

審査の結果の要旨

富尾 文子

本研究はプロラクチン(以下 PRL)による妊娠・産褥期における免疫調節機構を解明するため、主に Th1 誘導因子である T-bet に着目して CD4 陽性 T 細胞および産婦人科特有分野としての子宮頸部粘膜局所での発現の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. CD4 陽性 T 細胞株に hPRL(10,100 ng/ml)を短時間(10,20,40 分)添加した際の T-bet mRNA 量を、real time RT-PCR 法を用いて測定した。ヒト非妊娠時血中濃度に相当する低用量 PRL(10 ng/ml)および、ヒト妊娠時血中濃度に相当する高用量 PRL(100 ng/ml)どちらを添加しても T-bet mRNA は急速に増加した。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。
2. CD4 陽性 T 細胞株に hPRL(10 ng/ml)を短時間(10,20,40 分)添加した際の JAK2、Stat1、Stat5 の T-bet 転写量に付随するリン酸化パターンについてオリゴヌクレオチド沈降反応を利用した western immunoblotting を用いて検討した。リン酸化 Stat1、Stat5 の TRR(T-bet 調節領域)への特異的結合はオリゴヌクレオチド沈降反応により確認された。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 を添加した際の 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。
3. CD4 陽性 T 細胞株に hPRL(10,30,100 ng/ml)を 10 分間、120 分間添加した際の、JAK2/Stat 経路の阻害因子である SOCS1、SOCS3 や CIS のタンパク量の変化とリン酸化 JAK2、Stat5 のタンパク量の変化について western immunoblotting を用いて検討した。PRL 添加により SOCS1、SOCS3 は用量依存的、時間依存的に増加がみられた。PRL 添加により CIS の増加もみられたが、用量および時間とは無関係であった。リン酸化 JAK2、TRR 結合リン酸化 Stat5 の発現量は、PRL 添加 10 分後、120 分後いずれにおいても低用量 PRL(10-30 ng/ml)では増加がみられたが高用量 PRL(100 ng/ml)では減少か変化なしの状況であった。以上より、低用量 PRL では JAK2/Stat5 が優位に働き、高用量 PRL では SOCS1/SOCS3 が優位に働くことが示唆された。
4. CD4 陽性 T 細胞株に hPRL(10,100 ng/ml)を長時間(4 時間)添加した際の T-bet タンパク量を western immunoblotting を用いて測定した。低用量 PRL(10 ng/ml)添加時には T-bet の増加がみられたが、高用量 PRL(100 ng/ml)添加時にはわずかに減少がみられた。

5. CD4 陽性 T 細胞株に hPRL(10,100 ng/ml)を長時間(3,6,9,18,36 時間)添加した際の T-bet mRNA 量を real time RT-PCR 法を用いて測定した。低用量 PRL(10 ng/ml)添加時には T-bet mRNA 量は 3 時間でピークを迎え、その後 9 時間までに基準値に戻った。高用量 PRL(100 ng/ml)添加時には 36 時間にわたり T-bet の転写は抑制された。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ることが示された。
6. 60 日令の非授乳 Balb/c マウスの脾臓由来の初代 CD4 陽性 T 細胞に hPRL (10,30,100 ng/ml)を 3 時間添加した際の T-bet mRNA 量を real time RT-PCR 法を用いて測定した。低用量 PRL(10 ng/ml)添加時には T-bet mRNA 量は顕著に増加し、PRL の濃度の上昇とともに減少し、高用量 PRL(100 ng/ml)では基準値と差がみられなかった。
7. 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 mRNA 量および Th2 誘導因子である GATA-3 mRNA 量を real time RT-PCR 法を用いて測定した。増殖期、分泌期、授乳期別に分けて有意差検定を行った。T-bet mRNA 量は平均値がそれぞれ増殖期に 0.530、分泌期に 6.708(P=0.008)で、有意に分泌期で上昇がみられた。GATA-3 mRNA 量は平均値がそれぞれ増殖期に 1.619、分泌期に 0.465(P=0.0003)で、有意に増殖期で上昇がみられた。授乳期の T-bet mRNA 量は産後 1 ヶ月では 1.042 であったが、その後漸減し産後 11 ヶ月には 0.002 になった。GATA-3 mRNA 量は授乳期には変動がみられなかった。

以上、本論文は 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可能性を示した。また、子宮頸部リンパ球を分離することにより、子宮頸部という局所の粘膜免疫状態を直接観測した。本研究は、これまで不明な点の多かった PRL の免疫系への調節機構の解明および子宮頸部粘膜局所における免疫状態の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。