

令和 4 年 5 月 15 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18189

研究課題名(和文)慢性子宮内膜炎が子宮内膜免疫担当細胞に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effects of chronic endometritis on endometrial immunocompetent cells

研究代表者

北澤 純 (Kitazawa, Jun)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：30823900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性子宮内膜炎(CE)は着床障害の原因となる疾患である。着床には子宮内膜の免疫細胞が重要な役割を果たしている。今回、ヒト着床期子宮内膜内の免疫細胞の一種であるヘルパーT細胞(Th細胞)亜群の分布とそのCEの病態への影響を検討した。解析では、CE群はnon-CE群に比べTh1細胞が有意に多く、Th2細胞が少なかった。また、CEで出現する形質細胞数が増えるほどTh1細胞は増加し、Th2細胞は減少した。さらに、子宮内膜の蛍光免疫染色では、CD4陽性Th細胞は有意に形質細胞周囲に集簇していることが明らかになった。よって、CEはTh細胞に変動を来すことで着床障害に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は着床障害の原因として世界的に注目されているCEの病態メカニズムについて、その一端を解明した重要な研究である。CEの主たる原因は細菌感染と考えられており、治療として広域抗菌薬が使用される。CEを治癒できれば、着床率や生児獲得率は非CE患者と同等に改善するが、一部に抗菌薬治療抵抗性のCEが存在する。CEの病態メカニズムの解析が進むことで、抗菌薬以外の新しい治療方法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic endometritis (CE) is a condition that causes implantation failure. Immune cells in the endometrium play an important role in implantation. I investigated the distribution of a subgroup of helper T cells (Th cells), a type of immune cells, in the human implantation endometrium and their influence on the pathogenesis of CE. The analysis showed that the CE group had significantly more Th1 cells and fewer Th2 cells than the non-CE group. In addition, Th1 cells increased and Th2 cells decreased as the number of plasma cells appearing in CE increased. Furthermore, fluorescent immunostaining of the endometrium revealed that CD4-positive Th cells significantly congregated around the plasma cells. Thus, it was suggested that CE may be involved in implantation failure by causing fluctuations in Th cells.

研究分野：産婦人科

キーワード：慢性子宮内膜炎 ヘルパーT細胞 形質細胞 着床障害 flow cytometry Th1細胞 Th2細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性子宮内膜炎 (CE) は軽度の慢性炎症と考えられ、細菌感染や種々の要因が原因と考えられている。CE は軽度の不正出血や骨盤痛、性交痛、白色帯下などを認めることがあるが一般に臨床症状に乏しい。しかし、近年では我々や他の臨床研究より着床障害や流産の原因となることが示唆されている。組織学的には形質細胞の子宮内膜間質への浸潤を認めることから、免疫学的異常の関与が考えられているが、その詳細は明らかになっていない。

子宮内膜には好中球や T 細胞、B 細胞、肥満細胞、マクロファージ、子宮ナチュラルキラー細胞などが免疫細胞として存在する。これらの細胞は月経周期に伴い変動が見られ、特に着床期には異物である胚を受容するために様々な子宮内膜免疫細胞が関与する。その中でヘルパー T (Th) 細胞は少ないものの、着床や妊娠継続において重要な役割を果たしている。

2. 研究の目的

本研究では、CE と子宮内免疫環境との関連に注目し、その中でも CE の有無が Th 細胞亜群である Th1/Th2/Th17/Treg バランスに与える影響をフローサイトメトリーで解明する。Th 細胞バランスに変化があれば、Th 細胞と CE において子宮内膜に出現する形質細胞の関連について検討を行うことで、CE が着床障害を引き起こすメカニズムの一端を解明することを目的とする。

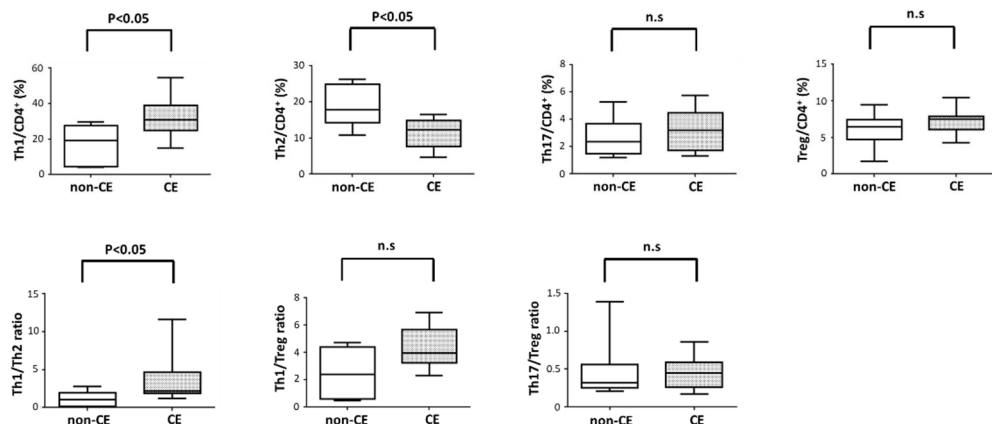
3. 研究の方法

対象は滋賀医科大学医学部附属病院で体外受精治療中の患者とした。経膈超音波検査での卵胞径の測定および排卵検査薬にて排卵日を特定し、着床期に子宮内膜を採取した。一部はパラフィン包埋標本を作製し、CD138 免疫組織染色を施行して、形質細胞が 1 個/10HPF 以上認めるものを CE と診断した。残りの検体は細切した後、コラゲナーゼおよび溶血処理した後、MACS Separator で CD45 陽性細胞を分離した。分離したサンプルは Th1、Th2 細胞解析用と Th17、制御性 T (Treg) 細胞解析用に分け、Th1、Th2 細胞解析用は PMA、Ionomycin、Monensin を加えて 37℃、5%CO₂ 下で 4 時間インキュベートし、Th17、Treg 細胞解析用は PMA、Ionomycin、Brefeldin A を加えて 37℃、5%CO₂ 下で 3 時間インキュベートした。細胞表面抗原の染色後、固定・膜透過処理を行い、細胞内染色を行ったのち、Flow Cytometry (FACSCanto) で解析した。また、Th 細胞と形質細胞の関連を検討するため、CE 患者の着床期子宮内膜パラフィン包埋標本に対して CD4 および CD138 蛍光免疫染色を施行した。

4. 研究成果

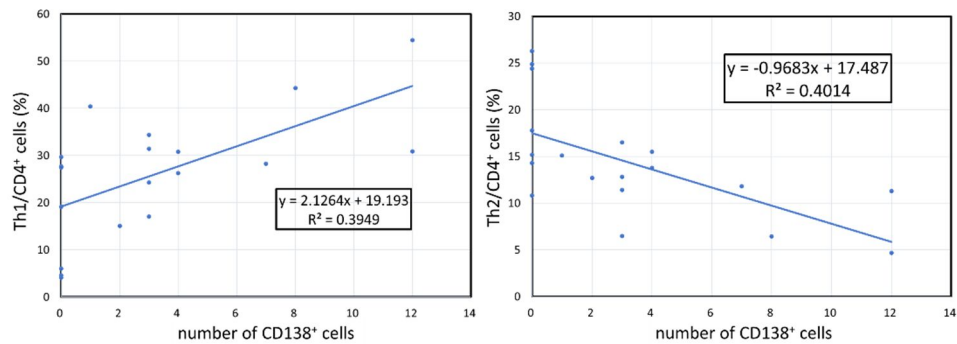
(1) 子宮内膜 Th 細胞亜群の分布の検討

CE 群 12 例、non-CE 群 7 例を対象とした。CE 群および non-CE 群の子宮内膜における Flow Cytometry での解析では、リンパ球あたりの CD4 陽性 T 細胞数には CE 群および non-CE 群で差は無かった。一方で、CE 群は non-CE 群に比べ Th1 細胞が有意に多く、Th2 細胞が少なかった。Th17 細胞、Treg 細胞については差は認めなかった。また、それぞれの細胞数の比を検討したところ、Th1/Th2 細胞比は CE 群で増加していたが、Th1/Treg 細胞比、Th17/Treg 細胞比に差は認めなかった。



(2) 子宮内膜 Th1・Th2 細胞と形質細胞の相関の検討

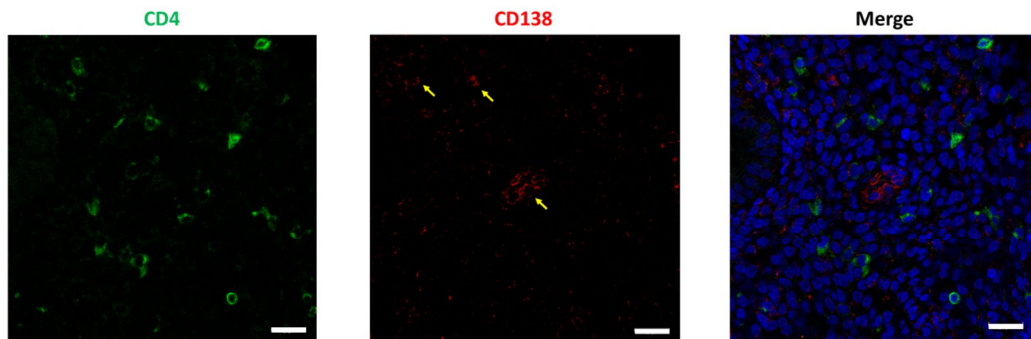
CE では子宮内膜において Th1 細胞が増加し、Th2 細胞が減少していた。この変化の割合が CE の炎症の程度と相関するのか、検討した。Flow Cytometry での CD4 陽性細胞中の Th1・Th2 細胞の割合と CD138 免疫組織染色での形質細胞数の相関を検討すると、CE では CD138 陽性細胞が増えるほど Th1 細胞は増加し、Th2 細胞は減少した。



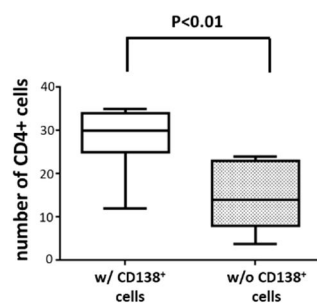
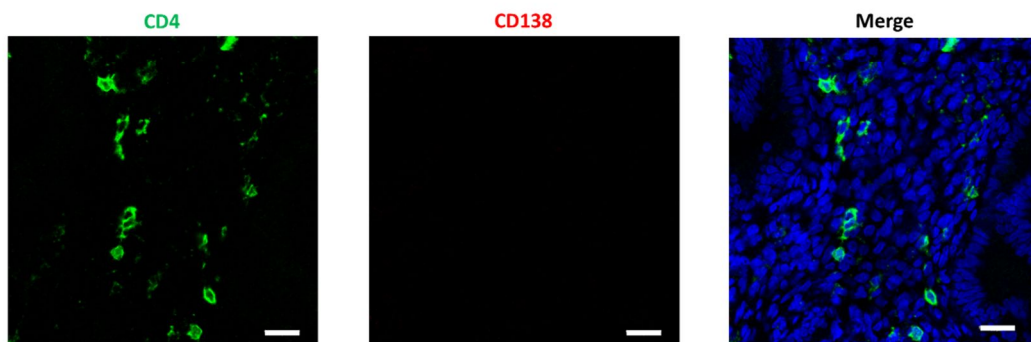
(3) 子宮内膜 Th 細胞と形質細胞の分布の検討

(2) より、子宮内膜 Th1・Th2 細胞は形質細胞数と相関することが判明した。さらに Th 細胞と形質細胞の関連を検討するため、7 例の CE 症例において子宮内膜の CD4 (Th 細胞マーカー) および CD138 (形質細胞マーカー) の蛍光免疫染色を施行した。形質細胞周囲 (代表図 a) と形質細胞から離れた領域 (代表図 b) で CD4 陽性細胞数を比較したところ、CD4 陽性細胞は有意に CD138 陽性細胞周囲に集簇していることが明らかになった。

a



b



本研究により、CE 患者の着床期子宮内膜では Th1/Th2 細胞のバランスが Th1 細胞優位となることが明らかとなった。通常、着床期子宮内膜は Th2 細胞優位となることが知られているが、CE ではこの Th 細胞のバランスが変動していた。また、CE では子宮内膜の形質細胞数が増加するほど Th1 細胞優位となり、Th 細胞は形質細胞周囲に集簇していた。この要因として、以下の可能性が考えられる。

CE の原因となる細菌やウイルスに対して、Th1 細胞と形質細胞が共に免疫応答している。これまで CE の原因は腸球菌や大腸菌、マイコプラズマやウレアプラズマなどの細菌感染が考えられていたが、細胞性免疫に関与する Th1 細胞が増加していることから、何らかのウイルス感染が関与している可能性も示唆された。

Th 細胞や形質細胞が子宮局所で分化しており、その分化に相互が関与している。この場合、子宮内に形質細胞の分化の場である胚中心が形成されている可能性がある。今回の検討では、Treg 細胞や Th17 細胞には変動は認められなかった。一方で、CE 症例で Th1/Th2 細胞比は上昇していたが、Th1/Treg 細胞比には有意差が認められなかった。このことから、CE では Th1 細胞増加による炎症状態は増強している一方で、Treg 細胞による免疫寛容性は維持されている可能性が示唆された。

現在、CE の治療は主にドキシサイクリンやメトロニダゾール、シプロフロキサシンなどの抗菌薬が用いられている。抗菌薬治療で CE が陰性化すれば non-CE 症例と同等の妊娠率に改善するが、抗菌薬治療を数クール施行しても CE が陰性化しない症例も存在する。このような CE 持続症例に対して、Th1/Th2 細胞バランスの変動を改善するような免疫抑制剤が妊孕性の改善につながる可能性があると考えられた。

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 0件）

1. 著者名 Kitazawa Jun, Kimura Fuminori, Nakamura Akiko, Morimune Aina, Hanada Tetsuro, Amano Tsukuru, Tsuji Shunichiro, Kasahara Kyoko, Satooka Hiroki, Hirata Takako, Kushima Ryoji, Murakami Takashi	4. 巻 85
2. 論文標題 Alteration in endometrial helper T cell subgroups in chronic endometritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American 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) 10.1111/aji.13372	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 北澤純、木村文則、中村暁子、高島明子、森宗愛菜、郭翔志、村上節
2. 発表標題 慢性子宮内膜炎における子宮内膜免疫担当細胞の変動の検討
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------