

学位論文内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 論文審査担当者 |
|--|---|
| 日下部 健 | 主査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 大 道 正 英 副査 教授 田 窪 孝 行 副査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 |
| 主論文題名 Effect of Danazol on NK Cells and Cytokines in the Mouse Uterus (マウス子宮におけるNK細胞およびサイトカインに対するダナゾールの効果) | |
| 学位論文内容の要旨 | |
| <p>《目的》</p> <p>子宮内膜症の治療薬であるダナゾールは、体外受精・胚移植(IVF-ET)治療に有利に働くことが報告されている。つまり、原因不明のIVF-ET不成功経験をもつ患者に対し、ダナゾールを前投与し、IVF-ETを再施行すると、その成功率が上昇することが示された。ダナゾールは子宮内膜症の病態因子である免疫細胞やサイトカインの活性・体内動態の異常を改善することが知られている。特にT細胞やnatural killer(NK)細胞活性の正常化、マクロファージの不活化について注目されているが、妊娠に対する作用についてはよく分かっていない。近年、サイトカインと妊娠についての研究が進み、T細胞由来のサイトカインでは、interferon(IFN)-γ、interleukin(IL)-2などのTh-1タイプに分類されるサイトカインは流産誘発機序に、IL-4、IL-6などのTh-2タイプサイトカインは妊娠維持機序に関わると言われている。またNK細胞由来のサイトカインでは、leukemia inhibitory factor(LIF)、granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)、macrophage-colony stimulating factor(M-CSF)が胚の着床に有利に働くことが報告されている。本研究では、マウスにダナゾールを投与し、血清および子宮内におけるサイトカイン、NK細胞の動態変化について検討を行った。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>BALB/c雌性マウスにダナゾールを2週間投与し、血液と子宮を採取した。また同様の処理を施したマウスに、投与終了後、一定の休薬期間を置き、同種の雄性マウスと交配させて妊娠率を調べた。対照群としては、溶媒のみを同じ方法で与えたBALB/c雌性マウスを用いた。採取した血液から血清を分離し、サンドイッチELISA法でサイトカイン濃度を測定した。測定対象のサイトカインは、IFN-γ、IL-4、およびTh-1タイプサイトカインの誘導作用を持つIL-12とした。子宮内サイトカインの検出にはRT-PCR法を用い、LIF、GM-CSF、M-CSFについて検討した。RT-PCR法では、新鮮な子宮組織からtotal RNAを抽出し、逆転写反応でcDNAを合成した。続いて各々のサイトカインの塩基配列から適切なプライマーを作成し、サーマルサイクラーを用いてPCR反応を行った。また、子宮内における免疫細胞の特異的表面マーカーについてもRT-PCR法で検討した。さらに免疫染色により、種々のサイトカイン陽性細胞および免疫細胞の子宮内局在を調べた。免疫染色では、子宮をホルマリン固定後、定法によりパラフィン切片を作成し、一次抗体を反応させ、avidin-biotin complex(ABC)法で陽性反応を検出した。</p> | |

《結果》

投与終了後、オスと交配させた対照群の妊娠率は 46.2%、ダナゾール群の妊娠率は 84.6%であった。血清サイトカインについては、IFN- γ 、IL-4、IL-12 は対照群およびダナゾール群共に検出限界以下であった。しかしながら M-CSF については、対照群と比べ、ダナゾール群の血清において有意に増加した。ダナゾール群の M-CSF 血清濃度は、休薬期間においても高く維持されていた。サイトカインの子宮内発現を見ると、LIF、GM-CSF に関しては両群共に検出されなかったが、血清と同様に、ダナゾール群の子宮において M-CSF の明瞭な発現が認められた。次に M-CSF の産生能をもつ NK 細胞について、その表面マーカーの Ly49 抗原に対する RT-PCR を行った。その結果、ダナゾール群の子宮において Ly49 抗原が明瞭に検出され、その発現量は対照群に比べ有意に増加した。Ly49 抗原に対する免疫染色を行うと、ダナゾール群の子宮内膜において Ly49 抗原陽性細胞が多数認められた。この反応部位は、M-CSF の陽性細胞の局在と同様であった。また M-CSF によって発現が亢進される接着因子 $\alpha 5$ integrin について免疫染色を行うと、 $\alpha 5$ integrin の陽性反応がダナゾール群の子宮内膜において顕著に増加していた。

《考察》

産婦人科領域では、IVF-ET 治療におけるダナゾールの有効性が認められているが、その作用機序は不明である。本研究により、ダナゾールは子宮内膜へ NK 細胞を集簇させ、M-CSF の局所的な産生亢進に関わることが初めて明らかとなった。さらに、M-CSF は子宮内膜における $\alpha 5$ integrin の発現を亢進させることにより、胚着床に有利な子宮内環境を形成し、妊娠の成立に働くと考えられた。

審査結果の要旨および担当者

| 報告番号 | 乙 第 号 | 氏 名 | 日下部 健 |
|--|-------|--|-------|
| 論文審査担当者 | | 主 査 教授 大 槻 勝 紀 副 査 教授 大 道 正 英 副 査 教授 田 窪 孝 行 副 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 | |
| 主論文題名 Effect of Danazol on NK Cells and Cytokines in the Mouse Uterus (マウス子宮におけるNK細胞およびサイトカインに対するダナゾールの効果) | | | |
| 論文審査結果の要旨 | | | |
| <p>ダナゾールが不妊症患者に対し、体外受精・胚移植(IVF-ET)治療の成功に有利に働くと考えられる報告例はあるが、その作用機序は不明である。また子宮内膜症の治療機序においては、ダナゾールが免疫細胞、特にNK細胞の機能調節に関わることが知られている。NK細胞は子宮において、M-CSFなどの着床に関わるサイトカインを分泌し、妊娠の成立に有用な働きを持つ。申請者はダナゾールの生殖学的作用について、NK細胞とそのサイトカインに着目し、マウスを用いた実験によって以下の結果を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1)ダナゾール投与後、休薬期間においてオスと交配させると、ダナゾール投与群の妊娠率が上昇した。 2)ダナゾール投与により血清中のM-CSF濃度が有意に増加した。またM-CSFの血清濃度は休薬期間でも高く維持されていた。 3)ダナゾール投与により、子宮内M-CSFの発現が亢進した。また子宮内NK細胞も増加した。M-CSFとNK細胞の局在部位は子宮内膜であり、両者の局在には相同性があった。 4)M-CSFで発現亢進と言われる接着因子$\alpha 5$ integrinの陽性反応が、ダナゾール投与群の子宮内膜で著明に増加した。 <p>本論文は、ダナゾールが子宮内膜におけるNK細胞の集簇およびM-CSFの産生亢進に関わることを初めて明らかにし、生殖学的に有効な作用をもつことを示した。また、M-CSFは$\alpha 5$ integrinの子宮内膜における発現を誘導し、胚の着床に有利な子宮内環境、いわゆるimplantation windowの形成に関わると示唆された。本論文の成果は不妊治療の発展に有用な基礎的知見を提供すると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項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) Journal of Reproduction and Development 53(1): 87-94, 2007</p> | | | |