

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

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 東京大学産科婦人科学准教授

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 $\beta_2$ 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、CD1d抗原に注目して研究している。CD1d抗原はヒト白血球抗原(HLA)類似の膜蛋白質であり、自己のリン脂質を含むリン脂質を提示し、初期の胎盤extravillous trophoblast表面に発現している。昨年度の研究において、我々は、抗 $\beta_2$ GPI抗体が、PS- $\beta_2$ GPI複合体と結合したtrophoblast表面のCD1dと間接的に結合し、その相互作用によってCD1dの架橋反応が起こり、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。妊娠初期に、extravillous trophoblast上のCD1dと母体抗 $\beta_2$ GPI依存性aPLが反応することにより過剰な炎症性反応が起こって、流産が発症しうると考えられた。本年度は、まず、この現象が、患者血清でも誘導されるか検討した。その結果、不育症患者血清中 $\beta_2$ GPI依存性抗cardiolipin抗体によってもCD1dの架橋反応が起こってIL-12が誘導されることがわかり、CD1dがaPLによる流産発症メカニズムに実際にかかわっている可能性が示された。本年度はまた、抗 $\beta_2$ GPI抗体による上記反応に、CD1dを認識して反応する脱落膜natural killer T (NKT)細胞がこの反応に影響している可能性を考え、脱落膜NKT細胞とtrophoblastとの相互作用を明らかにすることにした。ヒト脱落膜リンパ球からNKT細胞を誘導し、CD1dを強制発現させた絨毛癌細胞株と共培養した。その結果、ヒト脱落膜NKT細胞が、CD1dを介して絨毛細胞からの炎症性サイトカインIL12の産生を誘導することがわかった。しかし、CD1dを認識したNKT細胞からの特異的サイトカイン分泌変化は確認できなかった。次年度は、抗 $\beta_2$ GPI抗体を添加してcross-linkingを誘導したJeg3/CD1d細胞の培養上清をNKT細胞に添加し、IFN- $\gamma$ が誘導されるか検討する予定である。

A. 研究目的

抗リン脂質抗体(aPL)は不育症のリスクファクターである。aPLが関与する流産では血液凝固異常を介するメカニズムが提唱されており、胎盤血管内の血栓形成により胎盤機能が障害されて、流産が起るとされている。しかし、aPLは胎盤血管未形成の妊娠初期流産を反復する習慣流産にも関連性が報告されており、その流産発症メカニズムは必ずしも明らかになっていない。aPLの中でも、不育症を引き起こす力が特に強いと考えられている $\beta_2$ glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI) 依存性aPLは、陰性荷電を持つリン脂質と結合した $\beta_2$ GPIと反応し、血栓形成を誘導することにより、中期

流産を発症させるとされているが、最近、trophoblastへの直接的な細胞傷害作用による初期習慣流産発症機転も報告された。

CD1d 抗原は、HLA 近傍領域でコードされるHLA 類似抗原であり、trophoblast に発現されている。この抗原は HLA class I 抗原とほぼ同様の構造を持ち、invariant natural killer T cell (iNKT)に認識され、それにより双方の細胞から分泌される T helper 1 (Th1)サイトカインを介した局所炎症反応を誘導する働きを有している。実際、産婦人科領域においても、子宮頸管上皮細胞が CD1d 抗原を発現し、局所の iNKT などの免疫細胞との相互作用により、粘膜の感染防御反応に

重要な関与をしていることがわかっている。一方、iNKT 細胞は子宮脱落膜にも存在することがわかっており、trophoblast が CD1d 抗原を発現していることと合わせて、妊娠免疫に CD1d 抗原が重要な働きをしていることが考えられる。また、CD1d 分子は、抗 CD1d 抗体により分子架橋反応をおこし、細胞内のリン酸化カスケードにより、interleukin (IL)-12 などのサイトカイン分泌を誘導し、Th1 反応を導くことも知られている。さらに、human leukocyte antigen (HLA) がペプチドを細胞表面に提示するのと異なり、CD1d 抗原はリン脂質を提示する作用を有していることから、不育症の原因である抗リン脂質抗体症候群の病態に重要な関与をしている可能性がある。

そこで昨年度の研究において、trophoblast 上の CD1d を介した  $\beta_2$ GPI 依存性 aPL による流産メカニズムを解明することを目的とし、特に、1. trophoblast 上の CD1d がリン脂質を抗原提示し、このリン脂質に  $\beta_2$ GPI が結合していること、2. 抗  $\beta_2$ GPI 抗体により、CD1d の分子架橋反応が誘導されて、trophoblast から IL12 などのサイトカイン分泌が起こること、の 2 点について検討した。その結果、CD1d を恒常的に発現する trophoblast 株 Jeg3/CD1d の表面において、CD1d 発現に一致して PS、 $\beta_2$ GPI が存在していることを確認し、また、抗 CD1d 抗体に加え、抗  $\beta_2$ GPI 抗体でも架橋反応による IL-12 の発現が認められ、抗  $\beta_2$ GPI 抗体が、PS- $\beta_2$ GPI 複合体と結合した trophoblast 表面の CD1d と間接的に結合し、その相互作用によって CD1d の架橋反応が起こり、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。妊娠初期に、extravillous trophoblast 上の CD1d と母体抗  $\beta_2$ GPI 依存性 aPL が反応することにより過剰な炎症性反応が起こって、流産が発症しうると考えられた。

本年度の研究においては、まず、この現象が、患者血清でも誘導されるか検討した。また、妊娠

局所である子宮においては、脱落膜内に CD1d を認識して反応する natural killer T (NKT) 細胞が存在しており、抗  $\beta_2$ GPI 抗体による上記反応に影響している可能性がある。そこで本年度の研究において、脱落膜 iNKT 細胞と trophoblast との相互作用を明らかにすることにした。

## B. 研究方法

1.  $\beta_2$ GPI 依存性抗 cardiolipin 抗体陽性不育症の患者血清を Jeg3/CD1d 培養系に添加し、培養上清中への IL-12 の分泌を、ELISA で検討した。
2. 人工中絶症例から採取したヒト脱落膜を用いて脱落膜リンパ球を分離し、iNKT 細胞の増殖誘導剤  $\alpha$ GalCer を添加して 7 日間培養した。
3. この脱落膜リンパ球を Jeg3/CD1d もしくは Jeg3 と共培養した。
4. Interferon (IFN)- $\gamma$ 、IL-4、IL-12 誘導を ELISA 法および定量的 RT-PCR 法で観察した。
5. IFN- $\gamma$  産生細胞の存在を ELISPOT 法で観察した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の採取、使用は、施設倫理委員会の承認のもと、インフォームド・コンセントを取得して、実施した。

## C. 研究結果

1.  $\beta_2$ GPI 依存性抗 cardiolipin 抗体陽性不育症の患者血清を Jeg3/CD1d 培養系に添加すると、上清中への IL-12 の分泌が確認された。
2. フローサイトメトリー法による解析で、ヒト脱落膜リンパ球に対する  $\alpha$ GalCer 刺激により V $\alpha$ 24V $\beta$ 11 陽性の脱落膜 iNKT 細胞数が増加することが確認された。
3. ELISA 法では、Jeg3/CD1d との共培養で IL12 誘導が確認されたが、Jeg3 との共培養

では確認できなかった。

4. RT-PCR法でJeg3/CD1d細胞でIL12誘導が確認され、IL12はJeg3/CD1d由来であることが分かった。
5. ELISA法では脱落膜iNKT細胞からのIL4、IFN- $\gamma$ 誘導は確認できなかった。
6. ELISPOT法でIFN- $\gamma$ 産生細胞を認めたが、IFN- $\gamma$ 産生細胞数はJeg3/CD1dとの共培養、Jeg3との共培養で差がなかった。

#### D. 考察

今回の研究により、 $\beta_2$ GPI依存性抗cardiolipin抗体陽性不育症の患者血清中抗体によってもCD1dの架橋反応が起こることがわかり、CD1dがaPLによる流産発症メカニズムに実際にかかわっている可能性が示された。脱落膜iNKTとCD1dとの相互作用に関する研究では、脱落膜iNKT細胞は、CD1dを介して絨毛細胞からの炎症性サイトカインIL12の産生を誘導することがわかった。しかし、CD1dがiNKTからのIFN- $\gamma$ の分泌を特異的に増やしているという証拠は得られなかった。次年度は、抗 $\beta_2$ GPI抗体を添加してcross-linkingを誘導したJeg3/CD1d細胞の培養上清をiNKTに添加し、IFN- $\gamma$ が誘導されるか検討する予定である。

#### E. 結論

CD1dがaPLによる流産発症メカニズムに実際にかかわっている可能性が示された。また、脱落膜iNKT細胞は、CD1dを介して絨毛細胞からの炎症性サイトカインの産生を調節し、上記流産発症に関わっている可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
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, 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、 $\beta_2$ glycoproteinI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.
  - 2) 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  $\beta_2$  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.
  - 3) Iwasawa Y, Kawana K, Miura S, Fujii T: A novel pathogenic mechanism of recurrent miscarriage associated with  $\beta_2$ 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