

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592487

研究課題名(和文)胎児免疫寛容における胎児抗原特異的CTLの挙動と胎盤のバリア機構の解明

研究課題名(英文)Kinetics of fetal-antigen specific cytotoxic T cell (CTL) and protection role of placenta for feto-maternal tolerance

研究代表者

市川 雅男 (ICHIKAWA, MASAO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20366660

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)：本研究では、胎児抗原特異的CTLと免疫寛容について詳細な解析を行った。我々は、胎盤組織に高発現している抑制性共刺激分子であるB7-H1 (PD-L1)に着目した。この分子はCTL上の表面レセプターPD-1を介してCTLを制御しうると考えられている。本研究では刺激シグナルである41-BBと共にこのPD-L1-PD-1系のブロッキングを行ったが、胎児抗原特異的CTLの誘導はなされたものの流産には至らなかった。このPD-L1は胎盤組織だけでなく樹状細胞やマクロファージに、またPD-1はNK細胞にも発現していることに着目したところ、これらレセプターの制御を介した新たな流産メカニズムの存在を見いだした。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the mechanism of fetal-antigen specific cytotoxic T cell (CTL) for feto-maternal tolerance focused on the B7-H1 (PD-L1). B7-H1 is expressed on placenta and several kinds of tissues. B7-H1 is the suppressive co-stimulatory molecule and is thought to suppress CTL activity. In this study, fetal-antigen specific CTL was induced by the induction of anti-B7-H1 antibody and the 41-BB, co-stimulatory molecule, for pregnant mice in vivo CTL assay. However, the miscarriage was not facilitated by these treatments. PD-L1 is expressed not only the placenta but also dendritic cells and macrophages, and PD-1 is expressed not only T cells but also NK cells. From these points of view, the correlation between the PD-L1 molecules and innate immunity were investigated for the murine pregnancy. We found the new strategy of miscarriage concerned with the innate immunity including the kinetics of PD-L1 molecules.

研究分野：産婦人科学

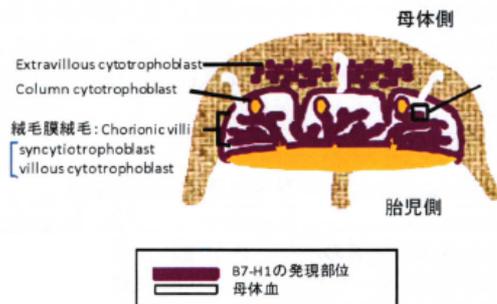
キーワード：生殖免疫 妊娠 B7-H1(PD-L1) 胎児抗原特異的CTL 自然免疫 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 胎児抗原が母体に認識されているかという疑問は、2007年に Erlebacher らのグループによって解決された。彼らは OVA 抗原が胎盤のみに発現しているマウスを用いて、母体 T 細胞が胎児由来の OVA 抗原を認識し分裂することを証明した(文献①)。しかし、これらの細胞は、無反応(アナジー)な状態にあり、何ら免疫学的異常を起こさなかった。このアナジーに至る過程に、何らかの抑制性メカニズムが介在していると考えられる。

(2) 末梢組織における免疫抑制のメカニズムとして B7-H1 (別名 PD-L1 あるいは、CD274) 分子が近年注目されている(文献②)。B7-H1 は、B7 ファミリーに属する抑制性の共刺激分子で末梢組織、肝臓、扁桃腺、各種癌等に発現が認められている。また、B7-H1 は胎盤上に強い発現が認められていることから (Fig. 1)、胎児免疫寛容においても重要な役割を担っていることが推測されていた。2005年 Guleria らのグループは、CBA と B6 マウスを交配させた妊娠マウスに B7-H1 の中和抗体を投与すると、コントロール群の流産率 18% に対して B7-H1 抗体投与群は 86% に上昇することを報告した(文献③)。この結果は胎児免疫寛容における B7-H1 の重要性を示しているが、異論も多い。実際我々のデータでは、マウス流産モデル (DBA/2♂ x CBA♀) に B7-H1 の中和抗体を投与しても、流産率に変化が見られなかった。

Fig. 1 ヒト胎盤上の B7-H1 分子の発現部位



ヒトの胎盤の B7-H1 の発現は、母体血と直に接する胎児側の最外層である栄養合体胞体層: syncytiotrophoblast に強い発現が認められ、その内側に存在する栄養合体胞層: villous cytotrophoblast にも発現が認められる(両者は母体血液と胎児血液間の物質輸送等をおこなう絨毛膜絨毛: Chorionic villi を構成する)。

(3) 流産という現象は複雑な因子が関与しているために、母体の胎児特異的細胞障害性 T 細胞の活性を直接評価することは難しい。そこで、我々は In vivo CTL 法を用いて母体の胎児抗原に対する CTL 活性を測定した。通常妊娠と Anti-B7-H1 Abs 単独投与群では、胎児抗原に対する CTL 活性が認められなかった。この結果は、B7-H1 のブロックのみでは胎児抗原特異的 CTL が誘導されない事を示した。

(4) 通常の妊娠においては、炎症等の danger signal の欠損により、胎児抗原提示の際の補助刺激シグナルが十分でないから、CTL が誘導されないと考えられる。そこで、anti-B7-H1 Abs と同時にアナジーを解除することが知られている補助刺激シグナルの 4-1BB 分子に対するアゴニスト抗体を投与したところ、CTL 活性が確認された。しかし CTL が誘導されたにも関わらず、胎盤の拒絶は見られなかった。これより、胎盤には胎児抗原特異的 CTL から身を守る新たなバリア機構の存在が示唆された。本研究の目的は、胎児免疫寛容における胎児抗原特異的 CTL の動態と胎盤のバリア機構を明らかにすることである。

2. 研究の目的

父系由来の抗原を持つ胎盤は、母体免疫系によって拒絶されない。その主な理由は、胎児抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) が、補助刺激シグナルの欠如により十分に活性化せず、さらに胎盤上の抑制性分子である B7-H1 分子によって抹消されるからと推定される。しかし、申請者は、妊娠マウスにおいて、補助刺激シグナルである 4-1BB 分子を刺激し、胎盤の B7-H1 分子をブロックすることによって活性を持った胎児抗原特異的 CTL を誘導したにも関わらず、胎盤の拒絶が起こらないことを見いだした。この結果は、胎児抗原特異的 CTL から身を守る B7-H1 分子以外の新たなバリア機構が胎盤に存在することを示唆する。本研究の目的は、活性を持った胎児抗原特異的 CTL の誘導と新たな胎盤のバリア機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) In vivo CTL assay 法

妊娠マウスに各種抗体 (Anti B7-H1/Anti 41-BB Abs など) を投与する。分娩後、メスマウスと同系マウスの脾細胞と異型マウスの脾細胞 (5 x 10E6) をそれぞれ CFSE de 0.5 nM (同系由来、low) と 5 uM (異系由来、high) でラベルして同数静脈内投与を行う。3 時間後に脾細胞を取り出し FACS 解析を施行する。FACS 上移入された細胞は、CFSE で二群 (high and low) に分けられる。コントロール群に比べてどれだけ異型マウスの細胞群 (high) が消滅したかで CTL の活性を測定する方法である。この方法を用いて、各種レセプターのブロック、刺激に対する CTL 活性の変化を調べることを試みた。

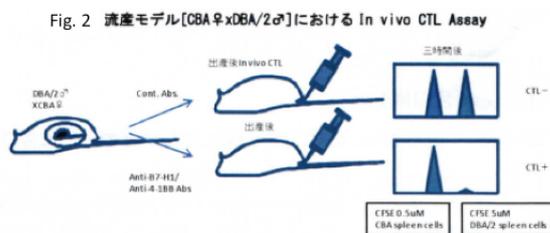
4. 研究成果

(1) B7-H1 ブロック、41-BB 投与による流産の誘導と、胎児抗原特異性 CTL の誘導

前述の通り、一般的に流産モデルとされている DBA/2 (♂) x CBA (♀) マウスに B7-H1 抗

体投与によるブロッキングを行ったが、有為な流産の誘導は認めなかった。これまでの報告では、CBA (♂) xB6 (♀) マウスにおいて流産が誘導されている (文献③)。これをもとに B6、BALB/c を用いた allogeneic、syngeneic 系の組み合わせにおいて同様の実験を行ったが、いずれも有為な流産率を見いだすことは出来なかった。このことは、In vivo assay 法において、前述の如く B7-H1 ブロッキング単独では胎児抗原特異性 CTL を誘導出来ないことに合致する。

一方、DBA/2 (♂) x CBA (♀) の組み合わせにおいて、B7-H1 のブロッキングと 41-BB の刺激の両者の組み合わせでは、in vivo CTL assay 法では下記の如く胎児抗原特異的 CTL を誘導されたにもかかわらず、予想に反して有為な流産率を見いだすことは出来なかった。



上記の実験を、別系統のマウス (allogeneic、syngeneic、B6、BALB/c などを用いた) で試みたが、胎児抗原特異的 CTL の誘導はされるにも関わらず、流産率には変化を認めなかった。

(2) 胎盤における CD8+T 細胞の分布

上記の CTL の誘導と妊娠帰結の相違について、次に胎盤、脱落膜、子宮筋層の細胞群の分布を調べた。マウス妊娠子宮の胎盤、脱落膜、子宮筋層から得られた細胞を、FACS 解析したところ、マウス種、妊娠日齢に関わらず CD8+T 細胞の割合はおよそ 1%であった。これに比較して、NK 細胞は 10-30%、樹状細胞は 5-10% と T 細胞に比してその割合は非常に高かった。この結果を考慮すると、共因子のブロック、刺激により胎児抗原特異的 CTL が誘導されているにも関わらず、流産が誘導されない理由は、子宮の局所に実際には T 細胞の分布が小さく、結果としてその他の細胞群の影響にマスクされてしまうのではないかと考えた。

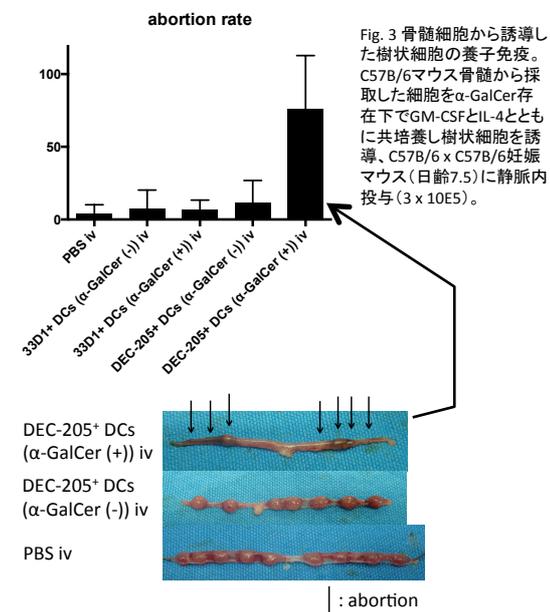
(3) 獲得免疫から自然免疫へ

実際、B7-H1 のブロッキングにおいて、CBA (♂) xB6 (♀) マウスにおいて流産が誘導されている (Guleria I: J. Exp. Med. 2005)。ここで申請者たちは、B7-H1 の分布に注目した。前述の如く、B7-H1 は胎盤に広く発現しているが、これは脱落膜中に多い樹状細胞にも発現している。B7-H1 (PD-L1) と反応するレセプターとしては PD-1 が知られているが、

これは主に T 細胞のみならず NK 細胞にも発現している。PD-L1 は様々な細胞に分布しているのに対して PD-L2 は樹状細胞、マクロファージのみに発現しており、近年腫瘍免疫を初めとして注目されている。そこで我々は、B7-H1 を獲得免疫の観点だけではなく NK 細胞、樹状細胞を含めた自然免疫系について注目していった。

(4) 糖脂質抗原による樹状細胞上の B7-H1 発現の変化と流産の誘導

マウス樹状細胞には大きく分けて Th1 指向性の DEC-205+樹状細胞と Th2 指向性の 33D1+樹状細胞が知られている。これまで申請者らのグループでは、妊娠中に樹状細胞のバランスを DEC-205+樹状細胞に傾けると流産が誘導されることを報告している (文献④)。一方、糖脂質抗原の一つである α -GalCer (α -Galactosyl Ceramide) はこの DEC-205+樹状細胞のみに取り込まれ、抗原提示をすることが近年示されている (文献⑤)。抗脂質抗原は様々な細菌感染において、外因性、内因性に体内で抗原となりうる物質であり、近年注目されている。我々はこの α -GalCer の添加により有為な流産を引き起こすこと、またこの α -GalCer でプライムした樹状細胞を妊娠マウスに養子免疫すると非常に高い流産率となることを見いだしている (Fig. 3)。



このように、申請者らの構築した流産モデルにおいて、B7-H1 の発現がどのように関わっていくのかを調べた。上記のように α -GalCer をプライムした樹状細胞は非常に強い流産誘導効果を有していたため、 α -GalCer 添加による DEC-205+樹状細胞、33D1+樹状細胞上の B7-H1 の発現強度を FACS を用いて検討した (Fig. 4)。すると興味深いことに、 α -GalCer によって Th1 指向性の DEC-205+樹状細胞上の PD-L1 の発現は増強、一方

33D1+樹状細胞上の発現は減少した。一方、活性化マーカーである CD80、CD86 の発現を調べたところ、逆に DEC-205+樹状細胞上の CD80、CD86 の発現は増加した。33D1 樹状細胞上の CD80、CD86 の発現には変化は認めなかった (Fig. 5)。

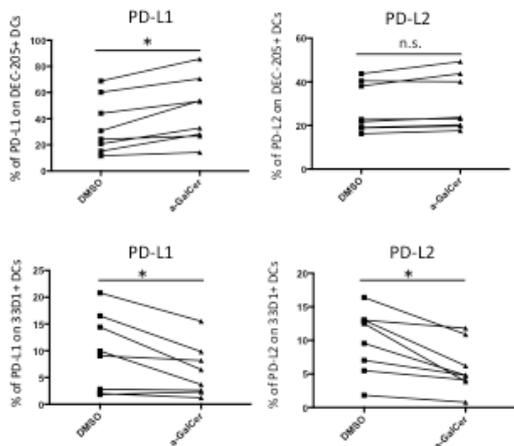


Fig. 4 α -GalCer存在下での、骨髓細胞から誘導した樹状細胞上のPD-L1、PD-L2の発現。DEC-205+樹状細胞(上段)、33D1+樹状細胞(下段)。

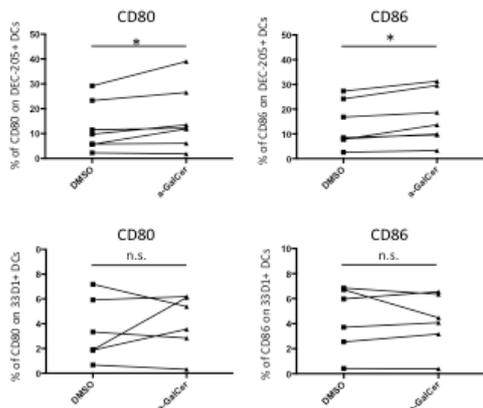


Fig. 5 α -GalCer存在下での、骨髓細胞から誘導した樹状細胞上のCD80、CD86の発現。DEC-205+樹状細胞(上段)、33D1+樹状細胞(下段)。

流産を引き起こす、 α -GalCerをプライムさせたDEC-205+樹状細胞の方が、CD80、CD86の表出は高いものの、PD-L1の発現も増加する結果となった。PD-L1とPD-1との関係は、免疫機能の観点からみれば、いわゆるブレーキの役割と捉えることが出来る。 α -GalCerによって樹状細胞は活性化されるが、そのためブレーキであるPD-L1~PD-1系の活性化が増強しているのではないかと考えている。

(5) 樹状細胞移入による流産のメカニズム解析

次に上記誘導されたマウス流産の、脱落膜、子宮筋層の細胞群のプロファイルをFACSを用いて検討した。すると興味深いことに、CD8+T細胞、CD4+T細胞の数にはまったく変化を認めず、代わりにNK細胞、NKT細胞の脱

落膜、子宮筋層局所への集積が認められた (Fig. 6) さらに現在検討中であるが、この流産の場合、NK細胞よりもNKT細胞の方が活性が強いことが認められている。

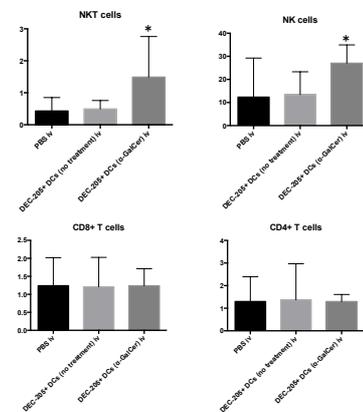


Fig. 6 樹状細胞の養子免疫における、マウス妊娠子宮筋層のNK細胞、NKT細胞、CD8+T細胞、CD4+T細胞の分布。マウスはC57B/6のsyngeneic系。

これらのことは、PD-L1の発現によりT細胞の活性化が抑制されているにも関わらず、樹状細胞-NK細胞、NKT細胞系の活性化により流産が引き起こされている可能性を示唆するものである。

現在、上記のような自然免疫を中心とする新たな流産メカニズムの解明について研究を行っている。

<引用文献>

- ①Erlebacher, A, et. al.,:J. Clin. Invest. 117, 2007, 1399-411.
- ②Ichikawa, M, et. al.,:Front Biosci. 10, 2005, 2856-60.
- ③Guleria, I, et. al.,: J. Exp. Med. 202, 2005, 231-7.
- ④Negishi, Y, et. al.,: Immunobiology, 217, 2012, 951-61.
- ⑤Arora, P, et. al., : Immunity, 40, 2014, 105-16.

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 1 件)

- ①根岸 靖幸、高橋 秀実
樹状細胞による妊娠、分娩の制御
62(6)巻、2014、604-608

[学会発表] (計 3 件)

- ①根岸 靖幸、市川 智子、竹下 俊行、高橋 秀実
Different roles of IL-13 for the fetal loss induced by IL-12 treatment or 33D1+ DC depletion in mice、第34回米国生殖免疫学会(2014)

②根岸 靖幸、市川 智子、竹下 俊行、高橋 秀実
妊娠制御に関わる樹状細胞の分化に対する糖脂質抗原の影響、第 30 回日本生殖免疫学会 (2014、東京)

③根岸 靖幸、市川 智子、小池 恵理、大倉 定之、竹下 俊行、高橋 秀実
Effects of glycolipid antigens on the differentiation of dendritic cells、第 43 回日本免疫学会 (2014、京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 雅男 (ICHIKAWA Masao)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：20366660

(2) 研究分担者

竹下 俊行 (TAKESHITA Toshiyuki)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号：60188175

根岸 靖幸 (NEGISHI Yasuyuki)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：50644580