

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790373

研究課題名(和文)胎盤でのNKG2Dリガンド発現の生理的意義と疾患への関与の解明

研究課題名(英文)NKG2D ligand expression in the murine placenta

## 研究代表者

大塚 紀幸(OTSUKA, Noriyuki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00447046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：NKG2D阻害抗体投与により、uterine NK (uNK) 細胞の主要な活性化経路であるNKG2Dシステムのin vivoにおける胎盤形成への関与を検討した。NKG2D受容体阻害により、妊娠満期時点では産仔数、胎児・胎盤重量に著変はないものの、胎盤形成期においてそのサイズ、及びトロホプラストの分布に変化が見られた。また、uNK細胞によるサイトカイン産生能はNKG2Dシステムを介して調節を受け、胎盤形成に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Uterine NK (uNK) cells reside in the fetomaternal interface in early gestation. Although the activity of uNK cells is known to be controlled via the interaction of the NKG2D receptor and its ligands, little is known as to whether NKG2D ligand-receptor interactions contribute to placental development. To elucidate the role of the NKG2D system at the fetomaternal interface in vivo, we treated pregnant mice with anti-NKG2D antibodies and analyzed the morphology of implantation sites and placenta. NKG2D blockade led to the alteration of placental structure and its size, though the number and the weight of fetus were not influenced. The mechanism underlying NKG2D-associated placental development remains unresolved.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胎盤 uNK細胞 NKG2D

## 1. 研究開始当初の背景

胎盤は胎児組織と母体組織(子宮内膜)の境界部に、妊娠期間中に限定して形成される特殊臓器である。胎盤の重要な役割は、胎児成長を助けることにあり、その血管構築形成には uterine NK (uNK)細胞を含む母体の NK 細胞を適切に制御することが重要であると考えられている。ヒトでは、流産や早産に NK 細胞が関与することが報告されている。

本研究者は比較ゲノム解析にて、哺乳類のうち有胎盤類で NKG2D 受容体-リガンドシステムが発達・確立されてきたことを明らかにした。哺乳類は、ウイルス等の外敵や悪性細胞除去のために NKG2D システムを発達させてきた一方で、「非自己」である胎児トロホプラストの進入に対して引き起こされた免疫反応により血管形成が促され、結果的に保育に有利な胎盤を形成したと考えられる。他方、胎盤による保育を維持するために、精緻な制御システムを持つ必要があったと想定される。

NKG2D は NK 細胞の主要な活性化受容体で、*in vitro*においてそのリガンドが uNK 細胞を活性化しサイトカイン産生を亢進させ胎盤形成に寄与する可能性が報告されている。また、ヒトでは、胎盤トロホプラストが exosome の形態で NKG2D リガンドを産生し、母体 NK 細胞の機能を調節している可能性が報告されている。しかしながら、生体における胎盤形成と疾患への関与については、十分な研究と検討は行なわれていなかった。

## 2. 研究の目的

マウスモデルを用いて NKG2D リガンド発現の解析を行ない、NKG2D リガンドを介した胎盤形成・維持機構の解明、疾患との関わりについて検討を行なった。

## 3. 研究の方法

(1)胎盤形成期・維持期・分娩期の各期において、多種類同定されている NKG2D リガンドが発現調節されている可能性が考えられる。このことから、胎盤形成過程における発現量変動の検討を行なった。

(2)NKG2D システムが胎盤形成と維持に関与し、流産・早産等の妊娠異常の原因となり得るかどうかを検討するため、胎盤形成期に NKG2D 受容体に対する阻害抗体の投与を施行し、胎盤組織形態の解析、遺伝子発現の変動、産生サイトカインの比較を行った。加えて、NKG2D 受容体阻害抗体投与による胎仔への影響、産仔数について検討を行った。

(3)ヒト流産・絨毛性疾患検体における NKG2D リガンド発現の関与の有無について、免疫組織化学的検討を施行し、検討を行った。

## 4. 研究成果

(1)胎盤における各 NKG2D リガンドの発現変動解析を施行した。採取したマウス胎盤からのタンパク質レベルでの発現検討が困難であることから、real-time PCR による検討に重点を置いて比較を行った。尚、マウスの交配系統により胎盤サイズに差異があることが報告されていることから、BALB/c(雌)×BALB/c(雄)、BALB/c(雌)×C57BL/6(雄)の組合せで検討を行なった。

その結果、胎盤形成期から妊娠後期にかけて MULT-1 mRNA 発現の減少が見られ、一方で H60c mRNA 発現の増加を認めた。但し、これらの発現は Rae-1 と比較すると低い発現量にとどまっている。MULT-1、H60c は、Rae-1 と比較して受容体との affinity に著明な差異はないことから、これらのリガンド発現の変動については、病態生理学的意義が必ずしも大きいとは言えない。

また、最も発現量の多い Rae-1 について、交配系統の組み合わせによる発現量の有意な差異は認められなかった。このことから、以後の胎盤形成に関する検討については、BALB/c(雌)×C57BL/6(雄)の組合せを用いて進めた。

(2)NKG2D リガンド-受容体間結合が胎盤形成と胎児発育に与える影響を評価するため、着床時点(妊娠4日目)から3日毎に NKG2D 阻害抗体の投与を施行した。妊娠初期、及び中期(胎盤形成初期)妊娠末期の各期に検体を採取して評価を行った。

妊娠初期に相当する、着床後の胎盤原器サイズを比較したところ NKG2D 阻害抗体投与群においてコントロール群に比べてサイズの

減少傾向が認められた。この胎盤サイズの減少については、妊娠中期まで継続していた。さらに、胎盤の組織構築に変化が認められ、NKG2D 阻害抗体投与群では labyrinth zone に存在するトロホプラストの分布に乱れが見られた。

この結果を支持する結果として、トロホプラスト形成の指標となる syncytin 遺伝子の mRNA 産生減少が NKG2D 阻害抗体投与群で見られた。

NKG2D 受容体阻害抗体の投与による産仔数の変化、流産率の増加は見られなかった。このことから、NKG2D システムによる妊娠維持のための免疫寛容への寄与は高くないと考えられた。また、胎盤重量や胎児発育への大きな影響は確認されず、何らかの代償機構の働いている可能性がうかがわれる。

胎盤形成への影響のメカニズムとしては、NKG2D システムを介して uNK 細胞のサイトカイン産生能が変動し、胎盤血管構築の形成に影響を与えている可能性が考えられることから、uNK 細胞によるサイトカイン産生を比較した。

胎盤基部への uNK 細胞集簇が最も顕著となる E10.5 (膈栓確認から 10 日) の時点で、NKG2D 阻害抗体投与群において real-time PCR での mRNA 産生量比較、ELISA 法による比較で IFN- $\gamma$  産生量に変動が見られた。以上より、NKG2D システムは uNK 細胞からのサイトカイン産生を介して胎盤形成していることが示唆される。

(3) 妊娠初期(概ね 5-8 週相当)の自然流産検体を用いて、ヒト NKG2D リガンド MICA/B, MULT1-6 について免疫組織化学的に発現検討を行なった。

既報では、ヒトトロホプラストにおいて MICA/B, MULT1-4 の発現が報告されている。今回の免疫組織化学的検討では、一部に陽性染色が見られたが、流産検体であるために避けられない検体の変性、抗体の非特異的な染色性を認めた。現時点で利用可能な研究材料では、再現性のある比較検討を行なうことが困難であった。

マウスでの研究結果からは、NKG2D システムの胎盤形成への関与が考えられた。流産検体等を用いた免疫組織化学的検索では有意差を検出することができなかったが、低出生体重児や胎盤形成不全を示すヒト疾患においても、その関与が考えられていることから、

今後メカニズムの解明とヒト検体によるさらなる検討が必要と考えられる。

## 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 1 件)

Involvement of an NKG2D ligand H60c in epidermal dendritic T cell-mediated wound repair. Yoshida S, Mohamed RH, Kajikawa M, Koizumi J, Tanaka M, Fugo K, Otsuka N, Maenaka K, Yagita H, Chiba H, Kasahara M. J Immunol. 188:3972-3979, 2012. [査読あり]

[学会発表](計 6 件)

1. Placental development is attenuated by disrupting the interaction between NKG2D and its ligands. 大塚 紀幸, 山本 菜見子, 青木 葉香, 宮崎 智彦, 宮武 由甲子, 笠原 正典 (第 42 回 日本免疫学会, 2013 年 12 月 11 日, 千葉県浦安市)

2. NKG2D 受容体阻害抗体投与による胎盤形成への影響. 大塚 紀幸, 山本 菜見子, 青木 葉香, 宮崎 智彦, 宮武 由甲子, 笠原 正典 (第 28 回 日本生殖免疫学会, 2013 年 12 月 1 日, 兵庫県西宮市)

3. 胎盤形成期における NKG2D リガンド発現意義の検討. 大塚 紀幸, 山本 菜見子, 須藤 洋一, 宮武 由甲子, 笠原 正典 (第 102 回 日本病理学会, 2013 年 6 月 7 日, 北海道札幌市)

4. 胎盤形成と妊娠維持への NKG2D リガンド関与. 山本 菜見子, 大塚 紀幸, 宮武 由甲子, 吉田 繁, 笠原 正典 (第 27 回 日本生殖免疫学会, 2012 年 12 月 9 日, 大阪府高槻市)

5. 胎盤形成と妊娠維持への NKG2D リガンドの関与. 山本 菜見子, 大塚 紀幸, 宮武 由甲子, 吉田 繁, 笠原 正典 (第 45 回 北海道病理談話会, 2012 年 10 月 13 日, 北海道札幌市)

6. 胎盤での NKG2D リガンド発現とその意義.

大塚 紀幸, 山本 菜見子, 近藤 瑞穂, 吉田  
繁, 笠原 正典 (第 101 回 日本病理学会,  
2012 年 4 月 26 日, 東京都新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

北海道大学大学院医学研究科分子病理学分  
野ホームページ

<http://www.path1.med.hokudai.ac.jp>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 紀幸 (OTSUKA, Noriyuki)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 00447046