

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04980

研究課題名(和文) 母体、胎児免疫相関から見た妊娠維持機構ならびにその破綻

研究課題名(英文) The mechanisms for maintenance of pregnancy or failure of pregnancy by the view point of feto-maternal immune-interaction

研究代表者

齋藤 滋 (SAITO, Shigeru)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：30175351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎児は、母親にとって半異物のため、本来は拒絶されるが、免疫寛容を誘導する制御性T細胞(Treg)により、妊娠が維持される。

今回の研究で父親抗原特異的な免疫寛容は精漿によりもたらされる事、ヒトの流産で胎児染色体正常例ではeffector Tregの数が減少していたが、父親抗原特異的Tregの割合は変化しなかった。一方、妊娠高血圧腎症ではeffector Treg細胞の減少は軽微であったが、父親抗原を認識すると考えられるクローナルなTregは、著明に減少していた。つまり、流産ではTreg細胞の減少が関与し、妊娠高血圧腎症では父親抗原特異的Tregが減少することが初めて証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでマウスなどの動物実験では、母子間免疫寛容の破綻が流産を起こすことは証明されてきたが、ヒトでこのような事が生じるのかは不明であった。今回の研究成果により、ヒトでも胎児染色体正常流産では父親抗原特異的Treg細胞の減少ではなく、effector Treg細胞の減少が原因である可能性を示唆した。一方、妊娠高血圧腎症では父親抗原特異的Tregの減少が認められた。精漿は父親抗原特異的Tregを誘導する事を、私達はマウスで証明している。同棲期間が短い妊娠、コンドームで避妊しているカップル、初産婦で妊娠高血圧症候群が多い疫学的な事実は、父親抗原特異的Tregの誘導不全という結果をよく証明できる。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T (Treg) cells are necessary for the maintenance of allogenic pregnancy. Treg cells are decreased in miscarriage and preeclampsia. However, the repertoire of effector Treg cells at the feto-maternal interface in human pregnancy remains unknown. Our objective was to study T cell receptor (TCR) repertoires of Treg cells during pregnancy compared to normal and complicated pregnancies such as miscarriage and preeclampsia. The frequency of clonally expanded populations of effector Treg cells increased in decidua of 3rd trimester subjects compared to 1st trimester subjects. Clonally expanded populations of effector Treg cells decreased in preeclampsia compared with that in 3rd trimester normal pregnancy. Failure of clonal expansion of populations of decidual effector Treg cells might be related to the development of preeclampsia, and decreased decidual effector Treg cells might be related to miscarriage.

研究分野：産婦人科学

キーワード：産科学 胎児医学 免疫学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マウスでは allogeneic 妊娠では、父親抗原特異的 Treg が増加すること、また Treg がなければ流産することが知られている。一方、Treg がないマウスの syngeneic 妊娠では流産しないため、Treg は異物である胎児を許容するために必須である事が判明していた。ヒト妊娠では、流産例や妊娠高血圧腎症 (PE) で子宮内もしくは末梢血の Treg が減少する事より、母体免疫寛容の破綻が妊娠合併症を引き起こすことが想定されていたが、父親抗原特異的 Treg の減少によるのか、Treg 細胞数の低下によるものか、全く不明であった。

2. 研究の目的

マウスの系では、父親抗原を認識する T 細胞受容体 (TCR) は同定される。例えば DBA/2 マウスに発現する Mls1a は T 細胞受容体 V_β6 で認識できる。BALB/C × DBA/2 妊娠を用いて、全身臓器や着床局所での父親抗原特異的 Treg の分布を明らかにするとともに、父親抗原特異的 Treg の誘導機序を明らかにする事を第一の目的とした。第二の目的として、流産、PE 症例での末梢血、脱落膜中の Treg を単一分離し、TCR をシーケンスし、同じ TCR を持つ Treg を父親抗原特異的と考え、ヒト妊娠での父親抗原特異的 Treg を末梢血、脱落膜で比較し、かつ流産や PE でその増減を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

アロ妊娠の系として BALB/C × DBA/2、同系妊娠として BALB/C × BALB/C を用い、DBA/2 に発現する Mls1a を認識する T 細胞受容体である TCRV_β6 を有する CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺細胞 (父親抗原特異的 Treg) を Flow cytometry で同定した。また精嚢除去マウス (精漿を欠く)、精管結紮マウス (精子を欠く) を用いて、交配させ、父親抗原特異的 Treg の増減を検討した。

ヒト妊娠で CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}CD45RA⁻ effector Treg 細胞を単一細胞に純化した後に、RT-PCR 法を行ない TCR 鎖をシーケンスし、同一塩基配列を有する細胞をクローン化 Treg とした。なお、ヒトでは TCR 配列は 1×10^8 があるため、同一配列を有する Treg は偶然ではあり得ない。妊娠初期、後期正常妊娠例、胎児染色体正常流産例、胎児染色体異常流産例、PE 例の末梢血、脱落膜中の Treg の TCR 鎖を解析した。

4. 研究成果

マウス妊娠では着床 1 日前に子宮所属リンパ節に父親抗原 Treg が集簇し、これには精漿のブライミングが関与していた。妊娠後から、子宮内で同 Treg 細胞が増加し、妊娠初期で最高値となる一方、所属リンパ節中の同 Treg は妊娠初期が最高値で、妊娠と共に減少した事により、所属リンパ節から妊娠子宮へ同 Treg が移動すると考えられた。

ヒト妊娠例では、妊娠初期の脱落膜にクローン化 Treg が 4.5%認められたが、妊娠末期では 20.9%まで増加した。胎児染色体正常流産では effector Treg が減少したが、クローン化 Treg は減少しなかった。胎児染色体異常流産では免疫学的な変化は認められなかった。一方、PE 症例脱落膜では effector Treg の減少は軽微であったが、クローン化 Treg は 9.3%にまで低下していた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

【齋藤 滋】

- 1) Tsuda S, Saito S(4名中4番目), et al. New paradigm in the role of regulatory T cells during pregnancy. *Front Immunol.* 2019 ;10:573. doi: 10.3389/fimmu.2019.00573.
- 2) Higashisaka K, Saito S(12名中10番目), et al. Neutrophil depletion exacerbates pregnancy complications, including placental damage, induced by silica nanoparticles in mice. *Front Immunol.* 2018;9:1850. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01850>. eCollection 2018.
- 3) Ono Y, Saito S(14名中14番目), et al. CD11c+ M1-like macrophages (M₁s) but not CD206+ M2-like M₂ are involved in folliculogenesis in mice ovary. *Sci Rep.* 2018;8:8171. doi:10.1038/s41598-018-25837-3.
- 4) Takahashi H, Saito S(10名中9番目), Takizawa T(10名中10番目) et al. Endogenous and exogenous miR-520c-3p modulates CD44-mediated extravillous trophoblast invasion. *Placenta.* 2017;50:25-31. doi: 10.1016/j.placenta.
- 5) Saito S(5名中1番目), et al. A new era in reproductive medicine: consequences of third-party oocyte donation for maternal and fetal health. *Semin Immunol.* 2016;38:687-697. DOI 10.1007/s00281-016-0577-x
- 6) Ahmadabad HN, Saito S(4名中3番目), et al. Decidual soluble factors, through modulation of dendritic cells functions, determine the immune response patterns at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol.* 2016;114:10-17. doi: 10.1016/j.jri.2016.01.001
- 7) Saito S(5名中1番目), et al. Role of paternal antigen-specific Treg cells in successful implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75:310-316. doi: 10.1111/aji.12469
- 8) Nakabayashi Y, Saito S(10名中10番目), et al. Impairment of the accumulation of decidual T cells, NK cells, and monocytes, and the poor vascular remodeling of spiral arteries, were observed in oocyte donation cases, regardless of the presence or absence of preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2016;114: 65-74. doi: 10.1016/j.jri.2015.07.005.
- 9) Toldi G, Saito S(9名中8番目), et al. Prevalence of Regulatory T-Cell Subtypes in Preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 74:110-115, 2015. doi: 10.1111/aji.12380.
- 10) Shima T, Saito S(7名中7番目), et al. Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy. *J Reprod Immunol.* 108:72-82, 2015. doi: 10.1016/j.jri.2015.02.005.
- 11) Inada K, Saito S(5名中5番目), et al. Helios-positive functional regulatory T cells are decreased in decidua of miscarriage cases with normal fetal chromosomal content. *J Reprod Immunol.*107:10-19, 2015. DOI: 10.1016/j.jri.2014.09.053

【村口 篤】

- 12) Tsuda S, Muraguchi A(9名中7番目), Saito S(9名中9番目), et al. Clonally expanded decidual effector regulatory T cells increase in late gestation of normal pregnancy, but not in preeclampsia, in humans. *Front Immunol.* 2018; 9: 1934. doi:10.3389/fimmu.2018.01934. eCollection 2018.

【二階堂 敏雄】

- 13) Han L, Nikaido T(8名中8番目), et al. Differential Response of Immortalized Human Amnion Mesenchymal and Epithelial Cells against Oxidative Stress. *Free Radic Biol Med.* 2019; 135: 79-86. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.017.

【瀧澤 俊広】

- 14) Ishida Y, Saito S(11名中10番目), Takizawa T(11名中11番目), et al. Maternal peripheral blood natural killer cells incorporate placenta-associated microRNAs during pregnancy. *Int J Mol Med.*2015; 35: 1511-1524. 10.3892/ijmm.2015.2157.
- 15) Ishikawa T, Takizawa T(8名中8番目), et al. Fc gamma receptor IIb participates in maternal IgG trafficking of human placental endothelial cells. *Int J Mol Med.*2015; 35: 1273-1289. 10.3892/ijmm.2015.2141.

〔学会発表〕(計 20 件)

【齋藤 滋】

- 1) Saito S. Clonal populations of Treg cells decrease in preeclampsia but not in miscarriage. 11th International Workshop Reproductive Immunology, Immunological Tolerance and Immunology of Preeclampsia; 2018.
- 2) Sayaka Tsuda, Hiroyuki Kishi, Xiaoxin Zhang, Tomoko Shima, Hiroshi Hamana, Akemi Ushijima, Atsushi Muraguchi, Shigeru Saito. Clonally expanded decidual effector Treg cells increase in late gestation of normal pregnancy, but not in preeclampsia in human. American-Sino Joint Meeting of Reproductive Immunology 2018. 2018.
- 3) 齋藤 滋: 妊娠高血圧症候群の最近の話題. 第 31 回富山県母性衛生学会総会・学術集会. 2019.
- 4) 齋藤 滋: WoCBA (Women of Child-Bearing Age) 患者の現状と治療課題 ~免疫からみた妊娠維持機構とその破綻~. 第 28 回日本リウマチ学会北海道・東北支部学術集会. 2018.
- 5) 齋藤 滋: WoCBA (Women of Child-Bearing Age) 患者の現状と治療課題 ~免疫からみた妊娠維持機構とその破綻~. 第 46 回日本臨床免疫学会総会. 2018.
- 6) 齋藤 滋: 妊婦の腸内細菌が出産、出生時に与える影響. 第 7 回日本 DOHaD 学会学術集会. 2018.
- 7) 齋藤 滋: 増える! 腸の現代病 ~炎症性腸疾患 (IBD) 合併妊娠の管理の実際~. 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会 ランチョンセミナー 23. 2018.
- 8) 津田 さやか, 他. ヒトの妊娠高血圧腎症と胎児染色体正常流産症例では脱落膜 effector 制御性 T 細胞のクローナリティと数が異なる. 第 39 回日本妊娠高血圧学会総会・学術講演会. 2018.
- 9) 津田 さやか, 他. 制御性 T 細胞の single-cell TCR レポートリー解析により示唆された流産と妊娠高血圧腎症の免疫学的病態の相違. 第 33 回日本生殖免疫学会総会・学術集会; 2018.
- 10) Saito S. Paternal antigen specific Treg cells play important roles for successful implantation and maintenance of pregnancy. 2017 The 5th National Summit of Reproductive Immunology/The 2nd PuJiang International Summit of Reproductive Immunology; 2017.
- 11) Saito S. Induction of tolerance to paternal antigens play important roles for implantation and maintenance of pregnancy. Tarbiat Modares University; 2017.
- 12) Saito S. Paternal antigen specific Treg cells play important roles for successful implantation and maintenance of pregnancy. 7th Yazd International Congress and Student Award in Reproductive Medicine; 2017.
- 13) Saito S. The role of regulatory T cells for pregnancy. The 3rd Annual meeting of Korean Society of Reproductive Immunology (KSRI); 2016.
- 14) Saito S. Pathophysiology of preeclampsia from the view point of immunological maladaptation. The 19th Congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies (FAOPS); 2016.
- 15) Saito S. Fetomaternal and peripheral immune status in preeclamptic and normotensive oocyte donation cases. 20th World Congress meeting of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP); 2016.
- 16) Saito S. Role of paternal antigens-specific Treg cells in successful implantation and pregnancy. Reproductive Immunology Satellite Meeting 2016 ; 2016.

【瀧澤 俊広】

- 17) 小古山学, 他. 妊娠初期流産における末梢血および脱落膜 NK 細胞の遺伝子発現解析: mRNA-miRNA 解析. 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会. 2018
- 18) Toshihiro Takizawa. Placenta-specific microRNAs: expression profile and functional implication. :2nd Asia Pacific Reproductive Immunology Forum. 2018
- 19) Toshihiro Takizawa. Placental exosomes in pregnancy: past and present. 2nd Asia Pacific Reproductive Immunology Forum. 2018.
- 20) Chaw Kyi Tha Thu, 他. Glucose transporter type1 (Slc2a1) is expressed in uterine natural killer cells of the mouse placenta. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2017

〔図書〕(計 2 件)

- 1) Saito S, et al. Immunological maladaptation. Springer 2018. (Edited by Saito S. Preeclampsia; Part IV; Chapter 4:65-84).
- 2) 瀧澤俊広、化学同人、(章) 4-1 受精、妊娠、出産におけるエクソソーム [落谷孝広, 吉岡祐亮 (監修). 医療を変えるエクソソーム], 2018 年、pp 92 - 98

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）
取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：村口 篤
ローマ字氏名：MURAGUCHI, Atsushi
所属研究機関名：富山大学
部局名：大学院医学薬学研究部（医学）
職名：特別研究教授
研究者番号（8桁）：20174287

研究分担者氏名：二階堂 敏雄
ローマ字氏名：NIKAIDOU, Toshio
所属研究機関名：富山大学
部局名：事務局
職名：理事・副学長
研究者番号（8桁）：50180568

研究分担者氏名：瀧澤 俊広
ローマ字氏名：TAKIZAWA, Toshihiro
所属研究機関名：日本医科大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：90271220

(2)研究協力者

研究協力者氏名：津田 さやか
ローマ字氏名：TSUDA, Sayaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。