

令和元年6月11日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15543

研究課題名(和文) 卵管上皮ホメオスタシス維持に関わる分子機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism for the differentiation of ciliated cells in fallopian tube epithelium

研究代表者

岩野 智彦 (IWANO, Tomohiko)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：10442930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵管上皮を構成する繊毛細胞の分化メカニズムを調べるためにブタ卵管上皮細胞を用いた初代培養系を確立し、実験を行なった。エストロゲン(E2)がERbetaを介して繊毛細胞の分化を促進することを見出した。これは、NotchのリガンドであるDLL1の発現減少に続くものである。一方、EGF経路の抑制はNotchシグナルを衰退し、結果として繊毛形成を促進した。エストロゲンはEGF経路には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、卵管繊毛細胞の分化は、EGFおよびエストロゲンシグナルのバランスに依存し、それぞれ独立にNotch経路を阻害または刺激することで制御していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵管上皮ホメオスタシス維持機構における繊毛細胞分化の分子機構の一端が明らかになった。この成果は発生生物学的に重要な知見となり、再生医療の面でもiPS細胞からのin vitro分化誘導に働くキープクター候補を提示できるという意義も有している。また、卵巣癌の一種は卵管上皮細胞の異常増殖および転移によると考えられており、本研究で着目したNotchやEGFシグナルの制御異常は他の組織ではガン化のリスクを高めることが知られているため、卵管上皮由来卵管がんの研究の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The lumen of the fallopian tube (FT) is lined with columnar epithelium composed of secretory and ciliated cells, both of which are important for reproduction. However, the molecular mechanism regulating the cell fate remains controversial. In this study, we established a primary culture system using porcine fallopian tube epithelial cells (FTECs) to study the differentiation mechanism. I found that estrogen promoted the differentiation of multi-ciliated cells (MCCs) through estrogen receptor, following the reduction of DLL1, a ligand of Notch. Meanwhile, epidermal growth factor (EGF), a regulator of epithelial homeostasis and differentiation, suppressed ciliogenesis by the activation of Notch signaling. However, the estrogen pathway did not affect the activation of the EGF pathway. Taken together, the differentiation of MMCs in FT depends on the balance of EGF and estrogen signaling, either of which inhibits or stimulates the Notch signaling pathway respectively.

研究分野：細胞生物学

キーワード：卵管上皮 エストロゲン EGFR Notch

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年不妊症や子宮外妊娠などの異常妊娠が増加しており、排卵・受精卵成熟における生体機構の解明は、不妊や異常妊娠の理解・治療の基盤となる研究である。卵管異常はその原因の一つであるが、卵管において繊毛細胞の運動繊毛の起こす流動が、分泌細胞からの分泌物の管内ホメオスタシスの維持に寄与し、同時に卵子の子宮方向への運搬を促している。

卵管の繊毛は月経周期によって変化し、恒常性維持機構により定期的に上皮細胞が新生する。エストロゲンとプロゲステロンがそれぞれ繊毛細胞と分泌細胞の活性化に関わることは古くから知られているが、細胞分化に関わる分子メカニズムは分かっていない。近年、卵管上皮に PAX8 陽性の幹細胞があることが知られ、転写因子 p73 は多繊毛 (運動繊毛) 形成に必須な FOXJ1 遺伝子の活性化に関わることが明らかになっている。また繊毛細胞分化には Notch シグナルが関わっているという報告があるが、隣接する細胞間の Notch シグナルと分化の関係を示した研究は未だ報告されていない。

細胞分化の制御は、細胞外シグナルに応答し遺伝子発現調節が適切に行われることで達成される。一次繊毛は微小管を柱とし細胞膜が突出したアンテナ様の構造を持ち、外来シグナルの受容機能を持つ。卵管や気管の繊毛細胞もその未成熟な時期には一次繊毛を形成しており、それが一旦退縮し、運動繊毛形成が起こる。実際に一次繊毛不全疾患として知られる多発性嚢胞腎の患者では気管上皮の異常が観察されている。また、表皮形成における Notch 経路に一次繊毛が必須であるという報告があるが、卵管機能や分化に関わる一次繊毛機能は明らかでない。

2. 研究の目的

卵巣がんが卵管上皮細胞に由来し、ガン化した細胞が転移するのではないかと近年考えられており、その病態の原因究明は治療や予防の点において早期の解明が求められている。しかしながら、その発生機序は未だ分かっていないことが多く、卵管上皮細胞の分化機構の解明は癌研究の面でも必要とされている。乳癌細胞では Notch シグナルとエストロゲン経路の関係が示唆されており、卵管上皮でも何らかの関係があることが推察される。

3. 研究の方法

山梨県食肉衛生検査場よりブタ卵管を購入し、卵管上皮の消化および上皮細胞の分離を行った。増殖因子を含む培地での培養を経たのち、トランスウエルディッシュを用いた Air Liquid Interface 培養で細胞分化を誘導した。約 2 週間培養後に細胞を固定し、免疫染色や定量 PCR、ウエスタンブロットによる遺伝子発現の解析により、細胞分化を検討した。この実験系において、培地への様々な薬剤を投与し、繊毛細胞分化を制御するシグナル経路の果たす役割を検討した。

4. 研究成果

(1) 初代培養卵管上皮の分化とその構造

前年度の研究において我々は *in vitro* での卵管上皮培養法を確立し、その実験系を用いて漢方薬成分が卵管上皮細胞の分化および動繊毛の動態に与える影響を解析した。ブタ卵管から分離した上皮細胞は、エストロゲン (E2) を添加した基礎培地で ALI 培養を 2 週間程度行うと、ac-tub 陽性の繊毛細胞が分化した。E2 濃度が 0.5ng/mL の場合繊毛細胞の割合は 20%程度であったが、2ng/mL では 30%程度に上昇した。以後、この濃度での実験を行った。一方、プロゲステロン (2-10ng/mL) では分化誘導ができなかった。走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いてエストロゲンで分化誘導された上皮細胞の組織構造を観察すると、長い複数の運動繊毛を持つ繊毛細胞と短い微繊毛を持つ分泌細胞が、生体由来の卵管内腔面とほぼ同じ比率で出現していることが分かった。また、運動繊毛の運動 (約 10Hz) も確認をすることができた。これらの結果は、初代培養卵管上皮細胞はエストロゲンにより繊毛細胞分化を誘導でき、その組織構築が生体内を再現していることを示している。この実験系を用いて、さらなる分子メカニズム解析を行った。

(2) 繊毛形成に関わるエストロゲンレセプター

エストロゲン受容体として Estrogen receptor alpha (ER α)、Estrogen receptor beta (ER β)、G-coupled protein receptor (GPR30) が知られており、どれが繊毛細胞の分化に関わるかを各々のアゴニスト (PPT、DPN、G-1) について検討した。DPN (10-100nM) を投与した場合に、E2 の投与と同様に繊毛細胞分化が誘導され、PPT や G-1 では誘導されなかった。この効果は ER β アンタゴニスト PHTTP の追加投与で抑制された。したがって、ER β が特異的に繊毛細胞誘導に関わることが分かった。

(3) 繊毛形成に関わる EGF シグナル

エストロゲン単独では最大で 30%の繊毛細胞しか誘導できなかったため、他の何らかのシグナル経路が阻害的に働いている可能性を考えた。既出論文によると気管上皮細胞は EGF シグナルが繊毛細胞分化に抑制的に働くことが報告されており、卵管上皮でも同様の機構が働いているかどうかを検討した。まず、培地から EGF を抜いて培養を進めると、培養 5 日で繊毛細胞が観察さ

れ始め、13 日後には約 40%の細胞が繊毛細胞に分化した。EGF を加えている場合では 13 日培養しても繊毛細胞は 10%程度であった。EGF と繊毛細胞分化の関係をさらに調べるために、EGFR 阻害剤ゲフィチニブを培地に投与した。すると 100nM から 1 μ M への投与量依存的に繊毛細胞の割合が増加した(5%から 20%)。また、ゲフィチニブ投与により MEK および ERK のリン酸化が減少したが、AKT のリン酸化には変化がなかったため、繊毛形成には MEK-ERK 経路が関与していることが示唆された。しかしながら、E2 および DPN の投与では MEK, ERK, AKT のリン酸化には影響を与えなかったため、エストロゲンによる繊毛細胞分化誘導は EGF 経路の阻害によるものでは無いと考えられる。

(4) 繊毛細胞分化におけるエストロゲンによる Notch シグナルの抑制

エストロゲン経路の作用するシグナル経路の候補として、Notch シグナルが挙げられる。Kessler らは Notch シグナルの抑制でヒトの卵管繊毛細胞分化が促進したことを報告している(Kessler et al., Nat. Commun., 2015)。そのような背景から、本実験系において、エストロゲンと Notch シグナルの関係を検討した。まず Notch シグナル阻害剤 DAPT を培地に投与すると、約 15%の細胞で繊毛細胞分化が誘導された。次に、E2 または DPN 投与で Notch シグナルに関係する遺伝子に変化があるかを QPCR やウエスタンブロットで調べた。すると、Notch リガンドである DLL1, DLL4, JAG1, JAG2 の中で、DLL1 のみの発現が E2 投与で低下していた。また Notch の活性化の指標である Notch intracellular domain(NICD)の量も減少していることが分かった。一方、FOXJ1 (繊毛形成誘導に関わる転写因子)の発現は上昇していた。これらの結果から、エストロゲンは Notch リガンドの発現抑制に関わり、結果として Notch シグナルが抑制される。同時にエストロゲンシグナルは直接的か間接的に FOXJ1 の発現を誘導し、繊毛形成が誘導されると考えられる。

(5) 繊毛細胞分化におけるエストロゲン、Notch、EGF シグナルの関係性

Notch シグナルは EGF シグナルにより活性化されることがすでに知られているため、繊毛細胞分化において、エストロゲンシグナルと EGF シグナルがどのように Notch シグナルの制御に関わっているかを調べた。まず、E2 または DPN とゲフィチニブを合わせて培地に投与すると、E2 または DPN 単独に比べて有意に高い割合(約 60%)で繊毛細胞分化が誘導された。それに一致して、DLL1 の発現も単独投与に比べてさらに大きく低下していた。つまり、エストロゲンおよび EGF シグナルは独立して Notch シグナルの制御に関わることが示唆された。

(6) まとめ

本研究の結果、卵管上皮の繊毛細胞の分化にはエストロゲンが作用しており、分化誘導は特に ER β を介するシグナル伝達経路による機能と考えられる。この分化制御には Notch シグナルが深く関与しており、エストロゲンによるリガンド DLL1 発現の抑制が Notch シグナルの低下につながり、結果的に繊毛細胞の分化方向に働くことが示された。また、EGF シグナルがエストロゲンシグナルと独立して Notch シグナルに作用し、卵管繊毛細胞分化の調整に関わることが示された。本研究では繊毛細胞分化に着目し、その分化メカニズムの解明を進めたが、もう一種の分泌細胞に関しては明らかにすることができなかった。この両者の文化メカニズムに関しては、今後の課題である。また、本研究はトランスウェルを用いた 2 次元培養による結果であり、体内での 3 次元的な組織構築のメカニズムを明らかにするためには、エストロゲン、EGF、Notch 以外のシグナルの関与も将来的に検討を進めるべきであろうと考えられる。

5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Maobi Zhu, Tomohiko Iwano, Sen Takeda

「Estrogen promotes the multiciliogenesis of fallopian tube epithelial cells through estrogen receptor β 」

2018 年 3 月 29 日 第 123 回 日本解剖学会総会全国学術集会 口頭発表

日本医科大学武蔵境校舎(東京都武蔵野市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：竹田 扇

ローマ字氏名：TAKEDA Sen

研究協力者氏名：朱 茂碧

ローマ字氏名：ZHU Maobi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。