

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11234

研究課題名(和文) 生殖不全における制御性B細胞、樹状細胞、NK細胞の役割の解明

研究課題名(英文) Participation of and regulatory B cells, dendritic cells, and natural killer cells in recurrent pregnancy loss

研究代表者

出口 雅士 (Deguchi, Masashi)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：50403291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血ではCD94陽性NK細胞およびBreg細胞中のCD43+CD27high B細胞の割合が不育症患者で増加する傾向を認めた。また、染色体正常流産脱落膜ではマクロファージのうちM1が増加する一方、M2の増加がみられず、M2への分化が初期の妊娠維持に好ましいことが明らかとなった。また、末梢血においてはNK細胞のCD44発現には変化はないものの、CD44陽性子宮NK細胞が染色体正常流産脱落膜で増加する傾向にあった。NK細胞上のCD44発現量については、末梢血による発現よりも脱落膜での発現が流産と関連する可能性があり、非妊時の末梢血よりも脱落膜に存在するNK細胞が重要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精卵が初めて母体と接する子宮の脱落膜と、簡単に検査できる非妊時の血液で流産と関係する免疫細胞のバランス変化について調査した。血液では予想外に自己免疫反応を抑制する制御性B細胞や、腫瘍等の細胞障害能力が弱いNK細胞が流産を繰り返す人で多い傾向があった。一方、流産脱落膜では子宮NK細胞でも細胞障害能力が強いタイプが多い傾向にあり、腫瘍等の増殖を助けるM2タイプのマクロファージが明らかに少なかった。妊娠時の脱落膜ではマクロファージやNK細胞が流産と関わるということが明らかになりましたが、それを非妊時の血液検査で容易に推定することは難しく、妊娠時の採血などより多角的な検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：CD94+ natural killer (NK) cells and CD43+ CD27 high B cells show a tendency to increase in the peripheral blood of women with recurrent pregnancy loss (RPL) compared with women without pregnancy loss. In the deciduae, M1 macrophages increased in miscarriages with normal fetal chromosome compared with miscarriages with abnormal fetal chromosome or induced abortion. M2 macrophages. M2 polarization in deciduae is favorable for the maintenance of early stages of pregnancy. As for CD44 expression of NK cells, CD44 expression in peripheral blood NK cell was not changed in RPL women, but CD44+ uterine NK cells show a tendency to increase in the deciduae of miscarriages with normal fetal chromosome. Cytotoxic CD44+ NK cells in the deciduae might be a more important factor than that in peripheral blood during nonpregnant period.

研究分野：不育症

キーワード：不育症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

不育症女性の約半数はリスク因子(原因)が不明である。非妊時の血中ナチュラルキラー細胞(NK細胞)活性が高値を示す例で、後の妊娠の際の流産率が高いことや、習慣流産女性では正常妊婦に比較して、妊娠初期の血中NK細胞活性が高値となることが知られている。動物実験ではTh1/Th2バランスをTh1優位にすると流産が起こり、逆にTh2サイトカインは細胞障害性を抑制し妊娠維持に有利に働くと考えられている。初期の妊娠維持に免疫の変化が重要であるが、正常の生殖機構および免疫学的生殖不全、特に習慣流産の病因については、不明な点が多い。

マウス不育症モデルでは、(1)免疫グロブリン静注(IVIg)が流産を抑制すること、(2)流産を惹起した子宮内においてはCD44<sup>bright</sup>NK細胞が有意に増加し、IVIg群では子宮内のCD44<sup>bright</sup>NK細胞数は増加していないことが報告されていたが、不育症患者における末梢血NK細胞のCD44発現頻度、流産脱落膜のNK細胞上のCD44発現頻度に関して検討した報告はない。

さらに、制御性B細胞が妊娠中のマウス脾臓では増加するが流産マウスでは増加しないため、妊娠維持に重要であるということも報告され、制御性B細胞が産生するIL-10が、TNFの産生を抑制し、病原性T細胞を誘導する樹状細胞を抑制し、妊娠維持に働いている可能性が考えられた。しかしながら、ヒトの妊娠における制御性B細胞の解析はこれまでに研究されていなかった。

### 2. 研究の目的

1)不育症患者(陰性対照:健常人)の末梢血ならびに2)染色体正常自然流産患者、染色体異常を伴う自然流産患者、および妊娠中絶患者の脱落膜を用いて血中や脱落膜組織におけるNK細胞上のCD44発現割合、活性化NK細胞の割合、NK細胞上の抑制性受容体発現割合、制御性B細胞および骨髄系樹状細胞(mDC)の割合を比較検討することで、染色体正常流産や不育症特異的な差異を調査することで、自然流産に関わる免疫学的背景を明らかにし、母児接点の免疫異常の関与が推定されるリスク因子不明不育症の病態の解明に役立てる。

### 3. 研究の方法

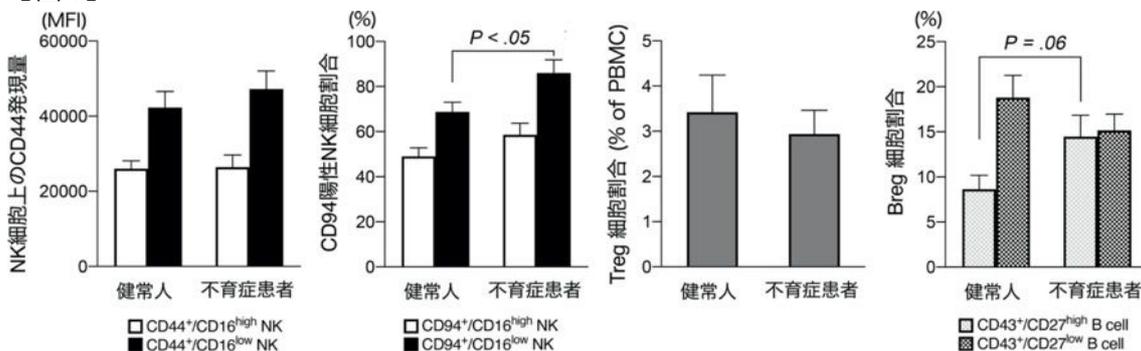
1)末梢血を用いた前向き研究では、不育症患者と健常人の2群間におけるCD44陽性NK細胞の発現量、抑制性受容体であるCD94発現NK細胞、制御性T細胞(Treg)及び制御性B細胞(Breg)割合の差異についてフローサイトメトリーで解析した。2)脱落膜を用いた前向き研究では絨毛染色体正常自然流産患者、絨毛染色体異常自然流産患者、および人工妊娠中絶患者の脱落膜の3群間、ならびに有意差があったものについては非妊時の黄体中期子宮内膜を加えた4群間で細胞障害性のCD44陽性の子宮NK細胞(uNK)の発現比率、抑制性受容体であるCD94陽性uNK細胞、制御性B細胞、骨髄系樹状細胞(mDC)の発現頻度に差異があるかをフローサイトメトリーで解析した。それぞれの細胞の解析に用いた表面マーカーは成果の項に記載した。

### 4. 研究成果

#### 1)末梢血を用いた前向き研究

末梢血NK細胞におけるCD44の発現量はCD16<sup>low</sup>NK細胞においてもCD16<sup>high</sup>NK細胞においても不育症患者と健常人で差を認めなかった。CD16<sup>low</sup>NK細胞ならびにCD16<sup>high</sup>NK細胞における抑制型受容体であるCD94陽性細胞割合を検討すると、不育症患者検体では健常人検体と比較して、CD94<sup>+</sup>CD16<sup>low</sup>NK細胞割合が増加していた(図1左・中左)。

【図1】

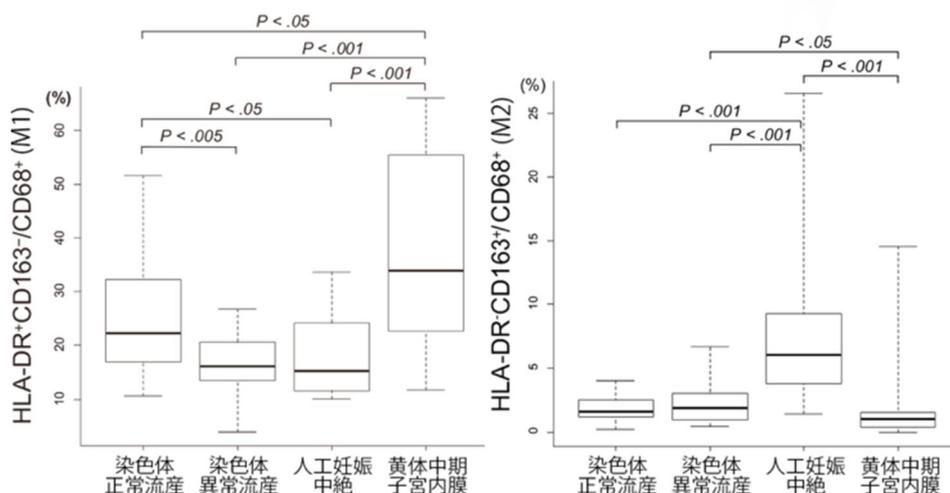


末梢血Treg細胞割合については、不育症患者と健常人の間で明らかな差は認められなかった(図1中右)。一方、末梢血Breg細胞の中でもCD43<sup>+</sup>CD27<sup>high</sup>B細胞は、不育症患者で健常人より増

加する傾向が認められた (図 1 右)。

2) 脱落膜を用いた前向き研究においては、絨毛染色体正常例 18 例および異常例 26 例の子宮脱落膜、人工妊娠中絶で得られた脱落膜 15 例、内膜日付診で得られた子宮内膜 19 例を解析し、タイプ 1 マクロファージ (M1: CD68<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD163<sup>-</sup>) は、非妊娠時黄体中期子宮内膜に比して妊娠時の脱落膜では減少していたが、染色体正常流産脱落膜では、染色体異常流産脱落膜人工妊娠中絶脱落膜に比して多かった。一方、タイプ 2 マクロファージ (M2: CD68<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD163<sup>+</sup>) は染色体異常流産脱落膜や人工妊娠中絶脱落膜では非妊娠時子宮内膜に比して増加したが、染色体正常流産脱落膜では増加しなかった。(図 2)。

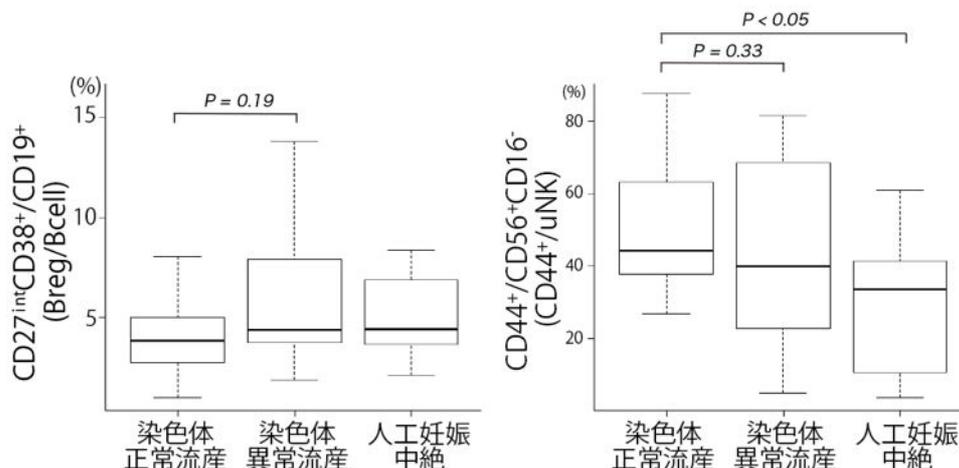
【図 2】



制御性 B 細胞 (Breg: CD19<sup>+</sup>CD27<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup>) は、染色体正常流産脱落膜では、染色体異常流産脱落膜や人工妊娠中絶脱落膜よりわずかに低下していたが、有意差を認めなかった (図 3 左)。CD19<sup>+</sup>CD27<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup>細胞群は IL-10 を高発現していると報告されているが、Breg に有意差が見られなかったため、IL-10 については検討しなかった。

ヒト末梢血中の樹状細胞の 2 つの主要なサブセットのうち、抗原の貪食やプロセッシングを行い強力な抗原提示細胞として機能する骨髄系樹状細胞 (mDC: Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>-</sup>) についての検討では、一定の傾向を認めなかった。

【図 3】



子宮 NK 細胞 (uNK: CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>) のうち細胞障害性レセプターである CD44 陽性細胞についての検討では CD44<sup>+</sup>/uNK 比率は染色体正常流産脱落膜では、人工妊娠中絶脱落膜より有意に高かったが、染色体異常流産脱落膜との比較では有意差を認めなかった (図 3 右)。CD44<sup>-</sup>CD94<sup>+</sup>の免疫寛容 uNK/uNK は CD44<sup>+</sup>uNK とは逆に染色体正常流産脱落膜では、人工妊娠中絶脱落膜より有意に低かったが (p<0.05)、染色体異常流産脱落膜との比較では有意差を認めなかった。流産後の変化の可能性も否定できず、染色体正常流産と CD44<sup>+</sup>uNK や CD44<sup>-</sup>CD94<sup>+</sup>uNKs との関係についてはさらなる検討が必要と考えられた。CD94<sup>+</sup>/uNK、および CD44<sup>+</sup>CD94<sup>-</sup>の細胞障害性 uNK/uNK についても検討したが、一定の傾向は認めなかった。

以上より、非妊時末梢血では CD94 陽性 NK 細胞および Breg 細胞中の CD43<sup>+</sup>CD27<sup>high</sup> B 細胞が不

育症患者血中で増加する傾向が認められた。また、染色体正常流産脱落膜ではマクロファージのなかでも M1 が増加する一方、M2 の増加がみられず、M2 への分化が初期の妊娠維持においては好ましいことが明らかとなった。また、CD44 陽性子宮 NK 細胞が染色体正常流産脱落膜で増加する傾向にあり、非妊時末梢血においては CD44 陽性 NK 細胞の変化はないものの、抑制型受容体である CD94 陽性 NK 細胞は予想に反して不育症患者で高かった。NK 細胞上の CD44 発現量については、末梢血による発現よりも脱落膜での発現が流産と関連する可能性があり、末梢血よりも脱落膜に存在する NK 細胞が重要である可能性がある。末梢血での Breg 細胞中の CD43+CD27<sup>high</sup> B 細胞や CD94 陽性 NK 細胞の不育症における役割については不明で、不育症患者における非妊時と妊娠時の検討など更なる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyaji Maho, Deguchi Masashi, Tanimura Kenji, Sasagawa Yuki, Morizane Mayumi, Ebina Yasuhiko, Yamada Hideto	4. 巻 35
2. 論文標題 Clinical factors associated with pregnancy outcome in women with recurrent pregnancy loss	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gynecological Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09513590.2019.1604657	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maesawa Yoko, Deguchi Masashi, Tanimura Kenji, Morizane Mayumi, Ebina Yasuhiko, Yamada Hideto	4. 巻 17
2. 論文標題 Effectiveness of high-dose i.v. immunoglobulin therapy for pregnant women with aspirin-heparin-resistant secondary antiphospholipid syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 149~154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12080	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Deguchi Masashi, Maesawa Yoko, Kubota Shino, Morizane Mayumi, Tanimura Kenji, Ebina Yasuhiko, Yamada Hideto	4. 巻 125
2. 論文標題 Factors associated with adverse pregnancy outcomes in women with systematic lupus erythematosus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 39~44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2017.11.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimada Shigeki, Ebina Yasuhiko, Iijima Norifumi, Deguchi Masashi, Yamada Hideto	4. 巻 79
2. 論文標題 Decidual CD68+HLA-DR+CD163+ M1 macrophages increase in miscarriages with normal fetal chromosome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e12791~e12791
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/aji.12791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 出口雅士
2. 発表標題 不育症の診断と治療
3. 学会等名 尼崎市産婦人科医会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出口雅士
2. 発表標題 血栓性素因と妊娠
3. 学会等名 第20回日本検査血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Deguchi M
2. 発表標題 Management of pregnancies complicated by systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibody syndrome.
3. 学会等名 14th World Congress of the International Society for Immunology of Reproduction/ The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology of Reproduction（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimada S, Ebina Y, Iijima N, Deguchi M, Yamada H
2. 発表標題 Decidual CD68+HLA-DR+CD163 - M1 macrophages increase in miscarriages with normal fetal chromosome
3. 学会等名 14th World Congress of the International Society for Immunology of Reproduction/ The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology of Reproduction（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyaji M, Deguchi M, Tanimura K, Morizane M, Ebina Y, Yamada H
2. 発表標題 The distribution of etiology and therapy outcomes of recurrent pregnancy loss at our recurrent pregnancy loss clinic
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会 仙台
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 出口雅士、山田秀人
2. 発表標題 【教育講演】不育症診療の現状と課題-さらなる妊娠予後改善にむけて-
3. 学会等名 第59回日本母性衛生学会総会・学術集会 新潟（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮地真帆、出口雅士、今福仁美、谷村憲司、森實真由美、蝦名康彦、山田秀人
2. 発表標題 神戸大学における不育症の臨床因子と妊娠予後の検討
3. 学会等名 第59回日本母性衛生学会総会・学術集会 新潟
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 出口雅士、谷村憲司、蝦名康彦、山田秀人
2. 発表標題 妊娠初期のプロテイン S 低値と産科異常との関連
3. 学会等名 第33回日本生殖免疫学会総会・学術集会 東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 島田茂樹、蝦名康彦、出口雅士、山田秀人
2. 発表標題 染色体正常流産の子宮脱落膜ではM1マクロファージが増加している
3. 学会等名 第32回日本生殖免疫学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 秀人  (Yamada Hideto)  (40220397)	神戸大学・医学研究科・教授   (14501)	
研究分担者	森實 真由美  (Morizane Mayumi)  (50514692)	神戸大学・医学研究科・講師   (14501)	
研究分担者	谷村 憲司  (Tanimura Kenji)  (80593988)	神戸大学・医学部附属病院・准教授   (14501)	
研究分担者	蝦名 康彦  (Ebina Yasuhiko)  (90322809)	神戸大学・医学研究科・医学研究員   (14501)	