

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18678

研究課題名(和文) 妊娠前、妊娠中の末梢血NK細胞の遺伝子・microRNA発現と各種病態形成

研究課題名(英文) The gene and microRNA expressions of peripheral natural killer cells in pre-pregnancy and pregnancy, and the pathophysiological hypotheses

研究代表者

石田 洋一 (Ishida, Yoichi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70772143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：母体末梢血NK細胞が着床や妊娠維持機構に関わっているという仮説を立て実験を開始した。今回、卵胞期、黄体期、妊娠初期におけるNK細胞のマイクロアレイを施行した。その結果、各比較において多数の発現変動を認めため、母体末梢血NK細胞が着床や妊娠維持機構に関わっている可能性が示唆された。卵胞期-黄体期ではCDK9等、黄体期-妊娠初期ではIL-10、MMP9、DUSP13等、卵胞期-妊娠初期ではIL-18、MMP9、DUSP13等の遺伝子発現の変動を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討で、妊娠前から妊娠初期にかけて母体末梢血NK細胞(pNK)の多数の遺伝子発現の変動を認めた。この結果から、pNKが着床や妊娠維持機構に関与している可能性が示唆された。このことは、いまだ病態が完全に解明されていない着床不全、不育症やまた早産、妊娠高血圧症候群、常位胎盤早期剥離など、妊娠に関わる疾患の原因解明や治療の向上につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that peripheral natural killer cells (pNK) were associated with the implantation and pathophysiology of fetomaternal tolerance, and started the examination. In this study, we examined the comprehensive gene expressions in pNK from pre-pregnancy (follicular phase and luteal phase) to 1st-trimester. The result showed the changes of expression for many genes, so pNK might be associated with the implantation and pathophysiology of fetomaternal tolerance. Changes in gene expression such as CDK9 in comparison between follicular and luteal phase, IL-10, MMP9, and DUSP13 in comparison between luteal phase and 1st-trimester, and IL-18, MMP9, and DUSP13 in comparison between follicular phase and 1st-trimester were observed.

研究分野：生殖免疫

キーワード：末梢血NK細胞 妊娠 網羅的解析 遺伝子 microRNA 着床 妊娠維持機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

母児間インターフェースにおいて、脱落膜NK細胞だけでなく母体末梢血NK細胞も母児免疫寛容に関わっている、という仮説を立て実験を開始した。妊娠初期と後期における母体末梢血NK細胞(pNK)の網羅的遺伝子発現解析により比較したところ、約1000の遺伝子と約25のmicroRNA(miRNA)に発現差があることを見出し、なかでも胎児由来と考えられるmiRNAが母体血中に存在し、母体末梢血NK細胞で発現していることを示した。これは胎児由来miRNAが母体由来NK細胞に影響を与え、母児免疫に関与することを示唆する。今回も母体血-胎盤絨毛の母児間インターフェースに引き続き注目する。妊娠初期に胎盤絨毛は母体血中という半異個体のなかにも関わらず、著しく増殖分化する。つまり、母体血中NK細胞が妊娠初期にも母児免疫寛容に寄与している可能性があると考えられる。これまでの検討では、妊娠前と妊娠初期の血液からNK細胞を分離してその細胞数をカウントしたところ、黄体期を頂点にpNK数がダイナミックに変動していた。この結果からもpNKが着床や妊娠維持機構に関与することが示唆され、今回の検討では妊娠前と妊娠初期におけるpNKの網羅的遺伝子発現解析を中心に検討した。

2. 研究の目的

(1) 脱落膜NK細胞が妊娠維持機構に関わっていることは知られているが、pNKが妊娠維持機構に関わっているかどうかはわかっていない。これまで妊娠初期から後期にかけてのpNK網羅的遺伝子発現解析において約1,000の遺伝子発現変動や胎盤特異的microRNAの検出を認めること、pNK数が黄体期を頂点に有意に変動することを報告してきた。今回、妊娠前から妊娠中にかけてpNKの網羅的遺伝子発現解析を施行し、pNKが着床や妊娠維持機構に関連がある傾向があるかどうか評価した。

(2) 妊娠前と妊娠初期におけるpNKの網羅的遺伝子発現解析において、有意に発現変動していた遺伝子のうち、これまでの知見でNK細胞が着床や妊娠維持機構に関与している可能性があると考えられる遺伝子について発現確認(validation)を施行し、その遺伝子の発現変動を評価した。

(3) 妊娠前と妊娠期におけるpNKのmicroRNAについて検討した。研究開始当初、microRNAの網羅的発現解析を計画していたが、採取したサンプルのpNKのTotalRNAの量が十分でなかったことから断念した。かわりに、妊娠前から妊娠中において胎盤特異的microRNAである*miR-517a*と*miR-512-3p*についてRT-PCRによりその発現を評価し、これらのmicroRNAが着床や妊娠維持機構に関連がある傾向があるかどうか評価した。

3. 研究の方法

(1) 当院生殖医学センターまたは周産期医療センターに通院している患者から同意を得て、妊娠前(卵胞期・黄体期)妊娠初期に末梢血14mlを採取し、磁気ビーズを用いてpNKを分離した。採取したサンプルのうち、同一人物から採取した卵胞期-黄体期6例、黄体期-妊娠初期5例、卵胞期-妊娠初期6例に対して、pNKの網羅的遺伝子発現解析を行い比較検討した。実験については、Agilent株式会社製のマイクロアレイスキャナを使用した。

(2) 同一人物からの妊娠前(卵胞期・黄体期)妊娠初期のpNKの検体を用いて、著明に有意に発現変動しかつこれまでの知見でNK細胞が着床や妊娠維持機構に多くに関与している可能性があると考えられる遺伝子についてRT-PCRにより評価した。Ct法を用いて、その相対発現量(2^{-Ct} 値)を比較検討した。統計解析については、SPSS Statistics ver.24 (IBM)を用いてWilcoxon signed-rank testによる検定を施行し、有意差を $p < 0.05$ とした。実験については、タカラバイオ株式会社製のThermal Cycler Dice Real Time System IIを使用した。

(3) 同一人物からの妊娠前(卵胞期または黄体期)妊娠初期、妊娠後期のpNKの検体を用いて、胎盤特異的microRNAである*miR-517a*と*miR-512-3p*についてRT-PCRでその発現を評価した。実験については、Thermo Fisher Scientific株式会社製のTaqMan MicroRNA Assayを使用した。

4. 研究成果

(1) 妊娠前(卵胞期・黄体期)から妊娠初期のpNKの網羅的遺伝子発現解析において、卵胞期-黄体期ではCDK9、IL-6等の2259種類の遺伝子、黄体期-妊娠初期ではMMP9、DUSP13、IL-10等の3553種類の遺伝子、卵胞期-妊娠初期ではMMP9、DUSP13、IL-18等の5786種類の遺伝子の発現の有意な変動を認めた。それらの遺伝子から、NK細胞の着床や妊娠維持機構に関与している可能性があると考えられる遺伝子についてまとめた(Fig. 1)。

B

Measurement ID	GENE SYMBOL	p value	Fold change
19321	DUSP13	2.09E-04	6.4566855
3802	DUSP13	3.74E-05	7.1371136
28017	DUSP13	3.18E-05	6.5219007
24453	DUSP13	2.89E-05	6.7096667
30837	DUSP13	2.89E-05	6.2673693
1682	DUSP13	5.99E-04	4.9883434
3866	DUSP13	3.49E-04	5.2485823
16729	DUSP13	1.29E-04	6.0417604
8155	DUSP13	4.64E-04	5.3287983
20444	DUSP13	3.75E-05	6.585831
12763	MMP9	4.66E-04	6.1373716
2442	MMP9	3.19E-04	5.9823413
43553	MMP9	3.31E-04	6.1863882
42313	MMP9	3.70E-04	6.3030097
24773	MMP9	6.51E-04	6.2151866
15088	MMP9	2.87E-04	6.053042
30970	MMP9	2.69E-04	6.3726077
41723	MMP9	3.22E-04	6.192926
32483	MMP9	3.22E-04	6.251407
14433	MMP9	2.89E-04	6.1586533
2704	IL18	9.85E-04	1.2701817
30462	IL18	0.00557828	1.3803945
24753	IL18	5.75E-04	1.4266766
46123	IL18	0.001703816	1.4564937
64645	IL18	5.29E-04	1.4564019
33246	IL18	9.63E-04	1.4487247
39174	IL18	5.39E-04	1.4404147
28321	IL18	2.81E-04	1.5213384
13413	IL18	5.44E-04	1.405847
31293	IL18	9.93E-04	1.4280157
36978	IL18	0.024416627	3.422903
24703	IL18	0.026889893	2.3765299
16563	IL18	0.026846064	3.5357964
5255	IL18	0.035849717	2.7445375
1380	IL18	0.02402184	3.632656
28799	IL18	0.024547297	3.1841471
38333	IL18	0.04091308	3.117844
38326	IL18	0.02643425	3.245426
38264	IL18	0.044175137	2.9492021
3873	IL18	0.014859025	3.6393987
7624	IL25	0.022755398	0.46890893
42952	IL25	0.030769318	0.6949074
6091	IL25	0.027522143	0.5314396
8174	IL25	0.032830888	0.5563553

A

Measurement ID	GENE SYMBOL	p value	Fold change
22932	CDK9	0.0325342	1.0949599
38452	CDK9	0.03350588	1.108086
4310	CDK9	0.018931684	1.0987864
17356	CDK9	0.010387697	1.1426893
2231	CDK9	0.010523813	1.1282488
11830	FASLG	0.019784367	1.163213
28828	FASLG	0.025302019	1.1447994
386	FASLG	0.068724592	1.1530238
34077	FASLG	0.005687501	1.1562128
37903	FASLG	4.87E-04	1.1562916
13263	FASLG	0.03950936	1.1414407
8012	FASLG	0.002913619	1.1465666
5259	FASLG	9.32E-04	1.1643894
23927	HLA-DRA1	0.004068311	1.1641947
38467	HLA-DRA1	0.023312407	1.1281252
34622	HLA-DRA1	0.020885088	1.1352156
23272	HLA-DRA1	0.018518014	1.149500
31836	HLA-DRA1	0.004519863	1.1823171
1328	HLA-DRA1	0.007503689	1.1340468
27922	HLA-DRA1	0.003491503	1.1782315
38850	HLA-DRA1	0.040877634	1.112932
16520	HLA-DRA1	0.04981343	1.1154953
24312	IL6	0.001705847	0.8742741
28214	IL6	0.03427081	0.66911936
31884	IL6	0.038927034	0.71408128
10438	IL6	0.023200762	0.847806

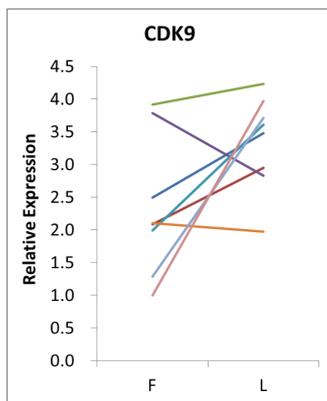
C

Measurement ID	GENE SYMBOL	p value	Fold change
16729	DUSP13	0.003529712	5.8783785
19938	DUSP13	2.05E-04	7.8225384
3809	DUSP13	5.01E-04	7.788755
28917	DUSP13	0.002956049	6.2696
29436	DUSP13	7.87E-05	7.7175384
8155	DUSP13	6.16E-04	7.172101
20444	DUSP13	3.20E-04	7.518231
30837	DUSP13	9.20E-04	6.933569
1689	DUSP13	0.002785948	5.8263545
7866	DUSP13	1.89E-04	7.630859
41733	MMP9	0.010345456	6.661218
19768	MMP9	0.009199731	8.888258
2442	MMP9	0.00982171	8.77329
43555	MMP9	0.010303684	8.605583
42313	MMP9	0.010319914	8.660455
32285	MMP9	0.008763175	8.979692
14435	MMP9	0.009108954	8.869355
24773	MMP9	0.009392815	8.140092
15088	MMP9	0.006634146	9.172993
30970	MMP9	0.007195446	8.78672
11078	IL10	0.039373302	1.7539205
15770	IL10	0.013279185	1.2392374

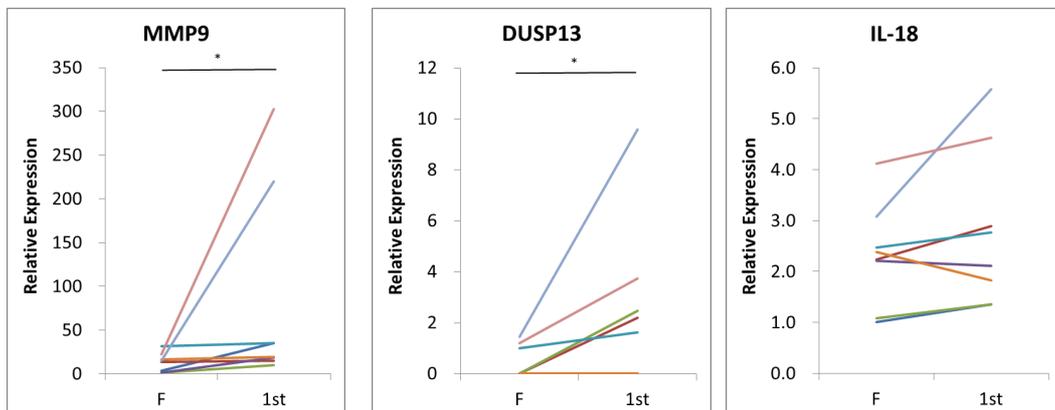
Fig.1 卵胞期と黄体期と妊娠初期における pNK の網羅的遺伝子発現解析において、著明に変動しかつ NK 細胞の着床や妊娠維持機構に参与している可能性がある遺伝子を示した。A: 卵胞期と黄体期の比較 (n=6)、B: 卵胞期と妊娠初期の比較 (n=6)、C: 黄体期と妊娠初期の比較 (n=5)。

(2) 網羅的遺伝子発現解析で著明に有意に変動した遺伝子でかつ NK 細胞の着床や妊娠維持機構にとくに参与している可能性があると考えられる遺伝子について選択し、RT-PCR によりその発現変動を確認したところ、IL-6 以外で同様の実験結果が得られた (Fig. 2)。IL-6 についてはマイクロアレイの結果を再解析したところ、検出されたシグナル値が非常に低かったことがわかり、それゆえに RT-PCR の実験では発現変動が確認できなかった、ということが考えられた。

A



B



C

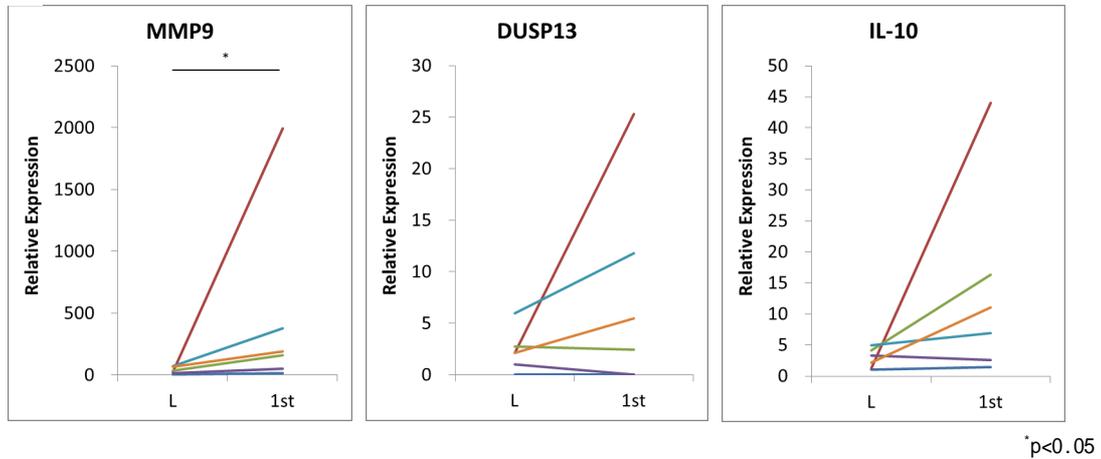
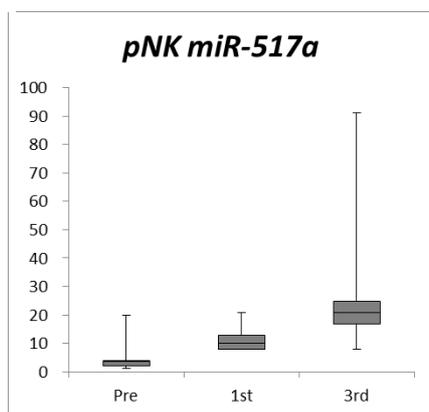


Fig.2 網羅的遺伝子発現解析で著明に変動した遺伝子でかつNK細胞の着床や妊娠維持機構に
とくに関与している可能性があると考えられる遺伝子におけるRT-PCRの結果。すべて同一人物
から採取したサンプル間で比較を行った。A:卵胞期(F)と黄体期(L)におけるCDK9の比較(n=8)。
有意差はなかったが、8例中6例において発現上昇を認めた。B:卵胞期(F)と妊娠初期(1st)
におけるMMP9、DUSP13、IL-18の比較(n=6~8)。DUSP13においては、妊娠前、妊娠初期ともに発
現を認めない症例があった。IL-18については、1~2例で発現低下を認めたが、その他の症例
で発現は上昇していた。C:黄体期(L)と妊娠初期(1st)におけるMMP9、DUSP13、IL-10の比較(n=6)。
IL-10については、1例でわずかな発現低下を認めたが、概ね発現は上昇していた。

(3) 妊娠前(卵胞期または黄体期)、妊娠初期、妊娠後期のpNKの胎盤特異的microRNAである
*miR-517a*と*miR-512-3p*のRT-PCRにおいて、妊娠前と妊娠初期では発現を認めないか軽度の発
現を認め、妊娠後期ではより強く発現を認めた(Fig. 3)。予想外であったのは、妊娠前におい
てもサンプルによっては、胎盤特異的microRNAの発現をわずかに認めた。実験時のコンタミネ
ーションや非特異的増幅の可能性も否定できないが、1つのサンプルにおいてコンタミネー
ションや非特異的増幅とは考えにくい発現を認めたため、妊娠前においても胎盤特異的microRNA
の発現がある可能性が示唆された。

A



B

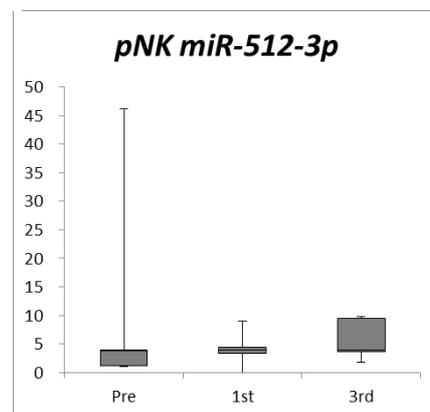


Fig. 3 妊娠前(Pre)、妊娠初期(1st)、妊娠後期(3rd)におけるpNKの胎盤特異的microRNAで
ある*miR-517a*と*miR-512-3p*のRT-PCRの結果。縦軸はU6をインターナルコントロールとした
各microRNAの相対発現量。A:*miR-517a*、B:*miR-512-3p*(妊娠前-妊娠初期-妊娠後期 n=5)。同
一人物から採取したサンプル間で比較した。予想通り*miR-517a*と*miR-512-3p*ともに全体的に
妊娠前から妊娠後期にかけて発現上昇していた。また*miR-517a*と*miR-512-3p*ともに妊娠前
でも発現を認める症例があった。

考察

過去の実験結果において黄体期を頂点に pNK 数がダイナミックに変動していた (Fig. 4)。今回の実験結果では、まず pNK の MMP9 の発現が妊娠前から妊娠初期にかけてはっきり上昇していた。MMP9 については、MMP9 は細胞外マトリックスの分解、組織のリモデリング等に関わることが知られている。考えられる機構としては、妊娠すると pNK の一部は子宮に移動し、母児間接着面である「脱落膜の形成」、つまり pNK による子宮内膜の再構成、また pNK 自身が機能を変え脱落膜 NK 細胞に移行する可能性がある、という仮説が考えられる。また DUSP13 の発現も妊娠前から妊娠初期にかけて上昇していた。タンパク質-チロシンフォスファターゼスーパーファミリーのメンバーである DUSP13 (二重特異性フォスファターゼ 13) は細胞の制御に関わっているとされるため、考えられる機構としては、妊娠した時の pNK の何らかの細胞機能の変化に関わっているのではないか、ということが考えられる。

IL-10 については、抑制性サイトカインである IL-10 の発現が妊娠時に上昇傾向であったことから、pNK が脱落膜 NK 細胞と同様に、母児間の免疫寛容に役割を果たしている可能性がある、ということが考えられる。

IL-1B については接着分子、ケモカイン、血管拡張因子の発現を誘導して白血球の浸潤を促進することが、また IL-18 については INF- γ の産生の増強因子であることが分かっている。このように IL-1B や IL-18 は免疫細胞の活性化に関わっているため、IL-1B や IL-18 の発現が妊娠時に上昇傾向であったことから、pNK 自身については pNK の子宮への集積に関わっているのではないか、ということが考えられる。

CDK9 については、細胞周期の調節に関わる CDK9 の発現が卵胞期から黄体期に上昇傾向であったことから、CDK9 等の発現により黄体期において pNK が活性化していることが考えられる。また卵胞期から黄体期にかけて pNK 数が増加することに CDK9 が関わっている可能性も考えられる。

MicroRNA については、今回胎盤特異的 microRNA である *miR-517a* と *miR-512-3p* の発現を妊娠前から認める症例があり、また妊娠初期から後期にかけての発現がこれまでの実験と同様に上昇していた。これらの結果から *miR-517a* と *miR-512-3p* は胎盤以外の組織でも産生され、着床や妊娠維持機構に寄与している可能性が示唆された。



Fig. 4 pNK 数のダイナミックな変動

引用文献

Ishida Y, Zhao D, Ohkuchi A, Kuwata T, Yoshitake H, Yuge K, Takizawa T, Matsubara S, Suzuki M, Saito S, Takizawa T: Maternal peripheral blood natural killer cells incorporate placenta-associated microRNAs during pregnancy. *Int J Mol Med*. 2015 Jun;35(6):1511-24.

Kambe S, Yoshitake H, Yuge K, Ishida Y, Ali MM, Takizawa T, Kuwata T, Ohkuchi A, Matsubara S, Suzuki M, Takeshita T, Saito S, Takizawa T: Human exosomal placenta-associated miR-517a-3p modulates the expression of PRKG1 mRNA in Jurkat cells. *Biol Reprod*. 2014 Nov;91(5):129.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

石田洋一 他、妊娠前から妊娠中にかけての母体末梢血NK細胞数のダイナミックな変動、2019年4月 第71回日本産科婦人科学会・学術講演会

石田洋一 他、妊娠前から妊娠中にかけての母体末梢血NK細胞数のダイナミックな変動、2019年8月 第37回日本受精着床学会総会・学術講演会

石田洋一 他、妊娠前から妊娠初期にかけての母体末梢血NK細胞の網羅的遺伝子発現解析、2022年8月 第74回日本産科婦人科学会・学術講演会

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田洋一
2. 発表標題 妊娠前から妊娠中にかけての母体末梢血NK細胞数のダイナミックな変動
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田洋一
2. 発表標題 妊娠前から妊娠中にかけての母体末梢血NK細胞数のダイナミックな変動
3. 学会等名 第37回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田洋一
2. 発表標題 妊娠前から妊娠初期にかけての母体末梢血NK細胞の網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会・学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------