

# 研究報告書

## 「マウス生殖モデルを用いた、老化が誘導する炎症メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 廣田 泰

### 1. 研究のねらい

新生児の死亡や後障害の原因となる早産は、世界で年 1500 万件、日本で年 6 万件が起こっており、医学が進歩した現代でも制御が困難である。早産の原因として細菌感染(主に腔内細菌)に伴う炎症、高年妊娠、子宮頸管の異常、遺伝体質、体外受精・胚移植の増加などの関与が示唆されており、早産はこれらの因子が複雑に絡み合った多因子疾患と考えられている。現在の治療法は子宮収縮抑制剤や抗生剤などの対症的なアプローチに限定されていて、新規療法を確立するためには早産に対する新たな視点からの基礎研究の展開が課題となっている。早産は妊娠時にのみ問題になるため「急性」炎症と考えられがちであるが、早産を研究するにあたり、加齢や体質、やせや喫煙、腔内の常在菌による感染・炎症などの因子が早産のリスクを高めていることや早産は反復しやすいことなど子宮における「慢性」的な疾患背景を有している点に着目する必要がある。本研究では、早産の病態を子宮の「慢性炎症」として捉え、本研究者が開発した子宮特異的 p53 欠損マウスを用いた自然早産モデルを用いて、細胞老化調節の鍵である p53 が子宮における慢性炎症の表現型である早産へ与える影響を観察し、細胞老化が誘導する炎症の分子メカニズムを検討することを目的とした。特に、p53 および p21 に着目し、それらの分子調節が PI3 kinase-Akt 経路や mTOR 経路などを介してどのように細胞老化を誘導するか、また細胞老化がどのように炎症を誘導するかについて検討した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究者はこれまでの研究によって、癌抑制遺伝子 p53 を子宮特異的に欠失したマウス (*Trp53<sup>loxP/loxP</sup>Pgr<sup>Cre/+</sup>*) において、妊娠初期から子宮内膜に細胞老化が起こり、妊娠の維持に重要な子宮内膜間質細胞の分化である脱落膜化が阻害されて脱落膜形成の異常が認められ、妊娠後期にはプロスタグランジン合成酵素 Cox2 および PGF2 $\alpha$  上昇が起こり、早期の子宮収縮が誘発され約半数の個体が自然早産となりそれに伴って新生仔死亡をきたすことを見出した(Hirota Y, J Clin Invest 2010)。本研究では、この新しい自然発症の早産モデルを用いて早産の病態の詳細を検討した。妊娠初期の子宮内膜を用いたプロテオミクス解析によって、p53 欠損子宮内膜では抗酸化酵素とミトコンドリアの ATP 産生に関連する蛋白の発現が低下しており、酸化ストレスやミトコンドリア機能低下が子宮内膜の細胞老化の亢進に寄与している可能性が示唆された(成果(1)-3)。次にこの早産モデルにおいて、子宮の細胞老化の存在が子宮収縮や早産の原因になっている可能性を考えた。mTORC1 阻害剤ラパマイシンの投与と p53/p21 の 2 重欠損マウスを用いた検討から、p53 欠損子宮では mTORC1 活性化が起こり p21 を介して細胞老化が誘導され、Cox2 発現が上昇し最終的に子宮収縮が起こり早産に至っていることがわかった(成果(1)-1)。ヒト早産では細菌感染を合併することが多いこと

から、p53 欠損早産マウスに LPS を投与し、早産の発症率を検討したところ、コントロールマウスでは妊娠の障害にならない量(10  $\mu$ g)の LPS によって、p53 欠損マウスでは卵巣の黄体ホルモン(プロゲステロン)産生が低下し 100%早産をきたすことが明らかとなった(成果(1)-6)。この LPS 投与による p53 欠損マウスの早産に対して、プロゲステロンとラパマイシンの同時投与によって、母体および胎仔に明らかな副作用なく早産とそれに伴う新生仔死亡を予防することができた。さらに、ヒト早産の臨床サンプルでも、子宮内膜の mTORC1 活性化や細胞老化が認められた。本研究により、早産マウスモデルで認められる細胞老化の経路がヒトの早産でも関わっていると考えられ、遺伝体質と細菌感染が相互的に作用し早産の発症を誘発している可能性が明らかになった。また、プロゲステロンと細胞老化の経路を抑制する薬剤による新しい早産予防法の可能性を見出すことができた。

本研究では細胞老化という視点で「慢性炎症」を捉えようと試みた。子宮の細胞老化の存在によって早期の子宮収縮が起こりやすくなり、細菌感染が重なることでさらに子宮収縮が促進されることが明らかとなった。この結果から、細胞老化が炎症の1つの発生母地になりうることが示された。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「p53 欠損子宮の細胞老化の誘導に関わる因子についての検討」

p53 欠損子宮とコントロール子宮の子宮内膜(脱落膜)組織を用いてプロテオミクス解析を行い、細胞老化の調節に関与する可能性のある因子を抽出した。この検討により 183 個の候補因子を同定した。この候補因子の中で、抗酸化酵素のクラスターの低下とミトコンドリア ATP 産生に関する蛋白のクラスターの低下が認められたことから、p53 欠損組織での酸化ストレス増加およびミトコンドリア機能異常の存在が推測され、これらの異常が p53 欠損組織の細胞老化の促進に関わっている可能性が示唆された(図 1、成果(1)-3)。

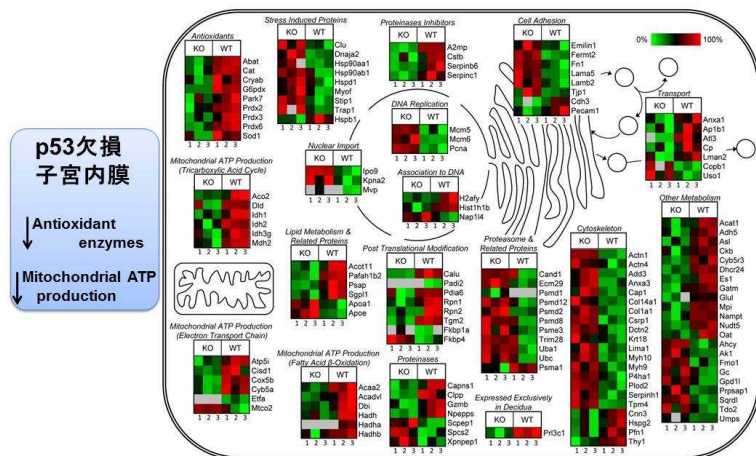


図1. 細胞老化が起こっているp53欠損子宮内膜組織を用いたプロテオミクス解析  
KO = p53欠損子宮内膜、WT = コントロール子宮内膜。緑が蛋白発現低下、赤が蛋白発現上昇

### 研究テーマ B「p53 欠損子宮における細胞老化の誘導に関わるシグナル経路の検討」

先行研究において、p53 欠損子宮における PI3 kinase-Akt 経路の活性化が示されている(Hirota Y, J Clin Invest 2010)。mammalian target of rapamycin(mTOR)経路は、Akt の下流のシグナル経路として知られているため、mammalian target of rapamycin complex 1(mTORC1)活性化の下流のシグナル因子である S6 リン酸化(pS6)を検討したところ、pS6 発現の亢進が認められ、p53 欠損子宮において mTORC1 の活性化が起こっていると考えられた。このことか

ら、早産モデルの子宮における Akt-mTORC1 経路の活性化が推測された。近年 mTOR シグナルの細胞老化への関与が指摘され、mTORC1 活性の阻害剤であるラパマイシン投与が寿命の延長に寄与する可能性も報告されていることから、この早産モデルでの mTORC1-細胞老化の経路の活性化が推測された。p53 欠損子宮の Akt および S6 のリン酸化亢進は Akt-mTORC1 経路の活性化を示唆していることから、次に mTORC1 阻害剤ラパマイシンを妊娠初期～中期にかけて子宮の p53 欠損マウスに投与し分娩の表現型を検討した。その結果、ラパマイシン投与にて p53 欠損マウスの早産が完全に抑制されることが分かった(図 2、成果(1)-1)。また、ラパマイシン処理後の妊娠後期の子宮においては、細胞老化が抑制され、さらに p21 発現および COX2 発現が抑制されていることがわかった。さらに子宮の細胞老化が早産の誘因である可能性を示すために、子宮の p53 欠損マウスを用いた早産モデルを応用し、細胞老化の極めて重要な調節因子である p21 発現が p53 欠損子宮で上昇していることから、子宮の p53 欠損に加えて p21 欠損を伴うマウス (*Trp53<sup>loxP/loxP</sup>Pgr<sup>Cre/+</sup>Cdkn1a<sup>-/-</sup>*) を作成し、p21 上昇に伴う子宮の細胞老化を抑制した場合に得られる分娩の表現型について解析した。興味深いことに、早産の表現型が p21 欠損によって改善され、p53/p21 の 2 重欠損マウスでは早産が完全に抑制された(成果(1)-1)。以上の結果から、p53 欠損マウスの子宮内膜(脱落膜)における

Akt-mTORC1-p21-細胞老化-COX2-PGF2 $\alpha$  という経路が早産発症に関わっていることが推測された。さらにはヒト早産の子宮内膜(脱落膜)組織においても、細胞老化および mTORC1 が子宮内膜で陽性となっており(成果(1)-6)、ヒト早産においてこれらの経路の活性化が起こっている可能性が示唆された。

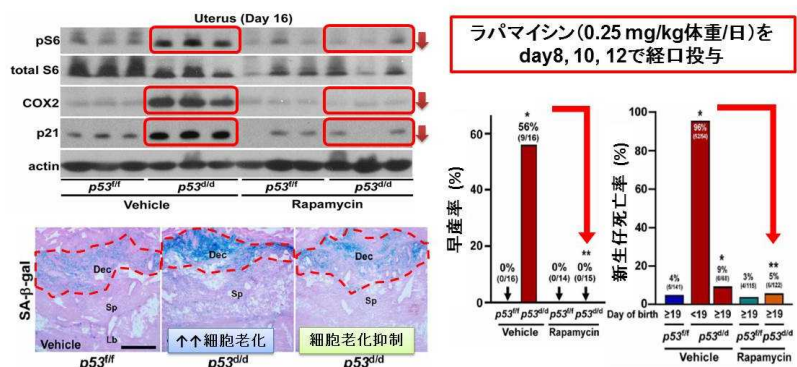


図2. p53欠損の自然早産マウスモデルに対するmTORC1阻害剤ラパマイシン投与効果  
p53<sup>del/del</sup> = p53欠損マウス、p53<sup>fl/fl</sup> = コントロールマウス。  
ラパマイシン投与により、p53欠損マウスの細胞老化と自然早産が抑制される。

### 研究テーマC「子宮の p53 欠損マウス早産モデルにおける、LPS 誘導性炎症による早産への影響について」

ヒト早産では子宮内の細菌感染・炎症を合併することが多いことから、早産子宮における細菌感染に対する感受性の低下が示唆される。子宮における細胞老化の存在が、細菌感染による早産のリスクを高めているという仮説のもと、細菌感染のモデルとして LPS 投与実験を行った。その結果、コントロールでは妊娠の障害にならない量 10  $\mu$ g の LPS を腹腔内投与によって、子宮の p53 欠損マウスでは 100%早産をきたすことが明らかとなった(成果(1)-6)。LPS による早産発症促進のメカニズムとして、脱落膜形成不全を介した子宮内膜由来の卵巣保護因子分泌の低下によって卵巣の LPS 感受性が高まり、卵巣の黄体ホルモン(プロゲステロン)代謝酵素 20 $\alpha$ -HSD が上昇して血中のプロゲステロン濃度が低下し、最終的に子宮収縮に関わる子宮収縮関連蛋白群の発現が高まり、早産が促進されている可能性が考えられた(図

### 3. 成果(1)–(6)。

この研究結果は、感染などによる軽度の炎症が環境因子として存在した場合に、遺伝的異常をもつ個体は早産をきたしてしまう可能性を示している。本研究により、遺伝的因子と環境因子が協調して早産

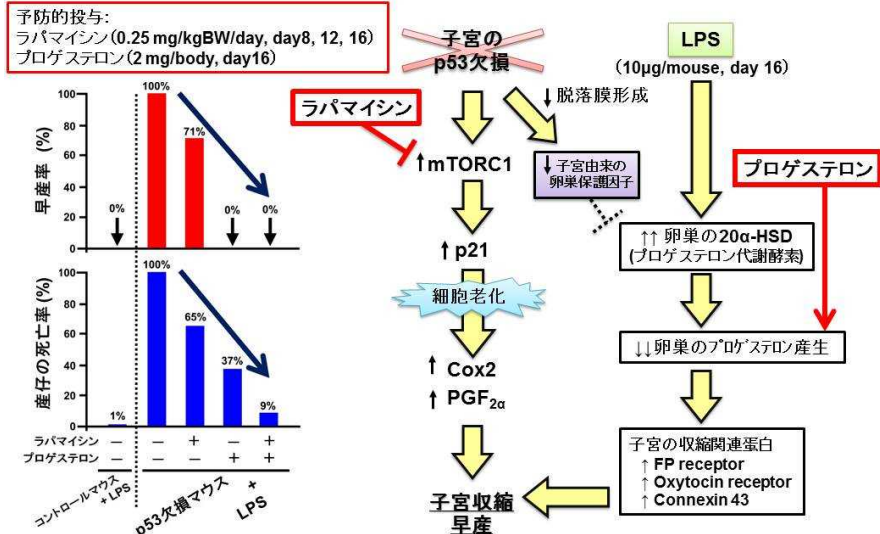


図3. p53欠損マウスへのLPS投与による早産モデルにおける早産の機序  
ラパマイシンおよびプロゲステロンの同時投与により、p53欠損マウスの早産が抑制される。

が高率に発症する可能性を示すことができた。疫学的にはヒトの早産は反復しやすいこと知られているが、「遺伝–環境の相互作用の早産への寄与」という概念によって、この反復早産の原因の1つを説明できるのかもしれない。

さらに本研究では、LPS 投与による子宮の p53 欠損マウスの早産に対して、黄体ホルモンであるプロゲステロンと免疫抑制剤として知られる mTORC1 阻害剤ラパマイシンの同時投与によって、母体および胎仔に明らかな副作用なくその早産を防止することができた(成果(1)–(6))。プロゲステロン投与は LPS による卵巣と子宮内膜におけるプロゲステロン代謝酵素 20α-HSD 誘導、局所および全身のプロゲステロン濃度低下を補うものであり、ラパマイシン投与は子宮内膜に作用し p53 欠損–mTORC1–細胞老化の経路を抑制した。さらには、ヒトの早産検体においても子宮内膜の細胞老化、mTORC1 活性の増加が認められ、ヒト子宮内膜細胞の初代培養系では、LPSによる炎症性サイトカイン IL-6 および IL-8 の分泌増加をプロゲステロンおよびラパマイシンが抑制することが示された。このように、プロゲステロンおよびラパマイシンの作用が協調的に早産を抑制する可能性が考えられた。早産既往や子宮頸管短縮などの早産のハイリスク女性に対する今後の早産の予防・治療法の確立に向けて、本研究の成果は有益な基礎的知見である。

### 3. 今後の展開

本研究は、細胞老化と炎症との関連性を示唆する研究結果である。老化細胞が炎症刺激に反応して炎症を増幅しやすい性質をもつことが明らかとなった(susceptibility to inflammation)。加齢が細胞老化を増加させることが知られており、老化細胞が炎症をおこすことで様々な疾患の病因・病態に関わっている可能性が明らかとなった。この老化細胞の性質については、癌や動脈硬化など、加齢によって増加する疾患の病因・病態との関連が考えられ、各分野での今後の研究の進展が期待される。

また、本研究によって早産が遺伝体質と環境の組み合わせによって起こっていることが証明できた。早産が多因子によって起こっていることが早産研究を難しくしている原因の1つであったが、今後早産関連の遺伝子などが最新の遺伝子解析などで判明してくれば、早産のハイリスク

群が遺伝学的に抽出することができるようになる。臨床的なハイリスク群と合わせて、それらのハイリスクの女性たちに対してプロゲステロン投与などによる環境因子の改善による早産の予防を進めることにより、臨床的に早産を減らすことが可能となる可能性が考えられる。また、早産の環境因子の改善方法としてプロゲステロンの存在が明らかとなったが、欧米では既にプロゲステロン製剤が積極的に早産の予防に使用されつつある。今後の日本での臨床治験によるデータ蓄積が期待される。

本研究の成果により、子宮の細胞老化が早産の発症に関わる可能性があることから、今後はその誘導経路を押さえる治療法の開発が期待される。本研究では、過去の動物実験の報告において胎児毒性が認められない低濃度のラパマイシンを使用しているとはいえ、高濃度の使用の場合の胎児毒性が報告されている。また妊娠中の薬物投与の胎児への影響を考慮すると、細胞老化をターゲットとした新規治療薬の開発・臨床応用は非常に難しい面がある。しかしながら、妊娠中に使用可能とされる、胎児毒性がないと考えられている既存の薬物を用いて細胞老化経路を押さえる治療法を見出すことができれば、今後の臨床応用が十分に期待できる。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

本研究では細胞老化という視点で「慢性炎症」を捉えようと試みた。その成果として、妊娠初期から存在する子宮の細胞老化の存在が、妊娠の最後に早産という形で炎症に促進的に関わっている可能性が明らかとなり、細胞老化が炎症の1つの発生母地になりうることを示すことができた。さらには、細胞老化経路をターゲットとした早産の新規予防法の可能性を示し、今後の臨床応用の可能性を見出すことができた。また本研究により、妊娠子宮という生理的に存在する細胞老化を観察できる生体モデルを確立し、細胞老化の発生から除去に至る一連の機構を解析することが可能となったが、今後このモデルを用いて老化細胞の除去機構の破綻と慢性炎症という新しい病態概念についての解析が可能になったという点は今後の発展性の期待できる成果といえる。今後も本研究の成果を生かして、細胞老化と炎症という観点から、臨床医学と基礎医科学の両者の発展に貢献できるように研究をさらに進めていきたいと考えている。

##### (2) 研究総括評価(公開項目)

独自に開発した子宮特異的 p53 欠損マウスを用いた早産モデルの解析から、母体側の子宮における Akt-mTORC1 経路の活性化を介した細胞老化-炎症が早産を引き起こし、また細菌感染に伴う子宮内におけるプロゲステロン濃度の低下(妊娠維持能力の低下)によりその早産がさらに促進されることを示し、治療の試みとして mTORC1 阻害剤投与とプロゲステロンの補充療法が有効であることを実験的に証明し論文報告した。当該臨床領域における基礎研究は必ずしも進んでおらず、本研究の質の高い成果は科学的に高く評価されると同時に、社会的にもインパクトがあるものとする。今後は、本研究で見出した早産の原因となるメカニズムが、早産の発生において想定されるその他の母体側因子や環境因子でも働いているものなのかの追及・証明、さらには臨床応用に向けた研究の前進が大いに期待できる。

#### 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Hirota Y**, Cha J, Yoshie M, Daikoku T, Dey SK. Heightened uterine mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling provokes preterm birth in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2011, 108(44), 18073–18078.
2. Daikoku T, Cha J, Sun X, Tranguch S, Xie H, Fujita T, **Hirota Y**, Lydon J, DeMayo F, Maxson R, Dey SK. Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity. **Dev Cell**. 2011, 21(6), 1014–1025.
3. \*Burnum KE, \***Hirota Y**, \*Baker ES, Yoshie M, Ibrahim YM, Monroe ME, Anderson GA, Smith RD, Daikoku T, Dey SK (\*, **equal contribution**). Uterine deletion of Trp53 compromises antioxidant responses in the mouse decidua. **Endocrinology**. 2012, 153(9), 4568–4579.
4. Cha J, **Hirota Y**, Dey SK. Sensing senescence in preterm birth. **Cell Cycle**. 2012, 11(2), 205–206.
5. **Hirota Y**, Burnum KE, Acar N, Rabinovich GA, Daikoku T, Dey SK. Galectin-1 markedly reduces the incidence of resorptions in mice missing immunophilin FKBP52. **Endocrinology**. 2012, 153(5), 2486–2493.
6. Cha J, Bartos A, Egashira M, Haraguchi H, Saito-Fujita T, Leishman E, Bradshaw H, Dey SK, **Hirota Y**. Combinatory approaches prevent preterm birth profoundly exacerbated by gene-environment interactions. **J Clin Invest**. 2013, 98(4), 1583–1590.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. **廣田泰**. 子宮の p53 による分娩調節とその機序. **第 30 回内分泌代謝学サマーセミナー**, 伊香保, 2012 年 7 月 13 日.
2. **Hirota Y**. Defective decidualization with cellular senescence and its outcome. **The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility**, Kobe, November 14, 2013.
3. **廣田泰**. 細胞老化シグナルを介した早産の発生機構に着目した新しい治療アプローチについての提案. **第 41 回日本臨床免疫学会**, 下関, 2013 年 11 月 28 日.

受賞

1. **第 12 回日本内分泌学会若手研究奨励賞**. 2011 年 4 月 23 日.
2. **第 56 回日本生殖医学会学術奨励賞**. 2011 年 12 月 8 日.
3. **平成 23 年度東京都医師会医学研究賞奨励賞**. 2012 年 1 月 27 日.
4. **第 64 回日本産科婦人科学会優秀演題賞**. 2012 年 4 月 15 日.
5. **第 19 回日本炎症・再生医学会奨励賞**. 2013 年 7 月 2 日.
6. **第 65 回日本産科婦人科学会優秀演題賞**. 2013 年 5 月 12 日.

プレスリリース

1. 母体の体質と感染・炎症の相互作用で、早産が起きる仕組みを発見—新しい早産予防の糸口. <http://www.jst.go.jp/pr/info/info977/index.html>, 2013 年 8 月 28 日.