

母体脱落膜リンパ球表面上での  
Natural Killer (NK) Receptor の  
発現に関する研究

三木 明德

母体脱落膜リンパ球表面上での  
Natural Killer (NK) Receptor の  
発現に関する研究

三木 明德

# 母体子宮脱落膜リンパ球表面上での Natural Killer (NK) Receptor の 発現に関する研究

三木 明徳

## <序論>

通常、腎臓・心臓などの同種移植片は免疫反応により拒絶され排除される。同種移植片に対する拒絶反応を抑制するために免疫抑制剤などの投与が必要であることは移植免疫学上よく知られた事実である(1)。胎児は遺伝子を父親から半分、母親から半分受け継いでいる。つまり、父系抗原、母系抗原それぞれ半分ずつからなりたっている。妊娠とは胎児が母体の子宮内に約 10 ヶ月にわたり存在することであり、移植免疫学の立場からすれば、母体の免疫系は胎児の父系抗原に拒絶反応を示し胎児は排除されるはずである。しかし、胎児は母体の免疫系からの攻撃をうけることなく、むしろ、母体の免疫系に働きかけ自分の生存に有利な環境を作り出し、約 10 ヶ月間にわたり母体の中で成長を続ける。哺乳類はこの非常に巧妙な仕掛けを作り上げ、未熟な子孫を母体の胎内に宿すことで危険な外界から隔離し、種の確実な伝承を可能としてきた。この妊娠中の母体と胎児との免疫応答を解き明かすことは移植免疫学に新たな新天地をもたらすのみならず、哺乳類、そして人類が歩んできた自然環境への適応の道筋を明らかにすることである。

この妊娠維持機構が破綻した現象として流産があげられる。大多数の流産は胎児の染色体異常をはじめとする重大な遺伝学的異常、およびそれに伴う胎児の死亡により惹起されると考えられている(2)。一方、流産を繰り返す女性(習慣流産患者)の中には、免疫学的妊娠維持機構に障害がありそのため流産を繰り返しているものがあると考えられている(3)。習慣流産患者に対する免疫療法(夫リンパ球輸血療法)(4)、大量ガンマグロブリン投与(5、6)など母体の免疫系を変化させることで習慣流産を治療する試みも行われており、一定の成果をあげてきている。

胎児から母体の免疫系へ働きかけるシグナルとして、近年発見された Human Leukocyte Antigen (HLA)-G が注目を浴びている。HLA-G は non-classical HLA class I の一種であり 1987 年に Geraghty らにより発見された(7)。HLA-G の特徴として、classical HLA と比較してきわめて限られた多型性しか示して

いないことがあげられる。その限られた多型性もタンパク質の立体構造を変えない程度のものであり、構造的にはほぼ単一の HLA-G 蛋白しか発現しないと考えられている(8, 9)。さらに HLA-G の発現場所は主として母体の免疫系と胎児抗原とが直接接触する胎盤の表面上であり、しかもこの場所には古典的 HLA の HLA-A, -B は発現していないことが報告されている(10-13)。

一方、HLA-G を認識するリンパ球のレセプターの検索がなされ、Natural Killer (NK) 細胞表面上に発現する NK receptor が HLA-G と結合することが近年報告されている(14, 15)。NK 細胞はリンパ球の一分画であり、末梢血単核球(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)の約 10~30%を占め、Major Histocompatibility Complex (MHC) を発現していない細胞を認識しこれを攻撃する(16, 17)。NK 細胞の攻撃性は対象となる細胞表面上に発現されている特定の MHC class I 抗原により調節をうけていることがわかっている(18)。近年、NK 細胞に抑制性のシグナルを伝える NK レセプターが報告され、これらの NK レセプターを介して NK 細胞は対象となる細胞表面上の MHC class I 分子を認識し自らの攻撃性を調節していることがわかった(19-21)。

NK レセプターは免疫グロブリン(Immunoglobulin, Ig) スーパーファミリー (super family, SF)に属する糖蛋白である。これらのレセプターは特徴的な構造を有している。すなわち、細胞外には2個または3個の免疫グロブリン構造を持ち、細胞内にシグナルを伝達する細胞内構造では、細胞内構造が長いグループと短いグループとが存在する(22)。このうち細胞外に2個の免疫グロブリン構造を持つグループは HLA-C 分子と結合し、細胞外に3個の免疫グロブリン構造を持つグループは HLA-A または HLA-B 分子と結合することがわかっている(23, 24)。一方、細胞内構造においては、長いグループには immuno receptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)が存在し、これを介して抑制性のシグナルを伝えると考えられているが、短いグループには ITIM が存在せず、他のレセプターと複合体をつくることで促進性のシグナルを伝えると考えられている(25, 26)。

胎盤が着床する子宮脱落膜中には多数のリンパ球 Uterine decidual mononuclear cells (UDMC)が存在するが、このリンパ球は PBMC とは異なっていると報告されている(27, 28)。すなわち、UDMC は PBMC と比較して $\alpha\beta$  T 細胞が少なく、かわりに多数の NK 細胞と PBMC 中にはほとんど存在しない $\gamma\delta$  T 細胞で構成されている。子宮脱落膜中に含まれる NK 細胞は細胞表面上の抗原が PBMC 中の NK 細

胞とは異なり、PBMC 中にほとんど含まれない CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK 細胞が大多数を占め、PBMC 中に多く含まれる CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> NK 細胞は少ない(27, 28)。

胎盤表面上に発現される HLA-G は抑制性の NK レセプター、促進性の NK レセプター双方と結合しシグナルを伝えることが報告されている(29)。しかし、胎盤表面上の HLA-G と直接反応する母体子宮脱着膜中のリンパ球については NK レセプターに関する研究はされていない。私は、まず、子宮脱着膜リンパ球が NK レセプターを発現しているか検討した。一方、母体子宮脱着膜において、リンパ球に発現している NK レセプターが伝えるシグナルが抑制性なのか促進性なのかでは、レセプターの存在意義が大きく異なるが、現在報告されている NK レセプター抗体は抑制性・促進性両方の NK レセプターと結合し、両者を区別することはできない(29)。私は現状ではタンパク質発現のレベルで両者を区別する方法がないため、mRNA のレベルで両者の区別をするため、塩基配列の微少な違いを認識することができる PCR-Single-strand conformation polymorphism (SSCP)法を用いた assay 方法を開発した。そして、新しく開発した PCR-SSCP 法を用いて子宮脱着膜リンパ球上に発現している NK レセプターの種類を検討した。

## <材料および実験方法>

### 材料

妊娠初期に人工妊娠中絶術を行った女性から、文書による同意を得て、手術中に子宮脱落膜を採取した。まず、鉗子にて胎児成分を除去した後掻破してきた子宮脱落膜を採取し、以下に述べる方法にて処理を行った。また、対象となった女性の末梢血を人工妊娠中絶術前に採取した。対象の年齢と妊娠週数、経妊回数、経産回数は Table 1 に示した。

### 末梢血単核球の調製

末梢血単核球(PBMC)はフィコール密度勾配遠心法にて末梢血より採取した。末梢血のサンプルはフィコール液に重層し、1,000g にて 15 分間遠心した。単核球を含む層を回収した後 1% fetal bovine serum (FBS) 加 RPMI1640 にて 3 度洗浄した。

### 子宮脱落膜中単核球の調製

採取した子宮脱落膜はまず phosphate-buffered saline(PBS)にて数回洗浄、その後ハサミにて細断し 0.1% の collagenase を加えた RPMI1640 メディウム中で 37°C、30 分間反応させ、付着しているリンパ球を剥離させた。滅菌処理されたガーゼにて濾過し子宮脱落膜成分を取り除いたあと、フィコール液を用いた濃度勾配遠心法にて PBMC と同様に処理し単核球を回収した。(30)

### Flow cytometric analysis

子宮脱落膜中のリンパ球、及び PBMC 上の NK レセプターの発現をモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリー法にて調べた。Ig-SF NK レセプターに対する抗体として anti-CD158a, anti-CD158b(Immunotec, Marseilles, France), anti-CD159(PharMingen, Marseilles, France)を用いた。Lectin type NK レセプターに対する抗体として anti-CD94 (Immunotech, Marseilles, France)を用いた。また、単核球中から NK 細胞を分別するするため anti-CD3, anti-CD16, anti-CD56 (Immunotec, Marseilles, France)を用いた。

基準となる NK レセプター cDNA クローン

基準となる cDNA クローン NKAT-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 は Dr. Marco Colonna からいただいた(31). NKAT-8 は我々が sub-cloning し DNA 配列を DNA シーケンスにて確認したものを使用した.

PCR-SSCP assay で用いるプライマーの設定

NK レセプターは結合するリガンドを決定する細胞外部分と、細胞内に伝達するシグナルを決定する細胞内部分とから成り立っている。細胞外部分は、結合するリガンドの多様性を獲得するため、とくに 3' 側に塩基配列の違いが認められ、一方、伝達するシグナルを決定する細胞内部分は ITIM の有無により大きく2つに分けられる(26)。発現している NK レセプターのリガンドと細胞内に伝達するシグナルを判別するために、Figure 1 のように PCR プライマーを設定した。つまり、Ig ドメインを2個持っているタイプの NK レセプターの 3' 側 Ig ドメインを増幅するようにプライマーを設定(Domain1)し、さらにシグナルを伝達する細胞膜内、細胞内部分を増幅するように PCR プライマーを設定(Domain2)した。(Figure 1)

Ig ドメインを3個持っているタイプの NK レセプターでは、Domain1 のプライマーセットでは 3' 側 Ig ドメイン2個分を増幅し、Domain2 のプライマーセットではシグナルを伝達する細胞膜内、細胞内部分を増幅する。

cDNA の調製および PCR

$1 \times 10^6$  の単核球から Dynabeads mRNA DIRECT kit (DYNAL)を用いて mRNA を採取した。採取した mRNA は M-MLV 逆転写酵素 (Gibco BRL)を用いて全量 50 $\mu$ l の cDNA 溶液とした。

上記のプライマーを用いて PCR 反応を行った。Domain1 の PCR 条件は全量 50 $\mu$ l 中に、1 $\mu$ l cDNA、200 $\mu$ M dNTP、3mM MgCl<sub>2</sub>、1unit Taq polymerase (Perkin-Elmer)を混合し、95°C 30seconds、58°C 30seconds、72°C 30seconds の条件で 32cycle 反応を行った。Domain2 の PCR 条件は全量 50 $\mu$ l 中に、1 $\mu$ l cDNA、200 $\mu$ M dNTP、2mM MgCl<sub>2</sub>、5% dimethyl sulfoxide (DMSO)、1unit Taq polymerase (Perkin-Elmer)を混合し、95°C 30seconds、58°C 30seconds、72°C 30seconds の条件で 32cycle 反応を行った。

#### 制限酵素切断試験

PCR 増幅した Domain1断片を制限酵素 Apal, SfaNI, XmnI にて切断した。同じく Domain2 断片は制限酵素 HphI, SfaNI, XmnI にて切断した。PCR 産物 5 $\mu$ L を、制限酵素とそれらの反応溶液計 15 $\mu$ L と混合し切断を行った。切断後、7.5% polyacrylamide gel にて電気泳動を行った。

#### PCR-SSCP assay

PCR 増幅した Domain1, Domain2 断片をエタノール沈殿法にて回収した。それを 95% formamide, 25mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol からなる SSCP バッファーに溶解し、95°C、5 分間変性させた。変性させた DNA 断片を 7.5% polyacrylamide gel, 40mA 定電流、20°C にて 110 分間電気泳動した。電気泳動後、polyacrylamide gel を銀染色にて染色し、SSCP バンドを描出した。

#### SSCP ゲル上のバンドの塩基配列決定

SSCP ゲル上にあらわれた一本鎖 DNA バンドの塩基配列を決定し、どの NK レセプターに由来するバンドかを明らかにするために、それぞれの DNA バンドを銀染色後最大 1mm 幅にてゲルごと切り出した。切り出したゲルの小断片をさらに細断し PCR 反応バッファー 50 $\mu$ L に浮遊させ室温に 4 時間放置した後、上記の条件にて PCR 反応を再び行った。増幅された PCR 産物は ABI PRISM Dye Terminal Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) と 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

## <結果>

### Flow cytometric analysis

まず最初に子宮脱落膜中リンパ球が採集できているかどうか検討した。PBMC 中ではほとんどの NK 細胞が CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>であり、D16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>である NK 細胞はほとんど存在しない。しかし、子宮脱落膜中では特徴的な NK 細胞として CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>である NK 細胞群が大部分をしめている。今回子宮脱落膜から採集してきたリンパ球にはこの特徴的な CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup>である NK 細胞が 60-80%含まれており、目的とする子宮脱落膜リンパ球が採集できていると考えられた(Figure 2)。

子宮脱落膜中のリンパ球表面上には NK レセプターの発現が認められた(Figure 3)。Two color flowcytometry 法により、子宮脱落膜中に特徴的な CD56<sup>bright</sup> NK 細胞に NK レセプターの強い発現が認められた。次に NK レセプターの発現量を蛍光強度(Mean fluorescence intensity, MFI)を示標として比較した。NK レセプター CD158a, CD158b および CD94 とともに PBMC 中の NK 細胞と比較し子宮脱落膜中 NK 細胞では強い蛍光強度を示していた(Figure 4)。Negative control 抗体を用いた検討では両者に差は認められなかった。このことより子宮脱落膜中では NK レセプターは PBMC と比較しより強く発現されていることが示唆された。

### PCR-SSCP 法の開発

#### PCR

PCR 増幅してきた Domain1, Domain2 の断片はそれぞれ 480 塩基対と 400 塩基対であり NK レセプターの塩基配列から予測された大きさと同一であった。PBMC, 子宮脱落膜リンパ球それぞれから得られた Domain1, Domain2 の断片に大きさの違いは認められなかった(Figure 5)。メインとなるバンドの他に Domain1 では 700 塩基対付近に薄いバンドが認められ、これは細胞外に3個のイムノグロブリン構造を持つグループに由来すると考えられた。Domain2 では 370 塩基対付近に薄いバンドが認められ、これは細胞外部分細胞膜側の一部の配列が脱落した NK レセプターに由来するバンドと考えられた。ともに、塩基配列の確認を行い NK レセプターの塩基配列ときわめて相同性が高いことを確認した。

これらの DNA 断片は genomic DNA を増幅して出現すると思われるバンドより大幅に小さく、また、逆転写酵素を加えずに行った negative control では DNA バンドは確認されなかったことより、genomic DNA

を PCR 増幅してきたバンドではないと考えられた。

これらの DNA 断片がすべて NK レセプターに由来するものであることを確認するために、制限酵素による切断実験を行った。Domain1 は制限酵素 Apal, SfaNI, XmnI を用い、Domain2 は制限酵素 HphI, SfaNI, XmnI にて切断した。それぞれの DNA 断片はいくつかのさらに小さなバンドに切断され、それらのサイズは NK レセプターの塩基配列から予測されたサイズに一致した (Figure 6)。

#### SSCP analysis

Domain1, Domain2 の DNA 断片を用いて SSCP analysis を行うことで標準となる NK レセプター、NKAT-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 を判別できるか検討を加えた。NKAT の DNA クローンをテンプレートとして PCR 増幅し、それらを SSCP ゲルに電気泳動した。NKAT はお互いに異なった距離を泳動され、判別できる SSCP バンドを形成した (Figure 7)。SSCP バンドの位置は、NKAT DNA クローンを混合しても変化することはなかった。

#### 子宮脱落膜中リンパ球表面上に発現する NK レセプターの種類

PBMC, 子宮脱落膜リンパ球から採取した cDNA をテンプレートとして同様に PCR-SSCP 解析を行った。それぞれの DNA 断片は SSCP ゲル上で 10 本以上のバンドに分かれた。一部の SSCP バンドは標準として用いた NKAT-1-10 のいずれのバンドとも異なっており、新しい NK レセプターであると考えられた。得られた SSCP のバンドパターンは個人ごとに大きな違いが認められた。しかし、同一個人では PBMC から得られた PCR-SSCP バンドパターンと子宮脱落膜リンパ球から得られた PCR-SSCP バンドパターンはほぼ同じパターンを示した。PBMC, 子宮脱落膜リンパ球から得られた PCR-SSCP バンドパターンにはそれぞれ抑制性の NK レセプター (NKAT-1, 2, 3, 4, 6)、刺激性の NK レセプター (NKAT-5, 7, 8, 10) に合致する SSCP バンドが認められた (Figure 8)。

#### SSCP ゲルから切り出したバンドの塩基配列確認

PBMC, 子宮脱落膜リンパ球から得られた PCR-SSCP バンドが標準となる NK レセプター、NKAT と塩基配列上合致するかどうか確認するために、SSCP ゲルから NKAT-2, 5, 8, 10 に相当するバンドを切り

出し、塩基配列の確認を試みた。Sequencing 法にて確認した塩基配列は報告されている NKAT-2, 5, 8, 10 と同一であった。

## <考察>

NK細胞は対象となる細胞上に発現する classical HLA class1 分子を認識し、自己の細胞傷害性を調節する(32)。近年、NK細胞上に発現し、NK細胞の HLA class1 分子認識に関与するレセプターが発見された(31, 33)。このレセプターは Ig-SF に属し、HLA-A, B, C をリガンドとして NK細胞の活性を調節する。さらに、この NKレセプターは non-classical HLA であり胎盤に発現する唯一の HLA class1 分子である HLA-G とも結合シグナルを伝達することが報告された(14, 15)。今回の研究で、子宮脱着膜中に存在するリンパ球表面上にも NKレセプターが発現しており、しかも子宮脱着膜に特徴的な CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK細胞に PBMC と比較して NKレセプターの強い発現が認められた。胎児は胎盤表面上に HLA-G 分子を発現し、それからのシグナルは NKレセプターを通じて母体免疫系に伝えられ、母体免疫系による胎児胎盤への攻撃を抑制していることが示唆された。

NKレセプターには抑制性のシグナルを伝える Killer Inhibitory Receptor (KIR)の他に刺激性のシグナルを伝える Killer Activatory Receptor (KAR)が存在することが知られている(22)。この2種類のNKレセプターは細胞外構造が非常に類似しているが、細胞膜貫通構造および細胞内構造が大きく異なり、まったく正反対のシグナルをリンパ球に伝達する(22, 29)。細胞外構造の類似性のためそれぞれに特異的に反応する抗体はまだ作製されていない。今回用いた SSCP 解析法は塩基配列の微小な違いを認識することができる非常に鋭敏かつシンプルな検出法である(34, 35)。NKレセプターを放射性同位元素を用いた SSCP法で識別する試みはすでに報告されている(33, 36)。今回の研究では放射性同位元素を用いず、かわりに銀染色法を用いることで、検出感度を高めさらに微小な塩基配列の違いの検出を可能としている。

できる限り多くの NKレセプターを識別するために、今回我々はリガンドを認識する細胞外 N 末端部分 480 塩基対を増幅してくるプライマーセット(Domain1)と、細胞膜貫通部分と細胞内部分を増幅してくるプライマーセット(Domain2)を設定した。KIR と KAR は細胞膜貫通部分と細胞内部分の構造の違いにより区別される。KIR は細胞内部分に ITIM がありこれを介して抑制性のシグナルを伝達すると考えられている(26)。一方 KAR の細胞内部分はとても短くこれだけではシグナルを伝達できないと考えられ、かわりに細胞膜貫通部分に電荷を帯びたリジン残基が認められこれを介して他の細胞膜上のタンパク質と会合す

ることでシグナルを伝達していると考えられている。(25)我々はこの違いを区別するために Domain2 のプライマーセットを設定した。

まず、設定した PCR 条件で目的とする配列が増幅されてきていることを制限酵素による切断法で確認した。さらに、SSCP の泳動条件を詳細に検討し、標準となる NK レセプター NKAT-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 を SSCP 法にて識別することを可能とした。さらに上記の NKAT-1~10 に該当しない多数の SSCP バンドが認められた。現在まで 100 近くの Ig-SF タイプの NK レセプターが報告されており、これらの SSCP バンドはそのいずれかに該当するものと考えられた。

PBMC 由来の cDNA をテンプレートとした SSCP 解析、子宮脱落膜中のリンパ球由来 cDNA をテンプレートとした SSCP 解析の結果、多数の SSCP バンドが確認された。多数のリンパ球から一括して cDNA を採取しているため個々のリンパ球表面上の NK レセプター発現について言及することはできないが、リンパ球全体として多数の NK レセプターを発現し、KIR, KAR 双方とも発現されていることが示唆された。免疫系が対処しなければならない異物・突然変異の種類は限りなく多く、できる限り多くに対応し NK 活性を調節するために今回検出されたように多くの種類の NK レセプターを発現し、多種多様なリンパ球・NK 細胞をつくる必要があるものと推測される。多種多様なリンパ球を作製することで体外からの様々な異物、様々な突然変異に対応し攻撃することが可能となっていると考えられる。各個人間で SSCP のバンドパターンは異なり、人により発現している NK レセプターの種類に違いがあることが推測された。

一方、同一個人では子宮脱落膜中のリンパ球と PBMC との間にバンドパターンの大きな違いは認められなかった。このことより子宮脱落膜中のリンパ球と PBMC は、同一個人においては発現の強さに違いはあるにせよ、ほぼ同じ NK レセプターを発現していると考えられる。フローサイトメトリーの結果から、子宮脱落膜中のリンパ球は PBMC と比較して特に子宮脱落膜に特徴的な CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK 細胞に NK レセプターの強い発現が認められている。今回の PCR-SSCP 法の結果とあわせて考察すると、子宮脱落膜に特徴的な CD16<sup>+</sup>CD56<sup>bright</sup> NK 細胞は表面上に強く NK レセプターを発現するが、発現している NK レセプターの種類は総体として PBMC との違いはないと考えられる。このことより子宮脱落膜中の NK 細胞も PBMC と同様に教育を受けていると考えられる。子宮脱落膜中のリンパ球は、末梢血リンパ球が移行してつくられるという説と子宮脱落膜中で独自に発達するという説があるが(27, 28)、この結果は前者を

支持するものである。また、もう一つの考え方として、NK レセプターの発現調節は翻訳以降の段階で行われており、それゆえに mRNA の段階で解析する RT-PCR-SSCP 法では PBMC、子宮脱着膜リンパ球間で違いが認められなかった可能性もある。この点を明らかにするためには、発現している蛋白質レベルで NK レセプターの微少な構造の違いを検出できる特異性の高い NK レセプター抗体の開発と NK レセプターの発現調節機構の解明が待たれる。

子宮脱着膜リンパ球の PCR-SSCP 解析の結果、KAR に相当する SSCP バンドが認められ、このバンドは KAR であることが DNA シークエンスを行うことで確認された。妊娠維持の観点から考えると、子宮脱着膜中のリンパ球に刺激型の NK レセプターが存在することは意外な結果ともいえる。しかし、同一リンパ球上に KIR と KAR が発現している場合 KIR の抑制性のシグナルが優先されるとい報告もあり(29)、KAR を発現しているリンパ球が HLA-G を発現している胎盤を攻撃しているとはいうことができない。

近年、Immunotrophism という考え方が提唱されている(37) 胎児胎盤は母体の免疫系から自己を隠すことにより生き延びることをはかるのみでなく、むしろ積極的に母体の免疫系に働きかけることにより自己の成長に有利な免疫学的な状況を作り出し急速な成長を可能にしていると考えられている。細胞性免疫が優位な状況下では胎盤の成長は阻害され、液性免疫が優位な状況下では胎盤の成長が促進されることが報告されている(38)。妊娠状態では液性免疫が優位になるように Th2 cytokine が積極的に分泌されている。KAR はリンパ球の細胞傷害性を高めるのではなく、cytokine の分泌状況を Th2 方向に促進させることにより胎盤の成長を促進させている可能性が考えられる。

妊娠中は細胞性免疫の抑制によると思われるウィルス感染の増悪、腫瘍の増勢等がよく知られており(39)、一方、細胞性免疫を亢進させる IL-2 を投与することによりマウスに流産が引き起こされることも報告されている(40)。習慣流産患者では通常では存在しない血液中の IL-2 が検出されるという報告もあり(41)、習慣流産の中にはサイトカイン分泌の異常のため流産にいたっている可能性も考えられる。サイトカインの分泌を調節し液性免疫と細胞性免疫のバランスを調整する細胞として CD4<sup>+</sup> T 細胞がその役割を果たしていると考えられていたが、近年、NK 細胞もサイトカインの分泌源として重要視されており(42)、NK 細胞が NK レセプターから受け取ったシグナルをもとに液性免疫と細胞性免疫を調節し、妊娠の維持に重要な働きを示している可能性がある。

NK 細胞は T 細胞, B 細胞と異なり, 近年まで特異的な表面マーカーが解明されず機能的な解明も緒についたばかりである。NK 細胞は子宮脱落膜内に豊富に存在すること, 妊娠の維持機構に重要な cytokine の分泌源と考えられることより, NK 細胞の妊娠への関与が考えられてきた。近年報告された NK レセプターが胎盤にのみ発現し胎児から母体免疫系へのシグナルとして重要視されている HLA-G と結合することからも NK 細胞の妊娠への関与が示唆される。以上に示したように, 今回の研究により, 子宮脱落膜中に存在するリンパ球表面上に NK レセプターが強く発現されていること, NK レセプターは抑制性のシグナルを伝達するタイプだけではなく促進性のシグナルを伝達するタイプも発現していることが明らかにされた。このことより, 子宮脱落膜内という限定された場所のリンパ球表面上に発現される NK レセプターが何らかの役割を果たしていることが示唆された。妊娠維持機構において実際どのような役割を果たしているのかは今後の課題である。

<Reference>

1. Bernabeu M: Meeting the challenges of transplantation in the 21st century. *Transplant Proc* 1998; 30: 1619-1623.
2. Stern J J, Dorfmann A D, Gutierrez-Najar A J, Cerrillo M, Coulam C B: Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1996; 65: 250-253.
3. Lim K J, Odukoya O A, Li T C, Cooke I D: Cytokines and immuno-endocrine factors in recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 469-481.
4. Coulam C B, Stephenson M, Stern J J, Clark D A: Immunotherapy for recurrent pregnancy loss: analysis of results from clinical trials. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35: 352-359.
5. Kwak J Y, Quilty E A, Gilman-Sachs A, Beaman K D, Beer A E: Intravenous immunoglobulin infusion therapy in women with recurrent spontaneous abortions of immune etiologies. *J Reprod Immunol* 1995; 28: 175-188.
6. Coulam C B, Krysa L, Stern J J, Bustillo M: Intravenous immunoglobulin for treatment of recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34: 333-337.
7. Geraghty D E, Koller B H, Orr H T: A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 9145-9149.
8. Bodmer J G, Marsh S G, Albert E D, Bodmer W F, Bontrop R E, Charron D, Dupont B, Erlich H A, Mach B, Mayr W R: Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Tissue Antigens* 1995; 46: 1-18.
9. Yamashita T, Fujii T, Watanabe Y, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T, Taketani Y: HLA-G gene polymorphism in a Japanese population. *Immunogenetics* 1996; 44: 186-191.
10. Yelavarthi K K, Fishback J L, Hunt J S: Analysis of HLA-G mRNA in human placental and extraplacental membrane cells by in situ hybridization. *J Immunol* 1991; 146: 2847-2854.
11. Chumbley G, King A, Holmes N, Loke Y W: In situ hybridization and northern blot demonstration of HLA-G mRNA in human trophoblast populations by locus-specific oligonucleotide. *Hum Immunol* 1993; 37: 17-22.

12. Lata J A, Tuan R S, Shepley K J, Mulligan M M, Jackson L G, Smith J B: Localization of major histocompatibility complex class I and II mRNA in human first-trimester chorionic villi by in situ hybridization. *J Exp Med* 1992; 175: 1027-1032.
13. McMaster M T, Librach C L, Zhou Y, Lim K H, Janatpour M J, DeMars R, Kovats S, Damsky C, Fisher S J: Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 1995; 154: 3771-3778.
14. Pazmany L, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis D M, Reyburn H T, Strominger J L: Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science* 1996; 274: 792-795.
15. Munz C, Holmes N, King A, Loke Y W, Colonna M, Schild H, Rammensee H G: Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med* 1997; 185: 385-391.
16. Ljunggren H G, Karre K: In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition [see comments]. *Immunol Today* 1990; 11: 237-244.
17. Moretta L, Ciccone E, Moretta A, Hoglund P, Ohlen C, Karre K: Allorecognition by NK cells: nonself or no self? *Immunol Today* 1992; 13: 300-306.
18. Solana R, Serrano R, Pena J: MHC antigens in NK cell recognition and lysis [letter; comment]. *Immunol Today* 1991; 12: 95.
19. Vitale M, Sivorì S, Sanseverino L, Barbaresi M, Morelli L, Olcese L, Agugliano R, Bottino C, Moretta A: Negative signalling via the P58/NKR for HLA C alleles. *Eur J Histochem* 1994; 38: 69-76.
20. Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, Pantaleo G, Moretta L: A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3- CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med* 1990; 171: 695-714.
21. Moretta A, Vitale M, Bottino C, Orengo A M, Morelli L, Agugliano R, Barbaresi M, Ciccone E, Moretta L: P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 1993; 178: 597-604.

22. Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L: Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 1995; 182: 875-884.
23. Vitale M, Sivori S, Pende D, Augugliaro R, Di Donato C, Amoroso A, Malnati M, Bottino C, Moretta L, Moretta A: Physical and functional independency of p70 and p58 natural killer (NK) cell receptors for HLA class I: their role in the definition of different groups of alloreactive NK cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 1453-1457.
24. Pende D, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Falco M, di Donato C, Accame L, Bottino C, Moretta A, Moretta L: The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 1996; 184: 505-518.
25. Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Pende D, Vitale M, Poggi A, Mingari M C, Moretta L: Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev* 1997; 155: 105-117.
26. Vely F, Olcese L, Biery M, Vivier E: Function of killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules. *Immunol Lett* 1996; 54: 145-150.
27. King A, Wellings V, Gardner L, Loke Y W: Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Immunol* 1989; 24: 195-205.
28. Starkey P M, Sargent I L, Redman C W: Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 1988; 65: 129-134.
29. Mandelboim O, Davis D M, Reyburn H T, Vales-Gomez M, Sheu E G, Pazmany L, Strominger J L: Enhancement of class II-restricted T cell responses by costimulatory NK receptors for class I MHC proteins. *Science* 1996; 274: 2097-2100.
30. King A, Birkby C, Loke Y W: Early human decidual cells exhibit NK activity against the K562 cell line but not against first trimester trophoblast. *Cell Immunol* 1989; 118: 337-344.
31. Colonna M, Samaridis J: Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with

- HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells [see comments]. *Science* 1995; 268: 405-408.
32. Colonna M, Brooks E G, Falco M, Ferrara G B, Strominger J L: Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 1993; 260: 1121-1124.
  33. Peruzzi M, Wagtmann N, Long E O: A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLA-B\*2705. *J Exp Med* 1996; 184: 1585-1590.
  34. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-879.
  35. Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T: Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* 1990; 5: 1037-1043.
  36. Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati M S, Vitale M, Bottino C, Moretta L, Moretta A, Long E O: Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 1995; 2: 439-449.
  37. Wegmann T G: Placental immunotrophism: maternal T cells enhance placental growth and function. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 15: 67-69.
  38. Michie C: Th1 and Th2 cytokines in pregnancy, from a fetal viewpoint [letter; comment]. *Immunol Today* 1998; 19: 333-334.
  39. Lynch-Salamon D I, Combs C A: Hepatitis C in obstetrics and gynecology. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 621-629.
  40. Lala P K: Interruption of murine pregnancy by activation of antigen-non-specific killer cells in the endometrium with indomethacin, high dose IL-2 or a combination. *Res Immunol* 1990; 141: 159-164.
  41. Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, Nishina H, Kozuma S, Mikami Y, Taketani Y: Evidence for an elevation in serum interleukin-2 and tumor necrosis factor-alpha levels before the clinical

manifestations of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 89-93.

42. Warren H S, Kinnear B F, Phillips J H, Lanier L L: Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J Immunol* 1995; 154: 5144-5152.

No.	Weeks of pregnancy	Age (years)	Gravity	Parity
1	7	33	0	0
2	9	20	0	0
3	6	29	1	0
4	6	32	5	0
5	6	29	0	0
6	10	29	0	0
7	6	25	1	0
8	8	25	3	1
9	6	25	5	0
10	8	26	0	0

Table 1 研究1で実験に用いた患者のリスト  
人工妊娠中絶術施行時の妊娠週数, 年齢, 経妊回数, 経産回数.

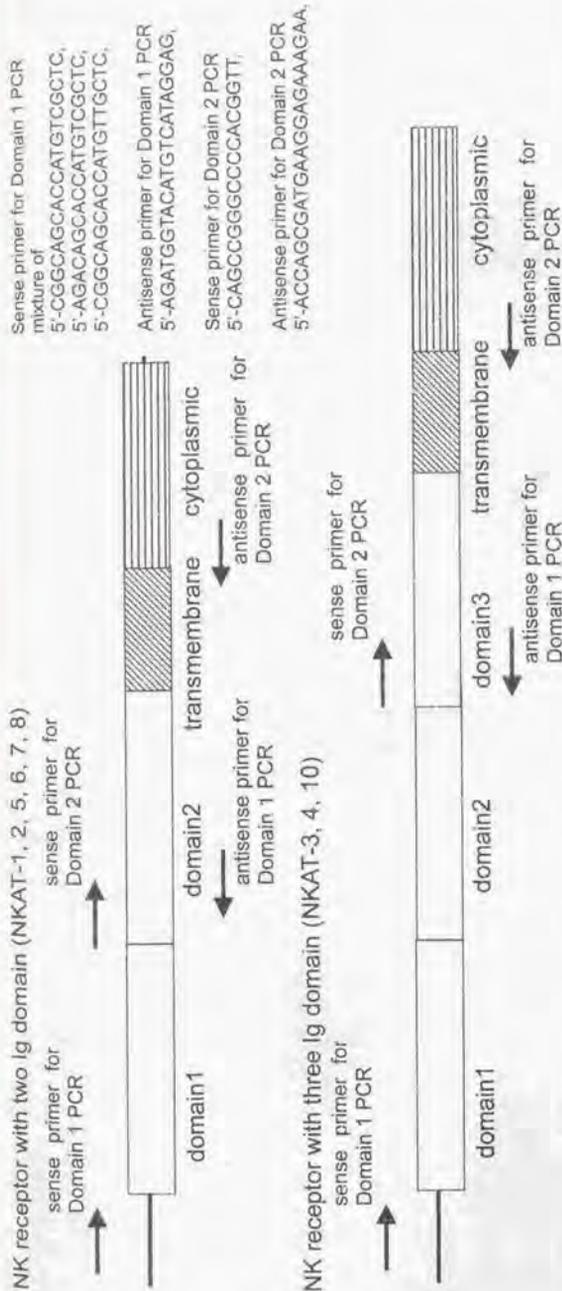


Figure 1

NK レセプターの RT-PCR のためのプライマー設定

Domain1: 細胞外に immunoglobulin 構造を2つもつタイプの NK レセプターの最外側の immunoglobulin 構造部分を増幅してく  
 るようプライマーを設定した。なるべく多くの種類の NK レセプターを増幅してつくるために sense primer は3種の混合とした。

細胞外に immunoglobulin 構造を3つもつタイプの NK レセプターでは外側2つの immunoglobulin 構造部分を増幅する。  
 Domain2: 細胞内に伝達するシグナルの種類を決定する細胞膜貫通部分と最も細胞膜よりの immunoglobulin 構造1つを増幅  
 してつくるように設定した。

Immunoglobulin 構造を3つもつタイプでも同様の部分を増幅する。

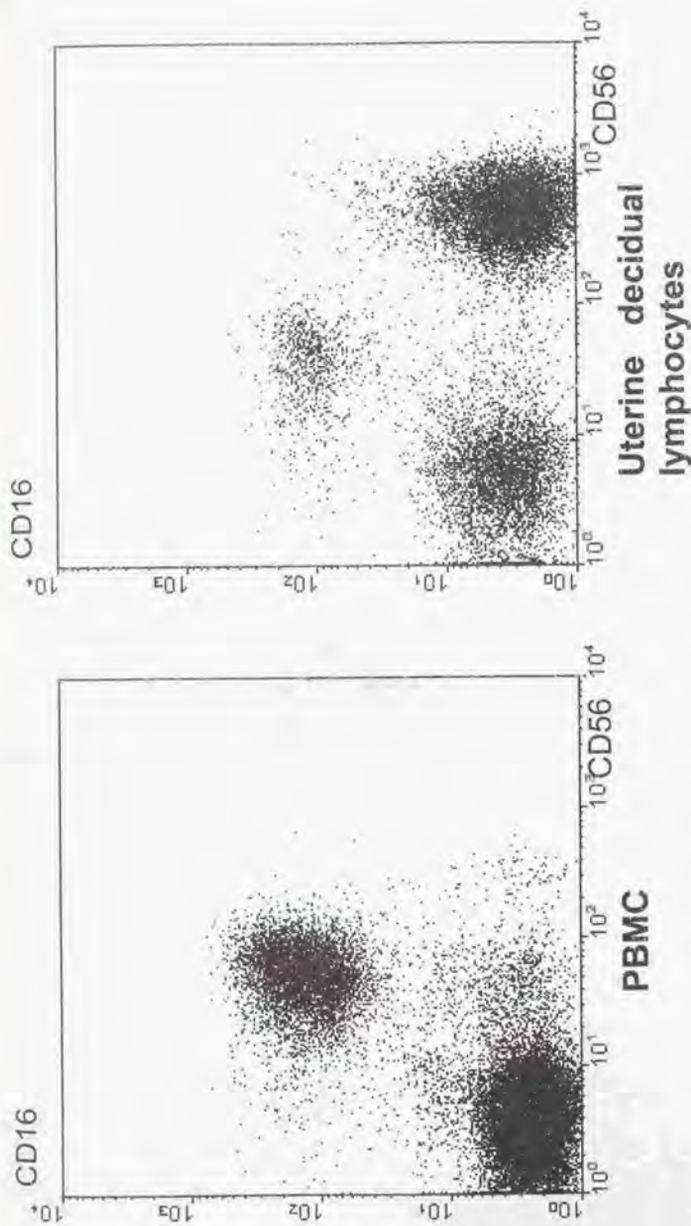
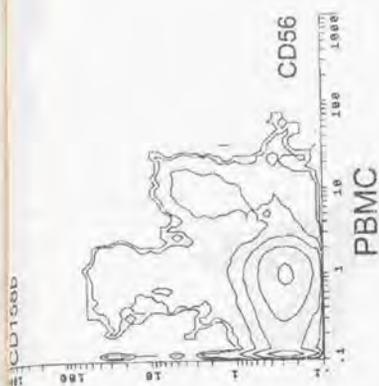
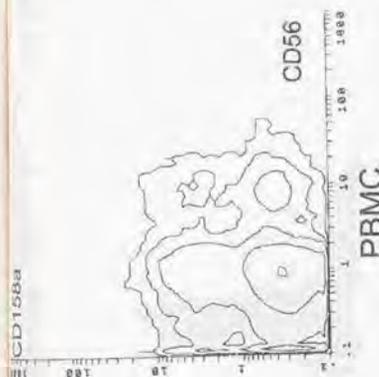


Figure 2: PBMC および子宮脱着膜中のリンパ球表面マーカーの違い

PBMC には CD16+CD56+ の細胞群が多いが、子宮脱着膜中のリンパ球には、PBMC ではほとんど認められない CD16-CD56bright の NK 細胞が多数認められた。すべての sample で同様な結果が得られた。代表的な一例のみを示す。



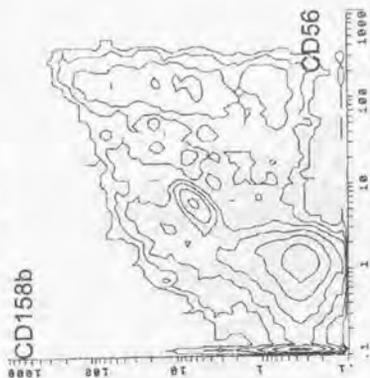
PBMC



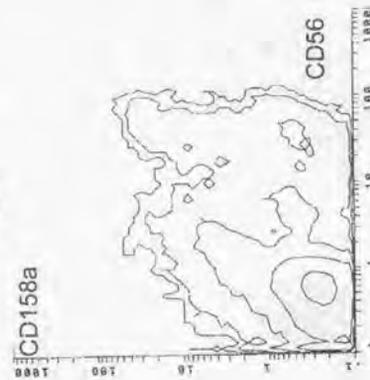
PBMC



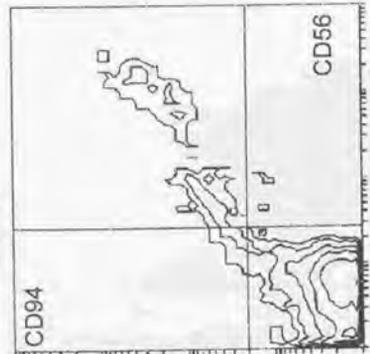
PBMC



Uterine decidual lymphocytes



Uterine decidual lymphocytes



Uterine decidual lymphocytes

Figure 3: PBMC および子宮脱着膜中のリンパ球表面上におけるNKレセプターの発現。  
 子宮脱着膜中のリンパ球にはPBMCではほとんど認められないCD16-CD56bright NK細胞が認められ、この子宮脱着膜に特徴的なNK細胞にNKレセプターCD158a, CD158bの強い発現が認められた。すべてのsampleで同様の結果が得られた。

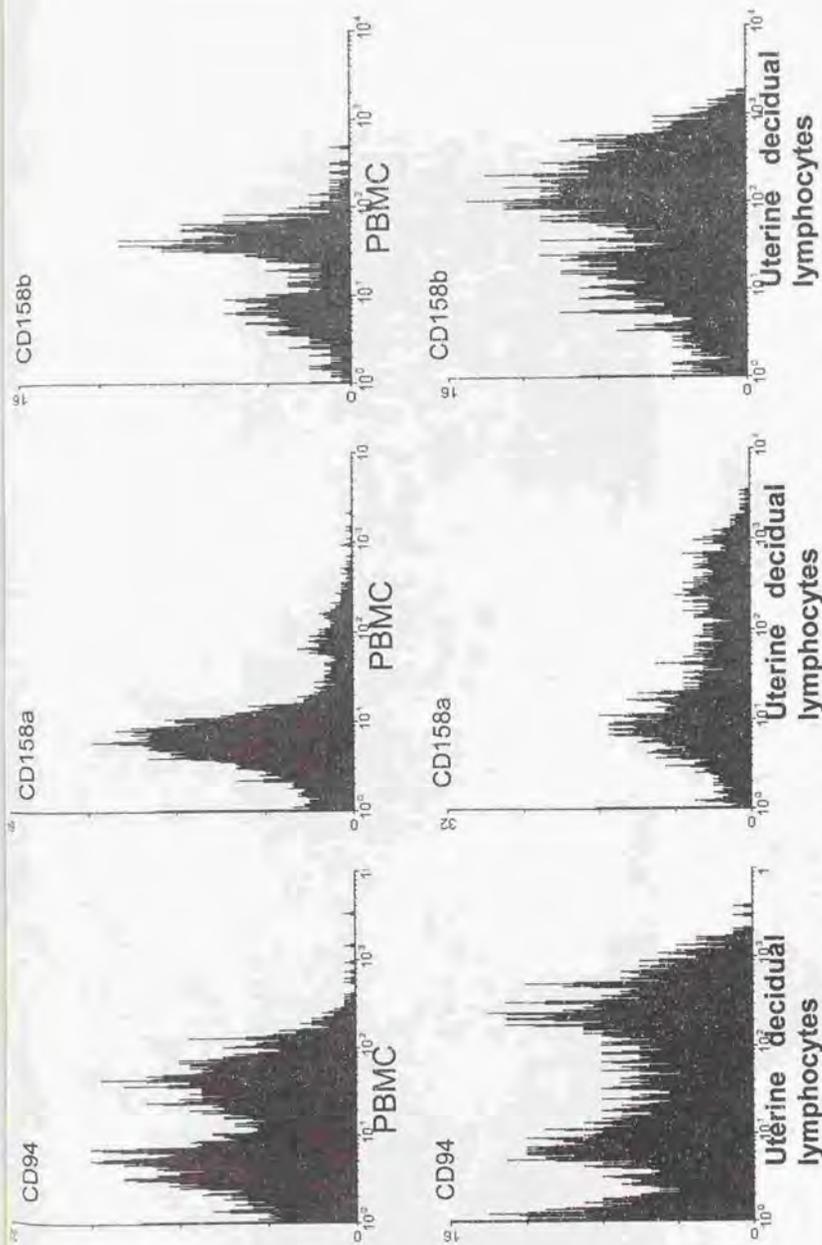
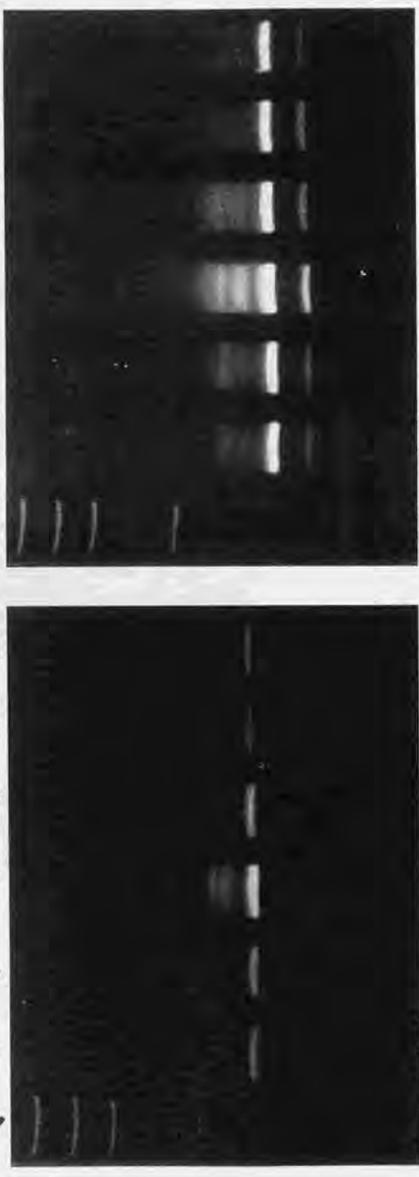


Figure 4: PBMC および子宮脱着膜中リンパ球表面上におけるNKレセプターの発現強度。それぞれのNK細胞においてNKレセプターの発現強度を検討した。CD94, CD158a, CD158b いずれにおいても子宮脱着膜中リンパ球ではPBMCと比較してNKレセプターの強い発現が認められた。

Marker  
 Sample 1 PBMC  
 Decidual Lymphocytes  
 Sample 2 PBMC  
 Decidual Lymphocytes  
 Sample 3 PBMC  
 Decidual Lymphocytes  
 Marker  
 Sample 1 PBMC  
 Decidual Lymphocytes  
 Sample 2 PBMC  
 Decidual Lymphocytes  
 Sample 3 PBMC  
 Decidual Lymphocytes



A: Domain 1

B: Domain 2

Figure 5: RT-PCR のポリアクリルアミドゲル電気泳動

PBMC および子宮脱落膜中のリンパ球ともに予測された大きさの PCR 産物を認めた。

Domain 1 では 3-immunoglobulin type の NK レセプターに由来するバンドが、Domain 2 では細胞外ドメインの一部

欠損のある NK レセプターに由来するやや小さなバンドが認められた。

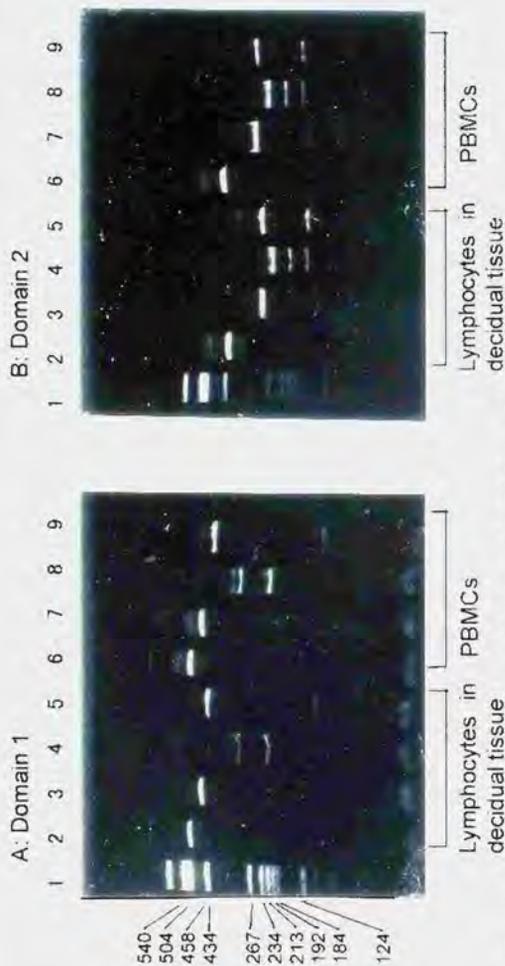


Figure 6 : Figure 5で検出された PCRバンドの制限酵素による切断結果  
 Figure 5で検出された PCRバンドがNKレセプター由来のものであることを確認するため、  
 Domain1のバンドは制限酵素 Apal, SfaNI, XmnI, Domain2バンドは制限酵素 HphI,  
 SfaNI, XmnIにて切断した。  
 NKレセプターの塩基配列から予測される大きさの切断産物ができて  
 いることを確認した。

A : Lane1,5:no digestion, Lane2,6:Apal, Lane3,7:SfaNI, Lane4,8:XmnIにて切断。  
 B : Lane1,5:no digestion, Lane2,6:HphI, Lane3,7:SfaNI, Lane4,8:XmnIにて切断。

A: Domain 1

B: Domain 2

NKAT1  
NKAT2  
NKAT5  
NKAT7  
NKAT8  
NKAT3  
NKAT4  
NKAT10  
mixture of KARS



Figure 7 : 標準的なNKレセプター, NKAT-1~10のSSCPによる判別

標準的なNKレセプター, NKAT-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10のDomain1, Domain2をそれぞれPCR増幅しSSCP電気泳動を行った. 温度条件等を検討することによりそれぞれをゲル上で異なったバンドとして識別することに成功した.  
それぞれのゲルで一番右側はKIR (NKAT-1, 2, 3, 4, 6, 7), KAR (NKAT-5, 8, 10)を混合して泳動したものであるが, 混合してもバンドの位置に変化がないことが示された.

A: Domain 1

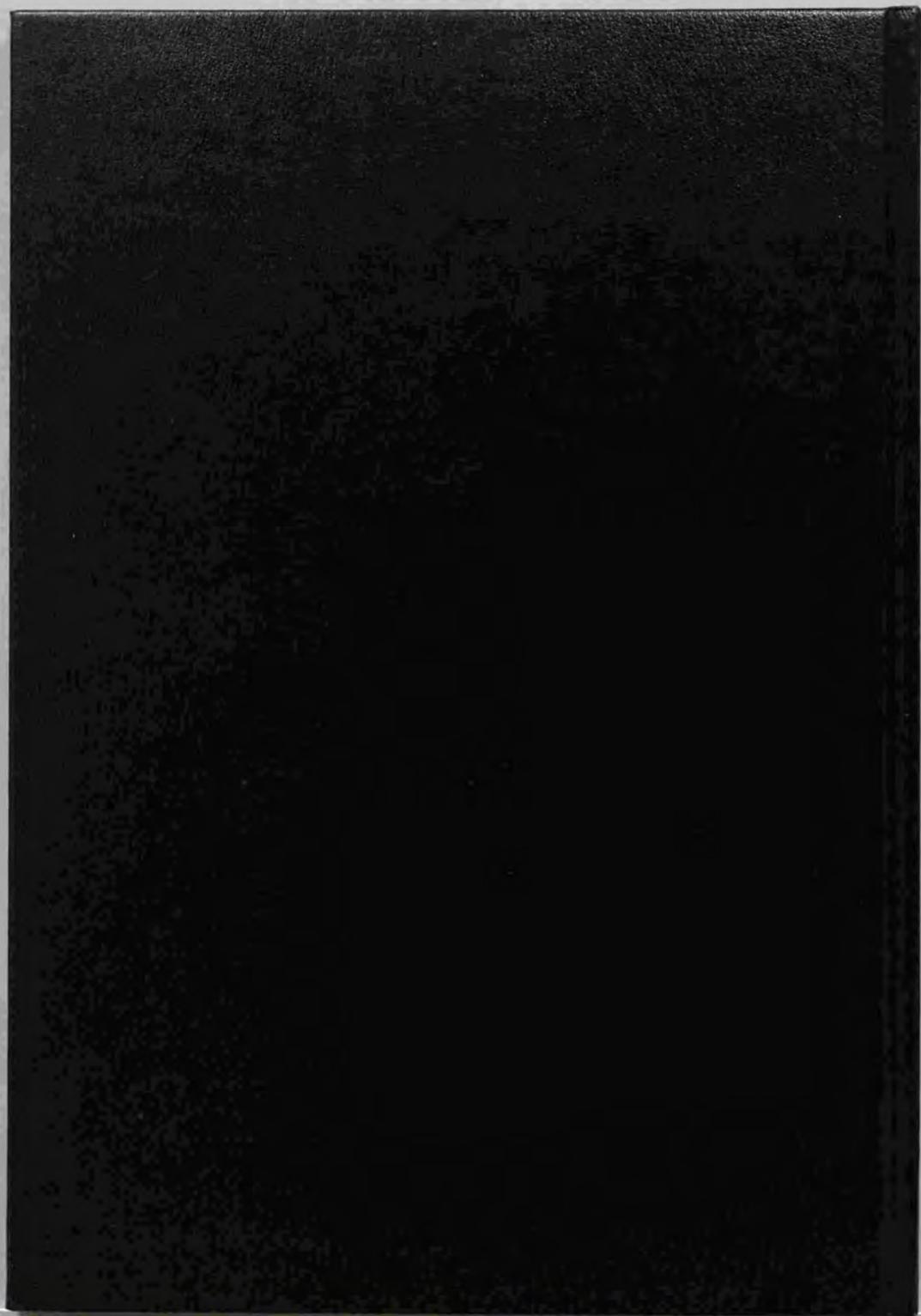


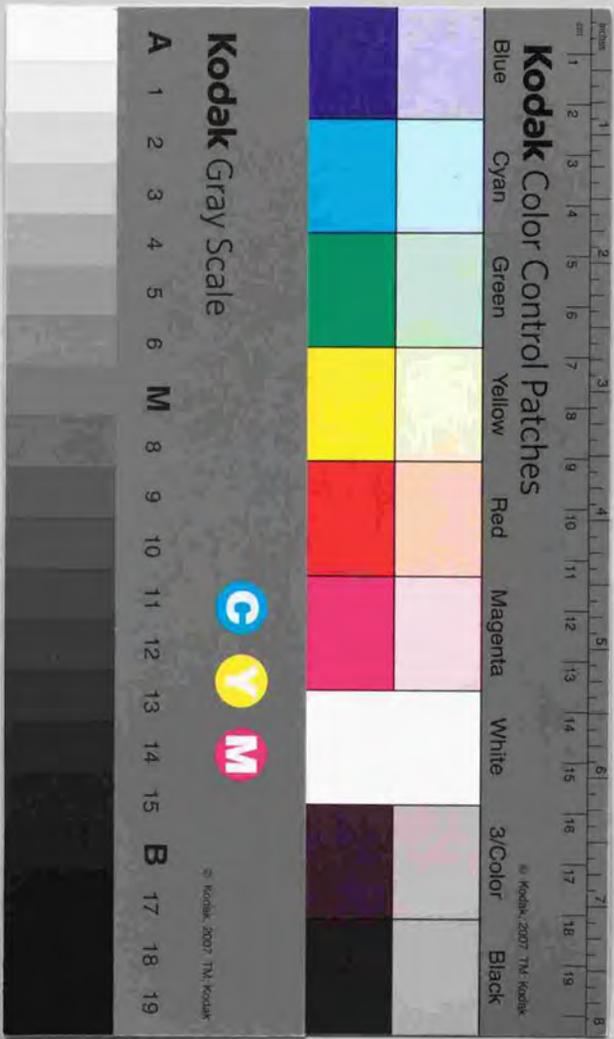
B: Domain 2



Figure 8 : PBMC および子宮脱落膜中リンパ球表面上でのNKレセプターの発現 (PCR-SSCP 解析)

Lane a: KIR mixture, Lane b: KAR mixture. その他の Lane は左側が PBMC, 右側が子宮脱落膜中のリンパ球由来の PCR-SSCP バンドである。個体により発現している NKレセプターの種類が異なっていることが推測されるが、同一個体では PBMC と子宮脱落膜中リンパ球との間でパターンに大きな違いはなく、発現している NKレセプターに大きな違いはないと考えられる。また矢印のバンドを切り出し塩基配列を確認することで、子宮脱落膜中リンパ球にも KAR が発現していることが示唆された。





# Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

## Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

C Y M

© Kodak, 2007. TM, Kodak