

氏名	ながやま しほ 永山 志穂
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 797号
学位授与年月日	令和 2年 12月 4日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第4条第3項該当
学位論文名	早発型妊娠高血圧腎症における末梢血中の形質細胞様樹状細胞の減少
論文審査委員	(委員長) 教授 佐藤 浩二郎 (委員) 教授 高木 健次郎      講師 唐澤 直義

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

妊娠高血圧腎症 (preeclampsia; PE) は、妊娠高血圧症候群 (hypertensive disorders of pregnancy; HDP)の一病型であり、妊娠 20 週以降に初めて高血圧を発症し、かつ、蛋白尿を伴うものをいう。また、加重型妊娠高血圧腎症 (superimposed preeclampsia; SPE)とは、主に慢性高血圧 (chronic hypertension)を合併した妊婦において、妊娠 20 週以降に、蛋白尿を伴うものをいう。今回の検討では、PE と SPE を合わせて PE と称する。妊娠 34 週までに発症した場合を早発型 PE (early-onset preeclampsia; EOPE)、妊娠 34 週以降に発症した場合を遅発型 PE (late-onset preeclampsia; LOPE) と分類した。EOPE は LOPE より母体合併症及び胎児発育不全の発症率が高率であり予後不良と考えられている。

PE の病因の全容は解明されていないが、妊娠初期のらせん動脈リモデリング障害が提唱されている。らせん動脈リモデリング障害により子宮胎盤循環不全が生じ、血管新生抑制因子や炎症性サイトカインが産生される。その結果、末梢血液中の白血球などが活性化し炎症が生じる。最終的に、血管内皮細胞障害が惹起され、高血圧や蛋白尿を生じると考えられている。本研究は、PE 病態の後半に発生する炎症に関係する免疫異常に焦点を当てた。

PE 患者では末梢血中制御性 T (Treg) 細胞が減少し、ヘルパー T17 (Th17) 細胞が増加することが知られているがこの変化がなぜ起こるか不明である。今回我々は上記変化につながる可能性のある形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells; pDCs)、骨髄系 DCs (myeloid DCs; mDCs) の変化に着目した。PE における pDCs と mDCs の変化に関して既報が 2 編あり、ひとつの報告では pDCs と mDCs は、正常妊娠と PE で差が無いとされていた。もうひとつの報告では正常妊娠よりも PE で pDCs は低く、mDCs は高かった。このように、PE において pDCs/mDCs が変化しているかどうかはまだ不明であった。加えて、EOPE・LOPE における pDCs/mDCs の変化は今まで報告されていなかった。今回、我々は、T 細胞サブセットの変動に関連して pDCs/mDCs が PE において変化し、特に EOPE では LOPE に比べ、pDCs/mDCs の変化が顕著であると仮説を立てた。本研究の目的は、(1)妊婦における pDCs/mDCs、Th17 細胞、Th1 細胞、及びナチュラルキラー (NK) 細胞の測定系を構築すること、(2)非妊婦、正常妊婦 (妊娠 19~29 週、35~37 週)、PE 妊婦 (EOPE 及び LOPE) における pDCs/mDCs、Th17 細胞、Th1 細胞、及び NK 細胞比率を比較すること、(3)上記免疫細胞比率と妊娠週数、pDCs/mDCs と Th17 細胞

との間の相関を検討すること、とした。

## 2 研究方法

非妊婦 13 名、正常妊婦 50 名（妊娠 19～29 週：36 名、妊娠 35～37 週：14 名）、EOPE 13 名、LOPE 10 名の合計 85 名を対象とした。同意書を取得後に、全患者から 10 mL 採血した。末梢血から単核球を分離後、細胞表面マーカーを用いて染色した。上記 5 群の末梢血中 pDCs/mDCs、Th17 細胞、Th1 細胞、NK 細胞数を BD LSRFortessa™ Cell Analyzer で測定し、Flowjo で解析した。結果は、中央値（四分位範囲）または個数（パーセント）で表した。連続変数は、Mann-Whitney テストあるいは Kruskal-Wallis テストで比較した。多群間の比較には、Steel-Dwass 法を用いた。また、離散変数は、Fisher 直接検定あるいは  $\chi^2$  テストで比較した。多群間の比較には、Bonferroni 法を用いた。相関は Pearson 法で求めた。統計解析は Prism8 あるいは EZR で行い、P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとした。

## 3 研究成果

(1) 表面抗原を染色することにより、5～6 カラーフローサイトメトリーを用いた NK 細胞、Th17 細胞、Th1 細胞、及び DCs(pDCs/mDCs)の測定系を確立した。(2) 末梢血液中における全 DCs は非妊婦よりも正常妊娠例（19～29 週）で少なかった（1.6% vs. 0.77%,  $p = 0.045$ ）。pDCs は EOPE で正常妊娠例（19～29 週）よりも有意に低く（4.1% vs. 19.0% [ $p = 0.025$ ]）、細胞数でも有意に低かった（3.358 vs. 11.47 [ $p = 0.0015$ ]）。一方、mDCs は EOPE で正常妊娠例（19～29 週）よりも有意に高く（95.9% vs. 80.0% [ $p = 0.027$ ]）、細胞数では有意差を認めなかった。Th17 細胞は EOPE で正常妊娠例（19～29 週）よりも有意に高く（1.2% vs. 0%,  $p = 0.022$ ）、Th1 細胞はどの群間にも有意差を認めなかった。NK 細胞はどの群間にも有意差を認めなかった。(3) 正常妊娠と PE における全 DCs 中の pDCs/mDCs の割合と妊娠週数の間に相関関係はなかった。pDCs と Th17 細胞との間には、有意な逆相関を認めた。（ $r = -0.369$ ,  $p = 0.023$ ）。

## 4 考察

### ・ EOPE における妊娠免疫と pDCs との関連性について

妊娠免疫の面で、胎盤と胎児は同種異系抗原であり、妊娠が終了に向かうに従い胎児抗原が暴露される危険性が急増する。PE の病態にも妊娠免疫の異常が関与していると推測されている。pDCs は臓器移植後の免疫維持に重要であり、移植片に対する免疫寛容が不十分である場合、pDCs が低下している。今回の研究においても同様に EOPE では pDCs が低下していた。pDCs の低下が免疫寛容の低下を引き起こした可能性が推測される。

### ・ EOPE と Th17 細胞、Th1 細胞について

EOPE では Th17 細胞の割合は正常妊娠と比較して高かった。これまでに Th17 細胞は PE で増加することや、LOPE よりも EOPE で増加することが報告されている。本研究では LOPE での Th17 細胞の割合は高かったが有意差には至らなかった。これは、LOPE の検体数が少なかったことが原因と考えられる。Th1 細胞が PE で多いことは以前より多数報告されているが、本研究における Th1 細胞の割合に有意差はなかった。本研究では、初めて PE 妊婦における Th1 細胞の解析方法として表面マーカー（CD3+CD4+CD8-CD183+CD196-）のみを用いたが、このことが今

回の結果に影響した可能性があるかもしれない。今後さらなる検討が必要である。

・EOPEにおけるpDCs/mDCsとTh17細胞/Th1細胞との関連について

本研究では、EOPEで正常妊娠と比較しpDCs比率は低く、細胞数でも低下していた。mDCs比率は高かったが、細胞数に有意差はなかった。すなわち、EOPEではpDCsは減少しているが、mDCsは増加しているかどうかは不明である。

正常妊娠マウスでは妊娠後、傍大動脈リンパ節でpDCsが増加し、cDCs(conventional DCs)は減少し、Treg細胞は増加する。一方、IFN- $\gamma$ 投与下妊娠マウスでは、傍大動脈リンパ節と脱落膜でpDCsは減少し、cDCsは増加し、Treg細胞は減少する。pDCsが正常妊娠で増加し、PEで減少する機序については未だ不明であるが、正常妊娠の維持にはpDCsとTreg細胞が関与している可能性が考えられる。

mDCsはIL-12、IL-1 $\beta$ 、IL-6を産生しTh1細胞とTh17細胞を誘導する。既報より、PE妊婦ではDCsからのTh17細胞とTh1細胞の誘導能が強いことが示唆されている。今回の報告ではmDCsの細胞数に有意差がなかったが、mDCsのサブセットが変化していた可能性はあるかもしれない。mDCsの2つのサブセットのうち、CD1c<sup>+</sup>mDCsはTh1細胞やTh17細胞を強く誘導する。一方、CD141<sup>+</sup>mDCsはTh1細胞とTh17細胞の誘導能は弱い。PEにおけるmDCsサブセットの変化についての報告は今までなく、今後さらなる検討が望まれる。

Treg細胞はIL-6の存在下でTh17細胞に変化するが(可塑性)、mDCsからIL-6が分泌されており、これがTreg細胞をTh17細胞に変化させているのかもしれない。本研究ではpDCs比率とTh17細胞比率間に負の相関を認めた。PEではTreg細胞が減少しTh17細胞が増加するが、そのメカニズムの一つに、pDCs低下が関連しているのかもしれない。

このような免疫細胞の変化には、微小因子の関与が示唆されている。PEでは胎盤でアポトーシスが発生し、血管新生抑制因子だけでなく胎盤からplacental debrisが母体血中に放出される。placental debrisのひとつにsyncytiotrophoblast micro particles(STBMs)が挙げられる。STBMsは単球に取り込まれて炎症反応が起こり、Th17細胞や顆粒球が活性化することで、炎症性サイトカインが分泌される。STBMsを感知するのはtoll-like receptor (TLR)であることが知られており、DCsもTLRを有することから、STBMsはDCsにも影響し、PEにおけるpDCs/mDCsの割合を変化させるのかもしれない。

## 5 結論

本研究で、(1)5~6カラーフローサイトメトリーによる、NK細胞、Th17細胞、Th1細胞、DCs(pDCs/mDCs)の測定系を確立した。(2)EOPEでは、正常妊娠と比較して、末梢血中のpDCsの割合は低く、mDCsの割合は高いことを示した。細胞数では、pDCs数は正常妊娠20~29週と比較し、EOPEで低く、mDCs数は変わらなかった。(3)pDCsとTh17細胞の間には、有意な逆相関を認めた。PEではTreg細胞が減少し、Th17細胞が増加する。これらT細胞の誘導にpDCsとmDCsのバランス異常が関連し、PEの病態に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本学位論文では、妊娠高血圧腎症(PE)の病態を理解する目的で、患者および対照群の末梢血中の免疫担当細胞を解析している。それは PE において、母体-胎児間の免疫寛容の異常が関与する可能性が示唆されているためである。具体的には、末梢血中の Th17 細胞、NK 細胞と、形質細胞様樹状細胞(pDC)、骨髄系樹状細胞(mDC)の比率をフローサイトメトリー法を用いて定量している。その結果、早発型 PE(EOPE)において pDC の比率が、正常妊娠例に比べて有意に低いこと、また Th17 細胞の比率は逆に優位に高いことを示した。mDC の比率は、pDC のそれと鏡面関係にあるため、EOPE において統計学的に有意に増加していたが、mDC の単位体積当たりの数については有意差を認めなかった。また Th1 細胞、NK 細胞の比率についても有意な差を認めなかった。これらの結果から、pDC の減少が Th17 細胞の増加をもたらす、PE の病態につながる可能性を申請者は考察している。また、PE において制御性 T 細胞(Treg 細胞)が減少していることが過去に報告されていることから、pDC の減少が Treg 細胞の減少をもたらす、その結果 Th17 細胞が増加しているのではないかという考察もしている。

本論文の限界点としては、(1) 末梢血が、病態の中心となる部位（ここでは胎盤）の免疫応答の異常をどれだけ反映しているのかがはっきりしないこと (2) 解析数が少ないことによって有意差が出ていないことがあり得るといふ検出力の問題 (3) EOPE における pDC の比率が Th17 細胞の比率と逆相関にあるという相関関係は示されるものの、pDC の減少が Th17 細胞の増加の原因であるという「因果関係」までは示すことができていないこと などが挙げられるが、それらの問題の解決はいずれも容易ではない。論文の修正点としては(1) 各 DC の比率だけでなく、単位体積当たりの数の追加 (2) Th17 細胞に加えて Th1 細胞のデータの追加 などを指示した。それらの修正を経て、論文の主張に大きな変更はない。PE の病態解明は臨床上重要な課題であることから、本研究には十分の新規性と意義が認められると判断し、学位論文として適切であるという結論に至った。

## 試問の結果の要旨

申請者の発表は、提出した学位論文に沿って行われた。それに対する審査員の質疑としては、具体的には

- (1) 末梢血は胎盤の状況をどの程度反映すると考えられるか
- (2) mDC, pDC はどのような細胞から分化するのか
- (3) Th1/Th17 の違いについて どのような役割の違いがあるのか
- (4) NK 細胞を解析した理由
- (5) mDC, pDC の単位体積あたりの数
- (6) 統計量の取り扱い、特に多重比較の方法について、および p 値の取り扱いについて

などの質問があり、それぞれに対して申請者は学位論文の内容に沿った回答をし、また一部回答できなかった部分については学位論文に追記をすることになった。総合的に判断して、学位取得に十分な内容であるという点で審査員全員の意見の一致をみた。