

正常妊娠および妊娠高血圧腎症における  
末梢血および脱落膜NK細胞subsetおよび  
natural cytotoxicity receptors の変化 (要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系産婦人科学専攻

高橋 英幹

修了年 2016年

指導教員 山本 樹生

【目的】 Natural killer (NK)NK 細胞は CD56 の発現レベルで CD56<sup>dim</sup> と CD56<sup>bright</sup> に分類され、CD56<sup>dim</sup> は成熟した NK 細胞である、一方 CD56<sup>bright</sup> は未熟な細胞で、サイトカイン産生を主として行っている<sup>1</sup>。妊娠初期脱落膜 NK 細胞のサブセットに関しては多くの報告があり<sup>2,3</sup>、CD56<sup>bright</sup>16-NK 細胞 (D56+CD3-CD16-NK 細胞) が子宮 NK 細胞として知られており、妊娠初期脱落膜リンパ球の 70~80%を占める<sup>4</sup>。しかし、妊娠末期脱落膜 NK 細胞サブセットの報告は免疫組織学的報告があるもののフローサイトメトリーによる報告はない。NK 細胞の細胞傷害性の活性化に関わる受容体は natural cytotoxicity receptors (NCRs) である。妊娠初期脱落膜の NCRs 検討はあるが正常末期妊娠の報告はない。このため最初に正常血圧末期妊娠の NK 細胞サブセットの変化と NCR の変化を検討した。

妊娠高血圧腎症 (PE) は、妊娠 20 週以降分娩後 12 週までに高血圧が見られ蛋白尿を伴う疾患であるが、その病因および病態に関しては不明な点が依然多く、種々の免疫の関与が報告されてきた<sup>5</sup>。しかし、脱落膜 NK 細胞サブセットや NCR に変化に関しては形態学的検討があるもののフローサイトメトリーによる報告はない。このため NK 細胞サブセットや NCR に変化を起こす可能性のある PE に注目し、NK 細胞サブセットの変化と NCR の変化を正常血圧末期妊婦と比較し検討した。

【方法】 Informed consent のもと当施設で正常血圧妊婦と PE 患者より末梢血及び脱落膜を採取した。末梢血と脱落膜は酵素処理後に比重遠心法にて、リンパ球を分離採取した。リンパ球を標識モノクローナル抗体にて標識し、FACS を用いて測定した。リンパ球領域に対する当該モノクローナル抗体陽性細胞の割合を求め検討した。細胞内サイトカイン産生についても、モノクローナル抗体を用いて染色し FACS にて測定・検討した。

【結果】 正常血圧妊婦で全リンパ球中の CD56+CD3-細胞の割合は、末梢血に比べ

脱落膜で減少傾向を認めた。CD56+CD3-細胞中の CD56+CD3-CD16+細胞の割合は末梢血に比べ脱落膜で有意に減少し、CD56+CD3-CD16-細胞の割合は末梢血に比べ脱落膜で有意に増加していた。CD56+CD3-細胞中の NKG2D(CD314)+細胞、NKp46(CD335)+細胞、NKp30(CD337)+細胞の割合は末梢血に比べ脱落膜で有意に低下し、NKp44(CD336)+細胞の割合は脱落膜で有意に増加していた。正常血圧妊婦でのサイトカイン産生では、CD56+細胞中の TNF- $\alpha$  産生細胞、IL-10 産生細胞および TGF- $\beta$  産生細胞の割合が末梢血に比べ脱落膜で有意に上昇していた。

正常血圧妊婦と PE 患者間での検討では、全リンパ球中の CD56+CD3-細胞の割合は、脱落膜で正常血圧妊娠に比べ PE で増加傾向を認めた。CD56+CD3-細胞中の CD56+CD3-CD16+細胞の割合は脱落膜において PE で有意に減少し、CD56+CD3-CD16-細胞の割合は脱落膜において PE で有意に増加していた。CD56+CD3-細胞中の NKG2D(CD314)+細胞の割合は末梢血において PE で有意に減少し、NKp30(CD337)+細胞の割合は脱落膜において PE で有意に増加していた。

【考察】CD56<sup>bright</sup>CD16-細胞と CD56<sup>dim</sup>CD16+細胞と区別を試みたが、筆者が検討した正常血圧妊婦末期脱落膜では (FACS calibur, CD56-FITC 使用)、明らかな群として区別できなかった。その理由としてフローサイトメーターの性能から明らかな群として区別出来なかった可能性。もう一つの理由として、正常血圧妊婦末期脱落膜では CD56<sup>bright</sup>細胞は妊娠初期の10分の1以下のため明確な群として検出できなかった可能性が考えられた。このため今回は CD56+CD3-細胞および CD56+CD3-CD16-細胞を CD56<sup>bright</sup>CD16-細胞を含む群として検討した。

Yamamoto らは末梢血 NK 細胞に比し、妊娠初期脱落膜 NK 細胞での CD56+CD3-CD16-NK 細胞比率の増加、CD56+CD3-CD16+NK 細胞比率の低下を報告している<sup>4</sup>。今回も正常血圧妊婦末期脱落膜 NK 細胞のサブセットにも同様の傾向が認められたが妊娠初期に比し CD56+CD3-CD16-NK 細胞比率は低値を示していた。

脱落膜 CD56+CD3-CD16-NK 細胞は末梢血に多く存在する CD56+CD16+NK 細胞より、サイトカイン産生能が高いことが報告され、妊娠維持に関与していると言われている<sup>1,5</sup>。妊娠初期に比べ CD56+CD3-CD16-NK 細胞比率の低値は、この細胞の妊娠維持機構への関与の必要性が減少している、もしくは分娩に向けての準備の可能性はある。

これまで、invasive trophoblast で NK 細胞受容体のリガンド発現が、栄養膜細胞(trophoblast)では NKp44 のリガンド発現が<sup>6</sup>、脱落膜組織では NKp30 や NKp44 の発現が報告されている。リガンドの受容体への結合は、NK 細胞レセプターを down-regulation することが報告されているので、今回確認された NK 細胞受容体の発現低下は、個々のリガンドの受容体への過剰結合による可能性がある<sup>7,8</sup>。NKG2D と NKp30 受容体の down-regulation は、胎盤 trophoblast 抗原の増加が起これ、この抗原に存在するリガンドの過剰発現によると考えられる。Vacca らは妊娠初期脱落膜 NK 細胞の絨毛組織対する細胞傷害性は減弱している<sup>6</sup>としており、末期妊婦でも細胞傷害性は減弱している可能性がある。

正常血圧妊婦末期脱落膜において、NK 細胞での NKp44 の発現が末梢血に比べ upregulate されていた。NKp44 の発現は活性化された NK 細胞でのみ認められる。このため正常血圧妊婦末期脱落膜において NK 細胞の一部は活性化されていると考えられる。正常血圧妊婦では IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10、TGF- $\beta$  などのサイトカインの産生が、末梢血と比べ脱落膜で増加していた。これは脱落膜 NK 細胞における NKp44 の発現増加と関連していると考えられる。

正常血圧妊婦では、妊娠末期においても、脱落膜において NK 細胞のサブセットである CD56+CD3-CD16-NK 細胞比率は高値を示し、さらに NCRs の発現は変化しており NKp46、NKp30、NKG2D は downregulate されており、NKp44 は upregulate されていた。しかし、脱落膜 NK 細胞はサイトカインを産生し、サイトカイン産

生において活性化されていると考えられる。

PE で脱落膜の NK 細胞サブセットを検討したところ CD56+CD3-CD16-細胞の割合は脱落膜において有意に増加していた。Lockwood らは免疫組織化学を用いて、PE 患者の脱落膜において CD56<sup>bright</sup>CD16-NK 細胞が減少していた報告している<sup>9</sup>。これは本検討とは異なる結果となっているが、組織学的検討とフローサイトメトリーの差（組織ではより深部の細胞を検討している可能性）、および検討した妊娠週数の差によるものと考えられ、Lockwood らは同等の妊娠週数を検討したが、筆者は正常血圧妊婦末期を比較したことによることが考えられる。現在、妊娠週数をマッチさせた検討を行っている。PE において、高血圧家族歴のある症例、PE の重症度や発症時期と NK 細胞サブセット、PE の胎盤所見で梗塞の有無にて検討したが、NK 細胞サブセットについて違いは認めなかった。

PE でNCR の検討をおこなったところ CD56+CD3-細胞中の NKG2D (CD314)+細胞の割合は末梢血において PE で有意に減少し、NKp30 (CD337)+細胞の割合は脱落膜において PE で有意に増加していた。PE において、高血圧家族歴のある症例において、末梢血で NKp30 (CD337) の割合が高値を示したため、高血圧の遺伝的な背景が関連している可能性がある。PE の重症度や発症時期と NK 細胞サブセットと NCRs の両方について検討を行ったが、有意差は認められなかった。PE の胎盤所見で、梗塞を認められた症例について検討したが、NCRs について違いは認められなかった。

PE 患者では胎盤からの栄養膜細胞(trophoblast)のデブリスの脱落が存在しており<sup>10</sup>、末梢血での NKG2D 受容体の down-regulation は、栄養膜細胞(trophoblast)の脱落増加と関連している可能性が考えられる。

PE 患者における脱落膜 NK 細胞での NKp30 受容体が正常血圧妊婦に比し up-regulation されていた。NKp30 にはいくつかアイソフォームがあり、NKp30a

と NKp30b にリガンドが結合することで IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  の産生が起こる<sup>11</sup>。PE では末梢血の TNF- $\alpha$  は増加し NK 細胞傷害活性が増加している。NKp30 発現増加はこれに関係している可能性がある。ストレスを受けた細胞が NKp30 のリガンドの一つであると報告されており、PE 患者では正常血圧妊婦より強い酸化ストレスが多く存在する。NKp30 の up-regulation は、PE で増加した酸化ストレスを受けた細胞からの産生物質の増加による可能性がある。Shemesh らは習慣流産患者の胎盤において、NKp30 の発現と、胎盤増殖因子(P1GF)との間に負の相関があったと報告している<sup>12</sup>。PE での P1GF の減少は脱落膜 NKp30 の up-regulation と関連している可能性がある。

**【結論】** 正常血圧妊婦末期脱落膜においても、CD56+CD3-CD16-細胞の割合は末梢血に比し高値を示し、NK 細胞のサブセットの変化が起きていたこと、脱落膜において、NKG2D、NKp46、NKp30 などの NCRs 発現は抑制されている一方、NKp44 発現が増加しサイトカイン産生が増加しており、NK 細胞が活性化されていることが判明した。筆者は、PE 患者において末梢血では栄養膜細胞(trophoblast)のデブリスの脱落の増加により NKG2D 発現は低下し、一方、酸化ストレスによる物質の産生増加が脱落膜 NK 細胞 NK p 30 発現増加に関係していると推察した。

#### **【引用文献】**

1. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. J Allergy Clin Immunol 2013; 132: 536-44.
2. Starkey PM, Sargent IL, Redman CW. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular

- lymphocytes by flow cytometry. *Immunology* 1988; 65: 129-34.
3. Nishikawa K, Saito S, Morii T, et al. Accumulation of CD16-CD56+ natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy decidua. *Int Immunol* 1991; 3: 743-50.
  4. Yamamoto T, Takahashi Y, Kase N, et al. Role of decidual natural killer (NK) cells in patients with missed abortion: differences between cases with normal and abnormal chromosome. *Clin Exp Immunol* 1999; 116, 449-452.
  5. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006; 12: 1065-74.
  6. Vacca P, Cantoni C, Prato C, et al. Regulatory role of NKp44, NKp46, DNAM-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells. *Int Immunol* 2008; 20: 1395-405.
  7. Groh V, Wu J, Yee C, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419: 729-34.
  8. Sandusky MM, Messmer B, Watzl C. Regulation of 2B4 (CD244)-mediated NK cell activation by ligand-induced receptor modulation. *Eur J Immunol* 2006; 36: 3268-76.
  9. Lockwood CJ, Huang SJ, Chen CP, et al. Decidual cell regulation of natural killer cell-recruiting chemokines: implications for the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Am J Pathol* 2013; 183: 841-56.

10. Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 2000; 21: 597-602.
11. Bulmer JN, Lash GE. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Mol Immunology* 2005; 42: 511-21.
12. Shemesh A, Tirosh D, Sheiner E, et al. First trimester pregnancy loss and the expression of alternatively spliced NKp30 isoforms in maternal blood and placental tissue. *Front Immunol* 2015; 6: 189.