

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380159

研究課題名(和文) 母子境界領域のサイトカインの免疫応答：胎盤特異情報付加再構築組織による検討

研究課題名(英文) Immune responses at the feto-maternal interface : Analysis using artificial tissues including placenta-specific factors

研究代表者

木曾 康郎 (Kiso, Yasuo)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：10142374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：母子境界領域における免疫応答を理解するために、様々なマウスモデルを用いて、免疫担当細胞の分化/増殖と胎盤特異因子との相関関係ならびにサイトカインネットワークを解析した。特に、PlGFとVEGFの動態に注目した。調べた腫瘍抑制因子、オートファジー関連因子、流産誘発因子、糖尿病因子、血圧調整因子、肥満因子はPlGFとVEGFの動態に影響を与え、流産あるいは子宮内発育遅延を誘発していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：To understand immune responses at the feto-maternal interface during pregnancy, we analyzed relationships among immunocompetent cells, placenta-specific factors and cytokine networks using various mouse models. Tumor suppressor factors, autophagy-related factors, abortion-induced factors, diabetes-induced factors, blood pressure regulation factors and obesity-related factors tested in this study can affect kinetics of the placental growth factor and vascular endothelial growth factor, and as a result, their changes can induce abortion or intrauterine growth restriction.

研究分野：生殖免疫学

キーワード：胎盤 栄養膜 胎盤成長因子 血管内皮成長因子 血管新生 アポトーシス オートファジー 脱落膜

## 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応答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、我々はピトロで再現可能で、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、Th1/Th2 サイトカインのバランスを基盤として、PIGFとVEGFに影響を与えるネットワークを明らかにする。さらに、胎盤は腫瘍と類似した細胞学的特徴を有するので、腫瘍抑制因子p53とオートファジー関連因子にも着目した。これらの胎盤特異情報の各因子を、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、絶食モデルである。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、インピトロ、インピボで実験を行い、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) 子宮上皮細胞の株化に関しては、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シユ(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。上皮細胞の極性に問題があり、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、さらに検討する必要がある。従って、本実験では、株化細胞を用いず、分離直後の上皮を用いた。繊維芽細胞(脱落膜細胞)と血管内皮細胞は以前株化したものを用いた。

(2) 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細胞数は有意に少なく、そ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とから、脱落膜細胞が子宮NK細胞の増殖を誘導し、分化は回復させたものと示唆された。実際、SCID妊娠中期では、PIGFとVEGF発現は野生型と変わらなかった。これは子宮NK細胞がPIGFとVEGFの産生に大きく関わっていることを示唆している。

(3) 腫瘍抑制因子p53とその機能の一つであるオートファジーに注目し、胎盤形成期から完成期におけるp53、MAP1LC3ファミリーの発現の変化を追跡した。p53は迷路部、基底脱落膜部、間膜腺部の各部位間、また各妊娠日齢間での変動は見られなかったが、胎盤完成期においてLC3Bが増加する傾向にあり、逆にLC3Cでは減少する傾向にあった。LC3Aについては全妊娠日齢で基底脱落膜部での発現が有意に高い。このことから、胎盤完成期(D14)における栄養膜侵入制御にLC3Bを介するオートファジーが関与していること、脱落膜の恒常性維持にLC3Aが関与していることが示唆された。p53については変動

が見られないため、他の経路からのオートファジー誘導が胎盤において働いていることが疑われる。

(4) 絶食マウスモデルを用いて、さらにMAP1LC3ファミリー、オートファジー関連因子を追跡した。栄養欠乏により誘導され、オートファジーを引き起こすLKB1、AMPK経路の上昇が胎盤完成期の基底脱落膜部で見られたため、胎子栄養要求量の増加が栄養膜侵入制御機構の一端を担っているかもしれない。LC3ファミリーの中で、LC3Bが絶食により誘導されたオートファジーに関連して特異的に増加したことから、栄養欠乏により誘導されるオートファジーにはLC3Bが関与していることが分かった。また、胎盤形成期に絶食により変動したオートファジー関連因子に差が見られたことから、胎盤血管系の構築、胎盤完成度の違いや胎子栄養要求量の違いなどでグルコース不足の程度に差があり、詳細は不明だが、PIGFとVEGF発現に影響を与えている。

(5) MHCクラスI抗原の違いによる自然流産モデルマウスを用いて、母子境界領域における母体血管構築と血管構築に関連するサイトカインの動態を追跡した。本モデルの流産部位はIFN- $\gamma$ のmRNA発現が有意に高く、IL-4のmRNA発現には変化がなかったことから、Th1/Th2比で言うと、Th1優位にシフトしていた。流産部位では、らせん動脈壁が有意に肥厚しており、細いらせん動脈の数が多く、狭窄部位が頻発した。さらに、血管構築に参与するIGF-1・VEGF・PDGFのmRNA発現は有意に上昇したが、PIGF発現に有意な変化はなかった。これは代償機構が働いたものと推察された。

(6) 糖尿病モデルマウスでは、流産率は高くないが、新生子の発育が有意に低い。そこで、子宮NK細胞の分化/増殖を検討した。妊娠後期で通常消失する子宮NK細胞が糖尿病モデルマウスでは有意な数で残存し、Fas-FasL介在性のアポトーシスが抑制されていることが分かった。妊娠後期には子宮NK細胞にはFAS抗原が発現するが、糖尿病子宮NK細胞では発現せず、機能傷害が示唆された。

(7) 前項の結果を受け、糖尿病モデルマウスを用いて、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、コリン、グレリンとそのレセプター、旨味レセプター、Kiss1とそのレセプター、苦みレセプターを追跡し、PIGFとVEGF発現との相関を明らかにした。ANPとコリンは通常妊娠進行に伴い上昇するが、糖尿病モデルで減少し、グレリンとそのレセプター、旨味レセプターは有意に減少した。Kiss1とそのレセプターは通常妊娠に伴う変化を見せないが、糖尿病モデルで有意に減少した。これらはPIGFとVEGF発現の変動と強く相関しており、糖尿病モデルマウス新生子と胎盤の発育に影響を与えたものと示唆された。

## 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12件・全て査読有り)

(1) Tachibana T, Kusakabe KT, Osaki S, Kuraishi T, Hattori S, Yoshizawa M, Kai C, Kiso Y. Histochemical specificities of adrenal cortex in the New World Monkeys, *Aotus lemurinus* and *Saimiri boliviensis*. *J Vet Med Sci*, 78(1):161-165. 2016.

(2) Imai H, Kano K, Fujii W, Takasawa K, Wakitani S, Hiyama M, Nishino K, Kusakabe KT, Kiso Y. Tetraploid embryonic stem cells maintain pluripotency and differentiation potency into three germ layers. *PLoS One*, 10(6): e0130585. doi: 10.1371/journal.pone.0130585. eCollection 2015.

(3) Sri Kantha S, Kuraishi T, Hattori S, Ishida T, Kiso Y, Kai C, Suzuki J. Behavioral Sleep of Captive Owl Monkey (*Aotus lemurinus*) in Amami Oshima, Japan. *International Medical Journal*. 22(6):521-524. 2015.

(4) Matsumoto T, Isobe K, Kusakabe K, Kuraishi T, Hattori S, Nakasato C, Matsumoto H, Fukui E, Kuwata A, Ochi M, Kiso Y, Kai C, Yoshizawa M. Morphological characterization and in vitro maturation of follicular oocytes from the owl monkey (*Aotus lemurinus*). *J Mamm Ova Res*. 32(3):103-108. 2015.

(5) Watanabe H, Matsumoto T, Nishi M, Kusakabe K, Kuraishi T, Hattori S, Matsumoto H, Fukui E, Kuwahara A, Ochi M, Kiso Y, Kai C, Yoshizawa M. Intracytoplasmic sperm injection into oocytes matured in vitro and early embryonic development in the owl monkey (*Aotus lemurinus*). *Reprod Med Biol*, 2015. DOI:10.1007/s12522-015-0229-1

(6) Nakasato C, Yoshizawa M, Isobe K, Kusakabe K, Kuraishi T, Hattori S, Matsumoto H, Fukui E, Kuwahara A, Ochi M, Kiso Y, Kai C. Morphological characterization of spermatozoa of the night monkey : Morphological characterization of spermatozoa of the night monkey. *J. Mamm Ova Res*. 32(1): 37-40. 2015

(7) Hiyama M, Kusakabe KT, Takeshita A, Sugi S, Kuniyoshi N, Imai H, Kano K, Kiso Y. Nutrient starvation affects expression of LC3 family at the fetomaternal interface during murine placentation. *J Vet Med Sci*, 77(3):305-311. 2015.

(8) Takeshita A, Kusakabe KT, Hiyama M, Kuniyoshi N, Kondo T, Kano K, Kiso Y, Okada T. Dynamics and reproductive effects of

complement factors in the spontaneous abortion model of CBA/JxDBA/2 mice. *Immunobiology* 219(5):385-391. 2014.

(9) Kawai I, Matsumura H, Fujii W, Naito K, Kusakabe K, Kiso Y, Kano K. Discoidin domain receptor 2 (DDR2) regulates body size and fat metabolism in mice. *Transgenic Res.* 23(1):165-175. 2014.

(10) Hayashi K, Kusakabe KT, Sugimoto S, Wakitani S, Sugi S, Kuniyoshi N, Hiyama M, Takeshita A, Kano K, Kiso Y. Influence of Atopic Dermatitis on Reproduction and Uterine Natural Killer Cells. *J Vet Med Sci*, 76(6):913-916. 2014.

(11) Hayashi K, Kusakabe KT, Khan H, Kuniyoshi N, Takeshita A, Hiyama M, Kano K, Kiso Y. Characteristic patterns of maternal and fetal arterial construction in the rabbit placenta. *Med Mol Morphol.* 47(2):76-82. 2014.

(12) Khan H, Kusakabe KT, Wakitani S, Hiyama M, Takeshita A, Kiso Y. Expression and localization of NO synthase isoenzymes (iNOS and eNOS) in development of the rabbit placenta. *J Reprod Dev*, 58(2): 231-236. 2012.

〔学会発表〕(計 32 件)

(1)花田紗季, 日下部健, 武下愛, 加納聖, 木曾康郎. マウス胎盤における補体調整因子 Crry の発現. 日本解剖学会中国四国学術集会 2015 .10.24-25 .愛媛大学(愛媛・松山市)

(2)小杉七草, 加納聖, 今井啓之, 日下部健, 木曾康郎. マウス四倍体胚の発生の特性に関する研究. 日本解剖学会中国四国学術集会 2015 .10.24-25 .愛媛大学(愛媛・松山市)

(3)今井啓之, 藤井渉, 日下部健, 木曾康郎, 加納聖. 四倍体マウス胚性幹細胞の細胞生物学的特性の解析. 日本解剖学会中国四国学術集会 2015 .10.24-25 .愛媛大学(愛媛・松山市)

(4)安達直, 加納聖, 日下部健, 木曾康郎. マウス初期胚におけるサイズ制御に関する研究. 日本解剖学会中国四国学術集会 2015 .10.24-25 .愛媛大学(愛媛・松山市)

(5)Saki Hanada, Ken Takeshi Kusakabe, Ai Takeshita, Kiyoshi Kano, Yasuo Kiso.

Expression of the complement regulator Crry in the mouse placenta. 5th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists. 2015.2.12-13.Bali, Indonesia.

(6)Orie Nagaoka, Harutaka Murase, Ken Kusakabe, Kiyoshi Kano, Yasuo Kiso. Histological comparison of the guinea pig and nutria placentas. 2015.2.12-13. Bali, Indonesia.

(7)Shota Yamane, Yungkun Kim, Ken Kusakabe, Kiyoshi Kano, Junpei Kimura, Yasuo Kiso. Placentation of the Korean water deer, *Hydropotes intermis argyropus*. 2015.2.12-13. Bali, Indonesia.

(8)Minori Ikeno, Park Jeong Chae, Ken Kusakabe, Kiyoshi Kano, Yasuhiko Ohta, Toshihiro Horiguchi, Yasuo Kiso. Lectin-binding pattern of albuminous glandular epithelium in star-spotted dogfish (*Mustelus manazo*). 2015.2.12-13. Bali, Indonesia.

(9)Chigusa Kosugi, Kiyoshi Kano, Ken Takeshi Kusakabe, Yasuo Kiso. Analysis of Zic3 expression in the mouse early embryo. 2015.2.12-13.Bali, Indonesia.

(10)Sunao Adachi, Kiyoshi Kano, Ken Takeshi Kusakabe, Yasuo Kiso. Optimized condition of the number of mouse embryonic stem cells for the production of chimeric embryos by piezo assisted manipulator. 2015.2.12-13. Bali, Indonesia.

(11) Minori Ikeno, Park Jeong Chae, Ken Kusakabe, Kiyoshi Kano, Yasuhiko Ohta, Toshihiro Horiguchi, Yasuo Kiso. Histology of albuminous glands in star-spotted dogfish (*Mustelus manazo*) with a special reference to lectin-binding patterns. 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation. 2014.10.14-17. Tam Dao National Park,

Hanoi, Vietnam.

(12) Shota Yamane, Joon Hyuk Sohn, Ken Kusakabe, Kiyoshi Kano, Masahiro Yasuda, Junpei Kimura, Yasuo Kiso. Morphology of the Korean water deer, *Hydropotes intermis argyropus*, placenta. 2014.10.14-17. Tam Dao National Park, Hanoi, Vietnam.

(13) 檜山雅人、日下部健、加納 聖、木曾康郎. マウス胎盤における MAP1LC3 ファミリー発現動態：正常胎盤と絶食時胎盤の比較. 第 157 回日本獣医学会 2014.9.9.11 北海道大学 (北海道・札幌市)

(14) 吉田優司、日下部健、伊藤良樹、倉石武、服部正策、吉澤緑、甲斐知恵子、檜山雅人、加納聖、木曾康郎. 新世界ザルの眼における比較形態学的研究. 第 157 回日本獣医学会 2014.9.9.11 北海道大学 (北海道・札幌市)

(15) 松本拓也、飯村真衣、日下部健、倉石武、服部正策、松本浩道、福井えみ子、桑波田暁子、越知正憲、木曾康郎、甲斐智恵子、吉澤 緑. リスザル卵核胞期卵子の体外受精. 第 13 回生殖バイオロジー東京シンポジウム. 2014.7.27-7.27 都市センターホテル (東京・千代田区)

(16) Ai Takeshita, Tomohiro Kondo, Kiyoshi Kano, Yasuo Kiso, Toshiya Okada, Ken Takeshi Kusakabe. Upregulation of complement alternative pathway in the mouse model of spontaneous abortion. 46th Annual Meeting Society for the Study of Reproduction. 2013.7.22-26. Montreal, Canada

(17) Masato Hiyama, Ken Takeshi Kusakabe, Kiyoshi Kano, Yasuo Kiso. Possible roles of p53 at the fetomaternal interface during pregnancy in mice. 46th Annual Meeting Society for the Study of Reproduction. 2013.7.22-26. Montreal, Canada

(18) 尾崎早百合、日下部 健、加納 聖、服部正策、倉石 武、吉澤 緑、甲斐知恵子、木

曾康郎. 新世界ザルの副腎に関する形態学的研究. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 2013.9.20-22. 岐阜大学 (岐阜・岐阜市)

(19) 鳥海早紀、日下部 健、武下愛、加納聖、木曾康郎. 自然流産モデルマウスの母子境界領域における母体血管構築と関連サイトカイン. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 2013.9.20-22. 岐阜大学 (岐阜・岐阜市)

(20) 中里千帆、磯部圭祐、日下部 健、倉石武、服部正策、松本浩道、福井えみ子、桑波田暁子、越知正憲、木曾康郎、甲斐知恵子、吉澤 緑. 新世界ザルの精子形態観察と凍結保存. 日本畜産学会 第 117 回大会. 2013.9.9-10. 新潟大学 (新潟・新潟市)

(21) 中里千帆、磯部圭祐、日下部 健、倉石武、服部正策、松本浩道、福井えみ子、桑波多暁子、越知正憲、木曾康郎、甲斐知恵子、吉澤緑. ヨザル精子の形態観察と凍結保存. 第 54 回日本卵子学会. 2013.5.25-26. 学術総合センター (東京・千代田区)

(22) 武下愛、近藤友宏、加納聖、木曾康郎、岡田利也、日下部健. 妊娠高血圧症候群における胎盤内および血清中の補体第二経路活性. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2013. 3.28-30. サポートホール高松・かがわ国際会議場 (香川・高松市)

(23) 武下愛、鳥海早紀、吉田優司、近藤友宏、加納聖、木曾康郎、岡田利也、日下部健. 自然流産モデルの母子境界領域における補体第二経路活性. 第 27 回日本生殖免疫学会. 2012.12.9-10. 大阪医科大学 (大阪・高槻市)

(24) 檜山雅人、日下部健、加納聖、木曾康郎. 正常妊娠過程における胎盤での p53 の役割. 第 27 回日本生殖免疫学会. 2012.12.9-10. 大阪医科大学 (大阪・高槻市)

(25) Ai Takeshita Saki Toriumi, Yuji Yoshida, Kiyoshi Kano, Tomohiro Kondo, Yasuo Kiso, Toshiya Okada, Ken Takeshi Kusakabe. Complement activation at the fetomaternal interface in a mouse model of preeclampsia. The 4th Congress of the Asian Association of Veterinary Anatomist.

2012.10.24-26. Phuket, Thailand.

(26) Masato Hiyama, Takeshi Kusakabe, Kiyoshi Kano, Yasuo Kiso. Role of p53 in the placenta during successful pregnancy. The 4th Congress of the Asian Association of Veterinary Anatomist. 2012.10.24-26. Phuket, Thailand.

(27) Ryuta Yoshioka, Shoichi Wakitani, Takeshi Kusakabe, Kiyoshi Kano, Yasuo Kiso. Effect of sodium butyrate on embryo implantation in mice. The 4th Congress of the Asian Association of Veterinary Anatomist. 2012.10.24-26. Phuket, Thailand.

(28) Saki Toriumi, Takeshi Kusakabe, Masoud Fayed, Kiyoshi Kano, Yasuo Kiso. Histology of the camel placenta with a special reference to lectin binding pattern. The 4th Congress of the Asian Association of Veterinary Anatomist. 2012.10.24-26. Phuket, Thailand.

(29) 武下愛、鳥海早紀、吉田優司、近藤友宏、加納聖、木曾康郎、岡田利也、日下部 健. Allogenic 交配の胎盤内における補体第二経路活性. 日本解剖学会第67回中国・四国支部学術集会. 2012.10.20-21. 山口大学(山口・宇部市)

(30) 檜山雅人、日下部 健、加納 聖、木曾康郎. マウス胎盤内 p53 の発現と動態. 日本解剖学会第67回中国・四国支部学術集会. 2012.10.20-21. 山口大学(山口・宇部市)

(31) 武下愛、鳥海早紀、吉田優司、近藤友宏、木曾康郎、岡田利也、日下部健. CBA/J × DBA/2 自然流産モデルにおける補体第二経路の関与. 第154回日本獣医学会学術集会. 2012.9.14-16. 岩手大学(岩手・盛岡市)

(32) Isobe Keisuke, Chiho Nakazato, Ken Kusakabe, Takeshi Kuraishi, Shosaku Hattori, Hiromichi Matsumoto, Emiko Fukui, Akiko Kuwahata, Masanori Ochi, Yasuo Kiso,

Chieko Kai, Midori Yoshizawa. Oocytes of night monkeys. 4th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction. 2012.8.31-9.2. Suita, Osaka.

〔図書〕(計1件)

(1)木曾康郎・日下部健・金井正美. 獣医組織学(第六版). 第15章胎盤を担当. 日本獣医解剖学会編. 学窓社. pp.221-231. 2014.

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木曾 康郎 (Kiso Yasuo)  
山口大学・共同獣医学部・教授  
研究者番号: 10142374

### (2) 研究分担者

日下部 健 (Kusakabe Takeshi)  
山口大学・共同獣医学部・准教授  
研究者番号: 20319536

### (3) 連携研究者

加納 聖 (Kano Kiyoshi)  
山口大学・共同獣医学部・准教授  
研究者番号: 40312516