

博士論文

論文題目 マウスCD11c⁺樹状細胞の卵胞形成及び黄体形成・維持に
おける役割に関する研究

氏 名 永井 美和子

目次

目次	1
略語表	2
要旨	4
序文	5
性周期とホルモン変化	5
卵巣周期と骨髄由来細胞浸潤	5
卵巣内骨髄由来細胞の性周期に伴う量的経時的変化	6
卵巣内各種骨髄由来細胞の性周期に伴う変化	7
樹状細胞	7
卵胞発育・排卵・黄体形成と血管／リンパ管新生	8
研究目的	9
実験方法	10
結果	24
考察	31
謝辞	45
引用文献	46
図表	54

略語表

An: Antral follicle (成熟卵胞 (胞状卵胞))

ANG: Angiopoietin

APC: Antigen presenting cell (抗原提示細胞)

At: Atresia follicle (閉鎖卵胞)

BSA: Bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)

CL: Corpus Luteum (黄体)

DTx: Diphtheria toxin (ジフテリア毒素)

DTR: Diphtheria toxin receptor (ジフテリア毒素受容体)

E2: Estrogen (卵胞ホルモン)

EIA: Enzyme immunoassay (酵素免疫測定法)

FBS: Fetal bovine serum (ウシ胎児血清)

FSH: Follicle stimulating hormone (卵胞刺激ホルモン)

FGF: Fibroblast growth factor (線維芽細胞成長因子)

hCG: Human chorionic gonadotropin (ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン)

HIF1A :hypoxia-induced factor 1a (低酸素誘導因子)

IL: Interleukin

LH: Luteinizing hormone (黄体化ホルモン)

LYVE: Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (リンパ管内皮ヒアルロン酸受容体)

P1: Primordial follicle (原始卵胞)

P2: Primary follicle (一次卵胞)

PBS: Phosphate buffered saline (リン酸緩衝塩類溶液)

PDGF: Platelet-derived growth factor (血小板由来成長因子)

PlGF: Placental growth factor (胎盤増殖因子)

PMSG: Pregnant mare serum gonadotropin (妊馬血清性腺刺激ホルモン)

P4: Progesterone (黄体ホルモン)

S: Secondary follicle (二次卵胞)

VE-cadherin: Vascular epithelial cadherin (血管内皮カドヘリン)

VEGF: Vascular endothelial growth factor (血管内皮細胞成長因子)

vWF: von Willebrand factor (フォンビルブランド因子)

マウスCD11c⁺樹状細胞の卵胞形成 及び黄体形成・維持における役割に関する研究

所属:東京大学大学院 博士過程 医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻

指導教官:藤井 知行

申請者:永井 美和子

要旨

本研究では卵巣における樹状細胞 (DC) の役割を明らかにするため、ヒトとマウス卵巣内DCを染色し、DCの存在を確認した。卵胞形成・排卵・黄体化に伴うDCの量的経時的変化の観察では、DCは卵胞期・黄体期に増加していた。CD11c-ジフテリア毒素受容体遺伝子改変マウスを用い一時的にDCを枯渇し各卵胞数と卵巣ホルモンを対照群と比較すると、性周期開始前には対照群と差を認めなかったが、卵胞期・黄体期ではDC枯渇卵巣で卵胞・黄体形成が障害された。血中卵巣ホルモン値もDC枯渇群で低値であった。これらよりDCは卵胞形成・排卵・黄体化に必須であり、排卵障害や黄体機能不全といった病態におけるDCの関与が示唆された。

序文

～性周期とホルモン変化～

性成熟した個体の卵巣では、卵胞発育・排卵・黄体形成という周期性変化が、マウス・ラットでは4日、ヒトでは28日間周期で見られる。卵胞の発育は、下垂体から分泌される卵胞刺激ホルモン（Follicle stimulating hormone; FSH）によって促され、卵胞中の顆粒膜細胞から卵胞ホルモン（エストロゲン）が分泌される。卵胞が成熟すると、下垂体から分泌される黄体化ホルモン（Luteinizing hormone; LH）によって、卵胞の黄体化が始まり、排卵が促される。排卵後の卵胞には黄体が生じる。黄体化がおこることによって、卵巣からはエストロゲンに加えて、黄体ホルモン（プロゲステロン）が分泌されるようになる。エストロゲンとプロゲステロンは協調して子宮内膜に作用し、受精卵の着床に備える。妊娠が成立した場合は、黄体が妊娠黄体となりプロゲステロンの分泌を続けるが、妊娠が成立しなかった場合は、黄体は退縮し、また新たな卵胞形成が始まるといった性周期を繰り返す(図1)。

～卵巣周期と骨髄由来細胞浸潤～

この周期的変化は、血管／リンパ管新生、血管維持、組織修復など様々なプロセスによって調節されている。一方、これらのプロセスにおいて、卵巣の顆粒膜細胞などから、種々のケモカインが分泌され、それらのケモカインに応答して、骨髄由来細胞が卵

巢に浸潤してくることが知られている。卵巣へ浸潤した骨髄由来細胞は、タンパク質分解酵素やサイトカイン・脈管新生因子を分泌し、上記のプロセスに関与していると考えられ(図2)、これら卵巣でのダイナミックな周期的変化は、1980年にLawrence Espeyによって「炎症」になぞらえて説明されてから [1]、多くの研究者に免疫学的側面からの解釈を試みられてきた。

～卵巣内骨髄由来細胞の性周期に伴う量的経時的変化～

性周期に伴い、発育卵胞に骨髄由来細胞が集積していることは古くから知られていた。Moricardは1953年に卵巣にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin; hCG) を投与すると、卵胞周囲に白血球の集積が見られることを発表している [2]。さらに細かい経時的変化については、Koのグループが未熟ラットにFSH作用のある妊馬血清性腺刺激ホルモン (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG) とLH作用のあるhCGを投与するという方法で人工的に性周期をつくり、卵巣中の骨髄由来細胞数の経時的変化を、フローサイトメリー法を用いて検討している [3]。その結果、汎白血球のマーカであるCD45の陽性細胞の割合はPMSGとhCG投与後に増加し、その後減少していることを示している。すなわち、卵巣中骨髄由来細胞は、卵胞発育とともに増加し、排卵・黄体化に伴いピークに達しその後減少する。以上より骨髄由来細胞が卵胞発育・排卵・黄体形成に何らかの機能を有していることが推察され

るが、各種骨髄由来細胞がそれぞれ卵胞の発育および退縮というメカニズムにどのような役割を担っているかは明らかではない。

～卵巣内各種骨髄由来細胞の性周期に伴う変化～

卵巣内骨髄由来細胞のうち、各種分画の性周期に伴う経時的変化については、Koのグループがマクロファージと樹状細胞のマーカーであるCD11b/c、およびリンパ球のマーカーであるCD3を用いてフローサイトメトリー法を用いて検討している。これによると、未熟ラットを用いたマクロファージと樹状細胞の汎白血球における割合はPMSGおよびhCG投与後に増加し、hCG投与6時間後をピークに減少、すなわち卵胞形成黄体化にかけて増加し、排卵後に減少することが示された。一方リンパ球はhCG投与後にむしろ減少することが示されている[3]。

～樹状細胞～

樹状細胞とはマクロファージと並ぶ抗原提示細胞（antigen presenting cell; APC）であり、全身に分布し、存在する組織によって表皮中ではランゲルハンス細胞（Langerhans cell; LC）、真皮中では真皮内樹状細胞（dermal DC）といった異なったサブセットが存在する。樹状細胞はこれらの末梢組織において細菌やウイルス、あるいはウイルス感染等によって損傷を受けた細胞の死骸・断片などといった抗原を認識

し捕獲し、未熟樹状細胞から成熟樹状細胞に分化し、輸入リンパ管を經由し、所属リンパ節に移動する。成熟樹状細胞は自己のクラスII主要組織適合遺伝子複合体分子(MHCII)上に抗原を提示し、ナイーブT細胞に抗原を提示する。一方、二次リンパ組織内にも樹状細胞サブセット(resident DC)が存在し、これらの樹状細胞はリンパ管を經由してリンパ組織に移動することはない、リンパ組織に由来する抗原を提示している。未熟樹状細胞はこのようにT細胞に抗原を提示する一方で、血管新生・血管維持・リンパ管形成などにも関与していると考えられている。

～卵胞発育・排卵・黄体形成と血管／リンパ管新生～

卵胞発育・排卵・黄体形成には、血管／リンパ管の新生および維持が必須であることが知られる[4]。線維芽細胞成長因子(Fibroblast Growth Factor; FGF)、血管内皮細胞成長因子(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)、Angiopoietin 1, 2 (ANG1, 2)、血小板由来成長因子(Platelet-derived Growth Factor; PDGF)などは血管新生作用を示す増殖因子である[5, 6]。またVEGFファミリーと呼ばれる一連の増殖因子にはVEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、胎盤増殖因子(Placental Growth Factor; PLGF)-1およびPLGF-2の7種類があり、受容体との結合を介して脈管形成・血管新生やリンパ管形成に関与していると言われている[7]。

～研究目的～

卵巣における樹状細胞の存在、役割についてはこれまでほとんど報告が見られず、その機能も明らかではなかった。最近、Fainaruらは、体外受精の採卵時に得た卵胞液中の骨髄由来細胞成分を解析し、樹状細胞はそれらのおよそ15%を占めており、樹状細胞の成熟度は性腺刺激ホルモンに対する卵巣の反応と正の相関関係があることを示し、樹状細胞の卵巣での何らかの機能を示唆する報告をしている[8]。しかし、これまでに卵巣内の樹状細胞の機能について検討している研究はほとんどない。

そこで本研究では卵巣における樹状細胞の機能を明らかにするために以下のような実験を行った。さらに本研究において、卵巣中の樹状細胞が組織学的に脈管周囲に多く存在していたことや、樹状細胞枯渇マウスにおいて卵胞発育形期および黄体期において血管の破綻・出血を認めたことより、樹状細胞が卵胞発育・排卵・黄体形成に必須な血管／リンパ管新生・維持に関与することで、卵巣機能を制御していると考え、樹状細胞枯渇マウス卵巣における、血管／リンパ管新生・維持に関与する因子の評価を行った。樹状細胞そのものが血管内皮細胞様性質を獲得し、脈管構造に関与しているという報告もあり[9-13]、本研究では卵巣内の、血管内皮細胞特異的に細胞間接着部位で接着分子として機能しているVE-cadherin[14]およびVEGFのレセプターであるVEGFR2に関しても調べることとした。

実験方法

～免疫組織化学染色～

実験は、東京大学動物実験実施規則に則り、動物実験専門委員会の承認を得て行った。マウスは理化学研究所より提供を受けて自家繁殖を行った樹状細胞の表面マーカーである CD11c のプロモーター領域にヒトジフテリア毒素受容体 (DTR) と緑色蛍光タンパク質 (GFP) を組み込んだ遺伝子改変 CD11c-DTR-GFP マウス (ヘテロ、BALB/c) および日本クレア株式会社から購入した野生型の BALB/c を用いた。それぞれマウス食 (MF オリエンタル酵母工業) が与えられ、12 時間交代の昼夜サイクルの下飼育された。

ヒト卵巣検体に関しては、東京大学医学部附属病院において、付属器切除を行った、正常月経周期を持つ患者の卵巣を用いており、実験使用に関しては全て東京大学医学部附属病院の倫理委員会の許可を受けたうえで、術前に患者よりインフォームドコンセントを得ている。

まず始めに卵巣内における樹状細胞の存在の有無とその局在を確認するため、免疫組織化学染色を行った。ヒト黄体期卵巣については、成熟樹状細胞のマーカーである抗 CD83 抗体 (MCA1582T、Mouse Monoclonal、1.0 mg/ml、50 倍希釈、Bio-Rad

AbD Serotec Limited) で染色し、マウス卵巣については、CD11c-DTR-GFP マウスを用いて、樹状細胞を抗ビオチン化 GFP 抗体 (ab6658、goat polyclonal、1 mg/ml、250 倍希釈、Abcam) で染色した。組織は中性ホルマリンにて固定、パラフィン包埋し、3 μ m の切片を準備した。パラフィン包埋切片は、100%、90%、80%、70%のエタノールにて脱パラフィン処理した。抗原賦活化は、CD83 の染色の際には Proteinase K (WAKO)、GFP 染色の際には pH6.0 クエン酸緩衝液 (三菱化学メディエンス) を用いた。切片は 30 分間の 3% 過酸化水素水処理をした後、水道水で洗浄し、PBS に溶解した一次抗体もしくは、同濃度のアイソタイプ IgG にて一晩 4 $^{\circ}$ C で静置した。CD83 染色の際には、スライド洗浄後、ダコ ENVISION キット / HRP (DAB) (DakoCytomation) に含まれるポリマー試薬を用いた後 DAB 染色を行った。GFP 染色の際には Vectastain ABC ELITE kit (Vector Laboratories) にて ABC 染色を行なった後、DAB 染色を行った。全てのスライドは、ヘマトキシリンで対比染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

～卵巣内樹状細胞量的経時的変化の検討～

動物実験は、東京大学の動物実験委員会の許可を得たプロトコールを用いて行った。

マウスは日本クレア株式会社から購入した未熟(3週齢)BALB/c野生型のメスマウスを用いた。

図4に示すように、卵胞発育・排卵・黄体形成に伴う卵巣での樹状細胞の量的経時的变化を評価するために、上記の未熟BALB/cマウスに生理食塩水で溶解したPMSG(動物用セロトロピン、あすか製薬)を10単位腹腔内投与、その48時間後に生理食塩水で溶解したhCG(HCGモチダ 持田製薬)を10単位腹腔内投与することで、人工的に性周期をつくり、PMSG投与前、PMSG投与後24時間後かつhCG投与前、hCG投与後12時間後およびhCG投与後24時間後の5ポイント(PMSG 0, PMSG 24, hCG 0, hCG 12, hCG 24)でそれぞれ5匹ずつ割り付け、エーテル麻酔下に採血し、さらにマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、卵巣摘出術を行った。フローサイトメリー用単細胞の準備のために、摘出卵巣を細切した上で、0.25% type I collagenase (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) および15 IU/ml deoxyribonuclease I (Takara Shuzo, Tokyo, Japan)を加えたDMEM/Ham's F-12溶液に入れ、37°Cで攪拌しながら60分インキュベートを行った。40 μ mのセルストレーナーにて濾過を行い、細胞を単離後、NH₄Cl赤血球溶解バッファーを用いて、混入した赤血球を除去し、フローサイトメリー用のバッファー(0.1% BSA (bovine serum albumin) および0.04% アジ化ナトリウム添加のPBS)に懸濁した後、フローサイトメリーにて評価した。実験は3回行い、これら

の平均を比較した。

～フローサイトメトリー～

細胞の表面抗原の解析のために、以下の蛍光色素抗体を用いて、フローサイトメトリーを行った。マウス卵巣樹状細胞の解析には、Anti-Mouse CD45.2 FITC、Anti-Mouse/Rat MHC Class II (I-Ek) PE、Anti-Mouse CD11c APC (eBioscience) を用いた。各抗体は、アイソタイプの抗体を染色してコントロールとした。染色した細胞はPBSで2回洗浄し、40 μ mのフィルターで濾過した後、フローサイトメトリー用のバッファーに懸濁した。フローサイトメトリーによる解析はBD FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) で行い、データの解析はFlowJo (Tree Star, Ashland) を用いて行った。前方散乱光、側方散乱光の散布図で生存細胞をゲートした後、図5に示すようにCD45陽性細胞をゲート、次にCD11c⁺MHC II⁺細胞すなわち樹状細胞をゲートし、その卵巣全体の生存細胞に占める割合を算出した。

～マウス樹状細胞枯渇モデル～

樹状細胞除去を行う実験では、CD11c-DTRマウスに、ジフテリア毒素 (Diphtheria toxin; DTx) の投与により一時的に全身の樹状細胞を枯渇させるモデルを用いた[15]。

ヒトジフテリア毒素受容体 (Diphtheria toxin receptor; DTR) はDTxとの親和性が強く、ヒトDTRを発現する通常のヒト細胞はDTx投与によりアポトーシスが誘導される。一方、マウス細胞はマウスDTRしか発現しないが、マウスDTRはDTxとの親和性が低いためDTxの存在下でも生存できる。一方、CD11c-DTR遺伝子改変マウスは樹状細胞の表面マーカーであるCD11cのプロモーター領域にヒトDTR遺伝子を発現させたものである。DTxの投与により、正常マウス細胞は障害を受けないが、DTRを発現するCD11c陽性の樹状細胞はアポトーシスに至る。したがって、DTxの投与により一時的な樹状細胞の全身的枯渇を行うことができるモデルである (図6-1 i)。マウス脾臓を用いた予備実験では、投与1日後には、樹状細胞は除去され、4日後には回復していた (図6-1 ii)。次にDTxの卵巣への影響を観察するため野生型 (Wt) マウスおよびCD11c-DTR遺伝子改変マウスにDTxを投与することにより卵巣および脾臓内における樹状細胞 (CD11c⁺MHC II⁺) への影響をフローサイトメトリーを用いて観察した。それぞれ3匹ずつの成熟マウスにPMSG・hCGを投与し黄体化起こし、DTx投与48時間後に卵巣および脾臓を回収し、抗CD45 抗体・抗MHC II 抗体・抗CD11c抗体で染色を行い、前方散乱光、側方散乱光の散布図で生存細胞をゲートした後、CD45陽性細胞をゲート、次にCD11c⁺MHC II⁺細胞をゲートしその卵巣および脾臓内CD45細胞に

占める割合を示した。

結果、DTx の投与により CD11c⁺MHC II⁺ 細胞は Wt マウス卵巣において 7.12% 存在する一方で CD11c-DTR マウス卵巣では 2.92% と減少していた。なお、図 6-1 と同様に脾臓においても CD11c⁺MHC II⁺ 細胞は Wt マウスにおいて 2.85% 存在する一方、CD11c-DTR マウスでは 1.19% と減少していた (図 6-2)。

～マウス卵巣周期における樹状細胞の機能評価～

上述の遺伝子改変メスマウスを用いて、マウスの各卵巣周期における樹状細胞の関与を調べた。図7に示すように i) PMSG 投与前すなわち性周期開始前、ii) PMSG 投与後48時間かつhCG投与前すなわち卵胞期、iii) PMSG投与後48時間後にhCG投与し24時間経過後すなわち黄体期、の3ポイントで卵巣及び血清を回収した。検体回収の48時間前にDTx (WAKO, 5 ng/g body weight) をPBSに融解したもの、もしくはコントロールとしてPBSのみ、それぞれ0.1mlを同マウスに腹腔内投与し比較した。なお予備実験では野生型マウスにDTxを投与したのもコントロールとして検討したが、遺伝子改変マウスにPBSを投与したものと同等の結果を示した。

～Enzyme immunoassay (EIA)～

上記によって採られたマウス血清中エストラジオール値とプロゲステロン値をEIA法を用いて測定することにより、それぞれ卵胞発育と黄体機能の評価を行った (Estradiol, EIA Kit / Progesterone, EIA Kit Cayman Chemical)。

～卵胞数・黄体数の評価～

卵巣を摘出しHE染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。原始卵胞（卵母細胞の周囲に一層の扁平な顆粒膜細胞を持つ）、一次卵胞（立方状へと変化した顆粒膜細胞を持つ）、二次卵胞（二層以上立方状顆粒膜細胞を持つ）、成熟卵胞（卵母細胞の横に卵胞液に満たされた空洞を持つ）、閉鎖卵胞（卵母細胞の消失、透明帯の変形がみられる）、黄体（排卵によって卵娘細胞とその周囲の顆粒細胞が抜け落ちた成熟卵胞から形成され、主に大型の細胞である顆粒層黄体細胞と辺縁部に認められる小型の卵胞膜黄体細胞よりなる）を1切片につきそれぞれ数え、比較検討を行った。

～樹状細胞回復後の卵巣機能に対する検討～

図8のようにCD11c-DTRマウスを使用し、PMSG・hCG投与により排卵・黄体形成を促した時点でDTxにより一時的に樹状細胞を枯渇させたマウスを放置し(予備実験では4日後に樹状細胞数は正常化していた)、樹状細胞数の回復の後2週間および6週間後にPMSG・hCGを投与し卵胞発育・排卵・黄体化を試み、上記同様にそれぞれマウス卵巣・血清を回収し組織学的検討およびプロゲステロンを測定することにより卵巣機能を評価した。

～樹状細胞が卵胞発育・排卵・黄体形成に関与する機序の検討(血管／リンパ管新生・維持への関与の検討)～

上記遺伝子改変マウスを用いてDTxもしくはPBS を投与し樹状細胞枯渇群とコントロール群とで、PMSG・hCGを投与し黄体期とした卵巣を回収し組織よりmRNAを抽出し各血管／リンパ管新生因子に関して比較を行った。尚、マウス3匹分の片側卵巣をまとめて1検体とし、mRNAの採取を行った。

当初、卵巣内DC固有の特徴を観察するため、成熟Balb/cマウス100匹を上記プロトコ

ールに基づきPMSGおよびhCGを投与し、hCG投与後12時間の時点(上述実験で卵巣中に最も樹状細胞数が多かった時点)で犠牲にし、卵巣を摘出、上記酵素処理法を用いて細胞を単離の後、フローサイトメトリー法を用いてCD45⁺ CD11c⁺ MHC II⁺細胞をソーティングし、樹状細胞を分離した(図9)。これより得た細胞よりmRNAを抽出し、血管/リンパ管新生・維持に関与する各分子のmRNAの発現をRT-PCRにて評価を試み、脾臓中樹状細胞をコントロールとして比較を試みた。しかしながら、マウス100匹から、卵巣内免疫担当細胞中0.9%程であるわずかなCD11c⁺ MHC II⁺細胞である樹状細胞は、ソート中のロスもあり、約5000細胞程度しか回収できず、またソート中に細胞の生存率が低下するためか、実際のRNA採取量も非常に少なかったことより、RT-PCR法の結果は再現性に乏しく、本方法の繰り返しによるデータ蓄積・解析は非効率的であると考え、これを断念した。

～RT-PCR～

樹状細胞RNAは、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を、卵巣組織RNAはISOGEN (nippongene)を用いて抽出した。逆転写の後に、Light Cycler (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany)を用いてリアルタイムPCRを行った。全てのPCRの際にはmelting curveの解析を行って、single peakであることを確認している。プライマーおよび各PCRの条件は以下のとおりである。

Murine VEGFR2

sense primer, 5'- GGCGGTGGTGACAGTATCTT -3'

antisense primer, 5'- GTCACTGACAGAGGCGATGA -3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 47°C 10 sec, extension: 72°C 7 sec

Murine FGF 1

sense primer, 5'- CCGAAGGGCTTTTATACGG -3'

antisense primer, 5'- TCTTGGAGGTGTAAGTGTTATAATGG-3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 64°C 49 sec, extension: 72°C 5 sec

Murine FGF 2

sense primer, 5'- TGTGTCTATCAAGGGAGTGTGTGC -3'

antisense primer, 5' - ACCAACTGGAGTATTTCCGTGACCG-3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 55°C 10 sec, extension: 72°C 8 sec

Murine ANG 1

sense primer, 5' - ACAACACCAACGCTCTGCAA -3'

antisense primer, 5' - TGGCCGTGTGGTTTTGAAC-3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 47°C 10 sec, extension: 72°C 16 sec

Murine ANG 2

sense primer, 5' - AGAGTACTGGCTGGGCAATGAGTT -3'

antisense primer, 5' - TTCCCAGTCCTTCAGCTGGATCTT-3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 49°C 10 sec, extension: 72°C 5 sec

Murine PIGF

sense primer, 5'- CACTTGCTTCTTACAGGTCC -3'

antisense primer, 5'- CACCTCATCAGGGTATTCAT-3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 55°C 10 sec, extension: 72°C 7 sec

Murine VEGF A

sense primer, 5'- CCCACGACAGAAGGAGAGCAGAAGT -3'

antisense primer, 5'- CATCAGCGGCACACAGGACGG-3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 63°C 10 sec, extension: 72°C 6 sec

Murine VEGF C

sense primer, 5'- AGCAGCCACAAACACCTTCTT -3'

antisense primer, 5' - TCAAACAACGTCTTGCTGAGG-3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 49°C 10 sec, extension: 72°C 5 sec

Murine VEGF D

sense primer, 5' - GCACCTCCTACATCTCCAAACAG -3'

antisense primer, 5' - GGCAAGCACTTACAACCCGTAT-3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 49°C 10 sec, extension: 72°C 5 sec

Murine VE-cadherin

sense primer, 5' - GCAATGGCAGGCCCTAACTTTC -3'

antisense primer, 5' - CAGCAAACCTCTCCTTGGAGCAC -3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 55°C 10 sec, extension: 72°C 8 sec

GAPDH

sense primer, 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'

antisense primer, 5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

denaturing: 95°C 10 sec, annealing: 64°C 10 sec, extension: 72°C 18 sec

～統計学的検討～

統計学的比較は、統計ソフトJMP Pro 9.0.2を使用しStudent's t-testもしくはWilcoxonの順位和検定にて行い、P値<0.05を有意差があるとみなした。

結果

～卵巣内における樹状細胞の存在と局在～

卵巣内における樹状細胞の存在の有無とその局在を確認するため、免疫組織化学染色を行った。図10のようにヒト黄体期卵巣(成熟樹状細胞のマーカーである抗CD83抗体で染色)とマウス卵巣(CD11c-DTR-GFPマウスを用いて樹状細胞を抗GFP抗体で染色)において、樹状細胞は卵巣内に存在し、特に脈管周囲に局在していることが明らかとなった。

～卵巣内樹状細胞量的経時的変化の検討～

卵胞発育・排卵・黄体形成に伴う卵巣での樹状細胞の量的経時的変化を評価するために未熟 BALB/c マウスに PMSG を投与し、その 48 時間後に hCG を投与することで人工的に性周期をつくり、PMSG 投与前、PMSG 投与後 24 時間後かつ hCG 投与前、hCG 投与後 12 時間後、および hCG 投与後 24 時間後の 5 ポイントで卵巣を採取し、CD11c⁺MHC II⁺細胞であるマウス卵巣内樹状細胞数の経時的変化の評価をフローサイトメトリーで行った。その結果、図 11 に示すように卵巣全細胞中の CD45⁺細胞の

割合は、PMSG 投与前 $2.54 \pm 0.227\%$; (平均±標準誤差)であったのが PMSG 投与 24 時間後に $4.55 \pm 1.15\%$; (同, $P = 0.081$) と PMSG 投与前と比較し有意差は認められないものの、その後、 $3.81 \pm 0.356\%$; (同, $P < 0.05$)となり、hCG 投与によって12時間後に $4.72 \pm 0.442\%$; (同, $P < 0.05$)までに増加した。その後、hCG 投与 24 時間後 $5.49 \pm 0.659\%$; (同, $P < 0.05$)に増加した。 卵巣全細胞中の CD11c⁺MHC II⁺細胞の割合は、PMSG 投与前 $0.059 \pm 0.010\%$; (平均±標準誤差)であったのが PMSG 投与後に $0.127 \pm 0.051\%$; (同, $P = 0.13$)、 $0.109 \pm 0.021\%$; (同, $P = 0.051$)となり PMSG 投与前と比較し有意差は認められないものの、hCG 投与によって12時間後に $0.172 \pm 0.040\%$; (同, $P < 0.05$)までに増加した。その後、hCG 投与 12時間後をピークに hCG 投与 24時間後では $0.154 \pm 0.040\%$; (同, $P < 0.05$)まで減少したが、PMSG 投与前と比較し有意な増加を示した。卵巣 CD45⁺細胞中の CD11c⁺MHC II⁺細胞の割合では、PMSG 投与前で $2.36 \pm 0.41\%$; (平均±標準誤差)であったのが PMSG 投与 24 時間後で $2.87 \pm 0.77\%$; (同, $P = 0.29$)、PMSG 投与後 48 時間後で $2.98 \pm 0.72\%$; (同, $P = 0.25$)、hCG 投与後 24 時間で $3.60 \pm 0.58\%$; (同, $P = 0.078$)と、PMSG 投与前と比較し有意な増加を示さなかった ($n = 3$, それぞれ PMSG 投与前と比較し Student's t-test を行った)。

これらの所見から樹状細胞は卵巣内で卵胞期から排卵期・黄体期で総数が増加し、

卵胞発育および排卵、黄体形成に何らかの寄与をしていると推察した。

～マウス卵巢周期における樹状細胞の機能評価～

CD11c-DTR遺伝子改変未熟マウスを用いて、樹状細胞枯渇群とコントロール群で

i) PMSG投与前すなわち性周期開始前、ii) PMSG投与後48時間後かつhCG投与前すなわち卵胞期、iii) PMSG投与後48時間後にhCG投与し24時間経過後すなわち黄体期の3ポイントで血清を回収し、EIA法によってエストラジオール値とプロゲステロン値を測定することにより、卵胞発育と黄体機能の比較評価を行った。それと同時に、卵巢を摘出、HE染色を行い、卵胞数・黄体数の評価、組織学的比較検討を行った。

i) 性周期開始前の卵巢における樹状細胞枯渇の影響

図 12- i に示したように、コントロール群と樹状細胞枯渇群の原始卵胞・一次卵胞・二次卵胞数を、HE 染色切片を用いて数え、比較した。結果、図 12- ii で示す通り、コントロール群 (n = 7) と比較し、樹状細胞枯渇群 (n = 6) では二次卵胞数が減少していた (33.4 ± 4.36 個 vs 19.83 ± 2.93 個; (コントロール vs 樹状細胞枯渇群 平均

± 標準誤差), $P < 0.05$) が、原始卵胞、一次卵胞の数には差がなかった。エストロゲン値は両者とも低値であり (16.45 ± 6.07 (pg/mL) vs 15.63 ± 5.74 (pg/mL); (同), $P = 0.46$) 有意差を認めなかった。

ii) 卵胞期の卵巣における樹状細胞枯渇の影響

図 13- i , ii で示す通り、卵胞期においては、コントロール群 ($n = 6$) では、多数の二次卵胞・成熟卵胞さらに黄体も認めたが、樹状細胞を枯渇させたマウス卵巣 ($n = 9$) においては成熟卵胞・黄体は殆ど認められず、それに伴い閉鎖卵胞の数が増加しているのが観察された (成熟卵胞 10.16 ± 1.42 個 vs 0 ± 0 個; (コントロール vs 樹状細胞枯渇群 平均±標準誤差), $P < 0.005$ /黄体 7.50 ± 2.07 個 vs 0 ± 0 個; (同), $P < 0.005$ /閉鎖卵胞 3.5 ± 0.84 個 vs 27.83 ± 4.39 個; (同), $P < 0.05$)。血中エストロゲン値も、コントロール群においては上昇を認めるも、樹状細胞枯渇群においては低値のままであった (64.38 ± 23.27 (pg/mL) vs 2.67 ± 1.70 (pg/mL); (同), $P < 0.05$)。

iii) 黄体期の卵巣における樹状細胞枯渇の影響

図 14- i に示したように、黄体を観察すると、樹状細胞枯渇マウスの卵巣では、出血が顕著で、黄体形成が明らかに障害されており、強拡大では黄体周囲にみられる脈管の破綻が観察された。図 14- ii で示す通り、hCG 投与後 24 時間(黄体期)においては、コントロール群(n = 6)と比較し樹状細胞枯渇マウスの卵巣(n = 7)では、出血が顕著で、黄体形成が明らかに障害されていた(黄体 10.2 ± 2.08 個 vs 0.71 ± 0.28 個;(コントロール vs 樹状細胞枯渇群 平均 \pm 標準誤差), $P < 0.005$)。また、血中プロゲステロン濃度もコントロール群に比べ樹状細胞を枯渇させた群では、統計学的に有意に低値であった(16.73 ± 1.81 (ng/mL) vs 4.49 ± 0.71 (ng/mL); (同), $P < 0.005$)。

～樹状細胞回復後の卵巣機能に対する検討～

CD11c-DTR マウスを使用し、黄体形成時に一時的に樹状細胞を枯渇させたマウスをしばらく経過させ、樹状細胞数を回復させた後、樹状細胞枯渇後 2 週間および 6 週間後に PMSG・hCG を投与し卵胞発育・黄体化を試み、それぞれマウス卵巣・血清を回収し卵巣機能の回復を評価した(図 8)。その結果、コントロール(n = 6)と比較し樹

状細胞回復 2 週間後の卵巣 (n = 8) では黄体数が少数 (図 15- i) であったが (黄体 10.2 ± 2.08 個 vs 5.66 ± 1.054 個; (コントロール vs 樹状細胞枯渇回復群 平均 \pm 標準誤差) $P < 0.05$)、前述の実験で行った黄体形成中に樹状細胞を枯渇させたマウスの卵巣 (n = 7) と比較すると、黄体数は多かった (黄体 5.66 ± 1.054 個 vs 0.71 ± 0.28 個; (樹状細胞回復 vs 樹状細胞枯渇群 平均 \pm 標準誤差) $P < 0.005$)。同様に血清中プロゲステロンの値もコントロールと比較し樹状細胞枯渇後 2 週間後のマウスでは低値であったものの (16.73 ± 1.81 (ng/mL) vs 7.22 ± 1.90 (ng/mL); (コントロール vs 樹状細胞枯渇回復群 平均 \pm 標準誤差), $P < 0.05$)、黄体形成中に樹状細胞を枯渇させたマウスと比較すれば高値であった (7.22 ± 1.90 (ng/mL) vs 4.49 ± 0.71 (ng/mL); (樹状細胞回復 vs 樹状細胞枯渇群 平均 \pm 標準誤差), $P < 0.05$) (図 15- iii)。今回の実験では図 14 の実験で用いた、黄体期の CD11c-DTR マウスに PBS を投与した群をコントロール群とした。1 回の PMSG・hCG 刺激による黄体期の導入および 2 週間あるいは 6 週間の加齢の影響は今回の実験系にはほぼ negligible と考えたが、今後念のため、黄体期の CD11c-DTR マウスに PBS を投与し、2 週間及び 6 週間たったマウスをコントロール群としたデータも集積する予定である。

一方、樹状細胞回復後 6 週間後の卵巣 (n = 2) においては黄体を認めず (図 15- ii)、血清中プロゲステロン値も 2.28 ± 1.36 (ng/mL) と非常に低値であり、組織学的

にも黄体の形成は全く認められなかった(図 15-iii)。

～樹状細胞の卵胞発育・排卵・黄体形成に関与する機序の検討(血管／リンパ管新生・維持への関与の検討)～

樹状細胞を枯渇させた卵巣とコントロール群卵巣組織より得られた mRNA を用いて各種脈管新生／維持因子につき検討を行った。その結果、卵巣組織より得られた mRNA において PlGF、VEGF-A、FGF-1 および FGF-2 では樹状細胞を枯渇させた卵巣において発現量が増大している傾向を認めた。VEGF-C に関しては樹状細胞枯渇卵巣とコントロール群卵巣では差を認めなかった。VEGF-D、ANG1/ANG2 は樹状細胞を枯渇させた卵巣において発現量が減少している傾向をみとめた(n = 2) (図 16 i-ix)。これらについては今後サンプル数を増やして統計学的有意差の検定を行う予定である。

また、先述の通り卵巣および脾臓より樹状細胞をソーティングし、血管／リンパ管新生・維持に関与する因子につき mRNA 発現の比較を試みた。結果、VEGFR2 および VE-cadherin の発現は脾臓樹状細胞に比し、卵巣樹状細胞で発現量が高かった。その他、各血管・リンパ管新生因子である VEGF-A、VEGF-C、

VEGF-D、FGF-1、FGF-2 に関しては卵巣樹状細胞での発現を多く認めたが、ANG1/ANG2 では差を認めなかった (図 17 i - x)。この実験系は 3 回の実験を試みてかろうじて得られた一回の結果を提示し、統計学的検討は行っていない。

考察

以前より卵巣内の発育卵胞・排卵および黄体形成に際し、種々の免疫担当細胞が集積し、機能を果たしていることは知られていたが、本研究では、卵巣内における樹状細胞が集積し、卵胞発育・排卵および黄体形成に必須であることを初めて明らかにした。

はじめに、ヒトおよびマウス卵巣内における樹状細胞の存在の有無とその局在を確認するため、ヒト卵巣を成熟樹状細胞のマーカーである抗 CD83 抗体で、遺伝子改変 CD11c-DTR-GFP マウス卵巣を抗 GFP 抗体を用いて免疫組織学化学染色した。これよりヒトおよびマウスにおいて樹状細胞は卵巣に存在することを初めて明らかにした。

次に、卵胞発育・排卵・黄体形成に伴う卵巣での樹状細胞の量的経時的変化を評価するために、マウスに PMSG・hCG を投与することで人工的性周期をつくり、各周期における卵巣全細胞中の CD11c⁺MHC II⁺細胞（樹状細胞）の割合の変化をフローサイトメトリー法で観察した。その結果、Koらのグループによって示された未熟ラット卵巣での CD11b/c⁺細胞、すなわちマクロファージ／樹状細胞の周期的変化とほぼ同様に[3]、卵巣全細胞中の CD11c⁺MHC II⁺細胞の割合は PMSG 投与後に増加し、hCG を投与によってさらに増加、すなわち卵胞発育に伴って増加し、排卵・黄体形成期にさらに増加することを明らかにした。今回の検討では、卵巣中 CD11c⁺MHC II⁺細胞の割合が過排卵刺激／排卵後に減少するかどうかについては検討していないが、先述の Koらのグループは、膣スメアによる周期(非発情期・発情前期・発情期・発情後期)同定法により、自然性周期を有する成熟ラット卵巣のマクロファージ／樹状細胞の周期的変化を観察し、発情期すなわち排卵期に増加し、その後減少することを示している[3]。このことから、我々のモデルである過排卵刺激後にも自然周期に戻り非発情期となれば、CD11c⁺MHC II⁺細胞の割合は減少すると考えられる。

なお、卵巣におけるその他の白血球分画については、同じグループが未熟ラットに過排卵刺激を加えて行った研究では、好中球は性周期に関与せず全卵巣細胞数に対して一定の割合、また CD3 陽性リンパ球は hCG 投与後にむしろ割合が減ることを示しており、骨髄由来細胞のなかでも、CD11c⁺MHC II⁺細胞の卵巣内での周期的に

変化は卵胞発育・排卵・黄体形成に伴って増加する点が特徴的であると考えられた。

このように樹状細胞が卵巣内に存在し、かつ卵胞発育・排卵および黄体形成時に卵巣内でその数が増加することから、樹状細胞が卵胞発育・排卵および黄体形成に何らかの役割を果たしていると考えられた。そこで、各卵巣各周期における樹状細胞の機能を検討するため、一時的に全身の樹状細胞を枯渇させることが可能な

CD11c-DTR マウスモデルを使用し実験を行った。すなわち、性周期開始前、卵胞期、黄体期の 3 ポイントで樹状細胞を枯渇させ、卵巣中の卵胞数・黄体数の評価、組織学的検討、および血清エストラジオール値とプロゲステロン値の測定を行った。

性周期開始前においては、樹状細胞を枯渇させた群でも、対照群に比し、原始卵胞・一次卵胞数に有意差を認めず、エストロゲン値にも有意差はなかった。前述のフローサイトメリー法を用いた卵巣全細胞中の樹状細胞の割合が PMSG 投与前では非常に低かったことと合わせ、性周期開始前では樹状細胞は数も少なく、重要な機能は果たしていないと考えられた。一方卵胞期においては、樹状細胞を枯渇させたマウスでは、成熟卵胞・黄体は殆ど形成されておらず、それに伴い閉鎖卵胞の数が増加していた。これと一致して血中エストロゲン値も、樹状細胞枯渇群においては低値のままであった。これより、樹状細胞は卵胞形成に必須であると考えられた。黄体期においては、

樹状細胞枯渇マウスでは、黄体形成が明らかに障害されていた。また、血中プロゲステロン濃度も、樹状細胞を枯渇させた群では、対照群に比べ統計学的有意に低値であった。これより、樹状細胞は黄体形成・維持にも必須であることが示唆された。

次に樹状細胞が卵胞形成・排卵・黄体形成／維持に関与する機序について検討した。ここで、卵巣の生理的性周期における脈管形成／維持についてこれまで知られていることを概説する。

卵巣は脈管系の構築と維持・リモデリングによって、卵胞形成・黄体に必要とされる栄養・酸素・ホルモンの供給をうけ、さらにおよび卵巣内で合成されたホルモンを放出することによってその機能を発揮・維持していることが知られ、卵巣における脈管系の形成障害や構築の破綻が各時期の生理的変化を阻害することも報告されている[16, 17]。各ステージの卵胞および黄体における脈管系を制御する因子としては以下のような報告がされている。原始卵胞や一次卵胞内には、血管新生作用を示す増殖因子である血小板由来成長因子(PDGF)や線維芽細胞成長因子(FGF2)が卵母細胞に存在している [18, 19]。しかし、それらの因子が莖膜細胞血管に及ぼす効果は不明である。卵胞期においては、二次卵胞内の顆粒細胞と莖膜に VEGF-A[20]の発現が知られており、ここでの血管新生に関与していると考えられている。しかし発現を誘導すると知られる hypoxia-induced factor 1a (HIF1A) といった因子は成熟卵胞以前では卵

胞内で発現していないことから[21]、この発現が何によって誘導されているかは明らかではない。成熟卵胞には Angiopoiein (ANG) と FGF2 [18, 22] が発現することが報告されている。一方、黄体形成においては、卵巣は LH サージ後、血管新生を伴った生化学的・形態的なダイナミックな変化を遂げる[16]。排卵後、基底膜の破壊に伴って、血管内皮細胞と周皮細胞 (pericyte) が顆粒膜細胞層へ侵入・増殖し血管新生が完成する。血管新生の後、ANG-1:ANG-2 が増加し、血管の安定化が起きる事によって、黄体において基質であるコレステロールの供給と合成されたプロゲステロンの血中への運搬が行われる[22]。また、黄体期においてプロゲステロンの流出はリンパ管が主な経路であると言われており[23]、VEGF-C や VEGF-D は血管内皮細胞に発現する VEGFR-1、VEGFR-2 に結合し、リンパ管形成を促進する事が知られている [25-29]。しかしながら、これらの因子の発現がどのように制御されているかは明らかではない。その後妊娠が成立しなかった場合、黄体は退縮するが、その際は黄体の血管内皮細胞に発現していた VEGFR-1、VEGFR-2 両者が著明に低下し[24, 25]、ANG-2 が ANG-1 に比べ優位となり血管の脱安定化や脆弱化に働いていると考えられる[26]。

このように、卵胞形成・排卵・黄体形成／維持において、血管新生が必須であること、さらに、これまでの形態学的観察実験から、樹状細胞が卵巣の脈管周囲に存在して

いたこと、また、樹状細胞を枯渇させた卵巣では、特に脈管の統合性の欠落が目立ったこと、さらに、樹状細胞が脈管新生因子を分泌したり[27]、樹状細胞そのものが血管内皮細胞的性格を獲得したり[9-13]することによって脈管新生に関与しているという報告があることから、樹状細胞が脈管新生を介して卵胞形成・排卵・黄体形成／維持に関与していると考え、卵巣内の樹状細胞のキャラクタライゼーション、および樹状細胞を枯渇させた卵巣の通常卵巣との比較を試みた。

以下の結果は予備的実験によるもので、追加検討が必要であるが、いくつか興味深い結果を得ている。まず卵巣内の樹状細胞は、全身の樹状細胞に比し(本研究では脾臓の樹状細胞を用いた)、VEGFR2、VE-cadherin といった、血管内皮細胞のマーカーの発現が高い傾向にあった。これは悪性腫瘍における樹状細胞が腫瘍内に浸潤し、血管内皮細胞的性格を獲得し、血管形成に関与するという報告に一致しており[28]、おそらく樹状細胞は卵巣の生理的周期においてもこれら血管内皮細胞的性格の獲得により、脈管形成／維持に関与していると考えられた。また樹状細胞は VEGF-A、FGF2、endothelin-1 といった脈管新生因子を発現することで、周囲の既存の血管に作用し、脈管形成に貢献することが知られているが[29, 30]、本研究でも卵巣内樹状細胞の VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、FGF-1、FGF-2 の発現は全身の樹状細胞に比し高値であり、卵巣内樹状細胞が、脈管形成／維持に関与している可能性

が示唆された。

一方、本研究では、樹状細胞が性周期に呼応して卵巣内に流入してくる機構については明らかにしていない。これについてはいくつかのグループが、卵巣から骨髄由来細胞の遊走を促すケモカイン (IL-8, MCP-1, RANTES, IP-10) が分泌されていることを報告している[31, 32]。樹状細胞については Zhou らが胸腺由来の CD8 α α 陽性樹状細胞が成熟卵胞莢膜に存在することを示し、この特異的樹状細胞に対する遊走能を有する胸腺発現性ケモカインが卵巣内に発現しており、これが CD8 α α 陽性 DC の遊走を促進していることをマウスモデルを用いて示している[33]。しかし他の樹状細胞に対する遊走能を持つケモカインの卵巣における発現、さらにそのゴナドトロピンによる時間的制御などについては明らかになっておらず、今後の検討課題としたい。

最後に、樹状細胞の枯渇によってみられた卵巣機能の破綻が、樹状細胞の復活によってレスキューされるか枯渇した樹状細胞を復活させた場合に、卵胞発育・黄体形成が復活するかどうかを検討するために、樹状細胞枯渇／復活 2 週間および 6 週間後における卵胞発育・黄体化を観察した。当初樹状細胞の復活により、卵巣機能は復活するかと予想していたが、この予想に反して、樹状細胞枯渇／復活後 2 週間後の卵

胞・黄体数は少数でありそれに伴い P4 の値も低値であった。さらに樹状細胞枯渇／復活後 6 週間後の卵巣においては過排卵刺激を行っても卵胞・黄体は全く認めず、ホルモン値も非常に低値であった。この結果より、樹状細胞の一次的な枯渇は卵巣に対して不可逆的な変化を与えることが明らかになった。おそらく樹状細胞の枯渇によって生じた脈管の破綻とそれに伴う炎症反応による組織の損傷が不可逆的な変化の原因と考えられるが、興味深い点は、2 週間後には一旦弱いながらも卵巣機能が復活していたが、これが 6 週間後になるとさらに卵巣機能が低下することから、むしろ進行性の機能低下を起こしていることが示唆され、これについてはさらなる観察研究が必要と考えている。また、上述の通り本研究では樹状細胞に対する遊走能を持つケモカインの卵巣における発現に関する検討を行っておらず、一旦樹状細胞を枯渇させ、機能低下を起こしている卵巣内において PMSG・hCG 投与を行った場合に、それに反応し樹状細胞が卵巣内に遊走するかどうかは不明であり、今後の課題としたい。

本研究を行っている間に、同様な検討をマクロファージについて行っている研究が相次いで 2 報報告された。以前よりマクロファージが卵巣へ浸潤することは、マウス [34,35] およびヒト [36] の研究により明らかになってきていた。そこで、Turner らは、マクロファージの卵巣での機能をさらに明らかにするために、マクロファージ特異的プロモ

一ター配列である CD11b の調節が可能である CD11b にヒトジフテリア毒素受容体 (DTR) を組み込んだ遺伝子改変 CD11b-ジフテリア毒素受容体 (CD11b-DTR) マウスに、ジフテリア毒素を投与することで一時的に全身のマクロファージを枯渇させるといふモデルを用いてマクロファージの欠乏が卵巣機能にどのような影響を及ぼすかを観察する実験を行っている[37]。マクロファージを一時的に枯渇させると血管内皮細胞の破綻と卵巣内出血、それに伴う黄体と莢膜細胞の破壊、閉鎖卵胞の増加が観測されている。これらより、マクロファージは卵巣において血管新生や血管構築の維持に関わっていることが示唆されている。なお、卵巣以外の他臓器(腎臓、腹膜、皮膚、副腎など)においてはマクロファージを枯渇させても出血は認められなかった。卵巣は恒常的に血管が存在する他臓器と対照的に、周期的に血管新生・退縮を生じるユニークな臓器とも言え、樹状細胞やマクロファージの枯渇によるダメージを受けやすいと考えられる。マクロファージが血管内皮細胞の維持に関わる機序については本研究では明らかにされていない。マクロファージは VEGF のような血管新生因子を分泌することが知られており[38, 39]、マクロファージの枯渇は VEGF の枯渇を引き起こすことで血管に異常を来すと想定されたが、抗 VEGF 抗体を投与してもマクロファージを枯渇させた時のような卵巣内出血は観察されず、マクロファージによる血管新生・血管構築維持は、単純に VEGF などの血管新生因子を介した経路だけではないことが推測されている。

つぎに Alison らが同様に上述マウスを用いてマクロファージに関する研究を行っているが、黄体中に含まれるマクロファージが血管新生誘導因子であるチロシンキナーゼ受容体 TIE2 を発現していたと報告している。また、その他の血管新生因子である VEGF に関して、彼らはマクロファージを枯渇させた群の卵巣をコントロール群と比較し、卵巣組織中の VEGF-C mRNA の発現が抑制された事を示している[40]。

今回、本研究においては樹状細胞を枯渇させると卵巣組織中の VEGF-D mRNA の発現が抑制されていた。VEGF-C および VEGF-D はリンパ管形成因子であり、マクロファージ及び樹状細胞がリンパ管形成に関与している事は興味深いと言える。その他本研究において樹状細胞を枯渇させると組織学的に卵巣内の脈管破綻が観察されると同時に、分子学的評価として卵巣組織中の VEGF-A、PIGF、FGF1、FGF2 の mRNA 発現の上昇が認められている様であるが、マクロファージでの報告も同様に卵巣組織中の VEGF-A mRNA の発現は増加しており、これは低酸素状態において HIF1A を介した発現の促進[41, 42]によるものと考えられる。本研究では今後マウス検体をさらに収集し各分子発現を検定していく予定であるが、VEGF-A は血管新生作用の他、血管透過性亢進作用もあることが知られており[42]、本研究でも観察された樹状細胞枯渇マウスにおける黄体期卵巣の構造破綻・出血はこれが一因ではないかと推測しており、この観点からの解析を進めたい。今後はリンパ管のマーカーである Lymphatic vessel

endothelial hyaluronan receptor -1 (LYVE1) や血管内皮細胞マーカーである von Willebrand factor (vWF) による卵巣内リンパ管・血管の免疫染色を行い、樹状細胞を枯渇した卵巣でのリンパ管と血管の変化を観察する予定である。

本研究では、卵巣内樹状細胞は、未熟樹状細胞が貪食を行い、成熟しリンパ管を通してナイーブ T 細胞に抗原を提示した T 細胞を介して機能しているのか、あるいは、未熟樹状細胞そのものがサイトカイン・血管因子の放出を行っているのか、卵巣内において機能している樹状細胞の性状／サブタイプについては明らかでない。今後、未熟樹状細胞のマーカーである CD1a 及び成熟樹状細胞のマーカーである CD83 といった各種サブセットマーカーによる卵巣免疫組織化学染色およびフローサイトメーター法を用いた研究を行いたい。

本研究の臨床意義として、いくつかのことが考えられる。卵胞発育・排卵・黄体機能／維持のそれぞれのイベントの異常は卵胞発育不全・排卵不全・黄体化未破裂卵胞・黄体機能不全などの異常を引き起こす[43]。これらの病態は不明な点が多く、それに対する治療も、現在のところ下垂体ホルモンによる卵巣刺激、黄体ホルモンの補充などに限られている。しかし本研究からそれらの異常の一つに樹状細胞の異常が関与し

ている可能性が示唆された。これに関しては Fainaru らが体外受精のための採卵時に卵胞液中の樹状細胞の成熟度がエストラジオール値と相関するというデータがあるのみで[8]、ヒト臨床検体を用いた研究は発表されていない。また興味深いことに

Makinoda らは、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor) を全身投与することで未破裂黄体化卵胞を治療したと報告している[44]。これは作用機序は明らかにされていないが、卵巣局所での樹状細胞を含めた骨髄由来細胞の活性化が卵胞発育・排卵・黄体機能／維持に寄与している可能性は高く、今後は①卵巣内樹状細胞の characterization ②卵胞液中樹状細胞の characterization③末梢血単球の機能解析 といった、ヒト検体を用いての卵巣機能不全(多嚢胞性卵巣症候群・黄体化未破裂卵胞・黄体機能不全・早発閉経)の患者における樹状細胞の関与についての検討、などにより、樹状細胞の制御による卵巣機能不全に対する治療という観点からも検討を進めたい。

もう一つの本研究の臨床的意義として、早発卵巣不全との関連についても論じたい。

ヒト女性は卵巣に 100 万個の卵子をもって生まれ、思春期に初経を迎えた後、毎月排卵し、50 歳前後で閉経を迎える。一方、なんらかの理由により、40 歳未満で卵巣機能が廃絶し、排卵が認められなくなる病態を早発卵巣不全と呼び、女性の約 1~3%が

罹患すると言われている[45-46]。早発卵巢不全の原因は、①染色体異常/遺伝性（ターナー症候群 スワイヤー症候群 アンドロゲン不応症 脆弱性X症候群関連など）
②家族性（酵素欠損/代謝性ガラクトース血症など） ③複数の輸血処理によるサラセミアメジャー、ヘモクロマトーシス ④医原性(化学療法/放射線療法)⑤外科的(卵巢の摘出や血流遮断) ⑥ウィルス感染 ⑦異常なゴナドトロピン（FSH および LH）分泌または作用 ⑧自己免疫疾患などが挙げられるが、原因が特定されない場合も多い[47]。⑧の自己免疫疾患の中でもバセドウ病や I 型糖尿病などの患者では高頻度に早発卵巢不全がみられることが報告されており、興味深いことに、それらの症例では単球および樹状細胞の機能異常が知られている。Hoekらは 健常者と比較し、早発卵巢不全と診断された患者の 20-46%に末梢血中単球の走化性能が減弱していること、また患者の 36%に樹状細胞の Tリンパ球へのクラスター機能の低下を認めたことを報告している[48]。本研究では一度樹状細胞を枯渇させることが卵巢に不可逆的変化、しかも進行性の卵巢機能低下をもたらした。この結果および、これまでの知見から、自己免疫疾患に合併する卵巢不全や、これまで原因が特定されなかった卵巢機能不全にも、樹状細胞の機能異常が関与している可能性があり、今後はこのような症例についても樹状細胞との関連を検討したい。

本研究によって樹状細胞が卵胞発育・排卵・黄体形成／維持過程において卵巢に

増加し、卵胞発育・排卵・黄体形成・黄体維持に関与している可能性が示唆された。これら月経周期ごとの卵巣の周期的変化には血管・リンパ管の新生・リモデリングが必須であり、実際、血管やリンパ管は各卵胞周囲に局在していることはこれまでも知られていたが[4]、本実験より樹状細胞は血管新生因子やリンパ管形成因子を分泌、あるいは自らがその一部を構成することにより、卵巣機能に関与していると考えられた(図 18)。これらの知見は、卵巣不全の原因のさらなる解明、さらに治療法の確立に寄与する可能性があり、今後、研究を進めて行く予定である。

謝辞

本研究を行うに当たり多くの諸先輩方、特に大須賀穰教授、甲賀かをり講師、藤井知行教授、武谷雄二元教授、上妻志郎前教授からは様々な御指導をいただきました。また、色々な実験のアドバイスを頂きました吉野修先生、廣田泰先生、平田哲也先生、原田美由紀先生、高村将司先生、泉玄太郎先生、東京大学医学部附属病院の先生方、皆様に深謝いたします。

引用文献

- [1] Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction-a hypothesis. *Biol Reprod.*; 22: 73-106. 1980
- [2] Moricard R. Fonction Melogene du liquide folliculaire et micro-injections de gonadotrophine chorale intra-folliculaire realisees chez la lapine. *Compt Rend Assoc Anat.*; 40: 762-770. 1954
- [3] Oakley OR, Kim H, El-Amouri I et al. Perioovulatory leukocyte infiltration in the rat ovary. *Endocrinology*; 151: 4551-4559. 2010
- [4] Brown HM et al. Blood and lymphatic vasculature in the ovary: development, function and disease. *Hum Reprod Update*;20: 29-39. 2014
- [5] Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R and Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.*;16:159-178. 2005
- [6] Folkman J and Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*;235:442-447.1987
- [7] Bahram F and Claesson-Welsh L. VEGF-mediated signal transduction in lymphatic endothelial cells. *Pathophysiology*;17:253-61. 2010
- [8] Fainaru O, Hantisteanu S, Rotfarb N et al. CD11c+HLADR+ dendritic cells are present in human ovarian follicular fluid, and their maturity correlates with serum

estradiol levels in response to gonadotropins. *Fertil Steril.*; 97: 702-706. 2012

[9] Fernandez Pujol B, Lucibello F.C, Gehling U.M, Lindemann K, Weidner N,

Zuzarte M.L, Adamkiewicz J, Elsasser H.P, Muller R and Havemann K.

Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation*;

65:287-300. 2000

[10] Fernandez Pujol B, Lucibello F.C, Zuzarte M, Lutjens P, Muller R and

Havemann K. Dendritic cells derived from peripheral monocytes express endothelial

markers and in the presence of angiogenic growth factors differentiate into

endothelial-like cells. *Eur J Cell Biol.*; 80:99-110. 2001

[11] Schmeisser A, Garlich C.D, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser

R.H and Daniel W.G. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage

markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions.

Cardiovasc Res.; 49:671-680. 2001

[12] Yang L, DeBusk L.M, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian

L.M, Carbone D.P and Lin P.C. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺

cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*;

6:409-421. 2004.

[13] Zhao Y, Glesne D and Huberman E. A human peripheral blood

monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci USA;
100:2426-2431 . 2003

[14] Wallez Y, Vilgrain I, and Huber P. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. Trends
Cardiovasc Med.;16:55-9. 2006

[15] Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S,
Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer E. G, Littman D. R and Lang R. A. In vivo depletion
of CD11c (+) dendritic cells abrogates priming of CD8 (+) T cells by exogenous
cell-associated antigens. Immunity;17: 211-20. 2002

[16] Reynolds LP and Redmer DA. Growth and development of the corpus luteum.
Journal of Reproduction and Fertility Supplement; 54:181-191. 1999

[17] Fraser HM and Lunn SF. Regulation and manipulation of angiogenesis in the
primate corpus luteum. Reproduction; 121: 355-362. 2001

[18] van Wezel IL, Umaphysivam K, Tilley WD and Rodgers RJ.
Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian
follicles. Molecular and Cellular Endocrinology; 115: 133-140. 1995

[19] Nilsson EE, Detzel C and Skinner MK. Platelet-derived growth factor modulates
the primordial to primary follicle transition. Reproduction; 131: 1007-1015. 2006

[20] Yang MY and Fortune JE. Vascular endothelial growth factor stimulates the

primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Molecular Reproduction and Development*; 74: 1095-1104. 2007

[21] Duncan WC, van den Driesche S and Fraser HM. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxiainducible factor-1 alpha in the follicle and corpus luteum. *Endocrinology*; 149: 3313-3320. 2008

[22] Hayashi KG, Berisha B, Matsui M, Schams D and Miyamoto A. Expression of mRNA for the angiopoietin-Tie system in granulosa cells during follicular development in cows. *Journal of Reproduction and Development*; 50:477-480. 2004

[23] Staples LD, Fleet IR and Heap RB. Anatomy of the utero-ovarian lymphatic network and the composition of afferent lymph in relation to the establishment of pregnancy in the sheep and goat. *J Reprod Fertil.*;64:409-420. 1982

[24] Sugino N, Matsuoka A, Taniguchi K and Tamura H. Angiogenesis in the human corpus luteum. *Reprod Med Biol.* ;7: 91-103. 2008

[25] Endo T, Kitajima Y, Nishikawa A, Manase K, Shibuya M and Kudo R. Cyclic changes in expression of mRNA of vascular endothelial growth factor, its receptors Flt-1 and KDR/Flk-1, and Ets-1 in human corpora lutea. *Fertil Steril.* ;76:762-768. 2001

[26] Sugino N, Suzuki T, Sakata A, Miwa I, Asada H, Taketani T, Yamagata Y and

Tamura H. Angiogenesis in the human corpus luteum: changes in expression of angiopoietins in the corpus luteum throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.*; 90: 6141-6148. 2005

[27] Sozzani S, Rusnati M, Riboldi E, Mitola S and Presta M. Dendritic cell-endothelial cell cross-talk in angiogenesis. *Trends Immunol.*;28:385-92. 2007

[28] Coukos G, Conejo-Garcia JR, Buckanovich R and Benencia F. Vascular leukocytes: a population with angiogenic and immunosuppressive properties highly represented in ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol.*;590:185-93. 2007

[29] Riboldi E. et al. Cutting edge: proangiogenic properties of alternatively activated dendritic cells. *J. Immunol.*; 175: 2788-2792. 2005

[30] Guruli G et al. Function and survival of dendritic cells depend on endothelin-1 and endothelin receptor autocrine loops. *Blood*;104: 2107-2115. 2004

[31] Ujioka T, Matsukawa A, Tanaka N, Matsuura K, Yoshonaga M and Okamura H. Analysis of the cytokine interaction among interleukin-1, interleukin-8, and interleukin-1 receptor antagonist in the rabbit ovulatory process. *Fertil. Steril.*; 70: 759-765. 1998

[32] Zhou C, Borillo J, Wu J, Torres L and Lou YH. Ovarian expression of chemokines and their receptors. *J Reprod Immunol.* ;63:1-9. 2004

- [33] Zhou C, Wu J, Borillo J, Torres L, McMahon J and Lou YH. Potential roles of a special CD8 alpha alpha+ cell population and CC chemokine thymus-expressed chemokine in ovulation related inflammation. *J Immunol.* ;182:596-603. 2009
- [34] Van der Hoek KH, Maddocks S, Woodhouse CM et al. Intrabursal injection of clodronate liposomes causes macrophage depletion and inhibits ovulation in the mouse ovary. *Biol Reprod.*; 62: 1059-1066. 2000
- [35] Brannstrom M, Mayrhofer G and Robertson SA. Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period. *Biol Reprod.*; 48: 277-286. 1993
- [36] Brannstrom M, Pascoe V, Norman RJ and McClure N. Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. *Fertil Steril.*; 61: 488-495. 1994
- [37] Turner EC, Hughes J, Wilson H, Clay M, Mylonas KJ, Kipari T, Duncan WC and Fraser HM. Conditional ablation of macrophages disrupts ovarian vasculature. *Reproduction*;141:821-31. 2011
- [38] Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R and Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol.*;55:410-422. 1994
- [39] Lamagna C, Aurrand-Lions M and Imhof BA. Dual role of macrophages in

tumor growth and angiogenesis. *J Leukoc Biol.*;80:705-713. 2006

[40] Alison S. Care, Diener KR, Jasper MJ, Brown HM, Ingman WV and Robertson SA. Macrophages regulate corpus luteum development during embryo implantation in mice. *J Clin Invest.*;123:3472-87. 2013

[41] Ferrara N and Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.*;18:4-25. 1997

[42] Senger D, Galli S, Dvorak A, Perruzzi C, Harvey V and Dvorak H. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*; 219:983-985. 1983

[43] ESHRE Capri Workshop Group. Health and fertility in World Health Organization group 2 anovulatory women. *Hum Reprod Update*;18:586-99. 2012

[44] Makinoda S, Hirosaki N, Waseda T, Tomizawa H and Fujii R. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the mechanism of human ovulation and its clinical usefulness. *Curr Med Chem.*;15:604-13. 2008

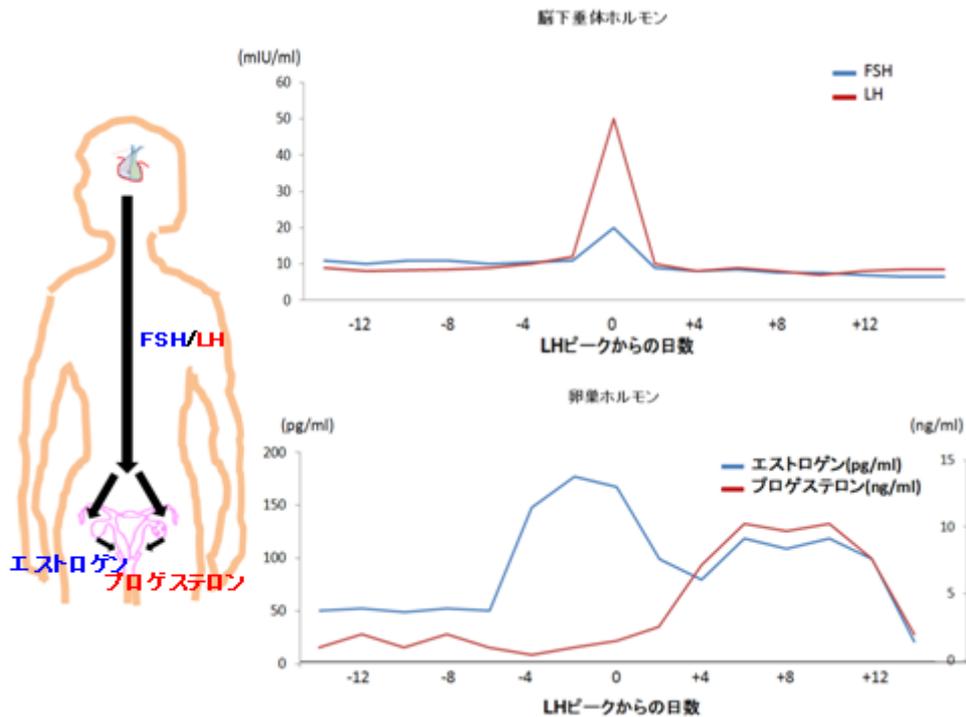
[45] Anasti JN. Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril.*;70:1-15. 1998

[46] Aiman J and Smentek C. Premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* ; 66:9-14. 1985

[47] Kalantaridou, S.N., Davis SR and Nelson LM. Premature ovarian failure.

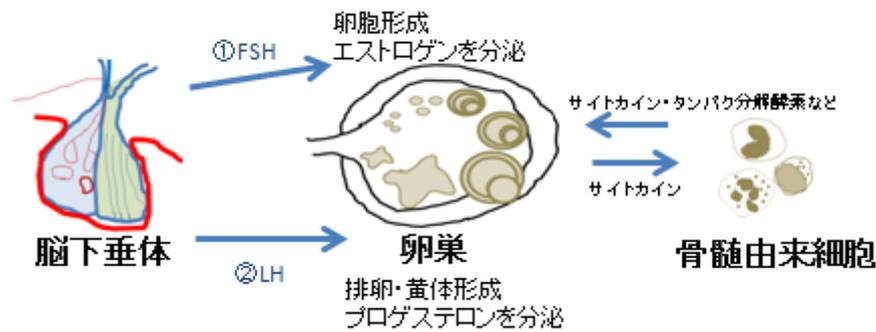
Endocrinol Metab Clin North Am.; 27:989-1006. 1998

[48] Hoek A, van Kasteren Y, de Haan-Meulman M et al. Dysfunction of monocytes and dendritic cells in patients with premature ovarian failure. Am J Reprod Immunol.; 30: 207-217. 1993



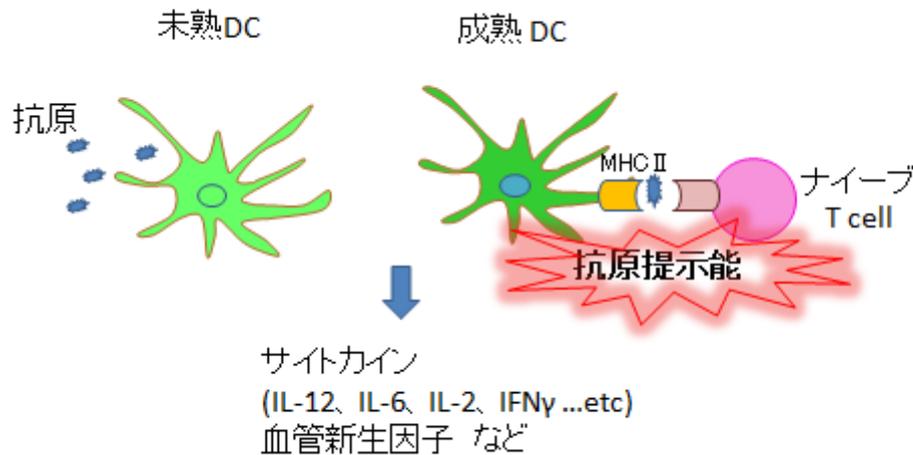
(図 1) 性周期とホルモン変化

性成熟した個体では、脳下垂体から分泌される卵胞刺激ホルモン (FSH) によって卵胞発育が促され、卵胞中の顆粒膜細胞から卵胞ホルモン (エストロゲン) が分泌される。卵胞が成熟すると、下垂体から分泌される黄体化ホルモン (LH) によって、卵胞の黄体化が始まり、排卵が促される。排卵後の卵胞には黄体が生じる。そこで卵巣からはエストロゲンに加えて、黄体ホルモン (プロゲステロン) が分泌されるようになる。エストロゲンとプロゲステロンは協調して子宮内膜に作用し、受精卵の着床に備える。妊娠が成立した場合は、黄体が妊娠黄体となりプロゲステロンの分泌を続けるが、妊娠が成立しなかった場合は、黄体は退縮し、また新たな卵胞形成が始まるといった性周期を繰り返す。



(図 2) 卵巢周期と骨髄由来細胞浸潤

脳下垂体からのホルモン刺激を受けた卵巢は周期的変化を示し、卵胞発育(原始卵胞→一次卵胞→二次卵胞→胞状卵胞あるいは発育が中断された卵胞は閉鎖卵胞となる)・排卵・黄体形成・黄体退縮が起きる。これらは血管／リンパ管新生、血管維持、組織修復など様々なプロセスによって調節されている。一方、卵巢の顆粒膜細胞などは、種々のケモカインが分泌されており、それらのケモカインに応答して、骨髄由来細胞が卵巢に浸潤してくることが知られている。卵巢へ浸潤した骨髄由来細胞は、タンパク質分解酵素やサイトカイン・脈管新生因子を分泌し、このプロセスに関与していることが知られる。



(図 3) 樹状細胞の役割

樹状細胞はマクロファージと並ぶ抗原提示細胞であり、全身に分布し、存在する組織によって表皮中ではランゲルハンス細胞、真皮中では真皮内樹状細胞といった異なったサブセットが存在している。

樹状細胞はこれらの末梢組織において細菌やウイルス、あるいはウイルス感染等によって損傷を受けた細胞の死骸・断片などといった抗原を認識し捕獲し、未熟樹状細胞から成熟樹状細胞に分化し、輸入リンパ管を経由し、所属リンパ節に移動する。

成熟樹状細胞は自己のクラス II 主要組織適合遺伝子複合体分子 (MHCII) 上に抗原を提示し、ナイーブ T 細胞に抗原を提示する。一方、二次リンパ組織内にも樹状細胞サブセットが存在し、これらの樹状細胞はリンパ管を経由してリンパ組織に移動することではなく、リンパ組織に由来する抗原を提示する。

樹状細胞はこのように T 細胞に抗原を提示する一方で、サイトカインの分泌、血管新生・血管維持・リンパ管形成などにも関与していると考えられている。現在樹状細胞が卵巣にどのように機能しているか明らかではない。

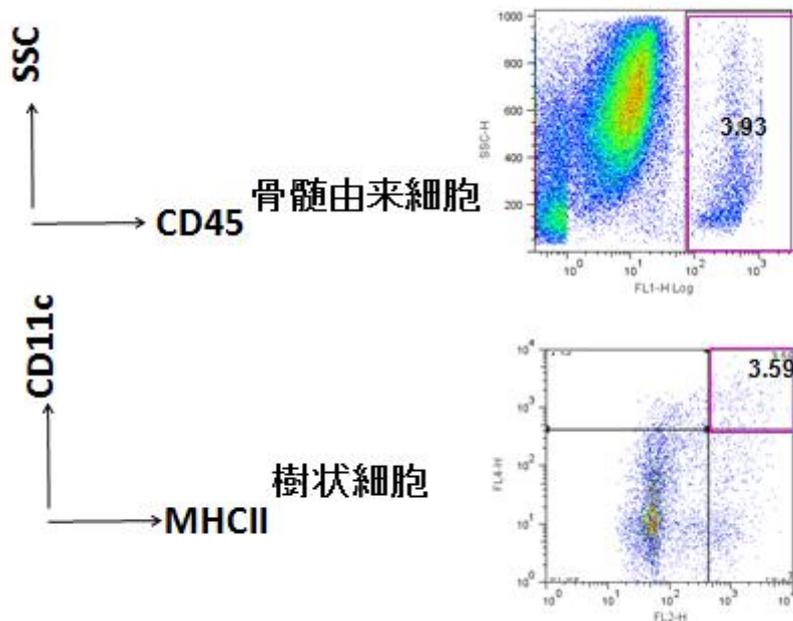


(図 4) 卵巣内樹状細胞量の経時的変化の検討

卵胞発育・排卵・黄体形成に伴う卵巣での樹状細胞の量的経時的変化を評価するために、未熟 BALB/c マウスに PMSG を 10IU 投与、その 48h 後に hCG を 10IU 投与することで、人工的に性周期をつくり、PMSG 投与前、PMSG 投与後 24 時間後かつ hCG 投与前、hCG 投与後 12 時間後、および hCG 投与後 24 時間後の 5 ポイントで卵巣を採取した。

PMSG : pregnant mare serum gonadotropin (妊馬血清性腺刺激ホルモン)。卵胞刺激ホルモン (FSH) 様の作用を示す。

hCG : Human chorionic gonadotropin (ヒト絨毛性腺刺激ホルモン)。黄体化ホルモン (LH) 作用を示す。

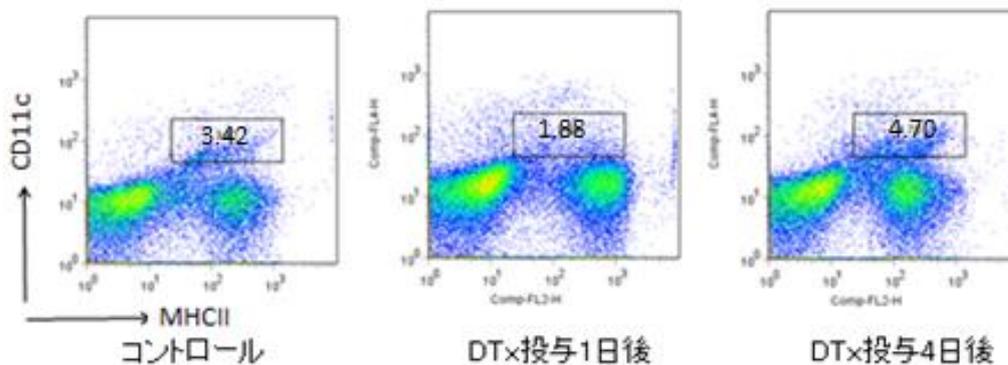


(図5) マウス卵巣内樹状細胞の量的経時的変化の検討

マウス卵巣内樹状細胞の量的経時的変化の検討をフローサイトメトリーを用いて行った。酵素処理にて卵巣の細胞を単離後、抗 CD45 抗体、抗 MHC II 抗体および抗 CD11c 抗体のトリプル染色を行い、前方散乱光、側方散乱光の散布図で生存細胞をゲートした後、CD45 陽性細胞をゲート、次に CD11c⁺MHC II⁺細胞すなわち樹状細胞をゲートし、その卵巣全体の生存細胞に占める割合を算出した。



ii

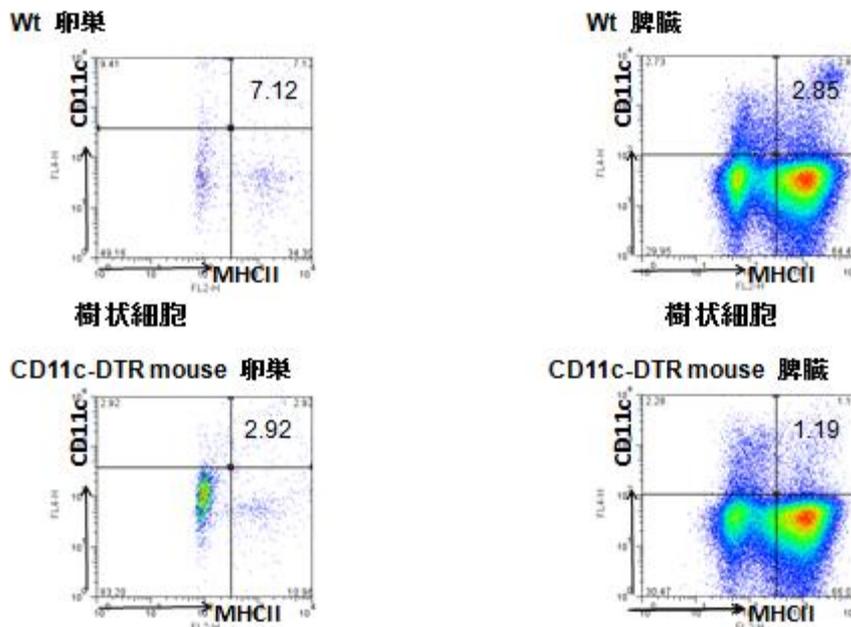


(図 6-1) マウス樹状細胞枯渇モデル

i . CD11c-DTR 遺伝子改変マウスに、ジフテリア毒素 (Diphtheria toxin : DTx) を投与することにより一時的に全身の樹状細胞を枯渇させるモデルを用いた。

ヒトジフテリア毒素受容体 (DTR: Diphtheria toxin receptor) は、DTx との親和性が強く、ヒト DTR を発現する通常のヒト細胞は DTx 投与によりアポトーシスが誘導される。一方、マウス細胞はマウス DTR しか発現しないが、マウス DTR は DTx との親和性が低いため、DTx の存在下でも生存できる。一方、CD11c-DTR 遺伝子改変マウスは、樹状細胞の表面マーカーである CD11c のプロモーター領域にヒト DTR 遺伝子を発現させたものである。DTx の投与により、正常マウス細胞は障害を受けないが、DTR を発現する CD11c 陽性の樹状細胞はアポトーシスに至る。したがって、DTx の投与により一時的な樹状細胞の全身的枯渇を行うことができるモデルである。

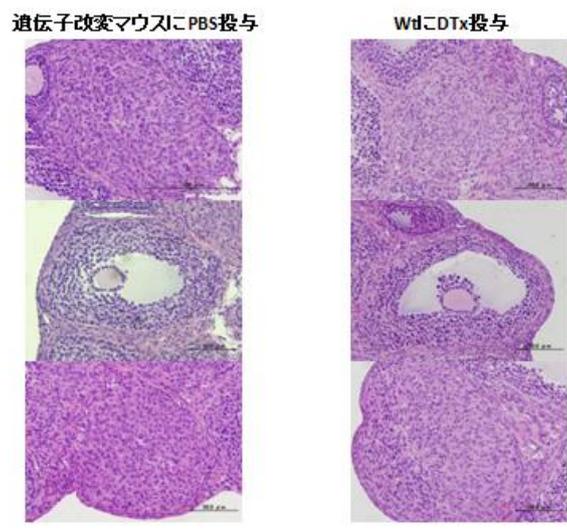
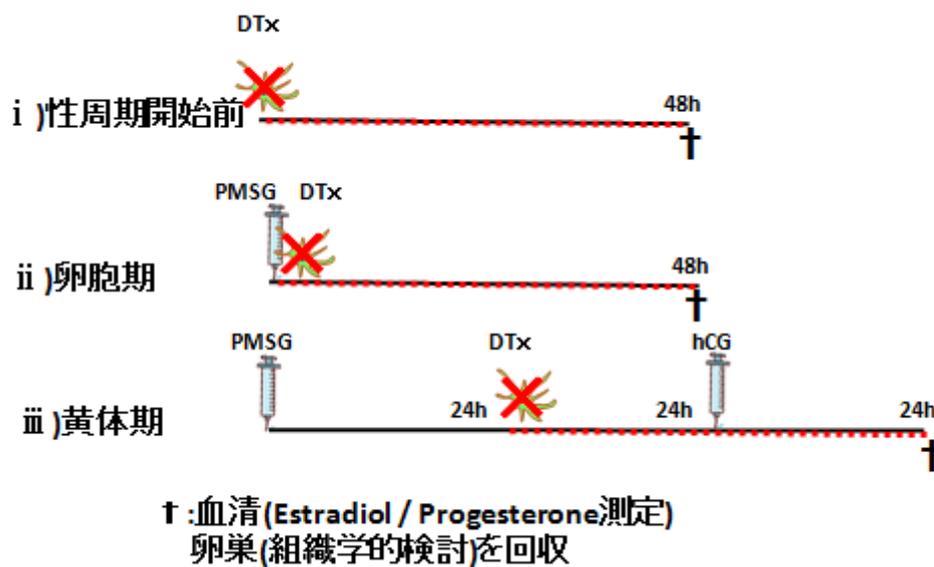
ii . 脾臓を用いた予備実験では、DTx 投与 1 日で、樹状細胞の数は半分以下に減少し、4 日後には投与前の細胞数に回復した。図は、脾臓細胞を抗 MHC II 抗体及び抗 CD11c 抗で染色し、フローサイトメトリーを用いて CD11c⁺MHC II⁺細胞 (樹状細胞) の全細胞中の割合を算出、DTx 投与後の経時的変化を示したものである。



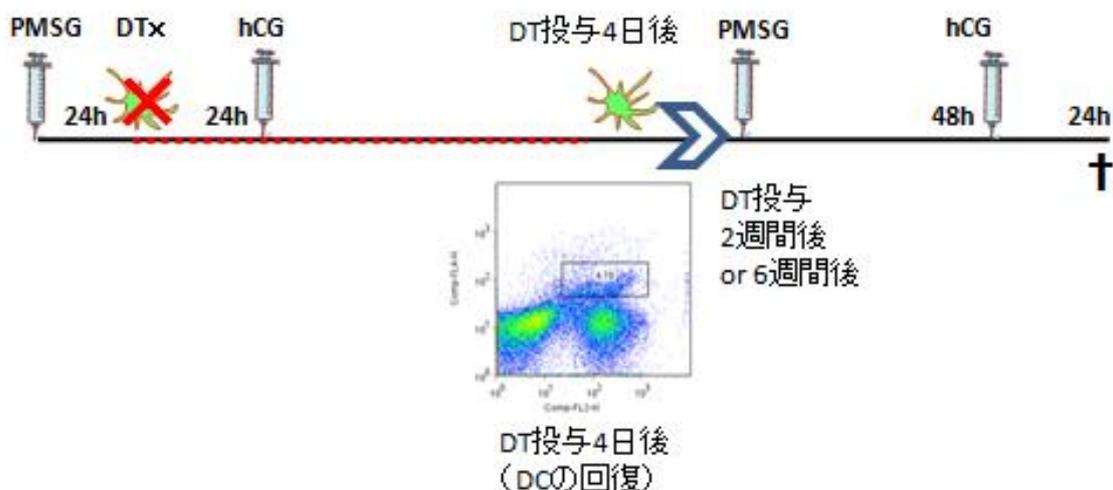
(図 6-2) 卵巣内ジフテリア毒素 (Diphtheria toxin : DTx) の影響
 成熟野生型 (Wt) マウスおよび CD11c-DTR 遺伝子改変マウスにジフテリア毒素 (Diphtheria toxin; DTx) を投与することによる卵巣内における樹状細胞 (CD11c⁺MHC II⁺) への影響をフローサイトメトリーを用いて観察した。

DTx 投与 48 時間後にマウス卵巣およびコントロールとして脾臓を回収し、抗 CD45 抗体・抗 MHC II 抗体・抗 CD11c 抗体で染色を行い、前方散乱光、側方散乱光の散布図で生存細胞をゲートした後、CD45 陽性細胞をゲート、次に CD11c⁺MHC II⁺細胞をゲートしその卵巣および脾臓内 CD45 細胞に占める割合を示した。

DTx の投与により、CD11c⁺MHC II⁺ 細胞は Wt において 7.12% 存在する一方で CD11c-DTR mouse では 2.92% と減少していた。尚、図 6-1 同様、脾臓においても CD11c⁺MHC II⁺ 細胞は Wt において 2.85% 存在する一方で CD11c-DTR mouse では 1.19% と減少していた。

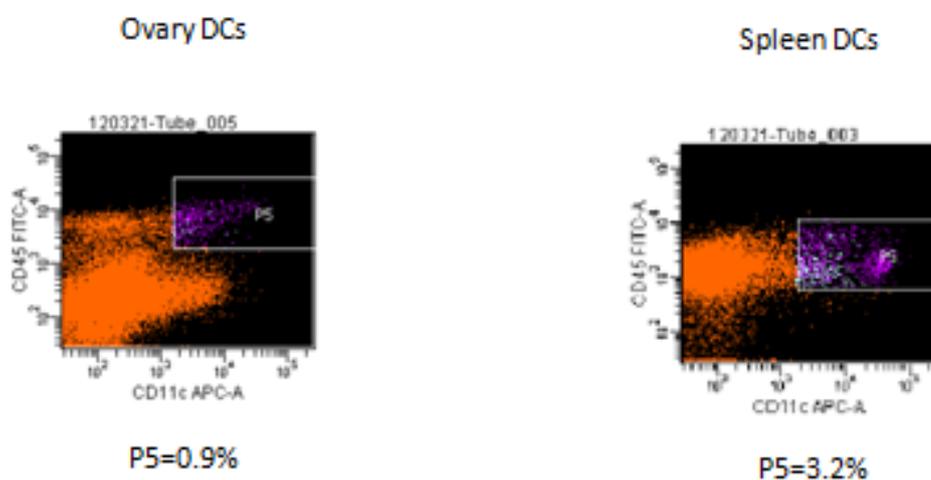


(図 7) マウス卵巢周期における樹状細胞 の機能評価
 図 6-1 に示した遺伝子改変メスマウスを用いて、マウスの各卵巢周期における樹状細胞の関与を調べた。i) PMSG 投与前すなわち性周期開始前、ii) PMSG 投与後 48 時間かつ hCG 投与前すなわち卵胞期、iii) PMSG 投与後 48 時間後に hCG 投与し 24 時間経過後すなわち黄体期、の 3 ポイントで卵巢及び血清を回収した。検体回収の 48 時間前に DTx (WAKO, 5ng/g body weight) を PBS に融解したもの、もしくはコントロールとして PBS のみ、それぞれ 0.1ml を同マウスに腹腔内投与し比較した。なお予備実験では野生型マウスに DTx を投与したものもコントロールとして検討したが、遺伝子改変マウスに PBS を投与したものと同等の結果を示した (HE 染色黄体期卵巢を図に示す)。



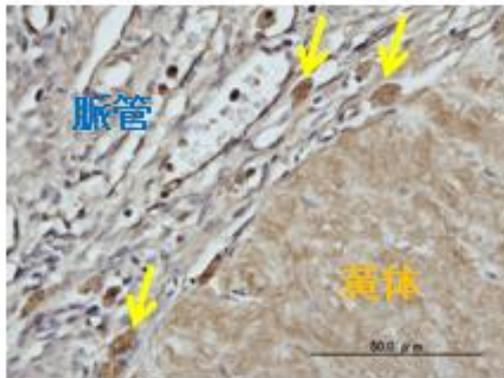
(図 8) 樹状細胞回復後の卵巣機能に対する検討

CD11c-DTR マウスを使用し、PMSG・hCG 投与により排卵・黄体形成を促した時点で DTx により一時的に樹状細胞を枯渇させたマウスをしばらく経過させ、樹状細胞数を回復させた後、樹状細胞枯渇後 2 週間あるいは 6 週間後に PMSG・hCG を投与し卵胞発育・黄体化を試み、それぞれマウス卵巣・血清を回収し卵巣機能の回復を評価した。

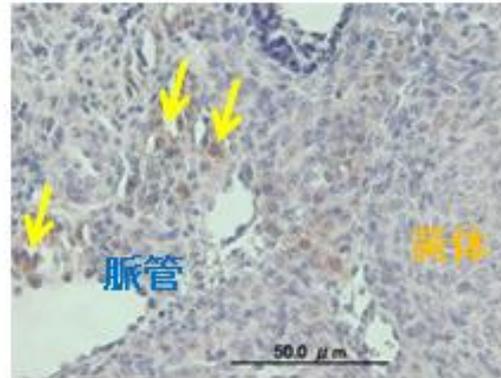


(図 9) マウス卵巣内樹状細胞の分離と mRNA の抽出(血管/リンパ管新生因子発現の検討)

マウス卵巣および脾臓を取り出し、フローサイトメトリー法を用いて CD45+CD11c+MHC II+細胞すなわち樹状細胞のみをソーティングし、得た細胞より mRNA を抽出の後、各血管/リンパ管新生因子の測定を行った。



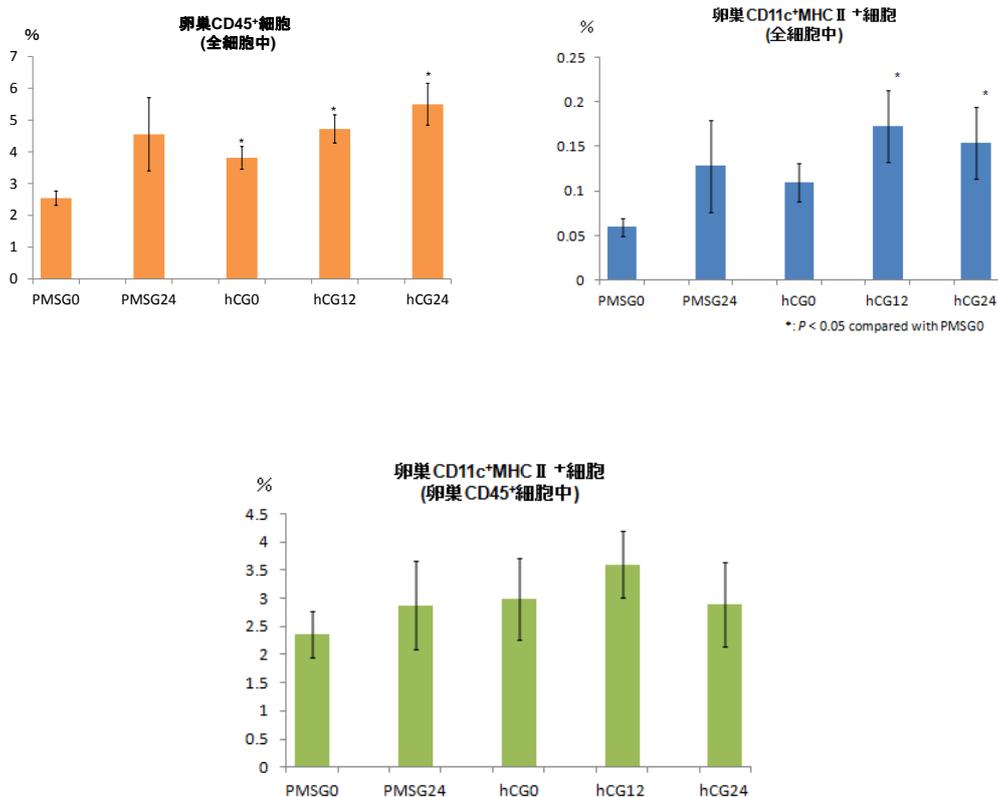
ヒト卵巣樹状細胞(抗CD 83抗体染色)



遺伝子改変CD11c-DTR-GFPマウス卵巣樹状細胞(抗GFP抗体染色)

(図 10) 卵巣内における樹状細胞の存在と局在

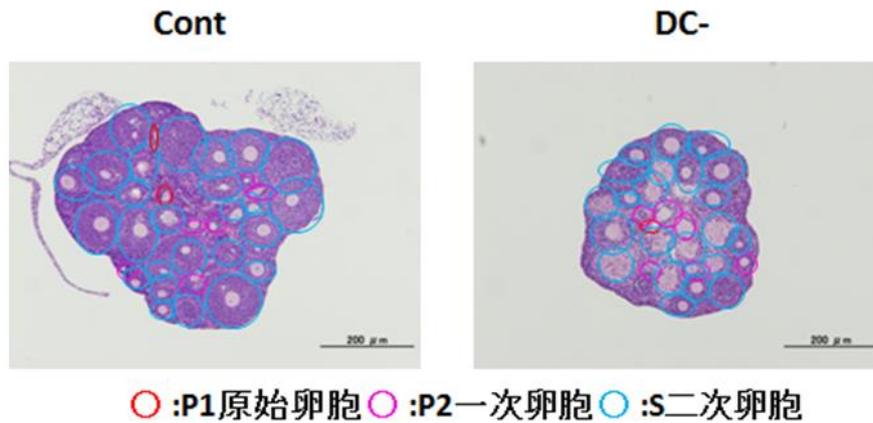
卵巣内における樹状細胞の存在の有無とその局在を確認するため、免疫組織化学染色を行った。ヒト黄体期卵巣については、成熟樹状細胞のマーカーである抗 CD83 抗体で染色し、マウス卵巣については、樹状細胞に特異的プロモーター配列である CD11c にヒトジフテリア毒素受容体 (DTR) と緑色蛍光タンパク質 (GFP) を組み込んだ遺伝子改変 CD11c-DTR-GFP マウスを用いて、樹状細胞を抗 GFP 抗体で染色した。ヒトおよびマウス卵巣において、樹状細胞は脈管周囲に存在していることが明らかとなった。



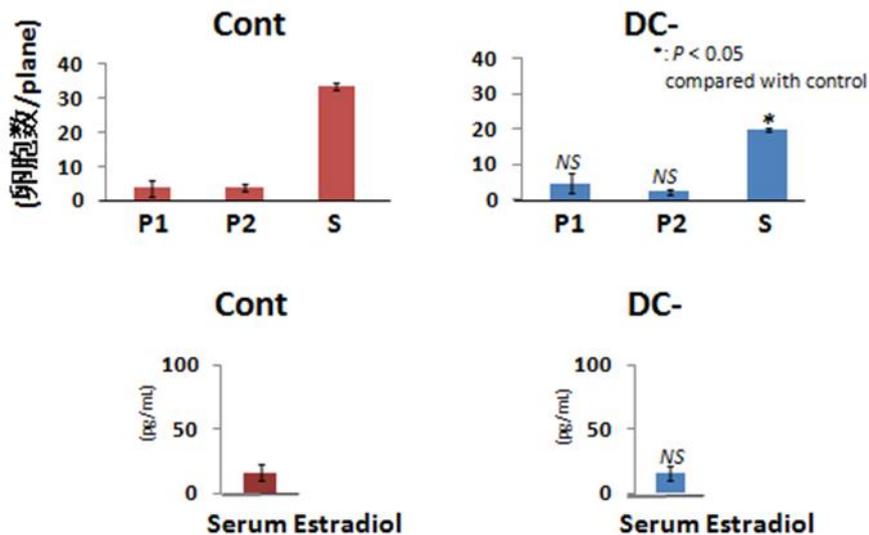
(図 11)PMSG/hCG 投与による人工的性周期における卵巣内 CD45⁺ 細胞および DC の割合の変化

卵巣全細胞中の CD45⁺細胞の割合は、PMSG 投与前 2.54 ± 0.227%; (平均±標準誤差)であったのがPMSG 投与24時間後に4.55 ± 1.15%; (同, P = 0.081) とPMSG 投与前と比較し有意差は認められないものの、その後、3.81 ± 0.356%; (同, P < 0.05)となり、hCG 投与によって12時間後に4.72 ± 0.442%; (同, P < 0.05)までに増加した。その後、hCG 投与24時間後5.49 ± 0.659%; (同, P < 0.05)に増加した。卵巣全細胞中のCD11c⁺MHC II⁺細胞の割合は、PMSG 投与前0.059 ± 0.010%; (平均±標準誤差)であったのがPMSG 投与後に0.127 ± 0.051%; (同, P = 0.13)、0.109 ± 0.021%; (同, P = 0.051)となりPMSG 投与前と比較し有意差は認められないものの、hCG 投与によって12時間後に0.172 ± 0.040%; (同, P < 0.05)までに増加した。その後、hCG 投与12時間後をピークにhCG 投与24時間後では0.154 ± 0.040%; (同, P < 0.05)まで減少したが、PMSG 投与前と比較し有意な増加を示した。卵巣 CD45⁺細胞中の CD11c⁺MHC II⁺細胞の割合では、PMSG 投与前で2.36 ± 0.41%; (平均±標準誤差)であったのがPMSG 投与24時間後で2.87 ± 0.77%; (同, P = 0.29)、PMSG 投与後48時間後で2.98 ± 0.72%; (同, P = 0.25)、hCG 投与後24時間で3.60 ± 0.58 %; (同, P = 0.078)と、PMSG 投与前と比較し有意な増加を示さなかった(n = 3, それぞれPMSG 投与前と比較し Student's t-test を行った)。

i .

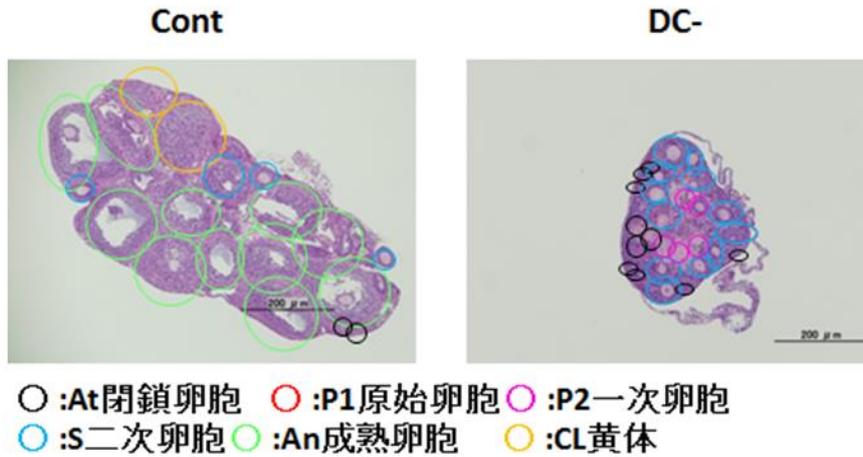


ii .

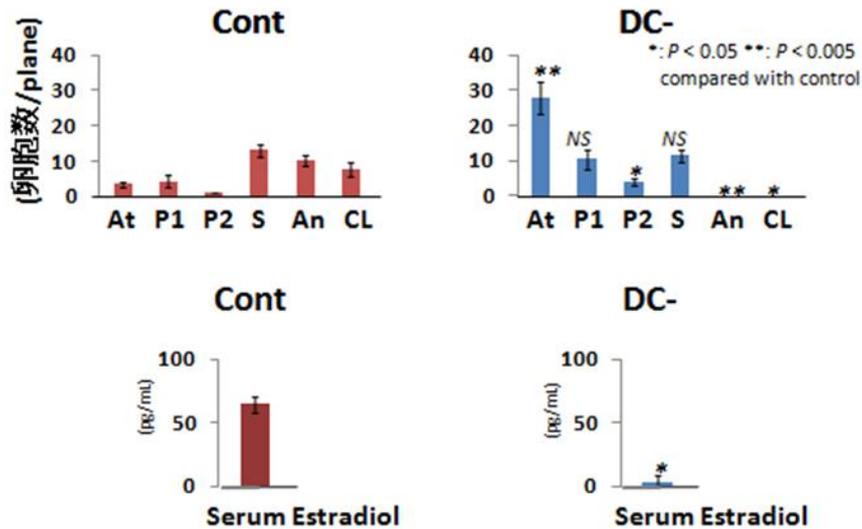


(図12) 性周期開始前の卵巣における樹状細胞枯渇の影響
コントロール群と樹状細胞枯渇群の原始卵胞(P1)・一次卵胞(P2)・二次卵胞数(S)をHE染色切片を用いて数え、比較した(i)。コントロール群(n=7)と比較し、樹状細胞枯渇群(n=6)では二次卵胞数が減少していた(33.4 ± 4.36個 vs 19.83 ± 2.93個;(コントロール vs 樹状細胞枯渇群 平均 ± 標準誤差), P < 0.05)が、原始卵胞、一次卵胞の数には差がなかった。エストロゲン値は両者とも低値であり(16.45 ± 6.07 (pg/mL) vs 15.63 ± 5.74 (pg/mL); (同), P = 0.46)有意差を認めなかった(ii)。

i .



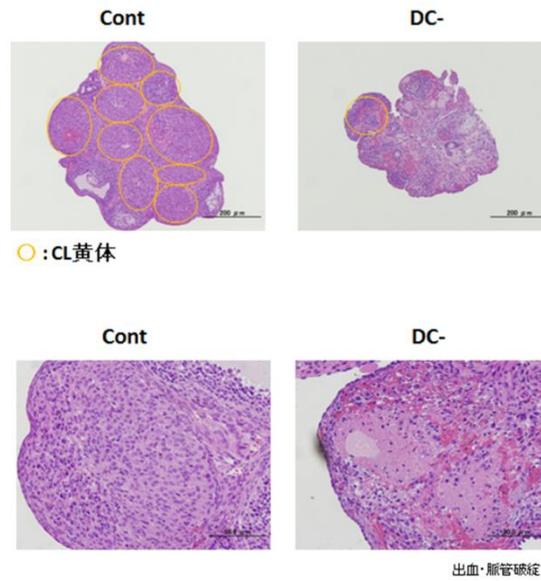
ii .



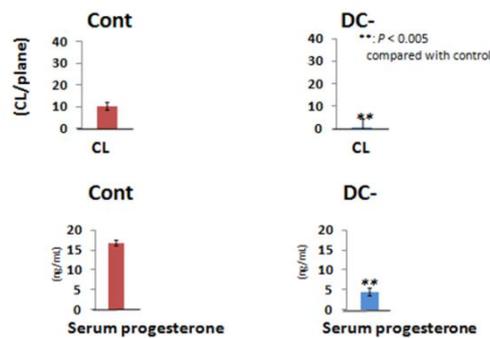
(図13) 卵胞期の卵巣における樹状細胞枯渇の影響

コントロール群と樹状細胞枯渇群の原始卵胞(P1)・一次卵胞(P2)・二次卵胞数(S)・成熟卵胞数(An)および黄体数(CL)、閉鎖卵胞数(At)をHE染色切片を用いて数え、比較した(i)。卵胞期においては、コントロール群(n=6)では、多数の二次卵胞・成熟卵胞さらに黄体も認められたが、樹状細胞を枯渇させたマウス卵巣(n=9)においては成熟卵胞・黄体は殆ど認められず、それに伴い閉鎖卵胞の数が増加しているのが観察された(成熟卵胞 10.16 ± 1.42個 vs 0 ± 0個;(コントロール vs 樹状細胞枯渇群 平均±標準誤差), $P < 0.005$ /黄体 7.50 ± 2.07個 vs 0 ± 0個;(同), $P < 0.005$ /閉鎖卵胞 3.5 ± 0.84個 vs 27.83 ± 4.39個;(同), $P < 0.05$)。血中エストロゲン値も、コントロール群においては上昇を認めるも、樹状細胞枯渇群においては低値のままであった(64.38 ± 23.27(pg/mL) vs 2.67 ± 1.70(pg/mL);(同), $P < 0.05$) (ii)。

i .



ii .

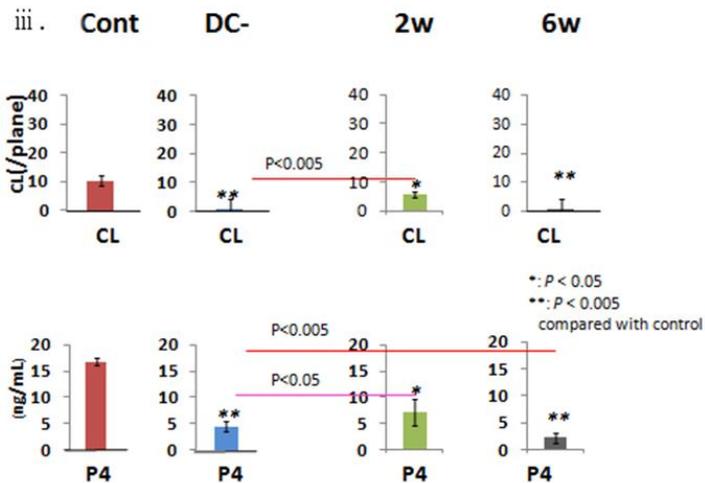
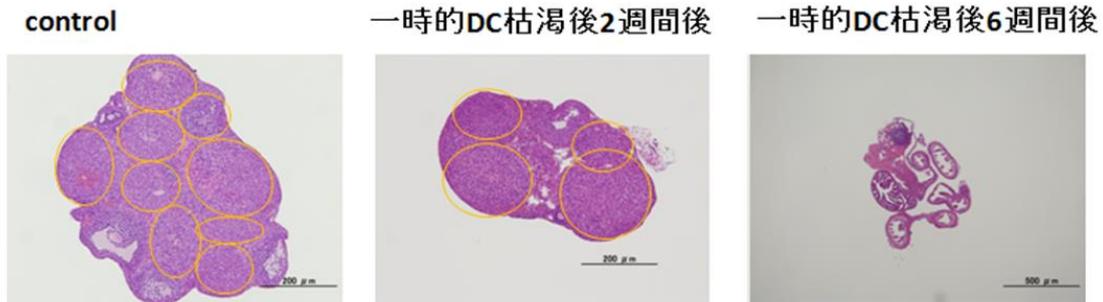


(図14) 黄体期の卵巣における樹状細胞枯渇の影響

黄体 (CL) を HE 染色切片を用いて観察すると、樹状細胞枯渇マウスの卵巣では、出血が顕著で、黄体形成が明らかに障害されており、強拡大では黄体周囲にみられる脈管の構造破綻が観察された (i)。hCG 投与後 24 時間 (黄体期) においては、コントロール群 (n = 6) と比較し樹状細胞枯渇マウスの卵巣 (n = 7) では、出血が顕著で、黄体形成が明らかに障害されていた (黄体 10.2 ± 2.08 個 vs 0.71 ± 0.28 個; (コントロール vs 樹状細胞枯渇群 平均 \pm 標準誤差), $P < 0.005$)。また、血中プロゲステロン濃度もコントロール群に比べ樹状細胞を枯渇させた群では、統計学的有意に低値であった (16.73 ± 1.81 (ng/mL) vs 4.49 ± 0.71 (ng/mL); (同), $P < 0.005$) (ii)。

i. 一時的DC枯渇後2週間後

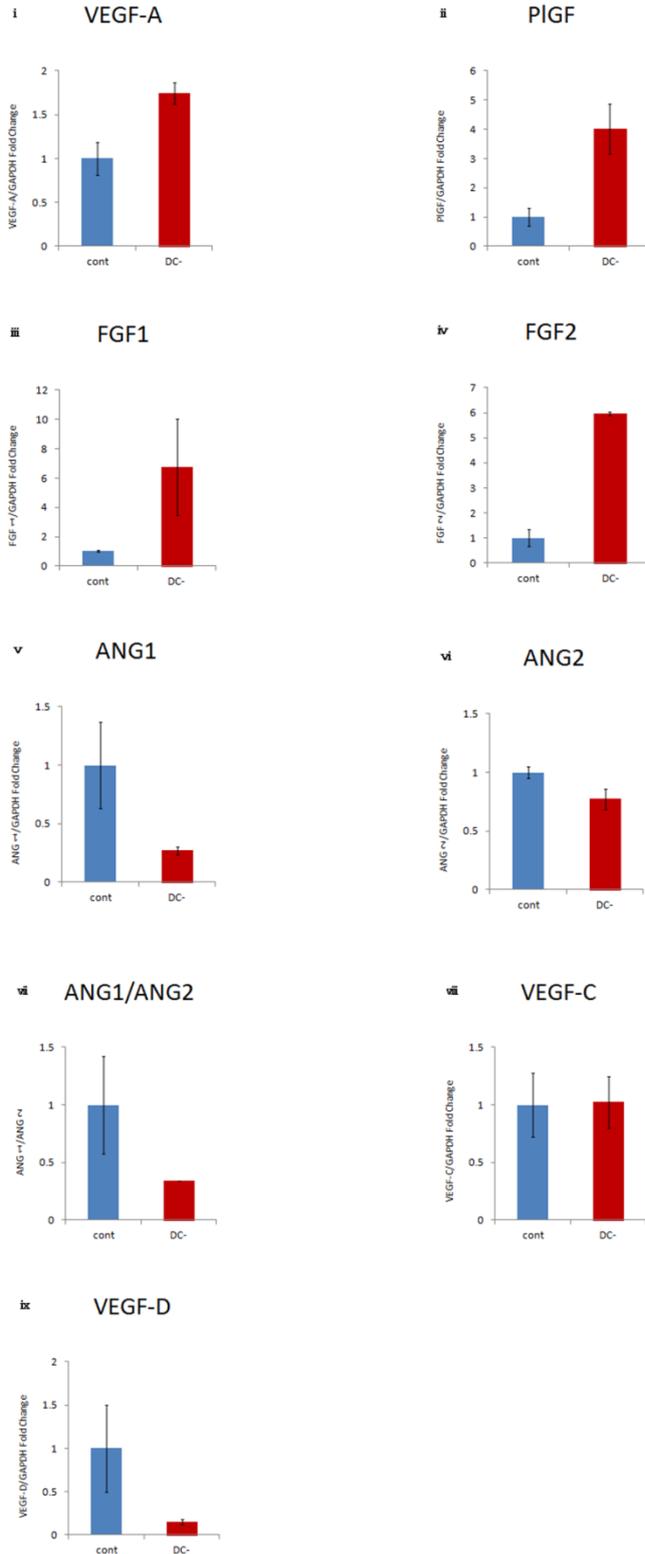
ii. 一時的DC枯渇後6週間後



(図15) 樹状細胞回復後の卵巣機能に対する検討結果

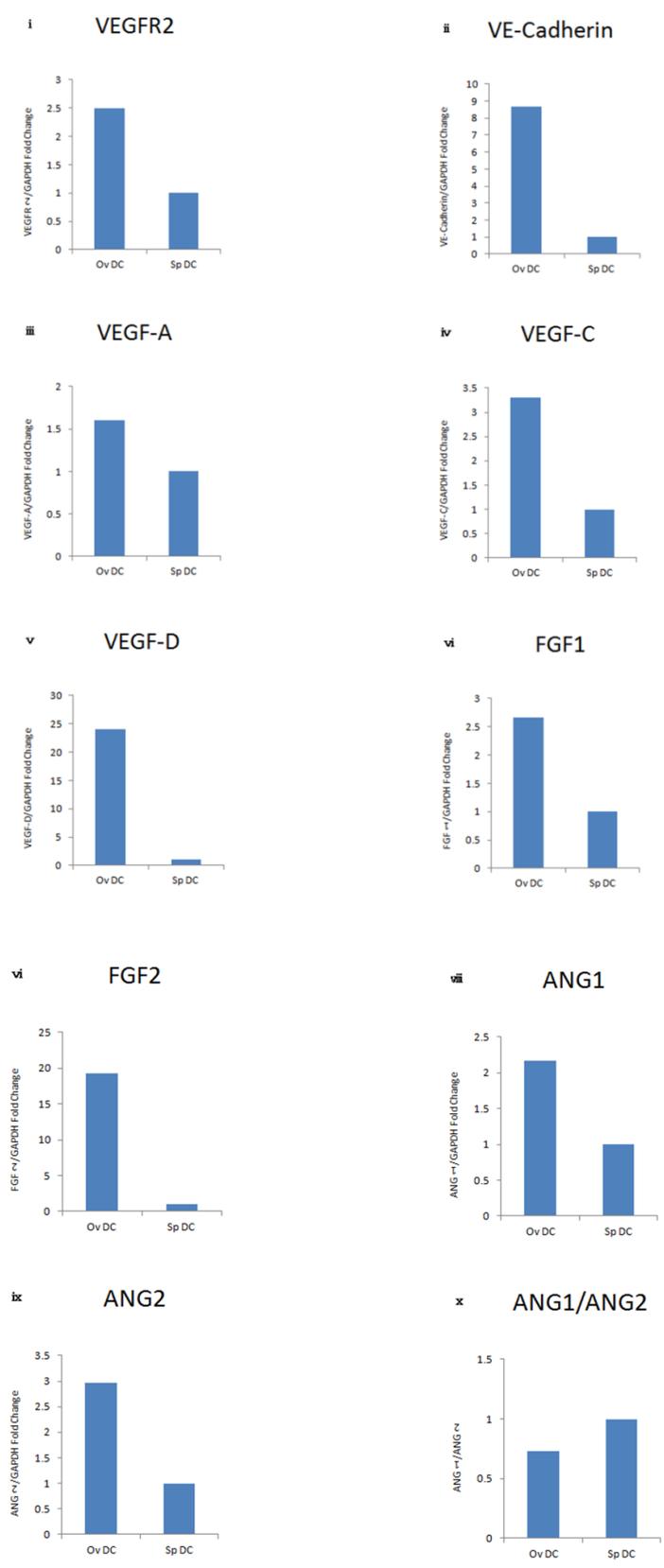
単回ジフテリア毒素投与2週間後の卵巣(n=8)ではHE染色切片を用いて比較すると黄体(CL)数はコントロールより少数であった(i)。単回ジフテリア毒素投与6週間後の卵巣(n=2)HE染色切片においては黄体を認めなかった(ii)。

組織学的検討と同様にプロゲステロン(P4)値の計測においても、単回ジフテリア毒素投与後2週間経過すると一旦はプロゲステロン値はやや回復するものの、6週間経過するとPMSG・hCGを投与しても黄体化が生じず、プロゲステロン値は低値であった(iii)。

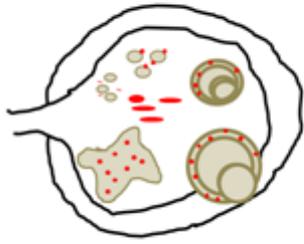


(図 16) 樹状細胞が卵胞発育・排卵・黄体形成に関与する機序の検討(血管/リンパ管新生・維持への関与の検討)① 樹状細胞を枯渇させた卵巣(DC-) とコントロール群卵巣組織(cont) より得られた mRNA を用いて各種脈管新生/維持因子につき検討を行った。結果、VEGF-A (i)、PlGF (ii)、FGF-1 (iii) および FGF-2 (iv) では樹状細胞を枯渇させた卵巣において発現量が増大している傾向を認めた。VEGF-C に関しては樹状細胞枯渇卵巣では差を認めなかった (vii)。VEGF-D (ix)、ANG1/ANG2 (vii) は樹状細胞を枯渇させた卵巣において発現量が減少している傾向をみとめた(平均 ± 標準誤差, n=2)。

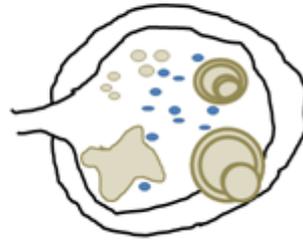
これらについては今後サンプル数を増やして統計学的有意差の検定を行う予定である。



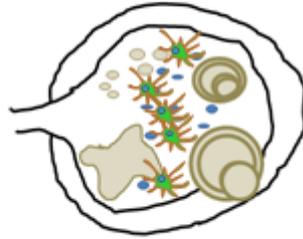
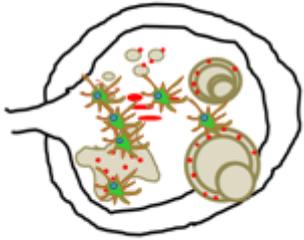
(図 17) 樹状細胞が卵胞発育・排卵・黄体形成に関与する機序の検討(血管/リンパ管新生・維持への関与の検討)②
 卵巣 (Ov DC) および脾臓 (Sp DC) より樹状細胞をソーティングし、血管/リンパ管新生・維持に関与する因子につき mRNA 発現を比較した。血管内皮細胞的性格を表す VEGFR2 (i) および VE-Cadherin (ii) の発現は脾臓樹状細胞に比し、卵巣樹状細胞で発現量が高かった。その他、各血管・リンパ管新生因子である VEGF-A (iii)、VEGF-C (iv)、VEGF-D (v)、FGF-1 (vi)、FGF-2 (vii) に関しては卵巣樹状細胞での発現を多く認めたが、ANG1/ANG2 では差を認めなかった(x)。この実験系は一度だけ実験を試みて得られた結果を提示し、統計学的検討は行っていない。



血管



リンパ管



(図18) 樹状細胞の卵胞形成及び黄体形成・維持における役割

卵巣は月経周期ごとの周期的変化を起こすが、それには血管・リンパ管の新生・リモデリングが必須である。実際、血管やリンパ管は各卵胞周囲に局在している。

本実験において樹状細胞を枯渇させると、卵胞・黄体形成障害や脈管構造の破壊がみられる事より樹状細胞は血管新生因子やリンパ管形成因子を分泌、あるいは自らがその一部を構成することにより、卵巣機能に関与していると考えられる。