

論文内容の要旨

論文題目：リン脂質抗原提示分子「CD1d」を介した
抗リン脂質抗体による流産メカニズムに関する研究

指導教員： 武谷 雄二 教授

東京大学医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

岩澤 有希

【序文】流産は約 10～15%の妊娠におこり、その 80%が胎児の偶発的染色体異常であり自然淘汰と考えられている。2 回流産した者が次の妊娠で流産する確率は 20～30%、3 回以上流産を経験した者が次の妊娠で流産する確率は約 50%と、流産回数の増加に伴ってその確率も上昇する。このことは、単なる偶然の染色体異常による流産の反復では説明困難で、母体あるいは胎児の父親にその原因がある場合があることを示している。習慣流産は 3 回以上自然流産を繰り返す状態と定義され、その原因は多岐にわたる。その中で最近注目されているのが、自己免疫異常の 1 つである抗リン脂質抗体症候群(antiphospholipid syndrome; APS)である。APS は 1986 年に Hughes らによって抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibody; APL) が陽性で、かつ血小板減少症、血栓症、または流産のいずれかの臨床症状を認める症候群として提唱された。周産期領域でも APS について様々な臨床研究がなされ、APS が習慣流産のみならず、妊娠 10 週以降の原因不明の子宮内胎児死亡、妊娠高血圧症候群、また胎児発育不全とも強く関連していることが明らかになってきた。実際、厚生労働省研究班の調査ではわが国の習慣流産患者のうち 9.3%に APS があるとされている。

APS は Phosphatidylserine(PS)などの陰性荷電を持つリン脂質に対する自己抗体の産生により引き起こされるが、APL の真の対応抗原はリン脂質そのものではなく、リン脂質に結合する β_2 -glycoprotein I(β_2 GPI)などの血漿蛋白である。 β_2 GPI は細胞膜リン脂質に結合し血液凝固カスケード、血小板凝集や *in vitro* で活性化された血小板のプロトロンビナーゼ活性を抑制する因子である。 β_2 GPI 依存性抗カルジオリピン抗体は、この機能を妨げ凝固能を亢進させて血栓傾向

を誘導し、胎盤内の血栓形成を促進させるために胎盤機能不全が生じ流産を引き起こすと考えられてきたが、胎盤血管形成がなされ血流が確立する妊娠9-10週以前の流産についてはそれだけでは説明困難である。

絨毛細胞は胎盤付着部位から母体子宮内膜内へと浸潤しつつ Extravillous trophoblast(EVT)へと分化していく。その分化の過程において EVT の増殖能、浸潤能など細胞特性がダイナミックに変化してゆくことが知られている。EVT の増殖、浸潤過程においては、EVT が発現する HLA-G 抗原をはじめとする HLA 抗原系や、EVT と母体免疫細胞が分泌する多くのサイトカイン、ケモカイン、また血管新生関連因子など、種々の分子が働いていることが明らかになっている。その中で、本研究では major histocompatibility complex(MHC) I 類似の抗原提示分子である CD1d に注目した。

CD1d は自己、または細菌由来の糖脂質を抗原提示する MHCclass I に類似した膜たんぱく質である。ヒト $V\alpha$ インバリアント NKT 細胞 (iNKT) は invariant $V\alpha 24J\alpha 18/V\beta 11$ T cell receptor (iTTCR) を発現しており、この iTTCR を通じて抗原提示細胞の CD1d を特異的に認識し、活性化される。CD1d を認識し活性化された iNKT 細胞からは interleukin(IL)-4 や interferon(IFN)- γ が急速に分泌され、T helper(Th)1/Th2 バランスが調節されるようになる。一方 CD1d 発現細胞からも IL-12、IL-15、IL-4、IL-10 などのサイトカインが分泌されNK 細胞を活性化する。また CD1d は近接する複数の分子が架橋されると NF- κ B を通じて CD1d 発現細胞内 cytoplasmic tail のチロシン基のリン酸化が誘導される。この反応により、CD1d 発現細胞より IL-12、IL-10 などのサイトカインが急速に分泌されるようになることも知られている。

本研究では APS を引き起こす代表的な抗リン脂質抗体である β_2 GPI 依存性抗カルジオリピン抗体が、 β_2 GPI 2 分子と安定的に結合すること、CD1d が自己のリン脂質である PS を抗原提示することに着目した。PS が β_2 GPI と複合体を形成し、細胞表面に存在することはすでに報告されていることから、 β_2 GPI 依存性抗カルジオリピン抗体が CD1d を介し直接的に絨毛細胞に作用し、サイトカイン分泌を促進することにより流産に関与するのではないかと考え、母体胎児境界における胎児側 CD1d と母体 iNKT の相互作用、さらにはこの相互作用に β_2 GPI 依存性抗カルジオリピン抗体が影響して流産を引き起こす機序について検討した。

【方法】

ヒト絨毛癌由来の細胞株 JEG に、CD1d 遺伝子、または機能実験における陰性コントロールとして細胞外構造が CD1d、細胞内構造が CD1a であるキメラ分子(細胞内へのシグナル伝達を行わない) CD1a/d を導入し、CD1d あるいは CD1a/d を恒常的に発現する trophoblast 株 JEG/CD1d および JEG3/CD1a/d を樹立した。次いで、CD1d あるいは CD1a/d、PS、 β_2 GPI の細胞表面存在をフローサイトメトリ

一法によって観察した。また CD1d と PS- β_2 GPI 複合体の結合を IP-Western blot 法で確認した。JEG/CD1d、JEG3/CD1a/d、JEG に対して、抗 CD1d 抗体、抗 β_2 GPI 抗体単独、コントロール IgG を添加し、CD1d 抗原の架橋反応が誘導されるか、炎症性サイトカインである IL-12 の発現を ELISA および定量的 RT-PCR 法で検討した。また、脱落膜中の母体 iNKT と胎児側 CD1d の相互作用を検討するため、施設倫理委員会承認のもと、文書で同意を得た人工中絶症例から採取したヒト脱落膜から脱落膜リンパ球を分離し、iNKT の増殖誘導剤 α GalCer を 7 日間添加して培養した。添加前後で V α 24V β 11 陽性 iNKT の細胞数をフローサイトメトリ法で比較した。JEG/CD1d もしくは JEG に、 α GalCer 刺激した脱落膜 iNKT を加え共培養し、上清中の IL-12 の濃度を測定した。さらに、JEG/CD1d、JEG/CD1a/d、JEG に、脱落膜 iNKT を加えた共培養系に抗 β_2 GPI 抗体またはコントロール IgG を添加した群と添加しない群で、炎症性サイトカイン IFN γ 、IL12 の産生を ELISA 法および定量的 RT-PCR 法で観察した。

【結果】フローサイトメトリ法では、JEG/CD1d、JEG/CD1a/d の細胞表面に CD1d 発現 (CD1a/d の細胞外ドメインは CD1d と同一) が認められ、その発現に一致して PS、 β_2 GPI の存在も認められた。次いで、JEG、JEG/CD1d 細胞のタンパク質を抽出し、抗 CD1d 抗体を用いて免疫沈降をおこなった。沈殿に対して HRP 標識した抗 β_2 GPI 抗体あるいは抗 AnnexinV 抗体 (PS を検出) を用いて Western blot 法により band を検出した。JEG/CD1d 細胞においては β_2 GPI および PS の band が確認できたが、JEG 細胞では認められなかった。以上より、JEG/CD1d 細胞表面において、CD1d、PS、 β_2 GPI が複合体を形成していることが確認された。抗 CD1d 抗体 + 二次抗体による架橋反応では、JEG/CD1d において IL-12 誘導能の増加が確認されたが、JEG/CD1a/d や JEG においては確認されなかった。JEG/CD1d における IL-12 誘導能の増加は抗 β_2 GPI 抗体単独でも認められ、抗 β_2 GPI 抗体は二次抗体なしに CD1d と相互作用をおこすことがわかった。また、脱落膜リンパ球に対する α GalCer 刺激により V α 24V β 11 陽性の iNKT の細胞数が約 15 倍に増加し、この細胞を以下の実験で脱落膜 iNKT として使用することとした。脱落膜 iNKT と JEG/CD1d との共培養では、培養液中の IL12 濃度上昇が ELISA 法で確認されたが、JEG との共培養では上昇しなかった。ただし、この実験における IL12 濃度上昇は、抗体による架橋反応で生じた IL12 濃度上昇よりも弱いものであった。すなわち、CD1d と脱落膜 iNKT の相互作用でも弱いながら、IL-12 産生が誘導されていることがわかった。次に抗 β_2 GPI 抗体存在下で脱落膜 iNKT を JEG/CD1d、JEG/CD1a/d あるいは JEG と共培養した。抗 β_2 GPI 抗体添加群とコントロール IgG 添加群の IL12 産生の比をとり各細胞間で比較したところ、JEG/CD1d 細胞では、18 時間後に抗 β_2 GPI 抗体添加群の IL12 産生がコントロール IgG 添加群の 3 倍にまで増加した。しかし、JEG/CD1a/d や JEG では抗 β_2 GPI 抗体存在下でも、IL12

産生の増加を認めず、この差は有意であった。次に同様の系で IFN- γ の産生についても、抗 β_2 GPI 抗体添加群とコントロール IgG 添加群の比をとり各細胞間で比較した。IL12 と異なり全ての細胞の抗 β_2 GPI 抗体添加群で、18 時間後に IFN- γ の産生が増加する傾向にあったが、JEG/CD1d 細胞においてのみ有意差を認め、JEG/CD1a/d や JEG では有意差を認めなかった。

【考察】母体の脱落膜組織に胎児の EVT が適切に浸潤していくことが、胎盤形成が正しく行われる鍵となるが、この過程では局所で厳密にコントロールされた炎症反応が必要である。脱落膜 iNKT と EVT 上の CD1d の相互作用により少量産生される IL-12 はこの炎症反応に寄与していると考えられる。しかし、この母体胎児境界に抗 β_2 GPI 抗体が存在すると厳密にコントロールされた環境が乱される。本研究において、抗 β_2 GPI 抗体が存在すると、PS- β_2 GPI 複合体を介して CD1d 分子と反応し、IL12 産生が増加するとともに、CD1d-脱落膜リンパ球間の相互作用による IL12 産生がさらに刺激されることが示された。また特に CD1d 発現細胞と脱落膜リンパ球の接する胎児母体境界では抗 β_2 GPI 抗体存在下で IFN- γ 産生が増加することがわかった。すなわち、抗 β_2 GPI 抗体が存在すると、IL12 が母体 IFN- γ 産生細胞である iNKT 細胞を活性化させる→iNKT 細胞から分泌された IFN- γ が EVT 上の CD1d 発現を増加させる→CD1d 発現細胞からさらに IL12 分泌が促進されるというサイクルが必要以上に活性化され、母体胎児境界における局所の炎症が過剰となり、流産を引き起こすことが示唆された。抗リン脂質抗体に関連した流産は胎盤内の凝固亢進による微小梗塞によるものであるとされているにもかかわらず、実際胎盤や妊娠初期の絨毛組織からは病理学的な梗塞像がみとめられることはごくまれである。このことから、抗リン脂質抗体の引き起こす流産には、別の機序が存在すると指摘されてきた。本研究により、抗 β_2 GPI 抗体による流産が、絨毛細胞上の CD1d と脱落膜 iNKT 細胞を介した過剰な炎症によるという新しい機序が示された。