

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04592

研究課題名(和文)細胞内寄生性病原体の侵入を防ぐ「バリア機構」を形成する胎盤の新規分子メカニズム

研究課題名(英文)The function and structure of the blood-placenta barrier to prevent invasion of intracellular parasitic pathogens

研究代表者

高島 康弘 (Takashima, Yasuhiro)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20333552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：母子境界領域である胎盤ラビンス部の栄養膜巨細胞と母体血流中の感染白血球の接着に關する接着分子群の発現パターンを解析し、マウス胎盤において胎盤表層の母体血流と接触する細胞群では一部の接着分子の発現が抑制されていることを示した。さらに血流中の感染白血球の挙動を可視化したところ、いくつかの臓器において感染白血球は非感染白血球よりも血管内皮に接着しやすく効率よく臓器内に留まっている傾向がみられた。また血管内皮に接着した感染白血球内の内部から原虫が4時間以内に白血球から脱出していった。一方胎盤において母体血流と触れる栄養膜細胞の表面ではこのような現象はおこっていないことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

母体から胎児への感染が獣医・医学上の問題となる病原体は多くが細胞内寄生性である。このような病原体は細胞内部に侵入できるため、細胞間接着や融合によって形成される「形態的」血液胎盤関門は無効である。従来の基礎研究はこのような「形態的バリア」に関するものがほとんどであったため、成果が母子垂直感染現象の理解につながらなかった。これに対し本研究では細胞内寄生性病原体をも防ぎうる「機能的バリア」という新概念について研究した。この新概念のバリア機構について得られた知見は、母子感染の制圧に資する重要な情報となり得る。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression pattern of adhesion molecules at the border of maternal blood flow and fetus derived cells in the placenta and showed that the expression of some adhesion molecules was suppressed. Furthermore, when the behavior of infected leukocytes in the bloodstream was visualized, in some organs, infected leukocytes tended to adhere to the vascular endothelium more easily than non-sensitized leukocytes, and tended to remain efficiently in the organs. In addition, the protozoa escaped from the leukocytes within 4 hours from the inside of the infected leukocytes attached to the vascular endothelium. On the other hand, it was confirmed that such a phenomenon did not occur on the surface of trophoblast cells in contact with the maternal blood flow in the placenta.

研究分野：獣医学

キーワード：トキソプラズマ 流産 胎盤 血管内皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の胎盤は有害な物質や病原体の通過を防ぎ胎児を護るための機能、いわゆる「血液胎盤関門」を有している。このようなバリア機構の成立メカニズムについては形態的・解剖学的な説明がなされることが多い。すなわち胎盤を構成する細胞が互いに融合しあい、あるいは密接に接しあうことで細胞間の隙間をなくし有害物質や微生物の通過を許さないのだという説明である。しかし細胞内部にもぐりこむことのできる細胞内寄生性病原体の場合、細胞間の隙間をなくしても胎盤構成細胞そのものを通ってこれを通過してしまうはずである。ところが実際には細胞内寄生性病原体といえども胎盤を無条件に素通りできるわけではなく、胎盤はこれらの病原体の通過をかなりの程度防ぐことができる。例えば、母体から胎児(仔)へ垂直感染が医学・獣医学上大きな問題となっている細胞内寄生性原虫のひとつであるトキソプラズマは、胎盤の栄養膜細胞に効率よく侵入する能力を持っている。しかし妊娠動物に感染しても必ずしも母仔の境界を越えて胎仔にまで到達するわけではなく、胎盤の母体側組織で増殖するものの境界を越えて胎仔側までは侵入しない例がかなり多い[Trend Parasitol., 2011,27; Jpn. J. Trop. Med. Hyg., 2001. 29]。すなわち「細胞間の隙間を作らない」という解剖学的なバリア以外に、細胞内寄生性病原体の侵入を阻む別の感染防御機構が胎盤で働いているということになる。しかし胎盤が細胞内寄生性病原体の通過を防ぐメカニズムについてはほとんど分かっていない。動物や人間に流産をおこす細胞内寄生性病原体の多くはいったん母体に感染し、母体血流中の細胞(白血球)によって胎盤・胎児へ侵入する。したがって母体から胎児への垂直感染が成立するには、母体血流中の感染白血球が胎盤に流入後にいったん胎盤組織にとどまる必要がある。したがって細胞内寄生性病原体の垂直感染について理解するには、母体白血球の胎盤内における挙動について情報を得る必要がある。

## 2. 研究の目的

哺乳類の胎盤は胎児に有害な物質の通過を防ぐため、母体と胎児(仔)境界の細胞が互いに非常に密に結合あるいは融合しあっている(血液胎盤関門)。ところが細胞内寄生性の病原体のほとんどはこのような「血液胎盤関門」を構成する栄養膜細胞そのものに侵入・貫通できるため、細胞間の隙間をなくすという形態的・解剖学バリアは感染防御の役に立たない。そこで本研究では細胞内寄生性病原体の通過を防ぐ未知の胎盤バリア機構についてそのメカニズムを検証する。具体的には、妊娠マウスと各種病原体(原虫、細菌、ウイルス)をモデルとして「胎盤の母子境界領域に母体側から流入した病原体を定着させないメカニズム」の成立機構を分子レベルで解明する。さらに同様の機構が胎盤構造の異なる反芻動物にも存在するか否か明らかにする。具体的には以下の通り。本研究では、細胞内寄生性病原体を胎盤まで運搬してきた母体血流中の感染白血球が胎盤組織にとどまりにくい構造が、垂直感染の防御機構として働いているのではないかという仮説を立て、この仮説について検証する。

## 3. 研究の方法

### 1) 胎盤内の接着分子の発現状況

妊娠マウスにトキソプラズマを感染させ、炎症性サイトカインが生産されている状況下で胎盤を採材する。得られた胎盤に対して免疫染色を施し、接着分子の発現パターンを明らかにする。特に母子境界領域である胎盤ラビリンス部の栄養膜巨細胞と母体血流中の感染白血球の接着に関与する接着分子群の発現パターンを重点的に解析する。さらに境界部分を構成する細胞のゲ

ノム DNA を抽出し、発言が抑制されている分子をコードする遺伝子領域周辺について、DNA メチル化の有無を検証した。

## 2) 胎盤内における母体白血球の挙動

トキソプラズマ感染白血球の挙動を明らかにするため、赤色蛍光タンパクを発現する組換え原虫を GFP マウスの白血球に感染させたのち、野生型マウスの血流中に移入した。経時的に臓器を採材し、標的臓器に流入する白血球と虫体をそれぞれ緑色および赤色蛍光を指標に観察した。採材した臓器は固定したのちに透明化处理を施し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して3次元画像を再構成した。

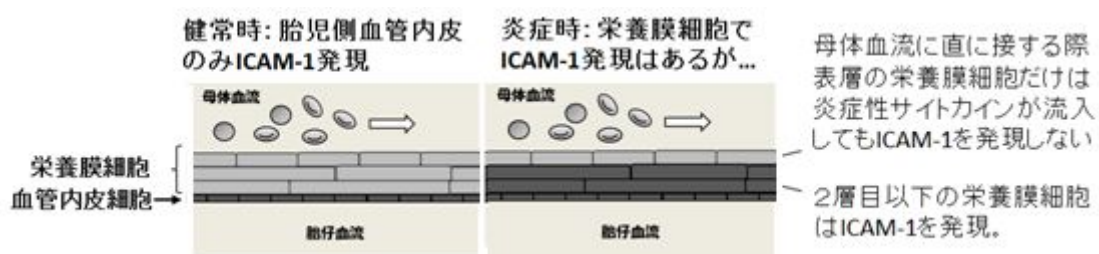
## 4. 研究成果

### 1) 胎盤内の接着分子の発現状況

マウス胎盤において胎盤表層の母体血流と接触する細胞群では一部の接着分子の発現が抑制されていることを示した。病原体に感染した母体血流中の白血球が胎盤に接着しにくいものと思われる。とくに ICAM-1 分子の発現が高度に抑制されていたことから、胎盤表層を構成する栄養膜細胞のゲノム DNA を調べたところ、ICAM-1 遺伝子上流のプロモーター領域が高度にメチル化されていることが明らかになった。これらの細胞において接着分子発現が、炎症性サイトカインによって誘導されないのは、このようなメチル化が寄与しているものと考えられる。

### 2) 胎盤内における母体白血球の挙動

胎盤以外の臓器、特に肺においては、感染白血球は非感染白血球よりも血管内皮に接着しやすく効率よく肺等の臓器内に留まることが分かった。また血管内皮に接着した感染白血球内の内部から原虫が数時間以内に脱出することが分かった。血流中の感染白血球から原虫が脱出することは稀で、血管内皮への接着が原虫脱出の引き金になっているものと思われる。すなわち、血流を流れる白血球の内部にひそむ病原体は、自分が乗る白血球と血管内皮の接着をもって標的臓器への到着を認識し、実質臓器に乗り移るものと思われる。様々な抗体により接着分子をマスクしこの現象を阻害できるかどうか試したところ、一部の分子に対する抗体により阻害効果がみられた。この分子が上記現象を司っている可能性が示された。これに対して胎盤ではこのような現象はおこっていなかった。胎盤において母体血流と触れる栄養膜細胞の表面と接着する母体白血球は極めて少なく、また感染白血球と非感染白血球の間に明確な接着効率の違いもみられなかった。ごく少数の病原体が胎盤組織に侵入していたが、胎盤内の虫体数の多寡と胎児への垂直感染成立の間にはっきりした相関関係がないことも分かった。これら二つの事実を総合的に勘案すると、虫体は必ずしも胎盤組織で増殖してから胎児に侵入するのではなく、何らかのメカニズムで短期間に胎盤組織を通過していることが強く示唆された(下図)。



本研究の終了までに、感染白血球がそのまま血液胎盤関門を通過しているのが、いったん白血

球から脱出した虫体が通過しているのかまで明らかにすることはできなかった。これは、仮に胎児組織内で母体白血球から脱出済みの原虫を見出したとしても、血液胎盤関門通過前に脱出したのか胎児到達後に脱出したのか判定ができないためである。この問題は今後の課題であるが、これを明らかにするためには白血球からの原虫の脱出を人為的かつ一時的に止める実験系が必要になる。そこでトキソプラズマの宿主細胞からの脱出に必須であると分かっているたんぱく質について、この安定性を変化させる組換え体を作成した。この組換え体は特定の薬物存在下では宿主細胞から脱出することができなかった。このような組換え体が得られたことで、近い将来「血液胎盤関門通過前に脱出したのか胎児到達後に脱出したのか」という疑問を解明するための実験系が確立できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Baba M, Kitoh K, Takashima Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Removal of extracellular <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites from suspended cell culture.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Parasitol. Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2016.01.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baba M, Sato M, Kitoh K, Takashima Y.	4. 巻 155
2. 論文標題 The distribution pattern of 2,3- and 2,6-linked sialic acids affects host cell preference in <i>Toxoplasma gondii</i> .	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Exp. Parasitol.	6. 最初と最後の頁 74-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exppara.2015.05.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baba Minami, Batanova Tatiana, Kitoh Katsuya, Takashima Yasuhiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Adhesion of <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoite-infected vehicle leukocytes to capillary endothelial cells triggers timely parasite egression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-05956-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Strategy of <i>Toxoplasma gondii</i> , a zoonotic protozoan parasite, to disseminate in the host body
3. 学会等名 Annual 11th International Meeting "New concepts on the mechanisms of inflammation, autoimmunity and tumorigenesis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高島 康弘、Tatiana Batanova、馬場 みなみ、鬼頭 克也
2. 発表標題 マウス胎盤におけるトキソプラズマ感染白血球の挙動
3. 学会等名 第159回日本獣医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 馬場 みなみ、Batanova Tatiana、鬼頭 克也、高島 康弘
2. 発表標題 Toxoplasma gondii感染白血球の血流内および標的臓器内での挙動
3. 学会等名 第159回日本獣医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 馬場みなみ、鬼頭克也、高島康弘
2. 発表標題 Toxoplasma gondii感染白血球の血流内および標的臓器内での挙動
3. 学会等名 第85回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2016年

〔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	高須 正規  (Takasu Masaki)  (00503327)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授    (13701)	

