

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06732

研究課題名(和文) 卵管上皮構築におけるエストロゲン受容体ベータを介した分子機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of Estrogen receptor beta 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・講師

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、卵管上皮構築におけるエストロゲン受容体ベータ(ER beta)を中心とした分子メカニズムの解明を目的とし、繊毛細胞分化に関する細胞内遺伝子発現のためにRNA-seq解析を行い、エストロゲン経路に影響を与える細胞外環境解析のため複数の基質の検討、上皮構築や機能に関する代謝産物の解析のため質量分析法を用いた解析、それぞれの解析において関係する分子を見出すことができた。また、ER betaを刺激する植物エストロゲンの効果についても検証を行い、複数の成分がファイトエストロゲンとして機能することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、卵管ホメオスタシスの維持における分子機構の解明は、不妊や異常妊娠の理解・治療の基盤となる研究である。本研究では、“卵管上皮がどのように構築され機能を保つか”という問いに対し、ERbetaが関与する卵管上皮細胞分化、細胞外環境、代謝成分の解明が進んだ。さらに、普段我々が食する大豆等に含まれる植物エストロゲンもERbetaと同様の機能を持つことが示され、卵管ホメオスタシスの維持における分子機構および食事による効果についても基盤となる研究となったため、学術的・社会的意義の高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the molecular mechanism centered on estrogen receptor beta (ER beta) in the construction of the fallopian tube epithelium. We performed RNA-seq analysis to determine intracellular gene expression related to ciliated cell differentiation, examined multiple substrates to analyze the extracellular environment that affects the estrogen pathway, and used mass spectrometry to analyze metabolites related to epithelial construction and function. As a result, we were able to find related molecules in each analysis. We also verified the effect of phytoestrogens that stimulate ER beta, and found that multiple components affect the construction of the fallopian tube epithelium.

研究分野：細胞生物学

キーワード：卵管上皮 エストロゲン 繊毛細胞 代謝 植物エストロゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵管の環境は月経周期によって大きく変化するが、ホメオスタシス維持機構により上皮構造と機能が保たれている。ホルモン異常や炎症などの要因で上皮細胞の機能が低下すると、妊娠異常やガン化などにつながる。卵管の上皮形成メカニズムに関しては未だ研究課題として残されている部分が多いが、卵管と構造的に非常に似た器官である気管の研究で得られた分子機序は卵管でも共通する部分がある。Notch や EGF シグナルはいずれの器官でも細胞分化に重要な役割を果たしている。一方で卵管や乳腺に強く影響を及ぼす女性ホルモンの機能は、乳がんとの関連性から乳腺での機能解明が進んでいるが、卵管での組織構築に関わる機能はあまり分かっていない。本研究では、卵管上皮ホメオスタシス維持における上皮構築のメカニズム解明を目標とする。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、卵管ホメオスタシスの維持における分子機構の解明は、不妊や異常妊娠の理解・治療の基盤となる研究である。

卵管内ホメオスタシスの維持に大きな役割を果たす上皮細胞は運動繊毛を有する繊毛細胞と粘液を分泌する分泌細胞で構成され、わずかに存在する未分化細胞からのターンオーバーでその数が維持されている。研究代表者はこれまでの研究において、卵管の初代培養系を確立し、未分化細胞から繊毛細胞への分化誘導に働くエストロゲン経路の一端を明らかにしたが、その詳しいシグナルカスケードや分泌細胞への分化メカニズムの解明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、“卵管上皮がどのように構築され機能を保つか”という問いに対し、エストロゲン受容体 b (ERb) が制御する細胞分化機構の解明、他のホルモンや細胞外基質等の細胞外環境が ERb 経路に及ぼす分子の同定、細胞動態に直結する代謝産物の分析、という3つの課題に取り組み、多角的に卵管上皮構築における ERb を介した分子メカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

繊毛細胞分化において ERb が制御する分子機構の解明

ヒトまたはブタの卵管上皮細胞初代培養系 (Zhu M, et al., 2020) を用い以下の実験を行う。

繊毛細胞マーカーとして acetylated-tubulin、分泌細胞マーカーとして Pax8 発現を調べる。

1. ERb アゴニスト DPN 投与後、経時的に変化する遺伝子を RNA-seq で調べる。ネガティブコントロールとして ERa アゴニスト PPT を用い、ERb 特異的制御遺伝子を抽出する。特に、EGF や Notch シグナルに影響する遺伝子に着目し、下流遺伝子候補を抽出する。
2. 繊毛細胞の分化前後で変化する一次繊毛の形成や長さを計測し、長さ調節の因子について結合タンパク質の局在を免疫染色法で観察し、その長さ調節に関する機能解析を行う。
3. 関連タンパク質の共免疫沈降によって得られるタンパク質の機能をノックダウンや相補遺伝子の導入によって調べる。

卵管エストロゲン経路に影響を与える細胞外環境の分子機構解明

上皮細胞は細胞外基質からも刺激を受け、分化に影響を受ける可能性がある。そこで、ERb による繊毛細胞分化に影響を与える細胞外環境因子の分子メカニズムを以下の方法で調べる。

1. エストロゲン投与に対し、植物由来のエストロゲン様成分 (ダイゼイン、ゲニステイン等) を投与し、細胞分化効率への影響を免疫染色で調べる。
2. 細胞外基質との関係を調べるため基質の種類や濃度、厚さを変えて検証する。細胞骨格への影響が想定されるため、E-カドヘリンなど接着因子複合体に関わる分子の構造機能解析を行う。構造の詳細な変化を調べる場合には、電子顕微鏡を用いた観察を行う。
3. 分化へ影響があった条件について、遺伝子発現解析および遺伝子のノックアウトや阻害剤実験を行うことで、関係する分子メカニズムの検証を行う。

上皮構築や機能に関する代謝産物の発現解析

上記条件下のメタボローム解析のため、質量分析装置 (LC-MS) を用いた成分分析を行う。

1. 代謝産物として、リン脂質や、アミノ酸、核酸等の一次代謝物を中心に調べる。
2. 増減する代謝産物のパスウェイ解析を行い、関連代謝経路を調査する。
3. 2 の代謝経路に作用する薬剤や遺伝子改変等の方法を調べ、成分と細胞動態との関連を解析する。

4. 研究成果

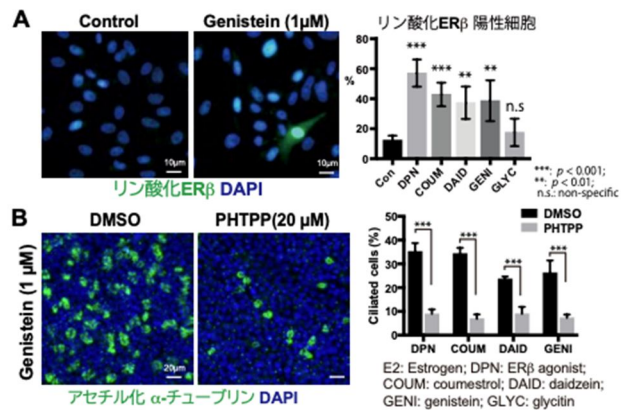
遺伝子発現に関して、エストロゲン受容体 アゴニストである DPN の投与有無の卵管上皮細胞で比較した RNA-seq 解析を行い、見出されたエストロゲン受容体ベータに関係する遺伝子経路のインヒビター実験等を行い、いくつかの経路の重要性が示唆されている。中でも細胞周期に関連する因子が複数同定されており、細胞周期関連因子と細胞分化や多繊毛形成への関わりについて、検討が必要であることがわかった。その中の一つ CDK2 に関して、阻害剤である NU6140 はエストロゲン刺激下でも運動繊毛形成を抑制しており、重要な因子の一つであることが分かる。すでに分裂を終えた細胞でのサイクリン関連タンパク質の機能はまだ十分にわかっておら

ず、多繊毛形成や運動性についての研究が今後さらに必要である。

一方で、多繊毛形成に先立ち、上皮細胞は一次繊毛を形成する。卵管上皮の一次繊毛の形成後、どのように多繊毛に切り替わるかについて、その分子機構ははまだ未知だが、一次繊毛の長さ制御はそのメカニズムの一つであると考えられる。一次繊毛に局在する分子として EHBP1L1 を新たに見出し、その発現抑制により一次繊毛が長くなるという現象を明らかにし、一次繊毛の長さ制御に関する分子機構について明らかにした。これは EHBP1L1 に結合する CD2AP や CIN85 を介したアクチンネットワークの制御によるものであることを見出した。多繊毛形成においても、頂端側でのアクチンネットワーク形成は重要であり、一次繊毛から多繊毛形成にシフトする制御の解明が今後の課題である。

細胞外環境に関して、インビトロ卵管上皮細胞の培養において、Air-Liquid-interface (ALI) 培養を行うが、その培養基質としてコラーゲン (type1-4)、ラミニン、フィブロネクチン、ゼラチン、マトリジェルなどの種類をいくつか検討したところ、繊毛細胞分化の促進が強まるものがあることがわかってきた。その検証と最良条件の検討、分子メカニズムについて追求している。

また、エストロゲン様効果を示すと言われるイソフラボンが及ぼす線毛上皮細胞分化への影響を調べた。Genistein (ゲニステイン)、Daidzein (ダイゼイン)、Coumestrol (クメストロール) は、ERbeta を活性化することが示された。これは、ERbeta アンタゴニスト PHTPP によって阻害されることから、上記イソフラボンが ERbeta 経路に作用した結果であることが示された (図)。



代謝成分の解析に関して、質量分析装置を用い、卵管上皮細胞の代謝解析を行なった。エストロゲン投与により繊毛上皮細胞形成を誘導した細胞を分析したところ、いくつかの成分の違いを見出した。これは、繊毛細胞分化における ER beta の重要性をさらに確認づけるとともに、卵管ホメオスタシス維持のための栄養補助剤としての効能を示唆する点において意義がある。見出された成分のうち、エストロゲン投与によりメチオニン経路に属する分子群が複数検出された (未発表)。近年、エストロゲン経路とホモシステイン (メチオニン経路の主要な代謝産物の一つ)との関連が研究されており、卵管でも同様のメカニズムが働いていることを示唆している。また、メチオニン経路は遺伝子やタンパク質のメチル化のメチル基を生み出す経路であり、間接的にさまざま遺伝子発現に対するエピジェネティック制御に影響を及ぼしていることが推測される。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maobi Zhu, Sen Takeda and Tomohiko Iwano	4. 巻 26
2. 論文標題 Natural Herbal Estrogen-Mimetics (Phytoestrogens) Promote the Differentiation of Fallopian Tube Epithelium into Multi-Ciliated Cells via Estrogen Receptor Beta	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 molecules	6. 最初と最後の頁 722-729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26030722	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iwano Tomohiko, Sobajima Tomoaki, Takeda Sen, Harada Akihiro, Yoshimura Shin-ichiro	4. 巻 299
2. 論文標題 The Rab GTPase-binding protein EHBP1L1 and its interactors CD2AP/CIN85 negatively regulate the length of primary cilia via actin remodeling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102985 - 102985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.102985	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩野智彦、朱茂碧、竹田扇
2. 発表標題 植物エストロゲンはエストロゲン受容体ベータを介して卵管上皮繊毛細胞分化を促す
3. 学会等名 日本解剖学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------