

漢方薬由来化合物のヒト卵管上皮細胞の 繊毛動態へ与える影響の解析

申請代表者	岩野 智彦	山梨大学大学院総合研究部医学域解剖学講座細胞生物学教室	助教
所外共同研究者	竹田 扇	山梨大学大学院総合研究部医学域解剖学講座細胞生物学教室	教授
所外共同研究者	朱 茂碧	山梨大学大学院総合研究部医学域解剖学講座細胞生物学教室	大学院生
所内共同研究者	柴原 直利	臨床科学部門漢方診断学分野	教授

■背景・目的

妊娠初期段階である排卵・受精・受精卵成熟における生理機構の解明は、近年の不妊症や子宮外妊娠などの異常妊娠の病態解明、それを受けた治療の基盤となる研究である。

卵管は、卵巣で作られた卵を子宮へ運ぶ通路としての役割を果たすだけでなく、受精卵の発達や精子との受精環境を整える管腔臓器である。卵管内壁を構成する上皮細胞は多数の運動繊毛を有しており、その同期運動が管内の流動性を生み出している。その流動性が乱れると、卵巣から子宮方向への卵細胞の動きやホルモンの流動が不足し、受精効率の低下や子宮外妊娠、受精卵の成熟異常につながると考えられている。繊毛運動の重要性は古くから知られているが、外来因子による繊毛の運動調節機構の詳細は未だ明らかでない。

また、卵巣がんが卵管採の上皮細胞に由来し、ガン化した細胞が転移するのでないかと近年考えられており (Kurman and Shih, 2010)、その病態の原因究明は治療や予防の点において重要なテーマである。しかしながら、その発生機序に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発癌機構の究明にもつながる。

一方、卵管上皮と似た組織構造を持つ気管上皮では、鼻や口から入ってきた塵や細菌などが粘液に付着し、繊毛細胞の繊毛運動による去痰機能を持つ。ノックアウトマウス等を用いた解析から、気管上皮細胞の発生・分化機構は解明されつつあり、繊毛運動と疾患の関連も示されている (Danahay et al., 2015)。繊毛の運動は、繊毛の柱を構成する微小管の上をモータータンパク質であるダイニンが ATP の加水分解によるエネルギーを使って滑り運動を行うことで制御されている。実際に、気管上皮繊毛細胞の繊毛運動は ATP 依存性のカルシウム流入や cAMP の増加に影響を受けている (Hayashi et al., 2005; Komatani-Tamiya and Daikoku, 2012)。また、漢方去痰薬である龍角散 (株式会社龍角散) は、その機序は不明であるが粘液の分泌および繊毛運動の活性化を効能として謳っており、漢方薬と繊毛運動の間には何らかの関係があることが示唆される。そこで、気管繊毛と似た構造である卵管上皮の繊毛運動に漢方薬がどのような影響を与えるかを解析する事で漢方を不妊治療に役立てることを企図した。すでに、月経不順の改善や不妊症治療に際しては、当帰芍薬散 (TJ-23) や桂枝茯苓丸 (TJ-25) が既に処方され、その有効性が認められているところである (Imai, 2006)。それらがホルモン分泌に対する効果があることはラットを用いた薬理試験によって示されているが、女性生殖器に対して及ぼす直接的な作用とその機序は分かっていない。そこで本研究では、漢方薬成分が直接卵管細胞に作用して、卵管の恒常性維持に寄与しているのかどうか、またその分子機序を明らかにすることを目的とした。

本稿では、平成 28 年度に行った当帰芍薬散・桂枝茯苓丸の初代培養卵管上皮細胞への影響を調べた研究成果を報告する。

■方法

卵管上皮細胞の in vitro 培養

実験に使用したブタ卵管は食肉衛生検査所から購入した。卵管壁を構成する上皮細胞はスクレイパーで筋層と分離し、100U/mL collagenase type IV, 10 μ g/mL DNase I を 37°C 中 1 時間処理後、collagen type I コート済プラスチックプレート上にて培養した。増殖培地 (DMEM; Ham's F-12, 1% GlutaMax, 2% B27 supplement, 10ng/mL hEGF, 1mM nicotinamide, 0.5 μ M SB431542, 5 μ M Y27632, 100ng/mL hFGF10, 100ng/mL hNoggin, 50ng/mL hWnt3a, 125ng/mL R-spondin, ペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシン B) 中にて幹細胞を含む卵管上皮細胞を 2~5 日間増殖させた。1x10⁵ 個の細胞を 24-well Transwell に播種し、2 日後に頂端側の培地を除き、基底側には基礎培地 (DMEM; Ham's F-12, 1% GlutaMax, 2% B27 supplement, 10ng/mL hEGF, 1mM nicotinamide, 0.5 μ M SB431542) を用いた。上皮細胞の分化成熟を促すために、Air-Liquid interface (ALI) 培養を 10~15 日間行った。

漢方薬抽出液の調製

漢方診断学分野の柴原直利教授により、100g の生薬 (株式会社栃本天海堂) より抽出・精製された抽出液が供与された。収率は、桂枝茯苓丸 8.697%、当帰芍薬散 14.795% であった。増殖培地および ALI 培養の基底側の培地に 100~500ng/mL の濃度で投与した。

免疫染色

4%PFA で固定されたブタ卵管凍結切片および初代細胞に対して、0.1% TritonX-100 による膜透過処理後、5%Normal goat serum によるブロッキング処理を行った。免疫染色の一次抗体として、マウスモノクローナル anti-acetylated alpha tubulin (Sigma, 1:1000), ウサギポリクローナル anti-p73 (Abcam, 1:100), anti-Ki67 (Novacosta, 1:200) を用いた。二次抗体として Alexa488 anti-mouse IgG および Alexa568 anti-rabbit IgG (Thermo) を用いた。核は 1 μ g/ml DAPI (Dako) で染色した。

ハイスピードカメラを用いた繊毛運動解析

Olympus microscope に接続されたハイスピードカメラ (Allied Vision Prosilica GE680) を用いて、トランスウェル上の初代培養卵管細胞の繊毛運動を撮影した (175fps)。取得した動画は TI workbench (早稲田大学井上貴文先生開発) を用いて解析した。

尚、研究計画ではブタおよびヒトの卵管を用いる予定であったが、ヒトの卵管は実験に十分に量が得られなかったため、漢方薬投与実験には使用しなかった。

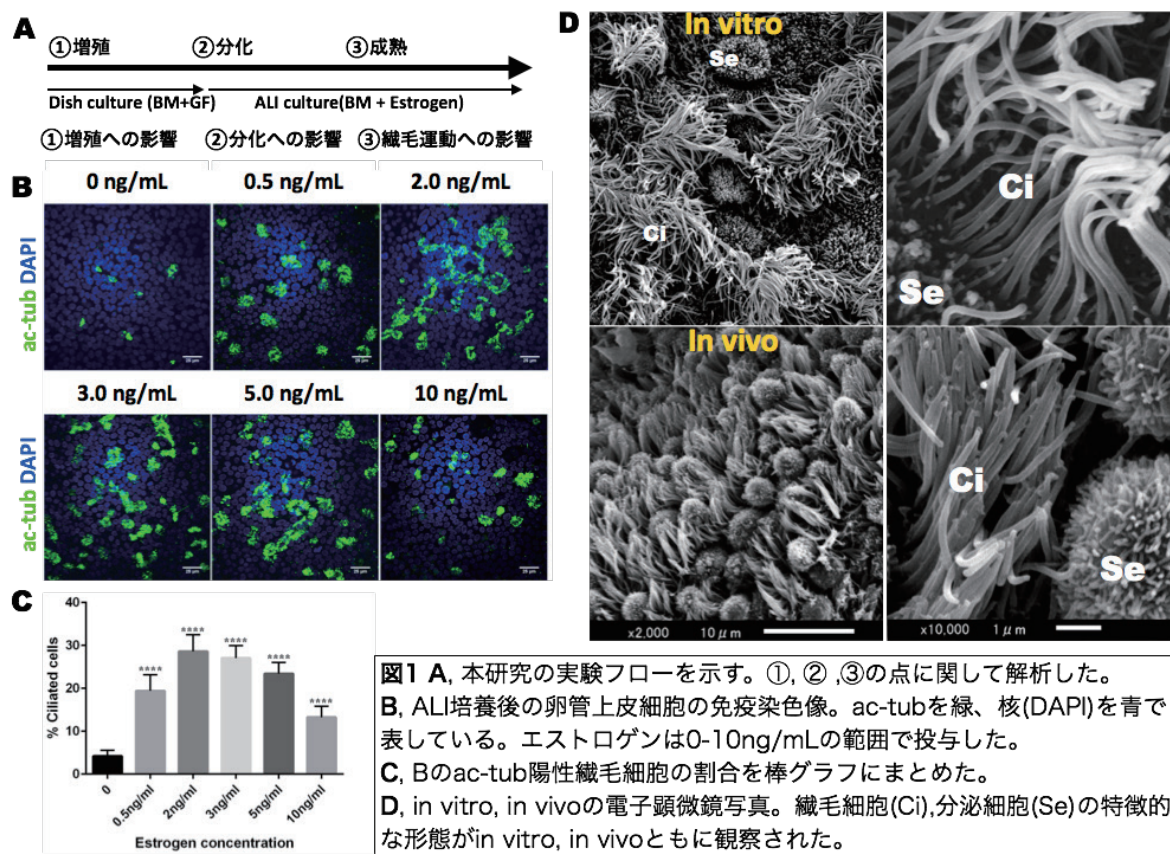
■結果

我々は in vitro での卵管上皮培養法を確立し、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詳細に解析した。卵管上皮細胞の初代培養において成熟する過程を、増殖・分化・繊毛運動の 3 つの段階に分け、それぞれに対して漢方薬抽出液がどのように影響するかを調べた (図 1A)。

(1) 初代培養卵管上皮の分化とその構造

まず、ブタから単離した卵管上皮細胞が in vitro で生体内のように成熟し、繊毛細胞や分泌細胞に分化できるかどうかを検討した。エストロゲンは卵胞ホルモンと呼ばれ、卵胞の成熟や子宮内膜の形成を促す効果があり、動物個体での繊毛細胞の産生誘導に関わることが報告されている (Anderson and Hein, 1976; Nayak et al., 1976)。そこで、ALI 培養において基礎培地にエストロ

図 1



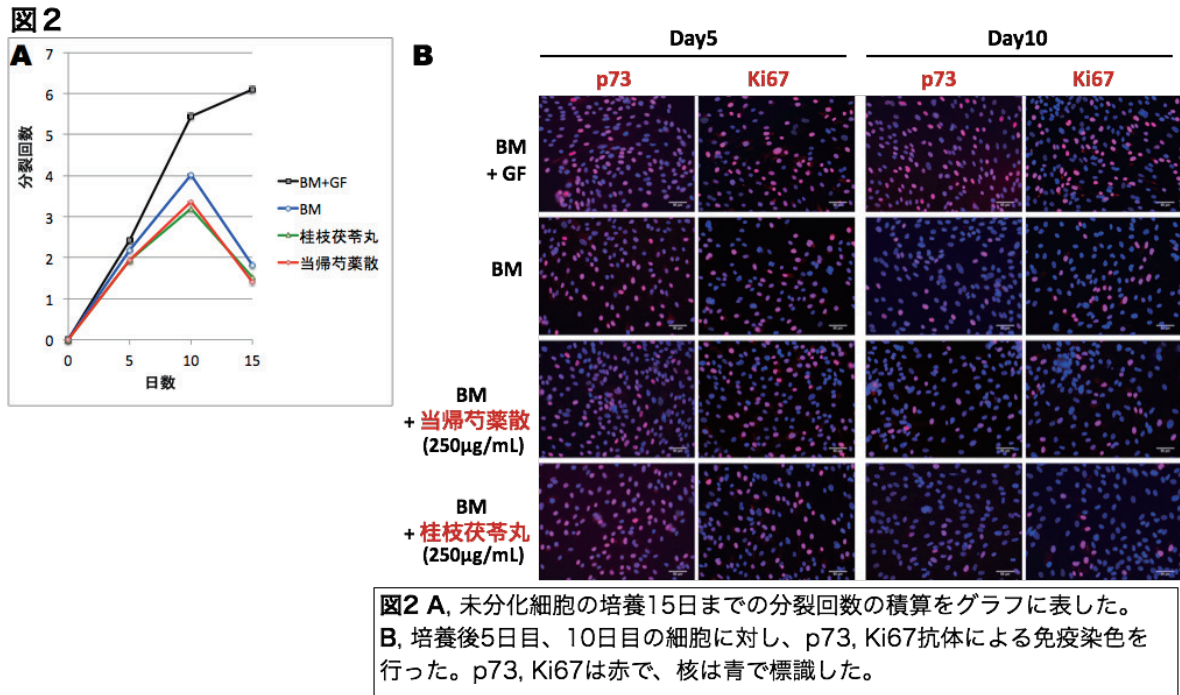
ゲン (0.5-10ng/mL) を添加し、初代卵管細胞から繊毛細胞の分化誘導効率を調べた。ALI 培養 15 日後アセチル化チューブリン (ac-tub) 陽性の繊毛細胞の割合を計ると、2ng/mL の時に最大となり約 25% の細胞が繊毛細胞へ分化したことが分かった (図 1B,C)。

さらに、組織構造に関して、初代培養卵管上皮が in vivo の卵管上皮を再現しているかどうかを、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて調べた。2000 倍および 10000 倍の倍率で観察すると、初代培養細胞でも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 (図 1D)。これらの結果は、初代培養卵管上皮細胞は細胞運命決定とその組織構築が生体内を再現していることを示しており、この初代培養条件下で漢方薬抽出液の卵管上皮細胞への効果について実験を行った。

(2) 卵管上皮幹細胞の増殖への影響

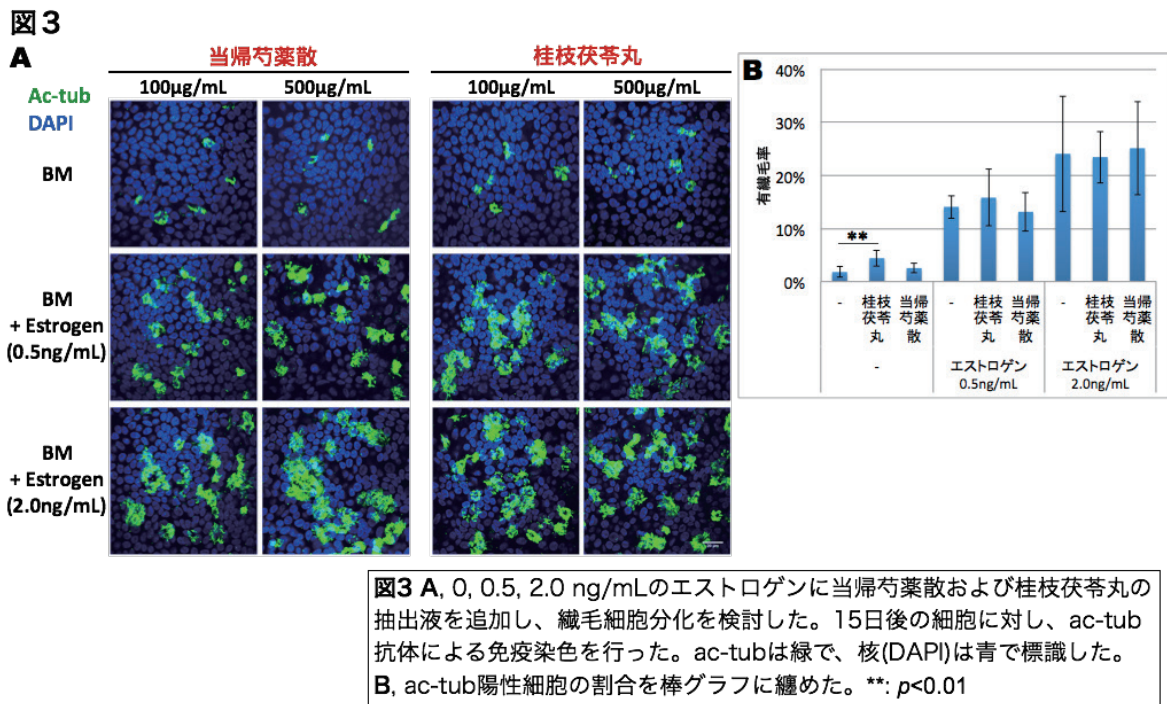
卵管上皮に含まれる幹細胞・前駆細胞の増殖に対する漢方薬の効果を調べた。未分化細胞をコラーゲン Type I コートしたディッシュに播種し、培養 5 日ごとの細胞数から分裂回数を計算した ($y = \log_2(5 \text{ 日後の細胞数} / \text{播いた細胞数})$)。また、培養開始から 5 日後と 10 日後の細胞での増殖マーカー p73 と Ki67 の発現を観察した。ポジティブコントロール (BM+GF) では 10 日以降でも細胞分裂を持続していたが、成長因子 (hFGF10, Noggin, hWnt3a, R-Spondin) の代わりに当帰芍薬散・桂枝茯苓丸 (250μg/mL) を添加した培地では細胞増殖が継続せず、ネガティブコントロール (BM) と有意な差はなかった (図 2A)。増殖マーカーの発現も増殖回数に相関しており、培養 5 日後では p73, Ki67 の発現する細胞の数は BM, BM+GF, BM+ 当帰芍薬散, BM+ 桂枝茯苓丸での培養間で差は観察されなかったが、培養 10 日後では BM, BM+ 当帰芍薬散, BM+ 桂枝茯苓丸

での培養においてマーカー発現細胞数が低下していた (図 2B)。



(3) 卵管上皮幹細胞から繊毛細胞分化への影響 (図 3)

繊毛細胞分化への影響を調べために、ALI培養の開始と同時に漢方薬抽出液を基底側の培地に添加し、培養15日後 ac-tub 陽性の細胞の割合を計数した。まず、漢方薬抽出液がエストロゲンの様に働き、繊毛細胞の分化を誘導できるかを調べた。エストロゲン無添加の培地に桂枝茯苓丸抽出液を加えた場合には、ネガティブコントロール (-) と比べて誘導率に僅かに差が見られたが、当帰芍薬散では差はなかった (図 3A, B)。次に、通常濃度 (2ng/mL) のエストロゲンで誘導される繊毛細胞分化に対する漢方薬の促進効果を検討した。桂枝茯苓丸、当帰芍薬散の投与は

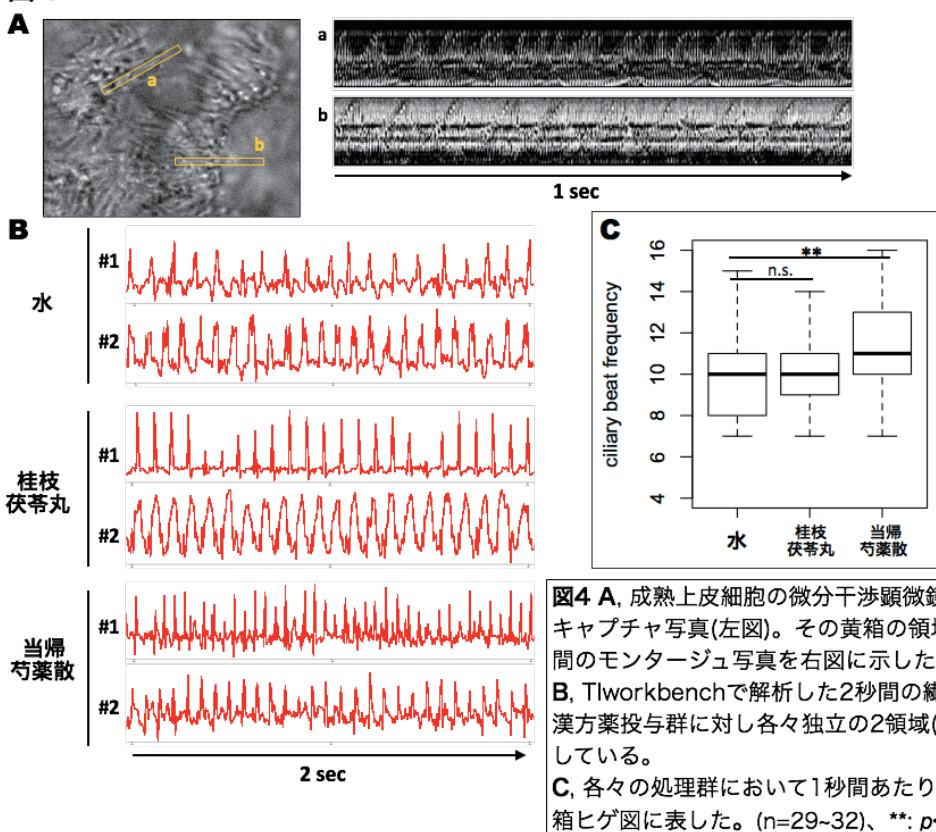


コントロール培地 (エストロゲン 2ng/mL; -) での培養と有意な差はなく、約 25% の細胞で繊毛を形成していた (図 3A、B)。更に、低濃度のエストロゲン (0.5ng/mL) 存在下における漢方薬の補助的効果を検討した。この場合もコントロール培地 (エストロゲン 0.5ng/mL; -) での培養と同等の約 15% の割合で繊毛細胞分化が観察された (図 3A、B)。

(4) 卵管上皮繊毛細胞の動繊毛の運動への影響 (図 4)

エストロゲン 2ng/mL を含む培地で 30 日間 ALI 培養し、卵管上皮細胞を成熟させた。その細胞に対して 500 μ g/ml の漢方薬抽出液を基底側の基礎培地に加え、24 時間後にハイスピードカメラを用いて繊毛細胞の繊毛運動を撮影した (図 4A)。繊毛の鞭打ち運動の周期は TIworkbench ソフトウェアを用いて解析した (図 4B)。その結果、ネガティブコントロールでは、一秒間に約 9.8 回の鞭打ち運動を行っていたが、当帰芍薬散を加えた場合にはそれが約 11.7 回になり有意に増加していた。一方、桂枝茯苓丸の場合には約 10.2 回で、それはネガティブコントロールと有意な差ではなかった (図 4B、C)。

図 4



■ 結論・考察

平成 28 年度の本研究では、卵管上皮細胞の invitro 培養システムを利用し、不妊治療にすでに使われている当帰芍薬散・桂枝茯苓丸の卵管上皮細胞に対する直接の効果について検討した。

- (1) ブタの卵管から分離した初代上皮細胞の培養とエストロゲン依存的な繊毛細胞の分化誘導に成功した。
- (2) 卵管上皮幹細胞の増殖に対して、その増殖を促進する効果は見られなかった。幹細胞の異常増殖はガン化につながる可能性があるが、両漢方薬はその点に対する影響は低いと考えられる。
- (3) ALI 培養での繊毛細胞分化に対しては、当帰芍薬散・桂枝茯苓丸はともにエストロゲンに匹敵する

ほどの誘導効果は見られなかった。漢方薬のエストロゲン様の効果という点において、人参や大豆は phytoestrogen(外因性エストロゲン) として知られている (Kim, 2008; Punnonen and Lukola, 1980)。従って、人参や大豆が繊毛細胞分化を促進するかという点に関して、我々の実験系を用いて解析することができると考えられる。(4) 成熟後の繊毛細胞の繊毛運動に関して調べると、当帰芍薬散の投与した場合に繊毛鞭打ち運動が有意に促進していたが、桂枝茯苓丸にはその様な効果が見られなかった。この結果から、当帰芍薬散は繊毛細胞の繊毛運動を活性化する作用を持つことが示唆された。繊毛は ATP 加水分解のエネルギーを利用したダイニンの滑り運動で制御されており、実際に気管の繊毛は ATP 投与によってその鞭打ち運動が促進されることが報告されている (Hayashi et al., 2005)。従って、当帰芍薬散の投与によって、繊毛への ATP の流入やダイニンの活動性について今後調べる必要がある。また、当帰芍薬散中のどの様な成分がその活性化に関わるのかという点についても解析したい。

■参考文献

1. Anderson, R. G. and Hein, C. E. (1976). Estrogen dependent ciliogenesis in the chick oviduct. *Cell Tissue Res.* 171, 459-66.
2. Danahay, H., Pessotti, A. D., Coote, J., Montgomery, B. E., Xia, D., Wilson, A., Yang, H., Wang, Z., Bevan, L., Thomas, C., et al. (2015). Notch2 is required for inflammatory cytokine-driven goblet cell metaplasia in the lung. *Cell Rep.* 10, 239-252.
3. Hayashi, T., Kawakami, M., Sasaki, S., Katsumata, T., Mori, H., Yoshida, H. and Nakahari, T. (2005). ATP regulation of ciliary beat frequency in rat tracheal and distal airway epithelium. *Exp. Physiol.* 90, 535-544.
4. Imai, A. (2006). Commonly used herbalmedicines in the treatment for female reproductive dysfunction. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 6, 1-11.
5. Kim, J. (2008). Protective effects of Asian dietary items on cancers-soy and ginseng. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 9, 543-8.
6. Komatani-Tamiya, N. and Daikoku, E. (2012). Cellular Physiology and Biochemistry Biochemistry Procatenol-stimulated Increases in Ciliary Bend Amplitude and Ciliary Beat Frequency in Mouse Bronchioles. 511-522.
7. Kurman, R. J. and Shih, I.-M. (2010). The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 433-43.
8. Nayak, R. K., Zimmerman, D. R. and Albert, E. N. (1976). Electron microscopic studie of estrogen-induced ciliogenesis and secretion in uterine tube of the gilt. *Am. J. Vet. Res.* 37, 189-97.
9. Punnonen, R. and Lukola, A. (1980). Oestrogen-like effect of ginseng. *Br. Med. J.* 281, 1110.