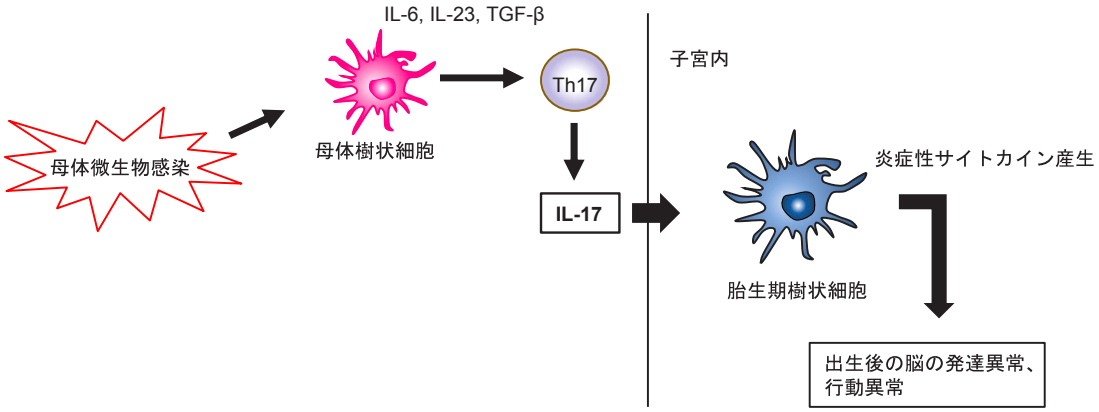
34　胎生期樹状細胞における分化制御機構と疾患制御機構	齋藤　史路

【目的】妊娠中の母体内の胎児は母体由来のアロ抗原や病原性微生物といった様々な免疫刺激に暴露される危険性がある。実際に母体の感染や炎症が胎児の脳の発達や自閉症の発症に影響を及ぼすことが報告されている。しかし、胎生期における病原性微生物を認識する免疫反応、特に樹状細胞については未だよくわかっていない。成人期における樹状細胞の分化や活性化機構、免疫応答誘導機構については非常によく研究されているが、胎生期における樹状細胞の活性化機構や免疫応答誘導機構についてはあまり解明されていない。そこで本研究では、胎生期樹状細胞について、その前駆細胞の分化制御機構、及び胎生期樹状細胞の機能、炎症における役割について解明することを目的とした。
【方法】マウス胎生期肝臓から樹状細胞の前駆細胞、樹状細胞を同定し、成体期樹状細胞と比べてどの程度の機能を有するのかを調べるために、樹状細胞について混合リンパ球反応を行った。また、TLR リガンド刺激によるサイトカインの産生量について定量 PCR やサイトカイン多項目同時解析をフローサイトメーターにて行った。
【結果】混合リンパ球反応の結果より、胎生期樹状細胞は成体期と同等の抗原提示能を有することを示した。また、TLR リガンド刺激によって炎症性サイトカインである TNF-α や IL-6 が成体期樹状細胞よりも多く産生されていることが明らかとなった。

母体感染時における胎児脳の発達、行動異常に胎生期樹状細胞が関与か？



34. 胎生期樹状細胞における分化制御機構と疾患制御機構

齋藤　史路

金沢医科大学 医学部 免疫学講座

Key words：樹状細胞，前駆細胞，胎児，感染，自閉症スペクトラム障害

緒　言

胎児は父親由来の抗原を発現しているため、母親にとっては異物となり拒絶反応が誘導される可能性があるが、制御性 T 細胞による免疫寛容が働き、胎児が母親由来の免疫細胞から攻撃されずに妊娠が維持される［1］。一方で妊娠時の母体を介した病原性微生物感染に対する胎児の免疫担当細胞や免疫反応機構はよくわかっていない。実際に妊娠期の母体への微生物感染が胎児の脳の発達や行動異常の原因となることが報告され［2］、そのメカニズムを解明することは生後の免疫並びに神経発達機構解明に重要である。これまでの報告では、妊娠時の母親のウイルス感染やバクテリア感染と生まれてくる子の自閉症スペクトラム障害の発症リスクに関連があるということ、その感染によって IL-17 などの炎症性サイトカインが産生されるが、そのサイトカインによって胎児の脳の発達異常が引き起こされるということが明らかとなっている［3，4］。また、アレルギーや喘息を罹患している母親と生まれてくる子の自閉症スペクトラム障害の発症リスクとの関連性も報告されており［5］、自閉症スペクトラム障害を発症した子は炎症性サイトカインが脳脊髄液内や血清中で上昇しており、これらサイトカインが胎児期の脳の発達障害を誘導し、自閉症スペクトラム障害の発症に起因している可能性が報告されている［6］。以上のことから、母親の妊娠中の免疫システムのバランスが崩れることにより自閉症スペクトラム障害を発症するリスクが上昇することが明らかとなってきている。しかし、これらのサイトカインの誘導機構や疾患制御メカニズムなど詳細は明らかになっていない。胎生期樹状細胞がこれらに関係している可能性は十分に考えられる。

これらの現状を踏まえ、本研究では、胎生期樹状細胞についてその前駆細胞の分化制御機構、及び胎生期樹状細胞の機能、炎症における役割について解明し、生後の脳の発達や行動異常にどのように寄与しているのかを解明することを目的とした。胎生期樹状細胞、その前駆細胞を同定し、樹状細胞について抗原提示やサイトカイン産生等の免疫応答について検討したところ、成体期樹状細胞と遜色なく免疫反応を誘導することが明らかとなった。

方　法

1.　胎仔肝臓中の樹状細胞および樹状細胞の前駆細胞の同定

C57BL/6J の妊娠 15 日目雌マウスから胎仔肝臓を取り出し、コラゲナーゼ処理、赤血球溶解後、抗体染色し、フローサイトメーターにて解析した。樹状細胞前駆細胞、樹状細胞は非常に小さい細胞集団であるので、前駆細胞は PE-Cy5 標識抗マウス CD3、NK1.1、TER119、B220、Gr-1 抗体で、樹状細胞は PE-Cy5 標識抗マウス CD3、NK1.1、TER119、B220 抗体で陽性となったものを Lineage 陽性として排除し、抗マウス c-kit、Flt3、M-CSFR、IL-7R、F4/80、PDCA-1、CD11c、I-A/I-E 抗体で染色して解析した。

2.　混合リンパ球反応

C57BL/6J の妊娠 15 日目胎仔肝臓、または C57BL/6J の 10 週令雄マウスの脾臓を取り出し、コラゲナーゼ処理、赤血球溶解後、CD11c マイクロビーズを用いて単離した CD11c 陽性樹状細胞を一晩 TLR リガンド刺激した。翌日 Balb/c マウス脾臓から CD90.2 マイクロビーズを用いて単離した T 細胞を CFSE（1 μM）ラベルし、前日に刺激した樹状細胞と混合（樹状細胞：T 細胞 = 1：2）し培養した。3 日後、フローサイトメーターにて T 細胞の増殖を解析した。

3. サイトカイン産生の測定

妊娠 15 日目胎仔肝臓から単離した CD11c 陽性樹状細胞を 48 時間 TLR リガンド刺激した。細胞上清を回収し、ビーズを用いたサイトカイン多項目同時解析（Multiplex assay）をフローサイトメーターにて行った。

結果および考察

1. 胎生期樹状細胞の前駆細胞および樹状細胞の同定

胎生期であってもマクロファージなど生体防御反応を担う免疫担当細胞が存在するため、同様に存在すると考えられる樹状細胞、同細胞の前駆細胞を同定するために妊娠 15 日目のマウスの胎仔肝臓をコラゲナーゼ処理後、抗体染色をして解析した。その結果、IL-7R^{-}Flt3^{+}の樹状細胞前駆細胞（図 1a）、F4/80^{-}CD11c^{+}I-A/I-E^{+}の樹状細胞を見出した（図 1b）。このことから胎生期でもマクロファージ同様樹状細胞も胎児の免疫反応を担っていることが示唆された。

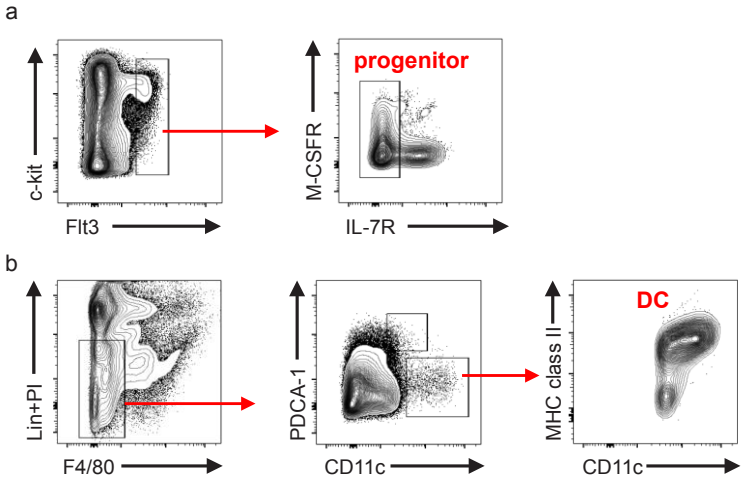


図 1. マウス胎仔肝臓中の樹状細胞前駆細胞、樹状細胞

a） マウス胎仔肝臓から IL-7R^{-}Flt3^{+}樹状細胞前駆細胞を同定。

b） マウス胎仔肝臓から F4/80^{-}CD11c^{+}MHCclass II $^{+}$樹状細胞を同定。

2. 胎生期樹状細胞の機能解析

胎生期樹状細胞が成体期樹状細胞と同等の機能を持つのかどうかを検討するために、混合リンパ球反応を行った。妊娠 15 日目の胎仔肝臓から単離した樹状細胞を、一晩 TLR リガンド刺激を行った。翌日に Balb/c マウスから単離した T 細胞を CFSE ラベルし樹状細胞と共培養した。その結果、胎生期樹状細胞は未刺激および TLR リガンド刺激のいずれも T 細胞を活性化させ、増殖させた（図 2）。よって、胎生期樹状細胞は成体期と同様、樹状細胞としての抗原提示能を有することが示唆された。

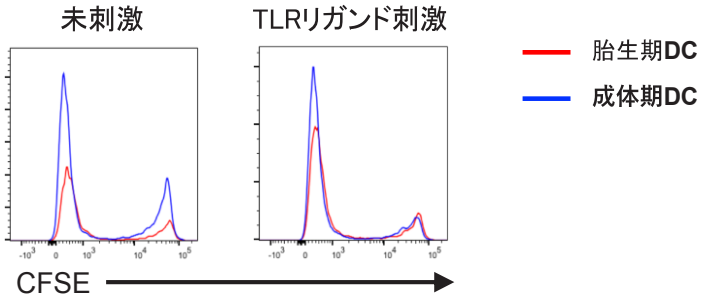


図 2. 胎生期樹状細胞の抗原提示能

胎生期、成体期それぞれの樹状細胞と Balb/c マウス T 細胞を 1：2 の割合で共培養し、T 細胞の増殖を解析した。

3. 胎生期樹状細胞のサイトカイン産生能の検討

次に胎生期樹状細胞が成体期樹状細胞と同様に免疫応答の機能を有するのかを検証するため、妊娠 15 日目の胎仔肝臓から単離した樹状細胞を TLR リガンドで刺激し、サイトカイン産生量をタンパク質レベルで解析した。培養上清中の TNF-α、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生量を調べると、胎生期樹状細胞は成体期樹状細胞と同じく免疫応答の機能を有することが明らかとなった。さらに、これら炎症性サイトカインの産生量は成体期樹状細胞よりも優位に多いことが判明した（図 2a、b）。この結果から成体期に比べて胎生期の免疫応答は過剰であると示唆されたことから、胎児の先天性疾患との関連、胎児期特有の免疫応答の意義などを今後検証していかなければならない。

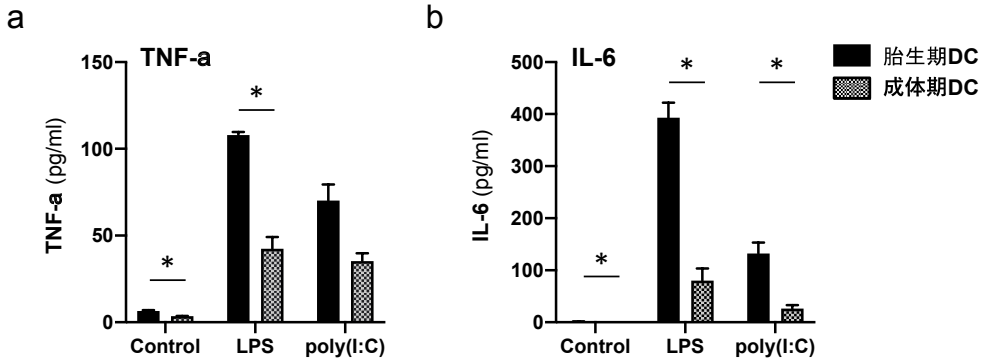


図 3. 胎生期および成体期樹状細胞におけるサイトカイン産生能

a) 胎生期および成体期樹状細胞の TLR リガンド刺激による TNF-α産生量。

b) 胎生期および成体期樹状細胞の TLR リガンド刺激による IL-6 産生量。

$P < 0.05$（Student's t-test）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、金沢医科大学医学部免疫学講座の小内伸幸、和田俊樹、松葉慎太郎である。

文　献

1) Samstein RM, Josefowicz SZ, Arvey A, Treuting PM, Rudensky AY. Extrathymic Generation of Regulatory T Cells in Placental Mammals Mitigates Maternal-Fetal Conflict. Cell. 2012 Jul 6;150(1):29–38. PMID: 22770213 DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.031.

2) Atladóttir HO, Thorsen P, Østergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. J Autism Dev Disord. 2010 Dec;40(12):1423–30. PMID: 20414802 DOI: 10.1007/s10803-010-1006-y.

3) Wong H, Hoeffer C. Maternal IL-17A in autism. Exp Neurol. 2018 Jan;299:228–40. Epub 2017 Apr 25. Review. PMID: 28455196 DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.04.010.

4) Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim S V., et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. Science. 2016 Feb 26;351(6276):933–9. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26822608 DOI: 10.1126/science.aad0314.

5) Schwartzer JJ, Careaga M, Chang C, Onore CE, Ashwood P. Allergic fetal priming leads to developmental, behavioral and neurobiological changes in mice. Transl Psychiatry. 2015 Apr 7;5(4):e543. PMID: 25849982 DOI: 10.1038/tp.2015.40.

6) Chez MG, Dowling T, Patel PB, Khanna P, Kominsky M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. Pediatr Neurol. 2007 Jun;36(6):361–5. PMID: 17560496 DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2007.01.012.