

免疫細胞可視化マウスを用いた妊娠免疫応答の解明

高田和秀¹⁾, 竹田善紀¹⁾, トリンズイクアン¹⁾, 相澤(小峯)志保子¹⁾Evaluation of the immune system during pregnancy
by immune response visualization mouseKazuhide TAKADA¹⁾, Yoshinori TAKEDA¹⁾, Quang Duy TRINH¹⁾,
Shihoko KOMINE-AIZAWA¹⁾

要旨

妊娠子宮にはNK細胞、制御性T細胞 (Treg)、マクロファージ、樹状細胞など多種多様な免疫担当細胞が集積し、胎盤形成や免疫寛容に関与する。しかし、妊娠に伴って子宮内に増加するこれらの細胞は、元来子宮内に存在していた細胞が増殖・分化したのか、他臓器から移動してきたのか、不明である。本研究では紫外線照射により蛍光発色が変化するKikGRマウスを用い、各リンパ組織における免疫細胞を標識し、子宮の免疫細胞の由来を明らかにすることを目的とした。フローサイトメトリの結果より、腋窩リンパ節から子宮へCD3+T細胞の遊走が認められ、その大半はCD8+細胞傷害性T細胞ということが判明した。また腸と女性生殖器官における相互作用に関する文献検索も併せて行った。本研究により半非自己である胎児に対する免疫応答の理解が進めば、少子化時代における不妊・不育の治療や予防戦略の確立に寄与することが期待できる。

1. はじめに

メスの体内で胎盤と胎児を育てる真胎生の生殖様式をとる脊椎動物では、獲得免疫系による異物認識から、半非自己である胎児・胎盤が逃れるメカニズムが必要である¹⁾。妊娠子宮にはNK細胞、制御性T細胞 (Treg)、マクロファージ、樹状細胞など多種多様な免疫担当細胞が集積し、胎盤形成や免疫寛容に関与する²⁾。しかし、妊娠に伴って子宮内に増加するこれらの細胞は、元来子宮内に存在していた細胞が増殖・分化したのか、他臓器から移動してきたのか、不明である。近年、妊娠後のマウス子宮における未成熟樹状細胞の増加は子宮外からの流入であることが報告されたが³⁾、それ以外の免疫細胞の由来は明らかになっていない。そこで本研究では紫外線照射により蛍光発色に変化するKikGRマウス⁴⁾を用い、各リンパ組織における免疫細胞を標識し、子

宮の免疫細胞の由来を明らかにすることを目的とした。本研究により半非自己である胎児に対する免疫応答の理解が進めば、少子化時代における不妊・不育の治療や予防戦略の確立に寄与し、SDGs目標「3.すべての人に健康と福祉を」の達成の一助となる。

2. 対象及び方法

本研究は遺伝子組換え実験及び動物実験であるため、医学部各委員会の承認を得て実施した。(承認番号 GU24MED002-2, AP24MED025-2, AP24MED026-2)。実験の概要を図1に示す。

マウス

KikGRマウス (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor<tm1.1(CAG-kikGR)Kgw>) は、特定の波長の光 (紫外線等) により緑色から赤色に蛍光が変化する光変換蛍光タン

1) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野
責任者連絡先: 高田和秀, takada.kazuhide@nihon-u.ac.jp

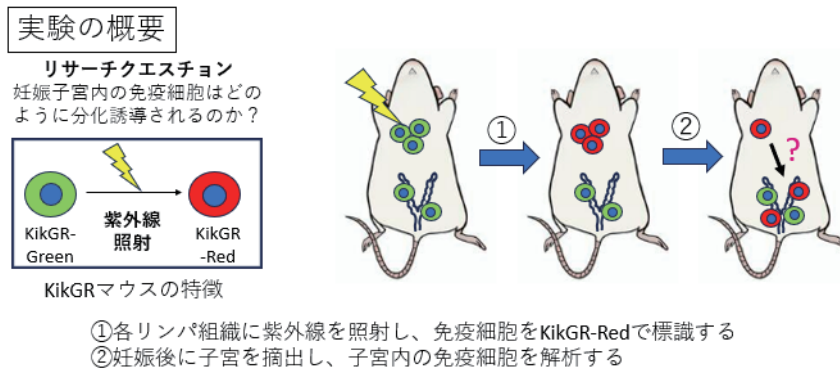


図1 実験の概要

パク質であるキクメイシ (*Favia fava*) 由来 KikGR 遺伝子をノックインしたマウスであり、理研バイオリソースセンターから購入後、維持継代を行った。

リンパ節への紫外線照射

イソフルランによる吸入麻酔下において8~12週齢のメスマウスの腋窩を剃毛後に上皮切開し、腋窩リンパ節を露出した状態において、紫外線照射を2分間行った。紫外線照射にはペンキュアー2000（株式会社モリタ製作所）を用いた。最後に創部を縫合した。

フローサイトメトリーによる子宮免疫細胞の評価

紫外線照射から一週間後、イソフルラン吸入麻酔下に、熟練者によって頸椎脱臼し安楽死させた後に、子宮を摘出した。組織をセルストレーナー上でハサミを用いてホモジェナイズしたあとPBSを加えながらシリンジの底部で濾し、50mlチューブに回収した。2000rpmで5分遠心した後上清を捨て、ACK Lysis Buffer (Thermo Fisher) を1ml加えて3分間静置し、赤血球を溶血させた。PBSを10ml加え2000rpmで3分間遠心した後上清を捨て、PBS1mlでペレットを溶解し1.5mlエッペンチューブに移し替えた。

再度10000rpmで3分遠心した後上清を捨て、Live/Dead (Thermo Fisher; 1:1000 in PBS) を100μl加えて室温で10分間遮光しながらインキュベートした。10分後にPBSを900μl加え10000rpmで3分遠心した後、上清を捨てPBS100μlに希釈した細胞表面抗体液を加えて室温で遮光しながら20分インキュベートした。用いた細胞表面抗体はanti-CD45

(1:100; BD)、anti-CD3 (1:100; BD)、anti-CD4 (1:100; BD)、anti-CD8 (1:100; BD)、anti-CD19 (1:100; BD)、anti-NK1.1 (1:100; BD) である。その後PBSを900μl加え10000rpmで3分間遠心して洗浄した。洗浄は計2回行った。

次にCytofix/Cytoperm (BD) を100μl加え40分間氷上で静置した。その後Perm wash (BD) を500μl加えて12000rpmで3分間遠心した。上清を捨てたのち、Perm washで希釈したanti-Foxp3 抗体 (1:100; BD) を100μl加え、室温で遮光しながら30分間インキュベートした。その後Perm washを500μl加え12000rpmで3分間洗浄した。洗浄は計2回行った後、PBSに希釈した0.8%PFA液を300μl加え、解析まで4℃で保管した。フローサイトメトリーにおける解析はCytoFLEX (Beckman Coulter) を用いた。KikGRマウスは全身にFITCチャンネルで検出可能な蛍光色素KikGR-Greenを発現しており、紫外線照射によりPEチャンネルで検出可能な蛍光色素KikGR-Redに変化する。そのため子宮から離れた遠隔組織で紫外線標識した細胞が子宮で検出された場合には、その遠隔組織から免疫細胞が遊走したということになる。

3. 結果

フローサイトメトリーの結果を図2に示す。図中の枠内がKikGR-Red陽性細胞、つまり腋窩リンパ節から子宮へ遊走してきた細胞と考えられる。フローサイトメトリーの結果より、腋窩リンパ節から子宮へCD3+T細胞の遊走が認められ、その大半はCD8+細胞傷害性T細胞ということが判明した。一方でCD4+ヘルパーT細胞の遊走はCD8+細胞傷害

性T細胞と比べると少なく、Foxp3+制御性T細胞は検出されなかった。またB細胞やNK細胞の遊走も認めたが、B細胞の遊走数は他の細胞と比べると相対的に少なかった。

4. 考察

今回のフローサイトメトリーの結果をまとめると、腋窩リンパ節から子宮へ遊走する免疫細胞は主にCD8+細胞傷害性T細胞とNK細胞であると考えられた。通常の動物実験では、動物愛護の観点から必要数のマウスをその都度購入することが原則であるが、KikGRマウスは提供元の理研バイオリソースセンターの規定により、繁殖用ペアでの提供となったため、自施設で繁殖を行う必要があった。それゆえマウスの繁殖継代を自施設で行った。今回の研究期間ではマウスの不妊や、出産した仔マウスを母親マウスが食殺してしまう事例が生じる等、当初の繁殖計画通りにマウスの供給を行うことが出来なかった。そのため現在繁殖計画を見直し、安定したマウスの供給体制の構築中である。マウスの安定供給体制が確立次第、腸骨下リンパ節やパイエル板など他のリンパ節標識も行い、妊娠時の免疫細胞の遊走も評価していく予定である。

次に腸と女性生殖器間における相互作用の関係について考察する。妊娠可能年齢における女性の腔内細菌叢は多様性の低い*Lactobacillus*主体であることが多い⁵⁾。しかしながら、多様性が多い方が健康的

とされる腸内細菌叢とは真逆であり、なぜ1-2種類の*Lactobacillus*のみが優位種として選択されるのかについては、まだ分かっていない。我々は以前腔内優位種が他の*Lactobacillus*の増殖を抑制するとの仮説を立て、それぞれの種の培養上清をお互いに添加することでその影響を検討したが、予想に反し*Lactobacillus*同士の明らかな増殖要請は見られなかった⁶⁾。この結果から女性の腔内における*Lactobacillus*の優位性には、宿主側の選択因子が強く影響している可能性が想定される。興味深いことに、マウスの腔内細菌叢は*Lactobacillus*主体ではないが、ヒトの腸内細菌叢を再現したマウスでは、腔内の*Lactobacillus*の割合が増加しており⁷⁾、腸-腔相関の存在が考えられる。

腸内細菌叢の制御にIgAが関与していることは近年分かってきたが⁸⁾、最近では腔内細菌もIgAコーティングを受けているとの報告が散見される⁹⁻¹¹⁾。機序はまだ不明であるものの、腔内細菌叢の構成によって、IgAコーティングの程度は変化しており、IgAによる細菌叢制御の可能性が示唆される。さらに子宮摘出後には腔内の抗体濃度が低下したという報告があり¹²⁾、子宮への抗体産生細胞を含む免疫細胞の遊走の実態解明が重要であると思われる。

子宮頸がんの原因となるヒトパピローマウイルス(HPV)の予防のために、HPVの構造の一部を表面に発現させた*Lactobacillus*を用いた経口ワクチンが研究されている。経口ワクチン投与後に、ワクチン

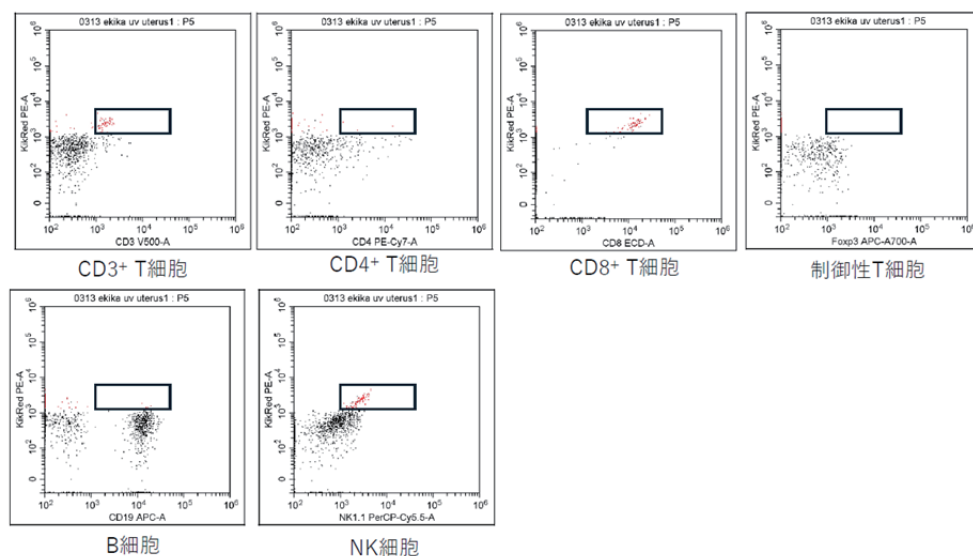


図2 フローサイトメトリーの結果

の標的構造を認識するIgA抗体が腔内で検出されていることから、消化管で*Lactobacillus*の一部を認識した免疫細胞が腔まで遊走し、局所で抗体を産生している可能性が考えられる^{7,13,14}。ヒトの回腸では*Lactobacillus*が局所的に多く¹⁵、そこで*Lactobacillus*反応性の免疫細胞が誘導され、その一部が腔へと遊走して、抗体産生を行うことで腔内細菌叢を制御しているという可能性が示唆された(図3)¹⁶。

5. 結語

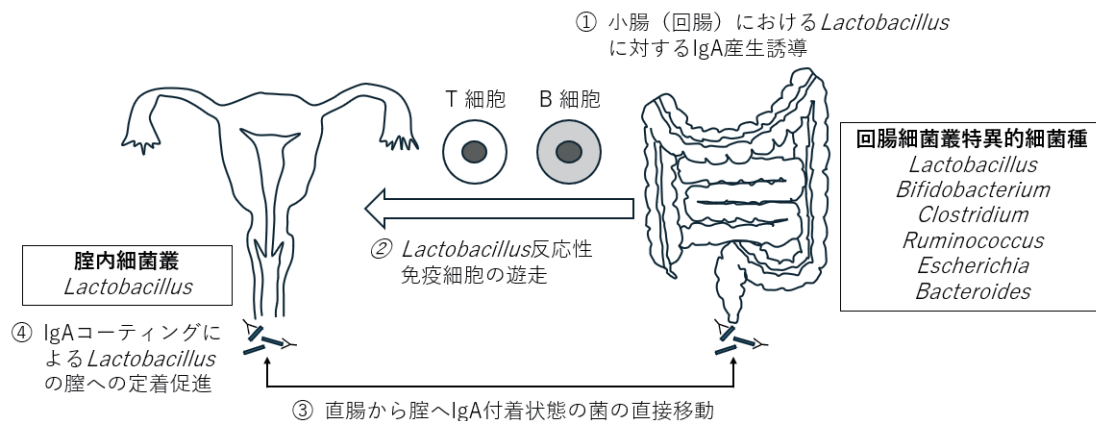
腸-子宮相関や、腸-腔相関の機序が明らかになり、半非自己である胎児に対する免疫応答の理解が進めば、少子化時代における不妊・不育の治療や予防戦略の確立に寄与することが期待できる。

謝辞

本研究は 令和6年度 日本大学若手研究者助成金の支援のもと行われた。

文 献

- 1) Rackaityte E, Halkias J. Mechanisms of Fetal T Cell Tolerance and Immune Regulation. *Frontiers in immunology* 2020;11:588.
- 2) Ding J, Maxwell A, Adzibolosu N, Hu A, You Y, Liao A, et al. Mechanisms of immune regulation by the placenta: Role of type I interferon and interferon-stimulated genes signaling during pregnancy. *Immunological reviews* 2022;308:9-24.
- 3) Yasuda I, Shima T, Moriya T, Ikebuchi R, Kusumoto Y, Ushijima A, et al. Dynamic Changes in the Phenotype of Dendritic Cells in the Uterus and Uterine Draining Lymph Nodes After Coitus. *Frontiers in immunology* 2020;11:557720.
- 4) Tomura M, Hata A, Matsuoka S, Shand FH, Nakaniishi Y, Ikebuchi R, et al. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Scientific reports*. 2014;4:6030.
- 5) Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:4680-4687.
- 6) Hayashida S, Takada K, Melnikov VG, Komine-Aizawa S, Tsuji NM, Hayakawa S. How were *Lactobacillus* species selected as single dominant species in the human vaginal microbiota? Coevolution of humans and *Lactobacillus*. *Medical Hypotheses* 2022;163:110858.
- 7) Mejia ME, Mercado-Evans V, Zulk JJ, Ottinger S, Ruiz K, Ballard MB, et al. Vaginal microbial dynamics and pathogen colonization in a humanized microbiota mouse model. *NPJ biofilms and microbiomes* 2023;9:87.
- 8) Huus KE, Bauer KC, Brown EM, Bozorgmehr T, Woodward SE, Serapio-Palacios A, et al. Commensal Bacteria Modulate Immunoglobulin A Binding in Response to Host Nutrition. *Cell host & microbe* 2020;27:909-921.e5.
- 9) Breedveld AC, Schuster HJ, van Houdt R, Painter



Takada K, *Front. Immunol.* 2025より改変

図3 腸-腔相関の予想図

- RC, Mebius RE, van der Veer C, et al. Enhanced IgA coating of bacteria in women with *Lactobacillus crispatus*-dominated vaginal microbiota. *Microbiome* 2022;10:15.
- 10) Schuster HJ, Breedveld AC, Matamoros SPF, van Eekelen R, Painter RC, Kok M, et al. The interrelation between microbial immunoglobulin coating, vaginal microbiota, ethnicity, and preterm birth. *Microbiome* 2024;12:99.
- 11) Murphy K, Gromisch M, Srinivasan S, Wang T, Wood L, Proll S, et al. IgA coating of vaginal bacteria is reduced in the setting of bacterial vaginosis (BV) and preferentially targets BV-associated species. *Infection and immunity* 2024;92:e0037323.
- 12) Mestecky J, Russell MW. Induction of mucosal immune responses in the human genital tract. *FEMS immunology and medical microbiology* 2000;27:351-355.
- 13) Mohseni AH, Taghinezhad SS, Keyvani H. The First Clinical Use of a Recombinant *Lactococcus lactis* Expressing Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncogene Oral Vaccine: A Phase I Safety and Immunogenicity Trial in Healthy Women Volunteers. *Molecular cancer therapeutics* 2020;19:717-727.
- 14) Yoon SW, Lee TY, Kim SJ, Lee IH, Sung MH, Park JS, et al. Oral administration of HPV-16 L2 displayed on *Lactobacillus casei* induces systematic and mucosal cross-neutralizing effects in Balb/c mice. *Vaccine* 2012;30:3286-3294.
- 15) Yersin S, Vonaesch P. Small intestinal microbiota: from taxonomic composition to metabolism. *Trends in microbiology* 2024;32:970-983.
- 16) Takada K. IgA and the gut-vagina axis. *Frontiers in immunology* 2025;16:1547303.