

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2015
課題番号：25861476
研究課題名(和文)CD1d-iNKT系が妊娠に及ぼす影響についての検討

研究課題名(英文)The effects of CD1d-iNKT system on pregnancy

研究代表者

河合 有希 (KAWAI, Yuki)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：70646463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗炎症作用をもつ 3脂肪酸を高濃度に発現する fat-1マウスを用い、NKTを標的とした流早産モデルに応用することで 3脂肪酸の抗炎症作用を解明し、流早産の治療法の糸口を見出すことを目的とした。妊娠した fat-1マウスにNKT細胞を賦活化させる物質(AGC)を投与し流早産率をコントロール群と比較したところ、fat-1マウスで有意に流早産率が低率であることがわかった。また同時に脾臓細胞のサイトカイン誘導性の違いを評価したところ、fat-1マウス由来の脾臓細胞でIL-4の分泌が増加していた。このことから 3脂肪酸優位な体内環境ではiNKT細胞がTh2優位な免疫誘導をすることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fat-1 mice express 3 fatty acids have anti-inflammatory effects at a high concentration. Alpha-GalCer (AGC) stimulates Th1 polarity of iNKT cells, whereas OCH Th2 polarity. AGC was injected to pregnant fat-1 mice and pregnant Wild type(WT)mice. The rate of miscarriage at pregnant fat-1 mice was lower than that of pregnant WT mice, and the secretion of IL4 in the splenocyte was higher in fat-1 mice than that in WT mice. AGC and OCH were injected to pregnant WT mice. Additionally, the effect on Th1/Th2 polarity shift was examined by measuring IL4/IFN-G mRNA expression ratio in the splenocytes. The rate of in-utero fetal absorption was significantly lower in OCH administration than that in AGC administration. AGC stimulation up-regulated IFN-G OCH stimulation preferentially induced IL-4 expression rather than IFN-G in the splenocytes, whereas the IL-4 induction after AGC stimulation was weak. Th2 polarity but not Th1 induced by iNKT stimulation is protective against the miscarriage.

研究分野：不育症

キーワード：不育症 妊娠免疫 CD1d NKT

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群は抗リン脂質抗体が陽性で、かつ血小板減少症、血栓症、または流産のいずれかを臨床症状を認める症候群である。周産期領域でも様々な臨床研究がなされ、抗リン脂質抗体症候群が習慣流産のみならず、妊娠 10 週以降の原因不明の子宮内胎児死亡、妊娠高血圧症候群、また胎児発育不全とも強く関連していることが明らかになってきた。

抗リン脂質抗体のうち、特に 2GPI 依存性抗カルジオリピン抗体は病原性が高いことで知られている。2GPI は細胞膜リン脂質に結合し血液凝固カスケード、血小板凝集を抑制する働きを有する。2GPI 依存性抗カルジオリピン抗体は、この機能を妨げることにより凝固能を亢進させ血栓傾向を誘導し、胎盤内の血栓形成を促進させるために胎盤機能不全が生じ、流産を引き起こすと考えられてきた。しかし胎盤内の血栓形成によるとする機序では、2GPI 依存性抗カルジオリピン抗体の関与する流産のうち、血流が確立する妊娠 12 週以降の流産に関しては説明しうるが、それ以前の流産に関しては説明困難である。実際、抗リン脂質抗体が関与すると考えられる初期の流産において、妊娠組織を病理組織学的に検討しても、胎盤に血栓形成が認められる例はほとんどないと報告されている。そんな中、近年、抗リン脂質抗体の絨毛細胞への直接的作用が明らかになってきた。例えば、抗 Phosphatidylserine(PS)抗体をはじめとする抗リン脂質抗体が、PS などのリン脂質の表面に結合して syncytiotrophoblast(ST) 形成を阻害し、さらに絨毛細胞の浸潤、増殖、分化にも影響を及ぼすことにより、ヒト絨毛性ゴナドトロピン分泌の低下や重度の胎盤機能不全を引き起こす原因となると報告されている。

Extravilloustrophoblast(EVT)と呼ばれる一群の絨毛細胞は脱落膜に浸潤し、胎盤と接する子宮壁の血管系を発達させて、胎盤内への十分な母体血の供給を導く。この EVT が脱落膜に進入する過程で母体リンパ球と出会い生じる相互作用が絨毛細胞機能を修飾し胎盤形成に影響する。EVT の子宮内への浸潤は胎児へ十分な母体血流を供給して妊娠を維持するにあたり重要な過程である。EVT の増殖、浸潤過程においては、HLA-G などの HLA 抗原系や、EVT と母体免疫細胞が分泌する多くのサイトカイン、ケモカイ

ン、また血管新生関連因子など種々の分子が関与していることが明らかになっている。これらの分子の中で、本研究では Major histocompatibility complex(MHC)I 類似の抗原提示分子である CD1d-invariant(i) 細胞系に注目した。

(i) 細胞が胎盤形成において担う役割については不明であるが (i) 細胞は末梢血に比較し脱落膜リンパ球中の比率が10倍以上高く(Boyson et al. Proc Natl Acad sci USA 99:13741-6, 2002)、(i) の特異的リガンドである GalCer を妊娠マウスに投与すると非常に高率に流産となることが報告されている(Ito K et al. Proc Natl Acad sci USA 97:740-4, 2000)。また Boyson らは正常妊娠の母体胎児境界では CD1d と iNKT 細胞の相互作用により、活性化された iNKT 細胞から IL-4 や IFN-gamma(G)などの炎症性サイトカインが分泌され T helper(Th)1/Th2 バランスが調節されると示唆した。母体の脱落膜組織に胎児の EVT が適切に浸潤していくことは、胎盤形成が正しく行われる鍵となるが、着床・浸潤過程ではこのようにある程度の炎症反応が必要であると報告されている。妊娠中は Th1/Th2 バランスが Th2 優位にあるとされ、習慣流産などの妊娠異常では Th1/ Th2 バランスの障害が指摘されている。

CD1d は(i) 細胞に対してリン脂質を提示するが、このリン脂質に母体血中の 2GPI が結合して複合体を形成する。申請者は母体胎児境界に抗 2GPI 抗体が存在すると、局所においてより強いレベルの炎症反応が誘導され、正常な胎盤形成過程を阻害し流産を引き起こすという流産機序における新しい可能性を報告してきた。

流産のみならず、妊娠高血圧症候群、胎児発育不全などの妊娠合併症における研究では、その原因として胎盤形成障害が指摘されてきた。その背景には、胎盤内局所における EVT の増殖、浸潤、母体側細胞との免疫応答も含めた細胞機能の異常が存在することが明らかになっている。

本研究では、以上の流産機序についての解析をさらに進めるとともに、妊娠高血圧症候群などの妊娠合併症における CD1d-i 細胞系の果たす役割についても検討する。

2. 研究の目的

本研究は絨毛細胞-母体リンパ球間のリン脂質認識機構である、CD1d-invariant NKT (iNKT) 相互作用に着目する。iNKTの活性化により胎盤機能の障害が生じるのではないかという仮説について検討を進める。fat-1 マウスは抗炎症作用を持つ 3 脂肪酸を高濃度に発現するトランスジェニックマウスで、すでに複数の研究結果により 3 脂肪酸がもつ抗炎症作用があらゆる疾患モデルに対しても有効である可能性が示唆されてきた。iNKT 細胞は絨毛細胞上の CD1d を介して賦活化され炎症

症状を惹起することは申請者がすでに報告している。fat-1 マウスを、NKT を標的とした流早産モデルマウスに応用することにより、NKT を標的とした炎症状態に対する 3 脂肪酸の新たな抗炎症作用を解明することを目的として研究を行う。それにより解明が不十分な APS の病理機序について CD1d-iNKT という新たな分子機構からのアプローチにより、抗リン脂質抗体を背景とした周産期異常の新たな理解をもたらす、適切な治療法への糸口を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 妊娠した fat-1 マウスに NKT 細胞を賦活化させる GalCer を 100 μ g/kg を腹腔内に投与し、流早産率をコントロール群と比較した。流産モデルは妊娠中期 9.5 日、早産モデルは妊娠後期 16.5 日に投与を行った。流産群は投与 72 時間後に子宮内の胎仔の数、および流産の痕跡を確認した。早産群は、分娩までの日数を確認し、分娩終了までを観察した。19.5 日未満の分娩を早産と定義した。

2) 妊娠中期の fat-1 マウスに GalCer を投与した流産群、妊娠後期に投与した早産群と C57BL/6 マウス群の脾臓細胞でのサイトカイン誘導性の違いをそれぞれ ELISA 法と定量的リアルタイム PCR 法で評価した。

3) 妊娠した C57BL/6 マウスに NKT 細胞を賦活化させる GalCer または OCH をそれぞれ 100 μ g/kg 投与し流産率を比較した。OCH は Th1/Th2 比を Th2 優位に刺激するのに対し、GalCer は Th1 優位を刺激する。また投与群とコントロール群とで脾臓細胞のサイトカイン誘導性の違いを ELISA 法と定量的リアルタイム PCR 法でコントロール群と比較した。

4. 研究成果

1) 流産群では C57BL/6 マウスは流産率が 90%と高率であったのに対し、fat-1 マウスでは 27.2%であった。(p=0.0010)。早産群では C57BL/6 マウス

の早産率が 72.7%であったのに対し、fat-1 マウスは 20.2%であった (p=0.016)。本研究の結果、fat-1 マウスの流早産率が C57BL/6 マウスよりも有意に低率であることがわかった。

2) GalCer 投与後の流産率、早産率とともに fat-1 マウスで C57BL/6 マウスと比較し抑制された。また C57BL/6 マウス、fat-1 マウスのそれぞれの脾臓細胞を GalCer 刺激したところ、fat-1 マウス由来の脾臓細胞は C57BL/6 マウスよりも有意に IL-4 の mRNA が高発現で分泌量も多かった。さらに IFN- γ /IL-4 比では fat-1 由来の脾臓細胞は C57BL/6 マウスよりも有意に低下していた。このことから、fat-1 マウスのように 3 脂肪酸優位な体内環境では iNKT 細胞が Th2 優位な免疫誘導を生じることが示唆された。

3) GalCer 投与群では流産率が 58.4%とコントロール群(9.8%)と比べて高率であった (p<0.001)。OCH 投与群は流産率が 8.6%とコントロール群と同等で GalCer 投与群と比較して有意に低率であった (p<0.001)。

以上の結果より、抗炎症作用のある 3 脂肪酸を高発現する fat-1 マウスでは、iNKT 細胞刺激による流早産に対して抵抗性を示すことがわかった。その抵抗性の要因として 3 脂肪酸優位な体内環境では iNKT 細胞が Th2 優位な免疫誘導が生じていることが確認された。これは NKT 細胞が関与する流早産の予防に 3 脂肪酸が有効であることを示唆するものである。

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)

1. Ichikawa M Functional regulation of trophoblast cells by lysophosphatidic acid signaling and its pathologic relevance to PIH. *Pregnancy Hypertensions*, 2015 (5)32

[学会発表](計 2 件)

1. 保谷茉莉 3 脂肪酸による NKT 細胞機能制御と流早産発症への影響
第 30 回日本生殖免疫学会総会・学術集会

2015 年 11 月 21 日~11 月 22 日(熊本県民交流館パレア)

2. 市川麻由子 リゾフォスファチジン

酸系は絨毛細胞における血管新生関連因子の発現を誘導する 第 66 回 日本産科婦人科学会 学術集会 2014 年 4 月 18 日～2014 年 4 月 20 日 (東京国際フォーラム)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河合有希(KAWAI, Yuki)

東京大学・医学部付属病院・登録研究員

研究者番号：70646463

(2)研究協力者

市川麻佑子(ICHIKAWA, Mayuko)

保谷茉莉(HOYA, Mari)