

第 63 回日本産科婦人科学会・学術講演会

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

富山大学大学院医学薬学研究部産科婦人科学教室

助教 中島 彰俊

The Approaches to Clarify Spontaneous Abortion Based on Immunological Aspects

Akitoshi NAKASHIMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Toyama, Toyama

はじめに

妊娠は母体の子宮内に受精卵が着床することで始まり、胎児と胎盤が形成される。その後、胎盤の絨毛間腔に母体血が流れ込み、絨毛を介して母子間の栄養交換、酸素交換が行われる。その際、浮遊絨毛は直接母体血液と接触するが、浮遊絨毛は CD8⁺T 細胞や natural killer(NK)細胞に認識される主要組織適合性抗原(MHC)クラス I 抗原, CD4⁺T 細胞に認識されるクラス II 抗原共に発現しておらず、母体からの免疫応答が起きにくい。一方、絨毛外栄養膜細胞(extravillous trophoblast: EVT)は胎盤組織を子宮に固着させるために、妊娠初期に子宮筋層内に侵入する。さらに、EVT 細胞はラセン動脈の平滑筋を置換し動脈を拡張させることで絨毛間腔への血流を増加させ、妊娠維持に重要な役割を果たす。この EVT 細胞にも MHC クラス II 抗原は存在しないが、MHC クラス I 抗原である HLA-C, および MHC クラス Ib 抗原である HLA-E, HLA-F, HLA-G は発現している。つまり、胎児は母体の免疫応答の標的分子である移植抗原(MHC 抗原)の発現パターンを変化させ、母体免疫機構からの排除を回

避している。しかしながら、それだけでは不十分であり、サイトカイン等の液性因子も協調的に働くことで、免疫学的寛容(トレランス)が十分に誘導され、妊娠が維持される¹⁾²⁾。一方、この機序が破綻すると、着床部において母体免疫細胞と接する EVT 細胞が母体に異物と認識され、流産となってしまう。

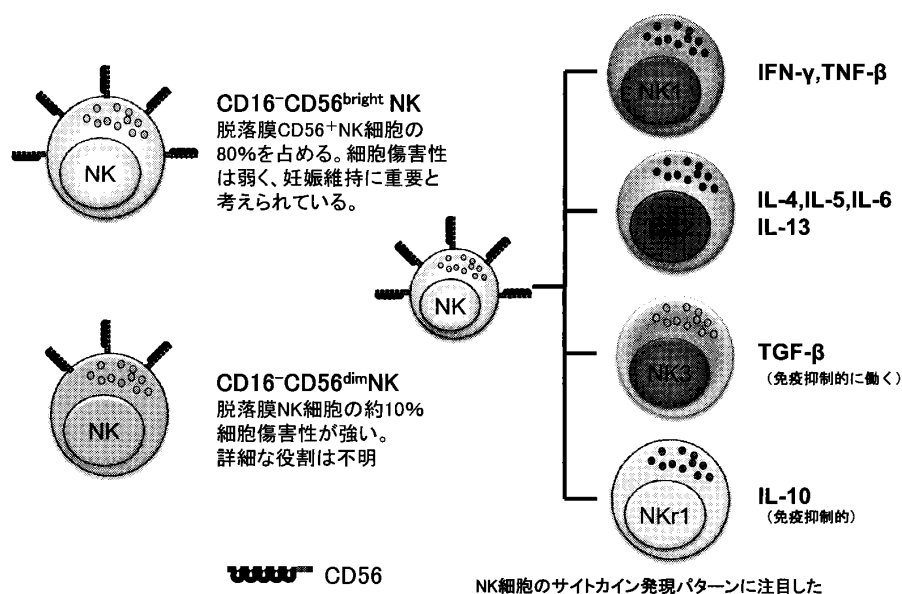
母体側すなわち脱落膜の白血球組成は末梢血中の組成と大きく異なり、約 70% を NK 細胞が占め、末梢血で主体となる T 細胞はわずか 10~20% であり、B 細胞がほとんど存在しないという特徴も持つ。加えて、この特徴的な母体側の免疫担当細胞に異変が生じれば、胎児拒絶が起こり流産となることもわかっている。本発表では、NK 細胞、T 細胞に注目し、それぞれの細胞における妊娠維持・胎児拒絶に関わる機能を紹介すると共に、免疫学的異常が流産を誘導するメカニズムについて解説する。

方法と結果

1. 妊娠ホルモンによる免疫抑制性 NK 細胞の誘導

NK 細胞は自然免疫の中心的役割を果たす細胞

Key Words: CD56bright-NK cells, Granulysin, Regulatory T cells, Th17 cells, Tolerance

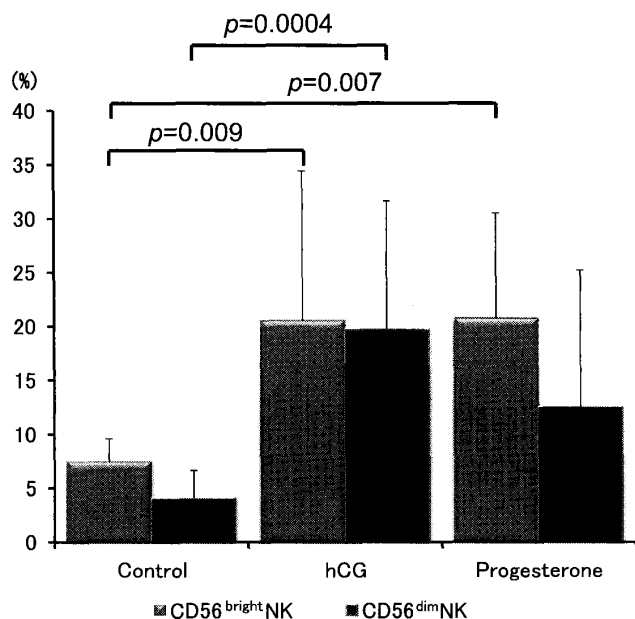
【図1】 CD56^{bright} NK 細胞サブセット

であり、抗原の種類やMHCに拘束されないで腫瘍やウイルスに感染した細胞膜上に発現した抗原を特異的に認識し、標的細胞を攻撃する。NK細胞は末梢血のみならず妊娠時の子宮脱着膜内に多数存在する。末梢血NK細胞の95%はCD16⁺CD56^{dim}NK細胞と数%のCD16⁻CD56^{bright}NK細胞の2つのサブセットに分かれ、末梢血CD16⁺CD56^{dim}NK細胞は強い細胞傷害活性を示す。一方、脱着膜NK細胞サブセットは末梢血と大きく異なり、CD16⁻CD56^{dim}NK細胞が10~20%、CD16⁻CD56^{bright}NK細胞が約70~80%と、細胞傷害性の低いCD16⁻CD56^{bright}NK細胞が有意に高いという特徴を持つ³⁾。さらに、末梢血および脱着膜NK細胞における転写因子の遺伝子発現解析の結果、末梢血NKと脱着膜NKに高発現している遺伝子が多数認められ、NK細胞の変化が妊娠に強く関与していることが分かっている⁴⁾。

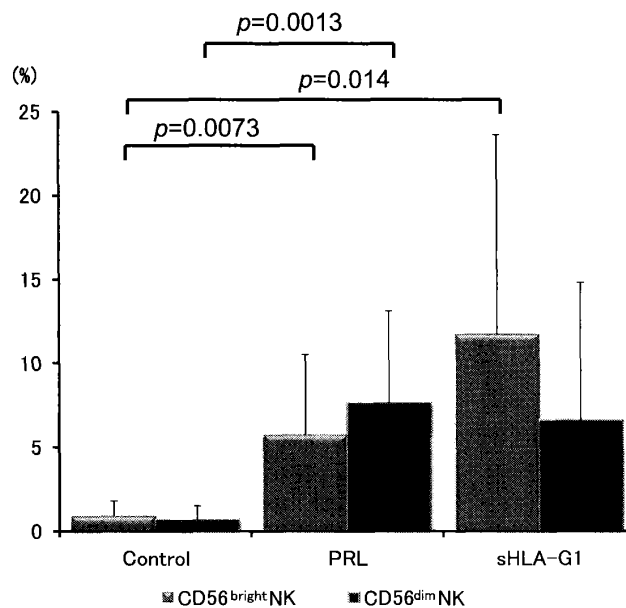
脱着膜NK細胞が妊娠維持に深く関与し、CD16⁻CD56^{bright}NK細胞が妊娠維持に重要なことは明らかであった。そこで、我々はさらに末梢血および脱着膜中のCD16⁻CD56^{bright}NK細胞をサイトカイン発現パターンから以下の4つのサブセットに分けて、正常妊娠群、自然流産群、非妊娠群を比較した(Th1サイトカインを発現するNK1, Th2サイトカインを発現するNK2, TGF(tumor

growth factor)-βを発現するNK3, IL(Interleukin)-10を発現するNKr1細胞の4つのサブセット：図1)。末梢血CD16⁻CD56^{bright}NK細胞において、正常妊娠群におけるNKr1細胞率は22.1±15.0%であり、自然流産の6.4±5.8%($p<0.005$)および非妊婦の3.2±3.5%($p<0.0001$)に比し有意に高値を示した。さらに、脱着膜CD16⁻CD56^{bright}NK細胞においても同様の検討を行ったところ、NKr1細胞率に有意な変化はなかったものの、NK3細胞率が19.2±9.1%であり、自然流産の1.2±2.5%($p<0.0005$)に比し有意に高値を示した。つまり、NK細胞サブセットの解析から、正常妊娠時のCD16⁻CD56^{bright}NK細胞のサイトカイン発現は末梢血ではIL-10発現NKr1細胞、脱着膜(局所)ではTGF-β発現NK3細胞が、自然流産群に比し有意となることが明らかとなった⁵⁾。

次に、正常妊娠時に誘導される末梢血NKr1細胞および脱着膜NK3細胞が、妊娠時のホルモンおよび可溶性HLA-G1(HLA-G1とは栄養膜細胞が発現する非古典的MHCであり、母体由来の免疫細胞がそれを認識する)によって誘導されるかを検討した。方法として、非妊婦女性の末梢血より単核球を分離した後、IL-2(1ng/mL)およびホルモン等(エストロゲン、プロゲステロン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、プロラクチン、可溶性HLA-G1)



【図2】 hCG/Progesterone は末梢血 CD56⁺NK 細胞から NKr1 (IL-10 陽性) を誘導



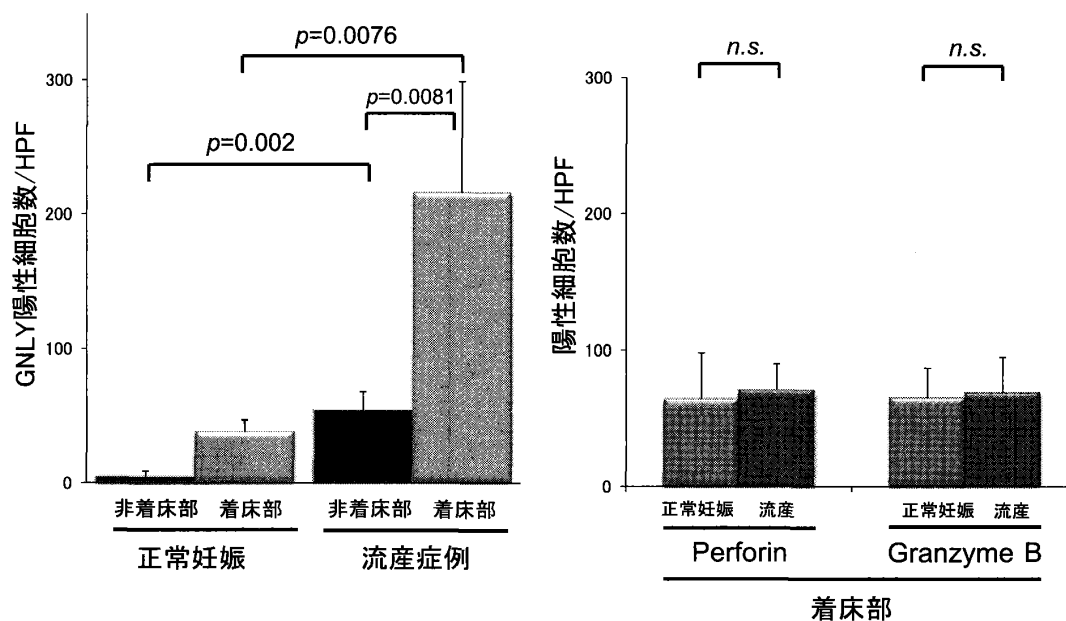
【図3】 PRL/sHLA-G1 は末梢血 CD56⁺NK 細胞から NK3 細胞 (TGF- β 陽性) を誘導

をそれぞれ培養液に添加し、7日間培養後に CD16⁺CD56^{dim}NK 細胞 および CD16⁺CD56^{bright}NK 細胞におけるサイトカイン発現パターンを解析した。プロゲステロンを 10^{-5} モル濃度で処理した場合に、CD16⁺CD56^{bright}NK 細胞の IL-10 発現 (NKr1 への誘導) が有意に上昇した ($p=0.007$)。一方、CD16⁺CD56^{dim}NK 細胞には IL-10 発現の有意な上昇を認めなかった。次にヒト絨毛性ゴナドトロピン処理時 (20IU/mL) には、有意な IL-10 発現上昇が CD16⁺CD56^{dim}NK 細胞 ($p=0.0004$) および CD16⁺CD56^{bright}NK 細胞 ($p=0.009$) において認められた (図2)。つまり NKr1 細胞への誘導にはプロゲステロンおよびヒト絨毛性ゴナドトロピンが重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、プロゲステロンおよびヒト絨毛性ゴナドトロピンは NK1, NK2, NK3 細胞率には影響を与えなかった。次に、プロラクチンを 20ng/mL 濃度で処理した場合に、有意な TGF- β 発現上昇 (NK3 への誘導) が CD16⁺CD56^{dim}NK 細胞 ($p=0.0013$) および CD16⁺CD56^{bright}NK 細胞 ($p=0.0073$) において認められた。次に、可溶性 HLA-G1 を 50ng/mL 濃度で処理した。HLA-G1 は CD16⁺CD56^{bright}NK 細胞の TGF- β 発現を有意に上昇させたが ($p=0.014$)、CD16⁺CD56^{dim}NK 細胞の TGF- β 発現には影響を

与えなかった (図3)。NK3 細胞への誘導には、脱落膜が産生するプロラクチンおよび栄養膜細胞が産生する HLA-G1 が重要であることがわかった。以上より、正常妊娠の脱落膜 NK 細胞は、流産に比し免疫抑制的 NK 細胞である TGF- β 発現 NK3 細胞および IL-10 発現 NKr1 細胞が有意に高値を示すことがわかった。さらに、それら免疫抑制的 NK 細胞の誘導に、プロゲステロン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、プロラクチン、HLA-G1 が関与することが明らかとなった。

2. CD56^{bright}NK 細胞による流産誘導メカニズム

脱落膜 NK 細胞の重要な機能として、EVT 細胞の制御がある。本来 EVT 細胞は悪性化細胞のような強い浸潤能をもつ細胞であるが、その浸潤は子宮筋層の約 1/3 まで及ぶものの、そこで浸潤を停止する。脱落膜中の NK 細胞は胎盤血管の構築にも重要な役割を果たし⁶⁾、脱落膜 NK 細胞から産生されるケモカインである IL-8 および IP-10 (interferon-inducible protein-10) が EVT 細胞浸潤を有意に増強することが報告されている⁷⁾。上述のごとく、正常妊娠時には CD16⁺CD56^{bright}NK 細胞が免疫抑制的に働く環境をつくることで、EVT 浸潤に対し正に働くと考えられる。一方で我々は、

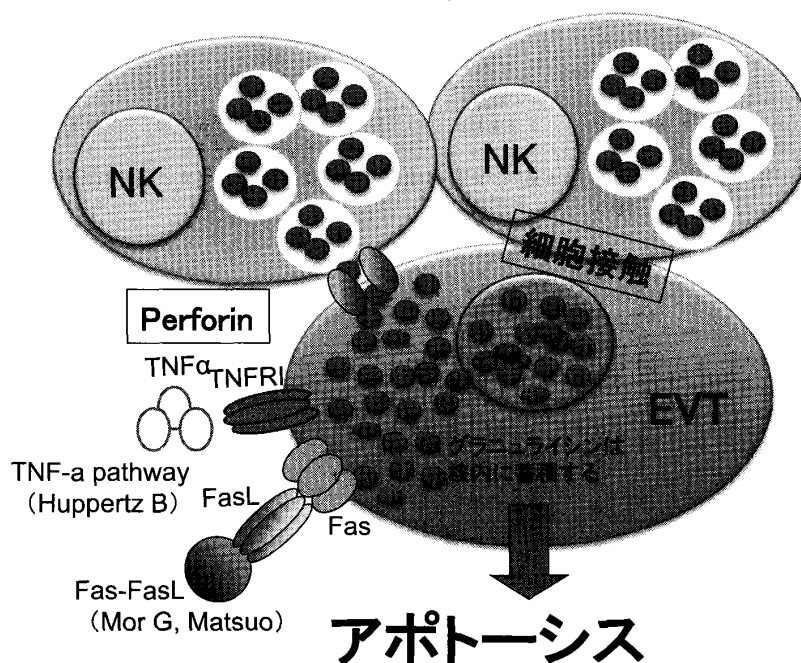


【図4】 Granulysin 陽性細胞は流産症例の着床部に集積

自然流産時のNK3やNKr1細胞の低下が流産誘導に関与すると考えた。つまり、免疫抑制的NK細胞の減少によって免疫が活性化され、本来細胞傷害性が弱いCD16⁺CD56^{bright}NK細胞の細胞傷害性に変化が起こるのではないかと仮説を立てた。そこで、まず初めにNK細胞の細胞傷害性分泌顆粒であるPerforin, Granzyme B, Granulysinの発現を正常妊娠、自然流産症例で検討した。Perforin, Granzyme Bの発現は、正常妊娠、自然流産間に有意な発現の差を認めなかったが、Granulysin発現は自然流産症例において正常妊娠に比し有意に高く、特に着床部におけるGranulysin陽性細胞数は正常妊娠の60±13個/HPFに比し、自然流産で218±82個/HPFと有意に高い結果が得られた(図4)。Granulysinは細胞傷害性T細胞あるいはNK細胞が発現する分泌顆粒タンパクであるため、脱落膜リンパ球細胞におけるGranulysin発現をFlow cytometryにて検討した。Granulysin発現はCD56^{bright}NK細胞に認められ、CD56^{dim}NK細胞やCD3陽性T細胞にはほとんど発現を認めなかった。また、Granulysin陽性CD56^{bright}NK細胞率は正常妊娠で20.2±2.9%であったのに対し、自然流産では33.8±6.4%と有意に高値を示した(p=0.043)。つまり、自然流産におけるGranulysin発現はCD16⁺CD56^{bright}NK細胞

が主体であることが明らかとなった。次に、流産検体におけるGranulysin発現の局在を確認するために、サイトケラチン(EVTマーカー)とGranulysinの2重免疫組織染色を行った。すると、Granulysin発現がEVT細胞内(特に核内)に散見されるという興味深い結果が得られた。EVT細胞はGranulysinを産生しないため、核内のGranulysinはCD16⁺CD56^{bright}NK細胞に由来する可能性が高い。Granulysin陽性EVT細胞数を比較すると、正常妊娠で0.5±0.5個/HPFに対し流産症例で3.7±0.8個/HPFと有意に(p=0.0083)Granulysin陽性細胞が多く認められ、同様の検体比較において抗cleaved-サイトケラチン18抗体陽性EVT細胞(初期アポトーシス細胞)が流産症例で有意に高値を示した(p=0.015)。つまり、EVTのアポトーシスはNKからのGranulysin移入によって起こっている可能性が示された。次に、*in vivo*におけるGranulysinのEVTへの移入を*in vitro*にて証明するために、人工妊娠中絶検体から脱落膜リンパ球を分離し、IL-2(1ng/mL)含培養液にて24時間刺激培養した(Granulysin発現を免疫染色にて確認)。それらの脱落膜リンパ球をEVTセルラインであるHTR8/SVneo細胞と共培養を行い、リンパ球を洗浄・除去後にHTR8/SVneo細胞内のGranulysin発現を検討した。その

Granulysinによる 流産誘導

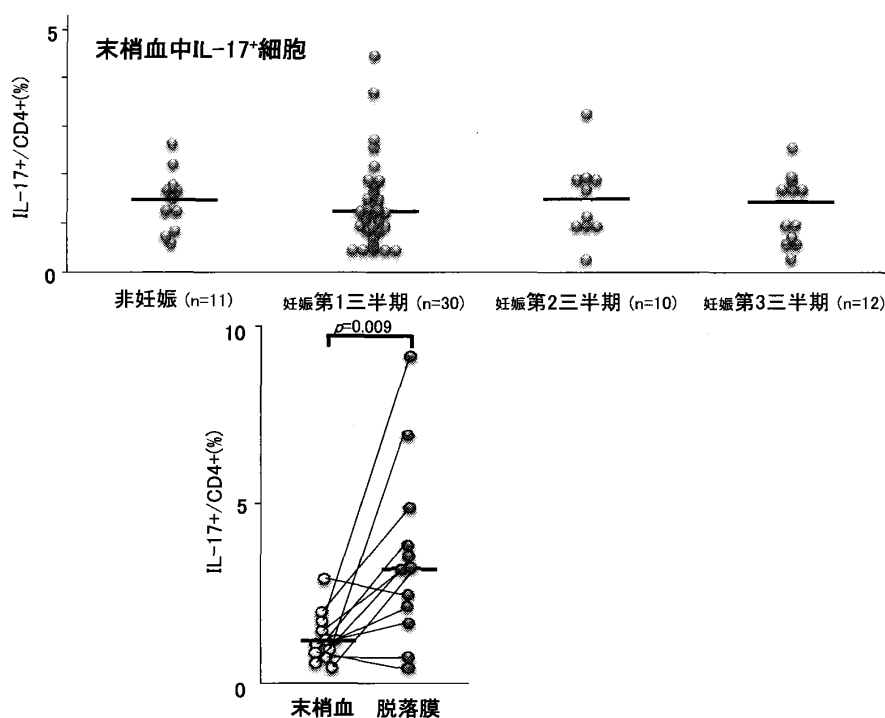


【図5】NK細胞による流産誘導

結果, Granulysin を発現していない HTR8/SVneo 細胞内に, 共培養 12 時間から 18 時間後にかけて, HTR8/SVneo 細胞質内に Granulysin 発現が増強し, 24 時間後には Granulysin が HTR8/SVneo 細胞核内に集積を認めた. さらに NK 細胞から HTR8/SVneo 細胞への Granulysin 移入メカニズムを明らかにするため, トランスウェルを用いた細胞間接触阻害実験および, コンカナマイシンを用いた Perforin (NK 細胞の分泌顆粒移入に関与する) 阻害実験を行った. その結果, Granulysin の移入には NK 細胞と EVT 細胞の接触および Perforin が必要であることが明らかとなった. 以上より, 免疫抑制機構の低下した流産症例では, NK 細胞の過剰な活性化が起こり, Granulysin 発現 NK 細胞が EVT 細胞を攻撃し, EVT 細胞をアポトーシスに陥らせることが明らかとなった. このことは“母体由来”の NK 細胞が“半移植片である胎児由来”絨毛外栄養膜細胞を直接攻撃することをヒトで初めて証明したものである⁸⁾ (図 5).

以前より不育症の 20~30% に NK 活性が高値 (40% 以上) を示す症例が認められ, これらの症例

では亢進した細胞性免疫により, 母親の免疫担当細胞が胎児を攻撃している可能性があった. 我々のデータは, 正常妊娠において免疫抑制的 NK 細胞が増加すること, さらに流産症例では免疫抑制的 NK 細胞が低下し高い細胞傷害活性をもつ NK 細胞が流産誘導に関与することを証明した. それらをもとに NK 活性と妊娠成立の関係を検討した. 対象は当科不育症外来通院中の患者 175 名の中から, 明らかな不育症原因を持たない NK 活性高値例 28 例であり, ステロイド内服 (n=26) および夫リンパ球免疫療法 (n=2) 後に NK 活性を測定した. その中から, 治療後 NK 活性低下群 21 例と治療後 NK 活性非低下群 7 例に対し妊娠成功率 (22 週以降の分娩率) を算出したところ, NK 活性非低下群では 3 例 (43%) であったのに対し NK 活性低下群で 20 例 (95%) と有意な成功率が得られた (p=0.011). これらのことより, 末梢血 NK 活性高値は妊娠成立時の脱落膜 NK 活性に何らかの影響を及ぼすと考えており, ステロイド剤などの免疫抑制が妊娠予後を改善したものと考えられる. 治療後の制御性 T 細胞の変化を含め, さらな



【図6】正常妊婦では脱落膜リンパ球にIL-17⁺細胞が増加

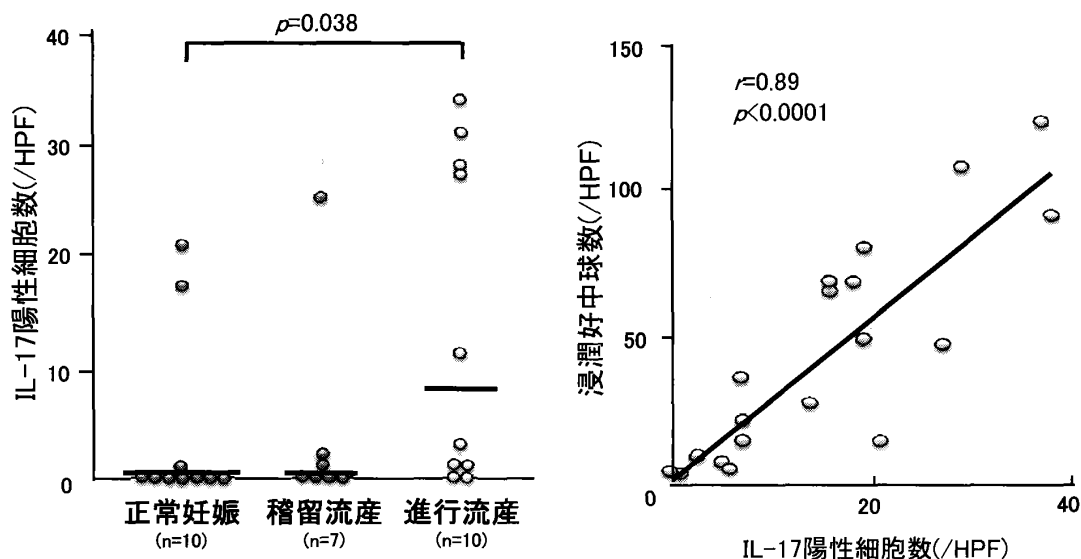
る検討を行う予定である。

3. Th17 細胞の流産への関与

これまで自然免疫にかかわるNK細胞について報告してきた。先に述べたように、獲得免疫の主役であるT細胞は脱落膜リンパ球中では10～20%程度と末梢血よりも明らかに減少するが、妊娠維持においてNK細胞に勝るとも劣らない働きをする。T細胞は細胞性免疫を司るTh1細胞、液性免疫を司るTh2細胞に大別され、異物である胎児を許容するために胎児を攻撃するTh1細胞が減少し、Th2細胞が優位になることで妊娠が維持されと考えられてきた⁹⁾。しかし、Th2サイトカインであるIL-4, IL-5, IL-9, IL-13をノックアウトしたマウスでもアロ妊娠が成立することや、妊娠時のTh1/Th2バランスは軽度しかTh2優位にならないことで、他の免疫系の関与が考えられてきた。その中で最も注目を浴びたのが制御性T細胞(次項)であるが、一方で関節リウマチなどの慢性炎症や好中球を介した感染防御に関与するTh17細胞(IL-17発現CD4陽性ヘルパーT細胞)も注目を浴びており、我々もIL-17が切迫早産に関与することを報告している¹⁰⁾。興味深いことに、抗炎症

作用をもつ制御性T細胞と炎症を惹起させるTh17細胞が、共通の前駆細胞から発生する¹¹⁾。つまり、ヘルパーT細胞パラダイムはTh1/Th2からTh1/Th2制御性T細胞/Th17細胞へと広がっていたのである¹²⁾¹³⁾。そこで、我々は制御性T細胞と共に、Th17細胞の妊娠中の変化や役割について検討した。

まず初めに、末梢血および脱落膜白血球中におけるIL-17発現を検討した。IL-17発現は、脱落膜および末梢血共にCD4陽性ヘルパーT細胞の一部に認められたが、CD8陽性細胞傷害性T細胞やCD56陽性NK細胞等には認められなかった。次に、妊娠第三半期間における末梢血中Th17細胞率を検討したところ、妊娠期間を通して1.2%と有意な変化を認めなかったが、同一検体における末梢血および脱落膜リンパ球のTh17細胞率では、末梢血の中央値1.1%(0.4～2.9%)に対し脱落膜では3.2%(0.4～9.1%)と局所的に優位にTh17細胞が集積することがわかった(図6, $p=0.009$)¹⁴⁾。Th17細胞は炎症惹起に関わることや、妊娠中のTh17細胞が脱落膜に集積しやすいということから、Th17細胞と流産の関与について次に



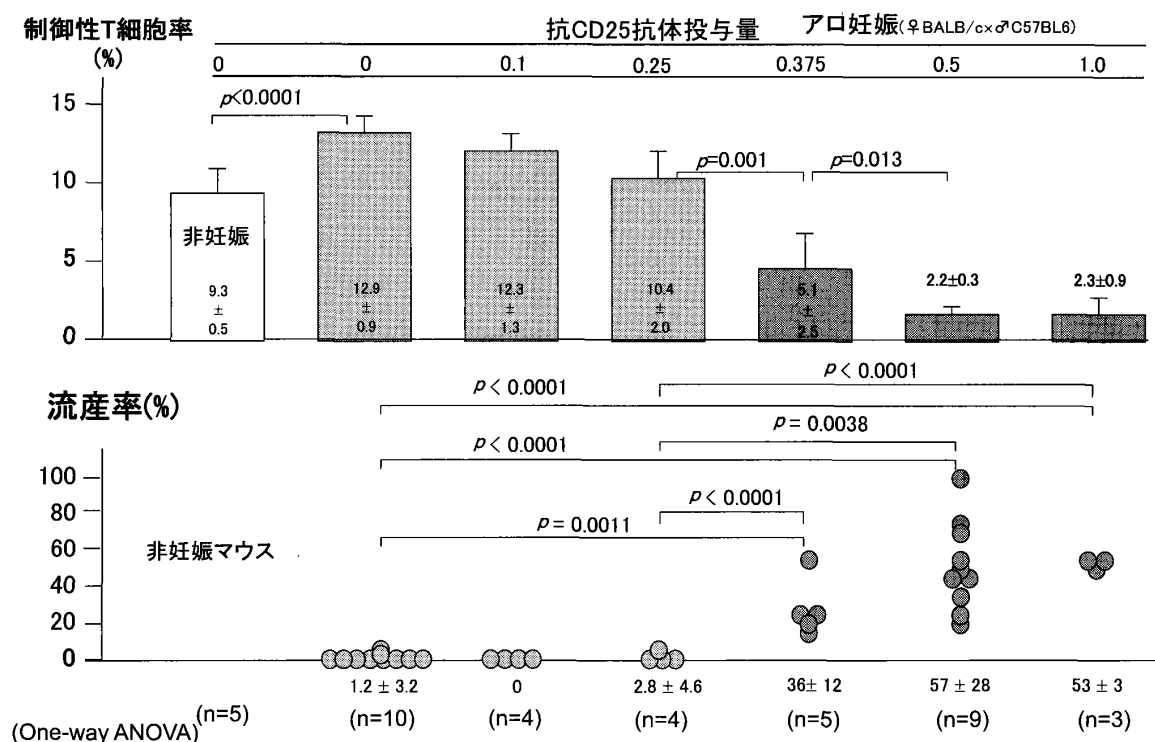
【図 7】 IL-17 は進行流産で増加し，好中球浸潤を誘導

検討した。初めに IL-17 発現を正常妊娠および自然流産で検討すると，IL-17 発現は正常妊娠ではほとんど認められなかったが，自然流産例では着床部および非着床部共に IL-17 陽性細胞が認められた。さらに自然流産症例を稽留流産および進行流産に分けて検討すると，IL-17 陽性細胞数(個/HPF)は進行流産では中央値 7(0~34)と正常妊娠の中央値 0(0~21)に比し有意に高値を示した($p=0.038$)。一方，稽留流産と正常妊娠の間に IL-17 陽性細胞数に有意差はなかった。加えて，IL-17 は好中球の遊走因子であることから，IL-17 細胞数と浸潤好中球数の相関を解析したところ，相関係数 0.89, $p<0.0001$ と有意な正の相関を示した(図 7)¹⁵⁾。以上を総合すると，Th17 細胞は進行流産症例のみににおいて脱落膜全体に分布し，好中球を集積させることから，流産における最終的な胎児排除段階で中心的役割を果たすことが明らかとなった。

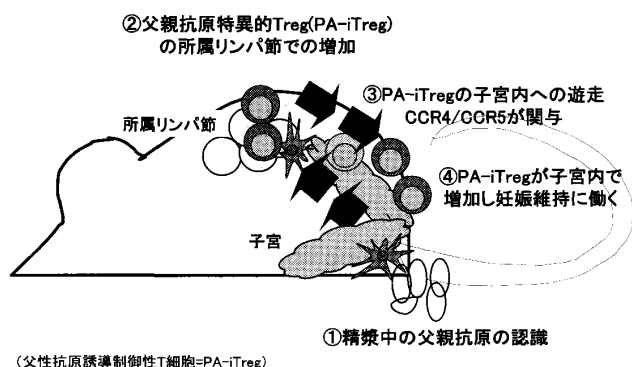
4. 制御性 T 細胞による妊娠維持と流産への関与

妊娠維持に関する免疫細胞に関して，注目度の高い論文が報告された。Aluvihare et al. は，T 細胞を欠損する BALB/c nu/nu マウスに BALB/c の全リンパ球を輸血したところ，妊娠が成立し流産は起こらなかったが，CD25 陽性リンパ球を含まないリンパ球を輸血すると，アロ妊娠では流

産が生じたが，同系妊娠では流産が起こらないことを報告した。すなわち，CD25 陽性細胞(制御性 T 細胞，活性化 T 細胞，一部の NK 細胞)を除くとアロ妊娠が成立しないことを証明した¹⁶⁾。彼らは，おそらく免疫抑制作用があり，胎児へのトランスを誘導する制御性 T 細胞が存在しないため流産が生じたと考えた。同時期に，我々もヒトの正常妊娠では $CD4^+CD25^{high}$ 制御性 T 細胞が増加するが，流産例では非妊娠レベルまで制御性 T 細胞が減少することを報告した¹⁷⁾。つまり，制御性 T 細胞が妊娠維持に重要であることがヒト，マウスで報告されたのである。そこで我々は，制御性 T 細胞のアロ妊娠における役割を，詳細に検討するため，制御性 T 細胞排除妊娠モデルを作成した。方法は，雌 BALB/c マウスと雄 C57BL/6 マウスを交配させ，膣栓にて妊娠確認後の雌マウスに CD25 モノクローナル抗体を妊娠 4.5 日(着床期)および妊娠 7.5 日(妊娠初期)に腹腔内投与するもので，CD25 モノクローナル抗体濃度を 0.1, 0.25, 0.375, 0.5, 1.0mg/body でそれぞれ投与した。その結果，子宮内制御性 T 細胞率はコントロールの $12.9 \pm 0.9\%$ に対し， $12.3 \pm 1.3\%$ (0.1mg/body)， $10.4 \pm 2.0\%$ (0.25mg/body)， $5.1 \pm 2.5\%$ (0.375mg/body)， $2.2 \pm 0.3\%$ (0.5mg/body)， $2.3 \pm 0.9\%$ (1.0mg/body) と濃度依存性に低下した。その時の流産率は 0.25mg/body の $2.8 \pm 4.6\%$ までは，有意な



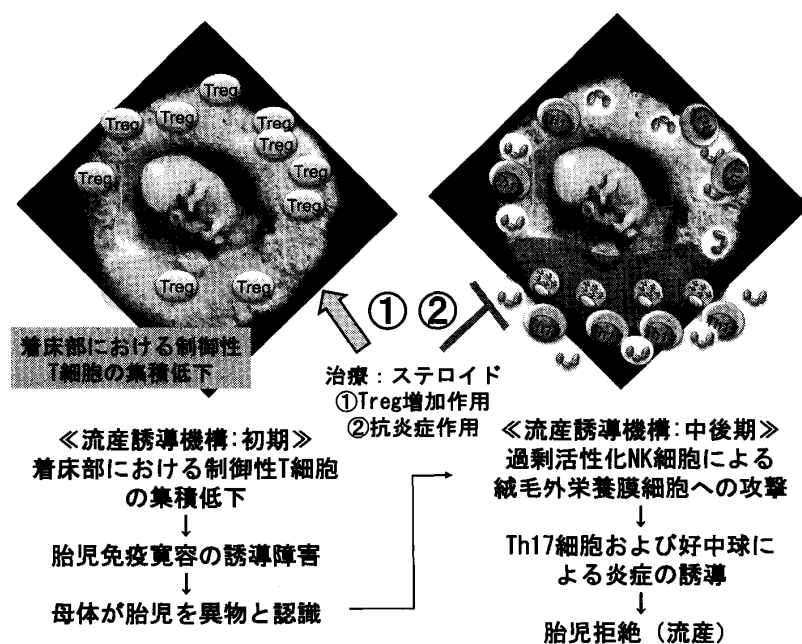
【図8】アロ妊娠での制御性T細胞低下は流産を誘導



【図9】制御性T細胞の妊娠維持モデル

流産率の上昇は認めなかったが、0.375mg/body以上では $36 \pm 12\%$ (0.375mg/body, $p=0.001$: 対コントロール), $57 \pm 28\%$ (0.5mg/body, $p<0.0001$: 対コントロール), $53 \pm 3\%$ (1.0mg/body, $p<0.0001$: 対コントロール)と有意な流産率の上昇を認めた(図8). 一方, BALB/c マウスの同系妊娠に対し, CD25 モノクローナル抗体投与は制御性T細胞率をコントロールの $11.7 \pm 1.4\%$ に対し, $2.9 \pm 1.2\%$ (0.5mg/body)と有意に減少させるが, 流産率には影響を与えなかった. つまり, 同系妊娠とアロ妊娠の比較から, 制御性T細胞の役割は父親抗原の認識と, 父親抗原を発現する細胞へ

の免疫寛容の誘導にあると推察された¹⁸⁾. そこで, 我々は雌 BALB/c マウスと雄 C57BL6 マウス交配を, 雄 DBA/2 マウスに変更して実験を行うこととした. その理由として, 1) DBA/2 マウスに発現する MlsIa 抗原は BALB/c マウスが発現していないこと, 2) MlsIa 抗原を認識するT細胞受容体は Vβ6 受容体という既知の受容体であること, の2点からである. つまり, Vβ6 陽性, 増殖マーカー Ki67 を発現する $CD4^+CD25^+Foxp3^+V\beta6^+$ 細胞は, 胎児(父親)抗原を認識し活性化された制御性T細胞として同定できるということである. $CD4^+CD25^+Foxp3^+V\beta6^+$ 細胞は, 妊娠3.5日(着床前日)と5.5日(着床1日後)の腹腔内リンパ節に増加し, 妊娠5.5日以降で妊娠子宮に増加していた¹⁹⁾. 一方, これらの父親抗原特異的制御性T細胞は脾臓や全身の表在リンパ節には増加しなかった. つまり, 着床前の子宮周囲リンパ節に父親抗原特異的制御性T細胞が増加していることが明らかとなった. そこで, 父親抗原の認識は精液のどの成分によってなされるのかを検討するため, 雄マウスの精囊腺(精漿を分泌する)除去を行い, 精子のみによる交配を行った. 妊娠成立は可能で



【図 10】免疫細胞による流産誘導機構

あったが、着床前に認めた子宮周囲リンパ節での父親抗原特異的制御性 T 細胞の増加は観察されず、妊娠 5.5 日における父親抗原特異的制御性 T 細胞の増加も観察されなかった。図 9 のごとくまとめると、性交渉後、腔内で樹状細胞が精漿中の父親抗原を認識し、着床の前日には所属リンパ節内で樹状細胞により父親抗原が制御性 T 細胞に提示され、活性化された制御性 T 細胞が増殖し、受精卵が着床すると、これらの制御性 T 細胞が子宮に動員されて妊娠が成立することが推測された。

マウスモデルにおいて制御性 T 細胞の重要性が明らかになったことから、我々はヒト流産例における制御性 T 細胞の関与を検討することとした。ヒト流産例の 70% 以上が胎児染色体異常であることは知られているが、胎児染色体異常例は流産不可避例と考え、免疫学的異常が含まれる可能性が低い群とした。一方で、胎児染色体正常例では何らかの流産原因が存在すると考え、免疫学的異常が含まれる可能性が高い群とした。脱落膜制御性 T 細胞率をフローサイトメトリーにて検討すると、正常妊娠 (n=6) で $14.7 \pm 3.3\%$ であったのに対し、染色体異常 (自然流産 n=13) で $11.8 \pm 6.8\%$ と有意な変化を認めなかったが、染色体正常

(自然流産 n=5) では $6.1 \pm 5.0\%$ と、正常妊娠に比し有意な制御性 T 細胞率の低下を認めた。さらに、胎児 (父親抗原) 細胞への免疫寛容に最も重要な場所である着床部において、制御性 T 細胞の集積を免疫組織化学にて検討することにした。制御性 T 細胞数 (Foxp3 染色陽性細胞) を分子に、ヘルパー T 細胞数 (CD3 陽性 T 細胞数から CD8 陽性 T 細胞数を除いたもの) を分母にて、制御性 T 細胞率を評価した。正常妊娠 (n=9) で $20.8 \pm 11.0\%$ であったのに対し、染色体異常 (自然流産 n=8) で $20.4 \pm 6.2\%$ と有意差を認めなかったが、染色体正常 (自然流産 n=10) では $12 \pm 6.5\%$ と、正常妊娠 (p=0.028) および染色体異常群 (p=0.041) に比し、制御性 T 細胞率の有意な着床部への集積低下を認めた。つまり、胎児染色体正常でありながら流産となる症例の中に、制御性 T 細胞率の低下および制御性 T 細胞の着床部への集積低下を認める症例が存在することを、初めて明らかにした。

考 察

今回の検討より、T 細胞および NK 細胞による流産誘導機構が明らかとなった。マウスモデルにおいて、制御性 T 細胞は父親抗原を精漿中で認識し、受精卵の着床前から妊娠維持に備えた父親抗

原特異的制御性 T 細胞を増加させ、着床後の胎児への免疫寛容に備えている。さらに、ヒトにおいて妊娠ホルモンにより誘導された免疫抑制的 NK 細胞 (TGF- β 陽性 NK3 細胞, IL-10 陽性 NKr1 細胞) が妊娠維持に働いている。一方で、その原因は今後の課題であるが、胎児染色体流産症例の一部に、制御性 T 細胞の低下例が存在することが示唆され、それが自然流産の一因になる可能性が示された。さらに、自然流産の初期段階において活性化 NK 細胞が、Granulysin を介して胎児由来の EVT 細胞を攻撃し細胞死を誘導することや、その後の胎児拒絶段階において Th17 細胞が脱落膜に好中球を遊走させ、胎児排除の結果、流産を誘導することを明らかにした (図 10)。また、臨床的に末梢血 NK 活性高値が反復流産の原因になる可能性があることから、NK 活性を低下させることが反復流産の治療になりうると考えられ、今後検討していく予定である。

謝 辞

本シンポジウムにおいて発表の機会を頂きました星合 晃学術集会長ならびに、座長の労をおとり頂きました木村 正先生、竹下俊行先生に深甚なる謝意を表します。また、研究の機会と詳細なご指導を頂いた齋藤 滋教授、共同研究者として献身的に実験を支えて頂きました島 友子助教、伊藤実香助教、稲田貢三子先生、塩崎有宏講師、米田 哲講師、佐々木泰先生、明星須晴先生、そして全面的に研究を支えて頂きました教室員および富山大学産婦人科同門会の先生方に深く感謝申し上げます。

共同研究者

富山大学産婦人科：齋藤 滋教授、日高隆雄准教授、塩崎有宏講師、米田 哲講師、島 友子助教、伊藤実香助教、稲田貢三子先生、その他医局員の先生方

株式会社 BML：永田欽也先生、小川一行先生

奈良県立医科大学法医学講座：石谷昭子先生

厚生連高岡病院産婦人科：佐々木泰先生 酒井正利先生

青木産婦人科クリニック：青木耕治先生

東北大学免疫学教室：石井直人教授

宮城県立がんセンター：菅村和夫先生

京都大学再生医科学研究所：坂口志文先生

栗野産婦人科医院：道又敏彦先生

おとぎの森レディースクリニック：副田善勝先生

八木産婦人科：八木裕昭先生

富山県立中央病院新生児科：伊奈志帆美先生

金沢大学産婦人科：明星須晴先生

文 献

- 1) Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, et al. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. *Semin Immunol Pathol* 2007; 29: 115—122
- 2) Saito S, Nakashima A, Shiozaki A, et al. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2008; 77: 14—22
- 3) Nishikawa K, Saito S, Sugamura K, et al. Accumulation of CD16-CD56 + natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 1991; 3: 743—750
- 4) Koopman LA, Kopcow HD, Strominger JL, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003; 198: 1201—1212
- 5) Higuma-Myojo S, Sasaki Y, Saito S, et al. Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54: 21—29
- 6) Li XF, et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acid in uterine natural killer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1823—1834
- 7) Hanna J, Wohl DG, Mandelboim O, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006; 12: 1065—1074
- 8) Nakashima A, Shiozaki A, Saito S, et al. Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abortion. *Am J Pathol* 2008; 173: 653—664
- 9) Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*

- 1993; 14: 353—356
- 10) Ito M, Nakashima A, Saito S, et al. A role of IL-17 in induction of an inflammation at fetomaternal interface in preterm labour. *J Reprod Immunol* 2010; 84: 75—85
- 11) Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 942—949
- 12) Saito S, Nakashima A, Shima T, et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 601—610
- 13) Saito S, Nakashima A, Shima T, et al. Future directions of studies for recurrent miscarriage associated with immune etiologies. *J Reprod Immunol* 2011; 90: 91—95
- 14) Nakashima A, Ito M, Saito S, et al. Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 104—109
- 15) Nakashima A, Ito M, Saito S, et al. Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. *Am J Reprod Immunol* 2010; 64: 4—11
- 16) Aluvihare V, Kallikourdis M, Betz AG, et al. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; 3: 266—271
- 17) Sasaki Y, et al. Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 347—353
- 18) Shima T, Sasaki Y, Saito S, et al. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance during early stage of pregnancy, but not necessary during late stage of pregnancy in allogeneic mice. *J Reprod Immunol* 2010; 85: 121—129
- 19) 島 友子, 伊藤実香, 立松美樹子, 中島彰俊, 塩崎有宏, 斉藤 滋. 妊娠には胎児抗原特異的制御性 T 細胞が関与する. *日産婦誌* 2009; 61: 618

Synopsis

Introduction: The process of pregnancy must include mechanisms to prevent allograft rejection, because a fetus is a semiallograft. Some mechanisms for the maintenance of pregnancy have been proposed. For example, villous trophoblasts do not express classical major histocompatibility complex (MHC) class I and class II molecules in humans, and human extravillous trophoblasts express only MHC-class I molecules such as human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-C, HLA-E, and HLA-G, which are specific ligands for uterine natural killer (NK) cells. Additionally, decidual NK cells produce a number of cytokines that promote trophoblast proliferation and differentiation, as well as angiogenesis factors. NK cells, however, sometimes have cytotoxic activity against fetal cells. Cytokines play an important role for the maintenance of pregnancy, and dysregulation of the cytokine profile induces abortion in mice. The old Th1/Th2 paradigm has developed into the new Th1/Th2/Th17 and regulatory T (Treg) paradigm. Previous data showed that regulatory T cells play an essential role in the induction of tolerance to paternal antigens during pregnancy. And, a reciprocal development pathway between Th17 cells, which are involved in inducing inflammation, and regulatory T cells was also reported. In unexplained recurrent spontaneous abortion cases, the proportion of decidual Th17 cells was significantly higher and the proportion of decidual regulatory T cells was significantly lower compared with that in normal pregnancy. Therefore, the balance between the activation system and regulation system in maternal immune cells is important to maintain successful pregnancy.

Results: First topic is the cytokines expression profiles of CD16⁻CD56^{bright} NK cells. Normal pregnant women had the significant high numbers of TGF- β positive NK cells, NK3, in decidual lymphocytes, compared with that of spontaneous abortion. Additionally, the significant high numbers of IL-10 positive NK cells, NKr1, was also obtained in peripheral blood lymphocytes of normal pregnant women. NK3 cells were induced by prolactin and soluble HLA-G1, and NKr1 cells were induced by human gonadotropin and progesterone *in vitro*. Second is the direct correlation between extravillous trophoblasts (EVTs) and CD16⁻CD56^{bright} NK cells. The number of granulysin-positive CD56^{bright} NK cells significantly increased in the decidua basalis in spontaneous abortion, compared with normal pregnancy. *In vitro* study showed that granulysin-positive decidual NK cells attack EVT; subsequently, the decidual NK-derived granulysin actively accumulates in the nuclei of EVTs, causing the death of EVTs due to apoptosis. This is the first report that maternal decidual NK cells directly attack fetus-derived EVTs in human. Third topic is about the role of Th17 cells in spontaneous abortion. Th17 cells are involved in the chronic inflammation and infection. IL-17⁺ cells were accumulated in decidua and were detected in decidual CD4⁺ T cells in spontaneous abortion cases. The number of decidual IL-17⁺ cells in inevitable abortion cases involving active genital bleeding was significantly higher than that in normal pregnancy cases. IL-17⁺ cells might be involved in the induction of inflammation in the late stage of abortion, but not in the early stage of abortion. Last topic is the roles of regulatory T cells in pregnancy. We have reported that CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells increased in the peripheral blood, and these regulatory T cells in early pregnant decidua further increased to three times the level found in the peripheral blood in humans. In this study, we constructed a pregnant mice model with lower number of regulatory T cell by an administration of anti-CD25 monoclonal antibodies at days 4.5 and 7.5 of gestation. The ratio of regulatory T cells in CD4⁺ regulatory T cells was decreased in proportion to the dosage of anti-CD25 monoclonal antibody. On the other hand, the abortion ratio was significantly increased in inverse proportion to the ratio of regulatory T cells in allogeneic pregnancy, but not in syngeneic pregnancy. Thus, regulatory T cells prevent fetal rejection at the implantation phase in an allogeneic pregnancy. Paternal antigen-reactive regulatory T cells increased in regional lymph nodes of the uterus such as para-aortic lymph nodes and pelvic lymph nodes at day 3.5 and increased in uterus since at day 5.5 in allogeneic pregnancy. Implantation occurs

on day 4.5 in mice, so increased regulatory T cells in regional lymph nodes occurred before implantation. Additionally, seminal fluid contributed to the priming the paternal antigen by maternal immune cells. In human pregnancy, the ratio of regulatory T cells in decidual lymphocytes was significantly decreased in spontaneous abortion with normal karyotype, but not with karyotype abnormality, compared with that with normal pregnancy. Furthermore, immunohistochemical analysis showed the significant decreased number of regulatory T cells in decidua basalis in spontaneous abortion with normal karyotype.

Conclusions: Maternal immune cells recognize the paternal antigen in seminal fluid. Subsequently, paternal antigen-reactive regulatory T cells increase in regional lymph nodes before implantation and these cells support to accept fetus in uterus. On the other hand, dysfunction of maternal regulatory T cells may cause to reject fetus. A decrease of maternal regulatory T cells might induce immunological response to fetus, and then activated NK cells directly attack EVT cells via granulysin. Finally excessive inflammation might accumulate Th17 cells and neutrophils, resulting in spontaneous abortion.
