

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06954

研究課題名(和文)胎生期樹状細胞の疾患制御機構の解明

研究課題名(英文)The disease regulation mechanisms in fetal dendritic cells

研究代表者

齋藤 史路(SAITO, Fumiji)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20569016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期樹状細胞(Lin-F4/80-CD11c+MHCII+)は成体期樹状細胞の細胞表面に発現しているCD4やCD8を発現していないものの、CD11c+CD4-CD8-細胞は抗原提示能やサイトカイン産生能など樹状細胞としての基本的な機能を持つことが判明した。また、母体感染のモデルであるMIAモデルマウスにおいては、胎生期の樹状細胞集団が感染前より増加し、さらにCD86の発現が上昇していた。このことは母親の病原体感染などの炎症反応によって、胎仔免疫細胞の免疫反応が惹起されることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに樹状細胞、マクロファージ等の細胞の機能や感染免疫における役割において成体期の免疫細胞については非常によく研究され、免疫学的な意義が明らかになっているが、妊娠時の母体内の胎児の免疫細胞に関しては不明な点が多い。胎児は母体から攻撃されることなく、免疫寛容が成立しているが、その制御機構は十分に理解されていない。この時期の免疫細胞の機能や胎生期の生体防御機構の仕組みを解明することは自己免疫疾患やガン免疫、さらには臓器移植治療などの自己の免疫認識機構が関与する疾患への新たな知見、さらには新規治療方法の開発につながり、社会的意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although fetal dendritic cells (Lin-F4/80-CD11c+MHCII+) do not express CD4 and CD8, which are expressed on the cell surface of adult dendritic cells, it was revealed that CD11c+CD4-CD8- cells have dendritic cell functions such as antigen presentation and cytokine production. In the MIA model, a mouse model of maternal infection, the population of fetal dendritic cells was increased and CD86 expression was upregulated. This suggests that fetal immune responses are elicited by maternal infection.

研究分野：免疫学

キーワード：胎生期樹状細胞 樹状細胞 母体感染

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

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。しかし、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の免疫応答機構はよくわかっていない。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ているが、胎児における病原性微生物を感知する免疫反応、特に免疫担当細胞の動態に関しては不明である。

樹状細胞は微生物を感知する受容体や細胞内センサーを発現し、生体内に侵入してきた微生物を素早く感知して活性化し、様々なサイトカインを産生して自然免疫を誘導する。さらに微生物由来の物質を取り込んで分解し、抗原として T 細胞に提示することで獲得免疫を始動させる重要な免疫担当細胞である。成人期における樹状細胞の分化や活性化機構、さらに免疫誘導機構は非常に詳細に研究されているが、胎生期における樹状細胞の活性化機構、免疫誘導機構に関しては明らかではない。

2. 研究の目的

妊娠期の免疫寛容は制御性 T 細胞や制御性 NK 細胞によってコントロールされているが、一方で母体を介した微生物感染に対する胎児の免疫担当細胞や免疫反応については定かではない。実際に母体の微生物感染や炎症が胎児の脳の発達や自閉症の発症に影響を及ぼすことが報告されているため、胎生期樹状細胞が病原性微生物や抗原に対する免疫反応に関わっている可能性は十分にあるが、その詳細は明らかとなっていない。

胎生期の免疫細胞の機能や生体防御機構の仕組みを解明することは、自己免疫疾患やガン免疫、さらには臓器移植治療などの自己の免疫認識機構が関与する疾患への新たな知見、さらには新規治療方法の開発につながると考え、胎生期樹状細胞の機能や炎症における役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胎生期樹状細胞の同定と NGS による細胞表面抗原発現の網羅的解析

妊娠 12 日目以降の C57BL/6J マウスの胎仔肝臓からコラゲナーゼ処理、赤血球除去処理をした細胞を Lineage マーカー抗体や以下の抗体（抗 c-kit 抗体、抗 Flt3 抗体、抗 IL-7R α 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 CD11c 抗体、抗 MHCclassII 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 CD24 抗体、抗 TLR4 抗体、抗 TLR9 抗体）により染色し、Lineage 陰性の細胞についてフローサイトメトリーにて解析した。

NGS 解析においては、セルソーターで単離した F4/80 陰性 CD11c 陽性細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーにて免疫関連の遺伝子に関する mRNA の発現を網羅的に解析した。

(2) 混合リンパ球反応

妊娠 15 日目の C57BL/6J マウスの胎仔肝臓から MACS で単離した CD11c 陽性細胞を TLR リガンドで刺激し、CFSE ラベルした Balb/c マウス脾臓由来 T 細胞と共培養した。5 日後の T 細胞の CFSE 発現量をフローサイトメトリーで測定することにより T 細胞の増殖を解析した。

(3) 胎生期樹状細胞の TLR 刺激によるサイトカイン産生

妊娠 15 日目の C57BL/6J マウスの胎仔肝臓からコラゲナーゼ処理、赤血球除去処理をした細胞をセルソーターで F4/80 陰性 CD11c 陽性細胞を単離し、TLR リガンドで刺激し、20 時間後に細胞を回収、mRNA の発現量をリアルタイム PCR で測定した。

また、妊娠 15 日目の C57BL/6J マウスの胎仔肝臓からコラゲナーゼ処理、赤血球除去処理をした細胞を MACS で CD11c 陽性細胞を単離し、TLR リガンドで刺激した。24 時間後その上清を回収し、マルチプレックスにてサイトカイン産生量を測定した。

(4) MIA モデルにおける胎生期樹状細胞の挙動解析

妊娠 12 日目のマウスに LPS を腹腔内投与し、妊娠 15 日目の胎仔肝臓から胎生期樹状細胞を単離し、フローサイトメトリーにて胎生期樹状細胞の動態を解析した。

4. 研究成果

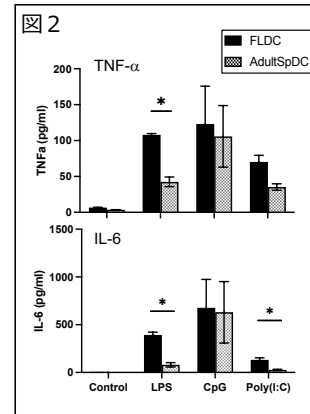
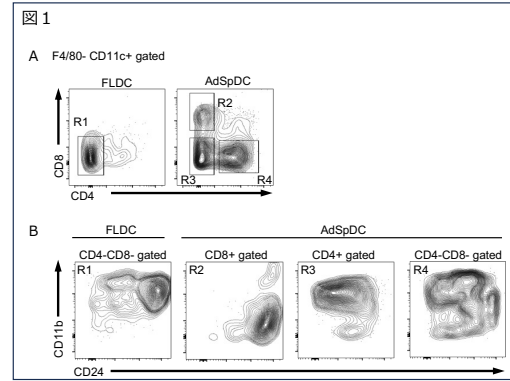
Lineage 陰性 CD11c 陽性 MHCclassII 陽性の胎生期樹状細胞の細胞表面抗原をフローサイトメトリーにて解析すると、成体期樹状細胞に発現している CD4 や CD8 がほとんど発現していないことが判明した。そして、多くの胎生期樹状細胞が CD11b を発現していることが明らかとなった (図 1)。

また、F4/80 陰性 CD11c 陽性の樹状細胞をセルソーターで単離し、NGS 解析で免疫系の細胞表面抗原の mRNA 発現について網羅的に解析すると、Irf8、Cxcr3、Clec9a など cDC1 に強く発現している表面抗原が高発現しており、Irf4 や Cx3cr1 のような cDC2 に高発現している表面抗原はほとんど発現していなかった。必ずしも成体期 cDC1 や cDC2 の表面抗原の発現パターンに合致した表現型ではなかったが、胎生期樹状細胞はおおむね cDC1 の発現パターンに類似していた。

次に混合リンパ球反応を行い、胎生期樹状細胞の抗原提示能について解析した。妊娠 15 日目の C57BL/6J マウスの胎仔肝臓から MACS で単離した樹状細胞を TLR リガンドで刺激を行ない、CFSE ラベルした Balb/c マウス脾臓由来 T 細胞と共培養すると、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。さらにオボアルブミン(OVA)を樹状細胞に取り込ませ、OVA に対する T 細胞受容体を発現する OT-I T 細胞と培養し、抗原特異的 T 細胞増殖並びに活性化誘導能を検証すると、胎生期樹状細胞は成体期樹状細胞と同様、抗原提示し、T 細胞の活性化を誘導することが示唆された。このことから樹状細胞は胎生期の時点で抗原提示能を有することが明らかとなった。

また、胎生期樹状細胞を単離し、TLR リガンド刺激をしてサイトカインの産生について mRNA 発現量およびマルチプレックスビーズにてサイトカイン産生量を解析した。結果、炎症性サイトカインの産生量が成体期樹状細胞よりも多く産生されていた (図 2)。このことから胎生期樹状細胞の病原微生物に対する免疫応答が成体期樹状細胞よりも増強されていることが明らかとなった。TNF- α や IL-6 は多様な生物活性を持ち、生体にとって良くも悪くも作用する。母体感染による、胎生期樹状細胞での多量に産生された TNF- α や IL-6 が胎児の発生異常を引き起こす可能性が考えられる。感染時の母親由来の IL-17 が胎児の脳の発生に異常をきたし、自閉スペクトラム症を引き起こすことが報告されているが、胎児樹状細胞の産生する比較的多量の TNF- α や IL-6 も関与している可能性が十分ある。またフローサイトメトリーの解析から、胎生期樹状細胞の TLR4 や TLR9 の発現が成体期樹状細胞よりも高く、TLR リガンドの刺激に対して補助シグナル分子 (CD40, CD80, CD86) の発現が著しく上昇することから感染に対する免疫応答が大きいと示唆される。実際に、母マウスに LPS を腹腔内投与 (MIA モデル) すると、胎仔肝臓中の CD11c 陽性樹状細胞の集団が多くなり、その樹状細胞は CD86 の発現が上昇していることが明らかとなった。

今後の課題は MIA モデルを用いて母体感染時における胎仔樹状細胞の詳細な機能解析である。母体感染時に成体期樹状細胞よりも多く産生される炎症性サイトカインが胎児の発生においてどのように影響を及ぼすのかメカニズムの詳細を検討することが必要である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	小内 伸幸 (ONAI Nobuyuki) (50323605)	金沢医科大学・医学部・教授 (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