



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1506号
学位記番号	第1077号
氏名	大林 勇輝
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tryptophan 2,3-Dioxygenase in Patients with Recurrent Miscarriage (反復流産患者における IDO と TDO の存在と意義)  American Journal of Reproductive Immunology , 2015 (accepted)
論文審査担当者	主査： 山崎 小百合 副査： 齋藤 伸治, 杉浦 真弓

## 論文内容の要旨

### 【目的】

妊娠は成立するが、流産、死産を繰り返して結果的に子供を持たない場合を不育症という。その頻度は約 4.2%であり、3 回以上の流産を繰り返す習慣流産は約 0.9%と報告されている。また、妊娠経験者の約 38%が流産を経験している。不育症の原因として最も多いのは胎児染色体異常(約 41%)で、それ以外に抗リン脂質抗体症候群、子宮奇形、夫婦染色体異常や内分泌異常などがあるが、残りの約 25%は今なお原因不明である。

indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)と tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO)はトリプトファン代謝を触媒する酵素である。IDO は肝臓移植における免疫寛容に、トリプトファン代謝を介して関与している。Munn らは IDO がマウスでの正常妊娠の胎盤において、局所的にトリプトファンを代謝し枯渇させることで母体 T リンパ球の機能不全を惹起し、妊娠初期の免疫寛容に関与すると報告している。Tnaka らは、マウスにおいて妊娠初期の免疫寛容に TDO が重要な役割を果たしていると報告している。今回、我々は IDO 及び TDO の反復流産病態における役割を検討した。

### 【方法】

インフォームドコンセントの得られた反復流産患者を対象とした。

- (1) 流産手術時に得られた子宮内容組織を実験に供した。IDO・TDO の局在を検討するため、免疫組織染色を行った。
- (2) ウェスタンブロット(WB)法にて IDO・TDO の存在を検討し、絨毛組織検査正常群と異常群とで半定量比較した。
- (3) 妊娠初期の子宮頸管粘液を採取し、IDO・TDO 活性と妊娠帰結との関連を検討した。
- (4) 流産群で絨毛染色体検査正常群と異常群とで子宮頸管粘液中の IDO・TDO 活性を比較検討した。

### 【成績】

- (1) 免疫組織染色法では、絨毛組織及び脱落膜組織の細胞質において IDO・TDO の染色性が観察された。
- (2) WB 法では IDO(約 41kDa)及び TDO(約 45kDa)がヒト絨毛組織及び脱落膜組織において検出された。WB 法では複数の非特異的バンドが認められたため、antigen inhibition assay を行いバンドの特定を行った。各々半定量しノンパラメトリック検定を行った結果、脱落膜組織における IDO の発現および絨毛組織における IDO・TDO の発現は、染色体検査正常群(n=8)と異常群(n=10)に有意差は認めなかった。  
絨毛組織における IDO の発現は、染色体検査正常群(n=8)で異常群(n=10)と比較して有意に高かった(p<0.05)。
- (3) 子宮頸管粘液における IDO・TDO の活性は、生児獲得群(n=18)と流産群(n=15)では有意差は認めなかった。
- (4) 絨毛組織・脱落膜組織における IDO・TDO 活性は染色体検査正常群(n=6)と異常群(n=8)に有意差はなかった。

### 【結論】

ヒト絨毛組織の細胞質および脱落膜組織の細胞質に IDO および TDO が存在することを明らかにした。今回の検討では、反復流産患者の絨毛組織において、絨毛染色体検査正常群、すなわち母体側に原因があると考えられる反復流産原因不明患者において IDO の発現が有意に高いことが示された一方で、IDO の活性に有意差は認めなかった。IDO の高発現あるいは IDO の活性化の阻害が

反復流産病態に関与している可能性が示唆された。近年、T 細胞の低下がヒトの習慣流産に関与することが報告されており、我々の検討結果からも IDO の高発現が T 細胞の低下を惹起し反復流産に関与することが示唆された。また反復流産病態においては TDO よりも IDO が重要な役割を果たしていると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

【目的】妊娠は成立するが、流産、死産を繰り返して結果的に子供を持たない場合を不育症という。我々は、その頻度は約 4.2%であり、3 回以上の流産を繰り返す習慣流産は約 0.9%と報告している。また、妊娠経験者の約 38%が流産を経験している。不育症の原因として最も多いのは胎児染色体異常(約 41%)で、それ以外に抗リン脂質抗体症候群、子宮奇形、夫婦染色体異常や内分泌異常などがあるが、残りの約 25%は今なお原因不明である。Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)と tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO)はトリプトファン代謝を触媒する酵素である。IDO は肝臓移植における免疫寛容に、トリプトファン代謝を介して関与している。Munn らは IDO がマウスでの正常妊娠の胎盤において、局所的にトリプトファンを代謝し枯渇させることで母体 T リンパ球の機能不全を惹起し、妊娠初期の免疫寛容に関与すると報告している。Tanaka らは、マウスにおいて妊娠初期の免疫寛容に TDO が重要な役割を果たしていると報告している。今回、我々は IDO 及び TDO の反復流産病態における役割を検討した。

【方法と結果】インフォームドコンセントの得られた反復流産患者を対象とした。免疫組織染色法では、絨毛組織及び脱落膜組織の細胞質において IDO・TDO の染色性が観察された。

WB 法では IDO (約 41kDa) 及び TDO (約 45kDa) がヒト絨毛組織及び脱落膜組織において検出された。WB 法では複数の非特異的バンドが認められたため、antigen inhibition assay を行いバンドの特定を行った。各々半定量しノンパラメトリック検定を行った結果、脱落膜組織における IDO の発現および絨毛組織における IDO・TDO の発現は、染色体検査正常群(n=8)と異常群(n=10)に有意差は認めなかった。絨毛組織における IDO の発現は、染色体検査正常群(n=8)で異常群(n=10)と比較して有意に高かった。子宮頸管粘液における IDO・TDO の活性は、生児獲得群(n=18)と流産群(n=15)では有意差は認めなかった。絨毛組織・脱落膜組織における IDO・TDO 活性は染色体検査正常群(n=6)と異常群(n=8)に有意差はなかった。

【結論】ヒト絨毛組織の細胞質および脱落膜組織の細胞質に IDO および TDO が存在することを明らかにした。反復流産患者の絨毛組織において、絨毛染色体検査正常群、すなわち真の原因不明患者において IDO の発現が有意に高いことが示された一方で、IDO の活性に有意差は認めなかった。IDO の高発現あるいは IDO の活性化の阻害が反復流産病態に関与している可能性が示唆された。

【審査の内容】主査の山崎から、T 細胞の機能解析の有無について、WB の特異的バンドの検出法としての inhibition assay 以外の方法、WB 法及び免疫染色の手順、本研究結果から推測する免疫関連療法等 7 項目、第一副査齋藤教授からは、Munn らの結果と今回の結果が異なる理論的根拠、絨毛の IDO 蛋白濃度と activity の結果が乖離した理由、生殖における免疫寛容はどこまでわかっているか等 7 項目、第二副査の杉浦教授からは Grade A 緊急手術と不妊症の原因と治療についての質問があり、おおむね満足する回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、産婦人科学に関する知識を有していると考えられた。近年、T 細胞の低下がヒトの習慣流産に関与することが報告されており、本研究では IDO の高発現が T 細胞の低下を惹起し反復流産に関与することを示した。以上を持って本論文の筆者は博士(医学)の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 山崎小百合 副査 齋藤 伸治 杉浦 真弓