

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15699

研究課題名(和文)母児間マイクロキメリズムに着目した妊娠時免疫寛容とその移植学、腫瘍学への応用

研究課題名(英文)Acquired tolerance during pregnancy, a challenge towards the application to oncology/transplantation

研究代表者

寺田 幸弘 (TERADA, YUKIHIRO)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10260431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の鍵となるモデル動物作製については2年間関連する腫瘍関連、生殖工学関連の学会等で情報を収集し試みたが安定した作成系を得るにはいたらなかった。しかしながらそれに派生したいくつかの婦人科腫瘍に関する知見を得た。卵巣成熟嚢胞性奇形種は卵子の単為発生をその起源とし、臨床的にもきわめて発生頻度の高い卵巣腫瘍である。若年者で再発を繰り返した同疾患の組織についてマイクロアレイ解析を行い、正常群との比較が進んでいる。卵子活性化に関連する遺伝子において正常群との差異がみとめられている。また、それらの組織中のマイクロキメラの発現程度についても解析をすすめていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Production of animal model is the fundamental process of this challenge. We collected information from bio/oncology conference and bio/reproductive conference for two years and continue a trial, but did not come to obtain stable system. However, we obtained the finding about some gynecologic tumors which were derived from this challenge. The origin of mature cystic teratoma is parthenogenesis of the ovum, and, It is extremely frequent ovarian tumor clinically. We perform microarray analysis in the tissue from young teratoma patients, that repeated a disease, and a comparison with the normal tissue. It is consisting clearly that a gene associated with the ovum activation of the tumor is different from a normal group. Furthermore, we are going to proceed with analysis about those microchimeric expression degree in the tumor.

研究分野：産婦人科学分野

キーワード：マイクロキメリズム 免疫寛容機構 キメラ

1. 研究開始当初の背景

マイクロキメリズムは、移植免疫分野から発見された概念である (Liegeois A, et al. Transplant Proc 1977)。臓器移植後に免疫抑制剤を必要とせずに移植臓器が長期生着している患者の血液および全身臓器に移植ドナー由来の細胞が存在することの発見に由来する (Staezel TE, et al. Lancet 1992)。また、妊娠中にも母体と胎児は胎盤を経由して細胞を相互に交換しマイクロキメリズムが成立する。侵入した胎児由来・母体由来の細胞は長期にわたり分娩/出生後も侵入先の個体内にとどまって存在し続けることが報告された (O'Donoghue K, et al. Lancet 2004)。マイクロキメリズムと疾患との関連については、強皮症、SLE などの自己免疫疾患の発症や I 型糖尿病での報告があり、乳癌 (Gadi VK, et al. Breast Cancer Res Treat 2010) や子宮頸癌 (Cha DH, et al. Obstet Gynecol 2003) などの悪性腫瘍でもその関連が報告され、組織修復への関与が指摘されている。生体おける意義については見解が分かれており、さらなる検討が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、母体-胎児間での細胞の相互交換現象であるマイクロキメリズムの成立機序の解明とその免疫寛容機構の移植医療およびがん治療への応用を目的とする。妊娠中に胎児細胞は長期にわたり母体内に存在し、全身に分布することが知られている。すべてのヒトは(母由来の細胞との)キメラであるが、生体にとって異物であるはずの同種異系細胞が排除されずに存在し続けることは、これまでの免疫学の概念から逸脱する現象である。妊娠という環境下での特殊な免疫寛容機構が想定され、この視点から移植・がん治療への応用を詳細に検討した報告はこれまでなされていない。本研究では、マイクロキメリズムが成立する環境としての「妊娠」の検証から移植医療への応用をめざし、その免疫寛容機構の解明によりがん治療の萌芽を誘起するチャレンジである。

3. 研究の方法

マイクロキメリズムおよび免疫学的異系移植の in vivo モデルを作製する。これらを用いて妊娠時の体内環境を再現することで、

マイクロキメリズムの成立を可能にしている免疫学機序の解明に迫る。また臍帯血移植および癌治療を想定した臨床応用をめざした検討を行う。具体的には以下の通りである。

1) マイクロキメリズムモデルマウスの作製

これらのモデルでは、母・仔の個体に解析したい疾患モデルマウスを選択すれば、マイクロキメリズムが関連すると想定される疾患をあらゆる組み合わせで解析できる。未妊妊産婦で発症が多い子宮内膜癌では、マイクロキメリズムの関与が推定されるが、マウスで適当な子宮内膜癌疾患モデルがないため、Donryu ラット(子宮内膜発症モデル)での解析を行う。

(1)胎児マイクロキメリズムモデル

GFP トランスジェニックマウスまたはラットの受精卵を WT の雌マウス/ラットに移植して新規マイクロキメリズムモデルを作製し、出産後のどのくらいの期間まで母体内にマイクロキメリズムが検出可能か検討する。これまでは雄の GFP トランスジェニックマウスと WT の雌マウスを交配することで胎児を得ているが (Khosrotehrani K, et al. J Reprod Immunol 2005) この方法では GFP 陰性の胎児も約半数の割合で得られるという問題がある。GFP トランスジェニックマウスの受精卵移植により確実に GFP 陽性の胎児を得ることができ、さらに、移植する受精卵の数を調節することで胎児マイクロキメリズムの量を制御することも可能となる。モデルマウス/ラットの作成は連携研究者の椋嶋が担当する。椋嶋は動物生殖学を専門とする農学博士であり、マウス/ラットの受精卵移植に関して豊富な経験を有する。GFP トランスジェニックマウスの受精卵は、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクより入手できる。マウスのバックグラウンドは以下の実験に用いるために、それぞれ同種異系のバックグラウンドをもつ C57BL/6 と BALB/c、CBA1 およびそれらを交配した F1 を用いる。

(2)母系マイクロキメリズムモデル

雌の GFP トランスジェニックマウスおよびラットに WT の受精卵を移植し、出生後に仔体内の GFP 陽性マイクロキメラ細胞を検出する。

2) 妊娠環境による免疫寛容機構の解析

臍帯血に含まれる幹細胞は、白血病などの難治性血液疾患の治療のために移植されてきた。近年はさらに応用が進み、臍帯血幹細胞移植による細胞治療が注目されている。通常の臍帯血幹細胞移植には HLA 6 座中特に重要な A/B/C/DR の 4 座 8 抗原の一致率が重要とされている。母子間では理論上はそれらの HLA 抗原の半数が一致するに過ぎない。妊娠中に成立するマイクロキメリズムは自然に成立する臍帯血移植と捉えることができ、妊娠環境によってこの HLA 一致率のギャップは埋められていることになる。臍帯血移植は現在では同種移植の 1/3 を占めるまでに発展し、HLA 2 座不一致まで許容されるうえドナー確保が比較的容易で移植可能な臍帯血を確保できる確立は 90%以上である。特に臍帯血を用いたミニ移植は高齢化の進む日本においては今後もさらに重要性が高まる治療法である。しかし、臍帯血移植は生着不全率が骨髄移植に比べて高いことが問題となっている。

母親の HLA のうち仔に遺伝しなかった HLA(Non-Inherited Maternal Antigens : NIMA)が、移植の際の不適合 HLA である場合には生着率が高いことが報告されており (Burlingham WJ et al. N Engl J Med 1998)、母子間や母子間マイクロキメリズムが成立している同胞間の造血幹細胞移植が行われている。マイクロキメリズム成立・維持の機序は未解明であるが臨床応用が進んでいる。

また妊娠中に増加するエストロゲンやプロゲステロンが免疫系に抑制的に作用していることが報告されている。エストロゲンは Treg の分化・増殖に関連し、プロゲステロンは Th1/Th2 バランスを Th2 優位にして抑制性サイトカイン産生や NK 細胞活性抑制などを誘導することが分かってきた。

そこで、ヒトへの臨床応用を想定して、妊娠環境が胎児マイクロキメリズム成立レシピエントへの異系臍帯血移植に対する免疫寛容に影響を与えるかを解析する。臍帯血移植のレシピエントとして雌 B6(H-2b/b)マウスを用い、マイクロキメリズム成立のために、この雌 B6 マウスと雄 BALB/c(H-2d/d)マウスを交配する。このマイクロキメリズム成立経産 B6 マウスにミニ移植前処置をし、BALB/c の胎仔から得た臍帯血を移植する。このとき、

第三の MHC をもつ CBA1(H-2^{k/k})の胎仔由来の臍帯血移植も行い比較する。移植時には、レシピエントに偽妊娠を誘導しエストロゲン・プロゲステロンを投与する群も設定し、非妊娠経産マウスや未妊マウスと比較する。移植臍帯血を得る胎仔は GFP トランスジェニックマウスとし、生着率の評価は末梢血での GFP 陽性細胞の検出で評価する。

3) 抗腫瘍効果の検討

子宮体癌は未妊産婦に多く発症することが知られており、妊娠により成立するマイクロキメリズムの正の関与が想定される。現在、マウスでは子宮体癌の自然発症モデルは報告されておらず、また Wild Type に移植可能なマウス子宮体癌細胞株もない。ラットにおいては Donryu 系ラットが他系統のラットに比して有意に子宮体部腺癌の発症頻度が高く、子宮内膜癌のモデルとして有用である。本研究ではこの Donryu ラットをモデルとして使用する。上記 1) の通りに Donryu ラットに GFP ラット受精卵を移植し、マイクロキメリズム成立ラットを作製する。この経産 Donryu マイクロキメララットにニトロソ系発癌剤で発癌を誘導し、未妊マクロキメリズム未成立ラットを対照として発癌および癌進展を比較する。組織学的に GFP 陽性キメラ細胞と腫瘍および免疫担当細胞の関連と局在を検討する。またマイクロキメラ細胞に抗腫瘍効果があるとするれば、治療への応用の可能性がある。上記 2) での結果を応用し、偽妊娠誘導した Donryu ラットに異系ラット臍帯血幹細胞を移植し抗腫瘍効果を検討する。これらの効果が確認されたら、骨髄ヒト化 NOG マウスを用いてヒト癌細胞株移植モデルマウスでヒト臍帯血移植による抗腫瘍効果を検討する。

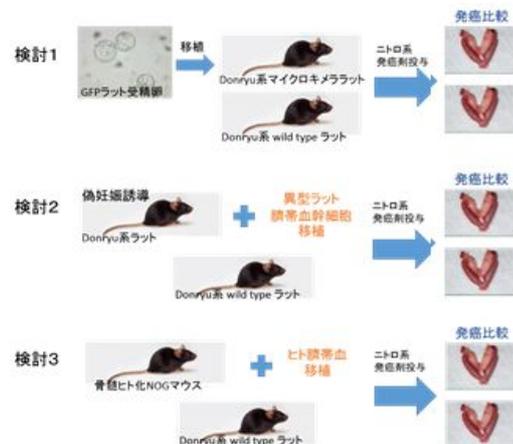


図2: マイクロキメリズムを応用した抗腫瘍効果

4) 臍帯血移植による抗腫瘍新規治療樹立へ向けた基礎実験

GFP をマーカーとして母マウス血中の胎児由来細胞をセルソーターで単離し、表面抗原を解析し、臍帯血中の幹細胞と比較検討する。このマイクロキメラ細胞は異系個体内で生存するための選択を受けており、この選択を受ける前の細胞集団と考えられる臍帯血細胞との比較により異系個体内での免疫寛容に必要な細胞表面分子を捉えることができる。これにより抗腫瘍効果をもつ細胞集団を選択して治療移植することができ、in vitro でこの免疫寛容責任分子の誘導を検討できる。

4 . 研究成果

本研究の鍵となるモデル動物作製については2年間関連する腫瘍関連、生殖工学関連の学会等で情報を収集し試みたが安定した作成系を得るにはいたらなかった。しかしながらそれに派生したいくつかの婦人科腫瘍に関する知見を得た。 卵巣成熟嚢胞性奇形種は卵子の単為発生をその起源とし、臨床的にもきわめて発生頻度の高い卵巣腫瘍である。 若年者で再発を繰り返した同疾患の組織についてマイクロアレイ解析を行い、正常群との比較が進んでいる。 卵子活性化に関連する遺伝子において正常群との差異が認められている。 また、それらの組織中のマイクロキメラの発現程度についても解析をすすめていく予定である。

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10件)

Onodera Y, Takahashi K, Goto M, Anzai M, Ono N, Shirasawa H, Sato W, Miura H, Sato N, Sato A, Kumazawa Y, Terada Y: The location of "8"-shaped hatching influences inner cell mass formation in mouse blastocysts. PLOS ONE (査読有) 12(4):e0175150(2017)
DOI:10.1371/journal.pone.0175150

Shimizu T, Sato T, Tsukiyama K, Fujita H, Kato S, Hoizumi M, Shirasawa H, Narita T, Terada Y, Seino Y, Yamada

Y: Food intake affects sperm-egg fusion through the GIP/PSG17 axis in mice. Endocrinology 158(7):2134-2144(2017) 査読有
DOI:10.1210/en.2016-1861

Tanaka H, Shirasawa H, Shimizu D, Sato N, Ooyama N, Takahashi O, Terada Y: Preventive effect of human papillomavirus vaccination on the development of uterine cervical lesions in young Japanese women. J Obstet Gynaecol Res (査読有) 43(10):1597-1601(2017)
DOI:10.1111/jog.13419

Shirasawa H, Terada Y: In vitro maturation of human immature oocytes for fertility preservation and research material. Reproductive Medicine and Biology(査読有) 16:258-267(2017)
DOI:10.1002/rmb2.12042

Takahashi K, Sato N, Sugawara T, Kato A, Sato T, Shimizu D, Tamura D, Kito M, Makino K, Shirasawa H, Miura H, Sato W, Kumazawa Y, Sato A, Terada Y: Clinical characteristics of Lynch-like cases collaterally classified by Lynch syndrome identification strategy using universal screening in endometrial cancer. Gynecologic Oncology(査読有) 147(2):388-395(2017)
DOI:10.1016/j.ygyno.2017.08.016

Sato W, Miura Y, Shirasawa H, Kumazawa Y, Kumagai J, Terada Y: A case of placental site trophoblastic tumor complicated nephrotic syndrome in which hysteroscopic biopsy did not yield a definitive diagnosis. Gynecology and Minimally Invasive Therapy (査読有) 6(2):69-72(2017)
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213307016301125>

Maeda E, Ishihara O, Tomio J, Sato A, Terada Y, Kobayashi Y, Murata K: Cesarean section rates and local resources for perinatal care in Japan: A nationwide ecological study using the national database of health insurance claims. *Obstetrics and Gynecology Research* (査読有) 44(2):208-216(2017) doi: 10.1111/jog.13518.

Kato A, Sato N, Sugawara T, Takahashi K, Kito K, Makino K, Sato T, Shimizu D, Shirasawa H, Miura H, Sato W, Kumazawa Y, Sato A, Kumagai J, Terada Y: Isolated Loss of PMS2 Immunohistochemical Expression is frequently Caused by Heterogenous MLH1 Promoter Hypermethylation in Lynch syndrome screening for Endometrial Cancer Patients. *Am J Surg Pathol* (査読有) 40(6):770-776(2016) Doi: 10.1097/PAS.0000000000000606.

Sato T, Sato N, Takahashi K, Kito M, Sugawara T, Kato A, Makino K, Shimizu D, Terada Y: Cesarean scar caseating granuloma: A case of vesicouterine fistula 30 years after cesarean section. *Clinical Case Reports* (査読有) 4(8):721-724(2016) doi: 10.1002/ccr3.607.

Kito M, Maeda D, Kudo Y, Sato N, Shih M, Wang L, Tanaka M, Terada Y, Goto A: Expression of cell competition markers at the interface between p53 signature and normal epithelium in the human fallopian tube. *PLoS ONE* (査読有) 11(6):e0156069(2016) doi: 10.1371/journal.pone.0156069.

[学会発表](計3件)

Kito M, Maeda D, Terada Y, Goto A(2017) *MED12* Mutation in Uterine Adenomyoma. The United States & Canadian Academy of Pathology's 106th Annual

Meeting, March 4 - 10, 2017 in San Antonio, TX

Tamura D(2017) Uterine Adenomatoid Tumor: A Neoplasm Having Frequent Association With Immunosuppressive Therapy. The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (ASGO2017), Nov 30-Dec 2, Tokyo.

佐藤敏治, 佐藤直樹, 高橋和江, 木藤正彦, 牧野健一, 清水大, 寺田幸弘 (2016) 臨床進行期期の卵巣粘液癌における後腹膜リンパ節郭清の省略条件. 第68回日本産科婦人科学会, 4月, 東京

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田幸弘 (TERADA, Yukihiro)
秋田大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号: 10260431

(2) 研究分担者

佐藤直樹 (SATO, Naoki)
秋田大学・医学(系)研究科・准教授
研究者番号: 40447199

清水大 (SHIMIZU, Dai)
秋田大学・医学部・講師
研究者番号: 60400503

佐藤敏治 (SATO, Toshiharu)
秋田大学・医学(系)研究科・助教
研究者番号: 70636183