

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11221

研究課題名(和文) 父親抗原特異的制御性T細胞と樹状細胞による母児免疫寛容誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) The crosstalk of paternal antigen specific Treg cells and dendritic cells in feto-maternal tolerance

研究代表者

島 友子 (Shima, Tomoko)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：00377285

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)：妊娠成立維持には母児間の免疫寛容が必須であり、制御性T細胞が一員を担っている。マウスモデルでは父親抗原特異的制御性T細胞が重要な役割を果たしている。妊娠成立維持が破綻した原因不明不妊症や不育症の原因解明、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細胞の誘導因子と考えられる樹状細胞の関与について検討した。子宮に存在する樹状細胞は免疫寛容誘導性の性格を持ち、父親抗原特異的Treg細胞の分化に影響し、妊娠成立維持に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫寛容の誘導維持には制御性T細胞と樹状細胞の相互作用が重要である。妊娠成立維持には母児免疫寛容の誘導が重要であり、父親抗原特異的Treg細胞と免疫寛容誘導性樹状細胞のクロストークが必要である。このクロストークには精漿が関与していることを本研究で示した。これにより、妊娠成立維持が破綻した原因不明不妊症や不育症の病態解明や、不妊症不育症の治療の糸口を導き出すことにつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fetus is a semi-allograft to maternal immune system. We had shown that paternal antigen specific regulatory T cells have an active role for feto-maternal tolerance. Dendritic cells are considered to be an inducer of paternal antigen-specific regulatory T cells. To investigate application to elucidation of causes of infertility and recurrent pregnancy loss of unknown cause, we analyzed the role of dendritic cells and paternal antigen specific Treg cells in mouse mated model. It was suggested that dendritic cells present in the uterus have a tolerance-inducing character and influence the differentiation of paternal antigen-specific Treg cells. The crosstalk of dendritic cells and Treg cells is important for success of pregnancy.

研究分野：産科婦人科

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

母体にとって semi-allograft (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母児免疫寛容の成立には、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 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 が減少していること (Inada, Shima ら, J Reprod Immunol, 2013, 2015) も報告しており、ヒトでも Treg 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。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 を除去する実験を施行し、アロ交配でのみ Treg 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 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 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^a 抗原は BALB/c マウス T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) V₆ で認識するため、V₆⁺Foxp3⁺Treg 細胞を父親抗原特異的 Treg と同定することができる。我々は、この父親抗原特異的 Treg 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. 2015)。一方、同系交配では着床前後の変化を認めなかった。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 (SVX アロ交配) と子宮での父親抗原特異的 Treg の着床直前 (妊娠 3.5 日) および着床直後 (妊娠 5.5 日) の増加を認めなかった。一方で、精管結紮をし精子分泌を除去した雄マウスとの交配 (VAS アロ交配) では正常アロ交配と同様に着床前後の父親抗原特異的制御性 Treg の増加を認めた。また、SVX アロ交配では妊娠仔数の低下 (着床不全あるいは流産) を認めており、精漿のプライミングが、着床前後の子宮での父親抗原特異的 Treg の増加と着床率の改善につながると考えられた。

一方で抗原特異的 Treg の誘導には免疫寛容誘導性樹状細胞 (tolerogenic DC) の関与が知られている。この樹状細胞 (以下 DC) は妊娠期における父親抗原特異的 Treg の誘導に関与していることが想定されるが、実際に妊娠期に tolerogenic DC が存在するのか、父親抗原特異的 Treg の誘導に関わっているのかの検討は不十分であった。

2. 研究の目的

これまで我々は、妊娠成立維持における父親抗原特異的 Treg の重要性、精漿の重要性を訴えてきた。また、父親抗原特異的 Treg 細胞の誘導には tolerogenic DC の関与が想定される。しかしながら、父親抗原特異的 Treg と DC との相互作用に関するメカニズムの詳細はいまだ不明確で

ある。そこで、我々は、精漿、DC、Treg の相互作用が妊娠成立維持に寄与するメカニズムの解明を進めることを目的とし研究を施行した。

3. 研究の方法

(1) マウスアロ交配における DC の変動と精漿の関わり

父親抗原特異的 Treg の同定が可能な BALB/c マウス (♀) × DBA/2 マウス (♂) のアロ交配を用い、妊娠 3.5 日目 (着床直前)、5.5 日目 (着床直後) の子宮、子宮所属リンパ節 (棒大動脈リンパ節)、全身表在性リンパ節、脾臓の CD11c⁺ DC の表面マーカーをフローサイトメトリーにて検討した。コントロールとして非妊娠 BALB/c マウス (♀)、同系交配の BALB/c マウス (♀) × BALB/c マウス (♂) について検討した。精漿と誘導される樹状細胞との関連性を検討するため、DBA/2 精嚢除去マウス (SVX) を作成し、BALB/c マウス (♀) と交配し、同様にフローサイトメトリーで DC の表面マーカーを検討した。

(2) DC による免疫寛容誘導性の評価

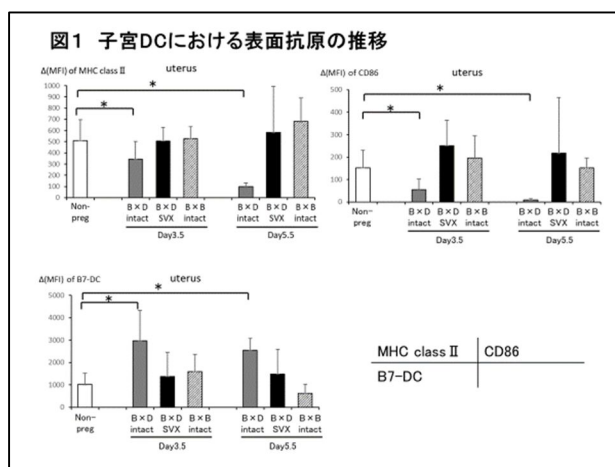
アロ交配 (BALB/c マウス (♀) × DBA/2 マウス (♂)) および精嚢除去 (SVX) アロ交配 (BALB/c マウス (♀) × DBA/2・SVX マウス (♂))、非妊娠 BALB/c マウスにおける DC の単核球への増殖抑制性を比較検討するために MLR (mixed lymphocyte reaction) 試験を行った。それぞれの雌マウスの子宮、および脾臓から Pan DC micro beads (Miltenyi Biotec, #130-092-465) を用いて DC を分離し、DBA/2 マウス (♂) 脾臓から分離し MMC 処理をした単核球 (stimulator) と BALB/c マウス () 脾臓から分離した単核球 (responder) とを混合培養した。5 日間の混合培養後、thymidine [methyl-³H] 取り込みにて細胞増殖の程度を比較検討した。

(3) 子宮由来樹状細胞による父親抗原特異的 Treg の誘導

アロ交配時に出現する子宮由来樹状細胞が父親抗原特異的 Treg 細胞の誘導が可能かどうか検討するために、妊娠 3.5 日目のアロ交配 BALB/c マウス (♀) から CD11c 陽性 DC を分離し、非妊娠 BALB/c マウス (♀) 脾臓由来の単核球と、TGF- β 1 と IL-2 を添加の上、8 日間の混合培養を行った。培養細胞を回収し、CD4、V β 6、Foxp3 にて染色し、フローサイトメトリーにて父親抗原特異的 Treg の検出率を検討した。

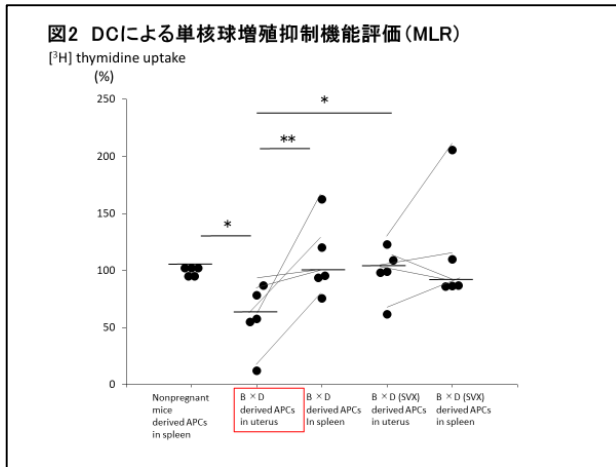
4. 研究成果

(1) マウスアロ交配における DC の変動と精漿の関わり (図 1)



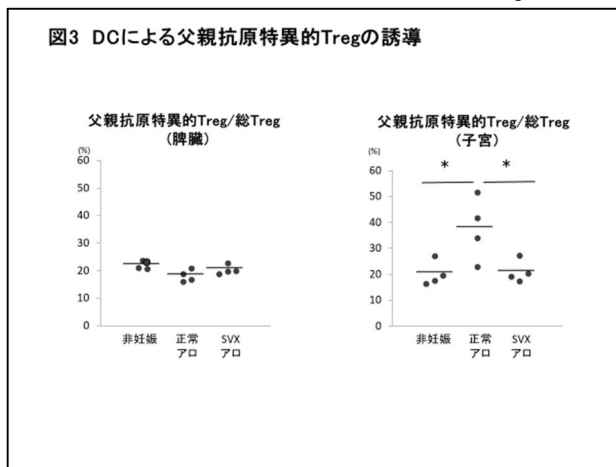
正常アロ交配では非妊娠時と比較して免疫応答の活性化に働く MHC class II (a 抗原) と CD86 が子宮局所の DC において着床直前 (妊娠 3.5 日目) と着床直後 (妊娠 5.5 日目) で有意に低下し、免疫抑制性共刺激分子である B7-DC は有意に上昇していた。正常アロ交配で子宮局所に集簇する DC は表面抗原上 tolerogenic DC の性格を有することを証明した。さらには、精漿のプライミングを欠く SVX アロ交配では MHC class II (a 抗原) と CD86 の発現低下に乏しく、また、B7-DC の有意な上昇なく、tolerogenic DC が誘導されないことを明らかにした。

(2) DC による免疫寛容誘導性の評価 (図 2)



MLR (mixed lymphocyte reaction) を用いた機能解析では、正常アロ交配の子宮由来 DC は 脾臓由来 DC に比較し、単核球の増殖を抑制した。一方、SVX アロ交配の子宮由来 DC を用いた場合には、単核球の増殖抑制作用の低下を認めた。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、さらには精漿によるプライミングが必要であると考えられた。

(3) 子宮由来 DC による父親抗原特異的 Treg の誘導 (図 3)



正常アロ交配由来の子宮 DC と非妊娠マウス由来の脾細胞との混合培養では、正常アロ交配由来の脾臓 DC や、非妊娠マウス由来の子宮樹状細胞、SVX アロ交配由来の子宮 DC に比較し、優位に父親抗原特異的 Treg 細胞が誘導された。子宮 DC は抗原特異的 Treg 細胞を誘導する機能を備えており、精漿の存在が抗原特異性に影響を与えることが示唆された。

本研究により、マウスアロ交配において、精漿の存在下に、子宮樹状細胞が父親抗原特異的 Treg 細胞を誘導し妊娠成立維持に関与することが明確になった。今後、原因不明着床不全や不育症といった正常な母児免疫寛容の破綻が原因の一因となっている疾患に対して、本研究をもとに新たな治療方法を提言できるよう、さらに研究をすすめていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shima Tomoko, Nakashima Akitoshi, Yasuda Ippei, Ushijima Akemi, Inada Kumiko, Tsuda Sayaka, Yoshino Osamu, Tomura Michio, Saito Shigeru	4. 巻 -
2. 論文標題 Uterine CD11c+ cells induce the development of paternal antigen-specific Tregs via seminal plasma priming	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jri.2020.103165	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 -

〔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
研究分担者	中島 彰俊 (Nakashima Akitoshi) (00436792)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	
研究分担者	齋藤 滋 (Saito Shigeru) (30175351)	富山大学・大学本部・学長 (13201)	