

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09449

研究課題名(和文) LfによるTreg分化誘導を利用した受胎率向上に関する研究

研究課題名(英文) Research on improving fertility by Lf and Tregs

研究代表者

竹内 崇師 (Takeuchi, Takashi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：10325061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)は着床時および妊娠中の子宮粘膜において多数認められ、妊娠の維持に関するTregの重要性が示唆されている。一方ラクトフェリン(Lf)は様々な免疫活性作用を有するが、Lfが初期胚の発生率を上昇させることが研究結果から示されている。このことから、Lfが着床期の子宮粘膜におけるTregの活性に与える影響について、検討を行った。

その結果、Lfの投与は着床期の子宮粘膜に流入するTreg数をやや増加させた。しかしながら、先行研究で示される様に、正常マウスの子宮粘膜におけるTregの数自体がほとんど増加していなかったことから、胚着床に対するTregの関与は少ない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は現在社会問題となっている不妊の原因の解明やその治療に対して寄与するものである。過去の報告から、Tregは着床時および妊娠中の子宮粘膜において多数認められたことから、妊娠の維持に関与するとの考察が為されている。今回の実験はこれを踏まえて行われ、Lf投与群ではTregの数が増加する傾向が見られたが、Lf未投与の個体においても、そもそも報告にあるようなTregの着床期子宮粘膜における大幅な増加が認められなかったため、両群間で定量的な相違を示すことが出来なかった。このことから、妊娠期におけるTregの関与について、今後更なる詳細な検討を行い、研究を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) are known to be seen in large numbers in the uterine mucosa during the implantation and pregnancy period, which suggesting the importance of Tregs for maintain the pregnancy. On the other hand, lactoferrin (Lf) has various immunostimulatory effects, especially, Lf increases the development rate of early embryos. Based on these facts, I investigated the effect of Lf on Treg activity in the uterine mucosa during the implantation period. As a result, Lf administration slightly increased the number of Tregs in the uterine mucosa during implantation period. However, there was no obvious difference between the LF group and control group.

These results could be suggesting that Tregs may not be involved in embryo implantation as previously reported.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：制御性T細胞 ラクトフェリン 常在細菌叢 胚着床 Lactorerrin Treg

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠を成立させるためには、受精卵の子宮への着床および胚の発生が必須であるが、母体にとって異物である胎子を許容する為には、妊娠中の子宮粘膜における免疫応答が抑制されねばならない。しかしながら生殖器はその存在位置から、病原微生物の侵入の危険に常に晒されている。実際に生殖器粘膜には雌雄共に微生物が恒常的に存在しており、ヒトでは3割もの精子提供者の精液中に細菌が認められる。妊娠期の免疫寛容の誘導機序については長年不明であったが、免疫応答を抑制する役割を担う制御性T細胞 (Treg = CD4+CD25+Foxp3 T細胞) は、着床時および妊娠中の子宮粘膜において多数認められる。またその増加は精液の暴露が発端となることが報告され、妊娠の維持にはTregが重要であることが近年明らかとなった。

一方、母乳等の外分泌液中に含まれるラクトフェリン(Lf)は、哺乳類の自然免疫において重要な役割を果たすことが知られている。Lfの免疫機能は抗菌作用、抗ウイルス作用など多岐に渡るが、特にLfの抗菌活性に関しては、グラム陰性菌の内毒素であり、自然免疫において病原体の認識に必須の因子であるToll様受容体(TLR)のうち、TLR4の主要なリガンドであるリポポリサッカライドと結合し、TLR4の下流シグナルを抑制する、すなわちLfはTLR4を介して殺菌作用を示すことが報告されている。生殖器への感染は配偶子の受精のみならず、胚の着床や胎児の発育等、不妊の重要な要因であることから抑制されるべきであるが、妊娠時には免疫寛容が誘導される為、病原体の侵入を許容してしまうという矛盾が生じる。これらのことから受胎率の向上には生殖器における病原性微生物の排除が望まれるが、現在まで有効な手段は報告されていない。

2. 研究の目的

現代の社会においては、晩婚化に伴う初産の高齢化が進んでおり、それらに起因すると思われる不妊が社会問題となっている。不妊の理由は様々であり、明快な改善策は見いだせないのが現状である。一方、男女の生殖器粘膜には細菌が高頻度に存在することが報告されている。病原微生物の存在が不妊の原因の一端であることが明らかになっていることから、特に胚着床や胎盤形成の時期には生殖器および配偶子からの微生物の排除が望まれる。具体的な方法としては抗生物質の投与等が行われているが、現在まで特別有効な手段であるとは言いがたい。他方、粘膜免疫応答の抑制に重要な役割を果たすTregは、消化管において酪酸の存在により強く誘導されることが近年報告されている。更にLfの経口投与により乳酸菌等のいわゆる善玉菌の増加が認められるが、併せてTregを増加させる可能性が示唆されている。

以上より本研究では、妊娠時におけるLfの摂取が、雌性生殖器粘膜における酪酸産生菌の増加の誘導と、それに続くTreg分化の誘導により、受胎率を向上させる可能性について、検討することを目的とした。もしこれが可能であれば、以下の点において貢献が可能である。

・不妊治療への寄与

本研究の結果は、現代社会において重大な社会問題となっている不妊に対し、新たな不妊治療の方法として寄与できる。

・実験動物作出の効率化

本研究により受胎率の向上が見込まれ、実験動物を効率的に作出することができる。

3. 研究の方法

C57BL/6の雌マウスにLfを経口的に連続投与した。投与の過程で雌マウスに性ホルモンを投与し、発情を誘起した。このマウスと雄マウスと同居させ、交配を確認した。続いて交配確認後4日、6日、および10日後、すなわちマウスにおける着床時期、胎盤形成時期、および胎子の形成が肉眼的に確認できる時期に、雌マウスを安楽死させた。安楽死後に膣及び子宮を採取し、子宮及び膣粘膜におけるTregの分布の変化について、免疫組織学的にTregのマーカーとして知られているFoxP3に陽性を示す細胞を検出し、Lf投与マウスおよびその比較対象として未投与のマウスの両者の粘膜における陽性細胞の数を比較検討した。

4. 研究成果

免疫染色の結果、胎盤形成期のLf投与群マウスの子宮粘膜ではTregの数は対照群よりも増加する傾向が認められた。しかしながら、Lfを投与しない対照群において、妊娠子宮におけるTregの数は非妊娠時と殆ど変わらず、先行研究で報告されている様な、大幅なTregの増加は確認されなかった。このことから、確かに対照群よりもTregの数はLf投与群において増加傾向が見られたが、胎子の受胎に影響を及ぼしているとは観察結果からは言えない状況であった。

また胎盤形成期における子宮および膣の常在細菌の変化について検討するために、次世代シーケンサーを用いてLf投与群と対照群の常在細菌の変化について検討した結果、Lf投与群では乳酸菌などの菌が属レベルで増加している傾向が認められた。酪酸産生菌については、明確な菌属の増加を示すことは出来なかったが、クロストリジウム属の増加が一部認められた。これらの結果は、Tregの増加の助長を示すと思われたが、先に記載した様に、実際のTregの増加に寄与

しているかどうかは今回の結果からは示すことができなかった。酪酸による Treg の誘導に関する分子機構については、酪酸がヒストン脱アセチル化酵素の阻害活性を介し、Treg のマスター転写因子である Foxp3 の遺伝子プロモーター領域およびエンハンサー領域のヒストンのアセチル化を亢進させることにより、Foxp3 の発現を促進する。妊娠期の子宮 Treg においても同様の機序により誘導がなされると考えられるが、生殖器に存在する免疫担当細胞は他の臓器とは異なる特徴を示すことから、本研究では酪酸による子宮 Treg の増殖誘導機序を確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

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

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
---------	---------