

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15700

研究課題名(和文)再生工学技術を用いた子宮再生の新基盤構築

研究課題名(英文)Regeneration of mouse uterus using decellularized uterine matrix transplantation

研究代表者

大須賀 穰(Osuga, Yutaka)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80260496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：脱細胞化した生体組織を足場として機能的組織を作成する新しい臓器再生法を用いて研究を行った。野生型マウスを用いて細胞外基質のみからなる子宮の脱細胞化担体(DUM)を作成し別の野生型マウス子宮に人工的欠損部に移植した。移植後1か月で子宮全層が完全再生され、正常産仔を産出できる機能的子宮であることが判明した。着床に必須の転写因子STAT3の子宮特異的欠損マウスをレシピエントとしてDUMを移植したところ、子宮上皮・間質・筋層いずれも再生が顕著に遅延し、子宮のSTAT3はDUM移植モデルにおける子宮再生において重要な因子であることが示された。脱細胞化技術は着床障害患者の新規治療戦略の基盤技術となりうる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish a new therapeutic strategy for implantation failure. We established a method of uterine regeneration through decellularized uterine matrix transplantation in mice. The decellularized uterine matrices obtained after SDS treatment were transplanted into the recipient mouse uteri with artificially induced defects. All the uterine layers were recovered at the sites of decellularized uterine matrix transplantation within a month. In the regenerated uterus, normal implantation and pregnancy maintenance were observed. The tissue regeneration processes were totally impaired in mice with uterine deletion of STAT3, a downstream signaling pathway of LIF, suggesting that STAT3 has a critical role in uterine regeneration as well as implantation. Thus, decellularized uterine matrix is a possible tool for regeneration of the functional uterus.

研究分野：産婦人科学

キーワード：子宮 脱細胞化 再生 STAT3 着床 細胞外基質 妊娠

1. 研究開始当初の背景

子宮は妊娠の場であり、その異常は不妊症だけでなく、早産・妊娠高血圧症候群などの周産期疾患の原因となる。先天奇形としての子宮欠損や悪性腫瘍などによる子宮摘出は永久不妊をきたす。子宮欠損に対して海外では、子宮の他家移植の試みがなされるようになってきているが、免疫拒絶や免疫抑制剤の使用の副作用などの問題があり、自家細胞・組織による子宮の再生が求められている。現在の再生医学の領域のなかで、子宮再生に関する研究は他臓器に比べて遅れており、子宮内膜や子宮筋の幹細胞の同定さえなされていない。幹細胞や前駆細胞からの子宮細胞の分化機序は全く不明であり、子宮の再生をめざした基礎研究を推進する必要性に迫られている。これまでに本研究者らは脱細胞化・再細胞化という新規の組織再生の技術を用いて、ラット子宮の再生を行った。生殖医学においてこのような再生医療工学的なアプローチはこれまでほとんど報告がない。この技術の特徴として、脱細胞化組織が SDS や高静水圧を用いて生体組織から細胞を除去し細胞外基質のみにする(脱細胞化)ことで得られ、脱細胞化により極めて低い免疫拒絶が得られる。さらに、脱細胞化した生体組織を足場として臓器由来細胞を導入(再細胞化)し機能的組織を作成する臓器再生法が世界的に注目されている。本研究者らはこの技術に着目し、ラット子宮から脱細胞化子宮を作成し、その一部を別の個体に移植することで、子宮内膜細胞、血管細胞、子宮平滑筋細胞などから構成される階層構造を有する再細胞化した子宮組織を作製した(Santoso EG, et al. PLoS One 2014)。

2. 研究の目的

本研究では、この脱細胞化・再細胞化モデルをさらに発展させ、マウス組織および細胞を用いて in vitro での脱細胞化・再細胞化技術を開発すると同時に、脱細胞化・再細胞化によって再生したマウス子宮を、着床障害マウスモデル(遺伝子改変マウスのうち、子宮の異常をきたし着床障害にいたるもの)に移植し、卵巣ホルモン反応性および妊娠という2つの評価基準で子宮の機能回復を評価し、脱細胞化担体を用いた子宮再生の基盤技術の確立を目指すこととした。また、この脱細胞化・再細胞化モデルを用いて、脱細胞化組織を移植した部分の局所における再生のメカニズムを、遺伝子改変マウスを用いた解析で検討した。

3. 研究の方法

動物実験は東京大学医学部・医学系研究科動物実験委員会の承認のもとに行った。界面活性剤 SDS でマウス子宮を脱細胞化し、細胞外基質のみからなる子宮の脱細胞化担体(DUM)を作成した。マウス子宮に人工的欠損部を作成し、同部位にDUMを移植して、

移植後のDUM内の組織再生や妊孕能を評価した。LIFのシグナル伝達因子であるSTAT3は着床に必須であることが知られているが、本研究では子宮特異的なSTAT3欠損マウスを用いて野生型マウスから得たDUMを移植し、移植後のDUM内の組織再生を評価した。

4. 研究成果

野生型マウス(ICR)を用いて、細胞外基質のみからなる子宮の脱細胞化担体(DUM)を作成し、別の野生型マウス(ICR)子宮に人工的欠損部を作成し、同部位にDUMを移植して、DUM内の組織再生をヘマトキシリン・エオジン染色で評価したところ、移植後1か月で子宮全層が再生された。また、この再生した子宮において、胚対位の際の着床能の指標である着床直前の子宮の細胞増殖のダイナミックな変化が認められ、着床期の各過程に重要な子宮因子であるMSX1、LIF、HIF2 α 、COX2の発現は正常に発現していた。妊娠19日目に帝王切開を行ったところ正常な産子が得られることが判明した。LIFの下流のシグナル伝達因子で着床に必須の転写因子STAT3の子宮再生過程における意義を、子宮のSTAT3欠損マウス(Stat3-loxP/Pgr-Cre)をレシピエントとして野生型マウスから作成したDUMを移植して検証したところ、子宮内膜上皮・間質および子宮筋層のいずれの層においても、子宮再生が顕著に遅延していることが判明した。このことから、子宮のSTAT3はDUM移植モデルにおける子宮再生において重要な因子であることが示され、着床調節以外の子宮のSTAT3の機能が明らかとなった。

本研究により、脱細胞化技術は子宮機能再生による着床障害患者の新規治療戦略の基盤となりうると考えられた。今後の課題として、加圧式循環培養装置を用いた子宮で作成した脱細胞担体へのin vitroでの細胞導入による組織再生や、人工担体を用いた組織再生が挙げられ、技術発展のための更なる基礎研究が必要とされる。

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23件)

1. Matsumoto L, Hirota Y, Saito-Fujita T, Takeda N, Tanaka T, Hiraoka T, Akaeda S, Fujita H, Shimizu-Hirota R, Igaue S, Matsuo M, Haraguchi H, Saito-Kanatani M, Fujii T, Osuga Y. HIF2 α in the uterine stroma permits embryo invasion and luminal epithelium detachment. J Clin Invest. 査読有, 2018, in press.
2. Egashira M, Hirota Y, Shimizu-Hirota R, Saito-Fujita T, Haraguchi H, Matsumoto L, Matsuo M, Hiraoka T,

- Tanaka T, Akaeda S, Takehisa C, Saito-Kanatani M, Maeda K, Fujii T, Osuga Y. F4/80+ macrophages contribute to clearance of senescent cells in the mouse postpartum uterus. *Endocrinology*. 査読有, Vol.158, 2017, pp.2344-2353, DOI:10.1210/en.2016-1886
3. Hiraoka T, Hirota Y, Saito-Fujita T, Matsuo M, Egashira M, Matsumoto L, Haraguchi H, Dey SK, Furukawa KS, Fujii T, Osuga Y. STAT3 accelerates uterine epithelial regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. *JCI Insight*. 査読有, Vol.1, 2016, pp.e87591, DOI:10.1172/jci.insight.87591
 4. Deng W, Cha J, Yuan J, Haraguchi H, Bartos A, Leishman E, Viollet B, Bradshaw HB, Hirota Y, Dey SK. p53 coordinates decidual sestrin 2/AMPK/mTORC1 signaling to govern parturition timing. *J Clin Invest*. 査読有, Vol.126, 2016, pp.2941-2954, DOI:10.1172/JCI87715
 5. Aikawa S, Kano K, Inoue A, Wang J, Saigusa D, Nagamatsu T, Hirota Y, Fujii T, Tsuchiya S, Taketomi Y, Sugimoto Y, Murakami M, Arita M, Kurano M, Ikeda H, Yatomi Y, Chun J, Aoki J. Autotaxin-lysophosphatidic acid-LPA3 signaling at the embryo-epithelial boundary controls decidualization pathways. *EMBO J*. 査読有, Vol.36, 2017, pp.2344-2353, DOI:10.15252/embj.201696290
 6. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Azhary JM, Yoshino O, Izumi G, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. A Potential Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Progesterone Deficiency in Obese Women. *Endocrinology*. 査読有, Vol.158, 2017, pp.84-97, DOI:10.1210/en.2016-1511
 7. Izumi G, Koga K, Takamura M, Bo W, Nagai M, Miyashita M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Yoshino O, Fujii T, Osuga Y. OSCM for Hysterosalpingography Modulates Dendritic Cell and Regulatory T Cell Profiles in the Peritoneal Cavity: A Possible Mechanism by Which OSCM Enhances Fertility. *J Immunol*. 査読有, Vol.198, 2017, pp.4277-4284, DOI:10.4049/jimmunol.1600498
 8. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Nose E, Azhary JM, Koike H, Kunitomi C, Yoshino O, Izumi G, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Chang RJ, Shimasaki S, Fujii T, Osuga Y. Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis. *Sci Rep*. 査読有, Vol.7, 2017, pp.10824, DOI:10.1038/s41598-017-11252-7
 9. Akino N, Wada-Hiraike O, Terao H, Honjoh H, Isono W, Fu H, Hirano M, Miyamoto Y, Tanikawa M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Oda K, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. Activation of Nrf2 might reduce oxidative stress in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*. 査読有, 2017, pii: S0303-7207(17)30522-1, DOI:10.1016/j.mce.2017.10.002.
 10. Saito A, Hirata T, Koga K, Takamura M, Fukuda S, Neriishi K, Pastorfide G, Harada M, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Preoperative assessment of factors associated with difficulty in performing total laparoscopic hysterectomy. *J Obstet Gynaecol Res*. 査読有, Vol.43, 2017, pp.320-329, DOI:10.1111/jog.13198
 11. Shozu M, Ishikawa H, Horikawa R, Sakakibara H, Izumi SI, Ohba T, Hirota Y, Ogata T, Osuga Y, Kugu K. Nomenclature of primary amenorrhea: A proposal document of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology committee for the redefinition of primary amenorrhea. *J Obstet Gynaecol Res*. 査読有, Vol.43, 2017, pp. 1738-1742, DOI: 10.1111/jog.13442
 12. Makabe T, Koga K, Miyashita M, Takeuchi A, Sue F, Taguchi A, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Drospirenone reduces inflammatory cytokines, VEGF and NGF expression in human endometriotic stromal cells. *J Reprod Immunol*. 査読有, Vol.119, 2016, pp.44-48, DOI:10.1016/j.jri.2016.12.002.
 13. Takeuchi A, Koga K, Miyashita M, Makabe T, Sue F, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Fujii T, Osuga Y. Dienogest reduces proliferation, NGF expression and nerve fiber density in human adenomyosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 査読有, Vol.207, 2016, pp.157-161, DOI:10.1016/j.ejogrb.2016.10.053
 14. Haraguchi H, Koga K, Takamura M, Makabe T, Sue F, Miyashita M, Urata Y, Izumi G, Harada M, Hirata T, Hirota Y,

- Wada-Hiraike O, Oda K, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. Development of ovarian cancer after excision of endometrioma. *Fertil Steril*. 査読有, Vol.106, 2016, pp.1432-1437.e2, DOI:10.1016/j.fertnstert.2016.07.1077.
15. Izumi G, Koga K, Takamura M, Makabe T, Nagai M, Urata Y, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Fujii T, Osuga Y. *Fertil Steril*. 査読有, Vol.107, 2016, pp.167-173.e2, DOI:10.1016/j.fertnstert.2016.09.036
 16. Takamura M, Koga K, Izumi G, Urata Y, Nagai M, Hasegawa A, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Neutrophil depletion reduces endometriotic lesion formation in mice. *Am J Reprod Immunol*. 査読有, Vol.76, 2016, 193-199, DOI:10.1111/aji.12540.
 17. Bolnick AD, Bolnick JM, Kilburn BA, Stewart T, Oakes J, Rodriguez-Kovacs J, Kohan-Ghadr HR, Dai J, Diamond MP, Hirota Y, Drewlo S, Dey SK, Armant DR; NICHD National Cooperative Reproductive Medicine Network. Reduced homeobox protein MSX1 in human endometrial tissue is linked to infertility. *Hum Reprod*. 査読有, Vol.31, 2016, pp.2042-2050, DOI:10.1093/humrep/dew143.
 18. Miyashita M, Koga K, Izumi G, Sue F, Makabe T, Taguchi A, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Effects of 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 on Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 査読有, Vol.101, 2016, pp.2371-2379, DOI:10.1210/jc.2016-1515.
 19. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Yoshino O, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Hirata T, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. A potential role of endoplasmic reticulum stress in development of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 査読有, Vol.428, 2016, pp.161-169, DOI:10.1016/j.mce.2016.03.032.
 20. Taguchi A, Koga K, Kawana K, Makabe T, Sue F, Miyashita M, Yoshida M, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Resveratrol Enhances Apoptosis in Endometriotic Stromal Cells. *Am J Reprod Immunol*. Vol.75, 査読有, 2016, pp.486-492, DOI:10.1111/aji.12489.
 21. 大須賀穰, 渡邊学, 萩野篤司. ジエノゲストの子宮腺筋症患者における臨床評価-多施設共同ランダム化プラセボ対照二重盲検並行群間用量反応比較試験, 薬理と治療, 査読有, 198 巻, 2017, pp.4277-4284.
 22. Osuga Y, Fujimoto-Okabe H, Hagino A. Evaluation of the efficacy and safety of dienogest in the treatment of painful symptoms in patients with adenomyosis: a randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled study. *Fertil Steril*. 査読有, Vol.108, 2017, pp.673-678, DOI:10.1016/j.fertnstert.2017.07.021
 23. Osuga Y, Watanabe M, Hagino A. Long-term use of dienogest in the treatment of painful symptoms in adenomyosis. *J Obstet Gynaecol Res*. 査読有, Vol.43, 2017, pp.1441-1448, DOI: 10.1111/jog.13406
- 〔学会発表〕(計 23 件)
1. Osuga Y. Diet and Supplements for Endometriosis. 6th Asian Congress of Endometriosis (招待講演)(国際学会), 2017
 2. Osuga Y. Novel immune mechanism in the development of endometriosis. 19th World Congress on In Vitro Fertilization in conjunction with VI. Society of Reproductive Medicine and Surgery Congress. (招待講演)(国際学会), 2017
 3. Osuga Y. Novel strategies for ART in patients with endometriosis, adenomyosis, and uterine fibroid. The 11th Congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine (招待講演)(国際学会), 2017
 4. Osuga Y. Current problems in infertile women associated with endometriosis. The 11th Congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine (招待講演)(国際学会), 2017
 5. Osuga Y. Results from a phase 2 study of Relugolix, an oral gonadotropin-releasing hormone receptor antagonist, VS. placebo in women with endometriosis-associated pain. World Congress of Endometriosis (招待講演)(国際学会), 2017
 6. Hirota Y, Hiraoka T, Saito-Fujita T, Fujii T, Osuga Y. Activated IL6-STAT3 pathway in adenomyosis. World Congress of Endometriosis 2017 (招待講演)(国際学会), 2017
 7. Hirota Y, Saito-Fujita T, Matsumoto L, Haraguchi H, Matsuo M, Hiraoka T, Akaeda S, Tanaka T, Takeda N, Osuga Y, Fujii T. Uterine hypoxia inducible

- factor contributes to blastocyst invasion by clearance of luminal epithelium at the site of blastocyst attachment. Society for the Study of Reproduction, 50th Annual Meeting(国際学会), 2017
8. Hirota Y. Medical and Surgical Treatment in Adenomyosis. 18th APAGE Annual Congress 2017 (招待講演)(国際学会), 2017
 9. Hirota Y. STAT3: A Key Transcriptional Factor Not Only in Embryo Implantation but also in Endometrial Regeneration. Society for Reproductive Investigation, 65th Annual Scientific Meeting, Endometrium Satellite Meeting (招待講演)(国際学会), 2018
 10. Matsuo M, Hirota Y., Saito-Fujita T, Haraguchi H, Igaue S, Matsumoto L, Hiraoka T, Akaeda S, Tanaka T, Fujii T, Osuga Y. Levonorgestrel Inhibits Embryo Implantation by Downregulation of Uterine LIF Expression. Society for Reproductive Investigation, 65th Annual Scientific Meeting (国際学会), 2018
 11. 廣田泰. 生殖医学の最先端 不妊症治療におけるブレイクスルーを目指して 着床障害の分子機構の解明に基づく着床能の診断法と革新的治療技術の開発. 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 シンポジウム, 2017
 12. 廣田泰. 天然型プロゲステロンが着床に与える影響. 第 3 回最適な不妊治療を考える会 (招待講演), 2016
 13. 廣田泰. 黄体ホルモンによる子宮の胚受容能と着床の調節機構. 第 5 回プロゲステロゲン研究会 (招待講演), 2016
 14. 廣田泰. 子宮の線維化: 子宮腺筋症 ~ IL6 / STAT3 経路の関与 ~. 第 1 回 Frontier in basic and clinical research of fibrosis (招待講演), 2017
 15. 廣田泰. 平岡毅大, 大須賀穰. IL6-STAT3 経路の活性化が子宮腺筋症の進展に寄与する. 第 90 回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム (招待講演), 2017
 16. Hirota Y. IL6-STAT3 signaling in adenomyosis. Asian Conference of Endometriosis 2016 (招待講演)(国際学会), 2016
 17. Hirota Y. STAT3 promotes uterine regeneration in a mouse model of decellularized uterine matrix transplantation. Gordon Research Conference on Mammalian Reproduction (国際学会), 2016

{ 図書 } (計 1 件)

1. 廣田泰. 日本産婦人科医会編. 研修ノート No.99 流産のすべて. 総ページ数 81 頁, 2018.

{ その他 }

1. 2017 年度日本内分泌学会研究奨励賞受賞: 廣田泰
2. 2017 年度日本医師会医学研究奨励賞受賞: 廣田泰

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大須賀 穰 (OSUGA, Yutaka)
 東京大学・医学部附属病院・教授
 研究者番号: 80260496

(2) 研究分担者

廣田 泰 (HIROTA, Yasushi)
 東京大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号: 40598653