

二本鎖RNAによる合胞体栄養膜細胞融合・分化障害メカニズムの解明

Revealing the mechanisms by which double-stranded RNA damages the syncytiotrophoblast fusion and differentiation

国立成育医療研究センター 免疫アレルギー・感染研究部 本村 健一郎

要約

Small for Gestational Age (SGA) や妊娠高血圧症候群 (Hypertensive Disorders of Pregnancy, HDP) といった母体・胎児双方に甚大なダメージを引き起こす妊娠合併症は、根治療法が確立されておらず、公衆衛生上も世界的に問題となっている。これらの妊娠合併症の一部に、胎盤障害が関与していることが示唆されている。胎盤の機能細胞である合胞体栄養膜細胞及びその前駆細胞である細胞性栄養膜細胞は、母児免疫寛容を司るとともに、胎盤での生体防御も担っている。細胞性栄養膜細胞が合胞体栄養膜細胞に分化する過程が障害されると、合胞体栄養膜細胞の形成・機能が障害され、ひいては胎盤機能障害を引き起こすと考えられているが、そのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、栄養膜細胞に発現する自然免疫反応の全容を明らかにし、その刺激を介した反応が、細胞性栄養膜細胞から合胞体栄養膜細胞への分化に与える影響、および実際に妊娠合併症を引き起こすかについて、検討を行った。ヒト満期胎盤から誘導した初代合胞体栄養膜細胞モデルの自然免疫系受容体のスクリーニングを行ったところ、二本鎖RNA受容体が特異的に発現していた。この二本鎖RNA受容体を介したシグナルが細胞性栄養膜細胞から合胞体栄養膜細胞への分化に影響を与えているかを、分化・融合に関わる遺伝子の発現で確認したところ、それらの低下を認め、さらに形成された合胞体栄養膜細胞のホルモン産生能も低下していた。さらに、二本鎖RNAが実際に妊娠合併症を引き起こすことを、動物モデルを用いて示した。これらの検討から、二本鎖RNAが自然免疫系受容体の活性化を介して細胞性栄養膜細胞の分化を障害し、妊娠合併症を引き起こす可能性が示唆された。今後、ウイルス由来あるいは内因性二本鎖RNAと妊娠合併症の関係について、さらに検討を進めていく必要がある。

緒言

胎盤は妊娠に欠かせない臓器であり、妊娠期間中の母体生理学・内分泌学的変化と、胎児の生命維持・発育の中心的役割を担う。一方で、この胎盤の機能障害はさまざまな妊娠合併症に関与していると考えられている¹。特に、Small for Gestational Age (SGA) や妊娠高血圧症候群 (Hypertensive Disorders of Pregnancy, HDP) といった母体・胎児双方に時に甚大なダメージを与える妊娠合併症は、未だ根治療法がないため臨床上管理に難渋する場面も多く、公衆衛生上も世界的に問題となっているが、これらの妊娠合併症の一部に、胎盤障害、胎盤局所・母体全身の炎症が関与していることが示唆されている。

ヒト胎盤は、母体血液が充満した絨毛間腔に胎児由来の組織である絨毛が浸る構造 (Hemochorial

placenta) を取る²。合胞体栄養膜細胞 (STB) は胎盤絨毛の表面を覆う胎児由来の細胞であり、ガス交換、栄養の胎児への輸送、胎児側の老廃物の母体への輸送、妊娠維持に必要なホルモン産生など、多くの胎盤の機能を司る。この合胞体栄養膜細胞は増殖能を持たず、その前駆細胞である細胞性栄養膜細胞 (CTB) が融合・分化することによって維持されており、この過程の異常が胎盤障害と、それに続く妊娠合併症の発症に関与していることが示唆されている¹。しかし、そのメカニズムはまだ明らかになっていない。

合胞体栄養膜細胞は、母体からみて非自己である胎児由来の細胞でありながら、母体の免疫システムから拒絶されないという免疫学的特性を持つ³。さらに重要なことに、この細胞は母体循環からの病原体

の胎児側へ侵入（垂直感染）を抑制する局所の免疫学的関門となっている。我々は、この母児間免疫寛容を誘導しつつ生体防御組織としても役割を果たすという一見相反する合胞体栄養膜細胞のユニークな免疫学的特性に着目し、抗原非特異的な自然免疫反応が、栄養膜細胞における生体防御、また付随する炎症・胎盤障害に重要な役割を果たすと考え、研究を進めている。本研究では、初めに合胞体栄養膜細胞に発現する自然免疫反応の全容を明らかにするため、その受容体発現を確認した。そこで明らかとなった二本鎖RNA受容体を介した反応が、細胞性栄養膜細胞から合胞体栄養膜細胞への分化に与える影響、および実際に妊娠合併症を引き起こすかについて、検討を行った。

方法

1. 合胞体栄養膜細胞に発現する自然免疫系受容体のプロファイリング

所属施設倫理委員会の承認を得て、分娩後のヒト満期胎盤からCTBを分離し、ヒト白血球抗原(HLA)-Class I陽性細胞を除去することで純化した。CTBを播種し、120時間培養することで分化・融合を誘導し、ヒト初代合胞体栄養膜細胞モデル(differentiated CTB, dCTB)として用いた。dCTBの純度をFlow cytometryを用いて確認して特に免疫細胞の混入が無いことを確認したのち、自然免疫系受容体の遺伝子発現プロファイリングを定量PCR(quantitative PCR, qPCR)で行った。さらに、自然免疫系受容体のリガンド(Pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 10種類でdCTBを刺激し、産生される炎症性サイトカイン・ケモカインをマルチプレックスアッセイで測定した。

2. 二本鎖RNAによる細胞性栄養膜細胞分化・融合障害

細胞培養プレートに播種した直後の未分化のCTBを合成二本鎖RNAで刺激し、その後培養を継続して分化を誘導したのち、その分化・融合能をqPCRを用いて、機能面をヒト絨毛ゴナドトロピン(hCG)産生量を測定することで検討した。さらに、生存率への影響を確認した。

3. 二本鎖RNA受容体刺激を介したマウス妊娠合併症モデルの解析

所属施設動物実験管理委員会の承認を得て、妊娠後期(15.5 days post coitum, dpc)のマウスに二本

鎖RNAを投与した。18.5dpcに解剖して胎盤・胎仔の重量を測定するとともに組織を回収し、胎盤の遺伝子発現を網羅的に解析した。

結果

1. 合胞体栄養膜細胞に発現する自然免疫系受容体のプロファイリング

Flow cytometryで確認したヒト初代合胞体栄養膜細胞モデルの純度は98.9%で、免疫細胞の混入は0.04%であった。この高度に純化された合胞体栄養膜細胞モデルには、*TLR3*、*MDA5*、*RIG-I*、*LGP3*といった二本鎖RNAを認識する自然免疫系受容体が発現しており、一方で他のタイプの自然免疫系受容体の遺伝子発現は低値であった(図1)。合胞体細胞モデルの自然免疫系受容体をそれぞれ対応するPAMPsで刺激したところ、合成二本鎖RNAであるPoly (I:C)で刺激したときのみ、炎症性サイトカインとケモカインを産生した(図2)。

2. 二本鎖RNAによる細胞性栄養膜細胞分化・融合障害

続いて、合胞体栄養膜細胞に分化する過程で二本鎖RNAが作用した場合に起きる変化について検討した。合胞体栄養膜細胞への分化段階で二本鎖RNAに暴露された細胞性栄養膜細胞は、融合に関連するタンパク(*ERV-W1*, *ERV-FRDI*, *GCM1*)の遺伝子発現が低下していた。また、二本鎖RNAへの曝露によりhCG産生能が低下した。一方、生存率への影響は限定的であった(図3)。

3. 二本鎖RNA受容体刺激を介したマウス妊娠合併症モデルの解析

Poly (I:C)を投与したマウスの胎仔・胎盤重量は対照群と比較して低値であった。また、この胎仔体重・胎盤重量低下は、代表的な二本鎖RNA受容体である*Tlr3*欠損マウス(*Tlr3*^{-/-})ではPoly (I:C)投与後も認めなかった(図4, E)。

次に、二本鎖RNAによる胎盤機能への影響を検討するため、Poly (I:C)を投与した妊娠マウスの16.5dpcと18.5dpcの胎盤の遺伝子発現をMicroarrayを用いて網羅的に解析し、発現変化の見られた遺伝子群を用いてPathway enrichment analysisを行った。16.5dpcでは、二本鎖RNAによる急性炎症反応を反映した遺伝子発現変化が認められた。18.5dpcでは、組織構造や代謝、イオン輸送に関わる遺伝子群の発現が変動していた(図5)。

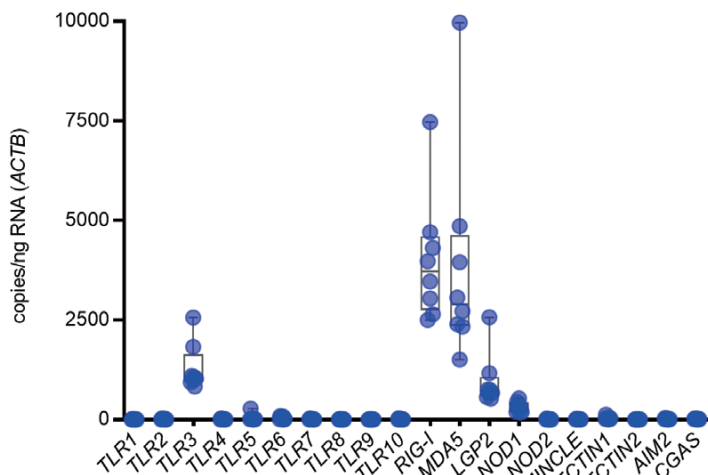


図1. 初代合胞体栄養膜細胞モデルの自然免疫系受容体遺伝子発現。

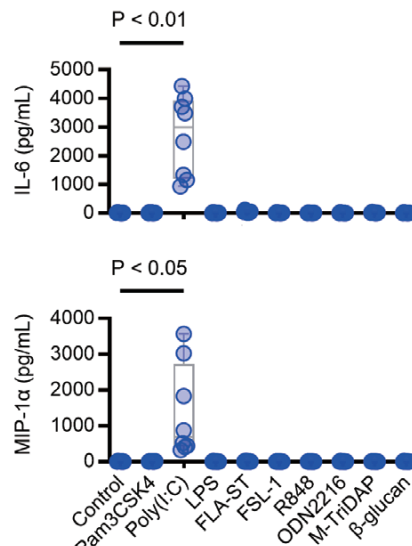


図2. 自然免疫系受容体リガンド刺激による、初代合胞体栄養膜細胞モデルの炎症性サイトカイン (IL-6)・ケモカイン (MIP-1α) 産生

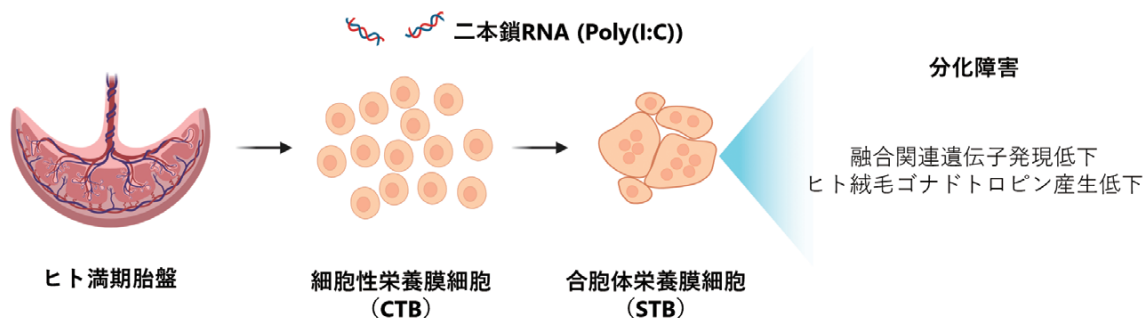


図3. 二本鎖RNAによる細胞性栄養膜細胞分化障害

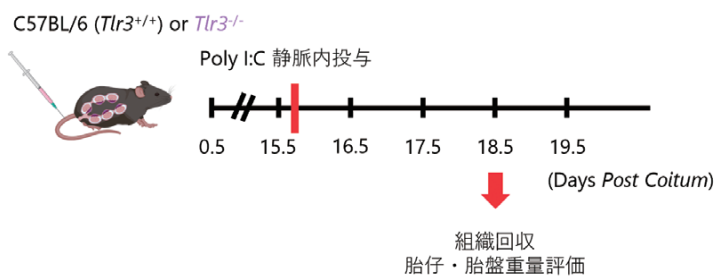


図4. 二本鎖RNA投与による妊娠合併症モデルマウス



図5. 二本鎖RNA投与による妊娠合併症モデルマウスの胎仔・胎盤解析結果

考 察

本研究では、初めに胎盤の自然免疫系受容体を介した炎症反応惹起メカニズムを包括的に検討するため、ヒト初代培養合胞体栄養膜細胞モデルを用いて自然免疫系受容体の発現を解析した。自然免疫系受容体は外来微生物特異的な分子構造 (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs) を認識して素早く免疫反応を引き起こすという、局所における生体防御の中心的役割を担っており、免疫細胞だけ

でなく、他の全身の体細胞にも発現している⁴。複数のタイプの病原体に対応するために、通常細胞には複数のタイプの自然免疫系受容体が発現しているが、興味深いことに栄養膜細胞では、二本鎖RNAに反応する受容体のみが発現し機能していた。胎児・胎盤は母体の免疫システムの視点からは半分は非自己であるが、妊娠期間中母体免疫細胞はこれを免疫学的に排除しない。これは、母児免疫寛容によるものであるが³、同時に胎盤は母体血中から胎児に移行

しようとする病原体をブロックするという重要な役割も担っている。二本鎖RNAがウイルスの保持するPAMPsであることを考慮すると、この結果は、栄養膜細胞が、胎盤の局所生体防御においては抗ウイルス防御において重要な役割を果たすとともに、他の病原体に対しては過剰に炎症を惹起しないという免疫寛容に対してはメリットとなりうる特徴を持つことを示唆している。

自然免疫系受容体を介した免疫応答・炎症は、病原体の排除に有益であるが、同時に周囲の組織傷害も引き起こす⁴。そのため、二本鎖RNAが、その自然免疫系受容体を活性化することによって胎盤障害を引き起こす可能性を、特に細胞性栄養膜細胞から合胞体栄養膜細胞への分化に焦点を当てて検討した。分化前に二本鎖RNAに暴露された細胞性栄養膜細胞は、合胞体栄養膜細胞への分化が障害されており、さらに分化後の合胞体栄養膜細胞の機能は低下していた。この結果はウイルス感染により、栄養膜細胞の合胞体栄養膜細胞への分化障害を介して胎盤機能低下が引き起こされる可能性を示唆している。

上記合胞体栄養膜細胞モデルで観察された二本鎖RNA受容体を介した栄養膜細胞の障害が、実際に妊娠合併症の発症に関与するかを検討するため、妊娠マウスを用いて検討を行ったところ、二本鎖RNAによって胎盤重量の低下と胎仔体重減少が認められ、妊娠合併症の一つであるSmall for Gestational Ageが惹起されることを確認した。この二本鎖RNAの効果は*Tlr3*欠損マウスでは認めなかったため、TLR3を介した反応であると考えられる。さらに、二本鎖RNAを投与したマウスの胎盤では、急性の炎症反応が消失した後も組織構造の変化や物質輸送能の変化が起こっていることが遺伝子発現から示唆され、こちらの機能変化を今後検討していく方針である。

これらの検討から、二本鎖RNAは、自然免疫系受

容体の活性化を介して栄養膜細胞の分化を障害し、妊娠合併症を引き起こす可能性が示唆された。これは、ウイルス感染による妊娠合併症の発症機序の一端を明らかにする所見である。一方、自然免疫系受容体は外来微生物由来ではなく、生体内で細胞障害などにより産生されるDamage associated molecular patterns, DAMPs)も認識し、免疫反応を引き起こすことが明らかとなっている⁵。そのため、上記胎盤・栄養膜細胞の分化障害は内因性二本鎖RNAによっても惹起される可能性もあり、内因性二本鎖RNAの胎盤内での同定や、妊娠合併症発症への関与も、併せて今後検討していく必要があると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益社団法人 神澤医学研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Maltepe E, Fisher SJ. Placenta: the forgotten organ. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2015;31:523-552.
2. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Placental types. In: Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN, eds. *Pathology of the Human Placenta.* sixth ed. Berlin: Springer; 2012:27-39.
3. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:387-411.
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801.
5. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(2):95-112.

発表論文

- 1 Motomura K, Morita H, Okada N, et al. Comprehensive Analysis of the Expression and Functions of Pattern Recognition Receptors in Differentiated Cytotrophoblasts Derived from Term Human Placentas. *J Immunol.* 2023;210(10):1552-1563.

Abstract

The placenta plays a central role in maintaining pregnancy and growing the fetus. The impairment of this pregnancy-specific organ is associated with some serious pregnancy complications, such as Small for Gestational Age (SGA) and Hypertensive Disorders of Pregnancy (HDP), which cause severe damage to both mother and fetus. The placental functional cells, the syncytiotrophoblast, and its precursor cell, cytotrophoblast, are responsible for immune tolerance as well as biological defense responses in the placenta, and disruption of the differentiation process of cytotrophoblasts into the syncytiotrophoblast can impair the formation and function of syncytiotrophoblast, which in turn causes placental dysfunction. However, the precise mechanism of this phenomenon is unclear. In this study, we sought to elucidate whether innate immune responses of the trophoblasts affect the differentiation of cytotrophoblasts into the syncytiotrophoblast, and it causes pregnancy complications. Screening the innate immune receptors expressed on a primary syncytiotrophoblast model derived from the human term placenta revealed the specific expression of functional double-stranded RNA receptors. We found that double-stranded RNA downregulated the expression of fusogenic genes and the production of human chorionic gonadotropin production, suggesting the impairment of cytotrophoblast differentiation. Furthermore, we showed that administering double-stranded RNA to pregnant mice reduced the fetal and placental weight. These findings indicate that double-stranded RNA may cause pregnancy complications by impairing trophoblast differentiation by activating innate immune receptor signaling. Further studies on the relationship between virus-derived or endogenous double-stranded RNA and pregnancy complications are warranted.