

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05474

研究課題名(和文) 光遺伝学と組織工学の技術を用いた子宮内膜機能の制御と治療への展開

研究課題名(英文) Regulation of uterine endometrial function using photogenetics and tissue engineering: its possible therapeutic potential

研究代表者

丸山 哲夫 (MARUYAMA, Tetsuo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：10209702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：齧歯類における脱細胞化子宮内膜組織(DES)を用いた内膜再生技術と光応答性CRISPR/CAS9(光CAS9)による遺伝子編集システムの開発を行った。内膜菲薄化・欠損モデルにおいて、DES移植により腺管構造を有する内膜の再構築が可能であった。その際、正しく再構築されるためには、用いるDESの構造極性が重要であった。一方、光CAS9の遺伝子編集を通じて、*in vitro*での遺伝子の発現を抑制・増強できること、さらに*in vivo*子宮においてもその遺伝子編集により生殖能を任意に制御することが可能であった。両技術の融合による子宮内膜の再生を目指した新しい治療法・研究ツールの基盤知見・技術が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DESと再細胞化技術による子宮内膜組織の再生は、アッシャーマン症候などの内膜菲薄化・欠損患者に対して有用な治療になり得る。一方、反復着床不全による不妊症や不育症の原因となる内膜の機能不全は、光CAS9という時空間的制御可能なゲノム編集システムを用いて遺伝的アプローチからその異常を是正することにより、改善・解決が可能である。本研究の成果は、新しい内膜機能・構造の再生・再建医療の開発につながる点で社会的意義が大きい。さらに、これらの技術を単独あるいは融合させることにより、子宮内膜の機能と構造を担う分子細胞生物学的メカニズムを明らかにする研究手法ツールになり得る点で、学術的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：We developed uterine endometrial regeneration technology using decellularized endometrial scaffolds (DES) and photoactivatable CRISPR/CAS9 (paCAS9)-mediated gene editing system to regulate reproductive function in rodents. We showed that placement of DES resulted in the regeneration of endometrium with delineated gland and luminal structures in rat endometrium injury and defect models. Notably, the orientation of the uterine scaffold was important for determination of the tissue topology and architecture of the regenerated uterus. We also found that, in addition to the *in vitro* gene regulation by paCAS9-mediated gene editing, paCAS9 was able to regulate uterine gene expression and reproductive functions including uterine embryo receptivity *in vivo* in response to LED light irradiation. The results of this study provide basic knowledge and technologies to develop a novel therapeutic concept and strategy for restoration and repair of endometrial dysfunction, injury, and defect in humans.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮内膜 脱細胞化 再細胞化 CRISPR/CAS9 ゲノム編集 再生医療 生殖医療

### 1. 研究開始当初の背景

アッシャーマン症候群や頻回なる子宮内容除去術による子宮内膜の欠損や菲薄化のような構造不全さらには反復着床障害など子宮内膜の機能不全も、着床障害や流産を惹起し、不妊症や不育症の原因になる。これらに対して外科的処置に加えて、子宮内膜の肥厚を目指す薬物療法、あるいは間葉系幹細胞による細胞治療が試みられている (Cervelló, Maruyama, et al., 2015)。しかしながら薬物や細胞治療では、細胞量とその足場不足から十分な組織構築が得られないことから、細胞だけでなく子宮内膜の脱細胞骨格 (脱細胞化子宮内膜骨格, Decellularized Endometrial Scaffold, DES) を細胞単体として移植することでより良い子宮内膜組織の再生を行えると考えた。これまで我々は、組織から細胞を除去する脱細胞化、および脱細胞化された組織骨格に新たに細胞を移入する再細胞化の技術を用いて、ラットにおいて妊娠能を有する子宮の部分的な再生・再建に成功した (Miyazaki & Maruyama, 2014)。この手法が効率的な子宮組織再生の一助となると考える。

子宮内膜は、増殖・分化・再生という構造的機能的変化を月経周期毎に反復するダイナミックな組織であり、子宮内膜の時空間的な遺伝子発現制御をコントロールするためには、時空間的な介入が可能システムを導入する必要がある。従来、時空間的な遺伝子発現制御にはドキシサイクリンやホルモンを用いた薬剤システムが用いられてきたが、対象細胞・組織に影響を及ぼすことから生理的制御を反映しているとは言い難い。しかしながら近年、任意の時間に任意の細胞で任意の遺伝子の発現変化を誘導できる“光遺伝学”とゲノム編集技術 (CRISPR/CAS9 システム) を組み合わせることにより、光応答性にゲノム編集が可能なシステムが開発された (Nihongaki, et al, 2015)。

本研究では、子宮内膜組織及び機能再生・再建治療を行うにあたり、この DES システムと光応答性ゲノム編集システムの 2 種類を統合的に導入することで細胞治療の基盤を得られると着想に至った。

### 2. 研究の目的

- (1) 光照射による子宮内膜における特定の遺伝子発現を時空間的に制御するシステム、
- (2) 子宮内膜から細胞を除去して得られた脱細胞骨格 (DES) を細胞・組織の導入・運搬・維持の担体として用いるシステム、

の二つのシステムを統合的に開発することを通じて、子宮内膜の構造・機能不全に対する新しい細胞治療の基盤知見および基盤技術を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

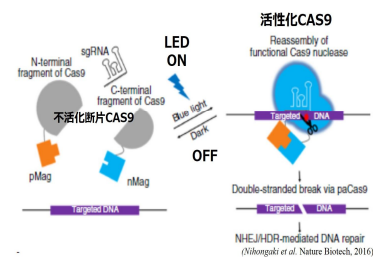
子宮内膜の構造的欠損に対しては、DES 単体あるいは内膜細胞により再細胞化した DES を移植することでその欠損を改善する。

機能的欠損に対しては、内膜機能を担う分子の遺伝子発現を光刺激により制御できる仕掛けを DES の再細胞化に用いる内膜細胞に予め施し、この改変内膜細胞を搭載した DES を子宮腔内に移植し生着させたいうで、子宮鏡を用いて光を子宮腔内に照射し、時空間的に遺伝子発現を制御することにより機能的欠損をレスキューする。

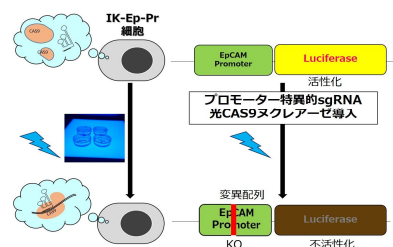
#### (1) In vitro 光応答性システムの開発と確立

光応答性 CRISPR/CAS9 システムを構成するベクター (以下光 CAS9) は光 (青色光, 470 nm ± 20 nm LED 光) を照射することにより二つの断片に分かれていた不活性化型 CAS9 蛋白が融合して活性化型 CAS9 蛋白となり、これが CRISPR/CAS9 複合体になり標的遺伝子のゲノム編集を行う (図 1)。まず光照射により CAS9 蛋白質が正常に発現するかについて 293T 細胞に光 CAS9 を導入し LED 照射後、抗 CAS9 抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った。さらに光 CAS9 システム作動を確認するためのマーカーとして、化学発光蛋白遺伝子である luciferase がゲノム編集後に活性が消失するシステムを作製した。まず、上皮由来子宮体癌細胞株 Ishikawa 細胞に上皮特異的なマーカーである EpCAM プロモーターにより誘導される Luciferase を導入したレンチウイルスベクターを感染させた (以下 IK-Ep-pr 細胞)。このプロモーター特異的なシングルガイド RNA (sgRNA) を作成し、光 CAS9 と IK-Ep-pr 細胞へ cotransfection し、24 時間後青色 LED 照射を行った。照射後、発光バイオイメージング IVIS で観察した (図 2)。他方、発現増強を目的とした光応答性 CRISPR/dCAS9 (以下 dCAS9, ベクター CibN-dCas9/Cry2FL-VP64) を購入し、EGFP 発現を増強する sgRNA

【図1】 光応答性CRISPR/CAS9システム(光CAS9)



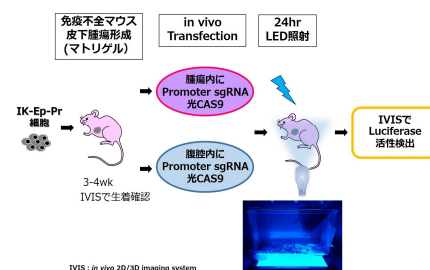
【図2】 IK-Ep-Pr細胞に対する光CAS9モデル



を Ishikawa 細胞に導入後 LED 照射を行い、EGFP 発現が増強するかについて蛍光顕微鏡で確認を行った。

- (2) In vivo 光応答性システムの開発と確立  
In vivo での光応答性システムを開発するにあたり、まず上記の細胞を免疫不全マウスにマトリゲル包埋し皮下注射を行い、腫瘍形成が認められた。腫瘍内の Luciferase 活性を IVIS により検出し、上記と同様の EpCAM プロモーター特異的 sgRNA と光 CAS9 を腫瘍内または腹腔内に注入し、その後青色 LED 照射を行い IVIS にて Luciferase 活性を検出した(図3)。

【図3】光CAS9を用いたマウスin vivoモデル作製



他方、内膜組織での光応答性システムを開発するにあたり、子宮内膜組織で発現し、機能が明らかにわかっている Lif 遺伝子を用いた。Lif は交配後のマウス子宮内膜上皮細胞や受精卵より分泌され、4 日後がピークになる。Lif ノックアウトマウスは脱落膜化が阻害され不妊となる。また交配後 2.5-3.5 日のマウスに Lif アンタゴニストを腹腔内投与することで妊娠を阻害することが既に分かっている。そこで Lif の sgRNA (sgLif) を作成し、交配後 2.5 日目 ICR マウスに sgLif と光 CAS9 を腹腔内投与し、3.5 日目より青色 LED を 24 時間照射し、7.5 日目に着床数を解析した。

- (3) 脱細胞化骨格を用いた子宮内膜の再生・再建の開発  
ラット子宮脱細胞化骨格 (DES) を作成するにあたり、ラットの子宮から子宮内膜組織を採取し、SDS 法を用いて DES を作成した。作成方法は 0.01% 0.1% 1% SDS と各 24 時間インキュベーションし、脱細胞化を行う。洗浄後 TritonX で処理し、5 時間以上洗浄後 DES として使用した。次に子宮内膜欠損モデル (アッシャーマン症候群モデルラット, Kilie, et al., 2014; Alawadhi, et al., 2014) として子宮内膜菲薄モデルに DES 単独を移植することで、構造的欠損が修復されるか否かについて 4 週間後解析・検討を行った。また全層性にラット子宮内膜を除去した子宮内膜剥離モデルに対し DES を移植することで上記と同様に修復されるかについて検討を行った。

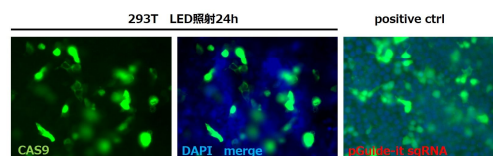
さらに DES の生体材料としての特性を解析するため、子宮の一部欠損部分に極性を反転させた DES を移植し、構造の修復が行われるか 4 週間後、マッソントリクローム染色および蛍光免疫染色 (Smooth muscle actin; SMA, Cytokeratin; CK) 法を用いて検討を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) In vitro での光応答性システムの開発と確立:

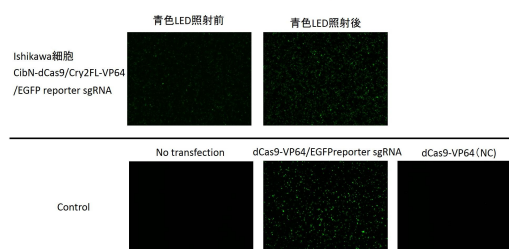
光照射により CAS9 蛋白質が正常に発現するかについて 293T 細胞に光 CAS9 を導入し LED 照射後、抗 CAS9 抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った。結果として光 CAS9 導入細胞の一部で CAS9 蛋白質の発現が確認できた(図4)。次に、上皮由来子宮体癌細胞株 Ishikawa 細胞に上皮特異的なマーカーである EpCAM プロモーターにより誘導される Luciferase を導入したレンチウイルスベクターを感染させた(以下 IK-Ep-pr 細胞)。このプロモーター特異的なシングルガイド RNA (sgRNA) を作成し、光 CAS9 と IK-Ep-pr 細胞へ cotransfection し、24 時間後青色 LED 照射を行い IVIS で確認した。コントロール群である sgCtrl に対し、プロモーター特異的 sgRNA を導入後、LED 照射をした細胞群では Luciferase 活性が抑制されていた。これらの結果から、光 CAS9 が正しく機能していることが in vitro レベルで証明できた。

【図4】LED照射によるCAS9の発現確認



さらに発現抑制系ではなく増強を目的とした光応答性 CRISPR/dCAS9 システム(以下光 dCAS9)を新たに立ち上げた。Ishikawa 細胞に光 dCAS9 (CibN-dCas9/Cry2FL-VP64) 及び EGFP レポーターに対する sgRNA を導入後、青色 LED 照射により EGFP の発現増強を可能にした(図5)。以上の事から、光 dCAS9 を用いた in vitro システムが正常に機能していることが明らかとなった。

【図5】光応答性CRISPR-dCAS9(光dCAS9)システム



(2) In vivo 光応答性システムの開発と確立:

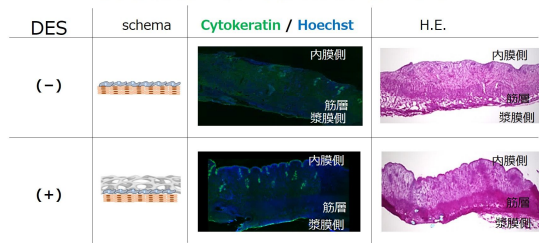
まず免疫不全マウスに上記の IK-Ep-pr 細胞を皮下注射し腫瘍形成を行い、上記と同様の sgRNA と光 CAS9 を腫瘍内または腹腔内投与し、LED 照射後 IVIS で腫瘍内の Luciferase 活性を検出した。結果として、腫瘍内または腹腔内投与共に Luciferase 活性が7割以上減弱した。さらに子宮は消化管組織より後腹膜側に位置することから、青色 LED 光の到達が子宮に到達し得るかについて検討を行った。免疫不全マウスの子宮内に IK-Ep-pr 細胞を注入し、子宮下部を強制的に結紮することで細胞を生着させた。その後上記と同様のプロモーター特異的 sgRNA 及び光 CAS9 を導入し LED 照射後、IVIS を用いて腹部及び背部から Luciferase 活性を確認した。結果として腹部及び背部共に約70%の Luciferase 活性の減弱が認められた。

他方、マウス子宮内に発現し、着床制御・責任因子として知られる Lif 遺伝子の時間的発現制御を試みた。Lif の sgRNA(sgLif)を作成し、ICR 雌雄マウス交配後、プラグが確認できた雌マウスに対して2.5日目に sgLif と光 CAS9 を腹腔内投与し、3.5日目より青色 LED を24時間照射、7.5日目に着床数を検討した。sgCtrl+LED 照射群、sgLif+LED 非照射群である妊娠コントロール群では無処置群と同様の着床数が得られた。しかしながら、sgLif+LED 照射群であるロックアウト群では着床数が低下した。以上の結果から、マウスレベルにおいて in vivo の光応答性ゲノム編集システムは機能することが示された。

(3) 脱細胞化骨格を用いた子宮内膜の再生・再建の開発:

子宮内膜欠損モデルとしてまず、ラット子宮腔内面を擦過し表層のみを欠損させた子宮に DES を移植した(子宮内膜菲薄化モデル)。4週間後に解剖し、欠損部位の構造の再生又は修復が生じるのか検討を行った。結果として、DES を移植していない群に対し、DES 移植群では管腔・腺管構造や mass として組織の再構成が認められた(図6)。次に内膜のみを全層性に剥離した子宮に DES を移植した(子宮内膜剥離モデル)。3-4週間後に解剖を

【図6】子宮内膜菲薄化モデルに対するDESの移植で子宮内膜は上皮・間質ともに再生する



を行い、上記と同様の検討を行った。結果として組織の再生は一部にとどまり、明らかな管腔構造などは得られなかった。しかしながら、全層性子宮内膜除去後の DES に DES 直径と同等のシリコン管を挿入し、同様の移植を行った。結果として、子宮内膜間質細胞の修復に至らなかったものの上皮細胞の再生に成功した。これらの結果から、菲薄化モデルにおける DES 移植による子宮内膜の修復及び再構成は可能であることが明らかとなり、さらに今後の検討課題にもなるが、重症剥離モデルにおいては管腔形態を維持することで DES 移植による子宮組織再構成ができる可能性が示唆された。

DES の特性を明らかにするため、DES を正常極性と反転したものをラット子宮の一部欠損部分に移植し、構造の再生が行われるかについて検討を行った。結果として、DES の構造極性が反転している場合、再生される子宮組織構造は DES 極性に反映された(Miki, Maruyama et al., 2019)。このことから、DES 移植に関して極性を合わせた移植を行う必要があることが明らかとなった。

これらの結果を踏まえた両結果の統合的な子宮修復・再生システムは現在進行中であり、各々の結果が子宮内膜構造及び機能の再生・修復における基盤の一助となる成果であり、今後に期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Miki F, Maruyama T, Masuda H, Uchida H, Tanaka M, et al.: The orientation of a decellularized uterine scaffold determines the tissue topology and architecture of the regenerated uterus in rats†. Biol Reprod. 2019; 100(5): 1215-1227. 査読有 doi: 10.1093/biolre/ioz004.

Miyazaki K, Maruyama T, Bulun SE, et al.: Generation of progesterone-responsive endometrial stromal fibroblasts from human induced pluripotent stem cells: role of the WNT/CTNNB1 pathway. Stem Cell Reports. 2018; 11(5): 1136-1155. 査読有 doi: 10.1016/j.stemcr.2018.10.002.

升田博隆, 丸山哲夫: 子宮再生. 臨床婦人科産科 2018; 72(6): 600-604. 査読無し

Furuya M, Masuda H, Uchida H, Maruyama T, Saya H, et al.: ZEB1 expression is a

potential indicator of invasive endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017; 96(9): 1128-1135. 査読有  
doi: 10.1111/aogs.13179.

Uchida S, **Maruyama T**, Masuda H, Uchida H, Tanaka M, et al.: Impact of borderline-subclinical hypothyroidism on subsequent pregnancy outcome in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017;43(6): 1014-1020. 査読有  
doi: 10.1111/jog.13319.

小野政徳, **丸山哲夫**, 田中 守: 産婦人科領域における再生医療とゲノム編集 子宮筋幹細胞の臨床的意義. *臨床婦人科産科* 2017; 75(5): 459-463. 査読無し

升田博隆, **丸山哲夫**: 産婦人科領域における再生医療とゲノム編集 子宮内膜の再生 子宮内膜不全への対応. *臨床婦人科産科* 2017; 75(5): 464-470. 査読無し

**丸山哲夫**: 産婦人科領域における再生医学・再生医療の現状. *臨床婦人科産科* 2017; 71(2): 268-272. 査読無し

Hellström M, **Maruyama T**, Brannstrom M, et al.: Bioengineered uterine tissue supports a pregnancy in a rat model. *Fertil Steril.* 2016; 106(2): 487-496. 査読有  
doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.03.048.

Uchida H, **Maruyama T**, Masuda H, Tanaka M, et al.: How to create an embryo penetration route. *Am J Reprod Immunol.* 2016; 75(3): 326-332. 査読有  
doi: 10.1111/aji.12476.

[学会発表](計 17 件)

宮崎 薫, **丸山哲夫**, Serdar Bulun, ほか: ヒト iPS 細胞からの子宮内膜間質細胞の誘導と分化過程における WNT/CTNNB1 経路の役割. 第 18 回日本再生医療学会. 2019 年.

高尾知佳, **丸山哲夫**, 内田 浩, 升田博隆, 田中 守, ほか: ヒト正常子宮平滑筋細胞に対する子宮筋腫関連遺伝子 MED12 の変異導入による機能的病因解析. 第 23 回日本生殖内分泌学会. 2018 年.

[招請講演] **丸山哲夫**: 子宮の再生・再建医療 - 子宮移植の先を見据えて -. 第 2 回周産期医療研修会. 2018 年.

**Tetsuo Maruyama**, Hirotaka Masuda, Hiroshi Uchida, Mamoru Tanaka, ほか: Attempts to establish screening system for identification of drugs targeting human uterine endometrial cancer stem-like cells. International Society for Stem Cell Research 2018 annual meeting (ISSCR2018). 2018 年.

[特別講演] **丸山哲夫**: 子宮内膜症の謎と不思議に迫る ~ 発症メカニズムから治療戦略へ ~. 第 11 回六甲山婦人科疾患研究会. 2018 年.

高尾知佳, **丸山哲夫**, 内田 浩, 升田博隆, ほか: CRISPR/CAS9 システムにより MED12 変異を導入したヒト子宮筋腫モデルの開発の試み. 第 70 回日本産科婦人科学会. 2018 年.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama**: Stem cells solve the enigma of endometriosis? 4th Congress of the Society of Endometriosis and Uterine Disorders (SEUD2018). 2018 年.

Kaoru Miyazaki, **Tetsuo Maruyama**, Serdar E. Bulun, ほか: Role of WNT/CTNNB1 pathway in differentiation of human induced pluripotent stem cells to endometrial stroma-like cells. 65th Annual Meeting of the Society for Reproductive Investigation (SRI). 2018 年.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama**: Current paradigm on the pathogenesis and etiologies of endometriosis. Taiwan Endometriosis International Symposium and Taiwan Endometriosis Society 2017 Annual Meeting. 2017 年.

Kaoru Miyazaki, **Tetsuo Maruyama**, ほか: Transcriptome analysis of endometrial stroma-like of organoids differentiated from human induced pluripotent stem cells. 73rd Annual meeting of American Society for Reproductive Medicine (ASRM2017). 2017 年.

三木史恵, **丸山哲夫**, 升田博隆, 内田 浩, 田中 守, ほか: 子宮内膜欠損・菲薄化モデルにおける脱細胞化技術を用いた子宮内膜の再生. 第 62 回日本生殖医学学会. 2017 年.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama**: Current concept and knowledge on the pathogenesis and aetiology of endometriosis. 13th World Congress on Endometriosis (WCE2017). 2017 年.

[招請講演] **Tetsuo Maruyama**: Stem cell of uterine fibroids and bioengineering uterine tissue for repair. 3rd congress of the Society of Endometriosis and Uterine Disorders (SEUD2017). 2017 年.

[世界体外受精会議記念賞(基礎)] 三木史恵, **丸山哲夫**, 升田博隆, 内田 浩, 田中 守, ほか: 脱細胞化技術による子宮再生医療の基礎的検討 再生子宮の構造と妊孕能を規定する因子の探索. 第 34 回日本受精着床学会. 2016 年.

[招請セミナー] **Tetsuo Maruyama**: Stem cells in the human uterus: physiopathology and regenerative medicine. Reproductive Biology Research at Northwestern University.

August 8, 2016, Chicago, IL, USA. 2016 年.

Fumie Miki, Hiroataka Masuda, Hiroshi Uchida, Tetsuo Maruyama, ほか : A disoriented decellularized uterine scaffold regenerates the uterus but disrupts the tissue polarity and architecture in rats. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2016 meeting. 2016 年.

[招請講演 : シンポジウム] 丸山哲夫 : 子宮における幹細胞とその役割 . 第 89 回日本内分  
泌学会. 2016 年.

〔図書〕(計 2 件)

Ono M, Maruyama T, Bulun SE, ほか: Stem cells and uterine fibroids. "Uterine Fibroids and Adenomyosis" eds: Konishi I, Katabuchi H. Springer, Japan. 2018, 59-67.

Maruyama T: Stem/Progenitor Cells in the Human Endometrium. "Uterine endometrial Function" ed. Kanzaki H. Springer, Japan. 2016, 139-155.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 内田 浩

ローマ字氏名 : (UCHIDA, Hiroshi)

所属研究機関名 : 慶應義塾大学

部局名 : 医学部

職名 : 専任講師

研究者番号 (8 桁) : 90286534

(2)研究分担者

研究分担者氏名 : 升田 博隆

ローマ字氏名 : (MASUDA, Hiroataka)

所属研究機関名 : 慶應義塾大学

部局名 : 医学部

職名 : 専任講師

研究者番号 (8 桁) : 80317198

(3)研究分担者

研究分担者氏名 : 小野 政徳

ローマ字氏名 : (ONO, Masanori)

所属研究機関名 : 慶應義塾大学

部局名 : 医学部

職名 : 共同研究員

研究者番号 (8 桁) : 70348712

(2016 年度まで研究分担者)

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 高尾 知佳

ローマ字氏名 : (TAKAO, Tomoka)

研究協力者氏名 : 宮崎 薫

ローマ字氏名 : (MIYAZAKI, Kaoru)

研究協力者氏名 : 三木 史恵

ローマ字氏名 : (MIKI, Fumie)

研究協力者氏名 : 吉政 佑之

ローマ字氏名 : (YOSHIMASA, Yushi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。