

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20380162
 研究課題名（和文） 胎盤特異情報を付加させた再構築組織による母子境界領域の免疫応答の解析
 研究課題名（英文） Analysis of immune responses at the feto-maternal interface using artificial tissues including placenta-specific factors
 研究代表者
 木曾 康郎 (KISO YASUO)
 山口大学・農学部・教授
 研究者番号：10142374

研究成果の概要（和文）：

糖尿病やアレルギー状態は子宮 NK 細胞の分化を遅らせ、そのアポトーシスを抑制し、胎盤特異因子である胎盤成長因子(P1GF)タンパクを減少させたが、代償的に成熟子宮 NK 細胞を有意に増加させ、妊娠維持に必要な P1GF タンパクを確保しているものと示唆された。一方、血管内皮成長因子には変化がなかったが、脱落膜形成を促進し、その結果、脱落膜由来のインシュリン様成長因子およびインターロイキン-15 が子宮 NK 細胞の分化を誘導したものと示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Under the condition of diabetes or allergy, differentiation of uterine natural killer (uNK) cells was delayed, their apoptosis was inhibited, and placental growth factor (P1GF) was decreased in production. However, the number of mature uNK cells was significantly increased, suggesting that deficiency of P1GF was compensated with P1GF secreted by uNK cells. Under such conditions, expression of vascular endothelial growth factor had no changes, but decidualization was promoted, suggesting that differentiation of uNK cells was induced by insulin-like growth factor and interleukin-15 derived from decidual cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトや家畜において原因不明の習慣性流産や着床不全等の生殖学的難問が顕著に増加している。原因の一つに母子境界の免疫寛容部位の作製の失敗による着床・胎盤形

成不全がある。また、食資源の確保と期待されたクローン動物も受胎率が思うように改善できない。この大きな原因も母子境界の免疫寛容不全による着床不全があげられている。胎盤の免疫寛容部位獲得機構としての

(i)免疫担当細胞の特異性、(ii)子宮内サイトカインネットワーク、(iii)MHC 発現の特異性、(iv)補体調節因子、等の情報の圧倒的不足により、習慣性流産や着床不全等に関与する機構に関してほとんど着手されていない。上記4点のうち特に免疫担当細胞の特異性および子宮内サイトカインネットワークを明らかにするために、我々はビトロで再現可能で、シンプルな実験系が不可欠との結論に至った。子宮を構成する各細胞の株化を試み、胎盤特異情報を付加した胎盤様組織を作成し、胎盤様組織と子宮との間で起こる母子境界領域の免疫応答を検討することとした

2. 研究の目的

本研究の目的は、妊娠現象の全過程を通して母子境界領域での免疫応答と胎盤特異的情報との関連を総括的に把握することである。すなわち、種普遍的に妊娠子宮に出現する子宮NK細胞の機能と分化を明らかにする。また、胎盤成長因子(PIGF)と血管内皮成長因子(VEGF)に注目し、さらに脱落膜組織から分泌されるインシュリン様成長因子(IGF)、さらにTh1/Th2サイトカインのネットワークに関して明らかにする。これらの胎盤特異情報各因子を、再構築組織様塊に導入し、これと子宮内膜との相互作用の解析を行い、複雑な母子境界領域の免疫応答機構と胎盤特異的情報との関連を総括的に捉えることを目的とした。

3. 研究の方法

用いたモデルマウスは、自然流産モデル2種、実験流産モデル2種、自然ミュータント2種、遺伝子改変モデル3種、遺伝子破壊モデル3種である。作成した細胞塊は子宮上皮+結合組織、血管内皮+結合組織、子宮上皮+結合組織+血管内皮から構成されるものを用いた。各組織間には吸水ポリマーのシートが介在している。導入を試みた因子は18種類に上る。これらの組み合わせで、インビトロ、インビボで実験を行い、解析は形態学的、組織化学的、生化学的、免疫学的手法により実施した。

4. 研究成果

本研究の目的は、妊娠現象の全過程を通して母子境界領域での免疫応答と胎盤特異的情報との関連を総括的に把握することであった。多種多様なモデルと因子を用いたが、一定の成果を得た組み合わせについて述べる。

(1)胎盤特異情報の因子として、胎盤成長因子(Placental Growth Factor, PIGF)に注目し、流産モデルとしてインスリン依存型およびインスリン非依存型糖尿病マウスモデルを駆使して、その生殖能力を検討した。さらに母子境界領域における子宮NK細胞の分化と機能に関して検討した。両糖尿病マウスモデルの生殖能力は対照と比べて、子宮重量、胎子数、胎盤重量が有意に減少した。組織学的には胎盤迷路部が縮小し、基底脱落膜と間膜腺は肥大した。しかしながら、胎子への最も重要な血液供給であるラセン動脈には顕著な変化は認められなかった。PIGFmRNA発現は糖尿病モデルで有意に減少したが、そのタンパク質発現には有意な変化は認められなかった。PIGFタンパクを産生する栄養膜細胞層の縮小にもかかわらず、そのタンパク量が変化しなかったことは他の組織・細胞による代償性機能が働いたものと推察された。その候補として、子宮NK細胞を検討した結果、基底脱落膜および間膜腺におけるその細胞密度に変化はなかったが、基底脱落膜および間膜腺の肥大と考え合わせるとその細胞数は有意に増加していた。さらに、妊娠満期には消失する子宮NK細胞が依然として存在したことから、アポトーシスが抑制されていることが疑われた。すなわち、糖尿病状態(高血糖症)は栄養膜からのPIGFタンパクを減少させるが、代償的に子宮NK細胞を有意に増加させ、妊娠維持に必要なPIGFタンパクを確保しているものと示唆された。さらに、子宮NK細胞は妊娠15日以降アポトーシスを起こし、子宮から消失していくが、このアポトーシス抑制が糖尿病状態(高血糖症)で誘起されており、その抑制はFas発現抑制によるものであることが分かった。その結果、妊娠後期に至っても、子宮NK細胞は依然として存在しており、妊娠後期に悪影響を及ぼすことが示唆された。

(2) 株化した子宮上皮細胞に対しては、LIF を添加した結果、シグナル伝達物質 STAT3 のリン酸化が起き、クローン細胞のエストロジェン添加培養は LIF 分泌能を示したが、子宮腺上皮細胞には変化がみられなかった。細胞培養に細胞外マトリックスコーティングデイス（ECM-D）を使用した際に、上皮細胞の極性に影響が現れ、ECM-D の種類によって極性が変化した。さらに、エストロジェン添加によりその極性は著しい変化を示し、これらの変化が着床に関与していることが疑われた。着床現象は細胞外マトリックスと密接な関係にあるので、細胞外マトリックスと上皮細胞の極性の関係を検討する必要がある。

(3) 株化した子宮内膜細胞（繊維芽細胞）にインシュリン様成長因子（IGF）を導入した結果、子宮 NK 細胞の成熟に関与していることが分かった。未分化な子宮 NK 細胞は無顆粒性であるが、IGF との相互作用により、顆粒を持つようになった。しかしながら、過剰な IGF 発現は子宮 NK 細胞を死滅させた。以前、我々はインビボで子宮 NK 細胞の分化は脱落膜細胞が誘導することを報告したが、その因子が脱落膜細胞由来の IGF であることが分かった。特に着床後期から胎盤形成初期にかけて、子宮 NK 細胞の分化に強く影響することが示唆された。

(4) 子宮 NK 細胞の分化/増殖に関して T-および B-細胞の影響を明らかにするため、SCID マウスを用いて、検討した。SCID 妊娠初期において、子宮 NK 細胞の分化は大幅に遅れ、未熟な子宮 NK 細胞のみであったが、妊娠中期には正常と変わらなくなった。子宮 NK 細胞の分化、特にその初期において、T-および B-細胞は強く影響していることが示唆された。驚いたことに、SCID 脱落膜細胞は胎盤形成初期において IGF と IL-15 を有意に高く分泌していた。これらにより、子宮 NK 細胞の分化は回復したものと示唆された。

(5) Th2 サイトカイン優勢なアレルギーモデルマウスを用いて、生殖能力を検討した。特に、IgE と母子境界領域で出現するリンパ球との関連を明らかにすることを目的とした。さらに、胎盤特異情報の因子として、胎盤成長因子（PlGF）の他に血管内皮成長因子（VEGF）に注目した。実験的に（強制的に）誘

導させたアレルギーモデルマウスでは、対象群と比較して、血中 IgE 濃度は有意に高く（約 100 倍）、胎盤の発達（重量）も悪かったが、胎子数と流産率に有意な差は見られなかった。逆に、間膜腺の発達は増加したが、そこで増殖する子宮 NK 細胞の動態に有意な変化は見られなかった。しかしながら、未熟な子宮 NK 細胞は有意に低く、アレルギー状態が子宮 NK 細胞の分化に強く影響していることが示唆された。IgE レセプターは変化しなかったが、高親和性のレセプターと低親和性のレセプターのバランスに変化が見られ、このアンバランスにより、子宮 NK 細胞の分化に影響を受けたものと考えられた。VEGF は顕著な変化が見られなかったが、PlGF は低い傾向にあり、そのため胎盤の発達が低かったものと考えられた。

(6) 前項と同じ目的で、自然発症アレルギーモデルマウスを用いて、生殖能力を検討した。対象群や前項の実験発症群と比較して、血中 IgE 濃度はさらに有意に高く（数百倍）、胎盤の発達（重量）も悪かった。これは前項の実験発症例と比較しても有意に異なる。統計的には胎子数と流産率に有意な差は見られなかったが、自然発症例ではそのバラツキが大きく、着床、妊娠状態の恒常性が失われているものと推察された。特に、着床間領域でポリープ状に子宮内膜が突出する箇所が認められ、さらに鬱血部位が存在し、血管透過性が増加していることが分かった。これらの病理的所見が妊娠維持の致命傷に必ずしもなっていないが、胎子の発育や胎盤形成に強く影響していることが示唆された。子宮 NK 細胞の分化もさらに遅れ、血管内皮成長因子（VEGF）と胎盤成長因子（PlGF）も有意に低かった。特に脱落膜での VEGF は前年度の実験発症群では変化が見られなかったが、有意に低下し、ラセン動脈の形成不全が認められ、局所での高血圧状態を誘起しているものと考えられ、これがひいては鬱血状態をさらに憎悪させたものと推察された。IgE レセプターは前年度の実験群と同様に変化しなかった。総じて、自然発症アレルギーの方が実験発症アレルギーより、免疫担当細胞の分化にも VEGF や PlGF の発現にも強い影響を与えることが分かった。総じて、高 IgE 血症が妊娠過

程において、免疫担当細胞に影響を与えること、特にその分化過程に強く影響することが示唆された。

(7) アレルギーモデルマウスで見られたポリープ状に子宮内膜が突出する組織塊を取り出し、これを他のマウス子宮内に移植したところ、血管洞が形成され、その周囲には漏出した血液(鬱血)が見られた。この組織塊には自然な状態で子宮上皮と結合組織(一部脱落膜化)が含まれており、人工的に作成した細胞塊より有効であろうと思われた。今後の展開を期待されたい。

(8) 内分泌攪乱物質(BPA)で暴露された母親から子どもを取り、その子ども(子宮内暴露のみ経験)からさらに子ども(孫、全く暴露の経験なし)を取り、その生殖能力を検討した。孫の子宮はHOXA10メチレーションパターンに影響が見られ、妊娠させると、間膜腺はやや過形成で、脱落膜は低形成であった。子宮NK細胞数は有意ではなかったが、高い傾向にあり、未分化なものが増数した。重篤ではなかったが、次世代に少なからず影響を与え、母子境界領域での免疫応答にも影響を及ぼす可能性が考えられる。現在、これの胎盤特異情報に関して解析を実施している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

- ① Hiyama M, Kusakabe KT, Kuwahara A, Wakitani S, Khan H, Kiso Y. Differentiation of uterine natural killer cells in the pregnant, SCID (*scid/scid*) mice. *J Vet Med Sci*, 2011(in press). 査読有り
- ② Hiyama M, Choi E-K, Wakitani S, Tachibana T, Khan H, Kusakabe KT, Kiso Y. Bisphenol-A (BPA) affects reproductive formation across generations in mice. *J Vet Med Sci*, 2011(in press). 査読有り
- ③ Khan H, Kusakabe KT, Wakitani S, Hiyama M, Kiso Y. Quantitative expression and immunohistochemical detection of glucose transporters, GLUT1 and GLUT3 in the rabbit placenta during successful pregnancy. *J Vet*

Med Sci, 2011(in press). 査読有り

- ④ Sugiyama M, Terakawa J, Khan H, Wakitani S, Choi EK, Kiso Y, Hondo E. Spacing of the embryo in the uterus is disrupted by the supine position of the body during the peri-implantation period in mice. *J Reprod Dev*, 56:191-194, 2010. 査読有り
- ⑤ Phichitrasilp T, Hondo E, Rerkamnyuaychoke W, Wakitani S, Sugiyama M, Terakawa J, Kiso Y. Reproductive performance in diabetes mice with a special reference to uterine natural killer cells and placental growth factor. *J Vet Med Sci*, 71: 519-523. 2009. 査読有り
- ⑥ Terakawa J, Hondo E, Sugiyama M, Wakitani S, Stewart CL, Kiso Y. Agrin pathway is controlled by leukemia inhibitory factor (LIF) in murine implantation. *J Reprod Dev*, 55: 293-298. 2009. 査読有り
- ⑦ Kusakabe K, Kiso Y, Hondo E, Kato K, Okada T, Shibata MA, Otsuki Y. Spontaneous endometrial hyperplasia in the uteri of IL-2 receptor beta-chain transgenic Mice. *J Reprod Dev*, 55: 273-277. 2009. 査読有り
- ⑧ Phichitrasilp T, Hondo E, Kusakabe K, Nakagawa Y, Ihara K, Wakitani S, Kiso Y. Uterine natural killer cells in perforin and β_2 -microglobulin deficient mice. *J Vet Med Sci*, 71: 251-253. 2009. 査読有り
- ⑨ Wakitani S, Hondo E, Phichitrasilp T, Stewart CL, Kiso Y. Up-regulation of Indian hedgehog gene in the uterine epithelium by leukemia inhibitory factor during mouse implantation. *J Reprod Dev*, 54:113-116. 2008. 査読有り
- ⑩ Maeda K, Hondo E, Terakawa J, Kiso Y, Nakaichi M, Endoh D, Sakai K, Morikawa S, Mizutani T. Isolation of a novel bat adenovirus from a fruit bat (*Pteropus dasymallus yaeyamae*). *Emerging Infect Dis*, 14: 347-349. 2008. 査読有り
- ⑪ Wakitani S, Hondo E, Shimokawa T,

Kusakabe K, Okada T, Nakamuta N, Stewart CL, Kiso Y. Effects of leukemia inhibitory factor on lectin-binding patterns in the uterine stromal vessels of mice.

Immunobiology 213: 143-150. 2008. 査読有り

[学会発表] (計 25 件)

- ① 檜山雅人・Choi EK・木曾康郎. 生殖器形成における BPA 暴露による次世代生殖器への影響. 第 150 回日本獣医学会. 2010.9.18. 北海道、帯広畜産大学.
- ② 室田晋吾・木曾康郎・その他 3 名. 着床遅延マウスにおける分娩までの誘導. 第 150 回日本獣医学会. 2010.9.18. 北海道、帯広畜産大学.
- ③ 杉晋二・木曾康郎・その他 5 名. マウス子宮 NK 細胞は妊娠子宮内での細菌感染防御に貢献するか. 第 150 回日本獣医学会. 2010.9.18. 北海道、帯広畜産大学.
- ④ 桑原愛・木曾康郎・その他 2 名. 妊娠 SCID マウスの子宮 NK 細胞の動態. 第 150 回日本獣医学会. 2010.9.18. 北海道、帯広畜産大学.
- ⑤ 寺井恵子・Khan H・木曾康郎. ウサギ胎盤における胎子側血管構築に関する形態学的研究. 第 150 回日本獣医学会. 2010.9.18. 北海道、帯広畜産大学.
- ⑥ 小林俊夫・木曾康郎. フクロモモンガ雌性生殖器の形態学. 第 149 回日本獣医学会. 2010.3.27. 東京、日本獣医生命科学大学.
- ⑦ Kobayashi T, Hondo E, Kiso Y. Morphology of the female reproductive tracts of the Sugar glider, *Petaurus breviceps*. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).
- ⑧ Sugiyama M, Kiso Y, Hondo E. Supine position of the body during peri-implantation leads disruption of the embryo spacing in mice. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).
- ⑨ Khan H, Fayed M, Hondo E, Kiso Y. Comparative histology of epitheliochorial placenta in the horse, pig and camel. The

3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).

- ⑩ Terai K, Hayashi K, Hondo E, Kiso Y. Morphological aspects of the maternal and fetal blood pathway in the rabbit placenta. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).
- ⑪ Phichitrasilp T, Hondo E, Rerkamnuaychoke W, Kiso Y. Diabetes condition inhibits uNK cell apoptosis in mice. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).
- ⑫ Wakitani, S, Ohta Y, Kiso Y, Hondo E. Involvement of estragen-pathways in expression of progesterone-receptor in mouse uterus. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).
- ⑬ Terakawa J, Wakitani S, Sugiyama M, Kiso Y, Hondo E. The effects of exogenous PEGlyated IgG on embryo implantation. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).
- ⑭ Hiyama M, Choi E-K, Hondo E, Kiso Y. The effects of bisphenol A on formation of reproductive organs in mice. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).
- ⑮ Kuwahara A, Hondo E, Kiso Y. A study of natural killer cells found in pregnant, SCID mice. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).
- ⑯ Sugimoto S, Hondo E, Kiso Y. A study of reproductive performance in NC/Nga mice with the spontaneous atopic dermatitis. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).
- ⑰ Sugi S, Hondo E, Kiso Y. Tricostatin A enhances phospholylation of signal

transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in murine uterine epithelium. The 3rd Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2009.11.5. Cheongju (Korea).

⑮ 杉元聡子・木曾康郎・その他5名. 自然発症皮膚炎マウスモデルにおける子宮NK細胞の分化に関する基礎的検討. 第148回日本獣医学会. 2009.9.25. 鳥取、鳥取大学.

⑯ 脇谷晶一・木曾康郎・その他2名. マウス着床期における子宮内膜プロゲステロン受容体発現の調節. 第148回日本獣医学会. 2009.9.25. 鳥取、鳥取大学.

⑰ 杉山真言・木曾康郎・その他2名. マウス胚のspacing決定時期の特定. 第148回日本獣医学会. 2009.9.25. 鳥取、鳥取大学.

⑱ 寺川純平・木曾康郎・その他3名. ポリエチレングリコール化正常ウサギIgGはマウス胚着床を阻害する. 第148回日本獣医学会. 2009.9.25. 鳥取、鳥取大学.

⑲ 清時啓史・木曾康郎・その他3名. ウサギ胎盤における母体側血管系の構築, 特に動脈道に関して. 第147回日本獣医学会. 2009.4.3. 栃木、宇都宮大学.

⑳ 辻知香・木曾康郎・その他2名. ハシブトカラスとフクロウにおける後肢のロック機構の比較. 第146回日本獣医学会. 2008.9.25. 宮崎、宮崎大学.

㉑ 水間なつみ・木曾康郎・その他2名. 分娩前後におけるマウス子宮上皮の再生. 第146回日本獣医学会. 2008.9.25. 宮崎、宮崎大学.

㉒ 檜山雅人・木曾康郎・その他2名. ラクダ胎盤の組織学的特徴. 第146回日本獣医学会. 2008.9.25. 宮崎、宮崎大学.

〔図書〕(計4件)

① 木曾康郎・日下部健・金井正美. 獣医組織学(第五版). 第15章胎盤. 日本獣医解剖学会編. 学窓社. pp.219-229. 2011.

② 木曾康郎. スンクスの生物学. 磯村源蔵監修. 第4編スンクスの解剖・組織, 2-5) 腸管における4種類の内分泌細胞, pp.126-127, および 5-4) 胎盤関門の構造. pp.166-168. 学会出版センター. 2011.

③ 谷口和之・木曾康郎・佐藤英明監修. 獣

医発生学. pp.1-392. 学窓社. 2008.

④ 木曾康郎. カラーアトラス獣医解剖学. 第4章後肢. pp.241-251. 日本獣医解剖学編集委員会. チクサン出版社. 2008.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木曾 康郎 (KISO YASUO)

山口大学・農学部・教授

研究者番号: 10142374

(2) 研究分担者

岩田 裕之 (IWATA HIROYUKI)

山口大学・農学部・教授

研究者番号: 40193750

加藤 大智 (KATO HIROTOMO)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号: 00346579

(3) 連携研究者

なし