

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14989

研究課題名（和文）MDSCの免疫抑制機構に着目した犬の胎子免疫寛容誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）The study of the mechanism of maternal-fetal immune tolerance in dogs focusing on MDSC

研究代表者

小林 正人（Kobayashi, Masato）

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：60898063

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）はT細胞活性を抑制して強力に免疫寛容を誘導するが、胎子免疫寛容におけるMDSCの役割は未だ不明である。本研究では妊娠犬の末梢血液中におけるMDSCを解析することで、妊娠に伴いMDSCが増加することを明らかにした。また、妊娠関連ホルモンとMDSCとの関連性を解析することで、リラキシンとMDSCで有意に相関していたことを発見し、リラキシンは単球系MDSCの誘導能とそれに関連した免疫抑制能を有していることを明らかにした。したがって、妊娠犬における単核系MDSCの増加はリラキシンが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、リラキシンのMDSC誘導能による免疫抑制作用を明らかにした。リラキシンは妊娠期間中のみ分泌されるホルモンのため、妊娠犬の母体免疫抑制にリラキシンが関与していると考えられる。胎子に対する母体免疫抑制（胎子免疫寛容）は正常な妊娠を行うために必要な機構であるが、この胎子免疫寛容が正常に誘導されない場合、着床不全や早期流産を引き起こすと考えられている。本研究により明らかになったリラキシンの免疫抑制機構は今後の胎子免疫寛容機構解明に重要な知見であり、不妊治療に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：MDSC suppress immune activity and maintain immune tolerance. However, the role of MDSC in maternal-fetal immune tolerance remains unclear. Herein, we investigated MDSC in the blood of pregnant canines and its induction mechanism. By analyzing MDSC in the blood of pregnant canines, elevation of MDSC which inhibit T cell activation has been observed. These results suggest that the elevated MDSC in canine pregnancy may contribute to reduces maternal immune activity. To clarify the cause of MDSC elevation in canine pregnancy, we analyzed the relationship between pregnancy-related hormones and MDSCs. Serum relaxin levels were correlated with the ratio of monocyte MDSC. Additionally, relaxin induced monocytic MDSC as well as inhibited T cell activation. Thus, relaxin contributes to the elevation of monocytic MDSC in the blood of pregnant canines. Our findings highlight the novel role of relaxin in pregnancy and contribute to a better understanding of maternal-fetal immune tolerance.

研究分野：獣医学

キーワード：胎子免疫寛容 リラキシン MDSC 妊娠 犬

1. 研究開始当初の背景

世界各国において盲導犬、介助犬や聴導犬などの補助犬が慢性的に不足していることは周知の事実であり、補助犬の安定的、効率的な繁殖は最も重要な課題の一つである。この問題の解決に凍結精液を用いた人工授精の活用は有効な手段であるが、母体や精液の状態に細心の注意を払ったとしてもその受胎率は 50-90% であり、性周期の関係で人工授精が年に 1~2 回しか行えないことを考えるとこの受胎率は決して高くはない。したがって、補助犬の安定的、効率的な繁殖を行うためには、人工授精における受胎率を向上させる必要があると考えられる。

母体にとって半異物である胎子が正常に発育することができるのは、胎子に対する母体免疫の攻撃が抑制 (胎子免疫寛容) されているためである。一方、この胎子免疫寛容が正常に誘導されない場合、母体免疫が胎子を排除するため、着床不全や早期流産を引き起こすと考えられている。着床不全や早期流産は人工授精における受胎率低下の要因であるため、胎子免疫寛容誘導メカニズムを解明できれば、人工授精の受胎率向上に寄与すると考えられるが、その誘導メカニズムは今のところわかっていない。骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) は、顆粒球、樹状細胞およびマクロファージに分化する前の未熟な細胞の中で、免疫反応の抑制能を有する細胞集団である。特に、MDSC はがんに対する免疫応答を抑制してがんの免疫寛容を誘導することが知られている。一方、犬の胎子免疫寛容における MDSC の役割は依然不明であり、MDSC は母体免疫を抑制することで胎子免疫寛容を誘導するかなどの問題が存在する。

2. 研究の目的

がんと同様に免疫から逃避することで、胎子は母体で発育することができるため、がんでは認められた免疫抑制機構が胎子に対しても働いている可能性が考えられる。そこで本研究では、がんの免疫寛容を誘導する MDSC の免疫抑制機構から、犬の胎子免疫寛容誘導メカニズムを解明することを目的とする。胎子免疫寛容は妊娠の成立、維持に極めて重要な機構であり、胎子免疫寛容が正常に誘導されない場合、着床不全や早期流産など不妊の原因となる。本研究では妊娠犬の末梢血液を用いて MDSC の解析を行い、犬の胎子免疫寛容に MDSC が関与するか解析する。また、MDSC の誘導機構を明らかにするために妊娠関連ホルモンと MDSC の関連性を解析するとともに、関連が認められたホルモンの MDSC 誘導能を解析する計画である。本研究により、犬の胎子免疫寛容誘導メカニズムが解明できれば、犬の不妊の病態解明に貢献できるとともに、新たな不妊治療の開発研究に展開できると考えられる。

3. 研究の方法

妊娠犬における MDSC の発現量解析

妊娠犬 5 頭から、妊娠 3 週目、妊娠 6 週目、妊娠 9 週目で採血を実施し、末梢血単核球 (PBMC) 中の MDSC とそのサブタイプである単球系 MDSC、および顆粒球系 MDSC の割合を解析した。CD11b⁺MHC class II⁻CD14⁺ 細胞を単球系 MDSC、CD11b⁺MHC class II⁻CD14⁻ 細胞を顆粒球系 MDSC として、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。

MDSC の T 細胞抑制能解析

妊娠で増加した MDSC の機能解析を実施するために、妊娠 9 週目の末梢血液から MDSC をソーティングにより分離した。また、末梢血液から PBMC を採取し、CFSE 染色を行ったのち 2×10^5 で 96 well プレートに播種した。その後、採取した MDSC を 0.5×10^5 および 0.25×10^5 で播種し、T 細胞活性にはコンカナバリン A を用いた。3 日間共培養を行い T 細胞の増殖率をフローサイトメトリー法により解析を行うとともに、培養上清中の IFN γ の発現量を ELISA により解析を行った。

妊娠関連ホルモンと MDSC 発現量の関連性の解析

妊娠犬 5 頭から、妊娠 3 週目、妊娠 6 週目、妊娠 9 週目で採血を実施し、血液中の妊娠関連ホルモン (エストロゲン、プロゲステロン、リラキシン) を測定した。また、各種ホルモンと MDSC の発現量との相関性を R 検定を用いて解析した。

リラキシンの MDSC 誘導能と免疫抑制能の解析

犬リラキシンリコンビナントタンパクを用いて、MDSC 誘導能と免疫抑制能を解析した。健常犬の末梢血液から PBMC を採取し、 1×10^6 になるように 6 well プレートに播種する。ついで犬リラキシンを 0-10 ng/ml の濃度で添加し、3 日間培養する。その後、MDSC の発現をフローサイトメトリーで解析するとともに、アポトーシスアッセイを行なった。免疫抑制能の解析には、採取した PBMC を用いて CFSE 染色を行い、 2×10^5 で 96 well プレートに播種した。犬リラキシンタンパクを 0-10 ng/ml の濃度でそれぞれ添加し、3 日間培養を行った。培養後、T 細胞活性処

置（コンカナバリン A）を行いさらに 3 日間培養した。T 細胞増殖率および IFN γ の発現を解析した。

4. 研究成果

妊娠犬における MDSC の発現量と機能解析

妊娠犬 5 頭から、妊娠 3 週目、妊娠 6 週目、妊娠 9 週目に採血を行い MDSC およびそのサブタイプである単球系 MDSC、顆粒球系 MDSC の発現を解析した。その結果、妊娠期間に関連して MDSC の発現量は増加し、妊娠 6, 9 週目では妊娠 3 週目と比較して有意に増加した。MDSC のサブタイプでは単球系 MDSC および顆粒球系 MDSC ともに妊娠期間に関連して増加し、顆粒球系 MDSC は妊娠 9 週目で有意に増加がみられ、単球系 MDSC では妊娠 6 週目から有意差が認められた。次に、妊娠 9 週目の PBMC から MDSC をソーティングにより採取し、MDSC の機能解析を行った。その結果、MDSC により T 細胞の増殖率は低下し、さらに炎症性サイトカインである IFN γ の発現量が減少した。したがって、妊娠により増加した MDSC は T 細胞抑制能を有していることが示された。

妊娠関連ホルモンと MDSC 発現量の関連性の解析

妊娠期間中のエストロゲン、プロゲステロンおよびリラキシンの血液濃度を解析し、MDSC との相関性を検討した。妊娠犬では妊娠期間中エストロゲンの発現は認められない一方で、プロゲステロンおよびリラキシンの発現が認められた。MDSC との相関性を解析すると、プロゲステロンと単球系 MDSC および顆粒球系 MDSC との相関性は認められなかった ($R < 0.01$)。一方、リラキシンと単球系 MDSC および顆粒球系 MDSC との相関性は $R = 0.66$ および $R = 0.77$ で相関が認められた。

リラキシンの MDSC 誘導能と免疫抑制能の解析

妊娠犬においてリラキシンと MDSC との相関が認められたため、リラキシンにより MDSC が誘導されている可能性が考えられた。そこで、犬リラキシンリコンビナントタンパクを用いて MDSC 誘導能を解析した。PBMC にリラキシン 0-10 ng/ml を投与して MDSC の割合を解析するとリラキシン 1 ng/ml から有意に MDSC が増加した。サブタイプでは顆粒球系 MDSC はリラキシンに関係なく増加は認められなかったが、単球系 MDSC はリラキシン 1 ng/ml の濃度で有意に増加した。また、この濃度のリラキシンでは PBMC のアポトーシスは認められなかった。そのため、リラキシンは単球系 MDSC を誘導すると考えられた。

次にリラキシンによる T 細胞抑制能を解析するとリラキシン 1 ng/ml から T 細胞活性を有意に抑制した。以上から、リラキシンは T 細胞抑制能を有しており、これは単球系 MDSC を誘導することで T 細胞活性を抑制している可能性が示唆された。

以上の研究結果により、リラキシンの新たな免疫抑制能が解明され、今後の胎子免疫寛容研究において重要な知見になると考えられた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kobayashi Masato, Sekine Honami, Ogawa Yushi, Toyama Shin, Komukai Yuki, Nakamura Moto, Mitanda Ryusuke, Hayashi Marina, Kobayashi Masanori, Hori Tatsuya	4. 巻 155
2. 論文標題 Relaxin contributes to the elevation of monocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood of pregnant canines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103778 ~ 103778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jri.2022.103778	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi Masanori, Onozawa Moe, Watanabe Shiho, Nagashima Tomokazu, Tamura Kyoichi, Kubo Yoshiaki, Ikeda Akiko, Ochiai Kazuhiko, Michishita Masaki, Bonkbara Makoto, Kobayashi Masato, Hori Tatsuya, Kawakami Eiichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Establishment of a <sc>BRAF V595E</sc> mutant canine prostate cancer cell line and the antitumor effects of <sc>MEK</sc> inhibitors against canine prostate cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 221 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12879	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 該当する

1. 著者名 Ikeda Akiko, Kobayashi Masanori, Hori Tatsuya, Michishita Masaki, Kobayashi Masato, Kawakami Eiichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Histopathological Characterization and Expression of Vitamin D Receptor in the Prostate of Healthy Dogs and Dogs with Prostatic Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Animal and Veterinary Sciences	6. 最初と最後の頁 47 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3844/ajavsp.2023.47.51	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 該当する

1. 著者名 HORI Tatsuya, TAJIMA Hideo, SASAKI Shinichi, KARASAWA Mizuki, YOSHIZAWA Madoka, KURIBARA Takuya, HORI Hidemasa, YAMAMOTO Fujio, NARUSHIMA Etsuo, NAGAI Kiyoshi, NIPPASHI Kazuaki, SATAKA Yurie, KOBAYASHI Masato, KOBAYASHI Masanori, TSUTSUI Toshihiko	4. 巻 85
2. 論文標題 Quality of cauda epididymal sperm immediately after collection and after freezing-thawing from Amur leopard cats (<i>Prionailurus bengalensis euptilurus</i>) and a local population of the subspecies Tsushima leopard cats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 117 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0230	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 該当する

1. 著者名 KOBAYASHI Masanori, TSUZUKI Chie, KOBAYASHI Marika, TSUCHIYA Hinano, YAMASHITA Yume, UENO Kanako, ONOZAWA Moe, KOBAYASHI Masato, KAWAKAMI Eiichi, HORI Tatsuya	4. 巻 83
2. 論文標題 Effect of supplementation with the reduced form of coenzyme Q10 on semen quality and antioxidant status in dogs with poor semen quality: Three case studies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1044 ~ 1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0174	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 該当する

〔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 小林正人, 小林正典, 堀達也
2. 発表標題 犬におけるリラキシンのMDSC誘導能と胎子免疫寛容機構の解明
3. 学会等名 第165回 日本獣医学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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