

## 論文の内容の要旨

論文題目           プロラクチンによる免疫調節転写因子 T-bet の  
                          調節機構に関する研究

指導教員           武谷 雄二 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

富尾 文子

女性の生体内は、妊娠・出産の際に精子や胎児が免疫排除されないように、女性ホルモンにより巧妙に免疫系をコントロールされている。なかでも子宮は、精子や胎児が存在する生殖臓器そのものであり、緻密な免疫系のコントロールが必要となる。妊娠初期に、着床は Th1 応答優位の炎症性の環境において起き、その後の妊娠維持には Th2 優位への Th1/Th2 バランスシフトが必要と言われている。また、子宮は外界と接し日常的に病原体に曝され、しばしば病原体の標的的部位となる。ヒトパピローマウイルス(HPV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、クラミジアトラコマティス、ナイセリアゴノレア、サイトメガロウイルス等の性行為感染により侵入する病原体は、子宮頸部に持続感染する。この易感染性は子宮が女性ホルモンに影響されやすい臓器であることが関係する。

プロラクチン(以下 PRL)は、妊娠 4 ヶ月頃より漸増し分娩直前には非妊時の 10 倍以上(300-500 ng/ml)に上昇する。授乳期には、授乳の影響で一時的な上昇は見られるが全体的には漸減する。だが、授乳している期間は非妊時上限(30 ng/ml)を下回ることはない。以上のように PRL は妊娠・産褥を通じて変化が著しく、同時期の免疫状態に多大な影響を与えている可能性がある。

本研究の目的は、主に Th1 誘導因子である T-bet に着目し、PRL による個体全体および産婦人科特有分野としての子宮頸部粘膜局所の免疫調節機構を解明することである。

PRL は妊娠の維持、乳腺の発達、体液の恒常性維持、免疫調節など様々な身

体的働きをもつポリペプチドホルモンである。ヒト非妊娠時血中濃度に相当する低用量 PRL(10-30 ng/ml)は炎症性免疫応答および抗体産生を促進するが、ヒト妊娠時血中濃度に相当する高用量 PRL(100 ng/ml)はこれらの応答を抑制されている。この相反する効果の機序はまだ不明な点が多い。また、エストロゲン、プロゲステロンを含む女性ステロイドホルモンは獲得免疫・自然免疫応答に影響すると言われている。エストロゲンの獲得免疫への影響は、リンパ球や樹状細胞からの Th2 サイトカイン分泌を促進することが特徴的である。エストロゲンは生殖器の上皮細胞を含む抗原提示細胞による抗原提示を抑制し、ナチュラルキラー(NK)細胞の自然免疫応答を抑制する。プロゲステロンは Th1 反応を抑制し、T 細胞の細胞傷害性活性を減弱させ、抗体産生能を高め、マウスとヒトで微生物の感染への感受性を高める。だが、女性ステロイドホルモンによる免疫学的変化の機序は不明な点も多い。

未熟ヘルパーT 細胞の炎症性 Th1 反応への分化は IFN- $\gamma$  や IL-12 などの Th1 サイトカインによる他に、T-bet と呼ばれる転写因子により誘導される。T-bet は CD4 陽性 T 細胞における Th1 分化を促進する転写因子の一つであり、Th1 分化の中心的役割をなす。T-bet はリンパ球、種々の抗原提示細胞(単球、マクロファージ、樹状細胞、骨髄性細胞)、ヒト生殖器の上皮細胞に発現し、IFN- $\gamma$  の生成を促進する一方 Th2 サイトカインの発現を抑制している。これまでに、IFN- $\gamma$  /Stat1 経路、IL-12/Stat4 経路が T-bet 発現機構として判明している。

本研究では、第一に PRL の用量依存性の免疫調節について検討した。PRL 受容体はサイトカイン受容体の一種であり、PRL 受容体シグナルは主に JAK2/Stat 経路を介する。本研究では、PRL 受容体シグナルが JAK2/Stat 経路に関与し、その結果 T-bet 発現の変化を通じて免疫調節を行うと仮説を立てた。そして、この仮説と、その結果生まれる CD4 陽性 T 細胞に対する高用量と低用量 PRL での逆説的な影響について検討した。

第二に、子宮頸部局所の免疫調節について、子宮頸部リンパ球を用いて検討した。これまでに、子宮内膜上皮細胞においてエストロゲン、プロゲステロン相互は Stat5 の活性化により分泌期中期～後期に T-bet を促進することが判明している。だが、子宮頸部に存在する粘膜リンパ球における T-bet の変動については不明である。本研究では性周期、性ホルモン、PRL による子宮頸部粘膜における Th1 誘導因子 T-bet、Th2 誘導因子 GATA-3 の変動について検討した。

ヒト白血病由来の CD4 陽性 T 細胞株である 8E5 細胞に、hPRL(10,30,100 ng/ml) を添加し、T-bet mRNA 量を real time RT-PCR 法で測定した。また、JAK2 および T-bet 発現に関与する可能性のある転写修飾因子 Stat1、Stat5 のリン酸化パターン、JAK2/Stat 経路の阻害因子である SOCS1、SOCS3、CIS のタンパク量の変化を Western immunoblotting 法で検討した。60 日令の非授乳 Balb/c マウス脾臓由来の

CD4 陽性 T 細胞に hPRL(0,10,30,100 ng/ml)を 3 時間添加し T-bet mRNA 量を real time RT-PCR 法で測定した。

8E5 細胞において、T-bet mRNA 量は低用量および高用量 PRL どちらを添加しても急速に増加した。変化のパターンは同じであったが、T-bet mRNA 量は、高用量 PRL に比べ低用量 PRL の方が高かった。低用量 PRL を 40 分添加すると TRR(T-bet のプロモーターにあり、転写促進に重要な調節部位)に結合する Stat1 のリン酸化は抑制された。TRR 結合リン酸化 Stat5 は添加前に殆ど確認できなかったが、低用量 PRL 添加後は CD4 陽性細胞において速やかに誘導され、40 分添加後に基準値に戻った。リン酸化 JAK2 および TRR 結合リン酸化 Stat5 の変化のパターンは低用量 PRL 添加時の T-bet mRNA 発現量の変化と類似していた。以上より、JAK2/Stat5 経路の PRL による T-bet 発現機構への関与が示唆された。

PRL 添加により SOCS1 と SOCS3 は用量、時間依存的に増加した。CIS も増加したが PRL とは無関係であった。JAK2 のリン酸化は低用量 PRL 添加時には用量依存的に増加したが高用量 PRL 添加時には減少し基準値に戻った。TRR 結合リン酸化 Stat5 の発現量も同様のパターンを示した。T-bet 発現への PRL の用量依存的影響の違いは短時間添加だけでなく長時間添加でも観測された。同様の結果がマウス初代 CD4 陽性 T 細胞でも確認された。

次に、文書で同意を得た女性 50 例(増殖期:20 例、分泌期:20 例、授乳期:10 例)より分離した子宮頸部リンパ球における T-bet、GATA-3 の mRNA 量を real time RT-PCR 法で測定した。増殖期・分泌期・授乳期に分けて有意差検定を行った。

T-bet mRNA 量は分泌期で約 13 倍上昇が見られた。GATA-3 mRNA 量は増殖期で約 4 倍上昇が見られた。T-bet/GATA-3 比(Th1/Th2 比)は分泌期で有意に上昇していた。授乳期の T-bet mRNA 量は産後 11 ヶ月まで漸減した。GATA-3 mRNA 量は授乳期には変動が見られなかった。

本研究により、PRL/JAK2/Stat5 経路と PRL/SOCS1、SOCS3 経路の均衡の変化により T-bet 発現量の PRL 用量依存的変化が起こることが示唆された。妊娠中のように高濃度に保たれた PRL は、女性ステロイドホルモンと共に胎児を、母親の局所的、全身的 Th1 応答、自然免疫応答から守っている可能性がある。

また、本研究ではサイトカイン発現の重要な調節因子である T-bet、GATA-3 両因子のヒト子宮頸部リンパ球における発現を観測し、T-bet mRNA、GATA-3 mRNA が性周期や妊娠・出産と共に変動することが判明した。本研究は、ヒト子宮頸部リンパ球を用いて粘膜免疫と性周期との関連を調べた初めての報告である。さらに、T-bet の発現は分泌期に増加し、GATA-3 の発現は分泌期に減少することが判明した。女性ステロイドホルモンは分泌期中期～末期に子宮内膜上皮細胞での T-bet 発現を促進するが、子宮頸部リンパ球においても、性周期で

の T-bet、GATA-3 発現の変動が女性ステロイドホルモンによる調節であることを強く示唆している。また、分娩直前に非妊時の10倍以上まで上昇した PRL は、授乳期に漸減する。今回、子宮頸部リンパ球において授乳期の進行と共に T-bet の減少が見られた。PRL300 ng/ml 以上という超高用量での T-bet 発現への影響は 100 ng/ml という高用量レベルとは異なる調節がかかっている可能性がある。

分娩直後の T-bet は高発現しており、初乳を含む最初の時期の母乳は胎児に強い免疫能を授ける大事な役割を果たしていると考えられた。

以上、本研究は、Th1 誘導因子である T-bet という転写因子に着目し、妊娠・産褥期における PRL の変化が、異なる分子メカニズムを介して免疫系を調節することを示した。また、子宮頸部リンパ球を分離することにより、子宮頸部という場所の粘膜免疫状態を直接観測した。

女性ホルモンによる免疫調節機構は子宮頸部リンパ球に反映されることが判明した。子宮頸部リンパ球は極めて簡便に採取でき、粘膜免疫の情報をヒトから直接的に得ることができる点で今後の粘膜免疫学研究にとって大変魅力ある試料となる。今後は、子宮頸部リンパ球を用い、生殖(妊娠・産褥)、性感染症、子宮頸癌といった産婦人科領域で代表的な疾患と、女性ホルモンによる免疫調節を結びつける研究を進めることが重要と考えられる。