

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：Granulysinと流産に関する研究

研究代表者 齋藤 滋 富山大学産科婦人科学教授
中島 彰俊 富山大学産科婦人科学助教

研究要旨

細胞傷害性 T 細胞または NK 細胞の産生する細胞傷害性蛋白（特に Granulysin による流産誘導メカニズムを解明することにより、いままで不明であった不育症誘導因子をあきらかにする。

A. 研究目的

これまでに不育症の原因といわれるものは多数報告されているが、どれが最も重要かという点においては未だ不明な点ばかりである。そこで、これまで不明であった流産の実行因子を同定し、それら実行因子の活性化を調整する原因を同定することが、不育症の解明につながると考え、研究を開始した。

これまで脱落膜リンパ球は、胎児細胞への免疫寛容等の機構により胎盤を形成し、妊娠維持に正の役割を果たすと考えられてきた。それら細胞の活性化が、胎児由来細胞である絨毛外栄養膜細胞の排除（つまり流産誘導）に関与しないかを検討した。

B. 研究方法

脱落膜リンパ球は 6-11 週前後において実施された人工流産手術を実施された患者 10 名および流産手術を実施した 20 名から、説明と同意（インフォームド・コンセント）を得た上で検体を採取した。

（倫理面への配慮）

研究結果は、結果のみを公表し、対象者の個人情報の漏洩が起こらないように配慮した。

C. 研究結果

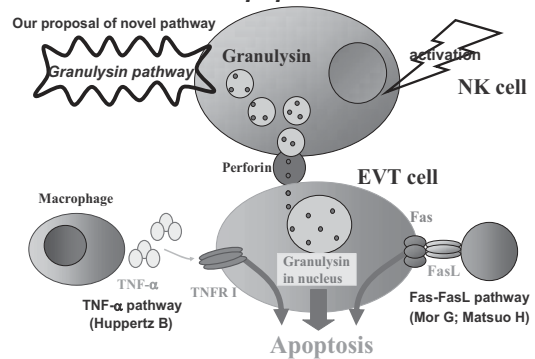
1. 脱落膜における細胞傷害性顆粒蛋白の発現の検討：Granulysin/Granzyme B/Perforin の発現を流産検体および正常妊娠検体にて検討すると、基底脱落膜における Granulysin (Gr) 陽性細胞数は、流産例で正常妊娠に比し有意に増加していた。一方で、他の傷害性顆粒タンパクである Perforin/Granzyme B の発現には有意差を認めなかった。2. 脱落膜リンパ球における Granulysin 陽性細胞の検討：Gr 発現細胞をフローサイトメトリー法において検討したところ、CD56^{bright}NK (CD56++) 細胞にのみ Gr は強発現しており、T 細胞にほとんど Gr の発現を認めなかった。また、流産例の Gr 陽性 CD56++細胞は正常妊娠と比較して有意に高かった。さらに興味深いことに、二重免疫染色において、流産例で絨毛外栄養膜 (EVT) 細胞の核内に Gr 発現を認め、これらの細胞がアポトーシスに陥っていた。EVT の mRNA 発現レベルにおいて、Gr 発現は認められなかったことより、Gr 陽性 CD56++細胞が EVT に Gr を導入している事が推測された。そこで Ap 誘導と Gr の核内移行の関係を解明するため *in vitro* にて IL-2 刺激した脱落膜リンパ球から CD56++細胞を分離し、EVT セルラインと共培養を行った。その実験結果から、EVT 細胞内で Gr の核内移行が観察された。つまり、実験的にも CD56++細胞から EVT に Gr が導入され、その Gr が核内移行することが証明された。

また、このNK細胞から分泌されたGrのEVTへの移行は細胞接触(トランスウェル実験)およびPerforin依存性(Perforin抑制剤処理によりGrのEVTへの移行が観察されなくなる)であることが分かった。さらに、EVT細胞にGFP融合Grを強発現させたところ、Grは細胞質から核内に移行し、それと共にApの増加を認めた。追加として、Grの細胞内移動メカニズムの解明のため、GFPx2分子を結合したGFPx2-Granulysin発現ベクターを作成した。これは、GFPx2は分子量の関係から核内に単純拡散できないことが分かっている。しかしながら、EVT細胞内に導入されたGFPx2-Granulysinは核内に集積することを我々は証明した。つまり、Grは能動的に核内に移行することでアポトーシスを誘導に参与することが示された。

D. 考察

今回の結果より、脱落膜リンパ球における血管形成に重要な役割を果たすと考えられてきたNK細胞(母体由来)が、直接絨毛外栄養膜細胞(胎児由来)を直接攻撃、アポトーシスを誘導することを世界に先駆けて報告した。また、この現象は流産が誘導される重要な機構であると推定される。なぜなら、これまで流産の主な原因のひとつとされる染色体異常を認める症例のみならず、その異常を認めない症例においても同様にこの機構が働いている事が確認されたためである。つまり、何らかの誘導因子がNK細胞の活性化を引き起こし流産を誘導すると考えられるわけである。この結果に加え、これまでに我々はTh1/Th2バランスの観点からTh1有意な状況が流産に関与すること、流産症例血清におけるGranulysin濃度が正常妊娠例と比較し高値を示すことを報告してきた。このことは、これまで報告されてきた流産の誘導因子とされるものが、NK細胞におけるGranulysinの発現に影響しうるか、Th1有意な状況を誘導しうるかなど今までになかった不育症因子の検査法となりうると考えられ、臨床応用も含め臨床結果と対比させていきたいと考えている。

自然流産では、NK細胞がGranulysinを介してEVT細胞にApoptosisを誘導する



E. 結論

細胞障害性顆粒蛋白であるGranulysinは母体由来の脱落膜NK細胞から、胎児由来細胞である絨毛外栄養膜細胞に分泌され、絨毛外栄養膜細胞にアポトーシスを誘導する。この機構は、流産誘導に重要な役割を果たす。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakashima A., Shiozaki A., Myojo S., Ito M., Tatematsu M., Sakai M., Takamori Y., Ogawa K., Nagata K., Saito S.: Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abortion. *American Journal of Pathology*. 173(3):653-664, 2008.

2. 学会発表

1) Nakashima A., Shiozaki A., Myojo S., Ito M., Tatematsu M., Saito S.: Decidual Natural Killer cell derived granulysin induces apoptosis of extravillous trophoblast in miscarriage. 14th International Federation of Placenta Associations Meeting. September 10-13, 2008, Seggau Castle, Austria.

2) 中島彰俊, 塩崎有宏, 伊藤実香, 立松美樹子, 明星須晴, 齋藤滋: 流産症例において、Granulysin陽性NK細胞はExtravillous trophoblast (EVT) をアポトーシスに陥らせる. 第16回日本胎盤学会学術集会, .2008年11月13日-14日. 浜松.

3) 中島彰俊, 塩崎有宏, 明星須晴, 伊藤実香, 立松美樹子, 齋藤滋: 脱落膜NK細胞由来 Granulysinは絨毛外トロホプラストにアポトーシスを誘導し、流産誘導に関与する. 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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Nakashima A.</u> , Shiozaki A., Myojo S., Ito M., Tatematsu M., Sakai M., Takamori Y., Ogawa K., Nagata K., <u>Saito S.</u>	Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abor- tion.	American Journal of Pathology	173(3)	653-664	2008