HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	妊娠高血圧腎症モデルマウスにおけるオートファジーの意義とATG9の役割の解明
Author(s)	小島, 崇史
Description	配架番号：2146
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11664号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11664
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59827
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Kojima.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

妊娠高血圧腎症モデルマウスにおける
オートファジーの意義と *ATG9* の役割の解明
(Studies on the role of *ATG9* gene and autophagy
in preeclampsia model mice)

２０１５年３月

北　海　道　大　学

小　島　崇　史

目　　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・ 1 頁
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6 頁
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7 頁
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・17 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・44 頁
総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・49 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・50 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・51 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

１． T. Kojima, T. Yamada, R. Akaishi, I. Furuta, T. Saitoh, K. Nakabayashi, KI. Nakayama, K. Nakayama, S. Akira, H. Minakami
Role of *Atg9a* gene in foetal growth and foetal survival in mice
Molecular Human Reproduction に投稿中

本研究の一部は以下の学会に発表した.

１． 小島　崇史，赤石　理奈，山田　崇弘，古田　伊都子，森川　守，山田　俊，山田　秀人，櫻木　範明，水上　尚典
妊娠高血圧腎症モデルマウスにおけるオートファジー活性化の検討
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会，2013 年 5 月 10 日～12 日，札幌

２． T. Kojima, R. Akaishi, T. Yamada, I. Furuta, M. Morikawa, T. Yamada, H. Yamada, N. Sakuragi, H. Minakami
Autophagy in the placentas of preeclampsia model mice
the 23rd Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynaecology, 20-23 October 2013, the Centara Grand & Bangkok Convention Centre at Central World, Bangkok, Thailand.

３． 小島　崇史，赤石　理奈，山田　崇弘，古田　伊都子，森川　守，山田　俊，櫻木　範明，水上　尚典
妊娠高血圧腎症モデルマウスにおけるオートファジー活性化の検討（第２報）
第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会，2014 年 4 月 18 日～20 日，東京

緒　　言

本研究の目的は妊娠の約 5%に発症し母児の生命に関わる重大な周産期疾患である妊娠高血圧症候群（Pregnancy Induced Hypertension; PIH）と妊娠高血圧腎症（Preeclampsia ; PE）におけるオートファジーの意義と，オートファジー関連遺伝子の 1 つである *ATG9* の役割について明らかにすることである．

オートファジーとは細胞内容物の消化，リサイクルをコントロールする細胞内の大規模な自己貪食・分解システムで，生命の維持に必要なアミノ酸プールの維持に重要な機構である [1-3]．本機構は飢餓状態や低酸素といった細胞内ストレス環境において活性化され，生体のホメオスターシスを維持するために重要であることが分かっている一方，発生における分化，発達や組織再生などにも重要と考えられている．近年，酵母からヒトまで保存されるオートファジー関連遺伝子が多く発見され，哺乳類におけるオートファジーの生理学的，病理学的重要性が注目されてきている．オートファジーは神経筋疾患，悪性腫瘍，プログラム関連死，あるいは感染症などと密接な関連があることが指摘されているが，その発生における重要性にもかかわらず胎盤や妊娠における役割はよく知られていない．

オートファジーの分子機構は酵母において初めて見いだされた．酵母が栄養飢餓状態におかれると，液胞の近傍（PAS; pre-autophagosomal structure）で隔離膜（isolation membrane）の形成が誘導され，二重膜構造のオートファゴソーム（autophagosome）が形成される．オートファゴソームの外膜は液胞膜と融合し，細胞質成分を含んだ内膜構造が液胞の中に排出される．この構造（オートファジックボディ ; autophagic body）は直ちに分解され，分解産物は細胞質へと輸送される [4]．これまで酵母におけるオートファジー関連遺伝子（*ATG*）群は *ATG*1 から *ATG*35 まで 30 数個が同定されており [5]，飢餓状態で誘導される非選択的オートファジーにおけるオートファゴソームの形成にはそのうち 18 個の遺伝子が必須であることが分かっている [6]．これらの遺伝子のほとんどは高等真核生物に受け継がれており，またオートファジー不能である酵母変異体は窒素欠乏環境において生存できないことが確認されている [7].

酵母 Atg9 はオートファジーに必須な Atg タンパクの中で唯一の膜貫通タンパク質である [8]．Atg9 の大半はゴルジ体に由来する直径 40-60nm の膜小胞として存在し，細胞質中を激しく動き回っている [9]. 飢餓状態におかれると少数の Atg9 小胞が PAS に集積し，最終的にはオートファゴソームの外膜に局在することが観察されている．機能の

詳細は未だ不明な点が多いが，オートファゴソーム膜形成のコア蛋白として機能していると考えられている．一方，酵母の Atg9 に対する哺乳類におけるホモログとして ATG9A と ATG9B の存在が明らかになっている[10]．両者は機能的パラログであるが，ATG9A は全身の細胞に広く発現しているのに対し，ATG9B は胎盤と下垂体にのみ特異的に発現している．ATG9A はオートファゴソーム形成に必須であり，ATG9B は ATG9A を機能的に相補することが分かっている[10]が，その詳細は酵母同様に不明な点が多い．

Yamada らは妊娠高血圧腎症や虚血性心疾患との関連が指摘されている一酸化窒素合成酵素遺伝子 *NOS3* のアンチセンス代謝物である *NOS3AS* を同定し，それが *ATG9B* と同一のものであることを証明した[10]．またその胎盤特異的発現と *NOS3* の転写後調節機構を明らかにしてきた．さらに，*ATG9B* がコードする蛋白 ATG9B と，そのパラログであり全身に発現する ATG9A の機能を解析し，両蛋白がオートファジー関連蛋白であることを証明した[10]．特に ATG9B は哺乳類特異的であり，機能の上でもマップされている染色体上の位置からも妊娠高血圧腎症との関連が指摘されている *NOS3* のアンチセンス代謝物であることから，妊娠高血圧腎症におけるオートファジーの役割の解析が進められてきた．

近年，Saitoh らによって *ATG9A* のノックアウトマウス（*Atg9a*-KO）が樹立された[11]．Atg9a はオートファジーに必須のタンパクであり，*Atg9a*-KO はオートファジー不能マウスである. 酵母での報告と同様に, オートファジー不能マウスである *Atg3*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg16L1* ノックアウトマウス（遺伝子型はそれぞれ $Atg^{-/-}$）は，在胎中は生存するものの，全例で出生後 1 日以内に死亡することが確認されており[12-15]，*Atg9a*-KO も同様の特徴を持つ[11]．また正常新生仔が出生後に突然胎盤からの栄養供給が断たれることへの反応として大規模なオートファジーが一過性に誘導されていることも分かっている[12].

ヒトにおいても，胎生期に妊娠中の高血圧や栄養不良などにより胎盤からの栄養や酸素供給が障害されると胎児発育制限（FGR）や子宮内胎児死亡（IUFD）を引き起こす[16-18]．妊娠高血圧腎症では子宮動脈における血管抵抗の増大によりしばしば妊娠中に高血圧症をきたし[16, 17]，母体の高血圧は FGR や子宮内胎児死亡（IUFD）をきたしうる妊娠中の有害事象として広く知られている[16]が，これは子宮動脈からの血流不全により胎盤機能不全をきたすことで，胎児が子宮内で飢餓状態に陥っていることが原因として考えられている．このことに関連し，ヒトの妊娠高血圧腎症では胎盤におけるオートファジーが活性化していることが報告されている[19, 20].

それ故，オートファジー不能マウスでも子宮内環境悪化への反応として同様の事象が生じている可能性がある．実際，オートファジーに必須な別の遺伝子である *beclin 1* 欠乏胎仔マウスは FGR もしくは IUFD となることが報告されている [21].

$p57^{Kip2}$ は強力な cyclin / cyclin dependent kinase（CDK）複合体のインヒビターであり，ヒトとマウスの両方において父由来のアレルが発現しない刷り込み遺伝子である [22]．母由来のアレルを欠く個体（遺伝子型 $p57^{Kip2-/-}$ もしくは $^{-/+*}$，アレル表記は母/父の順，+*は父由来の刷り込み遺伝子を示す）は $p57^{Kip2}$ を発現できない．これらのマウスは重篤な骨の形態異常に伴う呼吸障害などのため，約 90%が出生後 24 時間以内に死亡する [22]．一方で母由来のアレルを持つ個体（$p57^{Kip2+/+*}$ もしくは $^{+/-}$）は $p57^{Kip2}$ を発現できるので通常状態では表現型に異常をきたさない．しかしこの雌マウスが妊娠し，その受胎産物中に $p57^{Kip2}$ 非発現の個体（$p57^{Kip2-/-}$ もしくは $^{-/+*}$）が含まれていた場合，妊娠マウスは絨毛過形成を来たし，表現型として高血圧，蛋白尿といった妊娠高血圧腎症様症状を呈することが示されている [23]．このことから現在，$p57^{Kip2+/-}$ マウスは妊娠高血圧腎症のモデルマウスとして確立されている．

そこで，本研究においては妊娠高血圧腎症モデルマウスである $p57^{Kip2+/-}$ ヘテロ欠損マウスと *Atg9a*-KO を使用し，次のような仮説を立てて検証を行うこととした．

１．オートファジー不能胎仔では発育不全や胎仔死亡になりやすい．
２．生存オートファジー不能胎仔では *Atg9a* を相補する *Atg9b* の存在が重要である．
３．マウス胎盤においても *Atg9b* は *Nos3* のアンチセンス遺伝子（*Nos3as*）として作用している．
４．妊娠高血圧腎症モデルマウスにおいてオートファジーの活性化はヒト同様重要であり，オートファジー不能状態とした場合に定常状態に比較して胎仔死亡になりやすい．

上記の仮説を生理学的および生化学的手法により解析し，妊娠高血圧腎症におけるオートファジーの意義と *Atg9a* / *Atg9b* の役割を検討した．

オートファジーを検出しその活性を解析する主な手法には電子顕微鏡による観察，蛍光顕微鏡による観察，そしてウェスタンブロットを用いた生化学的解析などが挙げられるが，未だ確立されたものはなく，数多くの手法が模索されている状況にある．現時点ではいくつかの欠点があるものの酵母 Atg8 の哺乳類におけるホモログである LC3（ラット脳の微小管結合タンパク質である Microtubule-associated protein 1[MAP1] とともに精製されたため，light chain 3 と命名された [24]）の蛍光顕微鏡観察とウェスタ

ンブロットによる観察が標準とされている．LC3 は哺乳類ではじめて発見されたオートファゴソーム膜結合タンパク質として知られる[24]．LC3 は pro LC３として合成された直後に，システインプロテアーゼである Atg4 により C 末端の残基が切断されて LC3-I となる．LC3-I は細胞質に可溶性タンパク質として存在するが，LC3-I のユビキチン様修飾によりホスファチジルエタノールアミンが共有結合すると膜型の LC3-II となり，これが隔離膜およびオートファゴソーム膜に局在する[25]．LC3-II は脂質化されているため LC3-I と比べて移動度が大きく，分子量が小さくなるため電気泳動で見分けることができる（本研究で用いた抗 LC3 一次抗体を用いると LC3-I は 18kDa, LC3-II は 16kDa のバンドとして検出される）．LC3-II の量は細胞内に存在するオートファゴソームの数に比例するため，オートファジーの信頼できるマーカーとして用いられる．LC3 の機能について解析した研究では，LC3 は隔離膜を閉鎖させオートファゴソームが完成する段階で重要な働きをしていることが報告されている[26]．LC3-II はオートファゴソームの外膜と内膜に結合しているが，Atg4 は LC3-II からホスファチジルエタノール結合を切断・除去することもでき，オートファジーの過程においてオートファゴソームとリソソームの癒合が起こると，外膜に結合している LC3 は Atg4 による切断を受けて膜から離れる[25]．一方内膜に結合している LC3 はそのまま分解されるので，LC3 はオートファジー特異的に分解される基質と見なされている．

他方，p62/SQSTM1 もオートファジーのマーカーとして知られている．p62 は LC3 結合能とユビキチン結合能を持つタンパク質で，動物の細胞内にのみ発現し，真菌や植物には存在しない．p62 はオートファゴソーム形成部位に局在し，ユビキチン化されたタンパク質凝集体の形成や，オートファジーによる分解に関与していると考えられている．p62 はそれ自身もオートファジーによって分解されるが，LC3 との直接相互作用しながらユビキチン化されたタンパク質をオートファジー誘導時にリソソームにおいて分解させるために運搬する作用を持つと考えられており，オートファジーが抑制されると p62 は蓄積し，逆にオートファジーが誘導され進行すると発現レベルが減少することが確認されている[27,28]．

本研究ではこれら LC3-II と p62 の発現量を生化学的に解析することにより，オートファジーの活性化について検討を行った．

略　語　表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ACR	albumin / creatinine ratio
dpc	days post coitum
FGR	fetal growth restriction
IUFD	intrauterine fetal death
mRNA	messenger RNA
PAS	pre-autophagosomal structure
PE	preeclampsia
PIH	pregnancy induced hypertension
PVDF	polyvinylidene difluoride

実　験　方　法

本研究の動物実験に関しては，北海道大学大学院医学研究科の「動物実験に関する指針」に従い北海道大学大学院医学研究科動物実験委員会の承認のもとに行った.

1. 妊娠マウスの作成

（1）4 系統のマウスの準備

実験に用いた 4 つの系統の妊娠マウスおよびマウス胎盤を得るため，以下の方法でマウスを準備した.

1） Control (wild type: WT) : C57BL/6J マウス
必要数を購入し，実験に用いた.

2） 妊娠高血圧腎症モデルマウス：$p57^{Kip2+/-}$ヘテロ欠損マウス
共同実験者より購入後，以下の方法で継代，増殖させた．すなわち WT 雌マウスと $p57^{Kip2+/-}$雄マウスを交配させて仔を得た. 3〜5 週齢の仔の tail DNA について PCR 法を用いて解析し, 遺伝型が $p57^{Kip2+/-}$である雌あるいは雄マウスをその後の実験に供した.

3） *Atg9a*-KO マウス：$Atg9a^{+/-}$ヘテロ欠損マウス
共同研究者により樹立された *Atg9a* ヘテロ欠損（$Atg9a^{+/-}$）マウス[11]（遺伝的バックグランドは 129Sv x C57BL/6J. $Atg9a^{-/-}$マウスは出生後間もなく死亡するため，成獣とはならない）を譲り受け，本学附属動物実験施設内でクリーンアップ後継代，増殖させた．WT 雌マウスと $Atg9a^{+/-}$雄マウス，または $Atg9a^{+/-}$雌マウスと WT 雄マウスの組み合わせで交配して仔を得た．出生後，仔の尾部より DNA を抽出し，PCR による解析を行い，遺伝子型が $Atg9a^{+/-}$であったものをその後の実験に供した.

4） *Atg9a*-KO かつ妊娠高血圧腎症モデルマウス：$Atg9a^{+/-}$/$p57^{Kip2+/-}$マウス
上記 3)により作成した $Atg9a^{+/-}$雌マウスと上記 2)により作成した $p57^{Kip2+/-}$雄マウスを交配して仔を得た．3〜5 週齢の仔の tail DNA について PCR 法を用いて解析し，遺伝型が $Atg9a^{+/-}$かつ $p57^{Kip2+/-}$である雌マウスを実験用マウスとして確保した.

（２）妊娠マウスの作成

下記の組み合わせのマウスを 17 時から翌朝 8 時まで一晩交配させ, 膣栓の有無を目視で確認した．妊娠の判定は体重の増加および肉眼的に腹部の膨隆を確認することで行った．雌マウスは 8 週齢から生後 1 年未満マウスを使用した.

１）WT 妊娠マウス（control）(n=8)：WT 雌　×　WT 雄

２）$p57^{Kip2+/-}$妊娠マウス (n=11)：$p57^{Kip2+/-}$雌　×　WT 雄

３）$Atg9a^{+/-}$妊娠マウス (n=13) ：$Atg9a^{+/-}$雌 ×　$Atg9a^{+/-}$雄

４）$Atg9a^{+/-}$/$p57^{Kip2+/-}$妊娠マウス (n=13)：$Atg9a^{+/-}$/$p57^{Kip2+/-}$雌 ×$Atg9a^{+/-}$雄

２．妊娠マウスの体重および血圧測定

（１）体重測定

マウスを捕てい器に保持したまま重量計に乗せ，捕てい器の重量を差し引いた分をマウス体重として用いた. またマウス体重の測定は妊娠前, 0.5dpc (days post coitum) , 5.5dpc，9.5dpc, 13.5dpc, 15.5dpc，17.5dpc に行い，記録した.

（２）血圧測定

血圧測定には CODA^{TM} monitor (Kent Scientific, Torrington, CT, USA)を使用した．血圧は妊娠前，5.5dpc，9.5dpc，13.5dpc，15.5dpc，17.5dpc の計６回測定した．マウスの尾を把持した状態で体重毎に２種類のサイズのマウスホルダー内に補ていし，適切な温度に保温したパッドで包んだ状態で水平な台の上で 15 分間静置した. マウスが環境に慣れ安静化したところで尾部に筒型のマンシェットを通し，30 秒ごとに血圧を測定し，収縮期血圧（mmHg），拡張期血圧（mmHg），心拍数（bpm），尾内血流量（μL）を記録した．マウスが安静を維持し，尾内血流量も十分であった場合，適正な血圧値と定義し，適正な血圧値連続５～10 回分の平均値をそのマウス個体の血圧値として採用した.

（３）妊娠マウスの尿採取および尿蛋白測定

マウスの蓄尿にはマウス採尿ケージ（KN-645, 夏目製作所, 東京）を使用し，以下の要領で妊娠前, 0.5～1.5dpc, 4.5～5.5dpc, 8.5～9.5dpc, 12.5～13.5dpc, 14.5～15.5dpc, 16.5～17.5dpc の期間にそれぞれ蓄採尿を行った．朝８時にマウスを採尿ケージの中に入れ，蓋をした後，尿の蒸発を防ぐためにポリエチレンの袋で採尿ケージの上部を軽く覆い, 24 時間静置した. 翌日朝８時に採尿ケージの下部の受け皿にたまった尿を 25G 針付き 1ml シリンジで吸引し，泡立たないように 1.5ml のマイクロチューブに移し入

れた後，直ちに-20℃で保存した．

上記の手順で保存したマウス尿は，レビス®アルブミン–マウス（シバヤギ）のキットを用いて ELISA 法により尿中アルブミンを解析した．また妊娠マウスの体重増加による影響を考慮し，さらに尿中クレアチニンを測定して尿中アルブミン/尿中クレアチニン比を求めることで補正を行った．尿中クレアチニン測定にはキット：クレアチニン–テストワコー（和光純薬工業株式会社，大阪）を使用し，Jaffe 法により 520nm 波長の吸光度から検量線を作成し，クレアチニンを測定した．

３．胎児・胎盤の採取

上述 4 系統の妊娠中マウスから，13.5dpc，15.5dpc，17.5dpc に胎児・胎盤を採取した．

（１）妊娠マウスの dissection

あらかじめ設定した妊娠日齢（dpc）に到達した妊娠マウスをエーテルで深麻酔屠殺後，下腹部を切開し多房性の子宮を摘出した．各房の内容物が互いに混ざり合わないように注意しながら各房を子宮筋層ごと分離した．剪刀で子宮筋層および卵膜を切開し，胎仔と胎盤を露出させた．臍帯を胎仔側で切断し，胎仔重量と胎盤重量を測定した．遺伝子型判定用に胎仔尾を採取し-20℃で凍結保存した．

（２）胎仔体重の測定

臍帯をできるだけ胎仔腹壁に近いところで切断し，滅菌シャーレ上の胎仔重量を測定した後，シャーレ重量を差し引いたものを胎仔体重とした．次いで遺伝子型判定のために仔尾部を切除し，リン酸緩衝整理食塩液（PBS 液）中で血液成分を洗浄し（母体血混入を防ぐため），直ちに-20℃で凍結保存した．これらの作業中，すでに子宮内胎仔死亡（intrauterine fetal death, IUFD）となっており痕跡程度の個体は体重の解析からは除外し，遺伝子型判定のみを行った．胎盤の形状が維持され仔の遺伝子型が同定できたものは胎盤の解析にも使用した．

（３）胎盤の採取

摘出した胎盤は重量測定後，リン酸緩衝生理食塩液（PBS 液）で血液成分を充分洗浄した．実体顕微鏡下で海面層を除去後，緻密層を 4〜6 分割し， RNA 抽出用と蛋白抽出用に 2〜3 片ずつ分けた．前者は RNA later®（SIGMA Aldrich, USA）に浸漬して 4℃で一晩静置後，RNA later を除去して-80℃で凍結保存した．後者はただちに-80℃で凍結保存した．

（４）胎仔遺伝子型の解析：PCA 反応およびアガロースゲル電気泳動

上記手順で採取した胎仔尾部 DNA から胎仔の遺伝子型を検討した．DNA 抽出キット（DNeasy® Blood & Tissue Kit, Quiagen, Valencia, CA, USA）を用いて DNA を抽出し，WT，p57^{Kip2}-KO，*Atg9a*-KO の塩基配列から作成したプライマーを用いて Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）で PCR を行った．PCR 反応に用いたプライマーの塩基配列を表 1 に示した．p57^{Kip2}-KO と WT の鑑別のための PCR 反応は変性反応 94℃，30 秒，アニーリング 60℃, 30 秒，伸長反応 72℃, 90 秒を 40 サイクル行った．*Atg9a*-KO と WT の判定のための PCR 反応では変性反応 95℃, 15 秒，アニーリング 59℃, 60 秒を 30 サイクル行った．得られた PCR 産物のうち 5μl を 2%アガロースゲルで 135V，25 分間電気泳動し，泳動終了後のゲルを紫外線トランスイルミネーションにより可視化して胎仔の遺伝子型を判定した（図 1 および図 2）．

表１. Primer の塩基配列

Primer	Sequence	Tm(℃)
【p57^{Kip2} 遺伝子型判定のためのプライマー】		
KIP2-131	5’-TGCACTGAGAGCGAGTAGAGATT-3’	60
KIP2-331	5’-AGCGGACCGATGGAAGAACTCTG-3’	
KIP2-131	5’-TGCACTGAGAGCGAGTAGAGATT-3’	60
KIP2-503	5’-GCGAAGGAACAAAGCTGCTATTG-3’	
【*Atg9a* 遺伝子型判定のため最初に用いたプライマー】		
9aWK-Rs	5’-GAGCCTGCTACCACATTTGC-3’	58
9aW-Fs	5’-GTCCTTACAGTCTGAGTCCG-3’	
9aWK-Rs	5’-GAGCCTGCTACCACATTTGC-3’	58
9aK-Fs	5’-GCATGCTCCAGACTGCCTTG-3’	
【*Atg9a* 遺伝子型判定のため作成し直したプライマー】		
9aWK	5’-CCAGAGCCTGTCATGGTACTGGGAACC-3’	68
9aW	5’-CCTCAAGGAGCAGGTGCAGCGAGATGG-3’	
9aWK	5’-CCAGAGCCTGTCATGGTACTGGGAACC-3’	68
9aKO	5’-CTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTTG-3’	
【Real-time PCR 用のプライマー】		
Atg9a-F	5’-GAGCAGGTGCAGCGAGATG-3’	59
Atg9a-R	5’-GCAGGTCTCTGGACAGTGAGG-3’	
Atg9b-F	5’-GCATCACATCCAGAACCTGGA-3’	62
Atg9b-R	5’-CCGCTGATGATAGCTGTAGATCTTG-3’	
Nos3-F	5’-CCTCCCGGAGAATGGAGAGAGC-3’	64
Nos3-R	5’-GGTCTGAGCAGGAGACACTGTT-3’	
Gapdh-F	5’-GGCATTGCTCTCAATGACAA-3’	62
Gapdh-R	5’-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3’	

（５）マウス遺伝子型の判定に関する問題点

Atg9a$^{+/-}$雌マウスを妊娠させて *Atg9a*$^{-/-}$の胎仔・胎盤を得ようとしたが，当初同妊娠マウス（n=5）から得られた胎仔（n=24）DNA の遺伝子型の内訳は *Atg9a*$^{+/+}$が 21%（5/24），*Atg9a*$^{+/-}$が 79%（19/24），*Atg9a*$^{-/-}$が 0%（0/24）であり，メンデルの法則で予測された遺伝子型の分布と異なり *Atg9a*$^{-/-}$が 1 例も得られなかった．これについて以下の原因を考えた．

共同研究者より提供を受けた *Atg9a*$^{+/-}$マウスはもともと 129Sv × C57BL/6 遺伝的バックグラウンドを持つものであったが，当施設に搬入後に継代を行う際，C57BL/6 マウスと掛け合わせていたため，遺伝的バックグラウンドが C57BL/6 に近づいてしまった．その結果，より純系に近づいたために *Atg9a* の欠損による表現型が強く発現し，*Atg9a*$^{-/-}$の仔は dissection の前に淘汰されてしまっているのではないかと推察した．同時期，*Atg9a*$^{+/-}$マウスが提供された他の施設においても同じような報告が確認されたため，同マウスを 129Sv（Wild type）マウスと一代交配させ，もともとの遺伝的バックグラウンド（129Sv × C57BL/6）に近づけた．このマウスを妊娠させ（n=5），同様に胎仔（n=52）を得たが，これらの胎仔の遺伝子型は *Atg9a*$^{+/+}$が 25%（13/52），*Atg9a*$^{+/-}$が 75%（39/52），*Atg9a*$^{-/-}$が 0%（0/52）とやはり *Atg9a*$^{+/-}$に偏った割合であった．そこで改めて提供元より positive control および negative control としての *Atg9a*$^{-/-}$，*Atg9a*$^{+/+}$のマウス DNA，および *Atg9a*-KO 判定のためのプライマーの提供を受け，これまで用いていたプライマーと提供されたプライマーとで比較検討を行った．その結果，図 1(A) に示す通りこれまで用いていたプライマーでは *Atg9a*$^{-/-}$であっても野生型アレルのバンドが検出されてしまい，ヘテロ（*Atg9a*$^{+/-}$）と判定されていたことが分かった．従って，プライマーにより正しく遺伝子型が判定できていなかったことが原因と考えられた．しかしながら，Saitoh らの文献にならい，以後 *Atg9a*$^{+/-}$マウスの遺伝的バックグラウンドは 129Sv × C57BL/6J のものに統一して実験を行った．

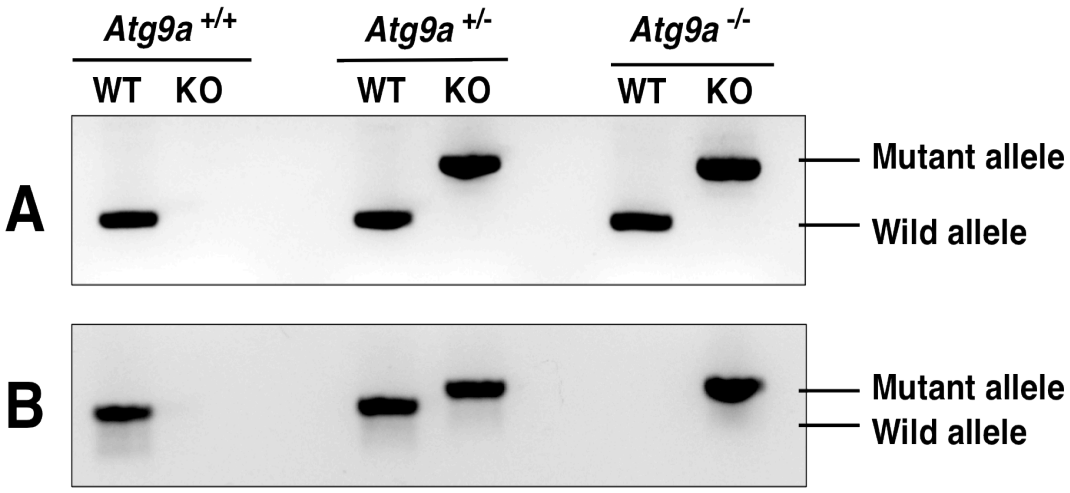

図１．マウス遺伝子型の判定(*Atg9a*)

Tail DNA を PCR 法で増幅した産物を 2%アガロースゲルで 135V, 25 分間電気泳動し，バンドのパターンから遺伝子型を判定した．野生型アレル検出プライマーと変異アレル（*Atg9a*-KO）検出のプライマーは別々のレーンで検出した．

(A) 当初使用したプライマーを用いると，*Atg9a*$^{-/-}$個体であっても野生型アレルのバンドが検出されてしまい，見かけ上 *Atg9a*$^{+/-}$と判定されてしまう．

(B) プライマーを変更した結果，個体では変異アレル（*Atg9a*-KO）のみが検出され，遺伝子型を正しく判定できるようになった．

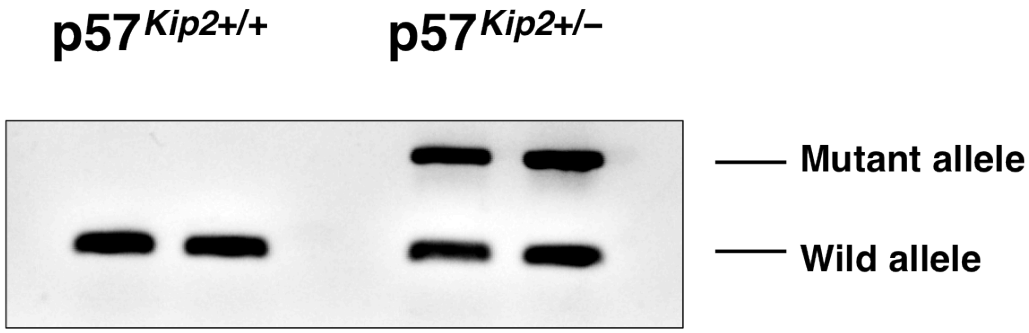

図２．マウス遺伝子型の判定（p57^{Kip2}）

Tail DNA を PCR 法で増幅した産物を 2%アガロースゲルで 135V, 25 分間電気泳動し，バンドのパターンから遺伝子型を判定した．p57^{Kip2} ヘテロマウスは野生型アレルと変異アレルの両方のバンドが検出される．

妊娠マウスから採取した胎盤の遺伝子型は，胎仔の尾から抽出した DNA をもとに PCR 法で確認した胎仔の遺伝子型と同一とみなした．オートファジー関連遺伝子 mRNA の発現およびオートファジー関連蛋白の発現は母マウスの遺伝子型には影響を受けるものの，胎仔・胎盤の $p57^{Kip2}$ の遺伝子型（すなわち $p57^{Kip2+/+}$，$p57^{Kip2+/-}$のいずれか）には影響を受けないことが確認されており，今回の検討にあたっては胎仔・胎盤の *Atg9a* の遺伝子型のみ考慮し，$p57^{Kip2}$ の遺伝子型については考慮せず同一のグループとして扱った（表 2）．

表２．母マウスの遺伝子型と胎仔・胎盤の遺伝子型の分類

	母マウスの遺伝子型		胎盤の遺伝子型	
	Atg9a	$p57^{Kip2(mat./pat.)}$	*Atg9a*	$p57^{Kip2(mat./pat.)}$
Wild type（WT）	[+/+]	[+/+]	[+/+]	[+/+]
$p57^{Kip2}$ ヘテロ	[+/+]	[+/−]	[+/+]	[+/+*] or [−/+*]
Atg9a ヘテロ	[+/−]	[+/+]	[−/−]	[+/+]
Atg9a/$p57^{Kip2}$ ヘテロ	[+/−]	[+/−]	[−/−]	[+/+*] or [−/+*]

+*は父由来のアレルを持つことを示す．$p57^{Kip2}$ 遺伝子は母性発現をする刷り込み遺伝子であるため，父由来のアレルのみ伝わり母由来のアレルを欠く場合はその個体は $p57^{Kip2}$ を発現できない．一方，父由来のアレルのみを欠き母由来のアレルを持つ場合はその個体は $p57^{Kip2}$ を発現させることができ，通常の状態では表現型に異常を示さないが，同雌マウスが妊娠し，その受胎産物に $p57^{Kip2}$ を発現できない個体が含まれていた場合には母マウスは妊娠中に妊娠高血圧腎症様の症状を呈する [22]．

４．胎盤の解析

（１）オートファジー関連遺伝子 mRNA の解析 : RNA 抽出と RT-PCR，定量 Real-time PCR

-80℃で凍結保存した胎盤検体から MicroSmash™(TOMY SEIKO, Tokyo, Japan)および RNA 抽出キット（RNeasy®Plus Mini Kit, Quiagen, Valencia, CA, USA）を用いてキットのプロトコールに従って RNA を抽出し，NanoDrop®（ND-1000, Thermo Scientific Japan，神奈川）を用いて RNA 濃度を測定した．各検体は RNase free water で希釈して均一な濃度（0.33μg/μl）に調整し，EDTA および DNaseI で処理したのち，Random hexamer を使用して Super Script™ III(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて逆転写反応を行い，cDNA を作成した．cDNA は直ちに-20℃で保存した．

次に上記の手順で抽出した cDNA を SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara, Shiga, Japan)を使用し，ABI 7300 Real Time PCR System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて定量 Real-time PCR で解析することにより, オートファジー関連遺伝子（*Atg9a*、*Atg9b*、*Nos3*）の mRNA 発現量を定量的に解析した．各遺伝子のプライマーの塩基配列およびアニーリング温度を表に示した．各反応においてそれぞれ同一の cDNA を standard とし，絶対定量を行った．また *Gapdh* の発現量も同時に測定し，この値を対照として各遺伝子の相対定量を行った．

（２）オートファジー関連蛋白の解析：蛋白抽出と Western Blotting

胎盤採取後-80℃に凍結保存した胎盤検体を用いて，以下の要領で蛋白抽出を行い，オートファジー関連蛋白（Atg9b，p62，LC3-II）の解析を行った．

検体を 2% Triton X-100 lysis buffer (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2% Triton X-100, 2mM PMSF and Complete Protease Inhibitor Cocktail) の中で超音波破砕装置（Handy Sonic, TOMY SEIKO, Tokyo, Japan）で破砕し，4℃で 1 時間静置後に 14000rpm, 10 分間遠心分離し, その上澄みを抽出した. 抽出液の蛋白濃度を BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Rockfold, IL, USA)を用いて測定した．

次に蛋白溶液を検体として，Western Blotting を行った．解析する蛋白は Atg9b(anti-ATG9B antibody：NB110-74833, NOVUS, Littleton, CO, USA)，p62（anti- p62 antibody：MBL, Nagoya, Japan)，LC3-II（anti-LC3：MBL, Nagoya, Japan）および対照として Gapdh (anti-GAPDH antibody：Chemicon International Inc, Themecula, CA, USA)の４種類とした．

SDS-PAGE 用に 1mm 厚の SDS 含有ポリアクリルアミドゲル（Atg9b、p62 は 8%ゲル、LC3-II は 13%ゲル）を作成した．

解析検体を含む複数のサンプルから得た蛋白溶液を混合して濃度を 6.0μg/μl に調整

し，これを標準溶液とした．解析時はこの溶液を 4.0，2.0，1.0μg/μl の３段階に希釈したものを作成し，解析サンプルと同時に流すことで定量の標準曲線の作成に用いた．

続いて以下のごとく SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った．すなわち 6L-DTT を加えて最終濃度 2.0μg/μl に調整したサンプルを，上記のゲルにそれぞれ 6μl（蛋白として 12μg）ずつ分注し，定電圧 80-100V で 80 分間電気泳動を行った．次いで Wet 法を用いてゲルを PDGF（ポリフッ化ビニルデン）膜に転写（定電流 250mA、60 分間）を行い，1%スキムミルク中で Blocking(60 分間振盪)した後，それぞれの一次抗体液中に浸漬し，4℃に保冷した状態で一晩振盪・反応させた．一次抗体希釈率は Atg9b が 1:1000，p62 は 1:2000，LC3 は 1:800，Gapdh は $1:4x10^6$ とした．

それぞれの一次抗体液一晩浸漬した PDGF（ポリフッ化ビニリデン）膜を 1% Tween in TBS 液で十分に洗浄（10 分 x3 回）した後，1:10000 に希釈した二次抗体液（Atg9b, p62, LC3 は ECL™ Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody, GE healthcare, UK、Gapdh は ECL™ Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody, GE healthcare, UK）に室温で 60 分間浸漬･振盪させた. さらに 1%Tween in TBS 液で洗浄（10 分 x3 回）した後, 検出には ECL 溶液（MILLIPORE, Immobilon ™ Western, Chemiluminescent HRP Substrate, Little Chalfont, UK）を使用し，ImageQuant LAS4000 (GE healthcare Japan, Tokyo, Japan)を用いてシグナル強度を定量した．さらに Gapdh を対照として Atg9b，p62 ならびに LC3-II を相対定量した．一部検体には内部対照の指標として β-actin も用いて再確認を行い，Gapdh を用いた場合と傾向に差がないことを確認した.

５．統計解析

統計計算ソフトは JMP® ver.8（SAS, Cary, NC, USA）を使用した．また各群の平均値の比較には Wilcoxon の順位和検定を用い，有意水準は $P<0.05$ とした.

実　験　結　果

１．妊娠マウスの体重，血圧，尿蛋白の検討

今回の実験に際し，表 3 に示すように妊娠雌マウスの遺伝子型，およびその胎仔の遺伝子型に 4 つの群に分けて検討を行った.

表３．交配パターンと胎仔の *Atg9a* 遺伝子型による４つの分類

	交配 (雄 × 雌)	胎仔胎盤の遺伝子型
Group A1	*Atg9a* $^{+/-}$ × *Atg9a* $^{+/-}$	*Atg9a* $^{+/+}$, *Atg9a* $^{+/-}$
Group A2	*Atg9a* $^{+/-}$ × *Atg9a* $^{+/-}$	*Atg9a* $^{-/-}$
Group B1	*Atg9a* $^{+/-}$ × *Atg9a* $^{+/-}$/p57$^{Kip2\ +/-}$*	*Atg9a* $^{+/+}$, *Atg9a* $^{+/-}$
Group B2	*Atg9a* $^{+/-}$ × *Atg9a* $^{+/-}$/p57$^{Kip2\ +/-}$*	*Atg9a* $^{-/-}$

*, p57$^{Kip2\ +/-}$ は父由来アレルを欠いた個体であることを示す.

（１）妊娠マウスの体重の検討

妊娠前のマウス体重（Mean ± SD）は *Atg9a*$^{+/-}$単独ヘテロマウス（表 3 の Group A1 および A2，n=13）と *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$マウス（表 3 の Group B1 および B2, n=13）との間で差を認めなかった（22.8 ± 2.7 vs. 21.7 ± 2.5g，Group A1+A2 vs. Group B1+B2, P<0.05）.

妊娠中の母マウスの体重増加を図 3 に示す. *Atg9a*$^{+/-}$単独ヘテロマウス（表 3 の Group A1 および A2），*Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$マウス（表 3 の Group B1 および B2）のいずれの系統においても，9.5dpc 以降に体重増加が顕著となった．また両系統の妊娠期間毎の体重増加量を比較すると, 13.5dpc では 7.5±2.1 [n=13]vs. 5.6±1.9 g [n=13]（Group A1+A2 vs. Group B1+B2），15.5dpc では 12.8±1.9 [n=9] vs. 7.5±2.4 g [n=11]（Group A1+A2 vs. Group B1+B2）, 17.5dpc では 13.9±4.3 [n=5] vs. 9.1±2.8 g [n=5]（Group A1+A2 vs. Group B1+B2）とそれぞれ有意差を認め, *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$ヘテロマウス群（Group B1+B2）では *Atg9a*$^{+/-}$単独ヘテロマウス群（Group A1+A2）と比較し体重増加量が減少していた．また平均胎仔数も *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$ヘテロマウス群において少なかった．（9.4±2.1 [n=13] vs. 7.2±1.9 [n=13], Group A1+A2 vs. Group B1+B2, P<0.05）.

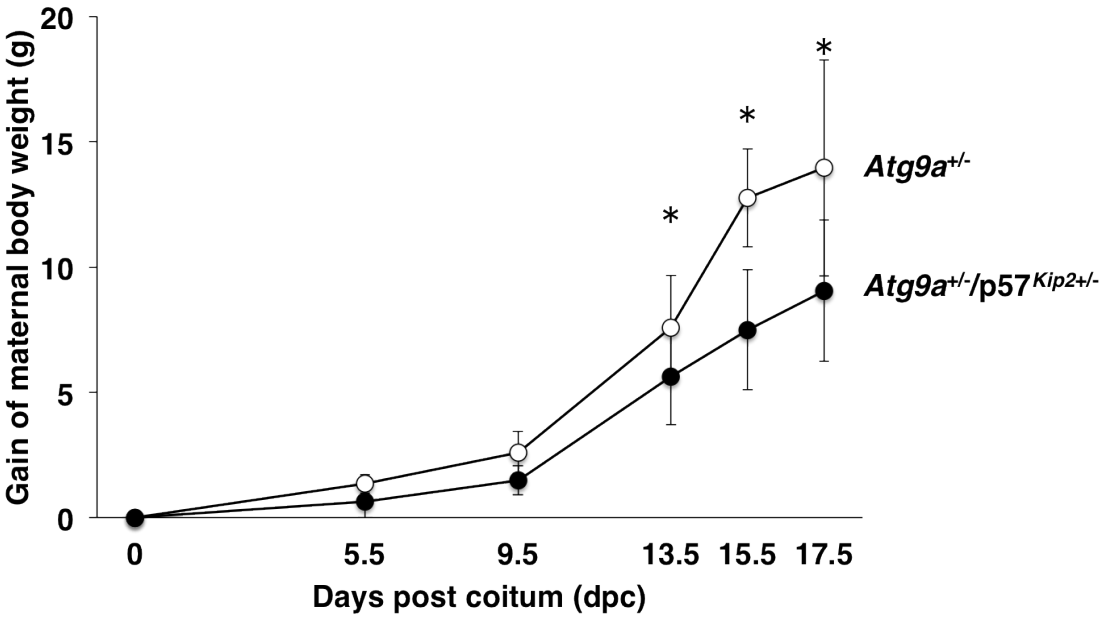

図３．妊娠中のマウス体重増加

○は *Atg9a*$^{+/-}$単独ヘテロマウス群（Group A1 および A2），●は *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$ヘテロマウス群における体重増加（Mean ± SD）を示す．妊娠前体重を基準としてその増減を示した．*は 2 群間の比較において P<0.05 であることを示す.

いずれの系統においても 9.5dpc 以降に急激な体重増加がみられた. また 13.5dpc 以降, 系統間の体重増加量に差を認めた.

（２）妊娠マウスの血圧の検討

妊娠マウスの収縮期血圧の推移を図 4 に示す．*Atg9a*$^{+/-}$単独ヘテロマウス（表 3 の Group A1 および A2）は，妊娠中に収縮期血圧の明らかな変化は呈さなかった．一方 *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$ヘテロマウス（表 3 の Group B1 および B2）の収縮期血圧（Mean ± SD）は 9.5dpc（111 ± 11.6mmHg）とそれ以降（116 ± 12.6 , 125 ± 16.2, 121 ± 12.8mmHg, それぞれ 13.5，15.5，17.5dpc）において，妊娠前の収縮期血圧（102 ± 12.0mmHg）と比べて明らかな血圧上昇が認められた．また 9.5dpc（113 ± 11.6 vs. 99 ± 9.5mmHg, *Atg9a*$^{+/-}$ vs. *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$），15.5dpc（125 ± 16.2 vs. 95 ± 10.5mmHg，*Atg9a*$^{+/-}$ vs. *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$）および 17.5dpc（121 ± 12.8 vs. 102 ± 12.1mmHg，*Atg9a*$^{+/-}$ vs. *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$）において，*Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$ヘテロマウス群で明らかな収縮期血圧の上昇が確認された．

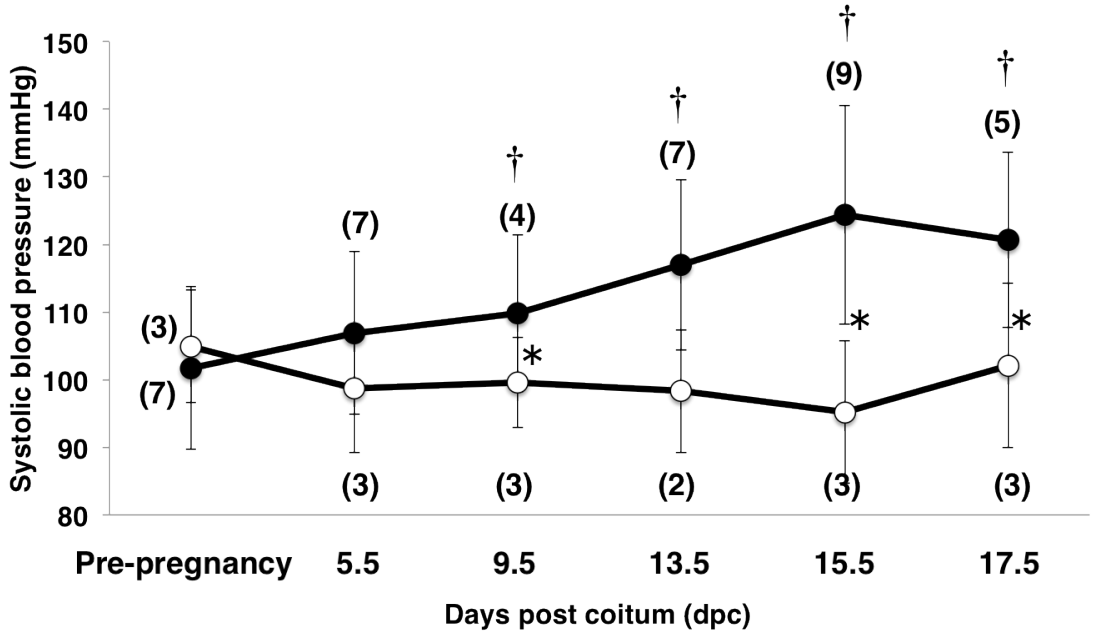

図４．妊娠マウスの収縮期血圧の推移

○は *Atg9a*$^{+/-}$単独ヘテロマウス（表 3 の Group A1 および A2）を，●は *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$ヘテロマウス（表 3 の Group B1 および B2）を示す．カッコ内の数字は妊娠マウスの数を表す．縦線は Mean ± SD を示す．

＊は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを，†は妊娠前の収縮期血圧との比較で $P<0.05$ であることを示す．9.5dpc 以降において *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$ヘテロマウス群で収縮期血圧の上昇を認めた．

（３）蛋白尿の検討

系統毎の尿蛋白定量の結果を図 5 に示す．既報と同様の結果（$p57^{Kip2+/-}$ヘテロ雌マウスは受胎産物中に $p57^{Kip2}$ を産生しない個体が存在した場合に蛋白尿を呈すること）を期待したが，$p57^{Kip2+/-}$を含むいずれの系統において明らかな蛋白尿の出現は確認できなかった．

各遺伝子型マウスの尿中アルブミン/クレアチニン比（ACR）（Mean ± SD）は妊娠前が 8.7 ± 1.6[n=6], 10.3 ± 4.1[n=5], 13.6 ± 4.7μg/mg Cr [n=7]（それぞれ $Atg9a^{+/-}$, $p57^{Kip2+/-}$, $Atg9a^{+/-}/p57^{Kip2+/-}$），13.5dpc では 8.6 ± 5.4[n=8], 12.7 ± 11.5[n=8], 12.3 ± 6.5μg/mg Cr [n=10]（$Atg9a^{+/-}$，$p57^{Kip2+/-}$，$Atg9a^{+/-}/p57^{Kip2+/-}$），17.5dpc では 9.0 ± 5.4[n=5]，20.3 ± 11.1[n=6], 11.3±1.9μg/mg Cr[n=5]（$Atg9a^{+/-}$，$p57^{Kip2+/-}$，$Atg9a^{+/-}/p57^{Kip2+/-}$）で，いずれの系統間の比較においても差を認めなかった．

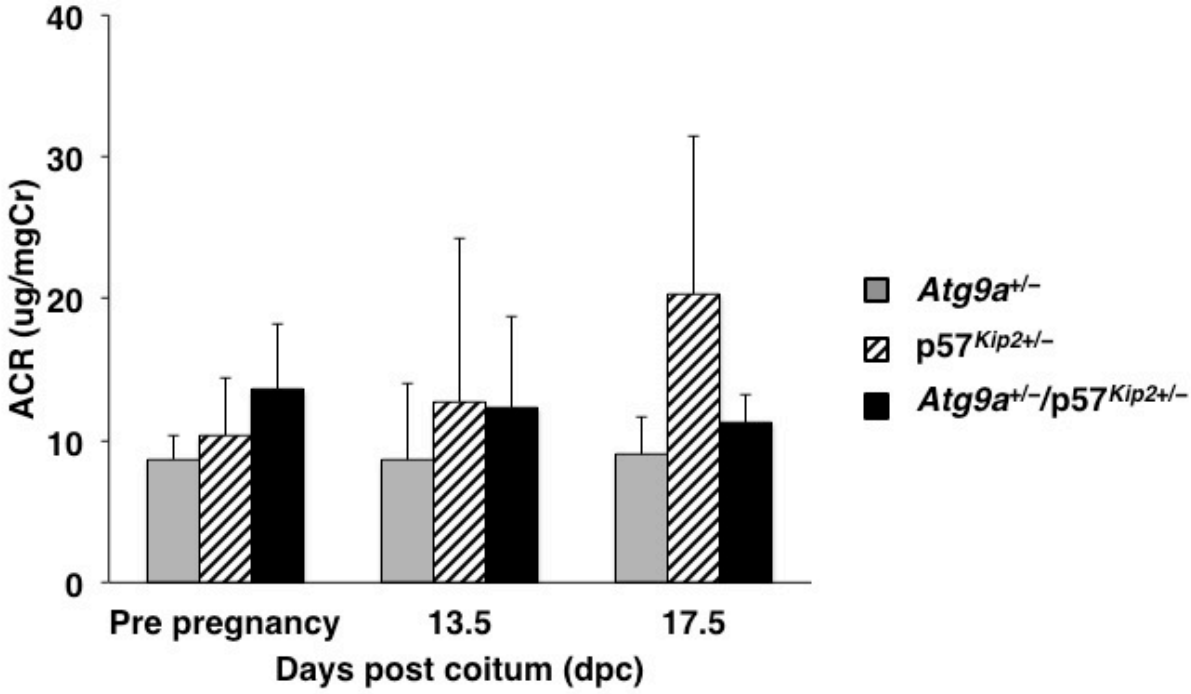

図５．妊娠中の尿中アルブミンの定量

尿蛋白の定量をアルブミン/クレアチニン比（Albumin / Creatinine ratio : ACR，　単位 μg/mgCr）で表す．妊娠前，13.5dpc，および 17.5dpc における ACR を比較した．同一系統内において妊娠週数による蛋白尿の変化は認められず，系統間の比較でも差は認められなかった．

２．　胎仔および胎盤の採取と体重の検討

（１）胎仔マウスの分類と遺伝子頻度

両遺伝子型の妊娠マウスを 13.5，15.5，および 17.5dpc にそれぞれ sacrifice することで得られた胎仔の数は，その遺伝子型別にみると *Atg9a*$^{+/+}$，*Atg9a*$^{+/-}$，*Atg9a*$^{-/-}$がそれぞれ 30%（69 / 231），53%（123 / 231）および 17%（39 / 231）であった．遺伝子型が *Atg9a*$^{-/-}$の胎仔数はメンデルの法則で予測された割合（25%）より若干低率であった．得られた胎仔を肉眼的に図 6 のように分類し，体重の検討については検体採取時に明らかに子宮内胎仔死亡（IUFD）と判定した仔は除外した．

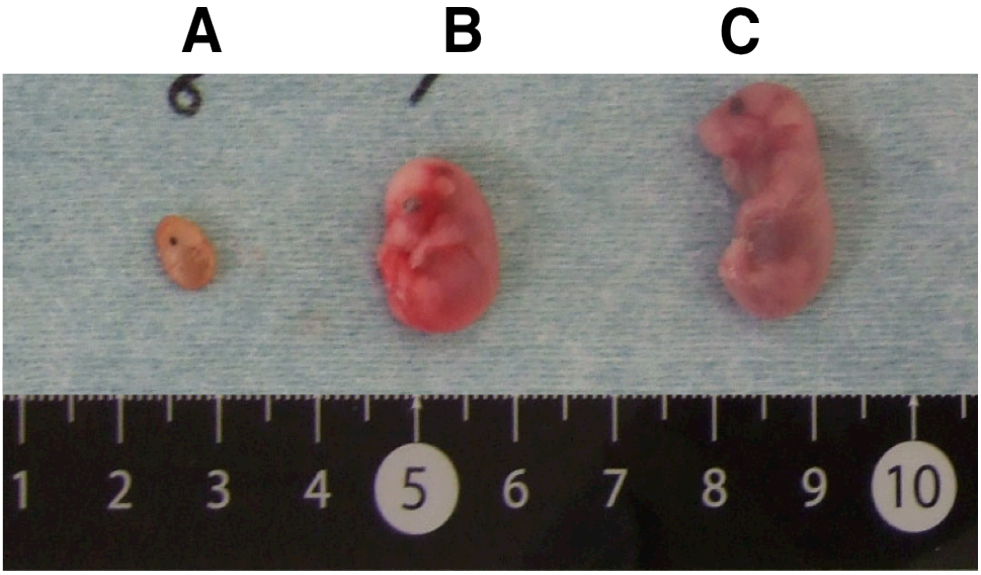

図６．胎仔の肉眼的分類

17.5dpc における胎仔の肉眼像を示す．(A) *Atg9a*$^{-/-}$の胎仔．子宮内胎仔死亡（IUFD）と判定した，(B) *Atg9a*$^{-/-}$の胎仔．生存はしているが発育不全で体重が小さい個体．(C) *Atg9a*$^{+/+}$の胎仔．正常発育を示す個体．

肉眼的に IUFD と判定した胎仔の割合は *Atg9a*$^{+/+}$，*Atg9a*$^{+/-}$，*Atg9a*$^{-/-}$の順にそれぞれ 1.4%（1/69）, 14%（17/123），および 26%（10/39）であった．IUFD の発生頻度は胎仔マウスの遺伝子型が *Atg9a*$^{+/+}$および *Atg9a*$^{+/-}$であった場合と比べ, *Atg9a*$^{-/-}$の場合において有意に高かった（26%[10/39] vs. 9.4%[18/192] , P=0.0082）．表 4 に胎仔の *Atg9a* 遺伝子型と得られた胎仔・胎盤数，および IUFD の発生頻度について示す．

表 4．*Atg9a* 遺伝子型が胎仔の子宮内胎仔死亡率に与える影響

胎仔の遺伝子型	*Atg9a* $^{+/+}$	*Atg9a* $^{+/-}$	*Atg9a* $^{-/-}$
Atg9a $^{+/-}$単独ヘテロ母マウス[血圧正常群]			
Subgroup	A1		A2
13.5 dpc (n = 4)	[12/0]	[11/3]	[4/0]
15.5 dpc (n = 4)	[21/0]	[16/3]	[10/1]
17.5 dpc (n = 5)	[14/1]	[31/2]	[2/6]
IUFD rate	2.1%	12%	30%†
Atg9a $^{+/-}$/p57$^{Kip2\ +/-}$ヘテロ母マウス[高血圧群]			
Subgroup	B1		B2
13.5 dpc (n = 2)	[3/0]	[8/0]	[5/0]
15.5 dpc (n = 6)	[9/0]	[24/4]	[3/1]
17.5 dpc (n = 5)	[9/0]	[16/5]	[5/2]
IUFD rate	0.0%	16%	19%
総胎仔数	69 [68/1]	123 [106/17]	39 [29/10]
IUFD 率	1.4%	14%*	26%†

†, P < 0.05 vs. *Atg9a* $^{+/+}$ and *Atg9a* $^{+/-}$.
*, P < 0.05 vs. *Atg9a* $^{+/+}$.

[ ]内はそれぞれの遺伝子型の胎仔における生存／死亡数を示す．メンデルの法則に従うと *Atg9a* $^{+/+}$, *Atg9a* $^{+/-}$, and *Atg9a* $^{-/-}$の個体が得られる割合はそれぞれ 25%，50%，25%である．母マウス 1 匹あたりの平均胎仔数（Mean±SD）は *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$ヘテロマウス群に比べ，*Atg9a*$^{+/-}$単独ヘテロマウス群で多かった（9.4±2.1 vs. 7.2±1.9, *Atg9a*$^{+/-}$ heterozygous mice vs. *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$ heterozygous mice, P<0.05）.

（２）*Atg9a* 遺伝子型による胎盤 *Atg9a* mRNA の発現量

胎盤における *Atg9a* mRNA の発現量は *Atg9a* の遺伝子型によって差が認められた．15.5dpc に採取した胎盤における胎仔・胎盤の遺伝子型と *Atg9a* mRNA の発現量の関係を図 7 に示す．*Atg9a*$^{-/-}$の胎盤における *Atg9a* mRNA の発現量（1.3 ± 0.6，Mean ± SD）は，*Atg9a*$^{+/+}$胎盤（17.9 ± 7.9）および *Atg9a*$^{+/-}$胎盤（11.2 ± 0.6）と比較して明らかに低下していることが確認された（17.9 ± 7.9 vs. 1.3 ± 0.6 および 11.2 ± 0.6 vs. 1.3 ± 0.6，それぞれ *Atg9a*$^{+/+}$ vs. *Atg9a*$^{-/-}$および *Atg9a*$^{+/-}$ vs. *Atg9a*$^{-/-}$）．一方で *Atg9a*$^{+/+}$胎盤と *Atg9a*$^{+/-}$胎盤の *Atg9a* mRNA の発現量には有意な差を認めなかった．

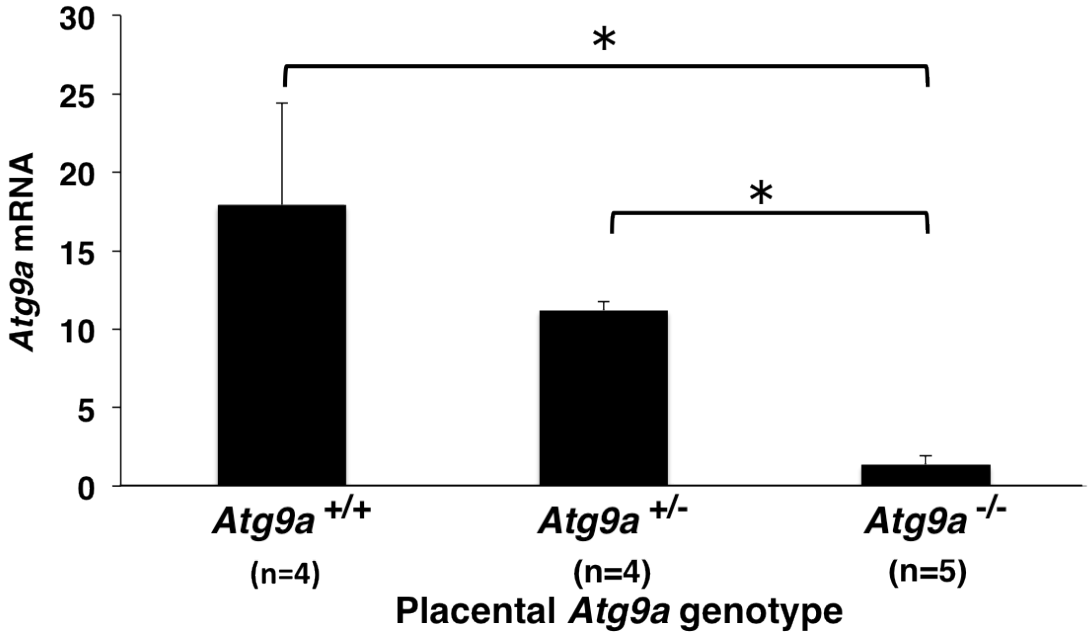

図７．胎仔遺伝子型と胎盤 *Atg9a* mRNA 発現量の関係

15.5dpc で sacrifice した *Atg9a*$^{+/-}$単独ヘテロマウスから得た胎盤（Group A1 および A2）について，*Atg9a* の遺伝子型によって 3 つのグループに分類し，それぞれの胎盤における *Atg9a* mRNA の発現量を Real-time PCR を用いて解析した．胎盤 *Atg9a* mRNA 発現量は *Atg9a*$^{+/+}$と *Atg9a*$^{+/-}$では差を認めなかったが，*Atg9a*$^{-/-}$胎盤では有意に発現量が低下していた．*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す．

（３）胎仔の遺伝子型と体重の検討

母マウスの高血圧の有無でみた胎仔発育の比較（Group A1+A2 と B1+B2 の比較）を図８に示す．胎仔体重は母マウスが高血圧を呈した群（Group B1 および B2）では高血圧を発症しない群（Group A1 および A2）と比べ，全ての妊娠ステージにおいて有意に小さかった．胎仔体重（Mean ± SD）はそれぞれ，13.5dpc で 0.23 ± 0.05 vs. 0.17 ± 0.02 g（Group A1+A2 vs. Group B1+B2）, 15.5dpc で 0.57 ± 0.12 vs. 0.49 ± 0.15g, 17.5dpc で 1.0 ± 0.24 vs. 0.86 ± 0.2g であった．

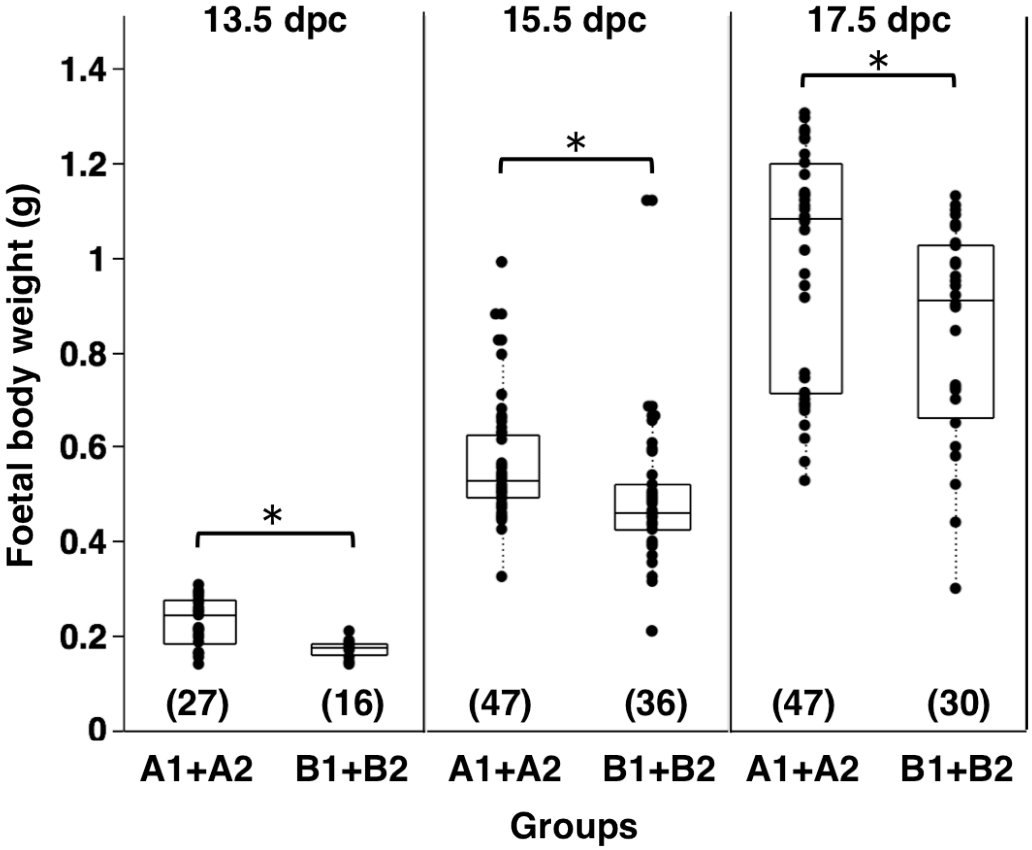

図８. 母マウスの高血圧の有無でみた胎仔発育の比較（Group A1+A2 と B1+B2 の比較）
*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す．箱ひげ図の中央線は Median，箱の上端は 75%，下端は 25%の分位点をそれぞれ示す．ひげは IQR（Interquartile range）の 1.5 倍を，それより上下にあるものははずれ値を示す．カッコ内は測定した胎仔の数を示す．

また胎仔の遺伝子型で比較すると，図 9 に示す通り胎仔体重（Mean ± SD）は *Atg9a*$^{-/-}$ の胎仔（Group A2 および B2）では *Atg9a*$^{+/+}$および *Atg9a*$^{+/-}$の胎仔（Group A1 および B1）と比べ，13.5dpc（0.22 ± 0.05 vs. 0.17 ± 0.03g，Group A1+B1 vs. Group A2+B2）および 17.5dpc（0.97 ± 0.22 vs. 0.65 ± 0.15g，Group A1+B1 vs. Group A2+B2）において有意に小さかった．

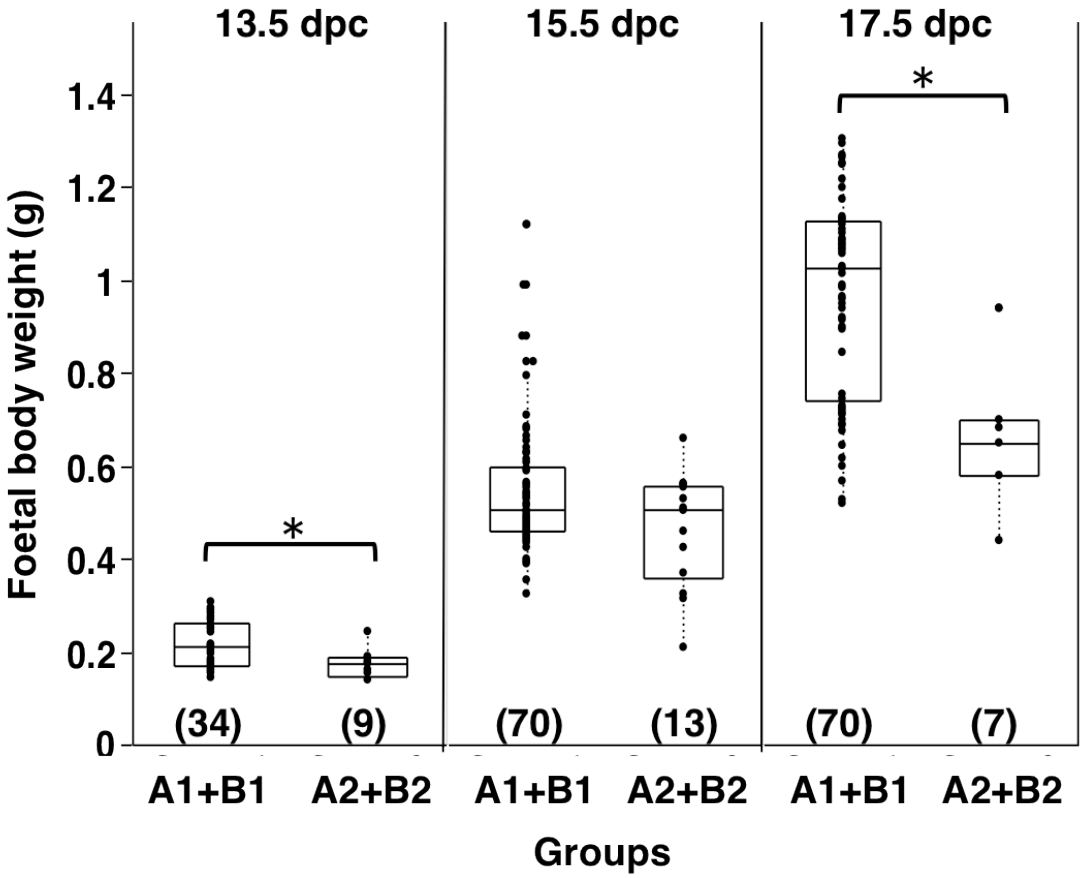

図９．胎仔の遺伝子型別にみた胎仔体重の比較（Group A1+B1 と A2+B2 の比較）
*は 2 群間の比較において *P*<0.05 であることを示す．箱ひげ図の中央線は Median，箱の上端は 75%，下端は 25%の分位点をそれぞれ示す．ひげは IQR（Interquartile range）の 1.5 倍を，それより上下にあるものははずれ値を示す．カッコ内は測定した胎仔の数を示す．

さらに，図 10 に示す通り，この胎仔体重の差は母マウスが妊娠中に高血圧を呈した場合より顕著であった．すなわち，母マウスが高血圧を呈しない群では全ステージにおいて胎仔体重に差を認めなかった（*Atg9a*$^{+/+}$および *Atg9a*$^{+/-}$ vs. *Atg9a*$^{-/-}$, Group A1 vs. Group A2）のに対し，高血圧を呈する群では胎仔体重は 15.5 および 17.5dpc において *Atg9a*$^{+/+}$および *Atg9a*$^{+/-}$の群（Group B1）と比べ *Atg9a*$^{-/-}$の群（Group B2）で明らかに小さかった. 胎仔体重（Mean ± SD）は GroupA1, A2, B1, B2 の順に 13.5dpc では 0.24 ± 0.05, 0.18 ± 0.05, 0.18 ± 0.02, 0.17 ± 0.02g, 15.5dpc で 0.58 ± 0.13, 0.53 ± 0.07, 0.51 ± 0.14, 0.30 ± 0.08g，17.5dpc で 1.0 ± 0.24, 0.81 ± 0.18, 0.92 ± 0.17, 0.59 ± 0.10g であった.

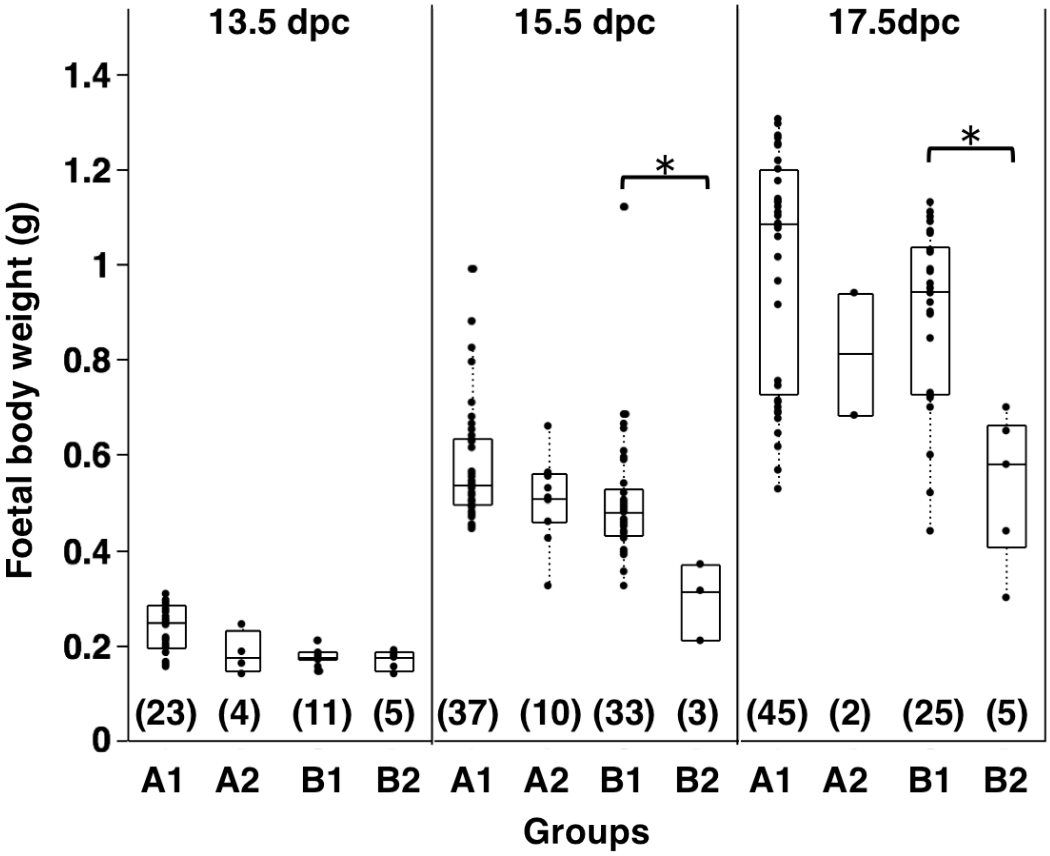

図 10. 母および胎仔の遺伝子型のグループ別にみた胎仔体重の比較

*は 2 群間の比較において P<0.05 であることを示す．箱ひげ図の中央線は Median，箱の上端は 75%，下端は 25%の分位点をそれぞれ示す．ひげは IQR（Interquartile range）の 1.5 倍を，それより上下にあるものははずれ値を示す．カッコ内は測定した胎仔の数を示す.

３．マウス胎盤におけるオートファジー関連遺伝子および関連蛋白の発現

実験に使用したマウス系統およびその胎盤は，以下の４つの Group に分類し，解析に用いた．

表５．母マウスの遺伝子型と胎仔・胎盤の遺伝子型の分類

	母マウスの遺伝子型		胎盤の遺伝子型	
	Atg9a	$p57^{Kip2(mat./pat.)}$	*Atg9a*	$p57^{Kip2(mat./pat.)}$
Group Ⅰ	[+/+]	[+/+]	[+/+]	[+/+]
Group Ⅱ	[+/+]	[+/−]	[+/+]	[+/+*] or [−/+*]
Group Ⅲ	[+/−]	[+/+]	[−/−]	[+/+]
Group Ⅳ	[+/−]	[+/−]	[−/−]	[+/+*] or [−/+*]

（１）Group1: Wild type（WT）マウス胎盤におけるオートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA，ならびに関連蛋白の発現解析

① オートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス（*Atg9a*, *Atg9b*, *Nos3*）mRNA の発現（図 11）

WT マウス胎盤では *Atg9a* の発現量は妊娠週数によって差を認めなかったが，*Atg9b* の発現量（Mean ± SD）は 13.5dpc と 17.5dpc の間（0.3 ± 0.9[n=7] vs. 7.7 ± 1.9[n=13], 13.5dpc vs. 17.5dpc）および 15.5dpc と 17.5dpc の間（1.3 ± 0.6[n=8] vs. 7.7 ± 1.9[n=13], 15.5dpc vs. 17.5dpc）でそれぞれ有意差を認め，妊娠の進行にともなう発現量の増加を認めた．

一方で *Nos3* は 13.5dpc と 17.5dpc の間（35.3 ± 4.5[n=7] vs. 22.6 ± 4.7[n=13], 13.5dpc vs. 17.5dpc）および 15.5dpc と 17.5dpc の間（32.4 ± 9.4[n=8] vs. 22.6 ± 4.7[n=13], 15.5dpc vs. 17.5dpc）でそれぞれ有意差を認め，妊娠の進行とともに発現量の減少を認めた．

② オートファジー関連蛋白（Atg9b, LC3-II, p62）の発現（図 12）

Atg9b 蛋白の発現量は妊娠期間によって差を認めなかった（97.3 ± 31.1[n=7] vs. 108.1 ± 50.7[n=12], 13.5dpc vs. 17.5dpc, Mean ± SD）．また LC3-II（136.9 ± 16.4[n=5] vs. 122.3 ± 65.4[n=11], 13.5dpc vs. 17.5dpc）および p62（16.8 ± 10.9[n=6] vs. 14.6 ± 16.7[n=12], 13,5dpc vs. 17.5dpc）の発現量にも変化を認めなかった．

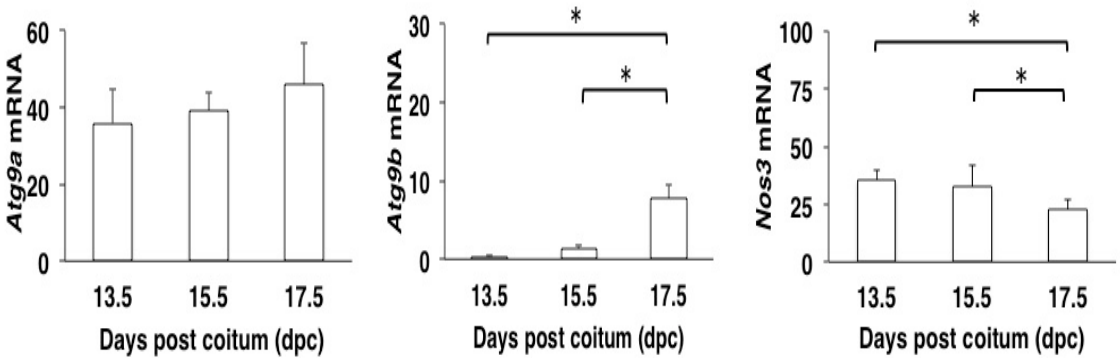

図 11. Group I 胎盤におけるオートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA の発現

左から順に *Atg9a*，*Atg9b*，*Nos3* mRNA の発現量を示す．*Atg9a* の発現量は変化しないが，妊娠の経過とともに *Atg9b* の発現量は増加し，*Nos3* の発現量が減少している．
*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す．

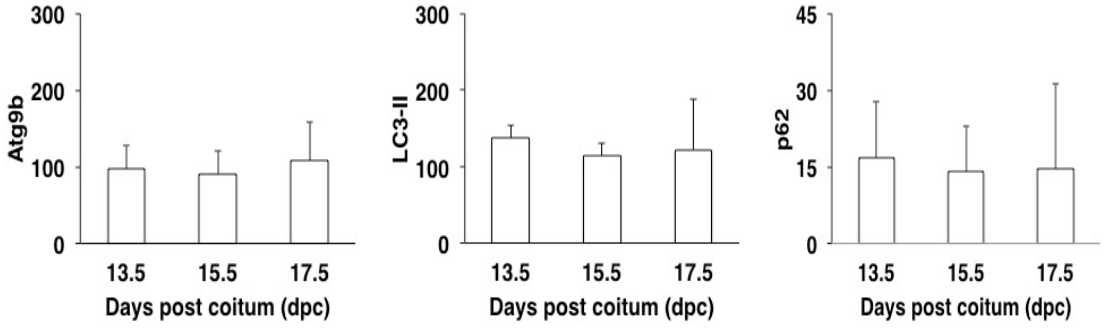

図 12. Group I 胎盤におけるオートファジー関連蛋白の発現

左から順に Atg9b，LC3-II，p62 の発現量を示す．いずれの蛋白も妊娠経過による発現量の変化は認めなかった．

（２）Group II : p57$^{Kip2+/-}$マウス胎盤におけるオートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA，ならびに関連蛋白の発現解析

① オートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス（*Atg9a*, *Atg9b*, *Nos3*）mRNA の発現（図 13）

Atg9a の発現量（Mean ± SD）は 13.5dpc と 15.5dpc の間（13.8 ± 9.0 vs. 39.2 ± 4.8, 13.5dpc vs. 15.5dpc）および 13.5dpc と 17.5dpc の間（13.8 ± 9.0 vs. 45.8 ± 10.8, 13.5dpc vs. 17.5dpc）で有意差を認め，妊娠経過とともに発現量の増加を認めた.

Atg9b は 13.5dpc と 17.5dpc の間（4.0 ± 2.5[n=16] vs. 12.0 ± 2.9 [n=14]）および 15.5dpc と 17.5dpc の間（1.7 ± 1.3[n=15] vs. 12.0 ± 2.9 [n=14]）においてそれぞれ差を認め，妊娠の進行とともに発現量が増加していた.

Nos3 は 13.5dpc と 17.5dpc の間（58.2 ± 14.2[n=16] vs. 21.3 ± 4.7 [n=14]，13.5dpc vs. 17.5dpc），および 15.5dpc と 17.5dpc の間（58.5 ± 16.6[n=15] vs. 21.3 ± 4.7 [n=14], 15.5dpc vs. 17.5dpc）でそれぞれ差を認め，妊娠の進行とともに発現量が減少していた.

② オートファジー関連蛋白（Atg9b, LC3-II, p62）の発現（図 14）

Atg9b 蛋白は妊娠の進行による発現量の増加を認めなかった（134.1 ± 94.8[n=8] vs. 168.7 ± 67.9[n=9], 13.5dpc vs. 17.5dpc, Mean ± SD）.

LC3-II の妊娠期間による発現量には統計学的有意差を認めなかったが, 15.5dpc から 17.5dpc にかけて発現量が増加する傾向がみられた（173.7 ± 56.7[n=15], 178.1 ± 66.8[n=23], 198.4 ± 82.4[n=11], それぞれ 13.5dpc, 15.5dpc, 17.5dpc）.

その一方で p62 は 13.5dpc と 15.5dpc の間（13.8 ± 6.3[n=8] vs. 5.7 ± 3.6 [n=8], 13.5dpc vs. 15.5dpc）および 13.5dpc と 17.5dpc の間（13.8 ± 6.3[n=8] vs. 4.3 ± 3.0 [n=17], 13.5dpc vs. 17.5dpc）でそれぞれ差を認め，妊娠の進行とともに発現量の減少を認めた.

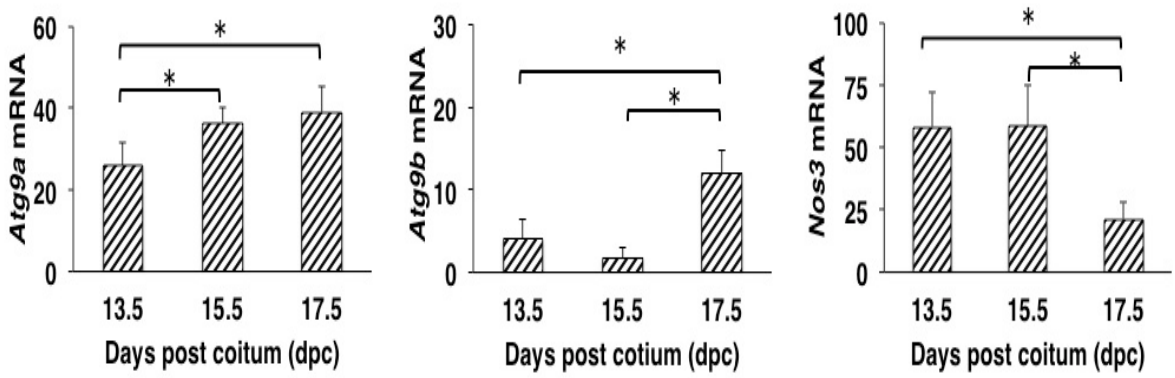

図 13.　Group II 胎盤におけるオートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA の発現

左から *Atg9a*, *Atg9b*, *Nos3* mRNA の発現量を示す. 妊娠の進行とともに *Atg9a* と *Atg9b* は発現量が増加，一方で *Nos3* は減少を認めた．*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す.

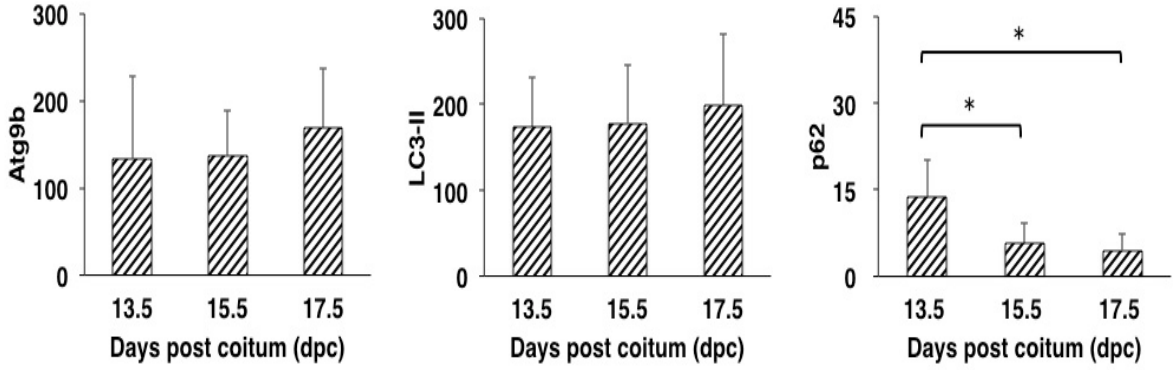

図 14.　Group II 胎盤におけるオートファジー関連蛋白の発現

左から順に Atg9b，LC3-II，p62 の発現量を示す．Atg9b，LC3-II の発現量はそれぞれ増加する傾向は見られたが, 有意差は得られなかった. 一方 p62 は 13.5dpc から 15.5dpc にかけて発現量の低下が認められた．*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す.

（３）Group III : *Atg9a*$^{+/-}$マウス胎盤におけるオートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA，ならびに関連蛋白の発現解析

① オートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス（*Atg9a*, *Atg9b*, *Nos3*）mRNA の発現（図 15）

Atg9a の発現量（Mean ± SD）は 13.5dpc で 2.2 ± 0.8[n=4], 15.5dpc で 1.3 ± 0.6[n=5], 17.5dpc で 3.65 ± 0.9[n=5]となり，妊娠期間による差を認めなかった．

Atg9b は 13.5dpc と 15.5dpc の間（1.6 ± 0.5[n=4] vs. 3.4 ± 0.9[n=7], 13.5dpc vs. 15.5dpc）および 13.5dpc と 17.5dpc の間（1.6 ± 0.5[n=4] vs. 6.2 ± 2.1[n=6], 13.5dpc vs. 17.5dpc）に差を認め，妊娠の進行による発現量の増加を認めた．

一方 *Nos3* は 13.5dpc と 17.5dpc の間で差を認め（18.4 ± 1.5[n=4] vs. 3.8 ± 5.1[n=5], 13.5dpc vs. 17.5dpc），妊娠の進行による発現量の減少を認めた．

② オートファジー関連蛋白（Atg9b, LC3-II, p62）の発現（図 16）

Atg9b 蛋白の発現量（Mean ± SD）は 13.5dpc が 97.3 ± 21.1[n=3], 15.5dpc で 93.5 ± 28.8[n=3], 17.5dpc で 86.4 ± 18.6[n=5]であり，妊娠期間による発現量の変化は認めなかった．

LC3-II 蛋白も妊娠期間による発現量の変化を認めなかった（81.8 ± 8.2[n=3], 80.5 ± 17.5[n=3], 88.3 ± 12,4[n=5], それぞれ 13.5dpc, 15.5dpc, 17.5dpc）．

同様に p62 蛋白についても妊娠期間による発現量の変化は認めなかった（161.9 ± 101.7[n=3], 75.4 ± 11.3[n=3], 90.8 ± 31.3[n=5], それぞれ 13.5dpc, 15.5dpc, 17.5dpc）．

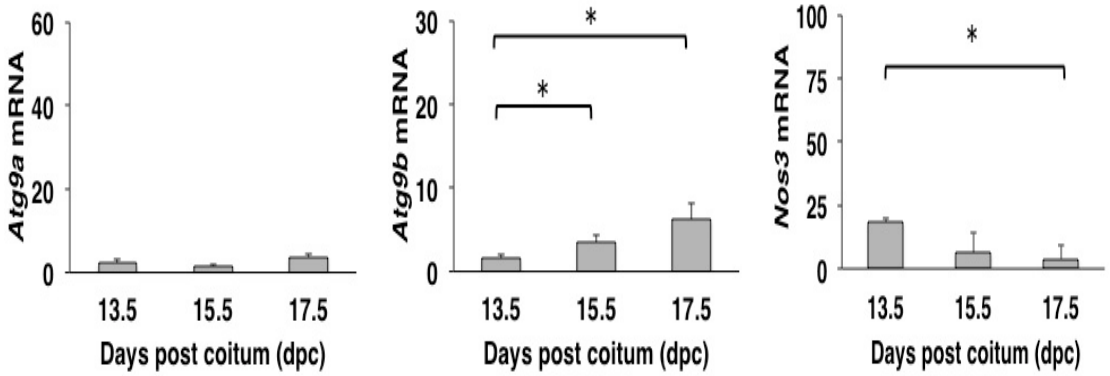

図 15. Group III 胎盤におけるオートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA の発現

左から *Atg9a*，*Atg9b*，*Nos3* mRNA の発現量を示す．妊娠の進行とともに，*Atg9b* は発現量が増加，一方で *Nos3* は減少を認めた．*Atg9a* の発現量には変化を認めなかった．*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す．

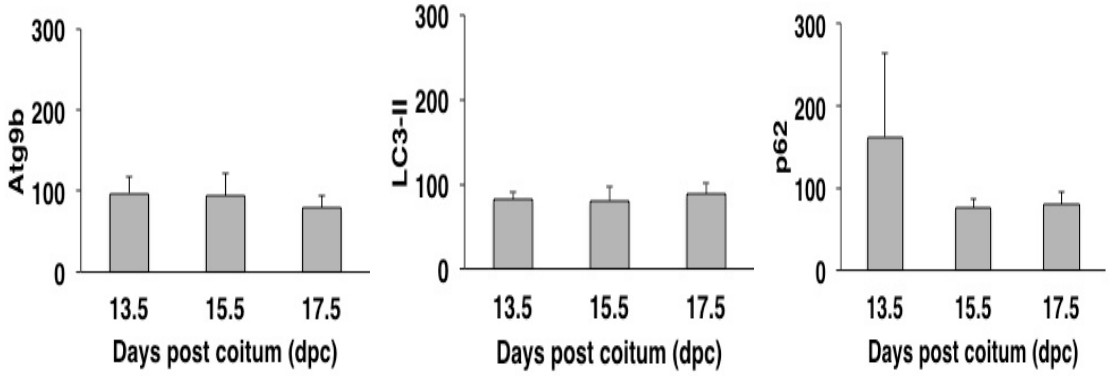

図 16. Group III 胎盤におけるオートファジー関連蛋白の発現

左から順に Atg9b，LC3-II，p62 の発現量を示す．いずれの蛋白も妊娠経過による発現量の変化は認めなかった．*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す．

（４）Group IV : *Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$ヘテロマウス胎盤におけるオートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA，ならびに関連蛋白の発現解析

① オートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス（*Atg9a*, *Atg9b*, *Nos3*）mRNA の発現（図 17）

Atg9a mRNA の発現量（Mean ± SD）は 13.5dpc で 0.2 ± 0.1[n=5], 15.5dpc で 0.2 ± 0.1[n=3], 17.5dpc で 0.3 ± 0.1[n=7]であり，妊娠期間による発現量の差を認めなかった．

Atg9b は 13.5dpc と 15.5dpc の間（1.3 ± 0.3[n=5] vs. 3.1 ± 1.1[n=3], 13.5dpc vs. 15.5dpc）および 13.5dpc と 17.5dpc の間（1.3 ± 0.3[n=5] vs. 6.2 ± 1.3[n=7], 13.5dpc vs. 17.5dpc）にそれぞれ有意差を認め，妊娠の進行による発現量の増加を認めた．

Nos3 は 13.5dpc と 15.5dpc の間（18.9 ± 2.9[n=5] vs. 5.9 ± 4.5[n=5], 13.5dpc vs. 15.5dpc）および 13.5dpc と 17.5dpc の間（18.9 ± 2.9[n=4] vs. 8.5 ± 3.0[n=7], 13.5dpc vs. 17.5dpc）でそれぞれ有意差を認め，妊娠の進行による発現量の減少を認めた．

② オートファジー関連蛋白（Atg9b, LC3-II, p62）の発現（図 18）

Atg9b の発現量（Mean ± SD）は 13.5dpc で 126.5 ± 20.5[n=3], 15.5dpc で 119.4 ± 50.0[n=4], 17.5dpc で 126.2 ± 21.5[n=7]で，妊娠の進行による変化を認めなかった．

LC3-II は 13.5dpc と 17.5dpc の間（93.9 ± 5.0[n=3] vs. 126.3 ± 24.6[n=7], 13.5dpc vs. 17.5dpc）, および 15.5dpc と 17.5dpc の間（96.1 ± 8.1[n=4] vs. 126.3 ± 24.6[n=7], 15.5dpc vs. 17.5dpc）でそれぞれ有意差を認め，妊娠の進行にともなう発現量の増加を認めた．

一方 p62 は 13.5 と 15.5dpc の間（236.9 ± 35.2[n=3] vs. 119.6 ± 6.6[n=4], 13.5dpc vs. 15.5dpc）および 13.5 と 17.5dpc の間（236.9 ± 35.2[n=3] vs. 158.7 ± 19.0[n=7], 13.5dpc vs. 17.5dpc）にそれぞれ有意差を認め，妊娠の進行とともに発現量の減少を認めた．

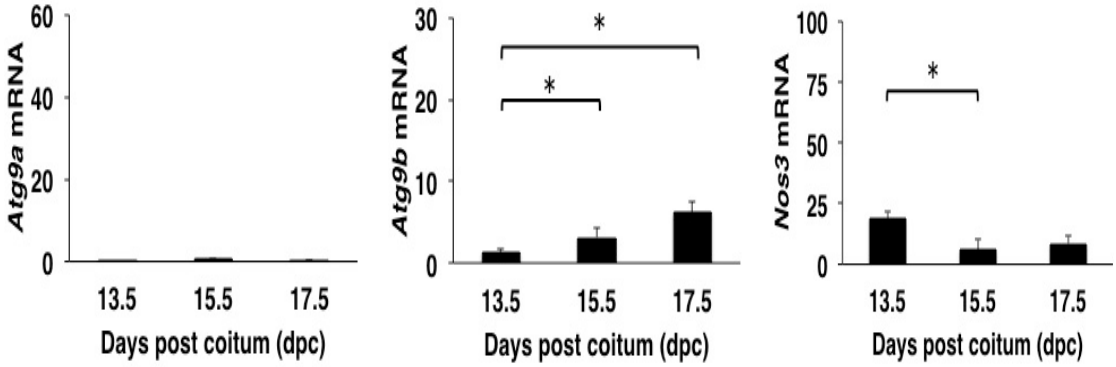

図 17.　Group IV 胎盤におけるオートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA の発現

左から *Atg9a*，*Atg9b*，*Nos3* mRNA の発現量を示す．*Atg9a* の発現は抑えられていた．*Atg9b* は妊娠期間とともに発現量が増加する一方, *Nos3* は 13.5dpc から 15.5dpc にかけて発現量の低下が認められた．*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す.

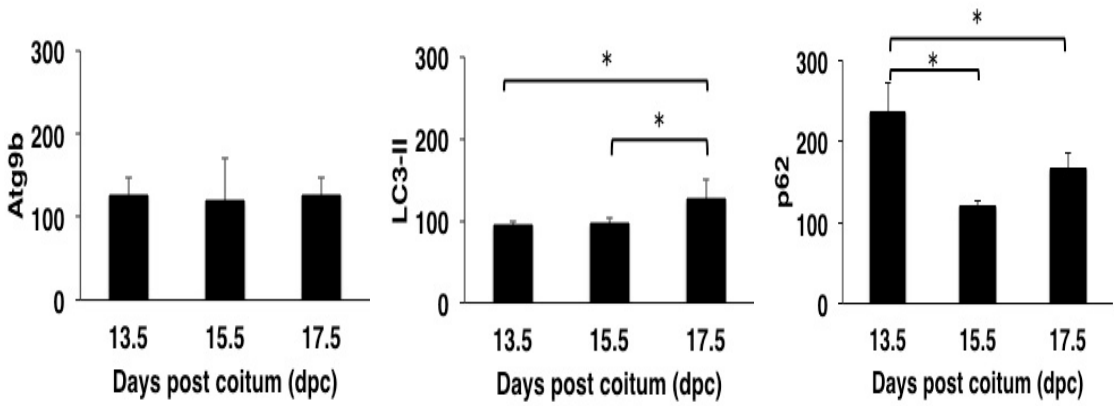

図 18.　Group IV 胎盤におけるオートファジー関連蛋白の発現

左から順に Atg9b，LC3-II，p62 の発現量を示す．Atg9b の発現量には変化がなかったが，LC3-II は 15.5dpc から 17.7dpc にかけて発現量の増加が認められた．一方 p62 は 13.5dpc から 15.5dpc にかけて発現量の低下が認められた．*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す.

（５）Group 間の比較

① オートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA の発現

１）Group I と II の比較（図 19-1）

Group I と II の比較において，*Atg9a* mRNA の発現量（Mean ± SD）は 13.5dpc で 35.9 ± 9.0[n=5] vs. 26.0 ± 5.7[n=5]，15.5dpc で 39.2 ± 4.8[n=5] vs. 36.1 ± 4.0[n=5], 17.5dpc で 45.9 ± 10.8[n=5]vs. 38.9 ± 6.6[n=5]（それぞれ Group I vs. Group II）であり，いずれの妊娠ステージにおいても発現量の差を認めなかった．

Atg9b は 13.5dpc（0.3 ± 0.9[n=7] vs. 4.0 ± 2.5[n=16], Group I vs. Group II）および 17.5dpc（7.7 ± 1.9[n=13] vs. 12.0 ± 2.9 [n=14], Group I vs. Group II）において差を認め，Group II の発現量が多く認められた．

Nos3 は 13.5dpc（35.3 ± 4.5[n=7] vs. 58.2 ± 14.2[n=16], Group I vs. Group II）と 15.5dpc（32.4 ± 9.4[n=8] vs. 58.5 ± 16.6[n=15], Group I vs. Group II）では Group II の方が発現量が多く認められたが，17.5dpc（22.6 ± 4.7[n=13] vs. 21.3 ± 6.9[n=14], Group I vs. Group II）では両群に差を認めなかった．

２）Group I と III の比較（図 19-2）

Group I と III の比較において，*Atg9a* mRNA の発現量（Mean ± SD）は 13.5dpc で 35.8 ± 9.0[n=5] vs. 2.2 ± 0.8[n=3]（Group I vs. Group III），15.5dpc で 39.2 ± 4.8[n=5] vs. 1.3 ± 0.6[n=10]，17.5dpc では 45.8 ± 10.8[n=5] vs. 3.6 ± 0.9[n=6] （Group I vs. Group III）とそれぞれ有意差を認め，すべての妊娠ステージにおいて Group III の発現量の低下を認めた．

Atg9b の発現量は 15.5dpc でのみ GroupIII の発現量の増加を認め（1.3 ± 0.6[n=8] vs. 3.4 ± 0.9[n=10], Group I vs. Group III），13.5dpc（0.3 ± 0.1[n=7] vs. 1.6 ± 0.5[n=3] , Group I vs. Group III）および 17.5dpc（7.7 ± 1.9[n=13] vs. 6.2 ± 2.1[n=6] , Group I vs. GroupIII）においては差を認めなかった．

一方で *Nos3* の発現量は 13.5dpc で 35.3 ± 4.5[n=7] vs. 18.4 ± 1.5[n=3]，15.5dpc で 32.4 ± 9.4[n=8] vs. 6.4 ± 7.9[n=10]，17.5dpc では 22.6 ± 9.4 [n=13] vs. 3.8 ± 5.1[n=6] （それぞれ Group I vs. Group III）とそれぞれ有意差を認め，すべての妊娠ステージにおいて Group III の発現量の低下を認めた．

３）Group II と Group IV の比較（図 19-3）

Group II と IV の比較において，*Atg9a* mRNA の発現量（Mean ± SD）は 13.5dpc で 26.0 ± 5.7[n=5] vs. 0.2 ± 0.1[n=5]（Group II vs. Group IV），15.5dpc で 36.1 ± 4.1[n=5] vs. 0.6 ± 0.1[n=3]（Group II vs. Group IV），および 17.5dpc では 38.9 ± 6.6[n=5] vs. 0.3 ± 0.1[n=7]

（Group II vs. Group IV）でそれぞれ有意差を認め，すべての妊娠ステージにおいて Group IV の発現量が低下していた．

Atg9b の mRNA 発現量は 13.5dpc（4.0 ± 2.5[n=16] vs. 1.3 ± 0.3[n=5], Group II vs. Group IV）と 17.5dpc（12.0 ± 2.9[n=14] vs. 6.2 ± 1.3[n=7]，Group II vs. Group IV）においてそれぞれ有意差を認め，Group II の方が高い発現量を示したが，15.5dpc においては差を認めなかった（1.7 ± 1.2[n=15] vs. 3.1 ± 1.1[n=3]，Group II vs. Group IV）．

Nos3 は 13.5dpc, 15.5dpc, 17.5dpc のすべてのステージで２群間に差を認め，Group IV の発現量の方が低かった（58.2 ± 14.2[n=16] vs. 18.9 ± 2.9[n=5], 58.5 ± 16.6[n=15] vs. 5.9 ± 4.5[n=3], 21.3 ± 6.9[n=14] vs. 8.5 ± 3.0[n=7], Group II vs. Group IV，それぞれ 13.5dpc, 15.5dpc, 17.5dpc）．

４）Group III と Group IV の比較（図 19-4）

Group III と Group IV の比較において *Atg9a* はいずれの群も抑制されていた．*Atg9b* mRNA の発現量（Mean ± SD）は 13.5dpc で 1.6 ± 0.5[n=3] vs. 1.3 ± 0.3[n=5]，15.5dpc で 3.4 ± 0.9[n=10] vs. 3.1 ± 1.1[n=3]，17.5dpc で 6.2 ± 2.1[n=6]vs. 6.2 ± 1.3[n=7]（それぞれ Group III vs. Group IV）で, すべての妊娠ステージにおいて両群間で差を認めなかった．

Nos3 の発現量も 13.5dpc で 18.4 ± 1.5[n=3] vs. 18.9 ± 2.9[n=5]，15.5dpc で 6.4 ± 7.9[n=10] vs. 5.9 ± 4.5[n=3], 17.5dpc で 3.8 ± 5.1[n=6]vs. 8.5 ± 3.0[n=7]（それぞれ Group III vs. Group IV）であり，すべての妊娠ステージにおいて両群間には差を認めなかった．

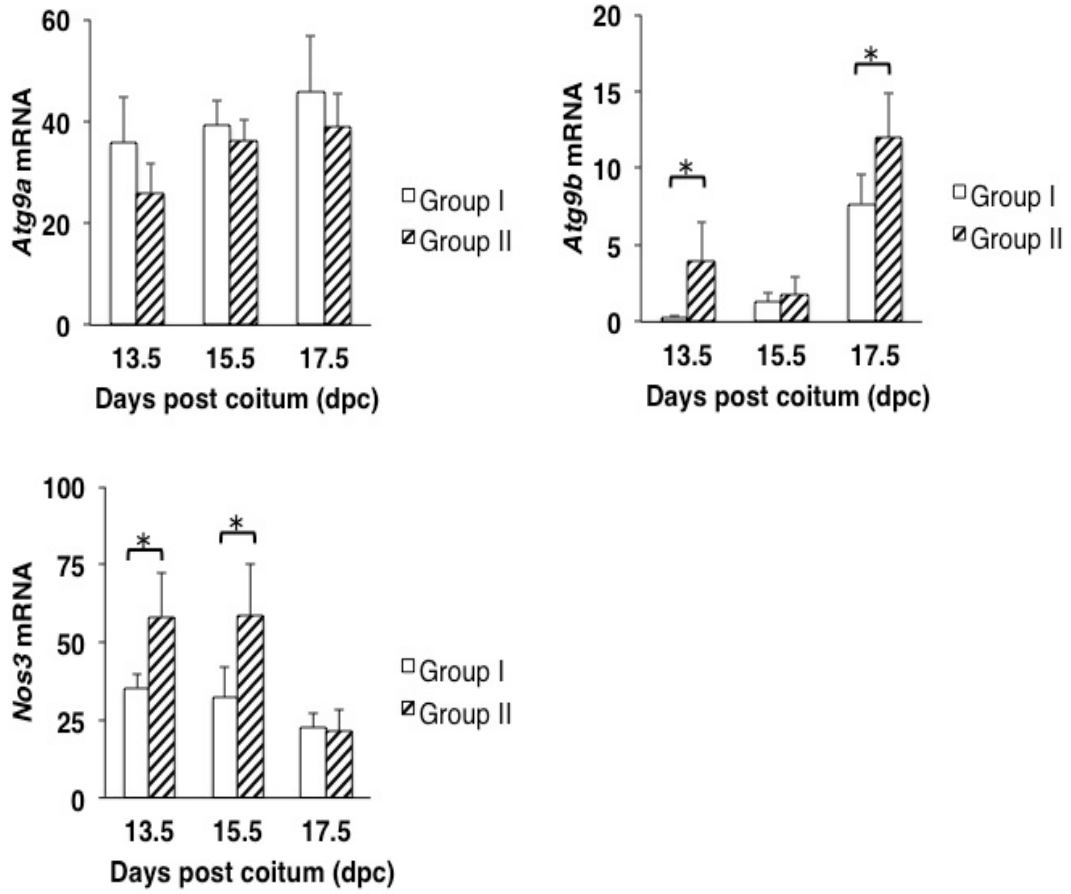

図 19-1. オートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA 発現の比較
(Group I vs. Group II)
上段左から順に *Atg9a*，*Atg9b*，下段は *Nos3* mRNA の発現量の比較を示す．*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す.

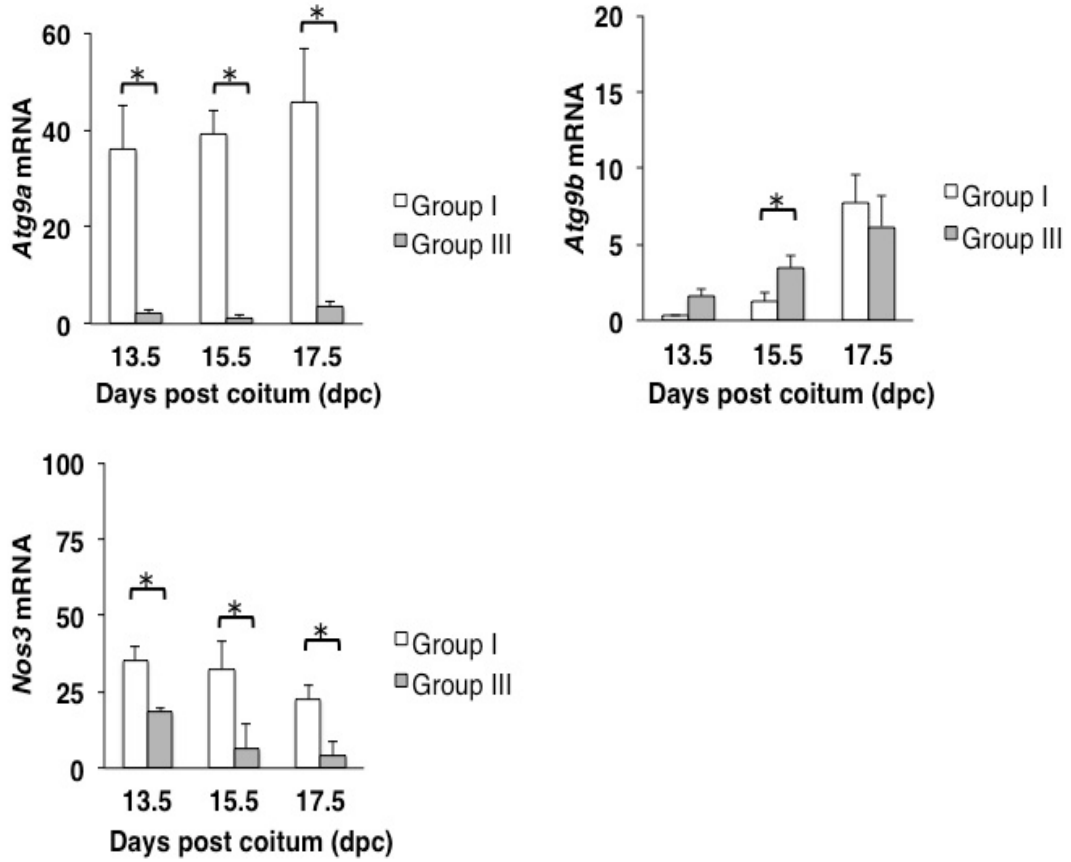

図 19-2. オートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA 発現の比較
(Group I vs. Group III)
上段左から順に *Atg9a*，*Atg9b*，下段は *Nos3* mRNA の発現量の比較を示す．*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す.

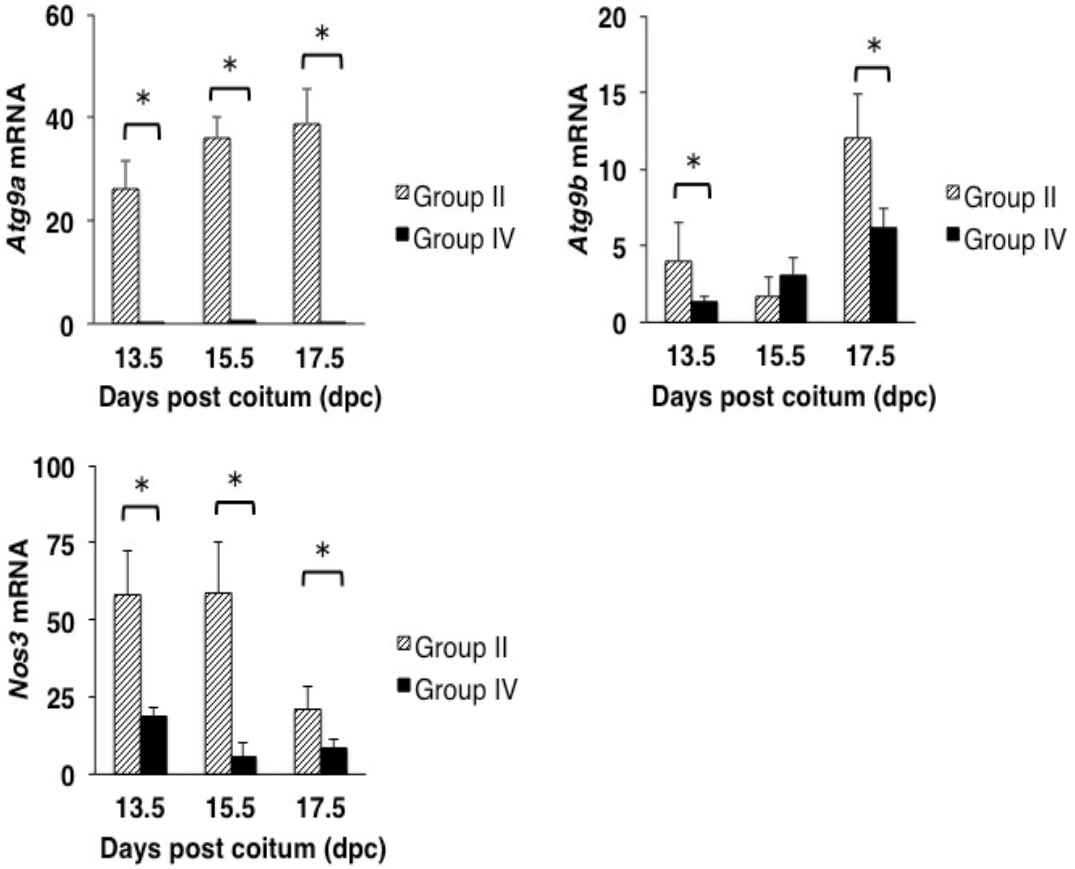

図 19-3. オートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA 発現の比較
(Group II vs. Group IV)
上段左から順に *Atg9a*，*Atg9b*，下段は *Nos3* mRNA の発現量の比較を示す．*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す.

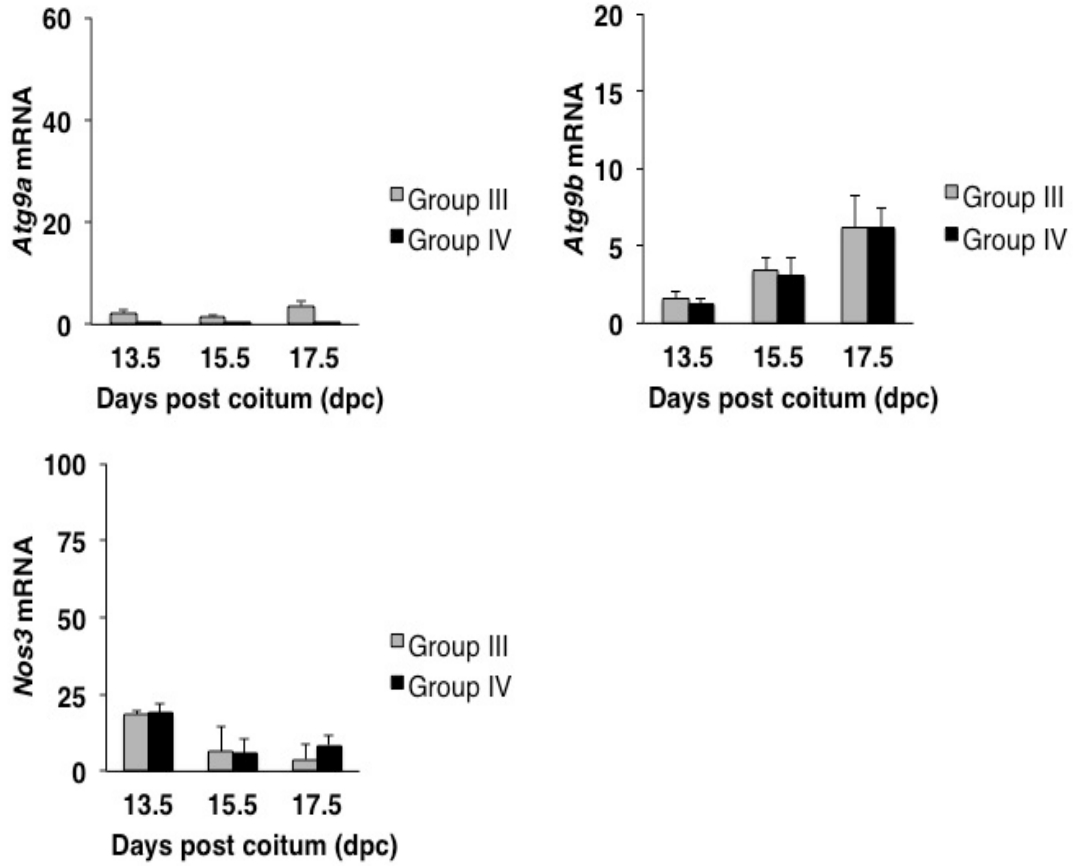

図 19-4. オートファジー関連遺伝子およびそのアンチセンス mRNA 発現の比較
(Group III vs. Group IV)
上段左から順に *Atg9a*，*Atg9b*，下段は *Nos3* mRNA の発現量の比較を示す．いずれの群間においても差は認めなかった．

② オートファジー関連蛋白の発現

17.5dpc におけるオートファジー関連蛋白の発現について比較した．結果を図 20 に示す.

１）Group I と II の比較

LC3 の発現量（Mean ± SD）は 57.8 ± 2.1[n=5] vs. 70.0 ± 9.1[n=7]（Group I vs. Group II）で Group II の方が多く，p62 の発現量は 68.2 ± 16.8[n=5] vs. 43.3 ± 7.4[n=7]で Group I の方が多かった．Atg9b の発現量には差を認めなかった（56.6 ± 10.9[n=5] vs. 66.5 ± 2.1[n=7], Group I vs. Group II）.

２）Group I と Group III の比較

発現量（Mean ± SD）は Atg9b（56.6 ± 10.9[n=5] vs. 86.3 ± 18.6[n=7], Group I vs. Group III），LC3（57.8 ± 2.1[n=5] vs. 88.3 ± 12.3[n=7], Group I vs. Group III）の両者において，Group I と比べて Group III の方が多かった．一方 p62 の発現量には差を認めなかった（68.2 ± 16.8[n=5] vs. 90.8 ± 31.3[n=7] , Group I vs. Group III）.

３）Group II と Group IV の比較

発現量（Mean ± SD）は Atg9b（66.5 ± 2.1[n=7] vs. 119.1 ± 21.4[n=7], Group II vs. Group IV），LC3（70.0 ± 9.1[n=7] vs. 121.6 ± 24.8[n=7], Group II vs. Group IV）の両者において，Group II と比べて Group IV の方が多かった．p62 も Group IV の方が Group II より発現量が多かった（43.3 ± 7.4[n=7] vs. 166.2 ± 19.0[n=7], Group II vs. Group IV）.

４）Group III と Group IV の比較

発現量（Mean ± SD）は Atg9b（86.3 ± 18.6[n=5] vs. 119.1 ± 21.4[n=7], Group III vs. Group IV），LC3（88.3 ± 12.3 [n=5] vs. 121.6 ± 24.8[n=7], Group III vs. Group IV），および p62（90.8 ± 31.3[n=5] vs. 166.2 ± 19.0[n=7], Group III vs. Group IV）であり，いずれの蛋白においても 2 群間の差を認め，Group IV の発現量の方が Group III より多かった.

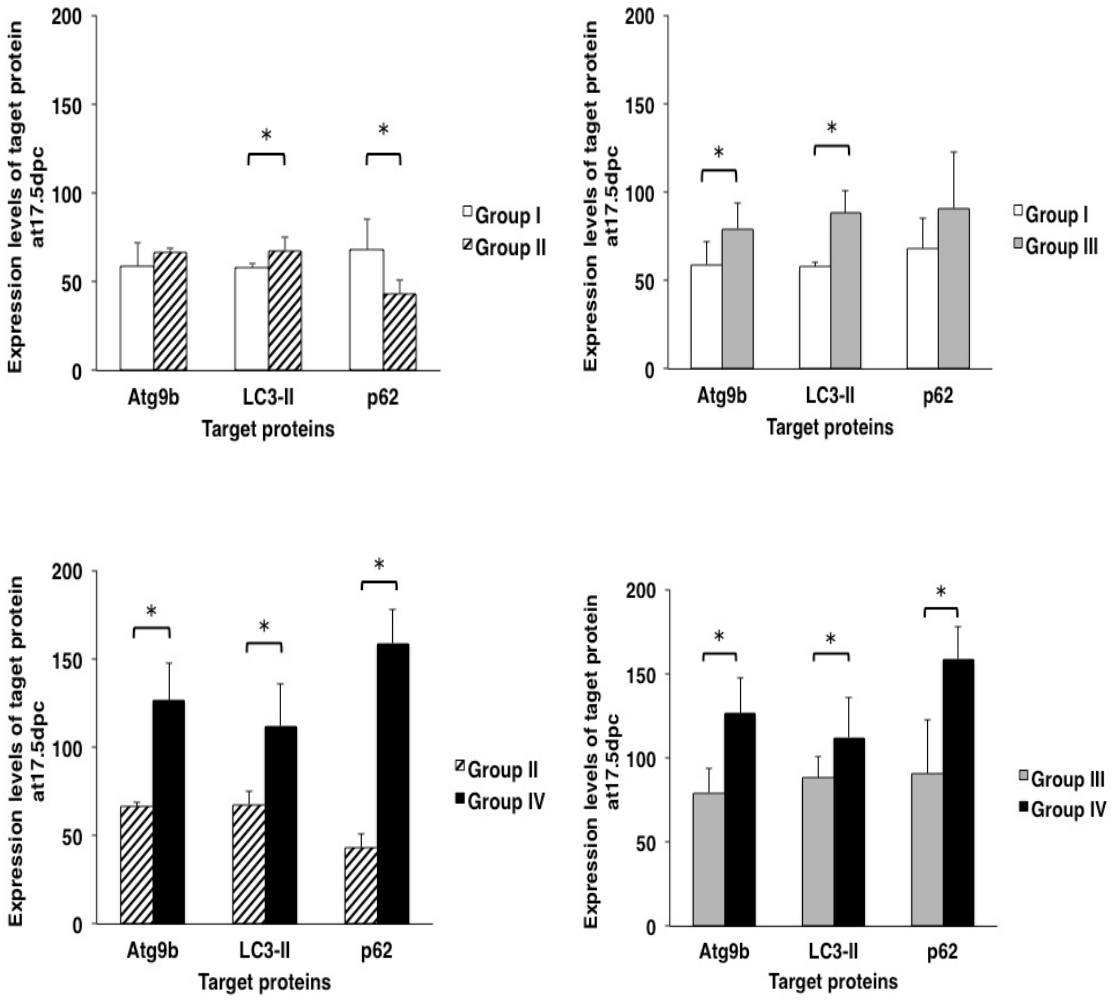

図 20.　Group 間におけるオートファジー関連蛋白発現の比較

17.5dpc における蛋白発現を比較した.

上段左　Group I と Group II の比較，上段右　Group I と Group III の比較,

下段左　Group II と Group IV の比較，下段右　Group III と Group IV の比較

*は 2 群間の比較において $P<0.05$ であることを示す.

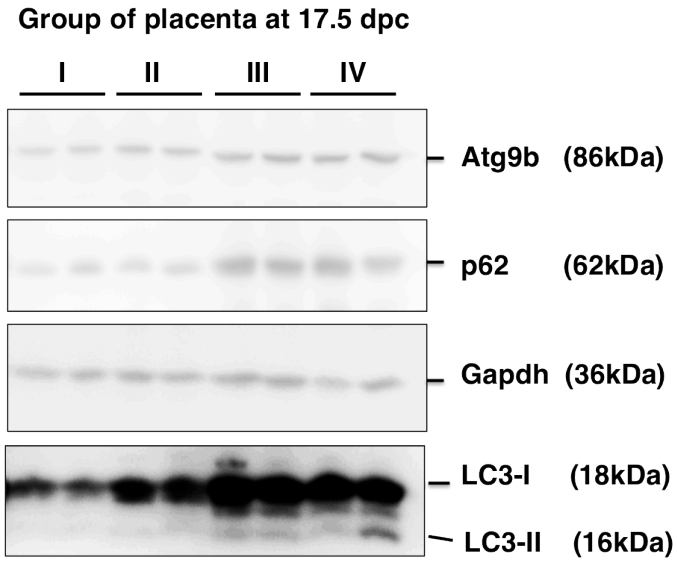

図 21. ウェスタンブロットによるオートファジー関連蛋白発現の確認
ウェスタンブロットにより上記に示す各バンドを検出し，解析に用いた.

考　　察

１．*Atg9a* の遺伝子型と母体の表現型，ならびに胎仔の表現型の検討

Kanayama らが示したように, $p57^{Kip2+/-}$雌マウスは受胎産物中に $p57^{Kip2}$ を発現できない個体が含まれていた場合，妊娠中に高血圧，蛋白尿といった妊娠高血圧腎症様の症状を呈することが分かっている [23]. そこで本研究で使用した $Atg9a^{+/-}$雌マウス（$Atg9a^{-/-}$マウスは出生後速やかに死亡するので妊孕性を獲得するには至らない）に $p57^{Kip2+/-}$（父由来アレルを欠くヘテロ）雄マウスを掛け合わせて作成した $Atg9a^{+/-}$/$p57^{Kip2+/-}$雌マウスが妊娠した場合，同様の現象が起きるかをまず検討した．血圧については $Atg9a^{+/-}$単独ヘテロマウスの妊娠時と比べ明らかに高血圧を呈することが確認できた．尿蛋白についても検討を行ったが，本研究においては $Atg9a^{+/-}$単独ヘテロマウスをコントロールとしても $Atg9a^{+/-}$/$p57^{Kip2+/-}$雌マウスにおいて明らかな尿蛋白の増加を確認することはできなかった．過去の報告において，マウスの尿蛋白（尿中アルブミン）定量においていくつかの評価法が用いられてきた．すなわち，補正を行わないもの [29]，24 時間尿量を母体体重で補正をするもの [23, 30]，尿中アルブミン値を尿中クレアチニン値で補正したもの [31] などがある. 近年, ヒトにおける妊娠中の蛋白尿の評価法として protein to creatinine ratio（P/Cr ratio）の有用性が提唱されてきており [32-34]，マウスにおいても同様の評価法が有用と考えられることから，尿中アルブミン/クレアチニン比（ACR; Albumin / Creatinine Ratio）を評価法として採用したが，本評価法においてはいずれのステージにおいても差を認めることはできなかった．上記他の評価法でも検討してみたが差は認めず，Kanayama らと同様の結果は得られなかった．マウスが自由意志で水分を摂取できるような環境で蓄尿を行ったものの，飼育施設内のおよび採尿塔内の湿度を一定に保てなかったことから，蒸散量にばらつきがあったことも原因の１つと推測できる.

本研究では遺伝子型 $Atg9a^{-/-}$の胎仔は $Atg9a^{+/+}$または $Atg9a^{+/-}$の胎仔と比べて発育が抑制されていることを示した．このことは *Atg9a* 以外のオートファジー関連遺伝子を欠損させたマウスにおいて，表現型が正常であるマウスと比べて低体重で出生することを示した過去の研究結果と一致する [12-15]．加えて，*beclin 1* ノックアウト胎仔マウスにおいて報告されているのと同様に [21]，本研究の結果は *Atg9a* ノックアウトマウスが子宮内で死亡する可能性が高まることを示唆するものである.

マウスにおけるオートファジー活性は胎生期全期間にわたって低いレベル（基底レ

ベル）にとどまり，大規模なオートファジーの誘導は出生直後の正常マウスにおいて一過性に起こることから，これまでオートファジーは胎仔マウスの子宮内での発育に重要な役割を果たしているとは考えられてこなかった[12]．しかしながら本研究の結果で示した，*Atg9a*$^{-/-}$の胎仔体重が *Atg9a*$^{+/+}$または *Atg9a*$^{+/-}$の胎仔体重と比べて明らかに低いこと（例えば 17.5dpc において 0.65±0.15 vs. 0.97±0.22g, P=0.0008）は，過去の複数の報告，すなわち *Atg3*$^{-/-}$，*Atg5*$^{-/-}$，*Atg7*$^{-/-}$の新生児マウスは Wild type およびヘテロマウスと比べて体重が明らかに小さい（*Atg3* では 0.99±0.12 vs. 1.19±0.11g[15]，*Atg5* では 1.16±0.14 vs. 1.29±0.14g[12]，*Atg7* では 0.98±0.07 vs. 1.20±0.12g[13]）という報告と同様の現象と考えられた．

Atg3$^{-/-}$，*Atg5*$^{-/-}$，*Atg7*$^{-/-}$，そして *Atg9a*$^{-/-}$マウスはすべてオートファジーを欠くマウスであるから[11, 12, 13, 15]，これらの結果は胎仔における機能的なオートファジー機構の欠如が低体重につながることを示唆しており，胎生期のオートファジー機構は胎児（仔）発育制限（FGR）に対して保護する機能を有していると考えられる．またこのことは母マウスが高血圧を呈するとき，*Atg9a*$^{-/-}$胎仔マウスの FGR がより顕著になることを示した本研究の結果によってさらに深められた．

ヒトにおいて，母体の高血圧は FGR や子宮内胎児死亡（IUFD）をきたしうる妊娠中の有害事象として広く知られている[17]．子宮動脈からの血流不全による胎盤機能不全が胎児の飢餓状態の最も大きな原因として考えられており，子宮動脈における血管抵抗の増大によりしばしば妊娠中に高血圧症をきたす[16, 18]．そのような劣悪な子宮内環境において、胎児のオートファジーは活性化されているかもしれないし，実際，妊娠高血圧症候群や FGR を呈する女性では胎盤におけるオートファジーの活性化が認められている[19, 20, 35, 36, 37]．加えて，ヒト胎盤における LC3-II 蛋白の発現量は標準化した出生時体重が減少するとともに直線的に増加することがわかっている（z-score は出生時体重, P=0.087）[20]．ヒトとマウスにおけるこれらの知見は，胎児（仔）のオートファジー機構の機能不全は必然的に FGR と関連しており，母体高血圧のような FGR における胎児（仔）オートファジーの保護的な作用を上回る劣悪な子宮内環境においては, たとえオートファジーが活性化された後であっても FGR に至ることを示唆するものである．

本研究において，*Atg9a*$^{-/-}$の胎仔マウス子宮内死亡を起こす割合が高いことを示した．さらに *Atg9a*$^{-/-}$の胎仔マウス自体の発生頻度はメンデルの法則で予測された割合よりも若干少なかった（表 4）．これは Saitoh らによって報告されている，*Atg9a*$^{-/-}$出生マウスの割合（14%，これらはすべて生後 1 日以内に死亡）と一致する（本研究では死亡と判定したマウスも含めて 17%[39/231]）．より重篤な表現型として *beclin 1* ノック

アウト胎仔マウスでも同様の所見が得られている（*beclin 1*$^{-/-}$胎仔マウスは重篤な発育不全を来たし，胎生期の初期にすべて死亡する．またそのような初期に死亡した胎仔マウスは痕跡程度となり胎仔として認識できなくなる）[21]．このことは本研究において *Atg9a*$^{-/-}$胎仔マウスの数がメンデルの法則の予測よりも少ないことを説明しうる．また dissection の時点での胎仔マウスの生死の判別は容易ではなく, 特に未熟性の強い 13.5dpc での判定においては困難であったため, 本研究では色調とサイズをもとに判定を行った．そのため，中には実際には生存マウスであっても死亡と判定してしまった可能性もある．しかしこれらの不確定さを考慮しても，*Atg9a*$^{-/-}$胎仔マウスが子宮内においてより死亡しやすいことは明らかと考えられた．

２．マウス胎盤におけるオートファジー活性化の検討

マウス胎盤におけるオートファジー関連遺伝子の検討において，Group I（WT 母マウス；*Atg9a* 正常，正常血圧群），Group II（p57$^{Kip2+/-}$母マウス；*Atg9a* 正常，高血圧発症群），Group III（*Atg9a*$^{+/-}$単独ヘテロ母マウス；*Atg9a* 欠損，正常血圧群），Group IV（*Atg9a*$^{+/-}$/p57$^{Kip2+/-}$母マウス；*Atg9a* 欠損，高血圧発症群）のすべての系統のマウスから得られた胎盤において, *Atg9b* の妊娠期間に伴う発現量の増加が見られ, 一方で *Nos3* の発現量の低下が確認された．これは *Atg9b* 遺伝子がオートファジー関連遺伝子としての側面とは別に *Nos3* のアンチセンス代謝物（*Nos3as*）として作用していることを示唆し，Yamada らの報告とも一致する [10]．また Group II（*Atg9a* 正常，高血圧発症群）において Group I（*Atg9a* 正常，正常血圧群）よりも *Atg9b* の発現量増加が認められたが，これと同様のことが *Atg9a* 欠損下でも生じるかを Group III（*Atg9a* 欠損，正常血圧群）と Group IV（*Atg9a* 欠損，高血圧発症群）との比較により検討したが，この傾向は確認できなかった．*Atg9a* の欠損を胎盤における *Atg9b* が相補することで *Atg9b* の発現量がさらに増加していることを期待したが，本実験からはそのことを確認することができなかった．

マウス胎盤におけるオートファジー関連蛋白の発現の検討においては，Group I（*Atg9a* 正常，正常血圧群）および Group III（*Atg9a* 欠損，正常血圧群）はともに妊娠進行に伴うオートファジーマーカー（LC3-II および p62）の発現量に変化を認めず，少なくとも観察期間内（13.5dpc から 17.5dpc）には大規模なオートファジーの誘導は行われていないと考えられた．その一方で GroupII（*Atg9a* 正常，高血圧発症群）および GroupIV（*Atg9a* 欠損，高血圧発症群）では妊娠進行に伴って LC3-II 発現量が増加し，逆に p62 発現量の低下するパターンが観察されたことから，母マウスが高血圧を

発症する環境においては何らかの形でオートファジーが誘導されていることが考えられた．

さらに，17.5dpc において Group I と II を比較すると，Group II では Group I と比べ LC3-II の発現が増加し，p62 の発現が低下していた．このことは *Atg9a* 正常発現下の胎盤において母が高血圧を発症するとオートファジーが誘導され正常に進行していることを示唆する．この結果はヒト妊娠高血圧腎症の胎盤において確認されている報告と一致し[20]，マウスにおいても同様の傾向を示すことが確認できた．Group I と III，すなわち母が高血圧非発症の場合における *Atg9a* 正常発現群（Group I）と非発現群（Group III）との比較では，Group III において Atg9b の発現が増加し，LC3-II の発現も増加しているが，一方で p62 の発現には差を認めなかった．高血圧非発症下では大規模なオートファジー誘導が求められていないが，基底状態のオートファジーを維持するために *Atg9a* 欠損下では胎盤において Atg9b が相補的に働くため，その発現が増加していると推測される．一方 Group II と IV の比較は母マウスに高血圧を発症させた場合の *Atg9a* 正常発現群（Group II）と非発現群（Group IV）の関係を見たものであるが，Group IV において Atg9b の発現量が増加し，LC3-II も増加した一方，本来オートファジーの進行により減少するはずの p62 は Group II と比べ明らかに発現量が高いままであった．Group III および IV（ともに *Atg9a* 欠損下での高血圧の有無で比較）でも同様であった．この乖離について，LC3-II の増加はオートファゴソームの増加を意味しており，これらの環境ではオートファジーが行われようとして，Atg9b の相補的な作用によってオートファゴソームの形成が起こっているが，その後の進行が不完全となり結果としてリソソームで分解されなかった p62 が蓄積してしまうと推測される．本研究では行っていないが，この点を明確にするためには近年様々な手法が報告されてきている，オートファジーの全行程の流れ（オートファジーフラックス，autophagy flux）の解析[38-41]を行うと良いのかもしれない．

まとめると，①妊娠中に母マウスが高血圧を発症すると，オートファジーの誘導が起こる．②Atg9a 欠損下においては胎盤特異的に発現する Atg9b が相補的に働く結果，オートファジーは失われておらず，基底状態のレベルを維持しようとする．③しかし母マウスが高血圧を発症し大規模なオートファジーが必要とされると，Atg9a 欠損下においても Atg9b によって代償的にオートファジーの誘導が始まり，オートファゴソームの形成が進むが，*Atg9a* 正常発現下と比較するとその後の過程が滞り不完全となる．

この事象は，本研究で確認された *Atg9a* 欠損マウス（*Atg9a*$^{-/-}$）胎仔が発育不全を呈し，母マウスの高血圧発症時により顕著となることと矛盾せず，オートファジーが深く関与している可能性が考えられた．

Atg9b 蛋白の発現は *Atg9a* 欠損マウス胎盤では *Atg9a* 正常発現胎盤に比べ増加していることから，これらの胎盤では *Atg9b* mRNA の発現量も同様に増加することが期待されたが，実際には *Atg9b* mRNA の発現量はそれほど増加しておらず，乖離が見られた．オートファジー関連蛋白は細胞質内に存在し，オートファジーが誘導されるとそれぞれの役割を果たすべく集まってくるが，最終的にリソソームにおいて蛋白の分解が起こると，それらのオートファジー関連蛋白は再び細胞質内へ戻り，再利用されている．このことから一定量の *Atg9b* mRNA が発現していれば，細胞質内における Atg9b 蛋白を必要に応じて利用できている可能性がある．本研究では明らかにすることはできなかったが，mRNA の転写後翻訳の過程において何らかの修飾が働いている可能性があるかもしれない．

冒頭に記したようにオートファジーの解析法については未だ確立したものがなく，活発な議論が行われているところである．LC3-II がオートファジーのマーカーとして注目されるようになる中で，細胞の種類によってはオートファジー誘導下でも LC3-II が増加せず，また他方では LC3-II が増加しているのにオートファジーが誘導されていない細胞種があることが報告されてきた [42, 43]．そのため，現在では従来の方法に代わりリソソームプロテアーゼ活性阻害剤の添加の有無における LC3-II 発現量の比較により，LC3-II のリソソームでの分解をウェスタンブロットで検出するアッセイが受け入れられてきているようである [41-45]．また p62/SQSTM1 の mRNA は様々な外的条件に応答した転写制御を受けることや，オートファジー以外にプロテアソーム系によっても分解されること，その他のシグナル伝達分子との相互作用の存在といった問題が指摘されており，本実験開始後に新たに発表された Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[43] の中では”Recommended methods for monitoring autophagy “の中に挙げられているものの，その解釈には慎重な扱いが求められている．

従って本研究において行った LC3-II および p62 を用いた生化学的解析手法のみではオートファジーの活性化を証明するには十分とは言えないかもしれない．今後，生化学的手法のみならず，電子顕微鏡や蛍光顕微鏡での観察を含めた複数の手法を組み合わせる中での検討が必要と考えられた．

総括および結論

本研究により，以下の知見を得た．

① *Atg9a* ノックアウト(*Atg9a*$^{-/-}$)胎仔マウスは子宮内において発育が抑制され，子宮内胎仔死亡となりやすい．

② 上記は母体の高血圧の存在下でより顕著となることが確認された．

③ *Atg9a*$^{-/-}$胎盤では，母マウスが高血圧を発症しない場合，妊娠中に大規模なオートファジーの誘導は起こっていないと考えられた．

④ 母マウスに妊娠高血圧腎症を発症させた場合，*Atg9a*$^{-/-}$胎盤においてもオートファジーが誘導され，オートファゴソームが形成されるが，その後の進行が滞り完全には働いていない可能性がある．

⑤ *Atg9a* 欠損マウスにおいてオートファジーが誘導されるのは，胎盤に組織特異的に発現する *Atg9b* が相補的に作用しているためであることが示唆された．

⑥ マウス胎盤においても *Atg9b* が *Nos3* のアンチセンス遺伝子（*Nos3as*）として作用していることが証明された．

これらの知見から，以下のように結論する．

１．オートファジー不能胎仔では発育不全や胎仔死亡になりやすい．

２．生存オートファジー不能胎仔では *Atg9a* を相補する *Atg9b* の存在が重要である．

３．マウス胎盤においても *Atg9b* が *Nos3* のアンチセンス遺伝子（*Nos3as*）として抑制的に作用している．

４．妊娠高血圧腎症モデルマウスにおいてオートファジーの活性化はヒト同様重要であり，オートファジー不能状態とした場合には定常状態に比較して発育不全や胎仔死亡になりやすい．

今後，オートファジー活性化をより正確に解析していくとともに，*Atg9a* に加え *Atg9b* を欠損させた場合についても検討を重ねていくことにより，妊娠高血圧腎症の病態解明の一端に役立てて行きたい．

謝　　辞

本研究に賛同しご協力くださいました大阪大学免疫学フロンティア研究センター自然免疫学研究室　特任准教授　齋藤　達哉先生，国立成育医療研究センター研究所周産期病態研究部　周産期ゲノミクス研究室室長　中林　一彦先生，九州大学生体防御医学研究所　細胞機能制御学部門教授　中山　敬一先生，東北大学医学系研究科附属創生応用医学研究センター教授　中山　啓子先生には変異マウスのご提供ならびに研究に関するご指導，ご助言をいただきました．また本研究にあたり直接ご指導いただきました北海道大学大学院医学研究科　生殖発達医学講座産科・生殖医学分野教授　水上　尚典先生, 北海道大学総合女性システム学講座特任講師　山田　崇弘先生，北海道大学大学院医学研究科　生殖発達医学講座産科・生殖医学分野助手　古田　伊都子先生，北海道大学病院産科・周産母子センター助教　赤石　理奈先生に深謝いたします．研究の遂行にあたりご協力いただいた北海道大学病院産科・周産母子センター　長　和俊先生，森川　守先生，荒木　直人先生，西田　竜太郎先生，小山　貴弘先生，石川　聡司先生，JCHO 北海道病院産婦人科診療部長　山田　俊先生，ならびに北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設の担当職員の方々に心よりお礼申し上げます．

引 用 文 献

1. Mizushima, N., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* **27**, 421-429 (2002).
2. Lum, J. J., DeBerardinis, R. J. & Thompson, C. B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 439-448 (2005).
3. Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1102-1109 (2007).
4. Baba, M., Osumi, M. & Ohsumi, Y. Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method. *Cell Struct. Funct.* **20**, 465-471 (1995).
5. Klionsky, D. J. *et al.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* **5**, 539-545 (2003).
6. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 458-467 (2009).
7. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS. Lett.* **333**, 169-174 (1993).
8. Noda, T. *et al.* Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J. Cell Biol.* **148**, 465-480 (2000).
9. Reggiori, F. & Klionsky, D. J. Atg9 sorting from mitochondria is impaired in early secretion and VFT-complex mutants in Saccharomyces cerevisiae. *J. Cell. Sci.* **119**, 2903-2911 (2006).
10. Yamada, T. *et al.* Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *J. Biol. Chem.* **280**, 18283-18290 (2005).
11. Saitoh, T. *et al.* Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**, 20842-20846(2009).
12. Kuma, A. *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-1036 (2004).
13. Komatsu, M. *et al.* Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* **169**, 425-434 (2005).
14. Saitoh, T. *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* **456**, 264-268 (2008).
15. Sou, Y. S. *et al.* The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4762-4775 (2008).

16. Albaiges, G., Missfelder-Lobos, H., Lees, C., Parra, M. & Nicolaides, K. H. One-stage screening for pregnancy complications by color Doppler assessment of the uterine arteries at 23 weeks' gestation. *Obstet. Gynecol.* **96**, 559-564 (2000).
17. Steegers, E. A., von Dadelszen, P., Duvekot, J. J. & Pijnenborg, R. Pre-eclampsia. *Lancet* **376**, 631-644 (2010).
18. Contro, E. *et al.* Uterine artery Doppler longitudinal changes in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction without preeclampsia. *Prenat. Diagn.* **34**, 1332-1336 (2014).
19. Oh, S. Y. *et al.* Autophagy-related proteins, LC3 and Beclin-1, in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. *Reprod. Sci.* **15**, 912-920 (2008).
20. Akaishi, R. *et al.* Autophagy in the placenta of women with hypertensive disorders in pregnancy. *Placenta* **35**, 974-980 (2014).
21. Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. & Heintz, N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 15077-15082 (2003).
22. Takahashi, K. & Nakayama, K. Mice lacking a CDK inhibitor, p57Kip2, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation. *J. Biochem.* **127**, 73-83 (2000).
23. Kanayama, N. *et al.* Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol. Hum. Reprod.* **8**, 1129-1135 (2002).
24. Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO. J.* **19**, 5720-5728 (2000).
25. Kabeya, Y. *et al.* LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell. Sci.* **117**, 2805-2812 (2004).
26. Fujita, N. *et al.* An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4651-4659 (2008).
27. Ichimura, Y. *et al.* Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J. Biol. Chem.* **283**, 22847-22857 (2008).
28. Bjørkøy, G. *et al.* Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods. Enzymol.* **452**, 181-197 (2009).
29. Helmering, J. *et al.* A mutation in Ampd2 is associated with nephrotic syndrome and hypercholesterolemia in mice. *Lipids. Health. Dis.* **13**, 167 (2014).
30. Ding, X., Yang, Z., Han, Y. & Yu, H. Fatty Acid oxidation changes and the correlation with oxidative stress in different preeclampsia-like mouse models. *PLoS. One* **9**, e109554 (2014).
31. Venditti, C. C., Casselman, R., Young, I., Karumanchi, S. A. & Smith, G. N. Carbon monoxide prevents hypertension and proteinuria in an adenovirus sFlt-1 preeclampsia-like mouse model. *PLoS. One* **9**, e106502 (2014).

32. Huang, Q. *et al.* Urinary spot albumin:creatinine ratio for documenting proteinuria in women with preeclampsia. *Rev. Obstet. Gynecol.* **5**, 9-15 (2012).
33. Yamada, T. *et al.* Problems in methods for the detection of significant proteinuria in pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **40**, 161-166 (2014).
34. Akaishi, R., Yamada, T., Morikawa, M., Nishida, R. & Minakami, H. Clinical features of isolated gestational proteinuria progressing to pre-eclampsia: retrospective observational study. *BMJ. Open* **4**, e004870 (2014).
35. Hung, T. H. *et al.* Increased autophagy in placentas of intrauterine growth-restricted pregnancies. *PLoS. One* **7**, e40957 (2012).
36. Chang, Y. L. *et al.* Increased autophagy in the placental territory of selective intrauterine growth-restricted monochorionic twins. *Prenat. Diagn.* **33**, 187-190 (2013).
37. Curtis, S., Jones, C. J., Garrod, A., Hulme, C. H. & Heazell, A. E. Identification of autophagic vacuoles and regulators of autophagy in villous trophoblast from normal term pregnancies and in fetal growth restriction. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **26**, 339-346 (2013).
38. Kimura, S., Noda, T. & Yoshimori, T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* **3**, 452-460 (2007).
39. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-326 (2010).
40. Katayama, H., Kogure, T., Mizushima, N., Yoshimori, T. & Miyawaki, A. A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery. *Chem. Biol.* **18**, 1042-1052 (2011).
41. 水島　昇，吉森　保 編．オートファジー～生命をささえる細胞の自己分解システム．化学同人，京都，2012．
42. Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes. Dev* **21**, 2861-2873 (2007).
43. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445-544 (2012).
44. Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T. & Kominami, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**, 84-91 (2005).
45. Kimura, S., Fujita, N., Noda, T. & Yoshimori, T. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods. Enzymol.* **452**, 1-12 (2009).