

氏 名 (本籍) 倉 林 由 美 代

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 2 4 2 0 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 4 年 2 月 26 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 60 年 3 月 26 日
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 ヒト脱落膜単核球 (とくにNK細胞) における
Interleukin-2 receptor の発現と機能

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 矢 嶋 聰 教 授 折 笠 精 一

教 授 橘 武 彦

論文内容要旨

【目 的】

Interleukin-2 (IL-2) は、主に活性化された T 細胞から産生、分泌されるサイトカインであり、T 細胞のみならず、B 細胞や Natural killer 細胞 (NK) にも作用し、その増殖や活性増強を促す。細胞表面上のその特異的な受容体である Interleukin-2 receptor (IL-2R) は IL-2 に対する親和性から高親和性、中親和性、低親和性に分けられる。この IL-2R には少なくとも二つのサブユニット (p55, p75) が存在し、非活性化状態の T 細胞はそのいずれかのみを発現しているが、活性化 T 細胞は両者を発現し、高親和性 IL-2R ($K_d=10\text{pM}$) を形成してシグナルを伝達することが知られている。一方、妊娠は半同種移植片である胎児、胎盤が拒絶されることなく生着する特殊な免疫反応であり、その機序は不明である。そこで、免疫系の活性化の指標の一つとして脱落膜単核球の IL-2R の発現を調べ、末梢血単核球と比較し、脱落膜における妊娠の局所免疫環境について検討した。

【方 法】

(1)人工妊娠中絶時 (妊娠 6 - 10週) に患者の同意を得た後に内容物を採取し、肉眼的に胎児組織、絨毛組織を除去し、洗浄、細切、メッシュ濾過後、Ficoll-conray 法、Percoll 法にて単核球分画を得た。(2)正常妊婦末梢血、満期正常分娩時の臍帯血をヘパリン採血し、Ficoll-conray 法にて単核球分画を得た。(3)phycoerythrin (PE) 標識各種抗リンパ球表面マーカー抗体と、fluorescein isothionate (FITC) 標識 H-31 mAb (抗 IL-2R p55) TU27 mAb (抗 IL-2R p75) により単核球を直接蛍光抗体法で二重染色し、フローサイトメトリーを行い、単核球サブセットと IL-2R の発現を調べた。(4)脱落膜単核球を NK 細胞 rich とし、 $0-1\text{nM}$ の rIL-2 各種濃度存在下の [^3H]-Thymidine の取り込みを測定し、IL-2 に対する増殖反応を調べた。また、抗 IL-2R 抗体を十分量添加した後に 10pM の IL-2 存在下で同様に培養し、レセプターの抑制実験を行った。(5)NK 細胞により特異的に傷害される K562 細胞を標的細胞 (T) とし、脱落膜単核球、およびその母体末梢血単核球を攻撃細胞 (E) として ^51Cr 放出試験を行い、E : T 比 20 : 1 - 0.625 : 1 の各段階において両者の NK 活性を比較検討した。

【結 果】

(1)妊婦末梢血単核球では CD4 (+) $36.2 \pm 4.3\%$ (mean \pm SD), CD8 (+) $19.1 \pm 3.6\%$, CD56 (+) $18.1 \pm 10.1\%$ であり、臍帯血はそれぞれ、 $35.3 \pm 9.3\%$, $13.9 \pm 5.7\%$, $8.5 \pm 4.8\%$ とあまり差

を認めなかったが、脱落膜では $7.7 \pm 3.9\%$ 、 $11.9 \pm 6.2\%$ 、 $62.7 \pm 3.9\%$ と、末梢血、臍帯血に比して有意にCD56陽性細胞が増加していた。また、末梢血、臍帯血CD56陽性細胞はほとんどが同時にCD16も陽性であったが、脱落膜CD56強陽性細胞はCD16陰性であった。(2)末梢血、臍帯血CD4陽性細胞はIL-2R p55のみを、CD8陽性細胞はIL-2R p75のみを発現しており、正常非妊娠末梢血と同様であった。CD56陽性細胞は、末梢血、臍帯血ではp75のみが強く発現しており中親和性IL-2Rを形成しているが、脱落膜CD56強陽性細胞はp75の強い発現に加えて、弱くp55を同時に発現し、高親和性IL-2Rを形成していた。(3)脱落膜単核球(CD56強陽性細胞60-90%)はIL-2が1pMの低濃度から濃度依存性に増殖反応が増加し、1pMで2.3倍、10pMで5.5倍、100pMで10.7倍、1nMでは13.8倍となった。また、レプターの抑制実験では10pMのIL-2存在下の増殖反応は、H-31添加では26.4%に、TU27添加では32.5%に、そして両者の添加では16.3%と著明に抑制された。(4)脱落膜単核球のNK活性はいずれのE:T比においても母体末梢血より低く、20:1では脱落膜 $11.0 \pm 2.2\%$ 、末梢血 $17.8 \pm 4.8\%$ と有意に低下していた。(p<0.05)

【考 察】

母児間の接点である脱落膜においてはCD56強陽性細胞が62.7%と著増しており、母体末梢血と独立して非常に特殊な免疫環境にあると考えられる。しかも、この細胞は末梢血と異なりCD16陰性であり、さらにIL-2R p75に加えp55も発現し、機能的な高親和性IL-2Rを形成している。しかし、NK活性は末梢血より低い。この細胞の存在の意義として二点考えられる。一つには、正常の妊娠時はNK活性が低く、絨毛や胎児組織に対して傷害を示さないが、妊娠維持に破綻をきたしそうな状況においては、産生されるIL-2が微量の段階から盛んに増殖し活性を増強してNK細胞として活発に働くものと推測される。また、NK細胞は種々のサイトカインを産生することが知られており、脱落膜自体や絨毛細胞からもサイトカインが産生されているとも報告されつつあることから、脱落膜-絨毛系は複雑なサイトカインネットワークを構成していると考えられ、この脱落膜CD56陽性細胞はその中で重要な役割を担当していると思われる。

【結 論】

脱落膜中には、高親和性IL-2Rを持ち、末梢血のNK細胞とは性質の異なるNK細胞が高比率に存在し、しかもそのNK活性は低いことが明らかになった。この細胞が脱落膜-絨毛間の局所において複雑な免疫機構の重要な働きをしている可能性が示唆された。

審査結果の要旨

妊娠とは半同種移植片である胎児・胎盤が拒絶されることなく生着する特殊な免疫反応であり、その機序についてはいまだ十分には解明されていない。一方、重要なサイトカインである Interleukin-2 に対する受容体、Interleukin-2 receptor (IL-2R) の単核球表面上での発現状態は、免疫系の活性化の一つの指標とされている。本研究は、ヒト脱落膜単核球の IL-2R の発現とその機能を調べ、末梢血単核球と比較し、妊娠の局所免疫環境について検討したものである。

本研究ではまず、妊娠各時期の妊婦末梢血、正常満期産臍帯血、人工妊娠中絶時（妊娠 6～10 週）の脱落膜より単核球分画を得、各単核球表面マーカーと IL-2R サブユニットを直接蛍光二重染色し、フローサイトメトリー法を用いて単核球サブセットと IL-2R の発現を検討した。妊婦末梢血、臍帯血の各サブセット、IL-2R の発現は正常人末梢血と差を認めなかったが、末梢血では 18.1% である CD56 陽性細胞（Natural killer 細胞、NK 細胞）が脱落膜中には 62.7% と有意に増加していた。しかも、この細胞は、末梢血 NK 細胞が IL-2R サブユニット p75 のみを発現して IL-2 中親和性の receptor を形成していることと異なり、さらに p55 も発現して高親和性 IL-2R を形成していることを明らかにした。これは、脱落膜が末梢血と独立した特殊な免疫環境にあり、そこに集積する活性化された NK 細胞が重要であることを示唆するものである。

次に、この脱落膜 NK 細胞の IL-2 に対する増殖反応をトリチウム・チミジンの取り込みにより解析し、IL-2R の機能を検討したところ、IL-2 1pM の低濃度から増殖反応が増加し、lnM では 13.8 倍となった。しかも、この反応が抗レセプター抗体の添加で抑制されることから、in vitro でこの高親和性 IL-2R が機能的にシグナル伝達を行っていることを明らかにした。しかし、この細胞の K562 に対する細胞傷害活性は、クロム放出試験において母体末梢血 $17.8 \pm 4.8\%$ に比し、 $11.0 \pm 2.2\%$ と有意 ($p < 0.05$) に低下していることを指摘した。この、脱落膜中に著増する NK 細胞が、機能的な高親和性 IL-2R を形成しているにもかかわらず、その NK 活性が低いということは、注目すべき事実である。このことから、正常妊娠においては脱落膜 NK 活性が抑制されていて胎児・胎盤の拒絶が抑制されているものの、妊娠維持に破綻がおりかけると、この細胞がその高い IL-2 反応性により増殖、活性増強、サイトカイン産生増加をおこして妊娠を維持させようとするものと推測し、この細胞こそが、複雑な妊娠免疫機構の中心的な免疫担当細胞である可能性を示唆している。

以上本研究は、ヒト組織を用い、その脱落膜組織における、末梢血 NK 細胞と性質の異なる特殊な NK 細胞の集積、およびその重要性を明らかにしたものであり、妊娠免疫の研究に貴重な資料を提供するものと考えられ、学位論文に十分値すると判断される。