

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791541

研究課題名（和文）HLA-E、-Gの脱落膜単核球細胞集団形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism how HLA-E and HLA-G form the population of decidual mononuclear cells.

研究代表者

王寺 典子 (OUJI NORIKO)

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（和文）：HLA-E、HLA-G が脱落膜単核球細胞集団形成に寄与するためには、特に HLA-G が胎盤トロホプラストに強く発現していることが重要であるが、近年、HLA-G は胎盤トロホプラスト以外にも存在するという報告が多い。これを検証するため、本研究では、卵胞液中の HLA-G について解析を行い、ELISA と免疫沈降で矛盾した結果を得た。この矛盾は、卵胞液中の何らかの物質が ELISA で偽陽性を示したためと考えられた。今後は、ELISA における偽陽性の原因を解析し、さらに高感度な HLA-G 検出法を開発する予定である。

研究成果の概要（英文）：To contribute to forming the population of decidual mononuclear cells, the specific and strong expression of HLA-E and HLA-G on placental trophoblast should be important. Recently, many reports showed the presence of HLA-G not only on placental trophoblast but also on other tissue. To verify those results, the expression of HLA-G in follicle fluids was tested by ELISA and immunoprecipitation. We have got the contradicted result between these 2 methods. It was considered that the contradiction was caused from a false-positive reaction induced by a substance in follicle fluids on ELISA. The cause of this contradiction should be analyzed, and the detection method of HLA-G with higher sensitivity is going to be established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、HLA-G、HLA-E、NK 細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) HLA-E、-Gの脱落膜単核球細胞集団形成機構

胎児由来の胎盤トロホプラストは、妊娠初期からHLA-GおよびHLA-Eを強く発現し、脱落

膜単核球の細胞活性を調節することにより、妊娠維持に機能している。脱落膜単核球は、CD56^{bright}NK細胞(70%)、CD14+細胞(マクロファージ/DC)(約20～30%)が多く、末梢血単核球とは異なるが、CD56^{bright}NK細胞はサイト

カイン産生、CD14+マクロファージはIDO産生による免疫抑制を行うことから、このようなポピュレーション（細胞集団）が母児免疫寛容には重要であると考えられている。しかし、脱着膜において、これらのポピュレーションがどのように形成されるのかについては、いまだ明らかになっていない。

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。HLA-EはNKレセプターCD94/NKG2Aのリガンドであるが、HLA-Gのシグナルペプチドを結合したHLA-E (HLA-E/G)は、他のHLA class Iのシグナルペプチドを結合した場合よりも非常に強くCD94/NKG2Aと結合することが明らかになっている。このCD94/NKG2Aは、脱着膜のCD56^{bright}NK細胞のほぼすべてに発現している。

HLA-Gは、正常組織においては胎盤トロホプラストに非常に強く発現しており、また、樹状細胞、マクロファージに発現するLILRB1/LILRB2のリガンドでもある。

以上のことから、我々は、胎盤脱着膜単核球のポピュレーション形成にHLA-E (HLA-E/G) およびHLA-Gが関与しているのではないかと考えた。

(2) HLA-E/G、HLA-Gの胎盤特異的発現

胎盤脱着膜単核球のポピュレーション形成には、胎盤トロホプラストに強くHLA-G、HLA-E/Gが発現していることが重要である。特にHLA-EはHLA class Iが発現する組織全てに発現しているが、CD94/NKG2Aを介してCD56^{bright}NK細胞を脱着膜に集積させるためには、胎盤トロホプラストにのみ強くHLA-Gが発現し、同じくこの胎盤トロホプラスト上にHLA-Gのシグナルペプチドを結合したHLA-E/Gが発現されていなければならない。しかし、昨今、HLA-Gが、胎盤トロホプラスト以外の組織、非妊婦血清、末梢血単核球、卵胞液等に発現しているとの報告が多い。末梢血単核球については、移植片生着患者の末梢血単核球に発現しているという報告が多く、我々はこの点についても検証を行っているが、そのような発現は見られていない。また、非妊婦血清についても検討しており、MEM-G/9を用いたELISAでは、多くの報告同様、20ng/ml程度が検出されるが、免疫沈降では検出できていない。いずれにせよ、非妊婦血清中あるいは末梢血単核球にHLA-Gが発現しているならば、HLA-E/Gも、末梢血単核球等、胎盤トロホプラスト以外にも発現すること

になり、HLA-E/Gを介した脱着膜へのCD56^{bright}NK細胞を集積、および脱着膜単核球集団形成は成立しない。

また、卵胞液においては、卵胞液中にHLA-Gが検出された受精卵の方が、着床率が高いという報告があり、卵胞液中のHLA-G検出が体外受精卵の良好胚選定に有用であると考えられつつある。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、受精卵自身が脱着膜NK細胞の集積に関与し胎盤脱着膜形成に関与している可能性もある。

HLA-GおよびHLA-E/Gが胎盤トロホプラスト特異的であるのか、受精卵着床期のどの時期から発現しているのかを検証するため、卵胞液中のHLA-Gについて詳細に解析する必要があると考えた。

2. 研究の目的

(1) HLA-G発現部位の検証

HLA-E/Gが胎盤脱着膜単核球のポピュレーション形成に寄与するためには、HLA-E/Gが胎盤トロホプラストにのみ強く発現していることが重要である。HLA-E/Gが胎盤トロホプラストにのみ強く発現するためには、HLA-Gが胎盤トロホプラスト限局的に発現している必要がある。現在、末梢血単核球、卵胞液等、トロホプラスト以外にHLA-Gが発現するという報告が散見されるため、トロホプラスト以外にHLA-Gが発現しているのかを検証する。

(2) HLA-E、-Gの胎盤脱着膜単核球のポピュレーション形成機構の解明

3. 研究の方法

(1) 卵胞液中のHLA-G抗原の検出 (ELISA)

抗HLA-G抗体 (MEM-G/9) と抗HLA class I抗体 (W6/32) を用い、卵胞液中のHLA-G抗原量を測定した。

(2) 卵胞液中のHLA-G抗原の検出 (免疫沈降)

抗HLA-G抗体 (87G)、抗HLA class I抗体 (W6/32) で免疫沈降し、電気泳動、ウェスタンブロットティング後、これを抗HLA-G抗体 (4H84) で検出した。

(3) より高感度なHLA-G抗原測定法の検討 (ELISA)

抗HLA-G抗体 (MEM-G/9、G233) と抗HLA class I抗体 (W6/32) を用い、より高感度にHLA-G抗原を検出する組合せを検討した。

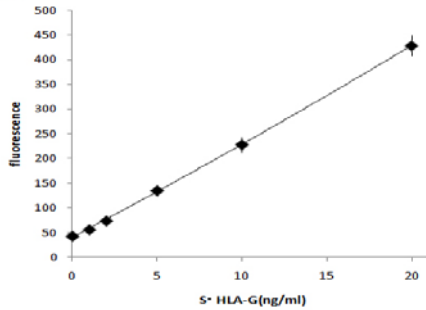
(4) より高感度なHLA-G抗原検出法の検討 (免疫沈降)

抗HLA-G抗体 (G233) を用いて免疫沈降し、電気泳動、ウェスタンブロットティング後、これらを抗HLA-G抗体 (4H84) で検出した。

4. 研究成果

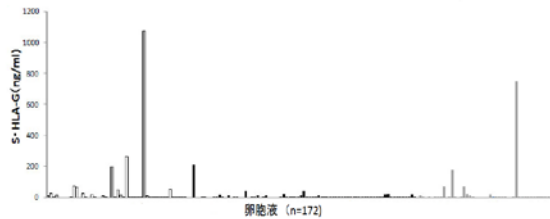
(1) 卵胞液中の HLA-G 抗原の検出 (ELISA)

我々はすでに市販されている HLA-G 検出 ELISA と同じ抗体の組合せで、より高感度に HLA-G を検出し得る ELISA 測定系を確立している (図 1)。そこでこれを用いて、卵胞液中の HLA-G 測定を行った。



(図 1) HLA-G 検量線 (MEM-G/9)

その結果、卵胞液 172 例中、55 例から HLA-G が検出された (図 2)。



(図 2) 卵胞液中の HLA-G 抗原濃度

(2) 卵胞液中の HLA-G 抗原の検出 (免疫沈降)

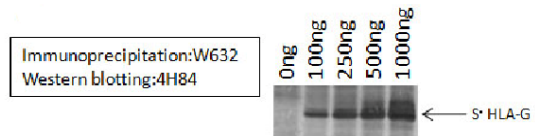
55 例の HLA-G 陽性卵胞液のうち、200ng/ml 以上 HLA-G が検出された卵胞液について、免疫沈降を行い、卵胞液中の HLA-G の検証を行った。

表 1 に示す HLA-G 陽性および陰性卵胞液について、抗 HLA-G 抗体 (87G)、抗 HLA class I 抗体 (W6/32) のそれぞれで免疫沈降し、その後イムノブロッティングを行い確認した。

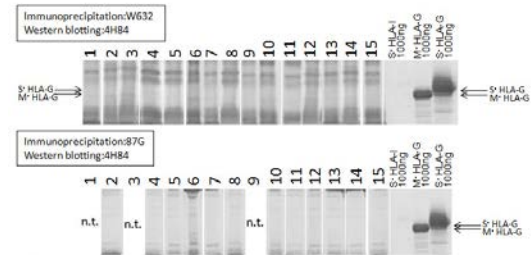
その結果、W6/32 で免疫沈降した場合 100ng/ml の HLA-G を検出し得る免疫沈降検出系 (図 3) において、ELISA で HLA-G が 1000ng/ml 検出された卵胞液からも免疫沈降では HLA-G を検出できなかった (図 4)。

表 1

卵胞液	S・HLA-G(ng/ml)
1	u.d.
2	u.d.
3	1072
4	211
5	u.d.
6	u.d.
7	9.0
8	24.7
9	19.8
10	20.0
11	3.6
12	69.2
13	69.7
14	2.7
15	745



(図 3) W6/32 を使用した場合の HLA-G 抗原検出感度 (免疫沈降)



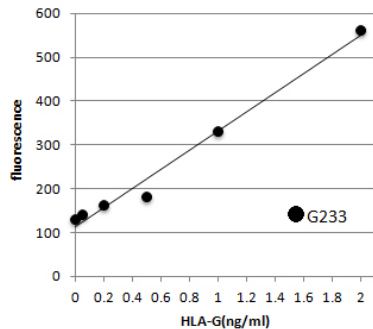
(図 4) 卵胞液中の HLA-G 抗原の検出 (免疫沈降)

上段: W6/32 で免疫沈降、4H84 で検出
下段: 87G で免疫沈降、4H84 で検出
いずれも、陽性コントロール (上段・下段: 右 2 列) (HLA-G 1000ng/ml) における HLA-G が検出されているにもかかわらず、卵胞液 3 中の HLA-G は全く検出されていない。

ELISA の結果から、卵胞液 3, 4, 15 の HLA-G 抗原濃度は 1072ng/ml、211ng/ml、745ng/ml と免疫沈降における検出限界以上で検出されているにもかかわらず、免疫沈降で検出することができなかったことから、ELISA における HLA-G 陽性が偽陽性である可能性が示唆された。また、これまでの MEM-G/9 と W6/32 を用いた HLA-G 検出 ELISA では、正確に体液中の HLA-G を検出できない可能性があると考えられた。この原因の一つとして、体液中に抗 HLA-G 抗体と反応しやすい物質、あるいは HLA-G 抗原と抗 HLA-G 抗体との反応を阻害する物質の存在が考えられた。そこで、検出感度を高くし、できるだけサンプルを希釈することにより、これらの反応阻害物質の影響を抑えることができないかと考え、より高感度な ELISA による HLA-G 検出系の確立を試みた。

(3) より高感度な HLA-G 抗原検出法の検討 (ELISA)

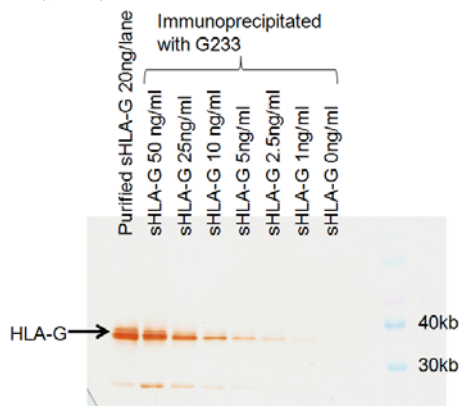
抗 HLA-G 抗体 (MEM-G/9、G233) と抗 HLA class I 抗体 (W6/32) を用い、より高感度に HLA-G 抗原を検出する組合せを検討した。その結果、G233 を用いることにより、これまでの 10 倍検出感度が高くなり、検出限界 0.2ng/ml の ELISA 系を確立することができた (図 5)。



(図 5) HLA-G 検量線 (G233)

(4) 高感度な HLA-G 抗原検出法の検討 (免疫沈降)

次に、免疫沈降においてもより HLA-G 抗原検出法を検討した。抗 HLA-G 抗体 (G233) を用いて免疫沈降し、電気泳動、ウエスタンブロットリング後、これらを抗 HLA-G 抗体 (4H84) で検出した。その結果、1ng/ml の HLA-G 溶液であれば本方法を用いて検出可能となった (図 6)



(図 6) HLA-G 抗原検出法の検討 (免疫沈降)

今回の我々の結果から、卵胞液中の HLA-G 抗原、ELISA の偽陽性を検出しているにすぎない可能性が示された。

胎盤脱落膜単核球のポピュレーション形成には、胎盤トロホプラストに強く HLA-G、HLA-E/G が発現していることが重要である。近年、HLA-G が、非妊婦血清、末梢血単核球、卵胞液等、あらゆる組織・体液に発現しているとの報告が多い。我々は、末梢血単核球、非妊婦血清についても解析を進めているが、ELISA、フローサイトメトリー等の測定方法

の感度不足で、いまだ、これらにおける HLA-G の発現を明確に示せていない。特に非妊婦血清中の HLA-G 抗原検出については、MEM-G/9 を用いた ELISA では、多くの報告同様、20ng/ml 程度が検出されるが、免疫沈降での感度不足のため検出できていなかった。

今後は、今回確立した、より感度の高い ELISA、免疫沈降法を用いて、卵胞液をはじめ、非妊婦血清等、組織・体液中の HLA-G 抗原の発現の有無を明らかにし、胎盤トロホプラスト以外にも HLA-G が強く発現しているのかを明らかにする。また、HLA-G 測定系において擬陽性を起こす物質の同定をすすめ、より正確な 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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 吉岡聡、成人 T 細胞白血病ウイルス感染者の T 細胞表面における HLA-F の発現についての検討、第 20 回日本組織適合性学会大会、2011 年 8 月 29 日、ツインメッセ静岡北館 (静岡県)

(2) 王寺典子、HLA-E with HLA-G-derived peptide on trophoblast binds CD56^{bright} NK cells strongly and may contribute the accumulation of NK cells in decidua. 第 14 回国際免疫学会議、2010 年 8 月 27 日、神戸国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王寺 典子 (OUJI 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