

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861518

研究課題名(和文) 不妊治療の妊娠率向上に向けた着床不全に対する再生細胞を用いた細胞医療モデル

研究課題名(英文) Cell treatment model for implantation failure using mesenchymal stem cells

研究代表者

菅原 かな (SUGAWARA, Kana)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：10453739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：羊膜由来間葉系幹細胞、月経血由来間葉系幹細胞、骨髄由来間葉系幹細胞に、エストロゲン+プロゲステロン、または8-Br-cAMPを添加培養し、子宮内膜間質様細胞の特徴である脱落膜化能を誘導することを試みた。細胞形態変化、細胞表面抗原解析、脱落化のマーカーであるプロラクチンやインスリン様増殖因子結合タンパク質1の発現について、免疫染色及び定量的リアルタイム逆転写核酸増幅法を用いて検討した。これまで骨髄由来間葉系幹細胞から子宮内膜様細胞への分化誘導は報告されていたが、今回羊膜由来間葉系幹細胞と月経血由来間葉系幹細胞からも脱落膜化能を有する子宮内膜間質様細胞に分化誘導されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We induced differentiation of human amnion-derived mesenchymal stem cells (AMCs) and menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MMCs) into endometrial stroma-like cells, which could be useful for cell therapy to support embryo implantation. Interestingly, the expression patterns of surface markers were similar among AMCs, MMCs, and endometrial stromal cells. In addition, whereas treatment with estrogen and progesterone was not very effective for decidualizing AMCs and MMCs, treatment with 8-Br-cAMP prompted remarkable morphological changes in these cells as well as increased expression of decidualization markers and attenuated expression of surface markers unique to mesenchymal stem cells. These results demonstrated that bone marrow-derived stem cells, which are considered a potential source of endometrial progenitor cells, as well as AMCs and MMCs show in vitro decidualization potential, which is characteristic of endometrial stromal cells.

研究分野：生殖生理

キーワード：着床不全 間葉系幹細胞 脱落膜化

1. 研究開始当初の背景

反復着床不全の原因や対策については、これまで様々な検討がなされてきた。たとえば、研究協力者の浜谷ら (Hamatani T, et al. Proc Natl Acad Sci. 2004) は胚性着床因子の網羅的解析を行い、Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) が子宮内膜から分泌されるだけでなく、胚盤胞からも提示されることが着床に重要であることを見出した。しかし反復着床不全症例の3分の2は胚に原因はなく、子宮の受容性あるいは胚と子宮のクロストークの異常によるものと推測される。

Landgren らは、正常の月経周期をもつ健康な女性から LH ピーク後 4, 5, 6 日に得られた子宮内膜生検を利用した共培養モデルを開発した。検体は細切して培養し、*in vitro*にて受精した1-3個の胚を裏打ちされた内膜上皮に置いて共培養された。光学顕微鏡にて分析すると子宮内膜上皮に侵入していることが明らかになった (Landgren BM, et al. Fertil Steril. 1996)。Eyheremendy らは、生殖補助医療での反復不成功患者において、胚を子宮内膜と共培養した群の方が、通常の胚移植を行った群よりも、胚移植後の妊娠率が高かったことを報告した (Eyheremendy V, et al. Fertil Steril. 2010)。また、Popovici らは、ヒト栄養芽細胞と子宮内膜間質細胞を共培養するシステムを利用することで、子宮内膜間質細胞の遺伝子表現における栄養芽細胞の接触の影響を研究している (Popovici RM, et al. Endocrinology. 2000)。このように、患者自身の胚と子宮内膜を用いて着床にかかわるメカニズムを明らかにしようとする研究がなされてきた。しかしながら、子宮内膜は加齢により菲薄化する傾向にある。また、子宮内膜炎や流産手術後に子宮内腔癒着により

Asherman 症候群を呈する症例や、子宮体癌初期や子宮内膜増殖症に対して行われる子宮内膜全面搔爬術の反復施行例では、子宮内膜の菲薄化が深刻である。これらの症例では、自身の子宮内膜細胞を生検から回収し培養することは困難であり、これまで他の有効な治療法も開発されていないという現状がある。そこで、ヒト間葉系幹細胞を子宮内膜間質様細胞に分化誘導させて着床を補助することができないかという着想に至った。本研究では、着床不全に対する細胞医療の可能性を開拓することを目指すこととした。

2. 研究の目的

これまで我々は、月経血中の子宮内膜細胞、羊膜、胎盤、骨髄などから、種々の間葉系幹細胞を樹立し、再生医療への応用を目指してきた。例えば、梅澤らはマウスやブタの骨髄から樹立した間葉系幹細胞を、虚血・壊死させたマウス骨格筋に注入して、骨格筋機能の改善を示す細胞医療モデルを報告した (Umezawa A, et al. Clin Calcium. 2005)。また、月経血細胞から効率よく心筋細胞へ分化させ、治療への応用も試みた (Hida N, Umezawa A, et al. Stem Cells 2008)。しかし、間葉系幹細胞から子宮内膜細胞へ分化誘導することは極めて困難で、我々に限らず、これまでにその成功が報告されたことはない。しかし、Mezey らは、骨髄細胞を green fluorescent protein (GFP) 標識して、長期放射線照射したマウス C57BL/6J のメスに注射し、子宮内膜上皮細胞が骨髄からできるという事実を明らかにした。また、CD45 陽性の骨髄幹細胞が、子宮内膜上皮の再構築に重要であると報告している (Bratincsák A, et al. Stem Cells. 2007)。Linda C. Giudice らは、骨髄由来間葉系幹細胞の培養液中に

8-Br-cAMP を添加することにより、ヒト子宮内膜間質細胞と同様の形態変化を示すのみならず脱落膜化のマーカである prolactin (PRL) や insulin-like growth factor binding protein1 (IGFBP1) が発現上昇することを明らかにした (Linda C.Giudice, et al. Biol Reprod. 2010)。

これまでの反復着床不全に対する治療は、抗血小板剤、抗凝固剤、ホルモン剤、ビタミン剤などを用いた薬物療法のみであった。本研究の目指すところは、胚を予め子宮内膜様細胞に接着・浸潤させることで、胚の着床のメカニズムを確実に始動させた上で胚移植する点、また自身の子宮内膜が菲薄化している場合には子宮内膜と胚とを接着させ着床を支持する可能性が期待される点、従来の治療とは全く違って、再生医療に基づく細胞医療である点などが特徴的である。本研究が、これまでに成し遂げられていない間葉系幹細胞から子宮内膜様細胞への分化誘導の実現とその分子機構の解明、胚と子宮内膜との分子的クロストークの解明、さらに着床不全の治療法開発に向けたブレイクスルーとなる可能性があると考えられた。

本研究では、以上の背景を踏まえヒト間葉系幹細胞を子宮内膜様細胞に分化誘導し、着床不全に対する細胞医療に応用可能な系を確立し、次に、ヒト子宮内膜様細胞をマウス胚と共に偽妊娠マウスに胚移植して脱落膜あるいは胎盤に寄与しないかを検討することを目的とした。このドナー胚でもレシピエントの子宮内膜細胞でもない第3の細胞が着床に寄与することが明らかとなれば、妊娠初期における免疫寛容の確立を研究する実験モデルとしても有用であると考えた。

3. 研究の方法

(1) 羊膜由来間葉系幹細胞 (amnion-derived mesenchymal stem cells : AMCs) と月経血由来間葉系幹細胞

(menstrual blood-derived mesenchymal stem cells : MMCs)、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells : BMCs) について、エストロゲン (estradiol : E_2) 10nM+ プロゲステロン (progesterone : P_4) 1 μ M または 8-Br-cAMP (cAMP) 1.0 μ M を添加した培養液で7, 14日間培養し、子宮内膜間質様細胞の特徴である脱落膜化能を誘導することを試みた。子宮内膜間質細胞 (endometrial stromal cells : ESCs) をポジティブコントロールとした。

細胞形態変化の観察、細胞表面抗原解析、PRL や IGFBP1 の発現について、免疫染色および定量的リアルタイム逆転写核酸増幅法 (quantitative real-time PCR : qRT-PCR) を用いて検討し、脱落膜化能の有無を評価した。

(2) 子宮内膜細胞組織の再構築ができるか子宮内膜細胞の多層培養を行い、病理学的に検討した。

(3) ヒト子宮内膜様細胞とマウス胚を含めた組織片をコラーゲンビトリゲル薄膜上に作成し、偽妊娠マウスの腎被膜下に移植する。ヌードマウスを用いて胚移植を行い、胎盤形成に寄与するか、病理学的に検討した。

4. 研究成果

(1) E_2+P_4 あるいは cAMP 添加培養前より AMCs, MMCs, BMCs は間葉系幹細胞に特徴的な細胞表面マーカー (CD29, CD44, CD59, CD73, CD105, CD166) を発現していた。AMCs, MMCs, BMCs の E_2+P_4 添加培養群では、免疫染色および qRT-PCR により PRL の発現が認められたが、IGFBP1 の発現は明らかではなく、細胞の形態変化も認められなかった。

AMCs, MMCs, BMCs に cAMP を添加培養して7日目から、いずれの細胞でも ESCs と同様に PRL, IGFBP1 の発現が認められ、さらに培養14日目では、ESCs と同様の形態変化も認められた。これまでに BMCs から子宮内膜様細胞への分化誘導については報告があり、子宮

内膜幹細胞が BMCs に由来すると考える根拠の一つとなっていたが、AMCs, MMCs からも脱落膜化能を有する子宮内膜間質様細胞に分化誘導されることが明らかとなった。

(2) コラーゲンビトリゲル薄膜上にヒト子宮内膜間質細胞をコンフルエントになるように培養し、それを繰り返すことで重層化し多層培養を行い、子宮内膜組織の再構築の再現を試みた。光学顕微鏡下には多層構造を示す様に観察されたが、切片作成し HE 染色した後の観察では、子宮内膜細胞の単層から二層構造が確認されたため、多層構造を再現することが、今後胚の接着・浸潤を観察する上で重要なことであると考えられた。

(3) コラーゲンビトリゲル薄膜上に間葉系幹細胞を培養した後、cAMP 添加により分化誘導し、培養液中にマウス胚盤胞を浮遊させたところ、細胞シート上にマウス胚盤胞が接着し増殖した。このマウス胚盤胞を含めた小組織片を、偽妊娠マウスの腎被膜下に移植した。ヌードマウスを用いて移植を行い、胎盤形成に寄与するか病理学的に検討した。片側に 3~4 カ所ずつ移植したマウスの腎臓を 7 日間後に摘出し、切片を作成した。胚を得るマウスを GFP 標識マウスとした。病理学的検討の際に、切片に胚盤胞が含まれるためには、より多数の移植が必要であるか、またはマウス子宮内に移植する方がより効率的であると示唆された。

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1件)

Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamiyo S, Kuji N, Akutsu H, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. Scientific Reports. Apr

8;4:4599, 2014. DOI: 10.1038/srep04599.
査読有

[学会発表](計1件)

菅原かな ヒト間葉系幹細胞から子宮内膜間質様細胞への分化誘導 日本産科婦人科学会第66回学術講演会 平成26年4月19日 東京国際フォーラム

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 かな (SUGAWARA, Kana)

国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：10453739

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

梅澤明弘 (UMEZAWA, Akihiro)

国立成育医療研究センター・細胞医療研究
部・部長

浜谷敏生 (HAMATANI, Toshio)

慶應義塾大学医学部・産婦人科学教室・講
師