

プロジェステロンが牛のリンパ球に及ぼす作用

前田洋佑

北里大学大学院 獣医畜産学研究科・日本学術振興会特別研究員 DC
(〒034-8628 青森県十和田市東23番町35-1)

【はじめに】

近年、乳牛の泌乳能力は遺伝的改良と飼育管理技術の発展により向上しているが、その一方で着床率の低下や分娩間隔の延長など繁殖成績の低下が深刻な問題となっている。こうした背景の中、受胎率向上に向けた研究が数多く進められている。しかし、最も基礎的な情報となるべき受精や受胎のメカニズムが複雑であるとともに、未だに不明な点が多く残されていることは繁殖成績向上の実効を上げるための障壁となっていると考えられる。ヒトやマウスなどの研究において、妊娠の成立と維持には生殖免疫が関わっており、プロジェステロン (P_4) などの内分泌調整は免疫機能に大きく影響を与えているとされている。家畜の子宮の形態および機能や、胎児 (子) と母体間の接触部位 (境界面) である胎盤と子宮との接合様式は、有胎盤類の動物種間により各々異なるため、他種動物における妊娠と内分泌および免疫学的相互作用に関する知見をウシに外挿し、ウシの生殖免疫を考察することは必ずしも適当とはいえない。本稿では、妊娠における免疫学的現象に関する知見を中心に、ウシの生殖免疫と P_4 に関する我々の知見を紹介する。

【免疫学における生殖免疫】

免疫とは自己と非自己を識別し、非自己を排除する機構である。妊娠における免疫は、非自己である精子が雌の体内に入り受精し、半分が非自己である胚が子宮に着床し、体内で发育し、分娩によって出生するまでの過程と考えることができる。この間、極めて特殊な免疫学的な機

構、すなわち交配や分娩などに伴う微生物の侵入を防ぎ、異物となる精子や受精卵を攻撃することなく着床へと導き、胎子出生まで育てるといふ、ある面では相反するような免疫機構が備わっている。また、最初の妊娠に至るまでの段階で免疫応答の排除機構が働くと妊娠は成立しないことになり、早期胚芽死、流産、または不妊症と関係してくると考えられる。

免疫応答を主導する白血球は顆粒球、単球、リンパ球に大きく分類することができる (図1)。リンパ球はさらにT細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞 (NK細胞) に分けるられる。免疫応答の中でもT細胞は中心的な役割を担い、その特異性が明らかにされてきている。T細胞は表面抗原の特徴から $\alpha\beta$ 型T細胞であるヘルパーT ($Th: CD4^+T$)、キラーT ($Tc: CD8^+T$) 細胞および $\gamma\delta$ 型T細胞に区別される。このうちTh細胞として、①感染細胞や癌細胞の排除を担う細胞性免疫応答を誘導するTh1、②抗体産生による免疫である液性免疫を誘導するTh2、③感染症に対して好中球などにより排除する機構である炎症性免疫反応を誘導するTh17、そしてこれらの免疫応答とは別に④免疫制御機能に特化して免疫寛容を誘導する制御性T細胞 (Treg) の存在が知られている。妊娠の成立には細胞性免疫を促進するTh1細胞よりも液性免疫応答を促進するTh2細胞が優位に反応し、胎子に対する拒絶反応を抑制する [17]。ヒトの流産患者では末梢血のTh1サイトカインが促進することでTh1/Th2バランスがTh1にシフトすることから [12]、妊娠の成立と維持における免疫機構の特殊性が窺える。近年、妊娠の成立・維持における免疫機構

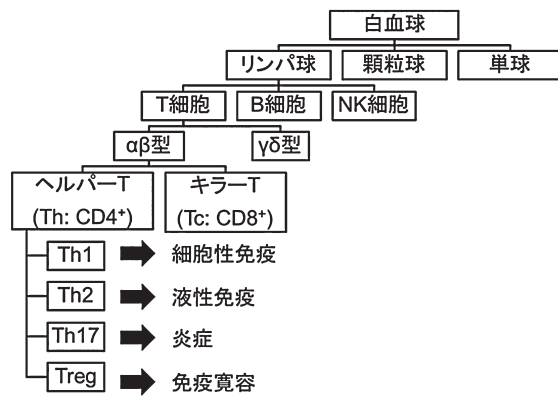


図1 免疫に関わる細胞の分類

における T 細胞の Th1/Th2 バランスに加え、免疫応答を負に制御し、免疫寛容を誘導する Treg 細胞の役割についても解明されつつある。ヒトでは正常妊娠の末梢血中 Treg 細胞率が非妊婦末梢血または流産症例の末梢血に比して明らかに高く、流産や早産、妊娠中毒症において、末梢血や胎児-母体境界面において Treg が減少し、Th17 の割合が増加することが報告されている [5, 13]。

[ウシに特徴的な生殖免疫]

ウシにおいても妊娠の成立と維持に上述したような免疫機構が存在していると考えられる。我々は妊娠牛では非妊娠牛に比べて末梢 T 細胞の Treg 関連因子である Foxp3、TGF- β 、IL-10 および CTLA4 が高いことを確認している (図2)。一方、ウシでは $\alpha\beta$ 型 T 細胞の一つである Treg 細胞よりも $\gamma\delta$ 型 T 細胞の IL-10 産生は高いことが知られており [3]、ヒトとは異なるウシ特有の妊娠免疫システムが妊娠の維持に関与している可能性がある。さらに、interferon-tau (IFN- τ) は反芻獣に特異的な母体の妊娠認識因子と考えられており、ヒツジでは妊娠 13-15 日、ウシでは 15-19 日の受精卵の栄養膜細胞から分泌され、黄体の退行を阻止する [15]。この IFN- τ の刺激により誘導される遺伝子として Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) の存在が知られ、妊娠牛では子宮内だけでなく妊娠 18 日のウシの末梢血細胞においても上昇することが知られている [4]。また、ウシの排卵後の時期における P₄ 製剤の投与は、子宮内の IFN- τ 濃度を 6 倍に増加させ、初期胚を 4 倍の伸長させることが報告されており

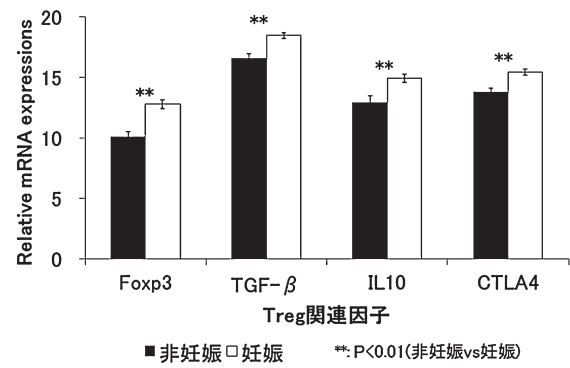


図2 非妊娠および妊娠期乳牛の末梢血単核球における Treg 関連因子遺伝子発現量の比較

[8]、P₄ の存在はウシの妊娠認識に関わる IFN- τ に対して促進的に作用していると考えられる。

[着床を助ける免疫細胞]

受精成立後に、受精卵は分割を繰り返しながら子宮内膜に接着して胎盤を形成、胎子として成長し続ける。ヒトでは、この過程において子宮内にナチュラルキラー (NK) 細胞の一種で大顆粒リンパ球 (CD56⁺CD16⁻) 細胞が増殖する。NK 細胞は細胞質内顆粒中にパーフォリンなどの殺細胞物質を含み、ウイルス感染した細胞や癌化した細胞の攻撃をする細胞性免疫応答の中心的役割を担う細胞である。この NK 細胞は排卵後に子宮内で増殖しはじめ、子宮内膜間質の 30% 以上を占めるようになり、子宮内膜間質が脱落膜化すると NK 細胞は移動し、やがて着床部位に集族する。ヒトでは、母子の接点である子宮脱落膜の免疫担当細胞のうち約 70% が NK 細胞を占める程になるとされる。NK 細胞は主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex : MHC) の不一致を認識し異物と認識して細胞障害反応を示すが、絨毛外絨毛細胞には MHC 抗原が存在せず、NK 細胞の攻撃を回避しており、胎子組織は母体に対して免疫寛容の状態となっていると考えられている。ヒトとウシでは胎盤の構造も異なるため、妊娠免疫の全てをヒトやマウスと同等とは考えられないものの、異物である胎子と共存できる免疫寛容の存在は考慮する必要がある。

また、末梢血中の免疫細胞が性ホルモンの支配により子宮内における胚着床の準備・維持に関与していることが明らかにされつつある。ヒ

トにおいて、妊婦から採取した末梢血中の免疫細胞が胚の子宮内膜面への接着を促進する現象が確認され、自己の末梢血リンパ球を子宮内膜に局所投与することで、子宮内膜への胚の着床を誘導する不妊治療の確立に関する研究が取り組まれている [18]。このような現象は、ウシにおいても末梢血リンパ球の子宮内投与が胚移植時の受胎率を改善することが報告されており [4]、性ホルモンによる末梢血細胞の機能調節と、子宮内の白血球の役割に関しては今後、さらに注目される研究である。

[P₄の作用と生殖免疫]

黄体ホルモンである P₄ は妊娠の成立と維持に重要な役割を果たしており、妊娠の維持における特殊な免疫機能のために、主導的な役割を担っていると考えられる。P₄ はリンパ球の P₄ レセプターを介して作用し、末梢血の Th1/Th2 バランスを Th2 優位な状態にすることが明らかとなっている [14]。さらにヒトやマウスにおいて P₄ が T 細胞に直接作用して Th1 への分化を抑制し、Th2 への分化を促進することが明らかにされている [10]。さらに、P₄ は Th17 細胞への分化を抑制し [6]、Treg を誘導するといった報告もなされてきている [9]。我々は、妊娠期および非妊娠期のウシにおいて、P₄ が Th1 サイトカイン (IFN- γ) および Th17 サイトカイン (IL-17) の発現を抑制することを明らかにした (図 3) [7]。したがって、ウシにおいても P₄ は Th1 および Th17 を選択的に抑制することにより、母体の免疫を変化させることが示唆された。また、妊娠期と非妊娠期の乳牛では P₄ 感受性が異なり、妊娠期では P₄

によって特徴的に Th2 サイトカインである IL-4 が増加した。また、非妊娠期の乳牛の中でも BCS (body condition score) が 2.25 以下のウシでは P₄ 刺激によるリンパ球の P₄ 感受性が劣っており [11]、低 BCS の乳牛の受胎率低下の一要因となる可能性がある。

[乳牛の周産期疾患と免疫]

乳牛の周産期疾患の発症が受胎率の低下を招く大きな要因であることは良く知られている。乳牛の繁殖障害の原因の一つである子宮内膜炎は、分娩時のトラブルや代謝性疾患、牛群の飼養内容の影響により発生しやすい疾病であり、細菌感染が疑われるため子宮洗浄や子宮内への薬注などにより処置することもある。免疫的な見地として、子宮内に強い炎症があれば好中球が主体となった化膿性滲出物の排出が見られる。一方、Cirkel ら [1] はヒトの子宮内膜炎の患者の子宮粘膜においてマクロファージと CD4⁺T 細胞が顕著に増数していることを観察している。子宮内膜炎のウマにおいても子宮内膜における CD4⁺T 細胞が CD8⁺T 細胞に比べて 2 倍程度に増数していることが観察されている [16] ことから、子宮疾患の動物では子宮内の CD4⁺T 細胞数が増量することが考えられる。我々は疾病発症の履歴のない健康な乳牛の子宮灌流液中の CD4⁺T 細胞は CD8⁺T 細胞に比べて低値であるのに対して、周産期に何らかの代謝性疾患の治療履歴のある乳牛の子宮灌流液中の CD4⁺T 細胞は CD8⁺T 細胞に比べて高値であることを確認している (図 4)。よって、周産期に疾病の罹患歴のある乳牛では子宮内の細菌数の増減に関わらず子宮内膜症の症例と類似した子宮内リンパ球の組成となることが示唆される。

[おわりに]

受胎・妊娠の維持のために、リンパ球は非自己である受精卵・胎子を排除しない免疫応答に積極的に関与していると考えられる。搾乳によるエネルギー要求量の増大や体調不良などによるエネルギー摂取量の低下など栄養状態や疾病の罹患歴などは免疫機能に影響する重要な要因であり、これらは分娩後の正常な妊娠免疫応答をかく乱する可能性が高い。これまで、受胎に

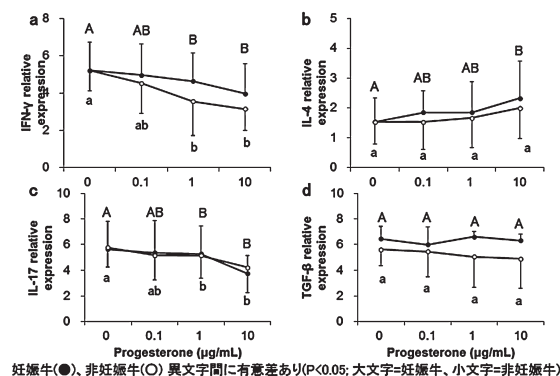


図 3 P₄ が妊娠および非妊娠乳牛の末梢血単核球における Th 関連遺伝子発現量に及ぼす作用

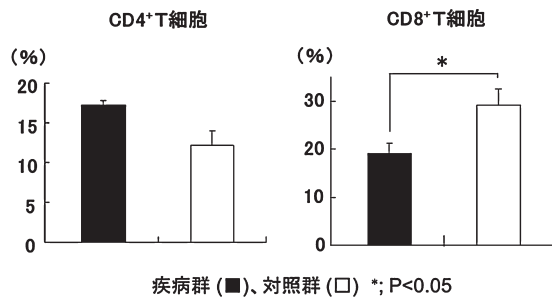


図4 周産期に代謝性疾患の治療履歴のある疾病群および対照群の子宮灌流液におけるCD4⁺およびCD8⁺T細胞(%)の比較

において血中P₄濃度の重要性が指摘されてきたが、これに加えリンパ球を含めた妊娠の維持に関与する細胞のP₄感受性が妊娠の維持において重要であると考えられる。今後、ウシの妊娠と免疫に関する研究が進展することで、免疫学的見地に基づいた乳牛の健康管理や、子宮を中心とした免疫学的治療法の開発にも着手できるものと期待される。

[参考文献]

1. Cirkel U., Ochs H., Mues B., Zwadlo G., Sorg C., Schneider H. P. 1993. Inflammatory reaction in endometriotic tissue: an immunohistochemical study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 48: 43-50.
2. Gifford C. A., Racicot K., Clark D. S., Austin K. J., Hansen T. R., Lucy M. C., Davies C. J., Ott T. L. 2007. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 274-280.
3. Hoek A., Rutten V. P., Kool J., Arkesteijn G. J., Bouwstra R. J., Van Rhijn I., Koets A. P. 2009. Subpopulations of bovine WC1(+) gammadelta T cells rather than CD4(+)CD25(high) Foxp3(+) T cells act as immune regulatory cells ex vivo. *Vet. Res.* 40: 6.
4. Ideta A., Hayama K., Nakamura Y., Sakurai T., Tsuchiya K., Tanaka S., Yamaguchi T., Fujiwara H., Imakawa K., Aoyagi Y. 2010. Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells enhances early development of the pre-implantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 77: 954-962.
5. Ito M., Nakashima A., Hidaka T., Okabe M., Bac N. D., Ina S., Yoneda S., Shiozaki A., Sumi S., Tsuneyama K., Nikaido T., Saito S. 2010. A role for IL-17 in induction of an inflammation at the fetomaternal interface in preterm labour. *J. Reprod. Immunol.* 84: 75-85.
6. Lee J. H., Ulrich B., Cho J., Park J., Kim C. H. 2011. Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. *J. Immunol.* 187: 1778-1787.
7. Maeda Y., Ohtsuka H., Tomioka M., Oikawa M. 2012. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and Regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. *Vet. Res. Commun.* accepted.
8. Mann G. E., Fray M. D., Lamming G. E. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet. J.* 171: 500-503.
9. Mao G., Wang J., Kang Y., Tai P., Wen J., Zou Q., Li G., Ouyang H., Xia G., Wang B. 2010. Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice. *Endocrinology* 151: 5477-5488.
10. Miyaura H., Iwata M. 2002. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J. Immunol.* 168: 1087-1094.
11. Ohtsuka H., Murase Y., Ando T., Kohiruimaki M., Mukai M., Oikawa M., Petrovski K. R., Morris S. 2009. Effect of body condition score of the dairy cow on the in vitro immune response of peripheral blood mononuclear cells to progesterone stimulation. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 549-553.
12. Raghupathy R., Makhseed M., Azizieh F., Omu A., Gupta M., Farhat R. 2000. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum. Reprod.* 15: 713-718.
13. Santner-Nanan B., Peek M. J., Khanam R., Richarts L., Zhu E., Fazekas de St Groth B., Nanan R. 2009. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in pre-eclampsia. *J. Immunol.* 183: 7023-7030.
14. Szekeres-Bartho J., Halasz M., Palkovics T. 2009. Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways. *J.*

- Reprod. Immunol. 83: 60-64.
15. Thatcher W. W., Meyer M. D., Danet-Desnoyers G. 1995. Maternal recognition of pregnancy. J. Reprod. Fertil. Suppl. 49: 15-28.
 16. Watson E. D., Thomson S. R. 1996. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. Equine Vet. J. 28: 106-110.
 17. Wegmann T. G., Lin H., Guilbert L., Mosmann T. R. 1993. Bidirectional cytokine interaction in the maternal-fetal relationship: successful pregnancy a TH2 phenomenon? Immunol. Today 14: 353-355.
 18. Yoshioka S., Fujiwara H., Nakayama T., Kosaka K., Mori T., Fujii S. 2006. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. Hum. Reprod. 21: 3290-3294.

Effect of progesterone on bovine lymphocytes

Yousuke Maeda

Graduate School of Veterinary Medicine, Kitasato University
Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science
(35-1 Higashi 23 bancho, Towada, Aomori 034-8628, Japan)