

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591907

研究課題名 (和文) 子宮再生療法確立のための基礎的研究  
 研究課題名 (英文) BASIC STUDIES FOR REGENERATION OF HUMAN ENDOMETRIUM

## 研究代表者

梅咲 直彦 (UMESAKI NAHIKO)  
 和歌山県立医科大学医学部・教授  
 研究者番号 20106339

## 研究成果の概要：

現在も未解決のまま残されている不妊の主要原因の一つが受精卵着床障害である。子宮内膜組織欠損あるいは子宮内膜組織機能障害に起因しているが、根本的治療法は自己子宮内膜再生療法の確立と制御である。そこで、ヒト子宮内膜正常組織の組織学的解析、*in vitro* 培養実験による増殖・分化・細胞死・細胞生存の調節機序の解析を行うと同時に、マウスを用いた子宮壁再生実験を試みた。その結果、子宮内膜上皮の再生にはサイトカインシグナルの中でも特に STAT3 シグナルが促進的に作用していることを *in vitro* 実験、siRNA ノックダウン実験で実証した。月経周期的に発現変動する主なヒト子宮内膜細胞外基質である 4 型コラーゲンとラミニンは巧妙に、子宮内膜再生を調節していることを免疫組織学的発現解析と *in vitro* 培養実験で証明した。子宮内膜症治療薬 danazol は、子宮内膜における正常範囲内のサイトカインネットワークを調節することで巧妙に受精卵着床準備状態を制御できる。動物実験施設のウイルス汚染のために、動物実験は完了しておらず、現在継続中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮内膜、再生、STAT3、danazol、コラーゲン、ラミニン、レプチン

## 1. 研究開始当初の背景

不妊治療が発達した現在でも未解決のまま残されている主要原因の一つが受精卵着床障害である。これは、子宮内膜組織欠損あるいは子宮内膜組織機能障害に起因しており、根本的治療法は自己子宮内膜再生療法の

確立である。ヒト子宮内膜間質細胞は容易に *in vitro* 培養可能で生理活性物質の効果を検証できることを、我々はこれまでの実験で数多く実証してきた。子宮内膜上皮細胞由来 HHUA 細胞は 46XX 正常核型細胞で各種生理的刺激に正常反応することも、我々はこれ

までの実験で数多く実証してきた。両細胞共に試験管内培養が容易であることから、共培養効果の解析が可能となっていた。

我々はこれまでに、マウス動物実験モデルで、子宮内膜組織を試験管内培養していた。さらに各種遺伝子改変マウスを飼育しており、特に共培養実験による細胞社会学的解析実験の経験もあった。これらの過去の実験素養を土台として、臨床応用を目指した、子宮再生療法のための基礎実験を開始することを目指した。

## 2. 研究の目的

長年の研究成果に基づき、マウスおよびヒトの子宮壁組織を *in vitro* で再生する実験システムと至適条件を見出すこと、近い将来にヒト子宮壁3層構造再生療法を臨床応用するための安全性や安定した再生条件の決定などの基礎的研究を行うこと、子宮壁3層構造構成細胞の細胞間シグナル応答を解析しヒト子宮壁3層構造再構築現象の至適条件を確定することにより子宮温存手術治療への臨床応用の基礎を固めること、等を本研究における最終目標とした。

子宮内膜細胞は再生増殖能が高く、単細胞化されても再構築可能であるため、特に今回の研究における再生研究の中心を子宮内膜間質細胞と子宮平滑筋細胞の層状構造再構築に置いた。具体的には以下の各日標を設定し実行する目的とした。

- (1) ヒトおよびマウスの子宮内膜細胞の増殖分化を制御する *in vitro* 細胞培養条件を決定する。
- (2) 子宮内膜上皮細胞、子宮内膜間質細胞、子宮筋層平滑筋細胞の層状構造 *in vitro* 再構築実験を確立する。
- (3) 子宮内膜上皮細胞、子宮内膜間質細胞、子宮筋層平滑筋細胞によるマウス子宮壁内層状構造再構築実験を確立する。
- (4) **green mouse** 由来子宮内膜上皮細胞、子宮内膜間質細胞、子宮内膜平滑筋細胞を用いた子宮壁再構築過程での細胞社会学的クロストークを解析する。① **green mouse** 由来細胞を混合することによる形態的細胞相互関係の解析を行う。② **siRNA** による遺伝子ノックダウン細胞、遺伝子改変マウス由来細胞を混合することによる子宮壁3種細胞間シグナルトークの解析を行う。
- (5) 子宮筋層平滑筋細胞と子宮内膜間質細胞と子宮内膜上皮細胞のマウス子宮壁内3層構造再構築実験を確立する。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒトおよびマウスの子宮壁細胞の増殖

分化を制御する *in vitro* 細胞培養条件の決定：子宮壁再生において、最も細胞増殖能が低い子宮平滑筋細胞の強い増殖促進物質を検索する。複数の因子を適当に組み合わせると相乗相加効果が期待できる。本研究では、続く研究の進行を平滑に進めるためにも、第一にヒト子宮細胞の増殖分化を制御する生理活性物質併用組み合わせを同定する。ヒト子宮壁細胞で培養条件を見出し、次いでマウスにも応用する。小規模実験なので、細胞増殖は比色法で、分子発現は免疫組織化学法と RT-PCR 法で定量評価する。

(2) 各種子宮壁細胞の層状構造 *in vitro* 再構築実験：子宮壁構造再構築実験で世界的にもまだ成功していない箇所は、子宮内膜間質細胞と子宮筋層平滑筋細胞の2層構造再構築である。至適条件を見出すためには、各種細胞をランダムに培養した場合の細胞間認識機構を解析すること、2種の細胞をコラーゲン膜で分離接触培養した場合の条件、さらに2種の細胞をコラーゲン膜で分離接触培養しながらコラーゲン膜に一定の伸展刺激を与えた状態で接触培養した場合の条件を比較する。細胞増殖は比色法で、各種細胞間の形態的相互作用は免疫組織学的手法で定量解析する。

(3) 子宮内膜間質細胞と子宮筋層平滑筋細胞によるマウス子宮壁内2層構造再構築実験：(2)で条件が決定された場合、マウスを用いて子宮をくり抜き、**green mouse** 由来の子宮内膜間質細胞と子宮筋層平滑筋細胞を同系野生型 C57/BL マウス子宮壁内に切半移植する実験1、ヒト子宮内膜間質細胞とヒト子宮筋層平滑筋細胞を **scid** マウス子宮壁内に切半移植する実験2を行い、病理組織学的に子宮壁再構築を検証する。移植する子宮細胞は、ランダム法、コラーゲン境界設置法、細胞外基質伸展培養法のそれぞれで作製された子宮細胞塊である。

(4) **green mouse** 由来子宮内膜上皮細胞、子宮内膜間質細胞、子宮内膜平滑筋細胞を用いた子宮壁再構築過程での細胞社会学的クロストーク解析：上述の、マウス子宮壁内移植実験での成果から、共培養のアプローチ変更が必要と判断された場合は、すぐに研究方針を修正する。① **green mouse** 由来細胞を混合することによる形態的細胞相互関係の解析：**green mouse** 由来子宮内膜上皮細胞、子宮内膜間質細胞、子宮内膜平滑筋細胞をフローサイトメトリーで分離し、それぞれ培養する。② **siRNA** による遺伝子ノックダウン細胞、遺伝子改変マウス由来細胞を混合することによる子宮壁3種細胞間シグナルトークの解析：3者のうち、2者に野生型マウス由来細胞、遺伝子改変マウス由来細胞を用いることで3者間のシグナルの一部を明らかとする。ただし、この実験は上述の研究成果の結果を

参考として条件を設定するので予定年度内に開始できるかどうかは不明であった。

#### 4. 研究成果

平成 18 年度に大学動物実験室のマウス肝炎ウイルス汚染が発見され、やむなく飼育マウスを全頭屠殺した。そのため、実験が完全に中断され、それまでのデータが役に立たなくなった。半年間の観察期間後にもウイルス汚染が再度検出され、動物実験室閉鎖が 1 年間以上続いた。19 年度後半には部分的に実験施設が再開されたので、一部の動物実験を再開したが、いまだに完全には浄化されなかった。そこで、研究方向転換を余儀なくされ、*in vitro* 解析を中心とせざるをえなかった。

1) ヒトおよびマウスの子宮細胞の増殖分化を制御する *in vitro* 細胞培養条件の決定：子宮壁再生において、最も細胞増殖能が低い子宮平滑筋細胞の強い増殖促進物質を検索してきた。ノックダウン解析から STAT3 経路が重要であることを実証した。興味深いことに子宮内膜上皮細胞においては STAT3 シグナルは細胞死増強シグナルを、内膜間質細胞および平滑筋細胞では STAT3 シグナルが細胞生存シグナルを伝える役割をになうことが証明された。さらに、子宮内膜症治療薬 danazol は *in vitro* で正常細胞の変動範囲内の STAT3 シグナルを安定化させることが証明された。おそらくは、このメカニズムが danazol による着床促進作用の一因と推測された。

2) 子宮壁細胞の層状構造 *in vitro* 再構築実験：動物実験が制限されたことから、子宮内膜組織における細胞間充填物質である細胞外基質の発現と子宮内膜細胞機能における役割の解析に転じた。性周期的にヒト子宮内膜組織におけるラミニンおよび 4 型コラーゲンの発現が有意に変化することを世界で初めて証明した。周期的発現推移は卵巣ステロイドの周期的変動に平行しているが、細胞外基質の発現が変動するとは考えにくく、おそらくは細胞外基質分解酵素活性が実質的に子宮内膜リモデリングを行っているかと推測された。さらに、細胞外基質との特異的接着が上皮細胞、間質細胞の増殖分化だけでなく、細胞増殖形態そのものを直接に制御していることを初めて証明した。このことは、子宮内膜再生には単に細胞を層状に分布させるだけでなく、細胞外基質を適度に充足させる必要性があると考えられた。

3) 子宮壁細胞によるマウス子宮壁内層状構造再構築実験：2) 条件が決定された場合、マウスを用いて再構築実験を行う予定であったが、動物実験施設の汚染事故により研究が中断された。

4) green mouse 由来子宮内膜上皮細胞、子宮

内膜間質細胞、子宮内膜平滑筋細胞を用いた子宮壁再構築過程での細胞社会学的クロストーク解析：上述の、マウス子宮壁内移植実験での成果から、共培養のアプローチ変更が必要と判断された場合は、すぐに研究方針を修正する。動物実験汚染事故で開始が遅れたが、現在は *in vitro* 実験結果を参照して、再検討中にある。

#### 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 14 件)

[1] Tanaka T: Danazol regulates the functions of normal human endometrial stromal cell subpopulations by modifying endometrial cytokine networks, *International Journal of Molecular Medicine* 23: 421-428, 2009. 査定有り

[2] Tanaka T, Umesaki N: Danazol enhances Fas-mediated apoptosis in human endometrial epithelial cells within normal physiology. *International Journal of Molecular Medicine* 23: 237-243, 2009. 査定有り

[3] Tanaka T, Wang C, Umesaki N: Remodeling of the human endometrial epithelium is regulated by laminin and type IV collagen. *International Journal of Molecular Medicine*, 23: 173-180, 2009. 査定有り

[4] Tanaka T, Umesaki N: Complete remission of OC-resistant catamenial shoulder joint pain and inguinal pain associated with extraperitoneal endometriosis following personalized GnRH agonist therapy, *Clinical & Experimental Obstetrics and Gynaecology* 36(1): 46-48, 2009. 査定有り

[5] 田中哲二: 知っておきたい今日のホルモン療法：閉経とエストロゲン 産婦人科治療 2009 増刊:64-68. 産婦人科治療 98: 504-508, 2009. 査定なし

[6] Tanaka T, Umesaki N: Leptin regulates the proliferation and apoptosis of human endometrial epithelial cells.

*International Journal of Molecular Medicine*, 22: 683-689, 2008. 査定有り

[7] Tanaka T, Wang C, Umesaki N: Autocrine/paracrine regulation of human endometrial stromal remodeling by laminin and type IV collagen. *International Journal of Molecular Medicine*, 22: 581-587, 2008. 査定有り

[8] 田中哲二: 不妊治療、早発卵巣不全 (POF) への対処は? : 閉経患者の内分泌動態から考

案した早発卵巣不全 (POF) の排卵誘発法. 臨床婦人科産科 62: 474-481, 2008. 査定なし

[9] 田中哲二、宇都宮智子、八木重孝、南佐和子、池島美和、帽子英二、湯川和典、梅咲直彦: ヒト子宮内膜組織における Laminin および IV 型 Collagen の月経周期的発現制御と生理機能. 日本受精着床学会雑誌 25: 27-32, 2008. 査定有り

[10] 田中哲二、宇都宮智子、梅咲直彦: 外来診療患者の内分所見からみた閉経後卵巣のエストロゲン産生能力. 産婦人科の進歩 60: 24-26, 2008. 査定有り

[11] Tanaka T: Long-term personalized GnRH agonist therapy without estrogen supplementation for recurrent endometriotic catamenial pneumothorax -case report. Clinical & Experimental Obstetrics and Gynaecology 34: 179-181, 2007. 査定有り

[12] 田中哲二、宇都宮智子、南佐和子、八木重孝、粉川克司、梅咲直彦、宇都宮洋才: 抗癌剤誘発卵巣障害を予防するための GnRH agonist 療法と GnRH agonist 感受性の個人差. 日本受精着床学会雑誌 24: 54-58, 2007. 査定有り

[13] 宇都宮智子、田中哲二、梅咲直彦、宇都宮洋才: Topoisomerase I inhibitor 誘発卵巣顆粒膜細胞アポトーシスにおける BCL-2 family の発現. 日本受精着床学会雑誌 24: 38-42, 2007. 査定有り

[14] 田中哲二: 子宮内膜症に対する桂枝茯苓丸の作用機序仮説 -血清中に亢進している抗アポトーシス活性から-. 漢方医学 31: 15-21, 2007. 査定有り

[学会発表] (計5件)

[1] 田中哲二: 仮説: 自然閉経のプロセスからみた閉経期不定愁訴の発症機序. 2008年11月15日~11月16日 第23回日本更年期医学会学術集会 (ワークピア横浜、横浜市)

[2] 田中哲二、宇都宮智子、梅咲直彦: ラミニニンと4型コラーゲンの自分泌・傍分泌機序によるヒト子宮内膜間質組織再構築 平成20年10月23日~24日 第53回日本生殖医学会総会・学術講演会 (神戸国際会議場、神戸市)

[3] 田中哲二: 自然閉経過程の内分所見からみた閉経期不定愁訴の発症機序に関する一考察. 2008年9月25日 第59回和歌山内分代謝研究会・講演会 (和歌山県立医科大学、和歌山市)

[4] 田中哲二、宇都宮智子、李莉、梅咲直彦: 抗癌剤治療に伴う性腺機能障害の分子機序と予防療法. 2008年3月27日 第58回和歌山内分代謝研究会・講演会 (和歌山県立医科大学、和歌山市)

[5] Umesaki N, Tanaka T: Long-term

personalized GnRH agonist therapy without estrogen supplementation for recurrent extraperitoneal endometriosis. Feb 28-March 2, 2008. (Florence, Italy), 13th World Congress of Gynecological Endocrinology

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅咲 直彦 (UMESAKI NAOHIKO)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 20106339

### (2) 研究分担者

田中 哲二 (TANAKA TETSUJI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号 80275255

湯川 和典 (YUKAWA KAZUNORI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 20391434 「19年度」

南 佐和子 (MINAMI SAWAKO)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 90219692 「19年度」

粉川 克司 (KOKAWA KATSUJI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 80254548 「19年度」

八木 重孝 (YAGI SHIGETAKA)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 60372869 「19年度」

池島 美和 (IKEJIMA MIWA)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 70433349 「19年度」

帽子 英二 (BOUSHI EIJI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 60433348 「19年度」

### (3) 連携研究者

宇都宮 智子 (UTSUNMIYA TOMOKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 60382355

湯川 和典 (YUKAWA KAZUNORI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 20391434 「20年度」

南 佐和子 (MINAMI SAWAKO)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 90219692 「20年度」

八木 重孝 (YAGI SHIGETAKA)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号 60372869 「20年度」

池島 美和 (IKEJIMA MIWA)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号 70433349 「20年度」