

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20591932

研究課題名（和文）妊娠中の肝機能異常における自己傷害性T細胞の関与の検討

研究課題名（英文）Evaluation of the role of self-reactive T cells in liver dysfunction during pregnancy

研究代表者

市川 雅男（ICHIKAWA MASAO）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20366660

研究成果の概要（和文）：

B7-H1 ノックアウトマウスの肝臓には、自己傷害性と思われるPD-1陽性のT細胞が蓄積している。その細胞群を刺激すると肝障害がおこる。これらの細胞群が妊娠中の肝障害に何らかの影響を与えると考えられたが、妊娠マウスの肝臓におけるPD-1陽性のT細胞の増加ははっきりと認められず、肝障害との関与は否定的である。一方、マウスモデルにおいて、胎盤に表出しているB7-H1分子に対する中和抗体とT細胞のアナジーをブレイクする4-1BB抗体を投与した群は、22.2%の流産率を示した（コントロール群は、4.1%）。この事は、胎盤上のB7-H1は何らかの形で胎児免疫寛容に関与すると示す。

研究成果の概要（英文）：

In the liver of the B7-H1 knockout mouse, PD-1 positive T cell had accumulated and have potential to cause liver damage. However, those cells did not change the number during the pregnancy and did not seem to be associated with the liver damage. On the other hand, B7-H1 molecules on the placenta in mouse model could play a role in feto-maternal tolerance, because the group which was administered with anti-B7-H1 blocking antibody and anti-4-1BB antibody shows miscarriage in 22.2% compared with the control in 4.1%.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：産科学

1. 研究開始当初の背景

T細胞に抑制性シグナルを伝達するB7-H1分子は、レセプターであるPD-1を介して、自己免疫疾患を抑制している事がわかった。B7-H1分子は、肝臓や胎盤等に

広く発現していることが解り、それらの分子が局所で何らかの自己免疫を制御している事が予想されていた。そのような中、妊娠という特徴的な環境の中でB7-H1分子の働きが注目される。

2. 研究の目的

ヒトの妊娠中には多くの**肝機能異常を示す病態：HELLP 症候群、急性妊娠性脂肪肝、妊娠性肝内胆汁うっ滞症、妊娠高血圧症候群、妊娠悪阻等が存在する。その原因はほとんどわかっていないが、何らかの細胞免疫反応がその発症に関与していることが推測されている。**以前より肝臓は自己反応性 T 細胞が発生する場所である事が知られており、それらの自己反応性の T 細胞が妊娠中の肝障害と関連している事が考えられるが、それらの細胞の制御における分子レベルのメカニズムは全くわかっていない。我々の検討により肝臓に発現する抑制性の B7-H1 分子がそれらの自己反応性の T 細胞の出現をコントロールしている事がわかったため³⁾、この分子が妊娠中の肝障害に影響を与える可能性が出てきた。今回の研究の目的は妊娠によって **B7-H1(PD-L1)分子による自己反応性の T 細胞の制御がどのように変化するかを検討し、それらが妊娠中の肝障害の原因となり得るかどうかを探求するものである。**

3. 研究の方法

妊娠中における **B7-H1/PD-1 経路のブロックによる肝臓の PD-1 陽性 CD8T 細胞の数・性質の変化を追跡する。**

妊娠 B6 マウスを用いて B7-H1/PD-1 経路のブロックによる肝臓の PD-1 陽性 CD8T 細胞の変化を追跡する。妊娠マウスの性交後 3、7、11 日目に 10B5 抗体を 200ug/mouse あるいはコントロール抗体にて投与して 14 日目に解剖し肝臓を取り出しコラゲナーゼで処理して肝臓内リンパ球を分離して抗体で染色してフローサイトメトリーにて PD-1 陽性 CD8T 細胞を検出する。さらにその

性質を調べるために、自動細胞解析分離装置 (BD 社 FACS Vantage SE : 日本医科大学微生物免疫学講座既設) あるいは MACS システムにて細胞を分離して細胞増殖能、サイトカイン産生能、細胞傷害性などを検討する。

4. 研究成果

マウスにおける肝障害モデルはあまりないが、我々は、B7-H1 ノックアウトマウスとアナジーをブレイクする 4-1 BB 抗体との組み合わせで、それを実現した。

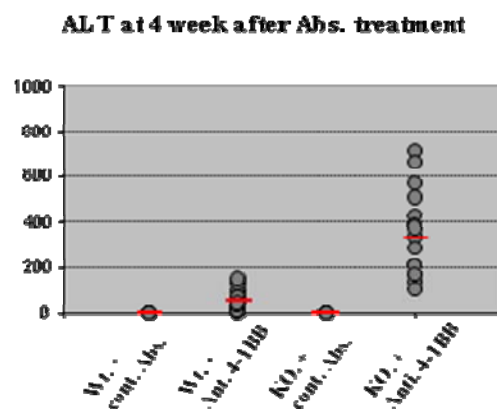
【図 1】



これは、左の二つは wild type の肝臓、右二つが B7-H1 KO の肝臓で、左から二番目と四番目には、4-1 BB 抗体が投与された。写真のように、KO に 4-1 BB の抗体を投与されたマウスの肝臓は、著明に肥大する。

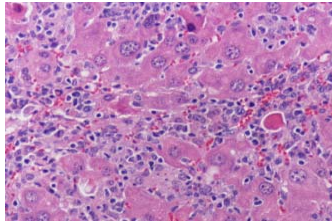
実際に、これらのマウスでは、肝酵素が著明に上昇する。(図 2) これらの現象は、肝臓に集積した自己傷害性の CTL の関与が強く指摘された (data not shown)

【図 2】



これらの病理組織も肝硬変と非常に近い病態を示す。(図3)

【図3】 B7-H1 KOに4-1BBを投与したマウスの肝臓所見



これらの実験結果から、B7-H1分子は、何らかのメカニズムで自己細胞性に肝障害を起こす可能性が示唆された。次に、妊娠という環境がこれらの細胞にどのような変化を起こすかどうかを検討した。父系由来の異系抗原を持つ妊娠マウスモデルを用いて妊娠マウスの肝臓を調べて、活性化した細胞に変化があるかどうかを調べた。

B7-H1KOの肝臓には、PD-1陽性の活性化したT細胞の蓄積が認められる事が知られている。そこで、アロの妊娠マウスモデルにおいて肝臓に活性化したPD-1陽性T細胞の蓄積の増加の傾向が認められていたが、詳細にしらべたところ、最終的には、著明な増加は認められなかった。また、これらの細胞の特異性ははっきりしなかったため、評価が難しいという問題が起こった。そこで、妊娠中の肝臓障害とB7-H1との関連を調べる事が非常に困難であるとの考えに至った。

そこでB7-H1分子は、肝臓と共に、胎盤にも豊富に発現している事を鑑み、アロの妊娠モデルにおいて、B7-H1と4-1BBの抗体の投与が流産にどのような影響を及ぼすかどうかをチェックした。コントロール

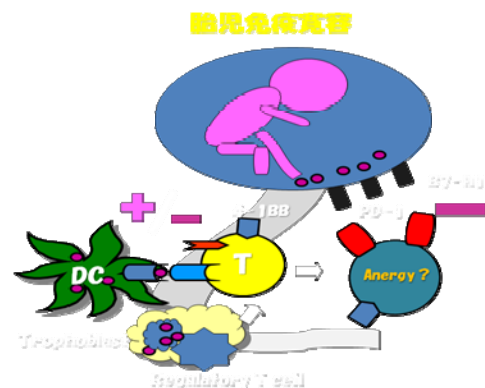
群の流産率が4.1%であったが抗B7-H1抗体投与群においては、流産率が10.0%で、B7-H1と4-1BB投与群では、22.2%と効率であった(表1)。しかしながら、これらの流産が実際に活性のあるT細胞によって引き起こされたものであるかどうかは、はっきりしなかった。現在、母体が父系由来による異系抗原に対して本当に活性化して細胞傷害性のあるCTLが産生されるのかを検討しているところである。

【表1】

	妊娠数	正常胚	非流産率	流産率
cont	8.17	7.83	95.90%	4.10%
Anti-B7-H1 Abs.	6.67	6	90.00%	10.00%
Anti-B7-H1/4-1BB Abs.	7.67	6	78.20%	22.20%

実際に、予想される胎児免疫寛容のメカニズムはさらに複雑と考えられる。

すなわち、B7-H1分子以外にも、Regulatory T細胞等の関与が考えられ、今後それらの一つ一つを考慮して胎児免疫寛容のメカニズムを解明したいと思っている。



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 1 件)

- ① 市川雅男 妊娠とB7-H1 医学の歩み
査読なし Vol.233 No.2 2010 151-155

[学会発表] (計 1 件)

- ① 市川雅男 妊娠とB7-H1 分子
(B7-H1knockout mouseのPhenotype
の解析を中心に) 日本生殖免疫学会
2009 年 11 月,東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川 雅男 (ICHIKAWA MASAO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：20366660

(2) 研究分担者

竹下 俊行 (TAKESHITA TOSHIYUKI)
日本医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60188175

里見 操緒 (SATOMI MISAO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：80318500