

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18690

研究課題名(和文) T細胞受容体レパートリーの観点から見た妊娠と子宮悪性腫瘍の免疫学的相違

研究課題名(英文) Immunological difference between pregnancy and cancer in terms of T cell receptor repertoire.

研究代表者

津田 さやか (Tsuda, Sayaka)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：60839075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：母子間免疫寛容と、腫瘍が宿主の免疫から逃れる機構は類似しており、T細胞免疫が重要な役割を果たす。制御性T細胞(Treg)と細胞障害性T細胞(CTL)のT細胞受容体解析を行い、妊娠と腫瘍での差異について検討した。妊娠では子宮局所で、初期には抗原特異的CTLを抗原非特異的にTregが抑制すること、後期は抗原特異的CTLの活性抑制とTregによる抗原特異的な免疫抑制が誘導されることが判明した。子宮体癌では、CTLが局所と末梢血でクローナリティが上昇し、末梢血では組織型と相関していた。妊娠では末梢血T細胞に異常妊娠の病態は反映されなかったが、腫瘍の末梢血CTLは局所の病態を反映していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

絨毛細胞(妊娠)と悪性腫瘍では免疫制御機構に類似点が多くある。宿主の抗原特異的T細胞免疫の、妊娠と悪性腫瘍(子宮体癌)での相違を比較検討することで、生殖免疫学的に流産、妊娠高血圧腎症の治療の糸口を見出し、腫瘍免疫学的に癌免疫療法の糸口を見出すことを目的とした。妊娠では制御性T細胞(Treg)と細胞障害性T細胞(CTL)の、子宮局所での抗原特異的T細胞免疫応答の変化を主体としており、末梢血には反映されないことから、局所に作用する免疫学的治療が望まれる。一方、子宮体癌では末梢血CTLクローンの多寡が腫瘍の性質を反映しており、免疫学的治療ならびにバイオマーカーとして応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Feto-maternal tolerance and evasion of cancer from immune surveillance is similar in terms of T cell immunity. The objective of this study was to investigate difference of regulatory T cells(Treg) and cytotoxic T cells (CTLs) response between pregnancy and cancer by T cell receptor repertoire analysis.

In early pregnancy period, suppressing antigen-specific CTLs by non-specific Treg cells in the uterus was important. In late pregnancy, inhibition of antigen-specific CTLs and induction of antigen-specific tolerance by Treg cells in the uterus was important. In endometrial cancer, clonal expansion of CTLs were observed both in the uterus and peripheral blood. Furthermore, clonality of CTLs in peripheral blood reflected histology of cancer. On the other hand, either Treg cells and CTLs in peripheral blood did not significantly change between normal pregnancy and pregnancy complications. To study the local T cells, it is necessary to comprehend pathophysiology of pregnancy complications.

研究分野：産科婦人科

キーワード：細胞障害性T細胞 制御性T細胞 T細胞受容体レパートリー 流産 妊娠高血圧腎症 子宮体癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胎児は母体にとって半異物であるが拒絶されることなく妊娠が維持される。胎盤を形成する絨毛組織は、母体の子宮内膜に浸潤して母体の免疫担当細胞と直接接触する。このとき、母体側の胎児に対する免疫寛容と、胎児側(絨毛組織)の免疫エスケープ機構が相互に機能することで拒絶を免れている。前者には、胎児抗原特異的な制御性T細胞(Treg)による免疫応答の抑制(免疫寛容;トレランス誘導)と、胎児を攻撃する細胞障害性T細胞(CTL)の機能的変化が関与している。また、後者では主要組織適合性抗原(MHC)発現調整、Indoleamine2,3-dioxygenase(IDO)発現によるCTLの免疫応答抑制、IL-10やTGF- $\beta$ 等の抑制性サイトカインの産生が関与している。同様の免疫学的環境は悪性腫瘍でも見られることから、妊娠は臓器移植より、悪性腫瘍と類似する。正常組織と宿主免疫との対峙である臓器移植に対し、妊娠と腫瘍は、胎児・腫瘍そのものが宿主の免疫学的環境の変化を惹起し、さらにこれからエスケープするシステムを構築するからである。ウイルス等の外来抗原に由来しない悪性腫瘍は真胎生の脊椎動物が進化する過程で出現した疾患であり、胎生を行うための免疫制御機構は、発癌リスクと引き換えに獲得されてきたとする仮説がある(Hayakawa S. Med Hypotheses. 2006;66(5):888-97.)。申請者らは、T細胞受容体(TCR)のレパートリー(TCRのバリエーションが特定のものに偏っているのか、あるいは多様であるのか)を比較することで、正常妊娠では子宮局所で抗原特異的Tregが増加しており(共通のTCRを持つTregが偏って増加)これが不十分であると妊娠高血圧腎症(PE)の誘因となりうることを示した(Tsuda S et al. Front Immunol. 2018; 24;9:1934.)。一方、腫瘍浸潤リンパ球中のTregの増加は悪性腫瘍の進展を助長し予後不良因子となることが報告されている(Saito T. Nat Med. 2016 Jun;22(6):679-84.)。ヒト子宮頸癌局所における抗原特異的CTLの集積は報告されているが(Stevanovic S. Science. 2017;14;356(6334):200-205)TregとCTLのT細胞受容体(TCR)双方から観た抗原特異性については報告がない。もしこの点が明らかになれば、生殖免疫学的に流産、妊娠高血圧腎症(PE)の治療の糸口を見出し、腫瘍免疫学的に癌免疫療法の糸口を見出すことができる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、子宮ならびに末梢血におけるTregならびにCTLのポピュレーションの、妊娠と悪性腫瘍(子宮体癌)での相違点を明らかにすることである。

T細胞はそれぞれが持つT細胞受容体(TCR)で抗原を特異的に認識して機能する細胞であることから、単一細胞レベルでTCRの解析を行い、妊娠と腫瘍での差異について検討を行うこととした。

### 3. 研究の方法

妊娠症例と子宮体癌症例の子宮局所と末梢血から取得したTregとCTLの、T細胞受容体(レパートリー)を単一細胞レベルで解析し、同じTCRを持つクローナルな集団の出現割合を比較する。上記のTCR解析で得られたTCRの抗原特異性の検証を行う。

### 4. 研究成果

妊娠におけるTregの検討では、免疫抑制活性の高いeffector Tregのうち、クローナルに増殖したeffector Treg細胞の割合は妊娠後期の脱着膜で有意に増加していた( $p < 0.001$ )。末梢血

と脱落膜とで共通するクローンの出現はほとんど見られなかったが、同一母体の後続妊娠では、前回妊娠と同一の TCR 配列を有する Treg クローンが脱落膜に出現していた。この事実は、胎児抗原を認識する Treg が繰り返し局所に誘導されることを示唆する。胎児染色体正常流産では正常妊娠初期と比し、effector Treg 細胞の割合が有意に低下していた ( $p=0.009$ ) が、クローナリティに差異は認めなかった。一方 PE では、クローナルな effector Treg 細胞の割合が正常妊娠後期より有意に低下していた ( $p=0.003$ )。また、クローナルに増加した Treg の TCR を母体末梢血 T 細胞に発現させ、自身の子の臍帯血、他人の子の臍帯血、他人の末梢血と混合培養したところ、自身の子の臍帯血と培養した際の増殖率が最も高かった。Treg は胎児抗原を認識し増殖している可能性が示唆された。以上より、Treg による局所での抗原特異的免疫寛容は、妊娠初期よりも後期でより重要であることが判明した。

妊娠における CTL では、TCR と抑制型補助刺激分子である PD-1 の発現について検討した。脱落膜の CD8+T 細胞 (CTL) に最も多く存在する effector memory CD8+T 細胞 (CD3+CD8+CD45RA-CCR7- cells; CD8+EM 細胞) のクローナリティは末梢血より脱落膜で高かったが、妊娠初期と後期では同等であった。しかし、クローナルな CD8+EM 中の PD-1 の発現率は妊娠後期の脱落膜で増加していた ( $p<0.01$ )。胎児染色体正常流産では正常妊娠初期と比較してクローナルに増殖した CD8+EM 細胞の割合が有意に増加 ( $p<0.05$ ) していたが、クローナルな CD8+EM 細胞における PD-1 の発現率には差を認めなかった。一方で PE では CD8+EM 細胞のクローナリティは正常妊娠と同等であったが、クローナルな CD8+EM 細胞における PD-1 の発現率が有意に低下していた ( $p<0.05$ )。次に、CD8+EM 細胞の抗原特異性を検証した。母体血と接触する絨毛細胞は HLA-C のみを発現するため、母体と父が有するハプロタイプの HLA-C を発現させた絨毛細胞株を準備した。CD8+EM 細胞から取得した TCR を TCR 陰性 T 細胞株に移入し、上記の絨毛細胞株と混合培養したところ、父方由来 HLA-C に強く反応する TCR が取得できた。すなわち、父方抗原 (=胎児抗原) 特異的 CD8+細胞が子宮に存在することが示された。

以上の事実から、CD8+EM 細胞は局所で胎児抗原を認識するが、PD-1 経路により活性が抑制されること、その作用は特に妊娠後期で顕著であることが示唆された。胎児染色体正常流産では子宮局所で抗原特異的 CD8+EM が増殖する一方、effector Treg の全体量の減少による免疫抑制が不十分であると考えられる。また、PE では抗原特異的 effector Treg の減少と、抗原特異的 CD8+EM 細胞での PD-1 経路による細胞傷害性の抑制が不十分であることが関与しており、流産と異なる免疫学的機序であると考えられる。Treg、CD8+細胞いずれも、末梢血での解析では正常妊娠と異常妊娠で顕著な差が見られず、子宮局所での T 細胞免疫応答の変化が主体であるが、末梢血には反映されないことが初めて明らかとなった。

次に、子宮体癌患者と良性疾患での子宮摘出患者 (コントロール群) で PD-1-CD137-非活性化 CD8+細胞と PD-1+CD137+活性化 CD8+細胞について検討を行った。活性化 CD8+T 細胞は子宮体癌局所でのみ増加しており、末梢血ならびにコントロール群子宮内膜にはほとんど存在しなかった。TCR クローナリティは癌局所の活性化 CD8+が最も高く、非活性化 CD8+細胞とは異なるクローンを有していた。すなわち、癌局所の活性化 CD8+細胞は腫瘍抗原に対して応答する集団であることが示唆される。非活性化 CD8+細胞の観点からみると、子宮局所でのクローナリティは癌症例とコントロール群で差は認められなかったが、末梢血でのクローナリティは癌症例がコントロール群より有意に高かった ( $p<0.01$ )。さらに、癌患者での末梢血の非活性化 CD8+細胞のクローナリティは、臨床進行期と組織学的グレードと正の相関を有していた。また、高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-high) 癌症例 (免疫原性が高い癌) と、非高頻度 (MSI-low/negative) 癌症例では、前者で末梢血の非活性化 CD8+細胞のクローナリティが有意に高

かった( $p < 0.05$ )。興味深いことに、腫瘍の臨床進行期・組織型・MSI status による差異は、TIL では認められず、末梢血でのみ見られた。

妊娠では末梢血 Treg・CD8+細胞は妊娠合併症で変化せず、子宮局所での T 細胞免疫応答の変化を主体としており、局所に作用する免疫学的治療が望まれる。また、末梢血は局所の免疫応答を反映しないため、病態把握には局所の T 細胞を取得する必要がある。一方、子宮体癌では末梢血 CD8+細胞クローンが腫瘍の性質を反映しており、免疫学的治療ならびにバイオマーカーとして応用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morita K, Tsuda S, Kobayashi E, Hamana H, Tsuda K, Shima T, Nakashima A, Ushijima A, Kishi H, Saito S	4. 巻 11
2. 論文標題 Analysis of TCR Repertoire and PD-1 Expression in Decidual and Peripheral CD8+ T Cells Reveals Distinct Immune Mechanisms in Miscarriage and Preeclampsia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.01082. eCollection 2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shima T, Nakashima A, Yasuda I, Ushijima A, Inada K, Tsuda S, Yoshino O, Tomura M, Saito S	4. 巻 141
2. 論文標題 Uterine CD11c+ cells induce the development of paternal antigen-specific Tregs via seminal plasma priming.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2020.103165	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 -
1. 著者名 Tsuda S, Nakashima A, Morita K, Shima T, Yoneda S, Kishi H, Saito S	4. 巻 82
2. 論文標題 The role of decidual regulatory T cells in the induction and maintenance of fetal antigen-specific tolerance: Imbalance between regulatory and cytotoxic T cells in pregnancy complications.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Immunology	6. 最初と最後の頁 346-352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humimm.2021.01.019.	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 -
1. 著者名 森田恵子, 津田さやか, 齋藤滋	4. 巻 52
2. 論文標題 母子感染症の必修知識-エキスパートに学び予防につなげる 妊婦の免疫学的特徴.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児内科	6. 最初と最後の頁 8-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 津田さやか, 齋藤滋	4. 巻 49
2. 論文標題 妊娠高血圧症候群update 病態 制御性T細胞 (Treg)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 周産期医学	6. 最初と最後の頁 1334-1339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 津田さやか
2. 発表標題 母児の予後からみた自己免疫性疾患罹患女性への妊娠支援～全国実態調査と富山大学における試み～.
3. 学会等名 第38回周産期学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田さやか, 竹村京子, 伊東雅美, 森田恵子, 安田一平, 島田なつみ, 荒木左諭, 島友子, 山本善裕, 中島彰俊
2. 発表標題 抗結核薬治療で無月経が改善した性器結核の一例.
3. 学会等名 第11回日本性感染症学会北陸支部学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田さやか
2. 発表標題 WoCBA患者さんのためのリウマチ科と産科の連携とは? 「リウマチ・膠原病科と産科・婦人科の連携～ベストプラクティスの事例を中心に～」
3. 学会等名 Interaction in Clinical Intelligence in 神奈川 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田さやか
2. 発表標題 母子間免疫寛容の維持に制御性T細胞が果たす役割.
3. 学会等名 第13回 母児間免疫病研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田さやか
2. 発表標題 産婦人科医が診るWoCBA (Women of Child-Bearing Age) RA患者の現状と課題.
3. 学会等名 第35回日本臨床リウマチ学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sayaka Tsuda, Keiko Morita, Tomoko Shima, Akemi Ushijima, Kei Tsuda, Shigeru Saito
2. 発表標題 Single-cell T cell receptor (TCR) repertoire analysis revealed insufficient clonal expansion of decidual effector regulatory T cells was present in preeclampsia, but not in miscarriage, in humans.
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayaka Tsuda, Hiroshi Hamana, Tomoko Shima, Akemi Ushijima, Kei Tsuda, Atsushi Muraguchi, Hiroyuki Kishi and Shigeru Saito
2. 発表標題 Failure of clonal expansion of decidual regulatory T cells is present in preeclampsia, but not in miscarriage, suggesting that fetal antigen - specific tolerance might be disturbed in preeclampsia.
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 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kei Tsuda, Akitoshi Nakashima, Sayaka Tsuda, Tomoko Shima, Osamu Yoshino, Shigeru Saito
2. 発表標題 Clonally expanded populations of cytotoxic T cell in tumor infiltrated lymphocyte and peripheral blood in uterine endometrial cancer
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Morita, Eiji Kobayashi, Sayaka Tsuda, Kiyomi Shitaoka, Tatsuhiko Ozawa, Hiroshi Hamana, Shigeru Saito, Hiroyuki Kishi
2. 発表標題 Common TCR Repertoire was found in both decidual and peripheral CD8+T cells in normal pregnancy
3. 学会等名 第48回日本免疫学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 齋藤 滋, 津田さやか	4. 発行年 2020年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 248
3. 書名 不育症	

1. 著者名 津田さやか, 中島彰俊, 齋藤滋	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 381
3. 書名 産婦人科臨床シリーズ 3分娩・産褥期の正常と異常/周産期感染症	



1. 著者名 Tsuda S, Saito S	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 445
3. 書名 Reproductive Immunology Basic Concepts volume1	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------