

論文の内容の要旨

論文題目 マウス胎盤形成におけるビタミンEと -tocopherol transfer proteinの機能解析

氏名 寺社下 浩一

はじめに

ビタミンEは、1922年にラットの妊娠に必要な食事因子として見出され、その経緯から別名 Tocopherol (「Tocos」はギリシャ語で「子供を産む」、「Phero」は「力を与える」という意味、以下 toc) と命名されている。しかしながら、命名の由来である抗不妊因子としての作用機構や関連分子は不明なことが多い。-tocopherol transfer protein (-TTP) は、神経疾患を呈する先天性ビタミンE欠乏症の原因遺伝子であるが、肝臓において -toc と特異的に結合し血中 -toc 濃度を規定する分子と考えられている。そこで本研究では、-Ttp 遺伝子欠損マウスを作製し、先天性ビタミンE欠乏症のモデル動物を樹立すると共に、-Ttp 遺伝子の機能とビタミンEの役割について検討した。

1. -Ttpノックアウトマウスの樹立

-Ttp 遺伝子の第一エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換したジーンターゲティングベクターを構築した。そして、そのベクターをES細胞に導入し、-Ttp 遺伝子が欠損したES細胞を得た後、-Ttp ノックアウトマウスを樹立した。ヘテロ欠損マウス同士の交配からは、野生型、ヘテロそしてホモ欠損マウスの産仔が、メンデルの法則どおり 1:2:1 の割合で得られた。

2. -Ttpノックアウトマウスの肝臓における -Ttpの発現量と血中 -tocopherol濃度の解析

-Ttp が、血中 -toc 濃度を規定する分子であることを証明するため、作製した -Ttp ノックアウトマウスの肝臓における -Ttp の発現量と血中 -toc 濃度を測定した。その結果、ホモ欠損マウスにおいては -Ttp の mRNA が検出されず、ヘテロ欠損マウスでは野生型の約半

分の発現量であった。血中 α -toc 濃度は、日本クレア製 CE-2 食 (α -toc 濃度 45 mg/kg) を給餌したマウスより採取した血漿を用いた。その結果、ホモ欠損マウスの血中 α -toc 濃度は検出限界以下であり、ヘテロ欠損マウスの血中 α -Toc は、野生型の約半分の濃度であった。この結果から、肝臓における α -Ttp の発現量が循環中の α -toc 濃度を制御していることが判明した。

以上のことから、 α -Ttp ノックアウトマウスは、ビタミン E の生理機能の解明に利用できる有用なモデル動物になると思われる。

3. α -Ttp ノックアウトマウスの繁殖能の解析

ホモ欠損マウスの繁殖能について検討を実施した。その結果、オスのホモ欠損マウスは繁殖能を保持していたが、メスのホモ欠損マウスにおいては、野生型のオスマウスと交配した場合でも、胎仔は神経管の奇形を呈し、交尾後 10.5~11.5 日目に死亡した。そして死亡した胎仔の胎盤は、labyrinthine trophoblasts の形成不全を呈していた。この胎仔の死亡が、ホモ欠損メスから排卵された卵子に起因しているのか、それともそれ以外の母体側の要因で起こるのかを確認するために、ホモ欠損の受精卵を、野生型のレシピエントメスの卵管に移植した。その結果、ホモ受精卵は正常に発生することができた。一方、野生型の受精卵をホモ欠損のレシピエントメスの卵管に移植したところ、胎仔は妊娠中期に死亡した。これらの結果から、胎仔の死亡は、排卵以降の母体側に原因があることが明らかとなった。

4. 胎仔、胎盤そして子宮における α -Ttp の発現

ホモ欠損マウス子宮内において胎仔が死亡することを受け、子宮、胎盤、そして胎仔における α -Ttp の発現について検討を行った。その結果、子宮における α -Ttp の発現は、着床直後に上昇し、その後分娩時にかけて発現量が緩やかに減少していくことを観察した。胎仔では、発生が進むにつれて、 α -Ttp の発現量が上昇していくことが観察された。一方で、ホモ欠損マウス子宮内で異常が見られた胎盤では、 α -Ttp の発現は、検出されなかった。これらの結果から、 α -Ttp は、肝臓において α -toc を全身に輸送する働きをしている一方で、子宮においても胚の着床に呼応するように発現量を増し、胎盤側に α -toc を輸送する働きをしていると考えられた。

5. α -tocopherol 過剰食あるいは抗酸化剤による α -Ttp ノックアウトマウスの不妊治療

ホモ欠損マウスのビタミン E 欠乏状態を治療すべく、 α -toc 過剰食を給餌し、血中の α -toc 濃度を上昇させることができるかどうか検討を行った。CE-2 食を給餌していたホモ欠損マウスに、 α -toc 過剰食 (α -toc 濃度 819mg/kg) を給餌し、血中 α -toc 濃度の変化を解析した。その結果、CE-2 給餌時は検出限界以下であった血中 α -toc 濃度が、 α -toc 過剰食給餌後 24 時間で約 150 μ g/dl の濃度まで上昇することが分かった。この濃度は、ヘテロ欠損マウスに CE-2 を給餌した場合とほぼ同等であった。 α -toc 過剰食を給餌した後に、再度 CE-2 食給餌に変更すると、血中 α -toc 濃度は、変更後 8 時間で約 50% まで減少した。このことから、 α -toc 過剰食と CE-2 食とを給餌仕分けることにより、ホモ欠損マウスの血中 α -toc 濃度を調整できることが明らかとなった。

次に、この α -toc 過剰食を給餌することにより、ホモ欠損メスマウスの不妊を治療できるかどうか検討した。また、 α -toc とは別の脂溶性抗酸化剤として B0-653 (中外製薬合成品)

も、CE-2 に混在させ給餌した。その結果、 α -toc 過剰食と B0-653 添加食のどちらを給餌した場合も、ホモ欠損メスマウスから正常に産仔が得られ、不妊の治療に成功することができた。

α -toc 過剰食だけでなく、抗酸化剤摂取によっても不妊が治療できたことから、ビタミン E 欠乏による胎仔の死亡の原因は、酸化ストレスによることが示唆された。

6 . 胚発生にとって α -tocopherol が必要な時期の検討

胚発生にとってどの期間 α -toc が必要か検討を行うために、ホモ欠損マウスに、妊娠中の特定期間のみ α -toc 過剰食を給餌し、胚が正常に分娩時まで発育するかどうか観察した。その結果、ホモ欠損マウス子宮内の胎仔の発生には、交尾後 6.5 日目から 13.5 日目までの α -toc 過剰食給餌が必須であり、6.5 日前と 13.5 日後は不要であった。マウスの胎盤形成は、交尾後 6.5 日目より開始され、交尾後 13.5 日目に成熟することが報告されている。この胎盤形成期間と α -toc 必須期間が完全に一致していたことから、 α -toc は胎盤形成にとって必要であることが推測された。

7 . α -Ttp ノックアウトマウス胎仔の血中 α -tocopherol 濃度の解析

胎仔そのもの発生にとって α -toc が必須かどうか検討するために、ホモ欠損胎仔の血中 α -toc 濃度の測定を行った。その結果、ホモ欠損胎仔は正常に発生していたが、血中 α -toc 濃度は検出限界以下であった。そして、野生型胎仔の血中 α -toc 濃度も、検出はされるものの成体の野生型マウスの血中濃度の約 5% 程度と非常に低かった。これらの結果から、胎仔の発生そのものには、 α -toc が必須でないことが示唆された。

8 . 胎盤形成・維持にとって α -tocopherol を必要としている部位（細胞）の検討

α -toc が胎仔の発生そのものより胎盤形成にとって必要不可欠であることが示唆されたため、次に、胎盤のどの細胞にとって α -toc が必要なのか検討を加えた。すなわち、ホモ欠損メスマウスに、交尾後 11.5 日目まで α -toc 過剰食を給餌することにより胎盤を形成させ、その後 CE-2 給餌に変え母体の血中 α -toc 濃度を低下させ、胎盤のどの細胞が最初に影響を受けるのかを観察した。その結果、胎仔が生存している段階において最初に異常が観察されたのは、胎盤の labyrinthine region の第 2, 3 層にある一部の syncytiotrophoblast 細胞の necrosis 像であった。そして、胎仔が死亡している段階になると、ほとんどの syncytiotrophoblast 細胞の necrosis と胎仔側血管内皮の necrosis が観察された。しかし一方で、labyrinthine region の第 1 層は残存し、母体側血管は腔の狭小化は見られるものの残存はしていた。その他に異常は見られなかった。以上の結果から、 α -toc 欠乏による胎仔の死亡は、胎盤形成不全、特に syncytiotrophoblast の necrosis が原因であることが示唆された。

最後に

これまで α -toc 欠乏による胎仔の死亡が、胎仔側と母体側のどちらに起因があるのか、更に胎盤と胎仔のどちらに起因があるのか、を見分ける方法がなかった。本研究により、 α -toc は胎仔そのものの発生には必須でなく、胎盤の形成、特に syncytiotrophoblast の維持・機能に抗酸化ストレス剤として重要な働きをしていることを明らかにすることができた。胎盤における酸化ストレスは、syncytiotrophoblast 細胞の胎盤性ホルモンの産生等の機能が、酸化ストレス

の発生源となっているのか、あるいは多くの lipid droplet が細胞質中に存在しているこの細胞の特性が、酸化脂質の影響を受けやすいのだと考えられる。

-*Ttp* 遺伝子欠損マウスの不妊は、*-toc* の過剰摂取で血中の *-toc* 濃度を正常域に上げることにより治療可能だが、自然の食物でこの濃度を確保するためには、ビタミン E 含有量が高い豆類を摂取するとしても、1 日当り体重の 30% 量以上を摂取しなければならない。したがって、*-Ttp* 遺伝子を保有していなければ、有胎盤類の繁殖・繁栄は困難であったと思われる。