

妊娠における補体 iC3b の新たな胎仔免疫寛容への効果

中村 圭吾¹⁾, 草間 和哉¹⁾, 白 汝嵐¹⁾, 須田 義人²⁾, 今川 和彦¹⁾

1) 東京大学大学院農学生命科学研究科実験資源動物科学教室

2) 宮城大学食産業学部動物遺伝育種学教室

はじめに

胎児や胎盤は父方由来の遺伝子をもつため、本来ならば母体にとって異物として認識され、母体免疫系によって排除される。そのため、胎盤形成やその後の妊娠維持には、母体の胎児に対する免疫寛容システムが必要となる [1]。この半同種異である胎児や胎盤を保護する母体免疫系の詳細を明らかにするため、多くの研究が行われてきた。その結果、さまざまな免疫細胞の存在や遺伝子発現が明らかにされてきたが、依然として不明な点が多い [2-8]。また、免疫系には自然免疫と獲得免疫が存在するが、これまでの母体免疫系に関連する研究は、抗原が体内に侵入してから特異的な免疫細胞を産生する時間、いわゆる学習時間を必要とする獲得免疫に注目したものが多く、一方、自然免疫は、獲得免疫の起動に必須であるにもかかわらず、妊娠の免疫では、獲得免疫ほど重要視されてこなかった。したがって、胎盤形成期における自然免疫の存在や機能を明らかにすることは、複雑な母体免疫系の理解につながる。

補体系とは自然免疫を担う主要な免疫系であり、30種類以上の主要なタンパク質分子から構成される。この補体系を活性化するには、古典経路、副経路、レクチン経路と呼ばれる3つの生化学的プロセスがある [9]。3つの経路の活性化方法はそれぞれ異なるが、すべての経路は活性化されると補体第3成分 (C3) の分解につながる [10]。C3とは補体系のなかで最も重要な因子として知られており、補体経路が活性化されると、C3は補体因子 B (CFB) と補体因子 D (CFD) と複合体を形成することで新たに C3b の生成を促進する [11, 12]。その後、生成された C3b は再度 CFB, CFD と複合体を形成し、さらに多くの C3b を生成する。これら C3b が細胞表面上で蓄積されることで、白血球の貪食作用や細胞融解が促進されることが知られている。一方、C3b は補体

因子 I (CFI) とその補酵素である補体受容体様タンパク質 (CRRY) の存在下で、iC3b に転換される [13]。さらに、前眼房において生成・分泌された iC3b が細胞表面上の補体受容体 3 (CR3) と結合することで、炎症作用を抑制する抗炎症性サイトカインの産生につながり、免疫寛容を起こすことが報告されている [14]。これらの知見は、補体系はさまざまな免疫機能を有しており、そのなかには異物排除だけではなく寛容機能もあることを示している。

補体成分は主に肝臓で産生されるが、肝臓以外にも胎盤を含むさまざまな組織で産生されることが知られている [15]。また、マウスの着床期において、C3が栄養膜細胞の脱落膜への浸潤を促進しているとの報告がある [16]。一方、C3や C1q のノックアウトマウスでは、胎盤のラビリンス層が発達不全となる [17, 18]。さらに、正常な胎盤と比べ、子癇前症の患者では C1q と C9が発現していないことが報告されている [19]。これらは、補体系が生体防御だけでなく、胚着床や胎盤形成にも関与していることを示唆している。これまでさまざまな補体系に関する研究が行われてきた一方で、補体系の母体-胎児間における役割、とりわけ胎盤形成期からその後の分娩に至る時期までの役割は、依然として不明な点が多い。

したがって本研究では、はじめに二次元電気泳動法および MALDI-TOF/MS 法を用いて、妊娠中期から後期に発現が変化する獲得免疫以外の免疫関連因子とくに自然免疫に関わる因子を探索し、さらにそれら因子の胎盤形成期から分娩前における役割について検証した。

胎盤形成初期のマウス脱落膜における特異的タンパク質の発現

マウスでは、交配後、膣栓が確認された日を妊娠 1 日とすると、妊娠 4 日の着床を経て、その後、胚・栄養膜細胞との相互作用で子宮内膜細胞は脱落膜化する。さらに、妊娠 9 日から 11 日には栄養膜細胞と脱落膜細胞との間で胎盤形成が始まる。本研究では、二次元電気泳動法を用いて、胎盤形成初期である妊娠 11 日のマウス脱落膜

連絡先：中村 圭吾，東京大学大学院農学生命科学研究科実験資源動物科学教室

〒319-0206 茨城県笠間市安居3145

TEL：03-5841-5382

FAX：03-5841-8180

E-mail：knakam00@yahoo.co.jp

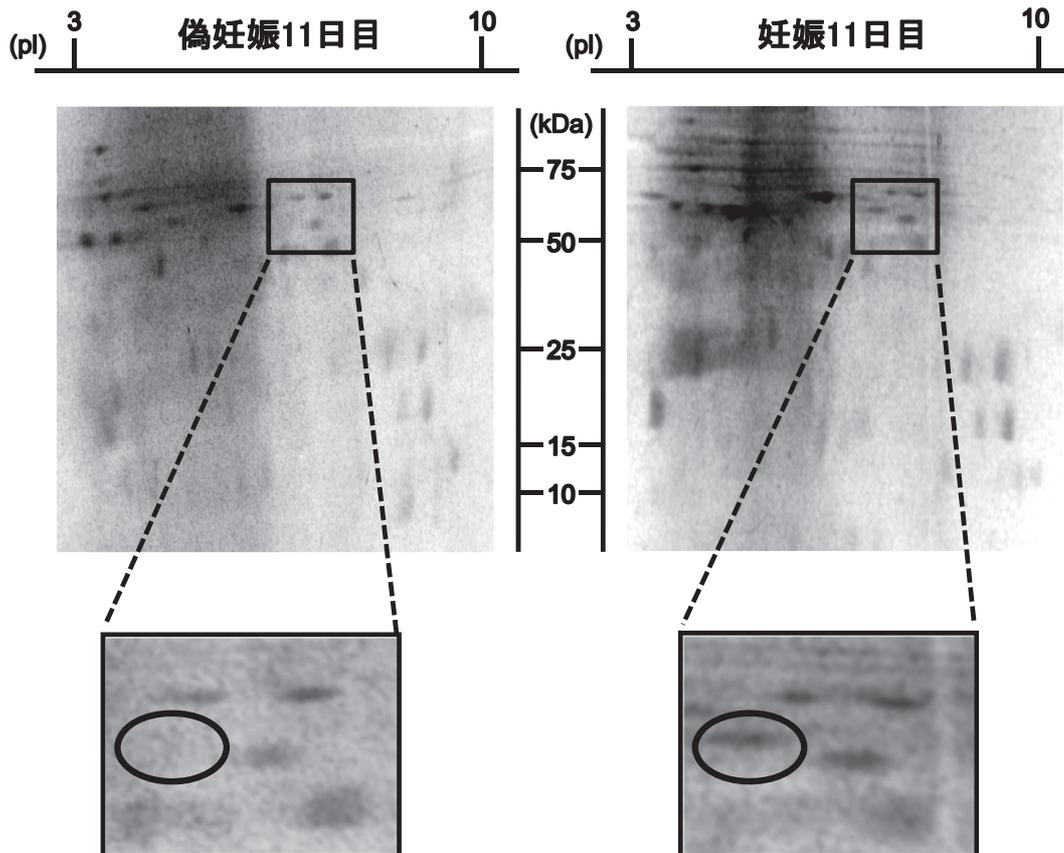


図1 胎盤形成初期のマウス脱着膜における特異的タンパク質の発現
偽妊娠11日の子宮内膜（左）と妊娠11日の脱着膜（右）からそれぞれ抽出したタンパク質を二次元電気泳動法により分離し、Ruby染色を行った。妊娠11日の脱着膜において、偽妊娠11日の子宮内膜に対して、とくに発現変化が大きくみられた丸で囲ったスポットを取り出し、MALDI-TOF/MS解析に供した。

組織のタンパク質を、精管結紮したオスと交配させた偽妊娠11日のマウス子宮内膜組織のタンパク質と比較することで、母体-胎児間での自然免疫に関わる因子を探索した(図1)。偽妊娠に比べて妊娠マウスの脱着膜では、特異的なスポット(タンパク質)が検出された。とくに発現変化が大きくみられた赤丸で囲んだスポットを切り取り、MALDI-TOF/MS解析に供した結果、スポットから45個のペプチドが同定された。さらに、これらペプチドから自然免疫に関わる因子を探索した結果、C3、C3b、iC3bタンパク質が同定された。

マウス妊娠中期から後期の脱着膜および胎盤組織におけるC3遺伝子発現とC3、C3b、iC3bタンパク質発現

マウス胎盤形成期の脱着膜で、自然免疫に関わる因子を探索した結果、妊娠11日の脱着膜から補体C3、C3b、iC3bのペプチドが検出された。この結果から、リアルタイムPCRとウエスタンブロット法を用いて、妊娠中

期11、15日から妊娠後期19日までの脱着膜および胎盤におけるC3遺伝子発現とC3、C3bおよびiC3bタンパク質発現をそれぞれ検討した(図2)。脱着膜組織において、妊娠11日と比べて、15、19日のC3 mRNA発現はそれぞれ約8倍と約9倍高かった。一方、胎盤組織におけるC3 mRNA発現は、各妊娠ステージで変化がみられなかった(図2A)。また、C3、C3b、iC3bタンパク質は、妊娠11日と比べて、妊娠15、19日の脱着膜および妊娠19日の胎盤でそれぞれ発現量が上昇した(図2B、C)。このことから、補体タンパク質C3、C3b、iC3bは、胎盤形成から分娩に向かい、その発現が増加することが判明した。

妊娠後期の脱着膜と胎盤におけるiC3b転換酵素Cfiとその補酵素Crryの発現

C3bタンパク質は、iC3b転換酵素CFIとその補酵素であるCRRYの存在下で、iC3bへと変換される[13]。そこで、妊娠後期の母体-胎児境界面においてiC3bが生

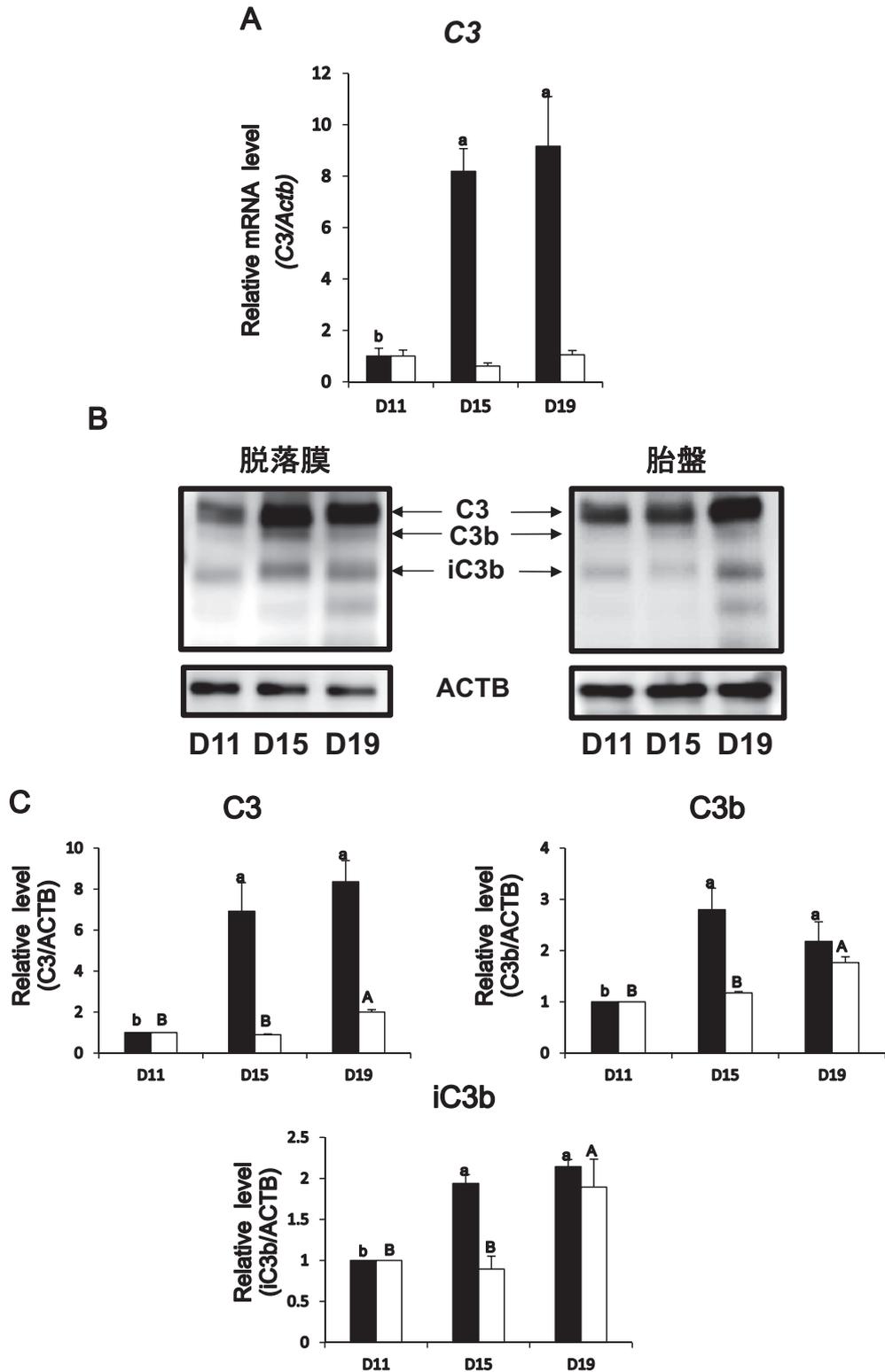


図2 マウス妊娠中期から後期の脱落膜および胎盤組織におけるC3遺伝子発現とC3, C3b, iC3bタンパク質発現 (A) 妊娠11, 15, 19日の脱落膜(黒グラフ)と妊娠11, 15, 19日の胎盤におけるC3の遺伝子発現(リアルタイムPCR). 小文字アルファベットの違いは, 脱落膜における発現量の差を示す. $p < 0.05$ (B) 妊娠11, 15, 19日の脱落膜(左)と妊娠11, 15, 19日の胎盤(右)におけるC3, C3b, iC3bタンパク質発現(ウエスタンブロット). (C) C3, C3b, iC3bタンパク質発現のデンストメトリー解析. 小文字アルファベットの違いは, 脱落膜における発現量の差を示す. 大文字アルファベットの違いは, 胎盤における発現量の差を示す. $p < 0.05$

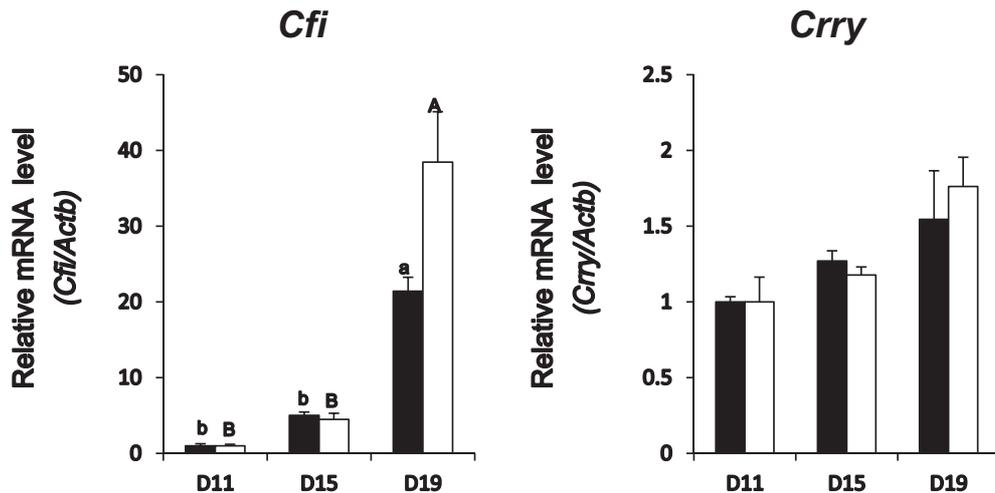


図3 妊娠後期の脱落膜と胎盤におけるiC3b転換酵素*Cfi*とその補酵素*Crry*の発現
 妊娠11, 15, 19日の脱落膜組織(黒グラフ)と妊娠11, 15, 19日の胎盤組織(白グラフ)における*Cfi*と*Crry*
 の遺伝子発現(リアルタイムPCR). 小文字アルファベットの違いは, 脱落膜における発現量の差を示す. 大
 文字アルファベットの違いは, 胎盤における発現量の差を示す. $p < 0.05$

成されているのかを確認するために, リアルタイムPCR法により, 妊娠11, 15, 19日の脱落膜および胎盤における*Cfi*と*Crry*の遺伝子発現を調べた(図3). *Cfi*は, 妊娠19日の脱落膜と胎盤で妊娠11, 15日と比べて, それぞれ約20倍と約40倍高く発現していた(図3). 一方で, *Crry*の発現量は, 妊娠19日の脱落膜組織および胎盤組織で, 上昇する傾向がみられた(図3). これらの結果とiC3bタンパク質発現(図2B, C)から, 妊娠19日の脱落膜と胎盤で, C3bからiC3bへの転換が促進されることが示された.

脱落膜および胎盤におけるiC3b受容体CR3の発現と局在

次に, 母体-胎児の境界面におけるiC3bの作用部位を明らかにするために, 妊娠11, 15, 19日の脱落膜および胎盤におけるiC3b受容体CR3を構成するCD11bとCD18のmRNA発現を検証した(図4A). 胎盤では, *Cd11b*および*Cd18*の発現量は, 妊娠11日では最小であったが, 妊娠19日には約10倍と約3倍の上昇がみられた(図4A). 一方, 脱落膜では, *Cd11b*と*Cd18*のmRNA発現は, 各妊娠ステージで一定の発現量を維持していた(図4A).

マウス胎盤は, 母体側と胎児側の組織が混在するスポンジ層と, 胎児組織から構成されるラビリンス層に分けられる. そこで, 免疫組織染色法により, 妊娠19日の胎盤組織におけるCD11bタンパク質の局在を検証した(図4B). 胎盤組織におけるCD11bの染色箇所と, マ

ウス胎盤スポンジ層の特異的マーカーであるTPBPA[20, 21]の染色箇所が一致したことから, iC3b受容体CR3は, 妊娠19日の胎盤において, スポンジ層に局在していることが明らかとなった(図4B). このことから, 妊娠後期の脱落膜および胎盤において生成されたiC3bは, 母体-胎児の境界面に作用していることが示された.

妊娠中期から後期にかけての抗炎症性サイトカインの発現

ここまでの結果から, 補体C3から生成されたiC3b発現が, 脱落膜および胎盤において, 妊娠中期から後期に向かい上昇していることが明らかとなった. さらに, このiC3bの受容体CR3が妊娠19日の脱落膜および胎盤のスポンジ層に局在していることが判明した. 次に, iC3bが免疫寛容に関与しているか検証するために, 妊娠11, 15, 19日の脱落膜および胎盤における炎症性サイトカイン*Il12*と抗炎症性サイトカイン*Il10*と*Tgfb1*の遺伝子発現を調べた(図5). 炎症性サイトカイン*Il12*を構成するサブユニット*Il12a*と*Il12b*の発現は, 妊娠11日目に比べて, 妊娠15, 19日の脱落膜および胎盤で少なかった(図5). 一方, 抗炎症性サイトカイン*Il10*の発現は, iC3bの発現と同様に妊娠19日の脱落膜および胎盤で上昇し, *Tgfb1*の発現は, 妊娠19日の胎盤で上昇が確認された(図5). これらサイトカインの発現変化は, 妊娠後期においてiC3bが脱落膜や胎盤に局在するCR3に作用した結果, 生じたものと考えられる.

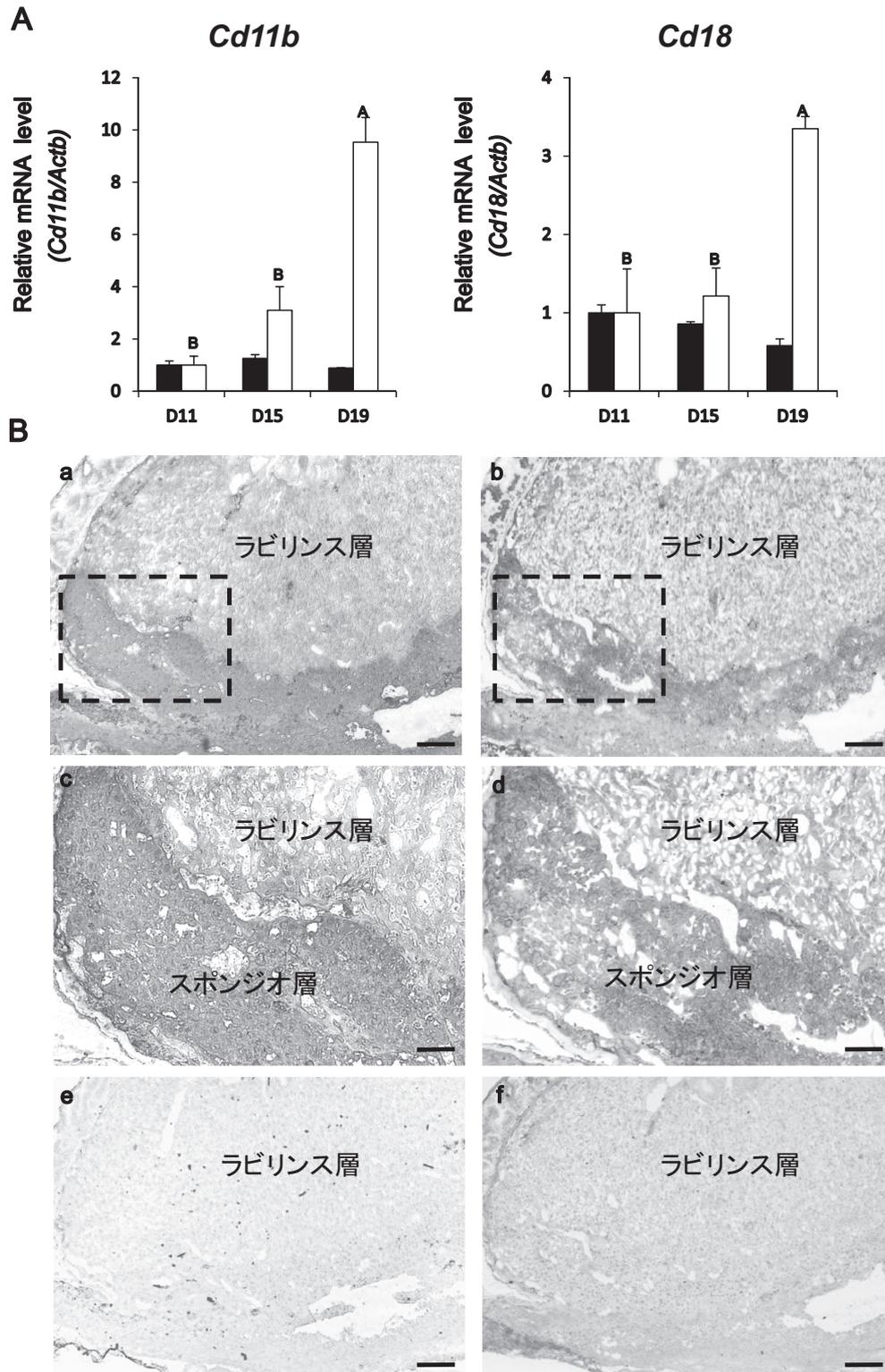


図4 脱着膜および胎盤における iC3b 受容体 CR3 の発現と局在
 (A) マウス妊娠11, 15, 19日の脱着膜 (黒グラフ) および胎盤 (白グラフ) における iC3b 受容体 CR3 を構成する *Cd11b* と *Cd18* の遺伝子発現 (リアルタイム PCR). 大文字アルファベットの違いは、胎盤における発現量の差を示す. $p < 0.05$
 (B) マウス妊娠19日の胎盤組織におけるマウス胎盤のスポンジオ層を特異的に染色する TPBPA (a, c, e) と CD11b (b, d, f) の免疫組織染色像. (a) および (c) の組織切片は、抗 TPBPA 抗体, (b) および (d) の組織切片は、抗 CD11b 抗体でそれぞれ染色された. (c) は (a) そして (d) は (b) の黒枠で囲われた箇所をそれぞれ拡大した. また、ネガティブコントロールとして、(e) と (f) の組織切片は、それぞれ抗 IgG 抗体で染色された. スケールバー=200µm (a, b, c, d), 100µm (e, f)

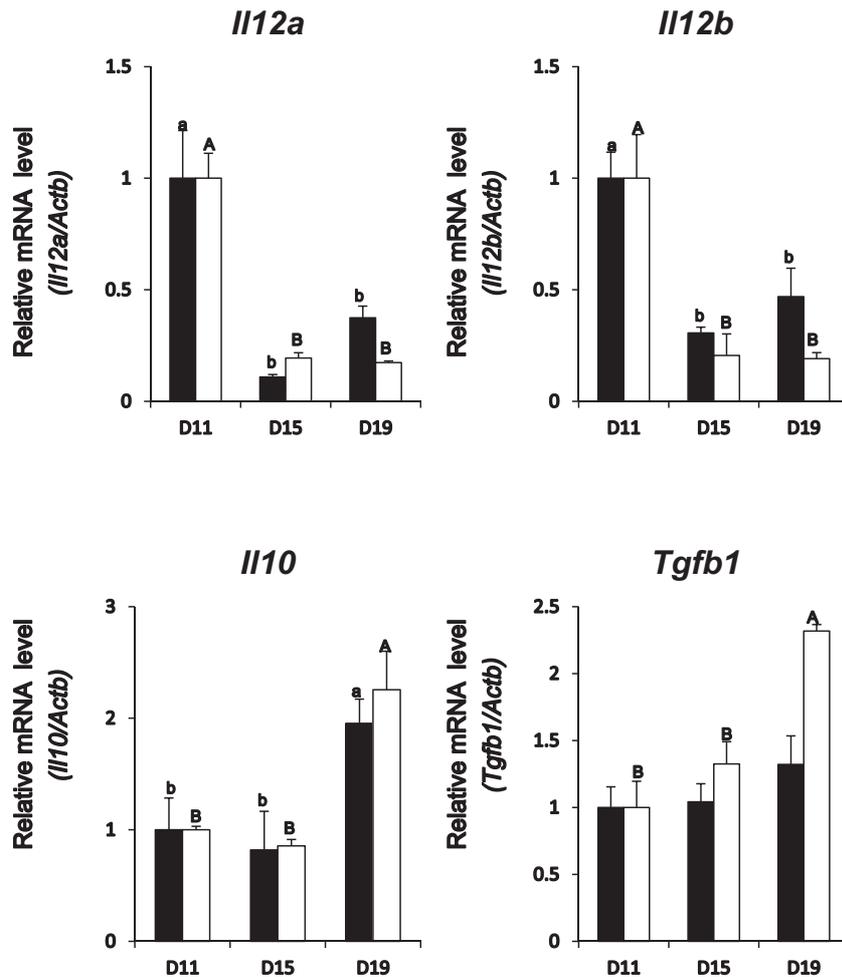


図5 妊娠中期から後期にかけての抗炎症性サイトカインの発現
 マウス妊娠11, 15, 19日の脱着膜（黒グラフ）および胎盤（白グラフ）における炎症性サイトカイン *Il12* を構成するサブユニット *Il12a*, *Il12b* と抗炎症性サイトカイン *Il10* と *Tgfb1* の遺伝子発現（リアルタイムPCR）。小文字アルファベットの違いは、脱着膜における発現量の差を示す。大文字アルファベットの違いは、胎盤における発現量の差を示す。p<0.05

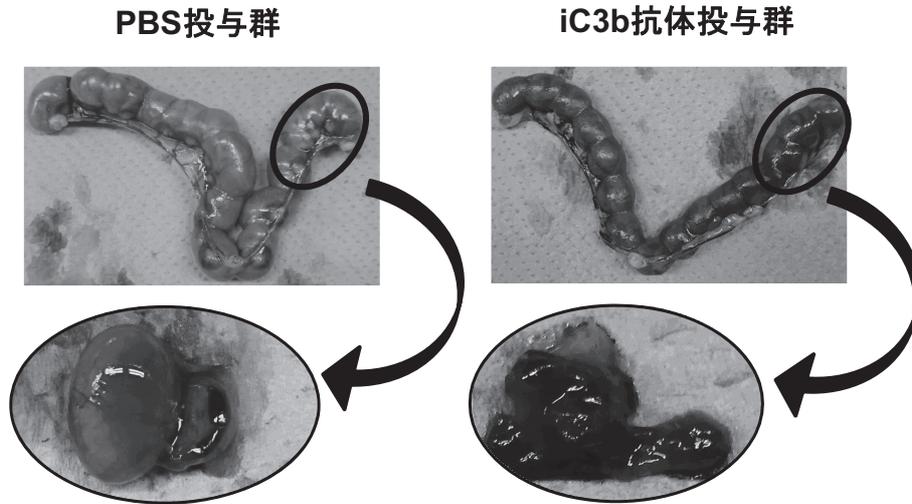
妊娠後期の子宮における抗炎症性サイトカイン発現に対する iC3b の効果

次に、われわれは妊娠後期の子宮における抗炎症性サイトカインの発現に対する iC3b の効果を検証するために、妊娠マウスへの iC3b 中和抗体の投与実験を行った。妊娠15日に iC3b 中和抗体を尾静脈より投与し、妊娠17日に脱着膜/胎盤の形態変化と抗炎症性サイトカインの遺伝子発現を調べた（図6）。脱着膜/胎盤の形態は、PBS 投与群に対して、iC3b 中和抗体投与群で出血、炎症反応がみられた（図6A）。また、PBS 投与群と比べて、抗炎症性サイトカイン *Il10* と *Tgfb1* の遺伝子発現は、iC3b 中和抗体投与群で減少していた。これらの結果から、iC3b が、脱着膜および胎盤で抗炎症性サイトカインの発現を制御していることが示唆された。

おわりに

本研究では、妊娠中期から後期に特徴的な自然免疫に関わる因子を探索し、さらにそれら因子の胎盤形成から分娩期における役割について検証し、補体因子 iC3b の妊娠中期から後期における新たな胎児免疫寛容への役割について明らかにした。iC3b は、自然免疫系のオプソニン作用に関わり、マクロファージなどの白血球の細胞表面に存在する CD11b と CD18 から構成される補体受容体 CR3 に結合し、食作用を促進する因子として知られている [22]。本研究で、脱着膜および胎盤において、*Cd11b* と *Cd18* が高発現しており、CD11b が妊娠19日の胎盤のスポンジ層に局在していることを明らかにした。さらに、抗炎症性サイトカイン *Il10* と *Tgfb1* の発現が、妊娠19日の脱着膜組織と胎盤組織で高い一方で、炎症性サイトカイン *Il12* 発現が、妊娠15, 19日の脱着膜

A



B

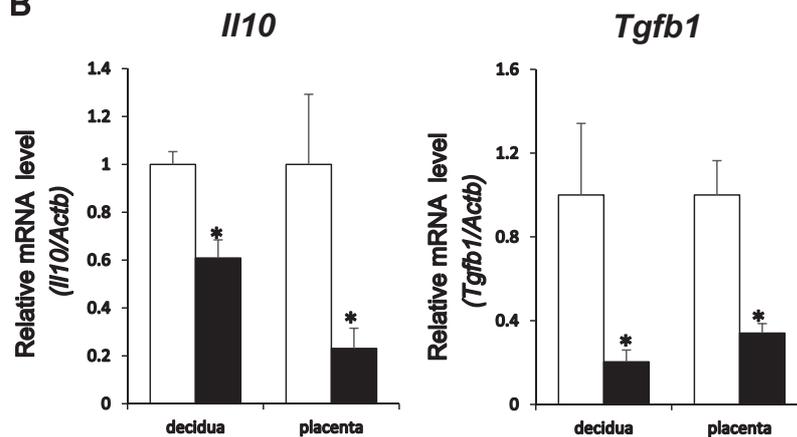


図6 妊娠後期の子宮における抗炎症性サイトカイン発現に対する iC3b の効果
 妊娠15日のマウスに iC3b 中和抗体と尾静脈より投与し、妊娠17日に胎盤の形態変化と脱着膜および胎盤の抗炎症性サイトカイン *Il10* と *Tgfb1* の遺伝子発現を調べた。また、コントロールとして PBS 投与群も設けた。
 (A) 妊娠17日のマウス胎盤の形態変化。(左) PBS 投与群 (右) iC3b 中和抗体投与群
 (B) 妊娠17日マウスの脱着膜および胎盤における PBS 投与群 (白グラフ) と iC3b 中和抗体投与群 (黒グラフ) の *Il10* と *Tgfb1* の遺伝子発現 (リアルタイム PCR)。p<0.05

および胎盤において減少していた。加えて、iC3b 中和抗体の投与は、抗炎症性サイトカインの遺伝子発現を減少させた。これらの知見から、母体-胎児境界面である脱着膜や胎盤のスポンジ層に存在する iC3b が、白血球表面に存在する CR3 に結合することで、抗炎症性サイトカイン産生の促進につながり、その結果として免疫寛容が起こることが示唆された。さらに、免疫寛容が起こっていると考えられている前眼房においても、iC3b と CR3 が結合することで、抗炎症性サイトカイン IL10 と TGFβ の発現が上昇し、一方で、炎症性サイトカイン

IL12 の発現が減少することが報告されており [14]、今回の報告とも一致している。

今回の実験で、妊娠11、15、19日の脱着膜および胎盤で、iC3b の発現に加えて C3b から iC3b への転換に必要な *Cfi* と *Crry* の高発現が明らかになった。その一方で、妊娠11、15、19日の脱着膜と胎盤で、C3b の発現を促進する *Cfb* と *Cfd* の発現は、確認されなかった (結果は省略)。 *Crry* 欠損マウスでの胚の生存率は、補体系の破綻や胎盤の炎症とともに、妊娠10.5日目以降に急激に減少する [23]。CRRY は、CFI とともに C3b から iC3b への

転換を制御しており [24], さらに, 今回の実験で, 妊娠中期から後期にかけて iC3b の発現が上昇したことから, 妊娠中期から分娩に至るには, C3b から iC3b への転換促進が必要であることが示唆された。

これまでの報告から, 補体系の破綻が, 胎盤形成不全を原因とする妊娠合併症に関与していることが明らかとなっている。実際, 早期胎盤剥離の患者では, 補体系 C3 を中心とした機能障害がみつかっている [25]。さらに今回の実験で, iC3b 中和抗体投与群マウスの胎盤形態が, 早期胎盤剥離を発症した患者の胎盤と類似していた点から, iC3b が妊娠中期から後期における胎盤維持に関与していることが考えられた。また, 自己免疫疾患の一種である抗リン脂質抗体症候群の患者では, 胎盤損傷とともに C3b の高発現が確認されている [26]。これらの知見は, 活性型の C3b から抑制型の iC3b への転換制御が, 胎盤形成および機能不全に関わる疾患に対する新たな治療法につながることを示唆している。

以上, 本研究で得られた知見から, マウスは獲得免疫だけではなく補体系などの自然免疫も駆使することで, 妊娠中期から分娩期までの免疫系を維持していることが明らかとなった。さらに, これまでの臨床報告や今回の結果から, 補体 iC3b は胎盤機能不全を原因とする流産や早産に対する新たな治療薬になることが示唆された。

謝 辞

本稿を執筆する機会を与えてくださった日本生殖内分泌学会理事長 緒方 勤先生, 第21回学術集會会長 杉野法広先生, ならびに本誌編集委員の先生方に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J (2006) Immunology of normal pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 11, 279-295.
2. Lanman JT, Herod L (1965) Homograft immunity in pregnancy. The placental transfer of cytotoxic antibody in rabbits. *J Exp Med* 122, 579-586.
3. Anderson DJ, Alexander NJ (1979) Induction of uterine leukocytosis and its effect on pregnancy in rats. *Biol Reprod* 21, 1143-1152.
4. Chaouat G, Menu E, Athanassakis I, Wegmann TG (1988) Maternal T cells regulate placental size and fetal survival. *Reg Immunol* 1, 143-148.
5. Brandon JM (1995) Macrophage distribution in decidual tissue from early implantation to the periparturient period in mice as defined by the macrophage differentiation antigens F4/80, macrophage and the type 3 complement receptor. *J Reprod Fertil* 103, 9-16.
6. Renaud SJ, Sullivan R, Graham CH (2009) Tumour necrosis factor alpha stimulates the production of monocyte chemoattractants by extravillous trophoblast cells via differential activation of MAPK pathways. *Placenta* 30, 313-319.
7. Erlebacher A (2010) Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat Rev Immunol* 13, 23-33.
8. Moffett A, Colucci F (2014) Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 124, 1872-1879.
9. Schmidt BZ, Colten HR (2000) Complement: a critical test of its biological importance. *Immunol Rev* 178, 166-176.
10. Lebel MÈ, Langlois MP, Daudelin JF, Tarrab E, Savard P, Leclerc D, Lamarre A (2017) Complement Component 3 Regulates IFN- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells following TLR7 Activation by a Plant Virus-like Nanoparticle. *J Immunol* 198, 292-299.
11. Sahu A, Lambris JD (2001) Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* 180, 35-48.
12. Nascimento EJ, Silva AM, Cordeiro MT, Brito CA, Gil LH, Braga-Neto U, Marques ET (2009) Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. *PLoS One* 4, e6782.
13. Miao J, Leshner AM, Miwa T, Sato S, Gullipalli D, Song WC (2014) Tissue-specific deletion of Crry from mouse proximal tubular epithelial cells increases susceptibility to renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 86, 726-737.
14. Sohn JH, Bora PS, Suk HJ, Molina H, Kaplan HJ, Bora NS (2003) Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nat Med* 9, 206-212.
15. Bulla R, Bossi F, Agostinis C, Radillo O, Colombo F, De Seta F, Tedesco F (2009) Complement production by trophoblast cells at the fetomaternal interface. *J Reprod Immunol* 82, 119-125.
16. Albieri A, Kipnis T, Bevilacqua E (1999) A possible role for activated complement component 3 in phagocytic activity exhibited by the mouse trophoblast. *Am J Reprod Immunol* 41, 343-352.
17. Chow WN, Lee YL, Wong PC, Chung MK, Lee KF, Yeung WS (2009) Complement 3 deficiency impairs early pregnancy in mice. *Mol Reprod Dev* 76, 647-655.
18. Singh J, Ahmed A, Girardi G (2011) Role of complement component C1q in the onset of preeclampsia in mice. *Hypertension* 58, 716-724.
19. Lokki A, Heikkinen-Eloranta J, Jarva H, Saisto T, Lokki ML, Laivuori H, Meri S (2014) Complement activation and regulation in preeclamptic placenta. *Front Immunol* 5, 312.
20. Cross JC (2005) How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice—a review. *Placenta* 26, Suppl A: S3-9.
21. Davila J, Laws MJ, Kannan A, Li Q, Taylor RN, Bagchi MK, Bagchi IC (2015) Rac1 Regulates Endometrial Secretory Function to Control Placental Development. *PLoS Genet* 11, e1005458.
22. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB (1998) Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* 188, 2313-2320.

23. Xu C, Mao D, Holers VM, Palanca B, Cheng AM, Molina H (2000) Critical role of murine complement regulator cry in fetomaternal tolerance. *Science* 287, 498-501.
24. Li B, Sallee C, Dehoff M, Foley S, Molina H, Holers VM (1993) Mouse Cry/p65. Characterization of monoclonal antibodies and the tissue distribution of a functional homologue of human MCP and DAF. *J Immunol* 151, 4295-4305.
25. Ohkawa R, Ohkawa K, Tosaka N, Ohhashi T, Hatano A, Ohkawa T (1984) Complement system in abnormal pregnancy and chorionic neoplasia: immunotherapy and chemotherapy of chorionic neoplasia. *Adv Exp Med Biol* 176, 111-125.
26. Shamonki JM, Salmon JE, Hyjek E, Baergen RN (2007) Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 196, 167. e1-5.