

## 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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670706

研究課題名(和文)脱細胞化と再細胞化で子宮を造る

研究課題名(英文) Reconstruction and regeneration of the uterus using decellularization and recellularization techniques

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いて脱細胞化・再細胞化による子宮再建技術の開発を行った。その結果、界面活性剤を用いることで、細胞外マトリックスや微小血管構造骨格を維持したままラット子宮から細胞を除去する(脱細胞化)技術を開発した。また、この脱細胞化骨格に、子宮細胞などを注入することにより、子宮様組織を再構築し得た(再細胞化)。さらに、in vivoでの再細胞化として、ラット子宮の一部を切除して脱細胞化マトリックスに置換した結果、プロゲステロン受容体や脱落膜化マーカーの発現を伴う子宮組織が再生されただけでなく、この子宮において自然妊娠が成立した。本法がヒト子宮再建に向けての有用な基盤技術になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：No effective therapies exist for complete loss of uterine structure and/or function. For such patients, genetic motherhood is possible only through gestational surrogacy or uterine transplantation. We here decellularized rat uteri decellularization by aortic perfusion with detergents and produced an underlying extracellular matrix together with an acellular, perfusable vascular architecture. Uterine-like tissues were then regenerated and maintained in vitro for up to 10 d through decellularized uterine matrix (DUM) reseeding with adult and neonatal rat uterine cells and rat mesenchymal stem cells followed by aortic perfusion in a bioreactor. Furthermore, DUM placement onto a partially excised uterus yielded recellularization and regeneration of uterine tissues and achievement of pregnancy nearly comparable to the intact uterus. These results suggest that DUM could be used for uterine regeneration, and provides insights into treatments for uterine factor infertility.

研究分野：産婦人科学、生殖生理学、幹細胞学、再生医学

キーワード：子宮再生 子宮再建 組織工学 幹細胞 脱細胞化 再細胞化

## 1. 研究開始当初の背景

子宮の構造不全として、ロキタンスキー症候群に代表される先天性子宮・腔欠損に加えて、子宮癌手術（円錐切除・トラケレクトミー）による後天的な子宮欠損が挙げられる。また、子宮関連疾患の塞栓術の際、血流不全により子宮機能不全に陥ることも少なくない。このような子宮の構造・機能欠損に対する究極の医療は、代理母に代表される代理子宮であるが、倫理的かつ法的な問題があり、その実現は極めて難しい。このような現状を鑑みると、子宮の再建・再生医療が医学的にも社会的にも切望される。近年、臓器の再建の一方法として、界面活性剤を用いて脱細胞化を施した足場（decellularized scaffold）を再細胞化することにより、心臓、肺、あるいは肝臓などを動物実験レベルで作成し得ることが報告された（Ott, et al, Nat Med, 2007）。しかしながら、本法を用いて子宮を再建した報告は国内外を通じて皆無である。われわれはこれまで、ヒト子宮の再建に向けて、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（Ono, et al. PNAS, 2007; Masuda, et al., PLoS ONE, 2010; Ono, et al., Hum Reprod, 2010）。さらに、内膜再生・内膜症モデルも作製し、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. PNAS, 2007）。幹細胞を用いた子宮再生医療を完成させるべく、脱細胞化・再細胞化技術を用いた子宮再建・再構築の戦略を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト子宮の再建・再構築を目指した再生医療を実現すべく、ラットなどの小動物を用いて、その基盤知見の収集と基盤技術の開発を目的とする。具体的には、以下を行う。

- (1) 脱細胞化技術の開発と確立
- (2) 再細胞化技術の開発と確立
- (3) In vitro 構築子宮の構造・機能解析
- (4) In vivo 構築子宮の構造・機能解析
- (5) 雌性生殖器官の再構成・機能再建に関する基盤技術の開発

細胞トラッキング技術を用いて、上記の子宮の脱細胞化、再細胞化、および再建・再構築過程における子宮の幹細胞の振る舞いと役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 脱細胞化技術の開発と確立  
両親媒性溶媒・界面活性剤を用いた脱細胞化技術の開発

ラット子宮を下大静脈と大動脈付きで摘出した後、灌流装置を用いて大動脈経路でドデシル硫酸ナトリウムなど種々の両親媒性

溶媒・界面活性剤を灌流し、子宮を脱細胞化した。免疫組織化学及び透過型電子顕微鏡にて decellularized scaffold (DS) の組織学的評価を行った。

その他の方法による脱細胞化技術の開発  
超高压処理、マイクロ波照射下での洗浄、あるいはその両者を組み合わせた方法を用いて、ラット子宮の脱細胞化を試みた。上記と同様に、免疫組織化学及び透過型電子顕微鏡にて DS の組織学的評価を行った。

## (2) 再細胞化技術の開発と確立

In vitro 再細胞化実験として、ラット子宮より単離した細胞、子宮細胞株、骨髄間葉系幹細胞などを、単独あるいは組み合わせで DS に注入し、酸素化した培地を大動脈より灌流して細胞注入 DS を培養する。

In vivo 再細胞化実験として、ラット子宮角の一部を切除し、DS の一部を欠損部に移植する。In vitro 実験では培養開始 3 日後から経時的に DS の一部を摘出し、in vivo 実験では 4~6 週後に移植部位を摘出した。続いて、腺上皮、間質など各内膜細胞系譜のマーカーにて免疫組織化学解析を行った。

幹細胞あるいはその関連細胞のトラッキングと bioluminescence imaging (BLI)

上記の in vitro あるいは in vivo の再細胞化の前に、注入予定の幹細胞あるいはその関連細胞に対して、発光蛋白あるいは蛍光蛋白を発現する遺伝子が搭載されたレンチウイルスを感染させて、発光蛋白あるいは蛍光蛋白を恒常的に発現させるように操作した。これらの発光細胞・蛍光細胞とマジョリティを占める非標識の細胞と混合して注入し、子宮の再建・再構築を図る。それらの発光・蛍光細胞が、再構築過程でどの場所にどのように寄与しうるかを、BLI でリアルタイム並びに非侵襲的にモニタリングするとともに、免疫組織化学などを用いて、詳細な局在・系譜解析を行った。

## (3) In vitro 構築子宮の構造・機能解析

上記の in vitro で再細胞化した子宮に対して、エストロゲン単独あるいはプロゲステロンや他の性ステロイドホルモンあるいはそれらの阻害剤を併用して器官培養し、増殖能・分化能を検討した。さらに、ラット胚を子宮腔内に注入し、着床および引き続いての初期胎盤形成の過程を観察した。

さらに、注入細胞に発光蛋白および蛍光蛋白で標識した子宮幹細胞あるいは間葉系幹細胞を混合して注入し、BLI を用いて、幹細胞を追跡（トラッキング）することにより、その振る舞いと各細胞系譜への貢献を検討した。

## (4) In vivo 構築子宮の構造・機能解析

In vivo で再細胞化した子宮に対して、工

ストロゲン単独あるいはプロゲステロン併用の存在下で器官培養し、増殖能・分化能を検討した。さらに、ラット胚を子宮腔内に注入し、着床および引き続いての初期～中・後期の胎児発育および胎盤形成の過程を観察した。

さらに、注入細胞に発光蛋白および蛍光蛋白で標識した子宮幹細胞あるいは間葉系幹細胞を混合して注入し、BLI を用いて、幹細胞を追跡（トラッキング）することにより、その振る舞いと各細胞系譜への貢献を検討した。

さらに DS 移植ラットを同系雄ラットと交配して、妊娠させるとともに、着床部位、胎仔数、胎仔体重などのパラメータに関する検討を行い、再細胞化子宮の生殖機能特性を検証した。In vivo BLI を施行し、非侵襲的リアルタイムに、再構成子宮における幹細胞の振る舞いをモニタリングすることにより、幹細胞の in vivo における役割と振る舞いを検討した。

#### (5) 雌性生殖器官の再構成・機能再建に関する基盤技術の開発

再生医療の要件としては、細胞、増殖・分化誘導因子、足場 (scaffold) が必要である。特に足場は構造・機能再建に必須となるが、そのなかで脱細胞化 (decellularization) による足場の作成を模索した (Ott et al., Nat Med, 2010)。

齧歯類の子宮は双角なので、一方の子宮を摘出し界面活性剤あるいは高圧環境で細胞成分を飛散させた後、細胞外基質による組織骨格に対して、子宮を作成するために、幹細胞を中心とした細胞を埋め込み、人工子宮片を作成した。これを、対側の intact の子宮（あるいは一部切離した子宮）に接合させることにより、構造的にも機能的にも子宮として作動するかを検討した。

構造としての再構成については、免疫組織化学的・生化学的手法により検証した。一方、機能再建が達成できたか否かについては、本来の子宮の機能は着床・妊娠の場であることを鑑み、再構成マウスを妊娠させて、産仔が得られるかについて調べた。

#### 4. 研究成果

脱細胞化技術の開発と確立については、ラット子宮を下大静脈と大動脈付きで摘出した後、灌流装置を用いて大動脈経由でドデシル硫酸ナトリウムにより灌流し、子宮を脱細胞化することに成功した。この脱細胞化マトリックス (decellularized scaffold, DS) を免疫組織化学及び透過型電子顕微鏡にて解析したところ、コラーゲンなどの細胞外基質とともに血管構造などの組織三次元構造が保持されていた。さらに、大動脈経由での Allura Red 染色色素の注入により、微細な血管構造まで染め分けることが可能であった。このことは、単に形態的な血管構造が保持さ

れているだけでなく、液性成分の漏出などが容易に起きない血管構造の強度も保持されていることが判明した。

再細胞化技術の開発と確立については、in vitro 再細胞化実験として、ラット子宮より単離した細胞、子宮細胞、骨髄間葉系幹細胞などを、単独あるいは組み合わせで DS に注入し、酸素化した培地を大動脈より灌流して細胞注入 DS を培養した。その結果、HE 染色および免疫組織化学により腺上皮および間質の組織構造の復元が確認されるとともに、最大 10 日間までその再細胞化組織を培養することが可能であった。ただし、平滑筋構造については十分な再構築は得られなかった。In vivo 再細胞化実験として、ラット子宮角の一部を切除した後 DS の一部を欠損部に移植した。移植 4 週間後に移植部位を HE 染色および免疫組織化学により検討したところ、腺管・腺上皮・間質・平滑筋構造がほぼ正常に再構築されていた。一方、DS を移植しなかったラットでは、組織は菲薄化しており、上記の一連の子宮構造は十分に再構築されなかった。

上記の通り、脱細胞化子宮マトリックス (DUM) が同種同系ラット間で子宮組織再構成の足場として in vivo で機能することを明らかにした。そこで、将来の臨床への応用を念頭において、DUM を異系統ラットに同種移植しても機能的な子宮再生が可能か検証した。Sprague-Dawley ラット (SD) 子宮に界面活性剤を灌流し DUM を作成した。Wistar 系統のレシピエントラットの子宮角を部分切除し、SD 由来 DUM 或いは子宮同種移植片 (Uterine allograft; UtA) を欠損部に移植した。5 週後に移植部位の再生組織を切除し、リアルタイム PCR を用いて Casp3, Esr1, Esr2, Pgr 各遺伝子発現の定量解析を行った。移植 5 週後、DUM 移植部位には子宮内膜と筋層を含む子宮組織が再生しており、免疫拒絶を疑う所見は認められなかった。一方、UtA 移植部位には線維化が認められ、系統立った子宮再生に至らなかった。アポトーシスマーカーである Casp3 遺伝子発現量は UtA と比較して DUM において有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。ホルモン受容体である Esr1, Esr2, Pgr 各遺伝子発現量は UtA と比較して DUM において有意に高値であった ( $p < 0.01$ )。DUM を同種移植すると、免疫拒絶を受けずにホルモン応答性を持った子宮組織の再生を促進する事が判明した。この結果は、将来的な臨床応用に際して、子宮性不妊患者に別個体由来の DUM を移植し機能的な子宮再生を行う事ができる可能性を示唆している。

#### 5. 主な発表論文等

\*corresponding author

[雑誌論文] (計 15 件)

英文論文

[Minireview] Ono M, Bulun SE,

**Maruyama T**\*: Tissue-Specific Stem Cells

in the Myometrium and Tumor-Initiating Cells in Leiomyoma. **Biol Reprod.** 2014; 91(6): 1-7. 査読有 .  
DOI: 10.1095/biolreprod.114.123794.

[平成 26 年度日本産科婦人科学会優秀論文賞] Miyazaki K, **Maruyama T\***: Partial regeneration and reconstruction of the rat uterus through recellularization of a decellularized uterine matrix. **Biomaterials.** 2014; 35(31): 8791-8800. 査読有 .  
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.052.

**Maruyama T\***: Endometrial stem / progenitor cells. **J Obstet Gynaecol Res.** 2014; 40(9): 2015-2022. 査読有 .  
DOI: 10.1111/jog.12501.

Ono M, Yin P, Navarro A, Moravek MB, Coon V JS, Druschitz SA, Serna VA, Qoang W, Brooks DC, Malpani SS, Ma J, Ercan CM, Mittal N, Monsivais D, Dyson MT, Yemelyanov A, **Maruyama T**, Chakravarti D, Kim JJ, Kurita T, Gottardi CJ, Bulun SE\*: Paracrine activation of WNT/ $\beta$ -catenin pathway in uterine leiomyoma stem cells promotes tumor growth. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2013; 110(42): 17053-17058. 査読有 .  
DOI: 10.1073/pnas.1313650110.

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, 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 .  
DOI: 10.1016/j.placenta.2012.12.010.

**Maruyama T\***, Ono M, Yoshimura Y: Somatic stem cells in the myometrium and in myomas. **Semin Reprod Med.** 2013; 31(1): 77-81. 査読有 .  
DOI: 10.1055/s-0032-1331801.

#### 和文論文

[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.  
[http://www.seishoku.org/13\\_18kan/9-frontier1.pdf](http://www.seishoku.org/13_18kan/9-frontier1.pdf)

[学会発表](計 20 件)  
国際学会

Kaoru Miyazaki, Yuki Ueno, **Hiroataka Masuda**, **Hiroshi Uchida**, **Tetsuo Maruyama**: Decellularized uterine matrix can promote uterine regeneration in vivo without immune rejection upon allotransplantation. International Federation of Fertility Societies / Japan Society for Reproductive Medicine (IFFS / JSRM) International Meeting 2015. April 26-29, 2015, Yokohama, Japan.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama** : Stem/progenitor cells in the human uterus: implications for uterine tumors. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine. October 9, 2014, Athens, Greece.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama**: Regeneration and reconstruction of the uterus as a future infertility treatment. International Federation of Fertility Societies (IFFS) Regional Meeting 2014. October 14, 2013, Boston, USA.

[Society of Reproductive Biologists and Technologists (SRBT) BASIC SCIENCE AWARD] Kaoru Miyazaki, **Tetsuo Maruyama**, **Hiroataka Masuda**, Naoko Hida, **Hiroshi Uchida**, Yasunori Yoshimura: Application of decellularized rat uterus as a three-dimensional scaffold to *in vitro* and *in vivo* uterine tissue engineering. 69th American Society for Reproductive Medicine (ASRM) Annual Meeting. October 12-17, 2013, Boston, USA.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama**: Human endometrial stem cells; implications for endometrial physiology and pathology. 99th Annual Congress of Korean Society of Obstetrics and Gynecology (KSOG). September 27, 2013, Seoul, Korea.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama**: Role of stem cells in the pathogenesis of endometriosis: implications for prevention and therapy of endometriosis targeting stem cells. 23rd International Conference of Russian Association of Human Reproduction (RAHR). September 4-7, 2013, Volgograd, Russia.

Kaoru Miyazaki, **Tetsuo Maruyama**, Hiroataka Masuda, Hideyuki Oda, Naoko Hida, Hiroshi Uchida, Yasunori Yoshimura: Novel decellularization and recellularization techniques for reconstruction and regeneration of the uterus in rat. 29th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). July 7-10, 2013, London, United Kingdom.

#### 国内学会

[招請講演] **丸山哲夫**: 子宮における幹細胞 雌性生殖器官の再生・再建と疾患メカニズムの解明を目指して . 第 25 回阪大医療組織工学フォーラム(大阪府吹田市・大阪大学) 2014 年 12 月 15 日

[シンポジウム] **丸山哲夫**: 幹細胞を用いた子宮内膜の再生・再建 . 第 87 回日本内分泌学会 (福岡県福岡市・福岡国際会議場) 2014 年 4 月 24-26 日

[教育講演] **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 . 第 35 回日本エンドメトリオーシス学会 (鹿児島県鹿児島市・城山観光ホテル) 2014 年 1 月 25-26 日

[招請講演: ワークショップ] **丸山哲夫**: ベンチサイドから: ヒト子宮幹細胞研究のこれまでと未来予想図 . 第 126 回関東連合産科婦人科学会 (静岡県浜松市・アクトシティ浜松) 2013 年 10 月 26-27 日

[若手研究奨励賞 (YIA)] 宮崎 薫, **丸山哲夫**, 升田博隆, 内田 浩, 吉村泰典: 脱細胞化マトリックスを用いた子宮の再構築 . 第 86 回日本内分泌学会 (宮城県仙台市・仙台国際センター) 2013 年 4 月 25-27 日

#### [図書](計 2 件)

宮崎 薫, **丸山哲夫**: 『三次元ティッシュエンジニアリング ~ 細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで ~ 』脱細胞化による子宮構築 . (大政健史, 福田淳二 監修) **エヌ・ティイー・エス** 317-321, 2015.

**Maruyama T**: Role of stem cells in the pathogenesis of endometriosis. " **Endometriosis: Pathogenesis and Treatment** " eds: Harada T. Springer, Japan. 2014, 33-48.

#### 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・講師  
研究者番号: 90286534

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