

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	生育科学領域生殖機能病態学教育研究分野 氏名 鴨井舞衣
<p>(論文題目)</p> <p>NK22 cells in the uterine mid-secretory endometrium and peripheral blood of women with recurrent pregnancy loss and unexplained infertility</p> <p>(不育症患者および原因不明不妊女性における黄体中期子宮内膜と末梢血 NK22 細胞に関する検討)</p>	
<p>【諸言】</p> <p>不育症のリスク因子には、夫婦染色体異常、子宮形態異常、内分泌異常、凝固異常などがある。不育症のうちリスク因子が同定されるものは約 4 割にすぎず、残りの 6 割はリスク因子不明不育症と診断される。近年、NK 細胞の異常（数・レセプター発現・サイトカイン産生等）によって、妊娠成立・維持機構に障害を来し、不妊や流産を引き起こす事が報告されている。我々は以前より不妊症・不育症の病態に NKp46 陽性 NK 細胞の発現異常や NK 細胞産生サイトカイン産生異常が関与する事を示してきた。</p> <p>近年、IL-22 産生性 NKp46⁺NK 細胞（NK22 細胞）が主に消化器や呼吸器、肝臓、皮膚などの粘膜関連リンパ組織に存在し、恒常性の維持や組織の再生、感染防御など粘膜上皮の恒常性を維持するために重要な役割を果たしていることが報告された。また、NK22 細胞は、疥癬、クローン病、慢性関節リウマチ、肝炎、アトピー性皮膚炎などの慢性炎症、GVHD などの自己免疫性疾患に関与している事が報告されている。しかし生殖領域においては、NK22 細胞が子宮内膜に存在するとする報告があるのみである。本研究では、NK22 細胞の生殖に関する機能の一端を明らかにすることを目的に、NK22 細胞と NK 細胞産生サイトカインおよび NK 細胞における NKp46 発現との関連性を検討した。</p> <p>【方法】</p> <p><u>対象</u></p> <p>2012 年から 2014 年までの間に、当院産科婦人科通院中の 2 回以上の流産歴を持つ症例（不育症群）43 例、及び原因不明不妊症症例（原因不明不妊群）38 例を対象とした。当院倫理委員会および患者の同意のもと、非妊時黄体中期に末梢血及び子宮内膜を採取し、本研究に供した。</p> <p><u>NK 細胞刺激方法の検討</u></p> <p>NK22 細胞測定のための最適な NK 細胞刺激法をみる目的で IL-23 と PMA/Ionomycin の 2 種類の細胞刺激方法を用いて IL-22 産生 NK 細胞の割合を測定した。</p> <p><u>NK 細胞における NKp46 発現、NK 細胞サイトカイン産生と NK22 細胞</u></p> <p>末梢血からは Ficoll を用いてリンパ球浮遊液を作成した。子宮内膜は物理的に粉碎し子宮内膜細胞浮遊液を作成した。CD45、CD56、NKp46 を用いて NK 細胞を標識し、フローサイトメトリーにて NK 細胞表面抗原発現の測定を行った。また NK 細胞産生サイトカインについては、末梢血リンパ球および子宮内膜細胞浮遊液を Brefeldin-A 存在下で PMA/Ionomycin で刺激、その後 CD45、CD56 で NK 細胞表面抗原を、次いで細胞内サイトカイン（IL-22、TNF-α、IFN-γ、IL-4、IL-10、TGF-β_1）を標識しフローサイトメトリーにて測定した。</p>	

統計解析

患者背景、両群間の NK 細胞における IL-22 産生の検定は Mann-Whitney U 検定を用いた。また、細胞刺激法の相関、NK22 細胞と NK 細胞産生サイトカイン、NKp46 発現との相関は Pearson 積率相関分析を用いた。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

患者背景

両群間の年齢、Body Mass Index には差を認めなかった。妊娠回数、分娩回数、流産回数は不育症群で有意に多かった。

NK 細胞刺激方法の検討

IL-23 刺激と PMA/Ionomycin 刺激による IL-22 産生は正の相関を認めた ($r = 0.847$, $p = 0.001$)。

NK 細胞における NKp46 発現、NK 細胞サイトカイン産生と NK22 細胞

末梢血 NK 細胞 (CD56⁺細胞、CD56^{bright}細胞、CD56^{dim}細胞) における IL-22⁺細胞は両群間で差を認めなかった。一方、子宮内膜 CD56⁺/IL-22⁺細胞は不育症群で原因不明不妊群に比して有意に高値であった ($p = 0.036$)。また不育症群の CD56^{dim}/IL-22⁺細胞は原因不明不妊群と比較して有意に高値 ($p = 0.043$)、CD56^{bright}/IL-22⁺細胞は高値 ($p = 0.055$) であった。

不育症群では末梢血 CD56^{bright}/IL-22⁺細胞と IFN- γ ($r = -0.343$, $p = 0.054$) および TNF- α ($r = -0.407$, $p = 0.020$) 産生 NK 細胞との間に負の相関を認めた。また子宮内膜 CD56^{bright}/IL-22⁺細胞と IFN- γ ($r = -0.399$, $p = 0.006$) および TNF- α ($r = -0.347$, $p = 0.017$) 産生 NK 細胞との間に負の相関を認めた。しかしこれらの相関は原因不明不妊群では認められなかった。

末梢血 CD56^{bright}/IL-22⁺細胞と NKp46⁺NK 細胞との間に負の相関を認めた ($r = -0.271$, $p = 0.008$)。

【考察】

本研究は不育症患者では黄体中期の子宮内膜の NK22 細胞の割合は原因不明不妊患者のそれと比べて有意に高いことを初めて報告した。このことから、不育症では原因不明不妊と異なった NK22 細胞の調節機構が作動している可能性があると考えられた。

特に、不育症群では NK22 細胞と NK 細胞による IFN- γ 、TNF- α 産生が負の相関を示した。この事は原因不明不妊患者では認められなかった。一方、我々は既に不育症群では NKp46 が減少することにより IFN- γ や TNF- α 産生が増加し流産を惹起している可能性を示してきた。これらのことから、不育症患者では NKp46 の低下により NK22 細胞が増加し、IFN- γ や TNF- α を低下させる方向に向かう可能性が示唆された。すなわち不育症ではサイトカイン産生異常を是正する何らかの制御的な役割が存在している可能性が示唆された。