

博士論文

論文題目 共刺激分子 B7-H1 の母児免疫制御
における役割に関する研究

氏名 佐山 晴亮

目次

	Page
目次	1
略語表	2
序文	4
実験方法	10
結果	15
考察	19
謝辞	24
引用文献	25
図表	27

略語表

APC	antigen presenting cells
CT	cytotrophoblast
DMC	decidual mononuclear cells
dM ϕ	decidual macrophage
dNK	decidual natural killer
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	fluorescein isothiocyanate
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukin
mAb	monoclonal antibody
MHC	major histocompatibility complex
Mo	monocyte
M ϕ	macrophage
NK	natural killer
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline

PD-1	programmed death 1
PE	phycoerythrin
PIH	pregnancy induced hypertension
pMo	peripheral monocytes
pT	peripheral T cells
ST	syncytiotrophoblast
TCR	T cell receptor

序文

同種移植に際して宿主が免疫拒絶反応を起こす事象は免疫学において基本的な事実であるが、胎児は父系由来の抗原を発現する半同種移植片であるにもかかわらず母体免疫系からの拒絶を受けることなく妊娠が進行する。胎児・胎盤が、母体にとって父系遺伝要素を有する半同種移植片という性質を持ちながら、母体からの免疫学的拒絶を生じることなく発育を継続できるというパラドックスは生殖免疫において常に注目されるテーマである。これを可能にしているのが免疫寛容であり、母体免疫担当細胞は胎児由来細胞との直接的接触あるいは液性因子を介しての間接的作用の結果、調和的な反応を示し、免疫寛容の状態を維持して胎児・胎盤の成長が進行する。胎盤は母体—胎児をつなぐ境界面であるが、その局所において母体側の脱落膜細胞は胎児側の細胞である絨毛細胞と直接接触しており、母体胎盤内での免疫現象を解明するにあたり脱落膜細胞と絨毛細胞は最も重要な存在である。

腔を介して外界と通じている子宮は常に種々の外来抗原に曝露される危険性があるため、胎児への免疫寛容を獲得すると同時に正常な免疫応答も必要とされる。このように、妊娠は免疫寛容と免疫応答という一見すると二律背反とも

取れる事象を同時に成立させながら精緻な免疫バランスの上に成り立っているが、この維持機構には未解明な点が多いのが現状である。

胎盤は、幹である臍帯と、樹状に発達した枝である絨毛からなる。絨毛は付着絨毛と自由絨毛の2種類に大別され、前者は子宮壁に接着し、胎盤と子宮壁の結合を担うのに対して、後者は胎盤と子宮壁の間(絨毛間腔)にプールされた母体血中に浮遊し、母体-胎児間のガス・物質交換の場となっている(図 1a,b,c)。すべての自由絨毛の表面は合胞体性栄養膜細胞(syncytiotrophoblast, ST)という特殊に分化した絨毛細胞に被覆されており、STが絨毛間質の血管内を流れる胎児血液と、子宮壁から絨毛間腔に流入、流出して循環する母体血とが互いに混ざり合うことを避ける解剖学的バリアとなっている。STを裏打ちするように絨毛内に存在する単核の細胞性栄養膜細胞 cytotrophoblast は ST の前駆細胞であり、増殖融合し ST へと分化すると考えられている。付着絨毛の先端からは子宮壁表層の脱落膜内に浸潤する絨毛細胞が存在し、絨毛外細胞性栄養膜細胞 extra-villous cytotrophoblast と呼ばれている。

母児免疫の母体面の最前線に位置するのが絨毛と近接する子宮内膜である。排卵後、子宮内膜はエストロゲン・プロゲステロンの影響により脱落膜化と呼ばれる構造的機能的な変化を生じ、受精卵の着床およびその後の胎盤発育にとって有利な環境が形成される。脱落膜内には、内膜構造自体を構成する腺上皮

細胞、間質繊維芽細胞、血管内皮細胞などに加えて豊富な免疫担当細胞が存在する。その構成比率を見ると妊娠初期では約 70%が CD56^{bright} の decidual Natural Killer (dNK) 細胞であり、10-15%程度が T 細胞、15-20%が CD14+HLA-DR+のマクロファージ(M ϕ)となっている。妊娠後期では dNK 細胞と T 細胞の比率が逆転し、M ϕ の比率には変化が見られない。B 細胞や成熟樹状細胞は 1%以下と極めて少数である(1)。NK 細胞はその細胞表面上に CD56 を発現しているが、その発現の強度によって CD56^{bright} と CD56^{dim} に分類され、機能面からもこの二つの表現型は異なる(2)。CD56^{dim} NK 細胞は細胞障害活性が強いのに対し、CD56^{bright} NK 細胞は細胞障害活性が弱い反面、種々のサイトカイン、血管新生因子を豊富に産生するという特性を持つ(3)。末梢血では NK 細胞の約 9 割が CD56^{dim} なのに対して、妊娠初期の脱落膜においてはそのほとんどが CD56^{bright} であり、妊娠初期の脱落膜においては NK 細胞の細胞障害活性が抑制され、胎盤形成に有利に働くように機能分化していると言える。

脱落膜内の T 細胞については CD8+サブセットが CD4+サブセットに対して優勢であること、メモリー/エフェクター T 細胞の比率が高いことが明らかとなっている(4)。また、共刺激分子や活性マーカーの発現が末梢血と比較して明らかに強い。こうした知見から、脱落膜 T 細胞は休眠しているのではなく、胎児と

いう半同種移植片の存在に対して反応して妊娠に対する合目的な機能的変化や分化誘導が生じていることが考えられている。

M ϕ は末梢血を循環する単球が様々なメディエーターによって組織に誘導され、組織特異的に様々な機能を有するが、脱着膜においてM ϕ は数的にNK細胞に継ぐ第2の免疫担当細胞のサブセットであり、妊娠に有利に働くような表現型のM ϕ に分化していると推測される。脱着膜において、M ϕ は妊娠を通じて様々な働きを有している抗原提示細胞であるが、プロスタグランジンE2やIL-10などの抗炎症性サイトカインを分泌するので、全体としては免疫を抑制する方向に誘導すると考えられている(5)。しかし、母児免疫におけるM ϕ の免疫寛容の機序については未解明な点が多い。

絨毛細胞の父側の抗原に対して母体側の免疫応答のサイトカイン、ケモカインによってM ϕ の機能分化が生じ、抗原提示細胞としての機能によりT細胞との相互作用が行われる。同種移植片の拒絶の場合に生じる、抗原特異的なT細胞の活性が母児間の免疫応答においていかに制御されているかが健全な妊娠の維持において鍵となる。T細胞と抗原提示細胞(APC)の相互作用は、まずM ϕ などのAPCがこれを貪食し、T細胞に提示して様々な免疫応答が起こる。この際、MHC class II上に抗原が提示され、T細胞がこれを認識する(first signal)が、同時に共刺激分子が抗原提示細胞とT細胞上に発現して、T細胞への刺激を修

飾する(second signal : 共刺激)。この共刺激分子には様々な組み合わせがあり、T細胞の最終的な挙動はこの second signal により規定される(6) (図 2)。Mφ と T細胞の共刺激分子の組合せは様々なものがこれまで報告されており(図 3)、その組み合わせによって、T細胞を活性化させるものと抑制させるものとに分かれる。共刺激分子の ligand で最も代表的な B7 family を例にとると、最初に発見された B7.1 と B7.2 は共通の受容体である CD28 と CTLA-4 に結合するが、CD28 が刺激型のシグナルを出すのに対して CTLA-4 は抑制型のシグナルを伝達する(7, 8)。

CD28 に代表されるように一部の共刺激受容体は恒常的に T細胞上に発現しているが、多くの共刺激受容体は細胞活性に応じた発現誘導を生じる(9)。例えば、ICOS と PD-1 は naïve T細胞には発現しておらず、抗原認識によって活性化された T細胞上にのみ発現する(10)。脱落膜 T細胞においては ICOS と PD-1 が恒常的に発現しており、この事実は脱落膜 T細胞が常に抗原に曝露されており、活性化状態にあることを示唆している(4)。この仮説を支持するように、脱落膜において、naïve CD8⁺細胞は減少、CD8⁺メモリー細胞は増加しており(11)、B7-H1:PD-1 結合が脱落膜における有害な T細胞の細胞障害活性を抑制している可能性があり、実際にマウスモデルにおいて、B7-H1 を阻害することによって同種同系の妊娠の維持はできたが、同種異系の妊娠はすべて流産となった(12)

ことから B7-H1 と PD-1 の相互作用の妊娠における重要性が注目されている。

B7 family の一部が dM ϕ 上に発現しているとの限られた報告はあるが、脱落膜 M ϕ の発現する B7 リガンドの意義は不明である。そこで、本研究は dM ϕ と T 細胞との相互作用において、B7 family が担う生理的役割を明らかとすることを目的とした。

方法

本研究は東京大学医学部研究倫理委員会より承認を受けている。(承認課題名：脱落膜リンパ球と絨毛細胞が、胎盤血管系発達に果たす生理学的、病理学的役割に関する研究 承認番号：3129)

1. ヒト脱落膜からの M ϕ とリンパ球の抽出

文書によるインフォームドコンセントを取得した上で、妊娠初期の検体は妊娠 7 週から 11 週の人工妊娠中絶患者から、妊娠後期の検体は合併症のない選択的帝王切開症例から、それぞれ脱落膜組織を採取して実験に使用した。妊娠初期の検体に関しては、脱落膜を PBS で洗浄して血液と絨毛を可及的に除去し、妊娠後期の検体に関しては、卵膜から脱落膜を剥離することで脱落膜だけを得た。

脱落膜を細切し、コラゲナーゼ 1mg/ml と DNase300U/ml を 50ml の RPMI1640 に添加した細胞分離 buffer に入れ、37°C で 20 分間反応させた。反応液を 40 μ m のメッシュに通した後に 300gx10 分で遠心し、細胞ペレットを得た。このペレットを PBS に溶解し、PBS を溶媒とした 35% Percoll の上に重層し、Ficoll を Percoll の下に重層させて 3 層にした後に 500gx40 分で遠心した。一番下の層と中央の層の間に形成された細胞層を抽出し、脱落膜の単核細胞 (DMC) を

得た。この DMC から CD14 で標識された磁気ビーズ(MACS, Miltenyi Biotec)を用いて CD14 陽性細胞を単離し、dMφを得た。また、同様に磁気ビーズ(pan T cell collection kit, MACS, Miltenyi Biotec)を用いることによって DMC から T 細胞を単離して脱落膜の T 細胞(dT)を得た。

2. 末梢血からの単球 (Mo) とリンパ球の抽出

末梢血は人工妊娠中絶もしくは帝王切開術に先だって術前検査採血時に採取した。EDTA を含んだスピッツに血液を採取し、PBS で 2 倍に希釈した後、Ficoll 2ml の上にこの血液希釈液を 4ml 重層し、400gx10 分で遠心して Ficoll の上にできた細胞層を注意深く抽出して PBS で洗浄した。このようにして得られた PBMC から 1. と同様にして CD14 による磁気ビーズ法で Mo を、pan T cell collection kit を用いて T 細胞を分離した。

3. モノクローナル抗体

Purified mouse anti-human CD3 モノクローナル抗体 (mAb)(OKT-3)、FITC 標識 mouse anti-human CD14 mAb、PE 標識 mouse anti-human B7-H1(MIH1)、B7-DC(MI-H12)、B7.1(2D10)、B7.2(IT2.2)、PD-1(CD279)mAb、および APC 標識 mouse anti-human HLA-DR(L243) mAb は Biolegend(San

Diego,CA)から購入した。FITC 標識 anti-human CD8 抗体は e-Bioscience から購入した。

4. フローサイトメトリー法

細胞表面上の分子の発現をフローサイトメトリー法で確認した。培養した接着細胞はセルスクレイパーで培養プレートから剥離して、PBS で 2 回洗浄した後に Fc γ 受容体との非特異的な結合を阻害するためにヒト血清に懸濁して 4°C で 5 分間反応させた。目的分子に対する蛍光標識されたモノクローナル抗体と 4°C で 30 分間反応させて PBS で 3 回洗浄し、1%パラホルムアルデヒド添加 PBS に懸濁して FACS calibur flow cytometry system(BD Bioscience)を用いて分析した。それぞれの抗体に対応した isotype control を用いて、分析を行った。

5. M ϕ と T 細胞の共培養と抗体による阻害

PBMC を生来健康な第 3 者の末梢血から分離した後に、磁気ビーズを用いて末梢血の T 細胞(pT)を分離した。dM ϕ と pMo を 10%FBS 入りの RPMI1640 (培養液) に懸濁し、96 well のプレートに 4×10^4 cells/well の密度で培養した。dM ϕ および pMo を抗 B7-H1 抗体(5pg/ml)もしくはマウス IgG(5pg/ml : 陰性コントロール)と 3 時間反応させた。3 時間で dM ϕ および pMo はプレートに接着す

るので、上清を破棄して接着細胞を培養液で洗浄した後に分離されたばかりの第3者からの pT(2×10^5 cells/well)と共培養した。実際の生体内では抗原を認識しうる TCR を有した T 細胞が抗原を認識してリンパ節にホーミングして増殖するが、in vivo では同様の反応を得ることはできない。そこで、抗原抗体反応を十分に起こすことを目的として、抗 CD3 抗体である OKT-3(200ng/ml)をこの共培養系に加えて 72 時間共培養した後に、サイトカイン測定用に上清を回収した。

(図 4)

6. ELISA 法によるサイトカイン測定

上清中の IFN- γ の濃度を ELISA(ELISA MAX, Biolegend)を使用して測定した。基準曲線はスタンダードサンプルを使用して吸光度計による 450nm 波長の測定値を用いて作成した。それぞれのサンプルを測定してこの基準曲線を用いて濃度を算出した。

7. 統計解析

本研究における細胞表面上の PD-1 の発現や IFN- γ の濃度分布は non-parametric である。Non-parametric な二つの群を比較する統計分析法としては Wilcoxon signed-rank testing と Mann-Whitney U-test があるが、前者

が対応ある 2 群間で用いられるのに対して、後者は対応のない 2 群間で用いられる。よって、本研究では対応ある 2 群間を比較する統計分析法として Wilcoxon signed-rank testing を用い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

結果

1. CD14 による磁気ビーズでの dM ϕ および pMo 分離の純度

dM ϕ と pMo を磁気ビーズで分離した際の純度をフローサイトメトリー法で測定した。脱落膜から得られた DMC と末梢血から得られた PBMC を抗 CD14 磁気ビーズと反応させ、各々から CD14 陽性の細胞を分離した。M ϕ および Mo は CD14 陽性かつ HLA-DR 陽性である。分離できた dM ϕ と pMo を CD14 および HLA-DR で染色してフローサイトメトリーで測定したところ、妊娠初期、妊娠後期の dM ϕ の純度は常に 93% 以上であり、末梢血の pMo の純度は 95% 以上を維持できた (図 5)。

2. dM ϕ 上の B7 family の発現様式

分離した dM ϕ および pMo 上の B7 family の発現をフローサイトメトリー法で測定したところ、①妊娠初期の dM ϕ 上には B7-H1 および B7.2 は発現していたが、B7.1 や B7-H2 や B7-DC は発現していなかった。②pMo 上には高濃度の B7.2 が発現していたが、B7.1 や B7-H1 や B7-H2 や B7-DC は発現していなかった。妊娠期間を通じて B7 family の発現に変化があるかを検討するために妊娠後期の dM ϕ および pMo 上の発現を検証したところ、①妊娠後期の dM ϕ に

は B7.1 および B7.2 は発現していたが、B7-H1 や B7-H2 や B7-DC は発現していなかった。②妊娠後期と妊娠初期の pMo では B7 family の発現には違いを認めなかった。このように、妊娠初期には dMφ 上に発現している B7-H1 が後期には発現しなくなっているという特徴が示された(図 6)。

3. 脱落膜 T 細胞上での PD-1 発現の確認

妊娠初期の dMφ に限定的に発現している B7-H1 に対する受容体である PD-1 が妊娠初期の脱落膜 T 細胞(dT)にも発現しているかどうかをフローサイトメトリ法で検証した。妊娠初期の dT 中の $65.7 \pm 8.7\%$ (mean \pm S.E., n=5)で PD-1 の発現を認めたが、同じ妊娠女性からの検体での pT では $12.5 \pm 4.0\%$ (mean \pm S.E., n=5)でしか PD-1 は陽性にならなかった(図 7)。妊娠後期の T 細胞の検体でも同様に、末梢血と比較すると脱落膜で PD-1 の発現が強く見られた(図 8)。また、T 細胞中の CD4⁺、CD8⁺の T 細胞のどちらに PD-1 が強く発現しているかも検証したが、両群に PD-1 の発現強度の差は認めなかった (図 9)。

4. IFN-γ 刺激による dMφ および pMo 上の B7-H1 発現の誘導

IFN-γ が dMφ や pMo 上の B7-H1 の発現に影響するかを検証した。初期の dMφ もしくは pMo を IFN-γ (100ng/ml)を添加した群としてない群で分け、48 時

間培養した後にフローサイトメトリー法で B7-H1 の発現を測定した。その結果、IFN- γ を添加した dM ϕ では B7-H1 の発現が増強されることが示され、元々 B7-H1 の発現を認めない pMo では B7-H1 の発現が誘導されることが示された (図 10)。

5. B7-H1 : PD-1 結合による T 細胞から IFN- γ 産生への影響

これまでの結果から、妊娠初期の脱落膜内で M ϕ と T 細胞が B7-H1 と PD-1 を介して反応している可能性が示された。そこで、同種の共培養系を準備して、B7-H1 : PD-1 結合による T 細胞からのサイトカイン分泌の変化を検証することとした。生来健康な第 3 者からの末梢血から得られた PBMC から磁気ビーズ法を用いて T 細胞を分離して、抗 CD-3 抗体 (OKT-3) で刺激した後に、同一の妊婦から得られた妊娠初期の dM ϕ もしくは pMo と共培養を行った。本来、生理的な妊娠状態においては、脱落膜の T 細胞が胎児抗原を認識して TCR-CD3 複合体を形成するが、その代用として T 細胞を刺激するのに OKT-3 を利用した。この OKT-3 による刺激で T 細胞上の PD-1 の発現が増強すること確認した (図 11)。

様々な共培養の条件の元で、T 細胞から分泌される IFN- γ の濃度を ELISA 法を用いて測定した。まず、OKT-3 刺激後の T 細胞のみで培養したところ、IFN-

γ 濃度は非常に低値であり、co-stimulation を欠いた first signal のみでは十分に T 細胞が活性化されないという従来から知られている知見に合致する結果であった。ところが、dM ϕ や pMo と T 細胞を共培養すると IFN- γ の産生が増加したが、IFN- γ の値は dM ϕ と共培養した群の方が有意に低値であった(図 12)。

この IFN- γ 産生抑制と B7-H1:PD-1 結合との関連を調べるために、B7-H1 と PD-1 との結合を阻害する抗 B7-H1 抗体を共培養する前の dM ϕ と pMo と反応させてから T 細胞との共培養を行った。共培養後の上清中の IFN- γ 濃度を ELISA で測定したところ、抗 B7-H1 抗体を使用した dM ϕ 群では非使用群と比較して、著明に IFN- γ の濃度が上昇していたのに対して、抗 B7-H1 抗体を使用した pMo 群では非使用群と比較して IFN- γ の濃度の上昇は顕著ではなかった(図 13a,b)。

考察

本研究は、dM ϕ において発現する B7 ファミリーの種類を明らかとした。中でも抑制性の共刺激分子である B7-H1 が妊娠初期の dM ϕ に限定的に発現していることは注目すべき点である。さらにその B7-H1 が脱落膜内で PD-1 を介して T 細胞と結合し、抑制性共刺激が伝達されることで脱落膜内での過剰な IFN- γ の増加を阻止している可能性を共培養実験において示した。脱落膜において、M ϕ は妊娠を通じて多彩な働きを有しているが、生理的状況下では免疫抑制的な特性を有するという報告が主である。本研究で得られた知見は、dM ϕ の抑制性の働きを共刺激分子という新たな観点からそうした過去の報告を支持する結果であった。

本研究における共培養実験においては IFN- γ の変動のみで炎症を評価しているが、実際は TNF-a、IL-2、IL-10 などほかのサイトカインの分泌にも影響を及ぼしていると推測される。実際、B7-H1 を発現している脱落膜間質細胞を T 細胞と共培養した実験においては IFN- γ 、TNF-a、IL-2、IL-10 の変動を評価しており、B7-H1 を阻害するとこれらサイトカインの分泌が促進されたが、中でも IFN- γ の増加が最も顕著であった(13)。IFN- γ の妊娠初期における重要性と

最も変動を評価しやすいであろうと推測し、本研究では IFN- γ の変動を集中的に調べた。

また、共培養実験において OKT-3 を使用して T 細胞を活性化しているのは実際の生体内での T 細胞の活性化とは異なる。本研究では Allogeneic な末梢血からの T 細胞を使用しているため dM ϕ や pMo との抗原抗体反応は起こるが、実際の生体内での反応と異なり、抗原を認識しうる TCR を有した T 細胞はリンパ節にホーミングして増殖することができない。よって、抗原を認識しうる T 細胞の数が限られているので、抗 CD3 抗体を使用しないと T 細胞の活性化がとても弱くなり刺激実験として機能しない。本研究では、他の多くの共培養実験で行われているように、抗原抗体反応の強度を実際の生体内のものに近づけるために抗 CD3 抗体である OKT-3 を使用して共培養実験を行った。

一般に、B7-H1 との結合によって PD-1 は phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway を活性化して T 細胞の活動性を抑制し、末梢での免疫寛容やがん浸潤で活躍している(14)。本研究によって妊娠の初期と後期で B7 family の発現に違いがあり、妊娠初期の dM ϕ にのみ B7-H1 が発現しているということが示された。これは、母体の免疫担当細胞が最初に胎児抗原と対峙する際に免疫寛容を獲得するうえで B7-H1 が重要な働きをしている可能性を示唆している。ひいて

は、この B7-H1 を介した母児免疫応答の異常が不育症や PIH などの妊娠初期に発生する病理に関係している可能性も考えられる。

組織の M ϕ の主要な起源は末梢を循環している pMo であるが、Mo の組織への動員と様々な表現型の M ϕ への分化はその組織でのケモカインやサイトカインによって制御されている(15)。本研究で、妊娠初期の pMo では B7-H1 の発現を認めなかったが、dM ϕ には B7-H1 の発現を認め、IFN- γ 刺激によって pMo 上に B7-H1 が誘導されることも示した。過去の報告より IFN- γ 刺激によって、interferon regulatory factor-1 (IRF-1)が B7-H1 の promoter 領域に結合して B7-H1 の発現が上昇することが知られており(16)、また妊娠初期の脱落膜 NK 細胞は豊富な IFN- γ 産生を行っている。こうした内容を踏まえると pMo が脱落膜に遊走し、脱落膜局所の IFN- γ 刺激に反応することで B7-H1 陽性の表現型を持つ dM ϕ に分化していくことが推定される。可能性としては、脱落膜には間質細胞が豊富に存在するので、pMo が脱落膜に遊走してきて間質細胞と相互作用を起こすことによって dM ϕ に分化していき、機能分化していく可能性もある。

マウスの骨髄移植モデルによって子宮の NK 細胞から分泌される IFN- γ は脱落膜の血管の再編に不可欠であることが示されている(17)。それに対して、着床の場面で過剰な濃度の IFN- γ は Th1/Th2 バランスに代表されるような局所の

繊細なサイトカインバランスを乱すきっかけとなり、流産の原因となる(18)。つまり、IFN- γ は多機能であり害益の両面的作用があり、濃度が適正なレベルに保たれていることが妊娠維持に必要である。本研究の共培養系実験の結果は、B7-H1:PD-1 結合が活性化された T 細胞からの IFN- γ 分泌を適正值に維持する機構として働いていることを示唆している。IFN- γ 刺激によって dM ϕ 上の B7-H1 の発現が上昇することから、過剰な IFN- γ 環境において dM ϕ は B7-H1 の発現上昇を行い T 細胞上の PD-1 とのシグナル応答を増強させることで T 細胞の活性を抑制し、結果として IFN- γ 濃度を制御するという negative feedback システムの存在が推定された(図 14)。

またさらにはこの B7-H1 : PD-1 シグナル応答の異常は IFN- γ の過剰産生につながり、初期流産などの妊娠異常の背景因子となる可能性がある。実際、妊娠初期の dM ϕ における B7-H1 の発現は個体差が大きく、発現が乏しい個体も認められた。人工妊娠中絶の症例から検体を集めているので、それら B7-H1 の発現が乏しい個体の周産期予後について追跡することができないが、同様に個体差が大きい流産の発生に関連している可能性も考えられる。例えば、前回の分娩において早産や切迫早産であった症例における妊娠初期、あるいは中期の脱落膜の細胞を採取できれば B7-H1 の発現と流産との関連性が指摘できる可能性がある。また、PIH においてはその病態生理は解明されつつあるが、抗炎症と

という観点からみると、**B7-H1:PD-1** シグナル応答が乏しいと激しい炎症が惹起され、より重篤な **PIH** になりやすいのではないかと推測できる。そして、**B7-H1** を誘導することで抗炎症作用を惹起し、**PIH** による炎症を緩和する緩衝材としての役割を持たせることも可能ではないかと考えられる。

今後はこうした流早産や **PIH** などの病的妊娠における **B7-H1:PD-1** シグナル応答の状態についての解析も進めていくことで疾患病理の解明や治療につながると考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、検体の採取にご協力頂いた各関連病院の先生方と手厚くご指導いただいた東京大学医学産婦人科学教室の藤井知行教授、山下隆博准教授、川名敬准教授、そして直接の指導教官である永松健助教に深い感謝の意を表します。

文献

References

1. Nagamatsu T, Schust DJ. Review: The Immunomodulatory Roles of Macrophages at the Maternal—Fetal Interface. *Reproductive Sciences*. 2010;17(3):209-18.
2. Dambaeva SV, Durning M, Rozner AE, Golos TG. Immunophenotype and Cytokine Profiles of Rhesus Monkey CD56bright and CD56dim Decidual Natural Killer Cells. *Biology of Reproduction*. 2012;86(1):1-10.
3. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood*. 2001;97(10):3146-51.
4. Nagamatsu T, Barrier BF, Schust DJ. The regulation of T-cell cytokine production by ICOS-B7H2 interactions at the human fetomaternal interface. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(3):417-25.
5. Heikkinen J, Möttönen M, Komi J, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clinical & Experimental Immunology*. 2003;131(3):498-505.
6. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol*. 1989;7(1):445-80.
7. Freeman GJ, Gray GS, Gimmi CD, Lombard DB, Zhou LJ, White M, et al. Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *The Journal of Experimental Medicine*. 1991;174(3):625-31.
8. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Jr., Lombard LA, et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*. 1993;262(5135):909-11.
9. Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, et al. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity*. 2000;13(1):95-105.
10. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999;397(6716):263-6.

11. Tilburgs T, Schonkeren D, Eikmans M, Nagtzaam N, Datema G, Swings G, et al. Human decidual tissue contains differentiated CD8⁺ effector-memory T cells with unique properties. *J Immunol.* 2010;185(7):4470-7.
12. Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, Habicht A, Azuma M, Yagita H, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *The Journal of Experimental Medicine.* 2005;202(2):231-7.
13. Nagamatsu T, Schust DJ, Sugimoto J, Barrier BF. Human decidual stromal cells suppress cytokine secretion by allogenic CD4⁺ T cells via PD-1 ligand interactions. *Human Reproduction.* 2009;24(12):3160-71.
14. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9543-53.
15. Nagamatsu T, Schust DJ. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 2010;17(3):209-18.
16. Seung-Jin L, Byeong-Churl J, Soo-Woong L, Young-Il Y, Seong-Il S, Yeong-Min P, et al. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS letters.* 2006;580(3):755-62.
17. Ashkar AA, Di Santo, James P, Croy BA. Interferon-gamma contributes to initiation of rterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.* 2000;192(2):259-70.
18. Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. Th1/Th2 paradigm in pregnancy: Paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: Reexamining the Th1/Th2 paradigm. *International Archives of Allergy and Immunology.* 2004;134(2):93-119.

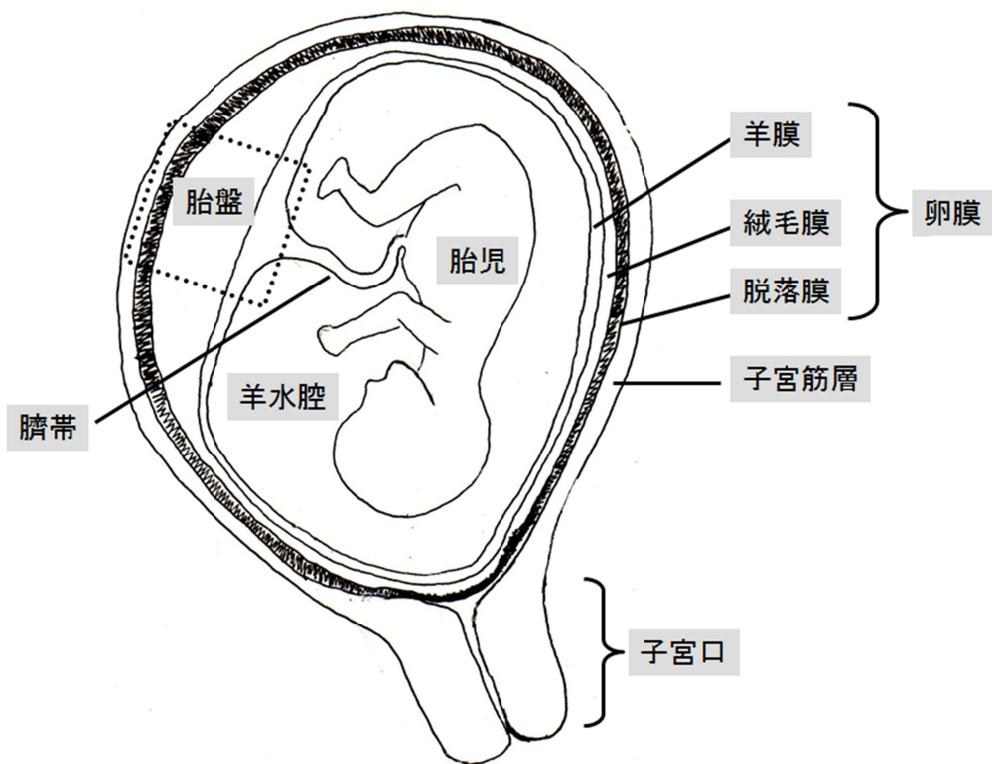


図 1a 胎盤完成後の子宮、胎児、胎盤、卵膜の構造

図1b 成熟胎盤の構造

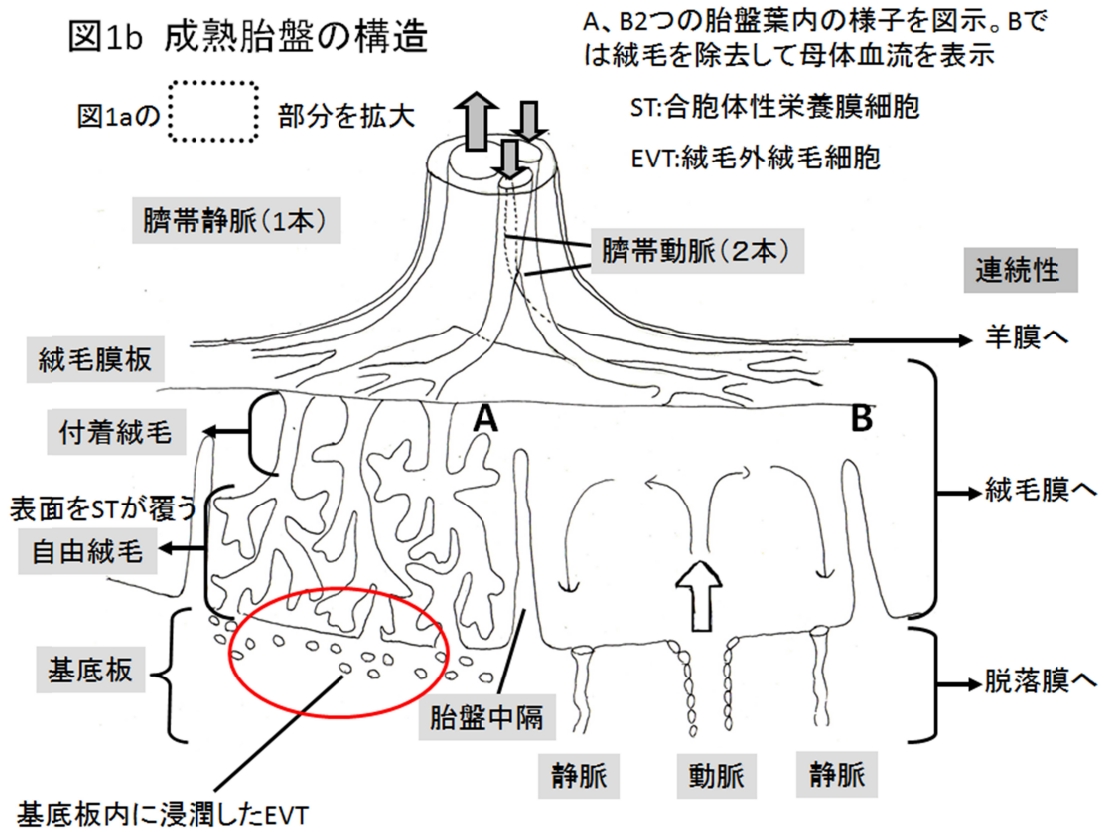


図1b 図1aの点線部分を拡大表示したもの。

A、B2つの胎盤葉内の様子を図示し、Bでは絨毛を除去して母体血流を表示してある。

脱落膜における免疫反応

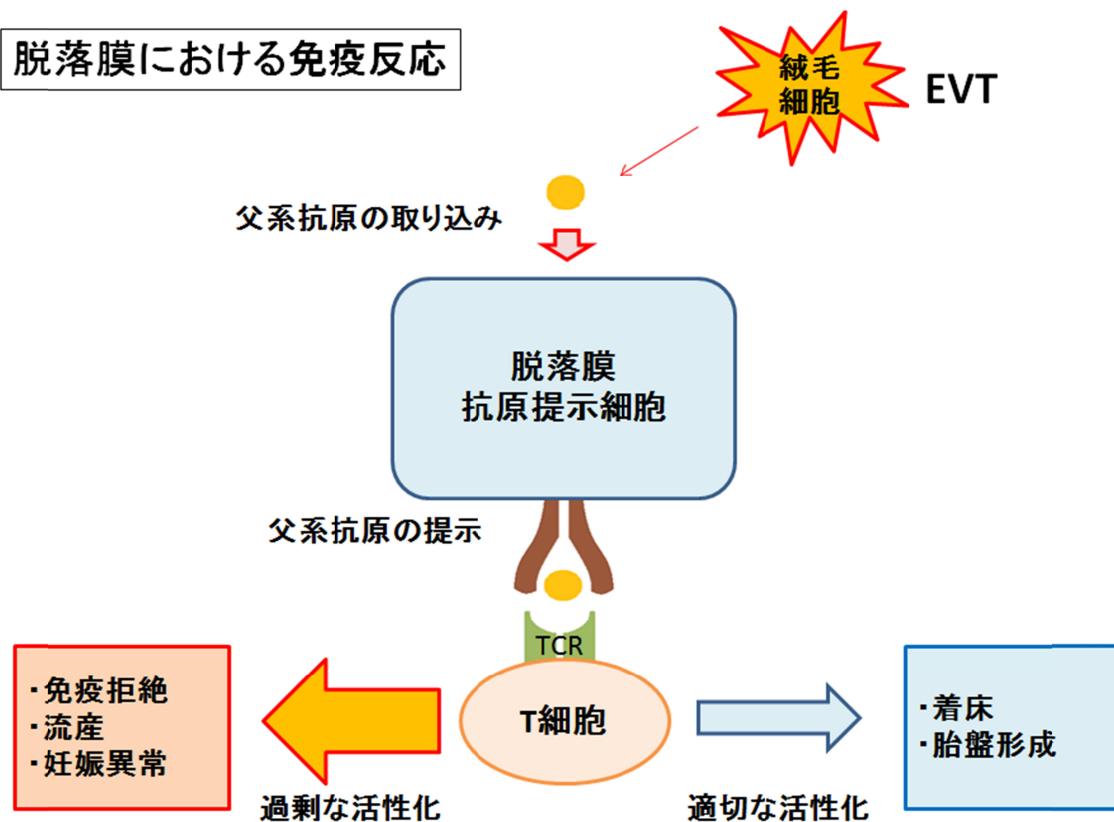


図 1c 脱落膜（図 1b の赤丸部分）における免疫反応

脱落膜において、抗原提示細胞が父系抗原を取り込み、抗原提示を行うと脱落膜における T 細胞が活性化されるが、正常な着床や胎盤形成には適切な活性化が不可欠であり、過剰な活性化は免疫拒絶や流産や妊娠異常につながる。

共刺激の機序～T細胞～

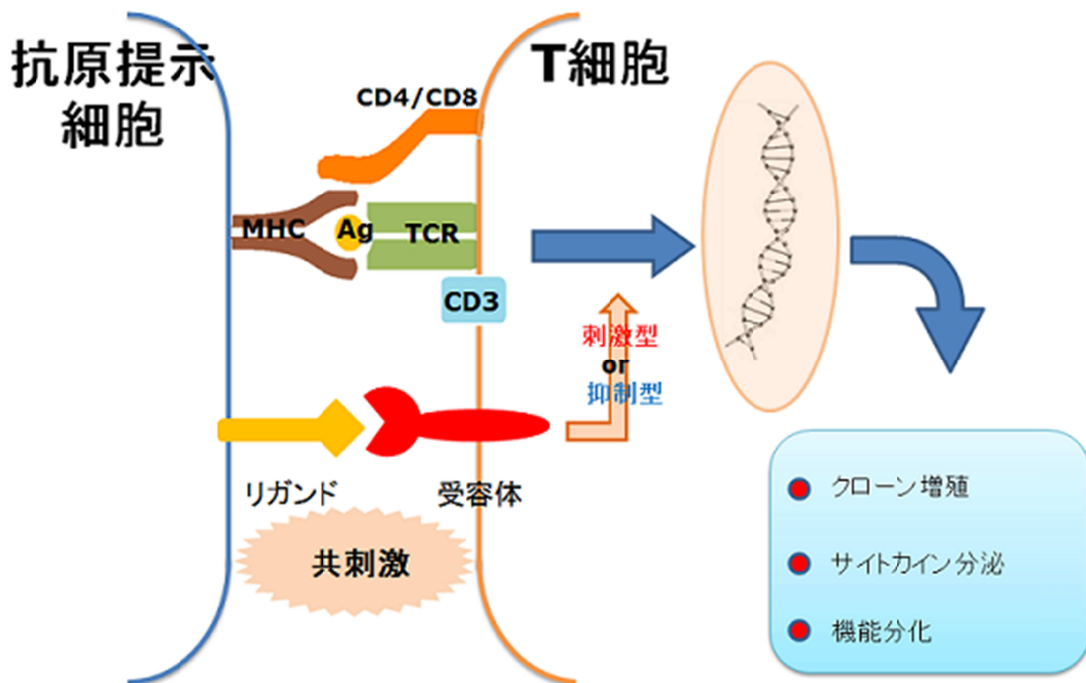


図2 共刺激の機序

Mφなどの抗原提示細胞に提示された抗原をT細胞受容体を介してT細胞が認識すると、これを共刺激分子が修飾する形で最終的なT細胞の挙動が決定される。この二つ目のシグナルは刺激型と抑制型の二通りあり、その共刺激分子のリガンドと受容体の組み合わせによってその修飾パターンは決定する。

リガンド	刺激型受容体	抑制型受容体	T細胞への作用
B7.1 (CD80)	CD28	CTLA-4	刺激(CD28) 抑制(CTLA-4)
B7.2 (CD86)	CD28	CTLA-4	刺激(CD28) 抑制(CTLA-4)
B7-H1 (PD-L1)	—	PD-1	抑制
B7-DC (PD-L2)	—	PD-1	抑制
B7-H2 (ICOSL)	ICOS	—	刺激
B7-H3	不明	不明	不明
B7-H4	—	不明	抑制
B7-H6	不明	NKp30	抑制・刺激？

図3 B7-family のリガンドと受容体の種類とその機能

dMφやpMoとT細胞との共培養実験

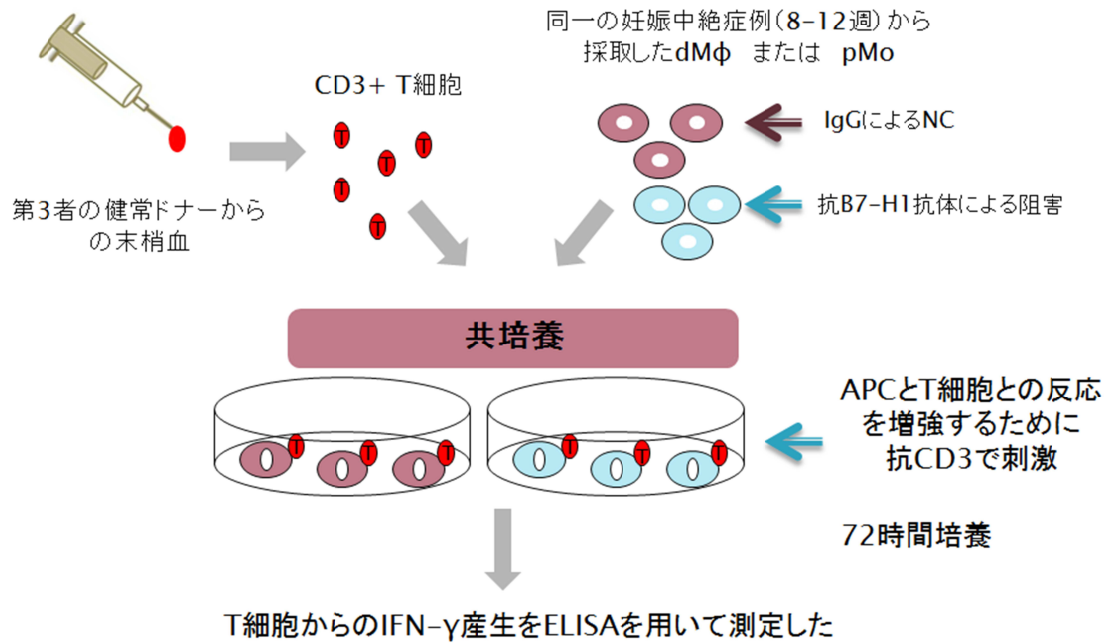


図4 dMφやpMoとT細胞の共培養実験

同一の妊娠中絶症例（8-12週）から採取したdMφとpMoを抗B7-H1抗体で阻害し、第三者の健常ドナーの末梢血から抽出したT細胞と共培養した。APCとT細胞との反応を増強するために抗CD3抗体で刺激しながら72時間培養し、T細胞からのIFN-γ産生をELISAを用いて測定するために上清を回収した。

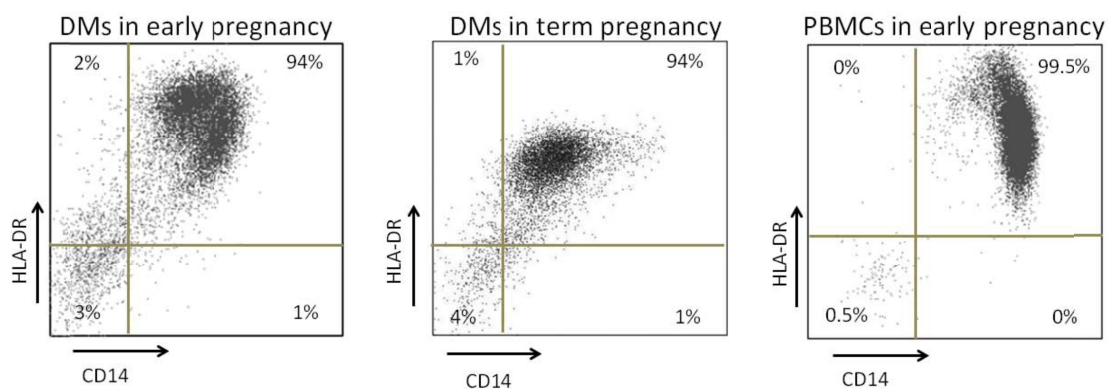


図5 CD14 磁気ビーズによる dMφ および pMo 分離の純度

DMC および PBMC から CD14 磁気ビーズで分離された dMφ と pMo の純度を測定するため、CD14 陽性かつ HLA-DR 陽性である **double positive** となる集団の割合をフローサイトメトリー法で検証すると、それぞれ 93%、95%以上の純度を維持できていることを確認できた。

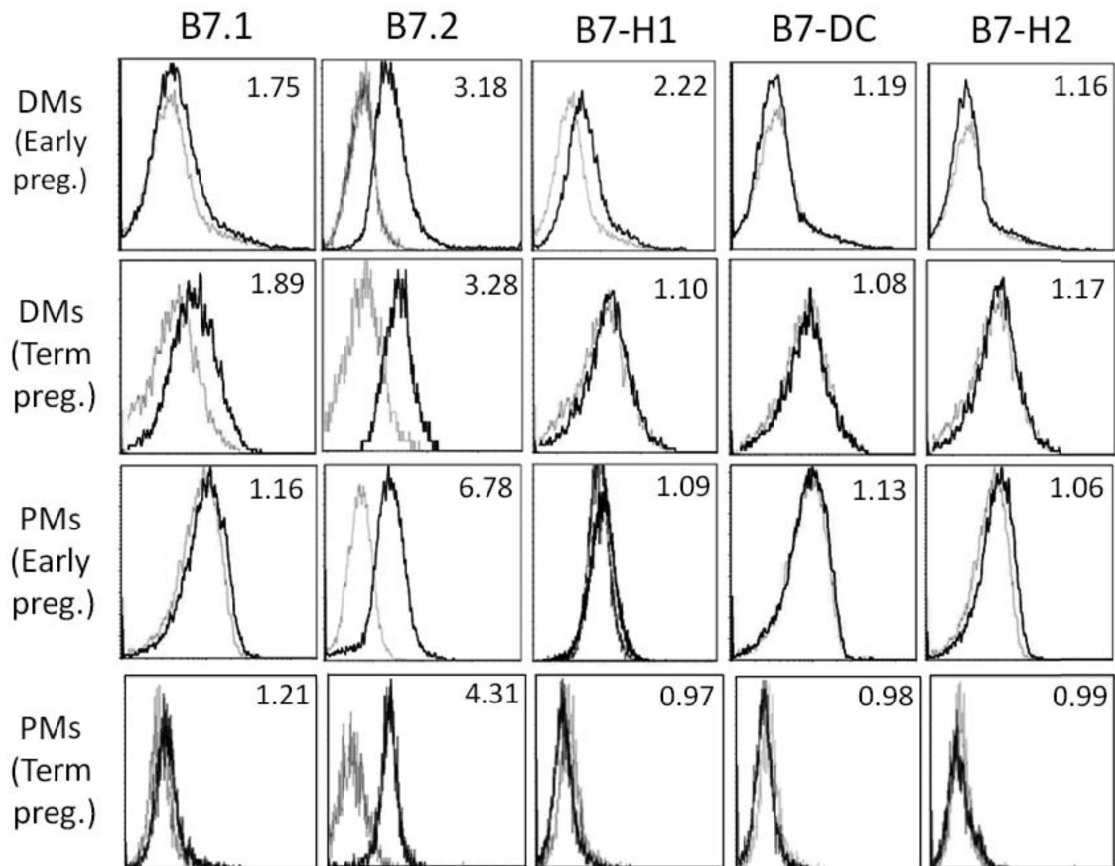


図6 妊娠中のdMφおよびpMoのB7-familyの発現様式

妊娠初期と後期の妊婦からの脱落膜および末梢血の検体を用いて、CD14による磁気ビーズで分離したdMφおよびpMo上のB7.1、B7.2、B7-H1、B7-H2、B7-DCの発現をフローサイトメトリー法で検証した。

それぞれのヒストグラムにおいて、薄い灰色の線がアイソタイプを示し、黒の線が各々のB7-familyの発現を示す。それぞれのデータは代表的なものを示し、それぞれの数値はアイソタイプと各々のB7-familyの発現をmean fluorescence intensityの比で表している。

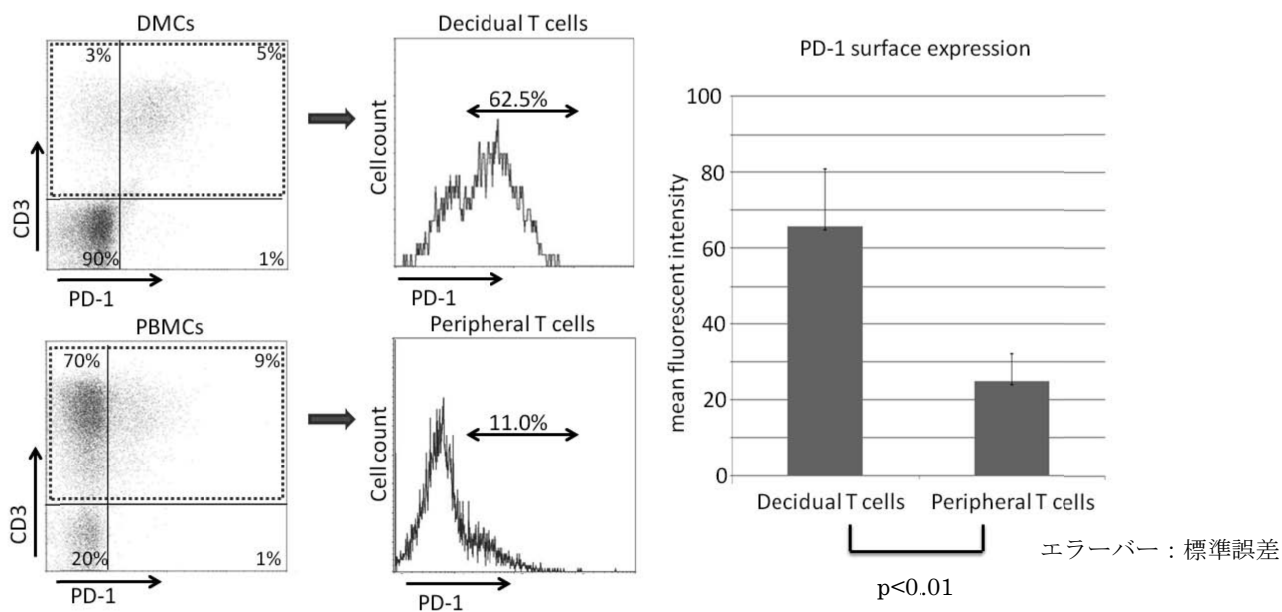


図 7 妊娠初期の脱落膜および末梢血 T 細胞における PD-1 の発現の割合
 妊娠初期の DMC および PBMC を T 細胞のマーカーである CD3 で標識し、CD3 陽性の集団の中から dT および pT 上の PD-1 の発現をフローサイトメトリー法で検証した。右側の棒グラフは CD-3 陽性細胞の中の PD-1 の発現を示しており、pT と比較すると dT において有意に PD-1 の発現が強いのが分かる。(N=5) エラーバー：標準誤差 SEM。(N=5)。統計：Wilcoxon signed-rank testing (左側のヒストグラムは代表的な例を示している)

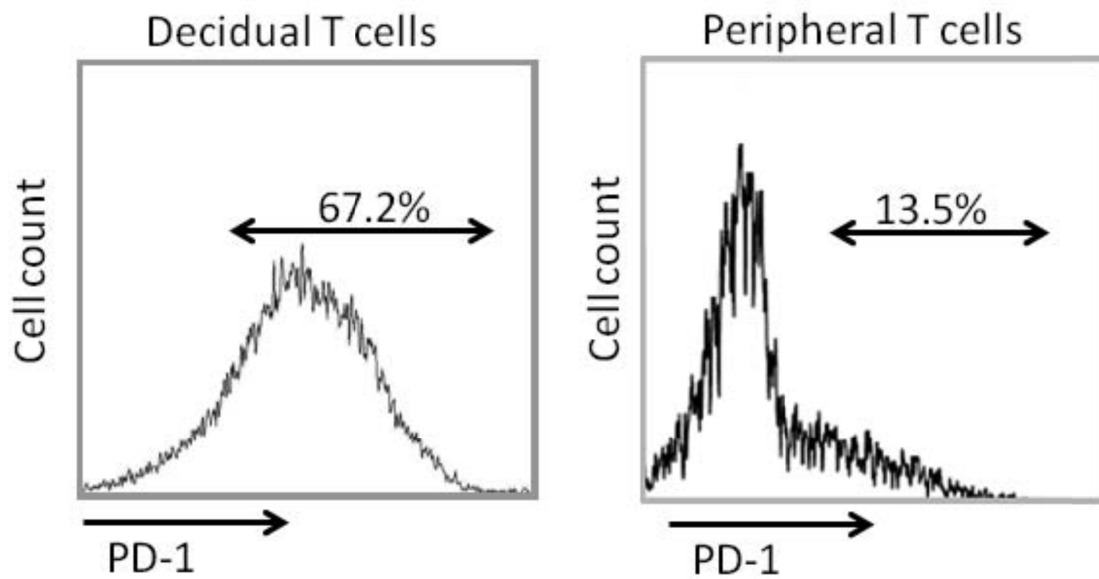


図 8 妊娠後期の脱落膜および末梢血 T 細胞での PD-1 の発現の違い
 妊娠後期の DMC および PBMC から磁気ビーズを用いて T 細胞を分離し、dT
 と pT 上の PD-1 の発現フローサイトメトリー法で検証した。ヒストグラム中の
 数値は T 細胞中の PD-1 陽性の割合を表している。

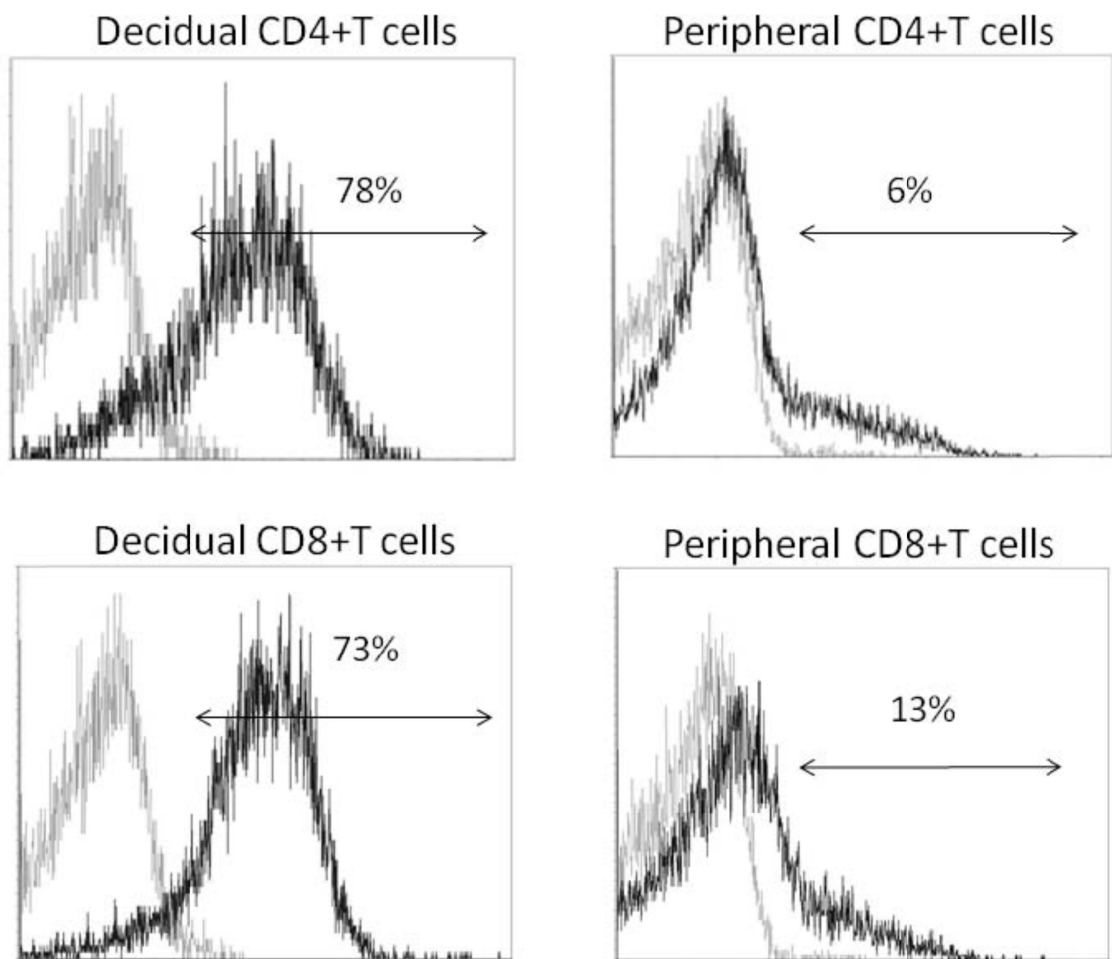


図9 CD4およびCD8陽性のT細胞におけるPD-1の発現様式
 脱落膜および末梢血から磁気ビーズで分離されたT細胞をCD-4、CD-8、PD-1
 で標識してフローサイトメトリーで測定したが、CD-4陽性、CD-8陽性の両群
 でのPD-1の発現強度の違いは認めなかった。
 図中の数値は各々のT細胞中のPD-1陽性の割合を示している。

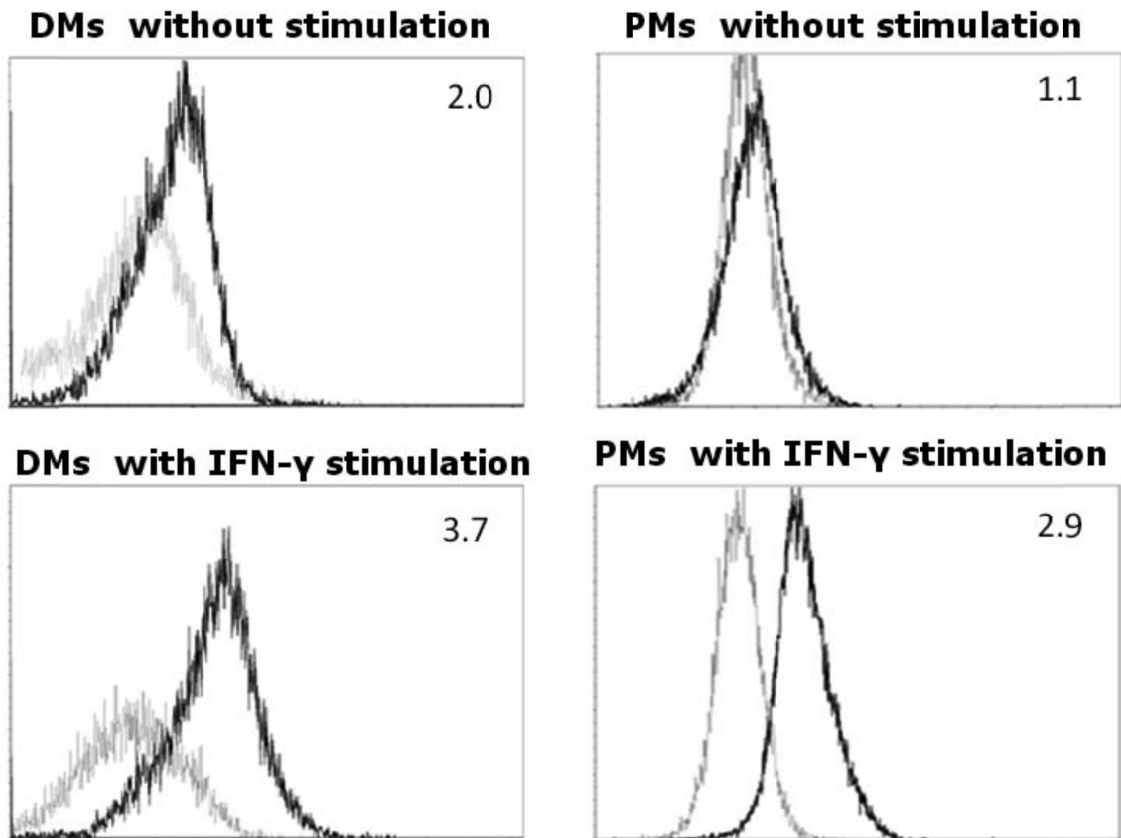


図10 IFN- γ 刺激による dM ϕ および pMo 上の B7-H1 の発現の変化
 同一妊婦からの分離した dM ϕ および pMo を IFN- γ (100 ng/ml) で 48 時間刺激し、B7-H1 の発現をフローサイトメトリー法で検証した。IFN- γ を添加した dM ϕ では B7-H1 の発現が増強されることが示され、元々 B7-H1 の発現を認めない pMo では B7-H1 の発現が誘導されることが示された。
 図中の数値は negative control との mean fluorescence intensity の比を表している。

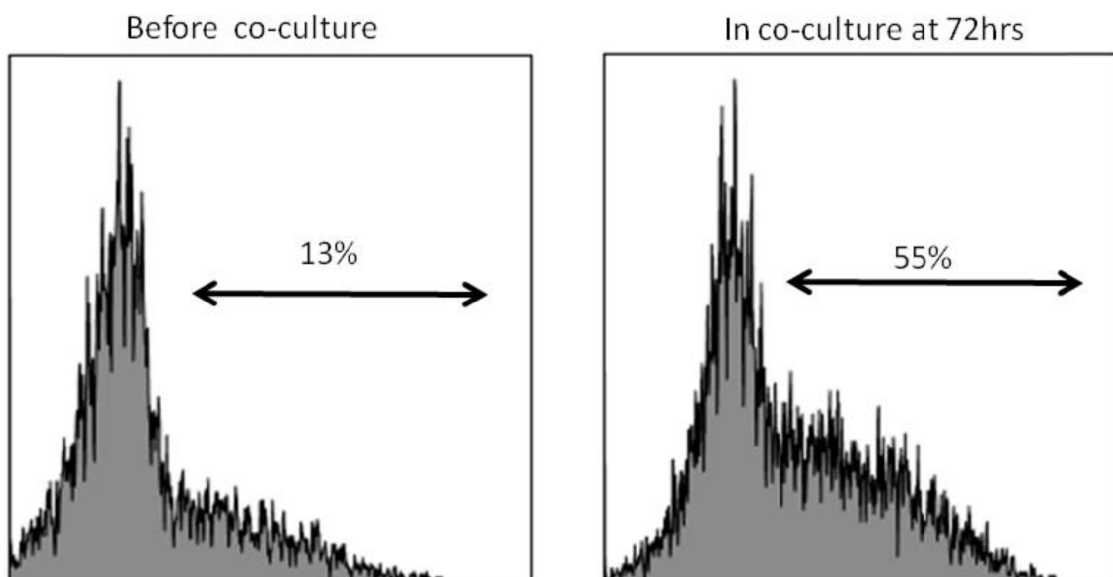


図 11 OKT-3 刺激による T 細胞上の PD-1 発現増強作用
 生来健康な非妊婦より得られた PBMC から磁気ビーズを用いて pT を分離し、
 OKT-3 と 72 時間共培養した。PD-1 の発現をフローサイトメトリー法で測定し
 た。ヒストグラム中の%は T 細胞中の PD-1 陽性の割合を表す。

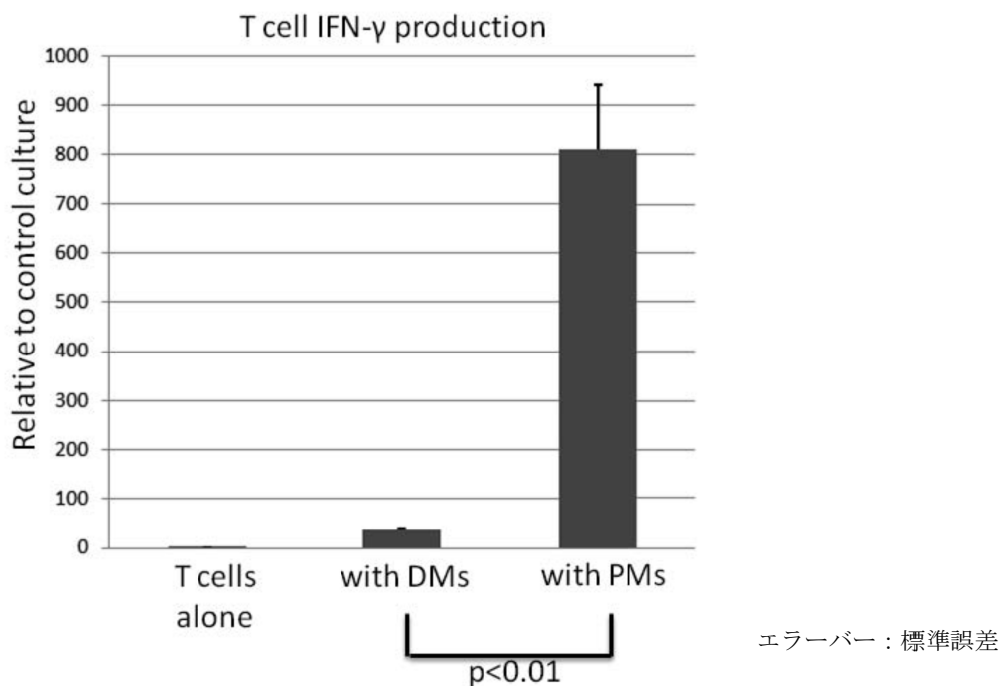
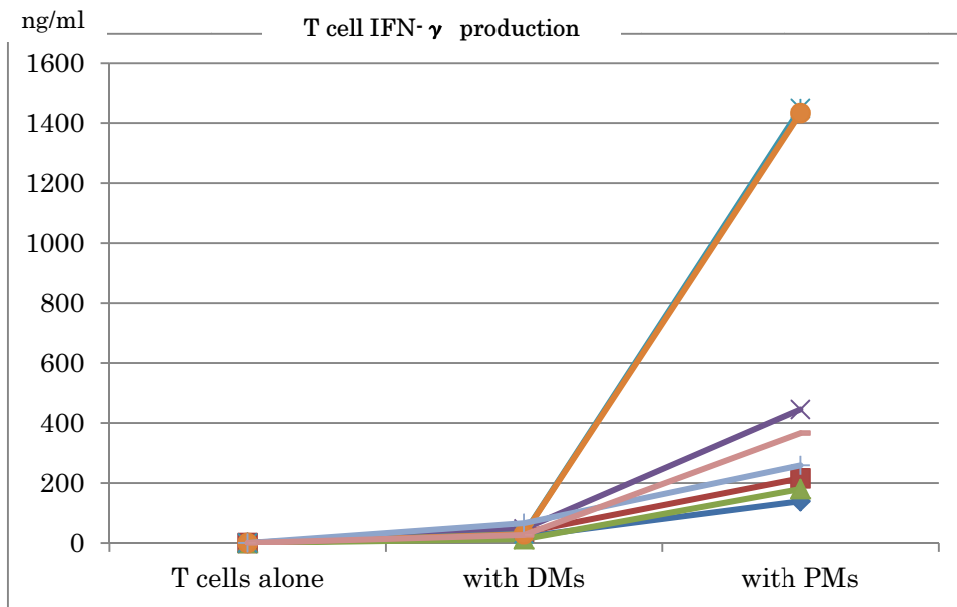


図 12 dM ϕ および pMo と T 細胞の共培養による IFN- γ 分泌の変化
 IFN- γ の分泌を ELISA で測定した。上段のドットプロットがそれぞれの IFN- γ の濃度の値を表しており、これらを T 細胞のみを培養したものを基準にして、下段のように比で表現した。dM ϕ や pMo と T 細胞を共培養すると IFN- γ の産生が増加したが、IFN- γ の値は dM ϕ と共培養した群の方が有意に低値であった。エラーバー：標準誤差 SEM。(N=8)。統計：Wilcoxon signed-rank testing

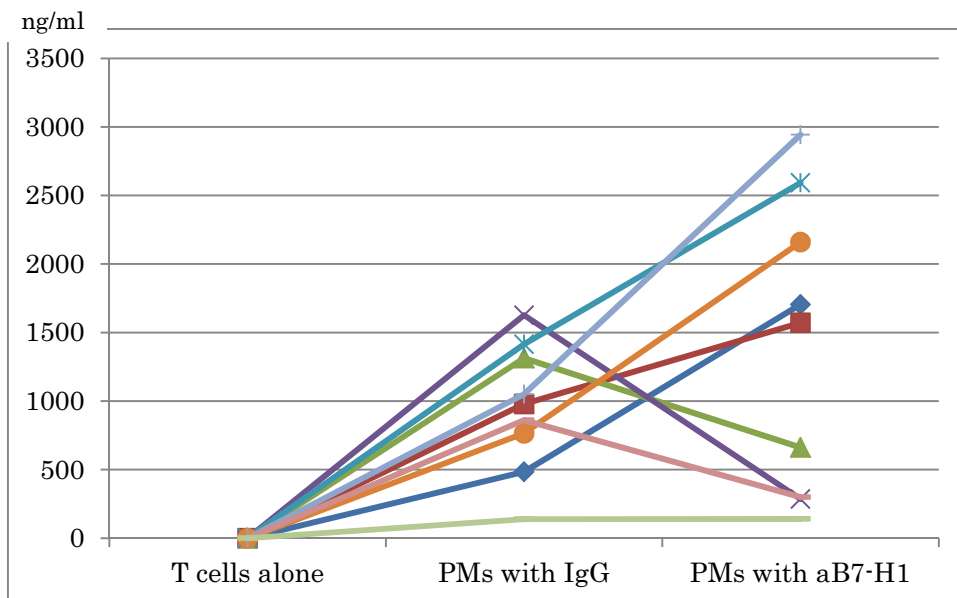
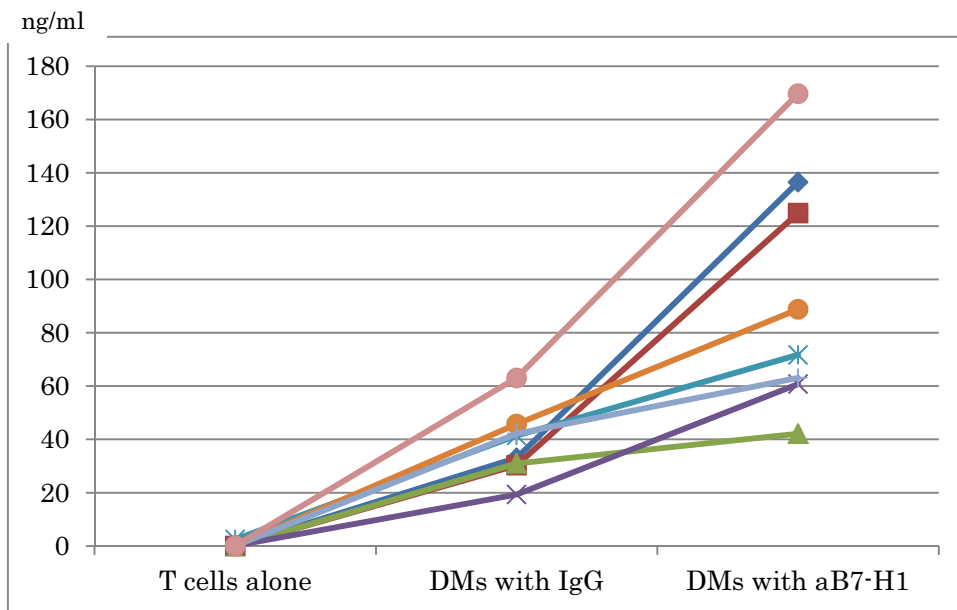
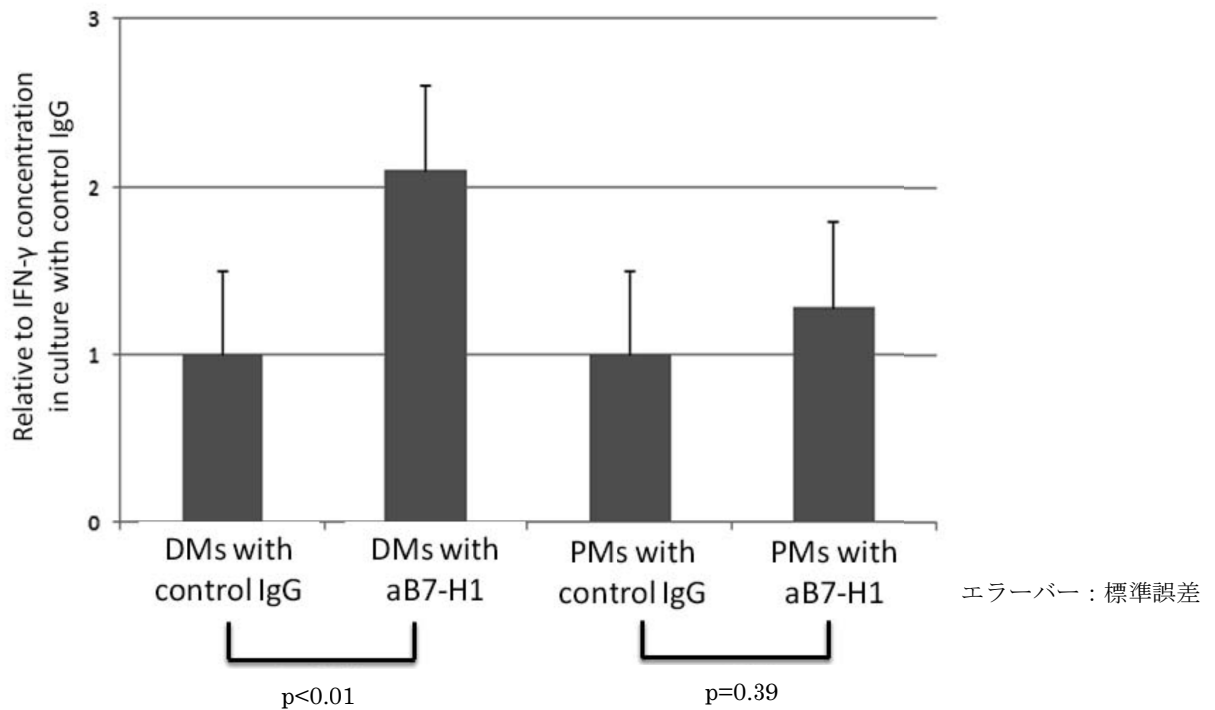


図 13a dMφ と pMo における B7-H1 阻害効果の比較

dMφ と pMo は予め抗 B7-H1 抗体と反応させて B7-H1 を阻害して B7-H1:PD-1 結合をブロックした。その後マウス IgG を陰性コントロールとして T 細胞を dMφ および pMo と 72 時間共培養し、その上清中の IFN- γ の濃度を ELISA で測定した。(N=8)



T cell

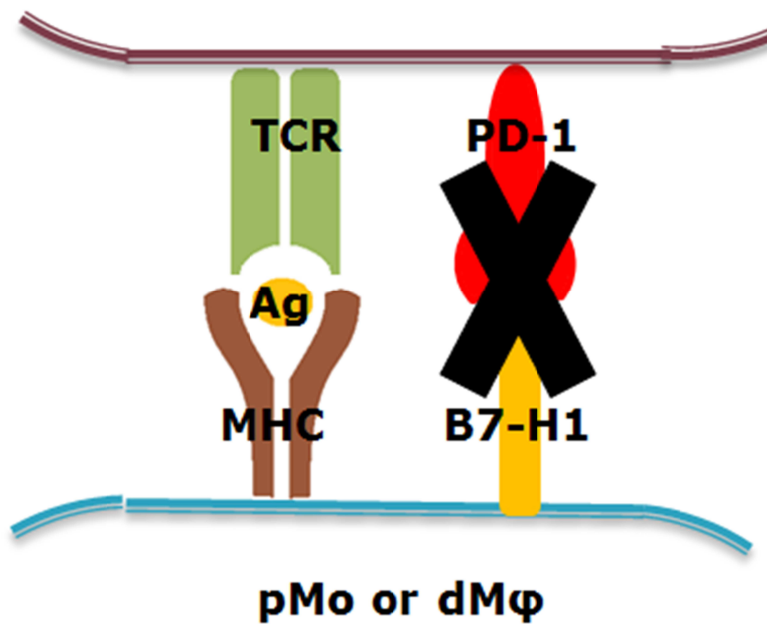


図 13b dMφ と pMo における B7-H1 阻害効果の比較

図 13a で得られたそれぞれ IFN- γ の値を、T 細胞のみを培養したものを基準にして、比で比較した。dMφ や pMo と T 細胞を共培養すると IFN- γ の産生が増加したが、IFN- γ の値は dMφ と共培養した群の方が有意に低値であった。エラーバー：標準誤差 SEM。(N=8)。統計：Wilcoxon signed-rank testing

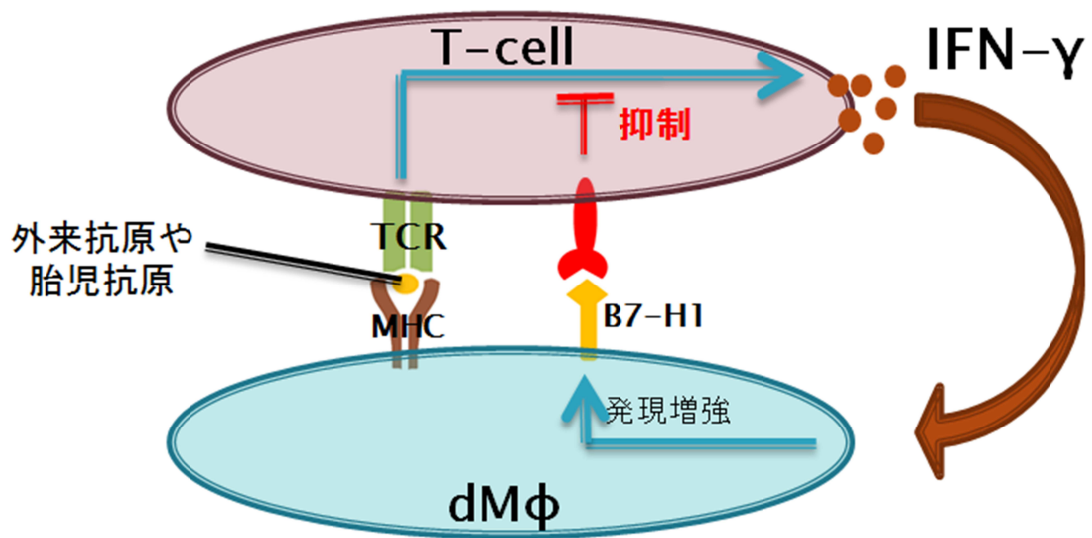


図 14 脱落膜における IFN- γ を適正值に維持する negative feedback 機構のシエーマ

IFN- γ 刺激によって dM ϕ 上の B7-H1 の発現が増強され、B7-H1:PD-1 結合を介して活性化された T 細胞からの IFN- γ 分泌を抑制することによって、脱落膜局所における最適な IFN- γ 濃度の維持に寄与していると考えられる。