

論文内容の要旨

Inappropriate activation of invariant natural killer T cells and antigen-presenting cells with the elevation of HMGB1 in preterm births without acute chorioamnionitis

絨毛膜羊膜炎を伴わない原因不明早産の解析
自然免疫制御による新たな早産予防を探る

日本医科大学大学院 医学研究科 女性生殖発達病態学分野

研究生 加藤 雅彦

American journal of reproductive immunology (2020) 掲載予定

DOI: 10.1111/aji.13330

早産は児の予後を大きく左右する重要な疾患である。これまで病原体感染に起因する絨毛膜羊膜炎(chorioamnionitis: CAM)はその主要原因と考えられてきたが、近年病理学的 CAM を伴わない早産がかなりの割合を占めることが見いだされ、これらは原因不明に分類される。最近様々な分野で damage-associated molecular patterns (DAMPs)、またはアラミンと称される内因性リガンドが惹起する「無菌性炎症」という概念が注目されている。そこで申請者はこの無菌性炎症が胎盤内で生じ、原因不明早産の原因になるという仮説を立て、CAM を伴わない早産脱落膜中の免疫細胞解析を行った。

本研究では妊娠 24 週 0 日から妊娠 33 週 6 日で分娩に至った病理学的 CAM を伴わないヒト早産症例について、陣痛もしくは破水などの分娩兆候を有する群と有さない群に分類して解析した。分娩後の胎盤壁側脱落膜(decidua parietalis: DP)、基底脱落膜(decidua basalis: DB) を採取しここに含まれる免疫細胞群および表面抗原の発現をフローサイトメーターを用いて解析した。また 37 週以降の予定帝王切開で得られた陣痛、破水を伴わない胎盤脱落膜より分離した抗原提示細胞、invariant natural killer T (iNKT) 細胞を high-mobility group box 1 (HMGB1) の存在下で共培養し、iNKT 細胞の増殖を評価した。

樹状細胞、マクロファージ、CD8⁺ T 細胞、CD4⁺ T 細胞、NK 細胞、(iNKT)細胞の分布を解析したところ、分娩兆候を有さない群に比して分娩兆候を有する群では DP における iNKT 細胞の有意な増加を認めた。iNKT 細胞は自然免疫に属し、その数は少ないながらも迅速に且つ大量のサイトカイン、細胞障害性因子を放出し得る免疫細胞群である。樹状細胞、マクロファージなどの抗原提示細胞に関しては、その数の割合は各群で有意差を認めなかったものの、分娩兆候を有する DP 内では Toll-like receptor (TLR) 4、receptor of advanced glycation endproducts (RAGE)、CD1d の発現亢進が認められた。

ここで申請者は、TLR4、RAGE に共通するリガンドである HMGB1 に着目した。HMGB1 は核タンパクであり通常は DNA を屈曲させその構造維持に関与しているが、細胞障害などのストレスにより細胞質、細胞外に放出され無菌性炎症を惹起する。そこで脱落膜中の細胞質内の HMGB1 を検索したところ、樹状細胞、マクロファージ、および非免疫細胞内の HMGB1 濃度は分娩兆候を有する群において有意に上昇していた。

これらの結果は、CAM を有さない早産の破水、陣痛発来起点には、HMGB1 により抗原提示細胞の免疫刺激活性が亢進され、iNKT 細胞の集積、活性化が亢進されるというメカニズムを示唆する。これをさらに検証するため、正常産の予定帝王切開症例の胎盤から磁気ビーズ法を用いて iNKT 細胞、抗原提示細胞を分離、これらをリコンビナント HMGB1 の存在の元共培養したところ、*in vivo* の結果と同様 iNKT 細胞の増殖が亢進された。

抗原提示細胞は CD1d-T 細胞受容体相互作用、及び IL-12 や IL-18 などのサイトカインを介して直接、間接的に iNKT 細胞の活性に関わる。さらに近年、流産防止目的で使用されるヘパリンは、HMGB1 と RAGE の結合阻害をして抗炎症効果を発揮する報告がある。そこで上記の共培養系に HMGB1 とともに抗 CD1d 抗体、IL-12 抗体、抗 IL-18 抗体、ヘパリンを添加したところ、ヘパリン添加群では iNKT 細胞増殖の抑制が確認された。有意な差はなかったものの、IL-12

抗体添加でも同様の傾向が観察された。

これらの結果より、CAM を伴わない早産の分娩開始起点には、内因性抗原である HMGB1 の増加、および抗原提示細胞の免疫刺激活性亢進や iNKT 細胞の集積といった、アラミンと自然免疫系が深く関与する可能性が示された。現在、抗リン脂質抗体症候群に起因した不育症には、ヘパリン療法が行われている。このヘパリンには抗凝固作用のみならず抗炎症効果もあると考えられているが、その作用点は不明のままであった。本研究ではHMGB1-RAGE相互作用の阻害にヘパリンが有効である可能性も示され、ヘパリンは流産のみならず早産予防法の一つの選択肢になるかもしれない。以上本研究により **HMGB1** や自然免疫系による無菌性炎症は原因不明早産の一因である可能性が示された。今後内因性抗原や自然免疫制御といった新しい治療戦略への布石となる研究結果となった。