

令和 5 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：2020～2022

課題番号：20K09614

研究課題名(和文) 制御性T細胞、樹状細胞、NK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 better understanding of the mechanism of maternal immune tolerance induction by regulatory T cells, dendritic cells, and NK cells

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：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。マウスアロ妊娠では父親抗原特異的Tregが着床後より母児境界面である子宮局所で増殖し、父親抗原特異的免疫寛容の誘導を担っている。本研究では、子宮に増殖している父親抗原特異的Tregが妊娠初期から後期にむけ胸腺由来Tregから末梢誘導性Tregへとサブセットが推移していることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において妊娠時の制御性T細胞のサブセットを解析したことで、免疫寛容誘導に関与と思われる樹状細胞やNK細胞など免疫細胞との相互作用を含めた母児免疫寛容を誘導するメカニズムの研究につながると考える。母児免疫寛容のメカニズムを解明することは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、その原因、診断、ひいては新規治療法の提案までできる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Treg) play an important role in the establishment of maternal immune tolerance, in which the fetus, which is semiallograft (half of the babies express paternal antigens and becomes foreign substances), is not rejected by the maternal immune system and continues to maintain pregnancy. Paternal antigen-specific Tregs proliferate in the uterus, which is the mother-infant interface, after implantation, and are responsible for inducing paternal antigen-specific immune tolerance. In this study, we proved that paternal antigen-specific proliferating Tregs in the uterus are dominated by the thymus-derived Treg subset in early pregnancy and predominantly in the thymus periphery-induced Treg subset in late pregnancy.

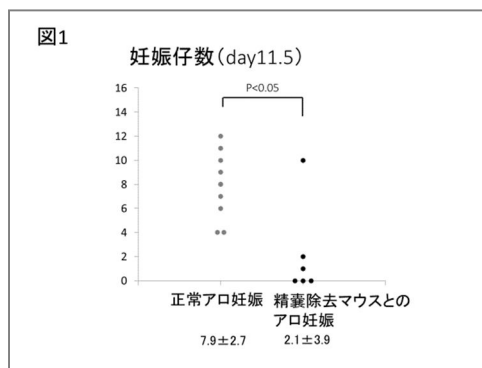
研究分野：生殖免疫学

キーワード：母児免疫寛容 父親抗原特異的制御性T細胞

### 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。免疫機構の破綻が想定される産婦人科的疾患である不妊症(着床障害)、習慣流産(不育症)、妊娠高血圧腎症ではTreg細胞の関与が示唆されている。通常、正常妊娠時には母児境界領域である子宮内膜(脱落膜)でTreg細胞が増加している。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, 2015)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。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. 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>6</sub>で認識するため、V<sub>6</sub><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. 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細胞の着床直前(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T細胞の増加を認めた。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(図1)、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細胞の増加と着床率の改善につながると考えられた。これは、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り、精漿の重要性を実験的に証明したと考えられる。



有胎盤動物の妊娠維持には胸腺外Tregが重要であること(Cell. 50:29-38, 2012) 妊娠維持にはmemory Tregが重要であること(Nature. 49:102-106, 2012)という報告がある一方で胸腺内で発育したnatural occurring Treg (nTreg)の重要性も報告されている。母児免疫寛容の誘導に関する細胞が、妊娠の経過とともにnatural occurring Tregから末梢で抗原刺激されたCD4+

ナイーブ T 細胞から誘導される peripheral induced Treg (iTreg) 細胞と変化する可能性が推察されるが、これまでに明確なデータは示されていない。

一方で抗原特異的 Treg 細胞の誘導には免疫寛容誘導性樹状細胞 (DC) の関与が知られている。我々は、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 ( 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、正常アロ交配で子宮局所に集簇する DC は tolerogenic DC の性格を有することを証明し、さらには、精漿のプライミングを欠く SVX アロ交配では tolerogenic DC が誘導されないことを明らかとした。また 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、単核球の増殖を抑制したが、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が低下した。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 (J Reprod Immunol. 2020)。

Treg は樹状細胞以外にも NK 細胞とも相互作用を果たす。哺乳類では妊娠子宮に NK 細胞が増加している。我々はこれまでに妊娠子宮 NK 細胞では CD25 発現が増強するサブセットが非妊娠時に比較して増加することを見出した。白血病モデルマウス末梢血で増加する CD25<sup>+</sup>NK 細胞は NK 活性が弱く、免疫抑制活性を有するという報告 (Ebata ら, J Immunol 2006) がある。妊娠子宮に存在する CD25<sup>+</sup>NK 細胞が母児免疫寛容の誘導に関与している可能性があり、予備実験で CD25<sup>+</sup>NK 細胞は DC 細胞の MHCclass 抗原を減弱させ、Treg 細胞を誘導する免疫寛容誘導性 DC 細胞に変化させることを認めている。

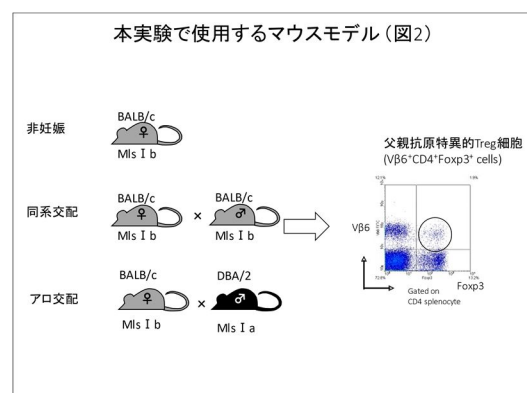
我々はこれまで、妊娠成立維持における父親抗原特異的 Treg の重要性、免疫寛容誘導性 DC の関与、精漿の重要性を訴えてきた。しかしながら、父親抗原特異的 Treg 細胞と樹状細胞あるいは CD25<sup>+</sup>NK 細胞との相互作用に関するメカニズムの詳細はいまだ不明確である。また、父親抗原特異的 Treg にも様々なサブセットが存在し、その中でも胸腺内発育由来の nTreg がどの程度関与しているかに関しても大いに疑問であった。

## 2. 研究の目的

本研究では精漿と妊娠期の母児免疫寛容について父親抗原特異的 Treg 細胞および免疫寛容誘導性 DC、CD25<sup>+</sup>NK 細胞の相互作用に着目し研究を進めることとした。相互関与を検討するにあたり、父親抗原特異的 Treg の由来を明確にする必要があると考えられた。父親抗原特異的 Treg 細胞の動態において、それが nTreg なのか末梢で誘導された iTreg なのか検討すべく、まず、父親抗原特異的 Treg 細胞中の nTreg および iTreg サブセットの経時的変化を明確にすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

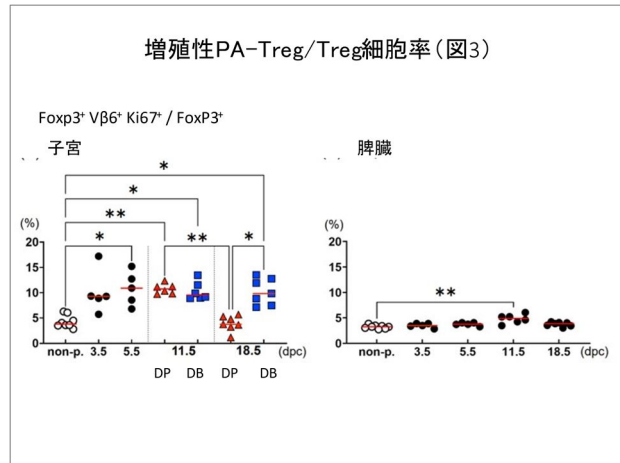
8 週齢以上の BALB/c マウス ( ) を DBA/2 マウス ( ) と交配させ (マウスアロ妊娠) 翌朝に膣栓が観察された個体を妊娠 0.5 日とした。妊娠 3.5 日 (着床直前)、5.5 日 (着床直後)、11.5 日 (妊娠中期)、18.5 日 (妊娠後期) に妊娠マウスの子宮と脾臓から単核球を分離した。なお、妊娠 11.5 日以降の子宮サンプルは、胎児と胎盤を取り除いた非着床部位の脱落膜である壁側脱落膜 (decidua



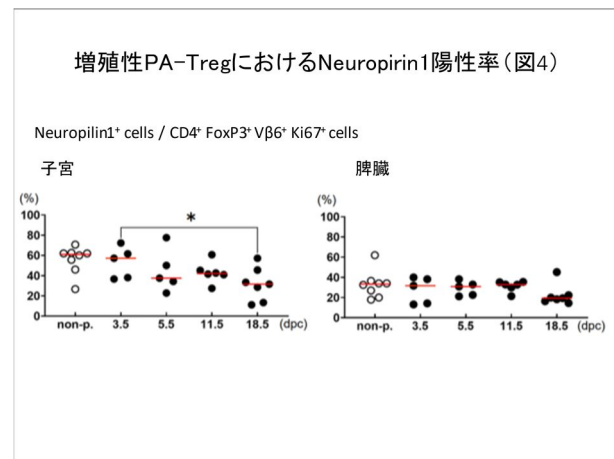
parietalis, DP)、胎盤の母体側に付着した着床部位の脱落膜である基底脱落膜 (decidua basalis, DB) から分離して細胞を回収した。フローサイトメトリーにより細胞マーカー発現を解析した。DBA/2 マウス由来のスーパー抗原 MIs 1a を認識する T 細胞受容体 鎖 V 6 を発現する CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 細胞を父親抗原特異的 Treg 細胞 (PA-Treg) と同定し (図 2) 細胞増殖マーカーとして Ki67、nTreg 細胞マーカーとして Neuropilin1 (Nrp1) および Helios を用いた。動物の飼育および実験手順は、富山大学の機関指針に従って行われた。

#### 4. 研究成果

胎児抗原を認識した PA-Treg 細胞は増殖活性を示す。そこで、アロ妊娠マウスの増殖性 Ki67<sup>+</sup> PA-Treg 細胞に着目した (図 3)。子宮の増殖性 PA-Treg/Treg 細胞率は、非妊娠群と比し妊娠全期間を通して著しく増加した。DB では妊娠 18.5 日においても増加が持続されたが、DP では妊娠 11.5 日に比し有意に減少した。以上の結果から、母児接点の場である DB における増殖性 PA-Treg 細胞の増加が妊娠後期まで持続することが、マウスアロ妊娠の維持に重要であると考えられた。従って、以降の実験では妊娠中期以降の脱落膜の代表的サンプルとして DB を用いた。



つづいて、増殖性 PA-Treg 細胞における nTreg 細胞から iTreg 細胞への転換の可能性を検討した (図 4)。nTreg 細胞マーカーである細胞膜受容体 Neuropilin1 (Nrp1) が陽性の細胞を nTreg 細胞、陰性の細胞を iTreg 細胞として同定した。脱落膜の増殖性 PA-Treg 細胞集団の Nrp1 陽性率は妊娠 3.5 日と比し妊娠 18.5 日で有意に減少したが、脾臓では変化を認めなかった。従って、母児境界面の増殖性 PA-Treg 細胞集団の主分画が、妊娠初期の Nrp1<sup>+</sup> Treg (つまり nTreg) 細胞から妊娠後期の Nrp1<sup>-</sup> Treg (つまり iTreg) 細胞に転換したことが示唆された。



本研究により、妊娠初期の増殖性 PA-Treg 細胞の主分画は nTreg 細胞サブセットであり、妊娠の進行に伴い iTreg 細胞サブセットに切り替わることが示唆され、妊娠後期に増殖性 PA-iTreg 細胞が母児境界面における父親抗原特異的免疫寛容に寄与する可能性が示された。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。

一方、本研究開始当初の背景で述べたように、母児免疫寛容誘導に関しては Treg 細胞のみならず、樹状細胞あるいは NK 細胞といった免疫細胞の存在が重要である。今後は父親抗原特異的 Treg, 免疫寛容誘導性樹状細胞、CD25<sup>+</sup> NK 細胞の相互作用に着目し研究を続けたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Shima Tomoko, Nakashima Akitoshi, Yasuda Ippei, Ushijima Akemi, Inada Kumiko, Tsuda Sayaka, Yoshino Osamu, Tomura Michio, Saito Shigeru | 4. 巻<br>141                   |
| 2. 論文標題<br>Uterine CD11c+ cells induce the development of paternal antigen-specific Tregs via seminal plasma priming                              | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Reproductive Immunology  | 6. 最初と最後の頁<br>103165 ~ 103165 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jri.2020.103165  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Araishi Kohei, Shima Tomoko, Yasuda Ippei, Tsuda Sayaka, Morita Keiko, Yamaki-Ushijima Akemi, Nakashima Akitoshi, Saito Shigeru   | 4. 巻<br>155                   |
| 2. 論文標題<br>Dynamics of neuropilin1 (Nrp1)-positive thymus-derived and Nrp1-negative peripherally induced paternal antigen specific regulatory T cells in the uterus and spleen during pregnancy in mice | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Reproductive Immunology  | 6. 最初と最後の頁<br>103792 ~ 103792 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jri.2022.103792  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する                  |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>荒石康平 島友子                                  |
| 2. 発表標題<br>マウス異系妊娠において、末梢誘導性父親抗原特異的Treg細胞は母児境界面で増殖する |
| 3. 学会等名<br>第36回日本生殖免疫学会総会・学術講演会                      |
| 4. 発表年<br>2021年                                      |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 中島 彰俊<br><br>(Nakashima Akitoshi)<br><br>(00436792) | 富山大学・学術研究部医学系・教授<br><br><br><br>(13201) |    |
| 研究分担者 | 戸村 道夫<br><br>(Tomura Michio)<br><br>(30314321)      | 大阪大谷大学・薬学部・教授<br><br><br><br>(34414)    |    |
| 研究分担者 | 津田 さやか<br><br>(Tsuda Sayaka)<br><br>(60839075)      | 富山大学・学術研究部医学系・助教<br><br><br><br>(13201) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |