

ヒト子宮脱落膜マスト細胞の表現系解析および培養系の確立 Characterization of human decidual mast cells and establishment of a culture system

松野孝幸^{1), 2)}, 豊島翔太^{1), 3), 4)}, 坂本朋美^{1), 3), 4)}, 柏倉淳一⁵⁾, 松田彰⁶⁾, 渡部保男⁶⁾, 東裕福²⁾, 川名 敬²⁾, 山本樹生²⁾, 岡山吉道^{1), 3), 4)}

Takayuki MATSUNO^{1), 2)}, Shota TOYOSHIMA^{1), 3), 4)}, Tomomi SAKAMOTO-SASAKI⁵⁾, Jun-ichi KASHIWAKURA⁵⁾, Akira MATSUDA²⁾, Yasuo WATANABE²⁾, Hiromitsu AZUMA⁵⁾, Kei KAWANA²⁾, Tatsuo YAMAMOTO²⁾, Yoshimichi OKAYAMA^{1), 3), 4)}

¹⁾日本大学医学部 免疫・アレルギー学プロジェクトチーム、²⁾日本大学医学部 外科系産婦人科、³⁾日本大学医学部 医学教育センター、⁴⁾日本大学医学部附属板橋病院 アレルギーセンター、⁵⁾北海道大学大学院 薬学研究院衛生化学研究室、⁶⁾順天堂大学 眼科

[要旨]

子宮脱落膜において、マスト細胞は母体側に局在していた。子宮脱落膜から単離直後の脱落膜マスト細胞および培養脱落膜マスト細胞は、マスト細胞の表面分子マーカーである FcεRI と Kit を発現していた。また、その細胞内には、Tryptase および Chymase を発現していた。さらに、IgE 依存性の刺激で単離直後および培養脱落膜マスト細胞からの脱顆粒も観察された。したがって、培養脱落膜マスト細胞は、子宮脱落膜に局在するマスト細胞の機能および性質を検証するための有益なツールとなることが示唆された。

[背景]

母体にとって胎児は、父親由来の抗原も有しており semi-allograft であるが免疫寛容が成立している。^{1, 2)} 妊娠成立の過程で形成される脱落膜には、ナチュラルキラー細胞や T 細胞が局在し、妊娠過程において、胎児への免疫寛容成立に重要な役割を果たしていると考えられている。^{1, 2)} IgE 依存性アレルギー疾患の責任細胞であるマスト細胞も子宮脱落膜で観察されている³⁾。マウスを用いた研究では、子宮マスト細胞は着床・妊娠維持および分娩に関与していることが示唆されているが、ヒトの子宮マスト細胞の妊娠過程における役割については不明な点が多い。

[目的]

子宮脱落膜におけるマスト細胞の表現系を明らかにし、機能を解析するための培養系の確立を行うことを目的とした。

[対象及び方法]

(1) 倫理的考慮

生命倫理に関しては、日本大学医学部倫理委員会および臨床研究委員会に研究倫理および臨床研究審査申請書を提出し、当委員会の承認を得ている(RK-150609-16)。

(2) 対象

子宮脱落膜は、人工妊娠中絶(妊娠 6~10 週)で子宮内容除去術を受けた患者より得た。

(3) 細胞単離

採取した脱落膜を細切し、1.5 mg/mL の Collagenase Type 1、0.75 mg/mL の Hyaluronidase で、37°C で 30 分間酵素処理後、Percoll を用いて比重遠心を行い、マスト細胞を分離した。分離したヒト脱落膜マスト細胞を SCF と IL-6 を含むメチルセルロース培地で培養した。

(4) フローサイトメーター解析

単離した脱落膜マスト細胞をマスト細胞のマーカーである FcεRIα、Kit、tryptase、chymase に対する抗体で染色し、発現を解析した。

(5) 蛍光免疫染色

ヒト妊娠初期脱落膜組織を tryptase で蛍光免疫染色を行った。

(6) ヒスタミン遊離試験

分離直後および培養脱落膜マスト細胞のヒスタミン遊離能を EIA 法で検討した。

(7) 統計解析

in vitro の実験データの 2 群間の統計学的解析は、Mann-Whitney U test を用いた。3 群以上の統計解析は、One-way ANOVA と Dunnett's test を用いた。p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意な差が認められると判断した。統計学的解析は、GraphPad Prism 7 (MDF, Tokyo, Japan)を使用した。

[結果]

ヒト妊娠脱落膜組織において tryptase 陽性細胞は、主に母体面側に局在していた。フローサイトメトリー解析の結果、妊娠脱落膜マスト細胞は FcεRI⁺ Kit⁺ tryptase^{high} chymase^{low} であった。分離した脱落膜マスト細胞を SCF と IL-6 を含むメチルセルロ

一ス培地で培養すると約 12 週間後には、ほぼ 100%の純度となった。分離直後および培養脱落膜マスト細胞は $Fc\epsilon RI$ の架橋刺激でヒスタミンを遊離した (図 1)。

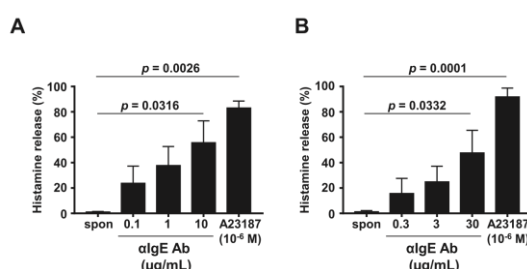


図1. IgE依存性刺激による脱落膜マスト細胞のヒスタミン遊離
(A) 分離直後 (B) 培養脱落膜マスト細胞

[考察]

ヒト妊娠脱落膜の母体側にマスト細胞は存在しており、妊娠初期において妊娠の維持や胎児に対する寛容に役割を有していることが考えられた。その妊娠脱落膜マスト細胞は、tryptase および chymase を発現していたことから、粘膜結合織型マスト細胞 (MC_{TC}) であると考えられる。さらに、細胞表面に機能を持った $Fc\epsilon RI$ を発現しており、IgE 依存性の刺激により活性化されることが示唆された。妊娠と IgE との関連は不明であるが、結合組織型のマスト細胞は IgE 非依存的に活性化できることから、脱落膜マスト細胞は、妊娠初期において IgE 非依存的な刺激によって活性化し、妊娠維持や寛容に寄与していることが示唆された。

[結論]

ヒト妊娠脱落膜にマスト細胞は存在していた。その脱落膜から細胞を単離し、培養することが可能である。培養によっても、マスト細胞の性質と機能を維持していた。⁴⁾

[参考文献]

- ¹⁾ Le bouteiller P, Bensussan A: Up-and-down immunity of pregnancy in humans. *F1000Res*. 2017; 6: 1216.
- ²⁾ Ghaebi M, Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Jadidi-Niaragh F, Ahmadi M, Yousefi M: Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. *Biomed Pharmacother*. 2017; 88: 61-73.
- ³⁾ Needham K, Fadia M, Dahlstrom JE, Harrington K, Shadbolt B, Robson SJ: Significance of mast cell distribution in placental tissue and membranes in spontaneous preterm birth. *J Inflamm Res*. 2016; 9: 141-145.

⁴⁾ Matsuno T, Toyoshima S, Sakamoto-Sasaki T, Kashiwakura JI, Matsuda A, Watanabe Y, Azuma H, Kawana K, Yamamoto T, Okayama Y: Characterization of Human Decidual Mast Cells and Establishment of a Culture System. *Allergol Int.* 2018; 67S: S18-S24.