

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 NK 細胞受容体 NKG2 の発現解析および KIR (Killer cell
 Immunoglobulin-like receptor)の遺伝的多型解析より導き出せる
 脱落膜 NK 細胞による母児免疫寛容機構の考察

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 15 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

久須美 真紀

産科領域には、妊娠性高血圧症、子宮内胎児発育遅延、習慣流産(3 回以上の流産既往)など、妊娠初期の胎盤形成不全に起因する病態と考えられ、根本的な治療法のない疾患が存在する。胎盤は母体組織(脱落膜)と胎児組織(絨毛)によって形成されており、絨毛細胞の脱落膜への侵入が十分であることが胎盤形成に重要である。しかし、絨毛細胞は父系抗原を有し、母体にとって半同種移植片である。従来の移植免疫とは異なり、絨毛細胞の脱落膜への侵入を許容し維持する妊娠免疫のしくみを解明することは胎盤形成及び上記疾患の病態解明のために重要であり、本研究の目的とした。

胎盤の母体側組織である脱落膜には Natural Killer (NK) 細胞が豊富に存在し、一方で接して存在す

る胎児側組織である栄養膜細胞 (trophoblast) には Major histocompatibility complex(MHC ; ヒトでは Human histocompatibility antigen (HLA)) class I 抗原が発現している。NK 細胞受容体の多くが HLA class I 抗原と結合するため、NK 細胞は母児間免疫応答を担うと考えられている。そのため、NK 細胞受容体のうち、C タイプレクチン型受容体 CD94/NKG2 と Immunoglobulin super family に分類される Killer Cell Immunoglobulin-like receptor (KIR)について以下の検討を行った。

1. C タイプレクチン型受容体(CD94/NKG2A, CD94/NKG2C)の解析

妊娠初期の妊婦の脱落膜 NK 細胞と末梢血 NK 細胞を用いて、trophoblast 上の HLA-E に作用する抑制型受容体 NKG2A と活性型受容体 NKG2C の発現をそれぞれ比較検討した。

2. KIR の解析

習慣流産患者及びその夫の DNA と健常人の DNA を用い、NK 細胞受容体 KIR に関して case-control study を行った。KIR のゲノム解析及び trophoblast 上で KIR のリガンドとなる HLA-C のグループ分類を行い、KIR 及び KIR と HLA-C との関係を考察した。

脱落膜 NK 細胞は末梢血 NK 細胞とは異なる特徴を有する。妊娠初期の脱落膜では脱落膜リンパ球の約 8 割が NK 細胞であり、そのほとんどが CD3⁻CD16⁻CD56^{bright}(強陽性)である。一方、末梢血では NK 細胞はリンパ球の 1 割程度であり、そのうち CD3⁻CD16⁺CD56^{dim}(弱陽性)タイプが 80-90%を占め、CD3⁻CD16⁻CD56^{bright}細胞は 5-10%である。妊娠初期に脱落膜 NK 細胞は trophoblast の周囲に豊富に集積し、妊娠免疫における主要な免疫細胞と考えられる。この脱落膜 NK 細胞の機能については、NK 細胞ではあるものの細胞傷害活性は抑制されており、サイトカイン分泌などを介して trophoblast の発育を調整していると考えられている。

trophoblast も他の有核細胞とは異なる特徴を有する。古典的 HLA class I 抗原の HLA-A, -B を発現しておらず、HLA-C や非古典的 HLA class I 抗原の HLA-E, G を発現している。そして、この HLA と脱落膜 NK 細胞受容体が結合し、NK 細胞の働きを調節していると考えられている。

1. C タイプレクチン型受容体 CD94/NKG2 の解析

informed consent を得た妊娠 5~10 週の人工妊娠中絶症例より脱落膜組織及び血液 10mL を採取し、各々リンパ球を分離し、以下の検討に供した。

① 抗 NKG2A 及び抗 NKG2C モノクローナル抗体と抗 CD56 モノクローナル抗体との三重免疫蛍光

染色にて、脱落膜 CD56^{bright}NK 細胞と末梢血 CD56^{dim}NK 細胞における NKG2A 及び NKG2C を発現する細胞集団の比率、発現パターンについてフローサイトメトリー法にて解析した。10 例の検討にて、脱落膜 NK 細胞集団において抑制型の NKG2A は 98.4%±0.2% (平均±標準誤差) に発現していたが活性型の NKG2C は 20.5±4.9%の細胞にしか発現していなかった。一方、末梢血 NK 細胞集団では NKG2A は 41.4%±5.5%、NKG2C は 10.9±5.0%の細胞に発現しており、またそれぞれが同一細胞上にはほとんど発現していないという特徴を有した。

② CD56 陽性細胞を分離し、クロミウム遊離試験 (⁵¹Cr release assay) を行った。HLA-E の発現

の有無によって脱落膜 NK 細胞と末梢血 NK 細胞の細胞傷害活性が変化するか各々検討し、脱落膜 NK 細胞において細胞傷害活性が抑制される傾向を認めた。

(まとめ)

活性型受容体 NKG2C および抑制型受容体 NKG2A は脱落膜 CD56^{bright}NK 細胞と末梢血 CD56^{dim}

NK 細胞では発現パターンに差異が見られた。脱落膜 CD56^{bright}NK 細胞においては、胎児を寛容する方向に働く抑制型受容体 NKG2A が特に強く発現しており、それに比べて活性型受容体 NKG2C の発現は弱く、更に NKG2C の発現する細胞には NKG2A が常に発現していた。HLA-E の存在下で脱落膜 NK 細胞は抑制性のシグナルが優位に働くため免疫寛容状態となり、trophoblast の適度な母体浸潤、胎盤形成を可能にしていると考えられる。一方、末梢血 CD56^{dim} NK 細胞では抑制型受容体 NKG2A と活性型受容体 NKG2C が独立して一部の細胞に発現していた。NKG2C のみを有する細胞分画は、高い細胞傷害活性をもち、trophoblast が過度に母体らせん血管に浸潤しないように母体免疫バリアとして働いている可能性がある。

2. KIR の解析

KIR は霊長類において多様性を獲得した、進化的に新しい NK 細胞受容体である。ヒトでは現在のところ、14 種類の発現遺伝子が存在し、細胞外 immunoglobulin domain(Ig) の数が 2 個か 3 個か (2D または 3D)、受容体の細胞内末端が immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)を有する長い抑制型受容体か DAP12 と作用する短い活性型受容体か(L または S)により命名されている (2DS1, 3DL2 など)。KIR 遺伝子はゲノム上のまとまった領域に存在し、規則的に配置されハプロタイプを構成する。脱落膜 NK 細胞にとっては trophoblast 上の HLA-C 及び-G がリガンドとなり、主に抑制性のシグナルが NK 細胞に伝達される。

日本人に限定し、1995 年～2003 年に東京大学医学部附属病院習慣流産外来を受診した原因不明の原発性習慣流産患者で夫リンパ球免疫療法を受けた患者(以下、習慣流産妻群)とその夫(以下、習慣流産夫

群)62 組(4 組は妻のみの検体)、及び対照として健常人(以下、コントロール群)100 人(男 32 人、女 68 人)に対し case-control study を行った。ゲノム DNA を抽出し PCR-sequence specific primer (SSP)法にて 17 種類の KIR 遺伝子、偽遺伝子についてタイピングを行った。そこから、各集団における KIR 遺伝子の存在頻度、ハプロタイプの分布について比較検討した。また、HLA-C については PCR-microtitre plate hybridization 法を用いてアロタイプを決定し、結合する KIR 分子の違いで、 $\alpha 1$ ドメインの 80 番目のアミノ酸残基が Asn の C1 または Lys の C2 の 2 つのグループに分類した。

KIR 遺伝子頻度について、抑制型受容体 KIR2DL2、及びそれと強い連鎖不平衡の関係にある活性型受容体 KIR2DS2 が、習慣流産妻群でコントロール群に比べて高い頻度で存在した(χ^2 検定, $p=0.0239$)。ハプロタイプの解析では、活性型受容体として KIR2DS4 しか有しない A ハプロタイプとその他の B ハプロタイプに分類したところ、習慣流産夫群ではコントロール群に比べて B ハプロタイプが有意に多かった (χ^2 検定, $p=0.0182$)。HLA-C については一般日本人集団と同様に習慣流産妻群及び夫群でも C1 ホモが約 80%、C1/C2 ヘテロが約 15%、C2 ホモが約 5%という結果であった。

(まとめ)

本研究では、妊婦が KIR2DS2 及び 2DL2 を有していることが習慣流産のリスクファクターの 1 つである可能性が示された。KIR2DL1, 2DL2, 2DL3 は HLA-C をリガンドに持ち、2DL1 と C2 タイプが、2DL2, 2DL3 と C1 タイプが結合する。今回の研究対象集団はほぼ全員が 2DL1, 2DL3 を有しているため、2DL2 を有している個人は HLA-C に結合する抑制型受容体すべてが発現していることになる。KIR2DL1, 2DL2, 2DL3 を 3 つとも有する NK 細胞は、HLA-C1 ホモまたは C2 ホモの細胞に対し傷害活性を示すという報告がある。日本人集団では C1 ホモ(2DL2 と 2DL3 がリガンド)と C2 ホモ(2DL1

がリガンド) が約 85 %を占めるため、KIR2DL1, 2, 3 を有する母体 NK 細胞には胎児の HLA-C に対しリガンドのない抑制型 KIR 受容体 (C1 ホモでは 2DL1、C2 ホモでは 2DL2 と 2DL3) に起因するアロ反応性 (missing-self hypothesis) が惹起されやすいと考えられる。それに 2DS2 による活性化シグナルが加わり、胎児拒絶反応が起こりやすくなる可能性がある。

また、ハプロタイプの解析に関しては今回の結果のみでは結論付けることはできないが、妊娠免疫における、KIR ハプロタイプの関与を示唆する結果になったと考える。今後の更なる検討が必要である。

KIR に関わる母体 NK 細胞活性化が胎児に対する拒絶反応に関わる可能性を示した。