
原 著

全胎状奇胎胎盤における HLA-E, -F, -G の発現に関する検討

奈良県立医科大学法医学教室

正 武 孝 規, 下 嶋 典 子, 中 西 真 理,
大 村 素 子, 粕 田 承 吾, 石 谷 昭 子,
羽 竹 勝 彦

白鳳会林産婦人科

徳 井 宏, 林 行 夫

DETECTION OF HLA-E, -F, -G EXPRESSION ON PLACENTAL TROPHOBLASTS IN COMPLETE HYDATIDIFORM MOLE

TAKANORI SHOBU, NORIKO SAGESHIMA, MARI NAKANISHI, MOTOKO OMURA,

SHOGO KASUDA, AKIKO ISHITANI and KATSUHIKO HATAKE

Department of Legal Medicine, Nara Medical University

HIROSHI TOKUI and YUKIO HAYASHI

Hakuhokai Hayashi Women's Clinic

Received August 18, 2006

Abstract : In this study, we focused on HLA-E, -F and -G expression on placental trophoblasts in complete hydatidiform mole comparing these cells with early normal pregnancy. Five normal placentas at 7-9 weeks and 4 complete hydatidiform moles were tested for the expression of HLA-E, -F, and -G by immunohistochemical staining using anti HLA-E, -F, and -G antibodies (3D12, 3D11, and 87G). The expression of HLA-E in hydatidiform mole was slightly stronger than in early normal placentas, while the expression of HLA-F was significantly stronger, with no substantial difference in HLA-G expression between hydatidiform mole and normal placenta. The meaning of the increased expression of HLA-F is not yet clear, since the function of HLA-F is unknown at this point. However, these results are suggestive of the possibility that increased HLA-F expression is influencing the growth and invasion of the tissue of the hydatidiform mole. This idea is based on our previous findings that certain types of undifferentiated cancer tissues expressed HLA-F. Further, it is suggested that increased levels of HLA-E expression may enhance the suppression of cytolytic activity of NK cell and protect the hydatidiform mole.

Key words: HLA-E, HLA-F, HLA-G, complete hydatidiform mole, extravillous trophoblasts (EVTs)

緒 言

非古典的 HLA class I (class Ib) 分子である HLA-E, -F, -G は, 1987 から 1990 年にかけて Geraghty らによって発見された遺伝子¹⁻³⁾で, 多型性が非常に乏しいことを特徴としている. HLA-G は通常, 人体組織においては母児の接点である胎盤 trophoblast にもみ発見し, 胎盤以外のいかなる組織にも発見していない. またこの trophoblast には HLA 分子としては古典的 HLA class I (class Ia) 分子 (HLA-A, -B, -C) と HLA class II のいずれも発見していない (但し HLA-C が弱く発見しているという報告がある⁴⁾). また, HLA-G は NK レセプターの一つである Immunoglobulin-like transcript (ILT)-2, -4 のリガンドとして NK 傷害活性の抑制に働くことが知られており, 母体 NK 細胞の傷害活性の抑制に重要な役割を担っている^{5,6)}. HLA-E は, 胎盤を含む HLA class I を発現する全ての組織上に発現して, 同じく NK レセプターの一つの CD94/NKG2 レセプターと結合し, NK 細胞を抑制あるいは活性化させることが知られている^{7,8)}. すなわち, HLA-E と -G はともに NK 細胞に働きかけ, 傷害性を抑制し, あるいは活性化することにより, 各種のサイトカインを分泌させるという妊娠維持にむけて複雑な働きをしていると考えられる⁹⁾. 一方, HLA-F についてはまだほとんど解明されておらず, その発現については人体のいかなる細胞においても細胞表面には発現されないと報告されてきた^{10,11)}. しかし, Lee & Geraghty¹²⁾によって, EB virus で形質転換された細胞において, その細胞表面上に発現することが報告された. またわれわれ¹³⁾は正常満期胎盤の trophoblast の細胞表面に HLA-E, -G だけでなく, HLA-F が発現していることを報告した. さらに妊娠周期別に HLA-E, -F, -G の発現形態を検討したところ, HLA-G は脱落膜に侵入している extravillous trophoblast (EVTs) に, 妊娠全期間にわたり, 一様に強く発現がみられ, HLA-E は, 妊娠初期から後期に向けて, EVTs における発現が増強しており, HLA-F は妊娠初期では, EVTs の細胞質にのみ認められた発現が, 妊娠後期になるにつれ細胞表面に移行し, 増強されることを確認した¹⁴⁾. これらの結果から HLA-E, -F, -G は妊娠中における胎児 / 母体間免疫に何らかの重要な役割を担うと推察される.

一方, 胞状奇胎は組織学的形態から, 全胞状奇胎と部分胞状奇胎に分けられるが, いずれの胞状奇胎も, 正常妊娠とは違って奇胎組織が子宮腔内にとどまらず, 肉眼的あるいは顕微鏡的に子宮筋層に侵入し肺などに遠隔転移をきたす侵入奇胎に進行することがある¹⁵⁾. すなわち,

胞状奇胎は悪性腫瘍と似た進展を示すと推測され, 悪性腫瘍で up regulate されている遺伝子が, 正常の trophoblast よりも強く発現しているという報告もある^{16,17)}.

これまで, HLA-G が免疫寛容分子であるという点から, 悪性腫瘍における HLA-G の発現については多くの報告が見られるが, いまだ明確な結論は得られていない. 我々も, 悪性腫瘍における HLA-G, さらに HLA-E, -F の発現について調べたが, HLA-G を発現している悪性腫瘍を見出すことはできなかった. しかし, 一部の悪性腫瘍において, HLA-F が発現しているものがあり, HLA-F が悪性腫瘍の分化あるいは予後に関係しているのではないかと考えている (未発表).

そこで, 悪性腫瘍と同様の進展を示す胞状奇胎の発生および異常増殖・転移機構の解明の一助とするため, 胞状奇胎組織における HLA-F, および HLA-E, -G の発現について調べた.

方 法

対象

合併症のない超音波検査などで胞状奇胎と診断された患者 4 例 (妊娠 7 ~ 9 週) と, 正常妊娠の初期妊婦 5 例 (妊娠 7 ~ 9 週) を対象とした. なお胞状奇胎と診断された症例はすべて全胞状奇胎の診断であった. 十分な説明のもとで同意を得て, 子宮内容清掃術 (正常妊婦では人工妊娠中絶) を施行した際に得られた胎盤組織に dry ice-acetone を用いて速やかに凍結し, -135°C で保存した.

抗体

HLA-E, -F, -G に対する抗体としては, それぞれ 3D12⁷⁾, 3D11¹³⁾, 87G¹⁸⁾ を使用した. これらの抗体の特異性は, すでに報告されている (Lee et al.^{7,18)} Ishitani et al.¹³⁾). trophoblast のマーカーとして, anti-cytokeratin (CK7, Beckton Dickinson 社) を, decidual cell のマーカーとして, anti-vimentin (V9, DAKO 社) をそれぞれ使用した. 3D12, 3D11, V9 の isotype control として IgG1 (e-Biosciences 社) を, 87G, CK7 の isotype control として IgG2a (e-Biosciences 社) をそれぞれ使用した.

免疫組織染色

凍結保存しておいた胎盤組織を 5 μ m に薄切し, スライドガラス上に風乾固定した. P B S 洗浄後, 1% paraformaldehyde-0.1M phosphate buffer (pH 7.4) にて 25°C, 30 分固定を行った.

固定液を洗浄後, 40% ヒト AB 血清 3% ウシ血清アル

ブミン phosphate buffered saline (PBS) でブロッキング (25°C, 20 分) を行った。PBS で洗浄後、一次抗体およびアイソタイプコントロール (CK7, V9; 5 µg/ml, それ以外 20 µg/ml) と反応させた (25°C, 20 分)。抗体を洗浄後、3% H₂O₂ で内因性ペルオキシダーゼをブロックした後、二次抗体 (HISTOFINE SIMPLESTAIN MAX-PO (M); ニチレイ社) を反応させた (25°C, 30 分)。これらの反応を 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) の発色により確認した。核染色を hematoxylin で行った。

結 果

正常妊娠初期胎盤における HLA-E, -F, -G の発現

正常妊娠初期胎盤脱着膜における HLA-E, -F, -G の免疫染色の結果を Table1 および Fig.1 に示した。Table1 は 5 例の正常胎盤組織における HLA-E, -F, -G の発現強度を示し、そのうちの 1 例の染色像を Fig. 1. A-G に示した。

この染色像において anti-cytokeratin (CK7) に強染し、anti-vimentin (V9) に染まらない部分は EVT s である。逆に V9 で染色されていて、CK7 で染まらない部分は decidual cell である。

HLA-E は、EVTs, decidual cell のいずれにも、弱く発現が認められた (Fig. 1. A)。HLA-F も、EVTs, decidual cell のいずれにも発現していたが、いずれの細胞にも、細胞質に弱く発現しており、細胞表面には発現して

いなかった。また、脱着膜間質にも弱い発現がみられた (Fig. 1. B)。すなわち、HLA-E と HLA-F は、脱着膜において、EVTs, decidual cell にかかわらず、一様に弱く発現していた。一方、HLA-G は、decidual cell には全く発現しておらず、EVTs にも強く発現していた (Fig. 1. C)。これらの結果は、我々の以前の結果と一致しており、妊娠初期の EVT s には HLA-E, -F は強く発現しておらず、HLA-G のみが強く発現していることが明らかとなった。

全胞状奇胎胎盤における HLA-E, -F, -G の発現

全胞状奇胎胎盤脱着膜付近の EVT s における HLA-E, -F, -G の免疫染色の結果を Table1 および Fig.1 に示した。Table1 は 4 例の胞状奇胎組織における HLA-E, -F, -G の発現強度を示し、そのうちの 1 例の染色像を Fig. 1. H-N に示した。

Fig. 1. K および Fig. 1. L において、ほぼすべての細胞が CK7 陽性、V9 陰性であること、Fig. 1. J において、ほぼすべての細胞が HLA-G 陽性であることから、これらの細胞は EVT s である。

HLA-G は胞状奇胎胎盤の EVT s に、正常胎盤と同様、強く発現していた。データには示していないが、正常初期胎盤 EVT s における HLA-G の発現強度は多様であるが、胞状奇胎胎盤 EVT s においては、一様に強く HLA-G が発現していた。正常胎盤と胞状奇胎胎盤において、HLA-G を強く発現している EVT s の HLA-E の発現

Table 1. Intensity of the HLA-E, -F, -G expression in extravillous trophoblasts (EVTs) from complete hydatidiform moles and early normal placentas.

Sample	Monoclonal antibodies		
	3D12 (anti HLA-E)	3D11 (anti HLA-F)	87G (anti HLA-G)
Complete hydatidiform mole			
1	+	++	+++
2	++	++	+++
3	+	++	+++
4	++	++	+++
Early normal placenta			
1	+	+	+++
2	+	+	+++
3	+	+	+++
4	+	+	+++
5	+	+	+++

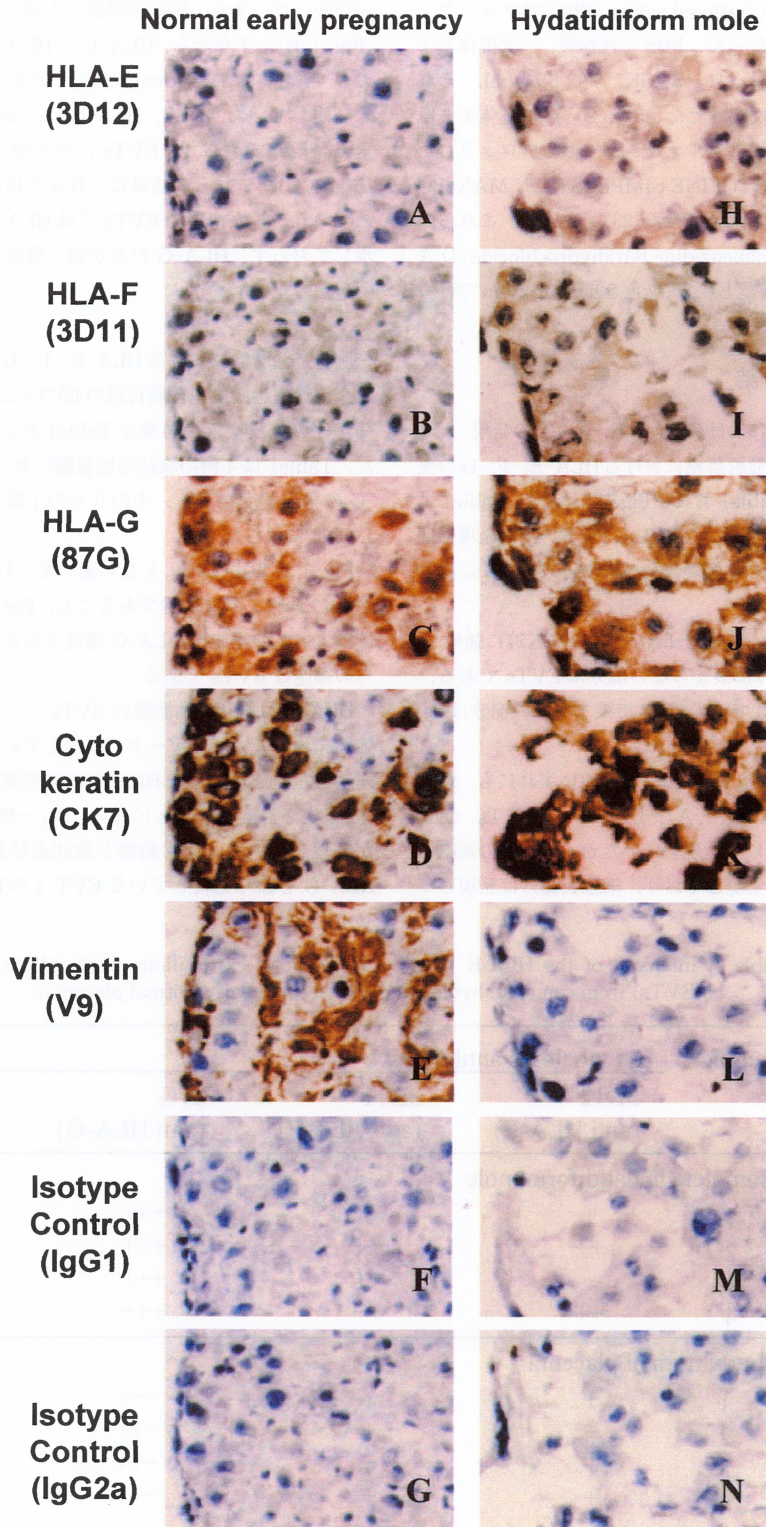


Fig. 1

を比較すると, HLA-E は, 胎状奇胎胎盤の EVTs に比較的強く発現していた (Fig. 1. H). また同様に, HLA-F の発現を比較すると, HLA-F も胎状奇胎胎盤の EVTs により強く発現しており (Fig. 1. I), 胎状奇胎胎盤における EVTs は HLA-E, -F, -G のいずれもが強く発現していた. しかし, HLA-F の発現については, 後期正常胎盤 EVTs の HLA-F が EVTs の細胞表面付近に強く発現しているのに対し, 胎状奇胎胎盤の HLA-F は, EVTs の細胞表面付近には強い発現は見られず, 細胞質に強く発現していた.

考 察

胎状奇胎の発生機序としては全胎状奇胎のほとんどが染色体的には 46XX でわずかの症例が 46XY とであるが, これらの染色体はいずれも父親から由来するといわれている (雄核発生: androgenesis)¹⁵⁾. また部分胎状奇胎は多くは 3 倍体 (69XXY, 69XXX, 69YYY) で, これらの染色体の 2 個は父親由来で残りの 1 個は母親由来とされている¹⁵⁾. いずれにしても胎状奇胎は染色体異常を持つ妊卵の病的表現型といえる. 今回われわれは全胎状奇胎における HLA-E, -F, -G の発現について検討した.

我々はすでに, HLA-G は, 正常妊娠初期から後期にわたり, 脱着膜に侵入している EVTs に強く発現していることを報告しているが, 今回, 全胎状奇胎 EVTs も, 正常妊娠と変わらず強く発現していることを示した. このことは, HLA-G が, 妊卵の発生異常をもつ胎状奇胎組織においても, 正常妊娠と同様に NK 傷害活性抑制に働き, 奇胎組織の子宮内での増殖を保護しているものと推察される.

一方, HLA-E は EVTs を含む正常妊娠初期胎盤全般に均一に弱く発現しているが, 全胎状奇胎においては同じ妊娠週令ながら, EVTs 以外の胎盤組織には正常胎盤同様, 弱く発現し, EVTs にのみ比較的強く発現していた. HLA-E は他の HLA 由来のシグナルペプチドを結合して細胞表面に発現し, NK レセプターの CD94/NKG2 と結合して NK 細胞を活性化あるいは抑制する. しかも結合するペプチドの種類によりその作用が異なり,

Class Ia 由来のペプチドを結合している場合は CD94/NKG2A を介し, NK 細胞を抑制するが, HLA-G 由来のペプチドを結合している場合は CD94/NKG2A と結合するが, 主として活性化レセプターである CD94/NKG2C と結合して NK 細胞を活性化させる^{7,8)}. この活性化された NK 細胞は傷害活性をもつと同時に interferon- γ (IFN- γ) 等各種サイトカインを分泌する. trophoblast においては, HLA 分子の発現は class Ib あるいは HLA-C に限られているため HLA-E の結合するペプチドは HLA-G あるいは HLA-C のシグナルペプチド由来のものに限られている^{9,10)}. すなわち, trophoblast 上の HLA-E は主に HLA-G 由来のペプチドを結合している (HLA-E/Gpеп) と考えられ, NKG2C と結合して NK 細胞を活性化する. しかし一方, HLA-C 由来のペプチドと結合した HLA-E/Cpеп は NKG2A と結合して NK 細胞抑制に働き, また HLA-G は ILT2 等と反応し, NK 細胞抑制に強く働く. そして結果としては, NK 細胞は trophoblast の細胞傷害までは至らないで, IFN- γ 等サイトカインの分泌を行うのではないかと推測される¹⁰⁾. この IFN- γ 等サイトカインの分泌こそが胎盤を形成するのに重要であると報告されている¹⁰⁾. 今回の胎状奇胎においては妊卵が子宮内で異常なかたちで増殖しながら拒絶されることなく発育していることから, HLA-E の発現増強が NK 活性をさらに抑制させる方向に働いて異常増殖する奇胎組織を保護していると考えられる.

HLA-F は, 正常妊娠初期胎盤において, EVTs を含む胎盤全体に一様にごく弱くしか発現していなかったのが, 全胎状奇胎においては EVTs にのみ, その発現が増強されていた. HLA-F の発現, 機能等についてはほとんど解明されていないが, Lee & Geraghty¹²⁾ は, 正常末梢血 B 細胞を, EB virus で形質転換することにより細胞表面に HLA-F を発現させることを報告している. このことから, HLA-F は, 細胞が何らかの活性化状態にある時に細胞表面に発現するようである. 彼らは, HLA-F を発現していることの意味として, その細胞が活性化状態であることを免疫担当細胞に知らせる働きをしているのではないかと推測している. 脱着膜に侵入して

Fig. 1. Immunohistochemical identification of HLA-E, -F, and-G in extravillous trophoblasts (EVTs) of early normal pregnancy and complete hydatidiform mole.

Frame A-G show EVTs in decidua of early normal pregnancy, and frame H-N show the EVTs in complete hydatidiform mole. Each section was stained with anti-HLA-E, 3D12 (frames A and H); anti-HLA-F, 3D11 (B and I); anti-HLA-G, 87G (C and J); anti-cytokeratin, CK7 (D and K); anti-vimentin, V9 (E and L); IgG1 (F and M); and IgG2a (G and N). The expression of HLA-E in hydatidiform mole was slightly stronger than early normal placentas, and the expression of HLA-F was much stronger, while there was not clear difference in the HLA-G expression between hydatidiform mole and normal placenta. Magnification: 100x.

いる EVTs が母体免疫系により何らかの活性化状態にある可能性はあるが、現時点では、なぜ、後期胎盤 EVTs 上に HLA-F 発現が増強されるのか、また、その意味についても不明である。他方、HLA-F の機能に関しては HLA-F の 4 量体が NK レセプター、ILT2、ILT4 と結合するという報告¹³⁾があるが追試確認されておらず、また、HLA-F が NK 細胞を抑制するという報告も全くないため、現時点では HLA-F の免疫担当細胞に対する機能は不明である。しかし、我々は胎状奇胎胎盤 EVTs における HLA-F 発現の増強は、後期胎盤 EVTs における HLA-F の発現増強とは異なっているのではないかと考えている。未発表データではあるが、我々は HLA-F が一部の悪性腫瘍の細胞質に強く発現していることを確認しており、胎状奇胎が、正常妊娠とは異なり、子宮腔内で異常に増殖し、場合によっては子宮筋層に侵入し、遠隔転移するという悪性腫瘍に似た特性を持っていることから、胎状奇胎 EVTs における HLA-F の発現増強は悪性腫瘍における HLA-F 発現に関連しているのではないかと考えている。

胎状奇胎は正常とは異なるが、妊卵が子宮腔内で发育していくという妊娠に関する領域と子宮筋層内に侵入し遠隔転移するという悪性腫瘍に似た領域が重なり合う興味深い分野である。今後さらに部分胎状奇胎を含め、構成する染色体数の異なる各種の奇胎について、HLA-F の発現と悪性度との関連を調べることにより、HLA-F 発現の意味をより明確にしようと考える。

結 語

全胎状奇胎胎盤における HLA-E、-F、-G の発現を検討した。その結果 EVTs における HLA-G は正常胎盤と同様に強く発現していたが、HLA-E、-F については EVTs における発現のみが増強していた。我々は一部の悪性腫瘍に HLA-F が発現していることを見出しているが、奇胎組織における HLA-F 発現亢進は、奇胎組織の悪性腫瘍に似た進展が関与しているのではないかと推測している。また HLA-E 発現亢進は奇胎組織をさらに強く保護するためではないかと考えている。

文 献

- 1) Geraghty, D. E., Koller, B. H. and Orr, H. T. : A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84** : 9145-9149, 1987.
- 2) Koller, B. H., Geraghty, D. E., Shimizu, Y., DeMars, R. and Orr, H. T. : HLA-E, a novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J. Immunol.* **141** : 897-904, 1988.
- 3) Geraghty, D. E., Wei, X., Orr, H. T. and Koller, B. H. : Human leukocyte antigen F(HLA-F), an expressed HLA gene composed of class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. *J. Exp. Med.* **171** : 1-18, 1990.
- 4) King, A., Burrows, T.D., Hiby, S.E., Bowen, J.M., Joseph, S., Verma, S., Lim, P.B., Gardner, L., Le Bouteiller, P., Ziegler, A., Uchanska-Ziegler B. and Loke, Y.W. Surface expression of HLA-C antigen by human extravillous trophoblast, *Placenta* **21** : 376-387, 2000.
- 5) Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M. and Lopes-Botet, M. : A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* **186** : 1809-1818, 1997.
- 6) Colonna, M., Samaridis, J., Cella, M., Angman, L., Allen, R. L., O'callaghan, C. A., Dunbar, R., Ogg, G. S., Cerundolo, V. and Rolink, A. : Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J. Immunol.* **160** : 3096-3100, 1998.
- 7) Lee, N., Goodlett, D. R., Ishitani, A., Marquardt, H. and Geraghty, D. E. : HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *J. Immunol.* **160** : 4951-4960, 1998.
- 8) Llano, M., Lee, N., Navarro, F., Garcia, P., Albar, J. P., Geraghty, D. E. and Lopez-Botet, M. : HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur. J. Immunol.* **28** : 2854-2863, 1998.
- 9) 石谷昭子 : HLA-E、-F、-G の発現と機能 - 胎児 / 母体間免疫のブラックボックスは開きうるか - . *奈良医学雑誌* . **53** : 113-123, 2002.
- 10) Wainwright, S. D., Biro, P. A. and Holmes, C. H.

- : HLA-F is a predominantly empty, intracellular, TAP-associated MHC class Ib protein with a restricted expression pattern. *J. Immunol.* **164** : 319-328, 2000.
- 11) **Lepin, E. J. M., Bastin, J. M., Allan, D. S. J., Roncador, G., Braud, V. M., Mason, D. Y., van der Merwe, P. A., McMichael, A. J., Bell, J. I., Powis, S. H. and O'Callaghan, C. A.** : Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur. J. Immunol.* **30** : 3552-3561, 2000.
 - 12) **Lee, N. and Geraghty, D. E.** : HLA-F surface expression on B cell and monocyte cell lines is partially independent from tapasin and completely independent from TAP. *J. Immunol.* **171** : 5264-5271, 2003.
 - 13) **Ishitani, A., Sageshima, N., Lee, N., Dorofeeva, N., Hatake, K., Marquardt, H. and Geraghty, D. E.** : Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting function roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J. Immunol.* **171** : 1376-1384, 2003.
 - 14) **Shobu, T., Sageshima, N., Tokui, H., Omura, M., Saito, K., Nagatsuka, Y., Nakanishi, M., Hayashi, Y., Hatake, K. and Ishitani, A.** : The surface expression of HLA-F on decidual trophoblasts increases from mid to term gestation. *J. Reprod. Immunol.* In press.
 - 15) **井上正樹** : 妊娠性絨毛性疾患 . 産婦人科治療 . **90** : 1047-1058, 2005.
 - 16) **Fulop, V., Mok, S. C. and Berkowitz, R. S.** : Molecular biology of gestational trophoblastic neoplasia. *J. Reprod. Med.* **49** : 415-422, 2004.
 - 17) **Li, H. W., Tsao, S. W. and Cheung, A. N.** : Current understandings of the molecular genetics of gestational trophoblastic diseases. *Placenta.* **23** : 20-31, 2002.
 - 18) **Lee, N., Malacko, A. R., Ishitani, A., Chen, M. C., Bajorath, J., Marquardt, H. and Geraghty, D. E.** : The membrane-bound and soluble forms of HLA-G bind identical sets of endogenous peptides but differ with respect to TAP association. *Immunity.* **3** : 591-600, 1995.
 - 19) **Ishitani, A., Sageshima, N. and Hatake, K.** : The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* **69** : 101-113, 2006.