

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24592456

研究課題名(和文) 妊娠の成立と維持に関する免疫担当細胞の新しい機能

研究課題名(英文) Functions of immune cells for achievement and maintenance of pregnancy

研究代表者

福井 淳史 (Fukui, Atsushi)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00321969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：非妊時および妊娠時末梢血そして非妊時子宮内膜および流産脱落膜を用いてそこに存在する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の発現が不育症や不妊症、あるいは妊娠糖尿病で変化していることを明らかにした。またNK細胞のサイトカイン産生異常はNK22細胞により制御を受けNK22細胞により是正される可能性が示された。またNK細胞はパートナーのリンパ球や精液により刺激することが可能であり、サイトカイン産生を来すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：I evaluated the function of NK cells for achievement and maintenance of pregnancy using pregnant or non-pregnant peripheral blood NK cells, and non-pregnant endometrial or aborted decidual NK cells. The abnormal expression of natural cytotoxicity receptors (NCRs), especially NKp46 on NK cell and the abnormal cytokines production by NK cells are associated with reproductive failures such as recurrent pregnancy loss, infertility and gestational diabetes mellitus. Cytokines production by NK cells may be regulated by NK22 cells. Interestingly, NK cells could be stimulated by partner's lymphocytes or semen.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生殖医学 NK細胞 NCR サイトカイン NK22 NKp46 不育症 不妊症

1. 研究開始当初の背景

免疫担当細胞、特にNK細胞は全身を循環する末梢血、局所である子宮内膜・脱落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細胞活性化受容体の1つでありNK細胞表面に発現するNatural Cytotoxicity Receptors (NCRs)の発現とNK細胞の産生するサイトカインの妊娠の成立・維持、そして妊娠に関連する病態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

NK細胞に発現するNatural Cytotoxicity Receptors (NCRs)は細胞傷害とサイトカインに関与すると考えられる。またNK細胞は血管増殖因子産生細胞としても重要な役割を果たしているとされているが、妊娠の成立・維持への関わりの詳細は明らかではない。本研究では特にこの点に着目し、NCRsの発現あるいはNK細胞産生サイトカインについて末梢血NK細胞、子宮内膜および脱落膜NK細胞の両側面からアプローチし、これらの機能分担と機能発現を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) NK22細胞とNK細胞NCR(NKp46)発現、NK細胞サイトカイン産生との関連:不育症患者、不妊症患者より採取した末梢血および子宮内膜から単核球浮遊液を作成し、NK22細胞を採取する。NK細胞に発現するNKp46とIL-22とをフローサイトメトリーを用いて測定し、NK22細胞を同定する。同時にNKp46陽性細胞およびNK細胞産生サイトカイン(IL-4、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 、TGF- β)を測定しNK22細胞との関連性を明らかにする。
- (2) NK細胞における真の患者特異的なサイトカイン産生およびタイプ1/タイプ2サイトカインバランス:着床不全患者、不育症患者を対象とし、末梢血および子宮内膜を採取し単核球浮遊液を作成する。これを夫あるいはボランティアリンパ球ないし精液で刺激しNK細胞が産生するサイトカイン(IL-4、IL-10、IFN- γ 、TNF- α)をフローサイトメトリーを用いて測定する。
- (3) 妊娠成立後のNK細胞と妊娠高血圧症候群・妊娠糖尿病との関連性:妊娠12週の妊婦健診時に末梢血を採取し、NK細胞におけるNCR(NKp46)発現とサイトカイン産生を測定する。

4. 研究成果

- (1) 原因不明不妊症と不育症患者とに比べ、子宮内膜および末梢血NK細胞の産生するIL-22細胞、すなわちNK22細胞を測定した。その結果、子宮内膜NK細胞におけるIL-22産生は不育症群において原因不明不妊症群に比して、有意に高値であった。さらに

NK22細胞は、TNF- α 、IFN- γ 産生NK細胞との間に有意な負の相関を認め、さらにNK22細胞陽性率とNCRの一つであるNKp46陽性NK細胞との間に有意な負の相関を認めた。NK細胞におけるNKp46発現は不育症患者で低下することを報告しており、今回の結果から不育症ではNKp46が低下し、これによりNK22が増加、さらにTNF- α 、IFN- γ 産生NK細胞が低下する。すなわちNK22細胞が不育症においてサイトカイン産生の制御因子として働いている可能性を示唆した。

原因不明不妊症と不育症患者における子宮内膜および末梢血NK22細胞および細胞内に発現するROR- γ tについて検討した。ROR- γ t陽性NK細胞はIL-22産生NK細胞(NK22細胞)と正の相関を示し、ROR- γ t陽性NK細胞はNK22細胞であると思われた。さらにROR- γ t陽性NK細胞をNK46陽性細胞とNKp44陽性NK細胞とに分けて検討すると、NKp46陽性ROR- γ t陽性NK細胞がNKp44陽性NK細胞に比して有意に高値で有り、NKp46陽性ROR- γ t陽性NK細胞が主たるNK22細胞であると思われた。またROR- γ t陽性NK細胞はNKp44に比してNKp46をより強く発現していた。このNKp46陽性ROR- γ t陽性NK細胞は原因不明不妊症群に比して、不育症群で有意に高値であった。また流産脱落膜を用いた検討では、NK22細胞の割合をその後に施行した絨毛染色体検査において染色体異常を認めたものと、認めなかったものにわけて検討すると、NKp46陽性ROR- γ t陽性NK細胞、IL-22産生NK細胞ともに、染色体正常流産群で有意に高値であった。すなわち、これまで私どもが報告してきたように染色体正常流産ではNK細胞の機能分担、機能発現異常があり、これを正常化させる(制御する)ためにNK22細胞が増加しているものと考えられた。

- (2) 真のNK細胞によるサイトカイン産生をみるために、男性リンパ球をもちいて、女性リンパ球を刺激し、フローサイトメトリーを用いてNK細胞のサイトカイン産生能を検討した。細胞同士は接触法、非接触法双方で検討したが、男性リンパ球を放射線照射により不活化した上での混合培養(接触法)することにより、NK細胞による良好なサイトカイン産生を測定し得た。さらに生理的な環境を創出するため、男性精液を用いて、女性リンパ球を刺激し、同様にNK細胞によるサイトカインを測定した。興味深いことに精子でもなく、精漿でもなく、精液による刺激により、NK細胞からのサイトカイン産生が増加した。最後に、妊娠成立の場におけるNK細胞による生理的なサイトカイン産生をみるために、子宮NK細胞および末梢血NK細胞を男性精液および従来通りのPMA、Ionomycinを用いて刺激した。精液による子宮NK細胞刺激によりサイトカインが産生されることが明らかとなり、その産生量は

PMA、Ionomycin 刺激によるものと異なっていた。さらに NK 細胞が産生するサイトカインの比 (NK1/NK2 比) も精液刺激と PMA、Ionomycin 刺激では異なることが明らかとなった。

- (3) NK 細胞における Natural Cytotoxicity Receptor 発現と種々の血管増殖因子からみた妊娠高血圧症候群 (PIH) の病態を解明するために妊娠 12 週における末梢血 NK 細胞 NKp46 発現およびサイトカイン産生 (VEGF、IFN- γ 、TNF- α 、TGF- β) を測定した。その後の PIH 発症の有無では差を認めなかったものの、妊娠糖尿病 (GDM) を発症した群では NKp46 陽性 NK 細胞が有意に低値であり、さらに IFN- γ 産生 NK 細胞、TNF- α 産生 NK 細胞が有意に高値、TGF- β 産生 NK 細胞が有意に低値であった。これらは細胞傷害性の増加を示していると思われ、GDM における病態の一端を明らかにしたものである。

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 14 件)

Fuchinoue K, Fukui A, Chiba H, Kamoi M, Funamizu A, Taima A, Fukuhara R, Mizunuma H: Expression of retinoid-related orphan receptor (ROR) γ on NK22 cells in the peripheral blood and uterine endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss and unexplained infertility. *J Obstet Gynaecol Res* 2016;42:1541-1552. 査読有

Kurosawa H, Utsunomiya H, Shiga N, Takahashi A, Ihara M, Ishibashi M, Nishimoto M, Watanabe Z, Abe H, Kumagai J, Terada Y, Igarashi H, Takahashi T, Fukui A, Suganuma R, Tachibana M, Yaegashi N: Development of a new clinically applicable device for embryo evaluation which measures embryo oxygen consumption. *Hum Reprod* 2016;31:2321-2330. 査読有

Chiba H, Fukui A, Fuchinoue K, Funamizu A, Tanaka K, Mizunuma H: Expression of Natural Cytotoxicity Receptors on and Intracellular Cytokine Production by NK Cells in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Am J Reprod Immunol* 2016;75:529-538. 査読有

船水文乃, 福井淳史, 淵之上康平, 鴨井舞衣, 福原理恵, 水沼英樹: 子宮内膜症に対する LEP 製剤投与による NK 細胞の変化. *日本エンドメトリオース学会誌* 2016;37:96-101. 査読有

Ota K, Dambaeva S, Kim MW, Han AR, Fukui A, Gilman-Sachs A, Beaman K, Kwak-Kim J: 1,25-Dihydroxy-vitamin D3 regulates NK-cell cytotoxicity, cytokine

secretion, and degranulation in women with recurrent pregnancy losses. *Eur J Immunol* 2015;45:3188-3199. 査読有

Kamoi M, Fukui A, Kwak-Kim J, Fuchinoue K, Funamizu A, Chiba H, Yokota M, Fukuhara R, Mizunuma H: NK22 Cells in the Uterine Mid-Secretory Endometrium and Peripheral Blood of Women with Recurrent Pregnancy Loss and Unexplained Infertility. *Am J Reprod Immunol* 2015;73:557-567. 査読有

Fukui A, Kamoi M, Funamizu A, Yokota M, Fuchinoue K, Fukuhara R, Mizunuma H: NK cell abnormality and its treatment in women with recurrent pregnancy loss. *Reproductive Medicine and Biology* 2015;14:151-157. 査読有

船水文乃, 福井淳史, 淵之上康平, 鴨井舞衣, 福原理恵, 水沼英樹: 子宮内膜症の重症度と末梢血・腹水中の NK 細胞 NCR 発現・サイトカイン産生との関連性. *日本エンドメトリオース学会誌* 2015;36:161-166. 査読有

福井淳史, 船水文乃, 淵之上康平, 千葉仁美, 鴨井舞衣, 當麻絢子, 福原理恵, 水沼英樹: NKp46 と生殖. *Reproductive Immunology and Biology* 2015;30:1-6. 査読有

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. *弘前医学* 2015;66:83-84. 査読有

Funamizu A, Fukui A, Kamoi M, Fuchinoue K, Yokota M, Fukuhara R, Mizunuma H: Expression of natural cytotoxicity receptors on peritoneal fluid natural killer cell and cytokine production by peritoneal fluid natural killer cell in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2014;71:359-367. 査読有

福井淳史, 水沼英樹: 不育症の新しい対策. *日本医事新報* 2014;4721:57. 査読有

船水文乃, 福井淳史, 横田恵, 淵之上康平, 鴨井舞衣, 伊東麻美, 阿部和弘, 福原理恵, 水沼英樹: 子宮内膜症における末梢血および腹水中の NK 細胞の NCR 発現とサイトカイン産生. *日本エンドメトリオース学会誌* 2013;34:113-117. 査読有

Yokota M, Fukui A, Funamizu A, Nakamura R, Kamoi M, Fuchinoue K, Sasaki Y, Fukuhara R, Mizunuma H: Role of NKp46 expression in cytokine production by CD56-positive NK cells in the peripheral blood and the uterine endometrium. *American journal of reproductive immunology* 2013;69:202-211. 査読有

[学会発表] (計 16 件)

福井淳史: NK 細胞異常を有する不妊症・不育症に対する新しい治療法、日本生殖免疫

学会、2016.12.03-04、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Fukui A: The expression of natural cytotoxicity receptors and cytokines production by NK cells for uterine endometrium and peripheral blood in infertile women, 国際生殖免疫学会, 2016.06.22-25, エアフルト(ドイツ)

福井淳史: 不妊症患者子宮内膜および末梢血 NK 細胞における NCR 発現とサイトカイン産生と臨床成績、日本産科婦人科学会、2016.04.14、東京国際フォーラム(東京都)

福井淳史: NK 細胞と生殖異常, 生殖免疫シンポジウム, 2016. 03.04, 琉球大学(沖縄県)

福井淳史: 精液刺激による子宮内膜 NK 細胞のサイトカイン産生能についての検討, 日本受精着床学会, 2015.11, 東京都

Fukui A: NK cells and reproductive failures such as infertility, implantation failures and recurrent pregnancy loss, 米国生殖免疫学会, 2015. 06. 02-05, キングストン(カナダ)

Fukui A: Exploration of the couple specific NK1 cell and NK2 cell using male lymphocyte or semen stimulation, IFFS regional meeting, 2015.04.15, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

福井淳史: 子宮内膜症における NK 細胞の NCR 発現とサイトカイン産生, Japan Endometriosis Forum, 2014.11.15, 東京都

Fukui A: Does immunoglobulin or intralipid work as an immune-modulator for recurrent pregnancy loss women with abnormal NK cells? 米国生殖免疫学会, 2014.06.02-05, ロングビーチ(米国)

福井淳史: 難治症例に対する新たな着床不全対策—着床不全に対する免疫学的アプローチ—, 受精着床学会, 2014.03.04, 東京都

Fukui A: Are there any abnormal NK cells in women with recurrent pregnancy loss? 日本生殖免疫学会, 2013.11.30-12.01, 兵庫医科大学(兵庫県西宮市)

福井淳史: 不育症診療における NK 細胞の関与とその適正化, 日本生殖医学会, 2013.11.15-16, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Fukui A: Recent progress of study on endometrial NK cells function in human reproduction, 国際生殖免疫カンファレンス, 2013.09.27-29, 上海(中国)

Fukui A: Should biochemical pregnancy be categorized as miscarriage? 国際生殖免疫学会, 2013.05.28-06.01, ボストン(米国)

Fukui A: Do NK cell abnormalities cause to reproductive failure such as infertility and recurrent pregnancy loss? 日本生殖免疫学会, 2012.12.08-09, 大阪医科大学(大阪府高槻市)

Fukui A: Intravenous immunoglobulin for women with recurrent pregnancy loss and

elevated NK cell cytotoxicity, 欧州生殖免疫学会、米国生殖免疫学会合同学会、2012.05.31-06.02、ハンブルク(ドイツ)

(図書)(計 1 件)

Fukui A, Funamizu A, Fuchinoue K, Kamoi M, Taima A, Fukuhara R, Mizunuma H: Functional Role of Uterine Natural Killer Cells. In *Uterine Endometrial Function*, H Kanzaki (ed). Tokyo, Springer, 2016, pp 61-81.

(産業財産権)

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

(その他)
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

福井 淳史(FUKUI, ATSUSHI)
兵庫医科大学・医学部・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:

(4)研究協力者

()