

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 東京大学大学院医学系研究科産婦人科学准教授

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 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た。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。我々は、CD1d を恒常的に発現する trophoblast 株 Jeg3/CD1d を樹立し、CD1d、Phosphatidylserine (PS)、 β_2 GPI の細胞表面存在を観察し、さらに、抗 CD1d 抗体、抗 β_2 GPI 抗体により、CD1d 抗原の架橋反応を観察した。その結果、Jeg3/CD1d の細胞表面において、CD1d 発現に一致して PS、 β_2 GPI の存在が認められた。また、抗 CD1d 抗体だけでなく、抗 β_2 GPI 抗体でも架橋反応による interleukin (IL)-12 の発現が、認められた。以上より、抗 β_2 GPI 抗体は、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⁺ trophoblast からの IL-12 誘導が起こると考えられた。妊娠初期に、extravillous trophoblast 上の CD1d と母体抗 β_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。

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。

さて、妊娠成立時の胎盤形成において、受精卵から分化した胎児側細胞である trophoblast は、母体側組織である子宮脱落膜に侵入していく。胎児の組織適合抗原はその半分が父親由来であり、母体からみると、胎児は半同種移植片である。したがって、trophoblast も母体の免疫担当細胞に認識され、移植免疫反応により、本来、排除されるはずであるが、実際は、母体に排除されず、増殖していく。近年、免疫反応を、細胞性免疫反応発動性の T helper 1 (Th1) 反応と、液性免疫発動性の T helper 2 (Th2) 反応に分類し、そのバランスで生体の免疫全体が制御されるとする考えが提唱されている。細胞性免疫は、移植免疫において、移植片を排除する主たる反応であり、妊娠においては Th1 が抑制され、Th2 優位優位になることによって、胎児が母体から排除されず、妊娠が維持されると考え

られている。その中で、我々はこれまで、trophoblast が発現する HLA-G 抗原が、脱落膜リンパ球からのサイトカイン分泌を Th2 優位にシフトさせるなどして、免疫学的妊娠維持反応におけるセンタープレーヤーとして機能していることを報告してきた。しかし、一方で、Th1 反応が全く誘起されないと、妊娠が成立しないことも分かっていた。受精卵は、胞胚期に子宮内膜に着床し、その中に侵入していくが、この過程で、内膜組織を破壊し、浸潤する必要がある、Th1 反応やそれに関連した炎症反応が重要であると考えられている。したがって、妊娠局所における Th1 反応を含む炎症反応の詳細を検討することは、妊娠成立および維持における免疫反応の仕組みを明らかにし、その異常に基づく、不育症をはじめとする種々の妊娠合併症の発症機転の解明に重要である。

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 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、IL12 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、HLA 抗原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。

そこで今年度の研究目的は、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 β_2 GPI が結合していること、2. 抗 β_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 点を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. CD1d および CD1a/d 遺伝子を絨毛癌由来の細胞株 JEG にレトロウィルスベクターを用いて導入した。なお、CD1a/d キメラ分子は、細胞表面の抗原性は Cd1d と同様だが、細胞内の cytoplasmic tail がないためにリン酸化カスケードが起こらない。この分子を、今回の実験の control として用いた。
2. CD1d と陰性荷電リン脂質である phosphatidylserine (PS) が細胞表面に共存していることを蛍光免疫染色とフローサイトメトリー法で確認した。
3. CD1d と β_2 GPI が細胞表面に共存していることを蛍光免疫染色とフローサイトメトリー法で確認した。
4. CD1d 分子と β_2 GPI-PS 複合体分子の結合を IP-Western 法で確認した。
5. 機能解析として、抗 β_2 GPI 抗体により、CD1d 分子架橋反応が誘導されるか、IL12 産生を定量的 PCR 法と ELISA を用いて、検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床検体を対象としておらず、倫理上、特に問題になる点はない。

C. 研究結果

1. CD1d 導入 JEG 細胞表面に、CD1d と PS が dot 状に共存していることが、免疫染色により証明された。
2. CD1d 導入 JEG 細胞表面に、CD1d と β_2 GPI が共存していることが、免疫染色により証明された。
3. CD1d 導入 JEG 細胞表面には、PS と β_2 GPI がともに存在しているが、CD1d を発現しない JEG 細胞表面には PS、 β_2 GPI とも存在していないことが、フローサイトメトリーにより証明された。
4. CD1d 抗体で免疫沈降し、抗 β_2 GPI 抗体でプロットする IP-Western 法により、CD1d 導入 JEG 細胞で、CD1d 分子と β_2 GPI 分子の結合が証明された。
5. 培養上清への抗 β_2 GPI 抗体添加により、CD1d 導入 JEG 細胞では、IL12p40 mRNA の発現が有意に上昇していた。しかし、JEG 細胞および CD1a/d 導入 JEG 細胞では、IL12p40 mRNA の発現は変化しなかった。また、CD1d 導入 JEG 細胞の培養上清中の IL12p40 タンパク濃度も抗 β_2 GPI 抗体添加により上昇した。

D. 考察

今回の研究により、trophoblast 上の CD1d は PS を抗原提示し、その PS に β_2 GPI が結合していることが示された。さらに抗 β_2 GPI 抗体により、CD1d 抗原の分子架橋反応が起こり、IL-12 分泌が促進されることが示された。妊娠初期に extravillous trophoblast 上の CD1d と母体抗 β_2 GPI 依存性 aPL が反応することにより、CD1d の分子架橋反応が誘導され、分泌される IL-12 を介して、Th1 反応が促進されると考えられる。この反応には、trophoblast 周囲に存在する母体の iNKT も関与すると考えられ、その結果、局所の過剰な炎症反応が誘起されて、流産が発症しうると考えられた。

E. 結論

trophoblast 上の CD1d を介した β_2 GPI 依存性 aPL による新たな流産メカニズムが存在する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
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. 2008 年 12 月 6-7 日. 富山.

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