

正常妊娠および絨毛性疾患の trophoblast における HLA-DP および HLA-DQ の表現に関する研究

香川医科大学医学部母子科学講座 (主任: 半藤 保教授)

笹川 基 佐々木敏江 安田 雅弘 望月 雅子
山崎 俊彦 黒瀬 高明 田中 耕平 半藤 保

HLA-DP and HLA-DQ Antigen Expression on Trophoblasts of Normal Human Pregnancy and Trophoblastic Diseases

Motoi SASAGAWA, Toshie SASAKI, Masahiro YASUDA,

Masako MOCHIZUKI, Toshihiko YAMAZAKI, Takaaki KUROSE,

Kohei TANAKA and Tamotsu HANDO

Department of Perinato-Gynecology, Kagawa Medical School, Kagawa

(Director : Prof. Tamotsu Hando)

概要 母体にとって semiallograft である胎児・胎盤がなぜ母体により拒絶されないのかは免疫学的に興味ある問題であり、生殖免疫学の分野において大きな研究テーマとなつている。これを説明しようとする諸説の中で、妊婦血清中に観察される遮断抗体の重要性が近年注目されている。これまでの研究により、遮断抗体が父系 HLA-DR と関連した抗体であることが明らかにされているが、この免疫原が何であるかはいまだに不明である。著者らは以前、母児の境界面に位置する trophoblast に HLA-DR が表現されていないことを報告したが、本研究では同じ HLA-D 領域に属する HLA-DP および HLA-DQ が各種の trophoblast に表現されているか否かを検討する目的で、単クローン抗体を用いた酵素抗体間接法により解析を行つた。

十分な陽性および陰性コントロールをおいた解析の結果、HLA-DP および HLA-DQ は妊娠 8 週から 22 週までの正常妊娠におけるすべての trophoblast、全胎状奇胎および部分胎状奇胎の trophoblast、ならびに妊娠性絨毛癌細胞に表現されていないとの成績が得られた。したがつて、以前得られた HLA-DR の陰性所見とも合わせ、遮断抗体が trophoblast 上の HLA-D 領域抗原を認識して産生された抗体である可能性は少ないと思われた。

Synopsis A blocking antibody in pregnant sera seems essential in understanding why a fetus can survive as a semiallograft in an immunologically competent mother. It has been demonstrated that blocking antibody is closely related to the paternal HLA-DR antigens. However, we previously reported that HLA-DR is not expressed on any trophoblast constituting the fetal frontier at the fetomaternal interface. The present study was then undertaken to clarify whether or not trophoblasts of normal pregnancy and trophoblastic diseases express HLA-DP or HLA-DQ antigens which are closely linked to HLA-DR as a haplotype.

Materials were taken from ten pregnant uteri, ranging from 8 to 22 weeks of gestation, two uteri containing complete mole and two uteri each containing gestational choriocarcinoma. Curettage specimens obtained from three cases of complete mole and two cases of partial mole were also employed. Antigen expression was examined by an indirect immunoperoxidase technique using various monoclonal antibodies.

From this immunohistochemical study, neither HLA-DP nor HLA-DQ seemed to be expressed on any trophoblast of normal pregnancy and trophoblastic diseases, which, together with the negative findings of HLA-DR on trophoblasts, may suggest that blocking antibody is not generated against HLA-D locus antigens on trophoblasts.

Key words: HLA-DP • HLA-DQ • Trophoblast • Normal pregnancy • Trophoblastic disease

緒 言

妊娠は免疫学的にみると, semiallograft である胎児・胎盤が子宮に生着した現象としてとらえることができる。胎児・胎盤が宿主である母体によりなぜ拒絶されないのかは興味深い問題であり, 生殖免疫学の分野における大きな研究テーマとなっている。

妊娠維持に關与する免疫学的機序を解明すべく, 数多くの研究成果¹⁴⁾が報告されてきているが, これらの中で, 妊婦血清中に観察される遮断抗体の重要性が近年注目されている。遮断抗体はマクロファージ遊走阻止試験¹⁷⁾やリンパ球混合培養¹²⁾など *in vitro* の試験において, 妊婦リンパ球の父系抗原に対する反応を抑制することが知られている。また, 習慣性流産患者の血清中には遮断抗体のみられないことが多い⁹⁾¹⁷⁾, 習慣性流産患者にプールした第三者のリンパ球や夫のリンパ球を用いて免疫することにより血清中に遮断抗体が出現し, 多くの症例で生児が得られる⁴⁾¹⁶⁾²²⁾²⁴⁾²⁵⁾などの臨床的経験から, *in vivo* においても妊娠維持のうえで重要な役割をはたしているものと推察されている。

遮断抗体の免疫原が何であるかについてはいまだ不明であるが, 夫由来の HLA-DR 抗原との関連性が報告されている¹⁰⁾¹³⁾¹⁷⁾。

HLA-D 領域は主として HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR により構成されており, これらはハプロタイプとして遺伝されることが知られている⁵⁾。著者は以前, 母児の境界面に位置する trophoblast に HLA-DR が表現されていないことを報告した²⁾が, trophoblast における HLA-DP および HLA-DQ の表現に関しては, これまでに Starkey の報告²⁰⁾がみられるのみである。

本研究では, 多数の材料を用い, 正常妊娠および絨毛性疾患の trophoblast における HLA-DP および HLA-DQ の表現について観察することを目的とした。

研究材料および研究方法

1. 研究材料

子宮筋腫など医学的適応により摘出された妊娠 8 週から 22 週までの正常妊娠子宮 10 例および全胞

状奇胎子宮 2 例, 子宮内容除去術により得られた全胞状奇胎組織 3 例および部分胞状奇胎組織 2 例, ならびに子宮摘出により得られた子宮絨毛癌 2 例を材料とした。

2. 抗体

HLA-DP および HLA-DQ の局在はマウス単クローン抗体を用いて解析した。抗 HLA-DP (B7/21⁸⁾¹⁸⁾, 培養上澄) および抗 HLA-DQ (抗 Leu-10⁶⁾⁷⁾, 培養上澄) は Becton Dickinson 社より購入したものを使用し, 各々 80 倍と 50 倍に稀釈して用いた。

正常ウサギ血清, ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリンは Dakopatts 社より求め, 各々 10 倍と 20 倍に稀釈して用いた。

正常血清の稀釈は 0.01M phosphate-buffered saline (PBS), pH7.6 により, また抗体の稀釈は 1% ウシ血清アルブミンを加えた 0.01M PBS により行つた。

3. 酵素抗体法

材料は摘出後, ただちに液体窒素により急速凍結し, ミクロトームで 4 μ m の薄片を作製した。空気乾燥後, 冷アセトンにて 10 分間固定した。

HLA 抗原の観察は酵素抗体間接法により行つた。組織切片を親水性に戻した後, 正常ウサギ血清を 20 分間組織に重ね, 二次抗体の非特異的反応の防止に努めた。軽く洗浄後, 一次抗体, 二次抗体の順に組織に重ね, 各々 60 分間および 30 分間室温にて反応させた。各反応後, 0.01M PBS にて十分洗浄した。

抗原観察は diaminobenzidine (ドータイト社)・H₂O₂ 溶液を用いた反応により行い, 核染色はメチルグリーンまたはヘマトキシリンにより行つた。

4. trophoblast の同定

正常妊娠および胞状奇胎において, trophoblast は絨毛表面に存在しているが, 絨毛構造に關与せず, 母体組織に向かつて増殖, 浸潤する trophoblast 細胞群の存在することが知られている¹⁹⁾。これらの細胞を母体細胞より細胞形態のうえから識別するのは困難であると考えられている。このため, ラット単クローン抗体である Troma 1 (西ド

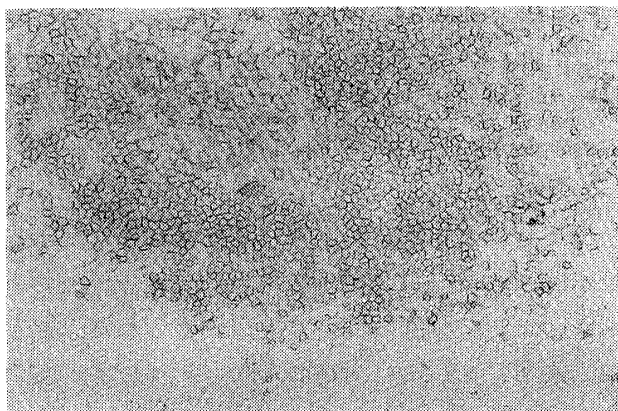


写真1 リンパ節における HLA-DP の染色 (×200). リンパ濾胞を構成するリンパ球に陽性所見が得られた.



写真2 妊娠8週の着床部における Troma 1 の染色 (×40). 絨毛表面の villous trophoblast, ならびに cell column (矢印) や脱着膜 (D) に存在する extravillous trophoblast が観察された.

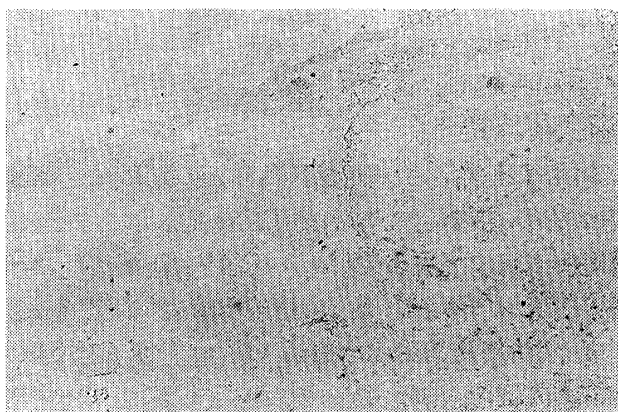


写真3 写真2の連続切片における HLA-DP の染色 (×40). 脱着膜および子宮筋層に HLA-DP 陽性のリンパ球が散見されたが, すべての trophoblast で HLA-DP は陰性であった.

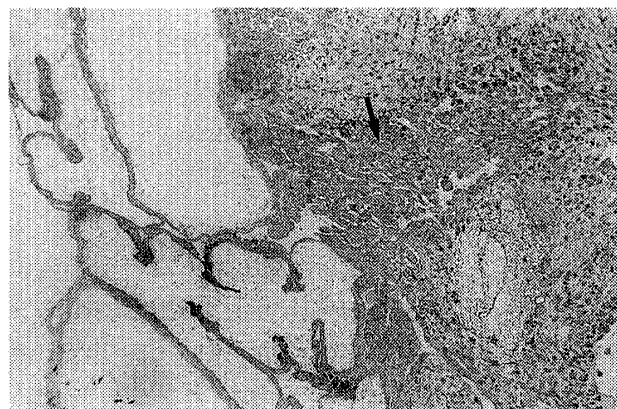


写真4 全胎状奇胎の着床部における Troma 1 の染色 (×40). villous trophoblast のほか, 旺盛な増殖を示す extravillous trophoblast (矢印) がみられた.

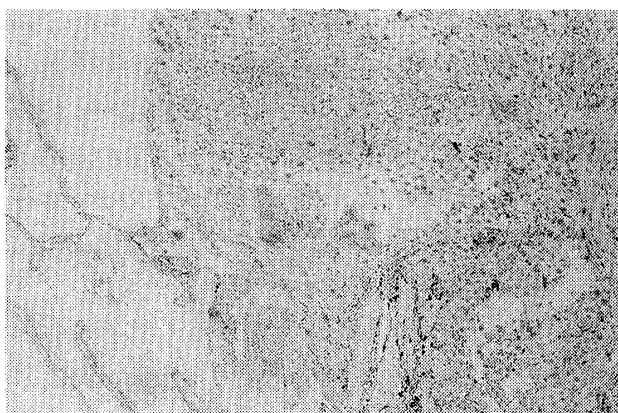


写真5 写真4の連続切片における HLA-DP の染色 (×40). villous trophoblast および extravillous trophoblast のすべての細胞で HLA-DP は陰性であった.

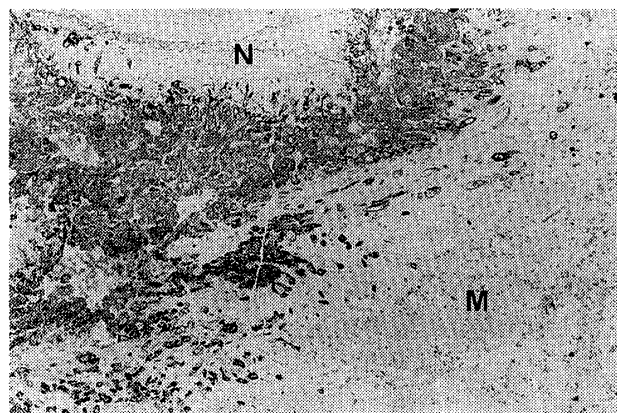


写真6 絨毛癌における Troma 1 の染色 (×40). 壊死組織 (N) と健常子宮筋層 (M) の間に絨毛癌細胞が多数認められた.

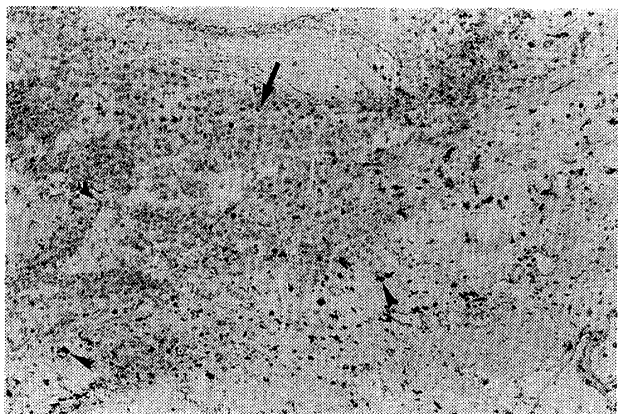


写真7 写真6の連続切片におけるHLA-DPの染色(×40)。周囲子宮筋層中にHLA-DP陽性のリンパ球(小さな矢印)が多数認められた。一方、絨毛癌細胞(大きな矢印)では陽性所見は得られなかった。

イツ・Kemler博士より供与された)を連続切片の中で用い、trophoblastの同定を確実にするよう努めた。Troma 1が正常妊娠および絨毛性疾患において組織学的trophoblast markerとして有用であることはすでに報告してある¹⁹⁾。

5. コントロール

本研究に先立ち、technical errorなどを確認する目的で、子宮頸癌の手術の際に摘出されたリンパ節を陽性コントロールとして用い、同様の方法で免疫組織化学的染色を行った。

また、反応の特異性を確認するため、マウス骨髄腫細胞株であるNS-1培養上澄液を一次抗体の陰性コントロールとして用いたが、陽性反応は観察されなかった。

成 績

1. リンパ節

リンパ濾胞を中心に、HLA-DP陽性のリンパ球、およびHLA-DQ陽性のリンパ球が多数認められた。

2. 正常妊娠

着床部において、脱着膜を中心にHLA-DPおよびHLA-DQが陽性のリンパ球が多数散在しているのが認められた。

絨毛表面のvillous trophoblastにおいて、HLA-DPおよびHLA-DQは陰性であった。cell column, shell, 脱着膜などに存在する絨毛形態に参与しないextravillous trophoblastについても

HLA-DP, HLA-DQはともに陰性であった。

これらの成績は観察したすべての組織において同一であり、HLA-DP, あるいはHLA-DQが陽性のtrophoblastは観察されなかった。

3. 胎状奇胎

摘出した全胎状奇胎子宮の着床部においてtrophoblastの旺盛な増殖がみられ、これらが母体組織に向かって浸潤していくのが認められた。奇胎絨毛表面のvillous trophoblastを含むすべてのtrophoblastにおいてHLA-DPおよびHLA-DQは陰性であった。一方、脱着膜などにはHLA-DPおよびHLA-DQが陽性のリンパ球が多数認められた。

子宮内容除去術により得られた全胎状奇胎組織、および部分胎状奇胎組織における成績も摘出子宮での成績と同一であった。

4. 絨毛癌

健常子宮筋層と中央壊死組織との間に絨毛癌細胞を認め、連続切片の中でTroma 1により絨毛癌細胞であることを確認しつつ、絨毛癌細胞におけるHLA-DPおよびHLA-DQの局在を観察した。

周囲筋層組織中にHLA-DPおよびHLA-DQが陽性のリンパ球が認められた。しかし、絨毛癌細胞については、すべての細胞でHLA-DPおよびHLA-DQが陰性であると考えられた。

考 案

妊娠維持機構における遮断抗体の重要性が近年注目されている。遮断抗体は妊娠5週より妊婦血清中に出現することが観察されており¹⁾、また、絨毛性疾患患者血清中にも存在することが知られており²³⁾、基礎的研究ならびに臨床的経験から、妊娠現象の中で重要な役割をはたしているものと考えられている。この抗体の免疫原が何であるかは十分に解明されていないが、夫由来のHLA-DR抗原との関連が認められている¹⁰⁾¹³⁾¹⁷⁾。

母胎境界面の胎児側を構成するのはtrophoblastであり、母体免疫担当細胞がtrophoblast以外の胎児細胞と接触することは原則的にないと考えられる。したがって、遮断抗体の免疫原として、まずtrophoblastを考えなければならないが、著者は以前、妊娠6週から18週までのすべてのtro-

phoblast で HLA-DR が表現されていないことを観察しており²⁾, この成績は諸家の報告²¹⁾とも一致している. HLA-D 領域の抗原は第 6 染色体上の遺伝子によりコードされており, 主として HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR により構成されているが, これらはすべてハプロタイプとして遺伝されていくことが知られている⁵⁾. それゆえ, 遮断抗体の免疫原を考えるうえで, trophoblast 細胞上に HLA-DR と深い関連のある HLA-DP および HLA-DQ 抗原が表現されているかどうかは興味深い問題である.

trophoblast における HLA-DP および HLA-DQ 抗原の表現についての報告は, これまでに Starkey の報告²⁰⁾のみである. この中で, 抗 HLA-DP 抗体(B7/21)が cytotrophoblast や syncytiotrophoblast などの villous trophoblast, 脱落膜や cell column に存在する extravillous trophoblast などと反応することが述べられている.

今回, 著者らは多くの材料を用い, 酵素抗体間接法により B7/21 の trophoblast との反応性を検討した. 十分な陽性および陰性コントロールを用いて解析した結果, B7/21 は正常妊娠および絨毛性疾患のすべての trophoblast と反応しないと考えられた. Starkey は三次抗体を用いた three stage technique により検討しており, 研究成績が一致しなかつたのは研究方法の感度の違いに起因することも考えられる. そこで, より高感度な方法とされる avidin-biotin-peroxidase complex 法¹¹⁾を用い同様の検討を行つたが, 得られた成績は同じであつた. Starkey の報告は少数例についての検討であり, また, 一次抗体の稀釈濃度が不明である, 高感度の方法論を用いている, などの点より, 非特異的な反応である可能性もあると思われる.

最近, 高橋ら³⁾は HLA-DP に対する cDNA probe を用いた Northern analysis により, HLA-DP に対する mRNA が正常妊娠の trophoblast に存在するか否かを検討し, 初期胎盤 8 例中 1 例, 満期胎盤 8 例中 1 例において陽性所見が得られたと報告している. 妊娠という基本的な

生命現象を考えるうえで 16 例中 2 例にみられた陽性所見は重要なものとはとらえづらく, 逆に高感度な方法論である Northern analysis により得られた 16 例中 14 例の陰性所見こそが, われわれの成績を支持するものと思われる.

HLA-DQ に関する成績は, 著者らの成績も Starkey の成績と一致しており, すべての trophoblast で陰性であつた.

B7/21 が認識するエピトープが正常妊娠の trophoblast 上に表現されているか否かについての結論は, 今後の追試験に委ねたいが, HLA-DP 上のほかのいくつかのエピトープが表現されていないことが Starkey により報告されていることから, HLA-DP が完全な分子として表現されているとは考えづらい. HLA-DQ および HLA-DR における陰性所見とも合わせ, 遮断抗体が trophoblast 上の HLA-D 領域抗原を認識して産生された抗体である可能性は少ないと思われた.

遮断抗体の免疫原として, 母体血中に観察される¹⁵⁾胎児血球上の HLA-D 領域抗原などいくつかの可能性が考えられるが, 今後の研究に期待したいと思う.

文 献

1. 丸橋敏宏, 梶野 徹, 高桑好一, 金沢浩二, 竹内正七: 妊娠初期血清中の HLA 抗体微量検出法の確立—Luminol 反応の応用—. 第 36 回日本産科婦人科学会学術講演会抄録集, 149, 1984.
2. 笹川 基: 免疫組織化学的解析による正常妊娠および絨毛性疾患の trophoblast subpopulation に関する研究. 日産婦誌, 37: 2010, 1985.
3. 高橋完明, 安達茂実, 金沢浩二, 竹内正七: ヒトトロホプラスト及び絨毛癌細胞における class II HLA の遺伝子発現. 日産婦誌, 40: S-202, 1988.
4. Beer, A.E., Quebbeman, J.F., Ayers, J.W.T. and Haines, R.F.: Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. Am. J. Obstet. Gynecol., 141: 987, 1981.
5. Bodmer, W.F.: The HLA system, 1984. In Histocompatibility Testing 1984 (eds. E.D. Albert et al.), 11. Springer-Verlag, Berlin, 1984.
6. Brodsky, F.M.: A matrix approach to human class II histocompatibility antigens: Reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes. Immunogenetics, 19: 179, 1984.

7. *Chen, Y.X., Evans, R.L., Pollack, M.S., Lanier, L.L., Phillips, J.H., Rousso, C., Warner, N.L. and Bodmer, F.M.* : Characterization and expression of the HLA-DQ antigens defined by anti-Leu-10. *Hum. Immunol.*, 10 : 221, 1984.
8. *Crumpton, M.J., Bodmer, J.G., Bodmer, W.F., Heyes, J.M., Lindsay, J. and Rudd, C.E.* : Biochemistry of class II antigens: Workshop report. In *Histocompatibility Testing 1984* (eds. E.D. Albert et al.), 29. Springer-Verlag, Berlin, 1984.
9. *Fizet, D. and Bousquet, J.* : Absence of a factor blocking a cellular cytotoxicity reaction in the serum of women with recurrent abortions. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 90 : 453, 1983.
10. *Hanaoka, J. and Takeuchi, S.* : Individual specificity of blocking antibodies in molar and normal term placenta-bound IgG. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 3 : 119, 1983.
11. *Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H.* : The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Am. J. Clin. Pathol.*, 75 : 816, 1981.
12. *Jeannet, M., Werner, C., Ramirez, E., Vassalli, P. and Faulk, W.P.* : Anti-HLA, anti-human "Ia-like" and MLC blocking activity of human placental IgG. *Transplant. Proc.*, 9 : 1417, 1977.
13. *Kajino, T., Kanazawa, K. and Takeuchi, S.* : Blocking effect of maternal serum-IgG and placental eluate-IgG on materno-fetal mixed lymphocyte reaction and their individual specificity. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 4 : 27, 1983.
14. *Lala, P.K., Hasroun, S.C., Kerns, M., Montgomery, B. and Colavincenzo, V.* : Immunobiology of the feto-maternal interface. *Immunological Rev.*, 75 : 87, 1983.
15. *Loke, Y.W.* : Immunology and Immunopathology of the Human Foetal-maternal Interaction. 75. Elsevier, Amsterdam, 1981.
16. *Mowbray, J.F., Gibbings, C., Liddell, H., Reginald, P.W., Underwood, J.L. and Beard, R. W.* : Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal cells. *Lancet*, 1 : 941, 1985.
17. *Rocklin, R.E., Kitzmiller, J.L., Carpenter, C.B., Garovoy, M.R. and David, J.R.* : Maternal-fetal relation: Absence of an immunologic blocking factor from the serum of women with chronic abortions. *N. Engl. J. Med.*, 295 : 1209, 1976.
18. *Rudd, C.E., Bodmer, J.G., Bodmer, W.F. and Crumpton, M.J.* : The expression of HLA-DR, DQ and DP antigens on the surface of lymphocytes as assessed by 2-D polyacrylamide gel analysis of immunoprecipitates. In *Histocompatibility Testing 1984* (eds. E.D. Albert et al.), 545. Springer-Verlag, Berlin, 1984.
19. *Sasagawa, M., Watanabe, S., Ohmomo, Y., Honma, S., Kanazawa, K. and Takeuchi, S.* : Reactivity of two monoclonal antibodies (Troma 1 and CAM 5.2) on human tissue sections: Analysis of their usefulness as a histological trophoblast marker in normal pregnancy and trophoblastic disease. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 5 : 345, 1986.
20. *Starkey, P.M.* : Reactivity of human trophoblast with an antibody to the HLA class II antigen, HLA-DP. *J. Reprod. Immunol.*, 11 : 63, 1987.
21. *Sunderland, C.A., Naiem, M., Mason, D.Y., Redman, C.W.G. and Stirrat, G.M.* : The expression of major histocompatibility antigens by human chorionic villi. *J. Reprod. Immunol.*, 3 : 323, 1981.
22. *Takakuwa, K., Kanazawa, K. and Takeuchi, S.* : Production of blocking antibodies by vaccination with husband's lymphocytes in unexplained recurrent aborters: The role in successful pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 10 : 1, 1986.
23. *Takeuchi, S.* : Immunology of spontaneous abortion and hydatidiform mole. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1 : 23, 1980.
24. *Taylor, C. and Faulk, W.P.* : Prevention of recurrent abortion with leucocyte transfusion. *Lancet*, 2 : 68, 1981.
25. *Unander, A.M. and Lindholm, A.* : Transfusion of leucocyte-rich erythrocyte concentrates: A successful treatment in selected cases of habitual abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 154 : 516, 1986.

(No. 6395 昭63・7・5受付)