

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791721

研究課題名(和文) ヒト卵管幹細胞の同定と解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of stem/progenitor cells in the human fallopian tube

研究代表者

内田 明花 (UCHIDA, SAYAKA)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：60445236

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)：卵管幹細胞の同定に必要なin vivo卵管組織再構成システムの確立に際して、その基盤となる技術開発を不死化内膜間質細胞と不死化内膜腺上皮細胞を用いて行った。まず、これらの細胞株を出発材料として、発光・蛍光蛋白を安定的に発現する細胞株を作成した。さらに、標識細胞が組織再構成の過程のなかで、どのように振る舞うかを検証する細胞追跡システムを開発した。本研究により、不死化卵管上皮細胞株が利用可能になった際、その再構成システムと幹細胞追跡法への応用が可能な基盤知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In vivo reconstitution system of human fallopian tube (hFT) is needed to identify and characterize stem cells of hFT in vivo. Using immortalized human endometrial cells, we here attempted to obtain fundamental knowledge and techniques to realize the hFT reconstitution and cell tracking system. For this purpose, we first made endometrial cell lines stably expressing bioluminescent and fluorescent proteins. We then developed a method to introduce genes of interest into cells without cell culture and established a cell tracking system through the combinatory use of our labeling method and a tissue reconstitution system. The results of this study will be useful for identification and characterization of putative hFT stem cells when a hFT cell line becomes available.

研究分野：産婦人科、生殖医学、臨床遺伝学、生殖内分泌学

キーワード：卵管 幹細胞 side population 子宮内膜

1. 研究開始当初の背景

卵管は、子宮と発生学的に共通の起源を持つ。生殖年齢にあるヒト個体において、卵管は精子及び卵子の viability の維持、受精、早期受精卵の発生と子宮への輸送に必要とされるユニークな環境を供給するため、内分泌因子(ホルモン等)の制御によって、細胞増殖と再生を含めたダイナミックな変化を遂げる。このような現象には成体幹細胞の活動が関与していると考えられ、組織中の成体幹細胞の存在を示唆するような報告(Jazedje T et al. Journal of Translational Medicine. 2009) もなされているが、実際に成体幹細胞を分離、同定した例は国内外を通じてまだ報告されていない。

われわれは、世界に先駆けてヒト子宮内膜組織および子宮筋組織より幹細胞的性質を有する細胞集団を分離することに成功し、その組織再構築能ならびに多分化能について報告した (Masuda H, et al., PLoS ONE, 2010, Ono, et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2007)。さらに、内膜再生モデルも作製し、幹細胞研究を目指す本研究での基盤ツールを開発した (Masuda, et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2007)。

これらの研究によって培われたノウハウを生かし、本研究では、これまでわれわれが用いてきた幹細胞分離方法である SP (side population)法を卵管上皮にも応用し、SP 細胞を分取して、その組織再構築能ならびに多分化能について解析する。

ただし、SP 法では、DNA 結合色素 Hoechst33342 の紫外線照射による蛍光を利用しているため、侵襲性や無菌性に加えて、濃縮効率の安定性、安定培養・組織構築の効率性、安全性、あるいは細胞操作性などに解決すべき問題が有り、直ちに臨床へ応用するのは未だ難しい。そこで、卵管上皮 SP 細胞に組織再構築能ならびに多分化能が認められた場合、これらの問題を解決しなければならない。そのためにはまず、幹細胞の有する様々な生物学的特性(未分化状態の維持、自己増殖能、多分化能)等を分子レベルで捕らえることが必須であると考えられる。様々な場面において役割を果たす分子群について一つずつその働きを明らかにしていくことで、これまで不明であった疾患メカニズムの解明や、再生医療に常につきまとう、使用する細胞の癌化や生理機能低下といった問題の解決にも大きく寄与できると考えられる。また、幹細胞特異的に発現する表面マーカーが明らかになれば、それらを用いた新しい幹細胞分離法が可能となり、臨床応用への道も開ける。このような背景により、研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト卵管における成体幹細胞システムの基礎的解明を進めていくと同時に、多角的な臨床応用を目指して、卵管幹細胞

分離法の確立を通じて、幹細胞を標的にした新しい治療法の開発を主たる目的として、以下の諸点について研究を行う。

(1) ヒト卵管上皮からの SP (side population)細胞の分取とその組織再構築能及び多分化能の解析

(2) ヒト卵管上皮の組織幹細胞に特異的に発現する遺伝子群の解析

(3) ヒト卵管上皮幹細胞特異的表面マーカーを用いた新しい成体幹細胞分取方法の確立

(4) ヒト卵管上皮細胞およびその幹細胞を用いた in vitro maturation (IVM)の基盤研究

3. 研究の方法

卵管幹細胞の同定に必要な in vivo 卵管組織再構築システムの確立を目指して、これまで報告されているヒト初代培内膜培養細胞を用いたヒト子宮内膜再構築システムを応用して、不死化内膜間質細胞と不死化内膜腺上皮細胞を用いた内膜再構築システムの開発を行った。これは、将来的に不死化卵管上皮細胞が得られた際には、ヒト卵管検体の稀少性といった問題をクリア出来る安定的な再構築システムを得るための、基盤となるプラットフォームを創るという位置付けの研究である。この観点から当初予定していた研究方法に変更が生じ、実際には以下を行った。

(1) 発光・蛍光蛋白安定発現細胞株の作製

不死化内膜間質細胞と不死化内膜腺上皮細胞に対して、非機能膜型受容体 (membrane X receptor, mXR)、発光蛋白 CBR、および蛍光蛋白 GFP の3つを同時に発現することが可能なレンチウイルスを感染させた。その後、GFP を高発現する細胞をセルソーターで選別し、GFP 高発現細胞を分取してフローサイトメーターで解析した。標識蛋白全てを安定的に発現することを確認したうえで、これらを大量に培養して細胞株のストックを確保した。

(2) レンチウイルスを用いた非培養細胞マーカー蛋白標識法の開発

幹細胞は一般に培養すると、その幹細胞特性を失うことが少なくない。特に組織から分離した幹細胞はその傾向が強い。そこで細胞培養を経ず、分離した状態のままウイルス感染させ遺伝子を導入する方法と技術の開発を行った。作成したウイルス液を組織から分離した直後の幹細胞と混合させ、様々な条件で数時間遠心させなどして、その条件を変えながら、蛍光蛋白や発光蛋白の発現強度を指標に、最も至適な条件の決定を行った。

4. 研究成果

上述の通り、これまで報告されているヒト初代培内膜培養細胞を用いたヒト子宮内膜再構築システムを応用して、不死化内膜間質

細胞と不死化内臓上皮細胞を用いた内膜再構成システムの開発を行った。まず間質細胞の振る舞いを発光イメージングを用いて可視化するために、非機能膜型受容体 (membrane X receptor, mXR), 発光蛋白 CBR, および蛍光蛋白 GFP の 3 つを同時に発現することが可能なレンチウイルスを感染させた。その後、GFP を高発現する細胞をセルソーターで 2 回選別し、GFP 高発現細胞を分取してフローサイトメーターで解析したところ、標識蛋白全てを安定的に発現することが判明し、これらを大量に培養して細胞株のストックを確保した。この細胞株は、mXR に対する磁性体標識抗体を用いれば、in vitro および in vivo において磁場をかけることで任意の場所に集積させることが可能なことが判明した。最近、他のグループから不死化卵管上皮細胞が樹立されたとの報告がなされた。本研究で得られた基盤知見と基盤技術により、不死化卵管上皮細胞を用いた新しい卵管再構成系の確立が実現化され、もって卵管幹細胞の同定のための in vivo 評価ツールの開発につながる。

本研究の当初の目的は、ヒト卵管における成体幹細胞システムの基礎的解明を進めていくと同時に、多角的な臨床応用を目指して、卵管幹細胞分離法の確立を通じて、幹細胞を標的にした新しい治療法の開発であった。ヒト卵管上皮からの幹細胞候補集団である SP (side population) 細胞の分取とその機能解析を行う予定であったが、ヒト卵管検体の入手が困難であり、最終的に適切なヒト卵管組織が得られなかった。そこでラットやマウスなどの齧歯類の卵管からの SP 細胞の分取を検討したが、そもそもヒト子宮内膜でも SP 細胞の比率は 2 % 前後であり、齧歯類で且つ内膜より小さい組織である卵管からの SP 細胞の分離は極めて困難であり、分取できたとしても次の解析に供するだけの十分な細胞量が取れないと判断し、戦略を変更した。SP 分取法よりは表面マーカーによる分取の方が細胞のダメージが少なく効率が良いため、内膜 SP 細胞に高発現する遺伝子を以前に行ったマイクロアレイデータを用いて in silico 解析を行った。この解析から抽出された候補マーカーで分取できた場合、その in vivo 多分化能の検証が幹細胞特性の証明に必要である。そのためには、免疫不全マウスの体内での卵管組織再構成系に標識した卵管幹細胞を混在させてその振る舞いを追跡する必要がある。微量の細胞への遺伝子導入を検討したところ、培養せずに直接ウイルス液と混合して遠心することで、効率的に遺伝子導入が可能であった。また、ヒト子宮内膜細胞による同様の再構成系において、細胞追跡法が可能であることも判明し、そのシステムの更なるブラッシュアップを通じて、卵管再構成系のシステム開発を目指した。

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 9 件)
英文論文

*corresponding author

Miyazaki K, Miki F, Uchida S, Masuda H, Uchida H, Maruyama T*: Serum estradiol level during withdrawal bleeding as a predictive factor for intermittent ovarian function in women with primary ovarian insufficiency. **Endocr J**. 2015; 62(1): 93-99. 査読有.
DOI: 10.1507/endocrj.EJ14-0189.

Uchida S, Uchida H, Maruyama T*, Kajitani T, Oda H, Miyazaki K, Kagami M, Yoshimura Y: Molecular analysis of a mutated FSH receptor detected in a patient with spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. **PLoS One**. 2013; 8(9): e75478. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0075478.

Kajitani T, Maruyama T*, Asada H, Uchida H, Oda H, Nishikawa-Uchida S, Miyazaki K, Arase T, Ono M, Yoshimura Y: Possible involvement of nerve growth factor in dysmenorrhea and dyspareunia associated with endometriosis. **Endocr J**. 2013; 60(10): 1155-1164. 査読有.
DOI: 10.1507/endocrj.EJ13-0027.

Maruyama T*, Miyazaki K, Uchida H, Uchida S, Masuda H, Yoshimura Y: Achievement of pregnancies in women with primary ovarian insufficiency using close monitoring of follicle development: case reports. **Endocr J**. 2013; 60(6): 791-797. 査読有.
DOI: 10.1507/endocrj.EJ13-0031.

[平成 25 年度日本生殖医学会学術奨励賞] Miyazaki K, Maruyama T*, Masuda H, Yamasaki A, Uchida S, Oda H, Uchida H, Yoshimura Y: Stem cell-like differentiation potentials of endometrial side population cells as revealed by a newly developed in vivo endometrial stem cell assay. **PLoS One**. 2012; 7(12): e50749. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0050749.

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.

和文論文

内田明花, 丸山哲夫: P01 の検査・診断法. **産婦人科産科** 2014;68(9): 850-853. 査読無 .
<http://medicalfinder.jp/doi/pdf/10.11477/mf.1409103868>

[平成 24 年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞受賞] 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. **日本生殖内分泌学会雑誌** 2013; 18: 21-25. 査読無 .
http://www.seishoku.org/13_18kan/9-frontiefl.pdf

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. **日本エンドメトリオーシス学会会誌** 2013; 34 :215-219. 査読無 .
<http://www.endometriosis.gr.jp/non-member/kaishi/kaishi34pdf/57-ippan-kiso5-3.pdf>

[学会発表](計 12 件)

国際学会

[25 SGI President's Presenter Awards] Kaoru Miyazaki, Tetsuo Maruyama, Hirotaka 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 the Society for Gynecologic Investigation (SGI). March 20-23, 2013, Orlando, FL, USA.

[招請講演] Tetsuo Maruyama, Masanori Ono, Takashi Kajitani, Hiroshi Uchida, Hideyuki Oda, **Sayaka Uchida**, Kaoru Miyazaki, Toru Arase, Takashi Nagashima, Hirotaka 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 for Reproductive Medicine Meeting(KSRM). December 1, 2012, Seoul, Korea.

国内学会

太田邦明, 丸山哲夫, **内田明花**, 田中 守, 青木大輔: 加齢は破骨細胞からの Sclerostin 分泌を促進し, 直接的に骨芽細胞分化を抑制する. 第 29 回日本女性

医学会(東京都千代田区・都市センターホテル) 2014 年 11 月 1-2 日

三木史恵, 内田 浩, 宮崎 薫, 太田邦明, **内田明花**, 升田博隆, 丸山哲夫, 田中 守: 卵巣過剰刺激症候群に対する内分泌学的加療により卵巣出血を来した一例. 第 15 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会(埼玉県さいたま市・ラフレさいたま) 2014 年 9 月 5-6 日

三木史恵, 丸山哲夫, **内田明花**, 各務真紀, 升田博隆, 内田 浩, 吉村泰典: 不育症診療における化学妊娠の取り扱いに関する検討. 第 32 回日本受精着床学会(東京都新宿区・ハイアットリージェンシー東京) 2014 年 7 月 31 日-8 月 1 日

内田明花, 丸山哲夫, 三木史恵, 各務真紀, 宮崎 薫, 升田博隆, 内田 浩, 吉村泰典, 青木大輔: 原因不明不育症には潜在性甲状腺機能低下症の亜集団が存在する. 第 66 回日本産科婦人科学会(東京都千代田区・国際フォーラム) 2014 年 4 月 18-20 日

各務真紀, 丸山哲夫, 小泉智恵, 越川和子, 菅沼真樹, **内田明花**, 宮崎 薫, 升田博隆, 内田 浩, 吉村泰典: 不育症学級を活用した不育症患者夫婦へのメンタルヘルスケアの有効性に関する検討. 第 66 回日本産科婦人科学会(東京都千代田区・国際フォーラム) 2014 年 4 月 18-20 日

内田明花, 内田 浩, 丸山哲夫, 梶谷 宇, 小田英之, 宮崎 薫, 各務真紀, 吉村泰典: 自然発症 OHSS 患者に見いだされた変異 FSH 受容体の解析. 第 18 回日本生殖内分泌学会(東京都千代田区・シェンバツハ・サポー) 2013 年 12 月 7 日

升田博隆, 古谷正敬, 浅田弘法, 伊藤嘉佑子, 有馬宏和, **内田明花**, 佐藤健二, 佐藤 卓, 丸山哲夫, 吉村泰典: 腹腔鏡下子宮筋腫切除術 5 年後に発症した臍窩感染の 1 例. 第 53 回日本産科婦人科内視鏡学会(愛知県名古屋市・ウインクあいち) 2013 年 9 月 5-7 日

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 18-19 日

[平成 24 年度学術奨励賞] 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

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 回日本生殖医学学会（長崎県長崎市・ブリックホール）2012 年 11 月 8-9 日

6．研究組織

(1)研究代表者

内田 明花（UCHIDA, Sayaka）

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：60445236