

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	成育科学領域生殖機能病態学分野 氏名 當麻 絢子
<p>(論文題目)</p> <p><b>A semen-based stimulation method to analyze cytokine production by uterine CD56<sup>bright</sup> natural killer cells in women with recurrent pregnancy loss</b>          (子宮内膜 CD56 陽性 NK 細胞の精液刺激法によるリスク因子不明不育症患者のサイトカイン産生能の検討)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>リスク因子不明不育症の中には免疫学的な要因を有するものがあると考えられる。中でも NK 細胞の機能発現異常やサイトカイン産生などの機能分担異常が不妊症や不育症の病態に関連していることが示唆されている。</p> <p>NK 細胞は細胞表面に発現する CD56 の発現強度の違いにより、CD56<sup>bright</sup> 細胞と CD56<sup>dim</sup> 細胞とに分類され、産生するサイトカインによって NK1 細胞と NK2 細胞とに分類される。NK1 は IFN-<math>\gamma</math>、TNF<math>\alpha</math> といった炎症性サイトカインを産生し、NK2 は IL4、IL10 といった抗炎症性サイトカインを産生する。妊娠すると正常であれば NK 細胞は NK2 細胞が優位となる NK2 シフトが起こるが、着床不全症例や不育症症例では NK1 シフトとなることが知られている。</p> <p>免疫担当細胞のサイトカイン産生を測定する際には薬物で細胞を刺激するのが一般的だが、この刺激法は人為的であり生理的なサイトカイン産生を見ているとは言い難い。</p> <p>妊娠成立においては精液の暴露は必須で有り、妊娠の成立・維持において精液が子宮内膜 NK 細胞に何らかの影響を及ぼすことは考えられる。そして我々は、排卵前の避妊のない性交（精液暴露）により子宮内膜 NK 細胞においてサイトカイン産生性の CD56<sup>bright</sup> 細胞が増加し、細胞傷害性の CD56<sup>dim</sup> 細胞が減少することを報告している。</p> <p>そこで不育症患者の子宮内膜 NK 細胞のサイトカイン産生能を測定する際に精液を細胞刺激物質として使用することができるか、そして生理的かつカップル特異的な NK 細胞刺激法があるのか、さらにリスク因子不明不育症において刺激法によりサイトカイン産生能に差が生じるのかを明らかにすることを目的に検討を行った。</p> <p>患者の同意を得たうえで子宮内膜を採取後子宮内膜リンパ球浮遊液を作成し、精液を用いて 18 時間刺激を行いこれらの抗体で染色し、NK 細胞(CD56+細胞)におけるサイトカイン産生(IFN-<math>\gamma</math>・TNF-<math>\alpha</math>・IL-4・IL-10)をフローサイトメトリーにて測定した。薬物(PMA、イオノマイシン)でも刺激を行い、未刺激群ともに精液刺激とのサイトカイン産生能の差異を比較した。</p> <p>まず、子宮内膜 NK 細胞の刺激法に差があるのか否かを検討してみたところ精液刺激では未刺激と比べて優意にそれぞれのサイトカインが産生された。また IFN-<math>\gamma</math> と TNF-<math>\alpha</math> では試薬による刺激よりも精液刺激においてサイトカイン産生が少ないが、IL-4、IL-10 では差を認めなかった。</p> <p>これらの結果を踏まえ、NK1 細胞/NK2 細胞比を検討してみたところ、いずれも精液刺激の方が試薬刺激よりも小さい値となった。</p> <p>このことから生体内の NK1 細胞/NK2 細胞比はこれまで試薬を用いて刺激、測定して</p>	

きたものとは異なり、実際には精液がより NK2 シフトを誘導している可能性が示された。

次に子宮内膜 NK 細胞と精液の組み合わせでサイトカイン産生能に差が生じるのかを検討した。同一の内膜を用いても刺激する精子が異なると、サイトカイン産生細胞の割合が異なる結果となった。これらより子宮 NK 細胞によるサイトカイン産生からみた精液と子宮内膜の相性が存在する可能性が示唆された。

さらにリスク因子不明不育症において、刺激法によるサイトカイン産生能の差を検討した。この実験では患者子宮内膜とパートナーの精液を使用した。それぞれのサイトサイトカイン産生能をコントロール群、免疫学的異常を有する不育症患者群、リスク因子不明不育症患者群で比較した。

NK1 細胞産生サイトカインは試薬刺激、精液刺激ともに 3 群間に有意差は認めなかった。NK2 細胞産生サイトカインにおいては、試薬刺激では 3 群間に差を認めないが、精液刺激ではリスク因子不明不育症患者の群が他群に比較しサイトカイン産生が少ないことが分かった。これを踏まえて NK1 細胞/NK2 細胞比を比較したところ、有意差はないがリスク因子不明不育症患者群では精液刺激において高い NK1/NK2 比を認めた。

免疫異常を有する不育症患者では、NK1 シフトが起こっていることが知られているが、以上の結果より、免疫学的異常を指摘されていないリスク因子不明不育症患者の中には精液刺激により NK1 シフトを惹起されている人がいる可能性が示唆された。

本来は精液暴露により NK2 シフトが起こり妊娠を維持する方向に向かうが、免疫異常を有している母体では NK1 シフトが起こるため流産が惹起されと考えられる。今回の結果より、元々免疫異常を有していないリスク因子不明不育症患者でも、精液刺激により NK1 シフトを起こし、妊娠を維持できなくなっている可能性が示唆された。

内膜 NK 細胞と精液の組み合わせによりサイトカイン産生に差が生じることより、免疫学的な相性は存在し、リスク因子不明不育症にも影響していると考えられる。これは免疫学的異常の新たな概念であり、カップル特異的な差異だと思われる。

以上よりカップル特異的な不妊症・不育症の検査として、精液刺激は生理的な検査法となりうる可能性が示唆された。