

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462574

研究課題名(和文)子宮内膜症の発症・進展における内膜幹細胞の役割とEMT/METの關係の解明

研究課題名(英文)The relationship between endometrial stem cells and epithelial-mesenchymal transfer on the development of endometriosis.

研究代表者

升田 博隆(MASUDA, HIROTAKA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80317198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト子宮内膜幹細胞候補であるSide Population(SP)細胞、CD146+PDGFR<sup>+</sup>細胞、W5C5細胞はそれぞれ異なる細胞集団であるが、一部の細胞は重複していることが判明した。子宮内膜症の特徴である浸潤能に注目し、子宮内膜細胞と子宮内膜SP細胞の遊走性をin vitroで確認した。また、その遊走性はEMT阻害薬により抑えられることをin vitroで明らかにした。現在In vivoにおけるEMT阻害剤の浸潤能抑制効果を確認中である。

研究成果の概要(英文)：Flow cytometry analysis revealed that endometrial side population (SP) cells, CD146+PDGFR<sup>+</sup> cells and W5C5+ cells were different populations, but these populations overlapped partially. The migration activity of endometrial cells and endometrial SP cells was demonstrated, and the activity was suppressed by an epithelial-mesenchymal transfer inhibitor. We are trying to show this inhibitory effect in vivo using our mouse model.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：子宮内膜症 子宮内膜幹細胞 上皮間葉転換(EMT) Side Population W5C5

## 1. 研究開始当初の背景

内膜症は、「子宮内膜様組織が異所性に存在し増生するために生じる病態」と定義される。月経のある女性の6-10%に発症し、**全世界で1.8億人**が月経困難や下腹部痛などにより QOL の低下を余儀なくされており、その経済的損失は**患者・週あたり 456 米ドル**と算出されている (Nnoaham et.al. Fertil Steril. 2011)。内膜症病変は上皮細胞および間質細胞から成り立ち、その増殖は正所性内膜と同様に周期的に分泌する卵巣ホルモンに反応し増悪する。治療法として病巣切除という外科的手法と、卵巣ホルモン分泌を停止させる薬物療法が存在するが、主病巣が生殖器官であるため外科的には切除範囲決定にも慎重にならざるを得ないこと、薬物療法は女性ホルモンの内分泌サイクル(月経)を止めることで悪化を抑えるため挙児希望症例には使用できないといった皮肉なジレンマが存在する。最近では、卵巣がんや腹膜がんの発生源となりうることも注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、前述した薬物療法のジレンマ回避のため、内分泌非依存性新規治療法へのアプローチとして、申請者らがこれまで蓄積してきた子宮内膜幹細胞および上皮間葉転換・間葉上皮転換(細胞が上皮と間葉の性質を転換することでその活動性を変化させる特異な現象)を基盤とした、子宮内膜症の発症・進展の病態解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) フローサイトメトリー解析によりヒト子宮内膜幹細胞候補である SP 細胞、CD146+PDGFR $\beta$ +細胞、W5C5 細胞の表面抗原解析等を行った。
- (2) NOG マウスの腎皮膜下にヒト子宮内膜細胞を移植して内膜症モデルを作成し、モデル病変に対して抗 W5C5 抗体による染色を行った。
- (3) 子宮内膜細胞と子宮内膜 SP 細胞に対して、Transwell migration assay と Wound healing assay を行った。また、それぞれの assay に EMT 阻害薬を添加することで遊走能の変化を検討した。
- (4) NOG マウスの腎皮膜下にヒト子宮内膜細胞を移植した内膜症モデルに対して EMT 阻害薬を投与した群と非投与群を作成した。

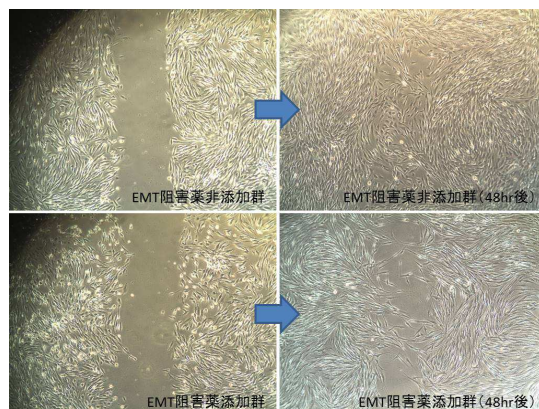
## 4. 研究成果

- (1) ヒト子宮内膜 SP 細胞には CD146+PDGFR $\beta$ +細胞が enrich されてい

ることが確認できたが、W5C5+細胞については SP 細胞と非 SP 細胞を比較し有意差がでなかった。一部の細胞は重複するが、それぞれが別の集団であることが判明した。

- (2) 100%の確率で再構築組織ができ子宮内膜様腺管構造も確認できたが、W5C5 の染色については一切陽性細胞が確認されなかった。ヒト子宮内膜切片を用いた検体で条件検討を行ったところ、4%PFA 固定のパラフィン切片では W5C5 抗体が機能しないと考えられ、再度凍結切片の作成を予定している。
- (3) ① Transwell migration assay の結果、SP 細胞は non-SP 細胞に比べて高い浸潤能を持つことがわかった。また、培養群に EMT 阻害剤を投与することで浸潤能の低下を確認しているが、n が少なく有意差に至っていない。今後 n を増やす予定である。

② Wound healing assay の結果からは、EMT 阻害薬添加群と非添加群の比較により、添加群では遊走能の低下が明らかとなった。この結果では、EMT 阻害薬が内膜細胞の遊走能(間葉的性質)を押さえる可能性が示唆された。



- (4) そこで、In vivo における EMT 阻害剤の浸潤能抑制効果を見るため、NOG マウスの腎皮膜下にヒト子宮内膜細胞を移植した系を用いて、再構築組織の組織学的評価を行っている。浸潤能を見るため免疫組織化学染色によるヒト由来細胞の動態と EMT マーカーの発現を検討中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. **Masuda H, Uchida H, Maruyama T, Sato K, Sato S, Tanaka M: Successful treatment of atypical cesarean scar defect using endoscopic surgery. BMC Pregnancy**

- Childbirth. 15, (1), 342, 2015. 査読有り.  
DOI: 10.1186/s12884-015-0730-x.
2. **Masuda H**, **Maruyama T**, Gargett C, Miyazaki K, Matsuzaki Y, Okano H, Tanaka M; Endometrial side population cells: potential adult stem/progenitor cells in endometrium. *Biol Reprod.* 93, (4), 84, 1-8, 2015. 査読有り.  
DOI: 10.1095/biolreprod.115.131490.
  3. Gurung S, Deane JA, **Masuda H**, **Maruyama T**, Gargett CE.; Stem Cells in Endometrial Physiology. *Semin Reprod Med.* 33, (5), 326-32, 2015. 査読有り.  
DOI: 10.1055/s-0035-1558405.
  4. Ono M, Kajitani T, **Uchida H**, Arase T, Oda H, Uchida S, Ota K, Nagashima T, **Masuda H**, Miyazaki K, Asada H, Hida N, Mabuchi Y, Morikawa S, Ito M, Bulun SE, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y, **Maruyama T**; CD34 and CD49f Double-Positive and Lineage Marker-Negative Cells Isolated from Human Myometrium Exhibit Stem Cell-Like Properties Involved in Pregnancy-Induced Uterine Remodeling. *Biol Reprod.* 93, (2), 37, 2015. 査読有り.  
DOI: 10.1095/biolreprod.114.127126.
  5. 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.* 62, (1), 93-9, 2014. 査読有り.  
DOI: 10.1507/endocrj.EJ14-0189.
  6. **升田博隆**, 丸山哲夫: 【子宮内膜症・子宮腺筋症治療の新展開】幹細胞からみた子宮内膜症の発生・病態メカニズムと治療戦略. *医学のあゆみ* 249, (13), 1307-1311, 2014. 査読無し.
  7. **升田博隆**, 丸山哲夫, 松崎有未, 岡野栄之, 吉村泰典: ヒト子宮内膜幹細胞研究の軌跡. *産婦人科の実際* 63, (1), 86-87, 2014. 査読無し.
  8. **升田博隆**, 丸山哲夫: 幹細胞から見た子宮内膜症の発生・病態メカニズムと治療戦略. *日本エンドメトリオーシス学会会誌* 35, 73-75, 2014. 査読無し.
  9. **升田博隆**, 丸山哲夫, 吉村泰典: 目で見える生殖幹細胞. *HORMONE EFONTIER IN GYNECOLOGY.* 20, (1), 6-9, 2014. 査読無し.
  10. **Maruyama T**, Miyazaki K, **Masuda H**, Ono M, **Uchida H**, Yoshimura Y; Human uterine stem/progenitor cells: Implications for uterine physiology and pathology. *Placenta.* 34, 68-72, 2013. 査読有り.  
DOI: 10.1016/j.placenta.2012.12.010.
  11. **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.* 60, (6), 791-7, 2013. 査読有り.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/60/6/60\\_EJ13-0031/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/60/6/60_EJ13-0031/_article)
  12. **Uchida H**, **Maruyama T**, Nishikawa-Uchida S, Miyazaki K, **Masuda H**, Yoshimura Y; Glycodelin in reproduction. *Reprod Med Biol.* 12, 79-84, 2013. 査読有り.  
<http://link.springer.com/article/10.1007/s12522-013-0144-2>
- [学会発表] (計 12 件)
1. [カレント リサーチ・レビュー] **升田博隆**, 丸山哲夫, 宮崎 薫, 松崎有未, 岡野栄之, 田中 守: 子宮内膜と子宮内膜幹細胞そして上皮間葉転換. 第 37 回エンドメトリオーシス学会. ホテル日航熊本(熊本県熊本市)2016 年 1 月 23-24 日
  2. [日本エンドメトリオーシス学会演題発表賞(基礎部門)] **升田博隆**, 丸山哲夫, 小田英之, 肥田直子, 内田 浩, 三木史恵, 日原華子, 吉政佑之, 片倉慧美, 田中 守: 磁性体を用いた非侵略的リアルタイム解析可能な子宮内膜症腹膜病変モデルの開発. 第 37 回エンドメトリオーシス学会. ホテル日航熊本(熊本県熊本市)2016 年 1 月 23-24 日
  3. **升田博隆**, 佐藤健二, 中林 章, 佐藤 卓, 三木史恵, 日原華子, 各務真紀, 内田 浩, 丸山哲夫, 吉村泰典, 田中 守: 非典型的な帝王切開癒痕部症候群に対する治療成功例. 第 55 回日本産科婦人科内視鏡学会. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)2015 年 9 月 10-12 日
  4. [Award] **Hiroataka Masuda**, **Tetsuo Maruyama**, Mamoru Tanaka, Caroline Gargett: Significance of endometrial stem/progenitor cells in women with endometriosis. International Federation of Fertility Societies / Japan Society for Reproductive Medicine (IFFS / JSRM) International Meeting 2015. April 26-29, 2015. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

5. **升田博隆**, **丸山哲夫**, 田中 守: 単一抗体によるヒト子宮内膜間葉系幹細胞の新規分離法の開発. 第 88 回日本内分泌学会(東京都千代田区・ホテルニューオータニ) 2015 年 4 月 23-25 日
6. [Good Poster Award] **Hiroataka Masuda**, **Tetsuo Maruyama**, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki, Caroline Gargett: Endometrial stem/progenitor cells in women with endometriosis. 第 67 回日本産科婦人科学会 International Session. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)2015 年 4 月 9-12 日
7. **升田博隆**, **丸山哲夫**, 田中 守, Caroline Gargett, : ヒト子宮内膜間葉系幹細胞の単一マーカーを用いた新規分離法の開発. 第 14 回日本再生医療学会総会. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)2015 年 3 月 19-21 日
8. [シンポジウム] **升田博隆**, Caroline Gargett, Kjana Schwab, **丸山哲夫**, 吉村泰典, 田中守: 子宮内膜症の子宮内膜幹細胞を通じた理解. 第 59 回日本生殖医学会. 京王プラザホテル(東京都新宿区) 2014 年 12 月 4-5 日
9. **升田博隆**, 佐藤健二, 佐藤 卓, 太田邦明, 三木史恵, 宮崎 薫, 内田明花, 各務真紀, **内田 浩**, **丸山哲夫**, 吉村泰典, 田中 守: 頸管拡張を必要としない子宮鏡下ポリープ切除術 . 第 54 回日本産科婦人科内視鏡学会. 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)2014 年 9 月 11-13 日
10. **升田博隆**, Caroline Gargett, **丸山哲夫**, 吉村泰典: 子宮内膜症患者と健常者の月経中腹水・月経血・末梢血に存在する子宮内膜幹細胞の比較. 第 35 回日本エンドメトリアーシス学会. 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)2014 年 1 月 25-26 日
11. **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. ウィンクあいち(愛知県名古屋市)2013 年 9 月 5-7 日
12. [高得点演題] **升田博隆**, **丸山哲夫**, 宮崎薫, 青木大輔, 吉村泰典, Caroline Gargett: ヒト子宮内膜間葉系幹細胞の新規単一マーカーによる分離法の開発. 第 65 回日本産科婦人科学会. ロイトン札幌(北海道札幌市)2013 年 5 月 10-12 日

[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]

慶應義塾大学医学部 産婦人科学教室ホームページ内 生殖内分泌研究室

<http://www.obgy.med.keio.ac.jp/04research/03rep-endo.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

升田 博隆 (MASUDA Hiroataka)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号: 80317198

### (2) 研究分担者

丸山 哲夫 (MARUYAMA Tetsuo)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号: 10209702

内田 浩 (UCHIDA Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号: 90286534