

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09777

研究課題名（和文）未解明のHofbauer cellの起源を探る

研究課題名（英文）Exploring the origin of the uncharacterized Hofbauer cell

研究代表者

北畑 伶奈（KITABATA, Reina）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：70772474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Hofbauer細胞はヒトおよび哺乳類の胎盤の絨毛膜絨毛に見られ、抗炎症機能などの調節をつかさどっている胎仔由来のマクロファージとされている。妊娠の調節および胎児の発育に重要な恒常性環境の維持に特別な役割を果たす。Hofbauer細胞が母体の妊娠糖尿病、子癇前症、およびウイルス感染症を合併している患者に関連している。胎児にとっての第一関門となるため、生体内のマクロファージより多様性に富んだマクロファージではないかと考えた。しかし、その起源は間葉系前駆細胞由来か、循環単球由来か原始マクロファージの血行性遊走か各種の説がある。本研究で原始マクロファージから遊走を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児にとって胎盤は母体からの第一関門となるため、生体内のマクロファージより多様性に富んでいる。成人では皮膚が外界との第一関門となる。皮膚ではLangerhans細胞が組織常在性マクロファージとして機能している。本研究によって、Hofbauer細胞が原始マクロファージ由来であることが証明された。これはLangerhans細胞と同様の起源であった。同様の起源である二つの細胞が類似した機能や分化する可能性を秘めており、学術的に興味深い。

研究成果の概要（英文）：Hofbauer cells are found in the chorionic villi of the human and mammalian placenta and are considered embryonic-derived macrophages that play a regulatory role, including anti-inflammatory functions. Hofbauer cells have been implicated in patients with maternal gestational diabetes, preeclampsia, and complicated viral infections. We hypothesized that they might be more diverse than macrophages in vivo because they are the first barrier to the fetus. However, there are various theories as to whether they originate from mesenchymal progenitor cells, circulating monocytes, or hematogenous migration of primitive macrophages. In this study, we confirmed migration from primitive macrophages.

研究分野：形成外科

キーワード：胎盤

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Hofbauer 細胞はヒトおよび哺乳類の胎盤の絨毛膜絨毛に見られ、抗炎症機能などの調節をつかさどっている胎仔由来のマクロファージとされている。それらは、妊娠の調節および胎児の発育に重要な恒常性環境の維持に特別な役割を果たす。Hofbauer 細胞の数は、ヒト胎盤の中で最も豊富な免疫細胞として妊娠中は維持されている。Hofbauer 細胞が母体の妊娠糖尿病、子癩前症、およびジカ熱、サイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルスなどのウイルス感染症を合併している患者に関与することが報告されている。母体からの微生物・ウイルスに対する第一関門となる胎盤において重要な役割を果たしているマクロファージと仮定すると、生体内のマクロファージより多様性に富んだマクロファージではないかと考えた。また Hofbauer 細胞は M1、M2 マクロファージに分化も可能な細胞であるという報告により (Zulu M.Z. J Innate Immun 2019;11:447-456.) 本研究の着想に至った。例えば、Hofbauer 細胞は間葉系前駆細胞に由来するとの報告もあげられる (Fox H. J Pathol Bacteriol. 1967 Apr;93(2):710-7.) が以降ほとんど証明されていない。また胎仔の循環単球が血流にのり、定着し分化するとの報告もある (Selkov SA, Placenta. 2013 Sep;34(9):836-9.)。本邦では 1991 年に高橋らが、原始マクロファージが妊娠 10 日目でマウス胎盤の絨毛膜絨毛の血管に出現し、これらが絨毛膜絨毛間質に入り、液性の物質を摂取して Hofbauer 細胞に変化することを報告している (Takahashi K, J Leukoc Biol. 1991 Jul;50(1):57-68.)。

もし胎盤由来の間葉系前駆細胞からの分化であるならば、その性質を引き継ぐことも考えられる。報告は少ないものの胎盤絨毛由来の間葉系幹細胞は自己増殖能が高く、免疫拒絶性が低く、免疫調整機能を有するため、同様の機能を有する可能性も考えられる。申請者らはこれまでに皮膚の慢性潰瘍の炎症のコントロールによる治癒機構に関して研究してきた。外界から身を守る手段として皮膚は第一のバリア機構として働いている。微生物・ウイルスに対して免疫機能の要として、マクロファージに由来するランゲルハンス細胞は非常に重要な役割を果たしている。今回着目した Hofbauer 細胞はヒトおよび哺乳類の胎盤の絨毛膜絨毛に見られ、抗炎症機能などの調節をつかさどっているため、皮膚の第一のバリア機構と同様の働きをしているのではないかと想定した。本研究では Hofbauer 細胞の起源について解明することで、皮膚マクロファージおよびランゲルハンス細胞との違いを明確にする。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は Hofbauer 細胞の起源を探り、将来どのような細胞に分化可能なかを示すことである。仮説として間葉系幹細胞由来、胎児単球由来、原始マクロファージ由来の 3 つの候補が報告されている。もし、この細胞が胎盤絨毛の間葉系幹細胞由来であれば自己増殖能が高く、免疫拒絶性が低く、免疫調整機能を有すると仮定できる。胎児単球由来であれば末梢血より誘導可能と考える。原始マクロファージ由来であれば外界との第一のバリア機構である皮膚マクロファージおよびランゲルハンス細胞と同様の起源であると考えている。皮膚マクロファージは骨髄由来の単球が血行性に組織に侵入しランゲルハンス細胞に教育されることによって分化し常に血行性に補充され維持される。Hofbauer 細胞がランゲルハンス細胞の代用となるかはわからないが、両者の起源をたどり共通点を見出すことができれば様々な機能の比較評価ができると考えた。

また、先にも述べたが、未だ、機能の解明できていない細胞は数多く存在するが、独自の視点から Hofbauer 細胞を選出した。この研究の成果はいずれ妊娠出産時の胎盤機能の解明にも大いに貢献することを可能にする Hofbauer 細胞の基礎研究である。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色

妊娠 13.5 日、18.5 日目の ICR マウスを用いて研究は行われた。妊娠マウスは三協ラボサービスより購入した。吸入麻酔下で鎮静の後、頸椎脱臼を行った。犠牲死を確認後、70%エタノールで腹部を消毒し、開腹し子宮を摘出した。子宮を切開し鈍的に胎盤を剥離して回収した。回収した胎盤を 4%PFA、4℃ で 24 時間置き固定した。30%スクロースに置換後、OCT コンパウンドで包埋し凍結標本とし、厚さ 10 μ m の凍結切片を作成した。抗 F4/80 抗体 (FITC Biolegend) を用いて蛍光標識し、核染色は DAPI で行った。

(2) Hofbauer 細胞の追跡

CX3CR1 Cre/ERT2 と CAG-tdTomato (Jackson Lab より購入) を交配し、胎生 8.5 日目にタモキシフェンを腹腔内投与し、原始マクロファージを tdTomato で蛍光標識した。その後、胎生 18.5 日目に前述と同様の方法を用いて胎盤を回収し、凍結切片を作成した。

4. 研究成果

(1) 免疫染色による Hofbauer 細胞の同定

前述した胎仔の循環単球が、定着し分化するとの報告より (Selkov SA, Selutin AV, Placenta. 2013 Sep;34(9):836–9.) 同定を行った。ターゲットとして胎生 13.5 日、18.5 日目の胎仔胎盤を用いた。抗 F4/80 抗体で凍結切片の免疫染色を行い、まずは胎盤のどの部位に Hofbauer 細胞が存在するかの確認を行った (Fig1)。

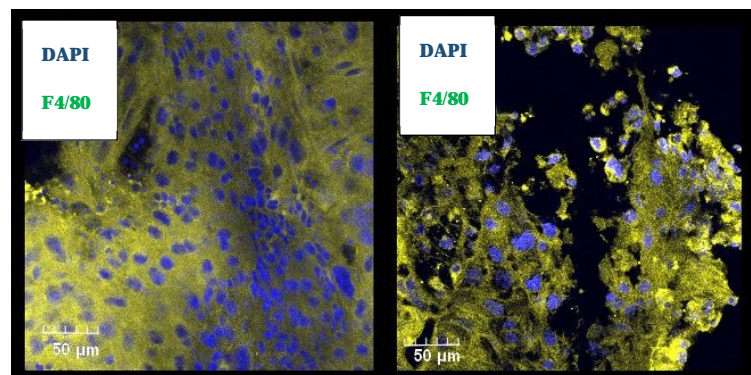
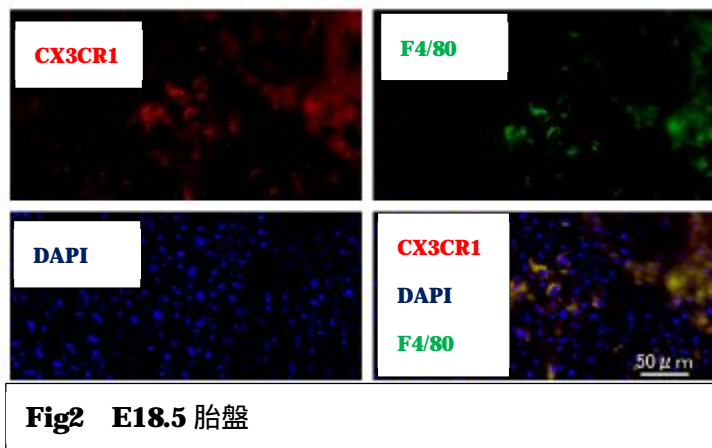


Fig1 左：E13.5 日胎盤 右：E18.5 日胎盤

これまでの報告では胎盤の大部分がこの細胞で構成されているとされている。実際に E13.5 日では F4/80 陽性細胞が密に観察されていた。また E18.5 日になると各所に陰性細胞も散見されるようになっていた。また脱落膜には本陽性細胞は確認できなかった。

(2) Hofbauer 細胞の追跡

次に 1991 年に高橋らが報告した、原始マクロファージが E10.5 日目でマウス胎盤の絨毛膜絨毛の血管に出現し、これらが絨毛膜絨毛間質に入ることを証明する (J Leukoc Biol. 1991 Jul;50(1):57-68.) が未だ決定的な追跡研究はされていない。まずはタイムポイントとして E9.5 日目・13.5 日目・18.5 日目の胎盤を用いて前述の手順で免疫染色を行った。しかしながら、各種抗体を用いても、原始マクロファージと単球等を免疫染色で区別をつけることは確定的とは言えなかった。そこで、C Stremmelらの報告をもとに、原始マクロファージの追跡を遺伝子組み換えマウスで行うことにした (Nat Commun. 2018 Jan 8;9(1):75.)。CX3CR1



Cre/ERT2×CAG-tdTomato を使用し原始マクロファージの出現する E8.5 日目にタモキシフェンを投与し蛍光標識し、その後 E18.5 日目の胎盤を回収した。凍結切片では F4/80 陽性細胞と tdTomato がマージしていること確認した (Fig2)。さまざまな文献にも胎盤の Hofbauer 細胞は E9.5 日には存在していないとされている。これにより、胎盤の Hofbauer 細胞は原始マクロファージ由来であることが示唆された。これまでに不明瞭であった Hofbauer 細胞の起源を追跡できたという、新たな知見を得た。

Hofbauer 細胞の妊娠中の動向に関する研究はヒト胎盤を使用するため進んでいない。しかしながら 2022 年 Developmental Cell で、胎盤胎仔マクロファージの生合成と局在の両方がマウスとヒトでは相同であることが証明された。今後さらに研究が進むであろう。ただし、マウス、ラットにおいても母体の妊娠糖尿病、子癩前症、およびジカ熱、サイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルスなどのウイルス感染症などを用いた実験は実験室の環境整備の観点から容易ではなく、その困難さから敬遠されがちであり進んでいない現状がある。

M1、M2 マクロファージに分化に関して、Hofbauer 細胞は前述した Zulu M.Z.らの報告の様に可能であるが胎児の安全性のため in Vivo での評価は行うことは不可能である。これが Hofbauer 細胞の起源、表現型、機能、および妊娠中に維持される理由を特定した研究が少ない理由である。もし、胎盤絨毛の間葉系幹細胞由来であるならば、自己増殖能が高く、免疫拒絶性が低く、免疫調整機能を有する、などの類似する機能を有する可能性も考えられたが現時点では否定的と考える。Hofbauer 細胞がランゲルハンス細胞の代用となるかはわからないが、両者の起源が共通という重要な知見を得ることができた。今後これらの情報をまとめ更なる研究が進むと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	酒井 成貴 (Sakai Shigeki) (00464941)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関