

|         |   |
|---------|---|
| 氏名      | 石田 洋一   |
| 学位の種類   | 博士 (医学)                                       |
| 学位記番号   | 甲第 471 号                                      |
| 学位授与年月日 | 平成 27 年 3 月 18 日                              |
| 学位授与の要件 | 自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当                        |
| 学位論文名   | 妊婦末梢血 natural killer 細胞の網羅的 microRNA -遺伝子発現解析 |
| 論文審査委員  | (委員長) 教授 川島 秀俊<br>(委員) 准教授 柏田 正樹 准教授 土橋 洋     |

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

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、microRNA (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。

### 2 研究方法

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ため、先端の 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 細胞に存在しない胎盤由来である第 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り解析を行った。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 NK 細胞の機能への影響やパスウェイ解析を行った。

### 3 研究成果

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。妊娠後期と分娩後 4 日の比較解析から、9 種類の miRNA が産後 4 日の 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。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に有意な変動を認め、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 を用いたバイオインフォマティクス解析から、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。

#### 4 考察

母体pNK細胞におけるC19MC miRNAの取り込みとクリアランスは、胎盤の発達とともに血中の胎盤由来miRNAは増加するため、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、分娩後はそ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。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、複雑であった。

#### 5 結論

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来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。

### 論文審査の結果の要旨

母体にとっては異物ともいえる胎児が、母体環境下において、いかに認容され、育成され、そして誕生に辿り着けるのかというテーマは、これまでも様々な視点から解析されてきた。妊娠維持さらに分娩発来を司る体内の環境の中でも、特に免疫ネットワークの働きが注目されている。様々な細胞群が免疫ネットワークを形成しているわけだが、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)は、自然免疫のエフェクター細胞としてがん細胞やウイルス感染細胞を殺傷排除するとともに、獲得免疫においても調節役としても重要な機能を担っている。以上を勘案すると、妊娠期間中の母体血液にも存在するこのNK細胞(pNK細胞)が、母体の妊娠・出産というプロセスにどのように関与しているのか、必然的に興味深いテーマの一つとなってくる。

申請者らは、microRNA(miRNA)が、タンパク質をコードしない短鎖RNAでありながら、相補的な配列を持つ標的mRNAの非翻訳領域と結合する事により遺伝子発現を調節している事に注目し、様々な妊娠時期および出産後の妊婦よりサンプルを得て、各群サンプルからのpNK細胞におけるmiRNAの発現程度の比較検討を行なった。その結果、

- 1) PCR miRNA アレイ解析から、妊娠初期～後期のpNK細胞において、25種類(胎盤由来のC19MC miRNA6種類含む)のmiRNA発現が上昇していた。また、妊娠後期～出産後のpNK細胞において、9種類(胎盤由来のC19MC miRNA8種類を含む)のmiRNA発現が低下していた。
- 2) リアルタイムPCR解析により、C19MC miRNAのなかのmiR-517a-3p、miR-518bの発現レベルを各群サンプルにおいて解析すると、妊娠後期で有意に高くなり出産後に有意に減少した。

3) DNA アレイ解析から、妊娠初期～後期の pNK 細胞において、69 種類（胎盤由来の C19MC miRNA8 種類を含む）の NK 細胞機能関連遺伝子に有意な変動を認めた。その結果を IPA Core analysis の Downstream effects analysis にかけると、proliferation of immune cells および quantity of cells が後期にかけて低下、activation of leukocytes および cytotoxicity が後期にかけて亢進、と予測された。In silico 解析では、妊娠後期の pNK 細胞において発現上昇した miRNA に対して、6 遺伝子（*KIR2DS4*、*KLRK1* など）の発現が減少することが予測され、妊娠中 pNK 細胞において 6 種類の miRNA-mRNA 制御機構の仮説を構築した。

論文審査の結果、いくつかの論文体裁に関するアドバイスがなされ、また今後雑誌論文掲載にむけ、リアルタイム PCR 解析による発現検証実験を実施すべきであるなど、今後の課題も指摘された。しかし、提出された論文は、母体における妊娠維持に関与する免疫ネットワークの一翼をなす NK 細胞にトピックを当てた充実した内容となっており、学位論文に値すると全員一致で判断した。

### 最終試験の結果の要旨

発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質と能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断し、最終試験に合格とした。学位論文は審査委員のアドバイスに従って構成・内容を修正することとし、再提出後に審査委員全員が確認した上で合格とした。