

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791162
 研究課題名（和文） ヒト型子宮内膜症モデルマウスの作成とその非侵襲的リアルタイム解析システムの開発
 研究課題名（英文） Development of noninvasive and real-time assessment system for the novel human endometriosis model mouse
 研究代表者
 升田 博隆（MASUDA HIROTAKA）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：80317198

研究成果の概要：

我々は、少量の子宮内膜細胞を重度免疫不全マウスの腎被膜下へ移植することで均一の異所性内膜様組織を持つモデルを作成し、その内膜様組織の非侵襲的かつリアルタイムな定量化が長期にわたり体外より可能なシステムを開発した。このシステムは既存の内膜症動物モデルが持つ問題点をすべて克服しており、内膜症および正常内膜の機能メカニズムの解明ツールとしてだけでなく内膜症の新規薬剤の評価システムとしても有用であると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

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・子宮内膜症・モデル・BLI (bioluminescence imaging)

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症（内膜症）は月経困難や下腹部痛などの痛みを主症状とする疾患で、月経周期とともに増悪するエストロゲン依存型疾患であるが、benign cancer と呼ばれ今なお不明な点が多く根治的治療法も確立していない。（Lancet 364, 1789, 2004）。罹患率は月経のある女性の約1割以上にもおよび、閉経に至るまで繰り返される疼痛などにより女性のQOLを著しく損なうばかりではなく、約半数が不妊症を併発するなど社会的問題も大きく、早期診断法と治療法の確立が期待

されている。

また、内膜症の生物学的ポテンシャルは大変ユニークであり子宮内膜幹細胞や癌との関係も注目されている。以前より内膜症の約5%が癌化するとの報告もあり、近年K-ras 遺伝子変異と PTEN 遺伝子の欠失による癌への移行が証明された（Nat Med. 11, 63, 2005）。このように臨床像ばかりでなく基礎的研究としても非常に興味深い疾患である。

現在、国の内外を通して in vitro の内膜症研究（Hum Reprod Update. 12, 49, 2006 review）は極めて盛んである。しかしながら、

既存の *in vivo* モデル (J Clin Invest. 99, 2851, 1997, Fertil Steril. 80, 832, 2003) は、組織片の移植であり定量性に欠けるため生着組織の均一化が困難であり *in vivo* 現象の再現性に限界があること、長期間にわたって同一個体を定量的にモニタリングできないことからモデル動物として適切であるとは言い難いのが現状である。

2. 研究の目的

上記の背景を元に、我々は既存の内膜症 *in vivo* モデルの問題点を克服した新しいヒト型子宮内膜症モデルマウスを作成し、新規薬剤候補の経時的スクリーニングによる新たな治療法の開発および内膜症自体の病態生理の解明を行うことを本研究の主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) 同意を得て採取したヒト子宮内膜を酵素処理で分散し、その細胞(SDECs) 5×10^5 個を重度免疫不全マウスの腎被膜下に移植した。estradiol (E_2) と progesterone (P_4) の調節投与により様々な月経周期様環境を作り、10 週後の移植部位に H E 染色と免疫組織染色を行い細胞系譜及び機能の解析を施行した(Figure. 1)。

(2) SDECs に lentivirus を感染させることで luciferase(luc) を恒常的に発現する内膜細胞(LEECs)を作成し、同様に重度免疫不全マウスの腎被膜下に移植した。そのマウスに E_2 と P_4 の調節投与を行い、移植細胞の luc 活性を体外から経時的に計測し構築組織量の定量的解析を行った。

(3) 腎被膜下移植で再構築された組織に対し増殖期細胞マーカーである Ki-67 の免疫組織染色を施行した。

(4) LEECs を重度免疫不全マウスの腹腔内、皮下、腎被膜下に移植し、定期的に体外から luciferase 活性をモニタリングし動物モデルとしての比較を行った。

4. 研究成果

(1) SDECs を移植されたマウス全ての腎被膜下に子宮内膜様組織の再構築を認めた。この組織は E_2 投与では増殖期様変化を、 P_4 併用では分泌期様変化を、 P_4 の消退では月経様変化とともに活動性内膜症腹膜病変に類似した肉眼的形態変化を惹起した(Figure. 1)。

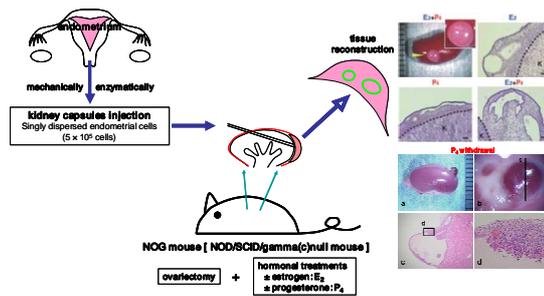


Figure 1. Transplantation of SDECs

(Masuda et al., 2007 PNAS)

(2) LEECs の移植では、再構築組織の E_2 依存的な用量時間的増大および E_2 と P_4 の調節投与による月経様変化を、luc 発光強度を体外から計測することで非侵襲的かつ経時的に定量化し得た(Figure. 2&3)。

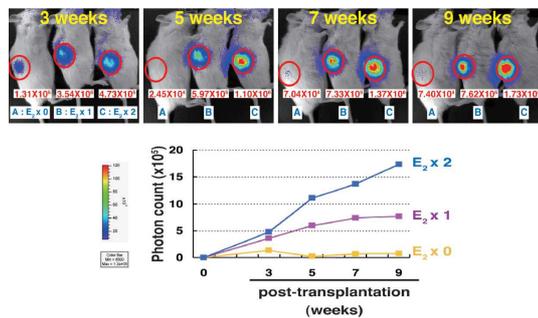


Figure 2. Quantitative assessment of E_2 -dependent growth

(Masuda et al., 2007 PNAS)

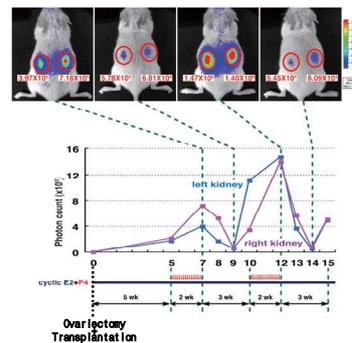


Figure 3.

Quantitative assessment of artificial menstrual cycle-related changes

(Masuda et al., 2007 PNAS)

(3) E_2 と P_4 の調節投与で模倣した月経周期様環境の各時期において Ki-67 陽性細胞は腺上皮および間質中ともに存在しており、間質の Ki-67 陽性細胞は smooth muscle actin 陽性細胞から近くの比較的一定の位置に存在していた。

(4) 腹腔内移植ではより少ない細胞数にて体外からの観察が可能であり、発光部位の経時的な移動よりその細胞は腹壁や腸管に正着したと考えられた。皮下移植した細胞はさらに少ない細胞数にて一定した場所で観察が可能であった。腹腔内および皮下移植では、luciferase の発光を体外から確認できるも

の、肉眼的に組織構築を確認できなかった。一方、腎被膜下移植では肉眼的な組織構築を認め、腺上皮細胞、間質細胞、血管を含む子宮内膜様組織が認められた。なお、観察可能期間は腎被膜下移植が最も長かった。

	procedure	tissue reconstruction	BLI signal intensity	BLI analysis	reconstruct survival
Kidney capsule Injection	complicated	macroscopic	moderate	easiest	longest
Intraperitoneal Injection	simple	microscopic?	strong	difficult	longest
Subcutaneous Injection	simple	microscopic?	strongest	easy	moderate

Table 1.
Advantage and weakness of each transplantation

(4)我々は、少量の細胞から均一の異所性内膜様組織を持つ動物モデルを作成することに成功し、長期にわたりその内膜様組織の非侵襲的かつリアルタイムな定量化が体外より可能であった。また、内膜症モデルのリアルタイム解析としては腎被膜下移植が最も適しており、腎被膜下で再構築される異所性内膜様組織はある極性をもって増殖していることが判明した。このモデルは内膜症の新規薬剤の評価システムに加えて、内膜症および正常内膜の機能メカニズムの解明への貢献も期待される。

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3件)

Masuda H, Okano HJ, Maruyama T, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y: "In vivo imaging in humanized mice." Curr Top Microbiol Immunol. 2008 ; 324 : 179-196. 査読有

Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T, Ono M, Miyoshi H, Okano HJ, Ito M, Tamaoki N, Nomura T, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y: "Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/ γ cnull immunodeficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 ; 104(6) : 1925-1930. 査読無

升田博隆, 丸山哲夫, 岡野栄之, 松崎有未, 吉村泰典: "子宮内膜幹細胞". 産婦人科の世界. 59(3), 33-42. 2007 査読無

[学会発表](計5件)

升田博隆・丸山哲夫・小野政徳・長島隆・梶谷宇・内田浩・浅田弘法・岡野栄之・松崎有未・吉村泰典: ヒト子宮内膜幹細胞様細胞の同定・分離とその幹細胞特性の機能解析、第13回日本生殖内分泌学会学術集会、2008年11月29日(大阪国際会議場・大阪市)

H. Masuda, T. Maruyama, M. Ono, T. Nagashima, T. Kajitani, H. Okano, Y. Matsuzaki, Y. Yoshimura.: Isolation and functional analysis of putative human endometrial stem/progenitor cells. ESHRE 2008 (24th Annual Meeting of The European Society of Human Reproduction and Embryology) 2008.7.7 (Barcelona, Spain) **Selected for the Poster Discussion Session (Oral Presentation)**

升田博隆・丸山哲夫・小野政徳・岡野栄之・松崎有未・吉村泰典: ヒト子宮内膜幹細胞の同定・分離の試み、第49回日本臨床細胞学会総会、2008年6月8日(グランドプリンスホテル新高輪・東京) **ワークショップ(再生医療, 最近のトピックス)**

升田博隆・丸山哲夫・吉村泰典・岡野栄之・松崎有未: 新規子宮内膜症モデルマウスの作成とそのリアルタイム解析システムの開発、第28回日本再生・炎症医学会、2007年8月3日(京王プラザホテル・東京) **ワークショップ(分子イメージング)**

H. Masuda, T. Maruyama, T. Nagashima, M. Ono, T. Kajitani, H. Uchida, K. Ohta, T. Arase, M. Kagami, H. Asada, H. Okano, Y. Matsuzaki, Y. Yoshimura.: Reconstruction and in vivo bioluminescence imaging of human endometrium in immunodeficient mice: its potential application as an endometriosis model. ESHRE 2007 (23rd Annual Meeting of The European Society of Human Reproduction and Embryology) 2007.7.3 (Lyon, France) **Basic Science Award for oral presentation. Finalist**

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

6 . 研究組織

(1)研究代表者

升田 博隆 (MASUDA HIROTAKA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80317198

(2)研究分担者

(3)連携研究者