

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06004

研究課題名(和文) 霊長類の素養が付与されたマウス子宮内膜症モデルの開発

研究課題名(英文) Development of mice model for endometriosis, privileged with characteristics in female primates

研究代表者

中村 紳一郎 (Nakamura, Shinichiro)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：50307980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類で見られる子宮内膜症の発症要件である、腹腔内での子宮内膜組織の生着、それに対する免疫反応、月経様ホルモン制御、を複合的に有する疾患モデルの作製を目指した。免疫不全マウス(SCID-hu)1個体内の腹腔内へカニクイザル子宮内膜組織、静脈へ骨髓細胞、卵摘後にプログラムポンプを皮下埋設しエストロゲンを断続的に投与し、目的のモデルを作製する。現状は、上述とをSCID-huへあわせて移植する実験、では卵巣摘出ICR系マウスの皮下へポンプを埋設しエストロゲンを投与、ホルモン挙動を確認する実験が完了している。助成の期間は過ぎるが、を併せ持つモデル動物が作製できる予定でいる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症は一部の霊長類種でしか自然発症せず、解剖学的並びに生理学的特徴の相違から自然発症しないマウスを用いた疾患モデルでは子宮内膜症の表現型の一部しか再現できない。本計画のマウスは、カニクイザルの子宮内膜組織、免疫細胞、月経様性周期が付与された、これまでにない、霊長類に見られる子宮内膜症のすべての表現型を有している。子宮内膜症の探索的研究は、部分的な表現型を有する疾患モデル動物を用いることで、研究開発の妨げが妨げられていた。このモデル動物の開発は、子宮内膜症の基礎的並びに探索的研究に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：We have attempted to develop a novel animal model that individual immunodeficient mouse (SCID-hu) possesses the common characteristics of endometriosis: (1) transplanted endometrial tissue in the abdominal cavity, (2) immune response against it, and (3) menstrual-like hormone cycle. In fact, SCID-hu mice engrafted with intra-abdominal endometrial and intra-vessel myeloid tissues and ovariectomized ICR mice regulated with estrogen secretion has been completed, respectively. Although supported period has been already passed by, we are estimating the novel model possessed with all factors of endometriosis, 1, 2 and 3.

研究分野：実験動物学

キーワード：疾患モデル動物 子宮内膜症 カニクイザル 免疫不全マウス

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は月経に付随して症状を示す、妊娠可能年齢の女性疾患で、不妊の原因にもなる。根本的な治療法が存在せず、本症を解決することが、先進国の歯止めのかからない少子化を救うことにも繋がる。研究の大きな障壁となっているのが、以下の2点である。

- ・主たる発症メカニズムが不明で、治療ターゲットが定まっていない。
- ・適切なモデル動物の欠落し、In vitro 等から In vivo 試験への移行が困難である。

医科学系の研究分野で、特定の疾患に対するメカニズムならびに創薬研究のプロセスには、適切な疾患モデル動物の存在が必須である。対象とする疾患の表現型をより良く模倣したモデル動物の存在によって、創薬や治療法の探索段階でのトライアンドエラーが行いやすく、そこから選別された手法が、次の非臨床試験、臨床試験への適切なステップとなる。

子宮内膜症モデル動物の現状として、最もポピュラーなのがマウス子宮内膜組織の自家ないしは近交系の同系統腹腔内移植モデル、探索のターゲット遺伝子の組換えマウス子宮内膜組織の自家腹腔内移植モデル、その他にヒト子宮内膜組織の免疫不全げっ歯類への腹腔内移植モデルなどがあるが、ヒト子宮内膜症の表現型を網羅的に標榜するげっ歯類モデルは存在しない。一方、子宮内膜症を自然発症するマカク属サル類は、ヒトと全く同じ表現型を呈するが、発症までに様する年数(7年以上)に加え、実験可能な施設が少なく、本課題の採択期間中には1頭の価格高騰(約800万円)が社会問題になるなど、経済的負担も大きい。

子宮内膜症を研究するための基盤的な汎用リソースとして、経済的な負担の少なく、かつ病態をより良く反映したげっ歯類モデル動物が必要である。

2. 研究の目的

霊長類の自然発症子宮内膜症で明らかとなっているいくつかの素養をげっ歯類へ付与し、子宮内膜症の最良なげっ歯類モデルを作製することが目的である。遺伝子組換えマウス作製技術の発展に、遺伝子編集技術が加わり、いまや「遺伝子組換え技術」でいかなる疾患モデルもげっ歯類で作製可能である。しかし子宮内膜症はヒトを含む霊長類とげっ歯類の雌性生殖器官の解剖学および生理学的差異、すなわち卵巣と卵管の解離、月経の存在が発症の起因となる特殊性のため、最新の「遺伝子組換え技術」でも適切な子宮内膜症モデル動物の作製は困難である。

月経において、子宮内膜組織を含む経血は腔からだけでなく、卵巣、卵管間の解離部分から腹腔内へ漏出する。播種された経血と子宮内膜組織は腹腔内の免疫反応によって除去されるが、免疫機能の異常があると腹壁(漿膜面)に同組織が着生し、月経周期に同期しながら増殖と剥離、出血を繰り返す。

げっ歯類モデルでもこういった一連の動きの再現が必要であり、そのためには「遺伝子組換え技術」より「ヒト化マウス」の技術が有効と考えた。ただしヒト細胞使用の倫理的障壁を下げるため、本計画ではヒトと同様に子宮内膜症を発症し、通年性に月経のあるカニクイザルをドナーとし、以下の子宮内膜症の素養をレシピエントである免疫不全マウスへ付与する実験を考案した。

- ・カニクイザル子宮内膜組織
- ・カニクイザル免疫細胞
- ・月経様のホルモン挙動

マウス1個体の中に、子宮内膜症の表現型を複合的に有することで、これまでの子宮内膜症げっ歯類モデルの弱点を克服する。

もしサル類(特にカニクイザル)を自然発症モデルとして使うなら、有病動物を獲得するためにおよそ7年以上を要し、すべての個体が発症するわけではなく、サル個体そのものが高価(約800万円)飼育コストもげっ歯類より格段に高価である。これらの状況を考えると、作製にあたって外科的施術が必要な「ヒト化マウス」であっても、有用性からのメリットは大きい。

一般的な医科学実験の中では、げっ歯類でより広範な挑戦的探索からターゲットを絞り込み、中大動物(サル類、ブタ、イヌ)を用いる試験を行い、これがヒトでの臨床試験へと繋がる。試行数ならびに短期で多面的な研究に貢献できる良好なげっ歯類モデルを開発することによって、子宮内膜症の基礎研究の敷居を低くすることで、治療法、創薬開発に大きく貢献することが期待できる。

3. 研究の方法

以下の実験はいずれも麻布大学動物実験委員会および滋賀医科大学動物実験委員会の承認を受けた。マウスを用いる実験は麻布大学附置生物科学総合研究所、カニクイザルを用いる実験は滋賀医科大学動物生命科学センターにて、適切な環境下で実施された。

実験 マウス子宮内膜組織の同種移植による移植条件予備検討

ドナーはメス C57BL/6N (日本クレア, Tokyo, Japan) を7匹、同系統移植のレシピエントはメス C57BL/6N を2匹、免疫不全の異系統移植のレシピエントはメス BALB/c nu/nu (日本クレア, Tokyo, Japan) を5匹、用いた。ドナー1例から得た細胞をレシピエント1例へ移植した。

ドナーマウスをペントバルビタールナトリウム(200 mg/kg, i.p.) (nacalai tesque: Kyoto,

Japan、麻布大学動物実験委員会承認レシピによる)によって安楽死、子宮を摘出した後、子宮全体を1%トリプシン(nacalai tesque: Kyoto, Japan)に浸漬、インキュベートした(60分間、37℃)。子宮の粘膜面を露出後、内膜を搔爬し内膜細胞を遊離させ、1mLのEMEM(Wako: Osaka, Japan)に懸濁して全自動セルカウンター(BIO RAD, CA, USA, TC20)で細胞数を計測した。細胞懸濁液を遠心分離し、上清を除去したのち、採取したすべての細胞を200 μ LのEMEMに再懸濁し、レシピエント同系統移植2匹、異系統移植2匹に腹腔内投与した。異系統移植の3例は200 μ LのEMEM懸濁液にVitro Gel Hydrogel Matrix(TheWell: NJ, USA)を200 μ L混和してから各レシピエントへ投与した。

レシピエントは細胞移植から2週間後にペントバルビタールナトリウム(200 mg/kg, i.p.)の投与によって安楽死させ、子宮、卵巣、腹壁を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。固定した臓器をパラフィン包埋したのち3 μ mに薄切した切片を作製し、HE染色、抗CD10抗体(abcam, Cambridge, UK)および抗CD10ポリクローナル抗体(proteintech, IL, USA)による免疫染色にて評価を行った。免疫染色の陽性対照として既存の異所性子宮内膜組織を有するカニクイザル切片、ICRマウスの子宮切片を用いた。

実験 インフュージョンポンプを用いた月経様ホルモン分泌誘起

ICRマウス(日本クレア、Tokyo, Japan)3匹を三種混合麻酔(メドトミジン、ミダゾラム、ブトルファンール:0.75+4+5 mg/kg, ゼノアック、Kooriyama, Japan、サンド、Tokyo, Japan、明治アニマルヘルス、Kumamoto, Japan)下にて卵巣摘出し、2週間後に頸背部皮下にプログラムインフュージョンポンプiPRECIO(プライムテック、Tokyo, Japan)を埋設した。iPRECIOに50 μ g/mLのエストラジオール(Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)を充填し、1-3 μ L/hの幅で、1匹は10日間28日間、霊長類の月経を模倣した分泌量が投与されるように設定した。ペントバルビタールナトリウムで安楽死させた後、心臓から採血を行った。

その他、卵巣摘出の手技練習に用い、1週間後に安楽死された9例、卵巣摘出後に10 μ g/200 mL皮下投与後、3日後後に安楽死された1例、卵巣摘出術を行わず、膣スミアによって発情前期、発情期、発情後期、休止期と確認後、安楽死された各3例から心臓採血を行った。血液から血漿を分離後、血中エストロゲンならびにプロゲステロン値をELISA(abcam, Cambridge, UK)にて計測した。

実験 カニクイザル子宮内膜組織ならびに骨髓細胞の異種移植

ドナーはメス・カニクイザルを2頭、レシピエントはメスCB17/1crJcl-Prkdcscid(SCID-hu:日本クレア、Tokyo, Japan)を6匹、用いた。ドナー1頭からレシピエント各3匹へ移植した。またEMEMのみを腹腔内、RMPI-1680のみを静脈内投与したコントロールのSCID-huを3匹、設置した。

カニクイザルを塩酸ケタミン・キシラジン(5+1 mg/kg, i.m.) (第一三共、Tokyo, Japan、ゼノアック、Kooriyama, Japan)によって前麻酔、その後、2-4%イソフルラン(MSD animal health, NJ, USA)で麻酔し、動物用腹腔内視鏡(LA-6500、町田製作所、Chiba, Japan)で骨盤腔内を観察しながら、子宮広間膜および卵管間膜に発生した子宮内膜症の病変部位、すなわち異所性子宮内膜組織を約5 mm角を採取した(図1)。さらに腸骨液1 mLをイリノイ骨髓穿刺針15G(日本BD、Tokyo, Japan)にて採取した。異所性子宮内膜組織はEMEM、骨髓液はRPMI-1640(Wako: Osaka, Japan)に浸漬し、滋賀医科大学から麻布大学へ移送した。採取から約5時間後、異所性子宮内膜組織は1%トリプシンに浸漬、インキュベートした(60分間、37℃)。子宮の粘膜面を露出後、内膜を搔爬し内膜細胞を遊離させ、1mLのEMEMに懸濁して全自動セルカウンターで細胞数を計測した。細胞懸濁液を遠心分離し、上清を除去したのち、採取したすべての細胞を200 μ LのEMEMに再懸濁し、Vitro Gel Hydrogel Matrix(TheWell: NJ, USA)200 μ Lと混和してからレシピエントの腹腔内へ三種混合麻酔下にて投与した。骨髓液は遠心分離(2000rpm, 10 min, 4℃)し、3 mLのPBSに懸濁、懸濁液と3 mLのFicoll(1.077)液の分離液とし、さらに遠心分離した(800G, 30 min, 室温)。分離液の中間に現れた骨髓細胞を採取し、1 mLのRPMI-1640に懸濁、全自動セルカウンターで細胞数を計測した。1匹当たり200 μ Lに再懸濁した細胞を、異所性子宮内膜組織が投与されたレシピエントへ静脈投与された。

レシピエントは細胞移植から2週間後にペントバルビタールナトリウム投与によって安楽死させ、子宮、卵巣、腹壁、小腸、大腸、脾臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。固定した臓器をパラフィン包埋したのち3 μ mに薄切した切片を作製し、HE染色、子宮、卵巣、腹壁、小腸、大腸は抗CD10抗体(abcam, AB951: Cambridge, UK)、脾臓は抗CD3抗体ならびに抗CD20抗体(ともにDAKO Agilent, CA, USA)による免疫染色にて評価を行った。免疫染色の陽性対照として異所性子宮内膜組織を有するカニクイザルならびにカニクイザル脾臓切片を用いた。

4. 研究成果

実験

移植細胞数

メディアムのみ細胞を懸濁した同系統移植時のドナー由来細胞数は、各 2.58×10^6 cells/mL、 2.84×10^6 cells/mLだった。メディアムのみ細胞を懸濁した免疫不全異系統移植時のドナー由来細胞数は、各 1.59×10^6 cells/mL、 1.55×10^6 cells/mL、メディアムとゲルに細胞を懸濁した免疫不全異系統移植時のドナー由来細胞数は、各 1.95×10^6 cells/mL、 4.53×10^6 cells/mL、 3.22×10^6 cells/mLだった。

HE 染色

同系統移植では 2 例中 1 例で卵巣周囲の脂肪組織に子宮腺や間質細胞と思われる構造が見られたため、移植した子宮内膜組織が生着したものと判断した。免疫不全異系統移植のうちメディウムのみに懸濁した移植では、2 例中 1 例の腹壁に、メディウムとゲルとで懸濁した免疫不全異系統移植では 3 例中 3 例の卵巣周囲の間膜脂肪組織または腹壁周囲の脂肪組織に子宮腺や間質細胞と思われる構造が確認できた (図 2-A, B)。

免疫染色

マウス子宮組織では abcam の抗 CD10 抗体では子宮腺上皮細胞刷子縁のみが陽性となり、間質細胞は陰性だったが、proteintech の抗 CD10 抗体はマウス子宮だけでなく、レシピエントに生着した子宮腺上皮の刷子縁と間質細胞の一部が陽性だった (図 3-A, B)。カニクイザル子宮組織では子宮腺上皮細胞刷子縁と間質細胞の細胞質で陽性を示した (図 3-C)。

現在、子宮内膜症モデルを作る際、ドナー子宮を腹壁へ縫合する手法が主流だが、この実験では実際に霊長類で起こる腹腔内での播種の現象を模倣し、細胞の腹腔内接種で移植した。また、目的とする移植で実際は、実験 による 2 回の手術を実施するため、動物福祉の面から苦痛の軽減を考慮した手法でもある。以上の結果から最低 1.5×10^6 cells/mL 投与すれば生着し、ゲルと混和することで生着が促されることが明らかとなった。

実験

卵巣摘出と iPRECIO を皮下埋設した動物は図 4 の通りで、術後、最長 28 日間 エストラジオールを iPRECIO にて投与された。その他の群を含めた、血中エストロゲンとプロゲステロンの値は表 1 の通りで、卵巣摘出群の値に対し、エストロゲン、プロゲステロンともに、1 例だけであるが エストラジオール 1 回接種の個体は最も高く、iPRECIO による投与を行った個体も高値であった。卵巣摘出後の iPRECIO による エストラジオール分泌が効果を示していることが明らかとなった。

実験

移植細胞数

異所性子宮内膜組織に由来する細胞の、レシピエント 1 匹に対する移植細胞数は、一方のカニクイザルドナーは、 1.0×10^6 cells/mL、他方のカニクイザルドナーは 2.6×10^5 cells/mL だった。カニクイザル由来の骨髓細胞はすべての個体に 1.0×10^6 cells/mL 投与した。

HE 染色

カニクイザルドナー 2 頭からレシピエント各 3 匹に腹腔内移植したうち、それぞれ 2 匹ずつの個体 (6 匹中計 4 匹) で、卵巣周囲の脂肪織、腹部ならびに背部腹壁に子宮腺や間質細胞と思われる構造が見られたため、移植した子宮内膜組織が生着したものと判断した (図 5-A, B)。脾臓ではコントロールはすべての領域が SCID-hu 由来と思われる骨髓細胞に占められていたが、カニクイザル由来骨髓細胞を移植したレシピエントでは、大小不同の円形から卵円形の細胞が島状に集まる像が観察された (図 5-C)。

免疫染色

移植由来の細胞は子宮腺上皮細胞刷子縁と間質細胞の細胞質が抗 CD10 抗体に対し陽性を示した (図 6-A)。脾臓では HE 染色で観察された島状病変内に、抗 CD3 抗体陽性細胞を多数認め、一方で抗 CD20 陽性細胞は散在性に確認され (図 6-B, C)、その数はそれぞれコントロールより多かった。現在、移植細胞がカニクイザル由来か否か、さらに明確に調べる手法として、Ku80 抗体 (タカラバイオ、Kusatsu, Japan) を用いる免疫染色を計画中である。

以上の通り、目的とするモデル動物を作製するための基礎的な実験は終了したが、最終型のモデル動物ではない。今後、SCID-hu を用いて実験 を行ったのち、同じ個体で実験 を行う実験 を行い、目的のモデル動物の完成とする。



図1 腹腔内視鏡によるカニクイザル子宮内膜症の異所性子宮内膜組織の観察像。チョコレート嚢胞 (★) と茶褐色の帯状病変 (→) が見られ、茶褐色病変を内視鏡下の電気メス、ピンセット操作で採取した。

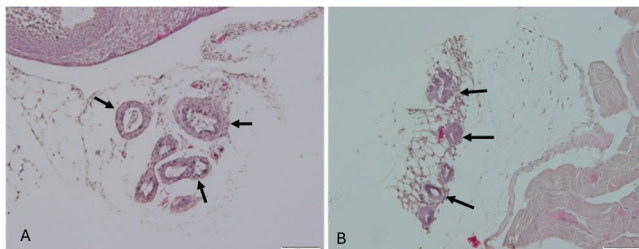


図2 卵巣周囲の脂肪組織 (A) に見られた子宮内膜様組織 (→) と腹壁の脂肪組織 (B) に見られた子宮内膜様組織 (→)。HE染色。

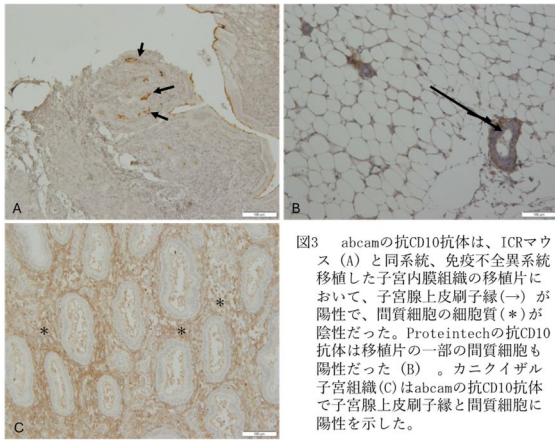


図3 abcamの抗CD10抗体は、ICRマウス (A) と同系統、免疫不全異系統移植した子宮内膜組織の移植片において、子宮腺上皮刷子縁(→)が陽性で、間質細胞の細胞質(*)が陰性だった。Proteintechの抗CD10抗体は移植片の一部の間質細胞も陽性だった (B)。カニクイザル子宮組織 (C) はabcamの抗CD10抗体で子宮腺上皮刷子縁と間質細胞に陽性を示した。

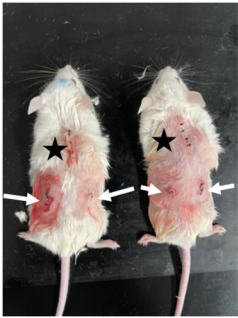


図4 卵巣摘出の皮膚アプローチ部位 (→) と、iPRECIO埋設部位 (★) を示す。

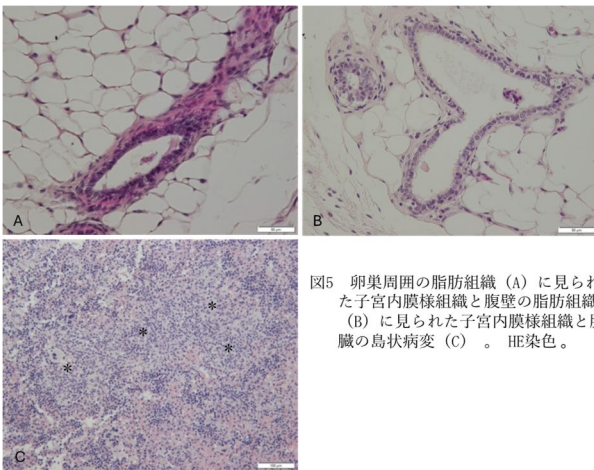


図5 卵巣周囲の脂肪組織 (A) に見られた子宮内膜様組織と腹壁の脂肪組織 (B) に見られた子宮内膜様組織と脾臓の島状病変 (C)。HE染色。

実験群	estradiol (pg/ml)	progesterone (ng/ml)
発情前期(n=3)	281	5.52
発情期(n=3)	213	6.28
発情後期(n=3)	191	3.51
休止期(n=3)	318	4.45
卵巣摘出(n=9)	242	0.807
卵巣摘出+エストラジオール1回(n=1)	797	2.34
卵巣摘出+iPRECIO10日(n=1)	403	1.48
卵巣摘出+iPRECIO28日(n=2)	410	0.836

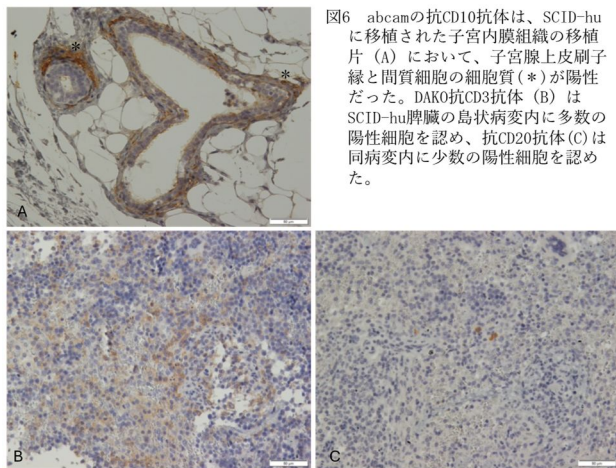


図6 abcamの抗CD10抗体は、SCID-huに移植された子宮内膜組織の移植片 (A) において、子宮腺上皮刷子縁と間質細胞の細胞質(*)が陽性だった。DAKO抗CD3抗体 (B) はSCID-hu脾臓の島状病変内に多数の陽性細胞を認め、抗CD20抗体 (C) は同病変内に少数の陽性細胞を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子萌美、宮原涼香、小沢哲史、岩谷千鶴、土屋英明、野中元裕、中村紳一郎
2. 発表標題 自然発症のカニクイザル子宮内膜症に対するペプチド治療法の有効性
3. 学会等名 第71回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本霊長類学会編（中村は編集幹事、子宮内膜症を含む3項目を執筆）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 752
3. 書名 霊長類学の百科事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------