

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791818

研究課題名（和文） 胎児抗原特異的制御性 T 細胞の重要性

研究課題名（英文） The importance of fetal antigen specific regulatory T cells in allogeneic pregnancy

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

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。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胎児（父親）抗原特異的制御性 T 細胞の関与について検討した。胎児（父親）抗原特異的制御性 T 細胞は父親抗原に対して強い抑制活性をもち、アロ交配では着床直前の子宮所属リンパ節ですでに増加しており、着床直後には子宮局所に速やかに集簇し、妊娠成立維持機構に重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Regulatory T (Treg) cells play an essential role for induction of feto-maternal tolerance. To understand the pathophysiology of unknown etiology of recurrent pregnancy loss and implantation failure, we have studied the paternal(fetal) antigen-specific Treg cells using mouse model. Paternal antigen specific Treg cells had paternal antigen specific immunosuppressive activity. Furthermore, paternal antigen specific Treg cells increased in the draining lymph nodes just before implantation, and in the uterus after implantation in allogeneic pregnant mice, but not in syngeneic pregnant mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：母児免疫寛容、胎児（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semi-allograftである胎児が母体免疫機構から拒絶されずに妊娠が維持継続す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維持に制御性T細胞（以下Treg）が重要な役割を果たしており、これまでの報告により、Treg細胞は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、マウス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（Sasakiら, Mol Hum Reprod. 10: 347-353,2004、Aluvihareら, Nat Immunol. 5: 266-271,2004; Zenclussenら, Am J Pathol. 166: 811-822,2005, 2005 J Reprod Immunol. 65: 101-110.; Zhuら, Biol Reprod. 72: 338-345, 2005; Robertsonら, Biol Reprod. 80:

1036-1045,2009)。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）、ヒト反復流産症例（Sasakiら, Mol Hum Reprod. 10: 347-353,2004）、ヒト妊娠高血圧症候群症例（Sasakiら, Clin Exp Immunol. 149: 139-145,2007）ではTreg細胞数が正常妊娠例に比較して減少しており、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。

筆者は、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）。しかし、妊娠後期にTreg細胞を除去しても早産や妊娠高血圧症候群様の症状は出現しなかった。すなわちTreg細胞は着床時、妊娠初期にアロ妊娠維持に極めて重要であることを初めて証明した。アロ交配でのみTreg細胞数の減少と着床不全、流産率が関与している点から、Treg細胞は胎児（父方）抗原特異的に機能していることが推察された。また、ヒトTreg細胞にもsubpopulationが存在し免疫抑制活性の違いが証明されている。今回、筆者はTreg細胞の中に胎児（父親）抗原特異的Treg細胞が存在すると考え、この胎児（父親）抗原特異的制御性T細胞に注目しその存在を証明するべく研究を進めた。

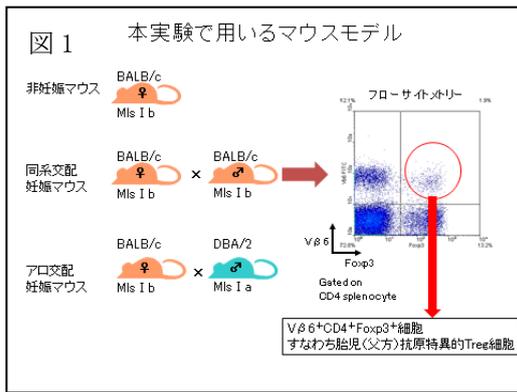
2. 研究の目的

ヒトでは主要組織適合性抗原の多様性のため胎児（父親）抗原特異的 Treg 細胞の検出は現在のところ不可能である。このため、ヒトでの胎児（父親）抗原特異的 Treg 細胞の同定への応用が可能になることを目的とし、まずマウスモデルでの胎児（父親）抗原特異的 Treg 細胞を同定し、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胎児（父親）抗原特異的 Treg 細胞の phenotype の特定、機能解析（胎児抗原非特異的 Treg 細胞との比較）

胎児（父親）抗原特異的Treg細胞は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ことを筆者らはすでに証明した。この系においてDBA/2マウスの細胞が発現しているMIc I a抗原はBALB/cマウスT細胞のT細胞受容体（TCR）Vβ6で認識され、図1の○で囲った細胞群（CD4⁺Foxp3⁺Vβ6⁺細胞）が胎児（父親）抗原特異的Treg細胞と同定できる。この系を用いて、胎児（父親）抗原特異的Treg細胞のPhenotypeおよび機能解析を行った。BALB/cマウス（♀）×DBA/2マウス（♂）をアロ交配させ、膣栓にて妊娠成立を確認した。妊娠成立したBALB/c（♀）マウスを妊娠3.5日目、5.5日目、10.5日目、17.5日目に解剖し、末梢血、脾臓、全身表在リンパ節、子宮所属リンパ節および子宮からリンパ球を分離したうえで、フローサイトメトリーにて胎児（父親）抗原特異的Treg細胞（Vβ6⁺CD4⁺Foxp3⁺細胞）のphenotype(ケモカインレセプター発現、活性化マーカーならびに細胞増殖マーカーの発現)を解析した。



また、Mixed lymphoid reaction を用いて胎児(父親)抗原特異的 Treg 細胞と非特異的 Treg 細胞の抑制活性、あるいは増殖能を *in vitro* で比較検討し、胎児(父親)抗原特異的 Treg 細胞と非特異的 Treg 細胞の機能的な差異の有無を検討した。

さらに胎児抗原特異的 Treg 細胞および非特異的 Treg 細胞集団を Flow cytometry で sorting し、mRNA を抽出し、マイクロアレイにて発現遺伝子について比較検討した。

(2) ヒト検体における胎児(父親)抗原特異的 Treg 細胞の特定とその変動

研究(1)でマウスにおける胎児(父親)抗原特異的 Treg 細胞の phenotype を特定したのち、同様な phenotype を持つ Treg 細胞がヒト検体ではどのように変動しているかを解析することとし、同意を得られた人工妊娠中絶術施行症例(ヒト正常妊娠例)、胎児染色体異常流産例、胎児染色体正常流産例より末梢血、脱落膜を回収しリンパ球を分離し、ヒトにおける胎児(父親)抗原特異的 Treg 細胞がどのように変動しているのかフローサイトメトリーにて解析した。

4. 研究成果

マウス妊娠にておいて胎児(父親)抗原特異的制御性 T 細胞はアロ妊娠においてのみ着床直前(妊娠 3.5 日目)より所属リンパ節で着床直後(妊娠 5.5 日目)より子宮局所で増殖していることをつきとめた(図 2、図 3)。脾

臓や全身表在リンパ節、および同系交配では変化を認めなかった。着床直前からの所属リンパ節での胎児(父親)抗原特異的制御性 T 細胞増加は精漿によるプライミングが関与している可能性があり、今後も研究をすすめていく必要がある。

図2 膺リンパ節における父親抗原特異的増殖性Treg細胞の変動 (Vβ6⁺Ki67⁺Foxp3⁺/CD4⁺)

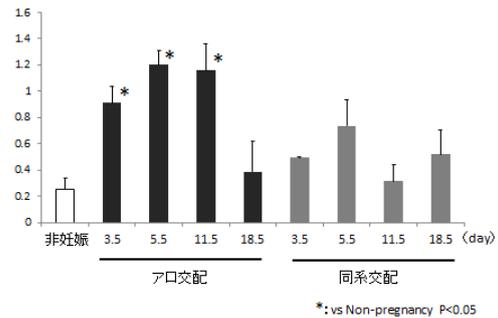
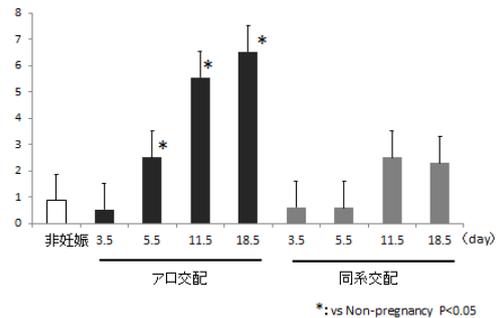


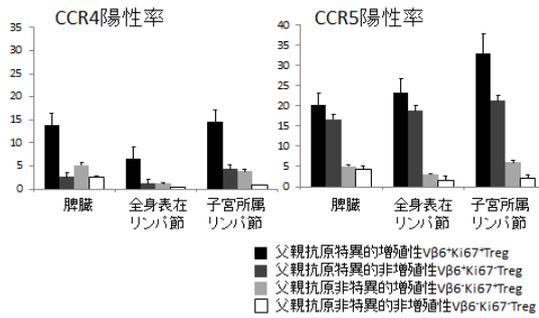
図3

子宮における父親抗原特異的増殖性Treg細胞の変動 (Vβ6⁺Ki67⁺Foxp3⁺/CD4⁺)



また、Mixed lymphoid reaction を用いた機能解析で胎児(父親)抗原特異的制御性 T 細胞は非特異的制御性 T 細胞に比較し、父親抗原に対して抑制活性が高いことを確認した。マウスにおける胎児(父親)抗原特異的制御性 T 細胞の phenotype 特定のため各種ケモカイン、ケモカインレセプター、活性化マーカーをフローサイトメトリーで検討したところ、胎児(父親)抗原非特異的制御性 T 細胞に比較し、CCR4 や CCR5 が強陽性であった(図 4)。

図 4 父親抗原特異的Treg細胞におけるCCR4,CCR5の発現 (BALB/c♀×DBA/2♂ 妊娠35日目)



同様な phenotype (CCR4、CCR5) がヒトでの胎児(父親)抗原特異的 Treg 細胞となりうるか正常妊娠、および胎児染色体異常流産、胎児染色体正常流産で検討したが有意なマーカーではなかった。このため、代替マーカー検索のため、現在、マウス胎児(父親)抗原特異的制御性 T 細胞を回収しマイクロアレイにて遺伝子解析をすすめており、今後ヒトに応用できるか検討していきたい。

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 6 件)

- ① Toldi G, Saito S, Shima T, Halmos A, Veresh Z, Vászárhelyi B, Rigó J Jr, Molvarec A. The Frequency of Peripheral Blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ Regulatory T Cells in Normal Pregnancy and Pre-Eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2012;68:175-80. doi: 10.1111/j.1600-0897.2012.01145.x. 査読有
- ② Nakashima A, Shima T, Inada K, Ito M, Saito S. The Balance of the Immune System between T Cells and NK Cells in Miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 67:304-310, 2012. 査読有

- ③ Toldi G., Saito S, Shima T., Halmos A., Veresh Z., Vászárhelyi B., Rigó J., Molvarec A. The frequency of peripheral blood CD4+ CD25high FoxP3+ and CD4+ CD25- FoxP3+ regulatory T cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 68:175-80, 2012. 査読有

- ④ Saito S, Nakashima A, Ito M, Shima T. Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011;7:649-57. 査読有

- ⑤ Saito S., Nakashima A., Shima T. : Future directions of studies for recurrent miscarriage associated with immune etiologies. *J Reprod Immunol.* 90:91-95, 2011. 査読有

- ⑥ Molvarec A, Blois M S, Stenczer B, Toldi G, Tirado-Gonzalez I, Ito M, Shima T, Yoneda S, Vászárhelyi B, Rigó J., Saito S. Peripheral blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin. Immunol* 139:48-56, 2011. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 島 友子 : 制御性 T 細胞は精漿のプライミングにより子宮内に増加し、着床および初期の妊娠維持に重要な役割を果たす : 第 26 回日本生殖医学会学術講演会、シンポジウム : 2012 年 12 月 8 日 : 大阪医科大学
- ② 島 友子 : Seminal fluid priming is important for inducing the paternal antigen-specific Tregs resulting in the successful implantation : 13th

International Symposium of Immunology
of Reproduction(13th ISIR)、Special
Prof. Hans Donat Awward受賞：2012年6
月22日～24日：Varna, Bulgaria

- ③ 島 友子：Paternal antigen-specific
inducible regulatory T cells are
increased just before the implantation
by seminal fluid-priming：the Joint
International Congress of the American
Society for Reproductive Immunology
(ASRI) and the European Society for
Reproductive Immunology (ESRI):2012
年5月31日～6月2日:Hamburg/Germany
- ④ 島 友子：精漿によるプライミングによ
り着床直前から子宮所属リンパ節には父
親抗原特異的制御性T細胞が増加する：第
64回日本産科婦人科学会学術講演
会:2012年4月13日：兵庫県神戸市
- ⑤ 島 友子：制御性T細胞は精漿のプライ
ミングにより子宮内に増加し、着床およ
び初期の妊娠維持に重要な役割を果た
す：第26回日本生殖医学会学術講演会、
シンポジウム:2011年12月8日：パシフ
ィコ横浜
- ⑥ 島 友子：精漿によるプライミングによ
り着床直前から父親抗原特異的制御性T
細胞が増加する：第56回日本生殖免疫学
会学術講演会：2011年12月2日：ウイ
ンク愛知

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