

論文の内容の要旨

論文題目 拘束性 NKT 細胞による Th1/Th2 サイトカインバランスの調節を介した
妊娠維持機構についての研究

氏名 保谷茉莉

自然流産は全妊娠の約 15%に発生する頻度の高い妊娠異常の一つであり、周産期医療においてその予防、治療は、重大な課題である。胎児側の要因である染色体異常が原因の 70~80%を占め、母体要因では感染、自己免疫疾患、免疫異常などが知られる。流産を 2 回繰り返す場合を反復流産、3 回以上繰り返す場合を習慣流産と呼び、これらに対しては、原因に応じて妊娠前後に必要な治療的介入を要する。しかし、原因検索を行っても 40~60%は原因が特定できない。したがって反復・習慣流産の未知の機序の解明は究明すべき問題である。妊娠は子宮内のみならず、全身的にも免疫学的変化が生じることは知られている。母体-胎児間の免疫応答のメカニズムについては過去多くの研究が行われてきたが、いまだ未解明の部分も多い。正常妊娠において母体の重要な免疫学的変化の一つに、Th1/Th2 極性が Th2 優位に変化するという現象がある。この Th2 方向への極性変化が適切に生じず、Th1 優位な状態である場合には、胎盤機能、胎児発育が障害されて流産、早産、妊娠高血圧症候群などの妊娠異常の病理因子となることが示唆されてきた。妊娠免疫における、iNKT 細胞の役割に関する過去の報告は限られているが、妊娠に伴い iNKT 細胞は脱着膜内に末梢血中の約 10 倍の存在頻度にまで集積するという報告がある。iNKT 細胞の非典型的 MHC 分子の CD1d が、脱着膜内に浸潤する絨毛外絨毛細胞に発現していることがわかっており、脱着膜内の iNKT 細胞との相互的応答を行っている可能性がある。これらの知見は、iNKT 細胞は母胎免疫応答に重要な役割を担っていることを示唆している。

本研究は iNKT 細胞による Th1/Th2 サイトカインバランスの制御に焦点を置いて、このリンパ球サブセットの妊娠免疫機構における働きを解明することを目的とした。 α -ガラクトシルセラミド（以下、AGC）と OCH はそれぞれ、iNKT 細胞を特異的に刺激する糖脂質であるが、それらが誘導するサイトカインの種類に違いがあることが知られている。OCH は AGC の構造変異体であり AGC と比較して Th2 系サイトカインに偏った放出を誘導する。本研究では、iNKT 細胞の妊娠免疫機構への関与および、その機能異常と流産発生との因果関係を明らかにすることを目的とした。特に、Th1/Th2 サイトカインバランスと iNKT 細胞の関わりについて着目して妊娠マウスモデルを用いた検討を進めた。

まず AGC と OCH をそれぞれ妊娠マウスに投与して流産率を比較した。AGC 投与群は OCH 投与群およびコントロール群よりも有意に流産率が高く、OCH 投与群とコントロール投与群の間には有意差を認めなかった。OCH 投与濃度による流産発生率の検討では、OCH の濃度を増や

しても流産率は上昇しなかった。さらに妊娠マウスに対する AGC、OCH 投与後 1.5 時間と 18 時間の血清中サイトカイン濃度を測定した。1.5 時間後では IL-2、IL-4、IL-10 については OCH 投与群において、AGC 投与群よりも高値を示した。IFN- γ については AGC 投与後 18 時間の血清中で濃度上昇を認め、この変化は OCH 投与群では認めなかった。また、培養脾細胞における AGC、OCH 刺激後の Th1 系 Th2 系サイトカイン産生の検討も行った。培養細胞を回収してリアルタイム PCR を用い、細胞のサイトカイン発現を確認し、培養上清を用い ELISA 法によりサイトカイン分泌についても検討した。IFN- γ の発現は AGC 刺激、OCH 刺激の間に差を認めなかったが、IL-12 β の発現は 48 時間後、72 時間後の両方とも OCH 刺激よりも AGC 刺激において有意に発現が多かった。IL-4 と IL-10 の発現については OCH 刺激の方が AGC 刺激よりも有意に高値であった。ただし、IL-4 については OCH、AGC 刺激の違いは 48 時間でのみ認め 72 時間後には明らかな差を認めなかった。サイトカイン濃度は、IL-4 と IL-10 は、AGC 刺激よりも OCH 刺激によってサイトカイン分泌の上昇を認めた。続いて妊娠マウスに対して AGC 刺激後に IL-4 投与を行ったところ、流産の発生は抑制された。

抗原刺激の種類により iNKT 細胞の反応とその後の妊娠への影響には違いがあり、AGC 刺激は Th1 優位のサイトカイン環境を誘導し妊娠継続が阻害されるのに対して、OCH 刺激では Th2 優位のサイトカイン環境が誘導されて妊娠が維持されることが示された。さらに IL-4 の投与が AGC 誘発性流産を抑制したことから、iNKT 細胞刺激後のサイトカイン環境において IL-4 が妊娠維持における鍵を握っていることが推察された。AGC と OCH はいずれも iNKT 細胞は糖脂質抗原を認識すると短時間に多量のサイトカイン放出を行う特徴を有するが、認識する抗原の違いによって分泌されるサイトカインの種類には大きな違いが生じる。我々の結果は、OCH は AGC と比較して相対的に Th2 優位のサイトカイン環境を誘導するという過去の報告の内容、すなわち多発性硬化症の動物モデルにおいて OCH 投与群では Th2 優位の反応を示したという報告や、OCH 投与により IL-2 が増強され INF- γ は AGC ほど産生されないという報告を支持している。AGC と OCH はいずれも CD1d と結合して iNKT 細胞上の TCR に認識される。その分子間応答に関する詳細な検討によると、CD1d は AGC との結合の場合と OCH との結合の場合で異なる立体構造変化を生じることが知られている。そして、その CD1d との複合体の立体構造の違いによって TCR との親和性が変化することが AGC と OCH のそれぞれに対する iNKT 細胞の活性化状態の差異となっていると報告されている。本研究において確認した AGC および OCH 投与後の妊娠マウスの末梢血中サイトカイン濃度の推移はそうした iNKT 細胞上の TCR との抗原特異的な結合特性に関連している可能性がある。しかし他方で iNKT 細胞による直接的なサイトカイン産生以外に iNKT 細胞活性化後の二次的な反応による他の免疫担当細胞からのサイトカイン産生の影響についても考慮が必要である。AGC 投与が妊娠マウスにおいて負の影響を与えることは過去に報告されてきたが、AGC による胎児への影響は、投与する妊娠時期により異なることが示されている。さらに AGC の有害作用の背景機序として iNKT 細胞に由来する細胞障害物質であるパーフォリンの活性化や、サイトカインの過剰産生に関連することが指摘されてきた。本研究では iNKT 細胞の活性化に際して、AGC 投与と OCH 投与という異なるタイプの刺激ではそ

こから生じる流産発生に関する妊娠への影響が全くことなることが初めて明らかとなった。本研究において、OCH 刺激後には妊娠末梢血中および培養脾細胞上清中のサイトカイン濃度の上昇が確認されたにも関わらず流産率の増加を認めなかった。これは AGC と OCH とのそれぞれの刺激に反応して生じる iNKT 細胞からのサイトカイン産生やその後に 2 次的に誘導される Th1/Th2 サイトカインバランスの違いが AGC 投与と OCH 投与との流産発生の差異の原因となっている可能性を示している。Th1/Th2 バランスの適切な制御が妊娠の成立、維持に重要であることはよく知られていて、流産、早産、妊娠高血圧症候群を含めた数々の妊娠異常において、Th1/Th2 バランスの異常の関与が指摘されてきた。本研究では、IL-4 の投与が AGC 誘導性の流産を抑制することを確認した。この結果は、IL-4 投与が AGC 刺激による iNKT 細胞活性により生じたサイトカイン環境のアンバランスによる胎児への有害作用を改善することを示唆している。IL-4 は代表的な Th2 サイトカインであり、抗原提示細胞の機能制御に深く関わっている。抗原提示細胞ではインターフェロンに反応して MHC や共刺激体分子の発現上昇が生じてその結果抗原提示能が増強するが、IL-4 はそうしたインターフェロンの作用を減弱することが知られている。妊娠中の Th2 優位な免疫環境は胎児由来抗原に対する母体免疫系の拒絶的な認識反応を抑制するために有用であり、AGC の投与は妊娠マウスにおける抗原提示細胞機能の抑制状態を解除して流産を誘発するのかもしれない。また、IL-4 投与は AGC により賦活化した抗原提示細胞の機能や IFN- γ などの Th1 サイトカインの効果を打ち消すことで AGC 投与後の流産を抑制している可能性がある。

さらに本研究では、OCH による iNKT 細胞の活性化は流産を生じることなく、Th2 優位なサイトカイン産生の誘導に寄与していることが示された。以上のことから、脱落膜内に集積する iNKT 細胞の機能が適切に調節されることは、妊娠維持に必要な Th1/Th2 サイトカインバランスの確立に寄与していることも推測される。

本研究ではマウスの妊娠において iNKT 細胞の活性化パターンが妊娠予後に影響することが示された。OCH 刺激による iNKT 細胞の活性化刺激は、AGC 刺激と比較して、相対的に妊娠維持にとって安全なサイトカイン環境を誘導することが明らかとなった。さらに、IL-4 の投与が AGC 誘発性流産を防止したことは、iNKT 細胞活性化に伴うサイトカイン環境の方向づけにおいて IL-4 が重要な働きを担うという新たな知見である。これらの本研究に得られた一連の結果から、iNKT 細胞は Th1 系 Th2 系の双方のサイトカイン産生能を有しており、その活性化状態によって Th1/Th2 バランス制御を調整する司令塔の役割を担っており、妊娠の維持と阻害のいずれの現象においても深く関与することが示唆された。