

学位番号乙第 2664 号

学位申請者 : 高 島 明 子

主 論 文 : Uterine natural killer cells severely decrease in number at gestation day 6 in mice

(マウスの子宮NK細胞は妊娠6日目に著明に減少する)

著 者 : Akiko Takashima, Fumio Ishikawa, Taku Kuwabara, Yuriko Tanaka, Toshihiko Kinoshita, Motohiro Ito, Terutaka Kakiuchi

公 表 誌 : Biology of Reproduction 89 (4) : 101, 1-8, 2013

論文内容の要旨 :

(緒言) NK細胞は自然免疫担当細胞で、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞を排除する。最近では妊娠に伴い子宮のNK細胞数が飛躍的に増加し、妊娠の成立に重要な役割を果たしていることも知られている。子宮外から流入するNK細胞またはその前駆細胞がこの増加に関与するといわれるが、非妊娠時にもNK細胞が子宮に存在する。非妊娠時の子宮NK細胞が妊娠後の増加に関与するかどうかは不明である。本研究では非妊娠時に存在する子宮NK細胞の関与について、BALB/c妊娠マウスを用いて検討した。

(方法) 非妊娠、妊娠4、6、9、12日目のBALB/cマウスの子宮から細胞を採取し、CD45分子を発現する白血球系の細胞について検討した。雌マウスにプラグが確認された日を妊娠1日目とした。動物実験については、東邦大学動物委員会の承認を得た(動承-13-31-225)。各特異抗体を用いて、細胞表面分子の解析、サイトカイン産生細胞等について、主としてフローサイトメーターを用いて解析した。

(結果) CD45<sup>+</sup>細胞についてCD11bまたはGr-1の発現を調べたところ、妊娠6日目にCD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>細胞とCD45<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>細胞が著しく減少しており、両者はほぼ同じ細胞集団であった。妊娠6日目は受精卵が着床し胎盤形成が始まる時期に相当する。減少する細胞はCD49bを発現するNK細胞であった。妊娠12日目には子宮NK細胞の比率は回復したが、12日目の子宮NK細胞ではCD11b、CD27、CD127、B220を発現する細胞が非妊娠時に比べてそれぞれ増加しており、成熟したNK細胞の増加がみられた。子宮のCD45<sup>-</sup>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日目では著明に低下していた。CXCL12に結合するCXCR4の発現は12日目の子宮NK細胞で非妊娠時に比べやや増加していた。NK細胞の生存・増殖に重要なIL-15産生は妊娠12日目のCD45<sup>+</sup>細胞のほうが非妊娠時よりも強く、IL-15R $\alpha$ 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。また妊娠成立に重要とされるインターフェロン- $\gamma$ 産生は妊娠12日目で非妊娠時のNK細胞よりも強くみられた。

(結論) 妊娠6日目には子宮NK細胞がほとんどみられなくなることから、非妊娠時に存在する子宮NK細胞は妊娠後の著しいNK細胞増加には関与していないものと考えられる。子宮CD45<sup>+</sup>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し、成熟したNK細胞がインターフェロン- $\gamma$ 産生を介して胎盤形成に関与していると考えられる。

1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2664 号	氏 名	高 島 明 子
論文審査担当者	主 査	森 田 峰 人
	副 査	久 布 白 兼 行
	副 査	武 城 英 明
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	赤 羽 悟 美
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>【目的】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、免疫学的にきわめて奇妙な現象であることが知られており、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、しかも、これら浸潤細胞の中でも最大の細胞集団が natural killer(NK)細胞であることが知られている。妊娠に伴い集積するこれらの免疫細胞は、妊娠成立・維持に不可欠なのではないかと考えられるようになってきているが、どのようなメカニズムが働いているのかについては明らかになっていない。そこで申請者らは妊娠の初期段階から妊娠後期まで、子宮に浸潤する免疫細胞の動態を広範囲に検討した。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おこなった。</p> <p>【方法】BALB マウスを用いて、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 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。</p> <p>【成績】</p> <p>FIG1A : まず始めに、妊娠日齢に伴う、子宮に浸潤する免疫細胞の変動を調べたもので、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、フローサイトメーターでそれぞれの発現頻度を測定した。その結果、CD45+CD11b-及びGr1-細胞は妊娠 6 日目に著明に減少し妊娠 12 日目には再び増加を示した。</p> <p>FIG1B は FIG1A の妊娠日齢で増減のあった CD45+CD11b-、CD11c-、Gr1-細胞の白血球細胞 (CD45+) 全体における割合をリプロットしたもので、CD11b-及びGr1-細胞は妊娠 6 日目で有意に低下していた。</p> <p>FIG2 : FIG1 で提示した妊娠 6 日目に著明に減少する細胞が何であるかを解析する為に非妊娠時と妊娠 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 日目に有意に低下していた。(B)はこれをヒストグラムで見たもので妊娠 6 日目には殆ど発現を認めていない。非妊娠時の CD45/CD49b と CD3、B220 の 3color ではその発現は殆ど認めなかった。</p> <p>FIG3:非妊娠時から 6 日目に著明に減少した細胞がNKであることを確認する為に、CD45/CD11b/CD49b の 3color で染色をした。まず非妊娠時の CD45+CD11b-細胞に CD49b の発現を認め、CD11b+もわずかに認めた。妊娠 6 日目の CD45/Cd11b/Cd49b の 3color 染色では Cd11b+、-いずれの分画にも CD49b は殆ど認められなかった。</p>		

FIG4：一子宮あたりの CD45/CD49b+ の細胞数を非妊娠時と 6 日目、12 日目でみると、絶対数および%は妊娠 6 日目に減少し 12 日目に著明な増加が認められた。

FIG5：NK 細胞の population を分類するため、CD11b、CD43、CD27、B220、CD127 を特異抗体で染色した。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為に 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 細胞は非妊娠時と異なるサブセットの NK 細胞であることが認められた。

FIG6：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 の発現は、非妊娠時と妊娠 6 日目で強く発現し、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。

FIG7：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-15Ra 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。非妊娠時と妊娠 12 日目の子宮の切片を IL-15 で組織染色し確認した。a、b、c が非妊時、d、e、f が妊娠 12 日目で、妊娠 12 日目で IL-15 の発現を認めた。IL15 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。

FIG8：NK 細胞は初期の免疫反応を制御する細胞としての重要性が明らかにされており、抑制性細胞としての IFN- $\gamma$  の発現が妊娠後の NK 細胞内にあるかを検討した。CD49b+NK 細胞内の IFN $\gamma$  の産生を確認したところ非妊娠時よりも妊娠 12 日目でより高い発現を認め、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考えられた。

#### 【結論】

- 1) BALB マウスにおいて CD45+CD11b- 及び 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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 妊娠後の子宮 NK 細胞内には IL-15 及び IFN $\gamma$  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し、その後に子宮に遊走される NK 細胞は非妊娠時とは異なるより成熟した NK 細胞であり、IFN $\gamma$  を産生し妊娠維持をサポートしていると考えられた。

公開審査は、平成 26 年 4 月 8 日（火）17 時から、審査担当者 5 名全員の出席のもと開催された。申請者による論文内容説明が行われた後、質疑応答が行われた。妊娠 6 日で NK 細胞が減少するメカニズムは、NK 細胞の減少は何を意味するのか。着床障害とのかかわりは。細胞数はその機能を反映するのか。などの質疑がなされ、申請者はすべての質問に的確に回答した。

審議の結果、マウスにおいて妊娠日齢に伴う NK 細胞の変動やその消失メカニズム、さらにその機能を明らかにした優れた論文であり、学位に値すると判断した。

