

シンポジウム1 流産の原因と対策

4) 免疫学的異常による流産原因の解明

富山大学 中 島 彰 俊

【目的】

流産の原因は多岐にわたるが、一方で習慣流産の原因には自己免疫疾患・自己免疫異常・抗リン脂質抗体症候群など免疫が関与することが知られている。我々は新たな治療法を模索するため、これまで不明であった母体免疫細胞による胎児認識機構を中心に流産原因を明らかにすることにした。

【方法】

リンパ球のサイトカイン・表面マーカーの検出は、免疫染色または Flow cytometry にて行った。サイトカインの定量は ELISA、免疫組織染色は DAB 染色、蛍光2重染色にて行い、mRNA レベルは RT-PCR 法、タンパク発現は Western Blot を用いた。流産誘導モデルとして CD25 抗体(PC61)を①妊娠2.5日、②4.5日および7.5日、③10.5日および13.5日に腹腔内投与し、妊娠胎仔数等を計測した。絨毛外栄養膜細胞(EVT)セルラインには HTR8/SVneo 細胞を使用し、臨床検体は患者の同意を得たうえで研究に使用した。

【成績】

1) Th1/Th2 バランスと流産 a) T 細胞による制御：原因不明の不妊症例において、胎児染色体異常例では Th2 細胞、Tc2 細胞の減少を認めなかったが、胎児染色体正常の流産例では Th2 細胞、Tc2 細胞は着床部において有意に減少し、Th1 優位な環境にあった。b) NK 細胞による制御：脱落膜 NK 細胞は妊娠初期脱落膜リンパ球の約 70% を占め、CD16⁺CD56^{bright} NK 細胞が主体であり、それらのサイトカイン産生能を検討した。流産例で免疫を抑制する TGFβ+ NK 細胞(NK3)が正常妊娠例に比し有意に低下し(p<0.0005)、Th1 サイトカインである IFNγ+ NK 細胞(NK1)が流産症例で増加していた(p<0.005)。次にホルモンによる NK 細胞のサイトカイン産生への影響を検討し

た。hCG、プロゲステロンは末梢血中 CD56^{bright} NK 細胞の IL-10 産生を亢進させ、プロラクチン、可溶性 HLA-G1 は TGFβ+ 産生を亢進させた。このことは妊娠関連ホルモンが NK 細胞を Th2 バランスに変化させることを示した。また一方で、T 細胞のみならず NK 細胞の Th1/Th2 アンバランスも流産に関与することが明らかになった。次に、不妊症女性 109 例の中で、明らかな原因を有さないが NK 活性のみ高値の症例が 14 例(12.8%)存在した。その 14 例に対し、リンパ球免疫療法(2例)あるいはステロイド治療(11例)を行ったところ、治療後の NK 活性低下群 9 例中 8 例(89%)が生児を獲得したのに対し、NK 活性高値継続群では 5 例中 1 例(20%)のみの生児獲得率であった(p<0.05)。この結果は免疫活性化による習慣流産の存在と、病態に NK 活性が関与することを示唆するものである。2) Granulysin を介した流産：我々はこれまで細胞傷害性分泌タンパクである Granulysin (Gra) が妊娠高血圧症候群患者の血清中で増加し Th1 免疫と正の相関を示すこと、また NK 細胞が流産に関与する可能性を報告した。そこで、流産症例で Gra+ NK 細胞の増減を検討した。着床部である基底脱落膜に Gra+ NK 細胞が有意に集積し(p<0.01)、脱落膜リンパ球中での Gra 発現細胞は CD56^{bright} NK 細胞が主であった。そこで、in vitro において脱落膜 NK 細胞から EVT セルラインへの Gra の移入実験を行った。NK 細胞の発現した Gra は、細胞接触および NK 細胞の Perforin 依存性に、EVT に移入され、Gra が EVT の核内に集積した後に EVT のアポトーシスを誘導することを証明した。3) 制御性 T 細胞と流産：制御性 T 細胞(Treg)は免疫寛容を誘導するために必須の細胞であり、妊娠中の役割を検討した。脱落膜中 Treg は正常妊娠で非妊時内膜

に比し有意に増加しており ($p < 0.0001$), 流産例では非妊時レベルまで有意に低下することが分かった ($p < 0.001$). 次に, 妊娠中母体での Treg の機能を検討するため, マウスモデルを用いて CD 25+細胞の減少 (広義の Treg 欠損モデル) の影響を検討した. 妊娠 2.5 日での抗 CD25 抗体投与で着床障害が観察された. 妊娠 4.5/7.5 日での抗体投与は, 抗体投与量依存性に流産率が増加し, 1mg 投与によりヘルパー T 細胞 (Th) 中の Treg 率は $1.6 \pm 0.6\%$ と, 正常妊娠の $11.8 \pm 1.4\%$ より有意に低値を示し ($p < 0.0001$), 流産率は $53.4 \pm 3.4\%$ まで増加した. 妊娠 10.5 日/13.5 日は影響を与えなかった. さらに, この現象は同種異系 (アロ) 妊娠にのみ認められ, 同種同系妊娠には認められなかった. 次に, アロ妊娠の系を用い増殖活性の強い胎児抗原特異的 Treg (Vb6+Ki67+Treg) 率の発現を検討した. 所属リンパ節では妊娠 2.5 日から, 子宮内には妊娠 4.5 日から Vb6+Ki67+Treg が有意に増加した. つまり, 胎児抗原認識後所属リンパ節で増えた Vb6+Ki67+Treg が子宮内に集積する可能性が考えられた. そこで, Vb6+Ki67+Treg において白血球遊走に関与するケモカイン受容体を調べたところ, CCR5 および CCR4 を有意に発現していた. これをヒトにフィードバックし, 脱落膜中 CD4+Ki67+Foxp3+Th 中の CCR5+細胞数を正常妊娠および流産例で比較

したところ, 流産群で有意に減少していた ($p < 0.05$). 4) Th17 と流産: 近年になり Th1/Th2 免疫に加え, 新しいパラダイムとして炎症に関与する Th17 細胞が報告されてきた. 妊娠中の Th17 産生細胞は CD4+T 細胞であり (Th17 細胞), 妊娠 3 半期での変化は認めなかったが, 正常妊娠で末梢血に比し脱落膜で有意に高かった ($p < 0.01$). 流産症例での IL-17 発現を検討したところ, IL-17+細胞は進行流産例で脱落膜全体に認められ, IL-17+細胞および周囲の好中球数が正常妊娠に比し有意な増加を示した ($p < 0.05$). つまり, IL-17+細胞は流産における最終段階の炎症誘導に関与することが示唆された.

【独創点/考察】

我々は末梢血, 脱落膜中での免疫担当細胞およびサイトカイン分泌変化だけでなく, 母体 NK 細胞が胎児由来 EVT 細胞を攻撃し流産に至らしめることをヒトで初めて証明した. さらに, ヒトならびにマウス実験系で Treg 細胞が胎児抗原を認識し, 妊娠維持に重要な役割を果たすことを示した. これは母体が積極的に胎児への免疫寛容を誘導し, Medawar 仮説から一歩進んだ概念である. また, ステロイド剤もしくはリンパ球免疫療法にて母体免疫系の過剰活性化を抑制してから妊娠すると高率に生児獲得できることも, このことを裏付ける現象と考えている.