

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	マウスの子宮NK細胞は妊娠6日目に著明に減少する
別タイトル	Uterine natural killer cells severely decrease in number at gestation day 6 in mice
作成者(著者)	高島, 明子
公開者	東邦大学医学会
発行日	2015.03
ISSN	00408670
掲載情報	東邦医学会雑誌. 62(1). p.42-46.
資料種別	学術雑誌論文
内容記述	東邦医学会賞受賞記念講演要旨 平成26年度
著者版フラグ	publisher
JaLCDOI	info:doi/10.14994/tohoigaku.62.42
メタデータのURL	https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD47866155

マウスの子宮 NK 細胞は妊娠 6 日目に著明に減少する

高島 明子

東邦大学医学部産科婦人科講座 (佐倉)

妊娠は、母体にとって異物である胚、すなわち胎児が拒絶されずに子宮内で発育するという、免疫学的に極めて奇妙な現象である。母体にとって胎児・胎盤は、父系遺伝子要素を有する半同種移植体であり、排除の対象にもかかわらず、拒絶反応を免れている。妊娠脱落膜では全細胞の約半数までが免疫細胞で占められており、浸潤細胞の中でも最大の細胞集団が natural killer (NK) 細胞である。NK 細胞は、種々のサイトカインやケモカインを産生し血管新生や血管のリモデリングを介して着床と胎盤形成、児の発育といった妊娠維持をコントロールしているとされている。

今回、私は妊娠の早期段階から出産後期まで、子宮に浸潤する免疫細胞の動態を広範囲に調べたところ、妊娠 6 日目で NK 細胞が一過性に消失することを発見した。しかも、消失後に再び出現する NK 細胞は、それまでのものと異なる NK 細胞集団であった。このような妊娠日齢に伴う NK 細胞の変動やその消失メカニズム、そして、その機能について検討を行った。

方法: BALB/c マウス [日本チャールス・リバー (株), 横浜] を用いて一晩 mating させ、翌朝 vaginal plug を確認したものを妊娠 1 日目とした。妊娠 4, 6, 9, 12 日目のマウスから、胎児胎盤を除去した子宮を採取した。得られた子宮を細切、コラゲナーゼ/DNase (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) で処理し子宮内に存在する免疫細胞を採取し、採取した細胞を特異抗体で染色し、その発現をフローサイトメトリー測定装置で解析した。

結果: 妊娠日齢に伴う、子宮に浸潤する免疫細胞の変動を測定した。子宮組織からの細胞と白血球を区別するために、広範囲な血液細胞への反応性を示す CD45 抗原と、CD11b, CD11c, Gr-1 抗原に対する特異抗体染色を行い、それぞれの発現頻度を測定した。CD45⁺CD11b⁻, CD45⁺Gr-1 細胞は妊娠 6 日目に減少し妊娠 12 日目に非妊娠時と

同程度まで増加した (Fig. 1)。

Fig. 1 で提示した妊娠 6 日目に著明に減少した細胞が何であるかを解析するために非妊娠時と妊娠 6 日目の子宮を CD45 と、T 細胞, B 細胞, NK 細胞, 単球, 樹状細胞の特異抗体を染色し比較したところ、CD49b の NK 細胞が妊娠 6 日目に有意に低下を示した (Fig. 2)。非妊娠時の CD45/CD11b/CD49b の 3color で染色をした。CD45⁺CD11b⁺細胞に CD49b の強発現を認め、CD11b⁺にもわずかに認めた。CD45⁺CD11b⁻細胞をソーティングしたところ、細胞内に顆粒を有する大型の細胞が多数認められ、これらは large granular lymphocyte, すなわち NK 細胞であることが確認された。妊娠 6 日目の CD45/CD11b/CD49b の 3color 染色では CD11b⁺, CD11b⁻いずれの分画にも CD49b はほとんど認められなかった。

NK 細胞はそのサブセットにより機能は異なる。ヒト NK 細胞は、表面マーカーの CD56 および CD16 の発現量から、CD56dimCD16⁺ と CD56brightCD16⁻ のサブセットに分類される。末梢血 NK 細胞は CD56⁻ を発現し、細胞傷害因子を豊富に発現するのに対し子宮 NK 細胞は CD56⁺ を発現し interferon-gamma (IFN- γ) などのサイトカインを産生する抑制性細胞としての機能が報告されており、末梢血 NK 細胞と子宮 NK 細胞は異なる機能を持っている。子宮マウスにはヒトの CD56, CD16 のように機能を明確に 2 分するような表面マーカーはない。マウスの NK 細胞は分化の過程で発現する表面マーカーが変化する。CD11b, CD43, CD27, B220, CD127 といった表面マーカーは NK 細胞の population を分類するのによい指標とされている。非妊娠時と着床後に増加する NK 細胞の population に相違があるか検討するために CD49b⁺細胞と各種表面マーカーを比較した。妊娠 12 日目には CD127, CD11b, B220 を発現する NK 細胞が増加しており、妊娠後に増加する NK 細胞は非

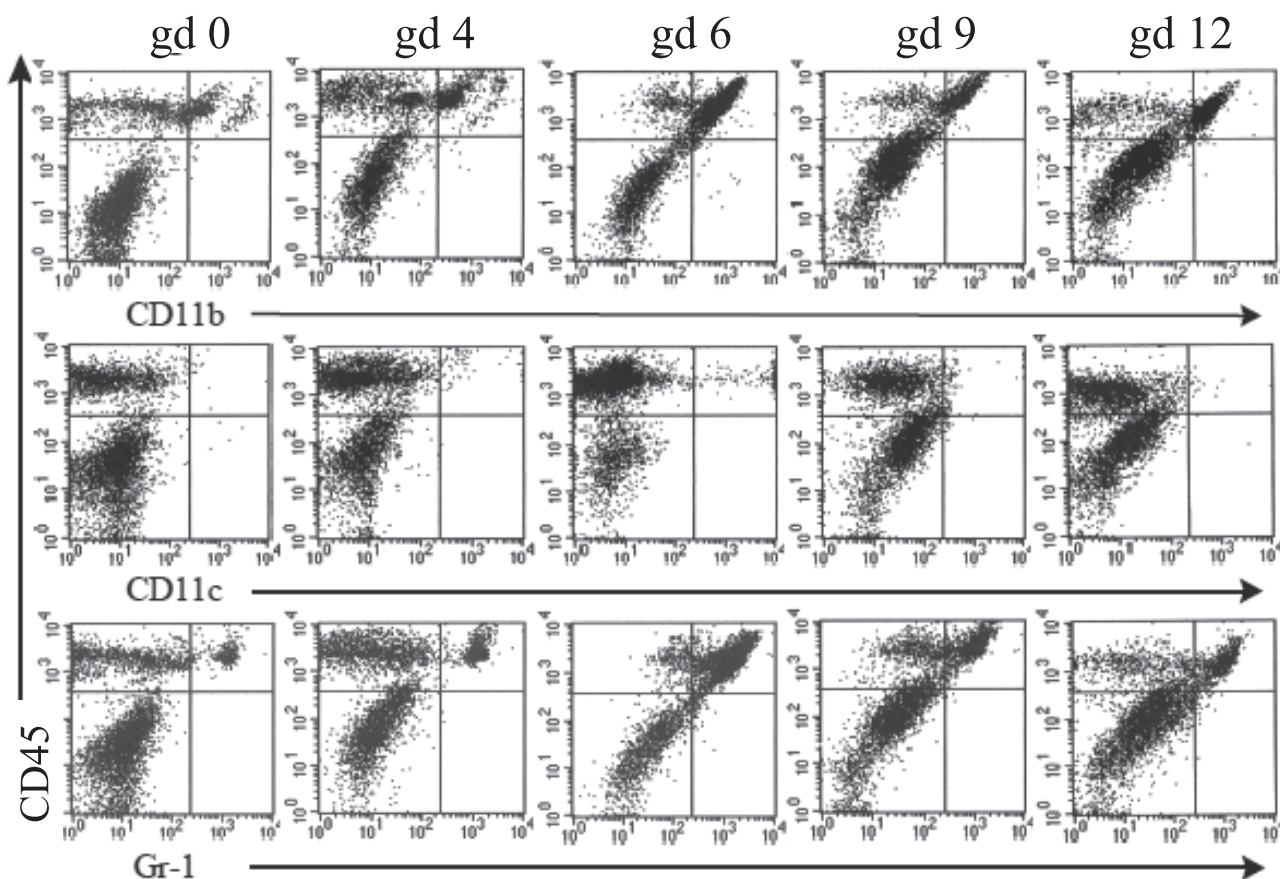


Fig. 1 Uterine cells were prepared from virgin mice and mice at gds 4, 6, 9, and 12.

Uterine cells were stained with anti-CD45-APC, treated with anti-CD11b-FITC, anti-CD11c-PE, or anti-Gr-1-FITC, and analyzed on a FACSCalibur™ flow cytometer, using CellQuest software (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

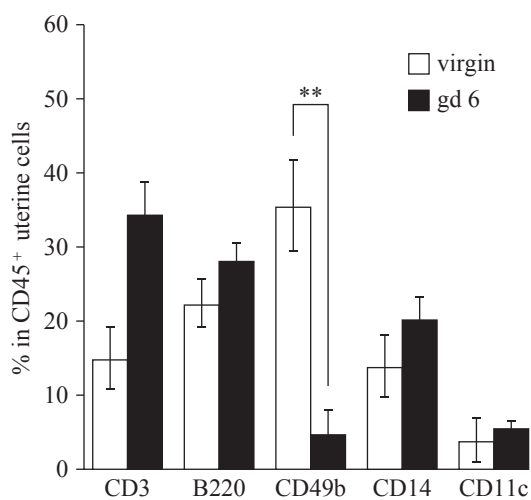


Fig. 2 Uterine cells from virgin mice and gd 6 mice were prepared. Uterine cells were first stained with anti-CD45-APC and then with anti-CD3-, anti-B220-, anti-CD49b-, anti-CD14-, or anti-CD11c-FITC. The percentages of CD3-, B220-, CD49b-, CD14-, or CD11c-bearing cells in CD45⁺ cells are shown.

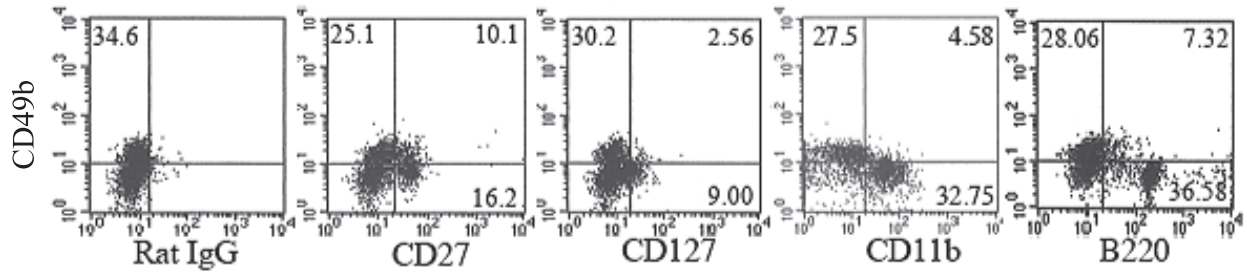
**p<0.01

妊娠時と異なるサブセットのNK細胞であった (Fig. 3).

NK細胞の減少増加, すなわちNK細胞の遊走にはC-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) とそのリガンドである chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12) や, interleukin-15 (IL-15) が関与すると報告している文献が散見される. 本研究においても, 着床後増加する子宮NK細胞の遊走にCXCL12, CXCR4リガンド-受容体ペアやIL-15が関与しているかを検討した.

子宮のCD45⁻細胞のCXCL12の発現をみると, 非妊娠時と妊娠6日目では強く発現し, 12日目では発現を認めなかった. 一方CD45⁺CD49b⁺子宮細胞ではCXCL12に結合するCXCR4の発現は非妊娠時に比較して妊娠12日目により強く認められた. この結果から非妊娠時には子宮CD45⁻の細胞の産生するCXCL12によりCXCR4を発現するNK細胞またはその前駆細胞が子宮に遊走する可能性が示唆されたが, 妊娠12日目にはCXCR4レセプターの発現はあるもののそのリガンドであるCXCL12の発現がないことから, 妊娠中のNK細胞の遊走には強い関連性は見いだせな

A virgin



B gd 12

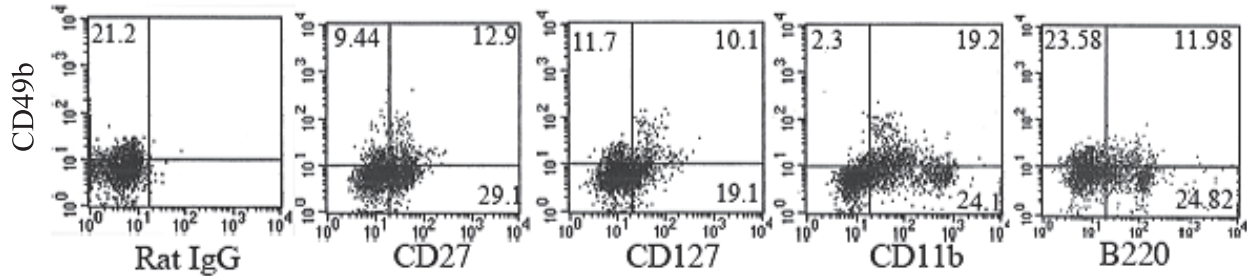


Fig. 3 Uterine cells were prepared from virgin (A) and gd 12 (B) mice, stained sequentially with anti-CD45-PE, Cy5.5 and then with anti-CD49b-APC, rat-IgG, anti-CD27-, anti-CD127-, anti-CD11b-, or anti-B220-FITC. The cells were analyzed on a flow cytometer. The experiments were repeated at least three times, and representative results are shown.

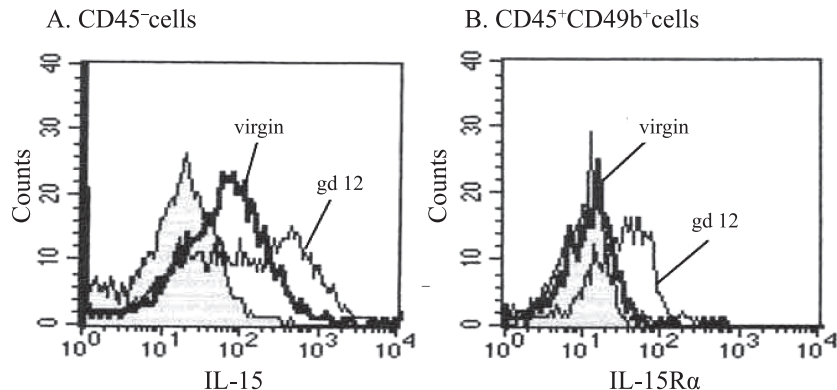


Fig. 4 Uteri were obtained from virgin and gd 12 mice. Uterine cells were prepared from virgin mice (bold line) and gd 12 mice (thin line) and stained sequentially with anti-CD45-Cy5.5 and then either with anti-IL-15-FITC (intracellularly) (A) or anti-IL-15R α -FITC (on the cell surface) (B). Shaded areas show the results obtained with the control antibody.

IL-15R α : interleukin 15 receptor alpha chain

かった。

IL-15 産生は CD45⁻ の細胞内において非妊娠時には弱く、妊娠 12 日目では強い発現を認めた。一方で CD45⁺ CD49b⁺ 細胞表面の IL-15R α の発現は 12 日目の NK 細胞で強くみられ、非妊娠時にはほとんど認められなかった (Fig. 4)。この結果から IL-15 は妊娠により増加する NK 細胞の集族、増殖に関与すると考えられた。非妊娠時と妊娠 12 日目の子宮の切片を IL-15 で組織染色した。妊娠 12 日目では

IL-15 の発現を認めた。IL-15 は妊娠により増加する NK 細胞の集族、増殖に関与すると考えられた。

NK 細胞は分化条件で IFN- γ や IL-10 産生性の NK1 と IL-5 や IL-13 産生性の細胞傷害因子を豊富に発現する NK2 細胞へと分化誘導される。抑制性細胞としての IFN- γ の発現が妊娠後の NK 細胞内にあるかどうかを検討した。CD49b⁺ NK 細胞内の INF- γ の産生を確認したところ非妊娠時よりも妊娠 12 日目により高い発現を認めた。すなわち妊

娠中に増加するNK細胞は抑制性細胞としての役割を果たしていると言えた。

結論: 1) BALB マウスにおいてCD45⁺CD11b⁻およびGr1⁻細胞は妊娠6日目に著明に減少した。2) この妊娠6日目に著明に減少した白血球は妊娠12日目には再び増殖をしていた。3) この妊娠6日目に著明に減少した白血球はCD49b⁺のNK細胞であり、他のT, Bといったリンパ球やマクロファージ、樹状細胞は妊娠6日目に著明な変化は認めなかった。4) 妊娠後増加するNK細胞は非妊娠時と異なる

サブセットであった。5) IL-15は妊娠時のNK細胞の遊走、増殖に関与している可能性が示唆された。6) 妊娠後の子宮NK細胞内にはIL-15およびINF- γ の産生を認めた。以上の結果から非妊娠時にもともと存在するNK細胞は着床期に著明に減少する。その後子宮に遊走されるNK細胞は非妊娠時とは異なる、より成熟したNK細胞であることが確認された。

本講演の要旨は、*Biol Reprod* **89**:101, 2013に掲載された内容である。

高島明子先生 略歴



- 2000年3月 東邦大学医学部卒業
5月 第94回医師国家試験合格（医籍登録番号 第412870号）
東邦大学医療センター佐倉病院にて研修
- 2002年5月 東邦大学医学部研究生（佐倉病院産科婦人科学講座）
- 2003年7月 同 助手（佐倉病院産科婦人科学講座）
- 2006年7月 組織改正東邦大学医学部助手（佐倉病院産科婦人科学講座）
日本産科婦人科学会専門医（第20000217-N-0505号）
- 2007年4月 職名変更東邦大学医学部助教（佐倉病院産科婦人科学講座）
- 2009年9月 日本産科婦人科内視鏡学会子宮鏡技術認定医（16410370909）
- 2012年9月 日本産科婦人科内視鏡学会腹腔鏡技術認定医（1641121212）
- 2013年10月 日本内視鏡外科学会技術認定医（13-GO-031）
- 2014年6月 医学博士取得（東邦大学乙第2664号）
12月 東邦大学医学部講師（佐倉病院産科婦人科学講座）
-