

学位論文題名

Expression of Allograft Inflammatory Factor-1 in  
Mouse Uterus and Poly (I:C) -induced Fetal Resorption

(マウス子宮における Allograft Inflammatory Factor-1 の発現と  
Poly (I:C) により誘導される胎児吸収)

学位論文内容の要旨

はじめに

Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1) は、1995年ラットの心臓アロ移植片に浸潤するマクロファージに発現する遺伝子産物として同定された。慢性拒絶反応下の同種 (アロ) 移植片でのみ発現し、同系移植片では見られないことから、AIF-1発現がアロ移植反応の進展に関与していることが示唆された。しかし、その後ヒト、マウスのAIF-1 mRNA が、脾臓、末梢血リンパ球、胸腺、肝臓、肺、胎盤など、様々な正常組織において発現することが明らかとなった。さらに、糖負荷時のインシュリン分泌に影響を与えることや、実験的自己免疫性脳脊髄炎、神経炎、ぶどう膜網膜炎でも発現が見られることなどが報告されている。胎児とtrophoblastとは、母体にとってsemi-allograftと考えられるが、生殖領域におけるアロ移植片としての母児インターフェイスに着目し、AIF-1の発現と機能について解析を行った研究は、これまで報告されていない。

方法と結果

1. 非妊娠時のマウス子宮における AIF-1 発現について解析した。7 週齢の BALB/c マウスを、各性周期で犠牲死させ、Northern blot analysis で調べた。その結果、AIF-1 mRNA が非妊娠時マウス子宮において発現されていることが初めて明らかとなった。AIF-1 mRNA の発現量は、proestrus では非常に少なく、estrus において急激に増加し、その後暫減していた。proestrus と estrus の間には、統計学的有意差が認められた。

次に、各性周期のマウス子宮を用いて、すでに性周期で消長が解析され、かつ AIF-1 との関連が深いと考えられる IFN- $\gamma$ 、NOS2、TNF- $\alpha$  各 mRNA 発現について RT-PCR で半定量化し、AIF-1 mRNA の発現との相関を検討した。NOS2 と TNF- $\alpha$  mRNA は、ほぼ estrus にのみ認められた。一方 IFN- $\gamma$  mRNA は、estrus に強く発現していたが、metestrus-2 から proestrus の間にも中等度の発現が認められた。従って非妊娠子宮における AIF-1 mRNA 発現は、NOS2、TNF- $\alpha$  の発現の増加と関連すると考えられた。

AIF-1 のタンパクレベルでの発現を調べるために免疫組織化学染色を行い、estrus の子宮においては、内膜上皮細胞の基底側や粘膜固有層のマクロファージの一部に AIF-1 が発現していることが明らかとなった。

2. 妊娠時における AIF-1 mRNA の発現を調べる目的で、妊娠マウスの子宮を Northern blot analysis で調べた。7 週齢の BALB/c $\times$ BALB/c の同系組み合わせ、BALB/c $\times$ C57BL/6 の異系組み合わせそれぞれについて解析したところ、AIF-1 mRNA は両者の妊娠初期子宮において発現していること、発現レベルは妊娠日齢に従い変化することが判明した。

estrus に強かった AIF-1 mRNA の発現は、同系、異系いずれの組み合わせでも受精後一度減少した。その後の AIF-1 mRNA の発現パターンは、同系と異系の組み合わせにおいて異なっており、同系組み合わせでは着床期に再び発現していたが、異系組み合わせでは着床前に一過性に発現が増強し、着床期には減少していた。

妊娠初期の子宮における、AIF-1 と IFN- $\gamma$ , NOS2, TNF- $\alpha$  mRNA の発現を、RT-PCR で同時に調べたところ、TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  mRNA の発現パターンは、AIF-1 の発現パターンと類似していた。興味深いことに、NOS2 mRNA の発現は、どちらの組み合わせにおいても着床後に強く認められた。

妊娠中期、後期における AIF-1 mRNA は、子宮、胎盤および胎児のいずれにおいても、Northern blotting では認められなかった。

3. 7週齢のCBA/JメスマウスにDBA/2Jオスマウスを交配したfetal resorption model において、AIF-1 の発現とresorptionへの関与について調べた。まず無処置群とpoly(I:C)200  $\mu$ g 投与群とにおけるresorption rateを算出したところ、無処置群、poly(I:C)投与群において、それぞれ21.9%、54.8%だった。

resorption が病理学的に明らかになるよりも前の時期に、無処置群と poly(I:C)投与群それぞれを犠牲死させ、胎児、胎盤とそれを包む子宮筋の全体を各 embryo の間で分割し、embryo 単位ごとについて AIF-1, IFN- $\gamma$ , NOS2, TNF- $\alpha$  mRNA 発現を RT-PCR で調べた。AIF-1, IFN- $\gamma$ , NOS2, TNF- $\alpha$  各 mRNA の発現が同時に認められた embryo の割合は、無処置例で 2/8 すなわち 25%、poly(I:C)投与例で 4/8 すなわち 50%であり、各々の群における resorption rate と近似した値だった。

免疫組織化学染色において、poly(I:C)投与群では、母児インターフェイスにおける脱落膜において、マクロファージの一部が AIF-1 を発現している embryo を認めた。

#### 考察

estrus には子宮マクロファージが数的に増加することが報告されており、今回明らかとなった NOS2, TNF- $\alpha$  の発現の増加とともに AIF-1 mRNA の高度の発現に関連すると考えられた。

異系間の妊娠組み合わせでは、同系のもものと比較し着床前の AIF-1 mRNA 発現がより強く、着床期には減少していた。異系妊娠マウスにおいては、着床時子宮マクロファージが不活性化していると思われ、それに伴い AIF-1, TNF- $\alpha$  発現の減少が見られたと考えられた。

fetal resorption model の embryo において、AIF-1 mRNA の発現は、poly(I:C)の投与で増強し、IFN- $\gamma$ , NOS2, TNF- $\alpha$  mRNA の発現の増強と関連することが判明した。明白な胚傷害が起こる前にマクロファージの活性化が誘導されることを示唆していると考えられた。

本研究により、新しいproteinであるAIF-1が、生殖システムにおける様々な事象において発現されることが判明した。今後AIF-1の機能的役割について研究を進めることが重要と考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 櫻木 範明  
副査 教授 長嶋 和郎  
副査 教授 小野江 和則  
副査 教授 水上 尚典

学位論文題名

## Expression of Allograft Inflammatory Factor-1 in Mouse Uterus and Poly (I:C) -induced Fetal Resorption

(マウス子宮における Allograft Inflammatory Factor-1 の発現と Poly (I:C) により誘導される胎児吸収)

Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1) は、1995年ラットの心臓アロ移植片に浸潤するマクロファージに発現する遺伝子産物として同定された。慢性拒絶反応下の同種(アロ)移植片でのみ発現し、同系移植片では見られないことから、AIF-1発現がアロ移植反応の進展に関与していることが示唆された。しかし、その後ヒト、マウスのAIF-1 mRNAが、脾臓、末梢血リンパ球、胸腺、肝臓、肺、胎盤など、様々な正常組織において発現することが明らかとなった。さらに、糖負荷時のインシュリン分泌に影響を与えることや、実験的自己免疫性脳脊髄炎、神経炎、ぶどう膜網膜炎でも発現が見られることなどが報告されている。胎児と trophoblast とは、母体にとって semi-allograft と考えられるが、生殖領域におけるアロ移植片としての母児インターフェイスに着目し、AIF-1の発現と機能について解析を行った研究は、これまで報告されていない。

非妊娠時のマウス子宮におけるAIF-1発現について解析した。7週齢のBALB/cマウスを、各性周期で犠牲死させ、Northern blot analysisで調べた。その結果、AIF-1 mRNAが非妊娠時マウス子宮において発現されていることが初めて明らかとなった。AIF-1 mRNAの発現量は、proestrusでは非常に少なく、estrusにおいて急激に増加し、その後暫減していた。proestrusとestrusの間には、統計学的有意差が認められた。次に、各性周期のマウス子宮を用いて、すでに性周期で消長が解析され、かつAIF-1との関連が深いと考えられるIFN- $\gamma$ 、NOS2、TNF- $\alpha$ 各mRNA発現についてRT-PCRで半定量化し、AIF-1 mRNAの発現との相関を検討した。NOS2とTNF- $\alpha$  mRNAは、ほぼestrusにのみ認められた。一方IFN- $\gamma$  mRNAは、estrusに強く発現していたが、metestrus-2からproestrusの間にも中等度の発現が認められた。従って非妊娠子宮におけるAIF-1 mRNA発現は、NOS2、TNF- $\alpha$ の発現の増加と関連すると考えられた。

AIF-1のタンパクレベルでの発現を調べるために免疫組織化学染色を行い、estrusの子宮においては、内膜上皮細胞の基底側や粘膜固有層のマクロファージの一部にAIF-1が発現していることが明らかとなった。

妊娠時における AIF-1 mRNA の発現を調べる目的で、妊娠マウスの子宮を Northern blot analysis で調べた。7 週齢の BALB/c×BALB/c の同系組み合わせ、BALB/c×C57BL/6 の異系組み合わせそれぞれについて解析したところ、AIF-1 mRNA は両者の妊娠初期子宮において発現していること、発現レベルは妊娠日齢に従い変化することが判明した。estrus に強かった AIF-1 mRNA の発現は、同系、異系いずれの組み合わせでも受精後一度減少した。その後の AIF-1 mRNA の発現パターンは、同系と異系の組み合わせにおいて異なっており、同系組み合わせでは着床期に再び発現していたが、異系組み合わせでは着床前に一過性に発現が増強し、着床期には減少していた。妊娠初期の子宮における、AIF-1 と IFN- $\gamma$ 、NOS2、TNF- $\alpha$  mRNA の発現を、RT-PCR で同時に調べたところ、TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  mRNA の発現パターンは、AIF-1 の発現パターンと類似していた。興味深いことに、NOS2 mRNA の発現は、どちらの組み合わせにおいても着床後に強く認められた。妊娠中期、後期における AIF-1 mRNA は、子宮、胎盤および胎仔のいずれにおいても、Northern blotting では認められなかった。

7週齢のCBA/JメスマウスにDBA/2Jオスマウスを交配したfetal resorption model において、AIF-1の発現とresorptionへの関与について調べた。まず無処置群とpoly(I:C)200  $\mu$ g投与群とにおけるresorption rateを算出したところ、無処置群、poly(I:C)投与群において、それぞれ21.9%、54.8%だった。resorptionが病理学的に明らかになるよりも前の時期に、無処置群とpoly(I:C)投与群それぞれを犠牲死させ、胎仔、胎盤とそれを包む子宮筋の全体を各embryoの間で分割し、embryo単位ごとについてAIF-1、IFN- $\gamma$ 、NOS2、TNF- $\alpha$  mRNA発現をRT-PCRで調べた。AIF-1、IFN- $\gamma$ 、NOS2、TNF- $\alpha$  各mRNAの発現が同時に認められたembryoの割合は、無処置例で2/8すなわち25%、poly(I:C)投与例で4/8すなわち50%であり、各々の群におけるresorption rateと近似した値だった。免疫組織化学染色において、poly(I:C)投与群では、母児インターフェイスにおける脱落膜において、マクロファージの一部がAIF-1を発現しているembryoを認めた。

estrus には子宮マクロファージが数的に増加することが報告されており、今回明らかとなった NOS2、TNF- $\alpha$  の発現の増加とともに AIF-1 mRNA の高度の発現に関連すると考えられた。異系間の妊娠組み合わせでは、同系のものと比較し着床前の AIF-1 mRNA 発現がより強く、着床期には減少していた。異系妊娠マウスにおいては、着床時子宮マクロファージが不活性化していると思われ、それに伴い AIF-1、TNF- $\alpha$  発現の減少が見られたと考えられた。fetal resorption model の embryo において、AIF-1 mRNA の発現は、poly(I:C)の投与で増強し、IFN- $\gamma$ 、NOS2、TNF- $\alpha$  mRNA の発現の増強と関連することが判明した。明白な胚傷害が起こる前にマクロファージの活性化が誘導されることを示唆していると考えられた。

本研究により、新しいproteinであるAIF-1が、生殖システムにおける様々な事象において発現されることが判明した。今後AIF-1の機能的役割について研究を進めることが重要と考えられた。

公開発表に際し、副査の長嶋教授から、estrus に AIF-1 発現が高い理由、estrus 内膜上皮細胞の AIF-1 局在、正常妊娠の allogeneic combination と syngeneic combination での着床期における AIF-1 mRNA 発現の差、CBA/J×DBA/2J 以外での poly (I:C)投与実験、CBA/J×DBA/2J の poly (I:C)投与群における各 mRNA 発現が胎仔吸収の原因であるのか結果であるのか、などについて質問があった。副査の水上教授からは、CBA/J×DBA/2J の胎仔吸収モデルでのプロゲステロン値の変動とプロゲステロン投与実験、ヒトにおける AIF-1 研究、について質問があった。副査の小野江教授から、マクロファージ

以外での AIF-1 発現, poly (I:C)の標的, について質問があった. 主査の櫻木教授からは, AIF-1 knockout mouse において発育や免疫制御がどのようになると予測されるか, について質問があった. これらの質問に対して, 申請者は自身のこれまでの研究成績や文献的情報をもとに概ね妥当な回答をなした.

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.