

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22787

研究課題名（和文）月経周期と妊娠における制御性T細胞サブセットの変動とその内分泌学的機序の解明

研究課題名（英文）Changes in the regulatory T cell subpopulations during the menstrual cycle and early pregnancy.

研究代表者

沖村 浩之 (Okimura, Hiroyuki)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：20883086

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：制御性T細胞（Treg）はactivated Treg（aTreg）、resting Treg（rTreg）、nonsuppressive Tregの3つのサブセットに分類される。本研究では、月経周期および妊娠初期におけるTregサブセットの変動と、Tregの産生における月経周期と関連したホルモンの影響を検討した。aTregは排卵期と妊娠成立後に有意に上昇していた。rTregは排卵期、黄体期ともに有意に上昇していた。Tregの誘導培養において、P4は誘導されたTregの割合を有意に上昇させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の不妊症患者の増加に伴い体外受精を始めとする生殖補助医療（ART）による妊娠も増加している。しかしながら、日々進歩しているARTを繰り返しても妊娠できない反復着床不全の患者は依然多い。妊娠には胎児に対する免疫寛容が重要であるが、その中で中心的な役割を果たす制御性T細胞（Treg）のサブセットの妊娠前後における変化とその調節因子を解明した本研究は不妊症に対するTregやプロゲステロンを用いた新しい免疫学的な治療開発の基盤となり得るものである。

研究成果の概要（英文）：We investigated the change of regulatory T cell (Treg) subpopulations, activated Tregs (aTregs), resting Tregs (rTregs), and nonsuppressive Tregs, in the menstrual cycle and early pregnancy and the hormonal effects on the mechanism of Treg cell production. During ovulatory phase, aTregs and rTregs increased. aTregs decreased during luteal phase, whereas rTregs remained expanded. aTregs expanded at 9-week gestation. In Treg induction culture, progesterone increased the induction of Tregs.

研究分野：生殖医療

キーワード：制御性T細胞 プロゲステロン 不妊症

1. 研究開始当初の背景

近年の不妊症患者の増加に伴い体外受精を始めとする生殖補助医療（Assisted reproductive technology, ART）による妊娠も増加している。しかしながら、日々進歩している ART を繰り返しても妊娠できない反復着床不全の患者は依然多い。その病態の多様性から正確な発症頻度は不明であるが、ART による不妊治療を受ける患者の 10%程度が該当するとされる。

両親の遺伝子を半分ずつ受け継ぐ胎児は母体にとっては非自己であるため、妊娠はいわば胚の同種移植に対する免疫寛容ととらえることができ、fetal-allograft と例えられる。着床や妊娠の維持のためには胎児の HLA や母体の免疫が協調して働くことが必須である。その中で、特に制御性 T 細胞（Regulatory T cell、Treg）は妊娠との強い関連が示唆されている。着床障害や流産、妊娠高血圧症候群との関連に加え、雌マウスにおける精液暴露による Treg の増加や、動物の中で妊娠する哺乳類のみに保存されている conserved noncoding sequence 1（CNS1）が Treg の分化に重要な役割を果たすという報告は胎児の免疫寛容に対する Treg の役割の重要性を強く示唆する。着床障害の患者の免疫機構に着目した治療法については、免疫抑制剤を使用し妊娠率を高める試みなどがあるが、その有用性について確立されたものはない。

Treg は免疫反応を抑制し、感染や腫瘍に対する免疫、移植臓器の拒絶、気管支喘息などのアレルギー性疾患や糖尿病や膠原病などの自己免疫性疾患における免疫応答の調節を行っている、CD4⁺Foxp3⁺T 細胞として分画される集団である。排卵や月経のある性成熟期女性においては、Treg の異常と着床不全、流産、妊娠高血圧症候群など妊娠における免疫寛容の異常との関連や自己免疫疾患の発症との関連、子宮内膜症の病態への関与などが報告されている。近年、ヒトにおいて Treg には Foxp3 および CD45RA の発現状態により分類される 3 つの分画があり、抗原特異的に免疫抑制能を発揮する activated Treg（aTreg）、aTreg に分化し抑制能を発揮する resting Treg（rTreg）、抑制能をもたず炎症性サイトカインを産生する nonsuppressive Treg（non-Treg）のサブセットに分類されることが報告されている。これらのサブセットの役割は互いに大きく異なるものであり、従来の Treg は均一な免疫抑制能をもつ集団ではない。

性成熟期女性の免疫系は月経周期や妊娠の成立による内分泌環境の変化により動的に変化する。月経周期内でのホルモンバランスの変化に応じた自己免疫疾患の寛解や増悪と Treg との関連や、末梢血中の Treg は排卵の近づく卵胞期後期に増加することなどが報告されている。しかしながら、Treg サブセットまで解析した月経周期や妊娠との関連の報告はなく、実際にどのサブセットが変動しどのような免疫状態にあるのかはいまだ解明されていない。これを解明することは、不妊症を含めた性成熟期女性に好発する疾患に対し内分泌学的に Treg を調整することによる治療アプローチにつながるものである。また、Treg の産生には TGF-β、IL-2、TCR/CD28 を中心に STAT5、NR4a、NF-κB、CNS などが複雑に関与しており、生体における Treg の制御機構の解明のためにホルモンがどのように関与しているのかに対する学術的関心は高い。

2. 研究の目的

本研究は月経周期や妊娠およびホルモンバランスの変化に対し Treg サブセットがどのような影響を受けるのかを検討し、妊娠に関わる免疫制御機構を明らかにすることを目的とする。

これまで月経周期や妊娠およびそれらにおけるホルモンバランスの変化と Treg サブセットの変動との関連を明らかにした報告はない。それぞれのサブセットは免疫における役割が異なり、本研究によりホルモンバランスの変化や月経、排卵、妊娠という生理的現象における免疫制御システムが明らかになる。また、Treg とホルモンの関係を分子学的機構まで含めて明らかにすることで不妊症や妊娠合併症、自己免疫疾患といった Treg と関連する疾患に対し、内分泌学的かつ免疫学的な新しい治療へのアプローチが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では健常女性の月経周期と妊娠初期における Treg サブセットの変動を解析するとともに、Treg 誘導培養における各種ホルモンの影響を以下のように検討する。Treg サブセットについては CD4⁺T 細胞を CD45RA と Foxp3 の発現状態により aTreg、rTreg、non-Treg に分画し、Treg およびそれぞれのサブセットの CD4⁺T 細胞における割合を解析した。

①月経周期における Treg サブセットの変動の解析

健常女性の卵胞期、排卵期、黄体期に末梢血を採取し Treg サブセットの解析を行う。

②妊娠初期における Treg サブセットの変動の解析

胚盤胞移植を実施する不妊症患者の移植日、妊娠判定日と、妊娠例について妊娠初期、中期および後期検査時に末梢血を採取し Treg サブセットの変動の解析を行う。

③Treg 誘導培養における各種ホルモンの影響の解析

Magnetic-activated cell sorting 法により末梢血からナイーブ CD4⁺T 細胞を分離し、Treg の誘導培養を行う。Treg の誘導効率、免疫抑制能、TGF-β/Smad 経路などの Treg 産生に関わるシグナル伝達経路に対するホルモンの影響を検討する。

これらにより特に着床の起こる黄体期と妊娠が成立した場合に着目し、妊娠の成立および維持にどの Treg サブセットが関わるのか、また、その変動にどのようにホルモンが関わるのかを

その分子機構とともに明らかにする。

4. 研究成果

24 人のボランティアの健常女性および 23 人の不妊症患者より検体を採取した。

健常女性において Treg は排卵期に上昇していた。サブセットを解析したところ、aTreg は排卵期に上昇していたが、rTreg は排卵期および黄体期にも上昇していることが観察された。Non-Treg については有意な変動を示さなかった。検体と同時に採取した血清中のエストラジオール (E2)、プロゲステロン (P4)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH) や抗ミューラー管ホルモン (AMH) との関連を検討したが明らかな Treg とそのサブセットとの関連は指摘できなかった。

不妊症患者において Treg およびその分画である aTreg は妊娠成立後に上昇した。rTreg および non-Treg は有意な変動を示さなかった。

これらの結果より、妊娠成立前には rTreg が上昇すること、妊娠成立後には aTreg が上昇することが妊娠の成立に重要であることが明らかとなった。胎児への免疫寛容の機序として、妊娠成立前には抗原特異性のない rTreg が上昇することで胎児抗原に対する免疫系の多様性を獲得すること、妊娠後には抗原特異的に aTreg が胎児抗原に反応していることが示唆された。

次に、月経周期と関連するホルモンと Treg の増減がどのような関係にあるのかをナイーブ CD4⁺T 細胞を用いた Treg 誘導培養によって検討した。Treg 誘導培養において E2、P4、LH、FSH、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) の Treg 誘導効率の変化を検討したところ、P4 が Treg の誘導を増強することが示された。次に、ナイーブ CD4⁺T 細胞からの Treg の誘導に重要な Smad2/3 のリン酸化を検討したところ、P4 は Smad2/3 のリン酸化を増強することが示された。

これらの結果より、月経周期や妊娠と関連するホルモンの中で、Treg の変動には P4 が重要な役割を果たしていると考えた。

本研究により妊娠の成立と維持には rTreg と aTreg の変化が重要な役割を果たすこと、その変化には P4 が重要であることが考えられた。これらの知見は不妊症に対する Treg やプロゲステロンを用いた新しい免疫学的な治療開発の基盤となり得るものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------