

令和元年6月24日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18404

研究課題名(和文)二本鎖RNAが誘導する栄養膜細胞の免疫反応に着目した妊娠合併症発症機序の解明

研究課題名(英文) Novel mechanisms of pregnancy complications resulting in the innate immune response in the syncytiotrophoblast induced by double-stranded RNA

研究代表者

本村 健一郎 (Motomura, Kenichiro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・共同研究員

研究者番号：00724329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト満期胎盤から採取した栄養膜細胞から形成した合胞体栄養膜細胞には二本鎖RNAを認識する受容体が発現しており、これを介した刺激により1) 炎症性サイトカインやケモカインを産生すること、2) 抗ウイルスタンパクを産生すること、3) カスパーゼ3/7依存性細胞死を起こすことを明らかにした。また、妊娠マウスに二本鎖RNAを投与して胎児発育遅延を誘導し、この作用が二本鎖RNA受容体であるTLR3を介していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症が関与する妊娠合併症は未だに原因が明らかになっていないものが多く、これが根治療法の開発を困難にしている。本研究は合胞体栄養膜細胞に発現する二本鎖RNA受容体に着目し、これらを介した刺激が誘導する胎盤での免疫反応の一端を明らかにした。今後臨床検体を用いた検討を組み合わせることで、胎盤障害の新たなメカニズム・バイオマーカーが明らかとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression and function of double-stranded RNA receptors on human syncytiotrophoblast. The syncytiotrophoblast play a central role in the placental functions. Using primary human term placenta-derived syncytiotrophoblast culture model, we showed that double-stranded RNA (dsRNA) receptors (TLR3, MDA5, RIG-I) are predominantly expressed on the syncytiotrophoblast, and the stimulations via these receptors using a dsRNA analogue, poly:IC induced 1) the production of inflammatory cytokines and chemokines, 2) the production of anti-viral molecules, and 3) caspase 3/7-dependent apoptosis. Moreover, using a pregnant mice model, we demonstrated that intravenous administration of dsRNA induced fetal growth restriction, and this process was turned out to be via TLR 3. These results suggest the link between dsRNA receptors and pregnancy complications and the possibility of double stranded RNA receptors as a novel biomarker or a therapeutic target.

研究分野：妊娠と免疫

キーワード：合胞体栄養膜細胞 妊娠合併症 パターン認識受容体 二本鎖RNA 胎盤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧症候群 (Hypertension Disease of Pregnancy : HDP) や Small for Gestational Age (SGA) といった母体・胎児双方にダメージを与える妊娠合併症には未だ根治療法がなく、临床上管理に難渋する場面も多い。これらの妊娠合併症の一部には胎盤障害、胎盤局所・母体全身の炎症が関与していることが示唆されているが、その詳細な発症メカニズムはまだ明らかになっておらず、それが根治療法の開発を困難にしている。

Figure.1 は胎盤を模式的に表したものである。絨毛が母体血の充満する絨毛間腔に伸び、そこで母体血と接している。絨毛の表面は、胎盤内の最大の機能細胞である胎児由来の合体栄養膜細胞 (Syncytiotrophoblast : STB) で覆われている。つまり胎児と母体は STB を介して接しており、これは STB が胎盤局所の免疫学的防御機能として重要な役割を果たしていることを意味する。

局所の免疫を担う重要な分子として、toll like receptors (TLR) や retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors (RLR) に代表される自然免疫系受容体がある。自然免疫系受容体はパターン認識受容体 (Pattern Recognition Receptors : PRRs) と呼ばれ、病原微生物特異的分子 (Pathogen Associated Molecular Patterns : PAMPs) や内因性リガンド (Alarmins) を認識し、炎症性サイトカイン産生や apoptosis を惹起して生体防御反応を担うが、一方でこの炎症反応により疾患を惹起することも報告されている。胎盤にもこの自然免疫系受容体が発現しており、上記炎症の関与が示唆される妊娠合併症発症に関与していることが示唆されている。しかし、どのようなメカニズムによってこの自然免疫系受容体によるシグナルが妊娠合併症を引き起こすのかは明らかになっていない。

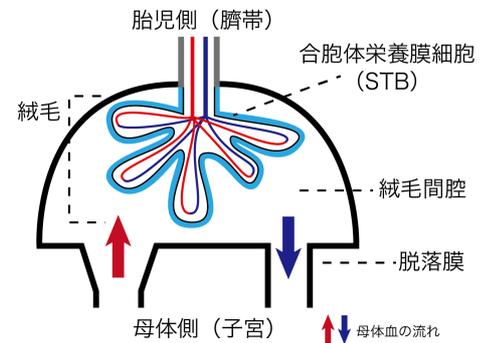


Fig. 1 胎盤構造の模式図

2. 研究の目的

申請者は STB の局所免疫反応に着目した研究を行っており、これまでの予備検討から、STB には dsRNA を認識する TLR3 が特異的に発現していることを見いだしていた。この結果に基づき、TLR3 の ligand である二本鎖 RNA (dsRNA) による STB の刺激が胎盤障害、母体炎症状態を引き起こし、妊娠合併症を惹起するという仮説を立てた。本研究ではこの仮説の検証を行うことで新たな妊娠合併症発症機序を明らかにすることを目的とした。これが明らかになることで、未だ根本的な治療が開発されていない SGA や HDP といった胎盤の炎症が関与する妊娠合併症の新たな管理方法や治療法の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

dsRNA が具体的に STB にどのような反応を引き起こし、またそれがどのように母体・胎児に影響するのかを検討するため、具体的に下記の項目を検討した。

(1) ヒト満期胎盤由来栄養膜細胞モデルを用いた、STB に発現する自然免疫系受容体の発現・機能解析

STB の *in vitro* 実験モデルとして、ヒト満期胎盤由来栄養膜細胞モデル (differentiated cytotrophoblast : dCTB) を用いた。満期胎盤から細胞性栄養膜細胞 (Cytotrophoblast : CTB) を分離し、パーコール法、抗 HLA-ABC 抗体を用いた免疫磁気ビーズ法で混入している間質細胞や免疫細胞を除去した。Fetal Calf Serum (FCS)、Epidermal growth factor (EGF)、Rho kinase 阻害薬 (ROCK 阻害薬) を添加した培養液で 120 時間培養し、CTB を STB 様に分化させた (Motomura, et al. PLoS One 2017)。この STB モデルを用いて下記の検討を行った。

自然免疫系受容体の発現解析

PRR には TLR 以外にも様々な受容体が含まれる。これらの受容体の STB における発現を qPCR を用いて確認した。さらに dCTB とヒト胎盤における dsRNA 受容体のタンパク発現を、Western blotting および蛍光免疫染色を用いて確認した。

自然免疫系受容体刺激によって STB に誘導されるサイトカイン・ケモカイン産生の解析

STB に発現する PRR の機能を確認するため、各 PRR に対応する PAMPs で刺激して培養上清を 24 時間後に回収し、産生されたサイトカイン・ケモカインを multiplex assay で測定した。また、受容体の特異性を確認するため、siRNA を用いて PRR をノックダウンし、dsRNA に対する反応が減弱するかを確認した。

dsRNA によって STB に誘導される抗ウイルス作用の解析

dsRNA 受容体を介した免疫反応は抗ウイルス作用を示すことが知られている。STB も同様の抗ウイルス作用が見られるのかを、qPCR および ELISA を用いて確認した。

dsRNA によって STB に誘導される細胞死の形態解析

申請者は予備検討において、dsRNA 刺激によって STB に Caspase 3/7 が誘導されることを見出していた。合体栄養膜細胞は複数の核を内包しており、それらが *in vitro* でどのように細胞死を起こすのかを、タイムラプスイメージングを用いて観察した。

(2) 妊娠マウスモデルを用いた dsRNA による妊娠合併症発症のメカニズム解析

dsRNA による妊娠合併症惹起の *in vivo* 実験モデルとして、妊娠 15.5 日目に低濃度の合成

dsRNA (PolyI:C) を尾静脈から投与するモデルを用いた。dsRNA 受容体の一つである TLR3 の、妊娠合併症への関与を検討するため、マウスは野生型 (C57BL/6J) および遺伝子改変 (*Tlr3*^{-/-}) マウスを用いた。

4. 研究成果

(1) ヒト満期胎盤由来栄養膜細胞モデルを用いた、STB に発現する自然免疫系受容体の発現・機能解析

自然免疫系受容体の発現解析

dCTB には TLR のうち dsRNA を認識する TLR3 が発現していることを見いだしていたが、さらに RLR、NOD-like receptor、細胞内 DNA 受容体といった TLR 以外の PRR の mRNA の発現も確認した。その結果、TLR3 以外の dsRNA 受容体である RIG-I、MDA5、DHX58 といった細胞内 PRR の mRNA が発現していることが明らかとなった。興味深いことに dsRNA 受容体以外の PRR の mRNA 発現はほとんど見られなかった。

mRNA 発現の見られた dsRNA 受容体のタンパク発現を Western blotting で確認したところ、TLR3、MDA5、RIG-I とも発現が見られた。特に、TLR3 は定常状態で高発現していた。さらに、dsRNA の刺激により受容体発現が誘導されるかを PolyI:C で刺激後に確認したところ、TLR3 の発現量はそれほど変化しなかったが、MDA5、RIG-I は強く発現誘導された。また、これらの dsRNA 受容体のヒト満期胎盤での発現を蛍光免疫染色で確認したところ、TLR3 が合体栄養膜細胞に局在していた。

以上の結果から、STB には TLR3 だけでなく、dsRNA を認識する他の PRRs も特異的に発現していることが明らかとなった。

自然免疫系受容体刺激によって STB に誘導されるサイトカイン・ケモカイン産生の解析

PRRs の下流シグナルは共通しており、サイトカイン・ケモカインが産生される。したがって、それらのリガンドである PAMPs 刺激によりサイトカイン・ケモカインが産生されることは、機能する PRR を発現していることを意味する。dCTB を 9 種類の PAMPs で刺激したところ、PolyI:C の刺激で IL6, TNF, IL-1 といった炎症性サイトカインが誘導されたが、他の PAMPs ではこれらのサイトカインの産生はほとんど見られなかった。また、PolyI:C 刺激でのみ IP10, MIP-1, MIP-1 といったケモカインの産生誘導が見られた。この結果は、STB が dsRNA に特異的に反応し炎症を惹起する作用を持つことを示唆した。

dsRNA によって STB に誘導される抗ウイルス作用の解析

PolyI:C に反応して、dCTB は Type I interferon (IFN) である IFN α を産生した。また、他の種類の interferon である IFN β , 1, 2, 3 も産生した。これらの IFN はウイルス増殖を抑制する作用を持ち、特に IFN α は Zika virus の感染を抑制する可能性が示唆されている。また、PolyI:C 刺激は抗ウイルス分子である IFIT1, MX1, OAS1 の mRNA 発現の上昇も認めた。これらの結果は STB が dsRNA の刺激により NK 細胞や Cytotoxic T cell 等を遊走させる chemokine や、抗ウイルス作用を持つ分子の産生を介して、抗ウイルス免疫応答を行うことを意味する。

dsRNA によって STB に誘導される細胞死の形態解析

細胞死に至った細胞内に含まれる複数の核は同時に縮小しており、縮小した核 (細胞死を起こした状態) と健全な核が同一細胞に維持されることはなかった。一方、異なる細胞間で細胞死の伝播は観察できなかった。

(2) 妊娠マウスモデルを用いた dsRNA による妊娠合併症発症のメカニズム解析

野生型マウスでは、PolyI:C 投与により胎児の体重減少が見られた。一方、*Tlr3*^{-/-} マウスでは、この体重減少は見られなかった。この結果は dsRNA により妊娠合併症 (胎児発育不全) が引き起こされ、さらにそれが TLR3 を介していることを示している。メカニズム解明のため、引き続き、dsRNA による胎盤の変化や炎症、さらに胎児への影響を *in vivo* で検討していく必要がある。

結論として、胎盤の最大の機能細胞である STB には dsRNA を認識する PRRs (TLR3, MDA5, RIG-I) が特異的に発現しており、dsRNA 刺激によって炎症性サイトカイン・ケモカイン産生や抗ウイルス作用を示すことが明らかとなった。この反応は胎盤でのウイルス防御に有益な役割を果たすと考えられるが、同時に炎症や細胞死により胎盤障害が引き起こす。dsRNA は外因性 (ウイルス) だけでなく生体内でも障害された細胞などから産生されることが明らかとなっており、これら内因性 dsRNA が胎盤障害・妊娠合併症発症の原因となっている可能性がある。今後臨床検体を用いた検討を組み合わせることで、胎盤障害の新たなメカニズム・バイオマーカーを明らかにできる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. 本村健一郎 松本健治 サイトカインネットワーク 周産期医学 (査読無し) 47 巻 12 号 P. 1521 - 1526 2017 年

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Motomura K, Differentiated cytotrophoblasts induce anti-viral responses through receptors for double-stranded RNA, American society for reproductive immunology annual meeting (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。