

胎盤絨毛外栄養膜細胞における HLA-G 発現の 消失に関する検討

奈良県立医科大学法医学教室

下 嶋 典 子, 石 谷 昭 子, 羽 竹 勝 彦

LACK OF HLA-G EXPRESSION IN A POPULATION OF EXTRAVILLOUS TROPHOBLAST IN NORMAL PLACENTA

NORIKO SAGESHIMA, AKIKO ISHITANI and KATSUHIKO HATAKE

Department of Legal Medicine, Nara Medical University

Received August 18, 2000

Abstract: HLA-G, one of the HLA class Ib genes, shows limited expression in placental trophoblasts, notably those at the maternal-fetal border, and is thought to be involved in protecting the baby from maternal immune rejection. Using HLA-G monoclonal antibody 87 G in histochemical staining, we have investigated HLA-G expression in first, second and third trimester placenta from a normal pregnancy, and in third trimester placenta from preeclampsia. These studies showed that HLA-G was expressed only on extravillous trophoblast cells (EXT) at all stages of pregnancy in normal or preeclamptic placentas. However, a subset of EXTs that showed a complete lack of expression of HLA-G in normal placenta was found. These EXTs expressed cytokeratin only on the cell membrane and in cytoplasm not stained with eosin, whereas EXTs expressing HLA-G showed cytokeratin expression on the whole cell including the cytoplasm stained with eosin. In preeclampsia placentas, populations of EXTs lacking HLA-G expression were also found. Interestingly, their characteristics on staining anti-cytokeratin and eosin were similar to EXTs lacking HLA-G expression in normal placenta. Therefore, no significant differences in HLA-G expression were found between normal and preeclamptic placentas. EXT is classified to the intermediate differentiation stage from cytotrophoblast (CT) to syncytiotrophoblast (ST) and EXTs can be found at various stages of differentiation at any stage of placental development. It appears then that EXT differentiation may influence the expression of HLA-G. The existence of EXTs lacking HLA-G expression in normal placenta suggests that other molecules, independent of HLA-G, may function to keep a fetus from an undesirable maternal immune response.

(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 332~342, 2000)

Key words : HLA-G, extravillous trophoblast, placenta, preeclampsia, decidua

緒 言

妊娠現象は産婦人科学のみならず、免疫学において最も興味ある現象の一つである。遺伝子の半分が異なる同

種移植片である胎児を母体が拒絶せず、妊娠期間中生着させうる機構は長年の研究課題であって、いまだ解明されていない。

胎児が拒絶されず妊娠が成立するのは胎盤の機能によ

るものと考えられてきたが、その最も重要なものとして、母児の接点である胎盤栄養膜細胞上に発現する HLA 抗原の特異性があげられてきた。最近、胎盤に HLA-C が弱く発現するという報告はあるが¹⁾、多型に富む他の HLA class Ia および class II 抗原の発現は認められていない^{2,3)}。したがって、T 細胞に非自己と認識されず、拒絶反応が引き起こされにくいと考えられる。しかし栄養膜細胞が全く HLA class Ia を発現していなければ、今度は NK 細胞からの傷害を免れることはできないはずである。それにもかかわらず、妊娠が成立するという事は、この NK 細胞の傷害活性を抑制する分子が栄養膜細胞に存在するのではないかと推測されてきた。

1990 年に入りはじめて、Ellis et al.⁴⁾ と Kovats et al.⁵⁾ によりこの母児の接点である栄養膜細胞に新しく発見された class I 分子、HLA-G が発現しているという報告がなされた。

Geraghty らのグループにより 3 種の非古典的 class I (class Ib) 遺伝子が発見されたが⁶⁻⁸⁾、HLA-G はその遺伝子の一つである。HLA-G の蛋白としての発現は、最近ではメラノーマ^{9,10)}、胎児胸腺^{11,12)} 等にも発現しているとの報告もあるが、主に胎盤栄養膜細胞に局限されている^{13,14)}。これら class Ib の特性は多型性が著しく乏しいことである^{15,16)}。さらにこの HLA-G は NK receptor の Immunoglobulin-like transcript ILT 2¹⁷⁾ および ILT 4¹⁸⁾、あるいは killer cell immunoglobulin-like receptor 2 DL 4¹⁹⁾ と結合して NK 傷害活性を抑制することが明らかにされた。すなわち、多型性が非常に乏しいため、母体 T 細胞に非自己と認識され難く、しかも NK 傷害活性抑制機能をもっている HLA-G が母児の接点に発現していることが妊娠維持に重要な機構となると考えられる。さらに最近、妊娠維持に重要であるとされる Th2/Th1 サイトカインバランスが HLA-G により影響されるということが報告²⁰⁾ されている。

胎盤における HLA-G の発現については、これまでに多数の報告^{21,22)} がみられるが、すべて母体組織に直接接する絨毛外栄養膜細胞に HLA-G がくまなく発現しているというものであった。

このように、HLA-G が妊娠維持に重要な役割を果たしていることを示すデータが集積されつつあるが、さらにこれを裏付けるように、妊娠中毒症患者の胎盤において、脱落膜に侵入しつつある絨毛外栄養膜細胞の HLA-G の発現が低下、消失しているという報告^{23,24)} がなされた。

しかし、我々もこれまで妊娠中毒症患者の胎盤を検討してきたが、絨毛外栄養膜細胞における HLA-G の発現

は弱い部位も存在していたが、正常の場合とあまり大きな差が認められなかった。すなわち、妊娠中毒症における HLA-G の発現を検討するには、それと比較すべき正常胎盤における HLA-G 発現に関するさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

そこで我々は、各発生段階の正常胎盤について、詳細に HLA-G の発現を調べた。その結果、これまでの報告と異なって、正常胎盤においても絨毛外栄養膜細胞における HLA-G の発現が低下あるいは全く見られない部位が見出されたので報告する。

材料と方法

1. 組織

日本産婦人科学会倫理規定を遵守し、インフォームドコンセントの得られた妊娠初期妊婦(5~11週)10例、中期妊婦(12~27週)3例、後期妊婦(28~40週)5例および妊娠中毒症妊婦10例(重症6例、軽症4例)を対象とし、その胎盤組織を採取した。各組織は、赤崎クリニック、熊本大学医学部産婦人科学教室、奈良県立医科大学産婦人科学教室より提供された。組織は約5mm³を切り出し、OCT compound中に包埋、凍結後、使用時まで、-135℃で保存した。

2. モノクロン抗体

a) 抗 HLA-G モノクロン抗体 87 G

我々はこれまでに抗 HLA-G モノクロン抗体 87 G の作製に成功しており²⁵⁾、この抗体を用いて、HLA-G の発現部位の検索をおこなった。

作製方法；すでに報告している²⁵⁾のでここでは簡単な説明にとどめる。HLA-G およびヒト β_2 microglobulin 遺伝子を導入したマウス細胞を HLA-B 27 トランスジェニックマウスに免疫し、このマウスより得た脾細胞を myeloma cell line と融合させることによりハイブリドーマを作製し、モノクロン抗体を分離した。

特異性；これまでに我々の報告を含めて、多数の報告がなされており^{13,25-27)}、The second International Conference on HLA-G and -E (Paris, July, 2000)²⁸⁾ において、現在最も特異性の高い抗 HLA-G 抗体として認められたものである。さらに詳細な特異性および反応性に関して現在投稿中である(Ishitani A et al.)が特異性の検定について簡単に述べると、1)知られている全ての HLA class I型を網羅する 60種の cell line を用いた microcytotoxicity test、2)ほとんどの HLA class I型を網羅する 26種の cell line を用いた flow cytometry、3)6種の B-lymphoblastoid cell line およびそれらに HLA-G 遺伝子を導入した細胞を用いた flow

cytometry, 4) それらの細胞を用いた Immunoprecipitation 法の 4 種の方法により HLA-G 以外のいかなる HLA class I 蛋白とも反応しないことを確認している。

b) その他の抗体

抗サイトケラチン 8/18 モノクロン抗体 CAM 5.2 (Isotype: IgG 2 a, Becton Dickinson, U. S. A) を用いて, サイトケラチンの発現を検索した。この抗体は胎盤においては栄養膜細胞の発現するサイトケラチンと特異的に反応することが報告されている^{29,30)}。マウス IgG 2 a (Pharmingen, U. S. A) を 87 G のアイソタイプコントロールとして用いた。

3. 免疫組織染色

クリオスタットにて 5 μ m に薄切した新鮮凍結標本をドライヤーで風乾したのち, アセトンで 5 分固定し, 再度ドライヤーでアセトンを除去後, 0.01 M phosphate-buffered saline (0.01 M PBS) に 5 分間浸した。その後, 3% BSA-PBS で 20 分, 非特異反応のブロッキングを行った後, 一次抗体として 0.2% Tween-0.01 M PBS で希釈した 87 G (10 μ g/ml), マウス IgG 2 a (10 μ g/ml) あるいは CAM 5.2 (0.1 μ g/ml) を 25°C 10 分反応させた。0.01 M PBS で 5 分, 3 回洗浄した後, 内因性ペルオキシダーゼをブロッキングするため 0.3% H₂O₂-methanol と 10 分反応させた。0.01 M PBS で 5 分, 3 回洗浄後, SIMPLE STAIN MAX PO (M) (Nichirei, Japan) と 30 分反応させた。0.01 M PBS で 5 分, 3 回洗浄後, ペルオキシダーゼと DAB の発色により, これらの反応を検出した。

免疫組織染色においては, 抗 HLA-G 抗体の特異性を確認するため, 陰性対照として HLA class I 欠損の B 細胞リンパ芽球性細胞株の 721.221 細胞, および class I を発現している T 細胞白血病細胞株 Molt-4 (ATCC より入手) を用いて, また陽性対照として 721.221 細胞 (ATCC より入手) に HLA-G 遺伝子を導入した 221-G³¹⁾ 細胞を用いて同時に染色をおこなって比較対照した。

結 果

1. 抗 HLA-G 抗体特異性の確認

HLA class II は発現しているが class I は発現していないとされる 721.221 細胞, HLA-G を発現する 721.221-G 細胞および class I を発現している Molt 4 の 3 種の細胞に対する抗 HLA-G 抗体 87 G の反応を調べたところ, 721.221 および Molt 4 には全く反応せず, 721.221-G には強く反応した (Fig. 1)。

2. サイトケラチンの発現

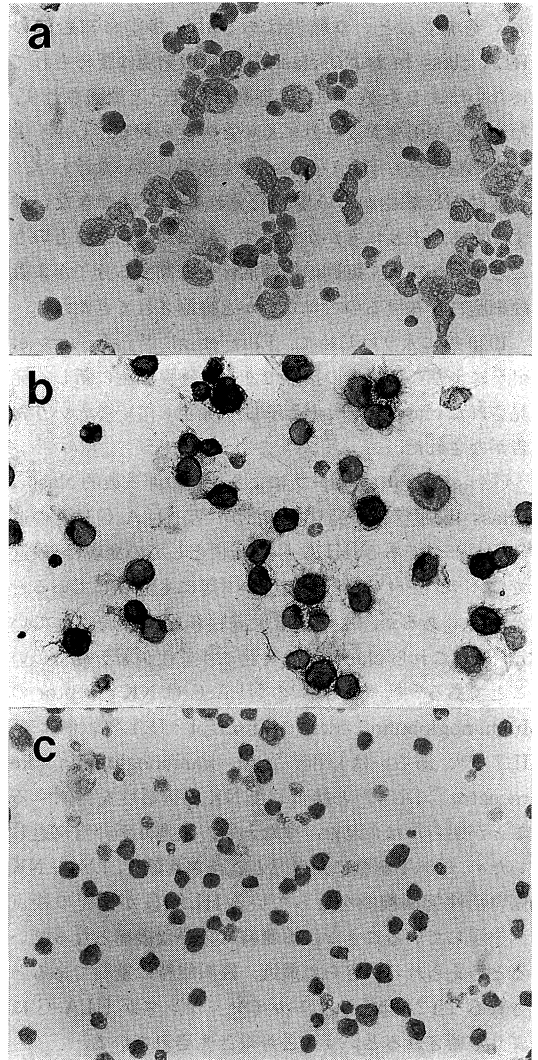


Fig. 1. Monoclonal antibody 87G is specific for HLA-G in immunohistochemical staining. 721.221(a), 721.221-G (b), Molt4 (c) cells were stained under conditions described in materials and methods using monoclonal 87G.

初期, 中期, 後期のいずれの妊娠段階においても, サイトケラチンの発現には, 絨毛, 脱落膜ともに, 細胞性栄養膜細胞(cytotrophoblast, CT), 合体体栄養膜細胞(syncytiotrophoblast, ST), 絨毛外栄養膜細胞(extravillous trophoblast, EXT)などのあらゆる栄養膜細胞(trophoblast, TB)において強く発現していた(Fig. 2~8のa). 一方, 絨毛の胎児血管や間質細胞, 脱落膜における脱落膜細胞などTB以外の細胞には全く発現が認められなかった.

3. 正常胎盤における HLA-G の発現

初期, 中期, 後期の妊卵着床部に位置する胎盤絨毛における HLA-G の発現を調べた結果は, Fig. 2~6のbに示している. 初期の正常絨毛における HLA-G は EXT にのみ発現しており, ST, CT には発現していなかった(Fig. 2b). 初期の脱落膜においては, 脱落膜へ侵入する EXT において強く発現していた(Fig. 3b). 中期(Fig. 4b)および後期(Fig. 5b)においても HLA-G は脱落膜へ侵入する EXT に発現し, ST, CT には発現していなかった. 妊娠初期には栄養膜細胞柱(trophoblastic cell column, TCC), 細胞性栄養膜細胞殻(cytotrophoblastic shell, CTS)と分類される EXT が多く存在するが, 中期, 後期の EXT にはほとんど認められない. しかし, データには示していないが, 中期においてわずかにみられた TCC および CTS においても妊娠初期同様に HLA-G は発現していた.

以上のように, HLA-G はすべての妊娠段階を通して, すべての EXT に発現しているようにみうけられた. しかし, 後期の平滑絨毛膜から脱落膜組織に侵入している EXT について, HLA-G の発現を詳細に検討したところ, 一部の EXT においては完全に HLA-G の発現が欠落していた(Fig. 6b). 通常の HLA-G を発現している EXT は, 細胞全体にサイトケラチンを発現しており, HE 染色においては, 細胞質はエオジンにより染色されるが, この HLA-G を発現していない EXT は, サイトケラチンが細胞膜部分にのみ発現され, エオジンで細胞質のほとんどが染色されない(データは示していない)という形態的特徴を示していた. すなわち, 正常胎盤のほとんどの EXT は, HLA-G を発現しているが, その部位や形態により HLA-G の発現には強弱が認められ, 一部, HLA-G が発現していない EXT も存在することが明らかとなった.

4. 妊娠中毒症胎盤における HLA-G の発現

重症 6 例, 軽症 4 例の妊娠中毒症胎盤における HLA-G の発現について検討をおこなったが, これらの間には大きな差が認められなかったので Fig. 7 および Fig. 8

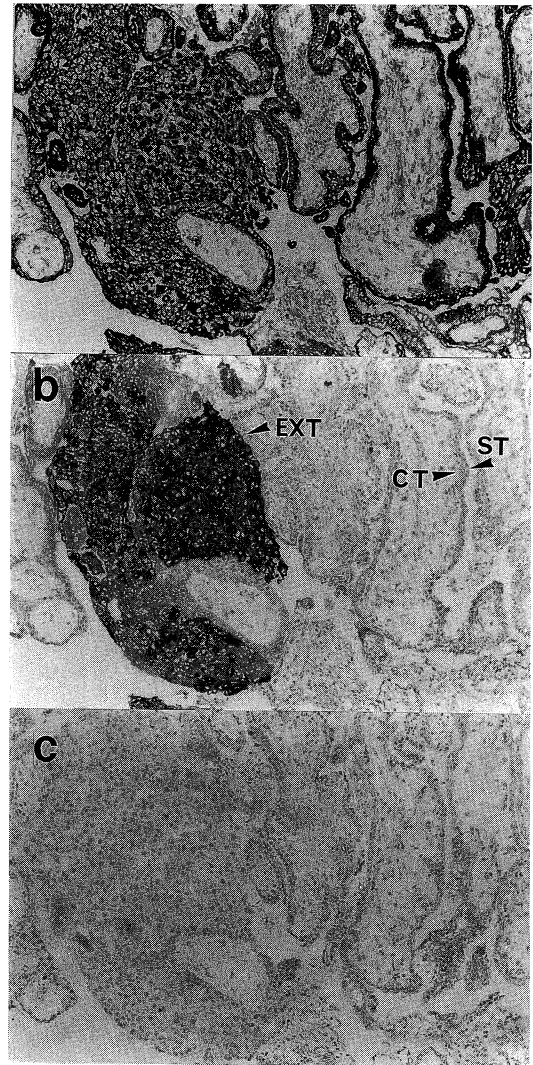


Fig. 2. HLA-G expression in first trimester chorionic villi. Immunohistochemical staining of first trimester chorionic villi with anti-cytokeratin antibody, CAM5.2 (a), 87G (b) and IgG2a (c) as IgG isotypic control for 87G was performed as described in materials and methods. cytotrophoblasts (CTs), syncytiotrophoblasts (STs) and extravillous trophoblasts (EXTs) are stained with CAM5.2. Only EXTs are stained with 87G but not with IgG2a.

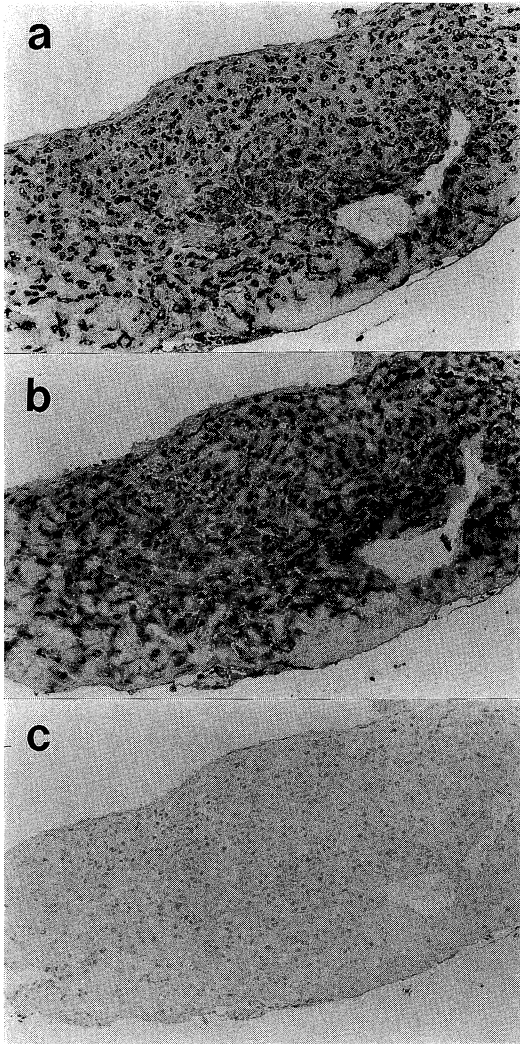


Fig. 3. HLA-G expression in first trimester decidua. Immunohistochemical staining of first trimester decidua with CAM5.2 (a), 87G (b) and IgG2a (c) was performed as described in materials and methods. Extravillous trophoblasts invading the decidua are stained with CAM5.2 and 87G but not with IgG2a (IgG isotypic control for 87G).

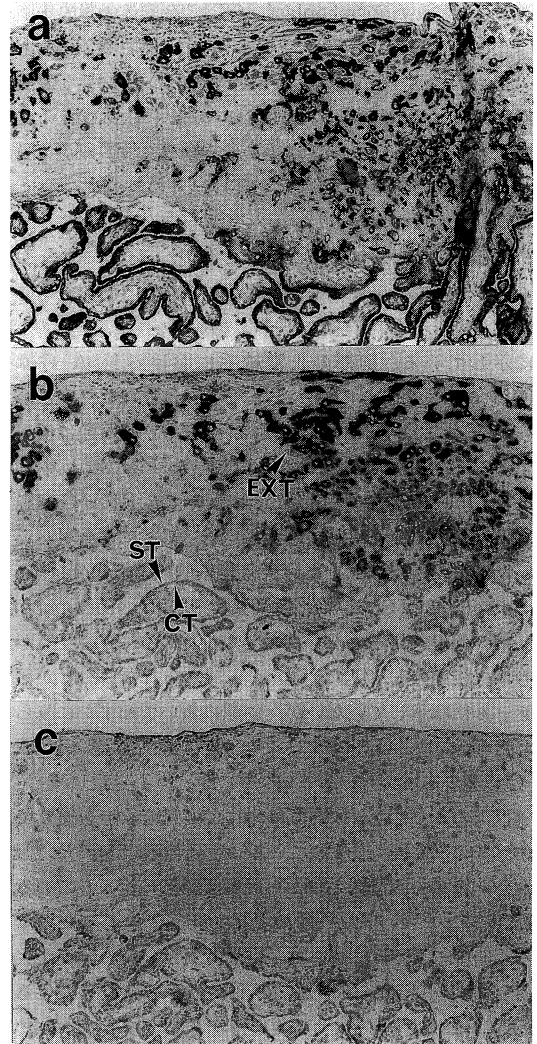


Fig. 4. HLA-G expression in second trimester villi and decidua. Immunohistochemical staining of second trimester villi and decidua with CAM5.2 (a), 87G (b) and IgG2a (c) was performed as described in materials and methods. All syncytiotrophoblasts, cytotrophoblasts and extravillous trophoblasts (EXTs) are stained with CAM5.2 strongly. Only EXTs are stained with 87G but not with IgG2a (IgG isotypic control for 87G).

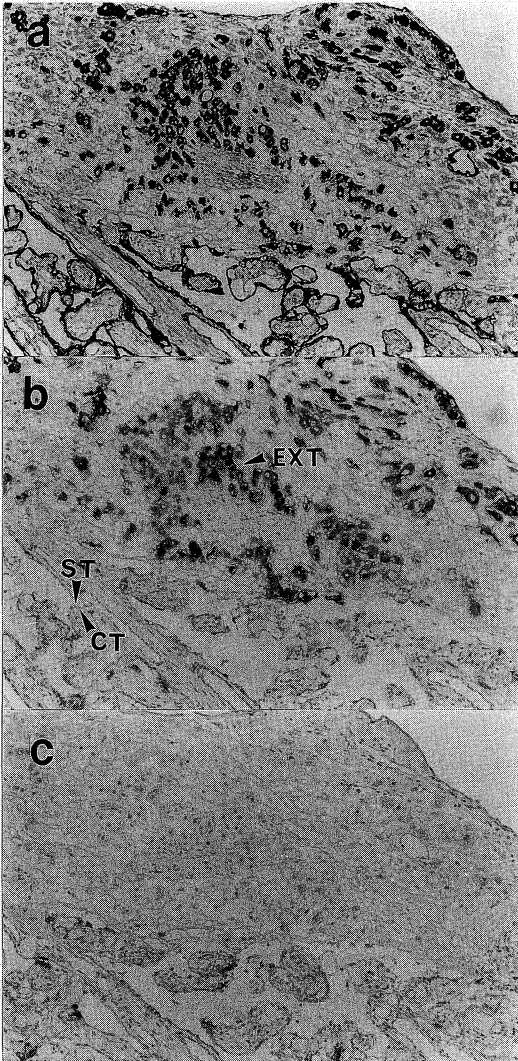


Fig. 5. HLA-G expression in third trimester villi and decidua. Immunohistochemical staining of third trimester villi and decidua with CAM5.2 (a), 87G (b) and IgG2a (c) was performed as described in materials and methods. All syncytiotrophoblasts, cytotrophoblasts and extravillous trophoblasts (EXTs) are stained with CAM5.2 strongly. Only EXTs are stained with 87G but not with IgG2a (as IgG isotypic control for 87G).

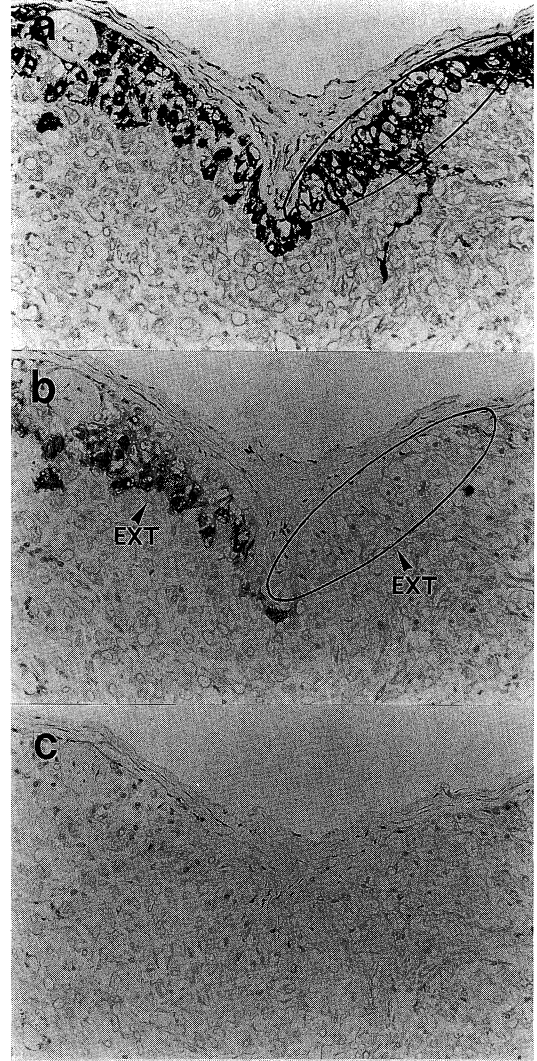


Fig. 6. HLA-G expression in third trimester chorion laeve. Immunohistochemical staining of third trimester chorion laeve with CAM5.2(a), 87G (b) and IgG 2a(c) was performed as described in materials and methods. Extravillous trophoblasts are stained with CAM 5.2 and 87G. But a population of EXTs (circled area) are not stained with 87G. There are some differences in CAM5.2 staining between HLA-G positive and negative EXTs. In HLA-G negative EXTs, only the cell membrane is clearly stained by CAM5.2 and the cytoplasm is only weakly stained with eosin.

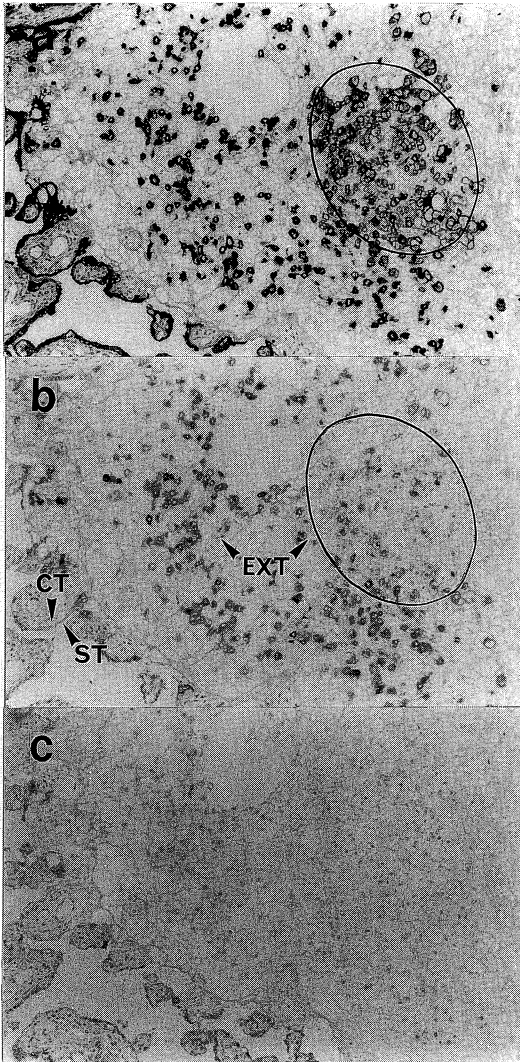


Fig. 7. HLA-G expression in villi and decidua of preeclamptic placentas. Immunohistochemical staining of villi and decidua of preeclampsia with CAM5.2 (a), 87G (b) and IgG2a (c) was performed as described in materials and methods. All syncytiotrophoblasts, cytotrophoblasts and extravillous trophoblasts (EXTs) are stained with CAM5.2. Only EXTs are stained with 87G. The expression patterns in preeclamptic placentas did not show any significant difference from that in normal placenta.

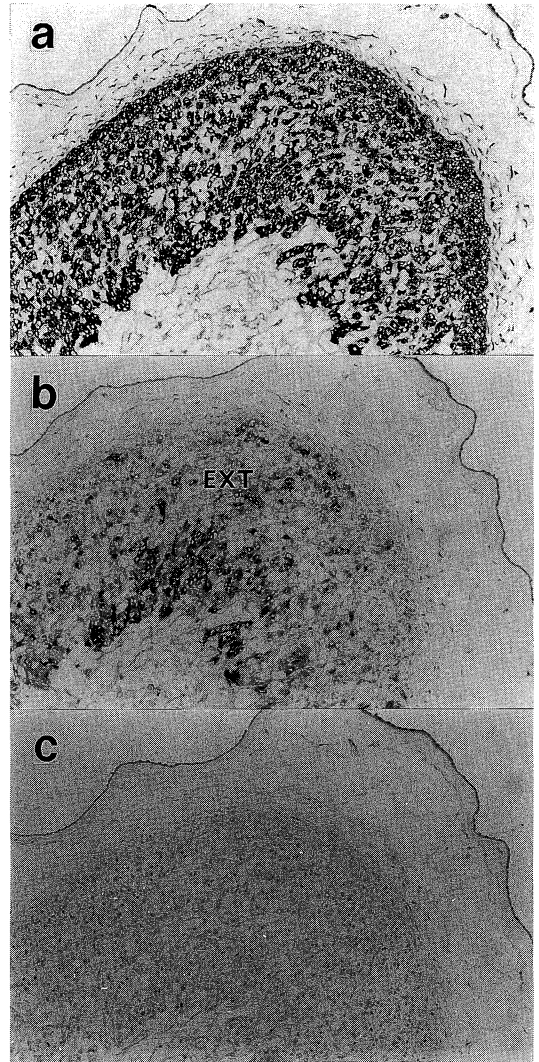


Fig. 8. HLA-G expression in chorion laeve of preeclamptic placentas. Immunohistochemical staining of chorion laeve of preeclampsia with CAM5.2 (a), 87G (b) and IgG2a (c) was performed as described in materials and methods. Extravillous trophoblasts (EXTs) are stained with CAM5.2 and 87G. However, a population of EXTs (circled area) are not stained with 87G. These EXTs showed morphological characteristics similar to the EXTs that were not stained with 87G in normal placentas. the EXTs are not stained with IgG2a as IgG isotypic control for 87G.

には、重症妊娠中毒症胎盤における HLA-G の発現を示した。妊卵着床部において、HLA-G は正常胎盤同様に絨毛の ST および CT において発現しておらず脱落膜に侵入した EXT にもみ発現し (Fig. 7b), その強度は、正常胎盤と比較して明確な低下は認められなかった。しかし、脱落膜に侵入する EXT および平滑絨毛膜の EXT の一部に、HLA-G の発現が認められない EXT や発現の低下している EXT が認められた (Fig. 7b と 8b)。これら HLA-G の発現が認められない EXT は、正常の平滑絨毛膜の HLA-G を発現していない EXT と形態的に類似した特徴をもつ EXT であった。すなわち、これらはサイトケラチンの発現が細胞膜にのみ明確にみられ、エオジンで細胞質が染色されないという特徴をもっていた。正常胎盤、妊娠中毒症胎盤の両者に、HLA-G の発現が認められない EXT が存在し、その細胞の形態も類似していたことから、妊娠中毒症胎盤における HLA-G の発現の低下や消失が、妊娠中毒症に関連して起こった異常性なのか、ただ EXT の部位、形態などの違いにより表れた正常な反応であるのかは、現時点では不明である。

考 察

非古典的 HLA class I の一つ HLA-G 遺伝子が発見され、それが胎盤 TB に発現していることが見いだされて以来、TB における HLA-G の発現に関する研究は数えきれないほど多く報告されている^{21,22)}。モノクロン抗体を用いた免疫組織染色法、HLA-G の mRNA を検出する方法などにより、HLA-G はすべての EXT に発現していると結論づけられている。そして、HLA-G は多型性に乏しく母体 T 細胞の認識を受けず、しかも NK 傷害活性抑制能のあることから、この分子が胎児を母体の免疫細胞より保護していると考えられてきた。それゆえ、妊娠中毒症胎盤において HLA-G の発現していない EXT が見いだされると、それが、この疾患の原因あるいは結果であると考えられたのである。

しかし、今回我々が、正常胎盤における HLA-G の発現を詳細に調べたところ、正常であっても、HLA-G 発現の欠落した EXT の存在することを見いだした。このことは、これまで考えられてきた HLA-G の機能からすると矛盾するものである。この HLA-G の発現していない EXT はどのようにして母体の免疫細胞の攻撃から逃れるのであろうか。この問いに対して、我々は、可溶性 HLA-G 抗原の存在が重要であろうと考えている。HLA-G には、膜結合性と可溶性の 2 種が存在することが知られている^{31,35)}。可溶性 HLA-G 抗原については、あまりその存在が認められていないが、我々 (Ishitani, A., et al.

投稿中) および Hunt et al.^{36,37)} のグループにより、可溶性 HLA-G 抗原は、膜結合性 HLA-G 抗原の発現が認められなかった ST、CT において検出されている。また我々は、TB には HLA-G と同じく多型性の乏しい非古典的 class I 分子 HLA-E および HLA-F が発現していることも確認している。これらの分子の機能についてはまだ解明されていないが、これらの分子の共同作用によることも推察される。本研究において、HLA-G の発現していない EXT の存在が見いだされたことは、膜結合性 HLA-G のみが胎児の保護に働いているのではなく、何らかの他の分子もそれにかかわっていることをしめしており、さらなる研究が必要である。

一方、正常胎盤においても妊娠中毒症胎盤においても、一部の EXT においては HLA-G を発現していなかったが、EXT において HLA-G を発現するものとしなないものが存在するが、その差はいったい何であろうか。EXT は、CT から ST への分化の途中であり、この EXT 全てが同じ分化段階にあるとは考えがたく、むしろいろいろの分化段階のものが混在していると考えられる。すなわちこの分化段階の違いが HLA-G の発現に大きく影響を与えている可能性がある。妊娠中毒症胎盤における HLA-G 発現の消失を報告した論文においても、TB のマーカーとしては、サイトケラチンが使われている。しかし、サイトケラチンは全ての TB に発現しているため、TB を分化段階、あるいは形態学的に分類するのは困難であると考えられる。今回、EXT の形態の違いがサイトケラチンの発現状態や、エオジンでの染色性における差として認められたが、あまり明確なものではなかった。今後は、分化段階を分類しうるようなマーカーを用いて、EXT の分類をする必要がある。妊娠中毒症などの疾患と正常との比較も同じ分化段階の EXT において比較されるべきであろう。

ま と め

本研究において抗 HLA-G モノクロン抗体 87G を用いて、正常妊娠の初期、中期、後期胎盤および妊娠中毒症の後期胎盤における HLA-G の発現について詳細に検討した。その結果、HLA-G はその妊娠段階の全ての時期を通じて、また正常、妊娠中毒症にかかわらず EXT のみに発現していた。

これまで、正常胎盤においては、HLA-G はすべての EXT に発現していると考えられていた。しかし、正常胎盤においても HLA-G の発現が完全に欠落した EXT の群が発見された。この HLA-G を発現していない EXT はサイトケラチンが細胞膜にのみ発現し、細胞質がエオ

ジン陰性であるという形態学的特徴をもっていた。一方、妊娠中毒症においても HLA-G が発現していない EXT が存在し、この EXT も正常胎盤において HLA-G を発現していない EXT と形態的に類似した特徴をもっていた。EXT は CT から ST への分化段階の中途にあり、全ての EXT が同じ分化段階にあるとは考え難く、いろいろの分化段階のものが混在していると考えられた。すなわち、この分化段階の違いが HLA-G の発現に影響を与えていると推察された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、試料をご提供いただきました赤崎クリニック赤崎正佳先生、熊本大学医学部産婦人科学教室の片岡秀隆先生、松村小百合先生、本学産婦人科学教室の森川肇教授、梅影秀史先生に感謝いたします。また病理所見のご指導を賜った第一病理学教室市島國雄教授に深謝いたします。(本研究は一部、文部省科学研究費補助金(課題番号 11671643)の助成を受けている。)

文 献

- 1) King, A., Burrows, T. D., Hiby, S. E., Bowen, J. M., Joseph, S., Verma, S., Lim, P. B., Gardner, L., Le Boutellier, 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.
- 2) Faulk, W. P. and Temple, A. : Distribution of beta-2-microglobulin and HLA in chorionic villi of human placenta. *Nature (London)*, **262** : 799-802, 1976.
- 3) Goodfellow, P. N., Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Snary, D. and Crumpton, M. J. : Expression of HLA system antigens on placentae. *Transplantation* **22** : 595-603, 1976.
- 4) Ellis, S. A., Palmer, M. S. and McMichael, A. J. : Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule. *J Immunol.* **144** : 731-735, 1990.
- 5) Kovats, S., Main, E. K., Librach, C., Stubblebine, M., Fisher, S. J. and DeMars, R. : A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* **248** : 220-223, 1990.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Geraghty, D. E., Wei, X. and Orr, H. T. : 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.
- 9) Paul, P., Rouas-Freis, N., Khalil-Daher, I., Moreau, P., Riteau, B., Gal, F. A. L., Avril, M. F., Dausse, J., Guillet, J. G. and Carosella, E. D. : HLA-G expression in melanomas : a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 4510-4515, 1998.
- 10) Real, L. M., Cabrera, T., Canton, J., Oliva, R., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F. : Looking for HLA-G expression in human tumors. *J. Reprod. Immunol.* **43** : 263-273, 1999.
- 11) Crisa, L., McMaster, M. T., Ishii, J. K., Fisher, S. J. and Salomon, D. R. : Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J. Exp. Med.* **186** : 289-298, 1997.
- 12) Mallet, V., Blaschitz, A., Crisa, L., Schmitt, C., Fournel, S., King, A., Loke, Y. W., Dohr, G. and Le Bouteiller, P. : HLA-G in the human thymus : a subpopulation of medullary epithelial but not CD 83⁺ dendritic cells expresses HLA-G as a membrane-bound and soluble protein. *Int. Immunol.* **11** : 889-898, 1999.
- 13) Hirano, Y., Ishitani, A. and Geraghty, D. E. : The expression of HLA-G antigen in different human tissues and placentas at different stages of pregnancy. *J. Nara Med. Ass.* **45** : 616-625, 1994.
- 14) Hammer, A., Hutter, H. and Dohr, G. : HLA Class I Expression on the Maternal-Fetal Interface. *Am. J. Reprod. Immunol.* **38** : 150-157, 1997.
- 15) Yamashita, T., Fujii, T., Watanabe, Y., Tokunaga, K., Tadokoro, K., Juji, T. and Taketani, Y. : HLA-G gene polymorphism in a Japanese population. *Immunogenetics* **44** : 186-191, 1996.

- 16) **Ishitani, A., Kishida, M., Sageshima, N., Yashiki, S., Sonoda, S., Hayami, M., Smith, A. G. and Hatake, K.** : Re-examination of HLA-G polymorphism in African Americans. *Immunogenetics* **49** : 808-811, 1999.
- 17) **Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Liano, M. and Samaridis, J.** : A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* **186** : 1809-1818, 1997.
- 18) **Colonna, M., Samaridis, J., Cella, M., Angmen, L., Allen, R. L., Ocallaghan, 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.
- 19) **Cantoni, C., Verdiani, S. and Falco, M.** : p 49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur. J. Immunol.* **28** : 1980-1990, 1998.
- 20) **Maejima, M., Fujii, T., Kozuma, S., Okai, T., Shibata, Y. and Taketani, Y.** : Presence of HLA-G-expressing cells modulates the ability of peripheral blood mononuclear cells to release cytokines. *Am. J. Reprod. Immunol.* **38** : 79-82, 1997.
- 21) **Le Bouteillier, P., Solier, C., Proll, J., Aguerre-Girr, M., Foumel, S. and Lenfant, F.** : Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? *Hum. Reprod. Update* **5** : 223-233, 1999.
- 22) 石谷昭子, 下嶋典子 : 胎盤トロホプラスト上に発現する HLA-HLA-G および HLA-E - 産婦人科の実際 **48** : 811-822, 1999.
- 23) **Hara, N., Fujii, T., Yamashita, T., Kozuma, S., Okai, T. and Taketani, Y.** : Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: Immunological demonstration with anti-HLA-G antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM 5.2". *Am. J. Reprod. Immunol.* **36** : 349-358, 1996.
- 24) **Goldman-Wohl, D. S., Ariel, I., Greenfield, C., Hochner-Celnikier, D., Cross, J., Fisher, S. and Yagel, S.** : Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblasts is associated with pre-eclampsia. *Mol. Hum. Reprod.* **6** : 88-95, 2000.
- 25) **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.
- 26) **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.
- 27) **Fournel, S., Huc, X., Aguerre-Girr, M., Solier, C., Legros, M., Praud-Brethenou, C., Moussa, M., Chaouat, G., Berrebi, A., Bensussan, A., Lenfant, F. and Le Bouteillier, P.** : Comparative reactivity of different HLA-G monoclonal antibodies to soluble HLA-G molecules. *Tissue Antigens* **55** : 510-518, 2000.
- 28) Second International conference on HLA-G Abstracts
- 29) **Sasagawa, M., Watanabe, S., Ohmomo, Y., Honmma, 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 marker in normal pregnancy and trophoblastic disease. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **5** : 345-356, 1986.
- 30) **Khong, I. Y., Lane, E. B. and Robertson, W. B.** : An immunocytochemical study of fetal cells at the maternal-placental interface using monoclonal antibodies to keratins, vimentin and desmin. *Cell Tissue Res.* **246** : 189-195, 1986.
- 31) **Ishitani, A. and Geraghty, D. E.** : Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** : 3947-3951, 1992.
- 32) 半藤 保 : Intermediate trophoblast 日産婦誌. **47** : 23-26, 1995.
- 33) **Shih, I-M., Jeffrey, D. S. and Kurman, R. J.** :

- Placental site nodule and characterization of distinctive types of intermediate trophoblast. *Hum. Pathol.* **30**: 687-694, 1999.
- 34) **McMaster, M. T., Librach, C. L., Zhou, Y., Lin, K-H., Janatpour, M. J., DeMars, R., Kovats, S., Damsky, C. and Fisher, S. J.** : Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J. Immunol.* **154**: 3771-3778, 1995.
- 35) **Fujii, T., Ishitani, A. and Geraghty, D. E.** : A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J. Immunol.* **153**: 5516-5524, 1994.
- 36) **Yang, Y., Geraghty, D. E. and Hunt, J. S.** : Cytokine regulation of HLA-G expression in human trophoblast cell lines. *J. Reprod. Immunol.* **29**: 179-195, 1995.
- 37) **Chu, W., Fant, M. E., Geraghty, D. E. and Hunt, J. S.** : Soluble HLA - G in human placentas: Synthesis in trophoblasts and interferon - γ - activated macrophages but not placental fibroblasts. *Hum. Immunol.* **59**: 435-442, 1998.