

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
平野 すずえ	主査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 大 道 正 英 副査 教授 田 窪 孝 行 副査 教授 窪 田 隆 裕 副査 教授 林 秀 行
主論文題名 Physiologically high concentrations of 17- β -estradiol enhance NF- κ B activity in human T cells (生理学的高濃度の 17- β -エストラジオールはヒト T 細胞において NF- κ B 活性を増強する)	
学位論文内容の要旨	
<p>【研究目的】 自己免疫疾患の多くにおいて、女性の罹患率が高いことが知られている。また、妊娠中に病勢が寛解する疾患や増悪する自己免疫疾患があることから、女性ホルモンの生理学的範囲内での変動が免疫反応に影響を及ぼすことが推察されているが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。NF-κB は、様々な免疫/炎症反応や細胞増殖に関与する多くの遺伝子の発現を制御する代表的な転写因子である。本研究は、生理学的範囲内でのエストロゲンの変動がヒト T 細胞における NF-κB シグナリングを修飾することを明らかにし、女性ホルモンが免疫反応を変化させる可能性を示すことを目的とした。</p> <p>【材料と方法】 (1)ヒト T 細胞として Jurkat 細胞株と健常人末梢血 CD3 陽性細胞を用いた。(2)NF-κB 結合配列とホタルルシフェラーゼ cDNA からなるプラスミドを用いたレポーターアッセイおよび ELISA 法を用いて、生理学的高濃度(10 nM)および低濃度(10 pM)の 17-β-エストラジオール (E2)によるヒト T 細胞での NF-κB シグナルの変化をみた。(3)ヒトエストロゲン受容体 (ER)α, β の発現プラスミド、siRNA プラスミドによる各々の強制発現系およびノックダウン系を用いて、各 ER アイソフォームの NF-κB シグナル変化への関与を調べた。(4)免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法を用いて、ER と NF-κB、転写共役因子の機能的な相互作用をみた。また、(5)NF-κB を介した現象として知られているヒト T 細胞アポトーシス(抗 CD3 抗体または ConA 刺激後)に対するエストロゲンの影響を調べるため、生理学的高濃度の E2 投与後の T 細胞を AnnexinV-Propidium Iodide で二重染色し、FACS で解析した。なお、統計学的処理は ANOVA で有意差を検定し、P 値 0.05 未満を有意とした。</p> <p>【結果】 1) E2 は Jurkat 細胞における NF-κB シグナルの活性化を増強する。 E2 単独投与では、Jurkat 細胞における NF-κB レポーター活性に変化はみられなかった。次に、Jurkat 細胞に PMA/ionomycin または TNF α を投与し NF-κB を活性化させた系では、生理学的高濃度(10 nM)の E2 投与時の NF-κB レポーター活性は、E2 無投与群に比較し有意に増強された。 2) E2 はヒト T 細胞において NF-κB 活性化を増強する。 TNF α で活性化した Jurkat 細胞とヒト末梢血 CD3 陽性 T 細胞において、ELISA 法で活性化 NF-κB</p>	

(p65)を測定すると、10 nM の E2 は E2 無投与群、生理学的低濃度(10 pM) の E2 投与群に比較し、活性化 NF- κ B を有意に増加させた。

3) E2 は ER β を介して NF- κ B 活性化を増強する。

1)の実験において、Jurkat 細胞の内因性 ER の存在下で 10 nM の E2 は NF- κ B 活性化を増強させた。ER には 2 つのサブタイプ (α と β) が知られており、細胞種によってその作用は様々である。ER β を Jurkat 細胞に強制発現させると 10 nM の E2 による NF- κ B 活性化はさらに増強し、ノックダウンさせると有意に減弱した。一方、ER α を強制発現・ノックダウンさせてもこれらの変化はみられなかったことから、T 細胞における E2 の NF- κ B 活性化増強作用は ER β を介していると考えられた。

4) ER は NF- κ B (p65)、ステロイドホルモンコアクチベーターと転写因子複合体を形成する。

免疫沈降法により、細胞核内成分において ER α ・ β ともに NF- κ B (p65)と結合していることを確認した。また、クロマチン免疫沈降法により、NF- κ B の標的遺伝子である IL-4 遺伝子のプロモーター領域上で、p65 と ER α ・ β 、ステロイドホルモンコアクチベーター (SRC-1・GRIP1) の結合が確認された。

5) 生理学的高濃度の E2 は T 細胞のアポトーシスに影響を与える。

NF- κ B により制御をうけることが知られている T 細胞のアポトーシス誘導実験系において、10 nM の E2 は E2 無投与群に比し、Jurkat 細胞ではアポトーシスを増強させ、末梢血 T 細胞では減弱させた。すなわち、各々の細胞において、NF- κ B の活性化増強に合致した変化がみられた。また、選択的 ER 阻害剤である ICI182780 を投与することによりその作用は打ち消されたことから、E2 が ER を介してヒト T 細胞のアポトーシスに影響を及ぼすことが示された。

【考察】

本研究において、生理学的高濃度の E2 がヒト T 細胞における NF- κ B 活性を増強させることが初めて示された。そのメカニズムとして、E2 は ER β を介して作用し、ER と NF- κ B、ステロイドホルモンコアクチベーターの直接の結合が NF- κ B シグナリングに影響していると考えられた。

エストロゲン/ER と NF- κ B の関連は種々の細胞において研究されているが、細胞種と ER サブタイプにより NF- κ B の作用は様々である。T 細胞においては ER β の発現が優位であるという報告が多く、ER β がヒト T 細胞での NF- κ B 活性増強作用に関わるという本研究の結果に合致していると考えられる。

E2 は単独では NF- κ B シグナリングに影響を与えず、NF- κ B が活性化された状態でのみその活性化を増強させること、および、二つの異なる活性化刺激 (PMA/ionomycin または TNF α) で同様の結果が得られたことより、E2 の作用点は二つの活性化刺激の作用点より下流、すなわち核内での働きであると考えられた。今回の研究により、核内で ER と NF- κ B(p65)が直接結合し、NF- κ B 制御遺伝子のプロモーター領域上で ER と NF- κ B (p65)が結合していること、さらに、ER のコアクチベーターである SRC1 と GRIP1 も結合していることが示された。このことよりヒト T 細胞における E2 の NF- κ B 活性化増強作用は、ER と NF- κ B が直接結合し、ER によって誘導されたコアクチベーターによって NF- κ B 活性が増強することによると推察された。以上の結果、女性ホルモンは、免疫、炎症、細胞増殖、細胞死などにかかわる遺伝子発現を変化させ、免疫反応の性差に重要な役割を果たす可能性が示された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	平野 すずえ
論文審査担当者		主 査 教授 花 房 俊 昭 副 査 教授 大 道 正 英 副 査 教授 田 窪 孝 行 副 査 教授 窪 田 隆 裕 副 査 教授 林 秀 行	
主論文題名 Physiologically high concentrations of 17- β -estradiol enhance NF- κ B activity in human T cells (生理学的高濃度の 17- β -エストラジオールはヒト T 細胞において NF- κ B 活性を増強する)			
論文審査結果の要旨			
<p>自己免疫疾患の多くにおいて、女性の罹患率の高いことや妊娠中に病勢が変化することが知られているが、免疫反応における性ホルモンの果たす役割についての詳細は不明で、そのメカニズムについても明らかではない。申請者は、生理学的範囲内でのエストロゲンの変動が免疫反応に及ぼす影響を、ヒト T 細胞を用いて検討している。</p> <p>その結果、申請者は、生理学的範囲内のエストロゲンの変動がヒト T 細胞内の NF-κB シグナリングを変化させ、免疫反応に影響を与えることを示した。更に、その分子メカニズムを検討し、ヒト T 細胞におけるエストロゲンレセプターと NF-κB の物理的・機能的関連を初めて明らかにした。</p> <p>本研究において、生理学的高濃度(妊娠中)のエストロゲンで、ヒト T 細胞における NF-κB シグナリング活性が増強すること、および、その増強作用にはエストロゲンレセプター β が関与していることが示唆された。また、NF-κB とエストロゲンレセプターが直接結合し、エストロゲンレセプターが転写共役因子を動員することによって NF-κB 転写活性を修飾するメカニズムが提唱された。更に、生理学的高濃度のエストロゲンによりヒト T 細胞のアポトーシスが変化することも示されており、今回の結果が免疫システムにおける性差の解明の糸口となることが期待される。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 292: R000–R000, 2007 (in press)</p>			