

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09731

研究課題名(和文) 自然免疫からみた早産発来機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of preterm birth from the view point of innate immunity

研究代表者

島 義雄 (Shima, Yoshio)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：70714765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：早産には子宮内感染が関与しているが、妊娠週数に反比例して絨毛膜羊膜炎の頻度が減少するので、多くの早産(とくに34-36週)は原因不明に分類されることになる。研究では子宮内感染によらない早産の解明を目的にフローサイトメトリー法による胎盤組織内の免疫細胞群の量的・質的な分析を行った。早産の対照には予定帝王切開事例を設けた。結果、早産胎盤ではTh1型の樹状細胞が増加し、絨毛膜羊膜炎ありの場合はNK細胞、なしではNKT細胞が有意となる集積パターンの差を観察した。CD8陽性およびCD4陽性T細胞には有意差はなかった。以上より、NKT細胞を中心とする自然免疫反応が原因不明の早産発来に関与している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of preterm birth without verified intrauterine infection was investigated, by analyzing profiles of immune cells in the placental tissue obtained from preterm birth according to the presence of histological placental inflammation. Activated dendritic cells accumulated in preterm placenta compared to those of term without in-labor. Predominant accumulation of NKT cells was observed in preterm placenta with histological inflammation, while that of NK cells in preterm placenta of absent histological inflammation. The accumulation of CD 8 positive and CD 4 positive T-cells were not significantly different in preterm placenta regardless of histological inflammation. We concluded that innate immunity, interaction between dendritic and NKT cells, could stimulate the onset of preterm labor in the absence of evident infection.

研究分野：胎児・新生児医学

キーワード：周産期 早産 絨毛膜羊膜炎 自然免疫

### 1. 研究開始当初の背景

わが国を含めた先進諸国では、社会構造の変化に伴う少子化にもかかわらず周産期死亡の最大要因である早産（妊娠 37 週未満の分娩）が増加しており、その発症時週数と反比例して子宮内感染が原因である確率が高くなるという事実が確認されている。しかし、実際には妊娠週数が進むほど事例数は増加するので、子宮内感染を明らかにすることができず原因不明と分類せざるを得ない場合が多いのが実情となっている。事実ウイルス、細菌などの病原微生物は早産の原因として重要であり、特に好中球浸潤を主体とする絨毛膜羊膜炎(chorioamnionitis: CAM)は早産に大きく関わると考えられているが、これらの感染を伴わない、いわゆる“無菌性炎症”という概念が生殖免疫の分野にも広まりつつあり、早産をはじめとして様々な産科合併症を引き起こし得ることが指摘されている。

これまで早産に関する研究は、多くの医療資源投入が必要となる早期早産に注目され、予後の良い妊娠 34 週以降で分娩に至る後期早産に対する関心は低かった。しかしながら近年、これら後期早産出生児においても少なからず認められる呼吸障害や脳障害、代謝異常などのリスクが高いことが指摘されるようになり、この後期早産の発症メカニズム管理、予防法の構築が求められる。

### 2. 研究の目的

妊娠は母体にとって異系抗原である胎児を許容する特殊環境であり、その破綻が種々の周産期異常の原因と考える多くの研究成果で集積されてきた。本研究では、早産の発来も母体・胎児間での免疫寛容の破綻という視点で捉え、両者の接点である胎盤組織における免疫担当細胞群を量的・質的に分析することで、子宮内感染の関与が証明できないゆえに原因不明とされてきた早産事例の機序解明を試みた。

### 3. 研究の方法

妊娠 32 週以後のヒト早産胎盤から組織片を採取、蛍光色素抗体で表面標識したのちにフローサイトメトリーを用いて細胞分離とポピュレーション解析を実施、とくに自然免疫に関与する細胞群に着目して子宮内感染の組織学的傍証である絨毛膜羊膜炎の有無によって比較検討を行った。なお、陣痛のない予定帝王切開から得られた胎盤組織を早産群の対照として設けた。さらにこれら細胞群の活性化状態の検索や、各細胞群の分離・共培養、また lipopolysaccharide (LPS) との共培養をおこない、その機能解析を行う。おもに以下の項目について検討を行った。

脱落膜組織中における免疫細胞群の分

布

上記細胞群の活性化状態の検索( CD86、CD69 などの表出  
これら細胞群の分離培養、共培養実験を用いた機能解析

### 4. 研究成果

Th1 誘導型 DEC-205<sup>+</sup> 樹状細胞 (dendritic cells: DC) の存在  
陣痛のない予定帝王切開で得られた脱落膜に比して、後期早産脱落膜では Th1 誘導型 DCs である DEC-205<sup>+</sup> DCs の有為な集積が認められた。

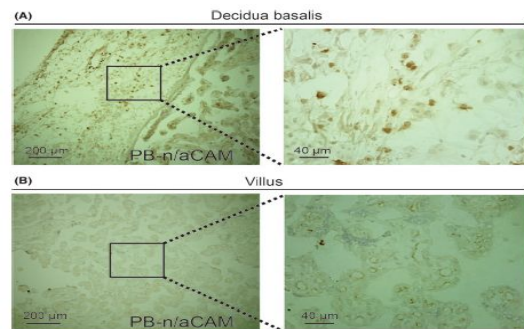


図 1 胎盤中の DEC-205<sup>+</sup> DCs の分布。(A) 脱落膜、(B) 絨毛膜。

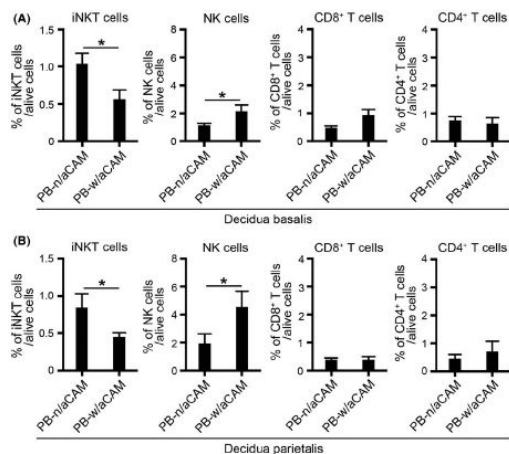


図 2 CAM の有無による、脱落膜中の免疫細胞群分布の違い。(A) 基底脱落膜、(B) 壁側脱落膜。

#### iNKT 細胞と NK 細胞の分布

CAM を伴わない後期早産から得られた脱落膜では、上記 DEC-205<sup>+</sup> DCs の他に invariant natural killer T (iNKT) 細胞の有為な集積を、また CAM を伴う場合は natural killer (NK) 細胞の有為な集積を認めた。

これらの結果は、早産の胎盤組織には Th1 型の樹状細胞が増加していることに加え

自然免疫系のNK細胞とNKT細胞は絨毛膜羊膜炎がある場合は前者、認めない場合は後者が有意であるという異なる集積パターンを示すことが明らかにされた。また、獲得免疫系の役割を果たすCD8<sup>+</sup>T細胞およびCD4<sup>+</sup>T細胞は、絨毛膜羊膜炎の有無による差異が認められなかった。以上より、これまで原因不明とされてきた子宮内感染によらない後期早産では、樹状細胞とNKT細胞がなんらかの理由により発動機転となって陣痛が導かれている可能性が示唆される結果が得られた。

CAMの有無による、DEC-205<sup>+</sup>DCsの機能の違い

上記によりCAMの有無によりiNKT細胞、NK細胞の分布に差があることが指摘されたが、我々はこの原因は、CAMの有無によりDEC-205<sup>+</sup>DCsの機能が異なるのではないかと仮定した。これを検証するため、脱落膜中の細胞を、磁気ビーズ法を用いてDEC-205<sup>+</sup>DCsを分離、これを別に分離しcarboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)でラベリングしたiNKT細胞、NK細胞と共培養を行い、その増殖能を調べた。

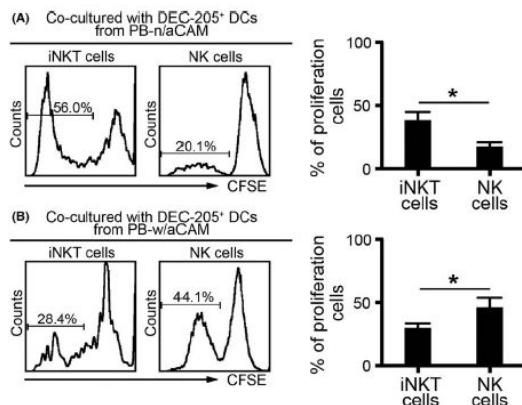


図3 DEC-205<sup>+</sup>DCsによる、iNKT細胞とNK細胞の増殖能。(A)CAM陰性から得られたDEC-205<sup>+</sup>DCsとの共培養、(B)CAM陽性から得られたDEC-205<sup>+</sup>DCsとの共培養。

この実験により、CAM陰性の脱落膜から得られた樹状細胞はiNKT細胞を有為に、またCAM陽性の脱落膜から得られた樹状細胞はNK細胞を有為に増殖させることが示された。

さらにDCs上の共刺激因子CD86の発現を検索したところ、CAM陰性から得られたDEC-205<sup>+</sup>DCsはCAM陽性からのものより高発現であり、LPS刺激に対しても反応性が高かった。

以上の結果より、本研究は自然免疫担当細胞であるiNKT細胞と、活性化し反応性が高いDEC-205<sup>+</sup>DCsが相互作用を示し、CAMを伴わずこれまで原因不明に分類さ

れてきた早産発症に関わっている可能性を示唆するものとなった。さらに本研究ではCAMの有無により樹状細胞の機能に変化があることを示したが、この相違は内因的、外因的入力抗原の相違に起因するのではないかと考え、更なる研究を続けている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Negishi Y, Shima Y, Takeshita T, Takahashi H: Distribution of invariant natural killer T cells and dendritic cells in late preterm birth without acute chorioamnionitis. *Am J Reprod Immunol.* 77: 2017, (10.1111/aji.12658).

Ichikawa, T., Negishi, Y., Shimizu, M., Takeshita, T., Takahashi, H.,  $\alpha$ -galactosylceramide-activated murine NK1.1<sup>+</sup> invariant-NKT cells in the myometrium induce miscarriages in mice. *European J. Immunology*, 46: 1867-1877, 2016.

[学会発表](計5件)

1. Yasuyuki Negishi, Yoshio Shima, Hidemi Takahashi, Toshiyuki Takeshita: Accumulation of dendritic cells and invariant natural killer T cells in the decidua of late preterm birth without acute chorioamnionitis. 37th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Immunology (2017)

2. 島 義雄, 根岸靖幸, 竹下俊行、高橋秀実: 自然免疫から考える後期早産. 第53回日本周産期・新生児医学会(2017)

3. 島 義雄, 根岸靖幸, 竹下俊行、高橋秀実: 自然炎症としての後期早産. 第62回新生児成育医学会(2017)

4. Yasuyuki Negishi, Yoshio Shima, Hidemi Takahashi, Toshiyuki Takeshita: Functional difference between decidual dendritic cells in late preterm birth with and without acute chorioamnionitis. 第25回日本胎盤学会(2017)

5. Yasuyuki Negishi, Tomoko Ichikawa, Yoshio Shima, Toshiyuki Takeshita, Hidemi Takahashi: Role of innate immune cells in preterm birth and

miscarriages induced by sterile  
inflammation in mice and humans. 第  
32 回日本生殖免疫学会(2017)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島 義雄 (SHIMA, Yoshio)

日本医科大学、医学部、教授

研究者番号：70714765

(2) 研究分担者

根岸 靖幸 (NEGISHI, Yasuyuki)

日本医科大学、医学部、助教

研究者番号：50644580