

令和元年6月14日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11147

研究課題名(和文)細胞外マトリックス蛋白欠損による骨盤臓器脱マウスモデルに対する幹細胞治療の試み

研究課題名(英文) Establishment of pelvic organ prolapse model mice by knockout of extracellular matrix protein and stem cell therapy

研究代表者

古山 将康 (Koyama, Masayasu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00183351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨盤臓器脱手術検体を用いて細胞外マトリックス関連遺伝子(fibulin-5, ITG)の発現低下を認めた。骨盤臓器脱発症の分子メカニズムが変異している可能性を示した。CRISPR Cas9システムでfibulin-5のノックアウトマウスを作成した。ガイドRNAを作成し、Cas9タンパク質とともにマウス胚に投与し、偽妊娠子宮に移植し、標的遺伝子配列の変異を確認した。ホモ接合体は分娩後に膈壁菲薄化と骨盤臓器脱を来した。弾性繊維染色で膈壁周囲の弾性線維が減少した。しかし、ホモ接合体のマウスの維持が不安定のため遅れが出ており、間葉系幹細胞のES細胞を調整し、遺伝子治療の可能性を検討中の段階である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化や妊娠・分娩は骨盤底臓器の弛緩を惹起し、骨盤臓器脱や下部尿路症状は女性の生活の質を低下させる。骨盤臓器脱は分娩や外傷などの物理的誘発因子と組織学的な骨盤底の結合組織や細胞外マトリックスの変化を伴う遺伝的な因子などの複合的な疾病であるが、前者の疫学的研究は進んでいるが、後者の因子の解明は進んでいない。骨盤底支持機構における細胞外マトリックスの蛋白レベルの研究は本分野の解明に大きく寄与すると考えられる。本研究ではノックアウトマウスを用いた骨盤臓器脱発症に関連する蛋白のリモデリングの解析を行い、骨盤臓器脱を個別化し、幹細胞移植をターゲットとした治療を開発することが可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on extracellular matrix proteins (ECM), we found that expression of extracellular matrix-associated protein genes (fibulin-5, ITG) decreased as pelvic organ prolapse (POP) progressed, using human specimens from POP. The molecular mechanism of POP progress was related abnormality of ECM. Based on this knowledge, knockout mice of fibulin-5 was made using CRISPR Cas9 system. Guide RNA targeting the mouse fibulin-5 gene was prepared, microinjected into mouse embryos along with Cas9 protein and implanted into the uterus of pseudo pregnant mice. DNA sequence revealed a mutation in the target gene sequence in approximately 50% of the mice. Homozygotes developed POP after delivery in mice. HE stains showed thinning of the vaginal wall and elastic fibers around the vaginal wall tended to decrease. However, because the maintenance of homozygous mice is unstable, the possibility of gene therapy is currently being examined by preparing mesenchymal stem cell stem cells.

研究分野：産婦人科学

キーワード：骨盤臓器脱 細胞外マトリックス 子宮脱 膀胱瘤 fibulin-5 ノックアウトマウス 幹細胞移植

## 1. 研究開始当初の背景

女性の骨盤底には膀胱、直腸という排泄機能をもつ重要臓器が存在し、膀胱と直腸の間には会陰、膣、子宮という生殖器が位置する。これらの骨盤底臓器は内骨盤筋膜によって互いに結合し、骨盤底筋群によって支持されているが、立位で活動する霊長類では骨盤臓器の下垂、脱出をきたしやすい構造となっている。子宮脱で代表される骨盤臓器脱は妊娠・分娩などの誘発因子、ホルモン低下（更年期障害）や加齢（非代償因子）、肥満・便秘などの生活習慣病などの助長因子によって骨盤底筋および筋膜構造の弛緩し多因子的に発症するとされる（図1）（プリンス頓産婦人科学から抜粋）。骨盤臓器脱は骨盤底臓器の排泄機能や生殖機能を障害し、高齢者の生活の質を著しく低下させる。高齢社会ではその生涯リスクは11%と推定されている。

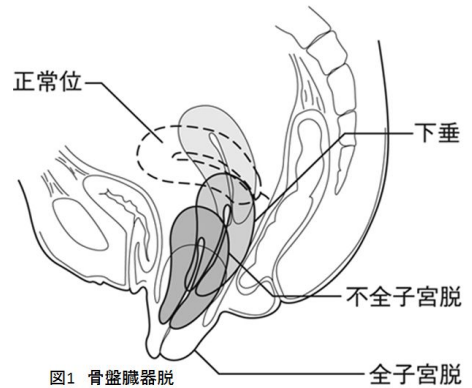


図1 骨盤臓器脱

申請者は平成18年度および19年度の日本学術振興会科研費による基盤研究で骨盤底弛緩における症状と膣壁、尿道、膀胱への末梢神経系の損傷とその再生の状態の関係を検討し、骨盤底臓器の解剖学的支持にもっとも重要な位置にある膣壁周囲の結合織並びに神経組織の特異な構造を明らかにすることができた（Clin Anat, 20:300, 2007）。骨盤臓器脱の原因として最も重要な妊娠・分娩の骨盤底への物理的な傷害度はマクロ解剖学的な解析で明らかとしてきたが（J Obstet Gynaecol Res 37 (1):13-23, 2011）、骨盤底への支持組織や細胞レベルでの生化学的な変化の解析は非常に遅れているのが現状である。

骨盤臓器脱の疾患モデルマウスとして、fibulin-5 遺伝子ノックアウトマウスがある。Fibulin-5 タンパク質は弾性繊維の形成に必要なタンパク質の一つであり、これをノックアウトしたマウスは経膣分娩後に高確率で骨盤臓器脱を発症すると報告された（Budatha et al. J Clin Invest. 2011）。しかしその後の研究が少なく、細胞外マトリックスタンパク質と骨盤臓器脱の発症メカニズムに一定の見解は得られていない。近年、幹細胞、特に組織幹細胞を用いた細胞治療についての研究が盛んに行われ、乳房摘出後の脂肪幹細胞移植による乳房再建など、一部では臨床応用されている。組織幹細胞は投与すると損傷した組織に生着し分化することが観察されており、組織の修復に寄与すると考えられている。骨盤臓器脱に関連する分野では、膣を機械的に損傷させた正常の遺伝子型のラットに間葉系幹細胞を経静脈的に投与したところ、膣壁、直腸や拳筋群に間葉系幹細胞の集積を認めたという報告がある（Michelle et al. Obstet Gynecol Int. 2012）。

これらの事実から、骨盤臓器脱に対する細胞外マトリックス蛋白の役割を再構築し、幹細胞治療の可能性について検討したいと考えている。その基盤となる研究として、骨盤臓器脱のモデルマウスである fibulin-5 遺伝子ノックアウトマウスに間葉系幹細胞を投与し、組織学的、生化学的に変化を認めるかどうかについて明らかにしたいと考えた

## 2. 研究目的

組織、臓器の形態の維持には結合強度を担う細胞外マトリックスが重要な役割をもつ。細胞外マトリックスの形成の中で伸び縮みに関与する弾性を担うのが弾性線維である。弾性線維はターンオーバーが遅いため加齢によって劣化が進行し組織の弾性の低下をきたす。弾性線維の基本構造は線維状に架橋されたエラスチン蛋白であり、エラスチンの単量体であるトロポエラスチンがリジルオキシダーゼ（LOX1）によって架橋されて形成される。この架橋の際に必須な蛋白が fibulin-5 蛋白である。Fibulin-5 の遺伝子バリエーションは加齢型黄斑変性や皮膚弛緩症の進行との関連が示唆されている（Biochem Mol Biol 51:2356, (2011)）。物理的な分娩傷害による骨盤底の弛緩や脱出には個人差がきわめて強く、このよ

うな遺伝的な背景が存在すると推察される。

一方で、組織幹細胞を用いた細胞治療の研究によって組織幹細胞は投与すると損傷した組織に生着し分化することが観察されており、組織の修復に寄与すると考えられている。腔を機械的に損傷させた正常の遺伝子型のラットに間葉系幹細胞を経静脈的に投与した実験では腔壁、直腸や骨盤底筋に間葉系幹細胞の集積を認めている(Obstet Gynecol Int Article ID 612946 (2012))。今回の研究では、投与する幹細胞として間葉系幹細胞を用いる予定である。様々な幹細胞の中で、間葉系幹細胞は脂肪組織や骨髄などのアクセスしやすい組織から採取可能であり、臨床応用の点から効率的である。iPS細胞は多分化能を有し、幹細胞移植に用いることができる可能性があるが、そのまま生体に移植すると腫瘍化のリスクがある。間葉系幹細胞は腫瘍化するリスクは低いとされている点からも臨床応用を考えるとふさわしいと考える。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨盤底臓器脱における細胞外マトリックス関連タンパク質遺伝子発現

本研究が採択されるまでの4年間で大阪市立大学付属病院にて Stage 3 以上の骨盤臓器脱患者で子宮摘出および骨盤再建術を施行した患者(29名)の検体を本学倫理委員会の承認を得て保存し、子宮周囲組織の結合織を研究材料とした。子宮頸部正常群と子宮頸部延長群に分類し、腔壁、仙骨子宮靭帯および子宮頸部組織における細胞外マトリックス関連遺伝子である5つの遺伝子(elastin, fibulin-5, integrin, lysyl oxidase like 1 (LOXL1), collagen)の発現をRT-PCR法により分析した。得られた結果とPOP進行指数(子宮頸部延長を示す指数)の相関を解析した。各組織におけるタンパク質の局在を免疫組織染色法により、またタンパク質の発現はWestern blotting法により解析した。

#### (2) CRISPR/Cas9システムを用いた fibulin-5 ノックアウトマウスの作製

ノックアウトマウスを作製する方法として、従来ES細胞を使用する手法が用いられてきたが、この方法ではノックアウトマウスを得るために長い期間を要する。近年、新たな遺伝子改変ツールであるCRISPR-Cas9システムを用い、ノックアウトマウスを作製する手法が開発された(Mali P et al. Science. 2013)。CRISPRはClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeatsの略であり、CRISPR-Cas9システムは細菌の獲得免疫機構として機能している。

その作成方法は以下のとおりである。ノックアウトする標的のDNA配列に対し相補的な配列を含むguide RNAおよびその相補鎖を設計し、それらの断片をCRISPRベクターにクローニングする。このプラスミドをマウスの受精卵にマイクロインジェクションすると、guide RNAと結合した標的のDNA配列をCasヌクレアーゼが切断し、その修復の際に標的DNA配列がノックアウトされる。この受精卵を偽妊娠マウスの子宮へと胚移植することでノックアウトマウスを得ることができる。この方法を用いれば、従来のES細胞を用いた方法よりも短期間で、効率よくノックアウトマウスを作製することが可能である。この手法を用い、fibulin-5ノックアウトマウスを作製する予定である。fibulin-5の配列を含むプラスミドを作製～受精卵へのインジェクション～偽妊娠マウスへの胚移植を行い、fibulin-5ノックアウトマウスを作製する。

#### (3) 妊娠・分娩後の腔周囲の組織リモデリングについての組織学的・生化学的検討

作成されたfibulin-5欠損マウスのヘテロ接合体のマウスの妊娠経過、分娩の進行を観察して子宮周囲の分娩前後の組織リモデリングをHE染色およびエラスチカワーギンソン染色では腔壁周囲の結合組織、弾性線維の状態を観察する。CRISPR-Cas9を用いて得られたホモ接合体Fibulin-5遺伝子ノックアウトマウスのオスから精子を採取し、人工授精にてマウスを得、PCRにてジェノタイピングを行った。ノックアウトマウスの系を維持するために、ホモ接合体マウス同士の交配では妊娠に至らなかったため、ヘテロ接合体マウスのオス、メスを交配させて自然分娩させ、ホモおよびヘテロ接合体マウスを得ることが

できた。得られたホモ接合体マウスを実験に用いる。

#### (4) マウス間葉系幹細胞の作製

マウス ES 細胞（連携研究者 森田隆教授より提供）を細胞の分化を抑制する Leukemia Inhibitory Factor (LIF) を添加しない培地を用い、hanging drop 法にて培養し胚様体 (embryoid body) を作製する。数日浮遊培養させた後、レチノイン酸を添加した培養液で培養し、次にトリヨードサイロニンを添加した培地でさらに培養し、分化を誘導する。これにより ES 細胞は様々な組織系幹細胞に分化する。この中から、間葉系幹細胞は CD105 陽性であることを利用し、マグネティックセルソーティング法 (MACS 法) により間葉系幹細胞のみを分離する。MACS separation column (Miltenyi Biotech 社) を用いて CD105 陽性細胞をマグネティックビーズに吸着させ、間葉系幹細胞のみを分離、回収する。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨盤臓器脱患者の子宮周囲に発現する細胞外マトリックスタンパク質の変化

fibulin-5 と elastin タンパク質は 膣および子宮頸部の粘膜固有層および線維性子宮筋層において主に、仙骨子宮靭帯においては全域に発現が見られた。子宮頸部正常群において fibulin-5 及び ITG $\beta$ 1 の遺伝子発現は骨盤臓器脱の進行に伴い低下していた。一方、子宮頸部延長群の仙骨子宮靭帯においては、fibulin5 や ITG $\beta$ 1 の遺伝子発現は骨盤臓器脱の進行に伴い逆に増加した。子宮頸部において、子宮頸部延長群では子宮頸部正常群とは異なり 5 つの細胞外マトリックス関連遺伝子 (elastin, fibulin-5, integrin-, lysyl oxidase like 1 (LOXL1), collagen) 全てが脱出の進行度とともに有意に増加した。この結果は骨盤臓器脱の進行に 2 種類のタイプが存在することを示唆している (図 2)。通常高齢化に伴って観察される骨盤臓器脱患者における細胞外マトリックス関連遺伝子の発現は細胞外マトリックスの減少に伴う子宮・膣周囲

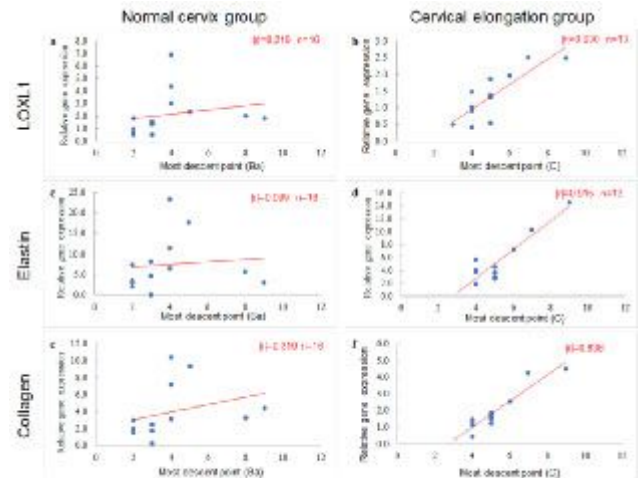


図2. 骨盤臓器脱の子宮頸部の延長とマトリックス

の脆弱化を伴うが、比較的若年に認められる子宮頸部が延長群では逆の相関を示した。このような進行の差異に細胞外マトリックス関連タンパク質が強く影響を与えている可能性を示唆する結果を得た。本結果は骨盤臓器脱外科治療において手術法を選択する上で、非常に重要な情報を与える。

#### (2) CRISPR/Cas9 システムを用いた fibulin-5 ノックアウトマウスの作製

CRISPR-Cas9 を用いて fibulin-5 ノックアウトマウスを作成し、メスのホモ接合体マウスを野生型マウスと交配させた。メスは分娩後直腸脱を呈したが、交配後のノックアウトマウスは死亡した。そこで、表現型 (直腸脱) を確認したメスのホモ接合体マウスの fibulin-5 の DNA 配列 (94bp 欠損) を CRISPR-Cas9 システムを用いてノックインしたマウスを作成することとした。野生型 (C57BL/6) マウスを PMSG-hCG 処理にて過排卵させた後交配し、マウス胚を得た。前述の fibulin-5 遺伝子 (94bp 欠損) の DNA 配列を目的配列としてドナーベクターを作成し、CRISPR ベクターとともに得られたマウス胚にマイクロインジェクションした。このマウス胚を偽妊娠マウスの子宮に移植、帝王切開にて 20 匹のマウスを得た。得られたマウスの DNA 配列をシーケンス解析したところ、40%のマウスに標的配列のノックインを確認した。このうちホモ接合体ノックインマウスをオス 2 匹、メス 2 匹をそれぞれ野生型マウスと自然交配させた。メスのノックインマウスは妊娠、出産に至り、分娩後に子宮脱及び直腸脱を認めた (図 3)。その後、複数回出産したが、母マウスの食殺などにより仔マウスを得ることができなかった。また、オスのホモ接合体ノックインマウスは自然交配に至らなかった。そのため、人工授精での分娩を試



みた。オスのノックアウトマウスより精子を採取し、PMSG-hCG 処理にて過排卵させた野生型マウスを解剖し輸卵管より未受精卵を採取、これらを人工授精した。余った精子は凍結保存した。得られた受精卵を偽妊娠マウスの子宮へ移植し、帝王切開により 37 匹の児を得た。このうち 12 匹がヘテロ接合体マウスであった。得られたヘテロマウス同士の自然交配により、児を得ることができた。

### (3) 妊娠・分娩後の腔周囲の組織学的・生化学的な変化

妊娠および出産による腔周囲の結合組織への影響を調べるため、未経産のマウスとヘテロ接合体マウスの分娩後組織と比較したところ、HE 染色にて腔壁の菲薄化を認め、また弾性線維の変化を同定するエラスチカワーゲンソン染色では腔壁周囲の弾性線維の減少傾向を確認した(図 4)。次にメスのホモ接合体マウスと野生型のマウスを交配させたが、妊娠に至らず、予定年度での観察を行えなかった。



図 3. 直腸脱を呈したノックアウトマウス

### (4) 間葉系幹細胞を用いた治療

間葉系幹細胞を用いた治療の試みについては、前述の通り Fibulin-5 遺伝子ノックアウトマウスの分娩後モデルの維持・継代が通常の飼育では確立できなかったため、まだ行えていない。当初の計画では間葉系幹細胞を ES 細胞から分化させることで作成する予定であったが、時間的な問題を克服するためマウス骨髄由来間葉系幹細胞を購入し、培養、維持して

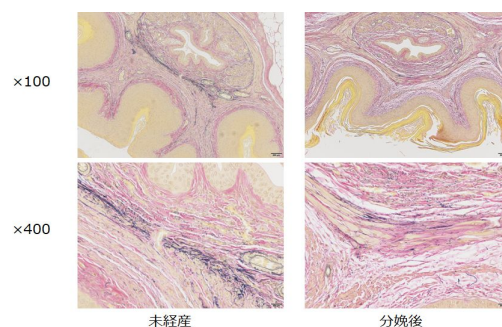


図 4. 前腔壁の構造の変化 (下部)

いる。メスのホモ接合体マウスが妊娠に至らない原因ははっきりとしていない。現在、ペアリングの変更、飼育環境を変えたりして妊娠に至るかどうかを検討しているところであるが、妊娠に至らない場合は過排卵処理した野生型マウスの受精卵を回収し、それをホモ接合体マウスに胚移植した後に経膈分娩させることで分娩後のモデルマウスとし、子宮およびその支持組織、腔壁周囲の組織における弾性線維の変化を HE 染色および免疫染色を用いて経膈分娩後の野生型マウス群と比較する予定である。また、ホモ接合体ノックアウトマウスの分娩後モデルに現在培養している間葉系幹細胞を腹腔内投与し、投与後の子宮支持組織、腔壁における間葉系幹細胞の影響を調べる予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Wang, H., Y. Kira, A. Hamuro, A. Takase, D. Tachibana and M. Koyama (2019). "Differential gene expression of extracellular-matrix-related proteins in the vaginal apical compartment of women with pelvic organ prolapse." (査読あり) *Int Urogynecol J* 30(3): 439-446.

Kamei, J., S. Yazawa, S. Yamamoto, N. Kaburaki, S. Takahashi, M. Takeyama, M. Koyama, Y. Homma, S. Arakawa and H. Kiyota (2018). "Risk factors for surgical site infection after transvaginal mesh placement in a nationwide Japanese cohort." (査読あり) *Neurourol Urodyn* 37(3): 1074-1081.

Hayashi, M., K. Yoshida, K. Kitada, A. Kizu, D. Tachibana, M. Fukui, T. Morita and M. Koyama (2018). "Low-dose irradiation of mouse embryos increases Smad-p21 pathway activity and preserves pluripotency." (査読あり) *J Assist Reprod Genet* 35(6): 1061-1069.

Betschart, C., M. Cervigni, O. Contreras Ortiz, S. K. Doumouchtsis, M. Koyama, C. Medina, J. M. Haddad, F. la Torre and G. Zanni (2017). "Management of apical compartment prolapse (uterine and vault prolapse): A FIGO Working Group report." (査読あり) *Neurourol Urodyn* 36(2): 507-513.

Takahashi, S., M. Takei, O. Nishizawa, O. Yamaguchi, K. Kato, M. Gotoh, Y. Yoshimura, M. Takeyama,

H. Ozawa, M. Shimada, T. Yamanishi, M. Yoshida, H. Tomoe, O. Yokoyama and M. Koyama (2016). "Clinical Guideline for Female Lower Urinary Tract Symptoms." ( 査読あり ) Low Urin Tract Symptoms 8(1): 5-29.

Hamuro, A., D. Tachibana, H. Wang, M. Hayashi, S. Yanai, Y. Kurihara, T. Misugi, H. Katayama, A. Nakano and M. Koyama (2016). "Combined reconstructive surgery involving uterosacral colpopexy and anterior vaginal mesh implantation for pelvic organ prolapse." ( 査読あり ) J Obstet Gynaecol Res 42(6): 707-715.

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 )

Koyama, M. (2019). Plenary Talk: History of POP surgery in Japan. The 6th Annual Meeting of the Asia-Pacific Urogynecology Association (APUGA), Okinawa, Japan.

Takase, A., A. Hamuro, M. Hayashi, N. Yokoi, H. Katayama, T. Misugi, A. Nakano, D. Tachibana and M. Koyama (2018). Differential localization of extracellular matrix related proteins in the uterine cervix of female pelvic organ prolapse. 70th Annual Cogress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology, Sendai, Japan, Japan Society of Obstetrics and Gynecology.

Koyama, M. (2018). Mesh - where do we stand in 2018 - international scenario and perspective. 43rd Annual Meeting International Urogynecology Association, Vienna, Austria, IUGA.

Koyama, M. (2018). Trends on managing the LUTS (SUI, DO, voiding dysfunction) associated with POP in Asia. 43rd Annual Meeting International Urogynecology Association, Vienna, Austria, IUGA.

Koyama, M. (2017). McCall Culdeplasty (Video Session). IUGA Regional Symposium 2017, Kamogawa, Chiba, International Urogynecological Association.

Koyama, M. (2017). What is the true efficacy of native tissue repair? (Symposium). IUGA Regional Symposium 2017, Kamogawa, Chiba, International Urogynecological Association.

Koyama, M. (2016). Overview of surgical trends of SUI in Asia women. Pan-Asian Meeting, 41st Annual Meeting of IUGA, Cape Town, South Africa, IUGA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名： 橘 大介

ローマ字氏名：( TACHIBANA, daisuke )

所属研究機関名： 大阪市立大学

部局名： 大学院医学研究科

職名： 准教授 研究者番号： 50381992

研究分担者氏名： 三枚 卓也

ローマ字氏名：( MISUGI, takuya )

所属研究機関名： 大阪市立大学

部局名： 大学院医学研究科

職名： 講師 研究者番号： 30761605

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。