶ。*NOS3AS* は染色体 7p36 に *NOS3* と重複して存在し、*NOS3* の post transcriptional regulation に関与すると報告されている。この *NOS3* locus は妊娠高血圧症候群 (pregnancy induced hypertension: PIH) などを含む様々な疾患との関与が指摘されている領域であり、*NOS3AS* も *NOS3* の anti-sense として機能することで PIH に関連している可能性があると考えられる。本研究では正常胎盤における *ATG9B* とその関連遺伝子の発現パターンおよび AP 活性を解析し、PIH の胎盤における結果と比較することで *ATG9B* の胎盤における生理的な機能や PIH における役割を検討した。

### 【対象と方法】

マウス: Wild type (WT) として C57BL/6 マウスを、PE モデルマウスとして p57<sup>Kip2</sup> Knockout (KO) マウスを用い、WT の雌と雄を、p57<sup>Kip2</sup> KO ヘテロマウスの雌と WT の雄を一晩 mate し、各々 13.5dpc、15.5dpc、17.5dpc に胎盤を採取した。

ヒト: 妊娠女性 131 名より分娩直後の胎盤から検体を採取した。正常妊婦 (NP) は 95 名、PIH 妊婦は 36 名であった。PIH 妊婦中、17 名は妊娠高血圧 (Gestational hypertension: GH) 妊婦、19 名が妊娠高血圧腎症 (Preeclampsia: PE) 妊婦であった。

ヒトとマウスの胎盤を用いて定量 RT-PCR 法により *ATG9A*、*ATG9B*、*NOS3*、*sONE* の発現を、Western Blotting 法により APG9B と AP 活性化の指標となる LC3-II の発現を検討した。

### 【結果】

マウス: *Atg9a* は WT と KO の両群間に有意差を認めず、妊娠週数に伴う影響を認めなかった。*Atg9b* は両群各々で週数増加に伴う発現量の増加を認め、各週数において WT より KO は高値を示した。*Nos3* は WT では週数によらず一定であったが、KO では 17.5dpc に発現量の減少を認めた。KO の *Nos3* は 13.5dpc、15.5dpc に WT より高値だったが、17.5dpc では差を認めなかった。*Atg9b* 蛋白は検出できず検討不能であった。LC3-II は週数による変化を認めず、両群間の比較でも差を認めなかった。

ヒト: NP 群の *ATG9A* と *NOS3* は発現量の変化を認めなかったが、*ATG9B* と *sONE* は週数増加

に伴い発現量が増加し、自然陣痛発来を伴う群では伴わない群より発現量が増加した。ATG9Bは週数や自然陣痛発来による影響を認めず、LC3-IIも同様であった。PIH群は自然陣痛発来を伴う症例が少なかったため、自然陣痛発来を伴わない症例のみを検討した。PIH群のATG9AとATG9B、NOS3は週数による影響を認めず、sONEのみ週数増加に伴い発現量が増加した。ATG9B・LC3-IIは週数による影響を認めなかった。自然陣痛発来のないNP群とPIH群の比較ではNOS3はNP群よりPIH群で有意に低値を示した。自然陣痛発来のないpretermのNP群とPIH群の比較ではPIH群のATG9Bの発現量はNP群より増加傾向を示し、sub-analysisでpretermのGH群単独はpretermのNP群に比し有意に高値であった。ATG9A、ATG9Bは両群間で有意差を認めなかった。LC3-IIはNP群よりPIH群で有意な高値を示した。

#### 【考察】

マウスでは妊娠週数増加に伴うAtg9b発現増加は、Atg9aとLC3-IIの発現に変化を認めず、これまで知られていたAPやNos3制御以外の生理的役割を持つ可能性が考えられる。WTと比べてKOはAtg9bの増加を認めたが、Atg9aやLC3-IIの増加を伴わず、APには関与しない可能性が示唆された。Nos3は、妊娠早期よりPE様症状が出現するKOで代償性に増加し、この代償機能が破綻することで17.5dpc頃に低下し、PEが悪化して分娩に至る可能性が考えられた。PEでは胎盤循環が障害され、低酸素状態が誘発される。低酸素状態においてはNos3asがNos3に対して抑制的に機能すると報告されている。今回、KOにおいてAtg9b上昇につれNos3低下を認めた(17.5dpc)ことから、KOの妊娠後期にAtg9bはNos3に対して抑制的に働いたと考えた。

ヒトNP群のATG9BとsONEは妊娠週数や自然陣痛発来により増加したが、ATG9B蛋白の発現量はATG9BのmRNA増加と異なり変化を認めなかった。また、ATG9AやLC3-IIの発現量の変化も伴わなかったため、ATG9BがAPの活性化に関与しない別の機能を持ち、そのために発現量が増加したと考えられる。胎盤に特異的に発現するATG9Bが妊娠週数増加や自然陣痛発来により増加したことから、妊娠維持や分娩において生理的役割を担っている可能性が考えられた。NP群のNOS3は妊娠週数や陣痛発来により変化しなかった。正常妊娠においてはATG9BとNOS3は必ずしも負の相関を示すわけではなく、ATG9BがNos3AS以外の機能を持つ可能性があると考えた。

PIH群 pretermではNP群 pretermに比べ、ATG9B上昇とNOS3低下を認め、これはマウスと同様にATG9BがNOS3ASとして機能し、NOS3の発現を抑制したと考えられる。PIH群のLC3-II増加によりAP活性化が示されたが、ATG9Bの発現上昇があるもののATG9B蛋白の上昇は観察されず、ATG9Bの発現上昇とAP活性化の関連は現時点では明らかではない。

PIH(PE)の胎盤では循環障害が起こっており、その結果として、低酸素・低栄養の飢餓ストレス状態にさらされている。この飢餓ストレス状態に対する反応としてAP活性化が起こったと推測されるが、今回のPEモデルマウスではAP活性化は観察されなかった。マウスにはヒトとは異なった飢餓ストレス状態救済機構が存在しているのかもしれない。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 水 上 尚 典

副 査 教 授 有 賀 正

副 査 教 授 田 中 伸 哉

学 位 論 文 題 名

## 胎盤におけるオートファジー関連遺伝子 *ATG9B* の 発現とその機能の解析

この論文は胎盤特異的な発現を示すオートファジー関連遺伝子遺伝子 *ATG9B* の胎盤における役割を解析したものである。

発表者は次の仮説に基づき、解析を行った。①胎盤特異的な発現を示す遺伝子である *ATG9B* は、胎盤の分化および成熟において重要な役割を果たしている可能性がある。②妊娠高血圧症候群 (pregnancy induced hypertension: PIH), 特にその1病型である妊娠高血圧腎症 (preeclampsia: PE) において、オートファジーはその1因あるいは代償機能として寄与する可能性がある。③ *NOS3* の調節因子である *NOS3AS (ATG9B)* は PE の病態において重要な役割を果たしている可能性がある。

以上より、正常胎盤における *ATG9B* とその関連遺伝子の発現パターンおよびオートファジー活性を解析し、PIHの胎盤における結果と比較することで *ATG9B* の胎盤における生理的な機能や PIH における役割を検討した。本研究ではヒトおよびマウスの二つの実験を行っている。

マウスでは妊娠週数増加に伴う *Atg9b* 発現増加を認め、オートファジーや *Nos3* 制御以外の生理的役割を持つ可能性が考えられた。WildType マウス (WT) と比べて妊娠早期より PE 様症状が出現する PE モデルマウス (KO) では *Nos3* が代償性に増加し、妊娠後期にこの代償機転が破綻することで低下する可能性が考えられた。今回、KO において *Atg9b* 上昇につれ *Nos3* 低下を認めたことから、KO の妊娠後期に *Atg9b* は *Nos3AS* として機能し、*Nos3* を抑制したと考えた。

ヒト正常妊娠 (NP) 群の解析では胎盤に特異的に発現する *ATG9B* が妊娠週数増加や自然陣痛発来により増加したことから、妊娠維持や分娩において生理的役割を担っている可能性が考えられた。PIH 群では NP 群に比べ、*ATG9B* 上昇と *NOS3* 低下を認め、これはマウスと同様に *ATG9B* が *NOS3AS* として機能し、*NOS3* の発現を抑制したと考えられる。PIH (PE) の胎盤では循環障害により低酸素・低栄養の飢餓ストレス状態が誘発される。この飢餓ストレス状態に対する反応としてオートファジーの活性化が起こると推測され、PIH 群の LC3-II 増加によりオートファジーの活性化が示された。しかし、今回の実験からは、*ATG9B* の上昇とオートファジーの活性化との関連は明らかにされなかった。

発表後、有賀教授より飢餓・飢餓ストレスについて質問があり発表者は実験系の特徴とオートファジーの仕組みについて文献を引用しながら適切に説明した。有賀教授より *ATG9B* タンパクの量とオートファジーの関連についての質問があり、一般的なオートファジー関連タンパクの働きについて例を挙げ *ATG9B* タンパクのオートファジーにおける役割を適切に説明した。また有賀教授、田中教授より妊娠高血圧のモデルマウスの意義についての質問が

あり、臨床的あるいは病理学的な表現型の類似性などを挙げ適切に説明した。有賀教授より *ATG9B* の *NOS3* 制御に関して質問があり *PIH* の一因として *NOS3* が減少することがあり、その機序は *ATG9B* (*NOS3AS*) 上昇によると考えられる点に言及しつつ適切に回答した。田中教授より病理学的検索について質問があり今回の実験系の特徴と関連づけて適切に説明した。田中教授より胎盤における具体的な作用部位に関しての質問があり *ATG9B* が特異的に発現しているトロホブラストにおける働きについて適切に回答した。田中教授、水上教授より *ATG9B* の臨床的意義について質問があり想定される意義や今後の計画も含めて適切に説明した。水上教授より作業仮説と研究結果との比較について質問があり *PIH* におけるオートファジーの活性化や *NOS3* 制御といった一致した部分と胎盤におけるオートファジーと *ATG9B* の直接の関わりを示すデータが得られなかったという一致しなかった部分を示し適切に回答した。水上教授よりマウスとヒトの実験結果の違いに関する質問があり組織採取の条件や症状発現の時期の差に起因する違いなどを考察し適切に回答した。

本研究はヒト *PIH* (*PE*) の表現型形成過程において、ヒト胎盤の検討より *ATG9B* が *NOS3AS* として機能している可能性を強く示唆し点について高く評価された。今後の *ATG9B* の生理的役割や *PIH* (*PE*) における役割解明に寄与することが期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。