

学位論文題名

免疫学的生殖不全マウスモデルを用いた
免疫グロブリンの流産抑止機構の解明

学位論文内容の要旨

緒言

不育症は、流産や死産を繰り返して健康な児を得ることができない疾患群とされる。このうち流産を繰り返す疾患は習慣流産と呼ばれ、1~3%の夫婦に存在する。

近年、原因不明の難治性習慣流産に対して、妊娠反応陽性時から1日20g、合計100gの免疫グロブリンを母体に投与する妊娠初期免疫グロブリン大量療法 (high dose intravenous immunoglobulin; HIVIg) が試みられ、その高い有効性が示唆されている。しかし、母児間接点 (Maternal-fetal interface)、つまり子宮脱落膜と胎児絨毛間において、HIVIg が薬理作用を発揮する機構は依然として不明であり、ヒト材料で解析することは倫理的にも不可能である。

本研究では、約20%に胎仔吸収 (流産) が起きることが知られているマウス CBA/J×DBA/2J 交配系を用い、二本鎖 RNA である poly (I:C) 投与により、流産をより高率に発症する免疫学的生殖不全マウスモデルを作成した。このモデルを用い、妊娠維持機構や流産発症機構と免疫担当細胞の関連、および免疫グロブリンの流産抑止作用を細胞免疫学的に解析し、興味深い知見を得たので報告する。

材料及び方法

4~6週齢の CBA/J 雌、DBA/2J 雄マウスを、夜9時から朝9時の間に交配させた。CBA/J マウスの膣栓が確認された日を妊娠0日目と定義した。

次に、DBA/J と交配した CBA/J マウスの妊娠7日目に、poly(I:C) 60, 100, または200 μ g を腹腔内投与し、13日目に解剖して子宮、胎仔および胎盤を肉眼で観察し、流産率を次式で算定した。(流産率=胎仔吸収妊卵数×100/総妊卵数 (%))

HIVIg 群では、妊娠7日目に poly(I:C) 200 μ g を腹腔内投与した後、intact 型免疫グロブリンを種々の方法で腹腔内投与し、妊娠13日目に流産率を測定した。一部の群では、Fab 型ヒト免疫グロブリンを、妊娠7~9日目に0.8g/kg (計2.4g/kg) 腹腔内投与した。

養子移入実験では、供与者 (donor) の非妊娠 CBA/J マウスに対して、intact 型免疫グロブリン0.8g/kg、あるいは PBS 640 μ l を、レシピエント妊娠 CBA/J マウスの妊娠1-3日目に合わせて、3日間 (計2.4g/kg) 腹腔内投与した。投与4日後に、これら非妊娠 CBA/J マウスより脾臓を摘出し、脾細胞浮遊液を調整した。一方、DBA/2J 雄マウスと交配し、7日目に poly(I:C) 200 μ g を投与した妊娠 CBA/J マウスに、調整した脾細胞 5×10^7 個を、同日、尾静脈より静脈内投与した。流産率は、妊娠13日目に判定した。

免疫グロブリン投与マウスから調整した脾細胞から亜分画を除くために、特定の細胞亜群に対する MACS 標識抗体 (T細胞:抗 CD90 マイクロビーズ, 樹状細胞:抗 CD11c マイクロビーズ, NK細胞:抗 DX5 マイクロビーズ) で脾細胞を処理した。また、B細胞を除くために B220 抗体上清で、マクロファージを除くために、F4/80, MOMA-1 抗体で処理後、抗

ラット-IgG マグネティックビーズを結合させた。その後、これらの MACS 標識抗体結合細胞を MACS カラムを通し、各抗体陽性分画を除去 (negative selection) した。これらの細胞分画を、妊娠 7 日目の CBA/J マウス静脈内に投与し、妊娠 13 日目に流産率を判定した。他の実験では in vivo でマクロファージを除去するため、Cl₂MDP-リポソームで処理した CBA/J マウスの脾細胞を用いた。

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。今回の解析では、2 群間の比較においては Mann-Whitney U 検定、多群間の比較においては分散分析 (Tukey-Kramer 法) を使用した。有意差 5%未満を統計学的有意とした。

結果

DBA/2J と交配した CBA/J マウスにおいて、poly(I:C) を 7 日目に poly(I:C) 200 μg 腹腔内投与することによって、55 ± 5% の胎仔に流産を惹起することが可能となり、免疫学的生殖不全マウスモデルとして、以下の実験系に使用した。

このモデルに対して、妊娠 7~9 日目に免疫グロブリン 0.8g/kg、すなわち計 2.4g/kg 投与したところ、流産率は 9 ± 4 % と、著明に抑制された。Fab 型免疫グロブリン を同様に投与した群では、流産率 46 ± 7% と、intact 型免疫グロブリン と比べて流産抑止効果は全く認められなかった。

養子移入実験において、PBS 処理コントロールマウスから調整した脾細胞を移入した群では、流産率 50 ± 6% と流産率の低下が認められなかったのに対して、intact 型免疫グロブリンを投与したマウスから調整した脾細胞を移入した群では、流産率 13 ± 3 % に抑制された。したがって、免疫グロブリン投与マウスの脾細胞を養子移入することにより、流産抑止効果を伝達できることが判明した。

特定の細胞分画を除去した脾細胞を養子移入する実験では、流産率は T 細胞除去分画 22 ± 9%、B 細胞除去分画 10 ± 4%、NK 細胞除去分画 23 ± 9%、樹状細胞除去分画 26 ± 7% と流産抑止効果は残存したが、F4/80 陽性、ならびに MOMA-1 陽性マクロファージを除去した場合、流産率はそれぞれ 45 ± 12%、46 ± 4% と、流産抑止効果が消失した。

PBS-リポソーム 200 μl と intact 型免疫グロブリンを投与した donor マウスから調整した脾細胞を、静脈内投与した妊娠マウスの流産率は、19 ± 8% であった。一方、Cl₂MDP-リポソーム 200 μl と intact 型免疫グロブリンを投与した、donor マウスから精製した脾臓細胞を静脈内投与した妊娠マウスの流産率は、49 ± 5% と流産抑止効果は消失した。

すなわち、移入脾細胞からのマクロファージの除去は、免疫グロブリン投与マウスからの脾細胞移入による流産抑止効果を、無効にすることが判明した。

考察

本研究において、CBA/J × DBA/2J の系における poly(I:C) 誘導性流産が、intact 型免疫グロブリン投与によって抑制されることが示され、ヒトにおける HIVIg による流産治療のマウスモデルが初めて確立された。本マウスモデルは、ヒト習慣流産に対する HIVIg 薬理作用機構を解明する上で、極めて有用と考えられる。さらに流産抑止効果が、免疫グロブリンを投与した非妊娠マウス由来脾細胞により養子移入可能であることが、本研究により初めて明らかとなった。このことは、免疫グロブリン大量投与によって生じる細胞性免疫系の機能修飾が、流産抑止に結びつくことを示す。しかし、Fab 型免疫グロブリンを同量投与した場合には、流産抑止効果は全く認められなかったことから、抗体による抗原結合反応のみでは不十分なことが判明した。このことは、Fc 受容体を発現する細胞が、今回観察された抑制効果に関与することを示す。母児間接点においては、炎症性の活性化マクロファージが存在することが知られている。免疫学的生殖不全マウスモデルにおいて、免疫グロブリン投与により、これらの炎症性マクロファージの活性が母児間接点において抑制されているのかどうか、また、NK 細胞、T 細胞などの免疫担当細胞が、抗炎症作用にどのように関わってくるのかについては、今後の重要な検討課題と考えている。この免疫学的生殖不全マウスモデルを用いて、今後、妊娠維持や流産発症機構および免疫グロブリンの薬理作用機構の解明が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 水 上 尚 典
副 査 教 授 小 野 江 和 則
副 査 教 授 櫻 木 範 明

学 位 論 文 題 名

免疫学的生殖不全マウスモデルを用いた 免疫グロブリンの流産抑止機構の解明

不育症は、流産や死産を繰り返して健康な児を得ることができない疾患群とされる。このうち流産を繰り返す疾患は習慣流産と呼ばれる。原因不明の難治性習慣流産に対して、妊娠反応陽性時から大量の免疫グロブリンを母体に投与する妊娠初期免疫グロブリン大量療法が試みられ、高い有効性が示唆されている。しかし、母児間接点、つまり子宮脱落膜と胎児絨毛間において、この治療法が薬理作用を発揮する機構は不明である。

本研究では、CBA/J×DBA/2J を用い、poly (I:C) 投与により、流産をより高率に発症する免疫学的生殖不全マウスモデルを作成し、妊娠維持機構や流産発症機構と免疫担当細胞の関連、免疫グロブリンの流産抑止作用を細胞免疫学的に解析することを目的とした。

7週齢以降のCBA/J 雌、DBA/2J 雄マウスを交配し、CBA/J マウスの妊娠7日目に、poly(I:C) を腹腔内投与し、13日目に解剖して妊卵を肉眼で観察し、流産率を算定した。妊娠7日目にpoly(I:C) 200 μ g 腹腔内投与することによって、 $55 \pm 5\%$ に流産が生じることが判明し、免疫学的生殖不全マウスモデルとして、以下の実験系に使用した。

この免疫学的生殖不全マウスに、intact 型免疫グロブリンを種々の方法で腹腔内投与、もしくはFab 型ヒト免疫グロブリンを、妊娠7~9日目に0.8g/kg 腹腔内投与したところ、妊娠7~9日目に免疫グロブリンを0.8g/kg 投与した場合、流産率は $9 \pm 4\%$ と抑制されたが、Fab 型免疫グロブリンを同様に投与した群では、流産率 $46 \pm 7\%$ と流産抑止効果は全く認められなかった。

養子移入実験では、供与者の非妊娠CBA/J マウスに対して、intact 型免疫グロブリンあるいはPBS を3日間腹腔内投与した。その後、これら非妊娠CBA/J マウスより脾細胞浮遊液を調整し、免疫学的生殖不全モデルマウス尾静脈より静注した。PBS 処理マウスからの脾細胞移入群では、流産率の低下が認められなかったが、intact 型免疫グロブリン

ン投与マウスからの脾細胞移入群では、流産率 $13 \pm 3\%$ に抑制された。つまり、免疫グロブリン投与マウスの脾細胞養子移入により、流産抑止効果を伝達できた。

次に、免疫グロブリン投与マウスから調整した脾細胞に、特定の細胞亜群に対する MACS 標識抗体を結合させ、これらを MACS カラムに通し、各抗体陽性分画を除去した。これら除去細胞分画を免疫学的生殖不全マウスに静注し、流産率を判定した。他の実験では、マクロファージを除去するため、クロドロネートで処理したマウスの脾細胞を用いた。T細胞除去分画、B細胞除去分画、NK細胞除去分画、樹状細胞除去分画の移入では、流産抑止効果は残存したが、F4/80 陽性、ならびに MOMA-1 陽性マクロファージを除去した場合、流産抑止効果が消失した。また、クロドロネートによりマクロファージを除去した脾細胞を静注したマウスでも、流産抑止効果は消失した。すなわち、移入脾細胞からのマクロファージの除去は、免疫グロブリン投与マウスからの脾細胞移入による流産抑止効果を、無効にすることが判明した。

今回、ヒト免疫グロブリン療法による流産治療のマウスモデルを確立したが、ヒト習慣流産に対する投与免疫グロブリンの薬理作用機構を解明する上で、極めて有用と考えられた。さらに流産抑止において、マクロファージの重要性を示した点で、妊娠維持機構における免疫担当細胞の役割解明に貢献する結果と考えられた。

口頭発表後、副査の櫻木教授から、免疫学的生殖不全モデルマウスのヒト習慣流産に対する相同性、また TLR のヒト習慣流産における役割について、副査の小野江教授から、ヒトでの炎症性刺激による流産率の上昇、血管炎疾患に対する免疫グロブリン大量投与の作用機序、マクロファージ上の $Fc\gamma R$ の種類・機能差、クロドロネート投与マウスの妊娠、についての質問があった。最後に主査の水上教授より、poly(I:C)で処理しない CBA/J \times DBA/2J の流産率に対する免疫グロブリン大量投与の影響、poly(I:C)の全身への影響、本研究の臨床応用、についての質問があった。これらの質問に対し申請者は、大概妥当に回答した。

この論文は、免疫グロブリン大量療法の作用機序の細胞因子を解明した点で高く評価され、今後の発展により新たな習慣流産治療法の確立、および免疫学的妊娠維持機構の解明が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。