

|                      |                                             |                           |               |
|----------------------|---------------------------------------------|---------------------------|---------------|
| 研究課題名                | 経胎盤感作の分子機構の解明：<br>ヒト胎盤由来絨毛細胞を用いた食物抗原の透過性の検討 |                           |               |
| フリガナ                 | マツモト ケンジ                                    |                           |               |
| 代表者名                 | 松本 健治                                       |                           |               |
| 所属機関（機関名）<br>（役職名）   | 国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー・感染研究部<br>部長         |                           |               |
| 共同研究者                | 氏 名（フリガナ）                                   | 所属機関・役職名                  | 役割分担          |
|                      | 久保 輝文<br>（クボ テルフミ）                          | 札幌医科大学医学部<br>病理学第一講座 特任助教 | 絨毛細胞の免疫組織学的検討 |
| 本助成金による<br>発表論文、学会発表 | なし                                          |                           |               |

## 研究結果要約

私達は、経胎盤感作が強く疑われる食物タンパク誘発性胃腸症（FPIES）患児 6 例（経口負荷試験陽性、臍帯血好酸球増多あり、生後 2 週間以内の発症）を経験した。本研究では、母胎血中の食物蛋白がどの様にして児に移行するのか、どの様な因子がそれを制御するのかを検討して、母胎－胎児関門の機能を明らかにし、さらに妊娠中の母胎へのストレス（感染、炎症）が与える影響について *in vitro* および *in vivo* のモデルを用いて検討する。

## 研究目的

経胎盤感作とは、妊娠中に母胎が摂取・曝露した抗原に対して、胎児が子宮内で経胎盤的に曝露し、抗原特異的な免疫応答性を獲得することを指す。1980年代までは、臍帯血中に存在する微量の抗原特異的なIgE抗体の存在が、その後のアレルギー疾患の発症と相関することが20編余りの論文で報告されていた。妊娠中は拒絶反応回避のためにIFN- $\gamma$ が産生されにくいことから、妊娠中には生卵を控える、卵の摂取を一日一個までに制限する、等と言った指導が広く行われていた。

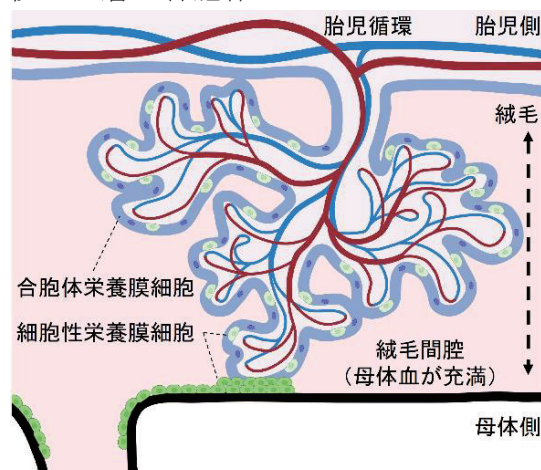
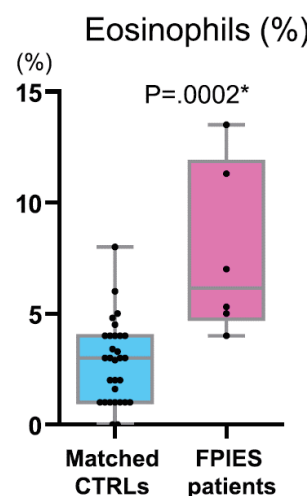
しかしその後、妊娠中に特定の食品を避ける介入試験が2回行われ、いずれも妊娠中の特定の食品の回避は、児の食物アレルギーの発症を抑制しないことが証明された（Fälth-Magnusson K. *Allergy*. 1987;42:64-73、Lilja G. *Clin Exp Allergy*. 1989;19:473-9）。また、臍帯血中の微量の抗原特異的IgE抗体が陽性となる食品が、母胎の血液中の抗原特異的IgE抗体が陽性となる食品とほぼ完全に一致することから（Bønnelykke K. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:646-51）、臍帯血中のIgE抗体は母胎からの直接移行（IgGの様な能動輸送では無く、Leak）によると結論づけられ、臍帯血中のIgEが直接児のアレルギー疾患と相関したのではなく、母親のアレルギーが遺伝学的に児のアレルギー疾患の発症に相関したとされた。こうした経緯から、経胎盤感作については殆ど存在しない、あるいは臨床的に意義の無い現象であると考えられ、見向きされなくなっていた。

私達は昨年、国立成育医療研究センターで出生

した22,459例の新生児の中に、生後2週間以内に発症し、経口負荷試験で確定診断した食物蛋白依存性胃腸炎（Food protein-induced enterocolitis syndrome: FPIES、非IgE依存性）が6症例含まれていることを見いだした（Suzuki H. *Allergol Int*. 2021;70:262-5）。興味深いことに、その内の3症例は生後7日以内に発症していた。抗原特異的な免疫応答の発現には、抗原曝露から抗原提示細胞による取り込み、Naïve T細胞への抗原提示、T細胞の分化・増殖と、最低でも1週間

はかかることから、この3例では経胎盤感作が成立し、出生後に当該抗原であるミルクを摂取して発症したことが強く疑われた。実際に、この6症例では臍帯血好酸球

増多が認められ、子宮内で何らかの2型炎症が始まっていた可能性すら示唆された（右図）。  
胎盤の構造を下に示す。母胎血に直接曝露する絨毛の表面は多核で一層の合胞体



性栄養膜（syncytiotrophoblast: STB）で覆われており、STB が母胎－胎児関門（バリア）として作用する。本研究では、母胎血中の蛋白がどの様にして児に移行するのか、どのような因子がそれを制御するのかを検討して、母胎－胎児関門の機能を明らかにし、妊娠中の母胎へのストレス（感染、炎症）が与える影響について *in vitro* および *in vivo* のモデルを用いて検討する。

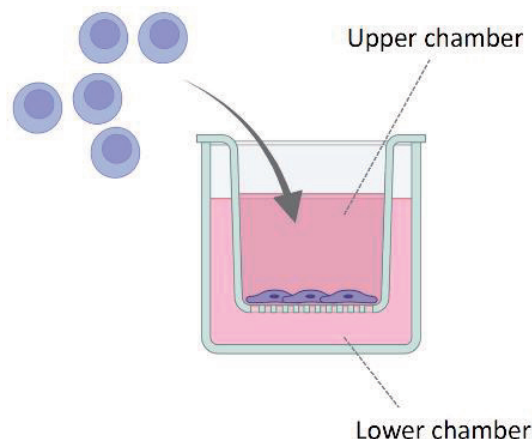
## 研究計画及び研究手法

経胎盤感作の分子機構の全貌解明にあたっては、①ヒト胎盤由来絨毛細胞を用いた食物抗原の透過性の検討（本研究）の他に、②ウイルス感染や炎症が、合胞体性栄養膜細胞（STB）からの alarmin の放出や経胎盤感作（樹状細胞活性化）に与える影響の検討、③妊娠マウスを用いた、経胎盤感作の検討、を実施することが必要であると考えている。

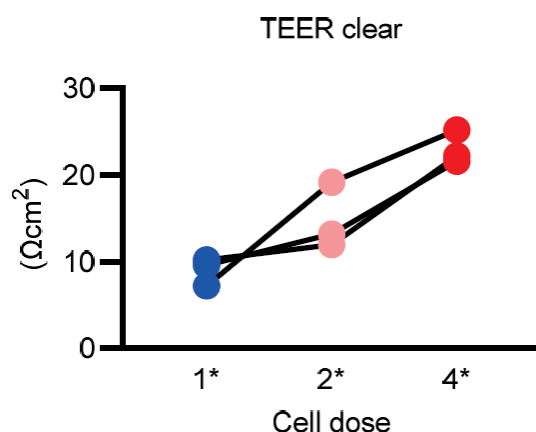
### ① ヒト胎盤由来絨毛細胞を用いた食物抗原の透過性の検討

a. ヒト胎盤からの細胞性栄養膜細胞（CTB）の単離と、Transwell 上での合胞体性栄養膜細胞（STB）への分化誘導：絨毛モデルの構築私達の既報（PLoS One 2017）に基づき、ヒト満期胎盤から酵素処理・比重遠沈および抗 HLA class I 抗体を用いた Negative selection によって CTB を単離する。CTB を Transwell の膜上に播種し、ROCK inhibitor の存在下で培養することによって、CTB は増殖をしないが癒合して、多核の STB に

分化する（下図）。



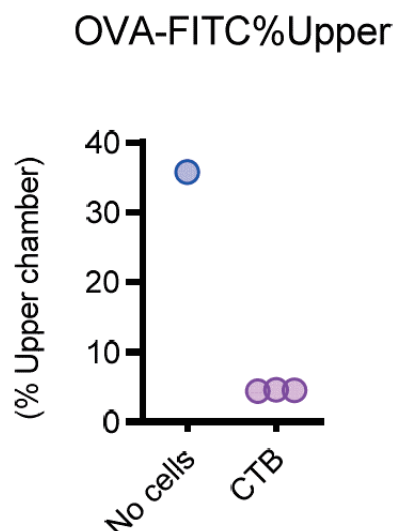
その際には、Transwell の上室と下室の間の電気抵抗（TEER）が上昇する（下図）。



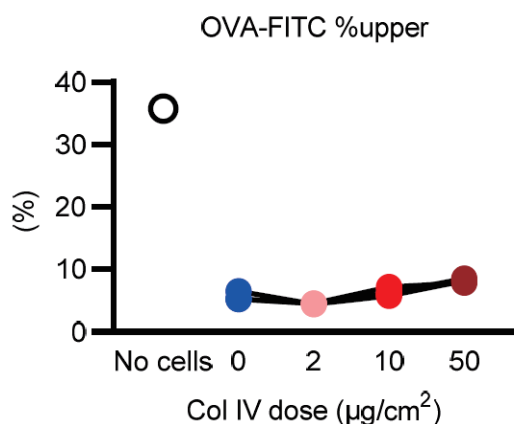
今回、予備検討として異なる細胞数を入れて TEER を測定した所、Well 内に入れる細胞数に応じて TEER の上昇が確認されたことから、TEER が良好な STB 単層膜を形成したことを確認する良い指標となることがされた。

b. 単層の STB が形成された所で、上室内に FITC 標識した OVA を添加した所、STB が無い Transwell の上室に添加した場合には、下室からは上室の約 37%の蛍光が検出されたが、CTB を添加して STB を分化誘導した下室ではわずか数%

しか透過しないことを見いだした（下図）。



又、Transwell のコラーゲン IV のコートは大きな影響を与えなかった（下図）。



c. 受動的輸送の検討では、上室には IgG 抗体を添加せず、Ovalbumin (OVA：分子量約 46 KD) を加水分解したものと加水分解していないものを添加して、下室の OVA 濃度を FASTKIT エライザ Ver. III（日本ハム株式会社）を用いて測定する。このキットは卵に対する Polyclonal 抗体を用いているため、分解された OVA の断片も測定

する事が可能である（業績 7 で使用経験あり）

d. 能動的輸送検討では、上室にヒト IgG 抗体（ヒト免疫グロブリン製剤）を添加して、FcRN が OVA 抗原と結合した IgG 抗体を下室に輸送するのを測定する。

この in vitro 系に、ウイルス感染を模した PolyI:C や TNF-α を添加して、受動輸送および能動輸送に与える影響を検討する。

2023 年度には上記①ヒト胎盤由来絨毛細胞を用いた食物抗原の透過性の検討（a. ～e.）を実施する。

特に、困難が予想されるのは、実験に使用するヒト IgG 抗体である。抗 OVA 抗体を大量に含有するロットを精査しつつ、各種ヒト免疫グロブリン製剤を試みる必要があると考えている。

当研究室には本研究の遂行に必要なすべての備品が揃っており、またヒト胎盤由来 CTB も数十ロットを冷凍保存しており、研究費が支給され次第、直ちに着手が可能である。

本研究の仮説は、「健常胎盤は良く分解された低分子を胎児に届ける様に機能する。また、母胎の食物抗原特異的な IgG は FcRN を介した能動輸送系によって高分子蛋白を胎児に届ける。母胎へのストレスによって胎盤が傷害を受けると、抗原透過性が亢進（Leak）する。また、その際に胎盤が傷害を受けて alarmin を産生放出した場合にのみ、経胎盤感作が誘導され、抗原特異的な Th2 型免疫応答が惹起される。

本研究によって経胎盤感作の機序、特にどの様

な食物抗原が合胞体栄養膜細胞を透過しやすいのか、どのような因子がこの透過性に関与しているかが同定されると、将来的に経胎盤感作を抑制する食品の開発や妊娠中の栄養法に関して臨床的に極めて重要な示唆が得られる可能性がある。

また、経胎盤的な能動輸送（FcRN を介する）に関わる食物抗原特異的な IgG 抗体の臨床的な役割が明らかになる可能性がある。現在、食物抗原に対する IgG 抗体の臨床的な意義は殆ど完全に否定されている（日本アレルギー学会 H27. 2. 25 お知らせ 参照のこと）。その一方で、経胎盤感作という視点で食物抗原特異的な IgG 抗体の意義を検討した論文は全く存在しない。分子量が大きい分子ほど抗原決定基が多く、免疫原性が高いと考えられており、胎内感作の中心は能動輸送によって胎児に届けられる抗原である可能性が高いと想定している。

## 結果と考察

上記研究については現在も進行中である。

## 今後の研究活動について

動物実験では、妊娠母体に OVA を経口投与し、かつ PolyI:C の静注を行って、仔マウスの脾細胞

を用いて OVA 抗原特異的な免疫応答を検討する予定である。

獲得免疫系の免疫記憶は生涯にわたって継続することから、経胎盤感作のメカニズムの解明は、新生児期のアレルギー疾患だけでなく、その後の獲得免疫応答への介入の第一歩となる可能性のある研究であると考えている。研究を更に推進してゆきたい。

## 参考文献

- 1) Suzuki H, Tsutsumi Y, Matsumoto K, et al. Cord blood eosinophilia precedes neonatal onset of food-protein-induced enterocolitis syndrome (FPIES). Allergol Int 2021;70:262-5.
- 2) Motomura K, Okada N, Morita H, Hara M, Tamari M, Orimo K, Matsuda G, Imadome KI, Matsuda A, Nagamatsu T, Fujieda M, Sago H, Saito H, Matsumoto K. A Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) inhibitor, Y-27632, enhances adhesion, viability and differentiation of human term placenta-derived trophoblasts in vitro. PLoS One. 2017 May 19;12(5):e0177994.