

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09488

研究課題名(和文)短鎖脂肪酸投与による子宮内Treg細胞誘導による女性不妊症に対する治療戦略の開発

研究課題名(英文)Development of a therapeutic strategy for female infertility by induction of intrauterine Treg cells by administration of short-chain fatty acids.

研究代表者

川越 淳(Kawagoe, Jun)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：60375342

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細胞)による免疫応答の抑制は妊娠成立に重要な役割を果たす。本研究では、短鎖脂肪酸によるTreg細胞誘導効果が子宮内でも認められるか否かを確認し、妊娠成立に与える影響の解明を目的とした。短鎖脂肪酸を投与した雌マウスを背景の異なる雄マウスと交配させ、胚着床時期の子宮、傍大動脈リンパ節、血清をそれぞれ回収し、リンパ節および血液中のリンパ球の状態をflow cytometryにて比較検討した。プロピオン酸を単独で投与した群では、血清と傍大動脈リンパ節におけるTreg細胞の有意な増加を確認でき、他の投与方法では有意な変化は確認できなかった。妊娠成立への影響は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊治療の社会的需要の高まりと共に、その治療成績改善も強く求められている。子宮内環境の異常、すなわち、炎症や免疫寛容の異常、微生物環境の異常などが胚着床不全の原因として報告され、その安全な治療法の開発が必要である。我々は、腸内での短鎖脂肪酸が全身の免疫調節に重要な働きをすることに注目し、それが子宮内でも炎症の改善や免疫寛容を誘導し妊孕性改善へ向けた効果を発揮できると考えた。実際、プロピオン酸投与が子宮内環境を反映する所属リンパ節内でTreg細胞の誘導に働くことを明らかにした。これは腸内環境の調節により子宮内環境を改善できる可能性を示し、今後の不妊治療への応用を進める基礎的結果として重要である。

研究成果の概要(英文)：Immune response suppression by regulatory T cells (Treg cells) plays an important role in the establishment of pregnancy. In this research, we aimed to investigate whether short-chain fatty acids (SCFAs) induce regulatory T cells (Treg cells) in the uterus during pregnancy establishment and to understand the mechanism and effects of SCFAs on pregnancy. Female mice were given different types of short-chain fatty acids and then mated with male mice of different backgrounds. We collected uterus, para-aortic lymph nodes, and serum at 3.5 days post coitum (dpc), the time of embryo implantation, and compared the lymphocyte status in lymph nodes and blood using flow cytometry. We found that the group treated with propionic acid alone showed a significant increase in Treg cells in serum and para-aortic lymph nodes, but no significant changes were observed with other administration methods. However, we did not observe any effect on the establishment of pregnancy.

研究分野：生殖医療

キーワード：生殖医療 不妊症 胚着床 制御性T細胞 短鎖脂肪酸 妊娠

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠の成立および維持には、子宮内膜の適切な増殖と分化、ならびに胚受容能の獲得が不可欠である。最近の研究では、慢性子宮内膜炎やリンパ球分布異常に起因する免疫環境の異常が胚受容能の低下に関与していることが報告されている。また、父性抗原を含む配偶子および胚に対する子宮内膜間質の免疫寛容の誘導が妊娠成立に重要であり、その異常が着床障害、習慣性流産、妊娠高血圧症候群の発症に関与する可能性がある。制御性 T 細胞 (Treg) は免疫応答の抑制に重要な役割を果たし、正常妊娠では Th17 細胞の機能が抑制され Treg 細胞が優位となるが、原因不明不妊症の女性では Th17 細胞が優位となり免疫学的に不寛容な状況であることが示されている。Treg 細胞には胸腺由来の tTreg と末梢性の pTreg があり、流産例では tTreg および effector Treg の減少が観察される。体外受精 (IVF) における妊娠成功群と不成功群の比較では、妊娠成功群が Treg 細胞優位の免疫寛容を示す一方、不成功群は炎症性反応を示す。さらに、原因不明不妊症の子宮内膜では Treg 細胞のマーカーである Foxp3 の mRNA 発現が減少しており、流産例でも妊娠中の末梢血および子宮内膜で Treg 細胞が減少していることが報告されている。このことから、Treg 細胞の不足が不妊や流産の原因となる可能性が示唆される。しかし、原因不明不妊症においてなぜ Treg 細胞が誘導されないのか、またどのように治療が可能かについては未解明である。したがって、免疫異常を解決し、子宮内環境を免疫寛容状態へ誘導することが、原因不明不妊症および習慣性流産の治療成績の向上に寄与する可能性がある。リンパ球の免疫調節において、最近の研究では腸内細菌叢やそれが産生する短鎖脂肪酸が重要な役割を果たし、腸管に存在する腸内細菌は、局所の腸管免疫へ影響するだけでなく、全身性の免疫応答を刺激する作用がある事が報告されている。実際、短鎖脂肪酸のプロピオン酸をあたえたマウスでは末梢組織において分化した制御性 T 細胞がわずかに増加し、酪酸により修飾したデンブンをあたえたマウスでは末梢組織において分化した制御性 T 細胞が有意に増加することが報告されている。従って我々は、短鎖脂肪酸を投与することにより、腸管を介して末梢組織中の Treg 細胞の分化誘導を促し、それが子宮内の Treg 細胞の増加を介して免疫寛容を誘導することで、最終的に着床不全の病態を改善させることが可能であると考え、検討を行う。

2. 研究の目的

本研究では、短鎖脂肪酸の免疫調節機能を利用し、子宮内環境を免疫寛容に誘導し、子宮内膜の胚受容能障害を改善させる新たな治療戦略の確立を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、以下の方法を用いて短鎖脂肪酸の投与およびその影響を解析した。

1) 短鎖脂肪酸の投与

6週齢の C57BL/6Jc1 雌マウスに対して、プロピオン酸ナトリウム、酪酸ナトリウム、酢酸ナトリウムの 3 種の短鎖脂肪酸を混合、またはそれぞれ単独で飲用水に溶解して給水ボトルで投与した。これらの投与群と比較するために、Vehicle 群には水または NaCl を同様に給水ボトルで投与した。短鎖脂肪酸を単独で投与する際には、腸内細菌の影響を排除するために抗生物質を併用した。

2) 排卵誘発と交配、組織採取

排卵誘発と交配は、雌マウスに動物用セロトロピンとゴナトロピンを投与することで行い、交配翌日にプラグを確認した。妊娠 3.5 日目 (3.5dpc) に雌マウスを犠牲にし、血液、子宮、および子宮の流入領域リンパ節 (dLN) を採取した。

3) フローサイトメトリー

フローサイトメトリー解析では、採取した dLN をホモジナイズし、単細胞懸濁液を作製した。血液および dLN のリンパ球層を回収し、特定の細胞表面および細胞内マーカーに対する抗体で染色した。CD3 陽性、CD4 陽性細胞を T 細胞とし、そのうち Foxp3 陽性細胞を Treg 細胞、ROR γ t 陽性細胞を Th17 細胞と定義しました。データ解析はフローサイトメトリーソフトウェアを用いて行った。

4) RNA 抽出および qPCR

RNA 抽出および cDNA 合成では、採取した子宮組織から Total RNA を抽出し、cDNA を合成した。定量 PCR を用いて Foxp3 と β -actin の遺伝子発現レベルを解析し、相対的な発現量を比較した。

5) 統計解析

統計解析には EZR を用い、群間の比較には Mann-Whitney U 検定や Student-t 検定、複数群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を使用した。P 値が 0.05 未満を有意とした。

6) 動物実験の倫理的配慮

本研究は山形大学動物実験委員会の承認を得て実施されました。

4. 研究成果

本研究では、妊娠および非妊娠マウスにおける子宮流入領域リンパ節（dLN）および血液中の T 細胞分布の変化と、短鎖脂肪酸（SCFA）の影響を調査した。

1. 妊娠時と非妊娠時の T 細胞分布の変化

C57BL/6 雌マウスを妊娠群と非妊娠群に分け、妊娠群は交配し 3.5dpc に dLN と血液を採取し、それぞれの T 細胞分布の変化を調査した。

妊娠群と非妊娠群のマウスを比較した結果、妊娠群では dLN の CD3+CD4+細胞数が有意に増加し、これに伴い Foxp3+細胞数も増加する傾向が見られた。しかし、dLN 内の Foxp3+細胞および ROR t+細胞の割合には有意な差は認められなかった。血液中の T 細胞分布に関しても、両群間で有意な差は見られなかった。

2. 短鎖脂肪酸 3 種混合投与の影響

C57BL/6 雌マウスを短鎖脂肪酸投与群と Vehicle 群に分け、3.5dpc に dLN と血液を採取し、それぞれの T 細胞分布の変化と、短鎖脂肪酸（SCFA）がこれに与える影響を調査した。

短鎖脂肪酸 3 種混合投与の影響を調べたところ、dLN および血液中の CD3+CD4+細胞に占める Foxp3+細胞や ROR t+細胞の割合に有意な変化を認めなかった。ただし、血液中の Helios+細胞（tTreg 細胞）の割合は、短鎖脂肪酸投与群で有意に減少した。

3. 短鎖脂肪酸単独投与の影響

C57BL/6 雌マウスをプロピオン酸群、酪酸群、酢酸群、Vehicle 群に分け、3.5dpc に dLN と血液を採取し、それぞれの短鎖脂肪酸が T 細胞分布の変化を調査した。

短鎖脂肪酸を個別に投与した実験では、dLN においてプロピオン酸投与群の CD3+CD4+細胞に占める Foxp3+細胞の割合が有意に増加した。一方、酢酸投与群の血液中では、CD3+CD4+細胞に占める ROR t+細胞の割合が有意に低下し、Foxp3+/ROR t+比が有意に増加した。しかし、その他の T 細胞の分布には短鎖脂肪酸投与は有意な変化を与えなかった。

4. プロピオン酸投与が子宮 T 細胞に与える影響

C57BL/6 雌マウスをプロピオン酸投与群と Vehicle 群に分け、3.5 dpc に子宮を採取し Treg 細胞の分布を qPCR にて比較した。プロピオン酸の投与が妊娠初期の子宮内の Treg 細胞分布に与える影響を調べたところ、Foxp3 の mRNA 発現量に関しては、プロピオン酸投与群と Vehicle 群の間に有意な差は認められなかった。

総じて、妊娠は子宮流入領域リンパ節の CD3+CD4+細胞数の増加を伴い、プロピオン酸の単独投与は dLN における Treg 細胞の増加に影響を与えるものの、短鎖脂肪酸の全体的な T 細胞分布に対する影響は限定的であった。しかしながら、プロピオン酸による Treg 細胞の誘導効果は子宮内での免疫バランス調節に影響を与える可能性のある反応であり、今後もその妊娠に与える効果を検討継続する価値があるものと考ええる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Watanabe Norikazu, Kawagoe Jun, Sugiyama Akiko, Takehara Isao, Ohta Tsuyoshi, Nagase Satoru	4. 巻 89
2. 論文標題 Nuclear receptor coactivator 6 is essential for the morphological change of human uterine stromal cell decidualization via regulating actin fiber reorganization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 165 ~ 174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrd.23568	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takahashi K, Kawagoe J, Nagase S
2. 発表標題 Sodium propionate administration may promote the uterine immune tolerance by increasing the number of Foxp3+ Treg cells in uterine draining lymph nodes.
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2021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	永瀬 智 (Nagase Satoru) (00292326)	山形大学・医学部・教授 (11501)	
研究分担者	太田 剛 (Oota Tsuyoshi) (50375341)	山形大学・医学部・准教授 (11501)	
研究分担者	竹原 功 (Takehara Isao) (80642496)	山形大学・医学部・助教 (11501)	

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