

## 論文内容の要旨

申請者氏名 Hasan, Md. Zobaer

HtrA はセリンプロテアーゼのファミリーで、セリンプロテアーゼドメインとその後ろに 1 つまたは 2 つの PDZ ドメインを共通して持つ。哺乳類には HtrA1-4 の 4 つのファミリータンパク質が存在し、そのうち HtrA2 はミトコンドリア内に存在するが、他の 3 つは細胞外に分泌される。HtrA4 の発現は限られた組織に限局するが、HtrA1 と HtrA3 は広範な組織で発現し、特に着床後の胎盤で最も強く発現する。最近、妊娠性高血圧症（子癩前症、妊娠中毒症、preeclampsia）の患者の血液中で HtrA1 と HtrA3 の量が増加することが報告され、胎盤における HtrA1 と HtrA3 の生理的・病的状態での機能に注目が集まっている。申請者は、申請者の研究室で樹立された HtrA1 と HtrA3 の遺伝子破壊 (KO) マウス (HtrA1<sup>-/-</sup> 及び HtrA3<sup>-/-</sup>)、およびそれを掛けあわせて作った HtrA1 と HtrA3 の二重遺伝子破壊 (DKO) マウス (HtrA1/3<sup>-/-</sup>) を解析して、HtrA1 と HtrA3 の胎盤における機能を解析した。

まず、ホモの遺伝子破壊マウス同士を掛け合わせて生まれてくる仔を観察したところ、HtrA1<sup>-/-</sup>、HtrA3<sup>-/-</sup>、HtrA1/3<sup>-/-</sup> マウスともに野生型に比べて出生直後の体重が有意に軽く、体重の有意差はそれぞれ、2、3、5 週間持続したのち解消した。また、HtrA1/3<sup>-/-</sup> マウスでは、妊娠の後期に血圧の上昇が観察された。これら 3 種の KO マウスの胎生 10.5 日目の胎児及び胎盤はいずれも小さく、胎盤の形成異常が胎児や出生仔の低体重を引き起こすことが強く示唆された。10.5 日目の胎盤では、胎盤結合部と迷路胎盤と呼ばれる胎児に由来する胎盤組織が特に小さくなっており、迷路胎盤内では胎児の血管と母親由来の洞様血管のいずれも発育の異常を示した。

そこで、申請者は着床から妊娠後期までの HtrA1 と HtrA3 の胎盤での発現を *in situ hybridization* で詳細に調べた。その結果、HtrA1 は胎生 7.5 日目から、胎児性組織が子宮壁内に進入する先端となる胎盤外円錐の栄養膜細胞、および母親の細胞由来の被包脱落膜で発現していた。一方、HtrA3 は胎児由来の胎盤組織では発現せず、HtrA1 よりやや遅れて胎生 8.5 日目の母親由来の被包脱落膜及び基底脱落膜で発現していることを明らかにした。

申請者は、HtrA1 が、胎盤内の多くの栄養膜細胞の前駆細胞となる胎盤外円錐の栄養膜細胞に発現することに注目し、栄養膜細胞の様々な細胞系列の分化を特異的なプローブを用いた *in situ hybridization* で分析した。その結果、Tpbpa (trophoblast specific protein  $\alpha$ ) 陽性の前駆体栄養膜細胞が減少し、それに由来するグリコーゲン栄養膜細胞と海綿栄養膜細胞数も減少していた。また、多数のグリコーゲン栄養膜細胞が迷路胎盤内に残存していた。これらが、胎盤結合部が小さくなる原因と考えられる。さらに、Tpbpa 陽性前駆体細胞に由来するらせん動脈結合栄養膜細胞の脱落膜内への浸潤が阻害され、母親血管のらせん動脈化が阻害されていた。らせん動脈化の異常と大量のグリコーゲン栄養膜細胞が残存することが 2 次的に迷路胎盤の発育を阻害し、胎児と母親由来の血液管の発育不全を引き起こしていると結論した。

このような HtrA KO マウスで見られる組織学的異常は、これまでに樹立された妊娠性高血圧症のモデルマウスの異常と類似していた。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Hasan, Md. Zobaer

妊娠性高血圧症（あるいは妊娠性高血圧腎症）は妊娠の 3~7%に見られ、新生児の体重の低下や時に母体の死を引き起こす重要な疾患である。主要な原因は、胎児の栄養膜細胞が誘導する母親血管の再構築に異常が生じ、胎盤内での胎児と母親からの血管が十分に近接して配置されないことに由来する、胎児への栄養と酸素の供給不足と考えられている。最近、この疾患の母体の血液中や胎盤組織で HtrA1 や HtrA3 のレベルの異常(上昇または低下)が相次いで報告され、HtrA と胎盤の発育との関連に注目が集まっている。

申請者は、申請者の研究室で樹立された HtrA1<sup>-/-</sup>、HtrA3<sup>-/-</sup>、及び HtrA1/3<sup>-/-</sup>の 3 種の遺伝子破壊マウスから得られる胎盤を分析して、HtrA1 と HtrA3 の胎盤形成における役割の一端を明らかにした。

HtrA1 は胎盤形成の初期に、胎盤外円錐に存在して様々な栄養膜細胞の先駆体細胞となる Tpbpa 陽性細胞が HtrA1 を発現していることを発見した。HtrA 遺伝子破壊マウスでは、Tpbpa 陽性細胞数が減少し、さらにこの Tpbpa 細胞から分化する海綿栄養膜細胞とグリコーゲン栄養膜細胞の数も低下していることを明らかにした。これが、HtrA KO マウスで胎盤結合部が小さくなる原因であるとした。更に同じく Tpbpa 細胞から派生するらせん動脈結合栄養膜細胞への分化も抑制されており、このため、らせん動脈結合栄養膜細胞の脱落膜への浸潤と母親の血管のらせん動脈への再構築が阻害されていること、おそらくその結果、血流の増加が生じないため二次的に迷路胎盤の類洞血管の発育が阻害されることを明らかにした。つまり、HtrA、特に HtrA1 は栄養膜細胞の初期分化を制御している可能性を示した。申請者は、更に分子機構の解明を進め、TGF- $\beta$ による分化制御の異常が、HtrA KO マウスで見られる胎盤の異常の原因である可能性を明らかにした。つまり、HtrA は、TGF- $\beta$ によるシグナル伝達を阻害する活性を持つ。また、TGF- $\beta$ は栄養膜細胞の初期分化を抑制する。これらの知見と一致して、申請者は、HtrA KO マウスの胎盤では TGF- $\beta$ の細胞内シグナル伝達を行う Smad2 タンパク質が野生型マウスに比べより高度にリン酸化されて活性化されていることを発見した。

HtrA KO マウスの新生児は低体重を示し、この低体重は生後数週間まで有意に持続した。また HtrA1/3<sup>-/-</sup>マウスは、妊娠後期に血圧の上昇を示した。これらは、ヒトの妊娠性高血圧症の代表的な症状であり、HtrA1/3<sup>-/-</sup>マウスが、モデル動物として活用できることを示している。

以上のように、本論文は、HtrA ファミリータンパク質の胎盤での生理機能を明らかにするとともに、重要なヒトの疾患である妊娠性高血圧症の発症機構の理解を促進し、病気の早期発見と治療への応用に寄与するものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。