

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 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、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。昨年度までの研究において、我々は、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、また、この現象が、患者血清でも誘導されることも確認した。さらに、ヒト脱落膜リンパ球から iNKT 細胞を誘導し、CD1d を強制発現させた絨毛癌細胞株(JEG/CD1d)と共培養し、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 IL12 の産生を誘導することを証明した。本年度は、trophoblast 上の CD1d と脱落膜 iNKT との相互作用が、抗 β_2 GPI 抗体の存在により、どのように変化し、局所における妊娠免疫反応がどのような影響を検討することとした。iNKT 細胞を誘導したヒト脱落膜リンパ球と、JEG/CD1d 細胞との共培養に、抗 β_2 GPI 抗体またはコントロール IgG を添加し、IL-12、Interferon (IFN)- γ 誘導を観察した。その結果、JEG/CD1d 細胞では、18 時間後に抗 β_2 GPI 抗体添加群の IL12 産生が陰性コントロール IgG 添加群の 3 倍にまで有意に増加した。JEG では抗 β_2 GPI 抗体存在下でも、IL12 産生の増加を認めなかった。IFN- γ の産生については、抗 β_2 GPI 抗体添加群と陰性コントロール IgG 添加群との比較で、IL12 と異なり JEG、JEG/CD1d 両者において、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た。

以上より、抗 β_2 GPI 抗体が存在すると、抗 β_2 GPI 抗体による CD1d の架橋反応で産生された 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必要以上に活性化され、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。

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、流産が起こるとされている。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 β_2 glycoprotein I (β_2 GPI)依存性 aPL は、陰性荷電を持つリン脂質と結合した β_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。

我々は、trophoblast 上の CD1d を介した β_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、昨年度までの研究において、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、 β_2 GPI が存在していること、また、抗 CD1d 抗体に加え、抗 β_2 GPI 抗体添加でも架橋反応による IL-12 の発現が認められ、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。この架橋反応は、 β_2 GPI 依存性抗 cardiolipin 抗体陽性不育症の患者血清を Jeg3/CD1d 培養系に添加しても誘導された。さらに、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 α GalCer 刺激により V α 24V β 11 陽性の脱落膜 iNKT 細胞数が増加することを確認し、この細胞と Jeg3/CD1d との共培養で Jeg3/CD1d から IL12 が誘導が確認されることを確認した。しかし、脱落膜 iNKT 細胞からの IL4、IFN- γ 誘導は確認できなかった。

本年度は、最終年度の研究として、trophoblast 上の CD1d と脱落膜 iNKT との相互作用が、抗 β_2 GPI

抗体の存在により、どのように変化し、局所における妊娠免疫反応がどのような影響を検討することとし、抗リン脂質抗体による流産発症機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 人工中絶症例から採取したヒト脱落膜リンパ球を iNKT 誘導剤 α GalCer で刺激し、iNKT 細胞 rich な脱落膜リンパ球を誘導した。
2. この脱落膜リンパ球を Jeg3/CD1d、CD1d と細胞外ドメインが共通で細胞内シグナル伝達が起こらないキメラ分子 CD1d/a を発現する JEG3/CD1d/a、もしくは Jeg3 と共培養し、この培養系に抗 β_2 GPI 抗体またはコントロール IgG を添加した。
4. IL-12、Interferon (IFN)- γ 誘導を ELISA 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. JEG/CD1d 細胞では、18 時間後に抗 β_2 GPI 抗体添加群の IL12 産生が陰性コントロール IgG 添加群の 3 倍にまで有意に増加した。JEG や JRG/CD1d/a では抗 β_2 GPI 抗体存在下でも、IL12 産生の増加を認めなかった。
2. IFN- γ の産生についても、抗 β_2 GPI 抗体添加群と陰性コントロール 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 分子が架橋され、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 産生が増加することがわかった。すなわち、抗 β_2 GPI 抗体が存在すると、抗 β_2 GPI 抗体による CD1d の架橋反応で産生された IL12 が母体 IFN- γ 産生細胞である iNKT 細胞を活性化させ、iNKT 細胞からの分泌が増加した IFN- γ が trophoblast 上の CD1d 発現を増加させて、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必要以上に活性化されることが示された。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。

E. 結論

抗 β_2 GPI 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流産機序が示された。

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
なし

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