

論文の内容の要旨

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

性成熟した雌個体では、脳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 (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。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。

この卵胞発育 (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・黄体退縮というダイナミックな周期的変化は血管/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。このプロセスのなかで、卵巣の顆粒膜細胞などが種々のケモカインを分泌し、それらのケモカインに応答して、骨髄由来細胞が卵巣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、このプロセスに関与していることが知られる。

骨髄由来細胞の一つである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、輸入リンパ管を經由し、所属リンパ節に移動する。成熟樹状細胞はナイーブ T 細胞に抗原を提示する。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。

本研究では卵巣における樹状細胞 (DC) の役割について検討した。まず、ヒト卵巣およびマウス卵巣を DC 特異的抗体 (ヒト成熟樹状細胞のマーカである抗 CD83 抗体、CD11c-DTR-GFP マウスを用いて抗 GFP 抗体を使用) で染色した結果、それぞれの卵巣において DC は存在しており、主に脈管周囲に局在していることを確認した。次に卵胞形成・排卵・黄体化に伴う卵巣での DC の量的経時的変化を評価するために、未熟マウスに 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 作用のあるヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin; hCG) の投与を行い、人工的卵巣周期を作り、抗 CD11c 抗体、抗 MHC II 抗体で染色しフローサイトメトリー法を用いて検討した。その結果、卵巣における CD11c⁺MHC II⁺細胞すなわち DC の数は、卵胞発育・黄体形成過程において増加しており、卵胞発育・排卵・黄体形成・黄体維持に何らかの関与をしている可能性が示唆された。

次に DC の卵巣における機能の評価を行うため、CD11c-DTR-GFP 遺伝子改変未熟マウスにジフテリア毒素 (DTx) を投与し一時的に DC を枯渇し、卵胞発育および卵巣ホルモン (エストロゲン・プロゲステロン) を対照群と比較した。その結果、DC 枯渇群は性周期前には対照群と差を認めなかった。卵胞期においては、対照群では、多数の二次卵胞・成熟卵胞さらに黄体も認めしたが、DC 枯渇マウス卵巣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た。これと一致して血中エストロゲン値も、対照群においては上昇を認めるも、DC 枯渇群においては低値のままであった。黄体期においては、DC 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いた。また、血中プロゲステロン濃度も、DC 枯渇群では、対照群に比べ低値であった。

さらに DC 回復後の卵巣機能に対する検討を加えるため、CD11c-DTR マウスを使用し、PMSG・hCG の投与により排卵・黄体形成を促した時点で DTx により一時的に DC を枯渇させたマウスを放置し、DC 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、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。結果、コントロールと比較し DC 回復 2 週間後の卵巣では黄体数が少数であったが、前述の実験で行った黄体形成中に DC を枯渇させたマウスの卵巣と比較すると、黄体数は多かった。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 DC 渇

後 2 週間後のマウスでは低値であったものの、黄体形成中に DC を枯渇させたマウスと比較すれば高値であった。一方、DC 回復後 6 週間後の卵巣においては黄体を認めず、血清中プロゲステロン値も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。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。

卵巣中の DC が組織学的に脈管周囲に多く存在していたことや、DC 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、DC 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、DC 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。卵巣および脾臓より DC を抗 CD11c 抗体、抗 MHC II 抗体で染色しフローサイトメトリー法を用いてソーティングし、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。結果、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、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、本研究でも卵巣内樹状細胞の、各血管・リンパ管新生因子である 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、卵巣内の樹状細胞が、脈管形成／維持に関与している可能性が示唆された。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。

次に、DC 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 PIGF、VEGF-A、FGF-1 および FGF-2 では DC 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 DC 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 DC 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。

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巣に増加し、卵胞発育・排卵・黄体形成・黄体維持において必須であり、その機序として、血管／リンパ管新生・維持を介していることが予想された。今後はこの機序に関してさらなる検討を加えたい。また臨床的には DC の機能が早発卵巣機能不全や黄体機能不全といった病態に関連があることが示唆され、DC の制御によるこれらの病態の制御の可能性についても、今後研究を進めて行きたいと考えている。