

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19547

研究課題名(和文)胆道閉鎖症への母児間マイクロキメリズムの関与検証

研究課題名(英文)Testing possible contribution of maternal microchimeric cells to biliary atresia

研究代表者

入江 直樹 (IRIE, Naoki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：10536121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々有胎盤類の体内には、妊娠中に移入した母親細胞が存在し続けているが、その実態や役割については十分に理解が進んでいない。この問題解明のため、本課題ではヒトジフテリア毒素受容体、そしてIRES配列を介したGFPを発現する遺伝子組み換え技術を活用し、母親細胞の同定を容易にしたマウスを作出した。また、母親細胞の頻度に、胎児側で大きな個体間差がある可能性を示唆するデータを得た。母親由来細胞が再生や免疫寛容、炎症性疾患への関与など、一見相反するような現象との関連が報告されていることを説明しうる可能性を秘めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達の体内には、妊娠中に入り込んできた母親細胞がなぜか存在しており、一生涯こうしたキメラ状態が続きます。しかし、こうした母親細胞が実際に何をしているのか、どういった細胞群なのかについては謎が多く残っています。本研究ではまず、この母親細胞が存在しない条件をつくりだすための遺伝子組み換えマウスをつくりだし、また、検出が難しい母親細胞の数を数えるということに成功しました。今後、母親細胞がどういった役割を担っているのか、いったいどういった細胞達なのかを解明する手がかりになることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Previous studies clarified that mammals, including ourselves, have non-self, maternal cells circulating in our body, however, exact entities and roles of these cells remain elusive. By taking advantages of human diphtheria toxin receptor, together with IRES associated GFP expressing system, we have developed transgenic mice which can specifically remove maternal cells. We also found that frequency of maternal cells could differ largely by individual infants. Maternal cells are reported to associate with seemingly contradictory phenomena, such as regeneration, immune tolerance, and inflammatory disease, and we hope our findings would provide basis for resolving this problem.

研究分野：発生生物学

キーワード：マイクロキメリズム 発生生物学

1. 研究開始当初の背景

我々有胎盤類は、実はキメラ動物である。妊娠中に微量な細胞が母児間で相互移入し、その状態(マイクロキメリズム)が一生涯続くことがわかっている。一方で、細胞数の少なさや移入している細胞の種類の特異性の難しさなどから、それらマイクロキメリズム細胞が生体内、特に胎児側でどういった役割・影響があるのかは十分に理解が進んでいない。これまで、再生や免疫寛容、炎症性疾患への関与など、一見相反するような現象との関連が報告されている状況にあるが、多くの研究は相関を示したのみであり、母親細胞が原因となっているのかどうかなど、その因果関係については明らかではない。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、母親由来の免疫担当細胞がある種の先天異常疾患(胆道閉鎖症患児)で高頻度に見られることや、当該患児では母親と高い免疫学的適合性を示すことを明らかにしてきた。類似の先天異常群も知られており、申請者はそれらをまとめて母児間免疫病仮説という新しい概念を提唱している。しかし、いずれも疾患群では高頻度の母親細胞が発見されるという「相関関係」以上の研究には至っていないのが現状であり、母由来細胞との因果関係は不明である。排除しきれない可能性として、炎症性疾患などでは何らかの免疫応答が起こったために、免疫学的に非自己である母親細胞が優先的に増殖したというシナリオもありえる。

そこで本課題では「ヒトでは不可能だった母親細胞を一掃した条件」を遺伝子改変マウス技術により構築し、母親細胞と炎症性傷害との因果関係を明らかにし、母親細胞の先天異常発症と増悪への関与を検証することを目的とした。また、上記実験に加えて、母親細胞の実態解明も並行して進めた。母親由来細胞の頻度は、健常者で1万から10万分の1程度とされており、検出が非常に難しいが、新しい技術等を活用して定量化することを目的とする。

3. 研究の方法

これまでこの分野ではヒトを対象とした研究が多く、母親細胞が原因なのか、あるいは炎症等何らかの現象が起こったために副次的に母親細胞が増えたのかは判別が難しかった。そこで本課題では、この問題を解決すべく母親細胞のみを除去する実験系として遺伝子組み換えマウスを作出した。具体的には、ヒトジフテリア毒素受容体を発現する遺伝子組み換えマウスを作出し、このマウス(ヘテロ接合体)を母親として野生型の遺伝型を持つマウスと交配させる。こうすることで、生まれた子マウスは2分の1の確率で自身の細胞は野生型だが妊娠中に移入してきた母親細胞はヒトジフテリア毒素受容体を発現している条件が生じる。ここにジフテリア毒素を注入すると、ヒトジフテリア毒素受容体を発現している母親細胞のみが死滅し、除去されるという仕組みである。これらマウスの作出に成功した際には、母親細胞の関与が疑われている胆道閉鎖症のモデルマウスであるロタウィルス感染系など

により、母親細胞が除去された条件とそうでない条件で何らかの違いが生じるかどうかを調べることとする。

一方で、母親細胞はもとよりその頻度が低いため、実際にどのくらいの数が毒素により除去されたのかを調べることは容易ではない。そこで、今回の遺伝子組み換えマウスでは、IRES 配列を介して蛍光タンパク質である GFP を発現する仕組みとし、さらに微小流路技術を応用した細胞数の定量的計測を行う。

4 . 研究成果

遺伝子組み換えには成功しているものの、その発現レベルが期待より低いなど遺伝子組み換えマウスの作出に困難が伴ったが、複数の遺伝子組み換えマウス系統を用意し、作出を進めた。現在、どの程度効率的に母由来細胞を除去できるかを検証している段階である。一方で、当該遺伝子組み換えマウスではなく、GFP マウスと野生型マウスを使って、母由来細胞の数を包括同定する実験系の構築にも成功した。母親由来細胞は非常に低い頻度でしか検出されないことが従来研究から明らかになっているなど、この母親細胞検出技術開発にも困難が伴ったが、微小流路を活用した細胞ソーティング技術などを駆使することで定量的検出に成功した。実験結果によると、胎子によって大きく母由来細胞の数が異なる可能性が示された。今後は、これら細胞 1 つ 1 つの細胞種を同定し、母親細胞が関与するとされている様々な現象（再生、免疫寛容、炎症性疾患の増悪や発症）との関連を探っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Flore Castellan, Naoki Irie
2. 発表標題 Characterization of the phenotypes and functions of maternal cells in biliary atresia
3. 学会等名 EMBO Practical course “Molecular interrogation of single-cells to decipher population heterogeneity and plasticity”（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本香菜、入江直樹
2. 発表標題 胎仔に移入する母由来間イクロキメリズム細胞とは何者なのだろうか？
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本香菜、入江直樹
2. 発表標題 胎児に混入する母親細胞とは何者なのだろうか？
3. 学会等名 母児缶免疫病研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本香菜、入江直樹
2. 発表標題 胎仔へ移入する母由来細胞の包括的細胞種推定
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Flore Castellán, Naoki Irie
2. 発表標題 Maternal microchimeric cells in shaping the developing immune system
3. 学会等名 EMBO Single Cell Biology workshop (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----