

# 妊孕性の基盤となる炎症抑制性免疫細胞の発見

Identification of uterine resident immune cells which establishes immune tolerance to a semi-aiiogenic fetus for successful pregnancy

岐阜大学応用生物科学部 共同獣医学科 獣医外科学 准教授 宮脇 慎吾

## 要約

妊娠の成立には「胎仔抗原に対する免疫寛容」および「着床の場の形成」が必要であるが、その実体の多くは不明である。すなわち、妊娠時に母体はどのように胎仔抗原を認識し、その過程に子宮に常在する免疫細胞はどのように寄与するのか？という学術的な問いは解明されていない。申請者は、子宮内膜において、精子の貪食に特化したマクロファージ（Sperm phagocytic Macrophage: SpMΦと命名）を発見した。本研究提案では、SpMΦがどのように妊孕性に寄与するかを解明し、体外での分化後に妊娠時に移入するなどの新規不妊治療の開発を目指している。神澤医学研究振興財団の助成を受け、上記の問いに対してSpMΦの性質を解き明かす可能性を示す新しい知見を得ることが出来た。子宮を構成する免疫細胞をSingle cell RNA-seq（以下、scRNA-seqと略す）を用いて網羅的に解析したところ、現在までに報告されているすべての免疫細胞サブセットを確認することができた。さらに、SpMΦは抗炎症性の遺伝子を発現するクラスターに属することが見出された。実際にMHC不一致によるリンパ球の増殖を抑制し、T細胞の増殖を抑制する分子を複数発現していた。また、SpMΦを特異的に生体から除去すると妊孕性が破綻することが確認出来た。妊娠時の免疫寛容にはTregの子宮への集積が重要であると示唆されているが、SpMΦは複数のケモカインを高く発現することが明らかとなった。これらのデータにより、SpMΦはリンパ球の増殖抑制、Tregの集積の誘導によって妊娠時の免疫寛容に寄与する可能性が示唆された（図1）。

## 緒言

妊娠は、母体にとって「非自己」である胎児を体内に宿す神秘的な生命現象である。しかし、医療水準が世界トップレベルの日本においてさえ全妊婦の10-15%が流産を経験し、流産を繰り返す不育症の60%以上が原因不明である。妊娠の成立には、母体にとって「非自己」である精子や胎児抗原に免疫寛容を誘導する必要がある。妊娠時の免疫寛容には

Tregが必須であるが、どのように母体免疫系が精子や胎児抗原を認識し、特異的な免疫寛容を誘導するかは解明されていない<sup>1,2</sup>。また、自然免疫細胞に属するサブセットがどのように妊娠時の免疫寛容に寄与するかは未だ不明である。申請者は自然免疫系に着目し、子宮内膜における免疫細胞の探索を行った結果、精子を貪食し免疫寛容を誘導する自然免疫細胞であるSpMΦを発見した。

今回の神澤医学研究振興財団の助成を受け、申請者は「SpMΦが子宮内における重要な抗炎症性細胞であり、Tregの集積の誘導に関与する」可能性を明らかにした。以下に子宮における妊娠時の免疫システムに関する知見を記載する。

## 方法

本研究は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守するため、岐阜大学にて設置されている遺伝子組換え安全委員会、実

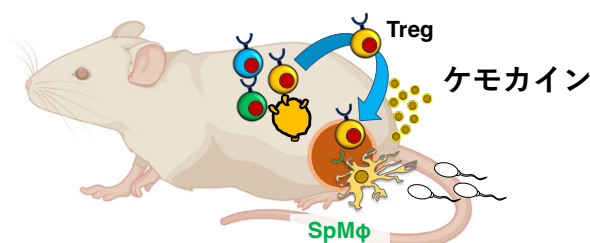


図1. SpMΦは精子の侵入を感知しTregの集積を介して妊娠時の免疫寛容を誘導する

子宮内膜において、精子の貪食に特化したマクロファージ（Sperm phagocytic Macrophage: SpMΦと命名）は制御性T細胞を呼び寄せ妊娠時の免疫寛容を誘導する。

験動物委員会の承認を受けた上で実施した。C57BL6雌マウス、BALB/c雄マウスはSLCから購入し、一週間馴化させた後に実験に使用した。妊娠マウスはC57BL6雌マウス、もしくはSpMΦ-DTRマウスとBALB/c雄マウスを終夜同居させ、膣プラグが翌朝確認出来た場合に妊娠0.5日目とした。着床数は妊娠6.5日に目で確認した。子宮、リンパ節からの免疫細胞の単離は、Collagenase D (Sigma) 2mg/ml in 1%FCS/RPMI1640を用いて行い、Trustain FcX Plus (Biolegend) でブロッキング後にそれぞれの抗原を蛍光標識抗体で細胞を染色した。フローサイトメトリーによる免疫細胞の解析とセルソーティングは、SH800 (Sony) と Cytoflex Srt (Beckman coulter) を用いて行った。Single cell RNA-seqは、10xGenomics社のChromium Next GEM Single Cell 3x Reagent Kitsを使用し、サンプルを調整した。その後、BGI社にてシーケンスの受託解析を行い、Cell rangerにてFastq解析を行った。FastqファイルをSeuratにより解析し、子宮全免疫細胞をクラスタリング、各クラスターにおける遺伝子発現解析を行った。

## 結果

### Single cell RNA-seqによる子宮常在性免疫細胞の網羅的解析

子宮における免疫システムを包括的に理解するために、子宮に存在する全免疫細胞を対象としてscRNA-seqを行った。興味深いことに、現在までに報告されているほとんどの免疫細胞が子宮に存在することに加え、SpMΦが特徴的なクラスターを構成することを突き止めた(図2)。その特徴として、免疫細胞の遊走を担うケモカインや、免疫抑制性マクロファージに特徴的な遺伝子を高く発現することが挙げられる。このことから、SpMΦ自身が抗炎症性の作用を持つこと、さらにはケモカインによってTregを子宮内膜に誘引することが考えられた。まず、SpMΦ自身の抗炎症性作用を検証するために、MHC不一致による拒絶反応を評価する混合リンパ球試験を行った。C57BL6マウスとBALB/cマウスのリンパ球を混合すると、MHC不一致による急激な増殖反応が起こるが、SpMΦの添加によってリンパ球の増殖が抑制される事を見出した。胎盤に存在する自然免疫細胞が類似の機能を持つと報告されているため、その細胞の本態はSpMΦである可能性があ

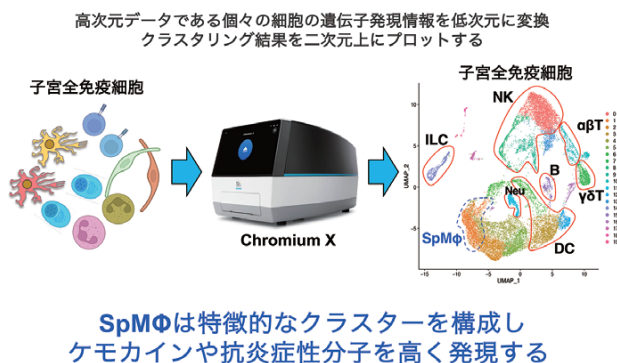


図2. シングルセルRNA-seqによる子宮全免疫細胞の網羅的解析

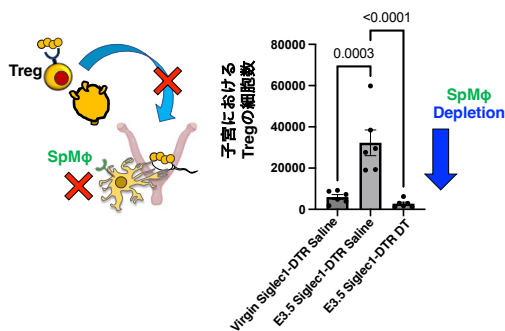
子宮内膜における全免疫細胞のSingle cell RNA-seqにより、SpMΦが特徴的なクラスターを構成することを突き止めた。Tregを呼び寄せるケモカイン、炎症抑制性分子を高く発現することが見出された。

る。その分子基盤として、SpMΦはリンパ球の増殖を抑制するIl-10などの分子を高発現する事を発見した。これらの免疫抑制分子はSpMΦに特異的に発現しており、子宮における抗炎症性細胞であることが示唆された。

### SpMΦはTregの集積を介して妊娠時の免疫寛容を誘導する

SpMΦに特異的に発現する遺伝子のプロモーター依存的にジフテリアトキシン受容体を発現する遺伝子組換えマウス(以下、SpMΦ-DTRマウスとする)を導入した。SpMΦ-DTRマウスではジフテリアトキシン(以下、DTと略す)の投与によりSpMΦを任意の時期に生体から除去できるため、妊娠時における機能を検証した。C57BL6を背景としたSpMΦ-DTR雌マウスとBALB/c雄マウスを交配し、DTの投与によりSpMΦの除去を行うと妊孕性が破綻することが明らかとなった。一方で、SpMΦ-DTR雌マウスとC57BL6雄マウスの交配では、SpMΦの除去をしても妊孕性は維持された。この結果は、ヒトにおける妊娠のように異なる系統のマウス間における交配の際にSpMΦが必須であることを示唆する。また、Tregを実験的に除去した際にも異なる系統のマウス間における交配でのみ妊孕性が破綻するため、SpMΦはTregを介した妊娠時の免疫寛容に必須であると考えられた<sup>3</sup>。

Tregは、免疫応答の調整や炎症の制御にも関与するT細胞のサブセットであり、妊娠においても重要な役割を果たしている。胎児は母体の免疫系に対して異物として認識される可能性があるが、妊娠を成



**図3. SpMΦはTregの子宮内膜への集積に必須である**  
子宮内膜におけるTregの細胞数を確認したところ、交配によって誘導される子宮内膜へのTregの集積が、SpMΦの除去によって阻害することが確認された。

功させるために免疫応答を調整して胎児の拒絶を防ぐ必要がある。Tregは妊娠中に増加し特に胎盤周囲に集積するが、これによって母体の免疫応答を抑制すると考えられている。Tregが適切に機能しない場合、胎児の異常や早産の原因となり得る。そのためTregを局所的に集積させるような生体システムの理解は不妊症や免疫関連の妊娠合併症の治療開発につながる可能性がある。これらのデータと既報を元に、TregがSpMΦの除去によってどのような影響を受けるのかを検証した。申請者はTregの誘導に影響があるのではないかと考え、子宮の所属リンパ節をフローサイトメトリーにより解析を行った。当初の仮説に反して、むしろ子宮の所属リンパ節ではSpMΦの除去によってTregが増えていた。次に、子宮内膜におけるTregの細胞数を確認したところ、交配によって誘導される子宮内膜へのTregの集積が、SpMΦの除去によって阻害されていた（図3）。これらのデータは、SpMΦはTregの誘導ではなく、子宮内膜局所への集積に必須であることを示唆している。この一連の実験結果と矛盾なく、SpMΦはTregの集積を誘導する複数のケモカインを非常に高く発現していることがscRNA-seqによっても裏付けられた。また、子宮に集積するTregはそれらのケモカイン受容体を複数発現することをフローサイトメトリーにより確認した。現在、これらのケモカインを欠損した遺伝子組換えマウスを作製中であり、子宮へのTregの集積と妊孕性への関与を確認する。

### SpMΦは精子の貪食によりケモカインを産生する

SpMΦは精子を貪食する細胞として当研究室にて発見されたが、精子の貪食がどのように免疫寛容の成立に関与するのかを検証した。この細胞は上記の

通り妊孕性に必須であり、ケモカインを介してTregを集積させ、妊娠時の免疫寛容機構を誘導する。申請者は、精子の子宮内への侵入をSpMΦが感知し、免疫細胞の遊走を担うケモカインを大量に産生しTregを子宮内膜へと集積させると仮説を立てた。SpMΦと精子の関係性を検証するため、未交配の雌マウスからSpMΦを回収し精子と共培養すると、精子を貪食したSpMΦはケモカインを大量に産生することが見出された。精子自身もケモカインを発現しており、SpMΦと共同でTregを子宮内膜に集積させることが考えられる。実際に不妊の男性の精子はケモカインの発現が低いことが報告されている<sup>4</sup>。今後、精子を貪食したSpMΦの遺伝子プロファイルをRNA-seqによって比較し、ケモカインの産生増強に関与する遺伝子群を同定する。この際、精子を貪食したSpMΦでのみ変化する遺伝子群に着目し、Treg集積の基盤となる分子メカニズムの解明を目指す。候補の遺伝子群が同定出来た場合、それらを欠損する遺伝子組換えマウスを作製する。作製したマウスの表現系は、ケモカインの産生、Tregの子宮内膜への集積、妊孕性に注目し評価する。

### 考察

妊娠は、父親由来の抗原に特異的な免疫寛容を誘導するシステムである。類似のシステムで免疫寛容を誘導すべき分子として、生体反応の過程で翻訳後修飾を受けた自己抗原、食物由来の分子などがある。それぞれの分子に対する免疫寛容が破綻すると、不妊、自己免疫疾患、食物アレルギーが起こり得る。また、人為的に特定の分子に対する免疫寛容を破綻させる事が出来れば、自己組織から発生したがんや老化細胞の免疫系による除去を誘導することが出来る。事実、SpMΦはがん組織内に浸潤し免疫抑制によってがんの増殖を促進するTissue-associated macrophage (TAM)に酷似した遺伝子群を発現する。また、SpMΦはHIVの細胞内への侵入に重要である受容体を複数発現する。精子を貪食することからもHIVの侵入経路、潜伏細胞である可能性も考えられる。SpMΦは子宮内膜にヘルパーT細胞を集積させるため、感染初期にSpMΦを除去しヘルパーT細胞へのHIV感染を防ぐといった発展も考えることが出来る。このように、SpMΦの免疫寛容機構の解明とその人為的制御は、自己・非自己の境界線定義の理解を深め、不妊に限らず様々な疾患の新規治療に繋がりをうる。

## 参考文献

1. Paolino, et al., RANK links thymic regulatory T cells to fetal loss and gestational diabetes in pregnancy, *Nature* 2020, 589, pages: 442–447
2. Rowe, et al., Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen, *Nature* 2012, 490, pages: 102–106
3. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice, *J Reprod Immunol*, 2010, Volume 85, pages: 121–129
4. Garcia-Herrero et al., The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not, *Fertility and Sterility* 2010, Volume 94, Issue 4Pages 1360-1373

## Abstract

The establishment of pregnancy requires immune tolerance to fetal antigens and the formation of the implantation site, but the underlying mechanisms remain unclear. Specifically, how the maternal body recognizes fetal antigens during pregnancy and how uterine resident immune cells contribute to this process had not been elucidated. We discovered specialized macrophages in the endometrium, Sperm phagocytic Macrophages (SpM $\Phi$ ), which are dedicated to engulfing sperm. This research proposal aimed to unravel how SpM $\Phi$  contributes to fertility and to develop novel infertility treatments, such as transplantation of SpM $\Phi$  during pregnancy after differentiation in vitro. With the support of the Kanzawa Medical Research Foundation grant, we gained new insights into the above questions. Using Single cell RNA-seq (scRNA-seq) to comprehensively analyze immune cells constituting the uterus, all previously reported subsets of immune cells were identified. Furthermore, SpM $\Phi$  was found to belong to a cluster expressing anti-inflammatory genes. SpM $\Phi$  suppressed the proliferation of lymphocytes due to major histocompatibility complex mismatch and express multiple molecules inhibiting T-cell proliferation. Additionally, the disruption of fertility was confirmed upon specific removal of SpM $\Phi$ . While the accumulation of regulatory T cells (Treg cells) in the uterus is suggested to be crucial for immune tolerance during pregnancy, SpM $\Phi$  was found to highly express various chemokines responsible for T reg cells accumulation. These data suggest that SpM $\Phi$  contribute to immune tolerance during pregnancy through the suppression of lymphocyte proliferation and induction of Treg accumulation.