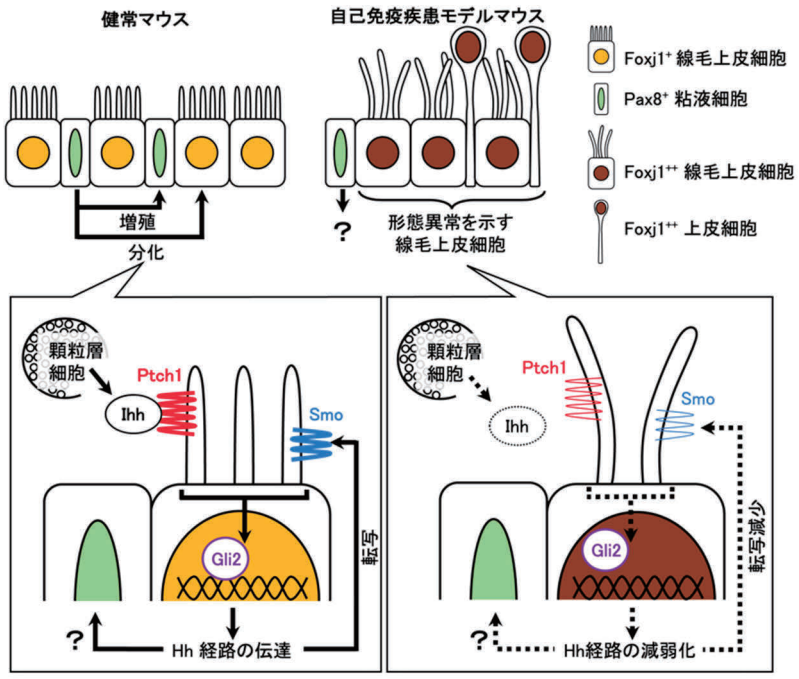
219　自己免疫疾患に因る卵管ピックアップ障害の分子病態	齋藤(細谷) 実里奈

【目的】雌性生殖器は各々が特有の生殖機能を司り、その機能異常が不妊症に直結する。例えば卵管の卵巣側末端・卵管ロートは、排卵胚を卵管内へ誘導するピックアップ機能を担い、その機能異常・ピックアップ障害は卵管性不妊症の一因となる。しかしその詳細な病態発生機序は不明である。一方我々は、自己免疫疾患モデルマウス MRL/MpJ-*Fas*$^{lpr/lpr}$（MRL/lpr）がピックアップ障害を呈し、その病態には卵管の炎症および線毛上皮の恒常性の破綻が関与することを明らかにした。さらに、卵管ロートのトランスクリプトミクス解析の結果、MRL/lpr の卵管ロートでヘッジホッグシグナル伝達経路（Hh 経路）の減弱化がみられることを発見した。本研究では、MRL/lpr の卵管の分子形態学的解析を通し、卵管ロートの形態機能制御における Hh 経路の役割と、その免疫異常との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】若齢（3 ヶ月齢）および加齢（6 ヶ月齢）のマウスを使用した。健常系統として C57BL/6N（B6）、卵管ロートの形態異常を呈する自己免疫疾患モデルマウス MRL/lpr およびその野生型 MRL/MpJ（MRL/+）を使用した。卵管ロートを採取し、免疫組織化学、遺伝子発現解析および *in situ* hybridization で Hh 経路の中枢分子である Ptch1、Smo、Gli1／2／3 およびリガンド（Shh、Dhh、Ihh）の局在・発現を解析した。加えて、卵管上皮の恒常性を制御する Pax8 と線毛形成を制御する Foxj1 の局在・発現も解析し、Hh 経路関連分子の発現量との相関性を解析した。

【結果】全個体で卵管ロートの線毛上に Ptch1、Smo および Gli2 が局在した。加齢 B6 および MRL/+では若齢と比べ、Hh 経路関連分子の発現が低下する傾向にあった。加齢 MRL/lpr の卵管ロートでは、若齢および他系統と比べ、*Ptch1*、*Smo* および *Gli1* の発現が顕著に低く、*Gli2* の発現が顕著に高かった。加齢 MRL/lpr の卵管ロートでは、若齢および他系統と比べ *Pax8* の発現が顕著に低く、*Foxj1* の発現が顕著に高かった。卵管ロートにおいて、若齢の全系統で *Ptch1*、*Smo* および *Gli2* と *Pax8* および *Foxj1* の発現量が正に相関した。一方、*Shh*、*Dhh* および *Ihh* は卵管ロート上皮では検出されず、卵巣の顆粒層細胞で *Ihh* の発現が検出された。以上、マウスの卵管ロートの線毛が Hh 経路を介したシグナル伝達を担い、全身自己免疫異常が Hh 経路の減弱化を通して線毛上皮の恒常性に影響を与える可能性が示唆された。

健常マウスと自己免疫疾患モデルマウスにおける卵管ロートの Hh 経路の発現



219. 自己免疫疾患に因る卵管ピックアップ障害の分子病態

齋藤（細谷）　実里奈

*酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 獣医解剖学ユニット

Key words：自己免疫疾患，上皮恒常性，線毛上皮細胞，ヘッジホッグシグナル伝達経路，卵管

緒　言

雌性生殖器は各々が特有の生殖機能を司り、その機能異常が不妊症に直結する。例えば卵管の卵巣側末端・卵管ロートは、排卵卵子を卵管内へ誘導するピックアップ機能を担い、その機能異常・ピックアップ障害は卵管性不妊症の一因となる。しかしその詳細な病態発生機序は不明である。哺乳類の卵管は卵巣側から卵管ロート、膨大部、および峡部に区分され、その上皮は線毛上皮細胞と粘液細胞から構成される。線毛上皮細胞と粘液細胞の占める割合は性周期や卵管部位によって変動し、卵管ロートでは線毛上皮細胞が上皮を覆う割合が高い。これは、卵管ロートの担うピックアップ機能において線毛機能の役割が重要であることを反映している。実際に我々は、自己免疫疾患モデルマウス MRL/MpJ-*Fas*$^{lpr/lpr}$（MRL/lpr）において、顕著な卵管炎に伴って卵管ロートの線毛上皮細胞数の減少や線毛の伸長がピックアップ機能を低下させることを明らかにした［1］。このほか、卵管上皮は炎症や喫煙、性ホルモンの変動によって形態が変化するのに加え、排卵時には炎症性因子を含む卵胞液に曝されることで上皮形態が障害される。しかし、これらの影響を受けた卵管ロート上皮の組織形態の恒常性を維持する分子機序の全貌は未だ明らかではない。

一般的に成体上皮は、上皮幹細胞の増殖・分化によって恒常性を維持している。上皮幹細胞の活性を制御するシグナル伝達経路には Wnt／β カテニンシグナル伝達経路、Notch シグナル伝達経路やヘッジホッグシグナル伝達経路（Hh 経路）などがよく知られる。卵管上皮においては、粘液細胞が上皮幹細胞として機能し、自己増殖ならびに線毛上皮細胞へと分化することが報告されている。卵管上皮の恒常性維持においては、Wnt／β カテニンシグナル伝達経路と Notch シグナル伝達経路の関与が報告されているが、Hh 経路の重要性について調査した報告はない。一方我々は、卵管ロートのトランスクリプトミクス解析の結果、卵管上皮形態異常を呈する MRL/lpr の卵管ロートで Hh 経路の減弱化がみられることを発見した。そこで本研究では、MRL/lpr の卵管ロートにおける分子形態学的解析を通し、卵管ロート上皮の恒常性維持における Hh 経路の役割を明らかにすること、およびその免疫異常との関連を考察することを目的とした［2］。

方　法

1. 実験動物

動物実験は酪農学園大学動物実験委員会の定める酪農学園大学動物実験指針に基づいて行った（承認番号：VH19A6、VH21A1）。3 ヶ月齢（若齢）および 6 ヶ月齢（加齢）の C57BL/6N（B6）、MRL/MpJ（MRL/+）、および MRL/lpr　マウスを使用した。すべてのマウスは三種混合麻酔による深麻酔下での頚椎脱臼によって安楽死させた。

2. 免疫組織化学・免疫蛍光法

安楽死させたマウスから雌性生殖器を採取し、4%パラホルムアルデヒド液で固定し、常法に従って組織切片を作製し免疫組織化学および免疫蛍光法に用いた。

*現在の所属：The University of Texas Medical Branch, Department of Otolaryngology

3. 遺伝子発現解析

安楽死させたマウスから卵管を採取し、用手で卵管膨大部・峡部（Proximal 部）と卵管ロート（Distal 部）に分離し、それぞれバイオマッシャーを使用して組織を破砕した。NucleoSpin® RNA Plus kit を使用し Total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を使用し cDNA を合成した。合成した cDNA を使用し THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix および特異的プライマーを用いて定量 real-time PCR を行った。

4. *In situ* hybridization

RNAscope® 2.5 HD Detection Regent-Brown kit を使用し、卵巣および卵管における *Shh*、*Dhh*、*Ihh* の mRNA 局在を検出した。

結果および考察

1. 卵管における Pax8 および Foxj1 の局在・発現

卵管上皮の粘液細胞に発現し、卵管上皮幹細胞のマーカーである Pax8 および線毛上皮細胞に発現し線毛形成因子である Foxj1 の局在を免疫組織化学で明らかにした。両月齢の B6、MRL/+および若齢の MRL/lpr の卵管ロートにおいて Pax8 は粘液細胞の核に局在したが、加齢の MRL/lpr ではほとんど局在がみられなかった（図 1）。Foxj1 は線毛上皮細胞の核に局在したが、加齢の MRL/lpr では上皮から脱落した非線毛上皮細胞の核にも発現した（図 1）。

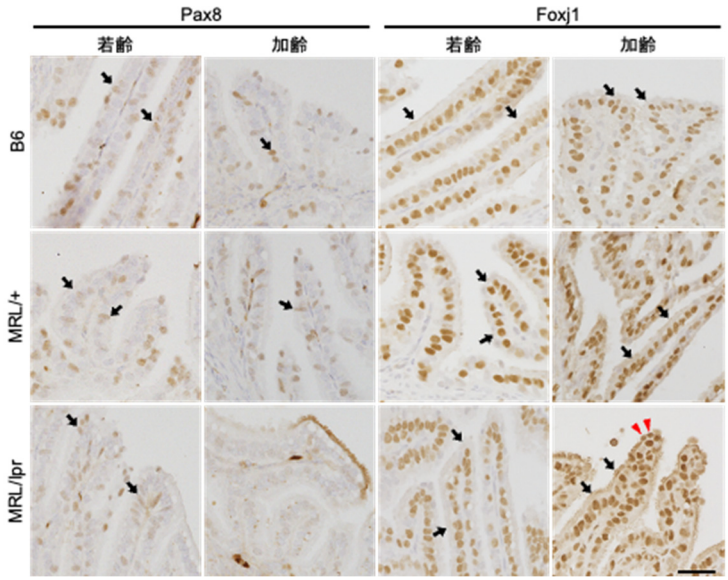


図 1. 卵管ロートにおける Pax8 および Foxj1 の局在

黒矢印：免疫反応陽性細胞、赤矢頭：上皮から脱落した非線毛上皮細胞、B6：C57BL/6N、MRL/+：MRL/MpJ、MRL/lpr：MRL/MpJ-*Fas* $^{lpr/lpr}$、スケールバー：25 μm。

Pax8 および *Foxj1* の卵管内発現量を定量 PCR で測定した結果、全系統・両月齢で *Pax8* の発現は卵管の Proximal 部と比較して Distal 部で低い傾向にあり、加齢 MRL/lpr では Proximal および Distal の両部位で他系統や若齢時と 比較して顕著な *Pax8* の発現低下がみられた（図 2a）。一方、全系統・両月齢で *Foxj1* の発現は卵管の Proximal 部と比較して Distal 部で顕著に高く、加齢 MRL/lpr では Proximal および Distal の両部位で他系統や若齢時と比較して顕著な *Foxj1* の発現上昇がみられた（図 2b）。

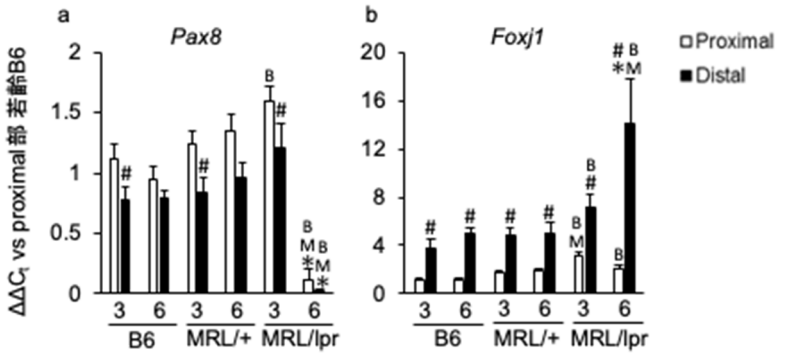


図 2. 卵管における *Pax8*（a）および *Foxj1*（b）の発現

*：同系統・同部位における月齢間の有意差（Student's t-test、$P<0.05$）、＃：同系統・同月齢におけるProximal・Distal部間の有意差（Student's t-test、$P<0.05$）、B・M：同月齢・同卵管部位におけるB6またはMRL/+との有意差（Tukey's test、$P<0.05$）。MRL/+：MRL/MpJ、MRL/lpr：MRL/MpJ-*Fas* $^{lpr/lpr}$。

以上の結果より、加齢MRL/lprでは卵管上皮の恒常性維持を担う分子の局在・発現が顕著に変化していることが示された。具体的には、Pax8の顕著な発現低下が卵管上皮の恒常性維持機構を障害し、Foxj1の過剰発現は、粘液細胞の線毛上皮細胞への分化が障害された結果と考えられる。加齢MRL/lprの卵管ロートでは、線毛上皮細胞数の減少、線毛の伸長・振動方向のばらつきがみられることが分かっており、この組織形態異常はPax8・Foxj1の局在・発現変化に起因すると考えられる。

2. 卵管における Hh 経路関連分子の局在・発現

続いて、卵管ロートにおける Hh 経路関連分子の局在を免疫組織化学で明らかにした。全マウスで Ptch1、Smo および Gli2 が線毛上皮細胞のもつ線毛上に局在した（図 3）。以上より、卵管上皮の線毛上皮細胞が Hh 経路関連分子を有していることが明らかとなった。気管上皮の線毛上皮細胞の線毛上にも Hh 経路関連分子が発現し、気道の傷害や炎症を感知することが報告されており［3］、一般的には一次線毛上に存在するとされてきた Hh 経路関連分子が、運動線毛（二次線毛）にも発現し、周囲環境のセンサーとして働くことが予想される。

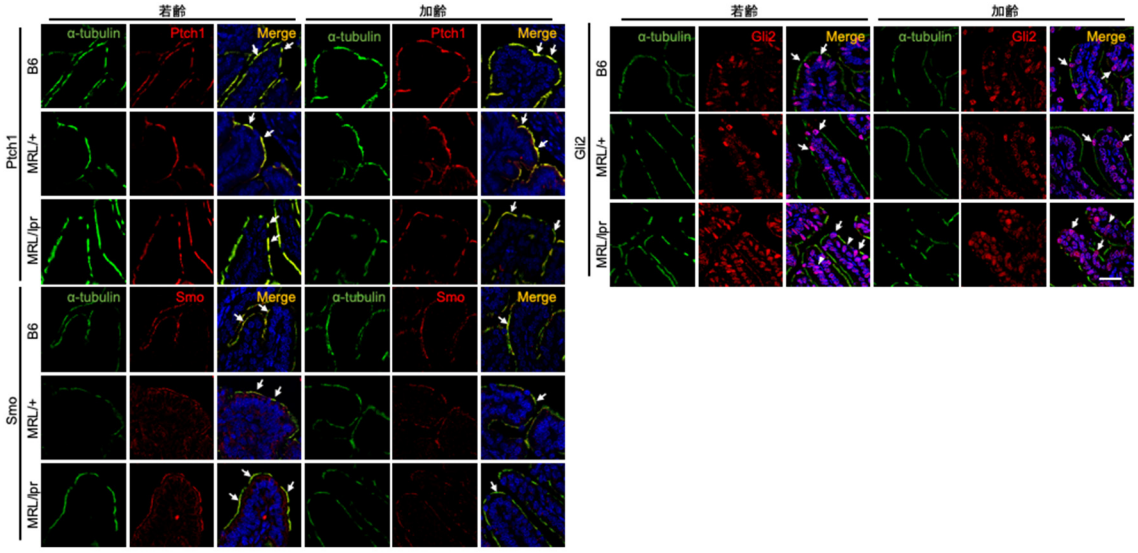


図 3. 卵管ロートにおける Hh 経路関連分子の局在

矢印：免疫反応陽性細胞、B6：C57BL/6N、MRL/+：MRL/MpJ、MRL/lpr：MRL/MpJ-*Fas* $^{lpr/lpr}$、スケールバー：25 μm。

定量 PCR の結果、卵管の Proximal 部および Distal 部の両部位で、他系統および若齢時と比較して加齢の MRL/lpr では *Ptch1*、*Smo* および *Gli1*／*3* の顕著な発現低下がみられた（図 3）。一方、他系統と比較して MRL/lpr では卵管の Proximal 部および Distal 部の両部位で *Gli2* の発現が高い傾向にあり、加齢 MRL/lpr の Distal 部では顕著に発現が上昇した（図 4）。以上から、加齢 MRL/lpr の卵管では Hh 経路関連分子の発現が顕著に変化し、シグナル伝達が減弱化していることが予想された。

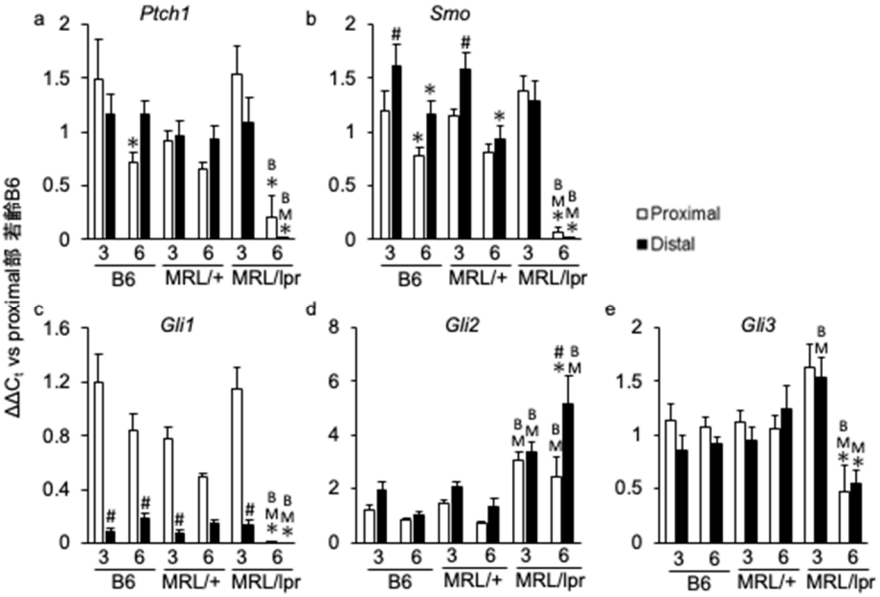


図 4. 卵管における Hh 経路関連分子 *Ptch1*（a）、*Smo*（b）、*Gli1-3*（c-e）の発現

*：同系統・同部位における月齢間の有意差（Student's t-test、$P<0.05$）、＃：同系統・同月齢における Proximal・Distal 部間の有意差（Student's t-test、$P<0.05$）、B・M：同月齢・同卵管部位における B6 または MRL/+ との有意差（Tukey's test、$P<0.05$）。MRL/+：MRL/MpJ、MRL/lpr：MRL/MpJ-*Fa s*$^{lpr/lpr}$。

一方、リガンドである *Shh*、*Dhh* および *Ihh* は卵管ロート上皮においてはほとんど発現せず、*Ihh* が卵巣の顆粒層細胞に強く発現したことから（図 5）、卵管の線毛上皮細胞は排卵時に放出された卵巣顆粒層細胞からの Ihh リガンドを受容している可能性が示唆された。

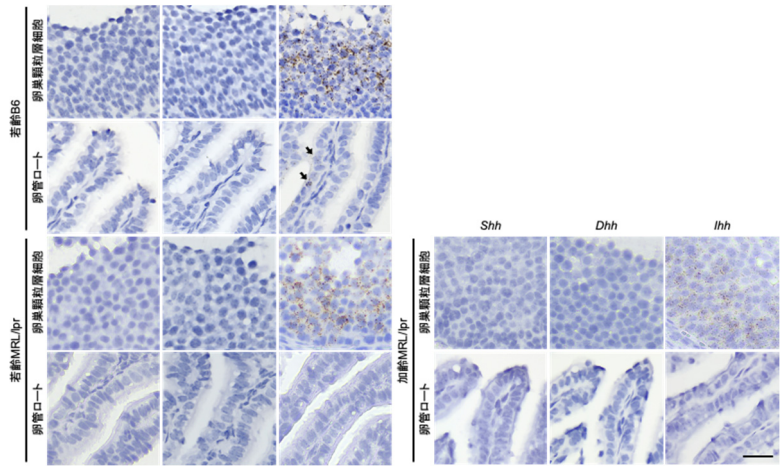


図 5. 卵巣顆粒層細胞および卵管ロートにおける *Shh*、*Dhh*、*Ihh* の局在

矢印：反応陽性卵管上皮細胞、B6：C57BL/6N、MRL/+：MRL/MpJ、MRL/lpr：MRL/MpJ-*Fas*$^{lpr/lpr}$、スケールバー：25 μm。

3. Hh 経路と卵管上皮恒常性維持の相関性

若齢マウスの卵管ロートにおける Hh 経路関連分子ならびに *Pax8・Foxj1* の発現量の相関解析の結果、*Ptch1* の発現量と *Smo・Gli2* の発現量が有意な正の相関を示した。加えて、*Ptch1・Smo・Gli2* の発現量が *Pax8・Foxj1* の発現量と有意な正の相関を示した（表 1）。以上より、卵管ロートにおいては Ptch1／Smo／Gli2 を介した Hh 経路伝達が存在し、その伝達が卵管上皮の恒常性維持機構に密接に関連することが示唆された。つまり加齢 MRL/lpr の卵管ロートでは、Hh 経路の減弱化が Pax8・Foxj1 の発現変化を通して線毛上皮の恒常性に影響を与える可能性が示唆された。Hh 経路の伝達変化は、自己免疫疾患において抗炎症作用を発揮し、組織の病理的変化を抑制することが知られている。加齢 MRL/lpr の卵管ロートにおける Hh 経路の減弱化は、顕著な卵管炎の発症と関連していることが予想される。

表 1. 卵管ロートにおける Hh 経路関連分子と Pax8・Foxj1 の発現量の相関

		Ptch1	*Pax8*	*Foxj1*
Ptch1	ρ	1	**0.63*** **	**0.62*** **
	P	-	**<0.0001**	**<0.0001**
Smo	ρ	**0.48*** **	**0.48*** **	**0.59*** **
	P	**0.0007**	**0.0007**	**<0.0001**
Gli1	ρ	0.19	0.13	0.23
	P	0.1981	0.3862	0.1226
Gli2	ρ	**0.43** **	**0.61*** **	**0.69*** **
	P	**0.0027**	**<0.0001**	**<0.0001**
Gli3	ρ	**-0.30***	-0.09	0.07
	P	**0.0431**	0.5554	0.6623

ρ ：Spearmanの相関係数。Spearman's correlation test、*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001。

以上、卵管ロートの線毛上皮の恒常性は、Wnt/βカテニンシグナル伝達経路、Notchシグナル伝達経路だけでなくHh経路によっても制御されると示唆された。MRL/lprの卵管ロートでは、自己免疫疾患に伴う顕著な卵管炎がHh経路を減弱化させ、線毛上皮の形態異常を招くと考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院獣医学院の昆泰寛教授、市居修准教授、中村鉄平准教授ならびに酪農学園大学食と健康学類の長谷川靖洋講師である。最後に、本研究の遂行にご支援を賜り、産前産後休暇取得に伴う研究期間の延長にもご対応下さりました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Hosotani M, Ichii O, Nakamura T, Kanazawa SO, Elewa YHA, Kon Y. Autoimmune abnormality affects ovulation and oocyte-pick-up in MRL/MpJ-*Fas*$^{lpr/lpr}$ mice. Lupus. 2018 Jan;27(1):82-94. PMID: 28566018. DOI: 10.1177/0961203317711772.

2) Hosotani M, Ichii O, Namba T, Masum MA, Nakamura T, Hasegawa Y, Watanabe T, Kon Y. Expression of Indian hedgehog signaling in murine oviductal infundibulum and its relationship with epithelial homeostasis. Cell Tissue Res. 2023 Mar;391(3):595-609. PMID: 36577879. DOI: 10.1007/s00441-022-03722-w.
3) Nordgren TM, Wyatt TA, Sweeter J, Bailey KL, Poole JA, Heires AJ, Sisson JH, Romberger DJ. Motile cilia harbor serum response factor as a mechanism of environment sensing and injury response in the airway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2014 May 1;306(9):L829-39. PMID: 24610937. DOI: 10.1152/ajplung.00364.2013.