

氏 名 つだ さやか
津田 さやか

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 279 号

学位授与年月日 平成 30 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
東西統合医学 専攻

学位論文題目

Clonally expanded decidual effector regulatory T cells
increase in late gestation of normal pregnancy, but not in
preeclampsia, in humans.

(ヒト脱落膜の effector 制御性 T 細胞は妊娠後期にクロー
ナルに増加するが、妊娠高血圧腎症では増加しない)

論文審査委員

(主査) 教授 足立 雄一
(副査) 教授 山本 善裕
(副査) 教授 稲寺 秀邦
(副査) 教授 絹川 弘一郎
(指導教員) 教授 齋藤 滋

論文内容の要旨

〔目的〕

〔目的〕

制御性T細胞 (Treg) は母児間免疫寛容の誘導に重要な役割を果たすことが知られている。マウスでは、胎児抗原特異的な制御性T細胞が、着床期および妊娠中に子宮とその所属リンパ節に集簇する事が知られている。一方、ヒトは主要組織適合性抗原の発現がヘテロな集団であるため、個人毎に胎児抗原が異なる。そのため、胎児抗原特異的なTregの同定はこれまで成功していない。しかし、脱落膜由来のTregはthird party由来の臍帯血単核球より自身の児の臍帯血単核球に対して、より高い抑制活性を発揮するため、胎児抗原特異的Tregがヒト妊娠例でも存在すると考えられている。Tregには、抑制活性の高いCD4⁺CD45RA⁻FoxP3^{high} effector Tregサブセットと、抑制活性の比較的低いCD4⁺CD45RA⁺FoxP3^{low} naïve Tregサブセットがある。ヒト妊娠中の末梢血および脱落膜では前者が高い割合を占めると報告されており、胎児抗原特異的なTregを有している可能性がある。

また、ヒトにおいてTregの数的異常や機能的異常が流産および妊娠高血圧腎症 (Preeclampsia ; PE) 発症に関与するとした報告がある。すなわち、染色体正常流産ではCD4⁺CD45RA⁻FoxP3⁺ effector Tregが減少しており、PE症例では、脱落膜と末梢血のTregが減少していたとする報告がある。Nellerらは、正常妊娠症例とPE症例の末梢血および脱落膜TregのTRBV (T cell receptor beta variable) を25種類の抗体を用いてフローサイトメトリーで比較したが、両者間に有意差を見出すことができず、ヒトでの胎児抗原特異的なTregの同定はできていない。

以上より、妊娠中脱落膜に集簇するeffector Tregには、母児間境界に発現する抗原に対して反応し、クローナルに増加する集団があると仮定した。Effector Tregのクローナリティーを検討するため、T細胞受容体 (T cell receptor ; TCR) のレパートリー解析を1つのeffector T細胞毎に施行することとした。また、母子免疫寛容の破綻が想定されている流産と妊娠高血圧腎症においてeffector TregのTCRレパートリーは、同時期の正常妊娠と異なるかを比較検討することを目的とした。

〔方法〕

当院および研究協力機関を受診した妊婦より、文書で同意を得た上で、末梢血ならびに分娩時または流産手術時に得られた脱落膜を採取し、リンパ球を分離した。セルソーターでリンパ球からCD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}CD45RA⁻細胞 (effector Treg) を96穴PCR用プレートに単一細胞ソートし、RT-PCR法を用いて単一細胞からTCRのcDNAを増幅した。シーケンサーで塩基配列を決定し、TCRβ鎖サブユニットにおける相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR3) のアミノ酸配列および塩基配列のレパートリーを

解析した。なお、Tregに特異的に発現するFoxP3 mRNAの発現も検討し、FoxP3 mRNA陽性細胞のみ解析を行った。共通のCDR3領域を有する群をクローナルなTCRレパートリーとし、解析できたTCRにおける割合を算出した。また、レパートリーの収束の評価にはGini係数を算出し比較した。Gini係数は0-1の値をとり、レパートリーが収束するほど高値となる。結果は中央値（四分位範囲）で示した。

〔成績〕

正常妊娠初期（人工妊娠中絶）9例、正常妊娠後期12例、胎児染色体異常流産11例、胎児染色体正常流産7例、PE7例であった。脱落膜から取得したeffector Tregでは、妊娠初期よりも後期でクローナルなTCRレパートリーの割合が増加していた（4.5%（1.4-10.8%） vs 20.9%（15.4-28.1%）， $p < 0.001$ ）。Gini係数は後者でより高く（0.04（0.02-0.09） vs 0.22（0.17-0.36）， $p < 0.001$ ）、脱落膜でTregのTCRレパートリーが収束していた。末梢血リンパ球から取得したeffector Tregでは、妊娠初期と後期でクローナルなTCRレパートリーの割合が増加する傾向はなかった。末梢血と脱落膜で共通のeffector Tregのクローンが出現していたのは、正常妊娠初期（9例）と正常後期（12例）中、それぞれ1例ずつのみであった。同一の症例で先行妊娠と後続妊娠でレパートリーが比較できた3例では、脱落膜のeffector Tregにおいて2つの妊娠で共通したクローンが出現しており、これらが胎児抗原を認識するTregの可能性はある。

正常妊娠初期群と比し、胎児染色体異常流産群および胎児染色体正常流産群の脱落膜effector TregのクローナルなTCRの出現割合（4.5%（1.4-10.8%） vs 7.0%（0.0-10.2%）， $p = 0.996$ and 4.5%（1.4-10.8%） vs 8.3%（6.8-16.3%）， $p = 0.399$ ）、Gini係数（0.04（0.02-0.09） vs, 0.08（0.00-0.16） $p = 0.898$ and 0.04（0.02-0.09） vs 0.08（0.07-0.17）， $p = 0.339$ ）に有意差は認められなかった。しかし、 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ total Tregにおける $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD25^+CD127^{low/-}$ effector Tregの割合は、正常妊娠初期群と比し、染色体異常流産は有意差が無かったが（90.6%（82.4-94.6%） vs 80.7%（72.9-94.3%）， $p = 0.562$ ）、染色体正常流産群は有意に低下していた（90.6%（82.4-94.6%） vs 80.0%（65.0-83.3%）， $p = 0.049$ ）。

正常妊娠後期群と比しPE群では、脱落膜effector TregのクローナルなTCRの出現割合が後者で有意に低下していた（20.9%（15.4-28.1%） vs 9.3%（4.4-14.5%）， $p = 0.003$ ）。また、Gini係数も後者が有意に低かった（0.22（0.17-0.36） vs 0.09（0.04-0.17）， $p = 0.005$ ）。 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ total Tregにおける $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD25^+CD127^{low/-}$ effector Tregの割合は両群間で有意差を認めなかった（87.0%（82.4-91.7%） vs 85.8%（71.1-88.4%）， $p = 0.331$ ）。

〔考察・総括〕

子宮局所では妊娠初期より後期で、クローナルなeffector Tregの出現割合が増加し

、レパトリーが収束していた。妊娠初期、後期とも末梢血ではeffector TregのクローナルなTCRレパトリーの割合は増加しなかった。脱落膜と末梢血で共通するクローンの出現頻度は低く、異なるレパトリーを形成していた。また、同一症例で先行妊娠と後続妊娠で、共通したクローンが脱落膜effector Tregに出現していた。若年成人におけるTCR β のCDR3アミノ酸配列パターンは約 2×10^7 と推定されており、共通したクローンの出現は偶然とは考えられず、母児境界領域に発現する抗原に対してTregが反応性にクローナルに増加した結果と考えられる。

正常妊娠初期と胎児染色体異常流産ならびに胎児染色体正常流産では、クローナルな脱落膜effector Tregの出現割合に有意差はなかったが、染色体正常流産で脱落膜total Treg中のeffector Treg率が低下していた。また、PEは脱落膜effector Tregのクローナリティーが正常妊娠後期より低下していた。以上より、妊娠初期には脱落膜effector Treg量が重要で、妊娠後期では脱落膜effector Tregのクローナリティーが妊娠維持に重要である可能性が初めて示唆された。

学位論文審査の要旨

【目的】

制御性 T 細胞 (Treg) は、母児間免疫寛容の誘導に重要な役割を果たすことが知られている。マウスでは胎児抗原特異的な Treg が着床期および妊娠中に子宮とその所属リンパ節に集簇する事が知られているが、ヒトは主要組織適合性抗原の発現がヘテロな集団であるため個人毎に胎児抗原が異なり、これまで胎児抗原特異的な Treg の同定は成功していない。そこで、妊娠中脱落膜に集簇する effector Treg が母児間境界に発現する抗原に対して反応しクローナルに増加するのかを明らかにすることを目的に、以下の研究を行った。

【方法と成績】

対象は、正常妊娠初期（人工妊娠中絶）9例、正常妊娠後期12例、胎児染色体異常流産11例、胎児染色体正常流産7例、妊娠高血圧腎症（PE）7例。脱落膜から取得した effector Treg では、妊娠初期よりも後期でクローナルな TCRレパトリーの割合が増加していた（4.5% (1.4-10.8%) vs 20.9% (15.4-28.1%), $p < 0.001$ ）。末梢血リンパ球から取得した effector Treg では、妊娠初期と後期でクローナルな TCRレパトリーの割合が増加する傾向はなかった。末梢血と脱落膜で共通の effector Treg のクローンが出現していたのは、正常妊娠初期（9例）と正常後期（12例）中、それぞれ1例ずつのみであった。同一の症例で先行妊娠と後続妊娠でレパトリーが比較できた3例では、脱落膜の effector Treg において2つの妊娠で共通したクローンが出現しており、これらが胎児抗原を認識する Treg の可能性がある。

正常妊娠初期群と比し、胎児染色体異常流産群および胎児染色体正常流産群の脱落膜 effector Treg のクローナルな TCR の出現割合に有意差は認められなかった（4.5% (1.4-10.8%) vs 7.0% (0.0-10.2%), $p = 0.996$ and 4.5% (1.4-10.8%) vs 8.3% (6.8-16.3%), $p = 0.399$ ）、Gini 係数（0.04 (0.02-0.09) vs 0.08 (0.00-0.16), $p = 0.898$ and 0.04 (0.02-0.09) vs 0.08 (0.07-0.17), $p = 0.339$ ）。しかし、 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ total Treg における $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD25^+CD127^{low/-}$ effector Treg の割合は、正常妊娠初期群と比し、染色体異常流産は有意差が無かったが（90.6% (82.4-94.6%) vs 80.7% (72.9-94.3%), $p = 0.562$ ）、染色体正常流産群は有意に低下していた（90.6% (82.4-94.6%) vs 80.0% (65.0-83.3%), $p = 0.049$ ）。

正常妊娠後期群と比し PE 群では、脱落膜 effector Treg のクローナルな TCR の出現割合が後者で有意に低下していた（20.9% (15.4-28.1%) vs 9.3% (4.4-14.5%), $p = 0.003$ ）。また、 $CD4^+CD25^+CD127^{low/-}$ total Treg における $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD25^+CD127^{low/-}$ effector Treg の割合は両群間で有意差を認めなかった（87.0% (82.4-91.7%) vs 85.8% (71.1-88.4%), $p = 0.331$ ）。

【総括】

局所では妊娠初期より後期でクローナルな effector Treg の出現割合が増加するのに対し、末梢血では妊娠初期と後期ともその割合は増加しなかった。脱落膜と末梢血で共通するクロー

ーンの出現頻度は低く、異なるレパトリーを形成していた。また、同一症例で先行妊娠と後続妊娠において共通したクローンが脱落膜effector Tregに出現していた。若年成人におけるTCR β のCDR3アミノ酸配列パターンは約 2×10^7 と推定されており、共通したクローンの出現は偶然とは考えられず、母児境界領域に発現する抗原に対してTregが反応性にクローナルに増加した結果と考えられた。また、正常妊娠初期と胎児染色体異常流産ならびに胎児染色体正常流産では、クローナルな脱落膜effector Tregの出現割合に有意差はなかったが、染色体正常流産で脱落膜total Treg中のeffector Treg率が低下していた。一方、PEは脱落膜effector Tregのクローナリティーが正常妊娠後期より低下していた。以上より、妊娠初期には脱落膜effector Treg量が重要で、妊娠後期では脱落膜effector Tregのクローナリティーが妊娠維持に重要である可能性が初めて示唆された。

本研究は、ヒトの妊娠において脱落膜にクローナルな effector Treg が存在することを明らかにした点において新規性があり、さらにクローナルな effector Treg が妊娠の維持や妊娠高血圧腎症の発症に関与していることを明らかにした点で医学における学術性が高く、不妊症治療への新たな方向性が示されたことで臨床的発展性も期待できる。以上より、本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値するものと判断した。