

表 題 妊婦末梢血 natural killer 細胞の網羅的
microRNA-遺伝子発現解析

論文の区分 博士課程

著 者 名 石田 洋一

担当指導教員氏名 鈴木 光明 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
生殖・発達医学 分野
母子保健学

2015年1月9日申請の学位論文

目次

	頁
I. 要旨	2
II. 緒言	4
III. 材料と方法	8
IV. 結果	13
V. 考察	26
VI. 結語	30
VII. 補足資料	31
VIII. 謝辞	39
IX. 引用文献	40

I. 要旨

蛋白質をコードしない領域から転写された短鎖 RNA である microRNA (miRNA) は、miRNA と相補的な配列を持つ遺伝子 (標的となる mRNA) の非翻訳領域 (3'-UTR) と結合し、遺伝子発現を微調整しており近年注目を集めている。Natural killer 細胞 (NK 細胞) は大型の細胞内顆粒を持つリンパ球であり、自然免疫のエフェクター細胞として、癌細胞やウイルス感染細胞を殺傷し排除する役割と同時に、獲得免疫においても調節役としての重要な機能を担っている。NK 細胞は血液中に存在し (pNK 細胞)、リンパ球の 5~20% を占めているが、妊娠期間中の pNK 細胞において、miRNA の発現様式や、転写後遺伝子発現調節については不明のままである。

自治医科大学および日本医科大学の倫理委員会の承認を得た後、妊娠初期、中期、後期、産後 4 日目の末梢血 NK 細胞を採取し実験に用いた。今回、妊婦 pNK 細胞においてどのような miRNA が発現し、NK 細胞内の遺伝子ネットワークを転写後調節しているのかを明らかにすることを目的とした。即ち、PCR アレイ miRNA 解析と DNA アレイ解析を組み合わせた網羅的 miRNA-遺伝子発現解析を、特に本来 NK 細胞に存在しないはずの胎盤由来第 19 番染色体上の miRNA (C19MC miRNA) が、妊娠中 pNK 細胞に取り込まれるのかに焦点を絞って解析を行った。さらに、妊婦 pNK 細胞における miRNA による遺伝子ネットワーク調節の解析を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用いて miRNA および遺伝子アレイより得られたデータをもとにして行った。

PCR miRNA アレイ解析から、妊娠初期と比較して後期 pNK 細胞において、胎盤由来の 6 種類の C19MC miRNA を含む 25 種類の miRNA の発現が有意に上昇していた。妊娠後期と産後 4 日の比較解析から、9 種類の miRNA が産後 4 日 pNK 細胞で有意に減少し、減少した 9 種類の miRNA のうちには 8 種類の C19MC miRNA が含まれていた。母体 pNK 細胞における C19MC miRNA の取り込みとクリアランスは、おそらくエクソソームを介して pNK 細胞への取り込みが増加し、分娩後は胎盤からの供給がなくなるためクリアランスされると考えられる。DNA アレイ解析から、妊娠初期と比較して後期 pNK 細胞において 69 種類の NK 細胞機能関

連遺伝子の有意な変動を認め、これらには細胞周期に関連した遺伝子とともに細胞表面に発現している様々な受容体をコードしている遺伝子が含まれていた。さらに、IPA Core Analysis 解析から妊娠後期に向けて pNK 細胞において細胞周期・細胞増殖が亢進していることが示唆された。一方、細胞周期・細胞増殖に関連する遺伝子以外の NK 細胞機能関連遺伝子の動向に関しては、細胞周期・細胞増殖関連遺伝子ほど単純でないが、妊娠後期 pNK 細胞の細胞障害活性に関与する遺伝子発現に変動が見られた。In silico 解析により、妊娠後期 pNK 細胞において、9 種類の発現低下した NK 細胞機能関連遺伝子の 3'-UTR に、結合部位を持つ 12 種類の発現上昇 miRNA を見出した。発現上昇した 12 種類の miRNA の中には C19MC miRNA である *miR-512-3p* が含まれており、Killer 細胞免疫グロブリン様受容体遺伝子である *KIR2DS4* が標的遺伝子候補であった。

胎盤由来 C19MC miRNA は妊娠時期に依存して pNK 細胞に取り込まれることをはじめて明らかにすることができた。妊娠時期依存的に pNK 細胞は miRNA-遺伝子ネットワークの発現を調節・適合させている可能性が示唆された。今回の研究は妊娠維持や分娩発生の分子機序における母体 pNK 細胞の役割解明に新たな知見を提供した。

II. 緒言

Natural killer 細胞 (NK 細胞) は大型の細胞内顆粒を持つリンパ球であり、自然免疫のエフェクター細胞として、癌細胞やウイルス感染細胞を殺傷し排除する役割を担っている。さらに、最近の知見では、自然免疫のみならず獲得免疫において樹状細胞の編集(1-3)、T 細胞との免疫応答(4-7)、さらには記憶免疫機能も見出されており(8-10)、獲得免疫においても重要な調節役としての機能を担っている(11, 12)。NK 細胞は、その細胞障害活性の発現において、他の細胞が細胞表面に発現している自己と他者を区別する標識である主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス I 分子を見分けることにより作用していると考えられている。NK 細胞は細胞表面に Killer 細胞免疫グロブリン様受容体 (killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR) をはじめとする様々な受容体を持っており、これら受容体が MHC クラス I 分子を認識すると、NK 細胞はその細胞への障害活性が抑制される。言い換えれば、NK 細胞は MHC クラス I 分子を持たない細胞を攻撃する (missing self 仮説) と考えられている(13-15)。このように NK 細胞の細胞障害活性やサイトカイン産生能は細胞表面に発現している様々な受容体によって調節されている。

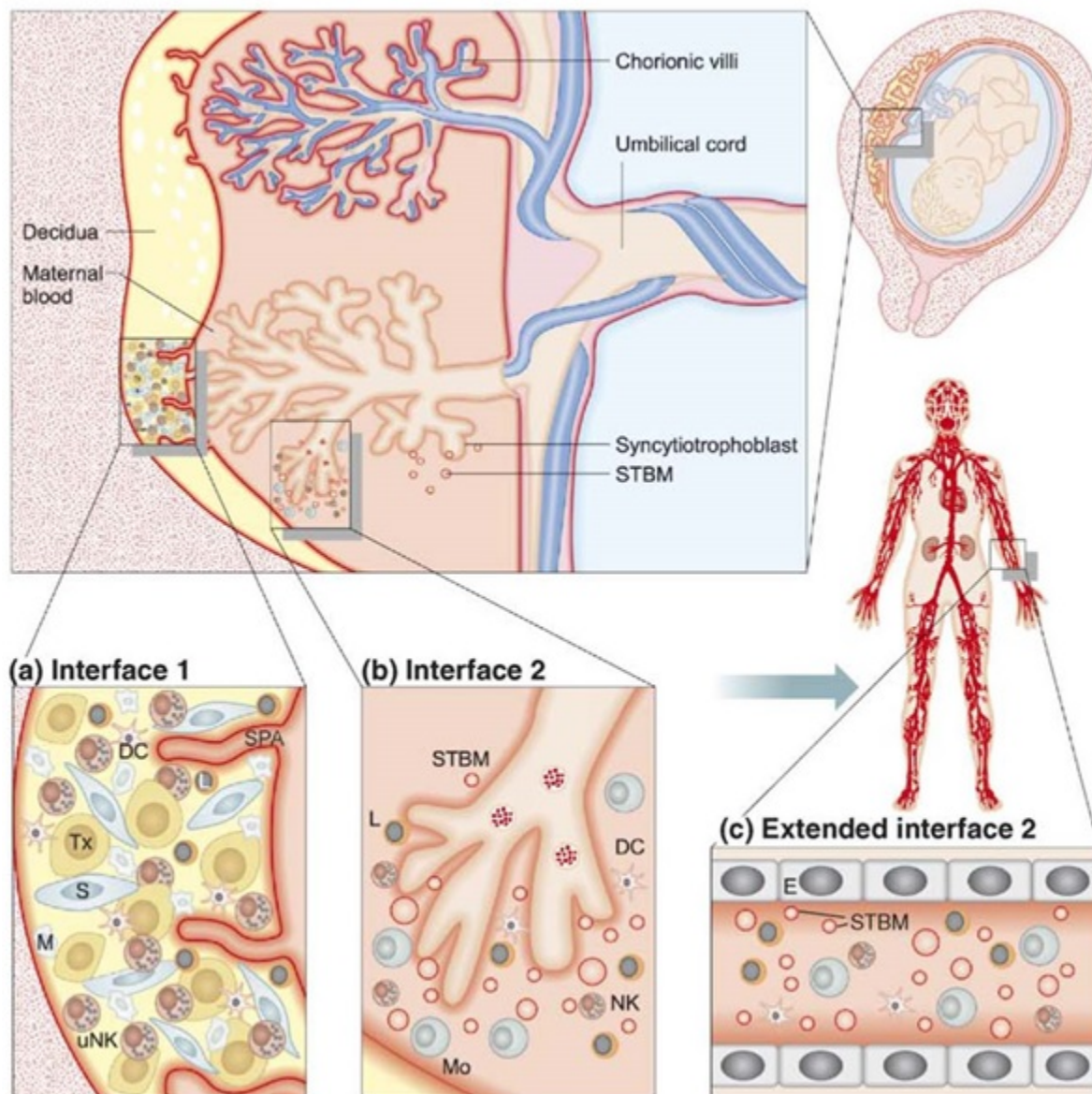


図 1 母体 NK 細胞

母児間のインターフェイスである胎盤の脱落膜に存在するNK細胞（dNK細胞）ともう一つのインターフェイスである絨毛膜絨毛と直接接している母体血液中のNK細胞（pNK細胞）。

（Sargent et al. *Trend Immunol* 27: 399-404, 2006 より引用）

L; T lymphocyte
M; macrophage
DC; dendritic cell
S; stromal cell
NK; NK cell
Mo; monocyte
E; endothelial cell

uNK; uterine NK cell(子宮 NK 細胞)
Tx; invasive extravillous cytotrophoblast(絨毛外栄養膜細胞)
STBM; syncytiotrophoblast microparticle(合胞体栄養膜細胞の微粒子)
SPA; spiral artery(ラセン動脈)

通常ヒト NK 細胞はそのマーカーである CD16 (FCGR3A) と CD56 (NCAM1) を発現し、遺伝子再構成で形成された T 細胞抗原受容体を持たないリンパ球として分離可能である(16)。NK 細胞は血液中に存在し (pNK 細胞)、リンパ球の 5~20%を占めている(17)。同時に、リンパ節、脾臓、子宮など組織中にも存在している(18, 19)。妊娠において、子宮に存在する NK 細胞、特に母児間インターフェイスである胎盤の脱落膜に存在する脱落膜 NK 細胞 (dNK 細胞) は、妊娠初期の胎盤形成 (MHC クラス I 分子 [HLA-E、HLA-G] を発現している絨毛外栄養膜細胞の子宮内膜への浸潤調節、絨毛外栄養膜細胞によるらせん動脈のリモデリング) において重要な役割を果たしている(20, 21) (図 1)。胎盤におけるもう一つの母児間インターフェイスである絨毛膜絨毛は母体血に直接接しており、pNK 細胞とクロストークが可能である (図 1)。絨毛表面を覆っている栄養膜 (合胞体性栄養膜) は MHC クラス分子を発現しておらず母体キラー T 細胞からの攻撃 (拒絶反応) を免れて妊娠が維持されている。しかし、MHC クラス分子の発現がないことは pNK 細胞の細胞障害活性に抵抗しなければならぬ(22)。Hedlund らは栄養膜から放出されるエクソソーム (多胞体由来の 30~100 nm 径の小胞) 上の KLRK1 リガンドが NK 細胞の KLRK1 受容体の発現を減少させ、NK 細胞の攻撃を避けることが可能であることを報告した(23)。

蛋白質をコードしない領域から転写された RNA (ノンコーディング RNA; ncRNA) の中で、長さ 22 塩基程度の 1 本鎖 RNA である microRNA (miRNA) は、miRNA と相補的な配列を持つ遺伝子 (標的となる mRNA) の非翻訳領域 (3'-UTR) と結合し、遺伝子発現を微調整している(24)。この miRNA の転写後翻訳調節は、様々な細胞の生理機能や疾患の分子病態に関与することが示唆されている。miRNA は、線虫の発生に関与する RNA として *cel-lin-4* が初めて報告され(25, 26)、現在までに約 2500 種類のヒト成熟 miRNA が miRNA データベース (miRBase Release 21; <http://www.mirbase.org/index.shtml>) に登録されている。Landgraf らは、哺乳動物 (ヒト、ラット、マウス) の各種臓器、および培養細胞の低分子 ncRNA ライブラリーを作製し、miRNA は組織の分化・機能と形態の維持に重要な役割を果たしていることを報告した(27)。このことは、miRNA が細胞・組織 (臓器) 特異的な発現様式を示しており、細胞の特異的機能、細胞の発生・分化などに深く

関わることを示唆している。ヒト NK 細胞における miRNA の発現解析はリンパ球のゲノムワイドな miRNA の発現比較解析の一部として報告されている(28, 29)。さらに、インターフェロンで活性化した NK 細胞の次世代シーケンスを用いた網羅的 miRNA 発現解析がなされ、*miR-378*、*miR-30e* が細胞障害活性の抑制調節因子であることが報告されている(30)。しかし、一部の環境下における NK 細胞の miRNA の発現パターンが明らかにされたのみであり、様々な NK 細胞における miRNA の発現様式や、転写後遺伝子発現調節については不明のままである。

今回、妊娠における母体 NK 細胞においてどのような miRNA が発現し、NK 細胞内の遺伝子ネットワークを転写後調節しているのかを明らかにするため、網羅的 miRNA および遺伝子解析を行った。miRNA の 5'側から 7~8 塩基までの「シード (seed) 配列」と呼ばれる部分については、miRNA が認識する標的遺伝子の配列との間にほぼ完全な相補性が存在し、標的遺伝子の特異性決定に重要であるが、それ以外の配列は完全な相補ではない(24)。small interfering RNA と異なり、この miRNA の不完全な相補性は、1 種類の miRNA が複数の遺伝子を標的とし、逆に 1 種類の遺伝子が複数の miRNA によって制御される「多対多」の転写後翻訳調節ネットワークが構築されることになる。この複雑なネットワークを網羅的に解析することは容易でない。そこで我々は妊婦 pNK 細胞における miRNA による遺伝子ネットワーク調節の解析を Ingenuity Pathway Analysis (IPA; www.ingenuity.com) ソフトウェアを用いて miRNA および遺伝子アレイより得られたデータをもとにして NK 細胞の機能への影響やパスウェイ解析を行った。

III. 材料と方法

1) pNK 細胞の分離

自治医科大学および日本医科大学の倫理委員会の承認を得た後、末梢血 NK 細胞を採取した。血液採取にあたり、妊婦より書面によるインフォームドコンセントをとった。

アレイによる網羅的発現解析には妊娠初期（7～11 週）、中期（19～23 週）、後期（36～38 週）および産後 4 日目において採取した血液サンプル [同一妊婦からの初期、中期、後期の 5 サンプルずつ（n=5）と妊娠中採取した妊婦とは異なる女性からの産後 4 日目の 5 サンプル（n=5）] を用いた。

Reverse transcription quantitative PCR（リアルタイム PCR）による miRNA の発現検証にはアレイによる網羅的発現解析を行ったサンプルとは別のサンプルセットを使用した。妊娠初期、中期、後期および産後 4 日目において採取した血液サンプル [妊婦からの初期、中期、後期の 5 サンプルずつ（n=5）と妊娠中採取した妊婦とは異なる女性からの産後 4 日目の 5 サンプル（n=5）] を用いた。pNK 細胞の分離は EDTA 入りの採血管に採取した血液を遠心し血液バフィーコートを回収、Lymphoprep（Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway）を用いてヒト単核球を分離した。分離した単核球を Dynabeads Untouched NK Cells kit（Invitrogen, Carlsbad, CA ; 図 2）を用いてネガティブアイソレーション（CD3、CD14、CD36、CDw123、HLA ClassIIDR/DP、CD235a に対するモノクローナル抗体ミックスによる NK 細胞以外の単核球を除去）にて pNK 細胞を分離した(31)。サンプルからの total RNA の抽出は RNAiso reagent（TaKaRa, Shiga, Japan）を用いて抽出した。RNA の品質チェックは Agilent 2100 Bioanalyzer（Agilent Technologies, Santa Clara, CA）を用いて行い、RIN（RNA Integrity Number; RNA 分解度）値が 7 以上のサンプルを解析に用いた。

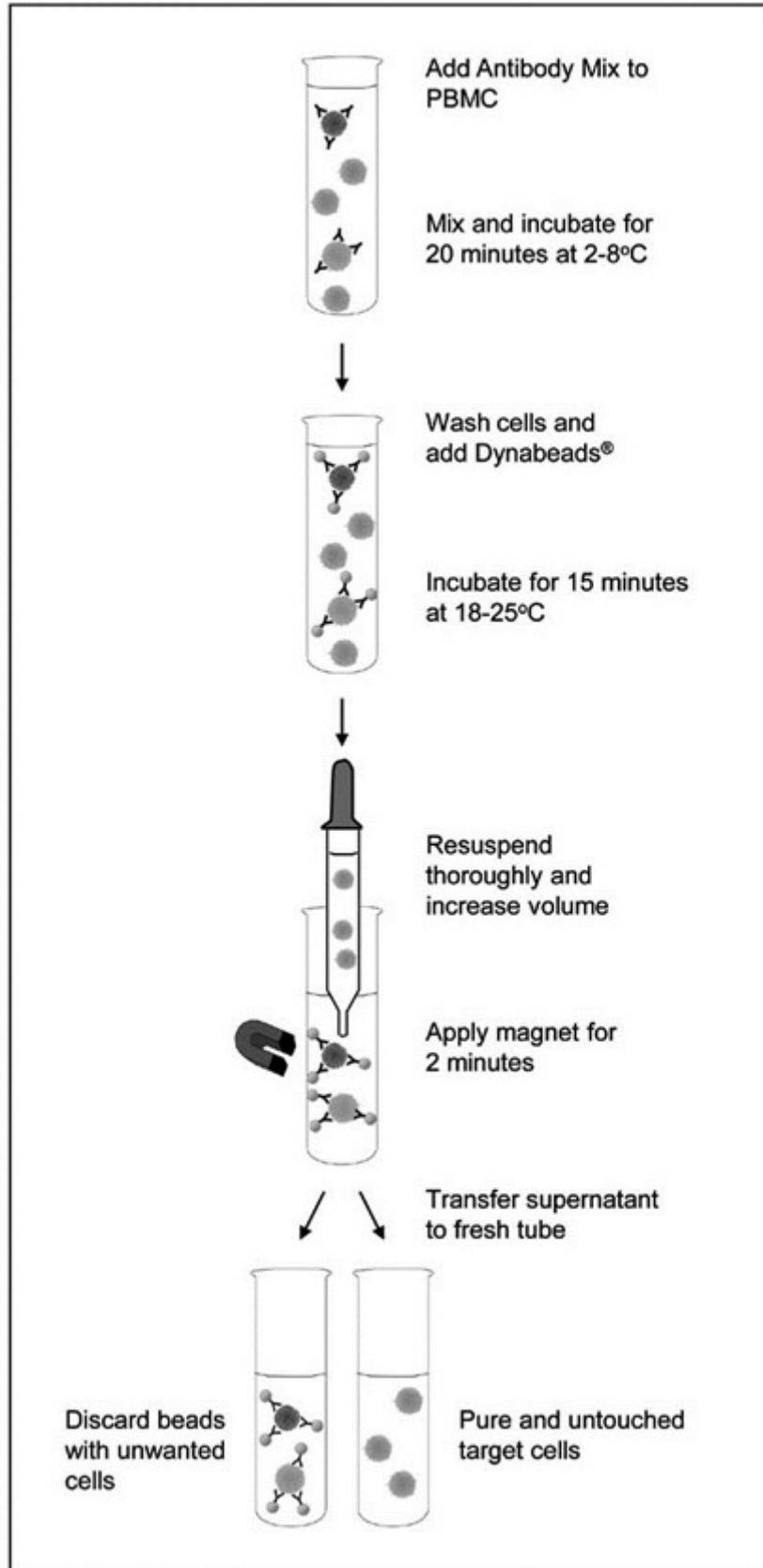


図 2 磁気ビーズによる NK 細胞分離の概要 (Invitrogen マニュアルより引用)

2) miRNA の PCR アレイ解析による網羅的発現比較解析

初期、中期、後期、産後 4 日目の miRNA の発現を比較するために PCR アレイ解析を行った。症例毎に 30 ng の微量 RNA を解析するために pre-amplification を行い、リアルタイム PCR システム 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて TaqMan Array Human MicroRNA Cards (A and B, version 2.0) により 756 種類のヒト miRNA の発現を解析した。カードは miRNA のプライマー・プローブセットを充填した 384 ウェルプレートを用いて行った (図 3)。

miRNA の注釈および分類は miRBase (Release 14) を用いた。RQ Manager 1.2 ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて比較 Ct 法 ($\Delta\Delta Ct$ method) にて相対的発現定量解析を行った(32)。データの標準化は内因性 small nuclear RNA *RNU6-2* を用いて行った。

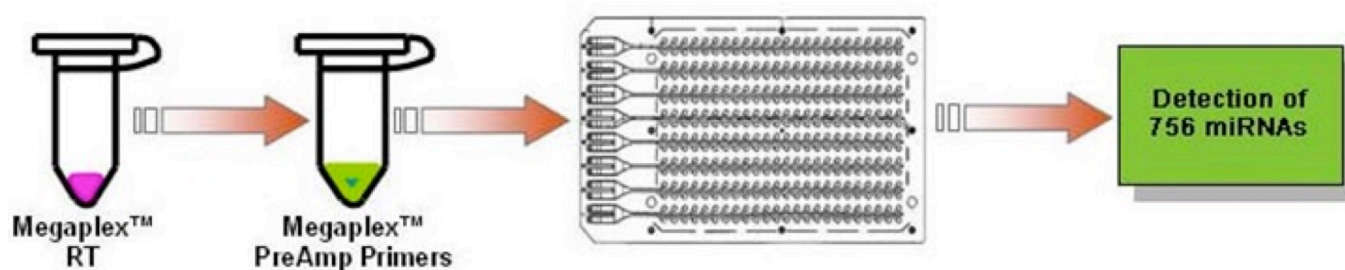


図 3 PCR アレイの概要

(<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4398965> より引用改変)

3) リアルタイム PCR による miRNA の発現検証

PCR アレイ解析による miRNA (妊娠中の pNK 細胞で検出された *miR-517a-3p*、*miR-518b*) の発現検証にリアルタイム PCR を行った。症例毎に 10 ng の total RNA から逆転写反応した cDNA テンプレートをサンプルとし、TaqMan 2× Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem) にて反応液を作製した後、7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystem) でリアルタイム PCR を行った。データの標準化は内因性 small nucleolar RNA *SNORD44* を用いて行った。

4) DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現比較解析

妊娠初期と後期の遺伝子発現を比較するために DNA アレイ解析を行った。症例毎に 20 ng の total RNA を 1 色法にて Cy3 で標識し、Agilent microarray (Human GE 4 x 44K, Santa Clara, CA, USA) にハイブリダイゼーションさせ、G2565BA DNA マイクロアレイスキャナシステム (Agilent Technologies) にて蛍光画像を取得した。このデータを GeneSpring GX ソフトウェア (version 11.5; Agilent Technologies) を用いて 75 パーセントイル補正を実施し、 P 値 (< 0.05) でフィルターをかけ Fold 解析を行った。

5) IPA によるパスウェイ・ネットワーク解析

妊娠初期と後期の遺伝子発現を比較した DNA アレイデータ P 値 (< 0.05) を用いて、影響を受けた生物学的機能・過程、分子間ネットワークおよびシグナルパスウェイを検索するための Core Analysis 解析 (IPA ソフトウェア) を行った。NK 細胞の機能に関連する遺伝子が妊娠期間中どのような影響を受けたのか検索するため、従来報告されている NK 細胞の機能に関連する 715 種類の遺伝子 (パーフォリン/グランザイムによる細胞障害経路、サイトカイン・ケモカインとその受容体、分泌経路、Fc 受容体、活性化・抑制性受容体、接着分子、シグナル伝達経路 [JAK/STAT pathway、TGF β pathway、PI3K-pathway activation、NFAT activation in NK cells、NF- κ B pathway regulation]) (33, 34)のうち、DNA アレイ解析で有意に変動した 69 種類の NK 細胞機能関連遺伝子に注目し (表 1)、そのデータセットを用いて解析を行った。

miRNA と標的遺伝子の関係は逆相関しており (miRNA の発現が上昇すれば標的遺伝子により結合しその発現は抑制され、miRNA の発現が減少すれば標的遺伝子への結合は減少し発現は上昇する)、IPA 解析で形成された pNK 細胞の遺伝子ネットワークにおいて、PCR アレイ解析から有意に変動した miRNA の発現と逆相関する標的遺伝子候補の検索を、主に熱力学的パラメーターに基づくアルゴリズム [TargetScan (<http://www.targetscan.org/> ; IPA に使用されているアルゴリズム) と microRNA.org database (August 2010 Release; <http://www.microrna.org/microrna/getMirnaForm.do>)]により in silico 解析を行い、標的遺伝子候補を予測・抽出した。

6) 統計解析

データの統計解析は SPSS statistical software package (Windows version 20; IBM-SPSS, Chicago, IL) を用いて、分散分析 (analysis of variance; ANOVA) を行い事後比較 (Tukey 検定)、またはノンパラメトリック検定として Kruskal-Wallis 検定を行った。有意水準は 5%未満とした。

IV. 結果

1) PCR アレイ解析による母体 pNK 細胞の miRNA 発現プロファイル

妊娠初期、中期、後期、産後 4 日目の miRNA の発現プロファイルおよびその変動を比較するために PCR アレイ解析を行った。今回解析した 756 種類の成熟 miRNA のうち、初期、中期、後期、産後 4 日目の pNK 細胞において、それぞれ 293、293、294、325 種類の miRNA が検出された。

第 19 番染色体上の 46 種類の miRNA 遺伝子はクラスター (the chromosome 19 microRNA cluster; C19MC) を形成しており、胎盤特異的に発現している miRNA であり(35, 36)、本来 NK 細胞には存在しない。C19MC 由来の成熟 miRNA が PCR アレイにより 47 種類検出可能であるが、驚いたことに初期、中期、後期の pNK 細胞において、それぞれ 12 種類 (26%)、15 種類 (32%)、18 種類 (38%) 種類の C19MC miRNA が検出された (図 3)。一方、産後 4 日目には 6 種類 (13%) に著明に減少した (図 4)。

PCR アレイデータの妊娠初期と後期の比較解析 (補足資料表 1) から、25 種類の miRNA が後期 pNK 細胞で有意に上昇していた。上昇した 25 種類の miRNA のうち 6 種類 (24%) の C19MC miRNA が含まれていた (図 5A)。後期 pNK 細胞で有意に減少した miRNA は *miR-7-2** の 1 つのみであった。次に PCR アレイデータの妊娠後期と産後 4 日の比較解析 (補足資料表 1) から、9 種類の miRNA が産後 4 日 pNK 細胞で有意に減少していた。減少した 9 種類の miRNA のうち 8 種類 (89%) の C19MC miRNA が含まれていた (図 5B)。産後 4 日 pNK 細胞で有意に上昇した miRNA は 5 種類であったが C19MC miRNA は含まれていなかった。

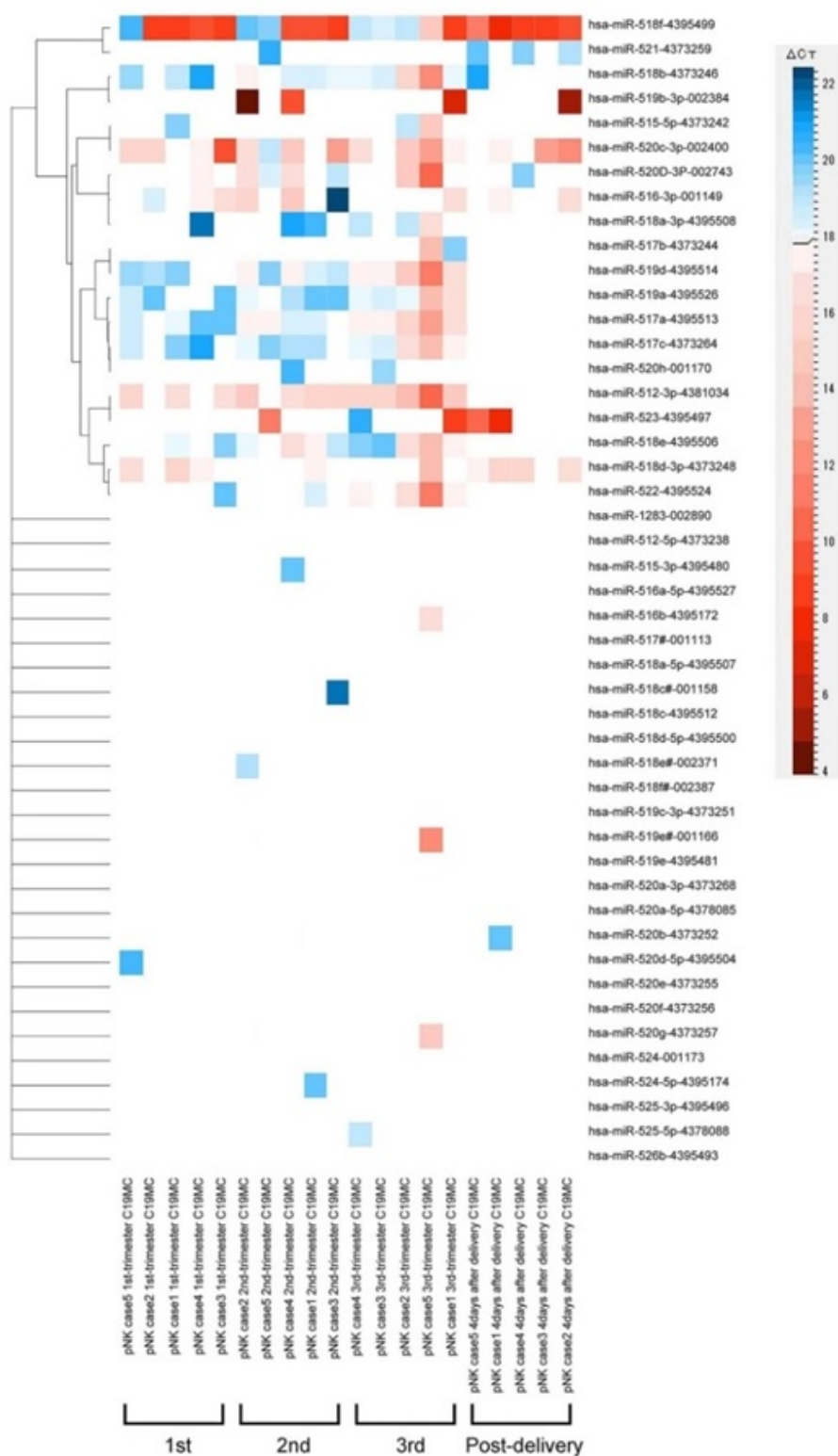


図4 pNK細胞におけるC19MC miRNA発現のヒートマップ解析
 PCRアレイ解析による妊娠初期(1st)、中期(2nd)、後期(3rd)、産後4日目(Post-delivery)におけるC19MC miRNAの発現。青は低発現、赤は高発現、白は未検出を示している。

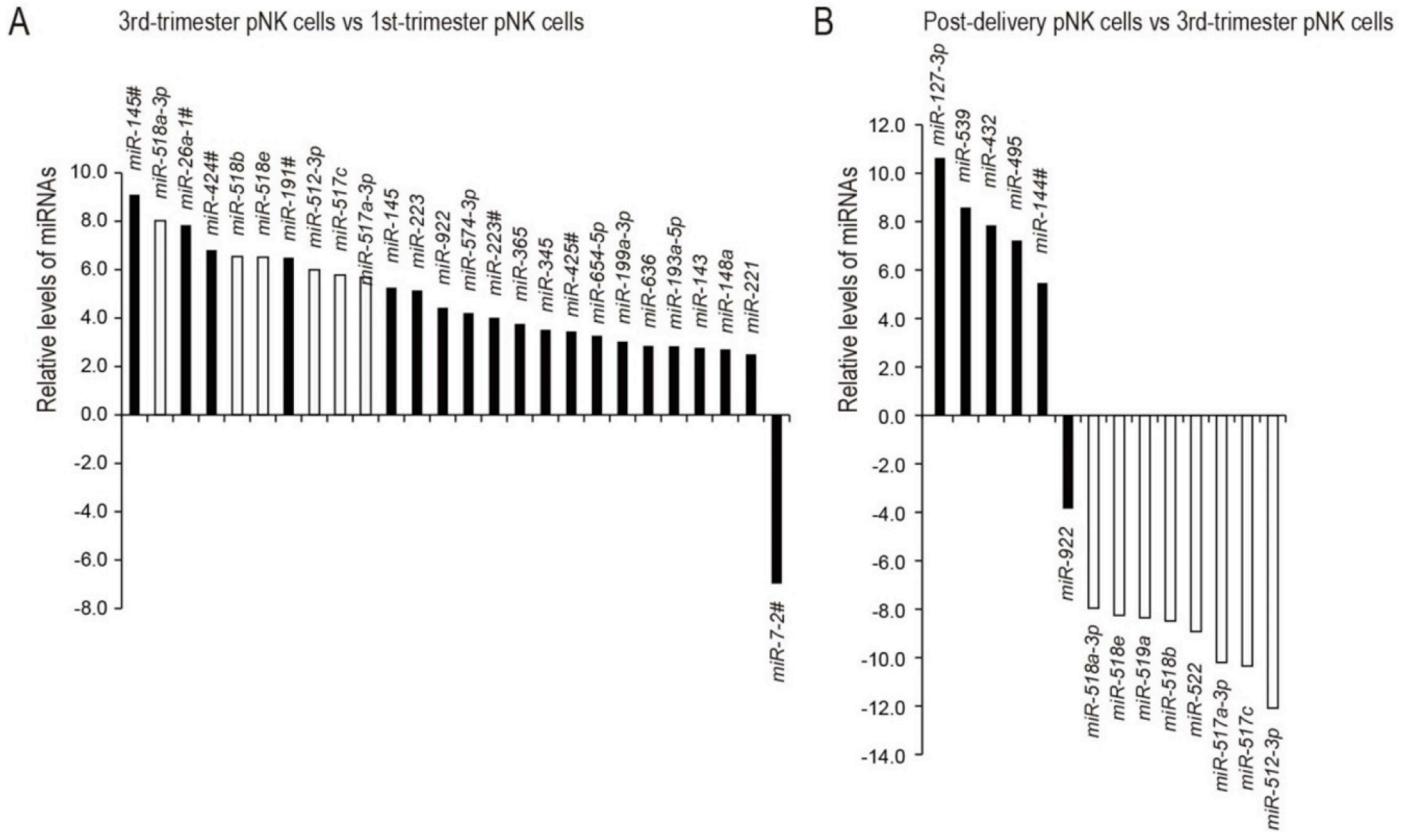


図5 PCRアレイによる pNK 細胞 miRNA の発現比較解析 (A)妊娠後期と初期(コントロール)、(B)産後 4 日目と妊娠後期 (コントロール) の発現比較において有意に変動した miRNA (Tukey test; $P < 0.05$)。白い棒グラフは C19MC miRNA。y-軸は miRNA の発現レベルの差を log fold change で示してある。データの標準化は内因性 *RNU6-2* を用いた。

2) リアルタイム PCR による miRNA の発現検証

前述の PCR アレイ解析において C19MC miRNA は妊娠後期 pNK 細胞内で発現が上昇し、分娩後の pNK 細胞で減少していたが、発現差異を確認するためにリアルタイム PCR にて検証を行った (図 6)。PCR アレイ解析で有意な発現変動の見られた 2 つの C19MC miRNA (*miR-517a-3p*、*miR-518b*) は、リアルタイム PCR による発現検証実験においても、有意な発現変動が確認された。

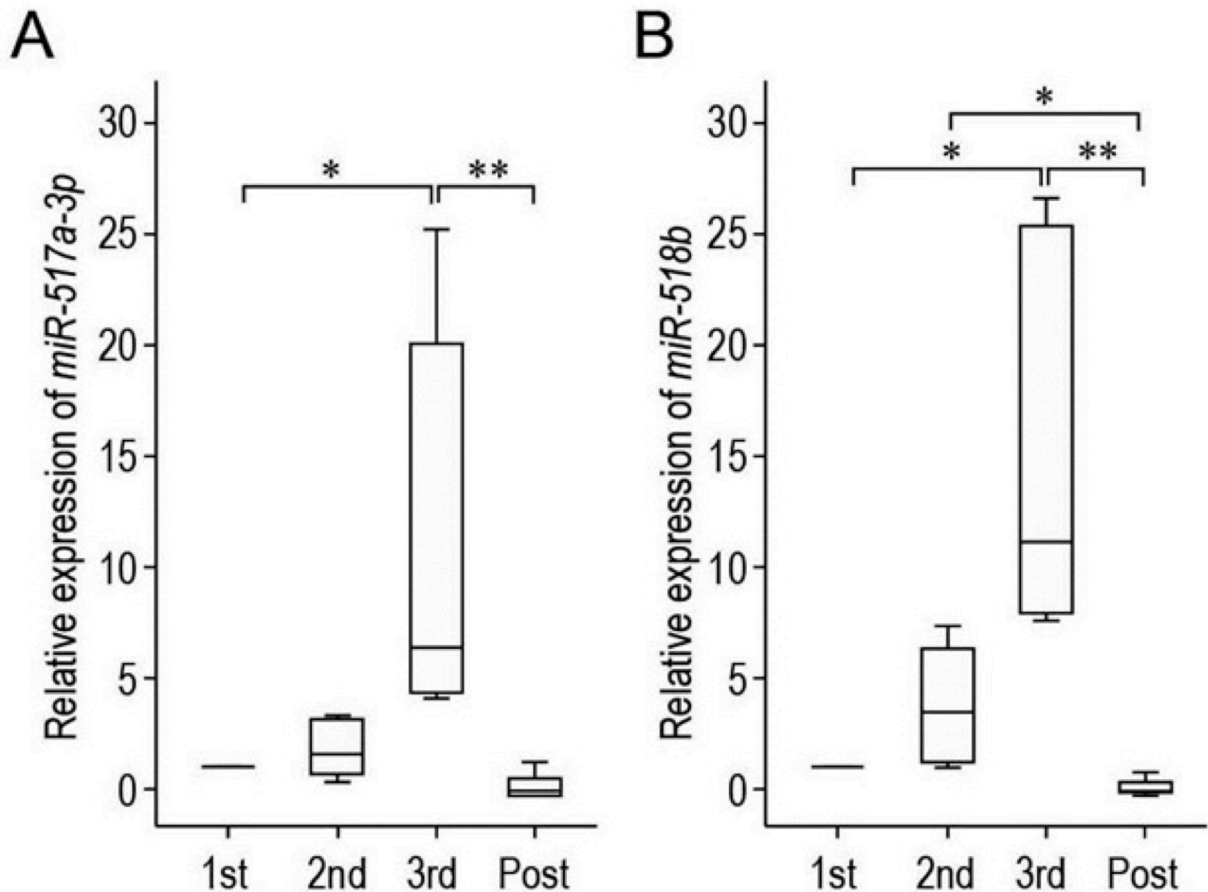


図 6 リアルタイム PCR による C19MC miRNA の発現検証解析
妊娠初期(1st)、中期(2nd)、後期(3rd)、産後 4 日目(Post)における C19MC miRNA *miR-517a-3p*(A)と *miR-518b*(B)の発現。初期 pNK 細胞の発現を 1 とした相対発現量を示している。データの標準化は内因性 *SNORD44* を用いた。箱ひげの中央の黒い線は中央値、箱の上下は 75 および 25 パーセントイル、T 字バー(内柵)は箱の高さの 1.5 倍までの最大値または最小値を示す。Kruskal-Wallis 検定; *P<0.05, **P<0.001.

以上の PCR アレイ解析およびリアルタイム PCR による検証の結果は、胎盤特異的 C19MC miRNA が妊娠期間中に末梢循環血液中の母体 pNK 細胞に取り込まれ、分娩後速やかにクリアランスされることを強く示唆する所見である。

3) DNA アレイ解析による網羅的発現比較解析

母体 pNK 細胞の miRNA とともにどのような遺伝子が差異変動を示したのか DNA アレイ解析を用いて妊娠初期と後期の発現比較解析を行った。アレイスライド上の 27958 種類の遺伝子のうち、1173 遺伝子が優位な発現差異 ($P < 0.05$) を示した (補足資料表 2)。1173 遺伝子のうち、264 遺伝子の発現が後期 pNK 細胞において有意に減少していた。

NK 細胞の機能に関連する遺伝子が妊娠期間中どのような影響を受けたのか検討するため、従来報告されている NK 細胞の機能に関連する 715 種類の遺伝子 (パーフォリン/グランザイムによる細胞障害経路、サイトカイン・ケモカインとその受容体、分泌経路、Fc 受容体、活性化・抑制性受容体、接着分子、シグナル伝達経路 [JAK/STAT pathway、TGF β pathway、PI3K- pathway activation、NFAT activation in NK cells、NF- κ B pathway regulation]) (33, 34) に注目すると、DNA アレイ解析で有意に変動した 1173 遺伝子のうち、69 遺伝子が NK 細胞機能関連遺伝子であった (表 1)。69 種類の NK 細胞機能関連遺伝子には細胞周期に関連した遺伝子とともに細胞表面に発現している様々な受容体をコードしている遺伝子が含まれていた (表 1)。興味深いことに、Killer 細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR) 遺伝子 (*KIR2DL4* など) は減少しており、白血球免疫グロブリン様受容体 (leukocyte Ig-like receptor, LILR) 遺伝子 (*LILRB2* など) は上昇していた。細胞周期・細胞増殖に関連する遺伝子 (*CDK2*、*CCNA1* など) は妊娠初期と比較して後期 pNK 細胞において上昇していた。

表 1 妊娠初期と後期 pNK 細胞の DNA アレイによる網羅的遺伝子発現比較解析において有意な差異変動を示した NK 細胞機能関連遺伝子

NK cell function	Gene symbol	Log fold change ([3rd] vs [1st])	P-value	Upregulated miRNAs that had the in silico target sites in the 3'-UTR of downregulated genes
Cytolytic pathway	<i>CTSZ</i>	1.44	0.0025	
	<i>TNFSF13B</i>	1.29	0.0009	
	<i>TNFAIP2</i>	3.26	0.0009	
Cytokines, chemokines and their receptors	<i>CXCR7(CMKOR1)</i>	-1.06	0.0009	
	<i>IL13RA1</i>	3.22	0.0053	
	<i>IRF2BP2</i>	0.76	0.0130	
Secretory signature, Cell cycle, proliferation	<i>IL17RA</i>	1.01	0.0067	
	<i>CDKN3</i>	2.74	0.0009	
Secretory signature	<i>HM13</i>	0.83	0.0013	
	<i>DEGS1</i>	1.07	0.0012	
	<i>GLRX</i>	0.72	0.0017	
Cell surface and adhesion molecules	<i>ITM2C</i>	2.57	0.0009	
	<i>CD59</i>	2.18	0.0009	
	<i>CD244(2B4A, 2B4)</i>	-0.70	0.0018	<i>miR-143</i>
	<i>CD24</i>	4.59	0.0010	
	<i>CD82</i>	3.22	0.0009	
	<i>CD63</i>	1.02	0.0016	
	<i>CD302</i>	3.57	0.0009	
	<i>CD200R1</i>	1.81	0.0082	
	<i>KIR2DL5A</i>	-0.86	<0.0001	<i>miR-148a, miR-221, miR-654-5p</i>
	<i>KIR3DL1</i>	-0.84	0.0009	<i>miR-221, miR-654-5p</i>
	<i>KIR2DS4</i>	-0.80	0.0003	<i>miR-512-3p, miR-654-5p</i>
	<i>KLRK1</i>	-0.83	0.0051	<i>miR-143, miR-365, miR-636, miR654-5p</i>
	<i>(NKG2D, CD314)</i>			
	<i>KIR2DL4</i>	-0.93	0.0009	<i>miR-654-5p</i>
	<i>LILRA2</i>	3.51	0.0009	
	<i>LILRA4</i>	2.40	0.0050	
	<i>LILRA5</i>	2.65	0.0009	
	<i>LILRA6</i>	3.58	0.0014	
	<i>LILRB2</i>	4.16	0.0009	
<i>LILRB3</i>	2.58	0.0015		
<i>CEACAM1</i>	3.87	0.0015		
<i>(BGP, CD66A)</i>				
<i>CEACAM6(CD66C)</i>	4.73	0.0009		

Cell cycle, proliferation	<i>TFDP1</i>	1.19	0.0009	
	<i>MCM6</i>	1.12	0.0012	
	<i>E2F1</i>	1.78	0.0009	
	<i>GTSE1</i>	2.31	0.0010	
	<i>CKS2</i>	1.04	0.0009	
	<i>MKI67</i>	3.45	0.0011	
	<i>PCNA</i>	1.13	0.0016	
	<i>CHEK1</i>	1.86	0.0009	
	<i>CKS1B</i>	1.11	0.0008	
	<i>CDK2</i>	0.73	0.0095	
	<i>KNTC1</i>	0.96	0.0009	
	<i>MCM2</i>	1.41	0.0009	
	<i>CCNB1</i>	1.60	0.0009	
	<i>CCNE2</i>	2.15	0.0009	
	<i>E2F2</i>	3.35	0.0009	
	<i>CCNB2</i>	3.61	0.0009	
	<i>KPNA2</i>	0.65	0.0009	
	<i>RBBP8</i>	1.91	0.0009	
	<i>CCNA2</i>	2.83	0.0009	
	<i>GADD45A</i>	1.99	0.0011	
Cell cycle, quiescence	<i>FBXO9</i>	1.28	0.0011	
	<i>DHRS7</i>	-0.25	0.0044	
JAK/STAT pathway	<i>JAK2</i>	0.61	0.0009	
	<i>SLA2</i>	-0.99	0.0022	
JAK/STAT pathway, NF-kB pathway regulation	<i>IL1R1</i>	3.99	0.0024	
JAK/STAT pathway	<i>IL6R</i>	3.43	0.0017	
TGF-b pathway	<i>RUNX2</i>	1.08	0.0052	
	<i>BMP2</i>	2.49	0.0019	
	<i>BMPRI1A</i>	-1.22	0.0068	<i>miR-143, miR654-5p, miR-922</i>
P25K pathway	<i>AKT2</i>	-0.55	0.0082	<i>miR-143, miR148a, miR-193a-5p, miR-221, miR-345, miR-365, miR-574-3p, miR654-5p, miR-922</i>
P43K pathway	<i>FOXMI</i>	2.83	0.0009	
P50K pathway	<i>PAK1</i>	1.95	0.0009	
NF-kB pathway regulation	<i>IRAK3</i>	3.93	0.0010	
	<i>TLR2</i>	2.41	0.0024	
NF-kB target genes	<i>DUSP2</i>	-1.05	0.0058	
	<i>LITAF</i>	-0.54	0.0049	<i>miR-636, miR-654-5p</i>
	<i>MARCKS</i>	4.25	0.0009	

4) IPA による pNK 細胞における miRNA-遺伝子パスウェイ・ネットワーク解析

妊娠初期と後期の遺伝子発現を比較した DNA アレイ解析で有意に変動した 69 種類の NK 細胞機能関連遺伝子をデータセットとして、影響を受けた生物学的機能・過程、分子間ネットワークおよびシグナルパスウェイを検索するための Core Analysis 解析 (IPA ソフトウェア) を行った。

古典的経路細胞シグナル伝達・遺伝子ネットワーク経路として細胞周期調節経路 (エストロゲン依存 S 期エントリー経路など) の他に NK 細胞シグナル伝達経路 ($P = 1.09 \times 10^{-8}$) が上位にランキングされた (図 7)。NK 細胞シグナル伝達経路には、妊娠後期 pNK 細胞で有意に発現抑制された KIR 遺伝子 (*KIR2DL4*、*KIR2DL5A*、*KIR2DS4*、*KIR3DL1*) が含まれていた。

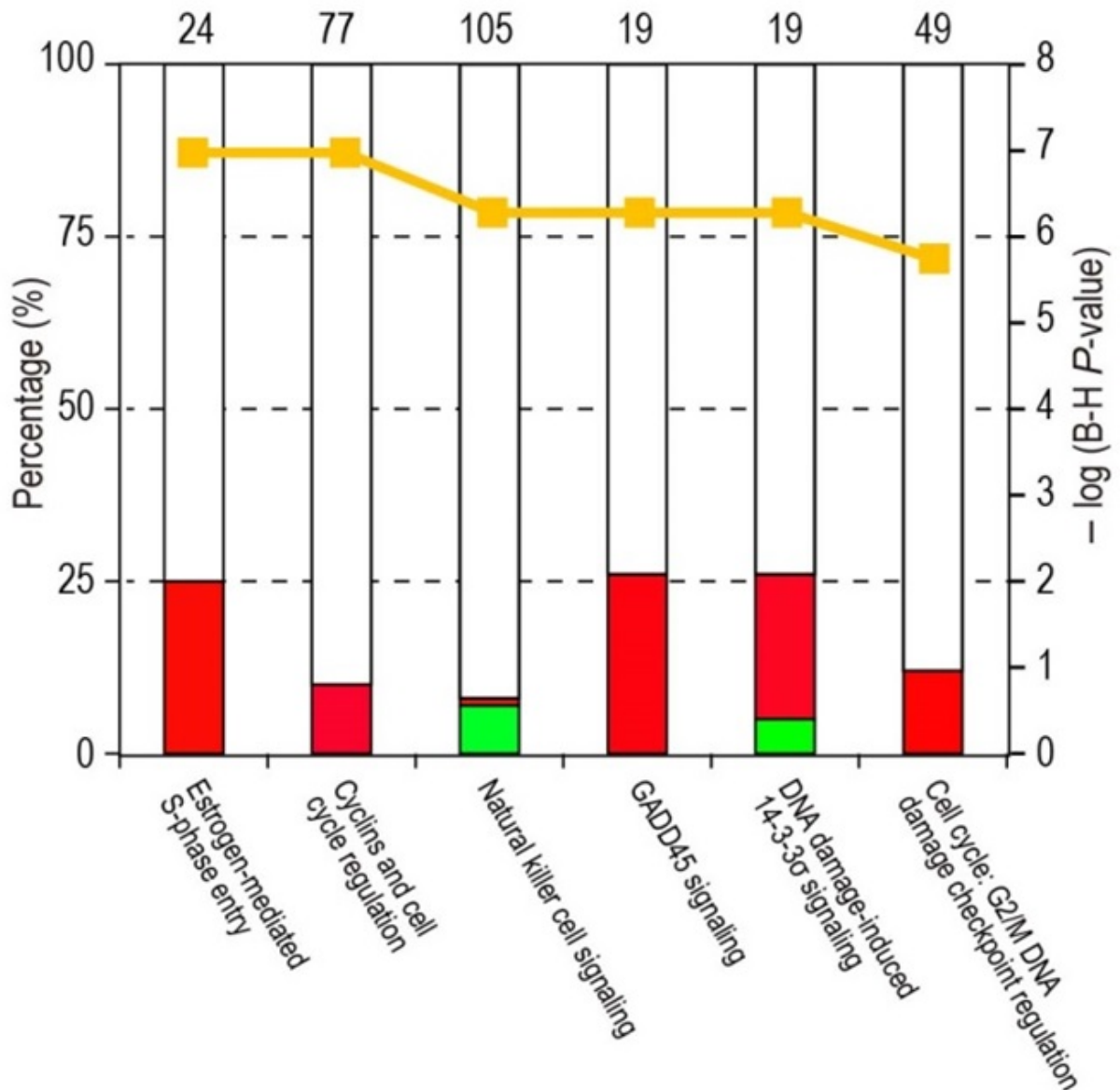


図7 IPA Core Analysisにより明らかとなった妊娠初期と比較して後期 pNK 細胞で影響を受けた上位の古典的経路細胞シグナル伝達・遺伝子ネットワーク経路

積み上げ棒グラフにおいて赤は上昇、緑は低下した遺伝子数の相対頻度を示している（白はデータセット以外の関連遺伝子）。各々の棒グラフ頂上の数字は各経路を構成する総遺伝子数。黄色の折れ線グラフは Fisher's exact test に Benjamini-Hochberg 法による多重検定補正を加えた P 値の $-\log$ 値を示している。

我々はデータセット（69 種類の NK 細胞機能関連遺伝子）の遺伝子が 10 以上含まれる基準を設定し、さらに NK 細胞のキーワードをフィルターとして疾病および生物学的機能が選択され、母体 pNK 細胞の影響を受けた機能を考察した。上位 4 つが proliferation of immune cells、quantity of cells、activation of leukocytes、cytotoxicity であった（補足資料表 3）。Proliferation of immune cells と quantity of cells 機能は初期妊娠と比較して後期 pNK 細胞において低下、activation of leukocytes と cytotoxicity 機能は亢進していることが予測された。IPA Downstream Effects Analysis による上位 4 機能を結合させた機能ネットワーク図を図 8 に示す。データセット中の多くの遺伝子（*IL1R1*、*CEACAM1* など）は発現が上昇しているが、*KIR* 遺伝子は減少していることが分かる。

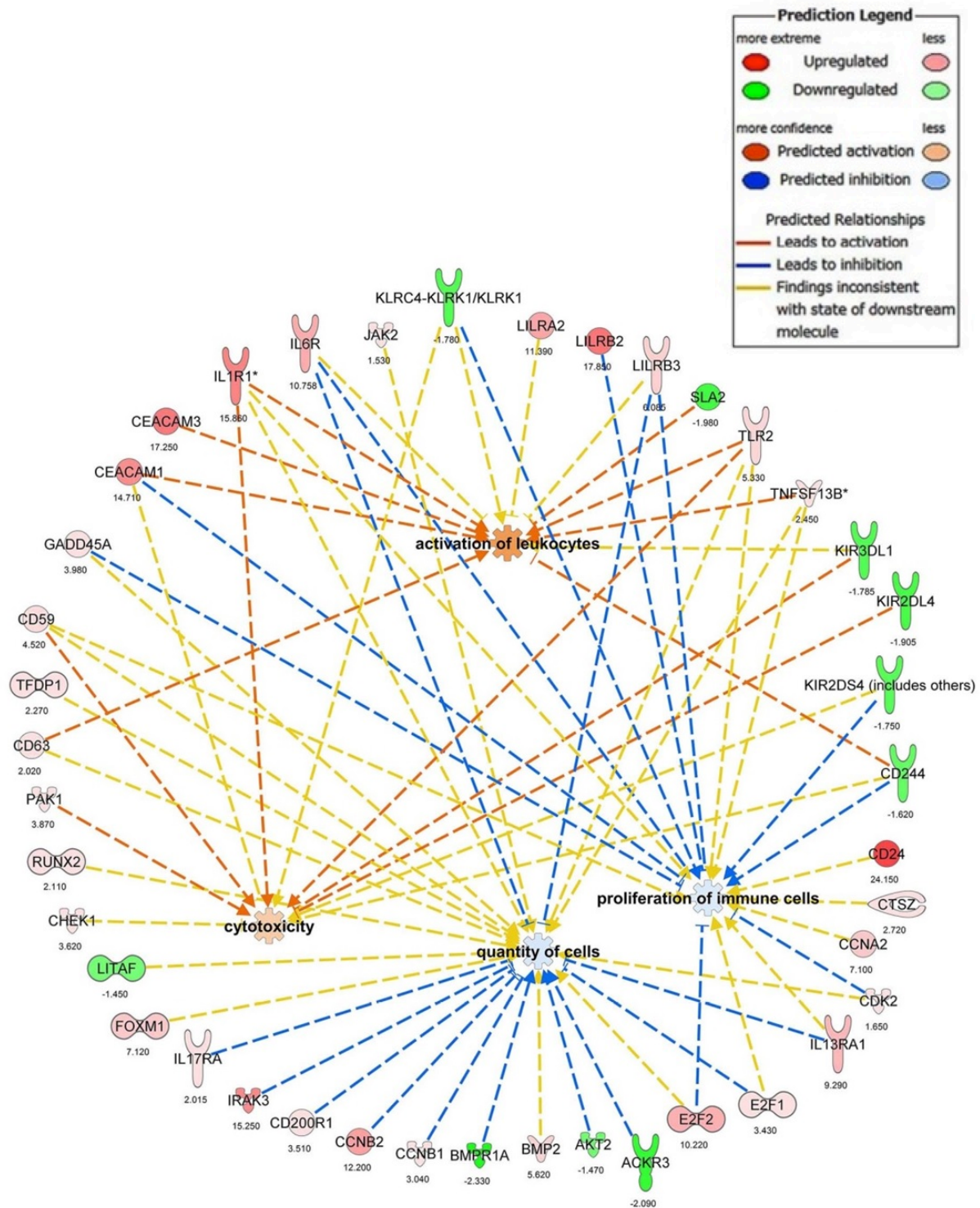


図 8 IPA Core Analysis の Downstream Effects Analysis により明らかとなった妊娠初期と比較して後期 pNK 細胞で影響を受けた上位の NK 細胞機能 proliferation of immune cells、quantity of cells、activation of leukocytes、cytotoxicity を結合させた機能ネットワーク図

データセットの 69 個の NK 細胞機能関連遺伝子のうち、41 遺伝子から構成されている。IPA の予測定義に関しては図中の説明を参照。各々の遺伝子に付随している数値は妊娠初期と比較した後期 pNK 細胞における発現レベルの fold change を示している。

前述したように miRNA と標的遺伝子の関係は逆相関しており、IPA 解析で形成された pNK 細胞の遺伝子ネットワーク (69 種類の NK 細胞機能関連遺伝子のデータセット) の妊娠後期 pNK 細胞において有意に発現が低下した 13 種類の遺伝子が、有意に発現上昇した 25 種類の miRNA の標的遺伝子候補になっているのか in silico 解析を行った。In silico 解析により、12 種類の miRNA (12/25 種類 = 48%) に対して 9 遺伝子 (9/13 種類 = 69%) の 3'-UTR において 27 箇所結合部位を持つことを見出した (表 1)。1 標的遺伝子あたり 1~9 種類の miRNA が 3'-UTR に結合する可能性が示された。12 種類の miRNA の中には C19MC miRNA である *miR-512-3p* が含まれており、*KIR2DS4* が標的遺伝子候補であった。

IPA Core Analysis によりデータセットから遺伝子ネットワークが構築され、NK 細胞のキーワードでフィルターすると 1 つのネットワークが構築された (図 9 ; 補足資料表 4)。ネットワークには 13 種類の妊娠後期 pNK 細胞において発現が低下した遺伝子のうち、6 遺伝子 (*KIR2DS4*、*KLRK1* など) が含まれており、その発現に逆相関し、かつ 3'-UTR に結合部位を持つ miRNA を図 9 中に示した。この発現低下した 6 遺伝子の中に 3 種類の KIR 遺伝子が含まれ、この 6 遺伝子に対して 7 種類の miRNA が 3'-UTR に結合する可能性が示された。

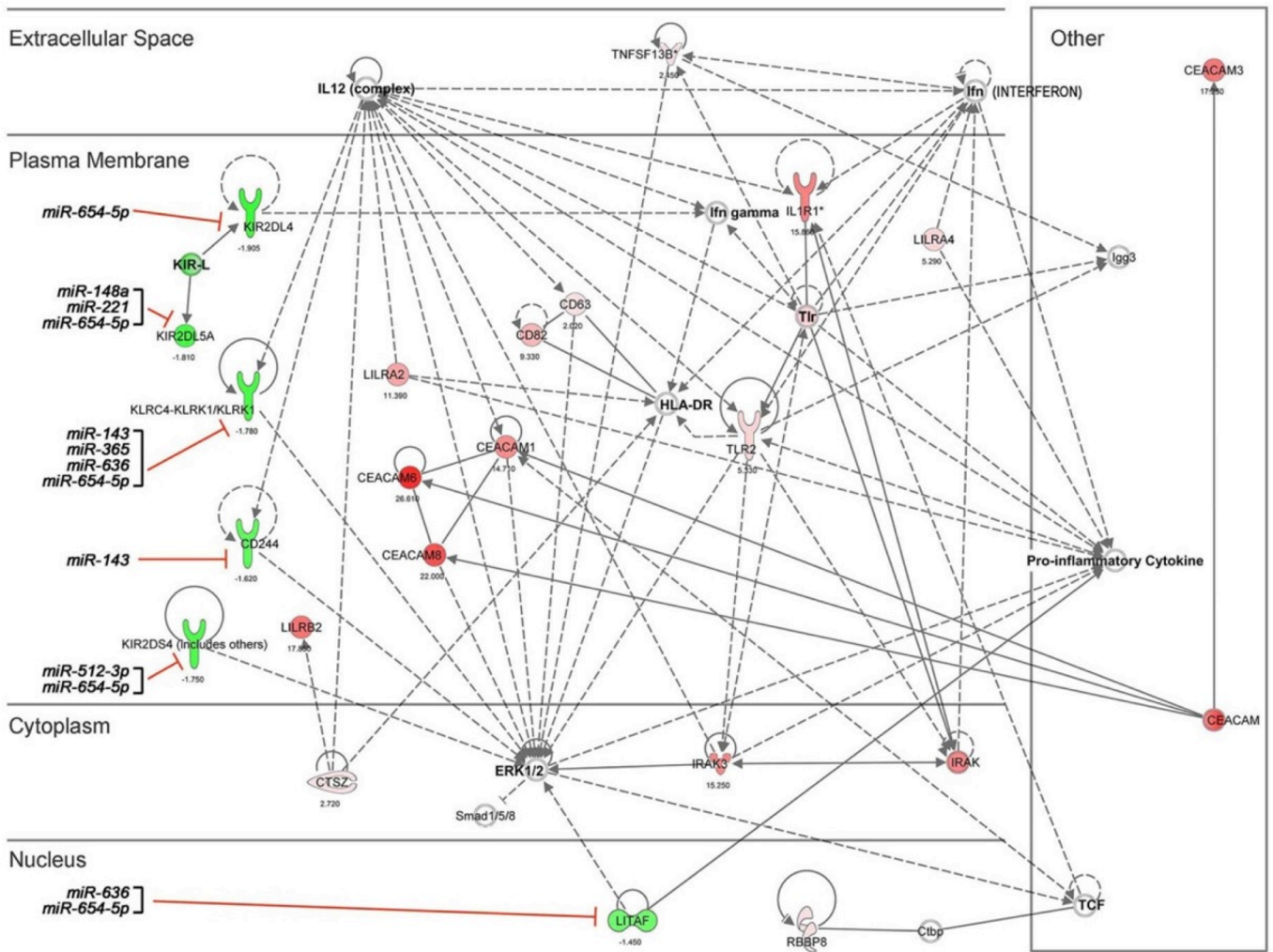


図9 IPA Core Analysisにより構築された妊娠初期と比較して後期 pNK 細胞で影響を受けた遺伝子ネットワーク図

データセット(69個のNK細胞機能関連遺伝子)から遺伝子ネットワークを構築(NK細胞のキーワードでフィルター)。妊娠後期 pNK 細胞においては発現が低下した遺伝子と逆相関し、かつ 3'-UTR に結合部位を持つ miRNA を追加してある。緑は低発現、赤は高発現、白はデータセット以外の関連遺伝子。各々の遺伝子に付随している数値は妊娠初期と比較した後期 pNK 細胞における発現レベルの fold change を示している。実線、破線はそれぞれ分子間の直接的、間接的な相互作用を示している。

V. 考察

C19MC miRNA はヒト胎盤に特異的に発現しており(36, 37)、この miRNA クラスターはヒトゲノムにおいて最大の miRNA クラスターであり、46 種類の miRNA 遺伝子を含むことが知られている(35)。C19MC は種間保存性がなく、ヒトを含む霊長類のみに存在し(35, 38)、父親由来のアリルのみから発現するインプリンティング遺伝子である(39)。C19MC miRNA とともに胎盤由来の miRNA はエクソソームを介して母体血中を循環している。Taylor らは胎盤由来のエクソソームが母体血中に存在し、エクソソーム蛋白質 (Fas リガンド) が、母体 T 細胞の CD3-zeta および JAK3 を介したシグナルを抑制することを報告している(40)。前述したように、Hedlund らはエクソソーム上の KLRK1 リガンドが NK 細胞の KLRK1 受容体の発現を減少させることを報告している(23)。エクソソームの蛋白質だけでなく、そこに含まれている miRNA、特に C19MC miRNA が胎盤-母体コミュニケーションに関与していることが予測されるが、胎盤エクソソーム由来の C19MC miRNA が母体免疫細胞の機能に影響を与えているのかほとんど報告がない。最近、Kambe らは妊娠中、C19MC miRNA の 1 つである *miR-517a-3p* が母体 pNK 細胞に取り込まれ、一酸化窒素/cGMP シグナル経路における鍵となるメディエーターである PRKG1(41, 42)をコードしている内因性遺伝子の発現を抑制していることを明らかにした(31)。このことは、胎盤由来の蛋白質だけでなく miRNA もエクソソームを介して母体 NK 細胞に取り込まれ、遺伝子の転写後修飾を通して NK 細胞の機能に影響を与えていることを示唆している。

今回、PCR アレイ miRNA 解析と DNA アレイ解析を組み合わせ、母体 pNK 細胞における網羅的 miRNA-遺伝子発現解析を行った。特に本来 NK 細胞に存在しない胎盤由来 C19MC miRNA が妊娠中 pNK 細胞に取り込まれるのかに焦点を絞り解析を行った。PCR アレイ解析により、胎盤由来 C19MC miRNA は妊娠時期に依存して pNK 細胞に取り込まれることを明らかにすることができた (図 4-6)。C19MC miRNA は妊娠時期が進むにつれ pNK 細胞により多く取り込まれ、分娩に伴う胎盤剥離・娩出とともに減弱または消失することを見出した。胎盤の発達とともに血中の胎盤由来の miRNA は増加するため(43)、それに伴い、おそらくエクソソームを介して pNK 細胞への取り込みが増加し、分娩後は供給がなくなるため

クリアランスされると考えられる。Kambe らの分娩前後における pNK 細胞中の *miR-517a-3p* と *miR-518b* の発現解析の結果(31)ともよい一致を示している。しかし、pNK 細胞に胎盤由来のエクソソームが特異的に取り込まれるのか、免疫細胞の種類の違いによってエクソソームの取り込みが異なるのかといった選択的取り込みについては今後の課題として残った。

妊娠期間中の pNK 細胞における網羅的遺伝子発現解析の報告はなく、今回妊娠初期と後期 pNK 細胞の網羅的遺伝子発現の差異を報告した。特に NK 細胞の機能に関連する遺伝子に注目し解析を行い、69 種類の NK 細胞機能関連遺伝子が有意に変動していることを明らかにした (表 1)。IPA Core Analysis 解析から多くの細胞周期・細胞増殖に関連する遺伝子の発現が上昇していることが判明し、細胞シグナル伝達・遺伝子ネットワーク経路のトップランキングにエストロゲン依存的 S 期エントリー経路の亢進が示唆された (図 7)。エストロゲンは G1/S 移行期の転写活性を促進させ、エストロゲン受容体を持つ乳癌細胞の増殖を誘導する(44)。NK 細胞はエストロゲン受容体を発現しており(45)、子宮 NK 細胞において妊娠期間中のエストロゲン上昇に依存して NK 細胞数が増加することが報告されている(46)。今回の研究から、妊娠後期に向けて pNK 細胞において細胞周期・細胞増殖が亢進していることが示唆され、将来の研究課題として興味深い結果であった。

一方、細胞周期・細胞増殖に関連する遺伝子以外の NK 細胞機能関連遺伝子の動向に関しては、細胞周期・細胞増殖関連遺伝子ほど単純でなく、図 8 に示した機能ネットワーク (IPA Core Analysis の Downstream Effects Analysis により明らかとなった妊娠後期 pNK 細胞で影響を受けた上位の NK 細胞機能 proliferation of immune cells、quantity of cells、activation of leukocytes、cytotoxicity を結合させた機能ネットワーク)は複雑である。Cytotoxicity に注目してみると、*KIR2DL4*、*KIR3DL1* 遺伝子の発現低下が細胞障害活性を促進する方向に働いていることが予測された。Yusa らは *KIR2DL4* キメラ分子を作製し、*KIR3DL1* 分子との機能比較解析から両分子は細胞障害活性を抑制することを報告しており(47)、今回の妊娠後期 pNK 細胞における細胞障害活性が亢進しているとする予測結果を支持している。Activation of leukocytes に注目してみると、細胞接着因子をコードしている *CEACAM1* 遺伝子の発現上昇が白血球の活性化を促進する方向に働いていることが予測された。Lu らは *Ceacam1* が移植片対宿主病および同種骨髄移植後の移植

片対腫瘍反応における調節因子であることを見出し、リンパ器官や標的組織において T 細胞の活性化やドナー T 細胞数を制御していることを報告している(48)。今回の妊娠後期 pNK 細胞における白血球の活性化を亢進しているとする予測結果を支持している。Proliferation of immune cells に注目してみると、白血球免疫グロブリン様受容体遺伝子である *LILRB2* 遺伝子の発現上昇が免疫細胞の増殖を抑制する方向に働いていることが予測された。ヒト *LILRB2* 分子は *CD1D* と直接結合し抗原負荷を阻止することにより、natural killer T 細胞の活性化を阻害することが報告されており(49-51)、今回の妊娠後期 pNK 細胞における免疫細胞の増殖を抑制しているとする予測結果を支持している。Cell quantity に注目してみると、白血球免疫グロブリン様受容体遺伝子である *LILRB3* 遺伝子の発現上昇が細胞数を抑制する方向に働いていることが予測された。*Lilrb3* ノックアウトマウスの解析から *Lilrb3* の欠損により腹腔 B リンパ球数が増加することが報告されている(52)。今回の妊娠後期 pNK 細胞における細胞数を減少させるとする予測結果を支持している。以上を斟酌すると、妊娠後期 pNK 細胞では細胞障害性が上昇するとともに、妊娠後期 pNK 細胞は獲得免疫へも影響を与えている可能性が推察される。同時に妊娠後期 pNK 細胞は免疫細胞増殖の制御にも関与していると思われる。しかし、図 8 において、IPA のデータベース (Ingenuity Knowledge Base) からの予測と一致しない相互作用も多数含まれており、結果の解釈には注意が必要である。

NK 細胞は NK 細胞のマーカーである *CD16* と *CD56* の発現量により 2 つのサブセットに分類される。*CD56^{dim} CD16^{pos}* NK 細胞は細胞障害活性機能 (細胞障害活性、抗体依存性細胞障害) が優位であり、*CD56^{bright} CD16^{neg}* NK 細胞はサイトカイン産生が優位な NK 細胞である(17, 53)。pNK 細胞の 95% は *CD56^{dim} CD16^{pos}* NK 細胞であり、細胞障害のエフェクター細胞としての性格を強く持つ。pNK 細胞は *KIR* を高発現していることになるが、今回の研究において、妊娠後期 pNK 細胞の活性化および抑制性 *KIR* 遺伝子、活性化受容体 *KLRK1* 遺伝子の発現は減少していた (表 1)。一方、*KIR* と同様に *MHC* クラス I 分子を認識する活性化および抑制性 *LILR* の遺伝子の発現は上昇していた (表 1)。この発現差異の結果から活性または抑制のどちらか一方向性にシグナルが進むと解釈することは難しく、矛盾が生じる。しかし、最近の研究から、NK 細胞の免疫応答は固定されているわけではなく、NK 細胞周囲の環境の変化に順応可能であることが報告されている(54,

55)。母体 pNK 細胞においても同様に、妊娠時期の環境に応じて NK 細胞機能関連分子の発現を調節し、適合させているのかもしれない。今回は正常妊娠に焦点を当て研究を進めたが、pNK 細胞のサブセットの割合の変化は反復流産における dNK 細胞の変化を反映しているという報告もあり(56)、周産期疾患で pNK 細胞の miRNA-遺伝子のネットワークがどのように変化しているのか、さらにはそれらの疾患における診断の新しいツールに結びつくのか興味深い。

VI. 結語

今回の研究により、正常妊娠における母体 pNK 細胞の詳細な miRNA-遺伝子発現プロファイルを明らかにした。PCR miRNA アレイ解析から、妊娠初期と比較して後期 pNK 細胞において、胎盤由来の 6 種類の C19MC miRNA を含む 25 種類の miRNA の発現が有意に上昇していることが明らかになった。胎盤由来 C19MC miRNA は妊娠時期に依存して pNK 細胞に取り込まれ、分娩とともに減弱または消失することを見出した。DNA アレイ解析から、妊娠初期と比較して後期 pNK 細胞において 69 種類の NK 細胞機能関連遺伝子の有意な変動を認め、細胞周期に関連した遺伝子とともに細胞表面に発現している様々な受容体をコードしている遺伝子が含まれていた。IPA Core Analysis 解析から、妊娠後期に向けて pNK 細胞において細胞周期・細胞増殖が亢進していることが示唆された。一方、細胞周期・細胞増殖に関連する遺伝子以外の NK 細胞機能関連遺伝子の動向に関しては、細胞周期・細胞増殖関連遺伝子ほど単純でなく複雑であるが、妊娠後期 pNK 細胞の細胞障害性が上昇している可能性が示唆された。In silico 解析により、妊娠後期 pNK 細胞において、9 種類の発現低下 NK 細胞機能関連遺伝子の 3'-UTR に、結合部位を持つ 12 種類の発現上昇 miRNA を見出した。発現上昇した 12 種類の miRNA の中には C19MC miRNA である *miR-512-3p* が含まれており、*KIR2DS4* が標的遺伝子候補であった。今回のバイオインフォマティクス解析から、母体 pNK 細胞で NK 細胞機能関連遺伝子に影響を与えている miRNA を抽出することができたが、真の標的遺伝子であるのか培養系を用いた検証実験 (3'-UTR ルシフェラーゼアッセイ、miRNA 過剰および抑制実験など) を行う必要があり、課題として残されている。近年、NK 細胞の分化・発達、機能に関与する miRNA が明らかにされつつあるが(57, 58)、母体 pNK 細胞のように内因性の miRNA だけでなく、取り込んだ miRNA (胎盤由来 miRNA) が NK 細胞の機能にどのような影響を及ぼすのか、ひいては妊娠の維持 (母児間免疫寛容) や分娩発来に関与するののかについてはさらなる研究が必要である。

VII. 補足資料

補足資料 表 1

A. Expression levels of miRNAs in 3rd trimester pNK cells compared to 1st-trimester pNK cells as revealed by PCR-based miRNA array (Tukey *P*-value < 0.05)

miRNA	ANOVA <i>P</i> -value	Tukey <i>P</i> -value (<i>P</i> < 0.05)	Up- or down-regulation ([3rd] vs [1st])	Log fold change ([3rd] vs [1st])
hsa-miR-145-4395389	<0.001	<0.001	Up	5.25
hsa-miR-518a-3p-4395508	<0.001	<0.001	Up	8.02
hsa-miR-223-4395406	<0.001	<0.001	Up	5.14
hsa-miR-345-4395297	<0.001	<0.001	Up	3.52
hsa-miR-191#-002678	<0.001	0.001	Up	6.49
hsa-miR-574-3p-4395460	0.001	0.002	Up	4.21
hsa-miR-922-002152	0.001	0.0019	Up	4.43
hsa-miR-517a-4395513	<0.001	0.002	Up	5.69
hsa-miR-143-4395360	0.001	0.003	Up	2.77
hsa-miR-148a-4373130	<0.001	0.004	Up	2.71
hsa-miR-193a-5p-4395392	<0.001	0.004	Up	2.84
hsa-miR-365-4373194	0.001	0.005	Up	3.76
hsa-miR-26a-1#-002443	0.007	0.008	Up	7.84
hsa-miR-145#-002149	0.006	0.009	Up	9.09
hsa-miR-424#-002309	0.004	0.009	Up	6.81
hsa-miR-425#-002302	0.005	0.012	Up	3.45
hsa-miR-7-2#-002314	0.017	0.014	Down	-6.97
hsa-miR-636-4395199	0.022	0.015	Up	2.85
hsa-miR-223#-002098	0.006	0.020	Up	4.01
hsa-miR-518b-4373246	0.003	0.021	Up	6.54
hsa-miR-518e-4395506	0.004	0.026	Up	6.51
hsa-miR-517c-4373264	0.001	0.030	Up	5.78
hsa-miR-512-3p-4381034	0.002	0.030	Up	5.99
hsa-miR-654-5p-4381014	0.041	0.031	Up	3.27
hsa-miR-221-4373077	0.008	0.034	Up	2.50
hsa-miR-199a-3p-4395415	0.006	0.041	Up	3.03

B. Expression levels of miRNAs in post-delivery pNK cells compared to 3rd trimester pNK cells as revealed by PCR-based miRNA array (Tukey *P*-value < 0.05)

miRNA	ANOVA <i>P</i> -value	Tukey <i>P</i> -value (<i>P</i> < 0.05)	Up- or down-regulation ([Post-delivery] vs [3rd])	Log fold change ([Post-delivery] vs [3rd])
hsa-miR-517a-4395513	<0.001	<0.001	Down	-10.20
hsa-miR-518a-3p-4395508	<0.001	<0.001	Down	-7.96
hsa-miR-517c-4373264	0.001	0.001	Down	-10.35
hsa-miR-512-3p-4381034	0.002	0.001	Down	-12.08
hsa-miR-519a-4395526	0.005	0.004	Down	-8.36
hsa-miR-922-002152	0.001	0.004	Down	-3.85
hsa-miR-518b-4373246	0.003	0.004	Down	-8.49
hsa-miR-495-4381078	0.006	0.007	Up	7.22
hsa-miR-518e-4395506	0.004	0.007	Down	-8.25
hsa-miR-522-4395524	0.024	0.020	Down	-8.92
hsa-miR-127-3p-4373147	0.044	0.032	Up	10.63
hsa-miR-539-4378103	0.027	0.034	Up	8.58
hsa-miR-432-001026	0.020	0.029	Up	7.85
hsa-miR-144#-002148	0.0346	0.043	Up	5.47

補足資料 表 2

Differentially expressed genes in 3rd trimester pNK cells compared to 1st-trimester pNK cells as revealed by DNA microarray analysis (Absolute log fold change ≥ 4)

Probe name	P-value ($P < 0.05$)	Up- or down-regulation ([3rd] vs [1st])	Log fold change ([3rd] vs [1st])	NK cell function- related genes	Gene symbol
A_33_P3252394	0.001	up	4.00		<i>GADD45G</i>
A_23_P137139	0.003	up	4.00		<i>BTK</i>
A_23_P427747	0.001	up	4.00		<i>C2orf65</i>
A_23_P28485	0.001	up	4.00		<i>GCA</i>
A_24_P391230	0.001	up	4.01		<i>CYYR1</i>
A_23_P24493	0.002	up	4.01		<i>MMP8</i>
A_23_P53891	0.001	up	4.01		<i>KLF5</i>
A_33_P3222501	0.002	up	4.02		<i>FAM157A</i>
A_23_P334709	0.001	up	4.02		<i>FKBP9</i>
A_33_P3240552	0.001	up	4.02		<i>PDE4D</i>
A_23_P166848	0.002	up	4.03		<i>LTF</i>
A_23_P87709	0.002	up	4.03		<i>PLBD1</i>
A_24_P365767	0.002	up	4.03		<i>CYBB</i>
A_32_P453321	0.001	up	4.03		<i>C1orf228</i>
A_33_P3403018	0.001	up	4.03		<i>LCE5A</i>
A_33_P3209651	0.002	up	4.04		<i>WDFY4</i>
A_23_P55020	0.001	up	4.04		<i>CD300LF</i>
A_23_P130515	0.001	up	4.04		<i>CEACAM3</i>
A_24_P382319	0.002	up	4.04	*	<i>CEACAM1</i>
A_33_P3257678	0.001	up	4.05		<i>HIST2H3A</i>
A_24_P25234	0.001	up	4.05		<i>MTL5</i>
A_24_P88763	0.001	up	4.06		<i>LOXL3</i>
A_24_P83379	0.001	up	4.06		<i>WDFY3</i>
A_33_P3293888	0.003	up	4.06		<i>AFF2</i>
A_33_P3253144	0.001	up	4.06		<i>DOK3</i>
A_23_P162211	0.001	up	4.06		<i>MANSC1</i>
A_23_P23048	0.002	up	4.07		<i>S100A9</i>
A_23_P7144	0.001	up	4.07		<i>CXCL1</i>
A_33_P3329686	0.001	up	4.08		<i>5-Sep</i>
A_23_P362759	0.002	up	4.08		<i>PRDM5</i>
A_24_P236799	0.001	up	4.08		<i>RAB31</i>
A_24_P265832	0.002	up	4.10		<i>SUCNRI</i>
A_23_P39251	0.002	up	4.11		<i>PLIN5</i>
A_23_P28834	0.001	up	4.11		<i>PHACTR3</i>
A_23_P7412	0.002	up	4.12		<i>BTNL8</i>
A_23_P259506	0.001	up	4.12		<i>C5orf32</i>
A_23_P157875	0.001	up	4.13		<i>FCN1</i>
A_23_P121064	0.001	up	4.13		<i>PTX3</i>
A_23_P7325	0.001	up	4.13		<i>BST1</i>
A_23_P301414	0.002	up	4.14		<i>ERG</i>
A_33_P3326447	0.001	up	4.16		<i>LOC100508384</i>
A_23_P208493	0.001	up	4.16	*	<i>LILRB2</i>

A_24_P453921	0.001	up	4.16	<i>DPY19LIP1</i>
A_23_P104464	0.001	up	4.17	<i>ALOX5</i>
A_33_P3301331	0.001	up	4.17	<i>CEACAM3</i>
A_33_P3218975	0.002	up	4.18	<i>ENTPDI</i>
A_33_P3381328	<0.001	up	4.18	<i>FAM201A</i>
A_33_P3292769	0.001	up	4.18	<i>NFAM1</i>
A_23_P201808	0.002	up	4.19	<i>PPAP2B</i>
A_23_P53126	0.001	up	4.20	<i>LMO2</i>
A_23_P42004	0.001	up	4.20	<i>SLC22A16</i>
A_23_P36753	0.001	up	4.21	<i>ALDH2</i>
A_33_P3365432	0.001	up	4.21	<i>NCF4</i>
A_23_P32577	0.002	up	4.21	<i>DACH1</i>
A_33_P3728979	0.002	up	4.21	<i>FAM151B</i>
A_24_P228302	0.001	up	4.22	<i>CEACAM7</i>
A_23_P142345	0.001	up	4.23	<i>PRTN3</i>
A_23_P137935	0.001	up	4.23	<i>MNDA</i>
A_23_P214222	0.001	up	4.25	* <i>MARCKS</i>
A_23_P208747	0.002	up	4.25	<i>PGLYRP1</i>
A_23_P122924	0.001	up	4.26	<i>INHBA</i>
A_33_P3275055	0.001	up	4.26	<i>ST6GALNAC3</i>
A_23_P18372	0.001	up	4.29	<i>B3GNT5</i>
A_24_P187970	0.001	up	4.29	<i>PADI2</i>
A_24_P235266	0.001	up	4.29	<i>GRB10</i>
A_23_P24948	0.001	up	4.30	<i>KCNE3</i>
A_33_P3405728	0.001	up	4.30	<i>PKP2</i>
A_33_P3218980	0.001	up	4.30	<i>ENTPDI</i>
A_24_P251534	0.003	up	4.30	<i>CTDSPL</i>
A_32_P465742	0.001	up	4.31	<i>PIP5K1B</i>
A_23_P46369	0.001	up	4.31	<i>RAB13</i>
A_33_P3352382	0.002	up	4.31	<i>ARG1</i>
A_33_P3319967	0.002	up	4.36	<i>ARG1</i>
A_24_P260443	0.001	up	4.36	<i>THBS4</i>
A_23_P330561	0.002	up	4.37	<i>C19orf59</i>
A_23_P32078	0.002	up	4.38	<i>SLC28A3</i>
A_33_P3258542	0.001	up	4.38	<i>SPINK8</i>
A_32_P35969	0.001	up	4.39	<i>CHRNA7</i>
A_23_P169437	0.002	up	4.41	<i>LCN2</i>
A_23_P76015	0.001	up	4.41	<i>ARHGEF17</i>
A_23_P119835	0.002	up	4.41	<i>NLRC4</i>
A_23_P117582	0.001	up	4.43	<i>JDP2</i>
A_24_P413884	0.001	up	4.43	<i>CENPA</i>
A_24_P252996	0.002	up	4.44	<i>FOLR3</i>
A_23_P121716	0.001	up	4.44	<i>ANXA3</i>
A_23_P137665	0.002	up	4.45	<i>CHI3L1</i>
A_23_P141021	0.001	up	4.45	<i>LPCAT2</i>
A_23_P216712	0.002	up	4.45	<i>TRPM6</i>
A_23_P58266	0.001	up	4.46	<i>S100P</i>
A_23_P31073	0.001	up	4.46	<i>MYB</i>
A_23_P380240	0.001	up	4.46	<i>CEACAM8</i>
A_23_P64913	0.002	up	4.47	<i>PDE6H</i>

A_23_P112452	0.001	up	4.47	<i>GGTA1P</i>
A_23_P501010	0.002	up	4.49	<i>COL17A1</i>
A_33_P3405769	0.001	up	4.49	<i>TARMI</i>
A_23_P304356	0.002	up	4.49	<i>CLEC5A</i>
A_23_P64372	0.002	up	4.49	<i>TCN1</i>
A_33_P3236030	0.002	up	4.50	<i>ARHGAP24</i>
A_33_P3387991	0.001	up	4.51	<i>CEBPE</i>
A_23_P41114	0.001	up	4.52	<i>CSTA</i>
A_24_P63136	0.003	up	4.54	<i>P2RY13</i>
A_23_P50710	0.002	up	4.55	<i>CYP4F2</i>
A_33_P3514487	0.001	up	4.56	<i>VSTM1</i>
A_23_P24903	0.001	up	4.59	<i>P2RY2</i>
A_33_P3369844	0.001	up	4.59	* <i>CD24</i>
A_23_P67847	0.001	up	4.60	<i>GALNT14</i>
A_33_P3421728	0.002	up	4.60	<i>DGKG</i>
A_23_P217319	0.001	up	4.61	<i>FGF13</i>
A_23_P364324	0.001	up	4.61	<i>ABCA13</i>
A_23_P133691	0.001	up	4.62	<i>RRAGD</i>
A_33_P3407529	0.001	up	4.64	<i>PRRT4</i>
A_23_P119222	0.002	up	4.65	<i>RETN</i>
A_33_P3349912	0.001	up	4.66	<i>RAB44</i>
A_23_P99253	0.002	up	4.67	<i>LIN7A</i>
A_23_P131789	0.001	up	4.67	<i>BPI</i>
A_33_P3424328	0.001	up	4.68	<i>RAB44</i>
A_24_P348265	0.002	up	4.68	<i>FCAR</i>
A_33_P3344831	0.004	up	4.71	<i>TMEM45A</i>
A_23_P131785	0.001	up	4.72	<i>BPI</i>
A_23_P56559	0.002	up	4.72	<i>DHRS9</i>
A_33_P3311498	0.002	up	4.73	<i>LOC283392</i>
A_23_P63390	0.001	up	4.73	<i>FCGR1B</i>
A_23_P218442	0.001	up	4.73	* <i>CEACAM6</i>
A_23_P161909	0.001	up	4.73	<i>MS4A3</i>
A_33_P3294277	0.001	up	4.77	<i>CYP4F3</i>
A_23_P356684	0.002	up	4.77	<i>ANLN</i>
A_24_P190472	0.001	up	4.78	<i>SLPI</i>
A_23_P326080	0.001	up	4.85	<i>DEFA4</i>
A_23_P140384	0.001	up	4.86	<i>CTSG</i>
A_23_P149529	0.001	up	4.87	<i>TACSTD2</i>
A_23_P57709	0.001	up	4.87	<i>PCOLCE2</i>
A_23_P35871	0.001	up	4.87	<i>E2F8</i>
A_23_P36658	0.001	up	4.91	<i>MGST1</i>
A_23_P160159	0.001	up	4.92	<i>SLC2A5</i>
A_23_P384635	0.001	up	4.92	<i>DZIP1L</i>
A_23_P29257	0.001	up	4.92	<i>HIF0</i>
A_32_P160045	0.002	up	4.95	<i>TCTEX1D1</i>
A_23_P163025	0.001	up	4.98	<i>RNASE3</i>
A_33_P3279353	0.001	up	4.99	<i>AZU1</i>
A_23_P151637	0.001	up	5.05	<i>RNASE2</i>
A_24_P46130	0.001	up	5.08	<i>ACPP</i>
A_32_P1712	0.001	up	5.10	<i>RNASE2</i>

A_24_P364807	0.001	up	5.16	<i>LPCAT2</i>
A_23_P130961	0.001	up	5.18	<i>ELANE</i>
A_23_P320124	0.002	up	5.24	<i>DEFT1P</i>
A_24_P411186	0.001	up	5.28	<i>BCL11A</i>
A_23_P141173	0.001	up	5.29	<i>MPO</i>
A_23_P159952	0.001	up	5.43	<i>BEX1</i>

補足資料 表 3

Gene-related functions with a minimum of 10 genes per category in the IPA defined Diseases and Bio Functions category as revealed by IPA Core Analysis

Categories	Functions	Diseases or functions annotation	P-value	P-value rankings	P-value rankings filtered by NK cell context with a minimum of 10 genes per category	Molecules	Number of Molecules
Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation, Hematological System Development and Function	proliferation	proliferation of immune cells	5.96 E-10	8	1	CCNA2,CD24,CD244,CD59,CDK2,CEACAM1,CTSZ,E2F1,E2F2,GADD45A,IL13RA1,IL1R1,IL6R,JAK2,KIR2DS4 (includes others),KLRC4-KLRK1/KLRK1,LILRB2,LILRB3,TLR2,TNFSF13B	20
Tissue Morphology	quantity	quantity of cells	1.02 E-09	11	2	ACKR3,AKT2,BMP2,BMPR1A,CCNA2,CCNB1,CCNB2,CD200R1,CD244,CD59,CD63,CDK2,E2F1,E2F2,FOXM1,GADD45A,IL13RA1,IL17RA,IL1R1,IL6R,IRAK3,JAK2,LILRB3,LITAF,RBBP8,RUNX2,TFDP1,TLR2,TNFSF13B	29
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking, Inflammatory Response	activation	activation of leukocytes	3.68 E-09	15	3	CD244,CD59,CD63,CEACAM1,CEACAM3,CEACAM6,GADD45A,IL1R1,IL6R,JAK2,KIR3DL1,KLRC4-KLRK1/KLRK1,LILRA2,LILRB2,LILRB3,SLA2,TLR2,TNFSF13B	18
Cell Death and Survival	cytotoxicity	cytotoxicity	6.25 E-09	19	4	CD244,CD59,CEACAM1,CHEK1,IL1R1,KIR2DL4,KIR2DS4 (includes others),KIR3DL1,KLRC4-KLRK1/KLRK1,PAK1,TLR2	11

補足資料 表 4

Networks in IPA Core Analysis of a data set of 69 NK cell function-associated genes that were differentially expressed between first- and third-trimester pNK cells

The filtering by Natural Killer Cell context found 1 networks

ID	Molecules in Network	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
1	CD63,CD82,CD244,CEACAM,CEACAM1,CEACAM3,CEACAM6,CEACAM8,Ctbp,CTS,ERK1/2,HLA-DR,Ifn,Ifn gamma,Igg3,IL 12 (complex),IL1R1,IRAK,IRAK3,KIR-L,KIR2DL4,KIR2DL5A,KIR2DS4 (includes others),KLRC4-KLRK1/KLRK1,LILRA2,LILRA4,LILRB2,LITAF,Pro-inflammatory Cytokine,RBBP8,Smad1/5/8,TCF,Tlr,TLR2,TNFSF13B	46	21	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking

VIII. 謝辞

研究全般についてご指導を賜りました自治医科大学産婦人科学講座・鈴木光明教授、松原茂樹教授、大口昭英准教授に深謝いたします。実際の実験計画、施行にご助言をいただきました日本医科大学分子解剖学講座瀧澤俊広教授、吉武洋講師、弓削和哉助教、趙東威助教、小菅拓治技術員をはじめ、同講座の先生方に感謝致します。

IX. 参考文献

1. Moretta L, Ferlazzo G, Mingari MC, Melioli G, Moretta A: Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells. *Vaccine* 21 Suppl 2: S38-42, 2003
2. Fink LN, Zeuthen LH, Christensen HR, Morandi B, Frokiaer H, Ferlazzo G: Distinct gut-derived lactic acid bacteria elicit divergent dendritic cell-mediated NK cell responses. *Int Immunol* 19: 1319-1327, 2007
3. Morandi B, Mortara L, Chiossone L, Accolla RS, Mingari MC, Moretta L, Moretta A, Ferlazzo G: Dendritic cell editing by activated natural killer cells results in a more protective cancer-specific immune response. *PLoS One* 7: e39170, 2012
4. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F: Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5: 1260-1265, 2004
5. Robbins SH, Bessou G, Cornillon A, Zucchini N, Rupp B, Ruzsics Z, Sacher T, Tomasello E, Vivier E, Koszinowski UH, Dalod M: Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog* 3: e123, 2007
6. Krebs P, Barnes MJ, Lampe K, Whitley K, Bahjat KS, Beutler B, Janssen E, Hoebe K: NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood* 113: 6593-6602, 2009
7. Andrews DM, Estcourt MJ, Andoniou CE, Wikstrom ME, Khong A, Voigt V, Fleming P, Tabarias H, Hill GR, van der Most RG, Scalzo AA, Smyth MJ, Degli-Esposti MA: Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med* 207: 1333-1343, 2010
8. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH: T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 7: 507-516, 2006
9. Paust S, Gill HS, Wang BZ, Flynn MP, Moseman EA, Senman B, Szczepanik M, Telenti A, Askenase PW, Compans RW, von Andrian UH: Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat Immunol* 11: 1127-1135, 2010
10. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM: Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:

1915-1919, 2009

11. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL: Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457: 557-561, 2009
12. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S: Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331: 44-49, 2011
13. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R: Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319: 675-678, 1986
14. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L: Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 14: 619-648, 1996
15. Yokoyama WM, Seaman WE: The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol* 11: 613-635, 1993
16. Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH: Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169: 2233-2238, 1989
17. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633-640, 2001
18. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Munz C: The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 172: 1455-1462, 2004
19. Kalkunte S, Chichester CO, Gotsch F, Sentman CL, Romero R, Sharma S: Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* 59: 425-432, 2008
20. Santoni A, Carlino C, Stabile H, Gismondi A: Mechanisms underlying recruitment and accumulation of decidual NK cells in uterus during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 59: 417-424, 2008
21. Moffett A, Colucci F: Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface.

J Clin Invest 124: 1872-1879, 2014

22. Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A: Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *Am J Reprod Immunol* 59: 388-400, 2008
23. Hedlund M, Stenqvist AC, Nagaeva O, Kjellberg L, Wulff M, Baranov V, Mincheva-Nilsson L: Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J Immunol* 183: 340-351, 2009
24. Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233, 2009
25. Wightman B, Ha I, Ruvkun G: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-862, 1993
26. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854, 1993
27. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T: mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129: 1401-1414, 2007
28. Rossi RL, Rossetti G, Wenandy L, Curti S, Ripamonti A, Bonnal RJ, Birolo RS, Moro M, Crosti MC, Gruarin P, Maglie S, Marabita F, Mascheroni D, Parente V, Comelli M, Trabucchi E, De Francesco R, Geginat J, Abrignani S, Pagani M: Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4⁺ T cells by the microRNA miR-125b. *Nat Immunol* 12: 796-803, 2011
29. Allantaz F, Cheng DT, Bergauer T, Ravindran P, Rossier MF, Ebeling M, Badi L, Reis B, Bitter H, D'Asaro M, Chiappe A, Sridhar S, Pacheco GD, Burczynski ME, Hochstrasser D, Vonderscher J, Matthes T: Expression profiling of human immune cell subsets identifies miRNA-mRNA regulatory relationships correlated with cell type specific expression. *PLoS One* 7: e29979, 2012

30. Wang P, Gu Y, Zhang Q, Han Y, Hou J, Lin L, Wu C, Bao Y, Su X, Jiang M, Wang Q, Li N, Cao X: Identification of resting and type I IFN-activated human NK cell miRNomes reveals microRNA-378 and microRNA-30e as negative regulators of NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 189: 211-221, 2012
31. Kambe S, Yoshitake H, Yuge K, Ishida Y, Ali MM, Takizawa T, Kuwata T, Ohkuchi A, Matsubara S, Suzuki M, Takeshita T, Saito S, Takizawa T: Human exosomal placenta-associated miR-517a-3p modulates the expression of PRKG1 mRNA in Jurkat cells. *Biol Reprod* 91: 129, 2014
32. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402-408, 2001
33. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S: Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9: 503-510, 2008
34. Dybkaer K, Iqbal J, Zhou G, Geng H, Xiao L, Schmitz A, d'Amore F, Chan WC: Genome wide transcriptional analysis of resting and IL2 activated human natural killer cells: gene expression signatures indicative of novel molecular signaling pathways. *BMC Genomics* 8: 230, 2007
35. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z: Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37: 766-770, 2005
36. Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, Takizawa T, Shigehara T, Goto T, Izumi A, Ohkuchi A, Matsubara S, Takeshita T, Takizawa T: Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod* 81: 717-729, 2009
37. Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Schmidt A, Chaiwangyen W, Markert UR: Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: origin, evolution and future of placenta miRNAs. *Placenta* 35 Suppl: S39-45, 2014
38. Zhang R, Wang YQ, Su B: Molecular evolution of a primate-specific microRNA family. *Mol Biol Evol* 25: 1493-1502, 2008
39. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, Cavaille J: The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 19: 3566-3582, 2010

40. Taylor DD, Akyol S, Gercel-Taylor C: Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol* 176: 1534-1542, 2006
41. Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J: Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev* 86: 1-23, 2006
42. Hofmann F, Wegener JW: cGMP-dependent protein kinases (cGK). *Methods Mol Biol* 1020: 17-50, 2013
43. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, Msuzaki H: Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 56: 1767-1771, 2010
44. Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL: Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 10: 179-186, 2003
45. Curran EM, Berghaus LJ, Verneti NJ, Saporita AJ, Lubahn DB, Estes DM: Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor-alpha-mediated pathway. *Cell Immunol* 214: 12-20, 2001
46. van den Heuvel MJ, Xie X, Tayade C, Peralta C, Fang Y, Leonard S, Paffaro VA Jr, Sheikhi AK, Murrant C, Croy BA: A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. *Am J Reprod Immunol* 54: 322-331, 2005
47. Yusa S, Catina TL, Campbell KS: SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J Immunol* 168: 5047-5057, 2002
48. Lu SX, Kappel LW, Charbonneau-Allard AM, Atallah R, Holland AM, Turbide C, Hubbard VM, Rotolo JA, Smith M, Suh D, King C, Rao UK, Yim N, Bautista JL, Jeng RR, Penack O, Na IK, Liu C, Murphy G, Alpdogan O, Blumberg RS, Macian F, Holmes KV, Beauchemin N, van den Brink MR: Ceacam1 separates graft-versus-host-disease from graft-versus-tumor activity after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *PLoS One* 6: e21611, 2011
49. Van Kaer L: Regulation of immune responses by CD1d-restricted natural killer T cells. *Immunol Res* 30: 139-153, 2004
50. Ueda N, Kuki H, Kamimura D, Sawa S, Seino K, Tashiro T, Fushuku K, Taniguchi M,

- Hirano, Murakami M: CD1d-restricted NKT cell activation enhanced homeostatic proliferation of CD8⁺ T cells in a manner dependent on IL-4. *Int Immunol* 18: 1397-1404, 2006
51. Li D, Wang L, Yu L, Freundt EC, Jin B, Screation GR, Xu XN: Ig-like transcript 4 inhibits lipid antigen presentation through direct CD1d interaction. *J Immunol* 182: 1033-1040, 2009
 52. Ujike A, Takeda K, Nakamura A, Ebihara S, Akiyama K, Takai T: Impaired dendritic cell maturation and increased T(H)2 responses in PIR-B(-/-) mice. *Nat Immunol* 3: 542-548, 2002
 53. Jabrane-Ferrat N, Siewiera J: The up side of decidual natural killer cells: new developments in immunology of pregnancy. *Immunology* 141: 490-497, 2014
 54. Joncker NT, Shifrin N, Delebecque F, Raulet DH: Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J Exp Med* 207: 2065-2072, 2010
 55. Elliott JM, Wahle JA, Yokoyama WM: MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. *J Exp Med* 207: 2073-2079, 2010
 56. Park DW, Lee HJ, Park CW, Hong SR, Kwak-Kim J, Yang KM: Peripheral blood NK cells reflect changes in decidual NK cells in women with recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol* 63: 173-180, 2010
 57. Beaulieu AM, Bezman NA, Lee JE, Matloubian M, Sun JC, Lanier LL: MicroRNA function in NK-cell biology. *Immunol Rev* 253: 40-52, 2013
 58. Leong JW, Sullivan RP, Fehniger TA: microRNA management of NK-cell developmental and functional programs. *Eur J Immunol* 44: 2862-2868, 2014