

分担課題: 抗リン脂質抗体による不育症発症メカニズムに関する研究

研究分担者 藤井 知行 東京大学産婦人科学准教授

研究要旨

習慣流産のリスクファクターである抗リン脂質抗体(aPL)の中で、特に β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI)依存性 aPL の、血液凝固異常以外の流産発症メカニズムについて、胎盤 extravillous trophoblast 表面に発現し、invariant natural killer T 細胞(iNKT)の標的分子である CD1d 抗原に注目して研究した。 β_2 GPI 依存性抗カルジオリピン抗体が β_2 GPI 2 分子と結合すること、CD1d が自己のリン脂質である phosphatidylserine (PS)を抗原提示すること、また PS が β_2 GPI と複合体を形成し、細胞表面に存在することがすでに報告されている。本研究では、 β_2 GPI 依存性抗カルジオリピン抗体が CD1d を介し直接的に絨毛細胞に作用し、サイトカイン分泌を促進することにより流産に関与するのではないかと考え、母体胎児境界における胎児側 CD1d と母体 iNKT の相互作用、さらにはこの相互作用に β_2 GPI 依存性抗カルジオリピン抗体が及ぼす影響を検討して、この抗体が流産を引き起こす機序を明らかにすることを目的とした。

本研究の成果は以下の通りである。1. 抗 β_2 GPI 抗体が、PS- β_2 GPI 複合体と結合した trophoblast 表面の CD1d と間接的に結合することを明らかにした。2. 抗 β_2 GPI 抗体と CD1d との相互作用によって CD1d 架橋反応と同様の反応が起こり、CD1d を発現する trophoblast からの IL-12 誘導が起こることを明らかにした。3. β_2 GPI 依存性抗カルジオリピン抗体陽性の不育症患者血清でも、CD1d を発現する trophoblast からの IL-12 誘導が起こることを明らかにした。4. ヒト脱落膜 iNKT 細胞が、CD1d を介して絨毛細胞からの炎症性サイトカイン IL-12 の産生を誘導することを証明した。5. ヒト脱落膜 iNKT 細胞と CD1d 細胞との相互作用に、抗 β_2 GPI 抗体が干渉すると、IL12 産生がさらに増加し、IFN- γ の産生が増加するが、IL-4 産生は増加しないことを明らかにした。

以上より、抗 β_2 GPI 抗体が存在すると、抗 β_2 GPI 抗体と CD1d の架橋反応様の相互作用で産生された IL12 が脱落膜 iNKT 細胞を活性化させ、iNKT 細胞からの IFN- γ 分泌が増加して trophoblast 上の CD1d 発現を増加させ、さらに CD1d 発現細胞からの IL12 分泌を促進するというサイクルが活性化されることがわかった。一方、IL-4 の産生は増加しないことから、母体胎児境界においては Th1/Th2 バランスが Th1 にシフトすることとなり、局所の炎症が過剰となり、流産を引き起こす可能性が示唆された。これにより、母体胎児境界における局所の炎症が過剰となり、流産を引き起こすことが示唆された。本研究により、 β_2 GPI 依存性抗リン脂質抗体による流産が、絨毛細胞上の CD1d と脱落膜 iNKT 細胞を介した過剰な炎症によるという新しい機序が示された。

A. 研究目的

不育症の中で、習慣流産は 3 回以上自然流産を繰り返す状態と定義され、その原因は多岐にわたる。

その中で最近注目されているのが、自己免疫異常の 1 つである抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome; APS)である。APS は

1986年にHughesらによって抗リン脂質抗体(antiphospholipid antibody; APL)が陽性で、かつ血小板減少症、血栓症、または流産のいずれかの臨床症状を認める症候群として提唱された。周産期領域でもAPSについて様々な臨床研究がなされ、APSが習慣流産のみならず、妊娠10週以降の原因不明の子宮内胎児死亡、妊娠高血圧症候群、また胎児発育不全とも強く関連していることが明らかになってきた。

APSはPhosphatidylserine(PS)などの陰性荷電を持つリン脂質に対する自己抗体の産生により引き起こされるが、APLの真の対応抗原はリン脂質そのものではなく、リン脂質に結合する β_2 -glycoprotein I(β_2 GPI)などの血漿蛋白である。 β_2 GPIは細胞膜リン脂質に結合し血液凝固カスケード、血小板凝集やin vitroで活性化された血小板のプロトロンビナーゼ活性を抑制する因子である。 β_2 GPI依存性抗カルジオリピン抗体は、この機能を妨げ凝固能を亢進させて血栓傾向を誘導し、胎盤内の血栓形成を促進させるために胎盤機能不全が生じ流産を引き起こすと考えられてきたが、胎盤血管形成がなされ血流が確立する妊娠9-10週以前の流産についてはそれだけでは説明困難である。

絨毛細胞は胎盤付着部位から母体子宮内膜内へと浸潤しつつExtravillous trophoblast(EVT)へと分化していく。その分化の過程においてEVTの増殖能、浸潤能など細胞特性がダイナミックに変化してゆくことが知られている。EVTの増殖、浸潤過程においては、EVTが発現するHLA-G抗原をはじめとするHLA抗原系や、EVTと母体免疫細胞が分泌する多くのサイトカイン、ケモカイン、また血管新生関連因子など、種々の分子が働いていることが明らかになっている。その中で、本研究ではmajor histocompatibility complex(MHC) I類似の抗原提示分子であるCD1dに注目した。

CD1dは自己、または細菌由来の糖脂質を抗原提示するMHC class Iに類似した膜たんぱく質である。ヒトV α インバリエントNKT細胞(iNKT)はinvariant V α 24J α 18/V β 11T cell receptor(iTCR)を発現しており、このiTCRを通じて抗原提示細胞のCD1dを特異的に認識し、活性化される。CD1dを認識し活性化されたiNKT細胞からはinterleukin(IL)-4やinterferon(IFN)- γ が急速に分泌され、T helper(Th)1/Th2バランスが調節されるようになる。一方CD1d発現細胞からもIL-12、IL-15、IL-4、IL-10などのサイトカインが分泌されNK細胞を活性

化する。またCD1dは近接する複数の分子が架橋されるとNF- κ Bを通じてCD1d発現細胞内cytoplasmic tailのチロシン基のリン酸化が誘導される。この反応により、CD1d発現細胞よりIL-12、IL-10などのサイトカインが急速に分泌されるようになることも知られている。

本研究ではAPSを引き起こす代表的な抗リン脂質抗体である β_2 GPI依存性抗カルジオリピン抗体が、 β_2 GPI 2分子と安定的に結合すること、CD1dが自己のリン脂質であるPSを抗原提示することに着目した。PSが β_2 GPIと複合体を形成し、細胞表面に存在することはすでに報告されていることから、 β_2 GPI依存性抗カルジオリピン抗体がCD1dを介し直接的に絨毛細胞に作用し、サイトカイン分泌を促進することにより流産に関与するのではないかと考え、母体胎児境界における胎児側CD1dと母体iNKTの相互作用、さらにはこの相互作用に β_2 GPI依存性抗カルジオリピン抗体が及ぼす影響を検討して、この抗体が流産を引き起こす機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒト絨毛癌由来の細胞株JEGに、CD1d遺伝子、または機能実験における陰性コントロールとして細胞外構造がCD1d、細胞内構造がCD1aであるキメラ分子(細胞内へのシグナル伝達を行わない)CD1d/aを導入し、CD1dあるいはCD1d/aを恒常的に発現するtrophoblast株JEG/CD1dおよびJEG3/CD1d/aを樹立した。次いで、CD1dあるいはCD1d/a、PS、 β_2 GPIの細胞表面存在をフローサイトメトリー法によって観察した。またCD1dとPS- β_2 GPI複合体の結合をIP-Western blot法で確認した。JEG/CD1d、JEG3/CD1d/a、JEGに対して、抗CD1d抗体、コントロールIgGおよびクロスリンカーとしての二次抗体を添加し、CD1d抗原の架橋反応が誘導されるか、炎症性サイトカインであるIL-12の発現をELISAおよび定量的RT-PCR法で検討した。また、生体内ではクロスリンカーとしての二次抗体は存在しないが、抗 β_2 GPI抗体は β_2 GPI 2分子と結合することから、抗 β_2 GPI抗体単独でも架橋反応様の反応が生じないかと考え、各trophoblast株培養系に抗 β_2 GPI抗体を単独で添加して、IL-12の発現を検討した。さらに、脱落膜中の母体iNKTと胎児側CD1dの相互作用を検討するため、ヒト脱落膜から脱落膜リンパ球を分離し、iNKTの増殖誘導剤

α GalCer を 7 日間添加して培養した。添加前後で $V\alpha 24V\beta 11$ 陽性 iNKT の細胞数をフローサイトメトリー法で比較した。JEG/CD1d もしくは JEG に、 α GalCer 刺激した脱落膜 iNKT を加え共培養し、上清中の IL-12 の濃度を測定した。さらに、JEG/CD1d、JEG3/CD1d/a、JEG に、脱落膜 iNKT を加えた共培養系に抗 β_2 GPI 抗体またはコントロール IgG を添加した群と添加しない群で、炎症性サイトカイン IL12、IFN γ 、および IL-4 の産生を ELISA 法および定量的 RT-PCR 法で観察した。

(倫理面への配慮)

ヒトから採取した生体試料および臨床情報を使用する研究については、施設研究倫理委員会の承認を得たうえで、文書による同意を得て実施した。

C. 研究結果

フローサイトメトリー法では、JEG3/CD1d/、JEG3/CD1d/a の細胞表面に CD1d 発現 (CD1d/a の細胞外ドメインは CD1d と同一) が認められ、その発現に一致して PS、 β_2 GPI の存在も認められた。次いで、JEG、JEG3/CD1d 細胞のタンパク質を抽出し、抗 CD1d 抗体を用いて免疫沈降をおこなった。沈殿に対して HRP 標識した抗 β_2 GPI 抗体あるいは抗 AnnexinV 抗体 (PS を検出) を用いて Western blot 法により band を検出した。JEG3/CD1d 細胞においては β_2 GPI および PS の band が確認できたが、JEG 細胞では認められなかった。以上より、JEG/CD1d 細胞表面において、CD1d、PS、 β_2 GPI が複合体を形成していることが確認された。抗 CD1d 抗体 + 二次抗体による架橋反応では、JEG/CD1d において IL-12 誘導能の増加が確認されたが、JEG/Cd1d/a や JEG においては確認されなかった。JEG/CD1d における IL-12 誘導能の増加は抗 β_2 GPI 抗体単独でも認められ、抗 β_2 GPI 抗体は二次抗体なしに CD1d の架橋反応と同様の反応を誘導することがわかった。また、脱落膜リンパ球に対する α GalCer 刺激により $V\alpha 24V\beta 11$ 陽性の iNKT の細胞数が約 15 倍に増加し、この細胞を以下の実験で脱落膜 iNKT として使用することとした。脱落膜 iNKT と JEG/CD1d との共培養では、培養液中の IL12 濃度上昇が ELISA 法で確認されたが、JEG との共培養では上昇しなかった。すなわち、CD1d と脱落膜 iNKT の相互作用でも、IL-12 産生が誘導され

ていることがわかった。次に抗 β_2 GPI 抗体存在下で脱落膜 iNKT を JEG/CD1d、JEG/Cd1d/a あるいは JEG と共培養した。抗 β_2 GPI 抗体添加群とコントロール IgG 添加群の IL12 産生の比をとり各細胞間で比較したところ、JEG/CD1d 細胞では、18 時間後に抗 β_2 GPI 抗体添加群の IL12 産生がコントロール IgG 添加群の 3 倍にまで増加した。しかし、JEG/Cd1d/a や JEG では抗 β_2 GPI 抗体存在下でも、IL12 産生の増加を認めず、この差は有意であった。次に同様の系で IFN- γ および IL-4 の産生についても、抗 β_2 GPI 抗体添加群とコントロール IgG 添加群の比をとり各細胞間で比較した。IL12 と異なり全ての細胞の抗 β_2 GPI 抗体添加群で、18 時間後に IFN- γ の産生が増加する傾向にあったが、JEG/CD1d 細胞においてのみ有意差を認め、JEG/Cd1d/a や JEG では有意差を認めなかった。IL-4 の産生増加はいずれの細胞でも認められなかった。

D. 考察

母体の脱落膜組織に胎児の EVT が適切に浸潤していくことが、胎盤形成が正しく行われる鍵となるが、この過程では局所で厳密にコントロールされた炎症反応が必要である。脱落膜 iNKT と EVT 上の CD1d の相互作用により産生される IL-12 はこの炎症反応に寄与していると考えられる。しかし、この母体胎児境界に抗 β_2 GPI 抗体が存在すると厳密にコントロールされた環境が乱される。本研究において、抗 β_2 GPI 抗体が存在すると、PS- β_2 GPI 複合体を介して CD1d 分子の架橋反応と同様の反応が誘導され、IL12 産生が増加するとともに、CD1d-脱落膜リンパ球間の相互作用による IL12 産生がさらに刺激されることが示された。また特に CD1d 発現細胞と脱落膜リンパ球の接する胎児母体境界では抗 β_2 GPI 抗体存在下で IFN- γ 産生が増加するものの IL-4 産生は増加しないことがわかった。すなわち、抗 β_2 GPI 抗体が存在すると、IL12 が母体 IFN- γ 産生細胞である iNKT 細胞を活性化させ、iNKT 細胞から分泌された IFN- γ が EVT 上の CD1d 発現を増加させて CD1d 発現細胞からさらに IL12 分泌が促進されるというサイクルが活性化されることがわかった。一方、IL-4 の産生は増加しないことから、母体胎児境界においては Th1/Th2 バランスが Th1 にシフトすることとなり、局所の炎症が過剰となって、流産を引き起こす可能性が示唆された。

E. 結論

β_2 GPI 依存性抗リン脂質抗体による流産が、絨毛細胞上の CD1d と脱落膜 iNKT 細胞を介した過剰な炎症によるという新しい機序が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表 投稿中

2. 学会発表

- 1) 岩澤有希、川名 敬、藤井知行、永松 健、松本順子、三浦紫保、山下隆博、兵藤博信、上妻志郎、武谷雄二: 絨毛細胞上に存在するリン脂質抗原提示分子「CD1d」を介した、 β_2 glycoprotein I 依存性抗リン脂質抗体による新規流産メカニズムに関する検討. 第 23 回日本生殖免疫学会総会・学術集会. 富山. 2008.12
- 2) 岩澤有希, 川名敬, 藤井知行, 永松健, 松本順子, 三浦紫保, 吉田志朗, 兵藤博信, 山下隆博, 上妻志郎, 武谷雄二: 絨毛細胞上に存在するリン脂質抗原提示分子「CD1d」を介した、 β_2 glycoprotein I 依存性抗リン脂質抗体による新規流産メカニズムに関する検討. 第 61 回日本産科婦人科学会総会・学術講演会, 京都, 2009.4
- 3) Iwasawa Y, Kawana K, Fujii T, Nagamatsu T, Matsumoto J, Miura S, Yamashita T, Hyodo H, Kozuma S, Taketani Y: A possible pathogenic mechanism of recurrent miscarriage associated with β_2 glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibody through the function of CD1d. 29th Annual Meeting of The American Society for Reproductive Immunology, Orlando, FL, USA, 2009.6
- 4) Iwasawa Y, Kawana K, Miura S, Fujii T: A novel pathogenic mechanism of recurrent miscarriage associated with β_2 glycoprotein I-dependent antiphospholipid antibody through CD1d on the trophoblast. 14th International Congress of Mucosal Immunology. Boston, MA, USA, 2009.7

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし