

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19731

研究課題名（和文）脱細胞化骨格を用いた霊長類子宮の再生とその機能解析

研究課題名（英文）Regeneration and functional control of the uterus using decellularization technologies in non-human primates

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：子宮脱細胞化骨格（DUS）を用いた子宮再生の技術を臨床応用すべく、滋賀医科大学動物生命科学センターを霊長類実験の実施場所として選定・決定し、実施に必要な体制とチームを整えた。その基盤知見・技術を強固にするためラットを用いた研究も並行して行い、内膜欠損モデルにおいて、DUS移植により腺管構造を有する内膜を再構築することが出来た。しかし、その構築効率は必ずしも高くないため、DUSに子宮構成細胞に分化し得る細胞を予め搭載して再細胞化することにした。胚様体形成とWNT/CTNNB1経路の活性化を通じてヒトiPS細胞をプロゲステロン応答性の子宮内膜間質細胞へ分化誘導する方法を共同研究により確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮の先天的・後天的な欠損に対して究極の医療は代理懐胎あるいは子宮移植となるが、安全性や倫理的・法的な問題のため、その実現は極めて難しい。また、これらを部分的な子宮欠損に行うことは過剰な対応である。本研究の成果により部分的な子宮の再生が可能になれば上記の問題は解決され、構造あるいは機能不全を呈する様々な子宮疾患に対して新しい医療になり得る点で、社会的意義は高い。さらに本研究は、世界に先駆けてiPS細胞から子宮構成細胞を作成した点、その過程にWNT/CTNNB1経路が重要な役割を果たしていることなど子宮の発生や分化の生理・病理メカニズムの一端を解明した点で、学術的意義も極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：For clinical application of uterine bioengineering to patients with partial uterine defects, we selected the Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Research, as the place for primate experiments and prepared staff members and experimental setup. To obtain more solid data towards clinical application, we simultaneously performed rat experiments and found that placement of a decellularized uterine scaffold (DUS) led to the regeneration of endometrium with delineated glandular and luminal structures in rat endometrium defect models. The regeneration efficiency, however, was not as high as expected, so we decided to employ DUS loaded with uterine cells to enhance endometrial regeneration. As one of the most likely candidates as the loading cells, we generated progesterone-responsive endometrial stromal from human induced pluripotent stem cells and showed that WNT/CTNNB1 pathway plays a critical role in the differentiation and generation processes.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮 再生 生殖医療 組織工学 iPS細胞 脱細胞化 再細胞化

1. 研究開始当初の背景

子宮の構造不全として、ロキタンスキー症候群に代表される先天性子宮・腔欠損に加えて、子宮癌手術(円錐切除・トラケレクトミー)や流産に対する子宮内容除去術によって引き起こされた後天的な子宮の機能・構造欠損が挙げられる。このような子宮の構造・機能欠損に対する究極の医療は、代理子宮や子宮移植であるが、安全性や倫理的かつ法的な問題があり、その実現は極めて難しい。このような現状を鑑みると、子宮の再建・再生医療が医学的にも社会的にも切望される。近年、臓器の再建の一方法として、界面活性剤を用いて脱細胞化を施した足場(decellularized scaffold)を再細胞化することにより、心臓、肺、あるいは肝臓などを動物実験レベルで作成し得ることが報告された(Ott, et al, Nat Med, 2007)。そこで、幹細胞を用いた子宮再生医療を実現するべく、脱細胞化・再細胞化技術を用いた子宮再建・再構築を試みたところ、世界に先駆けて、ラット子宮の部分再生・再建に成功した(Miyazaki and Maruyama, Biomaterials, 2014)。その後、世界初の移植子宮での出産に成功したグループとの共同研究で、脱細胞化骨格と細胞追跡法を用いたラット子宮の部分再生にも成功した(Hellström, et al., Fertil Steril, 2016)。また、スペインのグループとの共同執筆で、組織工学を用いた子宮の再生・再建医療に関する総説も発表した(Cervelló, et al., Semin Reprod Med, 2015)。これらの基盤知見・基盤技術に基づいて、ヒト子宮の再生メカニズムの解明と再生医療へ応用を目指す流れのなかで、霊長類を用いた本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、脱細胞化(decellularization)技術を用いて霊長類における子宮の再生・再建の基盤知見と基盤技術を得ることである。それにより、霊長類における子宮を含めた雌性生殖器官の再生のメカニズムが明らかになるとともに、ヒトの子宮を再生・再建する未来型医療の基盤となるプラットフォームの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 脱細胞化骨格を用いた子宮内膜の再生・再建の開発

ラット子宮脱細胞化骨格(DES)を作成するにあたり、ラットの子宮から子宮内膜組織を採取し、SDS法を用いてDESを作成した。作成方法は0.01% 0.1% 1% SDSと各24時間インキュベーションし、脱細胞化を行う。洗浄後TritonXで処理し、5時間以上洗浄後DESとして使用した。次に子宮内膜欠損モデル(アッシャーマン症候群モデルラット, Kilie, et al., 2014; Alawadhi, et al., 2014)として子宮内膜菲薄モデルにDES単独を移植することで、構造的欠損が修復されるか否かについて4週間後解析・検討を行った。また全層性にラット子宮内膜を除去した子宮内膜剥離モデルに対しDESを移植することで上記と同様に修復されるかについて検討を行った。

さらにDESの生体材料としての特性を解析するため、子宮の一部欠損部分にDESを通常極性と反転したものを移植し、構造の修復が行われるか4週間後、マッソントリクローム染色および蛍光免疫染色(Smooth muscle actin; SMA, Cytokeratin; CK)法を用いて検討を行った。

(2) ヒトiPS細胞からの子宮内膜間質細胞の誘導と分化過程におけるWNT/CTNNB1経路の役割の解明

DESによる子宮内膜の再生を効率良く行うために、DESに子宮構成細胞に分化し得る細胞を予め搭載して再細胞化を効率良く行う戦略を考案した。ヒトへの臨床応用を鑑み、その候補としてヒトiPS細胞を用いて検討した。すなわち、子宮の構造的機能的欠損に対して、ヒトiPS細胞由来の子宮内膜間質細胞(endometrial stromal cells, ESC)を用いた患者特異的な再生医療を目指す。

子宮は中間中胚葉由来のミューラー管が分化して形成される。ここではヒトiPS細胞よりプロゲステロン依存性分化(脱落膜化)能を有するESCを誘導し、ESCへの分化過程におけるWNT/CTNNB1(WC)経路の役割を明らかにすることを目的とした。ヒトiPS細胞から胚様体(EB)を作成し、WC活性化因子CHIR99021含有培地で培養した。分化特異的マーカーを用いてミューラー管分化を確認した。分化細胞の脱落膜化能を確認するため、14日目(D14)EBをcAMP+メドロキシプロゲステロン(MPA)で8日間処理した。

4. 研究成果

(1) 脱細胞化骨格を用いた子宮内膜の再生・再建の開発

ヒトおよびカニクイザルの子宮からの脱細胞子宮骨格の作成とその機能解析基盤となる知見とデータを得るため、主にラット子宮を用いて実験を行った。その理由として、霊長類において子宮頸部と子宮内膜全体の再生を主な目的とする当プロジェクトにおいて、子宮内膜全体の脱細胞化および再細胞化の技術的基盤と知見が未だ十分に得られていないことが研究を進めていくなかで判明したためである。

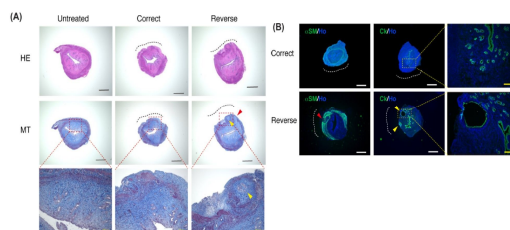
子宮内膜欠損モデルとしてまず、ラット子宮腔内面を擦過し表層のみを欠損させた子宮に

DES を移植した（子宮内膜菲薄化モデル）。4 週間後に解剖し、欠損部位の構造の再生又は修復が生じるのか検討を行った。結果として、DES を移植していない群に対し、DES 移植群では管腔・腺管構造や mass として組織の再構成が認められた。次に内膜のみを全層性に剥離した子宮に DES を移植した（子宮内膜剥離モデル）。3-4 週間後に解剖を行い、上記と同様の検討を行った。結果として組織の再生は一部にとどまり、明らかな管腔構造などは得られなかった。そこで、全層性子宮内膜除去後の DES に DES 直径と同等のシリコン管を挿入し、同様の移植を行った。結果として、子宮内膜間質細胞の修復に至らなかったものの上皮細胞の再生に成功した。これらの結果から、菲薄化モデルにおける DES 移植による子宮内膜の修復及び再構成は可能であることが明らかとなり、さらに今後の検討課題にもなるが、重症剥離モデルにおいては管腔形態を維持することで DES 移植による子宮組織再構成ができる可能性が示唆された。

DES の特性を明らかにするため、DES を正常極性と反転したものをラット子宮の一部欠損部分に移植し、構造の再生が行われるかについて検討を行った。結果として、DES の構造極性が反転している場合、再生される子宮組織構造は DES 極性に反映された（図 1, Miki et al., 2019）。このことから、DES 移植に関して極性を合わせた移植を行う必要があることが明らかとなった。

上記のラットの子宮脱細胞化骨格を用いた子宮再生・再建の基盤データ・技術をヒトおよびカニクイザルに応用すべく、滋賀医科大学動物生命科学センターを霊長類実験の実施場所として選定・決定し、施設基準を満たし且つ実験実施に必要な実験体制と実験チームを整えた。

【図 1】DES 極性は子宮組織構造再生には重要



(2) ヒト iPS 細胞からの子宮内膜間質細胞の誘導と分化過程における WNT/CTNNB1 経路の役割の解明

qPCR にて、D4 EB の中間中胚葉マーカー LHX1 と PAX2, D8EB のミューラー管マーカー ISL1 と PAX2, D14EB の ESC マーカー HOXA11 とプロゲステロン受容体 (PGR) の mRNA レベルは、ヒト iPS 細胞と比較し有意に上昇していた。cAMP+MPA 処理をした D14EB において、脱落膜化マーカー IGFBP1 と PRL の mRNA レベルは対照群と比較し有意に上昇していた。RNAseq のクラスター分析にて、D14 EB のトランスクリプトームはより早期の EB と比較して正常 ESC に近似していた。分化誘導培地に WC 阻害剤を加えると、PGR の発現が有意に抑制された。

このように、ヒト iPS 細胞を ESC 様細胞に分化させる事に成功した。また、その分化過程に WC 経路が重要な役割を果たす事を示した。本研究の成果は、ヒト iPS 細胞を搭載した子宮脱細胞骨格を用いる子宮再生医療の開発に貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Miki F, **Maruyama T**, Miyazaki K, Takao T, Yoshimasa Y, Katakura S, Hihara H, Uchida S, **Masuda H**, Uchida H, Nagai T, Shibata S, Tanaka M: The orientation of a decellularized uterine scaffold determines the tissue topology and architecture of the regenerated uterus in rats†. *Biol Reprod.* 2019; 100(5): 1215-1227. 査読有 doi: 10.1093/biolre/ioz004.

Miyazaki K, Dyson MT, Coon JS, Furukawa Y, Yilmaz BD, **Maruyama T**, Bulun SE: Generation of progesterone-responsive endometrial stromal fibroblasts from human induced pluripotent stem cells: role of the WNT/CTNNB1 pathway. *Stem Cell Reports.* 2018; 11(5): 1136-1155. 査読有 doi: 10.1016/j.stemcr.2018.10.002.

升田博隆, **丸山哲夫**: 子宮再生. *臨床婦人科産科* 2018; 72(6): 600-604. 査読無し

Furuya M, **Masuda H**, Hara K, Uchida H, Sato K, Sato S, Asada H, **Maruyama T**, Yoshimura Y, Katabuchi H, Tanaka M, Saya H: ZEB1 expression is a potential indicator of invasive endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017; 96(9): 1128-1135. 査読有 doi: 10.1111/aogs.13179.

Takahashi Y, Nishimura T, **Maruyama T**, Tomi M, Nakashima E: Contributions of system A subtypes to α -methylaminoisobutyric acid uptake by placental microvillous membranes of human and rat. *Amino Acids.* 2017; 49(4): 795-803. 査読有 doi: 10.1007/s00726-017-2384-7.

Uchida S, **Maruyama T**, Kagami M, Miki F, Hihara H, Katakura S, Yoshimasa Y, Masuda H, Uchida H, Tanaka M: Impact of borderline-subclinical hypothyroidism on subsequent pregnancy outcome in women with unexplained recurrent pregnancy loss. J Obstet Gynaecol Res. 2017;43(6): 1014-1020. 査読有
doi: 10.1111/jog.13319.

小野政徳, **丸山哲夫**, 田中 守: 産婦人科領域における再生医療とゲノム編集 子宮筋幹細胞の臨床的意義. 臨床婦人科産科 2017; 75(5): 459-463. 査読無し

升田博隆, **丸山哲夫**: 産婦人科領域における再生医療とゲノム編集 子宮内膜の再生 子宮内膜不全への対応. 臨床婦人科産科 2017; 75(5): 464-470. 査読無し

[学会発表](計 12 件)

宮崎 薫, Matthew Dyson, John Coon, 古川雄一, Bahar Yilmaz, **丸山哲夫**, Serdar Bulun: ヒト iPS 細胞からの子宮内膜間質細胞の誘導と分化過程における WNT/CTNNB1 経路の役割. 第 18 回日本再生医療学会. 2019 年. ポスターティザー

[招請講演] **丸山哲夫**: 子宮の再生・再建医療 - 子宮移植の先を見据えて -. 第 2 回周産期医療研修会. 2018 年.

Tetsuo Maruyama, Tomoka Takao, Hirotaka Masuda, Fumie Miki, Sayaka Uchida, Hiroshi Uchida, Mamoru Tanaka: Attempts to establish screening system for identification of drugs targeting human uterine endometrial cancer stem-like cells. International Society for Stem Cell Research 2018 annual meeting (ISSCR2018). 2018 年.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama**: Stem cells solve the enigma of endometriosis? 4th Congress of the Society of Endometriosis and Uterine Disorders (SEUD2018). 2018 年.

Kaoru Miyazaki, Matthew T. Dyson, John S. Coon, **Tetsuo Maruyama**, Serdar E. Bulun: Role of WNT/CTNNB1 pathway in differentiation of human induced pluripotent stem cells to endometrial stroma-like cells. 65th Annual Meeting of the Society for Reproductive Investigation (SRI). 2018 年.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama**: Current paradigm on the pathogenesis and etiologies of endometriosis. Taiwan Endometriosis International Symposium and Taiwan Endometriosis Society 2017 Annual Meeting. 2017 年.

三木史恵, **丸山哲夫**, 升田博隆, 瀬田康弘, 吉政佑之, 片倉慧美, 富里祥子, 内田明花, 内田 浩, 田中 守: 子宮内膜欠損・菲薄化モデルにおける脱細胞化技術を用いた子宮内膜の再生. 第 62 回日本生殖医学会. 2017 年.

Kaoru Miyazaki, Matthew T. Dyson, John S. Coon, Serdar E. Bulun, **Tetsuo Maruyama**: Transcriptome analysis of endometrial stroma-like organoids differentiated from human induced pluripotent stem cells. 73rd Annual meeting of American Society for Reproductive Medicine (ASRM2017). 2017 年.

Hirotaka Masuda, Masataka Furuya, **Tetsuo Maruyama**, Hironori Asada, Hidetaka Katabuchi, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka: Differential epithelial-mesenchymal transition status between types of endometriosis and adenomyosis. 33rd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE2017). 2017 年.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama**: Current concept and knowledge on the pathogenesis and aetiology of endometriosis. 13th World Congress on Endometriosis (WCE2017). 2017 年.

Hirotaka Masuda, Masataka Fuyuya, **Tetsuo Maruyama**, Hironori Asada, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka: Differential status of epithelial-mesenchymal transition in each endometriotic lesion: ZEB1 as a potential indicator of endometriotic invasiveness. 13th World Congress on Endometriosis (WCE2017). 2017 年.

[招請講演] **Tetuso Maruyama**: Stem cell of uterine fibroids and bioengineering uterine tissue for repair. 3rd congress of the Society of Endometriosis and Uterine Disorders (SEUD2017). 2017 年.

〔図書〕(計1件)

Ono M, **Maruyama T**, Fujiwara H, Bulun SE: Stem cells and uterine fibroids. “Uterine Fibroids and Adenomyosis” eds: Konishi I, Katabuchi H. Springer, Japan. 2018, 59-67.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：升田 博隆
ローマ字氏名：(MASUDA, Hirotaka)
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：80317198

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高尾 知佳
ローマ字氏名：(TAKAO, Tomoka)
研究協力者氏名：宮崎 薫
ローマ字氏名：(MIYAZAKI, Kaoru)
研究協力者氏名：三木 史恵
ローマ字氏名：(MIKI, Fumie)
研究協力者氏名：吉政 佑之
ローマ字氏名：(YOSHIMASA, Yushi)

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。