

機関番号：11101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009 年度～2011 年度
 課題番号：21791536
 研究課題名（和文） 妊娠の成立と維持に関する子宮内膜および全身における NK 細胞の機能分担と機能発現
 研究課題名（英文） Functions of endometrial and circulating NK cells for achievement and maintenance of pregnancy
 研究代表者
 福井 淳史（FUKUI ATSUSHI）
 弘前大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：00321969

研究成果の概要（和文）：非妊時および妊娠時末梢血および非妊時子宮内膜の NK 細胞の妊娠の成立・維持に関する検討を行い、NK 細胞表面に発現する NCRs、特に NKp46 の発現が生殖異常の方では変化していることが明らかとなった。また NK 細胞が産生するサイトカインにも異常を来す事が明らかとなった。さらに NK 細胞表面に発現する NKp46 と NK 細胞のサイトカイン産生には直接関連があることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：I evaluated the function of NK cells for achievement and maintenance of pregnancy using pregnant and non-pregnant peripheral blood NK cells and non-pregnant endometrial NK cells. The abnormal expression of natural cytotoxicity receptors (NCRs), especially NKp46 on NK cell is associated with reproductive failures. The abnormal cytokines production by NK cells exists in reproductive failures. There is a direct correlation between the expression of NKp46 on NK cell and cytokines production by NK cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学、NK 細胞、Natural Cytotoxicity Receptor、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

NK 細胞は末梢血、子宮内膜いずれにおいても妊娠の成立、維持において重要な役割を果たしているのは間違いないと思われるが、その詳細については明らかではない。NK 細胞の活性化の指標となる Natural Cytotoxicity Receptors (NCRs) の発現と NK 細胞の産生するサイトカインについても妊娠の成立・維持への関わりは示唆されているものの、その詳細は明らかにはされていない。

2. 研究の目的

子宮内膜および全身を循環する末梢血に

おける免疫担当細胞の機能分担と免疫担当細胞の機能発現、特に NCRs と NK 細胞産生サイトカインに焦点を絞り、これらの妊娠成立および妊娠維持に関する役割を明らかとし、また NCRs と NK 細胞産生サイトカインとの関わりについても明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 子宮 NK 細胞における NCRs 発現：子宮内膜組織を採取し、機械的分散により子宮内膜浮遊液を作成したうえで子宮 NK 細胞に発現する NCRs をフローサイトメトリーで測定する。

(2) 妊娠経過におけるNK細胞のNCRs発現とサイトカイン産生：妊娠中におけるNK細胞の活性化状態およびサイトカイン産生をみる目的で、様々な妊娠週数（12週、20週、28週、36週）において、末梢血NK細胞におけるNCRs発現および産生サイトカインをフローサイトメトリーで測定する。

(3) 子宮NK細胞におけるサイトカイン産生：非妊娠時子宮内膜における子宮NK細胞産生サイトカインをフローサイトメトリーで測定する。

(4) NK細胞におけるNCRs発現とNK細胞産生サイトカインとの関連性

①PBMCよりNCR陽性NK細胞と陰性NK細胞とを得、それぞれによるサイトカイン産生を測定し、NK細胞の機能分担を解明する。

②子宮内膜よりNCR陽性子宮NK細胞と陰性子宮NK細胞とを得、それぞれによるサイトカイン産生を測定し、NK細胞の機能分担を解明する。

4. 研究成果

(1) 子宮NK細胞におけるNCRs発現：非妊時子宮内膜におけるNKp46発現は、サイトカイン産生が主であると考えられるCD56^{bright}細胞におけるNKp46発現がRecurrent pregnancy loss (RPL)群 (n=28) でコントロール群 (n=60) に比して有意に低値 (p<0.05) であった。また細胞傷害が主であると考えられるCD56^{dim}細胞におけるNKp46発現も、RPL群でコントロールに比して有意に低値 (p<0.05) であった。NKp44発現、NKp30発現は両群間に差を認めなかった。

(2) 妊娠経過におけるNK細胞のNCRs発現とサイトカイン産生：RPL患者における検討では、非妊時末梢血CD56⁺/NKp46⁺細胞は対照群に比して有意に低値であった。さらにRPL患者では、CD56^{bright}/IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺細胞が対照群に比して有意に高値であった。これは反復流産におけるIFN- γ 、TNF- α といったタイプ1サイトカインの増加を示しているものと思われる。興味深いことにRPL患者ではCD56⁺/NKp46⁺細胞の低下は反復流産患者が妊娠成立し、その妊娠が維持されているとしても妊娠20週までは持続していた。一方、妊娠高血圧症候群患者では妊娠20週時点ですでにNKp46⁺発現が低下しており、その低下は分娩まで持続していた。末梢血NKp46陽性NK細胞と子宮NKp46陽性NK細胞との間には正の相関見られることから、これらのNKp46⁺発現異常は脱落膜、すなわち胎盤においてもおこっているものと推測される。

(3) 子宮NK細胞におけるサイトカイン産生：子宮NK細胞によるサイトカイン産生は、CD56^{bright}/TNF- α ⁺細胞 (p<0.02)、CD56^{bright}/IFN- γ ⁺細胞 (p<0.01)、CD56^{bright}/IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺細胞 (p<0.05)、CD56^{bright}/IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺細胞 (p<0.05) とともにRPL群 (n=28) でコントロール (n=60) に比して産生細胞数が低下していた (図5d)。妊娠の成立・維持の場においてTNF- α は血管新生をIFN- γ は血管のリモデリングを行っている。よってRPLではTNF- α による血管新生やIFN- γ による血管のリモデリングの異常を来すことにより流産となっている可能性を示していると思われる。

(4) NK細胞におけるNCRs発現とNK細胞産生サイトカインとの関連性：末梢血ではIFN- γ ⁺NK細胞およびIFN- γ ⁺/TNF- α ⁺NK細胞の割合はCD56^{bright}/NKp46^{bright}細胞において他の分画に比して有意に多く (p<0.01)、TNF- α ⁺細胞の割合はCD56⁺/NKp46^{dim}細胞でCD56⁺/NKp46^{bright}に比して有意に多かった (p<0.05)。子宮内膜では末梢血とほぼ同様の結果であった。IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺NK細胞の割合はCD56^{bright}/NKp46^{bright}細胞において他の分画に比して有意に多かった (p<0.01)。これより末梢血と子宮内膜双方においてCD56^{bright}/NKp46^{bright}細胞が主たるIFN- γ 産生細胞であることが明らかとなった。特に着床に関係すると考えられるIFN- γ ⁺/TNF- α ⁺NK細胞の主たる産生源がCD56^{bright}/NKp46^{bright}細胞であることが明らかとなり、NKp46発現とサイトカイン産生との直接的な関連が示された。

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12件)

- ① Fukui A, Yokota M, Funamizu A, Nakamura R, Fukuhara R, Yamada K, Kimura H, Fukuyama A, Kamoi M, Tanaka K, Mizunuma H: Changes of NK cells in preeclampsia. *American journal of reproductive immunology* 2012;**67**:278-286.
- ② 福井淳史: 流産の原因と対策 免疫機構から見た流産の病態解明とその対策. *日本産科婦人科学会雑誌* 2011;**63**:337-338.
- ③ 福井淳史: 妊娠の成立と維持におけるNK細胞の機能分担と機能発現. *北海道産科婦人科学会会誌* 2011;**55**:79-84.
- ④ Lee SK, Kim JY, Jang BW, Hur SE, Na BJ, Lee M, Fukui A, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J: Foxp3(high) and Foxp3(low) Treg cells differentially correlate

- with T helper 1 and natural killer cells in peripheral blood. *Hum Immunol* 2011;**72**:621-626.
- ⑤ Fukui A, Funamizu A, Yokota M, Yamada K, Nakamura R, Fukuhara R, Kimura H, Mizunuma H: Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2011;**90**:105-110.
- ⑥ 福井淳史, 中村理果, 山田健市, 横田恵, 福原理恵, 木村秀崇, 藤井俊策, 水沼英樹: 黄体中期子宮内膜および流産脱落膜 Natural Killer 細胞における Natural Cytotoxicity Receptors 発現. *日本受精着床学会雑誌* 2010;**27**:369-374.
- ⑦ 福井淳史, 福原理恵, 木村秀崇, 山本善光, 田中幹二, 尾崎浩士, 水沼英樹: 妊娠高血圧症候群発症への NK 細胞 Natural Cytotoxicity Receptor と NK 細胞産生サイトカインの関与. *日本妊娠高血圧学会雑誌* 2010;**18**:173-174.
- ⑧ Fukui A: NK cell and its role in reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2010;**64**:1-2.
- ⑨ Lee S, Kim J, Jang B, Hur S, Jung U, Kil K, Na B, Lee M, Choi Y, Fukui A, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim JY: Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women. *J Immunol* 2010;**185**:756-762.
- ⑩ Fukui A, Ntrivalas E, Fukuhara R, Fujii S, Mizunuma H, Gilman-Sachs A, Beaman K, Kwak-Kim J: Correlation between natural cytotoxicity receptors and intracellular cytokine expression of peripheral blood NK cells in women with recurrent pregnancy losses and implantation failures. *Am J Reprod Immunol* 2009;**62**:371-380.
- ⑪ 福井淳史, 福原理恵, 木村秀崇, 藤井俊策, 水沼英樹: 【生殖と免疫をめぐって】受精卵着床不全における NK 細胞の役割. *臨床免疫・アレルギー科* 2009;**52**:158-165.
- ⑫ 福井淳史, 中村理果, 山田健市, 福原理恵, 木村秀崇, 藤井俊策, 水沼英樹: 着床不全症例における NK 細胞上 Natural Cytotoxicity Receptors 発現と NK 細胞産生サイトカイン. *日本受精着床学会雑誌* 2009;**26**:341-347.
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Atsushi Fukui, Changes in NK cells functions in normal pregnancy and preeclampsia, First Clinical Reproductive Immunology Symposium, 2011.11.19, Providence, RI, USA
- ② 福井淳史, 妊娠の成立・維持における NK 細胞の機能、日本胎盤学会、2011 年 9 月 30 日、東京都
- ③ 福井淳史, 免疫機構から見た流産の病態解明とその対策、日本産科婦人科学会、2011.8.28、大阪市
- ④ Atsushi Fukui: Changes of NK cells in preeclampsia. American society of reproductive immunology, 2011.5.20, Salt Lake City, UT, USA
- ⑤ Atsushi Fukui, NK cell and its role in reproduction, International Conference on Reproductive Immunology, 2010.11.30, Shnagjai, China
- ⑥ Atsushi Fukui, Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy losses, implantation failures or preeclampsia, European Society for Reproductive Immunology, 2011.11.13, Munich, Germany
- ⑦ 福井淳史, 妊娠高血圧症候群発症への NK 細胞 Natural Cytotoxicity Receptor と NK 細胞産生サイトカインの関与、日本妊娠高血圧学会、2010.10、東京都
- ⑧ Atsushi Fukui, The expression of natural cytotoxicity receptors on natural killer cells from midsecretory endometrium and aborted decidua, 世界不妊学会議、2010.9、Munich, Germany
- ⑨ Atsushi Fukui, The expression of natural cytotoxicity receptors and the NK cell cytokines production in pregnant women with a history of recurrent pregnancy loss and pregnancy-induced hypertension, 世界不妊学会議、2010.9、Munich, Germany
- ⑩ Atsushi Fukui, The expression of natural cytotoxicity receptors and the NK cell cytokines production in pregnant women with a history of recurrent pregnancy loss or pregnancy induced hypertension, International Society for immunology of reproduction, 2010.8, Osaka, Japan
- ⑪ 福井淳史, 妊娠高血圧症候群発症に NK 細胞 Natural Cytotoxicity Receptors と NK 細胞産生 サイトカインが関与する、日本産科婦人科学会、2010.4、東京都
- ⑫ 福井淳史, 妊娠高血圧症候群発症における NK 細胞 Natural Cytotoxicity Receptors と NK 細胞産生サイトカインの関与、日本生殖免疫学会、2009.12、東京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 淳史 (FUKUI ATSUSHI)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00321969

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：