

学位論文題名

Administration of high-dose intact immunoglobulin has
an anti-resorption effect
in a mouse model of reproductive failure

(免疫学的生殖不全モデルマウスにおいて、高用量免疫グロブリン投与は
胎仔吸収抑制効果をもたらす)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 原因不明の難治性習慣流産に対して、intact 型ヒト免疫グロブリン (IH-Ig) 療法の有用性が期待されている。我々は、Poly (I:C) を用いる免疫学的生殖不全モデルマウスを作製し、IH-Ig 投与による胎仔吸収抑制効果を検討した。さらに、養子移入実験および脾臓や胎盤におけるサイトカイン mRNA 発現の解析によって、IH-Ig の作用機構について検討を行なった。

【材料と方法】 CBA/J (メス)、DBA/2J (オス) の交配系で、Poly (I:C) 投与により誘導される胎仔吸収モデルにおける IH-Ig の効果について検討した。

膣栓の確認を妊娠 0.5 日目 (d0.5) とした。d7.5 に Poly (I:C) 200 μ g を腹腔内投与する群をコントロールとし、A: IH-Ig 0.8 g/kg (d7.5)、B: IH-Ig 0.8 g/kg/d (d7.5-9.5)、C: IH-Ig 0.4 g/kg/d (d7.5-11.5)、または D: Fab 型ヒト免疫グロブリン (Fab-Ig) 0.8 g/kg/d (d7.5-9.5) のスケジュールにて、Poly (I:C) 投与妊娠マウスの腹腔内に免疫グロブリンを投与し、各群における胎仔吸収率の変化を比較、検討した。

さらに養子移入実験として、d7.5 に Poly (I:C) 200 μ g を腹腔内投与する群をコントロールとし、E: 未処置非妊娠 CBA/J ドナー、および F: IH-Ig 処置非妊娠 CBA/J ドナー (D1.5-3.5 に 0.8 g/kg/d を腹腔内投与) の脾細胞を、Poly (I:C) 投与妊娠レシピエントの尾静脈から d7.5 に移入し、胎仔吸収率に与える影響を調べた。

またレシピエントの脾臓および胎盤における IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、IL-4 および TGF- β_1 の mRNA 発現を、RT-PCR 法により解析した。

移入細胞の作用点について検討するため、*in vitro* にて carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 標識を行なった脾細胞を同様に Poly (I:C) 投与妊娠レシピエントに養子移入し、投与後 3-5 日後の脾臓および胎盤における移入細胞の動向をフローサイトメトリー法により検討した。

なお胎仔吸収率 (%) は (吸収胎仔数/吸収胎仔数 + 生存胎仔数) \times 100 により計算した。各検討において、統計には non-repeated measures ANOVA および Student-Newman-Keus test を用い、 $P < 0.01$ を有意とした。

【結果】 Poly (I:C) 200 μ g 投与による胎仔吸収率 (mean \pm SD) は、Ig 投与実験のコントロールは $55 \pm 5\%$ 、養子移入実験のコントロールは $47 \pm 5\%$ であった。A-F 処置による胎仔吸収率は、A: $39 \pm 9\%$ 、B: $10 \pm 3\%$ 、C: $41 \pm 8\%$ 、F $50 \pm 14\%$ 、E: $37 \pm 7\%$ 、F: $6 \pm 3\%$ であった。この結果から、IH-Ig 0.8 g/kg/d (d7.5-9.5) 投与 (B 群)、および IH-Ig 処置ドナー脾細胞養

子移入 (F 群) によって、流産率が有意に低下することが判明した。

CFSE 標識脾細胞養子移入実験により、移入細胞はレシピエントの脾臓細胞中の 0.75～2.45%、全胎盤単核球中の 0.33～0.81%に確認された。特に胎盤単核球中において、移入細胞に占める CD11 陽性細胞の高い割合が観察された。

また、IH-Ig (0.8g/kg/d, d7.5～9.5) 投与により、脾臓での IL-10 mRNA 発現が未治療群、および Poly (I:C) 投与群に比し有意に増加した。またこの IH-Ig 投与群の胎盤における IFN- γ 、TNF- α mRNA 発現が、Poly (I:C) 投与コントロール群に比し有意に減少した。

【考察】 高用量免疫グロブリン療法 (HIVIg) は、約 25 年前に特発性血小板減少性紫斑症に対する有効性が確認されて以来、ギランバレー症候群、川崎病、重症筋無力症などの自己免疫疾患や、炎症性疾患において有効性が確定され、標準的治療法となっている。現在、多発性筋炎、全身性ループスエリテマトーデス、クローン病ならびに習慣流産において、その有効性が検討されている。

習慣流産とは、3 回あるいはそれ以上の自然流産既往を指す概念である。その原因としては、子宮奇形、抗リン脂質抗体症候群、転座などの染色体異常、内分泌異常、および代謝異常などが考えられているが、大部分は原因不明である。その一部には NK 細胞や T 細胞の活性異常など、細胞性免疫異常が関与していると考えられている。

習慣流産に対する HIVIg は、1988 年に抗リン脂質抗体陽性者を対象に初めて実施された。原因不明の習慣流産に対しては、主に 1990 年代に無作為二重盲検法によりその有効性が検討されたが、大部分の研究ではプラセボに比べ有意な生児獲得率の上昇は確認できなかった。しかし、これらの研究では流産に至った場合の染色体核型分析が不十分である点、対象が不均一である点、投与量、期間が不均一である点などの問題点が指摘されている。我々は 4 回以上の原因不明自然流産既往の患者を対象に、妊娠初期に 1 日 20 グラムを 5 日間投与するスケジュールで HIVIg を実施しており、これまでに高い生児獲得率を得ている。さらに HIVIg 後の患者末梢血において、NK 細胞活性の抑制および helper T (Th) 細胞パランスの修飾が生じていることを報告した。

しかし、生殖不全モデル動物を用いた IH-Ig の作用機構について、これまで解析が進んでいなかった。我々は、Poly (I:C) を投与する免疫学的生殖不全モデルマウスを用い、IH-Ig の胎仔吸収抑制効果を検証するとともに、IH-Ig の作用機構についての解析を行なった。

本研究により、高用量 IH-Ig の連続投与 (3 日間)、および同様の処理をされた非妊娠ドナーマウス脾細胞養子移入により、免疫学的生殖不全マウスの胎仔吸収が有意に抑制されることが明らかとなった。IH-Ig の作用機構として、マクロファージ Fc γ レセプター (Fc γ R) のブロックによる抗体依存性細胞傷害の抑制、補体および免疫複合体介在性傷害の減弱、Fc γ RIIB を介する B 細胞抑制、ならびに Th1 細胞の抑制などが考えられている。本研究における胎仔吸収抑制には免疫グロブリンの Fc 部分が必要であり、また、母児間接点での直接作用のほか、脾細胞の機能的修飾を介する間接的作用も関与していると考えられた。実際 IH-Ig 投与により胎盤における炎症性サイトカインの抑制が誘導され、胎仔吸収抑制に関係していることが示唆された。

【結論】 高用量 IH-Ig 投与および高用量 IH-Ig 処置ドナー脾細胞の養子移入は、免疫学的生殖不全マウスの胎仔吸収を抑制する。母児間接点における抗炎症作用がその抑制機構に関与していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 小野江 和 則
副 査 教 授 水 上 尚 典
副 査 教 授 有 川 二 郎

学 位 論 文 題 名

Administration of high-dose intact immunoglobulin has an anti-resorption effect in a mouse model of reproductive failure

(免疫学的生殖不全モデルマウスにおいて、高用量免疫グロブリン投与は
胎仔吸収抑制効果をもたらす)

この論文は、Poly (I:C)を用いる免疫学的生殖不全モデルマウス (モデルマウス)における、免疫グロブリン投与による胎仔吸収抑制効果を検討したものである。さらに養子移入実験ならびにサイトカイン mRNA 発現の検討により、免疫グロブリンの胎仔吸収抑制機構についても検討を加えている。

CBA/J (メス)、DBA/2J (オス)の交配系で、妊娠 7.5 日目 (d7.5)に Poly (I:C) 200 μ g を腹腔内投与 (ip) したモデルをモデルマウスとした。

未治療群をコントロールとし、免疫グロブリンを A: intact 型ヒト免疫グロブリン (IH-Ig) 0.8 g/kg/d、d7.5 B: IH-Ig 0.8 g/kg/d、d7.5~9.5 C: IH-Ig 0.4 g/kg/d、d7.5~11.5 D: Fab 型ヒト免疫グロブリン 0.8 g/kg/d、d7.5~9.5 の方法でモデルマウスに ip し、各群における胎仔吸収率を検討した。養子移入実験として、E: 未処置非妊娠 CBA/J ドナー、および F: IH-Ig 処置非妊娠 CBA/J ドナー (D1.5~3.5 に免疫グロブリンを 0.8 g/kg/d を ip) の脾細胞をモデルマウスの尾静脈から d7.5 に移入し、胎仔吸収率を検討した。各処置による胎仔吸収率は、A: 39 \pm 9%、B: 10 \pm 3%、C: 41 \pm 8%、D: 50 \pm 14%、E: 37 \pm 7%、F: 6 \pm 3%となり、IH-Ig 0.8 g/kg/d、3 日間投与を受けた群、ならびに IH-Ig 処置ドナー脾細胞養子移入を受けた群で胎仔吸収率が有意に減少することが示された。

移入細胞の動態を検討するため、carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 標識を行なった脾細胞をモデルマウスに養子移入し、脾臓および胎盤における移入細胞の動態をフローサイトメトリーにより検討した。移入細胞はレシピエントの全脾臓細胞中の 0.75~2.45%、全胎盤単核球中の 0.33~0.81%に確認され、特に胎盤単核球中にお

いて、移入細胞に占める CD11 陽性細胞の高い割合が観察された。この実験により、移入細胞が実際にレシピエントの脾臓および胎盤に存在することが実証されるとともに、移入細胞による細胞性免疫調節が胎仔吸収抑制に関与している可能性が示唆された。

全身および局所のサイトカイン動態と胎仔吸収抑制との関連を検討するため、A: 未治療群、B: Poly (I:C) 群=モデルマウス、C: IH-Ig 群 (モデルマウスに IH-Ig を投与) の各群の脾臓および胎盤における IFN- γ 、TNF- α 、IL-10、IL-4 および TGF- β_1 mRNA 発現を RT-PCR により解析した。脾臓における IL-10 mRNA 発現が、C 群において A 群および B 群と比較し有意に増加、また胎盤における IFN- γ および TNF- α mRNA 発現が、B 群において A 群および C 群と比較し有意に増加していた。IH-Ig が直接的に胎盤に作用するとともに、脾臓細胞を介して胎盤に作用し、炎症性サイトカイン産生を抑制している可能性が示された。

発表後、有川教授より、CBA/J x DBA/2J における胎仔吸収の機序について、またマウスの妊娠日齢についての質問があった。発表者は既報の論文および実験データを引用し、胎仔吸収には胎盤における各種サイトカイン動態の変化が関与している可能性を、またマウスの妊娠 7.5 日目はヒトの妊娠初期に相当すると回答した。小野江教授より、IH-Ig の胎仔吸収抑制機構解明に必要な追加実験についての質問があった。発表者は、他の生殖不全モデルの樹立、ノックアウトマウス等を用いた実験が望ましいとの回答を行なった。有賀教授より、臨床応用の際の治療適応に関する質問があった。発表者は、既報の論文を引用し、NK 細胞や Th 細胞活性の検討が有用である可能性はあるが、現時点では既往歴等による適応の決定が現実的であるとの回答を行なった。また水上教授より、今後無作為二重盲検による検討を実施する場合に必要な条件についての質問があった。発表者は、既報の論文における問題点を指摘した上で、厳密な適応の決定、治療方法の統一が必要であるとの回答を行なった。

この論文は、モデルマウスの胎仔吸収抑制に免疫グロブリンが有効であることを示した点、作用機構として胎盤局所における炎症性サイトカインの減少が関与している可能性を示した点で高く評価され、原因不明習慣流産治療における高用量免疫グロブリン療法の確立と作用機構の解明に寄与することが期待される。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定した。