

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24659730
 研究課題名（和文）ヒト栄養膜細胞に特異的な新規液性因子 laeverin による免疫寛容誘導機構の解析
 研究課題名（英文）Induction of immune-tolerance by a novel human trophoblast-specific soluble factor, laeverin
 研究代表者
 藤原 浩 (FUJIWARA HIROSHI)
 京都大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：30252456

研究成果の概要（和文）：ヒトの胎盤形成過程において絨毛外栄養膜細胞は母体の子宮内膜に浸潤してラセン動脈を再構築する。本研究では研究申請者らが絨毛外栄養膜細胞に特異的に発現する分子として同定した laeverin について、特にその生理的役割を解析する目的で計画された。その結果、soluble form の laeverin が monocyte の dendritic cell への分化を誘導し、HLA-G とともに絨毛外栄養膜細胞に対する免疫寛容誘導にも関与している可能性が示された。これらの知見は胚や胎児の子宮内発育を可能とする機構を説明する上で重要な機序を示唆しており、臓器移植分野への応用も視野に入れてさらに検討すべき研究課題であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：During human placentation, extravillous trophoblast invades maternal endometrium and remodels spiral arteries. In this study, we examined the physiological roles of a novel human trophoblast-specific soluble factor, laeverin that we identified. We found that soluble-form laeverin induced differentiation of monocytes into dendritic cells and showed possible involvement of laeverin in induction of immune-tolerance in cooperation with HLA-G. These findings provide a new insight into the mechanisms for intrauterine human fetal development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ヒト絨毛外栄養膜細胞、laeverin、免疫寛容、胚シグナル

1. 研究開始当初の背景

ヒトの胎盤形成過程において EVT によるラセン動脈の再構築が阻害されると妊娠高血圧症候群などの合併症が発症することが知られている。このため EVT の機能解析は浸潤の制御機構と母体免疫寛容の獲得機構という 2 つの視点から精力的に進められてき

ており、最近では免疫細胞が EVT の浸潤を制御している可能性も示されつつある。本研究申請者はこれまで EVT の浸潤制御機構の解明を目指し、母体血管に侵入する EVT が chemokine 受容体 CCR1 を発現して ligand の RANTES がその浸潤を誘導すること、細胞膜結合型 peptidase である DPPiV が RANTES を

細胞表面で分解して EVT の浸潤を抑制すること、さらに母体血管内で活性化した血小板が RANTES などの chemokine を放出して EVT の血管内浸潤を誘導している可能性を提示してきた (Sato et al. JCEM 2002; Development 2003; Blood 2005)。一方で HCG が糖鎖受容体を介して免疫細胞から IL-8 の分泌を促進すること (Kosaka et al. JCEM 2002)、さらに妊娠時の免疫細胞が走化性物質を分泌して trophoblast の浸潤を促進すること (Egawa et al. Hum Reprod 2002) を世界に先駆けて示してきた。これらと並行してヒト EVT を認識する単クローン抗体を作成して認識する抗原分子の解析をおこなってきたが、その過程で laeverin 分子を発見した (Fujiwara et al., BBRC 2004)。その後の解析で laeverin が M1-family に属する新しい膜結合型 peptidase であり、新規の peptide 結合部位を霊長類以降の進化の過程で獲得していることが見出された (Maruyama et al. JBC 2007; JBC 2009)。さらに r-laeverin によって EVT の浸潤が促進されること、また dendritic cell への分化が誘導されることが観察され、加えて糖鎖を有する soluble form の laeverin が EVT から分泌されていることが確認された。以上の知見から本研究申請者は laeverin をこれまで不明であった EVT に特異的な液性因子 (embryonal signal) の候補として位置付け、本研究を計画することとした。

2. 研究の目的

妊娠が成立する過程において免疫系はどのようにして胚存在の情報 (embryonal signal) を得ているのであろうか？ヒトの妊娠成立過程を 1) 卵管または子宮腔に存在する着床前期、2) 子宮内膜に接着・埋没して母体循環系との交流を開始する着床期、3) 着床後の胎盤形成期、に分類すると、マウスでは卵管内の段階より免疫細胞が胚の存在を認識していることが示されたため、本研究申請者はこの時期の embryonal signal として卵および種特異的な糖鎖構造を有する透明帯の分解産物に着目し (Fujiwara et al. JRI 2009)、現在解析をすすめている (平成 23-25 年度基盤研究 B)。また本研究申請者は着床期に分泌される HCG が LH/HCG 受容体ではなく、糖鎖受容体を介して免疫細胞に胚着床に有利な機能変化を誘導することを世界に先駆けて見出し、HCG が内分泌のみならず免疫細胞に対しても embryonal signal として積極的に作用する仮説を提示してきた (Kosaka et al JCEM 2002)。近年この概念を支持する知見が相次

いで報告されている (Schumacher et al. J Immunol 2009)。

一方で妊娠成立過程の後半期すなわち胎盤形成期には、母体は EVT を免疫的に寛容状態として扱うのみならず、非自己であるが同種の個体であることを認識しつつ EVT と協調して母体組織の再構築を完遂する必要があるが、この時期の EVT 由来の embryonal signal に相当する液性因子はこれまで不明のままであった。今回糖鎖を有する soluble form の laeverin が EVT から分泌されることが確認されて laeverin が embryonal signal の有力な候補として登場したため、新しい展開が期待できることとなった。

これまでに可溶性 HLA-G が注目を集めた時期があったが、免疫細胞に対する impact のある作用が確認されず、また非妊娠女性や男性にも存在するため EVT 由来の embryonal signal としての地位は確立されていない。一方で laeverin 分子は EVT にのみ特異的に発現している機能分子であることより EVT 由来の重要な embryonal signal である可能性が期待される。本研究は laeverin の発見者である本研究申請者らによる最新の知見に基づいて計画されており極めて独創性が高い研究と評価でき、laeverin の免疫寛容誘導への作用が実証できれば自己免疫疾患や臓器移植など他の分野においても新たな展開をもたらすことが予想される。

3. 研究の方法

(1) 各種遺伝子組み換え laeverin の作成

これまで N 末端の細胞膜結合部位 (アミノ酸配列 14-36) を欠損させた可溶性の laeverin 遺伝子のはいったトランスファーベクターを構築後、Sf9 細胞にバキュロウイルスを発現させ、感染細胞を回収して大量培養し、アフィニティ精製法および SDS-PAGE を用いて分離精製して r-laeverin を作成してきた。同様の系を用いて、peptide 結合部位 HAME motif (379-383) の His379 を通常の Gly379 に変換した GAMEN motif を有する r-laeverin および gluzincin motif である Zn 結合酵素活性部位の HEXXH(X)18E motif を変異させ酵素を不活性化させた r-laeverin を作成した。

(2) 抗 laeverin 抗体の作成

精製した laeverin 抗原および r-laeverin をそれぞれ BALB/c マウスに免疫し、脾細胞をミエローマ細胞と細胞融合した後、ヒト胎盤凍結切片を用いた免疫組織染色法によってスクリーニングして EVT に特異的に反応する抗体を選んだ。選択された抗体産生株をクローニング後にマウス腹腔内に投与し、産生さ

れた腹水よりプロテイン A を用いて抗体を精製し、さらに初期絨毛組織から単離した EVT 細胞での染色性を確認して後述の機能実験に使用した。また脱糖鎖処理を行った r-laeverin への反応の有無を確認して糖鎖を認識する抗体を選別した。

(3) laeverin の機能解析

r-laeverin を末梢血単核球 (PBMC) に添加すると dendritic-like cell が活性化することが観察された。また r-laeverin が EVT 自身の浸潤能を亢進することも示された。

4. 研究成果

本研究は平成 24 年度の期間内に、(1)recombinant-laeverin (r-laeverin)の免疫細胞に対する作用を解析して laeverin の標的細胞を同定すること、(2)様々な遺伝子組み換え r-laeverin を作成してそれぞれの免疫細胞に対する作用を解析し、免疫細胞に対する機能構造の部位を推定すること、(3)r-laeverin および精製した laeverin を免疫源として認識エпитープが異なる抗体または糖鎖に特異的に反応する機能抗体を作成し、laeverin の免疫細胞に対する作用機序に関する情報を得ること、(4)抗 laeverin 抗体を用いた可溶性 laeverin の測定系を作成して疾患との関連を検討すること、以上 4 項目を明らかにして soluble form の laeverin の生理的な意義を推定することを目標として計画された。その結果、laeverin が monocyte の dendritic cell への分化を誘導し、HLA-G とともに extravillous trophoblast に対する免疫寛容誘導にも関与している可能性が示された。これらの知見は胚や胎児の子宮内発育を可能とする機構を説明する上で重要な機序を示唆しており、臓器移植分野への応用も視野に入れてさらに検討すべき研究課題であると考えられる。

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 4 件)

(1) Sato Y, Fujiwara H and Konishi I. "Mechanism of maternal vascular remodeling during human pregnancy." *Reprod Med Biol.* 11:27-36, 2012 査読あり DOI なし

(2) Horie A, Fujiwara H, Sato Y, Sugimami K, Matsumoto H, Maruyama M, Konishi I and Hattori A. "Laeverin/sminipeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation." *Human Reprod.* 27:1267-76,

2012 査読あり
DOI:10.1093/humrep/des068

(3) Fujiwara H, Nishioka Y, Matsumoto H, Suginami K, Horie A, Tani H, Matsumura N, Baba T, Sato Y, Araki Y and Konishi I. "Eph-ephrin A system regulates human choriocarcinoma-derived JEG-3 cell invasion." *Int J Gynecol Cancer.* 23:576-82, 2013 査読あり DOI なし

(4) Yoshitake H, Yokoi H, Ishikawa H, Maruyama M, Endo S, Nojima M, Yoshida K, Yoshikawa H, Suzuki F, Takamori K, Fujiwara H and Araki Y. "Overexpression of TEX101, a potential novel cancer marker, in head and neck squamous cell." *Cancer Biomark.* 13:141-8, 2013 査読あり DOI なし

[学会発表] (計 0 件)

(1) Matsumoto H, Sato Y, Suginami K, Horie A, Fujiwara H and Konishi I. "Regulatory role of sphingosine-1-phosphate in migration of human trophoblast." *The 18th International Federation of Placenta Assosiations Meeting.* 2012.9.18-21. Hiroshima, Japan

(2) 藤原 浩

「着床における胚・母体間の相互応答と母体組織の再構築」
第 4 回産婦人科内分泌研究会 2012. 10. 4

(3) 杉並 興、佐藤幸保、堀江昭史、松本久宣、谷 洋彦、藤原 浩、小西郁生

「月経時の子宮内膜修復過程において、血小板は子宮内膜上皮の integrity を増強させる」
第 57 回日本生殖医学会 学術講演会 2012. 11. 8-9 長崎

(4) 松本久宣、佐藤幸保、谷 洋彦、杉並興、堀江昭史、藤原 浩、小西郁生

「Sphingosine-1-phosphate はヒト extravillous trophoblast の浸潤調整に寄与している」
第 57 回日本生殖医学会 学術講演会 2012. 11. 8-9 長崎

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 浩 (FUJIWARA HIROSHI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30252456

(2) 研究分担者

佐藤 幸保 (SATO YUKIYASU)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：00508236

堀江 昭史 (HORIE AKIHITO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：30535836

服部 明 (HATTORI AKIRA)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：50300893

荒木 慶彦 (ARAKI YOSHIKO)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70250933