

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15610

研究課題名(和文) CRISPR/CAS9を用いた子宮筋腫発生モデルの開発

研究課題名(英文) Development of uterine leiomyoma model using CRISPR/CAS9 genome editing system

研究代表者

丸山 哲夫 (MARUYAMA, Tetsuo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：10209702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：正常子宮平滑筋組織から分離した子宮平滑筋細胞には、分離直後は幹様細胞が多く存在するが、その後培養を続けると幹様細胞は激減した。そこで、幹様細胞ではなく正常子宮平滑筋細胞に対して、CRISPR/CAS9システムを用いて子宮筋腫の約70%に存在するMED12変異の導入を試みたところ、MED12変異導入細胞が得られた。これを用いて子宮筋腫に特徴的なホルモン依存性の細胞増殖とコラーゲン発現について調べた。MED12変異導入細胞では野生型と比較して増殖に影響はなかったが、変異及びホルモン依存的にコラーゲン発現の増加傾向が認められた。現在in vivo子宮筋腫モデルの作製を進めている。

研究成果の概要(英文)：Uterine myometrial cells contained a small but significant amount of stem-like cells immediately after isolation from human myometrial tissues. The number of the stem-like cells, however, decreased considerably when they are cultured in vitro. Instead of myometrial stem-like cells, we introduced MED12 mutations, which are observed in approximately 70% of uterine leiomyomas, into human myometrium cells using CRISPR/CAS9 system, and analyzed hormone-dependent cell proliferation and collagen expression. Preliminary data showed that MED12 mutation did not affect cell growth but tended to induce collagen expression. In vivo leiomyoma model system is under development.

研究分野：生殖内分泌、婦人科腫瘍

キーワード：子宮筋腫 MED12 CRISPR/CAS9

### 1. 研究開始当初の背景

子宮筋腫は子宮平滑筋細胞を主な構成成分とする良性腫瘍であり、子宮筋中あるいはその周辺に発生することが知られている。子宮筋腫は卵巣ステロイドホルモン依存性の疾患であることから、社会的活動性の高い30-40代女性で30-40%と高い確率で認められる。時に過多月経や圧迫症状などにより女性のQOLを損ない、不妊症や不育症の原因にもなり得る疾患である。

子宮筋腫の発生に関しては単一細胞由来であることが示され、また筋腫の40%で染色体構造異常が確認されている。さらに近年、筋腫の約70%にMED12の変異が存在することが判明した。さらに組織内における平滑筋腫においてMED12の変異は子宮筋腫でしか認められていない。しかしながらMED12変異が子宮筋腫の原因か結果かなどは明らかとなっていない。そこでヒト平滑筋細胞の幹様細胞または非幹様細胞においてMED12の変異を導入し、*in vivo*筋腫発生モデルを開発する経緯に至った。筋腫発生に関与していれば、そのメカニズム解明にも寄与し、子宮筋腫の根治を目指した新しい治療法の開発にも貢献すると考える。

### 2. 研究の目的

CRISPR/CAS9システムを用いた子宮筋腫発生モデルの開発とそれを用いたMED12の病的意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

CRISPR/CAS9システムを用いた子宮筋腫発生モデルの開発において以下の実験を行った。(1)子宮平滑筋細胞における幹様細胞の同定を行うためFACS法によるside population (SP)細胞およびCD34+/CD49f+細胞の分離・免疫蛍光染色による発現解析及びリアルタイムRT-PCR法による機能解析を行った。(2)子宮平滑筋細胞をレンチウイルスベクター感染によりGFPを発現させた。characterizationのために、免疫蛍光染色、シーケンス解析、染色体検査を行った。(3)MED12の変異についてS-VAR解析で変異が蛋白質機能へ起こす影響を調べた。CRISPR/CAS9システムによりMED12の変異体を子宮筋腫で多く発生している上位2位までの2種類を作成し、シーケンス解析で確認した。このMED12変異株の増殖をMTS解析によって、コラーゲン発現をリアルタイムRT-PCRによって解析を行った。

### 4. 研究成果

手術検体より単離直後の子宮平滑筋細胞には、SP細胞およびCD34+/CD49f+細胞が存在し、これらが幹細胞特性を有することは確認したが、手術検体の子宮平滑筋組織から得られた平滑筋細胞を培養した後にレンチウイルスでGFPを導入した細胞では、高い増殖能は認められるものの、極めて少数のSP細胞およびCD34+/CD49f+細胞しか存在していなかった。この少数の幹細胞量では引き続

いての幹細胞特性の検証や確認は困難であった。

そこで平滑筋幹細胞に拘泥せず、子宮筋腫モデルの構築を試みることにした。まず、レンチウイルスを用いてGFPで標識したヒト正常子宮平滑筋組織由来細胞のcharacterizationを先ず行った。これらの細胞が、多数の継代を経ても高い増殖能を示し、さらに平滑筋分化マーカー、エストロゲン受容体、およびプロゲステロン受容体を発現することを明らかにした。また、Gバンド法による染色体検査にて、染色体に異常を認めないことも確認した。これらの細胞を重度免疫不全マウスの腎被膜下に移植すると、組織容積は小さいながらも子宮平滑筋様組織を構築することも示した。以上から、この細胞は子宮平滑筋の特性を有する細胞として、今後の子宮筋腫発生モデルを作成するに適した出発材料であることが示された。これまで子宮平滑筋腫(子宮筋腫)の約70%にMED12遺伝子の変異が存在することが知られており、マウスにおいて子宮特異的にCre-loxPシステムを用いてMED12に変異を入れると子宮筋腫様組織が発生することが、本研究プロジェクトを申請した後に発表された(Mittal P, et al., J Clin Invest, 2015)。しかしヒト子宮由来の細胞において、MED12変異が筋腫発生の原因になり得るかは示されていないため、我々は、CRISPR/CAS9システムを用いて、上記ヒト由来GFP標識平滑筋細胞にMED12変異を導入することを試みた。最も頻度の高い上位2つのMED12の変異を導入することに成功した。これらの細胞に対して増殖能を調べたところ、変異の有無にかかわらず増殖への影響は認められなかった。そこで子宮筋腫組織で発現の高いコラーゲンをリアルタイムRT-PCR法を用いて解析したところ、MED12変異株でコラーゲン発現の上昇傾向が認められた。さらにエストロゲン(E)プロゲステロン(P)同時投与によりコラーゲン発現の増加傾向が認められた。現在、これらの細胞をコラーゲン包埋し、免疫不全マウスの腎被膜下へ移植し*in vivo*子宮筋腫モデル実験を進めている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① **丸山哲夫**:産婦人科領域における再生医学・再生医療の現状. 臨床婦人科産科 2017; 71(2): 268-272. 査読無  
URL:  
<http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.11477/mf.1409208968>
- ② Hellström M, Moreno-Moya JM, Bandstein S, Bom E, Akouri RR, Miyazaki K, **Maruyama T**, Brännström M:

- Bioengineered uterine tissue supports a pregnancy in a rat model. **Fertil Steril**. 2016; 106(2): 487-496. 査読有 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.03.048.
- ③ Masuda H, Maruyama T, Gargett C, Miyazaki K, Matsuzaki Y, Okano H, Tanaka M: Endometrial side population cells: potential adult stem/progenitor cells in endometrium. **Biol Reprod**. 2015; 93(4): 84. 査読有 DOI: 10.1095/biolreprod.115.131490.
- ④ Maruyama T: Stem cells in the uterus: past, present and future. **Semin Reprod Med**. 2015; 33(5): 315-316. 査読無 DOI: 10.1055/s-0035-1563408.
- ⑤ Gurung S, Deane JA, Masuda H, Maruyama T, Gargett CE: Stem cells in endometrial physiology. **Semin Reprod Med**. 2015; 33(5): 326-332. 査読有 DOI: 10.1055/s-0035-1558405.
- ⑥ Bulun SE, Moravek MB, Yin P, Ono M, Coon V JS, Dyson MT, Antonia N, Marsh EE, Zhao H, Maruyama T, Chakravarti D, Kim JJ, Wei JJ: Uterine leiomyoma stem cells: linking progesterone to growth. **Semin Reprod Med**. 2015; 33(5): 357-365. 査読有 DOI: 10.1055/s-0035-1558451.
- ⑦ Cervelló I, Santamaría X, Miyazaki K, Maruyama T, Simón C: Cell therapy and tissue engineering from and toward the uterus. **Semin Reprod Med**. 2015; 33(5): 366-372. 査読有 DOI: 10.1055/s-0035-1559581.
- ⑧ Ono M, Maruyama T: Stem cells in myometrial physiology. **Semin Reprod Med**. 2015; 33(5): 350-356. 査読有 DOI: 10.1055/s-0035-1563602.
- ⑨ [第 68 回日本産科婦人科学会優秀論文賞 (生殖医学部門)] Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Uchida S, Ota K, Nagashima T, Masuda H, Miyazaki K, Asada H, Hida N, Mabuchi Y, Morikawa S, Ito M, Bulun SE, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y, Maruyama T: CD34 and CD49f double-positive and lineage marker-negative cells isolated from human myometrium exhibit stem cell-like properties involved in pregnancy-induced uterine remodeling. **Biol Reprod**. 2015; 93(2): 1-9. 査読有 DOI: 10.1095/biolreprod.114.127126.
- ⑩ 丸山哲夫, 小野政徳: ヒト子宮の平滑筋および平滑筋種における幹細胞 — 妊娠から子宮筋腫まで —. **日本生殖内分沁学会雑誌** 2015; 20: 29-33. 査読無 URL: [http://jsre.umin.jp/15\\_20kan/20-11review5.pdf](http://jsre.umin.jp/15_20kan/20-11review5.pdf)
- [学会発表] (計 8 件)
- ① [招請シンポジウム] Masanori Ono, Tetsuo Maruyama, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki, Serdar E. Bulun: Role of stem cells in pathophysiology of uterine leiomyoma. 5th Asian Conference on Endometriosis (ACE2016). September 22, 2016, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
- ② [招請講演] Tetsuo Maruyama: Bioengineered uterus and endometrial reconstruction by stem cells. 21st The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) World Congress of Gynecology and Obstetrics. October 4-9, 2015, Vancouver (Canada).
- ③ [第 84 回 北里賞受賞講演] 丸山哲夫: 雌性生殖器官の幹細胞システムの解明と再生医学への展開. 第 84 回北里記念式 慶應義塾大学医学部 (東京都・新宿区) 2015 年 6 月 23 日
- ④ Kaoru Miyazaki, Yuki Ueno, Hiroataka Masuda, Hiroshi Uchida, Tetsuo Maruyama: Decellularized uterine matrix can promote uterine regeneration in vivo without immune rejection upon allotransplantation. International Federation of Fertility Societies / Japan Society for Reproductive Medicine (IFFS / JSRM) International Meeting 2015. April 26-29, 2015, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑤ 小野政徳, 丸山哲夫, セルダーブルン: 性ステロイドは WNT/ $\beta$ -カテニンシグナルを介して子宮筋腫を發育させる. 第 88 回日本内分沁学会 ホテルニューオータニ (東京都・千代田区) 2015 年 4 月 23-25 日
- [図書] (計 3 件)
- ① Ono M, Maruyama T, Fujiwara H, Bulun SE: Stem cells and uterine fibroids. "Uterine Fibroids and Adenomyosis" eds: Konishi I, Katabuchi H. Springer, Japan. in press, 2017.

- ② **Maruyama T**: Stem/Progenitor Cells in the Human Endometrium. “**Uterine endometrial Function**” ed. Kanzaki H. Springer, Japan. 2016, 139-155.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室・生殖内分泌研究室

URL:

<http://www.obgy.med.keio.ac.jp/research/03rep-endo.php>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸山 哲夫 (MARUYAMA, Tetsuo)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：10209702

### (2) 研究分担者

内田 浩 (UCHIDA, Hiroshi)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：90286534

升田 博隆 (MASUDA, Hirotaka)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：80317198

小野 政徳 (ONO, Masanori)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号：70348712

荒瀬 透 (ARASE, Toru)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号：20348709

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

高尾 知佳 (TAKAO, Tomoka)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号：40612429