

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16764

研究課題名(和文)単一T細胞トランスクリプトーム解析による妊娠高血圧腎症治療のバイオマーカー探索

研究課題名(英文)Single T cell transcriptome analysis for biomarker discovery in the treatment of preeclampsia.

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：正常妊娠初期4例、正常妊娠後期3例、妊娠高血圧腎症(PE)3例の脱着膜CD4+T細胞をscRNAseqに供した。子宮内膜CD4陽性T細胞は、ナイーブ、濾胞性T細胞様、メモリー型、Th1/Th2中間型(7-Th1/Th2 int)、Th1、PRF+活性化型、FOXP3-Treg、Th17、FOXP3+Tregからなるヘテロな集団であった。クラスター毎の発現変動遺伝子解析では、PEでは妊娠後期に比べ、メモリーとTh1/Th2 intでT細胞活性化関連遺伝子の発現が上昇していた。さらに、PEでは、FOXP3+TregにおいてPDCD1をはじめとした疲弊関連遺伝子の発現が増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児は母体にとって半異物であるが妊娠が維持される。免疫応答を抑える働きを持つ制御性T細胞性のT細胞の働きも必要である。妊娠高血圧腎症(PE)では、両者のバランスの不均衡により胎盤に拒絶反応が生じることが指摘されていたが、詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、ヒトのPEの子宮では、炎症性CD4+ T細胞の一部で活性化を示す遺伝子の発現が上昇し、Tregでは疲弊して働きが低下することを示す遺伝子発現が上昇することを発見した。治療標的となりうるT細胞分画と分子の候補が明らかとなり、新規免疫学的治療開発への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Decidual CD4+ T cells from 4 healthy early pregnancies, 3 healthy late pregnancies, and preeclampsia (PE) cases were subjected to scRNAseq. The decidual CD4+ T cells were a heterogeneous population consisting of naive, follicular T cells, memory, Th1/Th2 intermediate type (7-Th1/Th2 int), Th1, PRF+ activated, FOXP3-Treg, Th17 and FOXP3+Treg. Differentially expressed gene analysis in each cluster showed that the expression of T cell activation-related genes was elevated in PE compared to late gestation in memory and Th1/Th2 int. In addition, the expression of PDCD1 and other exhaustion-related genes was significantly elevated in FOXP3+Tregs in PE.

研究分野：生殖免疫

キーワード：妊娠高血圧腎症 脱着膜 妊娠 制御性T細胞 CD4陽性T細胞 シングルセルトランスクリプトーム解析 T細胞受容体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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異物である父親由来抗原を発現するが、妊娠中は母子間免疫寛容が成立しているため拒絶されない。一方で、妊娠中でも外来微生物に対する免疫応答は維持されている。すなわち、母子間免疫寛容の本質は、父親抗原に特異的な免疫寛容が成立していることにある。母体の細胞障害性 T 細胞 (CTL) や CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (CD4+T 細胞) は T 細胞受容体 (TCR) で胎児抗原を認識し攻撃しうるが、免疫応答を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) により抑制される。CTL、CD4+T 細胞、Treg の適正なバランスが正常な妊娠維持に重要である。

妊娠高血圧腎症 (PE) は、胎盤形成不全を背景とし、母体高血圧・蛋白尿・胎児胎盤循環不全を呈する妊娠合併症である。根本的治療は妊娠の終結のみであり、早発型・重症型は管理に難渋することが多い。母子間免疫寛容の破綻が PE の発症にかかわっていることが報告されている。我々は、これまで妊娠女性の子宮内膜ならびに末梢血より取得した単一 T 細胞から TCR レパートリー (特定の TCR 配列を有するクローンが多く出現しバリエーションが偏っているのか、あるいは多様であるのか) を解析することで、PE では“特定の TCR を有する抗原特異的 Treg”の増加が不十分 (Tsuda S et al. *Front Immunol.* 2018.) である一方、“抗原特異的 CTL”における抑制型補助刺激分子 (PD-1) の発現が低下していることを報告してきた (Morita K, Tsuda S, et al., *Front Immunol.* 2020.)。すなわち、子宮局所での抗原特異的 Treg (=免疫寛容誘導) の誘導不全と、抗原特異的 CTL (=拒絶反応) の抑制が不十分であることが PE の形成に関与することを示唆する。

そのため、抗原特異的 Treg の誘導と機能強化、あるいは炎症を惹起する CTL・CD4+T 細胞の活性抑制が PE の免疫学的治療となりうる。T 細胞は TCR で抗原を特異的に認識し、さらに転写因子や補助刺激分子が作用することで機能を発揮する。したがって、T 細胞上の標的となる病態関連分子を同定する必要があるが、これまでの研究では明らかにできていない。

2. 研究の目的

- (1) 脱落膜 CD4+T 細胞と Treg の多様性ならびに妊娠時期での変化を明らかにする。
- (2) PE の病態に関連するサブセットならびに分子を明らかにする。

3. 研究の方法

正常妊娠初期 (人工妊娠中絶)、正常妊娠後期、PE 患者を対象とする。手術 (帝王切開または子宮内容除去術) にて娩出された脱落膜 (妊娠時の子宮内膜) からリンパ球を分離する。CD4+T 細胞 (ヘルパー CD4+T 細胞、Treg を含む) セルソーターで分離し、BD Rhapsody single cell analysis system で単一細胞から cDNA テンプレート作成を行う。その後、単一細胞 TCR レパートリー解析 (scTCRseq) と、単一細胞網羅的 mRNA 発現解析 (scRNAseq) のための cDNA 増幅・ライブラリー調整を施行する。次世代シーケンサーによる sequencing を行い、データ解析を施行する。

mRNA 発現パターンを基に Treg と CD4+T 細胞のクラスタリングを行う。mRNA 発現パターンをクラスター毎に正常妊娠と PE で比較し病態関連分子を同定する。TCR のアミノ酸配列を解析し、クラスター毎にクローナリティー高いクローンを同定する。クローナルに増加した細胞のサブセット間の分布を調べることで、分化過程を検証する。

4. 研究成果

正常妊娠初期脱落膜 CD4+T 細胞 4 例、正常妊娠後期脱落膜 CD4+T 細胞 3 例、PE 脱落膜 CD4+T 細胞 3 例、正常妊娠後期末梢血 CD4+T 細胞 1 例 (正常妊娠後期脱落膜 1 例と同じ対象由来) を scRNAseq に供した。このうち、正常妊娠初期脱落膜 2 例、正常妊娠後期脱落膜 1 例、正常妊娠後期末梢血 1 例、PE 脱落膜 1 例は同時に scTCRseq も行った。

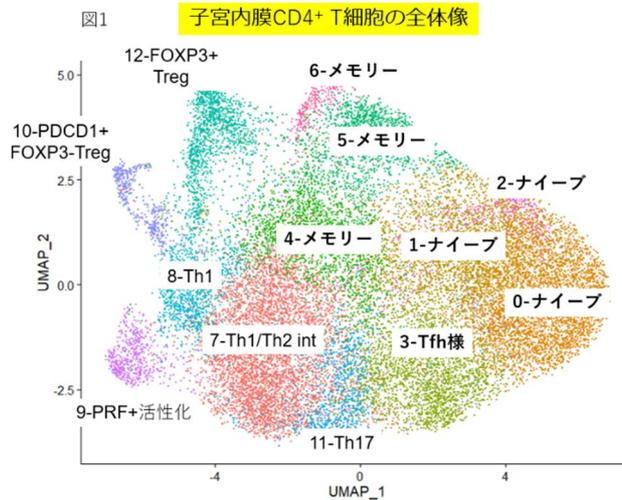
(1) 脱落膜 CD4+T 細胞と Treg の多様性ならびに妊娠時期での変化

子宮内膜 CD4 陽性 T 細胞は、1) ナイーブ型 (0 - 2 ナイーブ)、2) 濾胞性 T 細胞様クラスター (3-Tfh 様)、3) メモリー型 (4 - 6 メモリー)、5) Th1/Th2 中間型 (7-Th1/Th2 int)、6) Th1 型 (8-Th1)、7) パーフォリン (PRF)+活性化型 (9-PRF+Tct)、8) FOXP3-Treg (10-PDCD1+FOXP3-Treg)、9) Th17 型 (11-Th17)、10) FOXP3+Treg (12-FOXP3+Treg) の 13 クラスターからなるヘテロな集団であった (図 1) (Tsuda S. et al., *Frontiers in Immunology*, 2024)。

クローナルに増加した T 細胞は主として Th1/Th2 int、Th1、PRF+活性化、FOXP3+Treg クラスターに存在しており、これらのクラスターは抗原刺激を受け活性化・分化したと考えられた。このうち、FOXP3+Treg のみ妊娠初期ではクローナルな細胞は見られず (0%)、正常妊娠後期と PE でのみクローナルな細胞 (17-33%) が出現していた。これは我々の既報と一致しており、

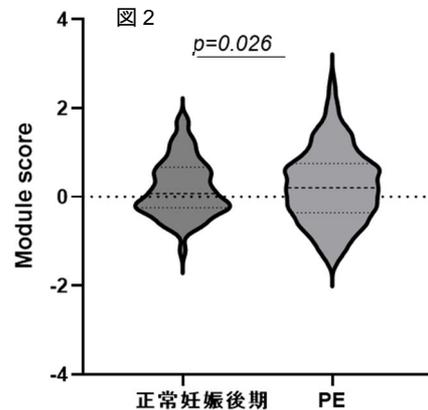
Treg は妊娠週数が進むにつれ抗原刺激をうけ増加していくと考えられた。

正常妊娠初期と正常妊娠後期でクラスター毎に発現変動遺伝子を解析したところ、5-メモリー、7-Th1/Th2 int、12-FOXP3+Treg の3クラスターに変動が集中していた。3クラスターに共通して細胞移動・活性化関連遺伝子が妊娠後期で低下していたが、FOXP3+Treg では免疫抑制機能に関するLGALS1、CTLA4の発現が妊娠後期で上昇していた (Tsuda S. et al., *Frontiers in Immunology*, 2024)。妊娠後期は初期に比較し総じてCD4+T細胞の活性が低下するが、FOXP3+Treg では免疫抑制機能の上昇を示唆する所見も同時に見られることが明らかとなった。



(2) PE の病態に関連するサブセットならびに分子

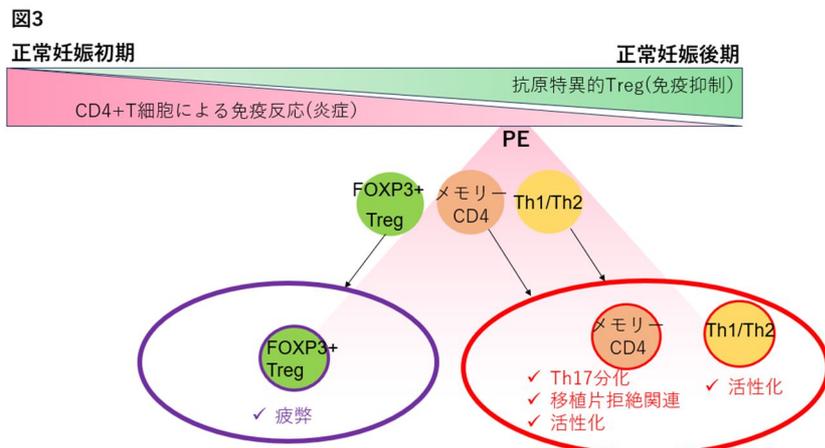
正常妊娠後期とPEの比較でも、同様に5-メモリー、7-Th1/Th2 int、12-FOXP3+Tregの3クラスターに発現変動遺伝子が集中していた。5-メモリークラスターではT細胞活性化・Th17分化・移植片拒絶関連遺伝子の発現がPEで増加していた。7-Th1/Th2 intでは、T細胞活性化関連遺伝子の発現がPEで増加していた。一方、12-FOXP3+TregではPDCD1をはじめとした疲弊関連遺伝子の発現が増加していた。既報で、Treg疲弊・機能不全に関与することが示されている遺伝子セット (TNFRSF18, TNFRSF4, PDCD1, IFNG, LAG3, CCR5, CXCR3, CCR6, HAVCR2, CXCR6, NKG7, SLAMF1, KLRB1, CD2, CXCR1) の発現スコア (module score) を12-FOXP3+Tregにおいて比較すると、PEが正常妊娠後期より有意に高値であった (p = 0.026) (図2) (Tsuda S. et al., *Frontiers in Immunology*, 2024)。



12-FOXP3+Tregをさらに詳細なサブクラスター解析に供すると、既報と類似した、免疫抑制活性が弱いナイーブTreg、免疫抑制活性を有さないFOXP3+活性化T細胞様クラスター、免疫抑制活性の高いエフェクターTreg様クラスターを認めた。この中で、クロナルな細胞が増加していたのは既報と同様エフェクターTregクラスターであった。PEにおけるTreg疲弊関連分子の発現増強はエフェクターTregでのみ認められた。

以上より、正常妊娠後期ではメモリー・Th1/Th2 intクラスターの活性が妊娠初期より低下するが、PEでは逆に活性が上昇することが明らかとなった(図3)。一方、FOXP3+TregサブセットはPEで疲弊分子の発現優位に上昇していた(図3)。

さらに、疲弊分子の上昇は、抗原特異的応答を担い免疫抑制活性の高いエフェクターTregに起因していた。メモリー・Th1/Th2 intの活性抑制あるいは、Tregサブセットの疲弊解除がPE治療の戦略になりうると思われる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furuta A, Shima T, Yoshida-Kawaguchi Mihoko, Yamada K, Yasuda I, Tsuda S, Yamaki-Ushijima A, Yoneda S, Higashisaka K, Cheng SB, Matsumoto K, Tsutsumi Y, Sharma S, Saito S, Nakashima A	4. 巻 155
2. 論文標題 Chloroquine is a safe autophagy inhibitor for sustaining the expression of antioxidant enzymes in trophoblasts.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Reprod Immunol.	6. 最初と最後の頁 103766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2022.103766. Epub 2022 Nov 24.	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 Araishi K, Shima T, Yasuda I, Tsuda S, Morita K, Yamaki-Ushijima A, Nakashima A, Saito S	4. 巻 155
2. 論文標題 Dynamics of neuropilin1 (Nrp1)-positive thymus-derived and Nrp1-negative peripherally induced paternal antigen specific regulatory T cells in the uterus and spleen during pregnancy in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Reprod Immunol	6. 最初と最後の頁 103792
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2022.103792. Epub 2022 Dec 29.	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 Nakashima A, Shima T, Aoki A, Kawaguchi M, Yasuda I, Tsuda S, Yoneda S, Yamaki-Ushijima A, Cheng SB, Sharma S, Saito S.	4. 巻 82
2. 論文標題 Molecular and immunological developments in placentas.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Immunology	6. 最初と最後の頁 317-324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.humimm.2021.01.012.	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 Nakashima A, Shima T, Tsuda S, Aoki A, Kawaguchi M, Furuta A, Yasuda I, Yoneda S, Yamaki-Ushijima A, Cheng SB, Sharma S, Saito S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Aggrephagy Deficiency in the Placenta: A New Pathogenesis of Preeclampsia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052432.	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 Yoneda N, Yoneda S, Tsuda S, Ito M, Shiozaki A, Niimi H, Yoshida T, Nakashima A, Saito S.	4. 巻 29
2. 論文標題 Pre-eclampsia Complicated With Maternal Renal Dysfunction Is Associated With Poor Neurological Development at 3 Years Old in Children Born Before 34 Weeks of Gestation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Pediatr	6. 最初と最後の頁 624323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2021.624323.eCollection 2021.	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 Honoki H, Yagi K, Tsuda S, Wada T, Enkaku A, Nakagawa-Yokoyama M, Kamigishi M, Shikata M, Takikawa-Nishiday A, Fujisaka S, Chujo D, Sasaoka T, Nakashima A, Saito S, Tobe K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Type 1 diabetes woman with repeated miscarriages successfully gave birth after introducing an insulin pump with a predictive low glucose suspend feature.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetol Int	6. 最初と最後の頁 324-329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13340-020-00489-9. eCollection 2021 Jul.	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 Arai NA, Yoneda S, Yoneda N, Ito M, Tsuda S, Shiozaki A, Nohira T, Hyodo H, Kumazawa K, Suzuki T, Nagasaki S, Makino S, Saito S.	4. 巻 48
2. 論文標題 Probiotics including Clostridium butyricum, Enterococcus faecium, and Bacillus subtilis may prevent recurrent spontaneous preterm delivery.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	6. 最初と最後の頁 688-693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.15166. Epub 2022 Jan 26.	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 Saito Shigeru, Tsuda Sayaka, Nakashima Akitoshi	4. 巻 159
2. 論文標題 T cell immunity and the etiology and pathogenesis of preeclampsia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 104125 ~ 104125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jri.2023.104125	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 Nakashima Akitoshi, Furuta Atsushi, Yoshida Kawaguchi Mihoko, Yamada Kiyotaka, Nunomura Haruka, Morita Keiko, Yasuda Ippei, Yoneda Satoshi, Yamaki Ushijima Akemi, Shima Tomoko, Tsuda Sayaka	4. 巻 91
2. 論文標題 Immunological regulation and the role of autophagy in preeclampsia	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13835	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 Sayaka, Shichino Shigeyuki, Tilburgs Tamara, Shima Tomoko, Morita Keiko, Yamaki-Ushijima Akemi, Roskin Krishna, Tomura Michio, Sameshima Azusa, Saito Shigeru, Nakashima Akitoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 CD4+ T cell heterogeneity in gestational age and preeclampsia using single-cell RNA sequencing	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1401738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2024.1401738	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 該当する

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 津田 さやか
2. 発表標題 T細胞免疫の観点からみた妊娠維持機構と早産予防対策への提言.
3. 学会等名 第38回日本産婦人科感染症学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sayaka Tsuda, Keiko Morita, Akemi Ushijima, Tomoko Shima, Akitoshi Nakashima, Shigeru Saito
2. 発表標題 Single-cell transcriptome and T cell receptor analysis revealed the diversity and phenotypic characteristics of decidual CD4+ T cells in normal pregnancies and preeclampsia.
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津田 さやか
2. 発表標題 T細胞による胎児の認識と許容のメカニズム解明への挑戦
3. 学会等名 第37回日本生殖免疫学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津田 さやか
2. 発表標題 妊娠合併症におけるT細胞免疫の基礎と免疫療法への展望.
3. 学会等名 第96 回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津田 さやか
2. 発表標題 合併症を持つ女性が安全に妊娠・出産するために～プレコンセプションケアの現場から～.
3. 学会等名 富山県薬剤師会「妊産婦服薬支援のための薬剤師サポート機能強化事業」研修会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津田さやか, 森田恵子, 七野成之, 島友子, 岸裕幸, 齋藤滋
2. 発表標題 単一T細胞解析による母子間免疫寛容のメカニズム解明への挑戦
3. 学会等名 第36回日本生殖免疫学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田さやか
2. 発表標題 不育症や自己免疫性疾患を有する女性のプレコンセプションカウンセリング
3. 学会等名 第33回富山県母性衛生学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 津田さやか
2. 発表標題 妊娠におけるT細胞免疫の不均一性を解明する.
3. 学会等名 第5回日本不育症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Tsuda S, Saito S, Gil M	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 462
3. 書名 Reproductive Immunology Basic Concepts volume1	

1. 著者名 藤井知行、永松 健、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 392
3. 書名 分娩・産褥期の正常と異常 / 周産期感染症	

〔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
研究協力者	中島 彰俊 (Nakashima Akitoshi)		
研究協力者	島 友子 (Shima Tomoko)		
研究協力者	齋藤 滋 (Shigeru Saito)		
研究協力者	森田 恵子 (Keiko Morita)		
研究協力者	鮫島 梓 (Sameshima Azusa)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	七野 成之 (Shichino Shigeyuki)		
研究協力者	戸村 道夫 (Tomura Michio)		
研究協力者	ティルバーグス タマラ (Tilburgs Tamara)		

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			
米国	Cincinnati Children's Hospital			