

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659783
 研究課題名（和文）改良型シグナルシーケンストラップ法による雌性生殖器幹細胞の新規蛋白質の探索
 研究課題名（英文）The search for novel proteins specific for the female reproductive tract stem cells by using an improved signal sequence trap method
 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）：

ヒト子宮内膜の幹細胞特性を *in vivo* で検証するアッセイ系を開発した。これにより、改良型シグナルシーケンストラップ法（SST-REX 法）による解析で同定・選別される細胞集団が、真に幹細胞としての特性を有しているかどうかの検証が可能となり、SST-REX 法による幹細胞同定システムの基盤となる技術と知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

In this study we have successfully developed *in vivo* assay to identify and validate the stem cell properties of human endometrium. This assay can be one of the basic and essential SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression)-based evaluation systems, enabling us to validate the stem cell activities of human-derived cells isolated and identified through the SST-REX method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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・幹細胞・抗体・蛋白

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む多くの生物のゲノム塩基配列が明らかになり、DNA マイクロアレイ技術の発展とも相まって、ゲノム遺伝情報や mRNA の発現状況などを、ハイスループットに解析することが可能になった。しかしながら、これらの情報のみからは、蛋白質の構造や蛋白質間のネットワーク、細胞や個体機能への役割などを予測することはできない。我々はこれまで、ヒト子宮内膜幹細胞の最有力候補である side population 細胞 (SP 細胞) に強く発現する遺伝子を DNA マイクロアレイで抽出したが、幹細胞の機能特性への関連付けは容易では無い。それゆえ、生命現象を実働部隊として担っている「蛋白質」や、生命の最小単位として機能する「細胞」をター

ゲットとした、細胞・プロテオミクス研究の重要性がとみに増している。そのなかで、シグナルシーケンストラップ技術とモノクローナル抗体技術を駆使することによって、プロテオミクスの観点から生命現象とそれに直結する創薬シーズを開発することを目指す研究手法が脚光を浴びつつある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、改良型シグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法) を用いて、ヒトの子宮内膜および子宮筋の幹細胞マーカー・分泌蛋白を同定し、これらのマーカー・分泌蛋白に対する抗体を作成することを通じて、ヒト雌性生殖器官における成体幹細胞の特性と機能を明らかにするべく、そのた

めの基盤システムの確立と基盤知見の収集を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト雌性生殖器官（子宮内膜など）の幹細胞分画と非幹細胞分画の分離・同定とその機能解析システムの開発

発光蛋白および蛍光蛋白の同時発現が可能な lentivirus をヒト子宮内膜幹細胞候補である内膜 side population 細胞 (SP) および内膜 main population 細胞 (MP) に感染させて、発光蛋白および蛍光蛋白による細胞標識を行った。これらを非標識の全内膜細胞と各々混合し、重度免疫不全マウスの腎被膜下に移植しエストロゲンおよびプロゲステロンを投与した。1 週および8 週後に発光イメージングで構築組織の発光量を定量化した。8 週後腎摘し、間質、腺上皮、血管内皮、および平滑筋などの各内膜細胞系譜への標識細胞の寄与率を免疫組織化学と画像解析ソフト TissueQuest にて SP と MP の間で定量比較した。

(2) 内膜 SP・MP 細胞を用いた改良型シグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法)

(1) にて確立されたシステムを用いて、内膜 SP 細胞が幹細胞の最有力候補集団であることを確認したうえで、内膜 SP および MP 細胞から高品質の RNA を抽出し、cDNA ライブラリーの作製、膜タンパク質・分泌タンパク質のカタログ化、SST クローンを免疫原としたマウスモノクローナル抗体 (mAb) の作成、ならびに mAb を用いた *in vitro*・*in vivo* 解析、特に (1) のシステムを用いて、mAb によって選別された新たな細胞集団の幹細胞特性を検証し、もって mAb の有用性を明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、ヒトの子宮内膜および子宮筋などの幹細胞の表面マーカーならびに分泌蛋白を同定し、これらを指標にして、ヒト雌性生殖器官の成体幹細胞の特性と機能を明らかにすることを目的とする。そのためにシグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法) を用いる戦略とした。その出発材料となる幹細胞と非幹細胞を明確に異なる集団として分離されることが本研究の成否を決するため、幹細胞特性を *in vivo* で確認するシステムの確立を目指した。これまでの子宮内膜再構成モデル (Masuda, et al., PNAS, 2007) をさらに改善していくとともに、内膜幹細胞 (Masuda, et al., PLoS ONE, 2010) のみをマーキングし非幹細胞とともに移植することで、幹細胞が内膜の各細胞成分 (腺上皮、間質、血管など) へどのように分化していくかを解析した。これまでの再構成系は移植部位であるマウス腎臓を穿通させて行ってい

たが、極めて高度の技術を要し困難を極めた。そこでまず、腎臓を穿通させずに移植する方法の開発に着手し、その技術を確立し得た。

続いて、内膜幹細胞の候補集団である内膜 SP 細胞および非内膜幹細胞 (内膜 MP) にそれぞれマーカー遺伝子を導入して標識した。これらを、非標識内膜細胞と混在させて、重度免疫不全マウスの腎被膜下に移植し内膜再構成を行った。その結果、標識 SP 細胞の移植によって再構築された内膜では、標識蛋白陽性細胞が内膜の各構成細胞 (腺上皮、血管内皮、間質など) に認められたが、標識内膜 MP 細胞の移植によって再構築された内膜では、標識細胞は腺上皮や血管内皮には存在せず、主に間質のみにしか認められなかった。画像解析ソフトを用いて再構築された子宮内膜の各構成細胞への寄与率を定量化した結果、標識 SP 細胞は標識 MP 細胞に比べて、腺上皮、間質、血管内皮への寄与率が有意に高いことが判明した。このように、重度免疫不全マウスを用いたヒト子宮内膜再構成系とレンチウイルスによる細胞標識・細胞追跡法を組み合わせることで、多分化能を指標にした *in vivo* ヒト子宮内膜幹細胞アッセイ系を確立した (Miyazaki, et al., PLoS ONE, 2012)。これにより、少なくとも現時点では、内膜 SP 細胞が内膜幹細胞の最有力候補集団であることが明らかになったことと、SST-REX 法による解析で同定・選別される細胞集団が、真に幹細胞としての特性を有しているかどうかの検証が可能となり、SST-REX 法による幹細胞同定システムの基盤となる技術と知見が得られた。

次に、改良型シグナルシーケンストラップ法 (SST-REX 法) を用いるべく、内膜 SP 細胞からの RNA 抽出を行った。しかし、摘出ヒト子宮全体の内膜に占める内膜 SP 細胞の割合は約 2% であり、さらに SP 細胞は G0 期といった静止期に留まっているために内膜 SP の RNA 量は少ない。従って、ひとつの摘出ヒト子宮全体の内膜 SP からは総量で高々 500ng 程度しか抽出できないことが判明した。一方、SST-REX 法には約 5 μ g の高品質の RNA が必要となる。良好なヒト検体と高品質の RNA を十分な数だけ得るのは限られた期間の中では困難であることを再認識したうえで、十分量の高品質の RNA を得るべく、RNA サンプルの蓄積を継続的に行った。さらに、手術検体回収システムの見直しに加えて、SP 細胞分離法や RNA 抽出法などの条件設定や改良・改善を行い、最終目標である SST-REX 法へ応用し得る基盤技術と基盤知見が得られた。

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 12 件)

*corresponding author

1. **Maruyama T***, Miyazaki K, **Masuda H**, Ono M, **Uchida H**, Yoshimura Y: Human uterine stem/progenitor cells: Implications for uterine physiology and pathology. **Placenta**. 2013, 27, S68-S72. 査読有
2. **Maruyama T***, Ono M, Yoshimura Y: Somatic stem cells in the myometrium and in myometrium. **Semin Reprod Med**. 2013, 31, 76-80. 査読有 doi: 10.1055/s-0032-1331801.
3. 升田博隆, **丸山哲夫**, 吉村泰典: 目で見る生殖幹細胞. **HORMONE EFONTIER IN GYNECOLOGY**. 2013; 20(1), 6-9. 査読無
4. 荒瀬透, **丸山哲夫**, 宮崎 薫, 柴田璃香, 升田博隆, 内田 浩, 吉村泰典: 特集 生殖と自然免疫 子宮内膜の粘膜免疫機構. **HORMONE EFONTIER IN GYNECOLOGY**. 2013; 20(1), 39-44. 査読無
5. Villacorte MD, Suzuki K, Hirasawa A, Ohkawa Y, Suyama M, **Maruyama T**, Aoki D, Ogino Y, Miyagawa S, Terabayashi T, Tomooka Y, Nakagata N, Yamada G*: β -catenin signaling regulates Foxa2 expression during endometrial hyperplasia formation. **Oncogene**, 2012. 査読有 doi: 10.1038/onc.2012.376.
6. **Uchida H***, **Maruyama T**, Nishikawa-Uchida S, Oda H, Miyazaki K, **Yamasaki A**, Yoshimura Y: Studies using an in vitro model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. **J Biol Chem**. 2012, 287(7), 4441-4450. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.286138.
7. Kagami M, **Maruyama T***, Koizumi T, Miyazaki K, Nishikawa-Uchida S, Oda H, **Uchida H**, Fujisawa D, Ozawa N, Schmidt L, Yoshimura Y: Psychological adjustment and psychosocial stress among Japanese couples with a history of recurrent pregnancy loss. **Hum Reprod**. 2012, 27(3), 787-794. 査読有 doi: 10.1093/humrep/der441.
8. **Maruyama T***, Yoshimura Y: Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis. **ront Biosci**. 2012, 4, 2754-2763. 査読有
9. **丸山哲夫**: ホルモン依存性子宮関連疾患に関する研究の新たな展開-ヒト子宮における幹細胞の意義と役割-. 公益財

団法人山口内分泌疾患研究振興財団
内分泌に関する最新情報 2012 (WEB 論文) 査読無

10. Ayabe T, Ishizuka B, **Maruyama T**, Fukami M, Yoshida R, **Uchida H**, Yoshimura Y, Nagai T, Ogata T*: Association of Primary Ovarian Insufficiency with a Specific Human Leukocyte Antigen Haplotype (A*24:02-C*03:03-B*35:01) in Japanese Women. **Sex Dev**. 2011, 5(5), 235-240. 査読有 doi: 10.1159/000330122.
11. Yuhki M, Kajitani T, Mizuno T, Aoki Y, **Maruyama T**: Establishment of an immortalized human endometrial stromal cell line with functional responses to ovarian stimuli. **Reprod Biol Endocrinol**. 2011, 9, 104. 査読有 doi: 10.1186/1477-7827-9-104.
12. **丸山哲夫**: 子宮内膜幹細胞と子宮内膜症. **Prog. Med**. 2011;31 624. 査読無

[学会発表] (計 25 件)

1. [25 SGI President's Presenter Awards 受賞] Kaoru Miyazaki, **Tetsuo Maruyama**, **Hiroataka Masuda**, **Akiko Yamasaki**, Sayaka Uchida, Hideyuki Oda, **Hiroshi Uchida**, and Yasunori Yoshimura; Development of *in vivo* human endometrial stem cell assay. 60th Annual Meeting of Society for Gynecologic Investigation (SGI). March 20-23, 2013, Orlando, FL, USA.
2. [招請講演: ワークショップ] 升田博隆, **丸山哲夫**, 松崎有未, 岡野栄之, 吉村泰典; 子宮内膜症動物実験モデル. 第34回日本エンドメトリオーシス学会 (栃木県宇都宮市・栃木総合文化センター) 2013年1月18日-19日
3. 宮崎 薫, **丸山哲夫**, 升田博隆, 小田英之, 内田明花, 内田 浩, 吉村泰典; ヒト子宮内膜幹細胞の分化能を明らかにする *in vivo* 解析システムの開発. 第34回日本エンドメトリオーシス学会 (栃木県宇都宮市・栃木総合文化センター) 2013年1月18日-19日
4. [平成24年度学術奨励賞受賞] 宮崎 薫, **丸山哲夫**, 升田博隆, 小田英之, 内田明花, 内田 浩, 吉村泰典; ヒト子宮内膜再構成システムを用いた *in vivo* 幹細胞アッセイの開発と内膜幹細胞の同定. 第17回日本生殖内分泌学会 (東京都千代田区・サピアタワー) 2012年12月8日
5. [招請講演] **Tetsuo Maruyama**, Masanori Ono, Takashi Kajitani, **Hiroshi Uchida**,

- Hideyuki Oda, Sayaka Uchida, Kaoru Miyazaki, Toru Arase, Takashi Nagashima, Hiroataka Masuda, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki, Yasunori Yoshimura; Isolation and characterization of human myometrial stem/progenitor cells: implications for pregnancy-induced myometrial remodeling. 63rd The Korean Society for Reproductive fo Reproductive Medicine Meeting(KSRM). December 1, 2012, Seoul, Korea.
6. 升田博隆, 丸山哲夫, 吉村泰典, Caroline Gargett; 単一の新規マーカーにより分離されたヒト子宮内膜間葉系幹細胞の機能解析. 第 57 回日本生殖医学会 (長崎県長崎市・ブリックホール) 2012 年 11 月 8 日-9 日
 7. 宮崎 薫, 丸山哲夫, 升田博隆, 小田英之, 内田明花, 内田 浩, 吉村泰典; ヒト子宮内膜幹細胞の *in vivo* 解析・同定システムの開発. 第 57 回日本生殖医学会 (長崎県長崎市・ブリックホール) 2012 年 11 月 8 日-9 日
 8. [第 20 回日本胎盤学会相馬賞受賞]Hiromi Eguchi, Masatoshi Tomi, Tomohiro Nishimura, Kenji Oda, Mai Yamazaki, Risa Yagi, Mariko Usuda, Kei Higuchi, Tetsuo Maruyama, Emi Nakashima; Characterization of sodium dependent betaine uptake in human placental brush-border membranes. 20th International Federation of Placenta Association Meeting(IFPA). September 18-21, 2012, Hiroshima, Japan.
 9. Tomohiro Tawara, Tomohiro Nishimura, Masatoshi Tomi, Mai Yamazaki, Rina Matsushita, Kei Higuchi, Tetsuo Maruyama, Emi Nakashima; Examining the role of SLC10A3 in the placenta. 18th International Federation of Placenta Association Meeting(IFPA). September 18-21, 2012, Hiroshima, Japan.
 10. [招請講演]Tetsuo Maruyama; Human uterine stem/progenitor cells: implications for uterine physiology and pathology. 18th International Federation of Placenta Association Meeting(IFPA). September 18-21, 2012, Hiroshima, Japan.
 11. [招請講演: ワークショップ]丸山哲夫; ヒト子宮由来幹細胞-何が分かって何ができるか-. 第 30 回日本受精着床学会(大阪府大阪市・大阪国際会議場) 2012 年 8 月 30 日-31 日
 12. Ikuko Kishi, Tetsuo Maruyama, Miho Ohishi, Yasuo Akiba, Hironori Asada, Yasuhiro Konishi, Masao Nakano, Kiyoshi Kamei, Yasunori Yoshimura; Thioredoxin, a small redox protein, in ovarian follicles of women undergoing IVF-ET. 28th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology(ESHRE). July 1-4, 2012, Istanbul, Turkey.
 13. Tetsuo Maruyama, Akiko Yamasaki, Kaoru Miyazaki, Toru Arase, Hiroshi Uchida, Yasunori Yoshimura; Combined treatment with estrogen and progesterone promotes ectopic survival of intravenously injected human endometrial cells in immunodeficient mice. 28th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology(ESHRE). July 1-4, 2012, Istanbul, Turkey.
 14. [招請講演: 第 14 回神澤医学賞受賞講演]丸山哲夫; 成体幹細胞を用いた雌性生殖器官の再生・再建と疾患モデルの構築. 第 14 回神澤医学研究振興財団講演会(東京都港区・ホテルオークラ) 2012 年 6 月 1 日
 15. [招請講演]Tetsuo Maruyama; Human Uterine Stem/ Progenitor Cells. 2nd The State Key Laboratory of Reproductive Biology Symposia in Reproductive Biology(SKLRB). May 6-11, 2012, Beijing ,China.
 16. Masanori Ono, Tetsuo Maruyama, Takashi Kajitani, Hiroshi Uchida, Hideyuki Oda, Sayaka Uchida, Toru Arase, Akiko Yamasaki, Takashi Nagashima, Hiroataka Masuda, Yasunori Yoshimura; Contribution of myometrial stem/progenitor cells to pregnancy-induced uterine remodeling. 2nd World Congress on Reproductive Biology(WCRB). October 9-12, 2011, Cairns, Australia.
 17. Hiroshi Uchida, Tetsuo Maruyama, Sayaka Uchida-Nishikawa, Yasunori Yoshimura; Possible evidence for epithelial-mesenchymal transition mediating displacement of endometrial cells away from the site of embryo implantation. 2nd World Congress on Reproductive Biology Meeting(WCRB). October 9-12, 2011, Cairns, Australia.
 18. [招請講演: セミナー]Tetsuo Maruyama; Human uterine stem/progenitor cells: implications for uterine physiology

- and pathology. Monash Health Translation Precinct (MHTP) Seminars 2011. October 6, 2011, Melbourne, Australia.
19. [シンポジウム] **Tetsuo Maruyama**; Stem cells theory for the pathogenesis of endometriosis. 22nd Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynecology (AOCOG). September 23-27, 2011, Taipei, Taiwan.
 20. [招請講演: セミナー] **Tetsuo Maruyama**; Stem/progenitor cells in the human uterus; implication for uterine diseases. CHU Clermont-Ferrand. September 8, 2011, Clermont-Ferrand, France.
 21. **Tetsuo Maruyama**, Takashi Kajitani, Hideyuki Oda, Kaoru Miyazaki, Sayaka Uchida, Akiko Yamasaki, Hironori Asada, Hiroshi Uchida, Yasunori Yoshimura; Identification of a novel endometrial gene associated with menstruation, endometriosis and adenomyosis. 11th World Congress on Endometriosis (WCE). September 4-7, 2011, Montpellier France.
 22. Toru Arase, **Tetsuo Maruyama**, Hiroshi Uchida, Kaoru Miyazaki, Hideyuki Oda, Sayaka Uchida-Nishikawa, Maki Kagami, Akiko Yamasaki, Kayoko Tamaki, Yasunori Yoshimura; Possible involvement of UDP-glucose and its receptor P2RY14 in embryo implantation. 27th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction Embryology (ESHRE). July 3-6, 2011, Stockholm, Sweden.
 23. Kaoru Miyazaki, Takashi Kajitani, Hiroataka Masuda, Toshio Hamatani, Hideyuki Oda, Akiko Yamasaki, Sayaka Nishikawa-Uchida, Hiroshi Uchida, Yasunori Yoshimura, **Tetsuo Maruyama**; CD93 and CD31 as possible candidate markers for human endometrial stem/progenitor cells. 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR). June 15-18, 2011, Toronto, Ontario Canada.
 24. [招請講演: セミナー] **丸山哲夫**; ヒト子宮幹細胞と臨床医学へのトランスレーション-子宮再生・再建医療への挑戦-. 熊本大学授業科目: 名医に学ぶセミナー (熊本県熊本市・熊本大学) 2012年2月1日
 25. [招請講演: ワークショップ] **丸山哲夫**; 子宮内膜症の遺伝的関与-Keynote Lecture-. 第33回日本エンドメトリオ

ーシス学会 (長崎県長崎市・長崎大学)
2012年1月21日-22日

[その他]

ホームページ等
テレビ東京「話題の医学: ヒト子宮内膜の再生と幹細胞」2012年12月30日 午前5時~5時15分放映。

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

升田 博隆 (MASUDA HIROTAKA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 80317198

山崎 彰子 (YAMASAKI AKIKO)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号: 60528777