

令和元年6月18日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20203

研究課題名(和文) 妊娠初期末梢血NK細胞の網羅的遺伝子発現解析による妊娠維持機構の検討

研究課題名(英文) A clinical and experimental study on the pathophysiology of pregnancy by comprehensive gene analysis in peripheral blood NK cells from pre-pregnancy to 1st-trimester

研究代表者

石田 洋一 (Ishida, Yoichi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70772143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：母体末梢血NK細胞(pNK)が妊娠維持機構に関連があるかどうか検証するために、妊娠前(卵胞期・黄体期)、妊娠中(初期、中期、後期)の末梢血からpNKを分離して、そのRNAを採取した。この時、卵胞期から黄体期にかけてpNK細胞数の有意な増加を認め、黄体期から妊娠初期にかけて有意に減少し、さらに妊娠初期から後期に進むにつれて有意な減少を示し、また妊娠前と比較して妊娠中で有意に減少した。この結果から、卵胞期から黄体期にかけて、また黄体期から妊娠初期にかけてpNKの遺伝子発現が変化している可能性が示唆された。今後、網羅的遺伝子発現解析を施行する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討で、母体末梢血NK細胞数(pNK)が妊娠前から妊娠中にかけて有意に変動していた。この結果から、pNKが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、いまだ病態が解明されていない不育症や早産、また妊娠高血圧症候群、常位胎盤早期剥離など、妊娠中に発症す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。今後、妊娠前の卵胞期・黄体期と妊娠初期の母体末梢血NK細胞の網羅的遺伝子発現解析を施行して、まだ未解明な部分の妊娠維持機構を明らかにする予定である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate whether peripheral natural killer cells (pNKs) were associated with the pathophysiology of feto-maternal tolerance, we obtained peripheral bloods for pre-pregnancy (follicular phase and luteal phase) and during pregnancy (1st, 2nd, 3rd-trimester), and then separated pNKs, subsequently extracted RNA. The number of pNKs increased significantly from follicular phase to luteal phase, while the number decreased significantly from luteal phase to 1st-trimester, and decreased even further from 1st-trimester to 3rd-trimester. Moreover, they decreased during pregnancy compared to pre-pregnancy. We hypothesized that gene expressions of pNKs may be changed from follicular phase to luteal phase, and from luteal phase to 1st-trimester. We plan to perform comprehensive gene analysis of pNKs using the extracted RNA from pNKs.

研究分野：産婦人科

キーワード：末梢血NK細胞 妊娠 網羅的遺伝子発現解析 microRNA 妊娠維持機構

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

### 1. 研究開始当初の背景

代表者らは妊娠初期と後期における母体末梢血 NK 細胞 (pNK) を網羅的に発現比較したところ、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、なかでも胎児由来の miRNA が母体血中に放出され、NK 細胞に取り込まれることを証明した (Ishida et al. 2015, Kambe et al. 2014)。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、母体血-胎盤絨毛の母児間インターフェイ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と考えられる。妊娠前と妊娠初期の血液から NK 細胞を分離して網羅的遺伝子発現解析を施行し、妊娠初期免疫寛容の機構解明の基盤データを構築する。

### 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。我々は、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 の遺伝子発現変化や胎盤特異的 microRNA の検出を認め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 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行うために pNK を採取し、また採取時に単核球(PBMC)と pNK の細胞数も調査した。

(2) 妊娠初期と後期における母体末梢血 NK 細胞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約 1,000 の遺伝子のうち、NK 細胞の細胞障害性作用に関与する KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor) や LILR (Leukocyte Immunoglobulin Like Receptor) が含まれていた。これらの遺伝子について発現確認(validation)を施行した。

### 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)、妊娠中 (初期、中期、後期) に末梢血 14ml を採取した。卵胞期 26 例、黄体期 18 例、妊娠初期 27 例、中期 8 例、後期 20 例から、まず比重分離液を用いて PBMC を分離し、その PBMC から磁気ビーズを用いて pNK を分離した。この分離時に血球計算盤を用いて PBMC と pNK 細胞数をカウントした。

(2) 同一人物 (N=6) からの妊娠初期と中期と後期の末梢血 NK 細胞の検体を用いて、有意に発現変動していた KIR (KIR2DS4, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR2DL5A) と LILR (LILRA2, LILRA4, LILRA5, LILRB2) の発現を RT-PCR で評価した。Ct 法を用いて、その相対発現量を比較検討した。統計解析については、SPSS Statistics 24.0 (IBM) を用いて Paired t-test による検定を施行した。有意差を  $p < 0.05$  とした。

### 4. 研究成果

(1) 得られた全てのサンプルの平均値について、末梢血中の pNK 細胞数 ( $\times 10^5$  個) は卵胞期  $8.14 \pm 6.75$ 、黄体期  $11.00 \pm 4.75$ 、妊娠初期  $6.10 \pm 3.60$ 、妊娠中期  $5.62 \pm 2.48$ 、妊娠後期  $3.47 \pm 2.42$  であり、pNK/PBMC (%) については、卵胞期  $7.18 \pm 5.36$ 、黄体期  $8.66 \pm 3.94$ 、妊娠初期  $5.07 \pm 2.95$ 、妊娠中期  $3.98 \pm 1.82$ 、妊娠後期  $2.25 \pm 1.38$  であった。

また同一人物からの検体でも比較したところ、pNK 細胞数は卵胞期から黄体期にかけて有意に増加し (図 1)、黄体期から妊娠初期にかけて有意に減少した (図 2)。さらに妊娠初期から後期にかけて有意に減少した (図 3)。また妊娠前と妊娠中両方採取した症例のみで比較したところ、妊娠前と比較して妊娠中で有意に減少した (図 4)。また pNK 細胞数は個人間で大きな違いを認めた。そのため、図 1~3 において、同じ黄体期、妊娠初期の群でも、中央値が違った結果になった。以上の結果は、pNK/PBMC (%) においても同様の結果が得られた。また PBMC 数についてはどの群間においても有意な変動を認めなかった。

今回の結果から、先行研究の妊娠初期から後期にかけてだけでなく、卵胞期から黄体期にかけて、また黄体期から妊娠初期にかけて pNK の遺伝子発現が変化している可能性、また卵胞期から黄体期にかけて pNK の増加を認めたために pNK が着床に関わっている可能性が示唆された。今後、卵胞期、黄体期、妊娠初期の末梢血を用いて、pNK の網羅的遺伝子発現解析を行う予定である。

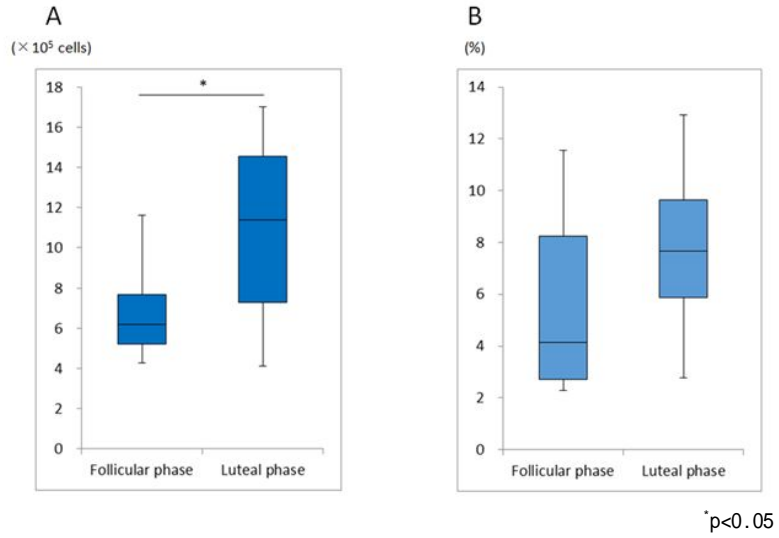


図1 卵胞期と黄体期における A:pNK細胞数、B:pNK/PBMC(%) (n=8)

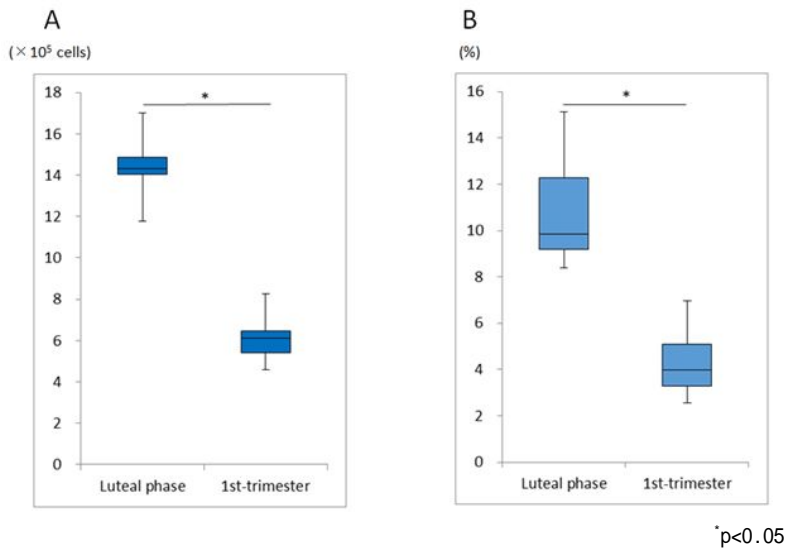


図2 黄体期と妊娠初期における A:pNK細胞数、B:pNK/PBMC(%) (n=6)

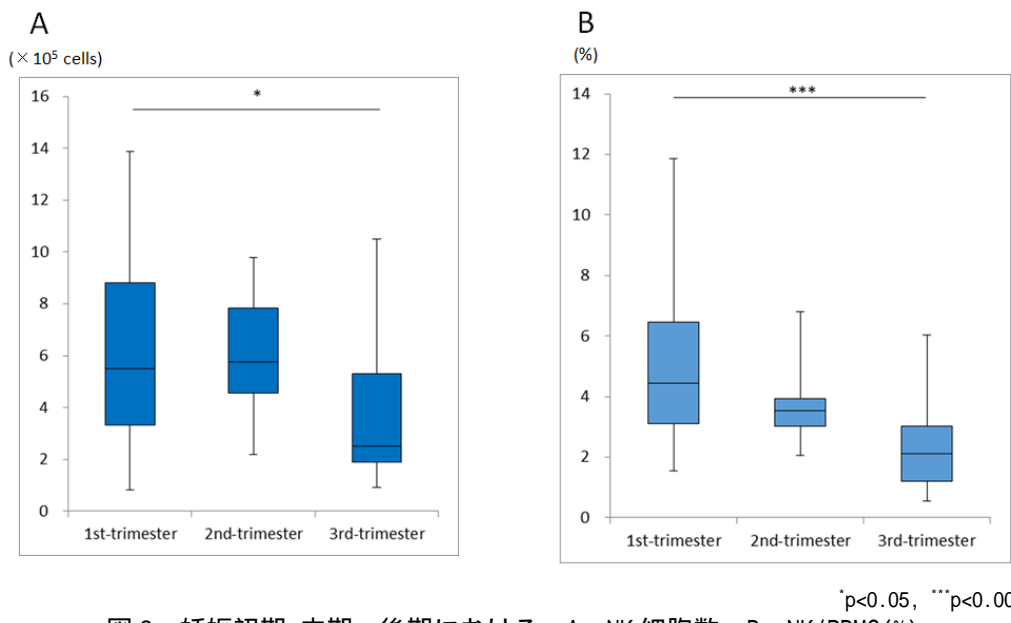


図3 妊娠初期,中期,後期における A:pNK細胞数、B:pNK/PBMC(%)  
(妊娠初期-妊娠中期 n=6、妊娠初期-妊娠後期 n=15)

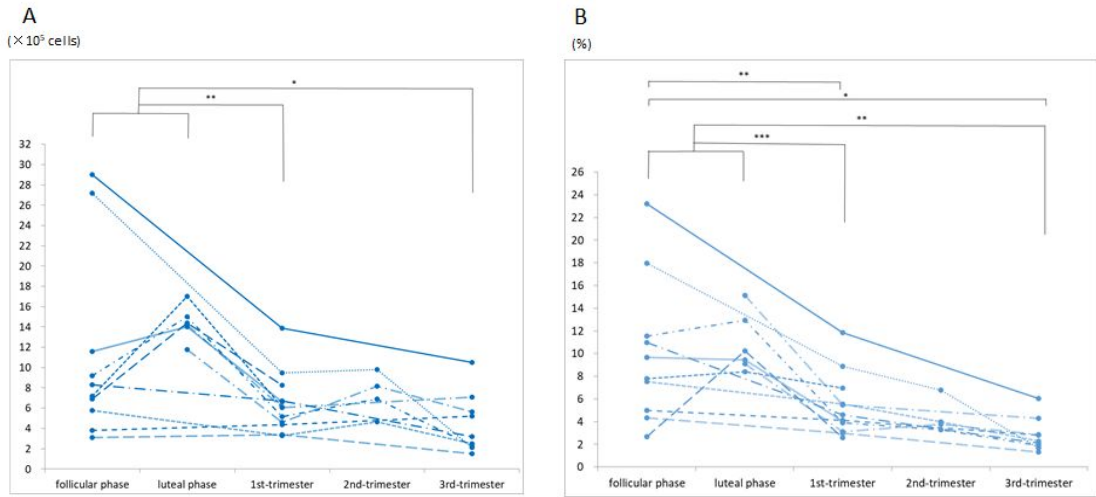


図4 妊娠前と妊娠中における A: pNK細胞数、B: pNK/PBMC(%)  
(卵胞期 n=10、黄体期 n=6、妊娠初期 n=12、妊娠中期 n=4、妊娠後期 n=8)

(2) KIR2DS4, KIR2DL4, KIR3DL1 の発現は、妊娠初期から後期にかけて有意に低下した。KIR2DL5A については、発現低下傾向を認めたが有意差を認めず、6 例中 3 例で発現を認めなかった。Allele frequency net (<http://www.allelefrequencys.net/>) によると、KIR2DL5A の発現は日本人でおよそ 50% の頻度で認め、この頻度と今回の実験結果は同様であった。LILRA2, LILRA4, LILRA5, LILRB2 の発現は妊娠初期から後期にかけて有意に上昇した。KIR、LILR とも、初期と後期における網羅的遺伝子発現解析の結果と同様であった(図5)。

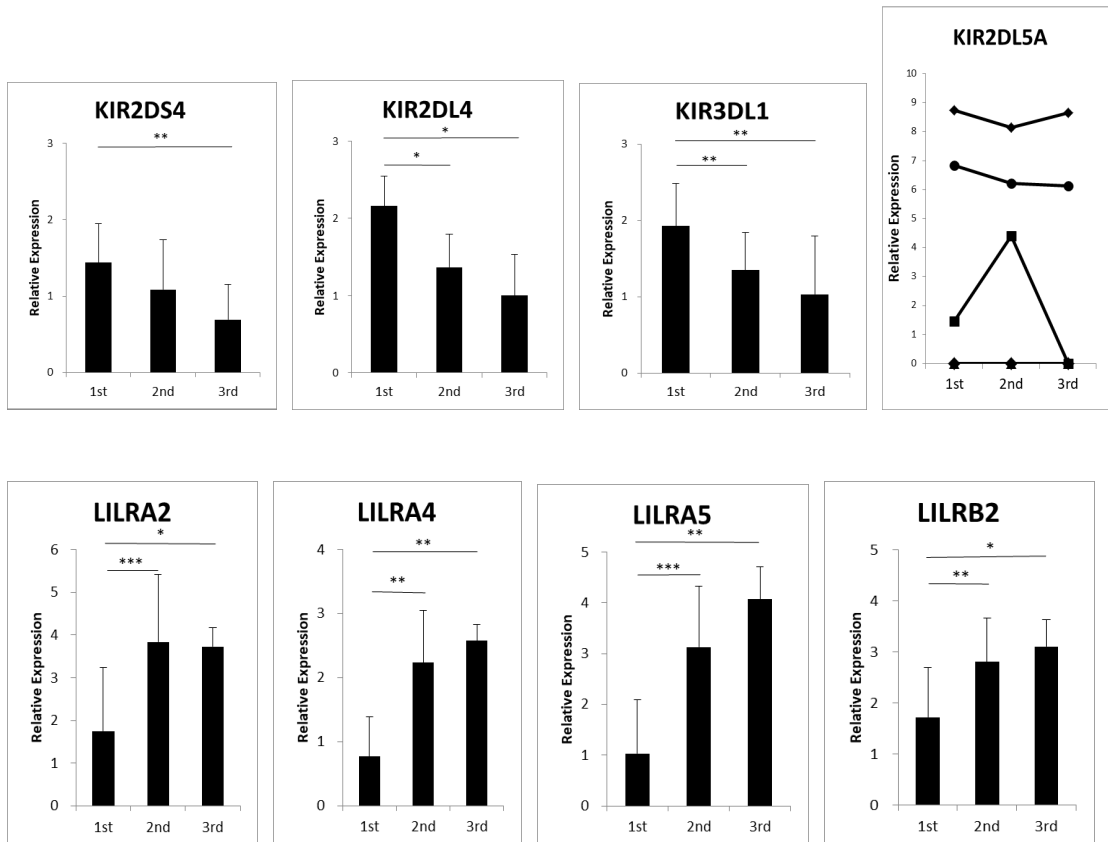


図5 妊娠初期、中期、後期における KIR、LILR 遺伝子の相対発現量 (n=6)

## 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

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

石田洋一 他、卵胞期から黄体期にかけての母体末梢血NK細胞数の変動、2017年12月 第32回日本生殖免疫学会総会・学術集会

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

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。