

胎児-母体境界領域における免疫特権環境形成の分子基盤

九州大学生体防御医学研究所免疫遺伝学分野 特任助教 國村 和史

要約

1948年、Peter Medawar博士(ノーベル生理学・医学賞受賞)によって免疫特権(immune privilege)という概念が提唱された。脳・眼・精巣などの一部組織で免疫応答が起こりにくい現象を指すが、その実体は未だに謎に包まれている。胎児は母体にとって父性抗原を持つ非自己(semi-allogenic)な存在であるが、拒絶されないことから特殊な免疫特権環境を子宮内で形成していると考えられてきた。私達の研究室では最近、免疫細胞の遊走・活性化に不可欠なRac活性化分子DOCK2(Dedicator of cytokinesis protein 2)の阻害剤を探索する過程で、コレステロール硫酸(Cholesterol sulfate: 以下CSと略す)が生体内においてDOCK2-Rac活性化阻害因子として機能していることを発見した。CSはコレステロールがSULT2B1b(Sulfotransferase 2B1b)によって硫酸化されることで合成される硫酸化体であるが、全身で広く産生されているわけではなく、一部の臓器や組織でしか認められない。CSが胎児-母体境界領域である胎盤で産生されているか否かを評価したところ、妊娠中期頃から末期にかけて胎盤内部において産生されていた。そこで本研究では、CSが化学的バリアを形成し免疫細胞の遊走・浸潤を阻害するという私達の知見に基づき、胎児-母体間領域での新たな免疫回避機構の存在を実証することを目的として実験を行った。SULT2B1bのレポーターマウスや、野生型マウス胎盤のsingle-cell RNA-seqを用いた解析の結果、胎児細胞由来の栄養膜細胞(トロホプラスト)において特異的にSULT2B1bが発現していることが分かった。また、SULT2B1ノックアウトマウスでは胎盤内やトロホプラスト周囲への免疫細胞浸潤が亢進することを見出した。本研究の成果をもとにさらに研究を進めていくことで、妊娠の成立・維持機構の理解に繋げ、ひいては産婦人科疾患の予防・診断・治療や生殖医療の発展に貢献していきたい。

緒言

免疫特権(immune privilege)という概念は1948年にPeter Medawar博士(1960年ノーベル生理学・医学賞受賞)により提唱されたものであるが¹、70年以上経った今でもその実体は謎に包まれている²。胎児は母体にとって父性抗原を持つ非自己(semi-allogenic)な存在であるものの、拒絶されずに子宮内で生着し育つことから、胎児自身あるいは胎盤が免疫学的拒絶を免れる特殊な“免疫特権環境”を形成していると考えられてきた。近年、マクロファージや制御性T細胞を中心とした免疫抑制機構が提唱されているが、子宮内における免疫特権の全貌は依然として不明である³。胎児由来細胞が異物として免疫系に認識され排除の対象となれば、胎児発育不全や流産につながる事が予想される。妊娠が成立し、維持される機構をさらに深く理解していくことは、少子化が進む日本のみならず世界の未来のために重要であろう。

DOCK (Dedicator of cytokinesis) ファミリー分子は低分子量Gタンパク質であるRacやCdc42を活性化する新しいタイプのグアニンヌクレオチド交換因子であり、その機能やシグナル伝達機構は国際的にも大きな関心を集めている。その中でもDOCK2は免疫細胞で特異的に発現する分子であり、2001年に当研究室にて発見された⁴。その後の解析によって、DOCK2はRac活性化を介して免疫細胞の細胞骨格を制御することで、T細胞、B細胞、好中球、NK細胞などの遊走や活性化に必須の役割を演じていることが分かってきた⁵。最近私達は、DOCK2によるRac活性化の機能を抑える物質を網羅的に探索する中で、コレステロール硫酸(Cholesterol sulfate: 以下CSと略す)を見つけ、実際に生体内(涙や前眼房)でDOCK2-Rac活性阻害因子として機能することで免疫細胞の浸潤を防いでいることを発見した⁶(図1)。

免疫監視を行なっている好中球やリンパ球などの

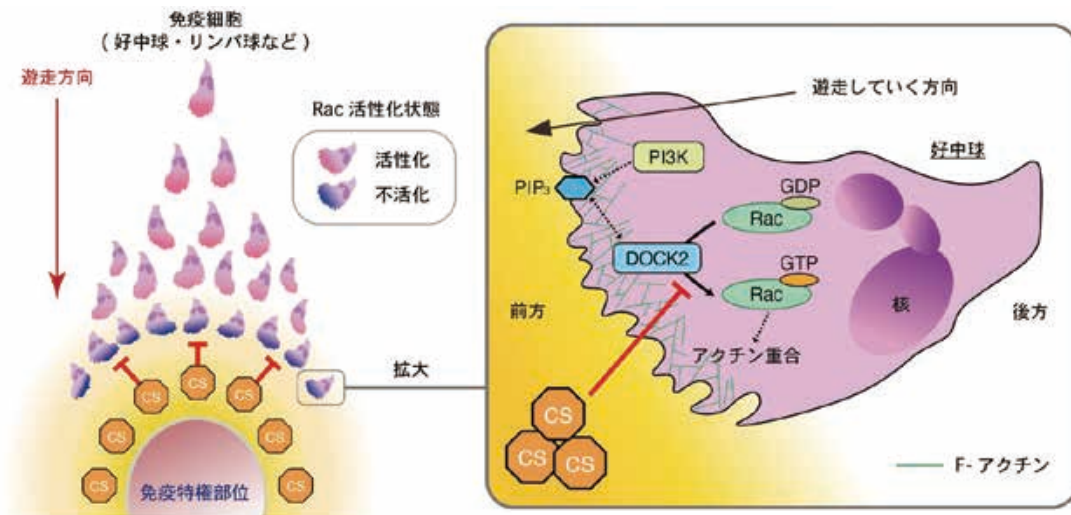


図1. コレステロール硫酸 (CS) が形成する化学的バリアの模式図

免疫細胞は、DOCK2によるRac活性化を経てアクチン重合・脱重合を調整することで自身の骨格を変え、遊走していく。DOCK2のRac結合部位(GDP-GTP交換反応を担う触媒ポケット)にCSが入り込み阻害する結果、免疫細胞の遊走がストップする。この化学的バリア(chemical barrier)が免疫特権環境の形成に関わっていると考えている。

また、SULT2B1aとSULT2B1bは、3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate(PAPS)を供与体として、基質(コレステロール)に硫酸基を付与する硫酸基転移酵素であるが、これらの分子はalternative splicingによって同一の遺伝子から生成される。SULT2B1aが主にプレグネノロンを硫酸化するのに対して、SULT2B1bはCSの産生に特に重要な働きをしていることも分かった⁶。

そこで免疫特権区域として知られる“胎盤”を解析したところ、胎盤内でSULT2B1bの発現が高く、実際にCSが産生されていることを見出した。本研究では、「CSがDOCK2阻害因子として化学的バリアを形成し免疫細胞の遊走・浸潤を阻害する」という私達の知見に基づき、胎児-母体間領域で産生・拡散されるCSが免疫回避機構の一端を担うことで免疫特権環境を形成しているとの仮説を立て、マウスを用いて妊娠におけるCSの意義とその詳細なメカニズムについて検討を行った。

方法

今回私達は、野生型のC57BL/6Jマウス(以下、WTマウス)やSULT2B1ノックアウトマウス(以下、

Sult2b1^{-/-}マウス)、SULT2B1bレポーターマウス(以下、*Sult2b1b*-tdTomato knock-inマウス)を用いて計画妊娠を行い、実験に供した。なお、動物実験は九州大学の各承認委員会による認可のもと、動物愛護の精神に則り苦痛の緩和等、適切な処置を講じて実施した。また、マウスは当大学動物飼育施設においてSPF(Specific pathogen free)環境下で維持・飼育した。

本研究では胎児の免疫特権環境形成においてCSがどこで、どの程度寄与しているかを調べるため、以下の3つについて研究を進めた。

(1) 妊娠期のマウス胎盤におけるCS局在とSULT2B1b発現細胞の同定

慶應義塾大学の杉浦悠毅 講師の御協力のもと、質量分析イメージング法によりWTマウスおよび*Sult2b1*^{-/-}マウスの胎盤内CS局在を解析した。また、胎盤におけるSULT2B1b発現細胞を同定するべく、*Sult2b1b*-tdTomato knock-inマウスの胎盤を免疫組織染色ののち、共焦点レーザー走査型顕微鏡(FV3000; オリンパス社)にて観察を行った。さらに、WTマウスの胎盤から非免疫細胞を分取したサンプルよりChromium Controller(10X Genomics社)にてドロップレットを取得し、single-cell RNA-seq(scRNA-seq)解析を行い、SULT2B1b発現細胞の遺伝子プロファイルから細胞種の同定を試みた。

(2) CS発現細胞における化学的バリア形成をin vitroで解析

まず、SULT2B1b発現細胞の効果的な単離法を確立するため、scRNA-seqデータからSULT2B1b発現細胞で特異的に発現する細胞表面マーカー分子に着目した。各候補の表面マーカーを用いて磁気ビーズ (MACSシステム; Miltenyi Biotec社)やCell sorting (FACS Melody; BD Biosciences社)を組み合わせることでSULT2B1b発現細胞の単離を試みた。また、単離した細胞における*Sult2b1b*の遺伝子発現をリアルタイムPCR (Bio-Rad社)により評価した。次にこの単離法を用いて、WTマウスと*Sult2b1*^{-/-}マウスの胎盤から単離したSULT2B1b発現細胞をT細胞と共培養し、タイムラプスイメージング (Incucyte; ザルトリウス社)によりバリア形成の有無を検証した。

(3)胎児の免疫特権環境形成におけるCSの生理的意義をin vivoで検証

WTマウスと*Sult2b1*^{-/-}マウスの出生数・胎児重量・胎盤重量を測定することで、流産や胎児発育不全の有無を評価した。同時に、各マウスの胎盤形態をHE (Hematoxylin-Eosin) 染色および免疫組織化学染色にて評価し、ImageJ Fijiを用いて定量した。また、胎盤内への免疫細胞の浸潤の程度を評価するため、各マウスの胎生期ごとに胎盤および子宮内膜から免疫細胞を採取し、質量分析サイトメトリー (CyTOF Helios; フリュエダタイム社)にて様々な免疫細胞サブセットの増減を網羅的に解析した。

さらに、妊娠における免疫細胞からのattackをより強く反映させたモデルを構築するため、人工的に抗原を付与した遺伝子改変マウスを作製した。具体的には、SULT2B1b発現細胞で特異的に「MHC class II (I-Ab; $\alpha\beta$) + 卵白アルブミン (OVA) ペプチド」を発現するノックインマウスを作出し、このマウスの妊娠時にOVA抗原を認識するT細胞 (OTII T cell) を移入することで、SULT2B1の有無による出生数や胎児重量などの変化を解析する。

結果

(1)-1 : CSの質量分析イメージング解析

まず、*Sult2b1*^{-/-}マウスの胎盤内では時期に関わらずCSが全く存在しないことが確認できた。その上でWTマウスの胎盤では妊娠中期から末期にかけてCS産生が認められ、興味深いことに胎児-母体境界領域である胎盤迷路部 (ラビリンス部) にCSの強いシグナルが認められた。さらに、そのCS産生は

まだらであった。

(1)-2 : SULT2B1bレポーターマウスの共焦点顕微鏡観察

上記のCSイメージング結果をもとに、胎生16.5日における*Sult2b1b*-tdTomato knock-inマウスの胎盤について、様々なマーカー分子に着目して免疫組織染色を行った。その結果、トロホプラストにおいて特異的にtdTomatoのシグナルが認められることが分かった。

(1)-3 : WTマウス胎盤 (非免疫細胞) のscRNA-seq解析

胎生16.5日におけるWTマウスの胎盤細胞をscRNA-seq解析に用いた。正規化・doublet除去後のデータ (n=4,848cells) をクラスタリング解析し、19クラスターに分類された。その中で*Sult2b1*を発現する細胞は1つの集団にまとまっており、発現遺伝子プロファイルはあるトロホプラストに特徴的であったことから、細胞種を1つに同定した。幸いなことに、このSULT2B1b発現細胞集団で特異的に高発現する遺伝子の中に細胞表面マーカーが複数含まれていたため、以下の実験に進んだ。

(2) : SULT2B1b発現細胞の単離とタイムラプスイメージング解析

候補となる表面マーカー抗原をdetectする抗体を準備し、様々な組み合わせによってMACSやFACS Melodyによる分離を試みた。その結果、複数の抗体を組み合わせnegative/positive gatingを経ることで*Sult2b1b*を特異的に高発現する細胞集団を単離することに成功した。次に、同集団をWTマウスと*Sult2b1*^{-/-}マウスの胎盤よりそれぞれ単離し、活性化させたT細胞と共培養下でタイムラプス撮影を行ったところ、WTではT細胞が近くまで寄り付かないのに対し、*Sult2b1b*ノックアウトではT細胞がcontactできることを確認した。

(3)-1 : SULT2B1b欠損マウスの胎児および胎盤の評価

Sult2b1^{-/-}マウスではWTマウスと比べ、出生数に大きな差はなかったものの、胎児重量および胎盤重量が有意に低下していた。また、胎盤のHE染色・免疫組織化学染色の結果、ラビリンス部の面積に差

は見られないが脱落膜との境界線が蛇行し不整であり、血管の空隙が目立った。さらに、*Sult2b1*^{-/-}マウスの胎盤ではT細胞や好中球、NK細胞といった免疫細胞サブセットがWTマウスより有意に増加していた。

(3)-2：胎盤細胞特異的に人工抗原を提示する遺伝子改変マウスの作製

scRNA-seq解析の結果得られたデータより、SULT2B1b発現細胞集団に特異的に強発現する遺伝子に着目した。この遺伝子のプロモーター直下においてI-Ab +OVA323-339を組み込んだコンストラクトを作成し、CRISPR-Cas9システムを用いてノックインマウスの作製を行った。現在受精卵を偽妊娠マウスに移植し、無事に産仔を得ている。遺伝型解析を行うことでこのファウンダーマウスの中から該当の配列が組み込まれたマウスを選別し、繁殖させていく予定である。今後、本マウスと*Sult2b1*^{-/-}マウスを掛け合わせて計画妊娠を行い、様々な胎生期においてOVA抗原認識T細胞を移入することで妊娠への影響を解析していく。

考 察

以上の結果より、①胎盤迷路部でCSが産生されていること、②トロホプラストで特異的にSULT2B1bを発現していること、③SULT2B1bを発現するトロホプラスト集団にはT細胞が寄り付かないこと、④SULT2B1を欠損したマウスでは胎児発育不全および胎盤形成不全をきたすこと、が分かった。

本研究は、CSがDOCK2のRac活性化を阻害する物質であり、生体内において限定的な場所で産生されているという発見をきっかけに始めたプロジェクトである。免疫細胞が寄り付かない免疫特権環境というキーワードから、新しい生命(母体にとっては半分異物)を育むための“胎盤”という神秘的な臓器に着目した。CSが妊娠時のヒトの血中や胎盤中で認められ、妊娠週数が進むにつれて増加してくることが1997年に報告されて以来⁷、妊娠におけるCSの生理的な意義は20年間未解明のままである。同様にSULT2B1b遺伝子についてもヒト胎盤において高発現することが2004年に報告されたものの⁸、その機能や意義は分かっていない。

本研究により、CSが持つDOCK2阻害作用によっ

て形成される化学的バリアが、妊娠時の免疫特権環境構築に寄与していることが実証されれば、不妊・不育症などの新たな治療法や予防法の開発に繋がると考えられる。母子ともに健やかな未来を築ききっかけになることを期待し、さらに研究を前に進めていきたい。

謝辞：本研究を支えていただいた神澤医学研究振興財団に深謝申し上げます。

参考文献

1. Billingham E, Brent L, Medawar PB. “ACTIVELY ACQUIRED TOLERANCE” OF FOREIGN CELLS. Nature 1953; 4379: 603-606.
2. Mellor A.L., Munn D.H. Creating immune privilege: Active local suppression that benefits friends, but protects foes. Nat Rev Immunol 2008; 8: 74-80.
3. Ander S.E., Diamond M.S., Coyne C.B. Immune responses at the maternal-fetal interface. Sci Immunol 2019; 4.
4. Fukui Y, Hashimoto O, Sanui T, et al. Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. Nature 2001; 412: 826-831.
5. Kunimura K, Uruno T, Fukui Y. DOCK family proteins: key players in immune surveillance mechanisms. Int Immunol 2020; 32: 5-15.
6. Sakurai T, Uruno T, Sugiura Y, et al. Cholesterol sulfate is a DOCK2 inhibitor that mediates tissue-specific immune evasion in the eye. Sci Signal 2018; 11: eaao4874.
7. Lin B, Kuboshiro K, Akiba Y, et al. Alteration of acidic lipids in human sera during the course of pregnancy: characteristic increase in the concentration of cholesterol sulfate. J Chromatogr B 1997; 704: 99-104.
8. He D, Meloche CA, Dumas NA, et al. Different subcellular localization of sulphotransferase 2B1b in human placenta and prostate. Biochem J 2004; 379: 533-540.

Abstract

In 1948, Dr. Peter Medawar proposed the concept of immune privilege. It refers to the phenomenon that some tissues do not respond well to immune responses, but its reality is still shrouded in mystery. Although the fetus is a semi-allogenic entity with paternal antigens for the mother, it has been thought that it forms a special immune-privileged environment in the uterus because it is not rejected. While searching for inhibitors of dedicator of cytokinesis protein 2 (DOCK2), which is indispensable for the migration and activation of immune cells, our laboratory has found that cholesterol sulfate (CS) inhibits Rac activation by DOCK2. CS is synthesized by sulfation of cholesterol by sulfotransferase 2B1b (SULT2B1b), but it is not widely produced throughout the body and is found only in some organs and tissues. Recently, we discovered that CS is produced in the placenta, which is the feto-maternal interface. In this study, we aimed to demonstrate the existence of a new immune evasion mechanism in the placenta based on our findings that CS forms a chemical barrier and inhibits migration and infiltration of immune cells. As a result of single-cell RNA-seq analysis of mouse placenta, we could identify a population that expresses SULT2B1b specifically. Further research will contribute to the development of novel therapy for obstetrical and gynecological diseases.