

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592485

研究課題名(和文)アロ免疫によるマウス流産モデルに対する免疫学的介入の研究

研究課題名(英文)Immunological analysis of immune-mediated pregnancy loss.

研究代表者

相澤 志保子(AIZAWA, Shihoko)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：30513858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：不育症の免疫学的背景解析のため、マウスの流産モデルを用いて研究を行った。食肉類を宿主とする寄生虫 *Dirofilaria immitis* 由来のタンパク抗原(rDiAg)には免疫調節効果があり、流産を抑制するためマウスを宿主とする寄生虫 *Nippostrongyls brasiliensis* の抽出物でも同様に検討を行ったが、流産抑制効果は見られなかった。制御性T細胞(Treg)は妊娠免疫寛容に重要であるが、rDiAgと柴苓湯を投与したマウスにおける検討では、Tregの変動は見られなかった。妊娠子宮内の免疫担当細胞の詳細な検討の結果、Treg以外の制御性細胞の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported recombinant *Dirofilaria immitis* polyproteins (rDiAg) treatment reduced the resorption rates of CBA/J×DBA/2J mouse model, which mimic human pregnancy failures with allo-immune backgrounds. In the present study, we examined possible immune-regulation of *Nippostrongyls brasiliensis* (Nb) which parasites mice as natural host. However the extract from Nb did not reduce abortion rate in the model system. Then we checked the intrauterine immune cells after administration of rDiAg and Saireito. Though importance of regulatory T cell (Treg) is well known to maintain pregnancy, no significant changes in Treg ratio were observed in both systems. Taken together, we suggest other regulatory cells for successful pregnancy.

研究分野：生殖免疫

キーワード：不育症 流産 寄生虫 生殖免疫 制御性T細胞 NK細胞

1. 研究開始当初の背景

原因不明の不育症には免疫の関与が推定され、ステロイドや免疫グロブリン、抗サイトカイン療法が有効とする報告もあるが、エビデンスは確立していない。我々はマウスモデルを用いて、アレルギーや自己免疫性疾患に対する有用性が報告されている寄生虫由来免疫抑制物質ならびに臨床の場で不育症患者に処方されることの多い漢方薬の流産抑制効果を明らかにした。しかしその免疫学的メカニズムの詳細は不明である。

2. 研究の目的

流産抑制マウスモデルを用い、妊娠維持に関わるアロ免疫応答の制御とその機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物

CBA/J、DBA/2J および C57BL/6 メスならびにオスマウスを日本クレア、オリエンタル酵母から購入し、実験に供した。動物実験においては、本学の動物実験委員会の承認を得て行った。

(2) rDiAg 投与実験

麻酔下に 8~10 週齢の CBA/J メスマウスの背部皮下に無菌的にオスモティックポンプの植え込み手術を行い、100mg/匹の rDiAg を 14 日間にわたり持続的に投与した。CBA/J もしくは DBA/2J オスマウスと交配し、腔栓を確認した日を妊娠 0.5 日とした。妊娠 14.5 日に解剖し、生存胎仔数と吸収胎仔数を判定し、脾臓、脱落膜から細胞を分離した。

(3) *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) の抽出物投与実験

Nb 抽出物をリン酸緩衝液で希釈し、等量のオリーブオイルと混合してミセル状にした。CBA/J メスマウス (7w) に経口投与用のカテーテルを用いて Nb 抽出物を 150~300mg/ml/頭の用量で経口投与した。経口投与後 7 日目から

DBA/2J 雄マウスと交配し、腔栓の確認できた日を妊娠 0.5 日とした。妊娠 7.5 日に流産を誘導する目的で、poly(I:C) (200mg/頭) を腹腔内投与した。妊娠 14.5 日に解剖し、流産率を検討した。

(4) 柴苓湯投与実験

マウスの体重や一日摂餌量から、柴苓湯の投与量を換算し、通常のマウス飼料に混入させた特殊飼料を作成して、CBA/J メスマウスに摂取させた。DBA/2J オスマウスと交配させ、妊娠 7.5 日目に流産を誘導するために poly(I:C) を腹腔内投与した。妊娠 14.5 日目に解剖し、胎盤・脱落膜の組織学的検討を行った。

(5) 母獣の脾臓リンパ球、脱落膜リンパ球のフローサイトメトリー

同系と異系妊娠における免疫応答を検討するため、CBA/J × CBA/J、CBA/J × DBA/2J、CBA/J × C57BL/6、C57BL/6 × C57BL/6 のメス × オスの組合せで交配し、妊娠 13-15 日で解剖し、脾臓、脱落膜から細胞を分離した。(2),(4)の実験で得られた細胞も同様に検討した。細胞を anti-mouse CD3, CD19, CD25, CD49b, FoxP3, CD1d, CD5 などで染色し、フローサイトメーターを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 柴苓湯は胎盤・脱落膜細胞のアポトーシスを抑制する

柴苓湯は、不育症患者に対し、広く使用されている漢方薬の一つである。我々は、既に流産モデルマウスにおいても、柴苓湯の流産抑制効果を確認している。その流産抑制のメカニズムを解析するために、流産モデルマウスに柴苓湯を経口投与し、妊娠 14.5 日目に胎盤・脱落膜の組織学的検討を行った。その結果、対照群と比較して、柴苓湯群ではアポトーシス細胞の減少を認めた。この結果より、柴苓湯は、胎盤・脱落膜細胞のアポトーシス

を抑制することにより、十分な胎盤形成を促し、流産を抑制する可能性が示唆された。

(2) マウスを宿主とする寄生虫

Nippostrongylus brasiliensis (Nb)の抽出物には流産抑制効果を認めない

われわれは、食肉類を宿主とする寄生虫 *Dirofilaria immitis*由来のタンパク抗原が免疫調節機能を有することから、そのリコンビナントタンパクに流産抑制効果があることを以前報告した。そこで、今回はマウスを宿主とし、免疫抑制作用が報告されている寄生虫 *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb)の抽出物についても、同様に検討を行った。その結果、Nb投与群では対照群と比較し、流産率の改善を認めず、むしろ悪化がみられた。



Nb 群 流産率 100%

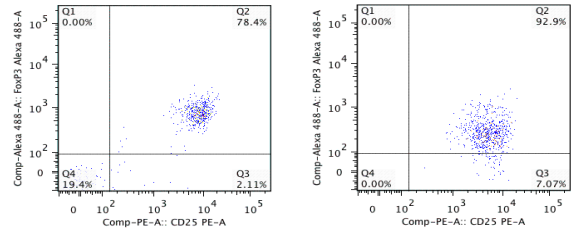
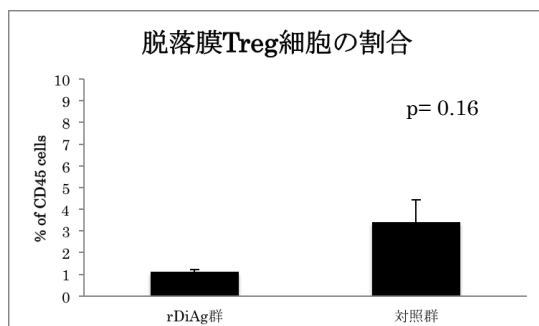


対照群 (PB 投与群) 流産率 42%

母獣脱落膜の制御性Tリンパ球 (Treg) 数をフローサイトメーターで検討したところ、両群で差を認めなかった。寄生虫種により、異なった免疫制御作用があると考えられた。

(3) 脱落膜制御性T細胞数はrDiAgと柴苓湯投与の影響を受けない

rDiAgによる流産抑制効果のメカニズム探索のため、妊娠子宮内のTreg細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、子宮内CD45陽性細胞に占めるTreg細胞にはrDiAg群と対照群の間で有意な差を認めなかった。



rDiAg 群

対照群

FoxP3
CD25

(死細胞を除去した後、CD45+CD3+CD4+細胞にゲートをかけて解析した)

同様に柴苓湯投与マウスでも検討を行ったが、対照群と比較し、Treg 細胞数の有意な増加は認めなかった。

また、CBA/J 非妊娠メスマウスに rDiAg を投与し、3 日目、7 日目にフローサイトメトリーにて脾臓細胞における Treg を解析した。その結果、脾臓細胞における Treg には変動が見られなかった。

(4) 妊娠子宮内には Treg 以外の制御性細胞が存在する

同系と異系妊娠における Treg を含む子宮内の免疫担当細胞を検討するため、CBA/J × CBA/J、CBA/J × DBA/2J、CBA/J × C57BL/6、C57BL/6 × C57BL/6のメス × オスの組合せで交配し、妊娠 13-15 日で解剖し、脾臓、脱落膜から細胞を分離し、フローサイトメトリーで検討した。その結果、子宮内膜には Treg の他にも制御性 B 細胞やその他の自然リンパ球が存在することが明らかになった。また、それらの細胞は妊娠時に増加傾向がみられた。

< 引用文献 >

Komine-Aizawa S, Izumi Y, Imai S, Fujita K, Hayakawa S. The therapeutic potential of the recombinant antigen from *Dirofilaria immitis* (rDiAg) for immune-mediated pregnancy loss. *Journal of Reproductive Immunology*. 2011 Dec;92(1-2):21-26. Epub

2011 Oct 7.

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)

相澤(小峯)志保子, 早川 智: CBA/J x DBA/2J 流産マウスモデルにおける“当归芍薬散”“柴苓湯”の効果. 産婦人科漢方研究のあゆみ, 29巻: 71-73, 2012. 査読なし

[学会発表](計2件)

相澤志保子. 生殖免疫学領域における動物モデル. 第42回日本臨床免疫学会. 2014年9月25日. 京王プラザホテル(新宿区、東京)

相澤志保子, 早川 智. アロ免疫による流産マウスモデルに対する新たな治療戦略と免疫学的解析. 第40回日本臨床免疫学会総会. 2012年09月27日~2012年09月29日. 京王プラザホテル(新宿区、東京)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相澤 志保子 (AIZAWA, Shihoko)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 30513858

(2) 研究分担者

早川 智 (HAYAKAWA, Satoshi)
日本大学・医学部・教授
研究者番号: 30238084

(3) 連携研究者

()

研究者番号: