

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21655

研究課題名(和文) 初代培養合胞体栄養膜細胞の母児免疫寛容・生体防御機構と妊娠合併症発症機序の解明

研究課題名(英文) The molecular pathogenesis of immune tolerance and host defense in primary human placenta-derived trophoblasts

研究代表者

本村 健一郎 (Motomura, Kenichiro)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・共同研究員

研究者番号：00724329

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)：初代栄養膜細胞安定培養系(dCTB)には二本鎖RNAを認識する自然免疫系受容体が特異的に発現しており、dCTBを合成二本鎖RNAであるPolyI:Cで刺激すると抗ウイルス作用を持つサイトカインと、母児免疫寛容に働く分子が産生された。さらにPolyI:C刺激によりdCTBにはミトコンドリア経路の活性化によるアポトーシスが誘導された。

今後この現象と疾患との関係を探っていくことで、妊娠合併症の新たな病因を明らかに出来る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Term human placenta derived primary cultured cytotrophoblasts (differentiated CTB: dCTB) predominantly expressed innate immune receptors for double stranded RNA. Stimulation with poly I:C (synthetic double stranded RNA) induced production of anti-viral cytokines and immune regulatory molecules in dCTB. Moreover, Stimulation with polyI:C decreased dCTB survival rate; pan-caspase inhibitor abrogated the cell death, suggesting that the dCTB cell death by polyI:C is likely to be apoptosis via mitochondria pathway. Further studies about the relationship between these phenomena and pregnancy complications will possibly elucidate the unknown etiology of pregnancy complications.

研究分野：妊娠と免疫

キーワード：合胞体栄養膜細胞 胎盤 妊娠合併症 Toll like receptors

1. 研究開始当初の背景

胎盤最大の機能である母体・胎児間のガス交換・栄養輸送は絨毛で行われており、その表面には機能細胞である合体栄養膜細胞 (Syncytiotrophoblast:STB) と、その前駆細胞である細胞性栄養膜細胞 (Cytotrophoblast:CTB) が存在する (Fig.1)。

CTB、STBとも胎児由来の細胞であり、特にSTBは母体血と直接接し、母体にとって最大の非自己である。しかしSTBは免疫寛容状態にあるために母体から拒絶されない。その理由として例えば免疫細胞が非自己や感染細胞を認識するための分子であるHLA class Iは全身の大部分の細胞に発現しているが、STBでは発現していない。またSTBは母体免疫細胞のapoptosisを誘導するFas ligandやTRAILを内包したexosomeを母体血中に放出し、母体免疫細胞をapoptosisさせ免疫能を調節する。そしてこの母児免疫寛容機構の破綻や炎症が、早産や妊娠高血圧症候群、常位胎盤早期剥離及びsmall for gestational age (SGA)の原因となっている可能性が示唆されている。

一方でこのSTBは母児免疫寛容と同時に母体血を経由した様々な感染や炎症刺激から胎盤・胎児を保護する生体防御機構も備えている。例えば初代培養STBは、抗ウイルス作用を持つmiRNAを内包するexosomeを分泌する。特に局所における免疫寛容と生体防御の一部は相反するものであるが、STBではこれが共存している。しかしこの母児免疫寛容・生体防御機構の全貌や調節機構は明らかになっていない。

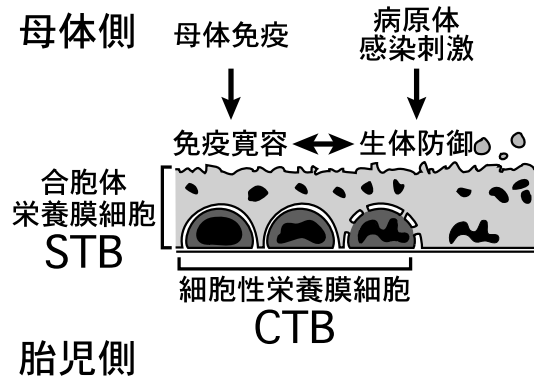


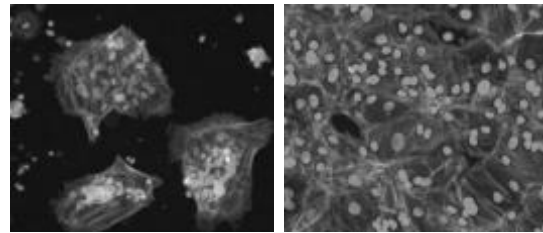
Fig. 1 絨毛表面の構造

2. 研究の目的

上記背景から、STBが母児免疫寛容・生体防御両方の機能を有し、そのバランスの破綻がSTBの障害・機能不全ひいては胎盤機能低下を引き起こし、妊娠合併症の原因となっているという仮説を立てた。本研究は、これを元にSTBにおける母児免疫寛容・生体防御機構を明らかにすることで、妊娠中期以降合併症の機序の一端を解明することを最終目標とした。

3. 研究の方法

STBの実験モデルとして、初代培養を用いた。満期胎盤からCTBを分離し、パーコール法、免疫磁気ビーズ法を用いて混入している間質細胞や免疫細胞を除去した。これまで胎盤から分離したCTBを安定的に培養することは困難であったが、独自に開発したROCK阻害薬を用いた培養によって、安定的にCTBをSTB様細胞に分化・培養させることが可能となった (Fig.2 differentiated CTB: dCTB) (Motomura, PLOS ONE, 2017)。この実験モデルを使用し、以下の検討を行った。



通常の培養系 確立した安定培養系
dish上に点在するのみ dish全体に発育

Fig. 2 合体栄養膜細胞初代安定培養系

(1) dCTBにおける母児免疫寛容・生体防御分子の発現解析

dCTBに実際に発現している免疫寛容・生体防御に関わる分子をマイクロアレイを用いて網羅的に同定した。

(2) dCTBに発現する自然免疫系受容体に関する解析

①dCTBに発現する自然免疫系受容体の発現解析

自然免疫系受容体は局所の免疫反応の担い手として重要である。胎盤にもこの自然免疫系受容体が発現しており、その発現の程度が妊娠合併症の発症と関連があるとする報告もある。そのため、STBにどのような自然免疫系が発現し、それが実際に機能するのかわかりたい。具体的にはdCTBを用いて調べた。具体的にはdCTBのmRNAを抽出し、リアルタイムPCRで自然免疫系受容体の中でも特に代表的なtoll-like receptor (TLR)の発現を検討した。また、そのTLRを刺激できるリガンドでdCTBを刺激し、共通して下流で産生されるIL-6の産生をELISAで測定し、実際に機能するかを確認した。

②dCTBの二本鎖RNAに対する反応の解析

①の検討によってdCTBは二本鎖RNAに反応する自然免疫系受容体には実際に機能するTLR3が発現していることが明らかとなった。そのため、dCTBを二本鎖RNA (Poly I:C)で刺激し、それによって誘導される現象の解析を行った。

②-a 遺伝子発現の変化の網羅的解析

dCTBをPolyI:Cで刺激して、mRNAを抽出しマイクロアレイを用いて遺伝子発現変化を網羅的に解析した。

②-b 細胞死の解析

dCTBをPolyI:Cで刺激すると細胞死が誘導された。この細胞死の経路やメカニズムをリアルタイムPCR、ウエスタンブロッティング、カスパーゼ活性化アッセイを用いて検討した。

(3) ヒト胎盤のマイクロアレイ解析

正常胎盤(4例)とSGAの胎盤(9例)の遺伝子発現の違いをマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、dCTBを用いた検討によって得られた結果が胎盤内でも見られるかを確認した。

(4) 母児免疫寛容・生体防御機構の破綻と全身への影響の検討

①感染・炎症刺激によるdCTB産生蛋白の変化の検討

感染・炎症刺激によってSTBが母体にどのような影響を及ぼすかを検討するため、同刺激によりdCTBが放出する液性因子がどのように変化するかを検討した。具体的には、dCTBを(2)で使用したTLR ligandやTNF、IL-1 β などのサイトカインで刺激し、培養上清中のホルモン産生の変化や、妊娠高血圧症候群発症への関与が指摘されている血管新生因子産生の変化(sFlt1、sEngなど)、炎症性サイトカインの変化をELISAで評価した。

②マウスモデルによる二本鎖RNA刺激が妊娠に与える影響の検討

母児免疫寛容・生体防御の破綻が実際に胎児、母体に影響を与えるかを検討するために、妊娠マウスを用いた解析を行った。具体的には、マウスの妊娠10.5~12.5日目にPolyI:Cを尾静脈から静脈内投与し、胎仔マウスおよび胎盤に起こる変化を検討した。

4. 研究成果

(1) dCTBにおける母児免疫寛容・生体防御分子の発現解析

96時間培養し、分化したdCTBの遺伝子発現をマイクロアレイで検討した。まず生体防御に関与する因子としては、後述する自然免疫系受容体のうち、TLR3が特異的に発現していた。

また、免疫寛容に関わる因子としては、既に報告のある分子(Fas ligandやTRAIL、Galectin-1)を含め、あまり発現は見られなかった。

(2) dCTBに発現する自然免疫系受容体に関する解析

①dCTBに発現する自然免疫系受容体の発現解析

多くの組織の細胞が様々なタイプのTLRを発現するのにに対し、dCTBはTLR3のmRNAの発現が高く、他のタイプのTLRの発現はTLR3と比較して低値であった。さらに、各TLRのリガンドでdCTBを刺激したが、TLR3のリガンドであるPolyI:Cで刺激したときのみIL6を産生し、他のリガンドでの刺激

ではほとんどIL6の産生は見られなかった。以上の結果から、dCTBには機能するTLR3が優位に発現しており、ウイルス感染に対して生体防御的役割を担っている可能性が示唆された。また、他のTLRが発現していないことは、過剰な免疫反応を抑制する上でも重要な所見であると考えられた。

②dCTBの二本鎖RNAに対する反応の解析

②-a 遺伝子発現の変化の網羅的解析

マイクロアレイ解析の結果、dCTBはPolyI:Cで刺激されることにより、IFNを初めとする抗ウイルス作用を誘導するサイトカインの遺伝子発現が上昇した。さらにこのマイクロアレイの結果をIngenuity Pathway Analysisにより解析したところ、感染に対する防御に関連する経路、細胞死に関連する経路が活性化していることが明らかとなった。

このうち、培養上清のIL6、IL8、IFN- β の濃度をELISAで測定して上昇していることを確認できた。

さらに、免疫寛容に関与する分子の発現に関しても検討したところ、刺激無しではほとんど発現が見られなかったのに対し、PolyI:C刺激によりIDOやFas ligand、TRAILのmRNA発現が見られた。以上から、免疫寛容を誘導する分子はもともと発現しているものではなく、何らかの刺激により誘導される可能性が示唆された。

②-b 細胞死の解析

PolyI:CでdCTBを刺激したときのみ鏡検で細胞死が観察された。また、マイクロアレイの結果から、細胞死に関連する因子の変動が見られた。この詳細を解析したところ、この細胞死はカスパーゼの活性化が関わっておりカスパーゼの阻害剤によって完全に抑制されたため、アポトーシスであった。さらにこのアポトーシスには、ミトコンドリアを介した内因性経路を調節するBCL2ファミリー蛋白の変動が関わっており、それによって調節されているカスパーゼ9の活性化が起こっていることが明らかとなった。

上皮系の細胞が自然免疫系受容体の刺激によってアポトーシスを起こすことは、感染を感知して自ら細胞死を誘導し感染をその場に留めるといった生体防御機構の一部と考えられている。STBにおける生体防御にも、この機構が関与していることが示唆された。

(3) ヒト胎盤のマイクロアレイ解析

正常胎盤とSGA胎盤の比較で、これまで報告のあった遺伝子の変動が認められた。さらに、一部のケモカインの発現が、dCTBをPolyI:Cで刺激した際に発現増強したものと一致していた。これはSGAの原因の一部にTLR3を介したシグナルの関与の可能性を示唆する所見であるが、因果関係の解析には更なる検討が必要であると思われた。

(4) 母児免疫寛容・生体防御機構の破綻と全身への影響の検討

①感染・炎症刺激による dCTB 産生蛋白の変化の検討

TLR ligand の刺激に関しては、TLR3 ligand である PolyI:C によって前述の IL6、IFN- β に加えて炎症性サイトカインである IL-8 や TNF α の産生が見られた。ホルモン産生能としては hCG- β を測定し刺激により低下が認められたが、炎症刺激自体ではなく細胞のアポトーシスによる影響も考えられた。妊娠高血圧症候群に関与する血管新生因子等に関しては、現在検討中である。

②マウスモデルによる二本鎖 RNA 刺激が妊娠に与える影響の検討

妊娠中に PolyI:C を静脈内投与しても、早産や胎仔死亡は変化しなかった。しかし、胎仔の体重は PolyI:C 投与群で有意に低値であった。これは二本鎖 RNA による胎盤障害が SGA を引き起こす可能性を示唆している。さらに、胎盤自体の変化について現在解析中である。

以上の成果から、胎盤内の最大の機能細胞である STB は特に二本鎖 RNA に対して反応して生体防御を担っている可能性が示唆された。また、その際同時に免疫寛容に関与するサイトカインの産生を行っていた。

今後はこれらの現象が起こっているかを正常胎盤と疾患胎盤で比較するなど臨床検体を使用した解析をさらに進めていくことで、STB の持つ生体防御と免疫寛容という役割がどのように妊娠合併症の形成に関わっているのかを明らかにできると考えられる。

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 2 件)

1. Motomura K, Okada N, Morita H, Hara M, Tamari M, Orimo K, et al. A Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) inhibitor, Y-27632, enhances adhesion, viability and differentiation of human term placenta-derived trophoblasts in vitro. PLoS One 査読有り、2017;12:e0177994. DOI: 10.1371/journal.pone.0177994
2. 本村健一郎、初代培養合胞体栄養膜細胞の母児免疫寛容・生体防御機構と妊娠合併症発症機序の解明、産科と婦人科 査読無し、2017;84:210-212

[学会発表] (計 4 件)

1. Motomura K, Induction of apoptosis in human term Syncytiotrophoblast by stimulation via TLR3、International Federation of Placenta Association、平成 27 年 9 月 11 日、Australia
2. 本村健一郎、ウイルス由来二本鎖 RNA は toll-like receptor 3 を介して満期胎盤

由来合胞体栄養膜細胞にアポトーシスを誘導する、日本産科婦人科学会学術講演会、平成 28 年 4 月 23 日、東京

3. Motomura K、Double-stranded RNA induces apoptosis in human term Syncytiotrophoblasts and mouse placentas via Toll-like receptor 3、International Society for Reproductive Immunology、平成 28 年 6 月 23 日、Erfurt

4. Motomura K、Double-stranded RNA regulates BCL2 family molecules and induces apoptosis in human cultured syncytiotrophoblasts via toll-like receptor 3. A possible mechanism for pregnancy complications?、日本産科婦人科学会学術講演会、平成 29 年 4 月 14 日、広島

[図書] (計 0 件)

[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

本村 健一郎 (MOTOMURA, Kenichiro)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター免疫アレルギー・感染研究部・リサーチアシリエイト
研究者番号：00724329

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()