

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：30109

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23708

研究課題名（和文）炎症性卵子pick-up障害における分子病態の解明と新規診断法の検討

研究課題名（英文）Elucidation of molecular pathogenesis and novel diagnostic methods in inflammatory oocyte pick-up dysfunction

研究代表者

細谷 実里奈（Hosotani, Marina）

酪農学園大学・獣医学群・助教

研究者番号：80848797

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、自己免疫疾患モデルマウスにみられる卵管pick-up障害の卵管上皮病態と、その原因となる分子病態に迫った。本マウスでは、卵管間膜の線維化による卵巣嚢孔の形態変化に加え、卵管の線毛運動速度の低下および線毛運動方向のバラつきがpick-up障害を招くことが示唆された。さらに本マウスでは、自己免疫疾患の発症に伴って卵管ロートにおけるヘッジホッグ経路関連分子の発現が顕著に低下することを明らかにした。ヘッジホッグ経路関連分子は成体上皮の修復過程においてその恒常性を担うため、本経路の減弱化が卵管上皮病態と関与する可能性が高く、卵管pick-up障害発症の根幹を担う分子病態解明の鍵となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患を有する女性や免疫系バランスの破綻した動物は高率に不妊症となることが知られるが、免疫異常と雌性生殖器の形態機能異常の関連については不明な点が多い。一方本研究では、免疫異常が卵管上皮の形態機能異常を招くことを明らかにした。現状、哺乳類における卵管pick-up障害の診断法は無く、原因不明の雌性不妊症にpick-up障害が関与する可能性が示唆されている。本研究で明らかとなった卵管形態機能異常およびそれに関連する分子病態は、卵管性不妊症の新たな診療・治療ターゲットの開発に繋がる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidate the pathology of the oviductal epithelium and its molecular pathogenesis related to oocyte pick-up dysfunction in autoimmune disease-prone mice. We found that the morphological changes of ovarian bursa caused by mesosalpinx fibrosis and abnormality in speed and direction of ciliary beating induce oocyte pick-up dysfunction in autoimmune disease-prone mice. Furthermore, expression of hedgehog signaling pathway-related genes was significantly downregulated in the oviductal infundibulum with deterioration of autoimmune abnormality. Since hedgehog signaling plays a role in maintaining homeostasis of adult epithelium, it is highly estimated that the hedgehog signaling attenuation involves in the pathogenesis of oviductal epithelium. Thus, we found the essential key of the molecular pathogenesis of oocyte pick-up dysfunction in autoimmune disease mice.

研究分野：獣医学

キーワード：卵管 不妊症 自己免疫疾患 卵子pick-up マウス

1. 研究開始当初の背景

ヒトの不妊症および動物の繁殖障害は、少子化の加速や食糧供給の不安定化を招く重大な社会問題である。雌性不妊症の原因である排卵から着床までの生殖プロセスの異常は、内分泌異常や代謝異常、免疫異常等の全身病態によって左右される。注目すべきことに、感染症や自己免疫疾患等の免疫異常を有する女性および免疫系バランスの破綻した動物は高率に不妊を発症することが知られる。しかし、免疫系の異常が雌性生殖器の形態機能にどのような影響を及ぼすか、またその詳細な病理発生機序は不明である。

一方我々は以前の研究で、自己免疫疾患モデルマウスの卵管において炎症、線毛上皮形態機能の異常および排卵胚の pick-up 機能の低下がみられることを発見した(細谷ら, *Lupus*, 2018)。排卵胚が卵管内に輸送されない pick-up 機能の異常は卵管性不妊症に直結するため、免疫異常と雌性不妊症を結ぶ重要な卵管病態が明らかとなった。しかし、その卵管病態を招く詳細な分子病態は未知であった。現状、哺乳類における卵管 pick-up 障害の診断法は無く、原因不明の雌性不妊症に pick-up 障害が関与する可能性が示唆されている。pick-up 障害における新たな診断・治療法開発の糸口を掴むためには、炎症に起因する pick-up 障害発症に関与する分子群の同定が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、自己免疫疾患モデルかつ炎症性 pick-up 障害モデルとして MRL/MpJ-Fas^{lpr/lpr} (MRL/lpr) の解析を軸とし、**免疫異常が卵管の形態機能異常を導く分子病態を明らかにすることを目的**とした。具体的には、疾患群マウスの卵管病理変化およびそれと相関する分子を見出し、免疫異常と卵管機能障害を繋ぐ責任分子として同定する。本申請課題を遂行し、ヒトの不妊、産業動物の繁殖障害を対象とした新たな病理発生理論や、卵管性不妊症における新たな診断・治療法開発の展開へ繋げる。

3. 研究の方法

3-1. 使用動物: 本研究では、若齢 (3ヶ月齢) および加齢 (6ヶ月齢) の雌マウスを使用した。重度の自己免疫疾患モデルかつ卵管 pick-up 障害モデルである MRL/lpr およびその野生型 MRL/MpJ (MRL/+) を使用した。

3-2. 実験方法

(A) pick-up 障害を招く卵管上皮形態異常の詳細を明らかにする

(A-1) 卵管ロートの線毛における形態機能解析: マウスから卵管ロートを採取し DMEM で培養した。光学顕微鏡下でその線毛上皮における線毛運動を観察し、動画を撮影した (3 秒、30fps)。得た動画を用い、線毛運動速度の指標値である線毛振動数 (CBF) を測定した (Chen ら, *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2016)。また、卵管ロートをハーフカルノフスキー液で固定し、定法に従い超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で卵管ロートの線毛上皮形態を観察した。

(A-2) 卵巣囊の形態解析: マウスから卵巣・卵管・子宮を採取した。実体顕微鏡下で、35G のナノニードルを用い卵巣間膜を穿孔し、卵巣囊内に 10~20μl の希釈墨汁を注入し、卵巣囊と腹腔の連続性を検証した。卵巣・卵管・子宮を 4%パラホルムアルデヒド液で固定し、定法に従い 12 μm 厚の完全連続切片を作製し、HE 染色を施した。Image Pro ソフトウェアを使用し、卵巣・卵管・子宮の組織構造を立体再構築した。加えて、卵巣・卵管・子宮の線維化の程度をマッソントリクローム染色によって解析した。

(B) 卵管上皮形態異常および pick-up 障害を招く分子群を同定する

重度の自己免疫疾患および pick-up 障害を呈する 6ヶ月齢 MRL/lpr および自己免疫疾患症状が軽度かつ pick-up 障害を呈さない 3ヶ月齢 MRL/lpr の卵管ロートにおいて網羅的遺伝子発現解析を実施し、その発現を 2群間で比較した。Gene ontology 解析により、3ヶ月齢 MRL/lpr に対し 6ヶ月齢 MRL/lpr で顕著に変動する機能遺伝子群を選抜し、これら遺伝子群を免疫異常と卵管機能障害を繋ぐ責任分子候補とした。卵管ロート内における責任分子候補の mRNA・蛋白発現をそれぞれ定量 PCR・組織免疫染色で同定した。

4. 研究成果

(A-1) pick-up 障害に卵管ロート線毛の形態機能異常が関与する

pick-up 機能の生理的メカニズムは完全には解明されていないが、卵管ロート線毛が適切な速度かつ規則的な方向に波打つことが必須要素であると考えられる。6ヶ月齢 MRL/lpr の卵管ロートでは、3ヶ月齢 MRL/lpr または 3 および 6ヶ月齢 MRL/+ と比較して線毛上皮細胞数の減少、線毛運動速度の低下、および線毛運動方向のばらつきが増大がみられた (図 1, 2)。特に

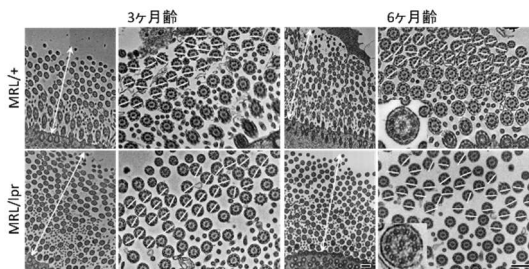


図 1. 卵管ロート線毛上皮の超微形態
両矢印: 線毛長, 直線: 線毛運動方向に
対し 90°

線毛運動速度の指標値である CBF は、全身自己免疫疾患症状の指標値である脾重量/体重比と有意な負の相関を示したことから、マウスにおいて全身の自己免疫異常が卵管ロート線毛上皮の形態機能に影響を与えることが示唆された。また、卵管ロートの粘膜固有層には顕著な炎症細胞浸潤があり、これら細胞由来の液性免疫因子が線毛上皮の病態に関与すると考えられた。

(A-2) pick-up 障害に卵巣嚢孔の形態が関与する

マウスの卵巣および卵管ロートは、卵巣間膜および卵管間膜によって包まれた袋状の構造・卵巣嚢内に位置するため、通説ではマウスにおいて排卵胚の卵管外への脱落は起こらないとされていた。一方 MRL/lpr では卵管内の pick-up 胚よりも排卵胚数が多いことが分かったため(細谷, *Lupus*, 2018)、卵巣嚢の形態を解剖学および組織学的に精査した。観察した全てのマウスにおいて、卵巣嚢に注入した墨汁が卵管と子宮の間に位置する孔構造から漏出した。卵巣・卵管・子宮組織の立体再構築像を解析した結果、本孔構造は大きさ約 0.04~0.12cm² であり、卵管峡部と子宮端を結ぶ卵管間膜上に存在することが分かった(図 3)。我々は本孔構造を“卵巣嚢孔”、卵巣嚢孔を囲う卵管間膜を“卵巣嚢孔間膜”と命名し、卵巣嚢が卵巣嚢孔を通じて腹腔との連続性を保つことを示した。卵巣嚢孔間膜は平滑筋に富み、その筋収縮によって卵巣嚢孔の大きさが変動する可能性が示された。つまり、マウスの排卵胚は卵巣嚢孔を通して腹腔内に脱落すると考えられた。一方、6ヶ月齢 MRL/lpr では、卵巣嚢孔間膜が線維化し(図 4)、若齢時と比較して卵巣嚢孔の面積が大きくなる傾向があったことから(図 3)、卵巣嚢孔の形態変化が pick-up 障害に関与することが示唆された。

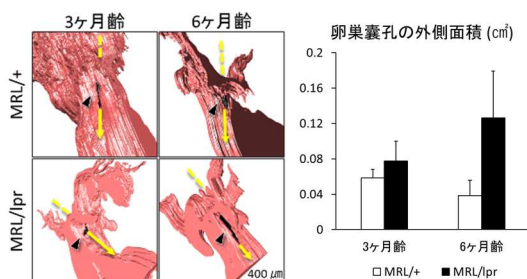


図 3. 卵巣嚢孔間膜に囲まれる卵巣嚢孔(矢印)とその外側面積
矢印: 卵巣嚢側→腹腔側

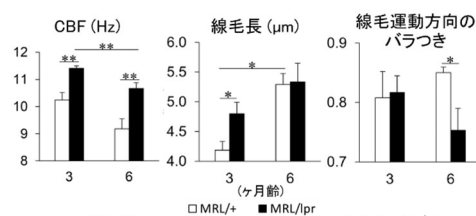


図 2. 卵管ロートの線毛運動速度(CBF), 線毛長, 線毛運動方向のバラつき
*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

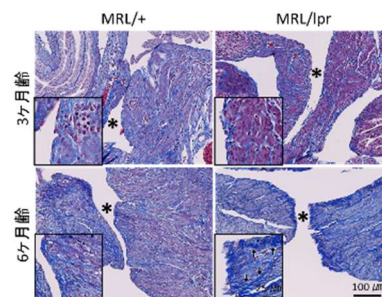


図 4. 卵巣嚢孔間膜の線維化(矢印)
マッソントリクローム染色, *: 卵巣嚢孔

(B) pick-up 障害にヘッジホッグ経路の減弱化が関与する (未公表データにつき図は省略した)

3ヶ月齢と比較し6ヶ月齢 MRL/lpr では、*Tnf* (Tumor Necrosis Factor) や *IL6* (Interleukin-6) などの炎症性サイトカインの発現上昇に加え、各種コラーゲン分子 (*Col6a5*, *Col7a1*, *Col17a1*, *Col15a1*, *Col25a1*) の発現上昇・低下がみとめられた。一方、線毛形態に関連する分子としてダイニンを構成する *Dnah6* (Dynein Axonemal Heavy Chain 6)、細胞内平面極性を制御する *Celsr3* (Cadherin EGF LAG Seven-Pass G-Type Receptor 3) およびヘッジホッグ経路関連分子 *Smo* (Smoothed) の発現低下がみとめられた。これら選抜分子に着目し、その卵管ロートにおける発現・局在をそれぞれ qPCR・免疫組織化学で検出したところ、MRL/+および3ヶ月齢 MRL/lpr と比較し、6ヶ月齢 MRL/lpr で *Smo* の発現が顕著に低下した。

そこでヘッジホッグ経路を担う中枢分子 *Ptch1* (Patched-1) および *Gli1-3* の発現・局在も同様に解析した。結果、MRL/lpr マウスの卵管ロートにおいては、自己免疫疾患の進行に伴って *Ptch1*, *Gli1* の発現が顕著に低下した一方、*Gli2* の発現が顕著に増加することが明らかとなった。ヘッジホッグ経路は成体上皮の恒常性維持を担うため、その卵管上皮の形態機能との関連が予想された。卵管上皮の恒常性を制御する *Pax8* (Paired box 8) と線毛形成を制御する *Foxj1* (Forkhead box protein J1) の卵管ロート内発現量を qPCR で計測したところ、MRL/lpr の卵管ロートでは自己免疫疾患の進行に伴って *Pax8* の発現が顕著に低下し、*Foxj1* の発現が顕著に上昇した。3ヶ月齢 MRL/lpr の卵管ロートでは、*Ptch1*・*Smo*・*Gli2* と *Foxj1* の発現量が正に相関した。以上より、マウスにおいて、全身自己免疫異常がヘッジホッグ経路の減弱化を通して卵管上皮の恒常性に影響を与える可能性が示唆された。

総括

マウスにおいて、全身性自己免疫異常が卵管線毛上皮および卵巣嚢孔の形態機能変化を通して pick-up 障害発症に関与することが明らかとなった。さらに、免疫異常と卵管上皮の形態機能異常を繋ぐ分子病態としてヘッジホッグ経路の関連が強く予想された。今後は本経路に着目し、MRL/lpr マウスに加え繁殖障害を呈する畜産動物検体も解析対象とすることで、pick-up 障害発症機序の全貌解明を目指すとともにその臨床エビデンスを収集していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hosotani Marina, Ichii Osamu, Nakamura Teppei, Masum Md. Abdul, Otani Yuki, Elewa Yaser Hosny Ali, Kon Yasuhiro	4. 巻 380
2. 論文標題 Altered ciliary morphofunction in the oviductal infundibulum of systemic autoimmune disease-prone MRL/MpJ-FasIpr/Ipr mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 627 ~ 641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03175-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hosotani Marina, Ichii Osamu, Nakamura Teppei, Namba Takashi, Islam Md. Rashedul, Elewa Yaser Hosny Ali, Watanabe Takafumi, Ueda Hiromi, Kon Yasuhiro	4. 巻 238
2. 論文標題 Anatomy and histology of the foramen of ovarian bursa opening to the peritoneal cavity and its changes in autoimmune disease prone mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 73 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joa.13299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 細谷 実里奈, 市居 修, 中村 鉄平, 難波 貴志, Ali Elewa Yaser Hosny, 渡邊 敬文, 植田 弘美, 昆 泰寛
2. 発表標題 マウスの卵巣嚢-腹腔連絡路(卵巣嚢孔)
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hosotani M, Ichii O, Elewa YHA, Nakamura T, Masum MA, Otani Y, Kon Y
2. 発表標題 Abnormality of ciliary morphofunction in oviduct of autoimmune disease model mice
3. 学会等名 The 7th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists (Asian AVA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細谷 実里奈, 市居 修, 中村 鉄平, 長谷川 靖洋, Md. Abdul Masum, 渡邊 敬文, 植田 弘美, 昆 泰寛
2. 発表標題 マウス卵管の線毛におけるヘッジホッグシグナル伝達経路の発現
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細谷 実里奈
2. 発表標題 自己免疫疾患モデルマウスの卵管形態機能解析から明らかにするピックアップ障害の病態
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会 獣医解剖分科会シンポジウム 「発生学の新しいアプローチによる新展開」(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柴原浩章編著, 分担執筆者(細谷実里奈, 他 64名)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 414
3. 書名 実践 卵管学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関