

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02644

研究課題名(和文)胎生期樹状細胞の機能解析と同細胞による脳の炎症性発達異常機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of fetal dendritic cells and elucidation of inflammation-induced brain development abnormality contributed by fetal dendritic cells

研究代表者

小内 伸幸 (ONAI, Nobuyuki)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：50323605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期には免疫寛容が働き、胎児は母体由来からの免疫細胞から逃れ妊娠が維持される。

一方で、胎生期における病原性微生物を認識する免疫反応、特に樹状細胞については未だよくわかっていない。成人期における樹状細胞の分化や活性化機構、免疫応答誘導機構については非常によく研究されているが、胎生期における樹状細胞の活性化機構や免疫応答誘導機構についてはあまり解明されていない。本研究で、我々は胎児肝臓から、樹状細胞と樹状細胞前駆細胞を同定し、その機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって胎生期の胎児肝臓中に樹状細胞が存在することが明らかになり、同細胞が制御性T細胞誘導し、免疫寛容に寄与する可能性が示唆された。妊娠期では免疫寛容が働き、胎児が母親由来の免疫細胞から攻撃されずに妊娠が維持されている。この免疫寛容の仕組みを理解することは、自己免疫疾患や移植医療に貢献する可能性があり、基礎医学・臨床研究において重要な研究成果である。

研究成果の概要(英文)：The foetation escapes from maternal immune cells to maintain pregnancy by immune tolerance. However, the immune reaction against pathogen, especially dendritic cells is not clear during the fetal period. The dendritic cell development and their function during the adult period have been studied well, but fetal period does not. In this study, we identify the dendritic cells and their progenitors in the fetal liver and perform their functional analysis.

研究分野：免疫学

キーワード：樹状細胞 前駆細胞 胎生期

1. 研究開始当初の背景

胎児は父親由来の抗原を発現しているため、母親にとっては異物となり拒絶反応が誘導される可能性があるが、制御性T細胞による免疫寛容が働き、胎児が母親由来の免疫細胞から攻撃されずに妊娠が維持される()。一方で妊娠時の母体を介した病原性微生物感染に対する胎児の免疫担当細胞や免疫反応機構は明らかになっていない。実際に妊娠期の母体への微生物感染が胎児の脳の発達や行動異常の原因となることが報告され()、そのメカニズムを解明することは生後の免疫並びに神経発達機構解明に重要である。これまでの報告では、妊娠時の母親のウイルス感染やバクテリア感染と生まれてくる子の自閉症スペクトラム障害の発症リスクに関連があるということ、その感染によってIL-17などの炎症性サイトカインが産生されるが、そのサイトカインによって胎児の脳の発達異常が引き起こされるということが報告されている()。また、アレルギーや喘息を罹患している母親と生まれてくる子の自閉症スペクトラム障害の発症リスクとの関連性も報告されており()、自閉症スペクトラム障害を発症した子は炎症性サイトカインが脳脊髄液内や血清中で上昇しており、これらサイトカインが胎児期の脳の発達障害を誘導し、自閉症スペクトラム障害の発症に起因している可能性が報告されている()。以上のことから、母親の妊娠中の免疫システムのバランスが崩れることにより自閉症スペクトラム障害を発症するリスクが上昇することが明らかとなってきた。しかし、これらのサイトカインの誘導機構や疾患制御メカニズムなど詳細は明らかになっていない。胎生期樹状細胞がこれらに関係している可能性は十分に考えられる。

2. 研究の目的

これらの現状を踏まえ、本研究では、胎生期樹状細胞についてその前駆細胞の分化制御機構、及び胎生期樹状細胞の機能、炎症における役割について解明し、生後の脳の発達や行動異常にどのように寄与しているのかを解明することを目的とした。胎生期樹状細胞、その前駆細胞を同定し、樹状細胞について抗原提示やサイトカイン産生等の免疫応答について検討したところ、成体期樹状細胞と遜色なく免疫反応を誘導することが明らかとなった。

3. 研究の方法

(1) 胎仔肝臓中の樹状細胞および樹状細胞の前駆細胞の同定

C57BL/6Jの妊娠15日目雌マウスから胎仔肝臓を取り出し、コラゲナーゼとDNaseI処理、赤血球溶解後、抗体による多重染色し、フローサイトメーターにて解析した。樹状細胞前駆細胞、樹状細胞は希少な細胞集団であるため、前駆細胞はPE-Cy5標識抗マウスCD3、NK1.1、TER119、B220、Gr-1抗体で、樹状細胞はPE-Cy5標識抗マウスCD3、NK1.1、TER119、B220抗体で陽性となったものをLineage陽性として排除し、抗マウスc-kit、Flt3、M-CSFR、IL-7R、F4/80、PDCA-1、CD11c、I-A/I-E抗体で染色して解析した。

(2) 混合リンパ球反応

C57BL/6Jの妊娠15日目胎仔肝臓、またはC57BL/6Jの10週令雄マウスの脾臓を取り出し、コラゲナーゼとDNaseI処理、赤血球溶解後、CD11cマイクロビーズを用いて単離したCD11c陽性樹状細胞を一晩TLRリガンド刺激した。翌日Balb/cマウス脾臓からCD90.2マイクロビーズを用いて単離したT細胞をCFSE(1 μ M)ラベルし、前日に刺激した樹状細胞と混合(樹状細胞:T細胞=1:2)し培養した。3日後、フローサイトメーターにてT細胞の増殖を解析した。

(3) サイトカイン産生の測定

妊娠 15 日目胎仔肝臓から単離した CD11c 陽性樹状細胞を 48 時間 TLR リガンド刺激した。細胞上清を回収し、ビーズを用いたサイトカイン多項目同時解析 (Multiplex assay) をフローサイトメーターにて行なった。

4. 研究成果

(1) 胎生期樹状細胞の前駆細胞および樹状細胞の同定

胎生期であってもマクロファージなど生体防御反応を担う免疫担当細胞が存在するため、同様に存在すると考えられる樹状細胞、同細胞の前駆細胞を同定するために妊娠 15 日目のマウスの胎仔肝臓をコラゲナーゼ処理後、抗体染色をして解析した。その結果、IL-7R⁺Flt3⁺の樹状細胞前駆細胞 (図 1 a)、F4/80⁻CD11c⁺I-A/I-E⁺の樹状細胞を見出した (図 1 b)。このことから胎生期でもマクロファージ同様樹状細胞も胎児の免疫反応を担っていることが示唆された。

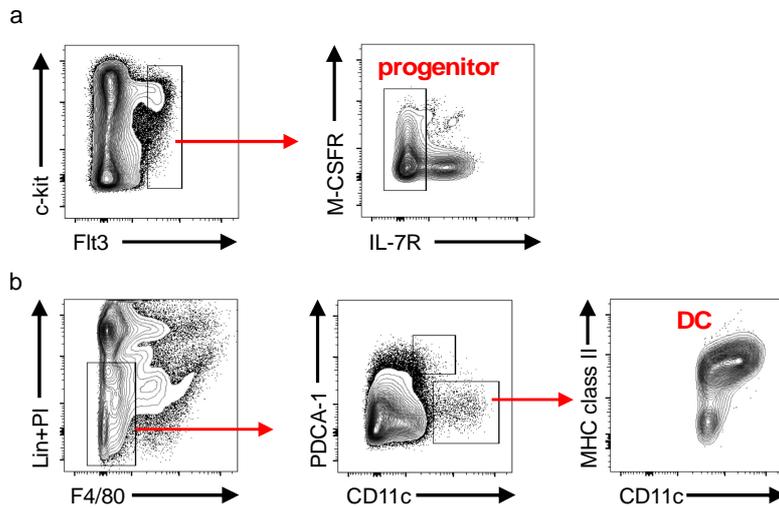


図 1. マウス胎仔肝臓中の樹状細胞前駆細胞、樹状細胞

(a) マウス胎仔肝臓から IL-7R⁺Flt3⁺ 樹状細胞前駆細胞を同定

(b) マウス胎仔肝臓から F4/80⁻CD11c⁺MHCclassII⁺ 樹状細胞を同定

(2) 胎生期樹状細胞の機能解析

胎生期樹状細胞が成体期樹状細胞と同等の機能を持つのかどうかを検討するために、混合リンパ球反応を行なった。妊娠 15 日目の胎仔肝臓から単離した樹状細胞を、一晚 TLR リガンド刺激を行なった。翌日に Balb/c マウスから単離した T 細胞を CFSE ラベルし樹状細胞と共培養した。その結果、胎生期樹状細胞は未刺激および TLR リガンド刺激のいずれも T 細胞を活性化させ、増殖させた (図 2)。よって、胎生期樹状細胞は成体期と同様、樹状細胞としての抗原提示能を有することが示唆された。

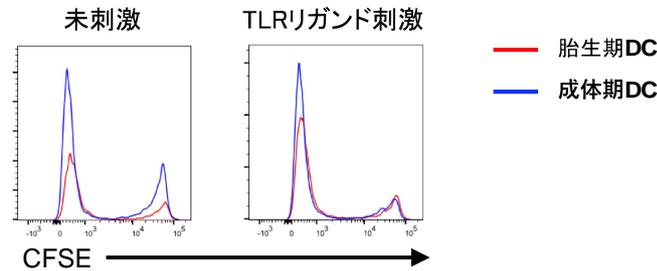


図 2 . 胎生期樹状細胞の抗原提示能

胎生期、成体期それぞれの樹状細胞と BaIb/c マウス T 細胞を 1 : 2 の割合で共培養し、T 細胞の増殖を解析した。

(3) 胎生期樹状細胞のサイトカイン産生能の検討

次に胎生期樹状細胞が成体期樹状細胞と同様に免疫応答の機能を有するのかを検証するため、妊娠 15 日目の胎仔肝臓から単離した樹状細胞を TLR リガンドで刺激し、サイトカイン産生量をタンパク質レベルで解析した。培養上清中の TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生量を調べると、胎生期樹状細胞は成体期樹状細胞と同じく免疫応答の機能を有することが明らかとなった。さらに、これら炎症性サイトカインの産生量は成体期樹状細胞よりも優位に多いことが判明した (図 2 a, b)。この結果から成体期に比べて胎生期の免疫応答は過剰であると示唆されたことから、胎児の先天性疾患との関連、胎児期特有の免疫応答の意義などを今後検証していかなければならない。

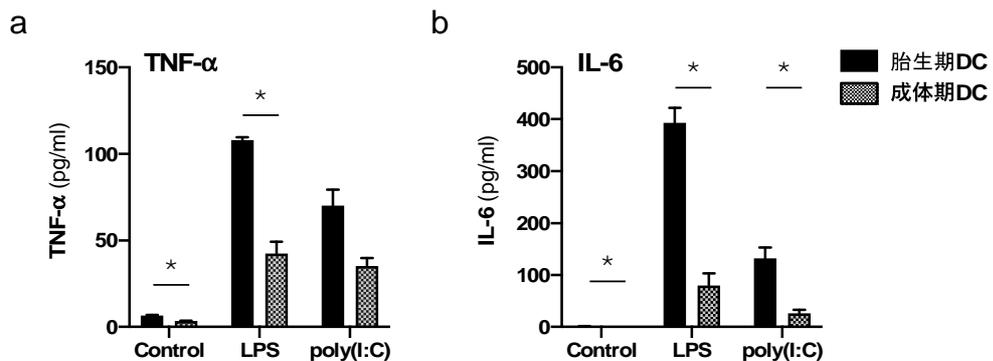


図 3 . 胎生期および成体期樹状細胞におけるサイトカイン産生能

(a) 胎生期および成体期樹状細胞の TLR リガンド刺激による TNF- α 産生量

(b) 胎生期および成体期樹状細胞の TLR リガンド刺激による IL-6 産生量

* P < 0.05 (Student ' s t-test)

<引用文献>

Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY. Extrathymic Generation of Regulatory T Cells in Placental Mammals Mitigates Maternal-Fetal Conflict. Cell. 2012 Jul 6;150(1):29-38. PMID: 22770213 DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.031.

Atladóttir HO, Thorsen P, Østergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2010 Dec;40(12):1423-30. PMID: 20414802 DOI: 10.1007/s10803-010-1006-y.

Wong H, Hoeffler C. Maternal IL-17A in autism. *Exp Neurol*. 2018 Jan;299:228-40. Epub 2017 Apr 25. Review. PMID: 28455196 DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.04.010.

Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim S V., et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*. 2016 Feb 26;351(6276):933-9. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26822608 DOI: 10.1126/science.aad0314.

Schwartz JJ, Careaga M, Chang C, Onore CE, Ashwood P. Allergic fetal priming leads to developmental, behavioral and neurobiological changes in mice. *Transl Psychiatry*. 2015 Apr 7;5(4):e543. PMID: 25849982 DOI: 10.1038/tp.2015.40.

Chez MG, Dowling T, Patel PB, Khanna P, Kominsky M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatr Neurol*. 2007 Jun;36(6):361-5. PMID: 17560496 DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2007.01.012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yabe-Wada T, Philpott CC, Onai, N.	4. 巻 10
2. 論文標題 PCBP2 post-transcriptionally regulates sortilin expression by binding to a C-rich element in its 3' UTR.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 407-413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12794. Epub 2020 Feb 3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yabe-Wada T, Matsuba S, Unno M, Onai N.	4. 巻 592
2. 論文標題 Crystal structure of the ligand-free form of the Vps10 ectodomain of dimerized Sortilin at acidic pH.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 2647-2657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13181. Epub 2018 Jul 16.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nobuyuki Onai, Junpei Asano, Rumiko Kurosaki, Shoko Kuroda, Toshiaki Ohteki.
2. 発表標題 Flexible fate commitment of E2-2high common DC progenitors implies tuning in tissue microenvironments.
3. 学会等名 第28回 日本樹状細胞研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢医科大学医学部免疫学講座ホームページ
http://www.kanazawa-med.ac.jp/~serol/Immunology/Top_Page.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	和田 俊樹 (矢部俊樹) (WADA-YABE Toshiki) (10451634)	金沢医科大学・医学部・講師 (33303)	
研究分担者	松葉 慎太郎 (MATSUBA Shintaro) (40367462)	金沢医科大学・医学部・助教 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------