

論文の内容の要旨

論文題目 胎盤トロホブラストに発現する

Human leukocyte antigen (HLA)-G の

妊娠維持における役割に関する研究

指導教官 武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 1 1 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 金井 孝夫

緒言

母体にとって胎児は、その半分が父親由来の同種移植片であり、免疫学的に異物である。しかしながら胎児は本来母体の免疫系からの拒絶を免れて9ヶ月もの間、母体体内で発育する。こうした特殊な移植免疫反応が起こるブラックボックスは母児の組織が接触する胎盤であり、どのような免疫現象が胎盤で起こっているかを解明することが、妊娠維持の免疫学的機序を解明する上で重要である。臓器移植において、移植免疫反応を決定するのは、移植片のヒト白血球抗原[human leukocyte antigen (HLA)]型と、それに対するレシピエントの反応であり、移植片のHLA型がレシピエントのHLA型と異なる場合、急激な拒絶反応が起こって、移植片は排除されることになる。しかし、妊娠においてはHLAの母児一致性が要求されることはない。

1. 胎盤トロホブラストに発現するHLA-G

1987年にGeraghtyらにより発見されたHLA-Gは、非古典的クラスIに属し、母体と胎児の接点である胎盤のトロホブラストに発現している。HLA-Gの遺伝子多型は、わずかに6つのみが認められている。さらに、HLA-Gは、選択的スプライシングにより膜型蛋白のほか酸性の可溶性蛋白としても分泌されている。

胎盤のトロホブラスト上にはHLAの古典的クラスIもクラスII抗原も発現しておらず、そのかわりに主HLA抗原としてHLA-Gが発現している。母体免疫細胞と直接接するト

トロホブラスト上に、多型性の乏しい HLA-G が発現することで、母体の免疫細胞から「異物＝他」と認識されないように働いているとも考えられている。また、可溶型 HLA-G 蛋白は、羊水中に認められている。可溶型 HLA-G 蛋白が、母児免疫にどのように関わっているか不明であるが、HLA-G は選択的スプライシングによって膜型蛋白および可溶型蛋白を作り出し、トロホブラスト上の主要組織適合複合体[major histocompatibility complex (MHC)]の役割をひとり二役で果たしていると考えられる。

2. 妊娠維持とサイトカイン

妊娠維持の機序として、母体リンパ球が、胎盤の抗原を認識し、種々のサイトカインを分泌し、トロホブラストの発育・分化を調節しているというイムノトロピズムの考え方が提唱されている。近年、ヘルパーTリンパ球は、その分泌するサイトカインにより、T helper 1(Th1)細胞と T helper2(Th2)細胞とに分類されている。前者は Interferon(IFN)- γ や Tumor necrosis factor(TNF)- β を分泌し、マクロファージを賦活して、細胞性免疫を促進する。一方後者は、Interleukin(IL)-4、IL-5、IL-10 や IL-13 を分泌し、抗体産生を賦活して、液性免疫を促進している。妊娠は、Th1/ Th2 サイトカインバランスにおいて、Th1 サイトカイン分泌が抑制され Th2 サイトカイン優位になっている現象と考えられている。

3. 子宮脱落膜組織に存在する母体リンパ球

末梢血のリンパ球のサブセットを調べると、妊娠の有無に関わらず、75%を CD3⁺T 細胞が占めている。一方 NK 細胞については、末梢血では CD16 抗原を発現する CD16⁺NK 細胞が主体をなすが、脱落膜中には CD16⁻CD56^{bright}NK 細胞が脱落膜単核球の 85%を占め、主体をなしている。CD16⁻CD56^{bright}NK 細胞は、末梢血中には 1%しか認められない。以上より、末梢血の単核球と脱落膜中の単核球では、構成も妊娠維持にかかわる働きも異なると考えられる。

目的

以上を踏まえ、私は、胎盤のトロホブラストに特異的に発現している HLA-G が、母体単核球からのサイトカイン分泌にどのような影響を与えて妊娠維持に関わっているか、Th1/ Th2 サイトカインバランスの観点から、膜型 HLA-G、あるいは可溶型 HLA-G 蛋白を認識した際の母体単核球からのサイトカイン分泌が、末梢血単核球と、母児免疫の接点である脱落膜に存在する脱落膜単核球においてどのような影響を受けるのか明らかにすることを目的として研究した。サイトカインは、Th1 サイトカインである IFN- γ 、Th0 サイトカインに属するが、細胞傷害性を有し Th1 サイトカインと同様と考えられている TNF- α 、また Th2 サイトカインである IL-4、IL-10、トロホブラストの発育や分化を促進させる働きのある IL-3 について検討した。

対象と方法

1. 末梢血単核球の調整

末梢血単核球は正常未妊婦 6 人 (年齢: 28.8 \pm 1.2 歳 mean \pm S.D.) (実験 1)、および 7 人 (年齢: 28.6 \pm 1.8 歳 mean \pm S.D.) (実験 2) の静脈血から採血後、Ficoll- Paque に重層し、1000 \times G、10 分間の遠心分離し、界面に存在する単核球を回収した (Ficoll- Paque 法)。

2. 脱落膜単核球の調整

脱落膜組織は、妊娠 5~9 週にかけて人工妊娠中絶を施行した 7 人（年齢: 26.2 ± 5.2 歳 mean \pm S.D.）（実験 2）、および 14 人（年齢: 28.2 ± 4.2 歳 mean \pm S.D.）（実験 3）からインフォームドコンセントを得て採取した。脱落膜組織を phosphate buffered saline (PBS) で数回洗浄した後、メスにて充分細切したのち 0.1% コラゲナーゼを含む RPMI1640 に 37°C 下に 30 分間融解させた。融解後、100 μ m メッシュにて濾過し、濾液を Ficoll-Paque 法により分離し回収した。

3. 細胞株

HLA クラス I 抗原を有さない B リンパ芽球細胞株 721.221(.221) とその細胞株に HLA-G1 の cDNA をレトロウイルスベクターである pLNCX を用いて transfect した細胞株(.221-G1) を膜型 HLA-G 発現細胞として用いた。

4. 可溶性 HLA-G 蛋白

可溶性 HLA-G 蛋白として、大腸菌により産生されたリコンビナント可溶性 HLA-G 蛋白を用いた。膜型 HLA-G1 の細胞外領域である $\alpha 1$ から $\alpha 3$ 部位をコードした cDNA を大腸菌に組み込んで培養し、培養上清中に産生された HLA-G 蛋白長鎖（細胞膜貫通領域と細胞質領域を欠如）を、HLA-G に対する特異抗体 87G を用いて精製した。得られた蛋白に $\beta 2$ -ミクログロブリンと HLA-G への結合が報告されているペプチド “KGPPAALTL” を組み込んでリコンビナント可溶性 HLA-G 蛋白を得た。

5. 母体単核球と .221 細胞および .221-G1 細胞との共培養

100Gy 放射線を照射した 1×10^6 個の .221 細胞または .221-G1 細胞を、 1×10^6 個の末梢血単核球または脱落膜単核球と、10% ウシ胎児血清および 1mM sodium pyruvate を添加した RPMI 1640 培地中で、37°C、5% CO₂ 下で 48 時間培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。また、リコンビナント可溶性 HLA-G 蛋白を 250、500、1000 ng/ml の濃度で各培養系に添加して、各濃度における培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。

6. サイトカイン濃度測定

サイトカイン濃度は、酵素抗体法 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) により測定した。

7. 統計学的検定

2 群間のサイトカイン濃度の有意差 ($P < 0.05$) については、Wilcoxon 法により検定した。

結果

1. 膜型 HLA-G が末梢血単核球および脱落膜単核球からのサイトカイン分泌に与える影響について

末梢血単核球を .221-G1 細胞と共培養した場合、.221 細胞との共培養に比べ、TNF- α 、IFN- γ の分泌が有意に低値となり ($P < 0.05$)、IL-4、IL-3 の分泌が有意に高値であった ($P < 0.05$)。IL-10 の分泌では有意な差は認めなかった。

脱落膜単核球を .221-G1 細胞と共培養した場合、.221 細胞との共培養に比べ、TNF- α 、IFN- γ の分泌が有意に低値となり ($P < 0.05$)、IL-10、IL-3 の分泌が有意に高値であった ($P < 0.05$)。IL-4 の分泌では有意な差は認めなかった。

2. 可溶性 HLA-G 蛋白が末梢血単核球および脱落膜単核球からのサイトカイン分泌に与える影響について

末梢血単核球を.221 細胞および.221-G1 細胞との共培養中に可溶性 HLA-G 蛋白を添加した場合、無添加の対照群に比べ、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10の分泌が有意に高値となり(P<0.05)、IL-3 の分泌が有意に低値であった(P<0.05)。さらに、それらの変化は、添加した可溶性 HLA-G 蛋白の濃度に依存していた。IL-4 の分泌では有意な差は認めなかった。

脱落膜単核球を.221 細胞および.221-G1 細胞との共培養中に可溶性 HLA-G 蛋白を添加した場合、無添加の対照群に比べ、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、IL-3の分泌が有意に低値となった(P<0.05)。ただし、末梢血単核球で見られたような添加濃度に依存する変化は見られず、低濃度から明確な変化が生じていた。IL-4 の分泌では有意な差は認めなかった。

考察

末梢血単核球が膜型 HLA-G を認識すると、IFN- γ 、TNF- α の分泌を低下させ、IL-4、IL-3 の分泌を増加させるが、IL-10 の分泌は変化しない。また、脱落膜単核球が膜型 HLA-G を認識した場合は、IFN- γ 、TNF- α の分泌が低下し、IL-4 の分泌は変化しないものの、IL-10 と IL-3 の分泌が増加する。つまり、末梢血、脱落膜単核球いずれもが、膜型 HLA-G を認識すると、Th1/Th2 サイトカインバランスを Th2 優位とし、妊娠維持に有利なサイトカイン環境を創出していることがわかった。IL-4 や IL-10 の分泌における、末梢血単核球と脱落膜単核球の相違点は、構成する単核球のサブセットの違いが影響していると考えられる。具体的には、末梢血においては CD3⁺の T 細胞が単核球の 75%占める一方、脱落膜では末梢血で 1%しか認められない CD16⁺CD56^{bright}NK 細胞が 85%存在するためと思われる。

次に、末梢血単核球が可溶性 HLA-G 蛋白を認識すると、膜型 HLA-G の有無にかかわらず、添加濃度依存性に TNF- α 、IFN- γ 、IL-10 の分泌を増加させ、IL-3 の分泌を低下させた。しかし、IL-4 の分泌には何らの影響を与えなかった。つまり、可溶性 HLA-G は、膜型 HLA-G とは反対に、妊娠維持にネガティブに働く IFN- γ や TNF- α をむしろ増加させ、ポジティブに働く IL-3 の分泌を低下させるといった、妊娠にはおおよそ不利な環境を創出しており、膜型 HLA-G に対して、アンタゴニストの如く作用していることがわかった。膜型 HLA-G を末梢血単核球が認識しても、IL-10 分泌が変化しないことから、可溶性 HLA-G 蛋白は、妊娠に優位な IL-10 の分泌を増加させることで、膜型 HLA-G の働きを補完している可能性が考えられた。

脱落膜単核球が膜型 HLA-G を認識すると、IFN- γ 、TNF- α の分泌が低下し、IL-10、IL-3 の分泌は増加し、IL-4 の分泌は変化せず、全体として、Th1/Th2 サイトカインバランスを Th2 優位としているが、可溶性 HLA-G 蛋白を認識すると、妊娠維持に不利な IFN- γ 、TNF- α の分泌が低下するだけでなく妊娠維持に有利な IL-3、IL-10 の分泌も低下することがわかった。IL-4 の分泌は変化しなかった。

つまり脱落膜単核球が、膜型 HLA-G と可溶性 HLA-G 蛋白それぞれを認識した場合のサイトカイン分泌の変化は、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 は同一であるが、IL-3 と IL-10 は相反していた。ただし、末梢血単核球で見られたような添加濃度に依存する変化は見られず、低濃度から明確な変化が生じていた。

受精卵が子宮内膜上に接着したあと、トロホブラストは、脱落膜に変化した子宮内膜へ浸潤し、母体脱落膜単核球は免疫担当細胞としてトロホブラストを認識する。しかしながらトロホブラストは多型性の殆どない HLA クラス I 抗原である膜型 HLA-G および可溶

型 HLA-G を発現しており、脱落膜内のキラーT 細胞やNK 細胞からの攻撃は起こらない。その一方で、膜型 HLA-G を認識した脱落膜単核球は、TNF- α 、IFN- γ の分泌を低下させ、IL-10、IL-3 の分泌を増加させて、トロホブラストの増殖に有利な環境を作り出す。可溶性 HLA-G は、TNF- α 、IFN- γ の分泌を低下させてトロホブラストを保護する一方、IL-10、IL-3 の分泌も低下させて、トロホブラストの一方的な増殖が起こらないようコントロールする。やがて、侵入トロホブラストは母体血管壁を突き破ると同時に、母体末梢血単核球の認識を受け、その浸潤および増殖を止め、直ちに分化して絨毛および胎盤血管系が構築され、胎盤が形成される。末梢血単核球は、膜型 HLA-G を認識して細胞傷害性サイトカインである TNF- α 、IFN- γ の分泌を抑制するが、一方で可溶性 HLA-G 蛋白を認識して、逆に拮抗的にこうした細胞傷害性サイトカインの分泌を増加させる。言い換えると、膜型 HLA-G は脱落膜、血管内いずれにおいても、トロホブラスト増殖に対しアクセル作用を有するが、可溶性 HLA-G 蛋白はその場に応じてアクセル作用だけでなく、ブレーキの作用を発揮し、トロホブラストの浸潤・増殖をコントロールしていると考えられる。仮に、可溶性 HLA-G 蛋白が膜型 HLA-G 同様にアクセルの作用のみを有していたなら、トロホブラストは、母体免疫細胞からの寛容を常に受け、止まることなく浸潤と増殖を繰り返し、母体を蝕み、癒着胎盤などの重大な合併症の原因となりうる。

以上より、HLA-G は膜型および可溶性蛋白の2形態で、母体免疫細胞と時間的・空間的に作用して、妊娠維持に優位なサイトカイン環境を整えていることが示唆された。