

ヒト脱落膜マスト細胞の分離と
培養脱落膜マスト細胞の樹立
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系産婦人科学専攻

松野孝幸

修了年 2017 年

指導教員 川名 敬

背景

母体にとって胎児は父親の抗原を有する semi-allograft と考えられるが、胎児は拒絶されず妊娠は維持される。これには胎盤の母体側すなわち脱落膜で免疫寛容をはじめとする妊娠維持機構が成立していると思われる。脱落膜 natural killer (NK) 細胞、マクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞は妊娠で重要な役割を演じていることが示され、子宮マスト細胞も同様にヒトの妊娠や出産に重要な役割をしていることが報告されてきた。マスト細胞は、高親和性 Immunoglobulin (Ig) E 受容体である FcεRI と stem cell factor (SCF) の受容体である Kit を共に発現する細胞として定義される。ヒトマスト細胞はプロテアーゼの違いから MC_T (tryptase のみを含む) と MC_{TC} (tryptase, chymase, carboxypeptidase, cathepsin-G like protease を含む) の 2 つのサブタイプに分類される。粘膜においては MC_T の数が、結合織や粘膜深層においては MC_{TC} の数が多いが、両者が混在している組織が多い。子宮マスト細胞は着床、胎盤形成および子宮収縮に関与していることが、げっ歯類の研究で示唆されているが、ヒト子宮マスト細胞の妊娠における役割に関しては不明な点が多い。

目的

基礎的な検討としてヒト脱落膜組織におけるマスト細胞の分離と特徴を解析し、脱落膜組織より培養マスト細胞を樹立することを目的とした。

対象と方法

1. 妊娠脱落膜由来マスト細胞の分離

ヒト脱落膜由来マスト細胞は、妊娠初期では、妊娠初期の患者が人工妊娠中絶術を施行された際にその組織の一部から採取した。妊娠末期脱落膜由来マスト細胞は帝王切開時、ガーゼで拭って採取した。ヒト脱落膜マスト細胞の組織からの分散方法は、肺マスト細胞の分散方法を改変した。単核細胞層をパーコール比重遠心法にて回収した。回収した単核細胞の一部を取り出し、トリパンブルーで総細胞数をカウントし、キムラ染色でマスト細胞数をカウントした。

2. ヒト脱落膜由来培養マスト細胞の樹立

採取したマスト細胞を SCF および Interleukin (IL)-6、0.1% bovine serum

albumin (BSA)、Insulin-Transferrin-Selenium を含んだ Iscove methylcellulose medium に懸濁し、24 穴プレート用いて 37°C、CO₂ 5% の条件で培養した。2 週間毎に SCF、IL-6、メチルセルロース無血清培地を追加した。6 週目に細胞を 50 ml tube に回収し、液体培地に移して培養継続した。

3. フローサイトメトリーによるマスト細胞の解析

組織から抽出したマスト細胞を検索するため、フローサイトメトリーを用いて検討した。マスト細胞の表面マーカーとして CD117 (Kit) と高親和性 IgE 受容体 α 鎖 (Fc ϵ RI α)、細胞内マーカーとして tryptase と chymase を染色して、フローサイトメーター (Gallios) で検出し、解析ソフト (FlowJo) を用いて解析を行った。

4. 蛍光免疫組織化学染色法

マスト細胞の局在とその数を調べるため、脱落膜組織を蛍光免疫組織化学染色した。新鮮凍結切片を作製し Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、脱落膜であることを確認した後 tryptase の染色を行った。

5. マスト細胞の histamine 遊離実験

細胞は 1 well あたり 5×10^2 個の濃度で 96 穴プレートに加え、抗 IgE 抗体、陽性コントロールとして 10^{-6} M の A23187 を添加し 37°C、30 分間インキュベートした。培養上清中の histamine の測定には enzyme immunoassay (EIA) kit を用いた。histamine 遊離率は、(放出された histamine 量/未刺激のマスト細胞に含まれる総 histamine 量) $\times 100\%$ として算出した。

結果

1. ヒトの脱落膜にマスト細胞は存在している

妊娠初期中絶検体 12 例より組織を採取した。採取した検体の妊娠週数は 6 週から 9 週であった。脱落膜組織は酵素を用いて細胞を分散した後、パーコーンによる比重遠心法で単核細胞層を回収した。脱落膜組織 1 g あたりから分離できた総細胞数は $8.2 \pm 9.3 \times 10^6$ 個であり、平均組織重量は 4.9 ± 2.7 g であった。組織 1 g あたりキムラ染色陽性マスト細胞数は $14.8 \pm 18.3 \times 10^5$ 個であった。総細胞数に対して、キムラ染色陽性細胞%は $16.9 \pm 8.0\%$ であった。蛍光免疫組織化学染色法によって、tryptase は細胞質に認められた。マスト細胞数は約 25 個/400 倍視野であり、母体面に多く存在していた。

2. 脱落膜マスト細胞のフローサイトメーターによる検討

マスト細胞の表面マーカーである CD117 (Kit) と FcεRIα に対する抗体を用いて、脱落膜細胞のフローサイトメーターによる解析を行った。全細胞中の CD117⁺FcεRIα⁺マスト細胞は $0.3 \pm 0.2\%$ (n = 11) であった。コントロールの $0.008 \pm 0.15\%$ に比し、CD117⁺FcεRIα⁺マスト細胞数は有意に高値を示した。

3. 妊娠初期 (6 週~9 週) 脱落膜 CD117⁺FcεRIα⁺マスト細胞における tryptase と chymase の発現 (mean fluorescence intensity: MFI の検討)

脱落膜 CD117⁺FcεRIα⁺マスト細胞のフェノタイプを解析するため、脱落膜 CD117⁺FcεRIα⁺マスト細胞に gate を設定し、CD117⁺FcεRIα⁺マスト細胞における tryptase と chymase の発現を検討した。両者の発現を認めたが tryptase 発現の MFI が 12.7 ± 9.3 に対して、chymase 発現の MFI は 4.5 ± 5.0 であった。tryptase は発現が強度であったが、chymase の発現は軽度であった。

4. 妊娠末期 (38 週) 脱落膜 CD117⁺FcεRIα⁺マスト細胞における tryptase と chymase の発現

初期脱落膜と比べて、chymase の発現 (MFI = 88.8) が強度であった。CD117⁺FcεRIα⁻では、tryptase と chymase の発現を認めたが、IgE 感作で発現低下が認められた。妊娠末期脱落膜では何らかの刺激により FcεRIα が internalize されていて、CD117⁺FcεRIα⁻のマスト細胞が存在することが考えられる。

5. 初期ヒト脱落膜マスト細胞の培養系の樹立

妊娠初期ヒト脱落膜からマスト細胞を分離し、培養することが可能であった。SCF と IL-6 を含むメチルセルロース培地で 6 週間が経過したところで、良好に培養されているものについては SCF、IL-6 添加の Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地に移し、培養を継続した。培養開始後、12 週間目にほぼ 100% の純度のマスト細胞が得られた。これよりヒト脱落膜からマスト細胞を分離し、培養系を樹立することが可能となった。

6. 脱落膜組織マスト細胞の機能の検討

脱落膜分離直後のマスト細胞の機能を検討するため、マスト細胞の IgE 依存性刺激による histamine 遊離を検討した。脱落膜分離直後マスト細胞に抗 IgE 抗体を 0.1-10 μg/ml 添加した後の培養上清中 histamine 濃度を測定した。脱落膜分

離直後のマスト細胞は IgE 依存性の刺激で histamine を遊離した。また、脱落膜組織培養マスト細胞に抗 IgE 抗体を 0.3-30 $\mu\text{g/ml}$ 添加した。脱落膜組織培養マスト細胞も IgE 依存性の刺激で histamine を遊離した。

考察・結論

ヒトの妊娠初期脱落膜のマスト細胞の存在に関して検討したところ、総細胞数に対して、キムラ染色陽性細胞%は $16.9 \pm 8.0\%$ であった。蛍光免疫組織化学染色法によって、tryptase は細胞質に認められた。蛍光免疫組織化学染色により、脱落膜に約 25 個/400 倍視野の tryptase 陽性のマスト細胞が存在することが確認できた。ヒトの妊娠初期脱落膜から酵素的に細胞を分散後、比重遠心法にて単核細胞を分離し、フローサイトメーターで検討すると、全細胞中 $0.3 \pm 0.2\%$ が $\text{CD117}^+\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+$ 細胞であり、フローサイトメーターにおいてもマスト細胞が確認できた。マスト細胞数はフローサイトメーターよりキムラ染色での細胞数が多かった。この相違はキムラ染色では、好塩基球、デブリス、死細胞が染まっていたためと考えられる。

ヒト妊娠初期脱落膜 $\text{CD117}^+\text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^+$ 細胞のプロテアーゼの発現パターンをフローサイトメーターで検討すると、tryptase^{high}chymase^{low} の MC_{TC} タイプであった。一方、38 週の妊娠末期では tryptase^{high}chymase^{high} の MC_{TC} タイプに変化した。ヒト子宮において非妊娠時の tryptase と chymase が同等の発現から、妊娠中に tryptase が優位の発現に変化するとの報告がある。本研究での知見はこれと逆であった。その理由としては、以前の報告では子宮脱落膜のみでなく子宮筋層を含めたマスト細胞を検討しているためと考えられる。また、IgE による histamine の遊離を検討したところ、濃度依存性に histamine の遊離が認められ、脱落膜マスト細胞は培養および分離直後の両方で histamine 産生能があることが確認された。ヒトでは histamine は blastocyte の着床や絨毛の浸潤、増殖、接着因子を発現して胎盤の形成に関与しているとされるので、マスト細胞からの histamine 産生はこれらの機能を担うと推察される。本研究で、妊娠初期脱落膜由来マスト細胞の培養系も確立することができた。脱落膜単核細胞を SCF と IL-6 を含むメチルセルロース培地で 12 週間培養すると、ほぼ 100% の純度のマスト細胞が得られた。脱落膜マスト細胞の長期培養系を樹立できたことから、この培養系の確立により脱落膜マスト細胞の着床や胎盤の形成、早産・陣痛・分娩のメカニズムの解明や解析に役立つと考えられる。