

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390436

研究課題名(和文)

磁性体を用いた新しい子宮内膜症モデルの開発

研究課題名(英文)

Development of a novel animal model of endometriosis using magnetic materials

研究代表者

丸山 哲夫 (MARUYAMA TETSUO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10209702

研究成果の概要(和文):

本研究では、磁性体を用いて子宮内膜症モデルマウスを作成し、その異所性内膜病変の振る舞いを非侵襲的・リアルタイムに定量解析することが可能なシステムを構築することを目的とする。まず、非機能表面マーカーと発光および蛍光蛋白の三者を同時に発現することが可能なウイルスベクターを開発した。これを内膜細胞に感染させたうえでその表面マーカーを標的にした抗体と磁性体を用いることにより、感染細胞の分取とマウス体内の特定の場所への集積が可能となり、ほぼ単一の構築病変の振る舞いを *in vivo* イメージングにより観察・解析するシステムの基盤知見・技術が得られた。

研究成果の概要(英文):

The aim of this research project was to develop a novel animal model of endometriosis using magnetic materials which enables non-invasive and real-time of assessment of the endometriotic lesion by *in vivo* imaging. We first have developed a lentivirus vector enabling the expression of a non-functional surface marker and fluorescent and luminescent proteins in infected cells. We then successfully isolated the infected endometrial cells and accumulated them to the specific site *in vivo* using magnetic materials. Finally, we were able to assess the behavior of the reconstructed lesion in non-invasive and real-time manner using *in vivo* imaging system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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：子宮内膜症，応用動物，幹細胞，血管新生

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は、子宮内腔以外の場所，すなわち異所性に子宮内膜様組織が生着・増殖・進展することにより、疼痛を主とする月経困難症および不妊症を引き起こす疾患である。これは、患者自身の QOL を著しく損なうばかりでなく、生殖年齢層にある女性の 5～10% が罹患していることより、少子化問題並びに家庭・社会における女性の労働資源性と

いう観点からも、社会的経済的損失は甚大である。現在、ゴナドトロピン放出ホルモンアナログ剤 (GnRHa) や性ステロイド関連化合物などによる薬物療法と外科的治療が主流である。しかし、前者は内膜症病変を dormant にすることが主であり、後者では病変が残存する可能性が有り、いずれも根治療法ではない。従って、根治性を目指した新しい治療法の開発が急務である。

子宮内膜症の病因メカニズムの解明および新しい治療薬の開発には、動物モデルが必須である。しかし、これまでの内膜症モデルは、ヒト内膜組織・細胞の定量的使用とその生着率、構築組織の均一性と *in vivo* 現象の再現性、血管ネットワークの有無、長期間にわたる非侵襲的かつリアルタイムな構築組織の定量的モニタリング、といった点を十分に満たしていると言えない。最近われわれは、これらの点を克服した新しい内膜症モデルマウスを開発した (Masuda, et al. Proc.Natl.Acad.Sic.USA, 2007)。

そこで、腹腔内膜症モデルを作成するには、移植細胞をある一定期間固定する必要があると考え、その細胞の固定方法として、磁性体を使用する着想に至った。

さらに、本モデルを活用して、内膜症の病因メカニズムの解明と新しい治療薬・治療法の開発を目指す。特に、上記の我々の内膜症モデルマウスでは、ユニークなヒト由来の血管新生がみられることに加えて、最近、根治性という観点から血管新生を標的とした内膜症治療について基礎研究が行われつつあることから (Ferrero, et al. Br J Pharmacol 2006;149:133-135), 血管新生関連因子に解析の焦点を絞る。一方、根治性という観点からのもうひとつの標的は、幹細胞である。最近われわれは、子宮内膜 (論文準備中) および子宮筋 (Ono, et al. Proc.Natl.Acad.Sic.USA, 2007; in press) より幹細胞候補集団を分離した。この知見を活用して、幹細胞を標的にした新しい内膜症治療薬および治療法の開発を目指す研究展開を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、磁性体を用いて腹腔子宮内膜症モデルマウスを作成し、その異所性内膜病変の振る舞いを非侵襲的・リアルタイムに定量解析することが可能なシステムを構築する。さらに、本システムを用いて、内膜症病変の増大・進展に寄与する種々の既知・未知因子について、特に血管新生および幹細胞に関連する因子について、その同定と機能解析を行い、病因メカニズムの解明を目指す。また、それらの知見に立脚した新しい治療薬・治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 磁性体を用いた異所性子宮内膜モデルマウスの作製

磁性体標識発光内膜細胞の作製

磁性体標識マーカーおよび発光マーカーの遺伝子導入のためのベクター構築: 当初は IL-2 受容体 α 鎖 (CD25; Tac) を選別マーカーにする予定であった。しかし、細胞内シグナル伝達系への影響を最小限にするた

め、細胞内ドメインを欠失した別の膜分子を選別マーカー (非機能型細胞表面受容体 [SR]) としたうえで、さらに発光および蛍光蛋白の3つを同時に発現するレンチウイルスの作製を行った。

磁性体による選別のための条件設定

内膜腺癌細胞株 Ishikawa で得られた実験条件を元に、上記で得られたレンチウイルスと初代正常内膜細胞を用いて、磁場を利用した magnetic cell sorting (AutoMACS) による選別のための条件設定を行う。レンチウイルスに感染した細胞は SR を膜上に発現しているため、抗 SR 抗体-coated Dynabeads® と混合することにより、細胞は磁性体に標識される。上記によって磁性体標識された発光内膜細胞を、磁場を利用した magnetic cell sorting (AutoMACS) により選別・濃縮し、次の B に移る。

(2) モデルマウスの作製

磁性体標識発光内膜細胞の移植

重度免疫不全マウスである NOG マウスの腹腔内に、分散・選別・濃縮された磁性体標識発光内膜細胞を移植する。同時に卵巣を摘出し、エストロゲンペレットを皮下に留置する。

磁性体留置の条件設定

単数あるいは複数個のミニ磁石を、前腹壁の皮下に留置し、磁性体細胞を集積させ、異所性組織構築を促す。

生物発光イメージング

Xenogen 社 IVIS を用いて、上記の異所性発光内膜細胞集団・組織量を、そのルシフェラーゼ活性を指標に体外から非侵襲的・リアルタイムに定量的解析を行う。

(3) 血管新生および幹細胞システムを標的にした新しい子宮内膜症治療法の開発のための基盤研究:

血管新生・幹細胞機能を制御する種々の薬剤、抗体、遺伝子の導入 (腹腔内投与、静脈投与、ミニポンプなど): 本モデルマウスに対して、血管新生阻害剤 (TNP470, endostatin, 抗 VEGF 抗体など) あるいは遺伝子 (IL-8 や TNF- α などの siRNA) を投与し、再構築異所性内膜の増殖・進展に及ぼす影響を、発光イメージングおよび Tunnel assay など組織化学的に解析する。

内膜症モデルマウスへの内膜幹細胞制御の試み: 内膜幹細胞関連遺伝子産物に対する siRNA を作製し、発光内膜細胞を有する内膜症モデルマウスへ投与し、再構築異所性内膜の増殖・進展に及ぼす影響を発光イメージングおよび組織化学的に解析する。

4. 研究成果

(1) 初代培養内膜細胞ではなく内膜腺上皮細胞株 Ishikawa を用いて、実験システムの基盤データを収集した。まず、Ishikawa 細胞を、以前我々が用いたレンチウイルス

(Masuda, et al., PNAS, 2007)により、発光蛋白と蛍光蛋白の両方で標識した。Ishikawa は EpCAM を発現しているの、抗 EpCAM 抗体と磁気ビーズを用いて標識した Ishikawa 細胞を分取し、重度免疫不全マウスの腹腔内へ移植した。同時に腹壁皮下に直径 5 mm の磁石を埋め込み、約 4 週間後に既報 (Masuda, et al., PNAS, 2007) と同様に bioluminescence imaging を行ったところ、埋め込んだ磁石の位置に Ishikawa が集積していた。しかし、EpCAM で選別していない Ishikawa でも磁石埋め込み位置に集積傾向がみられた。これは、磁石の皮下埋め込み部位で、局所の炎症反応が起こり、さまざまなケモカインやサイトカインが産生され、それにより移植した Ishikawa が遊送し集積していると考えられたため、埋め込みでなく、皮膚の外に貼付しただけにしたところ、24 時間の磁石の留置で十分集積することが判明した。一方、今後の初代培養内膜細胞の使用に向けて、発光ならびに蛍光蛋白に加えて選別マーカーの 3 つの蛋白を同時に発現するレンチウイルスの作製に着手した。

(2) 選別マーカーとトレーサーマーカー (ルシフェラーゼと GFP) を同時に且つ恒久的に発現させることが可能なレンチウイルスベクターが必要となる。そこで、前年度に構築したレンチウイルスベクターの検証を行ったところ、ウイルス力価や感染効率が低いことが判明したため、全長を出来るだけ短くするなどのベクターの改良とともに、遺伝子導入や感染の効率を上げるために培養条件や導入方法・試薬の改善を行った。その結果、許容できるレベルの力価ならびに感染効率が得られた。しかしながら、選別マーカーを用いても極めて低率にしか選別することができず、選別マーカーの発現レベルは極めて低いことが示唆された。その原因を検討したところ、本ウイルスベクターに用いた IRES 配列特有の問題である可能性が高いことが疑われた。そこで、IRES の代わりに、タンデムな 2 つの遺伝子を同時に発現することが可能な新しい配列を IRES の代わりに組み込んだ結果、高率にレンチウイルス感染細胞を選別することが可能となった。

(3) これまで取り組んで来た磁性体による単一病変内膜症モデルマウスのブラッシュアップを行った。昨年度に作製した蛍光蛋白、発光蛋白、および非機能型細胞表面受容体 (SR) の三者を発現することが可能なレンチウイルスベクターを初代ヒト子宮内膜細胞に感染させて SR を発現させた。続いて、磁気ビーズと結合した SR 抗体と反応させ、MACS で感染細胞を選別・分離した。この磁性を帯びた内膜細胞を重度免疫不全マウスの腹腔内に投与し、同時にマウス腹壁にネオジム磁石を 2-4 時間留置して帯磁細胞の腹壁

腹膜への集積を行った。感染方法、投与細胞数、および磁石の留置時間などについて条件を変えて実験を行ったが、感染効率および単一病変の構築率が必ずしも高率ではないことが判明した。前段階の実験として行った内膜腺上皮細胞株とその内因性の上皮マーカーを用いた単一病変モデルの作成の際の条件を参考に、初代内膜細胞の代わりに内膜腺上皮細胞株で同様の実験を行ったところ、磁石留置により初めて単一病変 (腫瘍形成) が出来る最小の移植細胞数と最適な条件を見いだした。以上、これをプロトタイプとした磁性体を用いた新しい腹腔子宮内膜症モデルマウスの作成と確立に際して、基盤となる材料、技術、ならびに知見が得られた。

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 11 件)

*corresponding author

1. Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Nishikawa Uchida S, Masuda H, Nagashima T, Yoshimura Y, Maruyama T*: OCT4 expression in human uterine myometrial stem/progenitor cells. *Hum Reprod*. 2010; 25(8), 2059-2067. 査読有
2. Maruyama T*, Masuda H, Ono M, Kajitani T, Yoshimura Y: Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. *Reproduction*. 2010; 140, 11-22. 査読有
3. Masuda H, Matsuzaki Y*, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, Arase T, Oda H, Uchida H, Asada H, Ito M, Yoshimura Y, Maruyama T*, Okano H: Stem Cell-Like Properties of the Endometrial Side Population: Implication in Endometrial Regeneration. *PLoS ONE*. 2010; 5(4), e10387. 査読有
4. Maruyama T*: Stem/progenitor cells and the regeneration potentials the human uterus. *Reprod Med Biol*. 2010; 9, 9-16. 査読有
5. Maruyama T*: Therapeutic Strategies for Implantation Failure due to Endometrial Dysfunction. *J Mamm Ova Res*. 2009; 26(3), 129-133. 査読有
6. Maruyama T*, Yoshimura Y: Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocrine J*. 2008; 55(5), 795-810. 査読有
7. Masuda H*, Okano J.H, Maruyama T, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y: In vivo Imaging in Humanized Mice. *Current Topics in Microbiology and Immunology*

324 2008; 179-196. 査読有

8. [平成22年度日本生殖学会学術奨励賞] Nagashima T, **Maruyama T***, Uchida H, Kajitani T, Arase T, Ono M, Oda H, Kagami M, Masuda H, Nishikawa S, Asada H, Yoshimura Y: Activation of SRC kinase and phosphorylation of STAT5 are required for decidual transformation of human endometrial stromal cells. **Endocrinology**. 2008; 149(3), 1227-1234. 査読有
9. Ohta K, **Maruyama T***, Uchida H, Ono M, Nagashima T, Arase T, Kajitani T, Oda H, Morita M, Yoshimura Y: Glycodelin blocks progression to S phase and inhibits cell growth: a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth. **Mol Hum Reprod**. 2008; 14(1) 17-22. 査読有
10. Ono M, **Maruyama T***, Yoshimura Y: Regeneration and adult stem cells in the human female reproductive tract. **Stem Cells and Cloning**. 2008; 1, 23-29. 査読有
11. [平成21年度日本産科婦人科学会優秀論文賞] Arase T, Uchida H, Kajitani T, Ono M, Tamaki K, Oda H, Nishikawa S, Kagami M, Nagashima T, Masuda H, Asada H, Yoshimura Y, **Maruyama T**: The UDP-glucose receptor P2RY14 triggers innate mucosal immunity in the female reproductive tract by inducing IL-8. **J Immunol**. 2009; 182(11), 7074-7084. 査読有

[学会発表](計8件)

1. [招請講演] **丸山哲夫**: 子宮内膜症の幹細胞説. 産婦人科スプリングフォーラム(京都府京都市・京都平安ホテル) 2011年3月5日-6日
2. [招請講演/セミナー] **Tetsuo Maruyama**; Human uterine stem/progenitor cells. Program in Developmental biology, Baylor College of Medicine(BCM). October 21, 2010, Huston, USA
3. [招請講演] **Tetsuo Maruyama**, Hirotaka Masuda, Takashi Nagashima, Takashi Kajitani, Masanori Ono, Sayaka Nishikawa, Uchida Hideyuki, Oda, Kaoru Miyazaki, Toru Arase, Maki Kagami, Hiroshi Uchida, Hironori Asada, Yasunori Yoshimura; Possible involvement of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of endometriosis. The First Asian Conference on Endometriosis(ACE). October 16-17, 2010, Shanghai, China

4. [招請講演/シンポジウム] **丸山哲夫**: 産婦人科医療と再生医療ソース-ヒト子宮由来幹細胞-. 第46回日本周産期・新生児医学会(兵庫県神戸市・神戸国際会議場) 2010年7月11日-13日
5. [招請講演] **Tetsuo Maruyama**; Animal model for reconstructed functional human endometrium: Potential for drug testing and gene-target validation. IUPS Satellite Symposium on Endometrial Receptivity and Blastocyst. July 25, 2009, Kyoto, Japan
6. [招請講演] **Tetsuo Maruyama**; Somatic Stem Cells in the myometrium and its putative implication in myoma formation. 26th European Society of Human Reproduction & Embryology(ESHRE) June 27-30, 2010, Rome, Italy
7. [招請講演] **Tetsuo Maruyama**; Regeneration potential of stem cell systems in the human female reproductive tract. 1st World Congress on Reproductive Biology. May 24-25, 2008 USA, Hawaii
8. [招請講演/セッション] **丸山哲夫**: 幹細胞からみた子宮内膜症の発症・伸展メカニズム. 第2回婦人科ホルモン依存性疾患研究会(東京) 2010年5月8日

[図書](計0件)

[産業財産権]

- 出願状況(計4件)
- 名称: 平滑筋幹細胞の単離方法
発明者: **丸山哲夫**, 小野政徳
権利者: 学校法人慶應義塾
種類: 特許権
番号: 特願2010-507301
取得年月日: 2010年8月19日
国内外の別: 国内
- 名称: 平滑筋幹細胞の単離方法
発明者: **丸山哲夫**, 小野政徳
権利者: 学校法人慶應義塾
種類: 特許権(欧州)
番号: 09729768.3
取得年月日: 2010年11月4日
国内外の別: 外国
- 名称: 平滑筋幹細胞の単離方法
発明者: **丸山哲夫**, 小野政徳
権利者: 学校法人慶應義塾
種類: 特許権(米国)
番号: 12/937,305
取得年月日: 2010年10月11日
国内外の別: 外国

名称：平滑筋幹細胞の単離方法
発明者：丸山哲夫、小野政徳
権利者：学校法人慶應義塾
種類：特許権（中国）
番号：200980121912.1
取得年月日：2010年12月10日
国内外の別：外国

取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

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・講師
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・助教
研究者番号：90286534

梶谷 宇 (KAJITANI TAKASHI)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：60407111

(3) 連携研究者

なし