

表 題 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

論文の区分 論文博士

著 者 名 永山 志穂

所 属 自治医科大学産科婦人科学講座

2020年8月5日申請の学位論文

紹 介 教 員 地域医療学系 専攻 生殖医学
職名・氏名 教授・大口昭英

目次

略語一覧

緒言

研究背景

1. 妊娠高血圧腎症 (preeclampsia; PE) の概要
2. 正常胎盤の構築
3. PE における子宮胎盤循環不全及び血管内皮障害
4. PE における母体免疫系の変化
5. PE における DCs と Th 細胞の関連について
6. PE と NK 細胞の関連について
7. PE の発症時期による免疫細胞の変化について
8. 胎盤免疫細胞と末梢血免疫細胞の関連

研究目的

対象と方法

- ・ 対象患者 (非妊娠、正常妊娠：妊娠 19～29 週、妊娠 35～37 週、EOPE、LOPE の 5 群) および倫理的配慮
- ・ 5～6 カラーフローサイトメトリーを用いた DCs (pDCs/mDCs)、Th17 細胞、Th1 細胞、及び NK 細胞の測定系の確立
- ・ PE、SGA 児、FGR の定義
- ・ 統計学的解析

結果

1. 患者背景
2. DCs、pDCs/mDCs 割合の 5 群間での比較、pDCs/mDCs の細胞数の 4 群間での比較、EOPE における pDCs と FGR の関係、pDCs/mDCs と妊娠週数の相関
3. Th17 細胞割合の 5 群間での比較、Th1 細胞割合の 5 群間での比較、Th17 細胞と pDCs の相関
4. NK 細胞割合の 5 群間での比較

考察

1. 本研究の結果の要約
2. EOPE における妊娠免疫と pDCs との関連性について
3. EOPE と Th17 細胞、Th1 細胞について
4. EOPE における pDCs/mDCs と Th17 細胞/Th1 細胞との関連について

- 4.1 正常妊娠における pDCs、mDCs、Treg 細胞について
- 4.2 EOPE における mDCs、Th1 細胞、Th17 細胞の関連
- 4.3 EOPE における Treg 細胞と Th17 細胞について
- 4.4 DCs に影響を与える因子について
5. 5～6 カラーフローサイトメトリーを用いた DCs (pDCs/mDCs)、Th17 細胞、Th1 細胞、及びNK 細胞の測定系の確立
6. 本研究の限界と展望

まとめ

謝辞

参考文献

略語一覧

ART, assisted reproductive technology
ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain
cDCs, conventional dendritic cells
CDP, common dendritic cell progenitor
DAMPs, danger/damage-associated molecular patterns
DCs, dendritic cells
dNK, decidual natural killer
EOPE, early-onset preeclampsia
EVT, extravillous trophoblast
FGR, fetal growth restriction
FMO, fluorescence minus one
FSC, forward scatter light
HDP, hypertensive disorders of pregnancy
HMGB1, high mobility group box protein 1
IFN, interferon
IL, interleukin
LOPE, late-onset preeclampsia
mDCs, myeloid dendritic cells
MNCs, Mononuclear cells
MSU, monosodium urate
NK, natural killer
NLRP3, Nod-like receptor protein 3
NRFS, non-reassuring fetal status
pDCs, plasmacytoid dendritic cells
PE, preeclampsia
PlGF, placental growth factor
sEng, soluble endoglin
sFlt-1, soluble fms-like tyrosine kinase 1
SGA, small-for-gestational-age
SPE, superimposed preeclampsia
SSC, side scatter light
STBMs, syncytiotrophoblast micro-particles
TGF- β , transforming growth factor- β
Th1, T helper 1
Th2, T helper 2
Th17, T helper 17

TLR, toll-like receptor

TNF- α , tumor necrosis factor- α

Treg, regulatory T

VEGF, vascular endothelial growth factor

VT, villous trophoblast

緒言

研究背景

1. 妊娠高血圧腎症 (preeclampsia; PE) の概要

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¹。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¹。上記の定義は 2013 年に定められたものであり、2018 年より上記の診断基準に加え、“妊娠 20 週以降に初めて発症した高血圧に蛋白尿を認めなくても関連疾患 (基礎疾患の無い肝機能障害、進行性の腎障害、脳卒中、神経学的障害、血液凝固障害、胎児機能不全) のいずれかを認める場合で、分娩 12 週までに正常化する場合”、または“妊娠 20 週以降に初めて発症した高血圧に蛋白尿を認めなくても子宮胎盤機能不全 (胎児発育不全 [fetal growth restriction; FGR]、臍帯動脈血流波形異常、死産) を伴う場合”も PE と診断されるようになった²。今回の研究は 2014 年に開始しており、2018 年に追加になった診断基準は含めず、旧定義の PE と SPE のみを対象とした。

PE は発症時期により 2 つの型に分類され、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) とする³。EOPE は LOPE より母体合併症や FGR の発症率が高率であり予後不良である^{4,5}。

PE では、FGR、胎児機能不全 (non-reassuring fetal status; NRFS)、常位胎盤早期剥離の合併症が多く⁶、約 20% が早産となり⁷、母体死亡、周産期死亡の原因になる^{8,9}。PE に罹患した女性は、将来、高血圧、心血管系イベント、及び脳卒中の発症が高い¹⁰。中でも EOPE は、LOPE と比べて高血圧、糖尿病、高脂血症を発症するリスクが更に高くなる¹¹。

PE の原因及び病態の詳細は不明であるが、分娩により症状は速やかに改善することから、胎盤の存在が疾患発症に関連していると考えられている¹²。このため、PE の根治療法は妊娠終結 (分娩) になる。特に EOPE の場合は、母体の病態をできるだけ抑えつつ、かつ早産に伴う新生児合併症を減らすために、在胎期間をできるだけ延長する事が望ましい。しかし、母児の重篤な合併症を回避しつつ、最も適切なタイミングで妊娠終結時期を判断する事は非常に難しい。分娩までの治療としては、降圧薬の投与などの対症療法を行い、妊娠期間の延長を図る。重症高血圧で血圧コントロールが不良の場合、重度の血小板減少、肝・腎機能障害、肺水腫、重度の NRFS などの場合には妊娠終結が推奨される¹³。

PE では様々な危険因子が知られている^{14,15}。初産や高年妊娠、多胎妊娠、HDP の既往は PE の危険因子である。また、血圧高値、高血圧症、腎疾患、糖尿病、肥満、全身性エリテマトーデス (SLE) や抗リン脂質抗体症候群などの自己免疫性疾患などが併存する場合も PE の発症率は高い。PE・高血圧の家族歴も危険因子と考えられている。初産が危険因子である一方、夫が変わることで PE の発症リスクは上がり^{16,17}、これは、新しく母体側に暴露された胎児抗原に対する免疫寛容の異常などが関連していると考えられている¹⁸。生殖補助医療技術 (assisted reproductive technology; ART) による妊娠でも PE のリスクは上昇する。妊娠初期や中期に子宮動脈血流速度波形異常を認め

る場合、PE の発症リスクは増加する¹⁹。PE に関連する遺伝的素因としてアンギオテンシノーゲン遺伝子の 235 番目のアミノ酸がトレオニンの場合、PE の発症率が上昇すると報告されている²⁰。さらに、人種に関してはアフリカ系アメリカ人に PE の発症が多いといわれている²¹。

2. 正常胎盤の構築

正常妊娠では、受精後 6~7 日後に受精卵が子宮壁に着床する。受精卵は外細胞塊（栄養膜）と内細胞塊（胚結節）からなる。栄養膜細胞は子宮内膜へ接着し絨毛栄養膜細胞（villous trophoblast; VT）と絨毛外栄養膜細胞（extravillous trophoblast; EVT）に分化する。

VT は更に分化して、細胞性栄養膜細胞（cytotrophoblast）と合胞性栄養膜細胞（syncytiotrophoblast）の 2 種類の細胞から構成される絨毛膜を形成し、母児間の酸素や栄養の運搬を行う。一方、EVT は脱落膜、子宮筋層、及びらせん動脈に浸潤する。脱落膜は妊娠のために変化した子宮内膜であり、母体血と栄養膜を連絡する。浸潤した EVT が子宮のらせん動脈に浸潤し血管内皮細胞および中皮細胞と置換することで、妊娠 15 週頃には子宮筋層内のらせん動脈の内腔が拡張し、血管抵抗の低い血管へ変化する（らせん動脈のリモデリング）²²。

また、脱落膜などの母体胎児境界には免疫細胞が存在し、胎盤の形成と維持に重要な役割を果たしている。妊娠初期の脱落膜白血球の約 70% を占める脱落膜ナチュラルキラー細胞（decidual natural killer cells; dNK 細胞）は、特に妊娠維持に重要である^{23,24}。dNK 細胞は末梢血中の NK 細胞と異なり細胞障害性はなく、interleukin (IL) -8 を発現し脱落膜への EVT 浸潤を促進する。更に、vascular endothelial growth factor (VEGF) や placental growth factor (PlGF) などの血管新生因子を産生し、らせん動脈の成長を促すなど、胎盤形成に重要な役割を果たす^{25,26}。

脱落膜マクロファージは妊娠初期の脱落膜白血球の約 20% を占める。マクロファージは 2 つのサブセットに分類され、M1 マクロファージは炎症誘導性であり、M2 マクロファージは組織修復や IL-10 産生を行う²⁷。脱落膜マクロファージは IL-10 を産生し、抗炎症作用により母体胎児の免疫を維持するなど M2 マクロファージの表現型を示す²⁸⁻³⁰。また、脱落膜マクロファージはらせん動脈のリモデリングにも関与している³¹。

脱落膜樹状細胞（decidual dendritic cells; decidual DCs）は、脱落膜白血球の約 1% を占める³²。ヒトの decidual DCs の働きについてはよくわかっていない。マウスの decidual DCs は脱落膜組織の血管新生に関与している³³。また、マウスの正常妊娠の脱落膜では、decidual DCs が IL-10 を産生し、母児間の免疫寛容に関与する³⁴。

脱落膜中の T 細胞は、血液中と比較すると数が少ない。T 細胞サブセットの構成も異なり、血液中では 90% が CD4⁺もしくは CD8⁺ T 細胞であるが、脱落膜では多くが CD4⁻ CD8⁻で γ δ T 細胞受容体を発現した γ δ T 細胞である^{35,36}。この γ δ T 細胞は、IL-10 や transforming growth factor (TGF) - β などのサイトカインを産生し、栄養膜細胞の浸潤を促し胎児に対する免疫寛容を支持している^{35,37}。

3. PE における子宮胎盤循環不全及び血管内皮障害

PE の病因の一つとして妊娠初期のらせん動脈のリモデリング障害が提唱されている。その前後

での胎盤局所、そして母体の全身性炎症が PE 発症の重要な起点と考えられている。

PE では EVT の子宮への浸潤が不十分となり、らせん動脈のリモデリング障害が生じる³⁸。EVT 浸潤障害のメカニズムの全容は明らかになってはいないが、胎盤特異的 micro RNA がらせん動脈周囲の EVT 浸潤抑制に関与している³⁹。

EVT 浸潤障害とそれに伴うらせん動脈の内腔狭小化は子宮胎盤循環不全をきたし、絨毛間腔は低酸素状態となる。この結果、絨毛細胞では VEGF の可溶性受容体である soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) の産生亢進と^{40,41}、PlGF の産生低下が見られる⁴²。sFlt-1 は血管新生抑制因子であり、PlGF は血管新生促進因子である。PE における sFlt-1 の増加は、sFlt-1 と結合していない遊離 VEGF と遊離 PlGF を減少させ、母体の血管内皮障害を引き起こす。それとともに絨毛細胞からの soluble endoglin (sEng) の産生が増加する^{43,44}。sEng は TGF- β の作用を減弱させ、sFlt-1 の増加と共同し HELLP (Hemolysis: 溶血、Elevated Liver enzymes: 肝酵素上昇、Low Platelets: 血小板減少) 症候群を発症させる可能性が示唆されている⁴⁵。

これらの血管新生関連因子は絨毛細胞から母体側に分泌され、PE 妊婦の末梢血中では sFlt-1 と sEng は増加し⁴⁶⁻⁴⁸、遊離 PlGF は減少する⁴⁹。sFlt-1 と sEng は血管内皮細胞を障害し高血圧や蛋白尿を生じる^{50,51}。また、sFlt-1 は、妊娠マウス/ラットに投与すると高血圧、蛋白尿を発生させることから、sFlt-1 を用いた PE モデル動物は、PE 病態解明のための基礎研究にしばしば使用されている⁵²。sFlt-1 は、血管内皮細胞における一酸化窒素の産生を阻害することで高血圧の発症に関与する可能性が示唆されている⁵³。

4. PE における母体免疫系の変化

T 細胞サブセットには 1 型ヘルパー T (T helper 1; Th1) 細胞と 2 型ヘルパー T (T helper 2; Th2) 細胞、IL-17 産生性ヘルパー T (T helper 17; Th17) 細胞、制御性 T (regulatory T; Treg) 細胞などが存在する。Naïve T 細胞から、IL-12 や interferon (IFN) - γ の存在下では Th1 細胞が誘導される。IL-4 の存在下では Th2 細胞が誘導される。また、TGF- β によって naïve T 細胞から Treg 細胞が誘導されるが、TGF- β と IL-6 の共存下では Th17 細胞が誘導される。Th1 細胞は IFN- γ を産生し、がん細胞やウイルス感染細胞の増殖を抑制する。Th17 細胞は、好中球の産生や上皮細胞・繊維芽細胞の活性化を誘導する IL-17 を産生するとともに、IL-21 や IL-22 など産生し⁵⁴、細菌や真菌の感染防御に働く。また、関節リウマチや炎症性腸疾患、多発性硬化症などの炎症性疾患への関与が示唆されている⁵⁵。

母体胎児間の免疫寛容の異常として、Th1 細胞と Th2 細胞のバランス異常が挙げられる。正常妊娠では、母体にとって半自己である胎児を拒絶しないように Th2 にシフトすることで免疫寛容が働いている⁵⁶。一方、PE では Th1 細胞が優位になり、炎症誘発性サイトカインの増加がみられる⁵⁷⁻⁵⁹。さらには、PE では免疫寛容に働く Treg 細胞の減少を認められており⁶⁰⁻⁶⁹、胎盤での炎症が惹起されると推測されている。一方で、Th17 細胞は増加し^{66,69-75}、母体の全身性炎症を誘導する。

近年、母体にとって半自己である胎児に対する『自然炎症』を誘導するインフラマソームと PE の関連が報告されている。インフラマソームは主に自然免疫細胞を中心に発現する。インフラマソームには様々な種類があるが、このうち Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) インフラマソーム

ムは danger/damage-associated molecular patterns (DAMPs) と呼ばれる無菌性の危険シグナルを感知することで活性化され、IL-1 β や IL-18 などの炎症性サイトカインを細胞外へ分泌する。NLRP3 インフラマソームは、正常妊婦と比較し、PE 患者の末梢血および胎盤組織で高発現している^{76,77}。また、ヒト栄養膜細胞は NLRP3 インフラマソームを構成する NLRP3、apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) そして caspase-1 を発現し、危険シグナルの一つであるナノシリカ投与により NLRP3 インフラマソームが活性化し IL-1 β の誘導が促進される^{78,79}。PE 患者では末梢血中や胎盤に placental debris が多く認められる^{80,81}。これに含まれる DNA、RNA、アデノシン、High mobility group box protein1 (HMGB1)、尿酸ナトリウム (monosodium urate; MSU) は DAMPs として絨毛細胞の NLRP3 インフラマソームを活性化する⁸²。このように、PE 患者においては、子宮胎盤循環不全から生じた placental debris がインフラマソームを誘導し炎症を誘発している可能性が示唆されている。

5. PE における DCs と Th 細胞の関連について

なぜ PE でこのような Th1 細胞、Th2 細胞、Treg 細胞、Th17 細胞の変化が起こるかは不明であった。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 DCs (plasmacytoid DCs; pDCs)、骨髄系 DCs (myeloid DCs; mDCs) の変化に着目した。

DCs は抗原特異的 T 細胞に抗原を提示し、naïve T 細胞の分化を促進する⁸³。Th2 細胞の誘導⁸⁴ や Treg 細胞を誘導し⁸⁵、免疫寛容の維持に働く。その一方で、DCs は Th1 細胞と Th17 細胞も誘導する⁸⁶。このように、周囲の環境により DCs は T 細胞への作用を変化させ、“免疫寛容” もしくは“生体防御機構” へ免疫応答を変化させている。末梢血 DCs は血液中の白血球の約 1% を占め⁸⁷、主に pDCs と mDCs に大別される^{87,88}。血液中の pDCs は約 35%、mDCs は約 65% と言われている⁸⁹。一般に DCs は骨髄において共通前駆細胞である common dendritic cell progenitor (CDP) から mDCs 前駆細胞 (pre-mDCs) と pDCs が分化し、pre-mDCs は末梢組織で成熟 mDCs に分化する。pDCs は血液循環を介して皮膚などの末梢組織やリンパ節へ移行する⁵⁴。pDCs と mDCs には細胞表面抗原の違いがある。HLA-DR は pan-DC マーカーとして共通して発現しており、pDCs の表面抗原は CD123 が高発現で CD11b、CD11c、CD13、CD33 の発現はない。mDCs では CD11b、CD11c、CD13、CD33 が発現している⁹⁰。pDCs と mDCs の変化は自己免疫性疾患や炎症性疾患で報告されている^{88,91}。pDCs は抗原提示能や T 細胞の刺激能は弱いですが、ウイルス感染の際に I 型 IFN を分泌し⁸⁷、Th1 細胞を誘導すると言われている⁹²。さらに pDCs は Treg 細胞の誘導にも関連している⁹³⁻⁹⁵。胸腺に存在する pDCs は FoxP3 陽性 Treg 細胞を誘導することができる⁹⁶⁻⁹⁸。mDCs は抗原の貪食を行い、強力な抗原提示細胞として機能し、高い T 細胞活性化能をもつ⁸⁷。さらに mDCs は 2 つのサブセットに分かれる。mDCs のサブセットである CD141⁺ mDCs は IL-12 を産生し⁹⁹、CD8⁺ T 細胞も刺激する¹⁰⁰。CD1c⁺ mDCs は IL-12p70、IL-1 β 、IL-6、IL-23 を産生し T 細胞を Th1 細胞¹⁰¹、Th17 細胞へと分化させる¹⁰²。胎盤に存在する DCs においても同様のサブセット (mDCs サブセット、pDCs) が存在することがわかっているが¹⁰³、その分化経路の詳細は分かっていない。

これまでに、PE における末梢血中の pDCs と mDCs の変化に関して既報が 2 編ある。ひとつの報告では、単核球中の pDCs と mDCs の割合は、正常妊娠と PE で差が無いと報告されていた⁶²。しか

し、もう一つの報告では、正常妊娠よりも PE で pDCs は低く、mDCs は高くなると報告されていた¹⁰⁴。このように、PE において末梢血中の pDCs、mDCs が変化しているかどうかはまだ不明であった。

6. PE と NK 細胞の関連について

NK 細胞は細胞傷害性リンパ球の 1 つであり、がん細胞やウイルス感染細胞を認識して直接的に細胞傷害性を示し細胞死を誘導する。IL-15 が前駆細胞からの分化を促し、産生された NK 細胞は炎症反応が生じるとリンパ節へ移動する。NK 細胞は IFN- α 、IFN- γ 、IL-12 により活性化され、細胞傷害機能を生じる。同時に IFN- γ を大量に産生し T 細胞の分化に寄与する。Th1 細胞を誘導する IFN- γ は主に NK 細胞から産生されている⁵⁴。通常ヒトでは CD56、CD16 が表面抗原として存在している。NK 細胞は表面抗原の発現により細分され、そのうち CD3⁻ CD56^{dim} CD16⁺ NK 細胞は NK1 細胞とよばれ末梢血中に多く存在し、CD3⁻ CD56^{bright} CD16⁻ NK 細胞は NK2 細胞とよばれ¹⁰⁵ 妊娠初期の脱落膜に多く存在している¹⁰⁶。

PE における末梢血中の NK 細胞に関する報告は今までに 3 編あり、一つの報告では妊娠経過（初期、中期、後期）と PE では末梢血中の NK 細胞に変化がなかった¹⁰⁷。しかし、もう一つの報告では、NK2 細胞が正常妊娠で増加し、非妊娠と PE で低下していた¹⁰⁸。さらに、Darmochwal-Kolarz らは、PE の末梢血 NK 細胞の IFN- γ 産生は正常妊娠よりも増加していたと報告している¹⁰⁹。このように、PE と末梢血中の NK 細胞は関連している可能性が考えられるが詳細は不明である。

7. PE の発症時期による免疫細胞の変化について

前述したように、母体・胎児の臨床症状は LOPE と比較し EOPE の方が重症である^{4,5}。Ribeiro らは EOPE と LOPE に分けて Treg 細胞、Th17 細胞、Th1 細胞、Th2 細胞の割合を比較した⁶⁹。その結果、EOPE では LOPE に比べて、炎症性免疫細胞である Th17 細胞と Th1 細胞が増加し、Treg 細胞と Th2 細胞は減少していた。このように、EOPE においては LOPE よりもより炎症が強い状態に変化していた。このことから、我々は EOPE と LOPE では各免疫細胞の割合が異なっているのではないかと考えた。

8. 胎盤免疫細胞と末梢血免疫細胞の関連

妊娠免疫の主座は胎盤の母体胎児境界面であることは明らかである。妊娠中の胎盤内の免疫細胞の評価はできないが、胎盤免疫細胞と末梢血免疫細胞が同様の挙動を示すことが報告されている。正常妊娠の子宮では非妊娠時と比べて Th1 細胞が減少し、Treg 細胞と Th2 細胞は増加するが、末梢血でも同様な変化がみられる^{59,110}。さらに、PE 患者では胎盤と末梢血で Treg 細胞が減少し⁶⁰、習慣性流産患者の末梢血と胎盤脱落膜では Th17 細胞が増加している¹¹¹。このように、末梢血での免疫細胞の変化は、胎盤における免疫細胞の変化と同様であり、胎盤での免疫細胞変化を反映している可能性があると考えられる。

以上より、今回、我々は、PE に関連する pDCs/mDCs、Th17 細胞、Th1 細胞、および NK 細胞が非妊娠、正常妊娠、PE 間で変化し、特に EOPE では LOPE に比べてそれらの変化が顕著であると仮説を立てた。

研究目的

本研究の目的は、(1)妊婦における DCs (pDCs/mDCs)、Th17 細胞、Th1 細胞、及びNK 細胞の測定系を構築すること、(2)非妊娠、正常妊娠(妊娠 19~29 週、35~37 週)、PE (EOPE 及び LOPE) における pDCs/mDCs、Th17 細胞、Th1 細胞、及びNK 細胞を比較すること、(3)上記免疫細胞割合と妊娠週数、pDCs/mDCs と Th17 細胞との間の相関を検討すること、とした。

対象と方法

対象患者および倫理的配慮

非妊娠 13 名、正常妊娠 50 名（妊娠 19 週～29 週：36 名、妊娠 35～37 週：14 名）、EOPE 13 名、LOPE 10 名を対象とした。全患者から 10 mL 採血した。

本研究は本学倫理審査委員会の承認を得て（第遺 12-78 号）、全ての被験者へ説明し、被験者から署名による同意を得て、ヘルシンキ宣言に則り行われた。

5～6 カラーフローサイトメトリーを用いた DCs (pDCs/mDCs)、Th17 細胞、Th1 細胞、及び NK 細胞の測定系の確立

ヘパリンコートした採血管に血液を 10 mL 採取し、全血を 15 mL の Falcon tube に入れた。全血に HetaSep™ (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) を全血 1 に対し HetaSep™ を 5 の割合で懸濁し遠心分離した (90 g、5 分間、25°C)。室温で 10 分間静置し、白血球を含む上層部を回収、4 倍以上の PBS (-) (富士フィルム和光純薬、大阪、日本) で懸濁し遠心分離した (120 g、10 分間、25°C)。上清を取り除き沈殿した白血球層を回収した。Pharm Lyse (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて赤血球を除去し白血球のみを採取した。

Countess® II FL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて細胞数をカウントし、Fc-block (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) (1×10^6 cell に対し 10 μ L) を入れ、4°C の暗所で 10 分間静置し、Fc レセプターをブロックした。Stain buffer (3% FBS + PBS) で 2 回洗浄し (370g、5 分間、4°C)、 1×10^6 cell/50 μ L に調整した。 1×10^6 cells を Stain buffer 1000 μ L に懸濁し、DCs と NK 細胞には FVS780-APCCy7 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用い、Th17 細胞と Th1 細胞には FVS520-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて死細胞をラベリングした (4°C、暗所、15 分間)。Maecker ら¹¹² の報告している細胞表面マーカー染色法を参考にして、DCs (pDCs/mDCs)、Th17 細胞、Th1 細胞、及び NK 細胞に対する蛍光標識された抗体カクテルをそれぞれ調製し染色した (4°C、暗所、30 分間) (表 1)。BD Stabilizing Fixative (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 500 μ L で固定し、濾過後冷暗所で保存した。

染色後 24 時間以内に BD LSRFortessa Cell Analyzer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) により 30,000 細胞のデータを取得し、Flowjo Software for Mac ver. 10.5.3 (BD, Ashland, OR, USA) で解析した。図 1～3 に DCs (pDCs/mDCs)、Th17 細胞、Th1 細胞、NK 細胞のそれぞれのフローサイトメトリープロットを示す。いずれの抗体カクテルも fluorescence minus one (FMO) を作成し、陽性・陰性境界を決定した¹¹³。

pDCs は lineage (CD3, CD14, CD19, CD20)⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁻ CD123⁺ で同定した。mDCs は lineage (CD3, CD14, CD19, CD20)⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD123⁻ で同定した。NK 細胞は lineage (CD3, CD14, CD19, CD20)⁻ CD8⁻ CD16⁺ CD56⁺ で同定した。Th17 細胞は CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD183⁻ CD196⁺ で同定した。Th1 細胞は CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD183⁺ CD196⁻ で同定した。

mDCs/pDCs の細胞数は、自治医大中央検査室で測定した白血球数と、フローサイトメトリーで求

めた細胞割合で計算した。

表1. 白血球表面マーカー、モノクローナル抗体、アイソタイプコントロール

表面マーカー	蛍光	モノクローナル抗体、サブクラス、製造元	アイソタイプコントロール、製造元
樹状細胞			
Lineage cocktail 3 (CD3,CD14,CD19, CD20)	FITC	IgM, κ, BD Biosciences, CA; cat.no. 643510	IgM, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 551448
HLA-DR	PECy7	IgG2a, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 560651	IgG2a, κ BD Pharmingen, CA; cat.no. 593691
CD123	BV605	IgG2a, κ, BD Horizon, CA; cat.no. 564197	IgG2a, κ BD Horizon, CA; cat.no. 562778
CD11c	PE	IgG1, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 560999	IgG1, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 5225509
NK細胞			
Lineage cocktail 3 (CD3,CD14,CD19, CD20)	FITC	IgM, κ, BD Biosciences, CA; cat.no. 643510	IgM, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 551448
CD16	APC	IgG1, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 561304	IgG1, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 554681
CD56	BV421	IgG2b, κ, BD Horizon, CA; cat.no. 562752	IgG2b, κ, BD Horizon, CA; cat.no. 5072615
CD8	BV711	IgG1, κ, BD Horizon, CA; cat.no. 563676	IgG1, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 563044
Th17細胞、Th1細胞			
CD3	BV570	IgG1, κ, BioLegend, CA; cat.no. 300436	IgG1, κ, BioLegend, CA; cat.no. 400159
CD4	PECy7	IgG1, κ, BioLegend, CA; cat.no. 344612	IgG1, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 400125
CD8	BV421	IgG1, κ, BioLegend, CA; cat.no. 301036	IgG1, κ, BioLegend, CA; cat.no. 400157
CD183 (CXCR3)	PE	IgG1, κ, BioLegend, CA; cat.no. 353706	IgG1, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 5225509
CD196 (CCR6)	APC	IgG2a, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 560619	IgG1, κ, BD Pharmingen, CA; cat.no. 554681

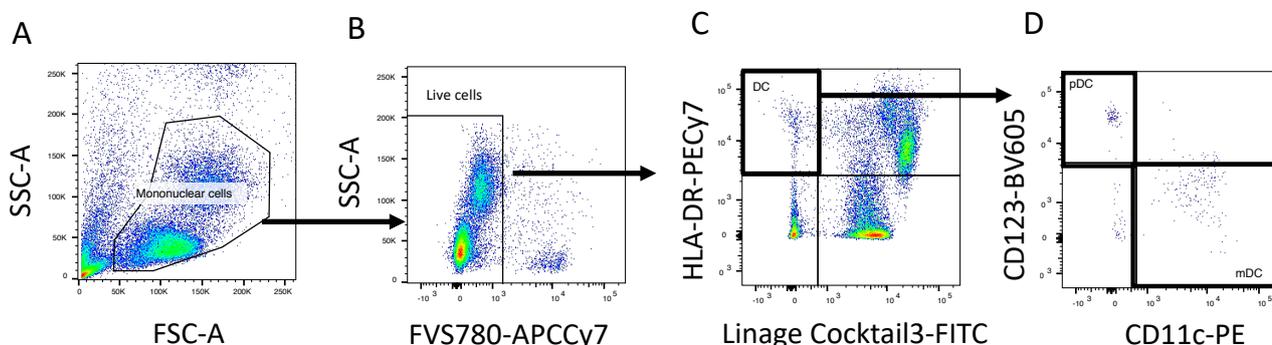


図1. DCs のフローサイトメトリゲートング方法

(A)はじめに side scatter light (SSC)、forward scatter light (FSC)を用いて単核球をゲートングした。(B)次に FVS780 を用いて生細胞をゲートングした。(C) Anti-Human Lineage Cocktail 3 (CD3, CD14, CD19, CD20)-FITC、HLA-DR-PECy7 を用いて DCs をゲートングした。(D)CD123-BV605、CD11c-PE を用いて pDCs と mDCs をゲートングした。lineage⁻HLA-DR⁺CD11c⁻CD123⁺細胞を pDCs とし、lineage⁻HLA-DR⁺CD11c⁺CD123⁻細胞を mDCs とした。

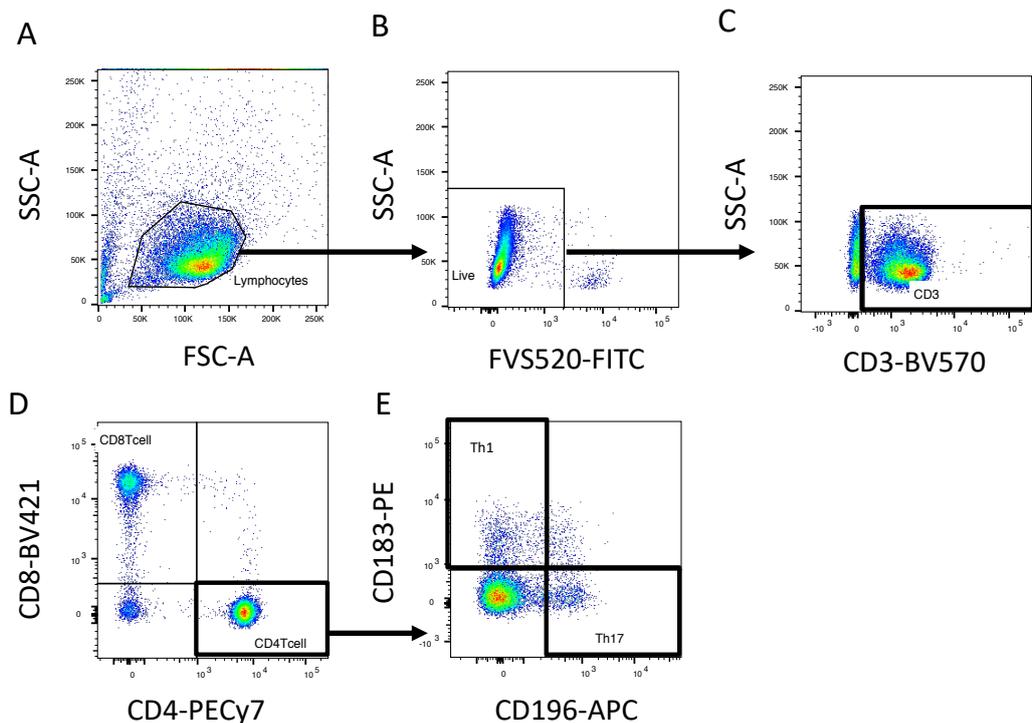


図 2. Th17 細胞、Th1 細胞のフローサイトメトリゲートイング方法

(A)はじめに SSC、FSC を用いてリンパ球をゲートイングした。(B)次に FVS520 を用いて生細胞をゲートイングした。(C)CD3-BV570 を用いて CD3 陽性 T 細胞をゲートした。(D)CD4-PECy7、CD8-BV421 を用いて CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ T 細胞をゲートイングした。(E)CD183 (CXCR3)-PE、CD196 (CCR6)-APC を用いて CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD183⁻ CD196⁺細胞を Th17 細胞、CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD183⁺ CD196⁻細胞を Th1 細胞とした。

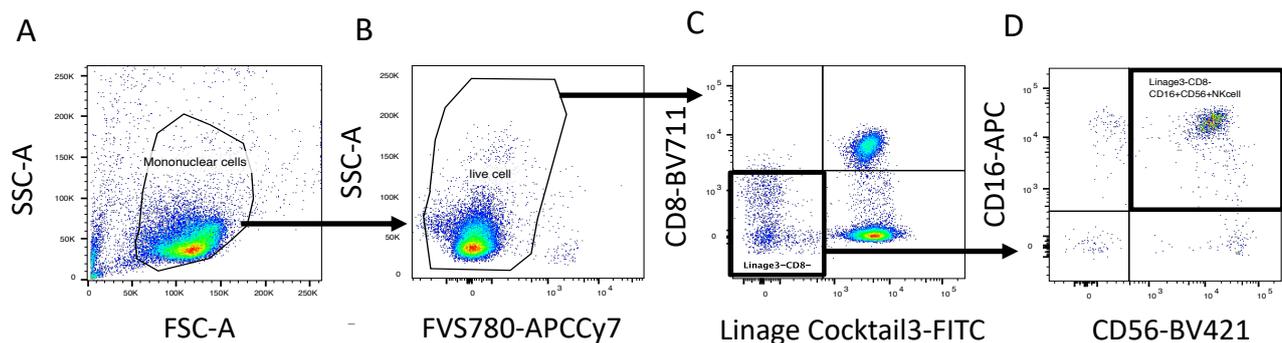


図 3. NK 細胞のフローサイトメトリゲートイング方法

(A)はじめに SSC、FSC を用いて単核球をゲートイングした。(B)次に FVS780 を用いて生細胞をゲートイングした。(C)Anti-Human Lineage Cocktail 3 (CD3, CD14, CD19, CD20)-FITC、CD8-BV711 を用いて Lineage⁻ CD8⁻細胞をゲートイングした。(D)CD16-APC と CD56-BV421 を用いて NK 細胞をゲートイングした。Lineage⁻ CD8⁻ CD16⁺ CD56⁺細胞を NK 細胞とした。

PE、small-for-gestational-age (SGA) 児、FGR の定義

PE は日本妊娠高血圧学会が提示した“妊娠高血圧症候群の定義と分類（2004 年）”に基づき診断した¹。PE は妊娠 20 週以降に発症した高血圧（4 時間以上空けて 2 回以上の収縮期血圧 140 mmHg 以上もしくは拡張期血圧 90 mmHg 以上）と蛋白尿（24 時間蓄尿で 1 日蛋白尿 300 mg 以上）で診断される。妊娠 20 週以前より高血圧を合併しており、妊娠 20 週以降に新たに蛋白尿を認めるものは SPE と診断される。今回の検討では、PE と SPE を合わせて PE と称した。24 時間蓄尿ができなかった場合は、随時尿で尿蛋白クレアチニン比 >0.27 g/gCr の場合に尿蛋白陽性と診断した¹¹⁴。PE の早発型、遅発型の分類に関しては国際妊娠高血圧学会の分類を用い、妊娠 34 週未満の発症を EOPE、妊娠 34 週以降の発症を LOPE と分類した³。

出生体重が“日本人の在胎別出生体重基準”の 10 パーセントイル未満の場合に、SGA 児と診断した¹¹⁵。FGR は、日本超音波医学会が定めた推定胎児体重が -1.5 SD 未満の場合に診断した¹¹⁶。

統計学的解析

統計学的解析は GraphPad Prism 8 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) と EZR on R commander for Windows ver. 1.37¹¹⁷ を用いた。連続変数の 2 群間の比較には Mann-Whitney 検定、3 群間以上の比較には Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass の多重比較検定を行った。離散変数の 2 群間の比較には Fisher の直接検定もしくは χ^2 テスト、3 群間以上の比較には加えて Bonferroni の多重比較検定を行った。相関分析には Pearson 相関分析を行った。P 値は 0.05 未満を有意差ありとした。

結果

1. 患者背景 (表 2)

正常妊婦 50 名のうち、36 名が妊娠 19 週～29 週に採血を行い、14 名が妊娠 35 週～37 週に採血を行った。患者背景は、非妊娠、正常妊娠、EOPE、LOPE の 4 群に分けて検討した。収縮期血圧と拡張期血圧は、PE で正常妊娠と比較し有意に高かった。EOPE では、正常妊娠と LOPE と比較し早産児が多く、児の出生体重が小さかった。

表 2. 患者背景

	非妊娠 (n = 13) (Group A)	正常妊娠 (n = 50) (Group B)	EOPE (n = 13) (Group C)	LOPE (n = 10) (Group D)	欠損値 (B/C/D)	P-値
年齢 (歳)	28 (27-29)	36 (32-38)	35 (34-39)	35 (30-39)	0	0.672
初産婦	–	28/48 (58)	7 (54)	3 (30)	2/0/0	0.299
高血圧家族歴	–	18/49 (37)	6/9 (67)	3/7 (43)	1/4/3	0.258
非妊娠時 BMI (kg/m ²)	–	20.7 (19.3-23.9)	21.2 (19.8-24.0)	22.1 (20.9-23.3)	0	0.921
喫煙	–	17 (34)	2/12 (17)	2/9 (22)	0/1/1	0.519
HDP既往	–	4 (8)	4 (31)	2 (20)	0	0.053
双胎妊娠	–	3 (6)	1 (8)	2 (20)	0	0.249
採血週数 (週)	–	28 (19-35)	30 (27-33)	37 (36-39)	0	<0.001 [‡]
収縮期血圧 (mmHg)	–	108 (104-119)	157 (144-163)	148 (143-150)	5/3/0	<0.001 [§]
拡張期血圧 (mmHg)	–	61 (55-68)	95 (85-101)	87 (78-99)	5/3/0	<0.001 [§]
出生週数 (週)	–	39 (37-40)	30 (28-34)	38 (36-39)	0	<0.001 [¶]
出生体重 [†] (g)	–	2,938 (2,725-3,138)	982 (755-2,046)	2,944 (2,398-3,131)	0	<0.001 [¶]
SGA児 [†]	–	7/47 (15)	5/12 (42)	2/8 (25)	3/2/1	0.106

略語: BMI, body mass index; EOPE, 早発型妊娠高血圧腎症; HDP, 妊娠高血圧症候群; LOPE, 遅発型妊娠高血圧腎症; SGA, small-for-gestational-age

データは中央値 (四分位範囲)、もしくは個数 (パーセント)

†, 単胎のデータのみ

‡, Significant pairs: B vs. D, C vs. D

§, Significant pairs: B vs. C, B vs. D

¶, Significant pairs: B vs. C, C vs. D

2. DCs、pDCs/mDCs 割合の 5 群間での比較、pDCs/mDCs の細胞数の 4 群間での比較、EOPE における pDCs と FGR の関係、pDCs/mDCs と妊娠週数の相関

1) DCs の 5 群間での比較

非妊娠、正常妊娠(19~29 週)、正常妊娠(35~37 週)、EOPE、LOPE の 5 群に分けて検討した。単核球 (Mononuclear cells; MNCs) 中の DCs は非妊娠と比較し、正常妊娠 (19~29 週) で有意に低かった (1.59% 及び 0.77% [$p = 0.045$])。DCs は EOPE、LOPE 間で有意差を認めなかった (図 4A、4B)。

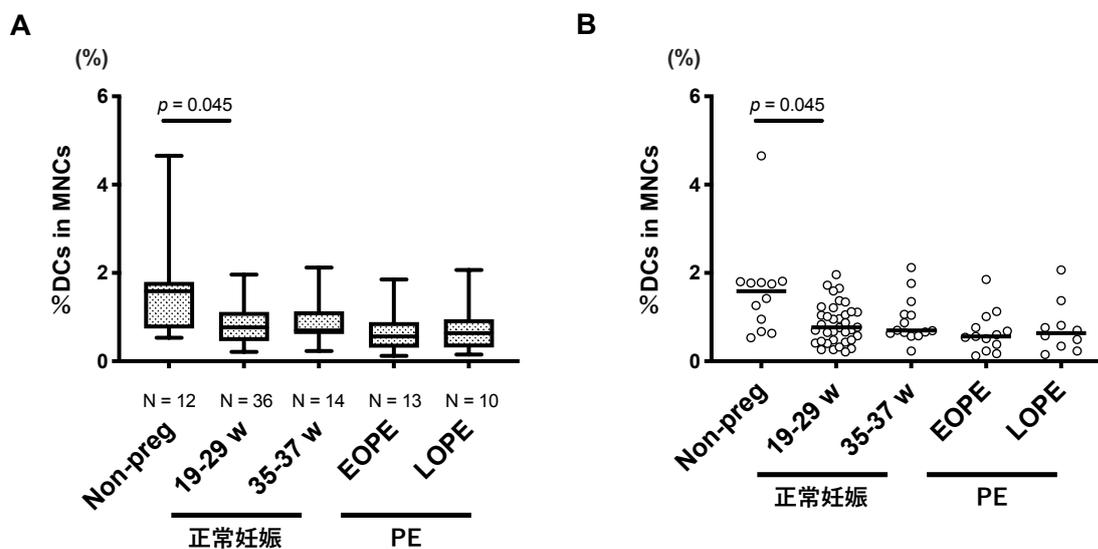


図 4. 単核球中の DCs の割合の比較

単核球中の DCs の割合を、非妊娠、正常妊娠 (19~29 週)、正常妊娠 (35~37 週)、EOPE、LOPE の 5 群間で比較した (A: 箱ひげ図、B: ドットプロット)。

略語: DCs, 樹状細胞; MNCs, 単核球; Non-preg, 非妊娠; EOPE, 早発型妊娠高血圧腎症; LOPE, 遅発型妊娠高血圧腎症; PE, 妊娠高血圧腎症。

2) DCs 中 pDCs/mDCs 割合の 5 群間での比較

DCs 中の pDCs の割合は EOPE で非妊娠、正常妊娠（19～29 週）と比較して有意に低かった（4.1% vs. 41.2% 及び 19.0% [$p = 0.0005$ 及び $p = 0.025$])（図 5A、5B）。

DCs 中の mDCs は pDCs と鏡面像となっていた。mDCs は EOPE で非妊娠、正常妊娠（19～29 週）と比較して有意に高かった（95.9% vs. 58.8% 及び 80.0% [$p = 0.0007$ 及び $p = 0.027$])（図 5C、5D）。

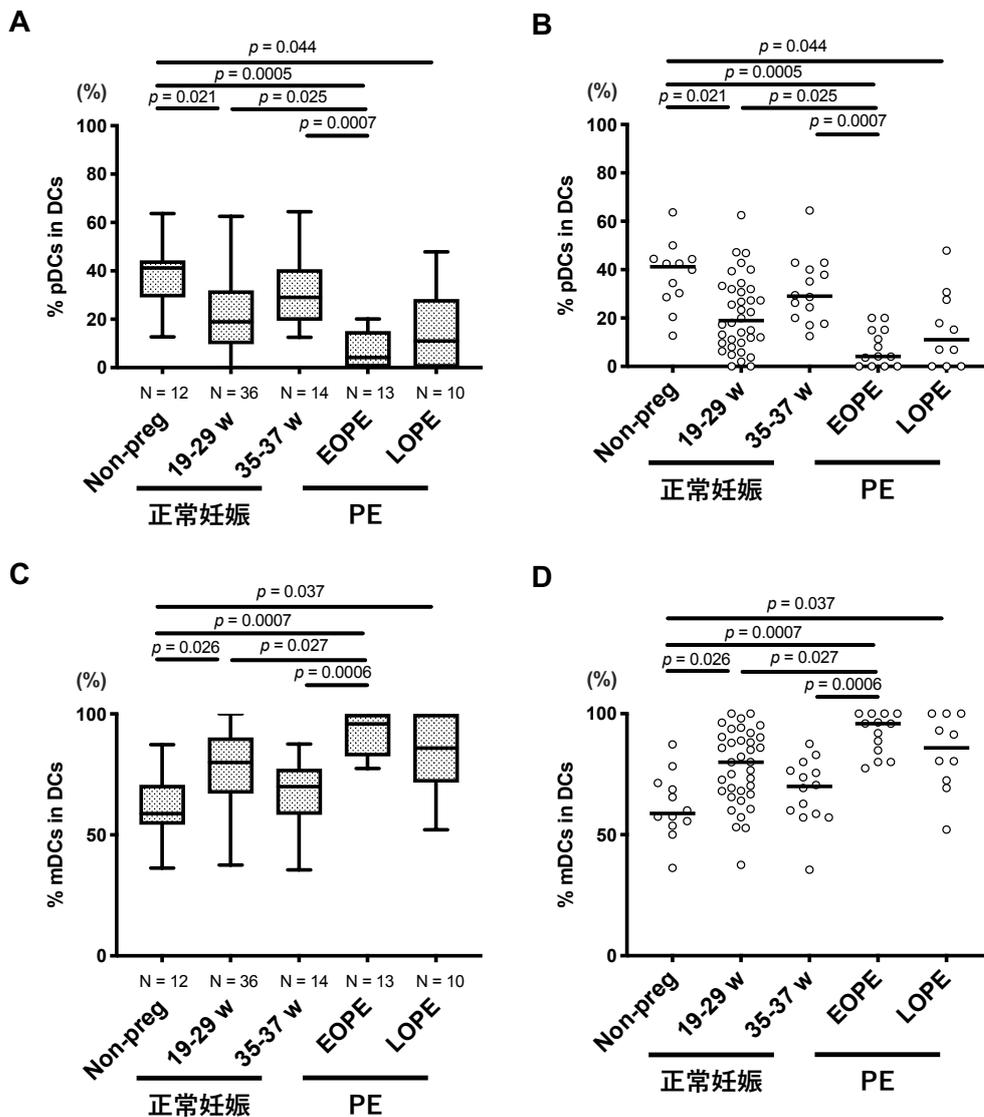


図 5. DCs 中の pDCs/mDCs の割合の比較

DCs 中の pDCs の割合を、非妊娠、正常妊娠(19～29 週)、正常妊娠 (35～37 週)、EOPE、LOPE の 5 群間で比較した (A: 箱ひげ図、B: ドットプロット)。DCs 中の mDCs の割合を、非妊娠、正常妊娠(19～29 週)、正常妊娠 (35～37 週)、EOPE、LOPE の 5 群間で比較した (C: 箱ひげ図、D: ドットプロット)。

略語: DCs, 樹状細胞; pDCs, 形質細胞様樹状細胞; mDCs, 骨髄系樹状細胞; Non-preg, 非妊娠; EOPE, 早発型妊娠高血圧腎症; LOPE, 遅発型妊娠高血圧腎症; PE, 妊娠高血圧腎症。

3) pDCs/mDCs の細胞数での 4 群間比較

白血球中の pDCs の細胞数は、EOPE で正常妊娠(19～29 週)と比較して有意に減少していた(2.205 cells/ μ l vs. 8.221 cells/ μ l [$p = 0.010$])。さらに、LOPE で正常妊娠(35～37 週)と比較して有意に低かった(3.233 cells/ μ l vs. 13.58 cells/ μ l [$p = 0.035$]) (図 6A、6B)。

白血球中の mDCs の細胞数は、4 群間で有意差を認めなかった($p = 0.417$) (図 6C、6D)。

なお、非妊娠においては末梢血白血球数を測定していなかったため解析から除外した。

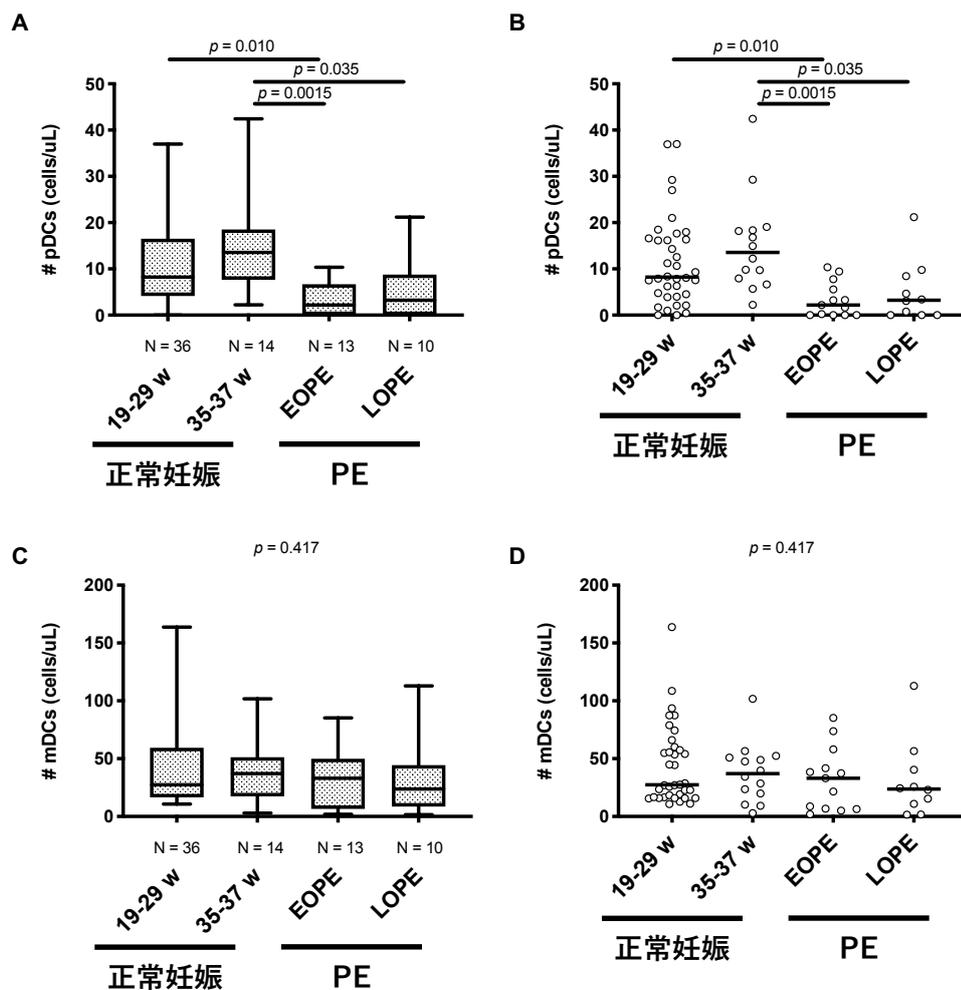


図 6. pDCs/mDCs の細胞数での比較

白血球中の pDCs の細胞数を正常妊娠(19～29 週)、正常妊娠(35～37 週)、EOPE、LOPE の 4 群間で比較した (A : 箱ひげ図、B : ドットプロット)。白血球中の mDCs の細胞数を正常妊娠(19～29 週)、正常妊娠(35～37 週)、EOPE、LOPE の 4 群間で比較した (C : 箱ひげ図、D : ドットプロット)。

略語: pDCs, 形質細胞様樹状細胞; mDCs, 骨髄系樹状細胞; EOPE, 早発型妊娠高血圧腎症; LOPE, 遅発型妊娠高血圧腎症; PE, 妊娠高血圧腎症。

4) EOPE における pDCs と FGR の関係

さらに、EOPE における pDCs と FGR の関連について検討したが、FGR の有無で pDCs の割合に有意差を認めなかった。しかし、FGR を認めた群は、FGR を認めなかった群と比較して、pDC の割合は低い傾向を認めた (0% vs. 4.35% [$p = 0.294$]) (図 7A、7B)。

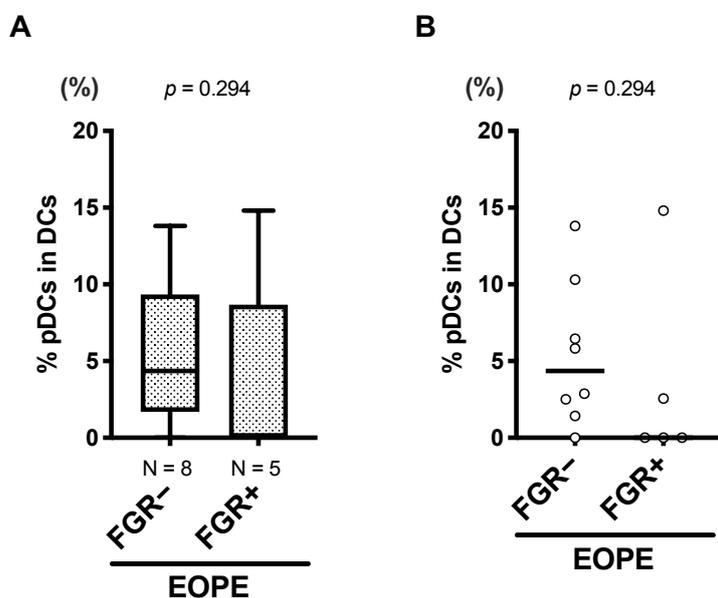


図 7. EOPE の pDCs 割合と FGR の関係

EOPE で FGR を認めた群 (FGR+) 5 名と FGR を認めなかった群 (FGR-) 8 名の pDCs 割合を評価した (A: 箱ひげ図、B: ドットプロット)。

略語: DCs, 樹状細胞; pDCs, 形質細胞様樹状細胞; FGR, 胎児発育不全; EOPE, 早発型妊娠高血圧腎症。

5). 正常妊娠と PE それぞれにおける妊娠週数と pDCs/mDCs の相関

正常妊娠と PE それぞれにおける DCs 中の pDCs/mDCs と妊娠週数との間には有意な相関を認めなかった。pDCs 割合と妊娠週数との相関は、正常妊娠では $r = 0.206$ ($p = 0.151$) (点線)、PE では $r = 0.343$ ($p = 0.109$) (実線) であった。mDCs 割合と妊娠週数との相関は、正常妊娠では $r = -0.046$ ($p = 0.134$) (点線)、PE では $r = -0.127$ ($p = 0.094$) (実線) であった (図 8A、8B)。

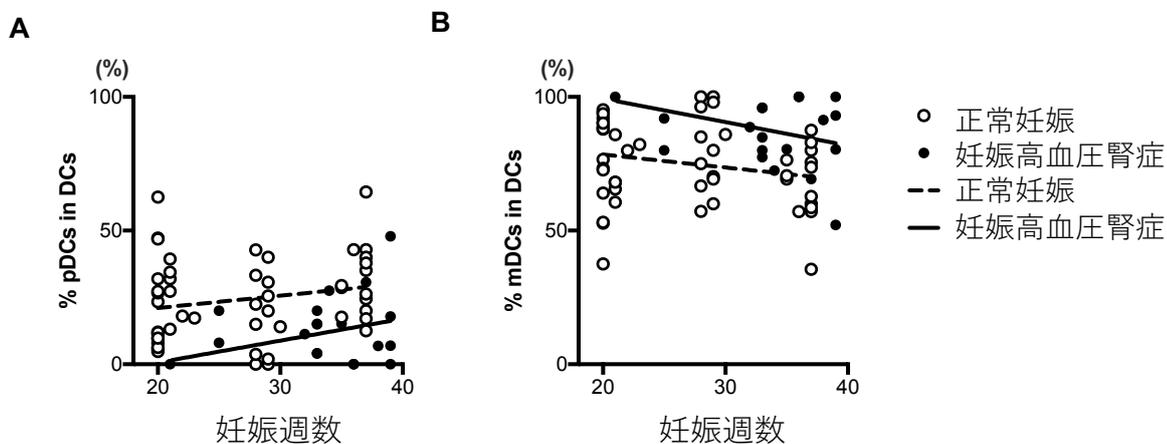


図 8. 全 DCs 中の pDCs, mDCs の割合と妊娠週数との相関

正常妊娠 50 名 (○) と PE 23 名 (●) を比較した。

A : 正常妊娠と PE の pDCs の割合と妊娠週数との相関を検討した。

B : 正常妊娠と PE の mDCs の割合と妊娠週数との相関を検討した。

略語: DCs, 樹状細胞; pDCs, 形質細胞様樹状細胞; mDCs, 骨髄系樹状細胞; PE, 妊娠高血圧腎症。

3. Th17 細胞割合の 5 群間での比較、Th1 細胞割合の 5 群間での比較、Th17 細胞と pDCs の相関

1) CD4 陽性 T 細胞中の Th17 細胞の割合

CD4 陽性 T 細胞中の Th17 細胞の割合は EOPE で正常妊娠（19～29 週）と比較し有意に高かった（1.2% vs. 0.0% [$p = 0.022$]). さらに、非妊娠では正常妊娠（19～29 週）群と比較し有意に高かった（1.0% vs. 0.0% [$p = 0.018$]). しかし、LOPE は正常妊娠との間に有意差を認めなかった（図 9A、9B）。

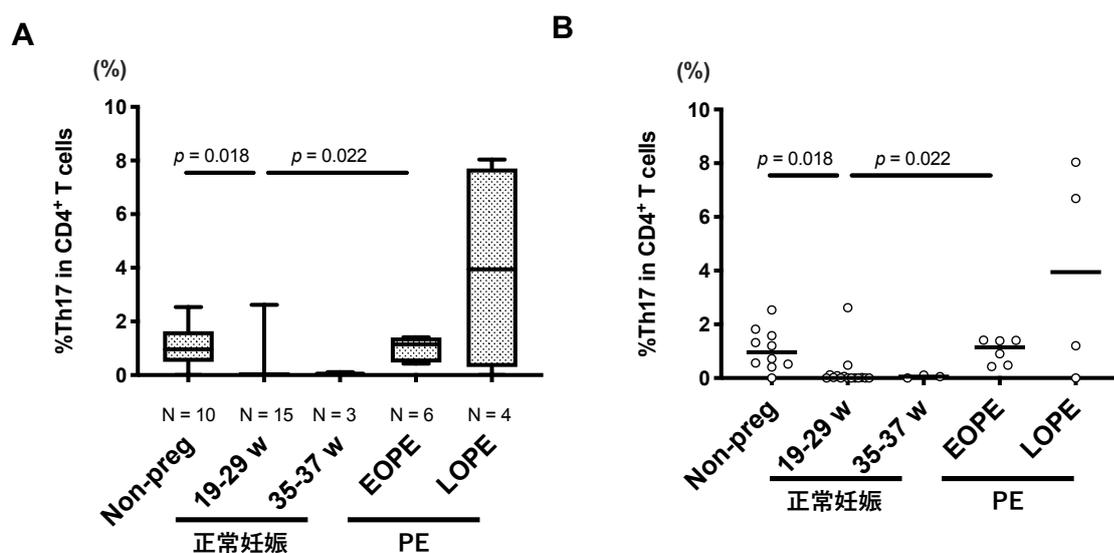


図 9. CD4 陽性 T 細胞中の Th17 細胞割合の比較

CD4 陽性 T 細胞中の Th17 細胞割合を非妊娠、正常妊娠（19～29 週）、正常妊娠（35～37 週）、EOPE、LOPE の 5 群間で比較した（A：箱ひげ図、B：ドットプロット）。

略語：Th17, IL-17 産生性ヘルパー T 細胞；Non-preg, 非妊娠；EOPE, 早発型妊娠高血圧腎症；LOPE, 遅発型妊娠高血圧腎症；PE, 妊娠高血圧腎症。

2) CD4 陽性 T 細胞中の Th1 細胞の割合

CD4 陽性 T 細胞中の Th1 細胞の割合は 5 群間で有意差を認めなかった ($p = 0.054$) (図 10A、10B)。

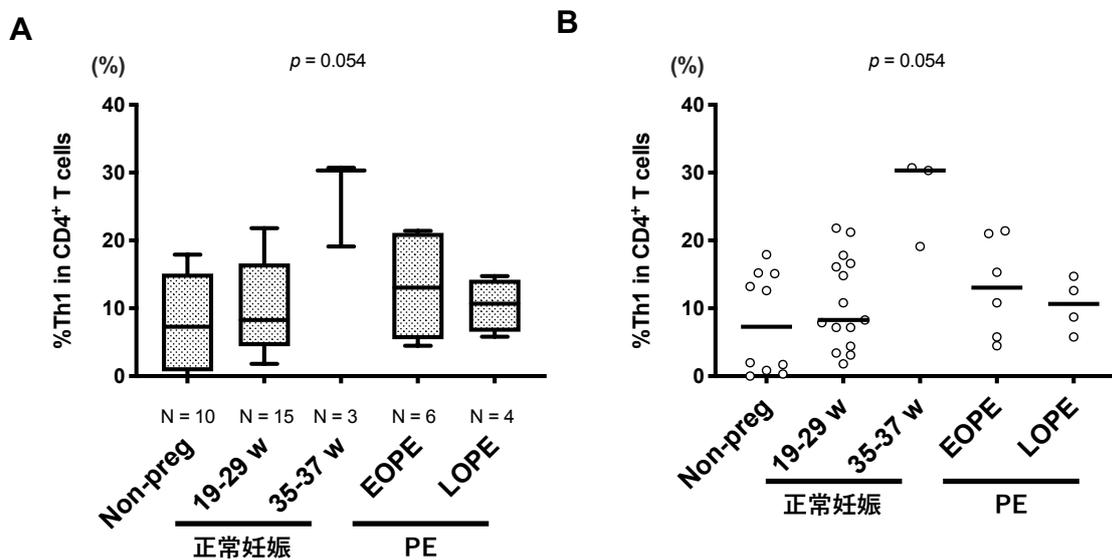


図 10. CD4 陽性 T 細胞中の Th1 細胞割合の比較

CD4 陽性 T 細胞中の Th1 細胞割合を非妊娠、正常妊娠 (19~29 週)、正常妊娠 (35~37 週)、EOPE、LOPE の 5 群間で比較した (A: 箱ひげ図、B: ドットプロット)。

略語: Th1, 1 型ヘルパー T 細胞; Non-preg, 非妊娠; EOPE, 早発型妊娠高血圧腎症; LOPE, 遅発型妊娠高血圧腎症; PE, 妊娠高血圧腎症。

3) 全群における pDCs と Th17 細胞の相関

全群における pDCs と Th17 細胞の相関について検討した (非妊娠 10 名、正常妊娠 19~29 週 15 名、正常妊娠 35~37 週 3 名、EOPE 6 名、LOPE 4 名、計 38 名)。全群を用いて検討したところ、pDCs と Th17 細胞に有意な逆相関を認めた ($r = -0.369$, $p = 0.023$) (図 11A)。また、EOPE を除いて検討しても (非妊娠 10 名、正常妊娠 19~29 週 15 名、正常妊娠 35~37 週 3 名、LOPE 4 名、計 32 名)、pDCs と Th17 細胞に有意な逆相関を認めた ($r = -0.420$, $p = 0.016$) (図 11B)。

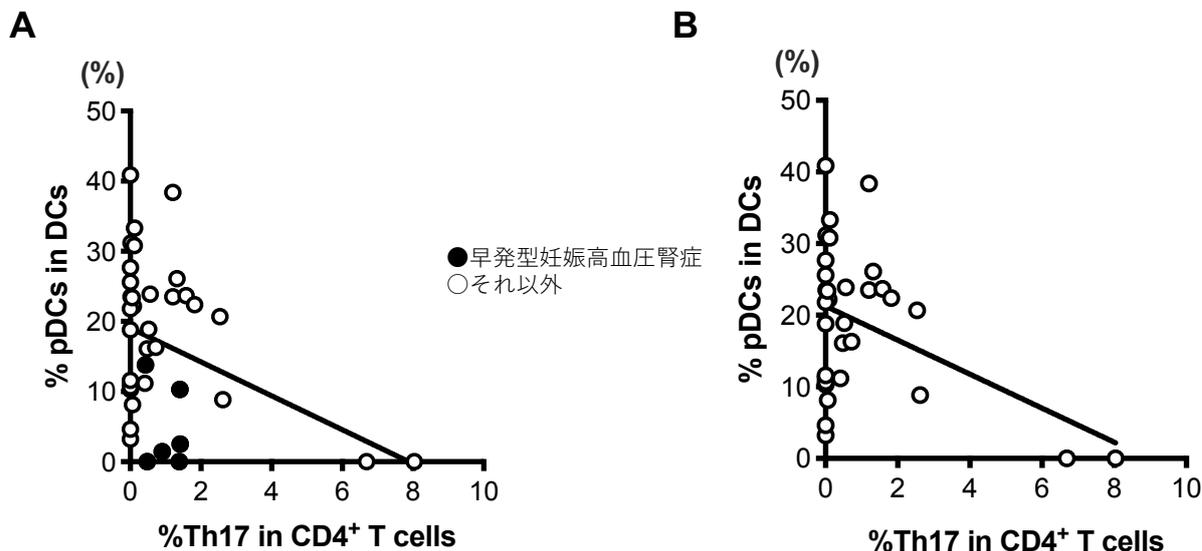


図 11. CD4 陽性 T 細胞中の Th17 細胞割合と DCs 中の pDCs 割合との相関

EOPE は●、それ以外は○で示した。

A : 全群における pDCs と Th17 細胞の相関について検討した。

B : 全群から EOPE を除き、pDCs と Th17 細胞の相関について検討した。

略語: DCs, 樹状細胞; pDCs, 形質細胞様樹状細胞; Th17, IL-17 産生性ヘルパー T 細胞; EOPE, 早発型妊娠高血圧腎症。

4. NK 細胞割合の 5 群間での比較

単核球中の lineage⁻ CD8⁻ CD56⁺ CD16⁺ NK 細胞は、5 群間で有意差を認めなかった ($p = 0.14$) (図 12A、12B)。

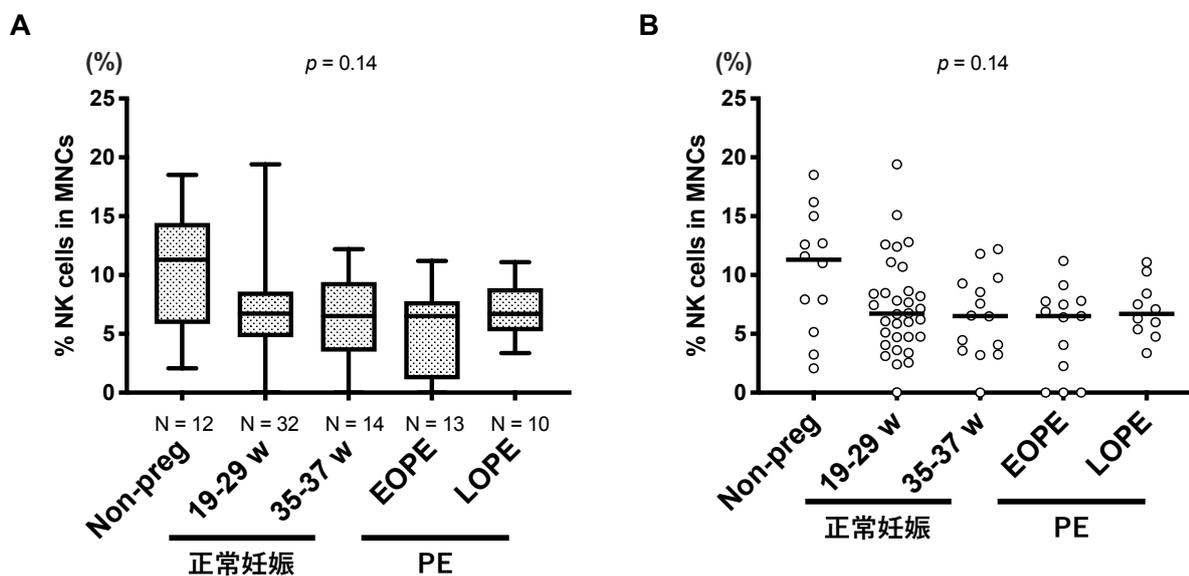


図 12. 単核球中の NK 細胞の割合の比較

単核球中の NK 細胞の割合を非妊娠、正常妊娠 (19~29 週)、正常妊娠 (35~37 週)、EOPE、LOPE の 5 群間で比較した (A: 箱ひげ図、B: ドットプロット)。

略語: MNCs, 単核球; NK cells, ナチュラルキラー細胞; Non-preg, 非妊娠; EOPE, 早発型妊娠高血圧腎症; LOPE, 遅発型妊娠高血圧腎症; PE, 妊娠高血圧腎症。

考察

1. 本研究の結果の要約

本研究で、(1)5~6 カラーフローサイトメトリーによる、DCs (pDCs/mDCs)、Th17 細胞、Th1 細胞、及びNK 細胞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見つけた。EOPE では正常妊娠と比較して、pDCs の細胞数は少なく、mDCs の細胞数は変わらなかった。(3)pDCs と Th17 細胞との間には有意な負の相関を認めた。

2. EOPE における妊娠免疫と pDCs との関連性について

EOPE では正常妊娠と比較して、末梢血中の pDCs の割合は低く、細胞数でも pDCs 数は減少していた。

pDCs は Treg 細胞の誘導に関連していることから、妊娠免疫に重要な役割を果たしていると推測される。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速に増加する。例えば、胎児母体間輸血症候群や Rh マイナスのような血液型不適合は妊娠後期に生じる。PE は通常妊娠 20 週以降にしか生じない。これらの妊娠合併症は妊娠 20 週以降の妊娠後半期から免疫不適合の危険性が上昇することを示唆している。

また、pDCs は臓器移植後の免疫寛容に重要であることが報告されている⁹⁶。肝移植後で、免疫抑制剤の維持療法が必要になった群では、免疫抑制剤の維持療法が必要にならなかった群と比較して、pDCs の割合が低下していた⁹⁶。このことは、移植片に対する免疫寛容の低下と、pDCs の低下が関連していることを示唆している¹¹⁸。本研究において、EOPE では pDCs が低下していたが、移植免疫時の pDCs と同じく、妊娠中の pDCs 低下は免疫寛容の低下を引き起こしたと推測される。

3. EOPE と Th17 細胞、Th1 細胞について

EOPE では、CD4 陽性 T 細胞中の Th17 細胞の割合は正常妊娠と比較して有意に高値を示した。Th17 細胞が PE で多いことは以前にも報告されている^{66,69-75}。Ribeiro ら⁶⁹の報告では、正常妊娠と比較し、EOPE と LOPE の両方で Th17 細胞の割合が増加し、さらに EOPE では LOPE よりも Th17 細胞の割合が増加していた。我々の結果は、Ribeiro らの報告と矛盾しない。なお、本研究では LOPE における Th17 細胞の割合は高かったが、有意差は認めなかった。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。以前の報告では1つの報告を除き⁶⁶、Th17 細胞の同定は細胞内の IL-17 を染色していた⁶⁹⁻⁷⁵。我々は細胞表面を染めて Th17 細胞を同定したことで研究時間の短縮につながった。いずれの方法が Th17 細胞を同定するのにより良いのか不明であるが、表面抗原のみの染色法は Th17 細胞のソーティングには有用と考えられる¹¹⁹。

Th1 細胞が PE で増加することは以前より多数報告されている^{57-59,69}。しかし、本研究における CD4 陽性 T 細胞中の Th1 細胞の割合に有意差はなかった。今までの妊娠や PE における Th1 細胞の報告に関しては、Th1 細胞の同定は細胞内の IFN- γ を染色していた^{57-59,69}。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。さらに、検体数も少なかったため、今後さらなる検討が必要である。

4. EOPE における pDCs/mDCs と Th17 細胞/Th1 細胞との関連について(図 13)

本研究では、EOPE で正常妊娠と比較し pDCs 割合は低く、細胞数も減少していた。一方、mDCs 割合は高かったが、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。また、正常妊娠と比較し EOPE で pDCs の低下と Th17 細胞の増加が見られ、pDCs 割合と Th17 細胞割合の間に有意な負の相関を認めた。

4.1 正常妊娠における pDCs、mDCs、Treg 細胞について

正常妊娠での pDCs、mDCs、Treg 細胞の変化に関して妊娠マウスでの報告がある。マウスでは妊娠成立後、傍大動脈リンパ節で pDCs が増加し、ヒトの mDCs にあたる conventional DCs (cDCs) は減少する。さらに Treg 細胞は増加する。一方、流産モデルである IFN- γ 投与下妊娠マウスでは、正常妊娠と逆に、傍大動脈リンパ節と脱落膜で pDCs は減少し、cDCs は増加し、Treg 細胞は減少していた¹²⁰。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 細胞が胎盤免疫寛容に関与している可能性が考えられる。

4.2 EOPE における mDCs、Th1 細胞、Th17 細胞の関連

mDCs は IL-12、IL-1 β 、IL-6 を産生し Th1 細胞と Th17 細胞を誘導する¹⁰²。CDP から pDCs、mDCs への分化は、toll-like receptor (TLR) 発現によって決定される¹²¹。pDCs では TLR7、TLR9 の強い発現があり、mDCs は TLR1~6、TLR8 の強い発現があるが、PE 患者の DCs は TLR3、TLR4、TLR9 の発現が高く IL-1、IL-12 の産生が増加しているとの報告もある¹²²。また、naïve CD4 陽性 T 細胞を Th17 細胞に分化させる IL-6 は¹²³、PE で増加している¹²⁴。さらに、Wang ら¹²⁵は、PE では DCs から IL-23 (Th17 細胞の維持に関与する) の分泌が増加することを報告している。このように、PE 妊婦の DCs は Th1 細胞と Th17 細胞の誘導能が強いことが示唆される。今回の報告では mDCs の細胞数には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があるかもしれない。前述したが、mDCs には 2 つのサブセットがあり、このうち CD1c⁺mDCs は IL-12、IL-1 β 、IL-6、IL-23 を分泌し Th1 細胞や Th17 細胞を強く誘導する。一方、CD141⁺mDCs も IL-12 と IL-23 を分泌するが Th1 細胞と Th17 細胞の誘導能は弱いと報告されている¹⁰²。今回の検討では mDCs サブセットは解析しなかったが、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になく、今後さらなる検討が望まれる。

4.3 EOPE における Treg 細胞と Th17 細胞について

TGF- β は Treg 細胞の分化を促進するが、PE で産生が亢進する sEng は TGF- β を阻害し Treg 細胞の分化を阻害する可能性が報告されている⁴⁵。また、Th17 細胞の増加には Treg 細胞の可塑性が関連している可能性も考えられる。Treg 細胞は IL-6 の存在下で Th17 細胞に変化することが知られている^{126,127}。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 割合と Th17 細胞割合の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 の低下が関連しているのかもしれない。

4.4 DCs に影響を与える因子について

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¹²⁸。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¹²⁸。placental debris のひとつに合胞体栄養膜細胞由来の syncytiotrophoblast micro-particles (STBMs) が挙げられる¹²⁹。STBMs は単球に取り込まれて炎症反応が起こり、続いて Th17 細胞や顆粒球が活性化することで¹³⁰⁻¹³³、IL-1 β 、IL-6、IL-8、tumor necrosis factor- α (TNF- α)¹³⁴⁻¹³⁶ など炎症性サイトカインが分泌される。STBMs を感知するのは TLR であることが知られており¹³⁰、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。

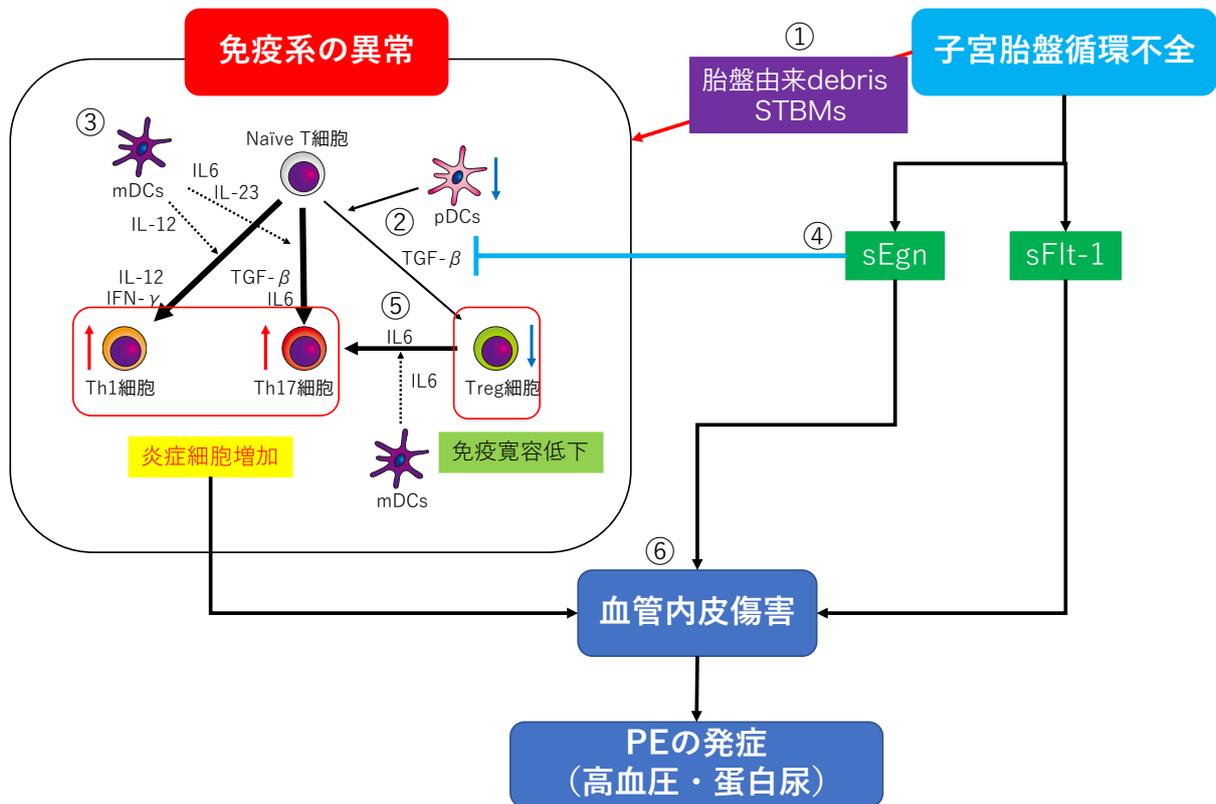


図 13 pDCs/mDCs バランス異常と EOPE の病態メカニズム(仮説)

- ①子宮胎盤循環不全の胎盤から放出された微小因子を DCs が抗原として感知し、DCs サブセットが変化する。
- ②pDCs が減少し、Treg 細胞が減少する。
- ③mDCs が変化し、Th1 細胞や Th17 細胞を誘導する。
- ④子宮胎盤循環不全の胎盤で産生された sEng が母体血液中に放出され、TGF- β を抑制し、Treg 細胞が減少する。
- ⑤mDCs からの IL-6 分泌により Treg 細胞が Th17 細胞へ分化する。
- ⑥Th1 細胞、Th17 細胞から産生された炎症性サイトカイン、sEng、sFlt-1 による血管内皮傷害、全身性炎症により PE が発症する。

略語：IL, interleukin; IFN- γ , interferon- γ ; TGF- β , transforming growth factor- β ; STBMs, syncytiotrophoblast micro-particles; pDCs, 形質細胞様樹状細胞; mDCs, 骨髄系樹状細胞; Th17 細胞, IL-17 産生性ヘルパーT 細胞; Th1 細胞, 1 型ヘルパーT 細胞; Treg 細胞, 制御性 T 細胞; sEng, soluble endoglin; sFlt-1, soluble fms-like tyrosine kinase 1; PE, 妊娠高血圧腎症; DCs, 樹状細胞; EOPE, 早発型妊娠高血圧腎症。

5. 5～6 カラーフローサイトメトリーを用いた DCs (pDCs/mDCs)、Th17 細胞、Th1 細胞、及びNK 細胞の測定系の確立

本研究では、HetaSep™を用いて末梢血から白血球を分離した。例えば、Ficoll (富士フイルム和光、大阪、日本) による濃度勾配法で細胞回収を行う場合、顆粒球とリンパ球をそれぞれ別々に回収する。限られた検体を分けて行うことが必要なため、回収できる細胞数が少なくなることに加えて、手技が煩雑になる。一方、HetaSep™では顆粒球、単球、リンパ球を一度に分離することが可能であるため、検体 (全血 10 mL) を有効に利用でき、手技が 1 回で済むことから有用な方法であった。

フローサイトメトリーの測定系を作成するにあたり、Maecker ら⁹の報告している細胞表面マーカー染色法を用いた。しかし、Th17 細胞は健常者末梢血中には約 0.2～0.6%と大変少ないことから¹³⁷、末梢血をそのまま positive control として用いることは困難であった。そこで、我々は EasySep™ Human Th17 Cell Enrichment Kit (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) を用いた磁気ビースによる細胞分離を行うことで、末梢血中の Th17 細胞を濃縮し positive control として用いた。細胞数が少ない場合は、このような磁気ビース法を用いた細胞濃縮は有用であった。

フローサイトメトリーでは、1つの蛍光色素から複数の検出器への漏れ込みが生じる。今回の様なマルチカラーフローサイトメトリーでは蛍光色素の漏れ込み補正 (コンペンセーション) が重要である。実験当初は、NK 細胞と DCs を同一検体で染色し、8 カラーでの測定を計画していた。しかし、コンペンセーションが複雑であり、最終的には NK 細胞と DCs を分けて計測することとした。また、マルチカラーフローサイトメトリーではカラー数が増えるほど蛍光の漏れ込みが増え、コンペンセーションが複雑となり、各ポピュレーションの分布は広がる。したがって、陰性集団と陽性集団を正確に同定するために、FMO コントロールを用いた。FMO とは使用する抗体カクテルの中からゲーティングしたい蛍光抗体のみを除いて作成したコントロールのことをいう。FMO を用いたゲーティング法は発現量が少ない細胞集団の同定には特に有効である¹¹³。マルチカラーフローサイトメトリーを行うにあたり、コンペンセーションと FMO コントロールにより信頼できるデータを得ることができた。

6. 本研究の限界と展望

本研究は Th17 細胞、Th1 細胞の測定において抗体不足により 38 名しか計測ができなかった。そのため解析の検定力が不足していたと考えられる。

また、NK 細胞を 5 群間で比較したが有意差は見られなかった。本研究は PE の定義から妊娠 20 週以降を対象としたものであったが、NK 細胞が胎盤形成 (妊娠 5～16 週に行われる) に関与することから¹⁰⁶、NK 細胞の変化を見るためには妊娠初期の解析が必要かもしれない。もし NK 細胞が PE 発症前から変化している場合、妊娠初期の末梢血の解析を行うことで発症予知につながる可能性があると考えられる。

さらに、本研究は末梢血を用いた解析であり、胎盤検体を用いた研究ではないため、胎盤免疫をどこまで反映しているかは不明である。PE の病態には胎盤での免疫が強く関連しており、EOPE、LOPE の胎盤における免疫学的評価は重要である。将来的に、同一患者において胎盤検体と血液検

体の両方を用いた免疫学的評価が望まれる。

まとめ

本研究で、(1)5~6カラーフローサイトメトリーによる、DCs (pDC/mDC)、Th17 細胞、Th1 細胞、及びNK 細胞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。EOPE では正常妊娠と比較して、pDCs の細胞数は少なく、mDCs の細胞数は変わらなかった。(3)pDCs と Th17 細胞との間には、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 PE 患者における 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。

謝辞

論文作成にあたり、大口昭英教授、白砂孔明准教授（東京農業大学）、永山学先生、西村智教授、高橋将文教授、松原茂樹名誉教授にご指導いただきました。また、フローサイトメトリーの使用にあたり研究補助員の早川裕子氏に支援をいただきました。心より感謝いたします。本研究は、私立大学戦略研究基盤形成支援事業(S1311029)の研究費を用いて実施しました。

参考文献

1. Watanabe, K., Naruse, K., Tanaka, K., Metoki, H., Suzuki, Y. Outline of definition and classification of “Pregnancy induced Hypertension (PIH)”. *Hypertens Res Pregnancy*. 1: 3-4, 2013.
2. Makino, S., Takeda, J., Takeda, S., Watanabe, K., Matsubara, K., Nakamoto, O., Ushijima, J., Ohkuchi, A., Koide, K., Mimura, K., Morikawa, M., Naruse, K., Tanaka, K., Nohira, T., Metoki, H., Kawabata, I., Takagi, K., Yamasaki, M., Ichihara, A., Kimura, T., Saito, S., Seki, H. New definition and classification of “Hypertensive Disorders of Pregnancy (HDP)”. *Hypertens Res Pregnancy*. 7: 1-5, 2019.
3. Tranquilli, A.L., Brown, M.A., Zeeman, G.G., Dekker, G., Sibai, B.M. The definition of severe and early-onset preeclampsia. Statements from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Pregnancy Hypertens*. 3: 44-47, 2013.
4. Lisonkova, S., Sabr, Y., Mayer, C., Young, C., Skoll, A., Joseph, K.S. Maternal morbidity associated with early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 124: 771-781, 2014.
5. Kovo, M., Schreiber, L., Ben-Haroush, A., Gold, E., Golan, A., Bar, J. The placental component in early-onset and late-onset preeclampsia in relation to fetal growth restriction. *Prenat Diagn*. 32: 632-637, 2012.
6. Sibai, B.M., Barton, J.R. Expectant management of severe preeclampsia remote from term: patient selection, treatment, and delivery indications. *Am J Obstet Gynecol*. 196: e1-9, 2007.
7. Duley, L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*. 33: 130-137, 2009.
8. Katsuragi, S., Tanaka, H., Hasegawa, J., Nakamura, M., Kanayama, N., Nakata, M., Murakoshi, T., Yoshimatsu, J., Osato, K., Tanaka, K., Sekizawa, A., Ishiwata, I., Ikeda, T. Analysis of preventability of hypertensive disorder in pregnancy-related maternal death using the nationwide registration system of maternal deaths in Japan.; Maternal Death Exploratory Committee in Japan and Japan Association of Obstetricians and Gynecologists. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 32: 3420-3426, 2019.
9. Xiong, X., Buekens, P., Pridjian, G., Fraser, W.D. Pregnancy-induced hypertension and perinatal mortality. *Reprod Med*. 52: 402-406, 2007.
10. Bellamy, L., Casas, J.P., Hingorani, A.D., Williams, D.J. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 335: 974. 2007.
11. Veerbeek, J.H., Hermes, W., Breimer, A.Y., van Rijn, B.B., Koenen, S.V., Mol, B.W., Franx, A., de Groot, C.J., Koster, M.P. Cardiovascular disease risk factors after early-onset

- preeclampsia, late-onset preeclampsia, and pregnancy induced hypertension. *Hypertension*. 65: 600-606, 2015.
12. Brown, M.A., Magee, L.A., Kenny, L.C., Karumanchi, S.A., McCarthy, F.P., Saito, S., Hall, D.R., Warren, C.E., Adoyi, G., Ishaku, S. International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). Hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis, and management recommendations for international practice. *Hypertension*. 72: 24-43, 2018.
 13. 日本妊娠高血圧学会監修。妊娠高血圧症候群の診療指針 2015 Best Practice Guide、IX 分娩
 周辺期および分娩時の管理、2. 妊娠終結の決定条件、CQ 妊娠終結の決定条件は？ pp. 200-
 204、2016.
 14. Duckitt, K., Harrington, D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic
 review of controlled studies. *BMJ*. 330: 565, 2005.
 15. Bartsch, E., Medcalf, K.E., Park, A.L., Ray, J.G. Clinical risk factors for pre-eclampsia
 determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort
 studies.; High Risk of Pre-eclampsia Identification Group. *BMJ*. 353: i1753, 2016.
 16. Sibai, B., Dekker, G., Kupferminc, M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 365: 785-799, 2005.
 17. Nagayama, S., Ohkuchi, A., Usui, R., Matsubara, S., Suzuki, M. The role of the father in
 the occurrence of preeclampsia. *Med J Obstet Gynecol*. 2: 1029, 2014.
 18. Dekker, G., Robillard, P.Y., Roberts, C. The etiology of preeclampsia: the role of the father.
J Reprod Immunol. 89: 126-132, 2011.
 19. Cnossen, J.S., Morris, R.K., ter Riet, G., Mol, B.W., van der Post, J.A., Coomarasamy, A.,
 Zwinderman, A.H., Robson, S.C., Bindels, P.J., Kleijnen, J., Khan, K.S. Use of uterine
 artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth
 restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ*. 11: 701-711, 2008.
 20. Morgan, T., Craven, C., Nelson, L., Laloue, J.M., Ward, K. Angiotensinogen T235
 expression is elevated in decidual spiral arteries. *Clin Invest*. 100: 1406-1415, 1997.
 21. Eskenazi, B., Fenster, L., Sidney, S. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia.
JAMA. 266: 237-241, 1991.
 22. Pijnenborg, R. Establishment of uteroplacental circulation. *Reprod Nutr Dev*. 28: 1581-
 1586, 1988.
 23. King, A., Balendran, N., Wooding, P., Carter, N.P., Loke, Y.W. CD3⁺ leukocytes present in
 the human uterus during early placentation: phenotypic and morphologic characterization
 of the CD56⁺⁺ population. *Dev Immunol*. 1: 169-190, 1991.
 24. Bulmer, J., Morrison, L., Longfellow, M., Ritson, M.A., Pace, D. Granulated lymphocytes
 in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod*.
 6: 791-798, 1991.
 25. Engert, S., Rieger, L., Kapp, M., Becker, J.C., Dietl, J., Kämmerer, U. Profiling chemokines,

- cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array. *Am J Reprod Immunol.* 58: 129-137, 2007.
26. Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., Gazit, R., Yutkin, V., Benharroch, D., Porgador, A., Keshet, E., Yagel, S., Mandelboim, O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med.* 12: 1065-1074, 2006.
 27. Svensson-Arvelund, J., Ernerudh, J., Buse, E., Cline, J.M., Haeger, J.D., Dixon, D., Markert, U.R., Pfarrer, C., Vos, P.D., Faas, M.M. The placenta in toxicology. Part II: systemic and local immune adaptations in pregnancy. *Toxicol Pathol.* 42: 327-338, 2014.
 28. Heikkinen, J., Möttönen, M., Komi, J., Alanen A., Lassila, O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol.* 131: 498-505, 2003.
 29. Lidström, C., Matthiesen, L., Berg, G., Sharma, S., Ernerudh, J., Ekerfelt, C. Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua. *Am J Reprod Immunol.* 50: 444-452, 2003.
 30. Kim, S.Y., Romero, R., Tarca, A.L., Bhatti, G., Kim, C.J., Lee, J., Elsey, A., Than, N.G., Chaiworapongsa, T., Hassan, S.S., Kang, G.H., Kim, J.S. Methylome of fetal and maternal monocytes and macrophages at the feto-maternal interface. *Am J Reprod Immunol.* 68: 8-27, 2012.
 31. Gustafsson, C., Mjosberg, J., Matussek, A., Geffers, R., Matthiesen, L., Berg, G., Sharma, S., Buer, J., Ernerudh, J. Gene expression profiling of human decidual macrophages: Evidence for immunosuppressive phenotype. *PLoS ONE.* 3: e2078, 2008.
 32. Gardner, L., Moffett, A. Dendritic cells in the human decidua. *Biol Reprod.* 69: 1438-1446, 2003.
 33. Plaks, V., Birnberg, T., Berkutzki, T., Sela, S., BenYashar, A., Vyacheslav Kalchenko, V., Mor, G., Keshet, E., Dekel, N., Neeman, M., Jung, S. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *J Clin Invest.* 118: 3954-3965, 2008.
 34. Blois, S.M., Alba Soto, C.D., Tometten, M., Klapp, B.F., Margni, R.A., Arck, P.C. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod.* 70: 1018-1023, 2004.
 35. Fan, D.X., Duan, J., Li, M.Q., Xu, B., Li, D.J., Jin, L.P. The decidual gamma-delta T cells up-regulate the biological functions of trophoblasts via IL-10 secretion in early human pregnancy. *Clin Immunol.* 141: 284-292, 2011.
 36. Mincheva-Nilsson, L., Baranov, V., Yeung, M.M., Hammarstrom, S., and Hammarstrom, M.L. Immunomorphologic studies of human decidua-associated lymphoid cells in normal early pregnancy. *J Immunol.* 152: 2020-2032, 1994.

37. Nagaeva, O., Jonsson, L., Mincheva-Nilsson, L. Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadelta T cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. *Am J Reprod Immunol.* 48: 9-17, 2002.
38. Redman, C.W., Sargent, I.L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 308: 1592-1594, 2005.
39. Takahashi, H., Ohkuchi, A., Kuwata, T., Usui, R., Baba, Y., Suzuki, H., Kyi, T.T.C., Matsubara, S., Saito, S., Takizawa, T. Endogenous and exogenous miR-520c-3p modulates CD44-mediated extravillous trophoblast invasion. *Placenta.* 50: 25-31, 2017.
40. Karumanchi, S.A., Bdolah, Y. Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the "chicken-and-egg" question. *Endocrinology.* 145: 4835-4837, 2004.
41. Nagamatsu, T., Fujii, T., Kusumi, M., Zou, L., Yamashita, T., Osuga, Y., Momoeda, M., Kozuma, S., Taketani, Y. Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology.* 145: 4838-4845, 2004.
42. Khaliq, A., Dunk, C., Jiang, J., Shams, M., Li, X.F., Acevedo, C., Weich, H., Whittle, M., Ahmed, A. Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. *Lab Invest.* 79: 151-170, 1999.
43. Gilbert, J.S., Gilbert, S.A.B., Arany, M., Granger, J.P. Hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats is associated with increased soluble endoglin expression. *Hypertension.* 53: 399-403, 2009.
44. Gu, Y., Lewis, D.F., Wang, Y. Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 93: 260-266, 2008.
45. Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y.M., Bdolah, Y., Lim, K.H., Yuan, H.T., Libermann, T.A., Stillman, I.E., Roberts, D., D'Amore, P.A., Epstein, F.H., Sellke, F.W., Romero, R., Sukhatme, V.P., Letarte, M., Karumanchi, S.A. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 12: 642-649, 2006.
46. Tsatsaris, V., Goffin, F., Munaut, C., Brichant, J.F., Pignon, M.R., Noel, A., Schaaps, J.P., Cabrol, D., Frankenne, F., Foidart, J.M. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 5555-5563, 2003.
47. Levine, R.J., Lam, C., Qian, C., Yu, K.F., Maynard, S.E., Sachs, B.P., Sibai, B.M., Epstein, F.H., Romero, R., Thadhani, R., Karumanchi, S.A. CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 355: 992-1005, 2006.
48. Rana, S., Karumanchi, S.A., Levine, R.J., Venkatesha, S., Rauh-Hain, J.A., Tamez, H.,

- Thadhani, R. Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. *Hypertension*. 50: 137-142, 2007.
49. Lash, G.E., Taylor, C.M., Trew, A.J., Cooper, S., Anthony, F.W., Wheeler, T., Baker, P.N. Vascular endothelial growth factor and placental growth factor release in cultured trophoblast cells under different oxygen tensions. *Growth Factors*. 20: 189-196, 2002.
50. Ahmad, S., Hewett, W.P., Al-Ani, B., Sissaoui, S., Fujisawa, T., Cudmore, J. M., Ahmed, A. Autocrine activity of soluble Flt-1 controls endothelial cell function and angiogenesis. *Vasc Cell*. 3: 15, 2011.
51. Walshe, T.E., Saint-Geniez, M., Maharaj, A.S., Sekiyama, E., Maldonado, A.E., D'Amore, P.A. TGF-beta is required for vascular barrier function, endothelial survival and homeostasis of the adult microvasculature. *PLoS One* 4: e5149, 2009.
52. Suzuki, H., Ohkuchi, A., Matsubara, S., Takei, Y., Murakami, M., Shibuya, M., Suzuki, M., Sato, Y. Effect of recombinant placental growth factor 2 on hypertension induced by full-length mouse soluble fms-like tyrosine kinase 1 adenoviral vector in pregnant mice. *Hypertension*. 54: 1129-1135, 2009.
53. Burke, S.D., Zsengellér, Z.K., Khankin, E.V., Lo, A.S., Rajakumar, A., DuPont, J.J., McCurley, A., Moss, M.E., Zhang, D., Clark, C.D., Wang, A., Seely, E.W., Kang, P.M., Stillman, I.E., Jaffe, I.Z., Karumanchi, S.A. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia. *J Clin Invest*. 126: 2561-2574, 2016.
54. 松島鋼治、上羽悟史、七野成之、中島拓弥. 実験医学別冊 もっとよくわかる！炎症と疾患、第2章 炎症・免疫反応にかかわるさまざまな白血球、pp.20-63, 2019.
55. Kolls, J.K., Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 21: 467-476, 2004.
56. Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-foetal relationship is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol*. 14: 353-356, 1993.
57. Saito, S., Sakai, M., Sasaki, Y., Tanebe, K., Tsuda, H., Michimata, T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin. Exp. Immunol*. 117: 550-555, 1999.
58. Ohkuchi, A., Minakami, H., Aoya, T., Haga, T., Kimura, H., Suzuki, M., Sato, I. Expansion of the fraction of Th1 cells in women with preeclampsia: inverse correlation between the percentage of Th1 cells and the plasma level of PAI-2. *Am J Reprod Immunol*. 46: 252-259, 2001.
59. Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., Ito, M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 63: 601-610, 2010.
60. Sasaki, Y., Darmochwal-Kolarz, D., Suzuki, D., Sakai, M., Ito, M., Shima, T., Shiozaki, A., Rolinski, J., Saito, S. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright)

- regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol.* 149: 139-145, 2007.
61. Steinborn, A., Haensch, G.M., Mahnke, K., Schmitt, E., Toermer, A., Meuer, S., Sohn, C. Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? *Clin Immunol.* 129: 401-412, 2008.
 62. Toldi, G., Svec, P., Vásárhelyi, B., Mészáros, G., Rigó, J., Tulassay, T., Treszl, A. Decreased number of FoxP3⁺ regulatory T cells in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 87: 1229-1233, 2008.
 63. Prins, J.R., Boelens, H.M., Heimweg, J., Van der Heide, S., Dubois, A.E., Van Oosterhout, A.J., Erwich, J.J. Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. *Hypertens Pregnancy.* 28: 300-311, 2009.
 64. Santner-Nanan, B., Peek, M.J., Khanam, R., Richarts, L., Zhu, E., Fazekas de St Groth, B., Nanan, R. Systemic increase in the ratio between Foxp3⁺ and IL-17-producing CD4⁺ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol.* 183: 7023-7030, 2009.
 65. Steinborn, A., Schmitt, E., Kisielewicz, A., Rechenberg, S., Seissler, N., Mahnke, K., Schaier, M., Zeier, M., Sohn, C. Pregnancy-associated diseases are characterized by the composition of the systemic regulatory T cell (Treg) pool with distinct subsets of Tregs. *Clin Exp Immunol.* 167: 84-98, 2012.
 66. Toldi, G., Rigó, J. Jr., Stenczer, B., Vásárhelyi, B., Molvarec, A. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 66: 223-229, 2011.
 67. Toldi, G., Saito, S., Shima, T., Halmos, A., Veresh, Z., Vásárhelyi, B., Rigó, J. Jr., Molvarec, A. The frequency of peripheral blood CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ and CD4⁺ CD25⁻ FoxP3⁺ regulatory T cells in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 68: 175-180, 2012.
 68. Darmochwal-Kolarz, D., Saito, S., Tabarkiewicz, J., Kolarz, B., Rolinski, J., Leszczynska-Gorzela, B., Oleszczuk, J. Apoptosis signaling is altered in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory lymphocytes in pre-eclampsia. *Int J Mol Sci.* 13: 6548-6560, 2012.
 69. Ribeiro, V.R., Romao-Veiga, M., Romagnoli, G.G., Matias, M.L., Nunes, P.R., Borges, V.T.M., Peracoli, J.C., Peracoli, M.T.S. Association between cytokine profile and transcription factors produced by T-cell subsets in early- and late-onset pre-eclampsia. *Immunology.* 152: 163-173, 2017.
 70. Darmochwal-Kolarz, D., Kludka-Sternik, M., Tabarkiewicz, J., Kolarz, B., Rolinski, J., Leszczynska-Gorzela, B., Oleszczuk, J. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 93: 75-81, 2012.
 71. Zhang, Z., Liu, H., Shi, Y., Xu, N., Wang, Y., Li, A., Song, W. Increased circulating Th2 cells correlated with Th17 cells in patients with severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 36:

100-107, 2017.

72. Salazar Garcia, M.D., Mobley, Y., Henson, J., Davies, M., Skariah, A., Dambaeva, S., Gilman-Sachs, A., Beaman, K., Lampley, C., Kwak-Kim, J. Early pregnancy immune biomarkers in peripheral blood may predict preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 125: 25-31, 2018.
73. Eghbal-Fard, S., Yousefi, M., Heydarlou, H., Ahmadi, M., Taghavi, S., Movasaghpour, A., Jadidi-Niaragh, F., Yousefi, B., Dolati, S., Hojjat-Farsangi, M., Rikhtegar, R., Nouri, M., Aghebati-Maleki, L. The imbalance of Th17/Treg axis involved in the pathogenesis of preeclampsia. *J Cell Physiol.* 234: 5106-5116, 2019.
74. Jabalie, G., Ahmadi, M., Koushaeian, L., Eghbal-Fard, S., Mehdizadeh, A., Kamrani, A., Abdollahi-Fard, S., Farzadi, L., Hojjat-Farsangi, M., Nouri, M., Yousefi, M. Metabolic syndrome mediates proinflammatory responses of inflammatory cells in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 81: e13086, 2019.
75. Muyayalo, K.P., Huang, X.B., Qian, Z., Li, Z.H., Mor, G., Liao, A.H. Low circulating levels of vitamin D may contribute to the occurrence of preeclampsia through deregulation of Treg /Th17 cell ratio. *Am J Reprod Immunol.* 82: e13168, 2019.
76. Matias, M.L., Romao, M., Weel, I.C., Ribeiro, V.R., Nunes, P.R., Borges, V.T., Araújo, J.P. Jr., Peraçoli, J.C., Oliveira, L., Peraçoli, M.T. Endogenous and uric acid-induced activation of NLRP3 inflammasome in pregnant women with preeclampsia. *PLoS ONE.* 10: e0129095, 2015.
77. Weel, C.I., Romao-Veiga, M., Matias, M.L., Fioratti, E.G., Peracoli, J.C., Borges, V.T., Araújo, J.P. Jr., Peraçoli, M.T. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 123: 40-47, 2017.
78. Shirasuna, K., Usui, F., Karasawa, T., Kimura, H., Kawashima, A., Mizukami, H., Ohkuchi, A., Nishimura, S., Sagara, J., Noda, T., Ozawa, K., Taniguchi, S., Takahashi, M. Nanosilica-induced Placental Inflammation and Pregnancy Complications: Different Roles of the Inflammasome Components NLRP3 and ASC. *Nanotoxicology.* 9: 554-567, 2015.
79. Tamura, K., Ishikawa, G., Yoshie, M., Ohneda, W., Nakai, A., Takeshita, T., Tachikawa, E. Glibenclamide inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion in human trophoblasts. *J Pharmacol Sci.* 135: 89-95, 2017.
80. Shao, J., Zhao, M., Tong, M., Wei, J., Wise, R.M., Stone, P., Chamley, L., Chen, Q. Increased levels of HMGB1 in trophoblastic debris may contribute to preeclampsia. *Reproduction.* 152: 775-784, 2016.
81. Wei, J., Chen, Q., James, J.L., Stone, P.R., Chamley, L.W. IL-1 beta but not the NALP3 inflammasome is an important determinant of endothelial cell responses to necrotic/dangerous trophoblastic debris. *Placenta.* 36: 1385-1392, 2015.
82. Shirasuna, K., Karasawa, T., Takahashi, M. Role of the NLRP3 inflammasome in

- preeclampsia. *Front Endocrinol.* 11: 80, eCollection, 2020.
83. Blois, S.M., Kammerer, U., Alba Soto, C., Tometten, M.C., Shaikly, V., Barrientos, G., Jurd, R., Rukavina, D., Thomson, A.W., Klapp, B.F., Fernández, N., Arck, P.C. Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biol Reprod.* 77: 590-598, 2007.
 84. Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., Flavell, R.A. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell.* 117: 515-526, 2004.
 85. Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol.* 89195, 2007.
 86. Liotta, F., Frosali, F., Querci, V., Mantei, A., Filì, L., Maggi, L., Mazzinghi, B., Angeli, R., Ronconi, E., Santarlasci, V., Biagioli, T., Lasagni, L., Ballerini, C., Parronchi, P., Scheffold, A., Cosmi, L., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. Human immature myeloid dendritic cells trigger a TH2-polarizing program via Jagged-1/Notch interaction. *J Allergy Clin Immunol.* 121: 1000-1005, 2008.
 87. O'Keeffe, M., Mok, W.H., Radford, K.J. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 72: 4309-4325, 2015.
 88. Chistiakov, D.A., Sobenin, I.A., Orekhov, A.N., Bobryshev, Y.V. Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunobiology.* 220: 833-844, 2015.
 89. 佐藤克明. 2.樹状細胞サブセットと機能、アレルギー, 65: 11-17, 2016.
 90. Collin, M., McGovern, N., Haniffa, M. Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 140: 22-30, 2013.
 91. Gilliet, M., Cao, W., Liu, Y.J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 8: 594-606, 2008.
 92. Boris, R., Anna, B., Hiyaa, S.G., Kanako, L.L., Vanja, S. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol.* 29: 163-183, 2011.
 93. Kuwana, M. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol.* 63: 1156-1163, 2002.
 94. Puccetti, P., Fallarino, F. Generation of T cell regulatory activity by plasmacytoid dendritic cells and tryptophan catabolism. *Blood Cells Mol Dis.* 40: 101-105, 2008.
 95. Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., Sisirak, V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol.* 29: 163-183, 2011.
 96. Rogers, N.M., Isenberg, J.S., Thomson, A.W. Plasmacytoid dendritic cells: no longer an enigma and now key to transplant tolerance? *Am J Transplant.* 13: 1125-1133, 2013.
 97. Martín-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbí, A.L., Toribio, M.L. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood.* 115: 5366-5375, 2010.

98. Hanabuchi, S., Ito, T., Park, W.R., Watanabe, N., Shaw, J.L., Roman, E., Arima, K., Wang, Y.H., Voo, K.S., Cao, W., Liu, Y.J. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol.* 184: 2999-3007, 2010.
99. Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.N., Malinarich, F., Malleret, B., Larbi, A., Tan, P., Zhao, H., Poidinger, M., Pagan, S., Cookson, S., Dickinson, R., Dimmick, I., Jarrett, R.F., Renia, L., Tam, J., Song, C., Connolly, J., Chan, J.K.Y., Gehring, A., Bertoletti, A., Collin, M., Ginhoux, F. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity.* 37: 60-73, 2012.
100. Villadangos, J.A., Shortman, K. Found in translation: the human equivalent of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J Exp Med.* 207: 1131-1134, 2010.
101. Leslie, D.S., Vincent, M.S., Spada, F.M., Das, H., Sugita, M., Morita, C.T., Brenner, M.B. CD1-mediated T cell maturation of dendritic cells. *J Exp Med.* 196: 1575-1584, 2002.
102. Rojas, I.M.L., Mok, W.H., Pearson, F.E., Minoda, Y., Kenna, T.J., Barnard, R.T., Radford, K.J. Human blood CD1c⁺ dendritic cells promote Th1 and Th17 effector function in memory CD4⁺ T Cells. *Front Immunol.* 8: 971, 2017.
103. Ban, Y.L., Kong, B.H., Qu, X., Yang, Q.F., Ma, Y.Y. BDCA-1⁺, BDCA-2⁺ and BDCA-3⁺ dendritic cells in early human pregnancy decidua. *Clin Exp Immunol.* 151: 399-406, 2008.
104. Wang, J., Tao, Y.M., Cheng, X.Y., Zhu, T.F., Chen, Z.F., Yao, H., Su, L.X. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell activity in hypertensive disorders of pregnancy. *Mol Med Rep.* 12: 3781-3786, 2015.
105. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22: 633-640, 2001.
106. Cunningham, F.G., Leveno, K.J., Bloom, S.L., Spong, C.Y., Dashe, J.S. Section 3. Placentation, embryogenesis, and fetal development, immunological considerations of the fetal-maternal interface. *Williams Obstetrics, 24th Edition*, pp98, 2014.
107. Southcombe, J., Redman, C., Sargent, I.L. Peripheral blood invariant natural killer T cells throughout pregnancy and in preeclamptic women. *J Reprod Immunol.* 87: 52-59, 2010.
108. Borzychowski, A.M., Croy, B.A., Chan, W.L., Redman, C.W.G., Sargent, I.L. Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and pre-eclampsia may be mediated by natural killer cells. *Eur J Immunol.* 35: 3054-3063, 2005.
109. Darmochwal-Kolarz, D., Rolinski, J., Leszczynska-Goarzelak, B., Oleszczuk, J. The expressions of intracellular cytokines in the lymphocytes of preeclamptic patients. *Am J Reprod Immunol.* 48: 381-386, 2002.
110. Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., Betz, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 5: 266-271, 2004.

111. Wang, W.J., Hao, C.F., Lin, Y., Yin, G.J., Bao, S.H., Qiu, L.H., Lin, Q.D. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol.* 84: 164-170, 2010.
112. Maecker, H.T., McCoy, J.P., Nussenblatt, R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol.* 12: 191-200, 2012.
113. Fox, A., Dutt, T.S., Karger, B., Rojas, M., Obregón-Henao, A., Anderson, G.B., Henao-Tamayo, M. Cyto-Feature Engineering: A pipeline for flow cytometry analysis to uncover immune populations and associations with disease. *Sci Rep.* 10: 7651, 2020.
114. Minakami, H., Maeda, T., Fujii, T., Hamada, H., Iitsuka, Y., Itakura, A., Itoh, H., Iwashita, M., Kanagawa, T., Kanai, M., Kasuga, Y., Kawabata, M., Kobayashi, K., Kotani, T., Kudo, Y., Makino, Y., Matsubara, S., Matsuda, H., Miura, K., Murakoshi, T., Murotsuki, J., Ohkuchi, A., Ohno, Y., Ohshiba, Y., Satoh, S., Sekizawa, A., Sugiura, M., Suzuki, S., Takahashi, T., Tsukahara, Y., Unno, N., Yoshikawa, H. Guidelines for obstetrical practice in Japan: Japan Society of Obstetrics and Gynecology (JSOG) and Japan Association of Obstetricians and Gynecologists (JAOG) 2014 edition. *J Obstet Gynaecol Res.* 40: 1469-1499, 2014.
115. Ogawa, Y., Iwamura, T., Kuriya, N., Nishida, H., Takeuchi, H., Yakada, M., Itabashi, K., Imura, S., Isobe, K. Birth size standards by gestational age for Japanese neonates. *Acta Neonatol Jpn.* 34: 624-632, 1998.
116. Shinozuka N. Fetal biometry and fetal weight estimation: JSUM standardization. *Ultrasound Rev Obset Gynecol.* 2: 156-161, 2002.
117. Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48: 452-458, 2013.
118. George V Mazariegos, G.V., Zahorchak, A.F., Reyes, J., Ostrowski, L., Flynn, B., Zeevi, A., Thomson, A.W. Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. *Am J Transplant.* 3:689-696, 2003.
119. Dunay, G.A., Tóth, I., Eberhard, J.M., Degen, O., Tolosa, E., van Lunzen, J., Hauber, J., Schulze Zur Wiesch, J. Parallel assessment of Th17 cell frequencies by surface marker co-expression versus ex vivo IL-17 production in HIV-1 infection. *Cytometry B Clin Cytom.* 90: 486-492, 2016.
120. Fang, W.N., Shi, M., Meng, C.Y., Li, D.D., Peng, J.P. The balance between conventional DCs and plasmacytoid DCs is pivotal for immunological tolerance during pregnancy in the mouse. *Sci Rep.* 6: 26984, 2016.
121. Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 31: 3388-3393, 2001.

122. Panda, B., Panda, A., Ueda, I., Abrahams, V.M., Norwitz, E.R., Stanic, K., Young, B.C., Ecker, J.L., Altfeld, M., Shaw, A.C., Rueda, B.R. Dendritic cells in the circulation of women with preeclampsia demonstrate a pro-inflammatory bias secondary to dysregulation of TLR receptors. *J Reprod Immunol.* 94: 210-215, 2012.
123. Yuk, C.M., Park, H.J., Kwon, B.I., Lah, S.J., Chang, J., Kim, J.Y., Lee, K.M., Park, S.H., Hong, S., Lee, S.H. Basophil-derived IL-6 regulates TH17 cell differentiation and CD4 T cell immunity. *Sci Rep.* 30: 41744, 2017.
124. Lau, S.Y., Guild, S.J., Barrett, C.J., Chen, Q., McCowan, L., Jordan, V., Chamley, L.W. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol.* 70: 412-427, 2013.
125. Wang, J., Tao, Y.M., Cheng, X.Y., Zhu, T.F., Chen, Z.F., Yao, H., Su, L.X. Dendritic cells derived from preeclampsia patients influence Th1/Th17 cell differentiation in vitro. *Int. J Clin Exp Med.* 7: 5303-5309, 2014.
126. Koenen, H.J.P.M., Smeets, R.L., Vink, P.M., Rijssen, E.V., Boots, A.M.H., Joosten, I. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood.* 112: 2340-2352, 2008.
127. Beriou, G., Costantino, C.M., Ashley, C.W., Yang, L., Kuchroo, V.K., Baecher-Allan, C., Hafler, D.A. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood.* 113: 4240-4249, 2009.
128. Knight, M., Redman, C.W., Linton, E.A., Sargent, I.L. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.* 105: 632-640, 1998.
129. Wei, J., Blenkiron, C., Tsai, P., James, J.L., Chen, Q., Stone, P.R., Chamley, L.W., Placental trophoblast debris mediated fetomaternal signalling via small RNA delivery: implications for preeclampsia. *Sci Rep.* 7: 14681, 2017.
130. Laresgoiti-Servitje, E. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J Leukoc Biol.* 94: 247-257, 2013.
131. Germain, S.J., Sacks, G.P., Sooranna, S.R., Sargent, I.L., Redman, C.W. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J Immunol.* 178: 5949-5956, 2007.
132. Sacks, G.P., Studena, K., Sargent, K., Redman, C.W. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* 179: 80-86, 1998.
133. Melgert, B.N., Spaans, F., Borghuis, T., Klok, A.p., Groen, B., Bolt, A., de Vos, P., van Pampus, M.G., Wong, T.Y., van Goor, H., Bakker, W.W., Faas, M.M. Pregnancy and preeclampsia affect monocyte subsets in humans and rats. *PLoS One.* 7: e45229, 2012.

134. Lau, S.Y., Guild, S.J., Barrett, C.J., Chen, Q., McCowan, L., Jordan, V., Chamley, L.W. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol.* 70: 412-427, 2013.
135. Mellembakken, J.R., Aukrust, P., Hestdal, K., Ueland, T., Abyholm, T., Videm, V. Chemokines and leukocyte activation in the fetal circulation during preeclampsia. *Hypertension.* 38: 394-398, 2001.
136. Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V., Guller, S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann NY Acad Sci.* 1221: 80-87, 2011.
137. Vargas-Rojas, M.I., Ramírez-Venegas, A., Limón-Camacho, L., Ochoa, L., Hernández-Zenteno, R., Sansores, R.H. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 105: 1648-1654, 2011.