

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11076

研究課題名(和文) NKG2DシステムによるuNK細胞制御と胎盤形成の検討

研究課題名(英文) Analysis for placental development via uNK cells and NKG2D system

研究代表者

大塚 紀幸 (OTSUKA, Noriyuki)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：00447046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤の形成には種々の免疫細胞が関与しており、uNK細胞が重要な働きを占めている。本研究では、NK細胞の主要な活性化レセプターであるNKG2Dとそのリガンドの役割とメカニズムを解析した。胎盤の組織再構築には、緩徐な低酸素状態の関与が考えられている。マウス皮膚虚血再灌流モデルを援用した検討により、NKG2Dシステムが炎症の制御と組織再構築に寄与していることが分かった。胎盤形成において低酸素や灌流不均衡が誘導因子としてNKG2Dシステムが関与している可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎盤の形成不全や機能不全は胎児発育に直結することから、生殖医療において胎盤の形成機構の解明は重要課題の一つとなっている。本研究では、NKG2Dシステムが胎盤形成に寄与していること、その機構には低酸素状態が関与していることを示した。今後さらに、胎盤形成のNKG2Dシステムを介した免疫調整機構を解析していく。これらの研究成果によって、胎盤機能を維持促進する治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Variety of immune cells are involved in placental development. Uterine NK cells play the key role in the process. In this project, we analyzed the role and the mechanism of NKG2D receptor and its ligands interaction using murine models. Mild hypoxic condition in placenta aids the tissue remodeling in the placenta. We employed a murine skin ischemia-reperfusion ulcer model to prove that NKG2D receptor-ligands interaction contributes to the immune control and the tissue remodeling. These results suggest that NKG2D system induced by hypoxia promote the placental development.

研究分野：病理学

キーワード：胎盤 NK細胞 NKG2D 虚血再灌流障害 トロホブラスト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 胎盤は胎児組織と母体組織(子宮内膜)の境界部に、形成される臓器である。胎盤は、胎児の発育を助けるために、特殊な血管構築が形成されており、その形成段階においてはuNK細胞を含む免疫機構の制御が重要と考えられている。実際に、流産や早産にNK細胞が関与することが報告されている。

(2) NKG2DはNK細胞の主要な活性化受容体で、*in vitro*においてリガンドがuNK細胞を活性化しサイトカイン産生を亢進させると報告されている。本研究者は、生体における胎盤形成と疾患への関与について研究を進め、NKG2D阻害抗体の投与によって、胎盤の構築に乱れが生ずることを見出ししてきた。

2. 研究の目的

主としてNKG2D欠損マウスを用いて、NKG2Dシステムの胎盤形成への影響を検討する。免疫細胞の関与と組織構築の詳細の解析を行う。NKG2Dリガンド発現を誘導する要因の検討を施行し、免疫細胞の調節とリガンド発現による胎盤形成の調節への端緒を求める。

3. 研究の方法

(1) NKG2D欠損マウス胎盤を採取し、uNK細胞の集簇と分布、NKG2Dリガンドの発現を検討する。さらに、トロホプラストの浸潤と分布を解析し、胎盤構築の変化の要因を検討することにより実験の方向性を定める。

(2) トロホプラストの初期培養を施行しNKG2Dリガンドの誘導、免疫細胞(uNK細胞)との相互作用を検討する。

(3) 虚血によるNKG2Dリガンド誘導の影響を検討するため、皮膚線維芽細胞を用いて、低酸素によるリガンド発現検討を施行する。

(4) 皮膚虚血再灌流により、血管の形成、線維芽細胞の増生が誘導されるが、ここにはNKG2D陽性細胞であるNKT細胞の関与が報告されている。胎盤形成に相同するモデルとして、マウス皮膚再灌流障害モデルを援用し、NKG2Dシステムが関与する組織再構築の検討を行う。

すなわち、円形磁石1対によってマウス背部皮膚を一定時間挟み、局所の虚血・低酸素状態をつくる。その後、磁石を外して再灌流による組織障害を形成するモデルであり、肉芽組織を形成させることができる。

(5) NKG2Dリガンドをツールとする胎盤形成過程への介入を目的として、可溶性NKG2Dリガンドの作製と利用を試みる。

4. 研究成果

(1) 既に報告の通り、NKG2D阻害抗体投与によって胎盤サイズ、特にトロホプラスト領域と血管領域の狭小化が認められる。NKG2D欠損マウスにおいて、同様の結果が認められた。さらに、マウス胎盤において、トロホプラストの分布に乱れが認められた。すなわち、junctional zone typeのトロホプラストが、labyrinth zoneと母体側の脱落膜に侵入する像が認められた。(図1)

さらに、免疫組織化学的にトロホプラストの分布を検討すると、NKG2D欠損マウスでは、母体脱落膜の血管周囲に浸潤するトロホプラストが、野生型マウスに比べて深く浸潤していた。(図2)

トロホプラストの浸潤は、胎盤の低酸素環境に依存することが知られており、NKG2D欠損マウスでは、トロホプラストの制御に何らかの影響があるものと推察された。

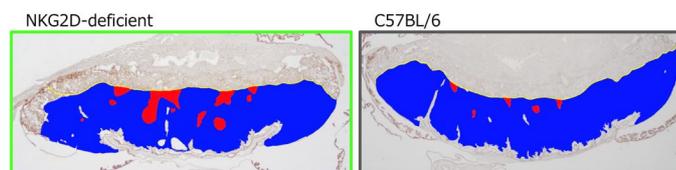


図1 Junctional zone-typeトロホプラストが、labyrinth zoneに陥入する像を認める。

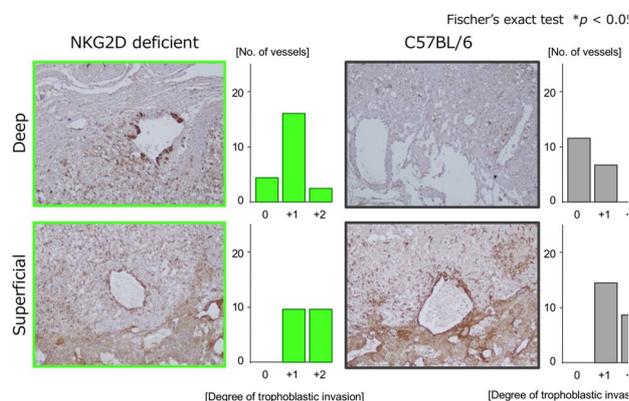


図2 NKG2D欠損マウスで脱落膜血管周囲へのtrophoblast(AE1/3陽性)の浸潤がより高度である。

(2) 低酸素下にあるマウストロホプラストの NKG2D リガンド発現と NKG2D 陽性細胞 (主として uNK 細胞) の相互作用について検討するため、トロホプラストの分離と初期培養を試行した。しかしながら、低酸素下の条件を検討するのに十分な培養が困難であったため、代替手段による解析を要した。

(3) トロホプラスト初期培養株の代替材料として、マウス皮膚線維芽細胞を用いて、亜ヒ酸を添加して NKG2D リガンドの誘導実験を施行した。

マウス皮膚線維芽細胞では、亜ヒ酸の濃度依存的に NKG2D リガンドの発現の増強が認められた。(図3)

(4) 皮膚線維芽細胞細胞では、低酸素条件下で NKG2D リガンドの発現増強が認められることから、マウス皮膚虚血再灌流モデルを援用して、NKG2D システムの関与を検討した。このモデルでは、表皮欠損と感染の影響を抑えつつ、深部に肉芽組織形成過程を再現することができる。

この皮膚虚血再灌流モデルを施行したマウスでは、円形磁石を装着した部位に一致して、リング状に組織に酸化ストレスが加わっていることを、酸化ストレス可視化マウス (OKD-Luc マウス) によって確認した。

病変形成部には、flowcytometry で NKG2D 陽性細胞の増加が確認された。また、この部位に一致して、NKG2D リガンド発現の増強を免疫組織化学的に確認した。(図4) 加えて、この領域に一致して、線維芽細胞細胞の増生、血管増生、炎症細胞の浸潤と集簇が認められた。

NKG2D 欠損マウスでは、マウス皮膚虚血再灌流モデルによって形成される創傷のサイズが、実験開始から 96 時間後において、対照群である野生型マウスに比べて増大していた。この病変部について、組織形態学的に検討を加えたところ、線維芽細胞増生や血管増生に有意差な変化は見られなかったが、集簇する炎症細胞の集簇に増強が認められた。(図5)

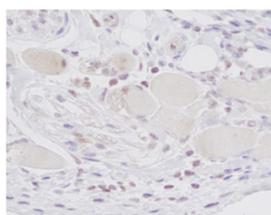


図4 マウス皮膚虚血再灌流辺縁部の真皮免疫組織化学染色 (Rae-1)

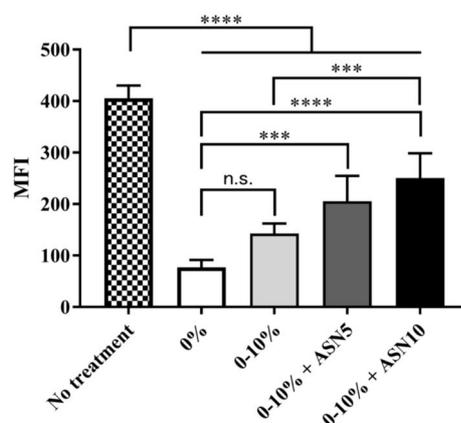


図3 亜ヒ酸 (ASN) 添加による NKG2D リガンド (Rae-1) の発現変動。

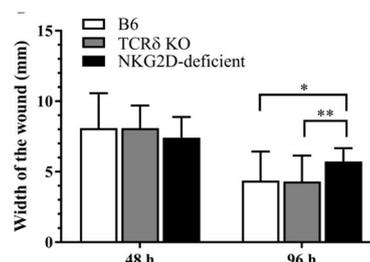


図5 皮膚虚血再灌流による創傷部サイズの比較

マウス角膜剥脱モデル、あるいはマウス皮膚創傷形成モデルにおいて、NKG2D を介した炎症の制御が報告されており、今回のマウス皮膚虚血再灌流モデルでも同様の機構が示唆される。

胎盤においても、低酸素下に曝されたトロホプラストによる NKG2D リガンドの発現増強により NKG2D 陽性細胞 (uNK 細胞) を介した炎症細胞の制御、トロホプラスト浸潤の調節機構の存在が想定されることから今後、その詳細の解明を進める。

(5) 可用型 NKG2D リガンドの作製を進めたが、生体への投与による確認段階には至っていない。引き続き、胎盤形成調節への応用のための検討を進める。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. NKG2D Ligand Expression Induced by Oxidative Stress Mitigates Cutaneous Ischemia-Reperfusion Injury. Makita K, Otsuka N, Tomaru U, Taniguchi K, Kasahara M. J. Histochem. Cytochem. 71:61-72 (2023). [査読有り]

2. P450 Side-Chain Cleavage Enzyme (P450-SCC) Is an Ovarian Autoantigen in a Mouse Model for Autoimmune Oophoritis. Tong ZB, Otsuka N, Tu W, Wei Q, DeCherney AH: *Reprod. Sci.* 29:2391-2400 (2022). [査読有り]

3. Laparoscopic posterior pelvic exenteration for primary adenocarcinoma of the rectovaginal septum without associated endometriosis: A case report. Fujimoto T, Tanuma

F, Otsuka N, Kataoka S. Mol Clin Oncol. 10:92-96. doi: 10.3892/mco.2018.1751 (2019)
[査読有り]

4. Clinicopathological significance of PSF3 expression in uterine endometrial carcinomas. Park JK, Otsuka N, Tomaru U, Suzuki H, Azuma M, Okamoto K, Yamashiro K, Kasahara M. Hum Pathol. 80:104-112. doi: 10.1016/j.humpath.2018.06.010 (2018) [査読有り]

5. Expression of cathepsins V and S in thymic epithelial tumors. Kiuchi S, Tomaru U, Ishizu A, Imagawa M, Kiuchi T, Iwasaki S, Suzuki A, Otsuka N, Deguchi T, Shimizu T, Marukawa K, Matsuno Y, Kasahara M. Hum Pathol. 60:66-74. doi: 10.1016/j.humpath.2016.09.027. (2017) [査読有り]

[学会発表] (計 7 件)

1. The expression of NKG2D ligand is induced in the cutaneous ischemia-reperfusion injury and mitigates pressure ulcer via NKG2D-NKG2D ligand interaction. Otsuka N, Makita K, Tomaru U, Kasahara M (第 104 回 American association for immunologists annual meeting, 2020 年 5 月)

2. 組織修復と組織再構築における NK 細胞と NKT 細胞の役割. 大塚 紀幸 (ワークショップ, 第 107 回 日本病理学会総会, 2018 年 6 月)

3. 皮膚虚血再灌流障害における NKG2D システムの役割についての検討. 牧田啓史, 大塚 紀幸, 外丸 詩野, 村田 恵里, 池下 隼司, 笠原 正典 (第 107 回 日本病理学会総会, 2018 年 6 月)

4. 皮膚虚血再灌流障害における NKG2D システムの役割についての研究. 牧田啓史, 大塚 紀幸, 三輪 和可奈, 徳永 美沙, 外丸 詩野, 笠原 正典 (第 50 回 北海道病理談話会, 2017 年 10 月)

5. NKG2D 欠損マウスを用いた皮膚虚血再灌流障害後の表皮再生と胎盤構築の解析. 大塚 紀幸, 牧田啓史, 徳永 美沙, 笠原 正典 (第 106 回 日本病理学会総会, 2017 年 4 月)

6. Attenuated epidermal regeneration after ischemia-reperfusion injury and alteration of placental structure in NKG2D-deficient mice. 大塚 紀幸, 牧田啓史, 三輪 和可奈, 徳永 美沙, 笠原 正典 (第 45 回 日本免疫学会, 2016 年 12 月)

7. NKG2D 欠損マウスにおける胎盤形成と組織再生機構の検討. 大塚 紀幸, 徳永 美沙, 青木 葉香, 笠原 正典 (第 31 回 日本生殖免疫学会学術集会, 2016 年 12 月)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

北海道大学大学院医学研究院分子病理学教室ホームページ
<http://path1.med.hokudai.ac.jp/path1/>

6 . 研究組織

[研究協力者]

笠原正典, 外丸詩野 / 北海道大学大学院医学研究院

松野吉宏 / 北海道大学病院病理診断科

八木田秀雄 / 順天堂大学大学院医学研究科

吉田繁 / 北海道大学大学院保健科学研究院

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。