

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16022

研究課題名（和文）脱細胞移植マウスモデルを用いた子宮再生と応用

研究課題名（英文）Establishment of uterine bioengineering technology for reproductive medicine

研究代表者

平岡 毅大（Hiraoka, Takehiro）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20836762

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：子宮内膜の着床における分子制御機構について明らかにした。具体的には、子宮再生に必須のSTAT3が、着床直前の子宮内膜上皮と間質のいずれにおいても活性化されることが必要であり、かつそれぞれの機能が異なっているを解明した。この成果は、再生と着床の両面で上皮だけでなく間質のSTAT3が重要な役割を果たしていることを示している。さらに、子宮内膜の異所性構築を本態とし不妊症と関連する子宮腺筋症のマウスモデルを樹立した。この成果により、子宮内膜は子宮内膜以外の細胞外基質上でも再構築されることが明らかとなり、さらに遺伝子改変マウスを用いることで病変形成においてSTAT3が必須の役割を果たすことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊症の原因は多岐にわたるが、着床障害の機序や治療法については未解明な点が多い。本研究は、着床の過程における子宮内膜の分子制御機構を明らかにしたと同時に、不妊症の原因となる子宮腺筋症の病態解明につながるマウスモデルを樹立した。また、これら一連の現象に、子宮再生に必須のSTAT3が密接に関わっていることが明らかとなった。これらの研究成果は、着床障害の原因解明につながるだけでなく、機能的な子宮内膜を試験管内で再構築し生体内に移植する、といった画期的な不妊治療の樹立につながる可能性があり、日本の少子高齢化に対する解決策の一つとなり得る。

研究成果の概要（英文）：The applicant has determined a physiological regulatory mechanism of embryo implantation in the endometrium orchestrated by differential roles of epithelial and stromal STAT3. This result suggests that both epithelial and stromal STAT3 are indispensable for endometrial regeneration and embryo implantation. Moreover, the applicant has established a mouse model of adenomyosis associated with female infertility and represented by ectopic growth of the endometrium in the myometrium. This achievement demonstrated that the endometrium can be reconstructed not only in the normal endometrial extracellular matrix but also in an alternative scaffold. The analysis of genetically modified mouse lacking uterine STAT3 and human specimen showed that the etiology of adenomyosis is critically related to the overactivation of STAT3 in the uterus. These findings will provide a clue to the establishment of in vitro reconstitution of the functional endometrium for epoch-making reproductive treatment.

研究分野：生殖医学

キーワード：STAT3 着床 子宮腺筋症 子宮再生医療

1. 研究開始当初の背景

不妊症の原因は多岐にわたる。なかでも、流産手術や子宮筋腫などの子宮手術による子宮内膜の菲薄化・器質的欠損が原因となる不妊症に対しては、有効な治療法が存在しない。また、近年生殖補助医療の現場で着目されている PGT-A (Preimplantation genetic testing for aneuploidy; 着床前胚染色体異数性検査) によって、胚の染色体異数性が着床障害や流産と関連していることが示唆されているが、PGT-A により正倍数性胚を選択し移植しても妊娠に至らない難治性妊孕性障害症例が依然多数存在する。これらの症例については、子宮内膜の機能的障害が不妊の原因となっていると考えられているが、その機序は未解明のままである。

子宮欠損の症例に対しては、近年では同種他家子宮移植が試みられ生児獲得に至った例も報告されており注目を集めているが、拒絶反応のリスクは今後も高いハードルの一つと考えられる。したがって、子宮再生医療の確立は、これら子宮欠損や子宮内膜菲薄化、子宮機能低下といった難治性妊孕性障害に対し光明をもたらす可能性を秘めていると考えられる。自身の細胞を用いた子宮再生・作製、あるいは子宮治癒を補助・促進する技術が確立されればまさに画期的であり、これを実現させるための子宮再生研究は大いに発展が期待される分野と言える。

申請者は、生体内での子宮再生過程を観察するマウス脱細胞化組織移植モデルを樹立し、子宮再生過程に転写因子 STAT3 が必須であることを過去に見出している。また、この分子が着床においても不可欠な役割を果たしていることが既報により明らかになっていることから、STAT3 を中心とした子宮内膜の着床・再生についての知見を深め、解決されていない難治性妊孕性障害に対する画期的な治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、着床を可能とする子宮内膜の生理的な分子制御機構の解明、そして子宮内膜の再生過程における分子学的・細胞学的知見を集積し、最終的には機能的な子宮内膜の試験管内再構築技術を確立し、画期的な不妊治療技術を開発することを目標に掲げ遂行された。本研究成果によって、出生数が年々低下傾向にある日本の少子化の波を食い止めることができる可能性があり、学術的意義だけでなく、社会的意義も大きいと考えられる。

3. 研究の方法

着床は生体内における現象であり、試験管内で着床を観察可能な実験モデルは現時点で樹立されていないため、遺伝子改変マウスを用いた表現型解析と機能解析によって着床や子宮内膜再生の生理・病理を解明する。

転写因子 STAT3 は、着床直前に子宮内膜上皮と間質で活性化され、子宮全体で欠損させると着床障害を来することが知られていた。一方で、子宮内膜上皮と間質それぞれにおける STAT3 の機能についてはこれまで知られていなかった。そのため申請者は、子宮内膜上皮/間質特異的に STAT3 を欠損させた条件付きノックアウトマウス Stat3-eKO/-sKO を新規に作製し、STAT3 が子宮内膜に胚受容能を付与し着床を誘導する機序の解明を行った。

また、不妊症に関連し、子宮内膜の子宮筋層内発育を本態とする疾患である子宮腺筋症について、マウスモデルの新規樹立を行い、解析を行った。ヒトにおいては、子宮腺筋症は流産手術や帝王切開など、子宮に侵襲を加えた後に発生頻度が上昇することが知られており、その機序として、子宮内膜基底層と子宮筋層との境界のバリア機構が破綻することで子宮内膜細胞が侵入するものと推測されている。それを踏まえ申請者は、マウス子宮内膜・筋層に損傷を与えることで子宮腺筋症様病変を誘導するモデルを作製した。

4. 研究成果

STAT3 による着床制御機構の解明

Stat3-flox マウスと、子宮内膜上皮/間質特異的に Cre を発現する Ltf-/Amhr2-Cre マウスを交配させることで、子宮内膜上皮 STAT3 欠損マウス(以後 Stat3-eKO)、子宮内膜間質 STAT3 欠損マウス(以後 Stat3-sKO)を新規に作製した。それぞれの表現型を解析したところ、いずれのメスマウスも着床障害による不妊を呈した。(図1)

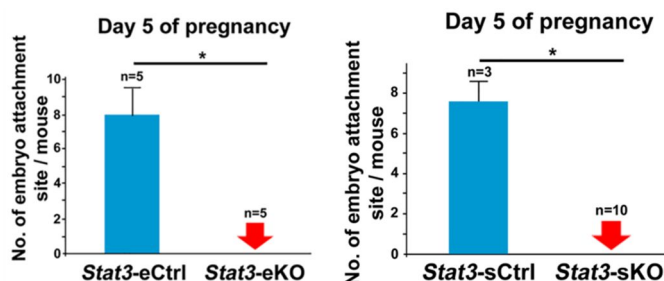


図1 子宮内膜上皮/間質STAT3欠損マウスは着床障害を呈する

着床障害の機序を検証するため、Stat3-eKO の着床直前の子宮を解析したところ、卵巣ホルモン(エストロゲン: E2, プロゲステロン: P4)による子宮内膜の制御は正常であったが、子宮内腔の形状が対照マウスと比較して鋸歯状に入り組んでいた。既報により、着床直前に子宮内腔の

形状が表面が平坦で細長いスリット状を呈することが着床成立の必要条件と考えられているため、Stat3-eK0の着床障害の原因として、STAT3を介した子宮内腔の形態制御機構に異常をきたしていることが推測された。また、着床に必須であることが知られているLIF(白血病阻止因子)の下流伝達因子としてSTAT3が重要であることが既報により示唆されているため、LIFによる着床制御経路の遮断も着床障害の一因と推測された。

また、Stat3-sK0の着床直前の子宮を検証したところ、E2とP4による子宮内膜の制御が破綻していることが判明した。具体的には、着床直前の子宮内膜において、正常ではP4が支配的に働くことでE2による子宮内膜上皮の増殖が抑制されるが、Stat3-sK0においてはE2の影響が支配的となり、上皮の増殖が亢進していた。定量PCRにおいても同様に、上皮におけるE2下流伝達因子の発現が有意に上昇していた。一方で、子宮内膜上皮・間質におけるE2受容体とP4受容体の発現はStat3-sK0において正常であった。これらの結果から、子宮内膜間質のSTAT3は子宮内膜上皮のE2応答性を調節し、間接的に着床を制御している可能性が示唆された。

さらに、着床障害を呈する子宮特異的STAT3欠損マウス(Stat3-uK0)の着床直前の子宮を解析したところ、Stat3-eK0とStat3-sK0の双方の特徴を兼ね備えていた。

以上の研究成果をまとめると、子宮内膜上皮と間質いずれのSTAT3も着床に必須の因子であり、一方で、それぞれの機能が決定的に異なることが明らかとなった(図2)。また、本研究により、子宮内膜間質が着床直前の上皮の性質を調節し、間接的に着床を制御していることが示唆されたが、この成果は、試験管内における機能的な子宮内膜の再構築においても重要な意味を持つ。なぜなら近年、子宮内膜「上皮」オルガノイドと胚の試験管内における相互作用についての報告がみられるものの、その後の胚の発生については生体内での発生を十分に模倣する段階には至っていない。その原因として、着床に必須の子宮内膜間質が欠如していることが一因と考えられる。そのため、将来的に機能的な子宮内膜の試験管内再構築を実現するためには、子宮内膜上皮だけでなく間質も含んだ組織の構築を念頭に置く必要があることが明らかとなった。また、子宮再生において必須の役割を果たすSTAT3が、着床の生理においても重要な役割を果たしていることが示された。

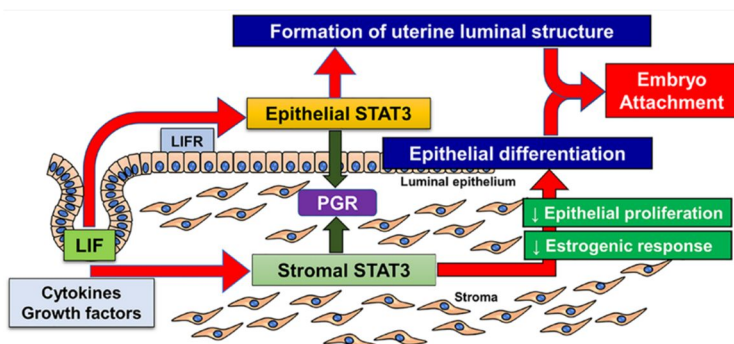


図2 上皮/間質のSTAT3を介した着床制御機構

子宮腺筋症のマウスモデルの樹立

子宮腺筋症とは、子宮内膜に類似した構造が子宮の筋層内に発生する良性疾患であり、耐え難い月経痛や慢性骨盤痛、過多月経、異常子宮出血を来すだけでなく、不妊症にも関連があることが示唆されている。流産手術や帝王切開などの子宮への外傷が要因となり、子宮内膜基底層が破綻することが発症の一因として知られている。そのため申請者は、マウス子宮の筋層と子宮内膜を針で貫くことで、子宮内膜の筋層内への侵入を誘導した。申請者の既報(Hiraoka T et al. JCI insight 2016)と同様に、子宮への損傷(Day 0)後、子宮内膜上皮は速やかに損傷部位へと移動を開始し、Day 1には筋層の創部内へと侵入した。そしてDay 28には、間質と腺管構造を伴う子宮腺筋症様病変が筋層内に認められた(図3)。

申請者の既報により、子宮内膜の再生にSTAT3が必須であることが明らかとなっているため、子宮内膜の異所性発育を本態とする子宮腺筋症の発生にもSTAT3が関わっていると仮説を立て、子宮特異的STAT3欠損マウス(Stat3-uK0)を用いて同様の処置を行ったところ、Day 28において、対照マウスと比較し有意な病変の減少を認めた(図4)。また、ヒト子宮腺筋症患者の子宮検体と非腺筋症患者を比較したところ、子宮腺筋症患者の子宮内膜においてSTAT3が月経周期に関わらず有意に活性化していることが明らかとなった。これらの結果より、子宮腺筋症の発生にSTAT3活性化の亢進が関わっている可能性が示唆された。

また、本研究結果により、子宮内膜は子宮内膜以外の細胞外器質上においても再構築可能であることが示された。これにより、申請者が試みようとしている試験管内での子宮内膜の再構築において、必ずしも子宮内膜の脱細胞化組織(界面活性剤により細胞成分を除去し、細胞外基質タンパク質のみを保存した担体)を用いる必要はないことが示唆された。

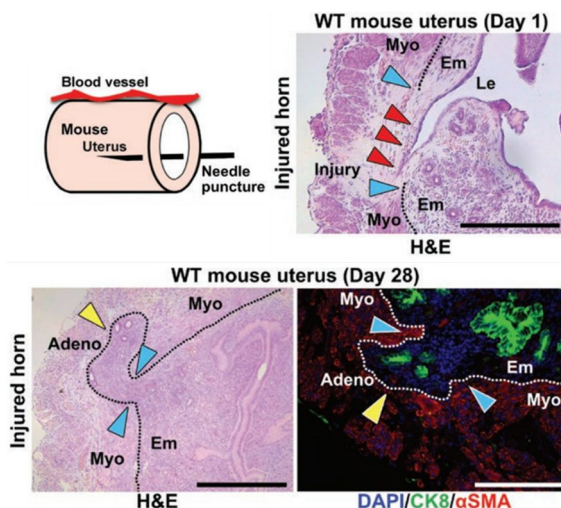


図3 マウス子宮腺筋症モデルによる病変の形成

今後、子宮内膜の再生培養システムの樹立を目指すにあたり、脱細胞化子宮組織以外の担体も含めて培養条件を検証することが必要と考えられた。

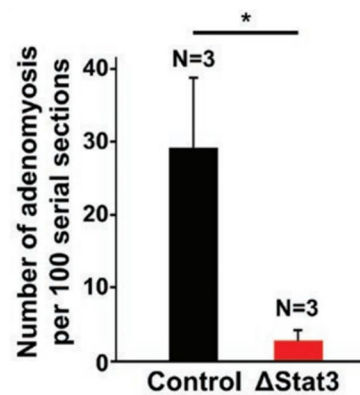


図4 STAT3の欠損による病変の減少

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiraoka Takehiro, Hirota Yasushi, Fukui Yamato, Gebril Mona, Kaku Tetsuaki, Aikawa Shizu, Hirata Tomoyuki, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Haraguchi Hirofumi, Saito-Kanatani Mayuko, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Yoshino Osamu, Fujii Tomoyuki, Osuga Yutaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Differential roles of uterine epithelial and stromal STAT3 coordinate uterine receptivity and embryo attachment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72640-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiraoka Takehiro, Hirota Yasushi, Aikawa Shizu, Iida Rei, Ishizawa Chihiro, Kaku Tetsuaki, Hirata Tomoyuki, Fukui Yamato, Akaeda Shun, Matsuo Mitsunori, Shimizu-Hirota Ryoko, Takeda Norihiko, Osuga Yutaka	4. 巻 163
2. 論文標題 Constant Activation of STAT3 Contributes to the Development of Adenomyosis in Females	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqac044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiraoka T, Hirota Y, Fukui Y, Kaku T, Hirata T, Akaeda S, Matsuo M, Iwase H, Yoshino O, Unno N, Fuii T, Osuga Y
2. 発表標題 Distinct functions of uterine epithelial and stromal STAT3 orchestrate uterine receptivity and embryo attachment
3. 学会等名 The 73rd Annual Congress of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平岡毅大、廣田泰、福井大和、賀来哲明、平田知之、岩瀬春子、吉野修、海野信也、藤井知行、大須賀穰
2. 発表標題 マウス子宮腺筋症モデルを用いた子宮腺筋症発生における転写因子STAT3の機能解析
3. 学会等名 第42回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------