

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861316

研究課題名(和文) 父親抗原特異的免疫寛容成立に与える精漿の役割

研究課題名(英文) The role of seminal fluid in paternal antigen specific feto-maternal tolerance

研究代表者

島 友子 (Shima, Tomoko)

富山大学・医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：00377285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠成立維持には母児間の免疫寛容が必須であり、父親抗原特異的制御性T細胞が一員を担っている。妊娠成立維持が破綻した不妊症や不育症の原因解明および治療探究に応用するため、マウスモデルを用いて父親抗原特異的制御性T細胞および同細胞を誘導する免疫寛容誘導性樹状細胞と精漿の関連性について検討した。マウスアロ交配では、精漿のプライミングにより、免疫寛容誘導性樹状細胞が着床直前より子宮で誘導され、父親抗原特異的制御性T細胞が着床直前より子宮所属リンパ節で誘導されていた。精漿が妊娠成立維持に免疫細胞を介して重要な役割を担っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Fetus is a semi-allograft to maternal immune system. We have shown that paternal antigen specific regulatory T cells have an active role for feto-maternal tolerance. And, it is known that antigen specific regulatory T cells are induced after antigen presentation by tolerogenic dendritic cells (DC). We analyzed the role of seminal fluid in paternal antigen specific feto-maternal tolerance with focused on paternal antigen specific Treg and tolerogenic DC. Seminal fluid priming is important for the induction of tolerogenic DC and paternal antigen specific Treg. The crosstalk of DC and Treg is important for success of pregnancy.

研究分野：産科婦人科

キーワード：精漿 父親抗原特異的制御性T細胞 免疫寛容誘導性樹状細胞 母児免疫寛容

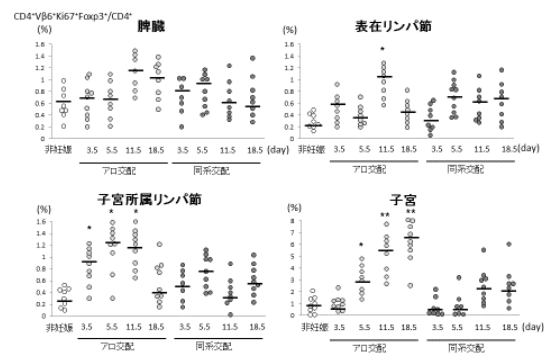
1. 研究開始当初の背景

母体にとって semiallograft (児の半分が父親抗原を発現し異物となる)である胎児が母体免疫機構から拒絶されずに妊娠維持継続されることは、いまだ不明な点が多い。一方、末梢性の免疫寛容の誘導に制御性 T 細胞 (以下 Treg) が重要な役割を果たしていることが判っており (Sakaguchi ら, J Immunol. 155: 1151-1164, 1995) 胎児母体間の免疫寛容においてもキーファクターとなりうることが示唆されている。ヒト (Sasaki, Shima ら, Mol Hum Reprod. 10: 347-353, 2004)、マウス (Aluvihare ら, Nat Immunol. 5: 266-271, 2004; Zenclussen ら, Am J Pathol. 166: 811-822, 2005; Robertson ら, Biol Reprod. 80: 1036-1045, 2009) ともに妊娠時には脱落膜 (子宮内膜) や末梢血中に Treg 細胞が増加している。一方、免疫機構の破綻が想定される産婦人科的疾患として、不妊症 (着床障害)、習慣流産 (不育症)、妊娠高血圧症候群などがある。不妊症の約 50%、流産の約 60% は原因不明とされており、これらの疾患では Treg 細胞の関与が示唆されている。流産モデルマウス (Zenclussen ら, 2005; Zhu ら, 2005) ならびに我々が初めて報告したヒト反復流産症例 (Sasaki ら, Mol Hum Reprod. 10: 347-353, 2004) では Treg 細胞数が正常妊娠例に比較して有意に減少していた。我々は、リスク因子不明不育症例の胎児染色体正常流産例では、着床部に限って Treg 細胞が減少していること (Inada, Shima ら, J Reprod Immunol, 2013) も報告しており、ヒトでも Treg 細胞の減少が原因不明流産の原因になっている可能性がある。また、原因不明不妊の子宮内膜では Treg 細胞の転写調節因子である Foxp3 の mRNA 発現レベルが減少しているという報告 (Jasper ら, Mol Hum Reprod. 12: 301-308, 2006) もある。我々は、アロ交配および同系交配マウスの着床前 (妊娠 2.5 日)、妊娠初期 (妊娠 4.5 日および 7.5 日) に抗 CD25 モノクローナル抗体を投与し

Treg 細胞を除去する実験を施行し、アロ交配でのみ Treg 細胞を減少させると、着床不全および流産が誘導されることを証明した (J Reprod Immunol. 85(2):121-9, 2010)。アロ交配でのみ着床不全、流産率上昇が認められたことから、Treg 細胞は父親抗原特異的に作用し着床や妊娠維持に必須であることが証明された。

父親抗原特異的 Treg 細胞の同定には、マウスモデルとして BALB/c マウス ( ) × DBA/2 マウス ( ) のアロ交配の系を利用することが可能である。この系において DBA/2 マウスの細胞が発現している Mls<sup>a</sup> 抗原は BALB/c マウス T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) V<sub>β</sub>6 で認識するため、V<sub>β</sub>6<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞を父親抗原特異的 Treg 細胞と同定することができる。我々は、この父親抗原特異的 Treg 細胞はアロ交配においてのみ着床直前の子宮所属リンパ節で増加しており、着床直後より子宮にて集簇していることを発見した (J Reprod Immunol. Vol. 86:3, 2010、94:12, 2012)。一方、同系交配では着床前後の変化を認めなかった (図 1 参照)。

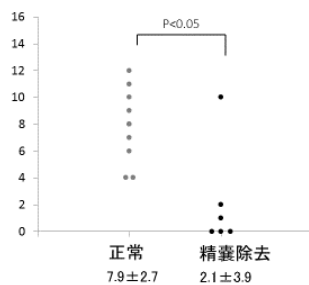
図1 父親抗原特異的Treg細胞の変動



精漿は交配の際に初めて女性生殖器に接触し、着床期あるいは妊娠初期の母体免疫に大きく関与していると考えられている。精嚢を除去し精漿分泌を除去した雄マウスと交配させると所属リンパ節での Treg 細胞の着床期の増加を認めなくなる (Robertson ら, Biol Reprod 2009) が、着床率については言及されていない。一方、申請者のこれまでの研究

で精嚢腺除去マウス（射精中には精子は存在するが精漿は欠如）とのアロ交配では妊娠仔数の低下（着床不全あるいは流産）を認めている（図 2 参照）。精漿のプライミングが体外受精の成功率を高めるという報告（Hum.Reprod 15:2653-8,2000）を理論的に裏付ける結果であった。そこで今回、精漿が免疫寛容を誘導する重要な因子であると想定し、父親抗原特異的 Treg 細胞における精漿の役割を検討した。また抗原特異的 Treg 細胞は免疫寛容誘導性樹状細胞（DC）により抗原提示され誘導されると考えられている。この Treg 細胞と相互作用のある免疫寛容誘導性 DC についても検討することとした。

妊娠仔数(day11.5) (図2)



## 2. 研究の目的

マウスモデルにおいて、精漿の免疫寛容誘導における役割を、父親抗原特異的 Treg 細胞および免疫寛容誘導性 DC に着目し、その phenotype や妊娠時の変動、機能を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) マウス妊娠における精漿存在の有無による父親抗原特異的 Treg の変動

父親抗原特異的 Treg は BALB/c マウス（♀）×DBA/2 マウス（♂）のアロ交配を用いることで同定可能であると我々はすでに証明している。この系において DBA/2 マウスの細胞が発現している Mls a 抗原は BALB/c マウス T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) V 6 で認識され、フローサイトメトリーでは CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>

V 6<sup>+</sup> 細胞が父親抗原特異的 Treg と同定できる。そこで、BALB/c マウス（♀）×DBA/2 マウス（♂）のアロ交配妊娠、および精嚢腺除去マウス（SVX：精漿欠如、精子あり）とのアロ交配妊娠、精管結紮マウス（VAS：精漿あるが、精子欠如）とのアロ交配妊娠において、この父親抗原特異的 Treg の集簇が変化するか否かを検討した。

(2) マウス妊娠における DC の phenotype の解析と精漿の役割

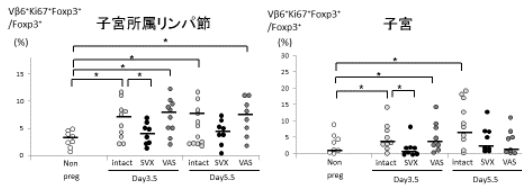
BALB/c マウス（♀）×DBA/2 マウス（♂）のアロ交配において、DC 細胞の Phenotype（表面マーカー； a 抗原、CD80、CD86、B7-DC、B7-H1）をフローサイトメトリーにて解析し、免疫寛容誘導性の性格を有しているか検討した。また、この変動が、精嚢腺除去マウス（SVX）とのアロ交配妊娠において変化するか否かを検討した。さらに Mixed lymphocyte reaction を用い、アロ交配あるいは SVX アロ交配での妊娠子宮由来 DC と脾臓由来 DC による細胞増殖能の比較検討し、機能的な差異の有無を検討した。

## 4. 研究成果

(1) マウス妊娠における精漿存在の有無による父親抗原特異的 Treg 細胞の変動（図 3 参照）

Treg 細胞中における父親抗原特異的 Treg 細胞の比率は、非妊娠時に比較し、正常アロ交配（intact）で、所属リンパ節および子宮局所で着床直前（妊娠 3.5 日目）から増加していたが、SVX アロ交配マウスでは増加を認めなかった。VAS アロ交配マウスでは正常アロ交配と同様に妊娠 3.5 日目には増加していた（ $P < 0.05$ ）。着床直前からの父親抗原特異的 Treg 細胞の増加には精漿によるプライミングが必要であると示唆された。

図3 マウス妊娠における精漿存在の有無による父親抗原特異的Treg細胞の変動



(2) マウス妊娠における DC の phenotype の解析と精漿の役割 (図4 参照)

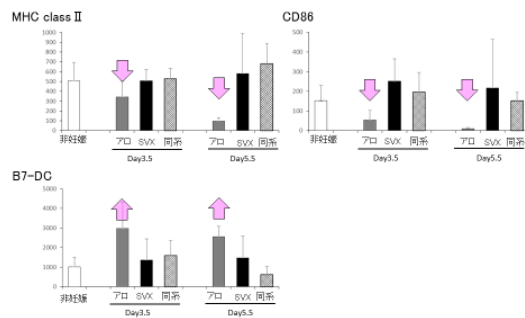
抗原特異的 Treg 細胞の誘導には免疫寛容性 DC による抗原提示が必要であると報告されている。母児免疫寛容における父親抗原特異的 Treg 細胞の誘導にも免疫寛容性樹状 DC が存在しているはずであり、これを確認するために着床前後での DC の phenotype を解析した。

正常アロ交配では非妊娠時と比較して免疫応答の活性化に働く MHC class II (a 抗原) と CD86 が子宮局所の DC において着床直前(妊娠 3.5 日目) ( $P < 0.05$ ) と着床直後(妊娠 5.5 日目) ( $P < 0.05$ ) で有意に低下していたが, SVX アロ交配ではそれらの低下を認めなかった。一方で免疫抑制性共刺激分子である B7-DC は正常アロ交配では非妊娠時と比較して子宮局所の DC において着床直前 ( $P < 0.05$ ) と着床直後 ( $P < 0.05$ ) で有意に上昇したが, SVX アロ交配では有意な差はなかった。即ち, 細胞表面マーカーからみた検討では, 正常妊娠の子宮局所 DC は免疫寛容誘導性 DC の形状を示したが, 精漿のプライミングを欠く SVX アロ交配では免疫寛容誘導性 DC が誘導されないことを明らかとした。

更に実際に妊娠によって子宮に集簇した DC がリンパ球由来単核球の増殖を抑制する働きを示すのかを, stimulator を父親由来脾細胞由来単核球, responder を母親由来脾細胞由来単核球を用いた MLR (mixed lymphocyte reaction) にて確認した。正常アロ妊娠の子宮

局所および子宮由来 DC での MLR では, 非妊娠脾臓由来 DC に比較し単核球の増殖が抑制された。一方, SVX アロ妊娠における DC を用いた場合には, 正常妊娠で認めた単核球の増殖抑制作用を認めずなかった。正常アロ妊娠の子宮由来 DC は機能的に免疫寛容誘導能を持ち, さらに精漿によるプライミングが必要であると考えられた。

図4 マウス妊娠における精漿存在の有無による子宮樹状細胞の表面マーカーの変動



以上より, 母児境界面では, 精漿によるプライミングにより免疫寛容誘導性 DC が誘導され, さらに父親抗原特異的 Treg 細胞が誘導され妊娠成立維持に働くと考えられた。

今後さらなる研究により, 精漿, 樹状細胞, Treg 細胞の相互作用が妊娠成立維持に寄与するメカニズムを解明し, 原因不明の着床不全, 習慣流産の原因解明, 新規治療の提言を目指したい。

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 2 件)

Shima T, Inada K, Nakashima A, Ushijima A, Ito M, Yoshino O, Saito S. Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy. J Reprod Immunol.

2015; 108: 72-82 査読有

Inada K, Shima T, Ito M, Ushijima A, Saito S. Helios-positive functional regulatory T cells are decreased in decidua of miscarriage cases with normal fetal chromosomal content. J Reprod Immunol. 2015; 107:10-9. 査読有

[学会発表](計 2 件)

島 友子, 稲田貢三子, 牛島明美, 伊藤実香, 中島彰俊, 吉野 修, 齋藤 滋. 精漿によるプライミングによる父親抗原特異的母児免疫寛容の誘導. 第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会; 2015 Apr 9-12; 横浜. (ポスター)

島 友子, 稲田貢三子, 中島彰俊, 吉野修, 齋藤 滋. 精漿によるプライミングは抑制性樹状細胞を誘導しトレランスを確立し妊娠成立に関与する. 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 ミニワークショップ; 2014 Apr 18-20; 東京

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

島 友子 (SHIMA TOMOKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
助教

研究者番号 : 00377285