

2015 年度

胎児染色体正常流産例における脱落膜制御性 T 細胞の
特徴についての研究

(Characterization of regulatory T cells in decidua of
miscarriage cases with normal fetal chromosomal content)

富山大学産科婦人科学教室

稲田貢三子

(主任教授 齋藤滋)

緒言

免疫系における恒常性の維持においては、免疫抑制機能に特化した制御性 T 細胞 (Regulatory T cells、以下 Treg と略す) が重要である。Treg は CD4⁺ CD25⁺ T 細胞として発見され (Sakaguchi et al. 1995)、その後、Foxp3 遺伝子が、Treg の発生および機能におけるマスター遺伝子であることが証明された (Hori et al. 2003)。妊娠は、母体にとって半同種移植片 (semi-allograft) である胎児が拒絶されない自然の移植成功例といえる。2004 年に Aluvihare らは、マウスの妊娠において、妊娠中に増加する Treg が母児免疫寛容を誘導していることを報告した。同じく 2004 年に、ヒトでは Treg が正常妊娠の脱落膜に集簇していること、流産では脱落膜中の Treg が減少していることを申請者の所属するグループが初めて報告した (Sasaki et al. 2004)。これ以後、着床期や妊娠初期に Treg が重要であるということを示す証拠や、さらなる詳細な Treg の特徴が、マウス、ヒトともに多数報告されている。例えば、正常妊娠マウスから分離した Treg を移入すると、流産モデルマウス (CBA/J 雌 × DBA/2J 雄) での流産を防ぐことができたが、非妊娠マウスからの Treg を移入しても、流産予防効果はなかった。これは、同種異系妊娠の維持において、胎児抗原特異的な Treg が重要な役割をはたしていることを示している (Zenclussen et al. 2005)。そこで、申請者は、ヒトの妊娠における Treg の役割をさらに解明するために、免疫組織化学染色を用いて、胎児染色体正常流産と胎児染色体異常流産の脱落膜中 Treg の頻度と局在を検討した。また、フローサイトメトリーを用いて、胎児染色体正常流産と胎児染色体異常流産における Treg 細胞率を検討した (参考論文 1)。

また、Foxp3 は Treg の絶対的なマーカーと考えられていたが、ヒトでは免疫抑制能をもつ Treg と、免疫抑制能がなくサイトカインを産生するエフェクター T 細胞の両方に Foxp3 が発現していることが報告された (Walker et al. 2003、Gavin et al. 2006、Allan et al. 2007)。Miyara らは (2009)、ヒト CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞が、CD4⁺ CD45RA⁺ Foxp3^{low} で免

免疫抑制能が弱い naive Treg、CD4⁺ CD45RA⁻ Foxp3^{high} の effector Treg、CD4⁺ CD45RA⁻ Foxp3^{low} で免疫抑制能のない Foxp3⁺ effector T 細胞 (Foxp3⁺ Teff) に分類できることを報告した。また、Treg は、胸腺で発生する natural occurring Treg (nTreg) と末梢で産生される inducible Treg (iTreg) に分類され (Sakaguchi et al. 2005)、Helios (Ikaros 転写因子ファミリーメンバー) が nTreg 細胞の特異的マーカーであると報告されている (Thornton et al. 2010)。Samstein ら (2012) は、iTreg の分化に必要な Foxp3 エンハンサーである CNS1 の遺伝子配列が、胎盤をもつ哺乳類のみにホモロジーの高い配列として保存されており、CNS1 欠損♀マウスでは同種異系妊娠で流産率が増加すると報告している。すなわち胎盤を持つ哺乳類では iTreg が妊娠維持に重要な役割を果たすことを見出した。

これらのことから、CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞のどのサブセット (naive Treg、effector Treg、nTreg または iTreg) がヒトの妊娠維持に重要な役割を果たしているのか再度評価すべきであることがわかる。そこで、申請者は胎児染色体正常流産と胎児染色体異常流産の脱落膜と末梢血における naive Treg、effector Treg、Foxp3⁺ Teff、Helios⁺ nTreg、Helios⁻ iTreg の細胞率に関して検討した (参考論文 2)。

対象と方法

I. 免疫組織化学染色での脱落膜着床部と脱落膜非着床部における Treg 細胞率 (Foxp3⁺/CD4⁺) の集簇に関する検討

1. 対象

本研究は富山大学倫理委員会にて承認されており、対象者には研究の目的を説明し、文書で同意を得た上で行った。脱落膜検体は正常妊娠 10 例、胎児染色体異常流産 10 例、胎児染色体正常流産 10 例から採取した。対象に子宮奇形、甲状腺機能異常、遺伝子疾患（本人と夫）、抗リン脂質抗体症候群などの不育症リスク因子を持っているものは除外した。稽留流産（流産の初期ステージ）と進行流産（流産の後期ステージ）では、免疫学的構成が違ふことが指摘されているため（Nakashima et al. 2010）、流産症例では、稽留流産症例のみを選択し進行流産症例は除外した。流産症例から採取した絨毛で胎児染色体核型検査（Gバンド染色）を行い、染色体異常の有無について確認した。人工妊娠中絶施行例から得た検体を正常妊娠症例とした。妊娠週数は、超音波による胎嚢径計測または最終月経から計算した。3 群間の臨床背景を表 1 に示す。既往流産回数は胎児染色体異常流産群と胎児染色体正常流産群では正常妊娠群より有意に多かった ($p < 0.05$)。妊娠週数は胎児染色体異常流産群では正常妊娠群より有意に早かった ($p < 0.05$)。

【表 1.】 免疫組織化学染色での検討における、正常妊娠、胎児染色体異常流産、胎児染色体正常流産症例の臨床背景。

| | 正常妊娠 n=10 | 胎児染色体異常流産 n=10 | 胎児染色体正常流産 n=10 |
|----------|-----------------|-------------------|-------------------|
| 年齢* | 29(25-38) | 34(26-43) | 34(26-38) |
| 妊娠回数* ** | 2(1-3) | 2.5(1-9) | 4.5(1-12) |
| 生児数* | 0(0-2) | 1(0-3) | 0(0-1) |
| 流産回数* ** | 0(0-0) | 2(1-8) † | 4(1-12) † |
| 死産回数* | 0(0-0) | 0(0-1) | 0(0-1) |
| 妊娠週数* | 8(7-10) | 6(5-8) † | 8(7-9) |
| BMI | 19.1(17.9-25.3) | 21.1(17.5-26.3) | 21.0(18.6-25.5) |
| 喫煙者 | 1(10%) | 0 | 0 |

*mean (range) **今回の妊娠も含む † $P<0.05$ vs. 正常妊娠

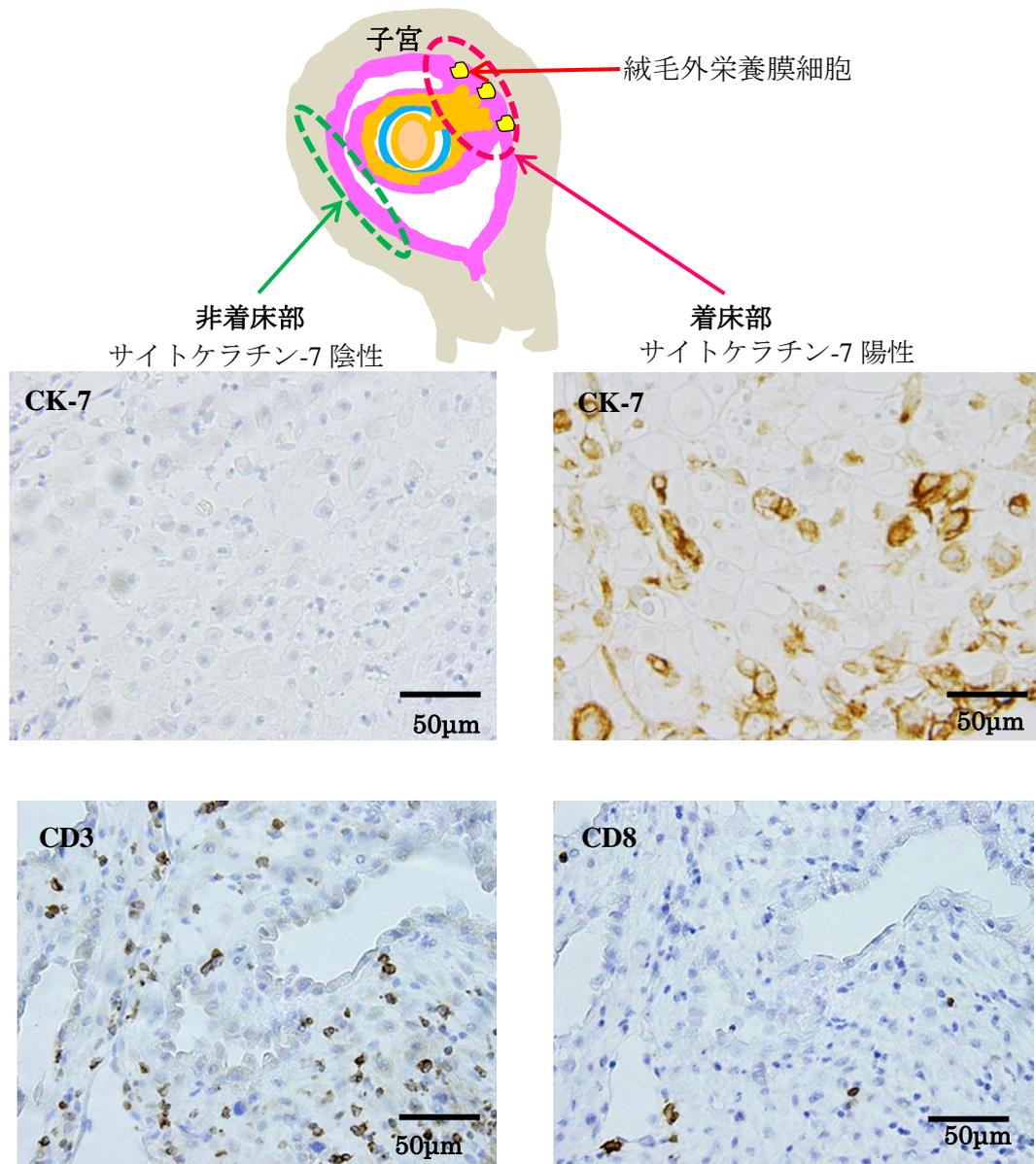
既往流産回数は、胎児染色体異常流産群と胎児染色体正常群では正常妊娠群より有意に多かった。妊娠週数は胎児染色体異常流産群で正常妊娠群より有意に早かった。

2.免疫組織化学染色

母体血の混入を防ぐために、脱落膜組織は PBS で洗浄後、10%中性緩衝ホルマリンで 48 時間固定しパラフィン包埋切片を作成した。免疫染色は以下の手順で行った。切片の脱パラフィン後、抗原賦活処理（緩衝液を用いたマイクロウェーブ法）を行い、3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行い、5%BSA にて非特異性反応のブロッキングを行った。1次抗体は抗 CD3 抗体（Novocastra）、抗 CD8 抗体（Dako）、抗サイトケラチン-7 抗体（Novus Biologicals）、抗 Foxp3 抗体（eBioscience）を使用し、2次抗体には ENVISION キット/HRP（Dako）を使用した。発色基質にはジアミノベンジジン（diaminobenzidine : DAB）を用いた。抗体の反応時間であるが、抗 Foxp3 抗体は 4℃で一晩反応させ、それ以外の 1次抗体と 2次抗体は間欠照射方式マイクロウェーブを用いて 15 分間反応させた。これまでの報告と同様に（Michimata et al. 2002）、サイトケラチン陽性の絨毛外栄養膜細胞（extravillous trophoblast 以下 EVT と略す）が存在する部位を着

床部、EVT の存在しない部位を非着床部とした。脱落膜組織のサイトケラチン陽性 EVT の例、CD3、CD8 染色例を図 1 に示す。抗 CD4 抗体はパラフィン包埋組織切片では免疫染色ができないので、CD4+ T 細胞の数は、CD3+ 細胞カウント数から CD8+ 細胞カウント数を引いて計算した (Michimata et al. 2002)。

【図 1】正常妊娠脱落膜における、CD3、CD8、CK-7 の免疫組織化学染色の例。



サイトケラチン-7 陽性の EVT が存在する部位を着床部とした。CD 4 陽性細胞は CD3 陽性細胞数から CD8 陽性細胞数を引いてカウントした。倍率は 200 倍でスケールは 50 µ m を示す。

3.統計

統計解析は、Mann-Whitney の U 検定で行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

II. フローサイトメトリーによる脱落膜中 Treg のサブセットについての検討

1.対象

研究 1 の対象は、正常妊娠 15 例、胎児染色体異常流産 14 例（内訳はトリソミー 12 例〔トリソミー 15:3 例、トリソミー 16:3 例、トリソミー 21:2 例、トリソミー 22:2 例、トリソミー 6:1 例、トリソミー 13:1 例〕と、転座 1 例、モノソミー 1 例）、胎児染色体正常流産 10 例とした。研究 2 の対象は、正常妊娠 11 例、胎児染色体異常流産 15 例（内訳はトリソミー 14 例〔トリソミー 16:3 例、トリソミー 21:3 例、トリソミー 22:3 例、トリソミー 8:2 例、トリソミー 13:2 例、トリソミー 15:1〕と、転座 1 例）、胎児染色体正常流産 8 例とした。対象者の選定等に関しては方法 I-1 と同様である。研究 1 の 3 群間の臨床背景を表 2 に示す。既往流産回数は胎児染色体異常流産と胎児染色体正常流産では正常妊娠群より有意に多かった ($p < 0.0001$)。研究 2 の 3 群間の臨床背景を表 3 に示す。既往流産回数は染色体異常流産と染色体正常流産では正常妊娠群より有意に多かった（それぞれ $p < 0.0001$ 、 $p < 0.001$ ）。

【表 2】 フローサイトメトリーでの検討（研究 1）における 3 群間の臨床背景

| | 正常妊娠 n=15 | 胎児染色体異常流産 n=14 | 胎児染色体正常流産 n=10 |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 年齢* | 27(17-39) | 36(30-45) †† | 34(29-39) † |
| 妊娠回数* ** | 2(1-6) | 4.5(1-6) | 4(2-5) |
| 生児数* | 0(0-4) | 0(0-2) | 1(0-3) |
| 流産回数* ** | 0(0-1) | 4(1-6) †† | 3(1-5) †† |
| 死産数* | 0(0-0) | 0(0-1) | 0(0-1) |
| 妊娠週数* | 7(6-9) | 7(6-11) | 6(6-10) |
| BMI | 19.6(17.4-20.8) | 19.1(17.1-33.7) | 21.5(17.7-25.8) |
| 喫煙者 | 2(20%) | 0 | 0 |

*mean (range) **今回の妊娠も含む † $P<0.001$ vs.正常妊娠 †† $P<0.0001$ vs.正常妊娠

既往流産回数は、胎児染色体異常流産群と胎児染色体正常群では正常妊娠群より有意に多かった。

【表 3】 フローサイトメトリーでの検討（研究 2）における 3 群間の臨床背景

| | 正常妊娠 n=11 | 胎児染色体異常流産 n=15 | 胎児染色体正常流産 n=8 |
|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 年齢* | 27.5±0.7(16-39) | 37.3±0.3(29-44) † | 32.1±0.8(22-42) |
| 妊娠回数* ** | 1.0±0.1(0-2) | 2.2±0.08(0-4) † | 2.5±0.2(0-5) |
| 未産率 | 6/11 (54.5%) | 10/15 (66.7%) | 4/8 (50.0%) |
| 生児数* | 0.7±0.08(0-2) | 0.3±0.03(0-1) | 0.5±0.07(0-1) |
| 流産回数* *** | 0 (0-0) | 2.5±0.08 (1-5)††† | 2.8±0.2(1-5) †† |
| 死産数* | 0(0-0) | 0.1±0.02(0-1) | 0(0-0) |
| 妊娠週数* | 7.5±0.2(6-10) | 7.2±0.09 (5-10) | 6.1±0.2(5-9) |
| BMI* | 20.4±0.2 (17.7-23.1) | 21.8±0.2 (17.7-27.1) | 20.6±0.4 (18.0-27.7) |
| 喫煙者 | 3/11 (27.2%) | 1/15 (6.7%) | 0/8 (0%) |

*mean±SEM(range) **今回の妊娠は含めない。***今回の流産は含めない。

† $P<0.05$ vs. normal pregnancy †† $P<0.001$ vs. normal pregnancy ††† $P<0.0001$ vs. normal pregnancy

既往流産回数は胎児染色体異常流産と胎児染色体正常流産では正常妊娠群より有意に多かった。

2.フローサイトメトリー

末梢血の単核球は Ficoll-Hipaque 法にて分離した。脱落膜単核球は、脱落膜組織をホモジナイズ後、 $32\mu\text{m}$ のナイロンメッシュでろ過し、Ficoll-Hipaque 法にて分離した (Saito et al. 1999)。分離した単核球を、研究 1 では、細胞表面抗原を PerCP-Cy5.5 標識抗 CD4 抗体 (BD bioscience) で、細胞質内抗原を FITC 標識抗 Foxp3 抗体 (eBioscience) で染色した。研究 2 では、細胞表面抗原を PerCP-Cy5.5 標識抗 CD4 抗体 (BD bioscience)、biotin 標識抗 CD45RA 抗体 (BD bioscience) と streptavidin-APC-Cy7 で、細胞質内抗原を FITC 標識抗 Foxp3 抗体 (eBioscience)、Alexa Fluor647 標識抗 Helios 抗体 (eBioscience) で染色した。まず、細胞表面抗原の染色を行い、fixation/permeabilization buffer (eBioscience) で 30 分反応させ、固定、膜透過処理を行った。その後、細胞質内抗原の染色を行った。フローサイトメトリーの解析は BD FACS Canto II で行った。

3.統計

統計解析は、Mann-Whitney の U 検定で行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

成績

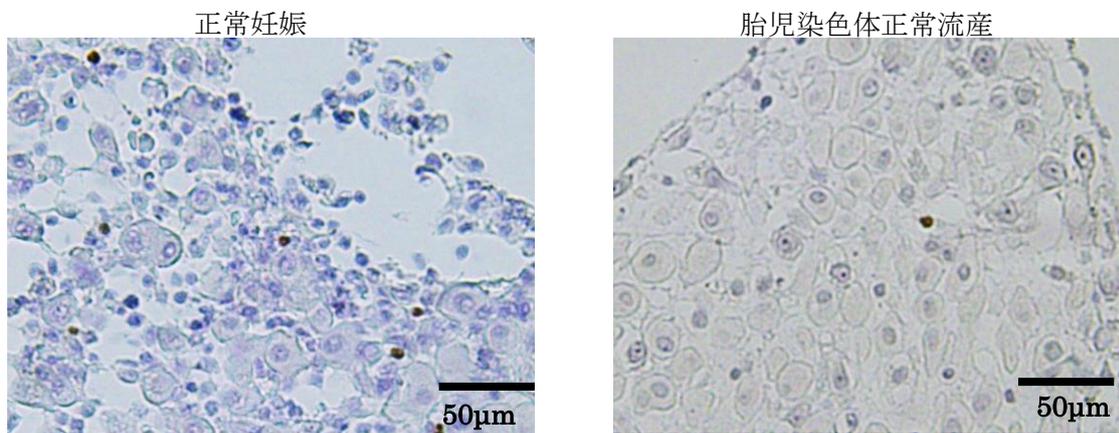
I. 免疫組織化学染色での脱落膜着床部と脱落膜非着床部における Treg 細胞率 (Foxp3⁺/CD4⁺) の集簇に関する検討

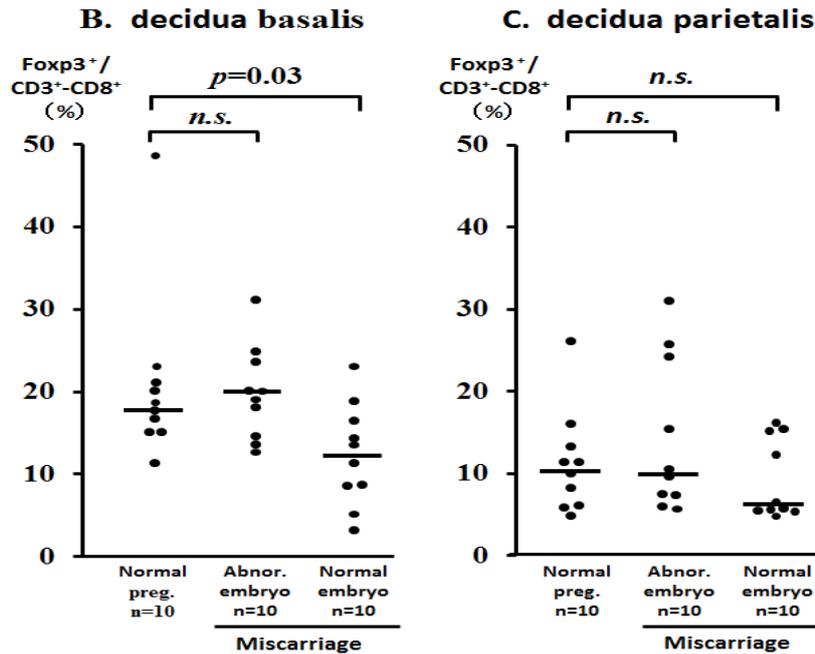
正常妊娠脱落膜における、Foxp3、CD3、CD8、サイトケラチン-7 (CK-7) の免疫組織化学染色の一例を図 1、図 2A に示す。脱落膜で観察された CK-7 陽性 EVT が存在する脱落膜着床部(decidua basalis)と、EVT が存在しない脱落膜非着床部(decidua parietalis)に分類した。また、CD3⁺ CD8⁻ 細胞を CD4⁺ 細胞としてカウントした。

胎児染色体正常流産の脱落膜着床部(decidua basalis)における CD4⁺ 細胞中の Treg 細胞率 (Foxp3⁺/CD3⁺ CD8⁻) は正常妊娠と比較して有意に低下していた (中央値 12.6% vs 17.8%, p=0.03: 図 2B)。胎児染色体異常流産における Treg 細胞率 (Foxp3⁺/CD3⁺ CD8⁻) は正常妊娠と有意差を認めなかった (中央値 19.6% vs 17.8%: 図 2B)。興味深いことに、非着床部(decidua parietalis)の Treg 細胞率 (Foxp3⁺/CD3⁺ CD8⁻) は 3 群間で差は認めなかった (図 2C)。この結果から、脱落膜着床部への Treg の集簇減少が胎児染色体正常流産で生じていることが示唆された。

【図 2】 免疫組織化学染色での脱落膜着床部と脱落膜非着床部における Treg 細胞率 (Foxp3⁺/CD4⁺) の集簇

A. Foxp3 染色例





A:正常妊娠と胎児染色体正常流産における Foxp3 染色例を示す。倍率は 200 倍でスケールは 50 μ m を示す。

B:胎児染色体正常流産の脱落膜着床部における CD4⁺ 細胞中の Treg 細胞率 (Foxp3⁺/CD3⁺CD8⁻) は正常妊娠と比較して有意に低下していた (中央値 12.6% vs 17.8% $p=0.03$)。胎児染色体異常流産における Treg 細胞率は正常妊娠と差を認めなかった。

C:非着床部の Treg 細胞率は 3 群間で差を認めなかった。

水平線は中央値を示す。

II. フローサイトメトリーによる脱落膜中 Treg 細胞率、Treg のサブセットについての検討

〔研究 1〕 脱落膜中 Foxp3⁺ 細胞率に関する検討

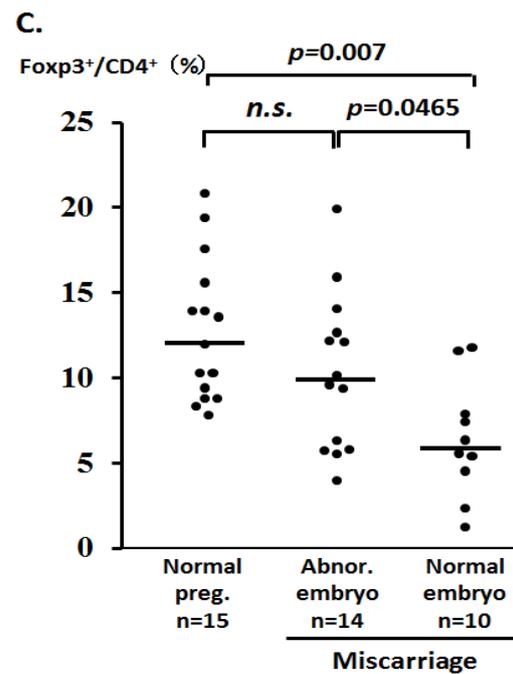
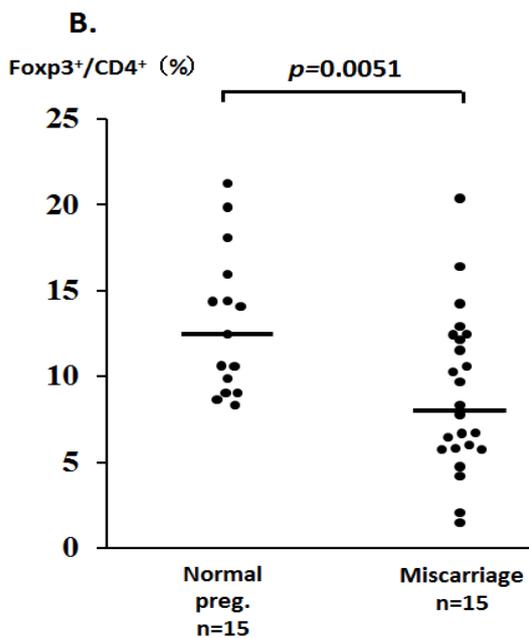
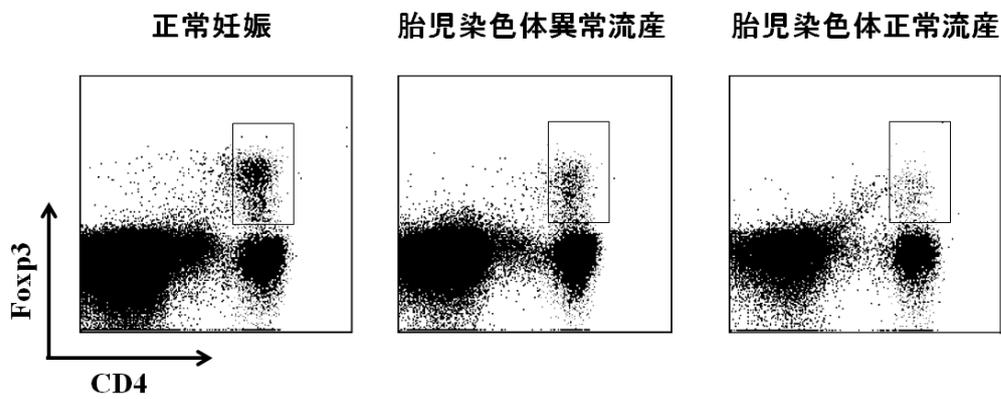
フローサイトメトリーの結果の一例を示す (図 3A)。流産症例では、脱落膜中 CD4⁺ 細胞中の Foxp3⁺ 細胞率 (Foxp3⁺/CD4⁺) は正常妊娠と比較して有意に低下していた (中央値 7.3% vs 12.3, $p=0.0051$: 図 3B)。次に、流産症例を胎児染色体異常群と胎児染色体正常群に分けて解析したところ、胎児染色体正常流産での Foxp3⁺ 細胞率 (Foxp3⁺/CD4⁺) は、正常妊娠と比較し有意に低く (中央値 5.7% vs 12.3%, $p=0.007$)、また胎児染色体異常流産

と比べても低かった（中央値 5.7% vs 9.7%, $p=0.0465$: 図 3C）。胎児染色体異常流産と正常妊娠の F_{oxp3}⁺ 細胞率（F_{oxp3}⁺/CD4⁺）は差を認めなかった。

I と II [研究 1] の結果より、胎児染色体正常流産では、着床近傍の Treg 細胞の集簇の低下が生じていることが明らかとなった。

【図 3.】フローサイトメトリーによる脱落膜中 F_{oxp3}⁺ 細胞の細胞率

A. フローサイトメトリーの CD4⁺ F_{oxp3}⁺ 細胞の一例



A:フローサイトメトリーの一部。FSC、SSC でリンパ球を選択し、単球・顆粒球・脱落膜間質細胞を除外した。

B: 流産症例では、脱落膜中 Foxp3⁺細胞率 (Foxp3⁺/CD4⁺) は正常妊娠と比べて有意に低下していた (中央値 7.3% vs 12.3% p=0.0051)。

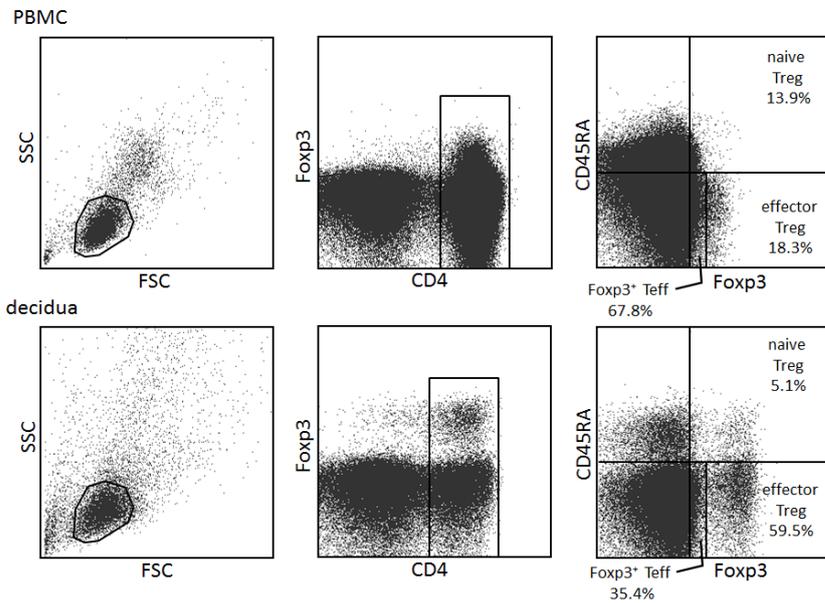
C: 流産症例を胎児染色体異常群と胎児染色体正常群に分けて解析した。胎児染色体正常流産での Foxp3⁺細胞率は、正常妊娠と比較し有意に低く (中央値 5.7% vs 12.3% p=0.007)、また胎児染色体異常流産と比べても低かった (中央値 5.7% vs 9.7% p=0.0465)。胎児染色体異常流産と正常妊娠の Foxp3⁺細胞率は差を認めなかった。

水平線は中央値を示す。

〔研究 2-1〕 脱落膜での Foxp3⁺ 細胞および Treg (naive Treg+effector Treg) 細胞の細胞率

フローサイトメトリーの結果の一部を示す(図 4)。脱落膜中の CD4⁺ 細胞における Foxp3⁺細胞の細胞率 (Foxp3⁺/CD4⁺) は、成績 II [研究 1] の結果と同じく、胎児染色体正常流産では正常妊娠と比較して有意に低下していたが (中央値 6.8% vs 8.4%, p=0.039: 図 5A)、胎児染色体異常流産では正常妊娠と同等であった(中央値 10.0% vs 8.4%: 図 5A)。次に、CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞から Foxp3⁺ effector T 細胞 (Foxp3⁺ Teff) を除いた真の Treg 細胞 (naive Treg+effector Treg) の細胞率 (true Treg/CD4⁺) を検討した。脱落膜における真の Treg 細胞率は胎児染色体正常流産では正常妊娠より、また胎児染色体異常流産より有意に低かった (それぞれ 中央値 3.5% vs 5.7%, p=0.0258、中央値 3.5% vs 6.7%, p=0.0389: 図 5B)。続いて、対象者を、今回が初めての妊娠である群 (○)、これまでに生児がいる群 (●)、これまで流産のみで生児なし (△) の 3 群にわけて再解析した。脱落膜中の Foxp3⁺ 細胞率 (Foxp3⁺/CD4⁺)、真の Treg 細胞率 (true Treg/CD4⁺) とともに、サンプルサイズが小さいためか 3 群間で有意差はなかった。

【図 4】末梢血、脱着膜におけるフローサイトメトリーの一列。

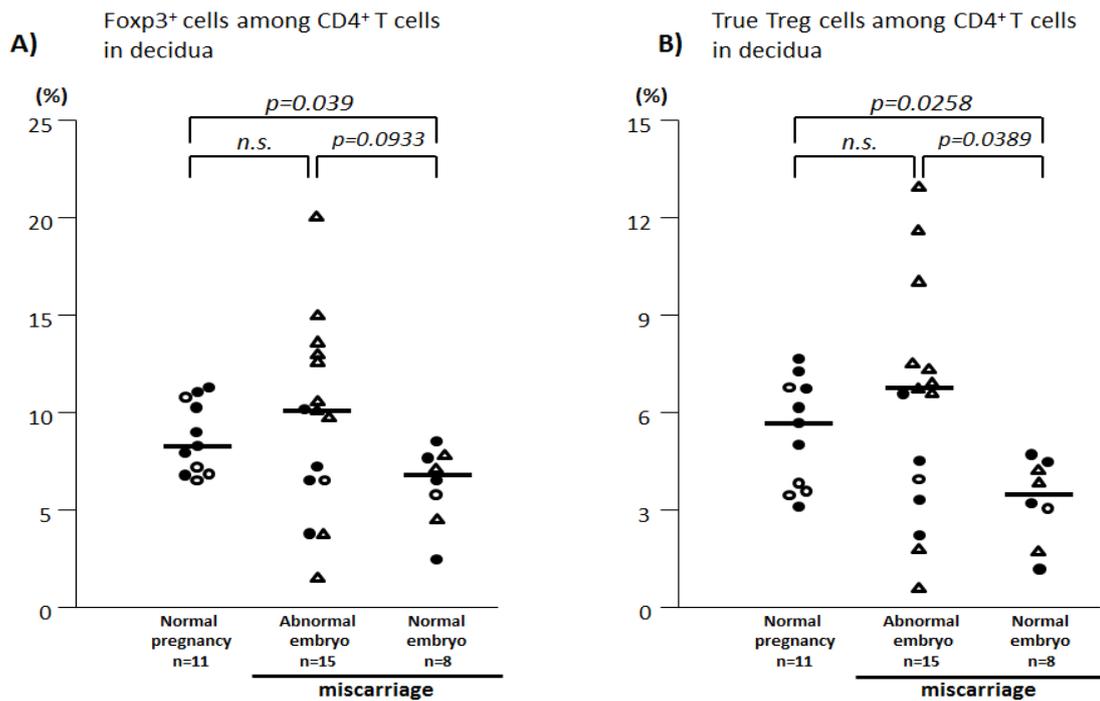


左：FSC、SSCでリンパ球を選択し、単球・顆粒球・脱着膜間質細胞を除外した。

中：選択したリンパ球から、さらに CD 4 陽性細胞のみを選択した。

右：選択した CD4 陽性細胞を Fxp3、CD45RA で展開した。CD4+ Fxp3+ 細胞を CD4+ CD45RA+ Fxp3^{low} の naive Treg、CD4+ CD45RA⁻ Fxp3^{high} の effector Treg、CD4+ CD45RA⁻ Fxp3^{low} の Fxp3+ effector T 細胞に分類した。

【図 5】脱着膜での Fxp3+細胞と真の Treg (naive Treg+effector Treg) 細胞の細胞率



A:脱落膜中の Foxp3⁺ 細胞の細胞率 (Foxp3⁺/CD4⁺) は、胎児染色体正常流産では正常妊娠と比較して有意に低下していたが (中央値 6.8% vs 8.4% p=0.039)、胎児染色体異常流産では正常妊娠と同等であった (中央値 10.0% vs 8.4%)。

B:CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞から Foxp3⁺ effector T 細胞 (Foxp3⁺ Teff) を除いた真の Treg 細胞 (naive Treg+effector Treg) の細胞率 (true Treg/CD4⁺) は胎児染色体正常流産では正常妊娠より、また胎児染色体異常流産より有意に低かった (それぞれ 中央値 3.5% vs 5.7% p=0.0258、中央値 3.5% vs 6.7% p=0.0389)。

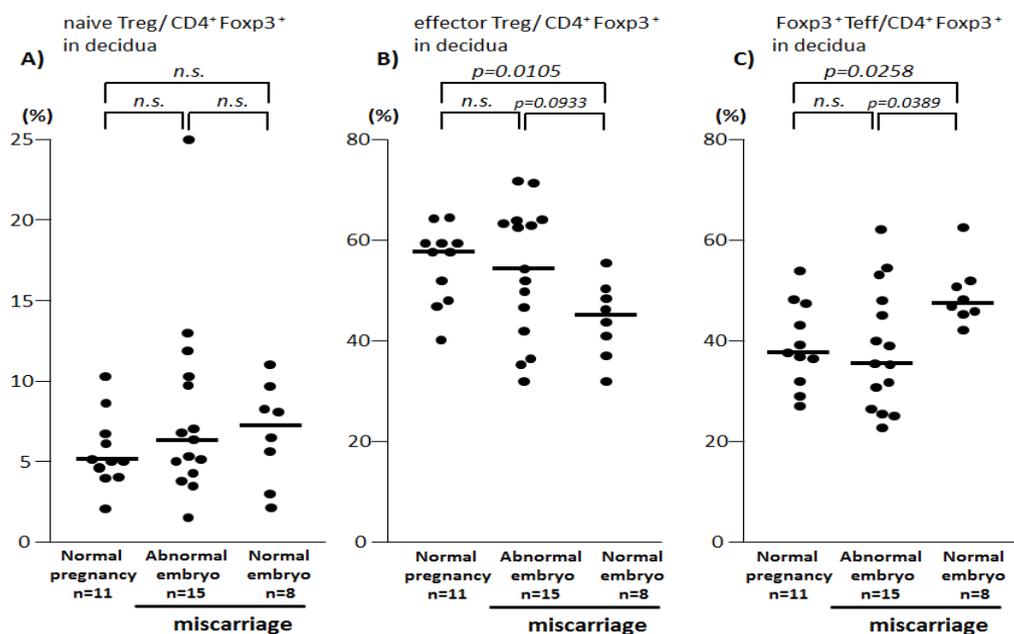
水平線は中央値を示す。

○:今回が初めての妊娠 ●:生児あり △:これまで流産のみで生児なし

〔研究 2-2〕 脱落膜中 CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞における naive Treg、effector Treg、Foxp3⁺ effector T 細胞の細胞率

脱落膜中の CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞における effector Treg 細胞率 (effector Treg/CD4⁺ Foxp3⁺) は、胎児染色体正常流産では、正常妊娠より有意に低下していた (中央値 45.0% vs 57.7%, p=0.0105: 図 6B)。一方、Foxp3⁺ Teff 細胞率 (Foxp3⁺ Teff/ CD4⁺ Foxp3⁺) は、胎児染色体正常流産では、正常妊娠や胎児染色体異常流産より有意に高かった (それぞれ 中央値 47.3% vs 37.8%, p=0.0258、中央値 47.3% vs 35.7%, p=0.0389: 図 6C)。naive Treg 細胞率 (naive Treg/ CD4⁺ Foxp3⁺) は 3 群間で有意な差を認めなかった (図 6A)。

【図 6】 脱落膜中の CD4⁺Foxp3⁺細胞における naive Treg、effector Treg、Foxp3⁺ effector T 細胞の細胞率



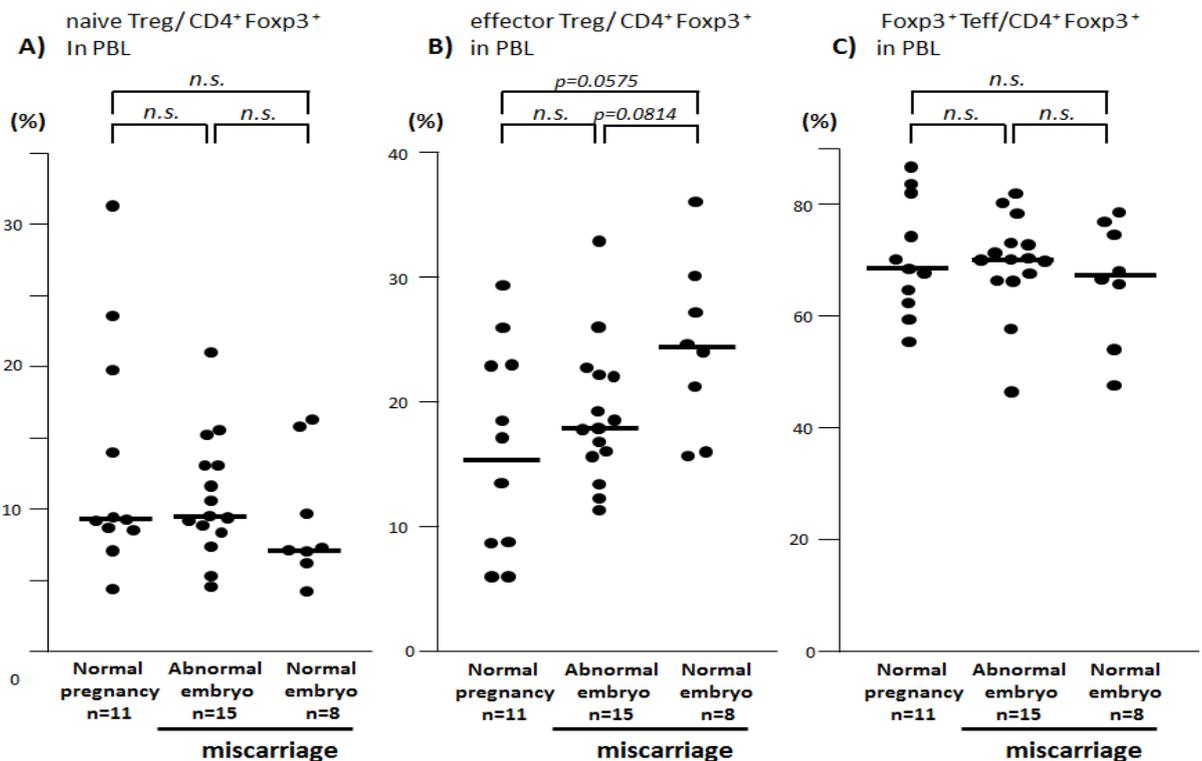
脱落膜中の CD4⁺Foxp3⁺ 細胞における effector Treg 細胞率 (effector Treg/CD4⁺Foxp3⁺) は、胎児染色体正常流産では正常妊娠より有意に低下していた (中央値 45.0% vs 57.7% p=0.0105、図 6B)。Foxp3⁺Teff 細胞率 (Foxp3⁺Teff/CD4⁺Foxp3⁺) は、胎児染色体正常流産では、正常妊娠や胎児染色体異常流産より有意に高かった (それぞれ中央値 47.3% vs 37.8% p=0.0258、中央値 47.3% vs 35.7% p=0.0389 図 6C)。naive Treg 細胞率 (naive Treg/CD4⁺Foxp3⁺) は 3 群間で同等であった (図 6A)。水平線は中央値を示す。

【研究 2-3】 末梢血中 CD4⁺Foxp3⁺ 細胞における naive Treg、effector Treg、Foxp3⁺ effector T 細胞の細胞率

末梢血中の CD4⁺Foxp3⁺ 細胞における naive Treg、effector Treg、Foxp3⁺Teff の細胞率は、3 群間で有意差は認めなかった (図 7A,B,C)。effector Treg 細胞率は、胎児染色体正常流産では正常妊娠より高い傾向はあったが、有意な差は認めなかった (図 7B)。胎児染色体正常流産の Foxp3⁺Teff 細胞率は、脱落膜では正常妊娠より増加していたが、末梢血では増加していなかった (図 7C)。effector Treg 細胞率は、脱落膜で約 55%、末梢血で約

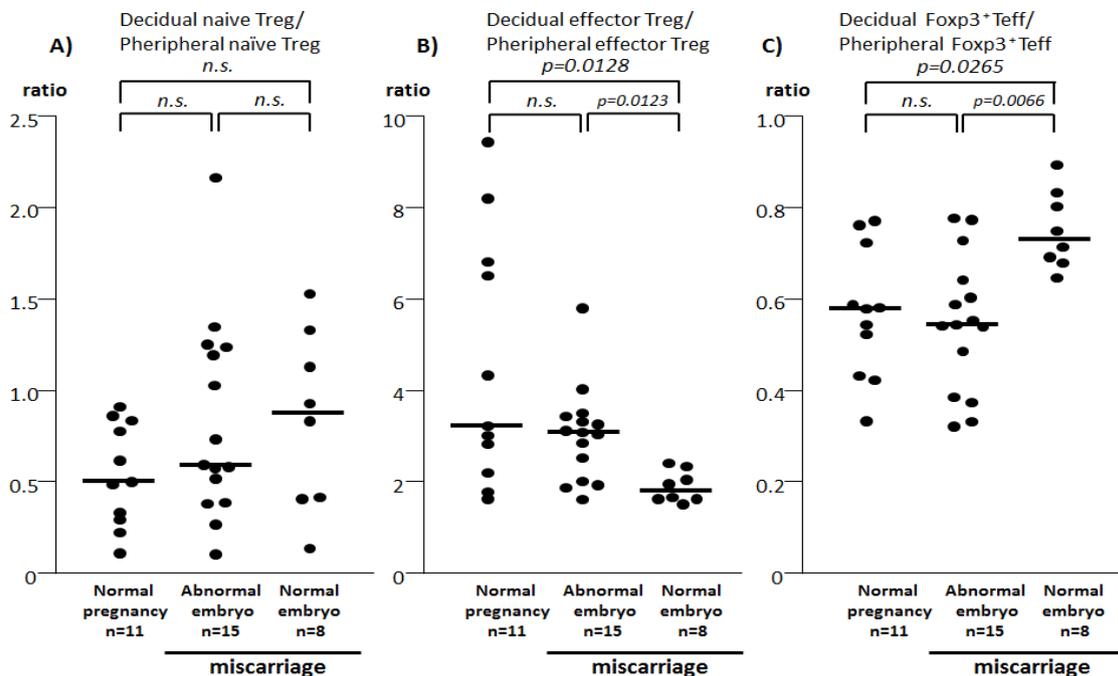
20%、Foxp3⁺ Teff 細胞率は脱着膜で約 40%、末梢血で約 70%と脱着膜と末梢血では比率が大きく異なっていた。そこで、naive Treg、effector Treg、Foxp3⁺ Teff の脱着膜と末梢血における存在比について検討した。脱着膜 effector Treg /末梢血 effector Treg 比は、胎児染色体正常流産では、正常妊娠や胎児染色体異常流産より有意に低下していた（それぞれ 中央値 1.8 vs 3.2, p=0.0128、中央値 1.8 vs 3.1, p=0.0123：図 8B）。脱着膜 Foxp3⁺ Teff/末梢血 Foxp3⁺ Teff 比は、胎児染色体正常流産では、正常妊娠や胎児染色体異常流産より有意に増加していた（それぞれ 中央値 0.73 vs 0.58, p=0.0265、中央値 0.73 vs 0.54, p=0.0066：図 8C）。

【図 7】末梢血中の CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞における naive Treg、effector Treg、Foxp3⁺ effector T 細胞の細胞率



末梢血中の CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞における naive Treg、effector Treg、Foxp3⁺ Teff の細胞率は、3 群間で有意差は認めなかった（図 7A-C）。effector Treg 細胞率は、胎児染色体正常流産では正常妊娠より高い傾向はあったが有意な差は認めなかった（図 7B）。胎児染色体正常流産の Foxp3⁺ Teff 細胞率は、脱着膜では正常妊娠より増加していたが、胎児染色体正常流産で増加していなかった（図 7C）。水平線は中央値を示す。

【図 8】 naive Treg、effector Treg、Foxp3⁺Teff における脱落膜と末梢血の比



脱落膜 effector Treg /末梢血 effector Treg 比は、胎児染色体正常流産では、正常妊娠や胎児染色体異常流産より有意に低下していた (図 8B)。脱落膜 Foxp3⁺Teff/末梢血 Foxp3⁺Teff 比は、胎児染色体正常流産では、正常妊娠や胎児染色体異常流産より有意に増加していた (図 8C)。水平線は中央値を示す。

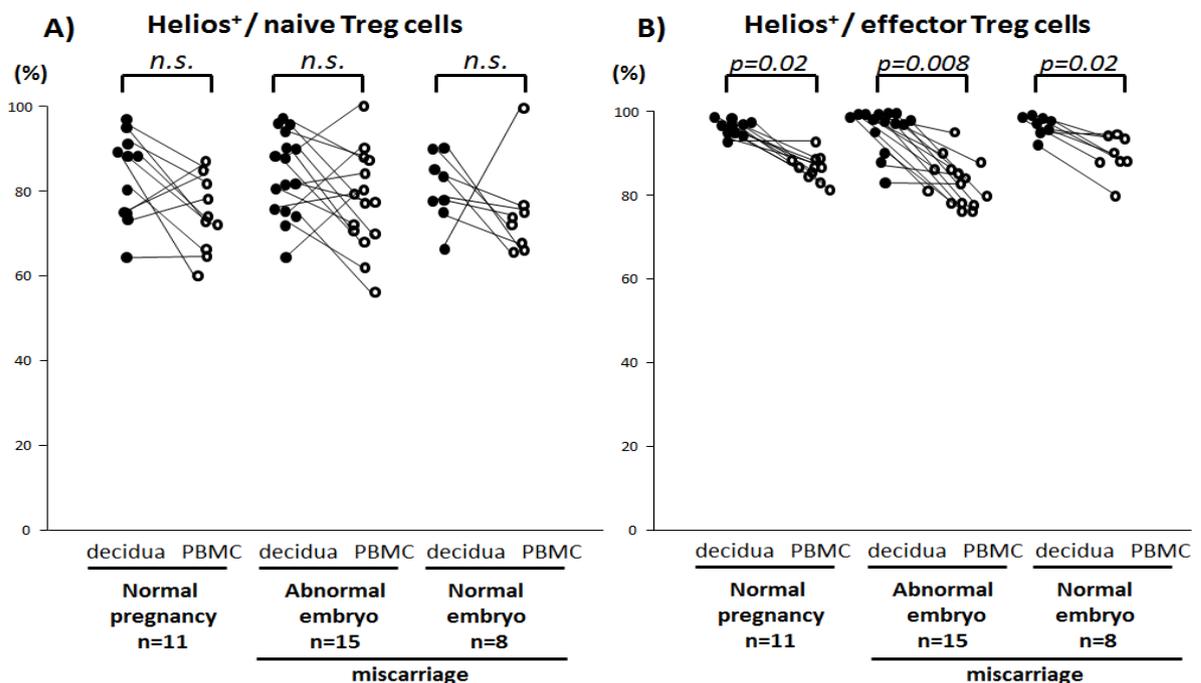
【研究 2-4】 脱落膜、末梢血中の effector Treg と naive Treg の Helios 陽性率についての検討

末梢血中の naive Treg の Helios 陽性率 (Helios⁺/ naive Treg) は 3 群とも約 80%であり、これまでの報告と同様であった (図 9A)。また、naive Treg の Helios 陽性率は、3 群とも脱落膜と末梢血における差は認めなかった (図 9A)。しかし、脱落膜の effector Treg の Helios 陽性率は 90%以上であり、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とも、脱落膜では末梢血に比べて effector Treg の Helios 陽性率が有意に高かった (それぞれ p=0.02、p=0.008、p=0.002: 図 9B)。これは、effector Treg の末梢血から脱落膜への選択的な移動を示唆している。

次に、脱落膜中 CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞における Helios⁺ naive Treg 細胞率 (Helios⁺ naive

Treg/ CD4⁺ Foxp3⁺) と Helios⁻ naive Treg 細胞率 (Helios⁻ naive Treg/ CD4⁺ Foxp3⁺)、Helios⁺ effector Treg 細胞率 (Helios⁺ effector Treg/ CD4⁺ Foxp3⁺) と Helios⁻ effector Treg の細胞率 (Helios⁻ effector Treg/ CD4⁺ Foxp3⁺) を検討した。脱落膜中の Helios⁺ effector Treg 細胞率は、胎児染色体正常流産では正常妊娠より有意に低下していた (中央値 42.83 vs 52.99, p=0.0258 : 図 10A)。Helios⁻ effector Treg 細胞率は、3 群間において差を認めなかった (図 10B)。脱落膜中の Helios⁺ naive Treg 細胞率・Helios⁻ naive Treg 細胞率は、ともに 3 群間において差を認めなかった (図 11)。末梢血でも同様に検討したが、末梢血においては、Helios⁺ or Helios⁻ effector Treg 細胞率、Helios⁺ or Helios⁻ naive Treg 細胞率のすべてにおいて 3 群間で有意差は認めなかった。

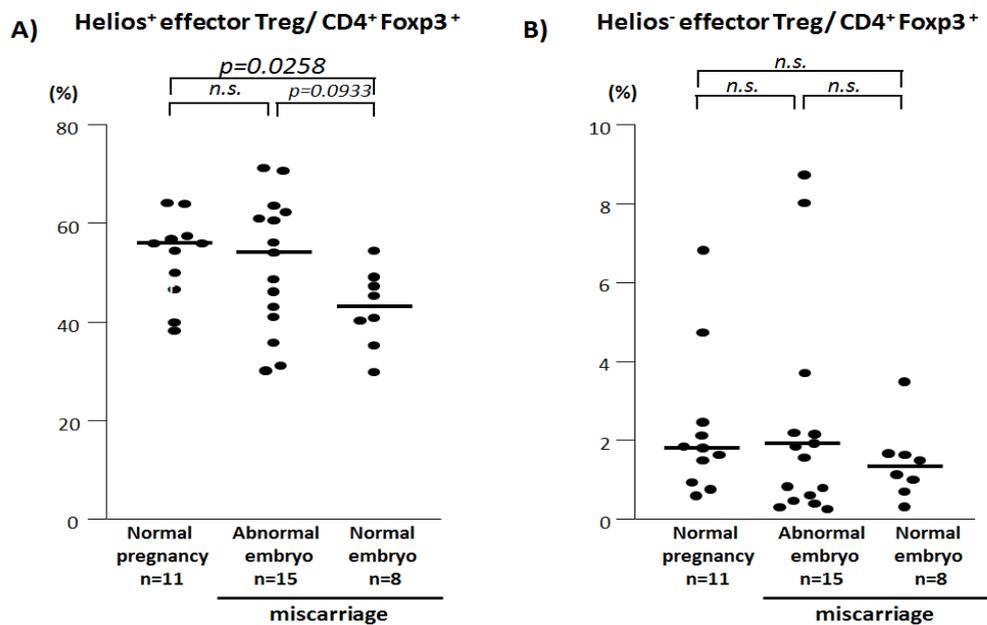
【図 9】 脱落膜、末梢血中の naive Treg と effector Treg の Helios 陽性率



A:脱落膜中の naive Treg の Helios 陽性率 (Helios⁺/ naive Treg) は 3 群とも約 80%であった。naive Treg の Helios 陽性率は、3 群とも脱落膜と末梢血における差は認めなかった。

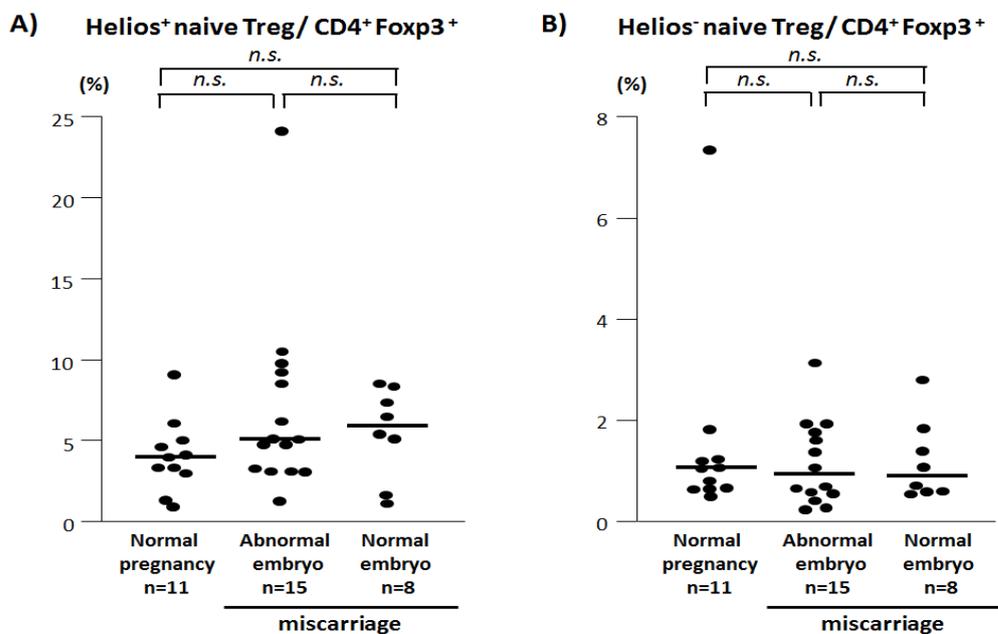
B:脱落膜の effector Treg の Helios 陽性率は 90%以上であり、脱落膜では末梢血に比べて、effector Treg の Helios 陽性率が有意に高かった (正常妊娠で p=0.02、染色体異常流産で p=0.008、胎児染色体正常流産で p=0.002)。

【図 10】脱落膜中 CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞における effector Treg の Helios 陽性細胞率と Helios 陰性細胞率



脱落膜中の Helios⁺ effector Treg 細胞率は、胎児染色体正常流産では正常妊娠より有意に低下していた（中央値 42.83% vs 52.99% $p=0.0258$ ）。水平線は中央値を示す。

【図 11】脱落膜中 CD4⁺ Foxp3⁺ 細胞における naive Treg の Helios 陽性細胞率と Helios 陰性細胞率



脱落膜中の Helios⁺ naive Treg 細胞率・Helios⁻ naive Treg 細胞率は、ともに 3 群間において差を認めなかった。水平線は中央値を示す。

考察

免疫系における活性と抑制のバランスを維持するためには、免疫抑制機能をもつ Treg が重要な働きをしている。Treg は、IL-10、TGF- β などの抑制性サイトカインの産生、高親和性 IL-2R の発現による IL-2 の枯渇、細胞傷害活性抑制などにより T 細胞の活性を抑制する。また Treg の細胞表面に高発現している CTLA-4 が、抗原提示細胞の CD80/CD86 と強く結合し、抗原提示細胞の T 細胞への副刺激を阻害して T 細胞の活性化を防ぐことなどにより免疫寛容を誘導する (Shevach et al. 2009)。妊娠における母児免疫寛容の誘導にも Treg は関与している。マウスでは、妊娠初期に Treg を欠損させると着床障害と流産が引き起こされる (Aluvihare et al. 2004、Darrasse-Jeze et al. 2006、Shima et al. 2010、Rowe et al. 2011)。また、正常妊娠マウスから分離した Treg を流産モデルマウスに移入すると、流産率が減少し、IL-10、TGF- β の産生が増加する (Zenclussen et al. 2005、Yin et al. 2006)。

ヒトでは、脱落膜中の Treg 細胞率が流産患者 (Sasaki et al. 2004、Jin et al. 2009) や原因不明習慣流産患者 (Yang et al. 2008、Mei et al. 2010、Wang et al. 2010、Lee et al. 2011) で減少していることが知られている。免疫因子による不妊症患者または流産既往のある患者における次回妊娠時の末梢血中の CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 細胞率が、妊娠成功群では流産群より高値であったことから、末梢血 Treg 細胞率が妊娠予後マーカーとなりえるかもしれない (Winger and Reed 2011)。さらに、原因不明の習慣流産患者では Treg 細胞の免疫抑制能の機能低下があることも報告されている (Wang et al. 2011、Arruvito et al. 2010)。Tilburgs らは母子間の HLA-C 不適合妊娠では脱落膜リンパ球中の Treg の増殖がみられるが、HLA-C 適合妊娠では Treg の増殖は認めなかったと報告している (Tilburgs et al. 2009)。これらの所見から、Treg がヒトの妊娠維持において重要な役割を果たしていることがわかる。

習慣流産の 40-60%は原因が不明のままである (Clifford et al. 1994)。もし、免疫系の

機能異常が流産を引き起こしているのであれば、母児免疫寛容の場である着床部位で、免疫学的変化が生じていると考えられる (Saito et al. 2011)。免疫学的変化の有無をより正確に検討するために、今回、申請者は流産を胎児染色体正常流産と胎児染色体異常流産の 2 群に分けて解析した。その結果、胎児染色体正常流産では正常妊娠と比較し着床部でのみ Treg の集簇が減少していること、非着床部での Treg の集簇は正常妊娠と同等であることを初めて報告した。また、胎児染色体異常流産は、着床部・非着床部ともに Treg の集簇が正常妊娠と同等であることが判明した。以上より、流産リスク因子のない胎児染色体正常流産つまりは原因不明の流産の一部は免疫異常によって引き起こされていること、胎児染色体異常流産は胎児・胎盤機能低下によって引き起こされていることが示唆される。今後、Treg 細胞率と共に、流産誘導の実行部隊である細胞傷害性 NK 細胞・細胞傷害性 T 細胞の変動についても検討することでより明解になるだろう。

Rowe らは (2012)、マウスの実験において、出産後、末梢血中胎児特異的 Treg 細胞は高いレベルを保っており 2 回目の妊娠時には初回時より迅速に増加すること、妊娠中期に Treg を部分的に除去した際の胎仔吸収率が初回妊娠よりも次回妊娠の方が低いことなどから、胎児抗原に対するアネルギーを維持するメモリー Treg が存在することを報告した。そこで、本研究のフローサイトメトリー解析に参加した対象者 (表 2、表 3) において、生児の有無による Treg 細胞率を検討したが、差を認めなかった。残念ながら、ヒトにおけるメモリー Treg の存在について本研究では明らかにはならなかった。

Foxp3 は Treg 細胞に特異的なマーカーであると信じられていたが (Hori et al. 2003)、ヒトでは IL-2、IFN γ を産生する effector T 細胞において一時的に Foxp3 を発現することが報告されている (Walker et al. 2003、Gavin et al. 2006、Allan et al. 2007)。Miyara らは (2009)、Foxp3⁺細胞は、免疫寛容に寄与する effector Treg と、免疫抑制力の弱い naive Treg と、免疫寛容を破綻させる T_{eff} 細胞に分類されることを証明した。これまでに多くの論文で、Foxp3⁺細胞が正常妊娠で増加し、流産 (Sasaki et al. 2004、Yang et al. 2008、

Jin et al. 2009、Mei et al. 2010、Wang et al. 2010、Lee et al. 2011) や妊娠高血圧腎症 (preeclampsia) で減少することが報告されているが (Sasaki et al. 2007、Santner-Nanan et al. 2009)、どのサブセットの Foxp3⁺ 細胞が増加・減少しているのかまでは報告されていない。今回、脱落膜リンパ球中の effector Treg 細胞率が、正常妊娠と比べ、胎児染色体正常流産で減少することを初めて報告した。興味深いことに、脱落膜中の Foxp3⁺ Teff 細胞率は、胎児染色体正常流産では正常妊娠と比べて増加していた。生体内の免疫系は、免疫活性と免疫抑制のバランスによってコントロールされているが、胎児染色体正常流産では、母児境界面での免疫バランスが免疫活性優位な状態にシフトし、胎児に対する免疫寛容の誘導が障害されていると考えられた。また、胎児染色体正常流産の末梢血中の effector Treg 細胞率は正常妊娠より低値ではなく、むしろ高い傾向にあった。このことから、胎児染色体正常流産で生じている免疫学的異常は全身で生じているのではなく、母児免疫境界である妊娠子宮のみに限局していることがうかがえた。

Samstein らは (2012)、Foxp3 エンハンサーである CNS1 (conserved noncoding sequence 1) が inducible Treg (iTreg) の誘導に必須であり、この CNS1 配列が胎盤をもつ哺乳類でよく保存されており、胎盤をもつ哺乳類の同種異系妊娠の妊娠維持において重要な役割を果たしていると報告している。Thornton らは (2010)、Helios (Ikaros 転写因子ファミリーメンバー) が natural occurring Treg (nTreg) の特異的マーカーであると報告した。そこで、iTreg と nTreg のどちらが妊娠維持に関与しているのかを検討するために、effector Treg の Helios⁺nTreg と Helios⁻iTreg について調べた。ヒトでは脱落膜中 Foxp3⁺ 細胞における Helios⁻effector iTreg 細胞率は約 2%、と非常に少なく、この Helios⁻effector iTreg 細胞率は正常妊娠と胎児染色体正常流産で差は認めなかった (図 10B)。しかし、脱落膜中 Helios⁺effector nTreg 細胞率は、胎児染色体正常流産では正常妊娠と比較し有意に減少していた (図 10A)。一方、naive Treg における Helios⁺ 細胞率・Helios⁻細胞率は、胎児染色体正常流産と正常妊娠において差を認めなかった (図 11)。この結果から、マウスとは

違い、ヒトでは Helios 陽性の effector nTreg が妊娠子宮に選択的に集簇していると考えられることができる。また、ヒト (Tilburgs et al. 2008) とマウス (Kallikourdis et al. 2007) の妊娠において、胎児特異的 Treg が末梢から脱落膜に選択的に移動していることが報告されている。本研究において胎児染色体正常流産では正常妊娠と比較し、Foxp3⁺ 細胞が脱落膜着床部でのみ減少しており (図 2B)、末梢血の effector Treg は増加する傾向を認めた (図 7B)。これらの結果を総合すると、胎児染色体正常流産では effector nTreg 細胞の末梢から母児境界面への移動が障害されていることが示唆される。これを証明するためには脱落膜組織あるいは Treg において、Treg の脱落膜へのホーミングに關与するサイトカイン (IL-2)、ケモカイン (CCL22、CXCL3、CCL3、CCL4、CCL5)、hCG、Treg に発現するケモカインレセプター (CCR5、CCR7 など) について検討する必要がある (Teles et al. 2013)。

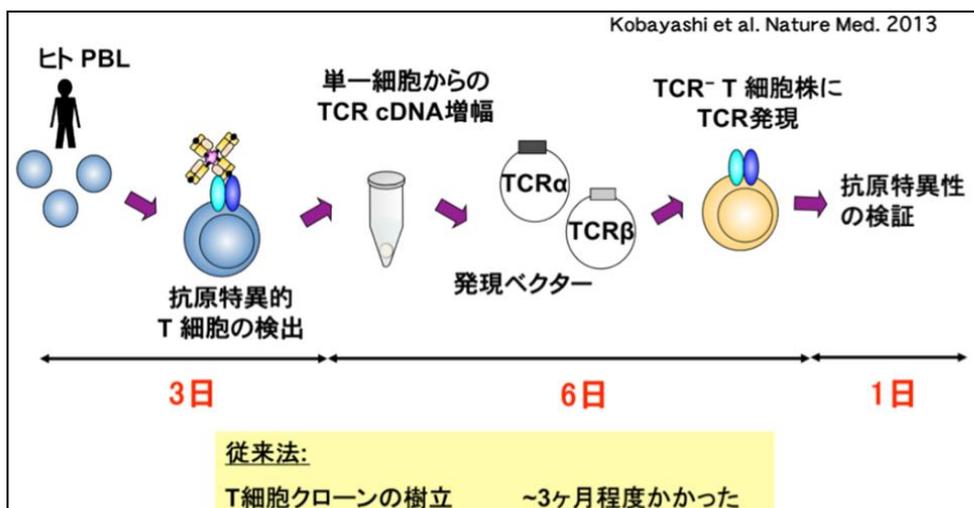
Treg が妊娠高血圧腎症で減少することは既によく知られた事実であるが (Sasaki et al. 2007、Santner-Nanan et al. 2009)、最近の報告では、Helios⁺ nTreg ではなく、Helios⁻ iTreg が妊娠高血圧腎症の脱落膜で減少していることが報告されている (Hsu et al. 2012)。Rowe らは (2012)、マウスにおいて、妊娠経過と共に胎児抗原特異的 Treg が増加していること、Helios⁺ 胎児抗原特異的 nTreg の割合が妊娠中期 (妊娠 11.5 日) では約 70%だが、妊娠後期 (妊娠 18.5 日) では、約 40%まで減少していること報告しており、これは Helios⁻ 胎児抗原特異的 iTreg が妊娠後期に増加していることを示す証拠でもある。また Samstein らは (2012)、野生型 C57BL/6 ♀マウスと BALB/c ♂マウスを交配させた時の胎仔吸収率は約 2%であったのに対して、iTreg の誘導に必須の CNS1 を欠損させた C57BL/6 ♀マウスと BALB/c ♂マウスを交配させた時の胎仔吸収率は約 10%であったと報告している。これは、これまでに報告されている全 Treg (nTreg と iTreg) を欠損させたマウスにおける同種異系妊娠時の胎仔吸収率より非常に少なかった。これらのことから、iTreg だけでなく、nTreg も妊娠成功には必要であること、iTreg は後期の妊娠維持に重要であることが示唆される。

近年、Helios が確実な nTreg のマーカーではないこと (Zabransky et al. 2012) や、Neuropilin1 が nTreg に高発現していること (Weiss et al. 2012) が報告されており、nTreg、iTreg を正確に同定する手法の検討が必要である。

Kallikourdis らは (2007)、マウスの妊娠で、父方同種異系抗原が妊娠子宮での CCR5⁺ effector Treg の集簇を増加させていることから、CCR5⁺ が父親抗原特異的 Treg のマーカーとなりうるかもしれないと報告した。Shima らは (2015)、父親抗原特異的 Ki67⁺ 増殖性 Treg 細胞が、CCR5 を発現していることを報告した。これらの所見から、ヒトにおいても CCR5⁺ Ki67⁺ 増殖性 Treg が父親抗原特異的免疫寛容を誘導している可能性が考えられたので CCR5⁺ Treg 細胞率・Ki67⁺ Treg 細胞率について検討してみたが、胎児染色体正常流産群と正常妊娠群において有意な変化を認めなかった。そこで、ヒト妊娠における父親抗原特異的 Treg を同定するために、Kobayashi ら (2013) が開発した hTEC10 (Human TCR efficient cloning within 10 days) の手法を応用する実験計画を考案した (図 12)。まず、母体血・脱落膜リンパ球から effector Treg、naive Treg を単一細胞で分離し、RT-PCR にて TCR cDNA を増幅させ、Direct Sequence で塩基配列を解析し、TCR レパートリーの変化を調べる。さらに、hTEC10 を用いて父親抗原特異的 Treg と予測される Treg を作成し、臍帯血リンパ球との MLR により抗原特異性を確認する。また、父親抗原特異的 Treg のサロゲートマーカーも検出したいと考えている。ヒト父親抗原特異的 Treg の妊娠中の動態を検討することで、着床・妊娠を成功に導く Treg の機能がさらに解明されることになるだろう。

【図 12】 hTEC10 (Human TCR efficient cloning within 10 days) の概略図

hTEC10 (Human TCR efficient cloning within 10 days)



結論

胎児染色体正常流産では着床部でのみ Treg の集簇が減少していること、胎児染色体正常流産の脱落膜では、Heliso⁺effector nTreg が減少し、Foxp3⁺Teff が増加していることを初めて証明した。これは、母児免疫境界における免疫寛容の誘導障害が流産の原因の 1 つであることを示しており、今後、原因不明不育症患者への治療法開発にもつながっていくことが期待される。

謝辞

本研究ならびに論文執筆にあたり、終始、御懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました富山大学医学部 産科婦人科学教室 齋藤滋教授、産科婦人科教室の皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., Levings, M.K., 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* 19,345-54.

Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., Betz, A.G., 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* 5, 266-271.

Arruvito, L., Sotelo, A. I., Billordo, A., Fainboim, L., 2010. A physiological role for inducible FOXP3+ TREG cells: Lessons from women with reproductive failure. *Clin. Immunol.* 136, 432-441.

Clifford, K., Rai, R., Watson, H., Regan, L., 1994. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum.Reprod.* 9,1328-1332.

Darrasse-Jèze, G., Klatzmann, D., Charlotte, F., Salomon, B.L., Cohen, J.L., 2006. CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol. Lett.* 102,106-109.

Gavin, M.A., Torgerson, T.R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W.Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E.L., Greenberg, P.D., Ochs, H.D., Rudensky, A.Y., 2006. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6659-64.

Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 299,1057-1061.

Hsu, P., Santner-Nanan, B., Dahlstrom, J.E., Fadia, M., Chandra, A., Peek, M., Nanan, R., 2012. Altered decidual DC-SIGN⁺ antigen-presenting cells and impaired regulatory T-cell induction in preeclampsia. *Am. J. Pathol.* 181,2149-60.

Jin, L.P., Chen, Q.Y., Zhang, T., Guo, P.F., Li, D.J., 2009. The CD4⁺CD25⁺ bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage. *Clin. Immunol.* 133,402-410.

Kallikourdis, M., Andersen, K.G., Welch, K.A., Betz, A.G., 2007. Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5⁺ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104,594-599.

Kobayashi, E., Mizukoshi, E., Kishi, H., Ozawa, T., Hamana, H., Nagai, T., Nakazawa, H., Jin, A., Kaneko, S., Muraguchi, A., 2013. A new cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of patients with cancer within 10 days. *Nat. Med.* 19,1542-1546.

Lee, S.K., Kim, J.Y., Hur, S.E., Kim, C.J., Na, B.J., Lee, M., Gilman-Sachs, A., Kwak-Kim, J., 2011. An imbalance in interleukin-17-producing T and Foxp3⁺ regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum. Reprod.* 26,2964-2971.

Mei, S., Tan, J., Chen, H., Chen, Y., Zhang, J., 2010. Changes of CD4+CD25high regulatory T cells and FOXP3 expression in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil. Steril.* 94, 2244-2247.

Michimata, T., Tsuda, Hi., Sakai, M., Fujimura, M., Nagata, K., Nakamura, M., Saito, S., 2002. Accumulation of CRTH2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human decidua in a prostaglandin D2-mediated manner., *Mol. Hum. Reprod.* 8, 181-187.

Miyao, T., Floess, S., Setoguchi, R., Luche, H., Fehling, H.J., Waldmann, H., Huehn, J., Hori, S., 2012. Plasticity of Foxp3+ T Cells Reflects Promiscuous Foxp3 Expression in Conventional T Cells but Not Reprogramming of Regulatory T Cells. *Immunity.* 36, 262-275.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochoy, G., Sakaguchi, S., 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 30, 899-911.

Nakashima, A., Ito, Mika., Shima, T., Bac, N.D., Hidaka, Takao., Saito, S., 2010. Accumulation of IL-17-Positive Cells in Decidua of Inevitable Abortion Cases. *Am.J. Reprod. Immunol.* 64, 4-11.

Rowe, J.H., Ertelt, J.M., Aguilera, M.N., Farrar, M.A., Way, S.S., 2011. Foxp3(+)

regulatory T cell expansion required for sustaining pregnancy compromises host defense against prenatal bacterial pathogens. *Cell Host Microbe*. 10, 54-64.

Rowe, J.H., Ertelt, J.M., Xin, L., Way, S.S., 2012. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature*. 490,102-106.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*155 ,1151-1164.

Saito, S., Tsukaguti, N., Hasegawa, T., Michimata, T., Tsuda, H., Narita, N., 1999. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *Am.J.Reprod.Immunol.*42,240-245.

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

Sakaguchi, S., 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6,345-352.

Samstein, R.M., Josefowicz, S.Z., Arvey, A., Treuting, P.M., Rudensky, A.Y., 2012. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell*. 150, 29-38.

Santner-Nanan, B., Peek, M.J., Khanam, R., Richarts, L., Zhu, E., Fazekas de St Groth, B., Nanan, R., 2009. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and

IL-17-producing CD4⁺ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J. Immunol.* 183, 7023-30.

Sasaki, Y., Darmochwal-Kolarz, D., Suzuki, D., Sakai, M., Ito, M., Shima, T., Shiozaki, A., Rolinski, J., Saito S., 2007. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 139-145.

Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S., Shiozaki, A., Saito, S., 2004. Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 347-353.

Shevach, E.M. 2009. Mechanisms of Foxp3⁺ T Regulatory Cell-Mediated Suppression, *Immunity.* 30, 636-645.

Shima, T., Inada, K., Nakashima, A., Ushijima, A., Ito, M., Yoshino, O., Saito, S., 2015. Paternal antigen-specific proliferating regulatory T cells are increased in uterine-draining lymph nodes just before implantation and in pregnant uterus just after implantation by seminal plasma-priming in allogeneic mouse pregnancy. *J.Reprod. Immunol.*108, 72-82.

Shima, T., Sasaki, Y., Itoh, M., Nakashima, A., Ishii, N., Sugamura, K., Saito, S., 2010. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J. Reprod. Immunol.* 85, 121-129.

Takahashi, T, Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., Sakaguchi, S., 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their

anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10, 1969-80.

Teles, A. Zenclussen, A.C. Schumacher, A., 2013. Regulatory T cells are Baby's Best Friends. *Am. J. Reprod. Immunol.* 69, 331-339.

Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y., & Shevach, E. M. 2010. Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *J. Immunol.*, 184, 3433-3441.

Tilburgs, T., Roelen, D.L., van der Mast, B.J., de Groot-Swings, G.M., Kleijburg, C., Scherjon, S.A., Claas, F.H., 2008. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *J. Immunol.* 180, 5737-5745.

Tilburgs, T., Scherjon, S.A., van der Mast, B.J., Haasnoot, G.W., Versteeg, V. D. Voort-Maarschalk, M., Roelen, D.L., van Rood, J.J., Claas F.H., 2009. Fetal-maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells. *J. Reprod. Immunol.* 82, 148-157.

Walker, M.R., Kasprovicz, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J.H., Ziegler, S.F., 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J. Clin. Invest.* 112, 1437-43.

Wang, W.J., Hao, C.F., Lin, Q.D., 2011. Dysregulation of macrophage activation by decidual regulatory T cells in unexplained recurrent miscarriage patients. *J. Reprod. Immunol.* 92, 97-102.

Wang, W.J., Hao, C.F., Q.u. Q.L., Wang, X., Qiu, L.H., Lin, Q.D., 2010. The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *Hum. Reprod.* 25, 2591-2596.

Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, MA., Parkhurst, CN., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., Yang, Y., Floess, S., Huehn, J., Oh, S., Li, M.O., Niec, R.E., Rudensky, A.Y., Dustin, M.L., Littman, D.R., Lafaille, J.J. 2012. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* 209, 1723-1742.

Winger, E.E., Reed, J.L., 2011. Low circulating CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) T regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure. *Am. J. Reprod. Immunol.* 66, 320-328.

Yang, H., Qiu, L., Chen, G., Ye, Z., Lü, C., Lin, Q., 2008. Proportional change of CD4+CD25+ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertil Steril.* 89, 656-661.

Yin, Y., Han, X., Shi, Q., Zhao, Y., He, Y., 2012. Adoptive transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells for prevention and treatment of spontaneous abortion. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 161,177-181.

Zabransky, D.J., Nirschl, C.J., Durham, N.M., Park, B.V., Ceccato, C.M., Bruno, T.C., Tam, A.J., Getnet, D., Drake, C.G., 2012. Phenotypic and functional properties of

Helios+ regulatory T cells. PLoS One. 7,e34547.

Zenclussen, A.C., Gerlof, K., Zenclussen, M.L., Ritschel, S., Zambon Bertoja, A., Fest, S., Hontsu, S., Ueha, S., Matsushima, K., Leber, J., Volk, H.D., 2006. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. Eur. J. Immunol. 36, 82-94.

Zenclussen, A.C., Gerlof, K., Zenclussen, M.L., Sollwedel, A., Bertoja, A.Z., Ritter, T., Kotsch, K., Leber, J., Volk, H.D., 2005. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. Am. J. Pathol. 166, 811-822.