

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11108

研究課題名(和文)新規子宮内膜症モデルの作成と内膜症の発症および進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) The establishment of a novel endometriosis model and the understanding of the developmental mechanism of endometriosis.

研究代表者

升田 博隆 (MASUDA, Hirotaka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80317198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腹腔内投与された磁気ビーズ付着細胞を磁石で集積し、その細胞を非侵襲的かつ定量的な観察することが長期間可能であり、将来的に子宮内膜症腹膜病変モデルに応用が可能と考えられた。

正所性子宮内膜上皮細胞はEMTを起こす一方で、子宮内膜症病変の上皮細胞はEMTを起こしており、子宮内膜症の発症や進展にEMTが深く関わっていると考えられた。また、ZEB1は子宮内膜症病変でのみ発現しており、浸潤性の高い病変で発現が強かった。EMT阻害薬により子宮内膜上皮細胞の接着と運動が阻害されたことは、子宮内膜症の発症と進展を抑制できる可能性を示唆しており、EMT阻害薬は新規子宮内膜症治療薬となり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症は不妊症に限らず、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、その経済的損失は患者・週あたり456米ドル(Nnoaham et.al, FertilSteril, 2011)と算出されている。日本においても、年間約3800億円の経済的損失(平成12年度厚生科学研究報告書)があると計算されている。さらには、上皮性卵巣癌や腹膜癌の前癌病変とも考えられ、社会的にもインパクトの大きい疾患である。よって、子宮内膜症の解明や治療は、大きな社会的貢献につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed a non-invasive and real-time assessment system using in vivo bioluminescent imaging to quantitate human endometrium-derived cells transplanted in the murine peritoneal cavity, which demonstrate its possibility as a peritoneal endometriosis model. Human eutopic endometrial cells occurred EMT via EMT induction, while endometriotic epithelia showed a variety of EMT status according to a type of endometriosis. Therefore, EMT was thought to be involved in the establishment and the development of endometriosis. ZEB1 was likely to be expressed in endometriotic epithelia of invasive endometriosis, but not in eutopic endometrial epithelia. An EMT inhibitor could suppress adhesive capacity and motility of endometrial epithelial cells, indicating that the inhibitor could prevent the establishment and development of endometriosis. An EMT inhibitor can be a novel drug for endometriosis.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：子宮内膜症 磁気ビーズ モデルマウス イメージングシステム Bioluminescence imaging 上皮間葉転換(EMT)

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症は月経周期を重ねることで、発症し進展する内分泌依存的疾患であり、外科的治療、内科的治療ともに治療後は月経がある限り再発する。生殖年齢で発症・増悪し不妊症も併発するが、主病巣が生殖器官であるため手術療法でも切除範囲は限定せざるをえず、既存の薬物療法は排卵を止める内分泌療法であり、子宮内膜症の存在自体が妊孕性を低下させるにもかかわらず、挙児希望のある子宮内膜症患者に対して満足できる治療法が存在しないというジレンマが生ずる。不妊症に限らず、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、その経済的損失は患者・週あたり456米ドル(Nnoaham et.al. FertilSteril. 2011)と算出される。日本でも年間約3800億円の経済的損失(平成12年度厚生科学研究報告書)があるとされている。さらには、上皮性卵巣癌や腹膜癌の前癌病変とも考えられ、社会的にもインパクトの大きい疾患である。

### 2. 研究の目的

本研究では、子宮内膜症に対する非内分泌的な新規治療法の開発することで、既存の治療法が持つジレンマを解消することを最終目標とした。そこで、我々がこれまでに蓄積してきた知見やノウハウを基盤とし、新しい子宮内膜症モデルマウスの開発と、子宮内膜症の発症・進展の病態解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) **平成28年度施行実験** 子宮内膜症のさまざまな病態の中で、最も発症率が高いと考えられる腹膜病変について、非侵襲的モニタリングができるようなin vivoモデルが存在しないことは、子宮内膜症研究を行うにあたり大きなハンデキャップとなっている。そこで、子宮内膜症腹膜病変モデルの作成を目標とした。

レンチウイルスによる遺伝子導入にて、非機能性神経成長因子受容体(NGFR)ルシフェラーゼ(CBR)、緑色蛍光蛋白質(EGFP)を同時に発現するヒト子宮内膜腺細胞株を作成し、フローサイトメトリーを用いてEGFPとNGFRの発現解析およびEGFPを発現する細胞の分取を行った。分取した細胞を培養し増殖させ、その細胞に対して抗NGFR磁気ビーズによる分離を行い、分離した細胞におけるCBRとEGFPの発現を確認した。また、磁気ビーズ付着細胞を培養し、培養皿の下に磁石を固定し細胞の集積を試みた。その培養皿は、生物発光イメージング(Bioluminescence imaging, BLI)を用いて細胞の集積を可視化した。次に、磁気ビーズ付着細胞を重度免疫不全マウスの腹腔内に移植し(磁気ビーズ純化群)、同時に腹壁皮下に小型強力磁石を挿入して腹腔内に移植された細胞の集積を試みた。磁石は2日後に除去した。腹壁への磁石挿入のない群、遺伝子導入や磁気ビーズの付着がない細胞を移植した群をコントロール群とした。磁気ビーズ純化群ではヒト子宮内膜間質細胞株を同時投与した群も作成した。各群を体内発光イメージング(In vivo BLI)にて経時的にモニタリングした。

(2) **平成29年度施行実験** 子宮内膜症は良性疾患ながら癌に特徴的な浸潤や転移を起こすことから、その過程には癌と同様に上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal transition, EMT)の関与が考えられる。しかし、子宮内膜症に特徴的なEMTマーカーの報告はなく、子宮内膜症の各病態におけるEMTの評価の報告もない。そこで、正所性子宮内膜および子宮内膜症の各病態における詳細なEMTの評価を行い、子宮内膜症とEMTの関係性の解明を目標とした。

同意を得た子宮内膜症患者の卵巣子宮内膜症性嚢胞、子宮内膜症深部病変、子宮内膜症腹膜病変、子宮腺筋症、正所性子宮内膜および非子宮内膜症女性の正所性子宮内膜を検体とした。非子宮内膜症群の正所性子宮内膜上皮細胞を分離・培養し、EMT促進剤であるTNFとTGFを用いてEMTの誘導を行い、EMT誘導前後での細胞形態の変化とタンパク発現の変化をWestern blotにより比較した。また、全検体でのEカドヘリン(Ecad)、Nカドヘリン(Ncad)、ビメンチン(Vim)、EMT関連転写因子(Snail、ZEB1)に対する免疫組織化学染色の結果を染色範囲と染色強度をもとにスコア化し比較解析した。また、子宮内膜症患者の術前血清CA125値をZEB1陽性群と陰性群で比較した。

(3) **平成30年度施行実験** 昨年度のEMTに関する結果をもとに、本年度は正所性子宮内膜の上皮がEMTを起こすか否かを再評価し、正所性子宮内膜が子宮内膜症病変成立に貢献し得るかどうかの検討すること、そして、EMT阻害薬によって正所性子宮内膜腺上皮細胞のEMTを抑制することができるかを評価し、EMT阻害薬の新規子宮内膜症治療薬としての可能性を検討することを目標とした。

同意を得た上で、非子宮内膜症患者の手術検体から正所性子宮内膜を採取し上皮細胞を分離、培養した。子宮内膜上皮不死化細胞を培養し、TNFとTGFを添加した群と無処置群を作成し、それぞれの接着能を比較する細胞接着能試験を行った。EMT阻害薬の持つ接着能や移動能の抑制効果を評価するために、子宮内膜上皮不死化細胞を用いた細胞接着能阻害試験および、正所性子宮内膜上皮細胞を用いたWound healing assay(WHA)とTransmembrane migration assay(TMA)を行った。

### 4. 研究成果

(1) **平成28年度施行実験** フローサイトメトリー解析では、遺伝子導入を試みた多くの細胞でEGFPとNGFRが同時に発現していた。また、磁気ビーズにより分取し増殖されたNGFR

発現細胞は CBR と EGFP をともに発現し遺伝子導入に成功していた。培養系では、磁気ビーズ付着細胞は磁石により集積可能であり、In vitro BLI で可視化された。磁気ビーズ付着細胞の腹腔内移植実験では、磁気ビーズを使用しないコントロール群においては移植細胞の生着部位が固定せず経時的な定量化は困難であったが、磁気ビーズ純化群に磁石を挿入したマウスでは磁石挿入部に一致して細胞が集積しており、in vivo BLI による非侵襲的経時的な定量的評価が可能であった。また、ヒト子宮内膜間質細胞株を同時に投与した群では、移植 7 ヶ月後まで移植細胞の in vivo BLI による評価が可能であった。

以上の結果より、この in vivo 実験系では、体外から非侵襲的に腹腔内に移植された細胞の挙動を長期に渡り定量的に観察可能であると考えられた。今後は、腹腔内の再構築組織が子宮内膜症腹膜病変を模倣するような細胞を選択あるいは作成することで、子宮内膜症腹膜病変モデルの確立を目指したい。

(2) **平成 29 年度施行実験** EMT 誘導実験では、EMT の際に特徴的なタンパク発現の変化であるカドヘリンスイッチ現象を認めた。免疫染色のスコア化の結果としては、間葉系マーカーである Ncad、Vim、Snail、ZEB1、それぞれの発現において病態間でさまざまな有意差を認めた。特記すべき点として、ZEB1 は子宮内膜症の有無を問わず子宮内膜上皮では発現せず子宮内膜症病変の上皮で発現し、同一患者内でも浸潤性が強い病変で強く発現していた。また、Ncad と Snail の病態間発現パターンが類似する点、Vim の発現は子宮内膜症性嚢胞で最も低く、非子宮内膜症群に比べ子宮内膜症群の子宮内膜で有意に高い点、Ecad は病態間で発現の有意差はないが、浸潤性の高い病変では飛び石状の発現を認める点が特徴的であった。ZEB1 陽性群の血清 CA125 値は ZEB1 陰性群に比べ有意に高かった。総じて、浸潤性の高いと考えられる病態で間葉系マーカーのスコア合計が高く、EMT の強度を反映していると考えられた。

以上より、子宮内膜上皮細胞は EMT を起こし得ることが明らかとなった。EMT マーカーの中で唯一 ZEB1 だけが子宮内膜症病変に特徴的なマーカーであった。また、各病態での EMT の状態が異なることが初めて明らかとなり、各病態における構成細胞の性質が異なり、発症や進展の過程も異なる可能性が示唆された。

(3) **平成 30 年度施行実験** 細胞接着能試験では、EMT の誘導により子宮内膜上皮不死化細胞の接着能が有意に上昇した。このことは、腺上皮細胞において EMT が起こることの裏付けであり、平成 29 年度に行った EMT 誘導実験の結果とともに、正所性子宮内膜上皮細胞が子宮内膜症病変の確立に貢献し得ることを明らかとした。また、細胞接着能阻害試験では、EMT 阻害薬によって EMT 促進剤により上昇した接着能が低下し、接着能の抑制効果が確認された。また WHA と TMA では、EMT 阻害薬により子宮内膜上皮細胞の移動能が低下し、運動能の抑制効果も証明された。

以上のように、EMT 阻害薬が子宮内膜上皮細胞の接着と運動を阻害することは、子宮内膜症の発症と進展の各ステップを抑制できる可能性を示唆しており、EMT 阻害薬は新規子宮内膜症治療薬となり得ると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 10 件)

Miki F, Maruyama T, Miyazaki K, Takao T, Yoshimasa Y, Katakura S, Hihara H, Uchida S, Masuda H, Uchida H, Nagai T, Shibata S, Tanaka M: 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.

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

Nguyen HPT, Xiao L, Deane JA, Tan KS, Cousins FL, Masuda H, Sprung CN, Rosamilia A, Gargett CE: N-cadherin identifies human endometrial epithelial progenitor cells by in vitro stem cell assays. Hum Reprod. 2017; 32(11): 2254-2268. 査読有  
doi: 10.1093/humrep/dex289.

Furuya M, Masuda H, Hara K, Uchida H, Sato K, Sato S, Asada H, Maruyama T, Yoshimura Y, Katabuchi H, Tanaka M, Saya H: 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, Kagami M, Miki F, Hihara H, Katakura S, Yoshimasa Y, Masuda H, Uchida H, Tanaka M: 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  
Masuda H, Endo T, Yoshimasa Y, Uchida H, Nakabayashi A, Maruyama T, Tanaka M: A case of hysteroscopic resection of cervical pregnancy after successful treatment with systematic methotrexate. J Obstet Gynaecol. 2016; 36(7): 865-866. 査読有  
doi:10.1080/01443615.2016.1174837  
Uchida H, Maruyama T, Masuda H, Uchida S, Miki F, Hihara H, Katakura S, Yoshimasa Y, Tanaka M: 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 26 件)

Tetsuo Maruyama, Satomi Katakura, Tomoka Takao, Toru Arase, Yushi Yoshimasa, Shoko Tomisato, Sayaka Uchida, Hirotaka Masuda, Hiroshi Uchida, Mamoru Tanaka: P2RY is involved in the migration and invasion of human extravillous trophoblast. Society for Reproductive Investigation 66th Annual Scientific Meeting (SRI2019). 2019 年.  
升田博隆, 古谷正敬, 丸山哲夫, 高尾知佳, 内田 浩, 内田明花, 吉政佑之 . 片倉慧美, 吉村泰典, 片淵秀隆, 田中 守: 子宮内膜幹細胞と上皮間葉転換をターゲットとした非内分泌的な子宮内膜症の新規治療 . 第 23 回日本生殖内分泌学会. 2018 年.  
Tetsuo Maruyama, Tomoka Takao, Hirotaka Masuda, Fumie Miki, Sayaka Uchida, Hiroshi Uchida, Mamoru Tanaka: 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.  
Yushi Abe, Hirotaka Masuda, Marie Fukutake, Toshimitsu Otani, Yu Sato, Mamoru Tanaka: A potential therapy for fetal myelomeningocele by human amniotic fluid stem cells. International Society for Stem Cell Research 2018 annual meeting (ISSCR2018). 2018 年.  
[International Session Workshop] Hirotaka Masuda, Masataka Furuya, Tetsuo Maruyama, Fumie Miki, Satomi Katakura, Yushi Yoshimasa, Sayaka Uchida, Hiroshi Uchida, Tomoka Takao, Hidetaka Katabuchi, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki: Anovel approach to treat endometriosis via targeting epithelial-mesenchymal transition. 第 70 回日本産科婦人科学会. 2018 年.  
[招請講演] Hirotaka Masuda: Endometrial stem and progenitor cells in endometriosis. The 8th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction. 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.  
丸山哲夫: 子宮内膜症の謎に迫る ~ 病因から治療戦略へ ~ . 第 10 回山口県プロゲスチン療法研究会. 2017 年  
升田博隆, 古谷正敬, 丸山哲夫, 内田 浩, 内田明花, 吉村泰典, 佐谷秀行, 片淵秀隆, 田中 守: 子宮内膜症の各病態における上皮間葉転換 (EMT) 状態の解析と EMT 阻害薬の新規内膜症治療薬としての検討 . 第 22 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2017 年.  
Hirotaka Masuda, Masataka Furuya, Tetsuo Maruyama, Hironori Asada, Hidetaka Katabuchi, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka: Differential epithelial-mesenchymal transition status between types of endometriosis and adenomyosis. 33rd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE2017). 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.  
Hirotaka Masuda, Masataka Fuyuya, Tetsuo Maruyama, Hironori Asada, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka: Differential status of epithelial-mesenchymal transition in each endometriotic lesion: ZEB1 as a potential indicator of endometriotic invasiveness. 13th World Congress on Endometriosis (WCE2017). 2017 年.  
Hirotaka Masuda, Masataka Furuya, Hironori Asada, Tetsuo Maruyama, Hiroshi Uchida, Sayaka Uchida, Yasunori Yoshimura, Hidetaka Katabuchi, Hideyuki Saya, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki: Differential status of epithelial-mesenchymal transition in endometriosis and adenomyosis: ZEB1 as a potential indicator of endometriotic invasiveness. 第 69 回日本産科婦人科学会 International Session. 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.

吉政佑之, 丸山哲夫, 宮崎 薫, 高尾知佳, 片倉慧美, 日原華子, 富里祥子, 内田明花, 内田 浩, 升田博隆, 田中 守: ヒト子宮細胞を用いた子宮腺筋症モデル構築の試み. 第38回日本エンドメトリオーシス学会. 2017年.

[招請シンポジウム] 升田博隆, 丸山哲夫, 田中 守: 子宮内膜症発症における幹細胞学仮説. 第38回日本エンドメトリオーシス学会. 2017年.

升田博隆, 古谷正敬, 丸山哲夫, 内田 浩, 吉村泰典, 佐谷秀行, 片淵秀隆, 田中 守: 子宮内膜症病変における上皮間葉転換の証明. 第21回日本生殖内分泌学会. 2017年.

升田博隆, 丸山哲夫, 小田英之, 内田 浩, 三木史恵, 日原華子, 吉政佑之, 片倉慧美, 田中 守, 青木大輔: 磁性体を用いた内膜症腹膜病変モデルと非侵略的リアルタイム定量的解析システムの開発. 第68回 Japan Endometriosis Form. 2016年.

三木史恵, 丸山哲夫, 宮崎 薫, 升田博隆, 片倉慧美, 吉政佑之, 日原華子, 内田明花, 内田 浩, 田中 守: 脱細胞化技術における再生子宮の構造と妊孕能を規定する因子の検討. 第61回日本生殖医学会. 2016年.

[招請講演] Hirotaka Masuda: Endometrial stem/progenitor cells and endometriosis. 5th Asian Conference on Endometriosis (ACE2016). 2016年.

- ⑲ [世界体外受精会議記念賞(基礎)] 三木史恵, 丸山哲夫, 宮崎 薫, 升田博隆, 片倉慧美, 吉政佑之, 日原華子, 内田明花, 内田 浩, 田中 守: 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.
- ⑳ 日原華子, 佐藤健二, 内田明花, 中林 章, 升田博隆, 丸山哲夫, 田中 守: 卵管結紮術後の腹腔鏡下卵管再疎通術における工夫. 第56回日本産科婦人科内視鏡学会. 2016年.
- ㉑ Fumie Miki, Kaoru Miyazaki, Naoko Hida, Hirotaka Masuda, Hanako Hihara, Mamoru Tanaka, Hiroshi Uchida, Tetsuo Maruyama: 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.
- ㉒ 升田博隆, 丸山哲夫, 小田英之, 内田 浩, 三木史恵, 日原華子, 吉政佑之, 片倉慧美, 田中 守, 青木大輔: 磁性体を用いた内膜症腹膜病変モデルと非侵略的リアルタイム定量的解析システムの開発. 第68回日本産科婦人科学会. 2016年.
- ㉓ 三木史恵, 丸山哲夫, 宮崎 薫, 升田博隆, 片倉慧美, 吉政佑之, 日原華子, 内田 浩, 田中 守, 青木大輔: 脱細胞化骨格の位相が再生子宮の組織極性を規定する. 2016年.
- ㉔ 三木史恵, 丸山哲夫, 宮崎 薫, 日原華子, 片倉慧美, 吉政佑之, 升田博隆, 内田 浩, 田中 守: 脱細胞化子宮骨格により再生された子宮における組織極性とエストロゲン受容体の発現解析. 第89回日本内分泌学会. 2016年.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 丸山 哲夫  
ローマ字氏名: (MARUYAMA, Tetsuo)  
所属研究機関名: 慶應義塾大学  
部局名: 医学部  
職名: 准教授  
研究者番号(8桁): 10209702

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: 講師  
研究者番号(8桁): 90286534

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。