

称号及び氏名	博士（獣医学）	武下 愛
学位授与の日付	平成26年3月31日	
論文名	マウス胎生期致死機構と胎子免疫寛容における adipsin の関与	
論文審査委員	主査	岡田 利也
	副査	玉田 尋通
	副査	山手 丈至
	副査	日下部 健

論文要旨

緒論

妊娠時の子宮における免疫反応は、他の臓器と同様、病原体や異物から母体や胎児を守る働きをしている。しかし一方で、母体組織に対して半同種移植片と見なすことが出来る胎児は、免疫寛容の環境下で分化・成長する。このため、胎盤内には独自の免疫抑制機構が存在すると考えられている。例えば、**CD4** 陽性ヘルパー**T** (**Th**) 細胞の **Th2** 傾倒や、制御性 **T** 細胞の存在、胎児由来の栄養膜細胞が産生するトリプトファン異化酵素の作用により、細胞傷害性 **T** 細胞の機能は著しく抑制されている。さらに栄養膜細胞は **MHC** クラス **II** および **Ia** を発現しておらず、免疫原性が抑制されている。

補体は全血清タンパク質の **10%** を占め、生体防御機構の主要要素である。補体活性化は体内に最も多く存在する補体成分 **C3** を中心として、古典経路、第二経路、レクチン経路により起こる。補体は妊娠時にも重要な役割を担っているとされ、補体抑制因子欠損マウスは胎盤内 **C3** 活性化により胎生期に死に至ることや、ヒトの習慣性流産の患者では血中および胎盤内で過剰な補体活性化が認められることが報告されている。しかし、補体活性化の機序や胎盤形成に与える影響は未だ不明である。

本研究では、補体活性化経路のなかでも抗原抗体反応非依存性で自然免疫を司り、さらに脂質代謝にも関与することが知られている第二経路に注目し、第二経路の最終転換

酵素である **adipsin** が胎生期致死機構と胎子免疫寛容に与える影響を明らかにすることを目的とした。第一章では胎子致死後の胎盤における補体活性と **adipsin** 発現の変化を、第二章では自然流産モデルマウスの胎盤内および体内環境と **adipsin** 発現の関連性を解析した。第三章では外因性 **adipsin** が妊娠に与える影響を調べ、胎子死機構における **adipsin** の役割を検討した。

第一章：C57BL/6J マウスの胎子死胎盤における補体の発現変化とその役割

比較的高頻度で胎生期致死が認められる **C57BL/6J** マウスを同系統間で交配し、胎子の死亡が確実に判定できる妊娠 **14.5** 日目において、正常な胎子発育がみられる着床部位（正常部位）と胎子が死に至っている着床部位（胎子死部位）の胎盤内の補体発現を比較し、その役割を検討した。

第一節 補体の発現変化

採取した胎盤からタンパク質を抽出し **western blotting** を行った。正常および胎子死部位の両胎盤において補体因子の発現が認められ、特に胎子死部位では **C3** および **adipsin** の有意な増加を認めた。一方で、胎子死部位では補体抑制因子 **Crry** の発現増加も確認された。ウサギ赤血球を用いた溶血反応により補体第二経路活性を測定すると、胎子死部位において **adipsin** 発現増加と関連した有意な上昇が認められた。

第二節 脂質代謝変化

Adipsin の発現と脂質代謝との関連性を検討するため、胎盤内の脂質保持状態と脂質代謝関連因子の **mRNA** 発現量を解析した。胎子死部位では正常部位と比較し、細胞内脂質小滴の増加とトリグリセリド (**TG**) 含有量の増加が見られたが、補体第二経路が関与する **ASP/C5L2** 経路上の各因子の発現に有意な差は認められなかった。

以上のことから、マウスの胎盤内では胎子の生死に関わらず補体が発現しており、さらに胎子死胎盤内では **adipsin** により補体第二経路が活性化していることが明らかになった。また胎子死後の組織再構築過程において **adipsin** は脂質代謝よりも免疫機構への関与が大きいことが示された。

第二章：CBA/J×DBA/2 自然流産モデルにおける補体の発現動態

DBA/2 雄マウスと交配させた **CBA/J** 雌マウス (**CBA/J×DBA/2** マウス) は高い胎子死率を示すため習慣性流産モデル動物として用いられており、胎子死率の低い **CBA/J×BALB/c** マウスとの比較によって胎生期致死を発症しやすい体内環境に関する多くの研究がなされてきた。そこで本章では妊娠 **14.5** 日目の **CBA/J×DBA/2** マウスの胎盤および全身の補体の発現動態を解析し、**CBA/J×BALB/c** マウス (コントロールマウス) と比較することで、**CBA/J×DBA/2** マウスが持つ体内環境と補体の関連性について検討した。

第一節 胎盤内における補体活性化因子の発現変化

Western blotting により正常胎盤内の補体発現量を解析すると、**CBA/J×DBA/2** マウスではコントロールマウスと比べ、**C3** および **adipsin** の発現が増加していた。しかし第二経路のもう 1 つの活性化因子 **factor B** の発現量に有意な差は認められなかった。免疫染色により正常部位では、間膜腺、迷路部の栄養膜合胞体層の母体血液洞に面する側、および母体血漿に **C3** と **adipsin** が局在していた。胎子死部位では迷路部構造の崩壊が見られ、補体の陽性反応が迷路部全体に拡散していた。

第二節 全身における補体の発現動態

胎盤内の補体発現と全身における発現動態の関連性を検討するため、血清中の補体成分について **western blotting** により解析した。**CBA/J×DBA/2** マウスではコントロールマウスに比べ、血清中においても **adipsin** の増加が見られた。そこで妊娠期の **CBA/J×DBA/2** マウスの **adipsin** 産生臓器を検討すると、胎盤や肝臓に比べ乳腺での **mRNA** 発現が多かった。

第三節 補体抑制因子 **Crry** の発現動態

胎盤内と血清中の **Crry** 発現を **western blotting** により解析した。**CBA/J×DBA/2** マウスの正常胎盤では、コントロールマウスの正常胎盤と比べ、**Crry** の有意な増加が見られた。しかし胎子死部位では増加は認められず、血中濃度にも有意な差は認められなかった。

以上のことから、本モデルマウスの体内および胎盤内環境に **adipsin** が関与していることが明らかになった。正常胎盤では胎盤関門が胎子血管への補体の流入を防いでいるが、胎子死部位では局所的な補体抑制機構の低下と補体因子の動員により栄養膜合胞体層が傷害され胎子側へ補体成分が流入、急激な補体活性化と組織傷害が起きている可能性が示された。さらに胎盤内の補体第二経路の活性化は、胎盤外の組織で産生・分泌された **adipsin** により誘導されていると推察された。

第三章：血中の **adipsin** 増加が胎盤および胎子に与える影響

CBA/J×DBA/2 マウスでは、血清中の **adipsin** 濃度に変化が認められた。加えて、妊娠初期に **Crry** タンパク質や抗補体抗体を投与することで胎子死率が減少するという報告がある。本章では **adipsin** が自然流産の誘発因子であると仮定し、第二章のコントロールである **CBA/J×BALB/c** マウスの妊娠 4.5 日目にリコンビナント **adipsin** タンパク質 2.5 μg /匹を投与し、妊娠 14.5 日目に血清および子宮を採取し、妊娠維持に与える影響を検討した。本章では **PBS** を投与した **PBS** 投与群を対照として用いた。

第一節 胎盤形成および胎子発育に与える影響

胎子死率は **adipsin** 投与群 $24.4 \pm 2.7\%$ 、**PBS** 投与群 $7.7 \pm 4.6\%$ となり有意に上昇した。また **adipsin** 投与群では胎盤の厚さと胎子重量に増加が認められた。組織学的

解析により、**adipsin** 投与群の正常部位では **PBS** 投与群では見られない **vimentin** 陽性細胞が観察され、胎子死部位の迷路部では膠原線維の蓄積や線維素の析出が認められた。

第二節 胎盤内におけるサイトカイン発現変化

リアルタイム **PCR** により、胎盤形成に重要なサイトカイン発現を解析した。**Adipsin** 投与群の正常部位では、**PBS** 投与群の正常部位に比べ、血小板増殖因子 **PDGF** と **Th1** サイトカインの **IFN- γ** の増加、**Th2** サイトカインの **IL-4** の減少が認められた。

第三節 胎盤内の脂質代謝変化

正常胎盤内における脂質代謝変化について解析を行った。**Adipsin** 投与群では **TG** 含有量が増加傾向にあったが、**adipsin** が関連する **ASP/C5L2** 経路の各因子の **mRNA** 発現量に変化は見られなかった。また **TG** を遊離脂肪酸に分解するホルモン感受性リパーゼの有意な発現増加が認められた。

以上のことから、妊娠初期の血中 **adipsin** 濃度増加により胎盤内の補体が活性化し、結合組織増生、**Th1/Th2** サイトカインの **Th1** 傾倒や血管傷害が生じ、胎子死を引き起こすと推察された。さらに胎盤内の脂質代謝が変化し、胎盤の肥厚や胎子重量の増加に繋がったと考えられた。

総括

1. 胎盤内では胎子の生死に関わらず、恒常的に補体活性化因子および抑制因子が発現していることが明らかにした。
2. 自然発症した胎子死胎盤では、補体 **C3** および第二経路活性化因子 **adipsin** の増加によって炎症反応を惹起し組織再構築を促進すると同時に、補体抑制因子 **Crry** が局所的に発現し過剰な補体活性を抑制している可能性を示した。
3. 自然流産モデルマウスにおける胎子死を発症しやすい体内および胎盤環境の形成に **adipsin** が深く関わることを示した。
4. 補体発現が増加傾向にある妊娠母体では、胎盤局所での **Crry** の減少が胎子死の誘発に関与することを示した。
5. 血中の **adipsin** 増加が胎子死の原因となることを明らかにし、胎盤内の補体第二経路活性化において **adipsin** が重要な活性化因子である可能性を示した。
6. 血中の **adipsin** 増加により胎盤内の **Th** サイトカインバランスおよび脂質代謝が変化し、胎盤の形態や胎子発育に影響を与えることを明らかにした。

本研究により胎生期致死機構および胎子免疫寛容の機序の一端が明らかになった。この成果は哺乳類の生殖様式の解明やヒト流産の予防医学に貢献することが予想される。

審査結果の要旨

妊娠子宮における免疫反応は、病原体や異物から母体や胎児を守る働きをしている。胎児は母体組織に対して半同種移植片と見なすことができ、母体の免疫学的侵襲を受けても不思議ではない。このことから、胎児が母体内で分化・成長するために、胎盤内では独自の免疫抑制機構が働いていると考えられる。補体は全血清タンパク質量の **10%** を占め、その活性化が生体防御機構において重要な役割を果たしている。補体活性化は体内に最も多く存在する補体 **C3** を中心として起こり、主な活性化の経路には古典経路、第二経路、レクチン経路の3つが存在する。古典経路は抗原抗体複合体が補体 **C1q** に結合することで起こり、レクチン経路は細菌のマノース結合レクチンに反応して起こる。第二経路には他の経路とは異なり、特定のイニシエータが存在しない。恒常的に低活性化状態にある補体 **C3** が補体活性化因子 **factor B** および **adipsin** により活性化され、活性化された補体が活性化経路の上流にフィードバックする特有の増幅経路を持つ。胎盤内においてもこれら補体の免疫機構は重要な役割を担っていると考えられる。さらに習慣性流産を示す母体では過度な補体活性化が認められること、胎児死の原因になり得る妊娠高血圧症候群や抗リン脂質抗体症候群では胎盤内に補体 **C3** が沈着することが報告されているが、第二経路による補体活性化が胎盤形成に与える影響やそのメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では補体活性化第二経路の最終転換酵素である **adipsin** に着目し、自然発症したマウスの胎子死胎盤における **adipsin** の局在と補体活性及び補体成分の発現動態を調べた。さらに補体第二経路が関与すると言われている脂質代謝への影響を解析し、胎生期致死機構における **adipsin** の役割を検討し、以下の成果を得た。

第1章では比較的高頻度で自然流産が認められる **C57BL/6J** マウスを用い、正常な胎子発育が認められる着床部位と胎子死部位の胎盤における補体活性化の中心である補体 **C3**、第二経路活性化因子である **adipsin**、および補体抑制因子で妊娠維持に必須である **Crry** の発現を比較し、それらの役割を検討した。胎盤から抽出したタンパクを **western blotting** により解析したところ、正常および胎子死部位の両胎盤において補体 **C3**、**adipsin**、および **Crry** の発現が認められ、さらに胎子死部位ではこれらの発現が有意に増加した。胎子死部位では **adipsin** 発現増加と関連したウサギ赤血球を用いた溶血反応の有意な上昇が認められ、胎子死胎盤内では **adipsin** により補体第二経路が活性化していることが示唆された。さらに、補体第二経路活性化が関与する **ASP/C5L2** 経路を介した細胞内での脂肪蓄積を調べたが、**ASP/C5L2** 経路に関わる脂質代謝関連因子の **mRNA** 発現量に有意な差は認められなかった。このことは、胎子遺残物が完全に吸収されている胎子死部位での **adipsin** の働きは脂質代謝よりも免疫機構への関与が大きいことを示す。

第2章では **CBA/J×DBA/2** マウス（習慣性流産モデル動物）の胎盤および全身の補体

の発現動態を解析し、このマウスが持つ体内環境と補体との関連性について検討した。胎子死率の低い **CBA/J**×**BALB/c** マウスをコントロールとして用いた。**CBA/J**×**DBA/2** マウスの胎盤内ではコントロールと比較して、補体 **C3** および **adipsin** の発現が増加していること、胎子死部位では栄養膜細胞の傷害により胎子側へ補体成分が流入、大量の胎子抗原に暴露され、急速な補体活性化と活性増幅が起きている可能性が示された。血清濃度においても **adipsin** の増加が見られた。胎盤内の **Crry** 発現は **CBA/J**×**DBA/2** マウスの正常胎盤において増加していたが、胎子死部位では増加は認められず、血中濃度にも有意な差は認められなかった。このことから局所における **Crry** 発現が胎盤内の補体活性を抑制している可能性が示唆された。

第3章では **adipsin** が自然流産の誘発因子であると考え、**CBA/J**×**BALB/c** マウスにヒトリコンビナント **adipsin** タンパクを投与し、妊娠に与える影響を検討した。妊娠 4.5 日目に **adipsin** タンパク 2.5 µg/匹を尾静脈より投与し、妊娠 14.5 日目に子宮を採取し、胎子死率を算出した。同じ組み合わせのマウスに実験群と同様の方法で **PBS** を投与したものを対照群とした。**Adipsin** 投与によって胎子死率の有意な上昇および胎盤の厚さと胎子重量の増加が認められた。**Adipsin** 投与により正常胎盤内における血小板増殖因子 **PDGF** の増加と **Th** サイトカインの **Th1** 傾倒が認められた。妊娠初期の血中 **adipsin** 濃度増加により胎盤内の補体が活性化し、血管傷害、結合組織増生や **Th1/Th2** アンバランスが生じ、胎子死を引き起こすと推察された。一方、**adipsin** 投与により **ASP/C5L2** 経路の上昇傾向が見られ、またトリグリセリドを遊離脂肪酸に分解するリパーゼの有意な発現増加が認められた。このことから、**adipsin** 投与により胎盤内の脂質代謝が変化し、胎盤の肥厚や胎子重量の増加に繋がったと考えられた。

以上、本研究は胎盤内では恒常的に補体第二経路活性化因子 **adipsin** および抑制因子 **Crry** が発現しており、自然発症胎子死、自然流産モデルマウスにおける胎子死を発症しやすい体内および胎盤環境に **adipsin** の増加が、胎子死の誘発に胎盤局所での補体抑制因子 **Crry** の減少が深く関わることを示し、胎生期致死機構ならびに胎子免疫寛容の機序の一端を明らかにした。これらの成果は、哺乳類の生殖様式の解明やヒト流産の予防に繋がるものであり、医学、獣医学の発展に貢献するものである。本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。