

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430095

研究課題名(和文) マーモセット胎盤に発現するHLAオーソログの妊娠免疫における機能の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of HLA ortholog expressed on marmoset placenta

研究代表者

亀谷 美恵 (KAMETANI, Yoshie)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50338787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：HLA-G による妊娠時の免疫抑制機能解析には、MHC分子進化や胎盤形成の進化速度が速いため、霊長類モデルの作製を必要とする。そこで非ヒト霊長類コモンマーモセットを霊長類妊娠免疫モデルとし、胎盤トロフォブラストでのヒトHLA オーソログの発現と母体の免疫系との相互作用の解析を行った。まず、野生型の母体に形成されたGFP発現マーモセットの胎盤を用いることにより両者の識別を可能とし、母体脱落膜および胎仔絨毛組織それぞれよりトロフォブラストを分離し、胎盤に発現する古典的・非古典的マーモセットMHCを同定した。分泌型HLA-Gオーソログは妊娠母体末梢血の血漿中に検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：The analysis of HLA-G function on pregnant immunity needs primate-based models because of the high evolution speed of MHC molecules and placenta development. We used common marmoset as a non-human primate pregnant model and analyzed the expression of human HLA ortholog and the interaction with maternal immunity. The GFP marmoset placenta developed in the wild type mother enabled to distinguish fetal and maternal tissues. The classical and non-classical marmoset MHC was identified expressed on the trophoblasts from decidua and villi. The secretion type HLA-G ortholog was not detected in the pregnant marmoset peripheral blood-derived plasma.

研究分野：免疫学

キーワード：コモンマーモセット MHC 胎盤 オーソログ

1. 研究開始当初の背景

栄養膜を形成する栄養胚葉細胞

(trophoblast)は、母体への浸潤能獲得過程で絨毛を形成するvillous trophoblast (VT)からextravillous trophoblast (EVT)に分化する。これらは胚の着床・胎盤形成およびそれに関連する妊娠免疫の成立に重要な役割を果たす。EVT は免疫抑制分子であるHLA-G の発現に代表される免疫抑制分子群や組織破壊を行うプロテアーゼを発現し、脱落膜中に存在するNK 細胞やCD8+ T 細胞、プロテアーゼインヒビターなどによる攻撃・防御等に対抗している。一方、免疫担当細胞が産生するインターフェロンなどのサイトカインは、EVT の浸潤に対抗する一方で、免疫抑制に有効な分子形態であるHLA-G dimer の形成を亢進するなどの報告もあるため、リンパ球やそのエフェクター分子がVT, EVT の生長に正に働く可能性もある。HLA-G および関連分子の発現は胎盤形成に重要であるのみならず、多くの癌でも報告されており、これらの分子機序は、今後、腫瘍免疫でも重要な知見をもたらすことが予想される。しかしながら、胎盤の解剖学的所見は、マウスとヒトでは非常に大きな差があり、遺伝子発現プロファイルも大きく異なることから、マウスVT, EVT はヒトのモデルとして用いることが出来ない部分が非常に大きい。また、VT, EVT それぞれの分化段階を反映すると考えられる代表的細胞株のJAR, JEG-3 は、発現アレキ解析により新鮮組織と大きく異なる発現プロファイルを持つことが明らかとなり、培養細胞系を用いた研究も大きな問題を有することが明らかとなっている。一方、免疫系関連遺伝子の発現プロファイルについても、ヒトとマウスでは、大きく異なる事が知られている。これらの事実から、現時点では、VT, EVT および脱落膜に存在する免疫系細胞の解析には、非ヒト霊長類を

用いることが必須であると考えられている。旧世界ザル、新世界ザルの胎盤の組織化学的、細胞生物学的研究より、旧世界ザル、新世界ザル共にヒトと類似の高度に浸潤性のある組織構造を持ち、EVT の浸潤能などについては特にマウスより大幅にヒトに近いデータを得られる可能性が高い。しかし、非ヒト霊長類は、一般に産仔数が少なく(数年に1回1匹を出産など)、大型であり、免疫系の解析も遅れている。その中で、非ヒト霊長類であるコモンマーモセットは小型で多産であり(一年に2回、2-3匹を出産する)、実験動物コロニーが国内にある上、トランスジェニック動物の作出に成功するなど、非ヒト霊長類実験動物として優れた点を多く持ち、近年、霊長類モデル動物として着目されている。申請者らは、コモンマーモセットの免疫系解析ツールを作製し、その免疫系を解析すると共に(Kametani et al. 2009)、これらを用いて造血幹細胞を同定し、マスト細胞を含む免疫担当細胞の分化を解析してきた(Nunomura et al. 2012)。また、連携研究者らとT細胞受容体の多様性解析を行ってきた(Kitaura et al. 2012)。また、申請者らは既にマーモセットCD4, CD8抗体など、T細胞マーカー特異的モノクローナル抗体を作製しており、免疫関連遺伝子のcDNAも同定した(Kohu et al. 2008)。申請者らは、これらを駆使してコモンマーモセットの免疫系解析を行うことを可能にしてきた。さらに、連携研究者である佐々木らにより、既に作製されているトランスジェニックGFPマーモセット由来の胎盤を用いれば、脱落膜の細胞群と胎盤由来の細胞群を新鮮組織からセルソーターにより分離可能であり、胎盤由来の遺伝子発現を正確に知ることが出来ると考えられた。これらのツール開発、免疫系のデータの集積により、このサルをVT, EVTの分化及び妊娠免疫との関

連性について解析する為のモデル動物として確立するには、他の非ヒト霊長類と比べても突出して有利であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、まずヒトEVT で発現するHLA-G やその分泌型HLA-G、HLA-A,B,C に相当するマーマセットMHC を、現在進行しているマーマセットMHC 解析プロジェクトと密接に連携しながら同定する。ヒトVT, EVT で発現する新鮮胎盤組織は母体側、新生仔側の組織の区別が困難であるが、野生型の母体に形成されたGFP 発現マーマセットの胎盤を用いることにより両者の識別が可能となる。この組織をそのまま、あるいは培養によりVT, EVT を分離し、mRNA よりEVT 特異的に発現するMHC を同定する。

妊娠中のマーマセットにおいて、ヒトで確認されている分泌型分子が血漿中に分泌されるか否か、また、存在するならば活性の高いdimer の形態で存在するののかについて、妊娠マーマセット血漿の2次元電気泳動と質量分析を組み合わせて明らかにする。

また、同時に、以下のような、分子細胞学的解析も試みる。マーマセットはまだ解析ツールが充実していないため、mRNA の定量を中心とした詳細な解析を行う。細胞分画の採取には、現在ある抗体をフルに用いる一方で、モノクローナル抗体の作製も試みる。特に現在マーマセット抗体としては、NK 細胞を検出する抗体が得られていないため、本研究ではCD56 抗体についても合わせて作製を試みる事とした。

マーマセットに発現するHLA オーソログMHC のVT からEVT への分化過程における発現調節とリンパ球との相互作用について機能解析を行う。また、ヒト培養系との比較を行うことによりヒトでの免疫系調節機構にどの程度似ているのか明らかにする事を試みた。これらのリンパ球の存在がMHC

の発現を介して、VT, EVT を拒絶するという方向だけでなく、浸潤能獲得を含むVT からEVT への分化に正に働くのか、負に働くのか、分化に関しては全く中立であるのかについても明らかにする。さらに、VT, EVT の存在が、脱落膜中のリンパ球の動態に与える影響をあきらかにする。具体的には、HLA オーソログの発現するVT, EVT が存在する局所にリンパ球が集積してくるのか、もし集積してくるなら、どのようなリンパ球が集積してくるのか、VT, EVT とのHLA を介した相互作用の後、どのような転写調節がリンパ球に生じるののかについても *in vitro*, *in vivo* の系を用いて明らかにする。これらの結果をヒトVT, EVT の培養による結果と比較し、どこまでこれらの実験動物がヒトを代替できるのかについて評価することとした。

3. 研究の方法

(1)野生型マーマセット子宮にGFP 発現マーマセットの受精卵を移植し、親が野生型、新生仔がGFPマーマセットの新鮮胎盤を得る。この胎盤採取については、連携研究者である佐々木えりか氏が行う。胎盤をトリプシン処理した後、GFP 陽性細胞と陰性細胞をセルソーターで分離する。陰性細胞よりリンパ球ゲート細胞分画をフローサイトメトリーで解析したのちCD8+CD3+細胞およびCD4+CD3+細胞、CD4-CD8-CD3+細胞、CD4-CD8-CD3-細胞を精製する。分離した細胞は一部をそのままTrizol 処理し、mRNA 抽出を行う。残りはMEM 培地で培養を行い、*villi* が進展した後VT, EVTを顕微鏡下で採取、分離する。これらについてもTrizol 処理し、mRNA を抽出し、cDNA を得る。これらの細胞発現しているCaja 組織適合性抗原(MHC)遺伝子について、今まで申請者らが同定してきた配列に基づいてprimer を設計し、PCR およびDNA 配列解析により同定する。

(2)ヒト胎盤での発現プロファイル変異を明らかにするために、ヒト胎盤より同様にVT/EVT 及び各分画を得る。ヒトVT/EVT 及びリンパ球は、培養及びフローサイトメトリーを用いて精製する。また、リンパ球活性化についてもフローサイトメトリーを用いて解析する。これらの細胞群の共培養から得た細胞のmRNA を用いて発現アレイを解析し、マーモセットとの相同性を明らかにする。

(3)妊娠マーモセット化マウス・妊娠ヒト化マウスを作製し、これらのMHCの発現動態を確認する。

4. 研究成果

本研究において、我々は以下の3つの結果を得た。

(1) マーモセット胎盤からのプロテアーゼ処理による絨毛膜・脱落膜・胎盤血など各種細胞の分離法を確立し、また、GFP マーモセット胚を野生型仮親子宮に移植して作製したキメラ胎盤を用いて胎盤の上記各組織中に存在する胎仔および母体細胞の識別を可能とした。また、GFP および各種蛍光標識抗体を用いて胎盤中のトロフォブラスト画分、ヘルパーT細胞、細胞障害性T細胞、B細胞、NK細胞画分の精製にも成功した。これらの細胞を用いて低酸素下で共培養を行う事も可能とした。これに引き続き、GFP マーモセット胎盤組織におけるMHCの発現解析を免疫組織化学染色及び次世代シーケンサーを用いて行った。その結果、胎盤組織に古典的class-I MHCの発現が確認され、母体組織と比較してその発現が低い事が示唆された(Fig1)。また、胎盤のみに発現が確認され、ほとんど他の組織におけるmRNA発現が確認されないHLAオーソログであるCaja-B遺伝子を同定した。HLA-GオーソログであるCaja-Gは、むしろ胎盤以外の組織でも高発現しており、HLA-Gと機能的に異なることが示

唆された。

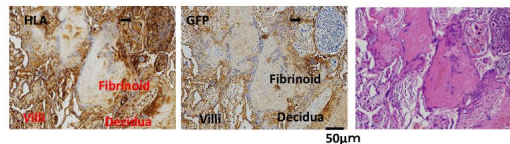


Fig 1 Identification of fetal and maternal placental tissue cells

(2) 重度免疫不全マウス(NOG マウス)へのヒト・マーモセット造血幹細胞移植および末梢血単核球移植を行い、ヒト細胞との比較解析を行いながら、マーモセット造血幹細胞マーカーの同定とリンパ球が分化・生着する条件、および細胞動態を解析する条件を決定した。また、ヒト及びマーモセット末梢血単核球を移植した系も作製し、これを妊娠させる事によって、ヒト妊娠免疫系のマウス体内での再構築に成功した。このマウスにおいては、CD8T細胞が胎盤に集積する一方で、脾臓のヒトリンパ球はCD4T細胞優位になっていた(Fig 2)。

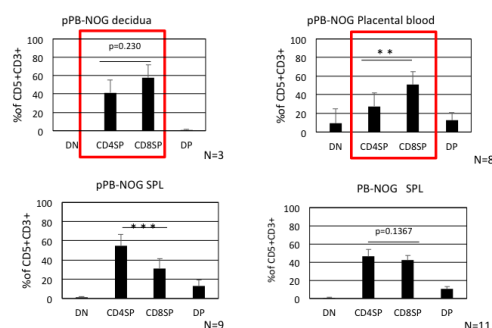


Fig 2 Cellularity of fetal and maternal placental tissue T cells

(3) Class-I MHC に対するモノクローナル抗体作製法は、ブタ SLA-1 を用いてPBMC, トランスフェクタントによる免疫と細胞融合・スクリーニング法について一連の方法論を確立しており、特許申請も2015年1月に行った。

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8件)

1. Improved hematopoietic differentiation of primate embryonic stem cells by inhibition of

the PI3K-AKT pathway under defined conditions. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Hiroshi Kohara, Saori Yamaguchi, Hirotaka Kawano, Erika Sasaki, Yoshie Kametani, Kenzaburo Tani. 2015 *Exp Hematol* 43:901-911 (査読有)

2. Common marmoset CD117-positive hematopoietic cells possess multipotency. Shin Shimada, Satoshi Nunomura, Shuya Mori, Hiroshi Suemizu, Toshio Itoh, Shuji Takabayashi, Yoshinori Okada, Takashi Yahata, Takashi Shiina, Hideki Katoh, Ryuji Suzuki, Kenzaburo Tani, Kiyoshi Ando, Hideo Yagita, Sonoko Habu, Erika Sasaki, Yoshie Kametani* 2015 *Int Immunol* 27:567-577 (IF 2.536) doi: 10.1093/intimm/dxv031doi:10.1016/j.exphem.2015.06.001. (IF 2.475) (査読有)

3. ヒト化NOGマウスにおける抗体産生 B 細胞サブセット 宮本あすか、亀谷美恵 臨床免疫・アレルギー科 2015 63(3):278-283 (3月) (査読無)

4. 免疫研究の霊長類モデルとしてのコモンマーモセット 布村聡、嶋田新、羅智靖、佐々木えりか、亀谷美恵 臨床免疫・アレルギー科 2015 63(1):78-83 (1月) (査読無)

5. NKG2D functions as an activating receptor on natural killer cells in common marmoset (*Callithrix jacchus*). Watanabe M, Kudo Y, Kawano M, Nakayama M, Nakamura K, Kameda M, Ebara M, Sato T, Nakamura M, Omine K, Kametani Y, Suzuki R, Ogasawara K. *Int Immunol*. 2014 26(11):597-606 (IF 2.536) (査読有)

6. Genomic sequence analysis of the major histocompatibility complex (MHC) class I G/F segment in common marmoset (*Callithrix jacchus*). Kono A, Brameier M, Roos C,

Suzuki S, Shigenari A, Kametani Y, Kitaura K, Suzuki R, Inoko H, Walter L, Shiina T J. *Immunol*. 2014 (April) 192(7):3239-3246 doi: 10.4049/jimmunol.1302745 (査読有)

7. エストロゲンと胎盤形成；新たな非ヒト霊長類コモンマーモセットを用いたヒト妊娠免疫モデルの提案 亀谷美恵、宮本あすか、石本人史、和泉俊一郎 比較内分泌学 2014 (1月) 40(151):11-13(査読無)

8. 非ヒト霊長類コモンマーモセット免疫系の重度免疫不全マウスへの移植による再構築 亀谷美恵*、嶋田新、森修弥、佐々木えりか、安藤潔 2013 *J.Germfree life and Gnotobiol* 43(2):113-118 (査読有)

[学会発表](計12件)

1. Common marmoset CD117-positive hematopoietic cells possess multipotency Kametani Yoshie, Shimada Shin, Nunomura Satoshi, Suemizu Hiroshi, Takabayashi Shuji, Shiina Takashi, Katoh Hideki, Suzuki Ryuji, Habu Sonoko, Sasaki Erika The 44rd Annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 2015. Nov. 18-20, Sapporo Sapporo Convention Center

2. Characterization of Lymphocyte in Pregnant Immunity. Kinami Rihito, Nishigami Erina, Mori Shuya, Suzuki Ryuji, Sasaki Erika, Ito Mamoru, Kametani Yoshie The 44rd Annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 2015. Nov. 18-20, Sapporo Sapporo Convention Center

3. ヒト胎盤における癌遺伝子 TrkB と免疫抑制遺伝子 PD-L1 の共発現 西上絵里奈、木南理仁、寺山隼人、坂部貢、石本人士、三上幹男、亀谷美恵 第30回日本生殖免疫学会総会・学術集会 2015年11月21日(熊本)くまもと県民交流館パレア

4. Improved Hematopoietic Differentiation of Primate Embryonic Stem Cells Takenobu Nii,

Tomotoshi Marumoto, Saori Yamaguchi, Hiroataka Kawano, Yoshie Kametani, and Kenzaburo Tani Blood 2014;124(21), suppl. 56th AHS Annual meeting and exposition San Francisco, CA December 6-9, 2014

5. Analysis of immune cells in the fetal/maternal interface of the primate placenta. Kametani Yoshie, Numao Erina, Mori Shuya, Kinami Rihito, Kitaura Kazutaka, Shiina Takashi, Suzuki Ryuji, Sasaki Erika The 43rd Annual meeting of the Japanese Society for Immunology. 2014. Dec. 10-12, Kyoto, Kyoto International Conference Center

6. NOG マウス環境下で分化する transitional B 細胞の抗体産生細胞の解析 小島美香、森 修弥、嶋田 新、大島 志乃、伊藤 守、鈴木 隆二、安藤 潔、亀谷 美恵 第 37 回日本分子生物学会年会 2014. 11 月 25-27 日 パシフィコ横浜

7. 森修弥、沼尾絵里奈、大島志乃、嶋田新、岡原純子、佐々木えりか、鈴木隆二、石本人士、椎名隆、亀谷美恵 コモンマーモセット胎盤における妊娠免疫系の解析 2014 年 5 月 17 日 第 61 回日本実験動物学会総会 札幌・札幌コンベンションセンター

8. 小島美香、森修弥、大島志乃、伊藤守、安藤潔、亀谷美恵 ヒト免疫系再構築マウス Transitional B 細胞の抗体産生能解析 2014 年 5 月 17 日 第 61 回日本実験動物学会総会 札幌・札幌コンベンションセンター

9. 椎名隆、重成敦子、森修弥、北浦一孝、亀谷美恵、鈴木隆二、コモンマーモセット MHC 遺伝子に置ける DNA タイピング法の開発と多型解析 2014 年 5 月 17 日 第 61 回日本実験動物学会総会 札幌・札幌コンベンションセンター

10. Yoshie Kametani, Shuya Mori, Shin Shimada, Ryoji Ito, Mamoru Ito, Sonoko

Habu Antibody secreting B cell subsets developed in humanized NOG mouse, 2013 年 12 月 12 日 第 42 回日本免疫学会・学術集会 (千葉・幕張メッセ)

11. 森修弥、嶋田新、大島志乃、岡田義則、安藤潔、亀谷美恵 ヒト免疫系再構築 NOG マウス B 細胞の性状解析 2013 年 5 月 15 日 第 60 回日本実験動物学会総会 茨城・筑波国際会議場

12. 北浦一孝、藤井克樹、松谷隆治、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、亀谷美恵、倉根一郎、鈴木隆二 コモンマーモセットにおけるリアルタイム PCR を用いた免疫関連遺伝子発現解析 2013 年 5 月 16 日 第 60 回日本実験動物学会総会 茨城・筑波国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称 : プタ主要組織適合性抗原 (MHC) SLA-1 を特異的に認識するモノクローナル抗体発明者 : 亀谷美恵・安藤麻子・大島志乃・平山典明
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : 特願 2015-004905
出願年月日 : 2015/01/14
国内外の別 : 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織
(1) 研究代表者
亀谷 美恵 (KAMETANI Yoshie)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号 : 50338787

(3) 連携研究者

佐々木 えりか (SASAKI Erika)
公益財団法人実験動物中央研究所・部長
研究者番号 : 70390739

鈴木 隆二 (SUZUKI Ryuji)
独立行政法人国立病院機構 (相模原病院臨床研究センター)・教授
研究者番号 : 70373470