

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 10 年度博士課程入学

氏名: 巖軍麗

指導教官: 塩田邦郎

論文題目

Study on the Role of Retinoic Acid Signaling in the Placental Development
(胎盤発生におけるレチノイン酸シグナルの機能に関する研究)

緒言

胎盤は哺乳類の胚発生において最初に形成される臓器のひとつである。胎盤の大部分を構成する栄養膜細胞は受精卵に由来する細胞で、いくつかのサブタイプに分化したそれらが胎盤の主要な機能を担う。遺伝的要因、および、母体側の環境要因は栄養膜細胞の発生・分化に影響を及ぼし、胎盤機能の欠陥と、それによる胎児の成長遅延や胎児死を引き起こす。近年、マウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) 株が樹立されたが、この細胞は *in vitro* ですべての栄養膜細胞サブタイプ、すなわち栄養膜巨細胞、海綿状栄養膜細胞、および迷路部栄養膜細胞に分化できることが示されている。また、TS 細胞はキメラ形成能を有し、*in vivo* で胎盤構築に寄与することができるが、胎児の体細胞および生殖細胞には分化しない。これらの性質から、TS 細胞は胎盤形成過程における栄養膜細胞の増殖・分化制御機構を解析するための有用なツールとして用いられている。

核内受容体スーパーファミリーには、甲状腺ホルモン、ステロイドホルモン、レチノイド、ビタミン D などの受容体、および、その内在性リガンドがまだ同定されていない、いわゆるオーファン受容体が含まれる。これらの核内受容体は、胚発生、細胞分化、代謝調節、恒常性の維持などにおいて様々な重要な役割を果たしているこ

とが明らかになっているが、胎盤発生における役割に関する知見は未だに非常に乏しい。核内受容体スーパーファミリーのうち、レチノイン酸に対する各種受容体の遺伝子がマウス胎盤で部位特異的に発現されている。このことなどから、胎盤の発生と機能の制御にレチノイン酸シグナルが関与する可能性が示唆されているが、既存のレチノイン酸受容体である RAR のノックアウトマウスでは胎盤形成に異常は見られず、胎盤発生過程にレチノイン酸シグナルがどのように関与しているのかは、未だ謎である。

そこで本研究では、*in vitro* と *in vivo* におけるレチノイン酸シグナルの影響を、TS 細胞と生体内の胎盤について解析を行った。ここで得られた結果は、レチノイン酸シグナルが栄養膜細胞の分化方向の決定に影響を及ぼすこと、またレチノイン酸代謝酵素である CYP26A1 が栄養膜幹細胞の維持に働いていることを強く示唆する。これらの結果をもとに、レチノイン酸の作用・代謝経路およびその胎盤形成における重要性について述べる。

第1章 TS 細胞における核内受容体の発現

エストロゲン及びプロゲステロンは胚発生、特に胚の着床に重要な役割を担うが、胎盤での働きについては結論が出ていない。ここでは、TS 細胞におけるエストロゲン受容体 (ER α 、ER β)、およびプロゲステロン受容体 (PR) の発現を RT-PCR 法を用いて調べ、これらが TS 細胞では発現されていないことを確認した。一方、各種オーファン受容体が胚発生に重要な役割を果たしていることから、これらが栄養膜細胞系列の中でどのような働きをしているか調べるために、GCNF、TR2、COUP-TFII、Rev-Erb、ROR の TS 細胞における発現を調べた。その結果、それぞれが TS 細胞に発現しており、TS 細胞の増殖・分化条件においてさまざまな発現パターンを示すことがわかった。これらのことから、オーファン受容体が栄養膜細胞系列の発生過程でも何らかの役割を果たしていることが推測された。

第2章 レチノイン酸は栄養膜細胞を栄養膜巨細胞に分化させる

前章において TS 細胞での発現が認められたオーファン受容体のほとんどは、

レチノイン酸受容体との相互作用などを介し、レチノイン酸シグナルおよびそれによる遺伝子発現の制御にも関与していることが知られている。そこで、レチノイン酸が胎盤形成に与える影響を解明するために、TS 細胞の増殖および分化に対するレチノイン酸の作用を解析すると同時に、レチノイン酸を投与し、外胎盤錐 (ectoplacental cone) の発生への影響を解析した。

通常の培養下では、TS 細胞は RAR β を除く全てのレチノイン酸受容体のサブタイプを発現していた。また、RAR β の発現も、培養液中にレチノイン酸を添加することによって誘導されることがわかった。FGF4 と胎児繊維芽細胞培養上清 (EMFI-CM) の除去によっておこる、TS 細胞の各種栄養膜細胞サブタイプへの分化において、レチノイン酸は、海綿状栄養膜細胞の分化を抑制すると同時に、栄養膜巨細胞への分化を促進することがわかった。さらに、妊娠中のレチノイン酸投与 (妊娠 6.5 および 7.5 日の二回投与) の結果でも栄養膜巨細胞の過形成と、海綿状栄養膜細胞の減少が見られた。これらから、レチノイン酸は細胞外シグナル因子として働き、栄養膜細胞の細胞運命の決定に関与することが考えられる。母体側の子宮脱落膜細胞がレチノイン酸産生能を持つことと、栄養膜巨細胞がこの脱落膜細胞に接する位置に局在することを併せて考えると、本研究によって得られた結果は、レチノイン酸が栄養膜巨細胞の分化を促す生体内位置情報として作用していることを示唆する。

第3章 栄養膜幹細胞におけるレチノイン酸シグナルの負の制御

TS 細胞の培養系では、レチノイン酸が FGF4 と EMFI-CM の分化抑制/増殖促進作用に拮抗する作用を及ぼすことが分かった。このことは、生体内での胎盤形成時には、内在性レチノイン酸の局在が厳しく制御されていることが必要であることを示す。レチノイン酸の不活化酵素である CYP26A1 は不必要なレチノイン酸シグナルから胚細胞を守る働きがあると言われている。興味深いことに、CYP26A1 は原始内胚葉層に加え、栄養膜幹細胞集団が局在すると考えられている胚体外外胚葉で特異的に発現している。また、CYP26A1 は未分化条件下の TS 細胞のみで発現しており、FGF4 と EMFI-CM の除去後 12 時間で発現は失われる。この急激な発現の消失は、CYP26

の発現が他の栄養膜幹細胞特異的遺伝子と比べても、よりその幹細胞条件と密接に関わっていることを示す。さらに、ノックアウトマウスの解析から、CYP26A1 の欠損は巨細胞過形成を伴う胎盤形成初期の異常につながるということが明らかとなった。これらの結果は、CYP26A1 が栄養膜幹細胞の早発的な分化を防ぐという新しい役割を示すものである。胚体外外胚葉に CYP26A1 の発現が必要なことは、栄養膜幹細胞の維持条件として、FGF4 の存在とレチノイン酸の不在の双方が必要であることを示唆している。

総括

本研究は、レチノイン酸が胎盤細胞の分化に影響を与え、その一方でレチノイン酸代謝酵素 CYP26A1 が栄養膜幹細胞の維持に働いていることを明らかにし、レチノイン酸の作用と代謝機構が胎盤形成に重要であることを示した最初の報告である。

レチノイン酸は栄養膜細胞を巨細胞側へ分化誘導する。この結果は、生体内における栄養膜巨細胞とレチノイン酸産生部位の局在、さらにレチノイン酸受容体の発現部位を併せ考えて、レチノイン酸が、栄養膜巨細胞が胎盤辺縁部で形成されるための位置情報として働く可能性を示唆する。ビタミン A 欠損ラットの胎児死と胎盤異常についての報告があるが、レチノイン酸産生の欠如が巨細胞形成に影響を与えうることから、大変興味深い現象であるといえる。

レチノイン酸の不活化酵素として、CYP26A1 は後脳のパターン形成、脊椎骨の identity の獲得、及び体後部の発生に重要である。さらに、組織・細胞によって様々な細胞分化制御における役割が報告されている。栄養膜細胞における CYP26A1 の役割はここで初めて示されるものである。CYP26A1 欠損マウスは栄養膜幹細胞の維持に働く *Errβ* や *Fgf2r* の変異体に似た異常を示す。このことから、やはり栄養膜幹細胞の維持には、適切な増殖因子による分化抑制／増殖促進機構と、レチノイン酸による分化促進作用からの防御機構が、同時に必要であることがいえるだろう。本研究は、胎盤発生におけるレチノイン酸シグナルの役割とその重要性に新たな知見を与えるものである。