

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	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	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	大学院生
所内共同研究者	柴原直利	臨床科学研究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、卵巢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、卵巢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、卵巢がんが卵管采の上皮細胞に由来し、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。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, T., et al., 2005, *Exp. Physiol.*)。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。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。

■結果・考察

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。1x10⁵個の細胞は、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。ATPナトリウム塩(A6419-1G)はSigmaから購入した。

漢方薬抽出液の調製

漢方方剤の生薬分量により構成される100gの生薬(株式会社栃本天海堂)に水道水500mLを加え、煎じ器「ニューマイコン漢方煎じ器文火楽々」(EK-SA10型,350w)にて火力中で50分間煎じた。得られた煎じ液をガーゼ(テトラゼNo.2, 白十字)に通し、凍結真空乾燥法(EYELA,FDU-2200)により抽出粉末を作成した。収率は、桂枝茯苓丸8.697%、当帰芍薬散14.795%であった。

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アセチル化チューブリン(ac-tub)抗体 (Sigma, 1:1000)を用いた。二次抗体としてAlexa488 anti-mouse 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(Inoue, T. et al., 2018, *Microscopy*)。

PESI-MS(probe electrospray ionization mass spectrometry)を用いたメタボローム解析

6-wellディッシュに培養した卵管上皮細胞を、水または当帰芍薬散(500 μ g/mL)を含む培地で24時間培養を行った。その後細胞をスクレーパーで1.5mLチューブに回収し、PBSで洗浄後、遠心分離にて細胞ペレットにした。細胞ペレットは、50%エタノール200 μ L中でディスパーザブルペッスルにてホモジナイズした。ホモジネートは遠心分離機にて不溶画分と分離後、その上清をLCMS-2020(島津製作所)を用いてPESI-MS解析した(Yoshimura, K., 2011, *Anal. Biochem.*)。

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な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。

結果と考察

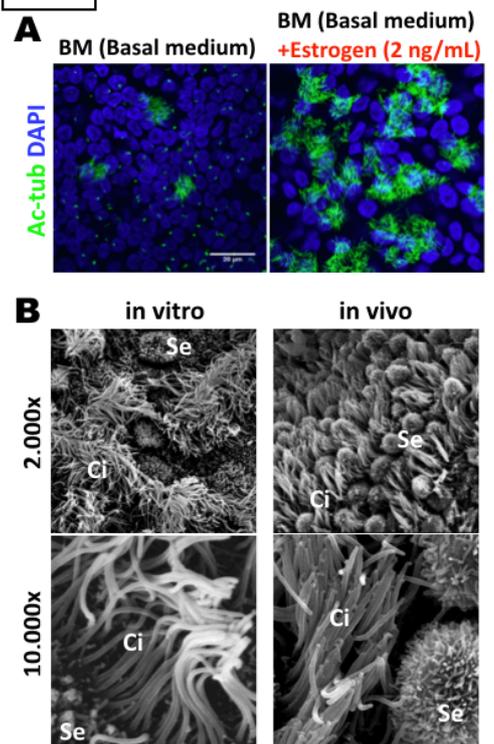
(1) 初代培養卵管上皮の分化とその構造

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(2ng/mL)を添加した基礎培地でALI培養を2週間程度行くと、ac-tub陽性の繊毛細胞が分化した(図1A)。走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて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(Ci)と短い微繊毛を持つ分泌細胞(Se)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1B)。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の繊毛運動性への効果について実験を行った。

(2) 卵管上皮繊毛細胞の動繊毛の運動への影響(図2)

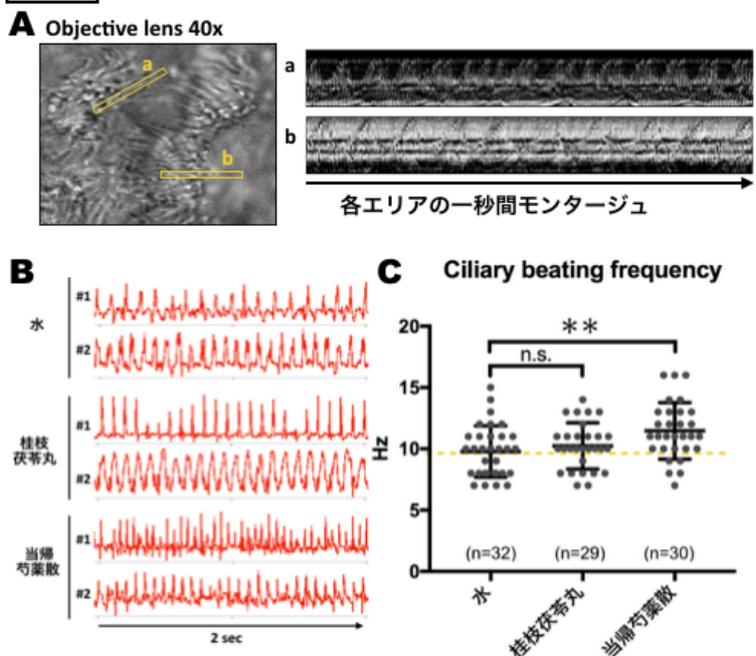
エストロゲン2ng/mLを含む培地で30日間ALI培養し、卵管上皮細胞を成熟させた。その細胞に対して500μg/mlの漢方薬抽出液を基底側の基礎培地に加え、24時間後にハイスピードカメラを用いて繊毛細胞の繊毛運動を撮影した(図2A)。繊毛打頻度(Ciliary Beating Frequency: CBF)はTIworkbenchソフトウェアを用いて解析した(図2B)。その結果、ネガティブコントロールとしての水を加えられた繊毛細胞は、一秒間に約9.8回の鞭打ち運動を行っていたが、当帰芍薬散を加えられた場合にはそれが約11.7回になり有意に増加していた。一方、桂枝茯苓丸の場合には約10.2回で、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2C)。したがって、繊毛運動の促進に関しては、桂枝茯苓丸よりも当帰芍薬散が効果的であることが示された。

図1



A, ALI培養後の卵管上皮細胞の免疫染色像。ac-tubを緑、核(DAPI)を青で表している。**B**, in vitro, in vivoの卵管上皮細胞の電子顕微鏡写真。繊毛細胞(Ci)、分泌細胞(Se)の特徴的な形態が、in vitro, in vivoともに観察された。

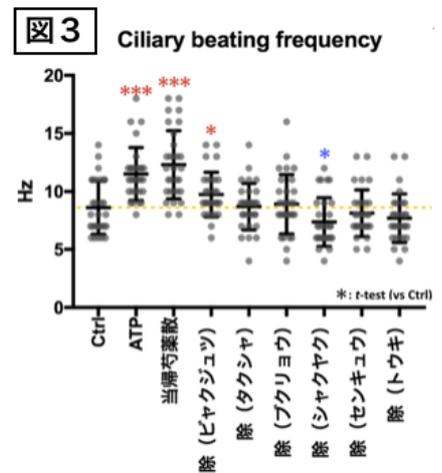
図2



A, 卵管上皮細胞の微分干渉顕微鏡で撮影した動画のキャプチャ写真(左)。その黄枠の領域(a,b)に対して、1秒間のモンタージュ写真を右に示した。**B**, TIworkbenchで解析した2秒間の繊毛運動を示した。漢方薬投与群に対し、各々代表的な2領域(#1,#2)の繊毛振幅を示した。**C**, 各々の処理において、1秒間あたりの繊毛打頻度(CBF)をScatter plotにて表した。**= $p < 0.01$

(3) 繊毛の運動性に影響を及ぼす当帰芍薬散中の生薬の探索 (図3)

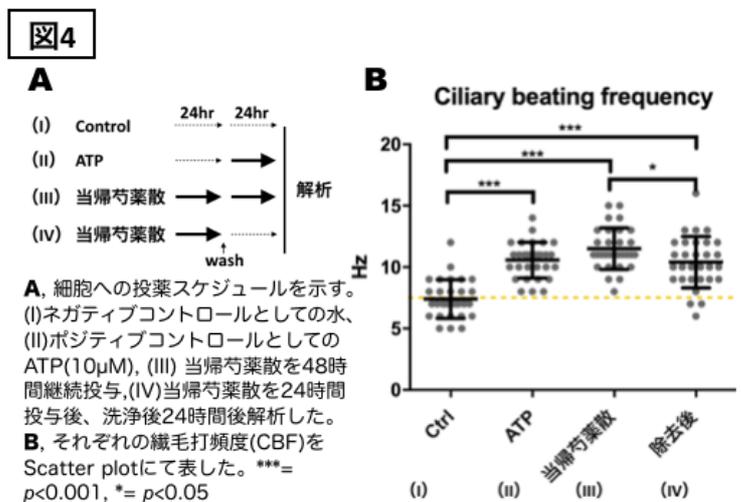
次に、当帰芍薬散に含まれるどの生薬が繊毛運動の促進に寄与しているかを調べるために、当帰芍薬散に含まれる6種類の生薬(ビャクジュツ・タクシヤ・ブクリヨウ・シヤクヤク・センキュウ・トウキ)のうち一つを除いた5種の混合抽出液の効果を検討した。その抽出液それぞれに対して(2)と同様の繊毛運動性解析を行った。すると、ビャクジュツを除いた場合にはわずかな運動促進効果は残っていたが、タクシヤ・ブクリヨウ・センキュウ・トウキを除いた場合にはネガティブコントロールと差がなかった。一方で、シヤクヤクを除いた場合には、ネガティブコントロールよりも運動性が低下した。つまり、当帰芍薬散は6種類の生薬の混合物である場合にのみ、繊毛運動促進に対して効果的であることが明らかとなった。



当帰芍薬散の生薬を1種類除去した抽出液を卵管上皮細胞に投与し、それぞれの繊毛打頻度(CBF)をScatter plotにて表した。***= $p < 0.001$, *= $p < 0.05$, 赤字は増加、青字は減少を意味する。

(4) 当帰芍薬散で誘導される繊毛運動促進の持続性 (図4)

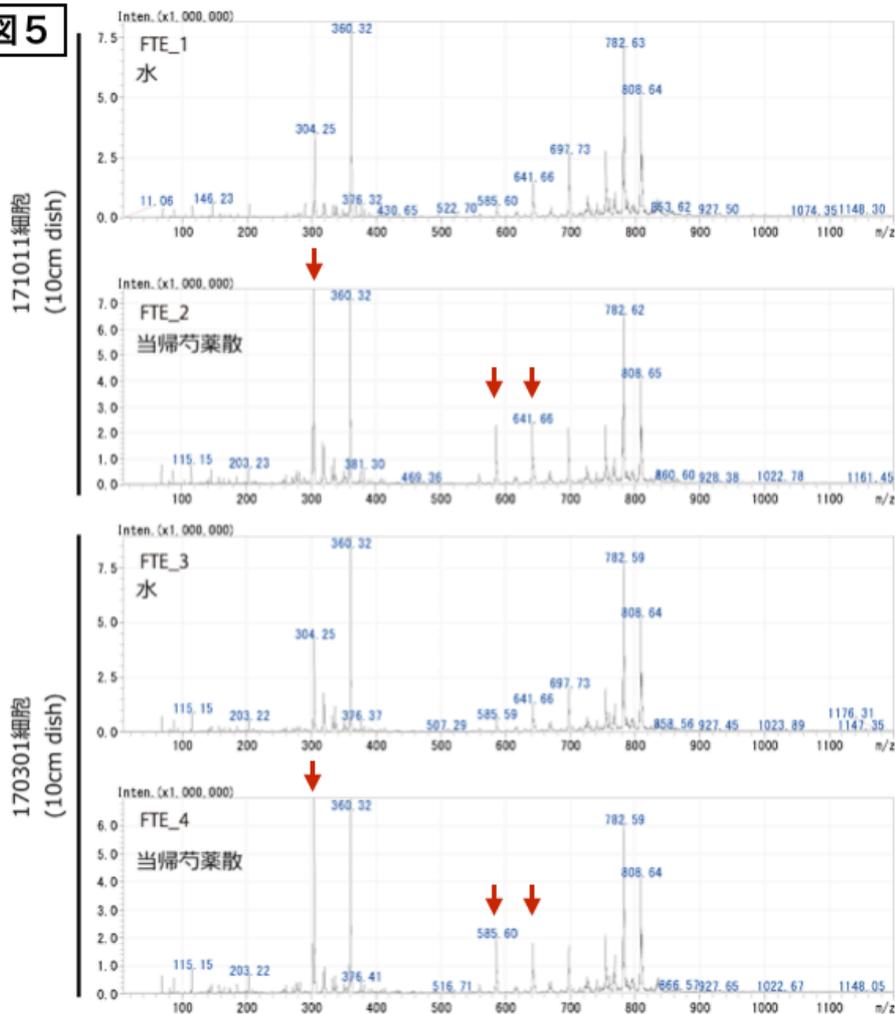
当帰芍薬散に含まれる6種類がどれも必要なことが分かったが、その効果が繊毛に対する一時的な効果か、細胞内の代謝変化によるものかという疑問が残った。それを明らかにするために、当帰芍薬散を投与して24時間後に洗浄を行い、さらにその24時間後でも繊毛運動性が持続するかどうかを検討した(図4A)。すると、当帰芍薬散の継続的な処理は、ポジティブコントロールとしてのATP(10 μ M)と同程度の繊毛運動促進を示し、さらに洗浄後24時間経た細胞でも促進効果が持続していた(図4B)。このことは、当帰芍薬散が繊毛に対して直接運動性を高める効果を及ぼすというよりは、むしろ細胞内のシグナル伝達や代謝変化を引き起こしたことを示唆している。



(5) 当帰芍薬散を添加された細胞のメタボローム解析 (図5)

当帰芍薬散が細胞内のどのような代謝変化を引き起こしているのかを調べるために、解剖学講座細胞生物学教室の吉村健太郎博士の協力の下、PESI-MSを用いて細胞のメタボローム解析を行った。採取日の異なる2種類のブタ初代培養細胞に対して水または当帰芍薬散(500 μ g/mL)を投与し、24時間後に細胞溶解液を調製した。ポジティブイオンモードでの測定結果から、2種類の独立したコントロール細胞はほぼ同様のピークパターンを示しており、異なるブタ個体からでも初代培養細胞はメタボロームに大きな差がないことがわかった。一方で、当帰芍薬散を投与された細胞は、コントロール細胞と異なるピークパターンを示し、特に $m/z=304.25$, 585.60 , 641.66 のイオン強度が増加していた。このことは、24時間の当帰芍薬散投与により、細胞内のメタボリズムに確かな変化が起こったことを示している。

図 5



水または当归芍薬散を投与した2種類 (171011、170301細胞) の卵管上皮細胞抽出液に対する質量分析を行った。ポジティブイオンモードで測定したm/z10-1200間での平均化スペクトルを示している。赤矢印は特に変化のあるピークを指している。

■ 結論

卵管上皮細胞のin vitro培養システムを利用し、不妊治療にすでに使われている漢方薬、当归芍薬散・桂枝茯苓丸、卵管上皮細胞に対する効果について検討したところ、当归芍薬散が繊毛運動に対して促進効果を持つことを明らかにした。その効果の持続性という点では、一時的に投与し洗浄後24時間経ても繊毛運動が促進され続けていることが分かった。次に、当归芍薬散中のどの生薬がその効果に決定的であるかを明らかにしようと試みたが、結果的に構成する6種類の生薬が一つでも欠けるとその効果が十分に発揮できないことがわかった。このことは生薬の混合物が協同的に細胞に作用し、細胞内の様々なシグナル伝達経路や細胞内代謝を変化させ、結果として繊毛運動の活性化に現れていることを示唆している。そこで我々は、網羅的に細胞内の代謝変化を調べるためにPESI-MSを用いてメタボローム解析を行った。実際に、当归芍薬散投与された細胞では、メタボリズムが明らかに変化していた。今回の実験結果で増加していたm/z=304.25, 585.60, 641.66の分子は、当归芍薬散そのものから抽出される主要な成分Paeoniflorin ([M+Na]⁺: m/z=503)など(Chen L., et al., 2009. *J. Pham. Biomed. Anal.*)には合致しないことを確認している。つまり、これらの分子は当归芍薬散の刺激により細胞内で生成されていると考えられるが、具体的な分子の同定には至らなかった。将来的に、分子代謝マップを具体的に明らかにすることで、繊毛運動の活性化メカニズムについて説明出来ると考えられる。