

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：19791161

研究課題名（和文） トロホプラスト上の HLA-E による胎盤 NK 細胞の集積・分化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of accumulation / differentiation mechanism of decidual NK cells by HLA-E on trophoblasts.

研究代表者 王寺典子（下嶋典子）(NORIKO OUJI) (NORIKO SAGESHIMA)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30398432

研究成果の概要：

妊娠初期より HLA-E、HLA-G は胎盤に発現し、妊娠維持に関与する。最近、着床前の受精卵も HLA-G を産生・分泌し、体外受精卵の良好胚選定に HLA-G 検出が有用であるといわれている。この真偽を確認するため、体外受精卵培養上清 481 例において HLA-G 測定を行ったが、検出されなかった。この結果は、良好胚選定法に HLA-G 検出は不適であることを世界的に示した点で意義がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000		1,900,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景

胎盤脱落膜には非常に多くの NK 細胞が存在し、母児免疫寛容に機能していることが明らかになっている。しかし、NK 細胞が胎盤脱落膜に集積する機構は明らかになっていない。この胎盤脱落膜 NK 細胞は、末梢血 NK 細胞と性質が異なり、細胞障害活性をほとんどもたない。さらにそのほぼ 100% が NK 細胞抑制性レセプターの CD94/NKG2A を発現している。この CD94/NKG2A のリガンドが HLA-E といわれる分子である。

HLA-E は非古典的 HLA (HLA class Ib) 遺伝子の一つであり、非常に多型性に乏しいこ

とが特徴である。また、HLA-E は通常の HLA class I 分子の発現様式とは異なり、HLA-E 以外の HLA class I 分子のシグナルペプチドのみを結合して発現する。胎盤トロホプラストには HLA-G のみが非常に強く発現していることから、胎盤トロホプラスト上の HLA-E は、そのほぼすべてが HLA-G のシグナルペプチドを結合していると考えられる。またこの HLA-G のシグナルペプチドを結合した HLA-E (HLA-E/G) が、CD94/NKG2A と結合することが明らかになっており、我々は、胎盤脱落膜における NK 細胞集積に HLA-E/G が関与しているのではないかと考えた。

またこれまで、トロホプラスト上のみ強く発現すると考えられていた HLA-G が、近年、体外受精卵においても発現し、その培養上清中に可溶性の HLA-G 抗原を分泌するという報告がなされた。そして分泌の有無が着床の可否にも関与しているというものであった。これが真実であれば、受精卵にも HLA-E/G が発現している可能性があり、受精卵自身が脱落膜 NK 細胞の集積に関与し胎盤脱落膜形成に関与している可能性もある。そこでこの真偽について確認する必要があると考えた。

2. 研究の目的

HLA-E/G が胎盤脱落膜NK細胞の集積に関与しているのかを明らかにする。さらに HLA-E/G が胎盤脱落膜NK細胞の分化・維持にも機能しているのかを明らかにする。

また、より高感度な HLA-G 測定 ELISA を確立し、体外受精卵培養上清中の HLA-G 抗原の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 高感度な ELISA 法の確立

① HLA-G 抗原測定法の確立

抗 HLA-G 抗体 (87G, 16G1, o1G, MEMG/9) と抗 HLA class I 抗体 (W6/32) を用い、最も高感度に HLA-G 抗原を検出する組合せを検討した。

② HLA class I 抗原測定法の確立

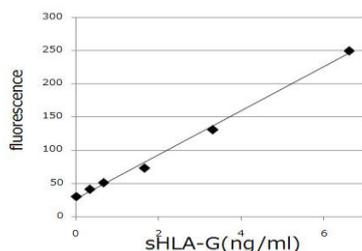
抗 HLA class I 抗体 (W6/32) と抗 $\beta 2$ マイクログロブリン抗体を用い、高感度に HLA class I 抗原 (HLA-G 抗原を含む) を検出する系を確立した。

(2) 体外受精卵培養上清中の HLA-G および HLA class I (HLA-G を含む) 抗原の検出

4. 研究成果

(1) HLA-G 抗原測定法の確立

現在、市販されていて ELISA で使用しうる 4 種の抗 HLA-G 抗体を capture 抗体として用い、検出に抗 HLA class I 抗体 (W6/32) を使用して検討した。その結果、MEMG/9 を capture に使用した場合が最も高感度に HLA-G を検出し得た (検出限界: 2ng/ml) (図 1)。以後の体外受精卵培養上清中の HLA-G 抗原検出には抗 HLA-G 抗体 MEMG/9 と抗 HLA class I 抗体 W6/32 を使用した sandwich



ELISA で行った。

図 1 検量線 (HLA-G 抗原)

(2) 体外受精卵培養上清中の HLA-G 抗原の検出

(1) で確立した HLA-G 抗原検出法を使用して、day1 培養上清 37 例、day3 培養上清 88 例、day6 培養上清 49 例中の HLA-G 抗原の検出を行ったが、いずれにおいても検出限界以下、あるいは検出限界付近でしか HLA-G 抗原は検出されなかった。(図 2) 本結果からは、体外受精卵培養上清中に HLA-G 抗原が存在するとは考え難かった。

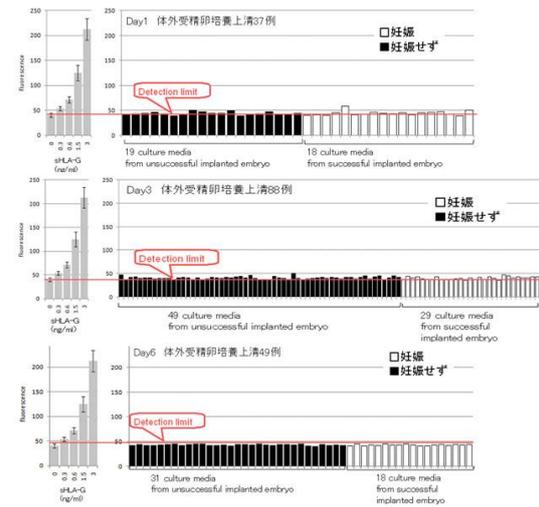


図 2 体外受精卵培養上清中の HLA-G 抗原

(3) HLA class I 抗原測定法の確立

(2) において体外受精卵培養上清中に HLA-G 抗原は検出されなかったが、その原因の一つに HLA-G 抗原検出測定法の感度にあると考え、さらに高感度な方法として、HLA class I 抗原を測定しうる方法を確立した。抗 HLA class I 抗体 W6/32 と抗 $\beta 2$ マイクログロブリン抗体を使用した Sandwich ELISA を行った (検出限界: 0.5ng/ml)

また、この HLA class I 抗原測定法では HLA-G 抗原も検出限界 0.5ng/ml で測定しうることを確認した (図 3)。

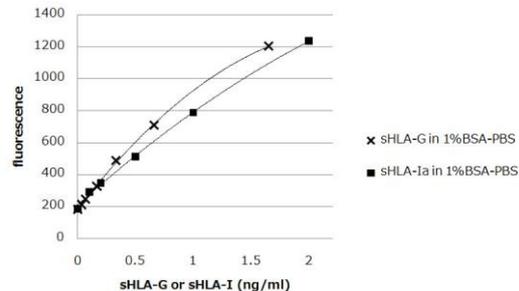


図 3 検量線 (HLA class I 抗原、HLA-G 抗原)

(4) 体外受精卵培養上清中の HLA class I 抗原の検出

(3) において確立した HLA class I 抗原測定法を使用して day3 培養上清 110 例、day6 培養上清 88 例中の HLA class I 抗原の検出を行ったが、いずれにも HLA class I 抗原は検出できなかった (図 4)。すなわち体外受精卵培養上清中には HLA-G 抗原を含む HLA class I 抗原が存在しない、あるいは 0.5ng/ml 以下でしか存在しないことが示された。

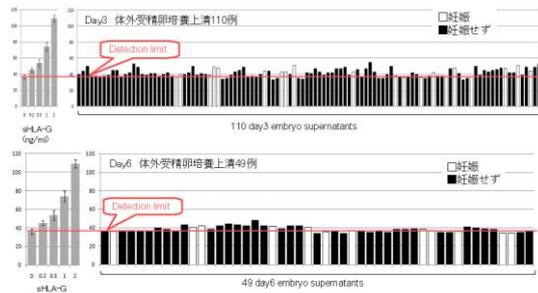


図 4 体外受精卵培養上清中の HLA class I 抗原 (HLA-G 抗原を含む)

今回の我々の結果から、体外受精卵培養上清中に HLA-G 抗原は産生されない、あるいは検出限界以下でしか産生されないということが示された。すなわち、体外受精卵の良好胚選定に、HLA-G 抗原検出法は、不適であることが示唆された。一方で、我々は卵胞液中に可溶性 HLA-G 抗原が擬陽性で検出されることを見出している。今後は、このような擬陽性を起こす物質の同定をすすめ、より精密な HLA-G 抗原測定法の開発を目指す。

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 1 件)

① Sageshima N, Shobu T, Awai K, Hashimoto H, Yamashita M, Takeda N, Odawara Y, Nakanishi M, Hatake K, Ishitani A. Soluble HLA-G is absent from human embryo cultures: a reassessment of sHLA-G detection methods. *J Reprod Immunol.* 75(1):11-22. 2007. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

①王寺典子、受精卵着床における可溶性 HLA-G 抗原の意義、第 23 回 日本生殖免疫学会、2008 年 12 月 7 日、富山・富山国際会議場

②王寺典子、可溶性 HLA-G 抗原測定法の問

題点—卵胞液中の可溶性 HLA-G 抗原の意義—、第 17 回日本組織適合性学会大会、2008 年 9 月 21 日、大阪・大阪国際会議場

③王寺典子、Absence of sHLA-G from embryo cultures—a reassessment of detection methods、EMBIC Workshop on sHLA-G and Implantation、2008 年 6 月 28 日、イギリス・Mansfield college

④王寺典子、可溶性 HLA-G 測定法の問題点と体外受精分野への影響、第 7 回日本組織適合性学会近畿地方会、2008 年 2 月 7 日、大阪・参天製薬株式会社本社

⑤王寺典子、旧世界ザルにおける HLA-G、HLA-F ホモログの発現、第 16 回日本組織適合性学会大会、2007 年 9 月 9 日、京都・ぱる・るプラザ京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王寺 典子 (下嶋 典子) (Ouji Noriko (Sageshima Noriko))
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30398432

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

