

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791722

研究課題名(和文)フェノーム解析を用いた子宮内膜幹細胞マーカーの探索

研究課題名(英文)The search for the endometrial stem cell marker using the phenome analysis

研究代表者

小田 英之(Oda, Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：50445235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜幹細胞特性に重要であるとされるWnt7aの受容体およびside population細胞に発現するCD93について検討したが、いずれも幹細胞特性との関連は認められなかった。In vivoでの幹細胞特性の検討のために、マウス腹腔内移植モデルを作成した。その際に用いる細胞としては、ヒト内膜初代培養細胞ではなくその癌細胞株および不死化細胞がより適切であった。

研究成果の概要(英文)：In silico analysis suggested that Fzd5 and LRP6, which are the receptors for Wnt7a, might be one of the candidate markers for the endometrial stem cells. Both Fzd5- and LRP-positive cells, however, did not reconstruct the endometrium. We then investigated the CD93, which is preferentially expressed in side population cells, but we did not find an association between CD93 and stemness. We next attempted to develop a novel mouse model of endometrial implantation using a lentivirus system to introduce bioluminescent, fluorescent, and cell surface marker genes and to address the in vivo endometrial stem cell activity. Firstly we used human primary endometrial cells, but they showed a very low implantation rate. We, therefore, used a human endometrial cancer cell line and immortalized human endometrial cells and found that they both showed a relatively higher success rate.

研究分野：産婦人科、生殖内分泌、不妊医療、腹腔鏡、子宮内膜幹細胞

キーワード：フェノーム解析 子宮内膜幹細胞 幹細胞表面抗原マーカー 遺伝子導入 磁力 新規子宮内膜移植モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

近年造血幹細胞をはじめとして、各臓器においても組織幹細胞が同定されてきている。再生医療に応用することを考慮すると、組織幹細胞の選定には、細胞表面抗原をマーカーとして、特異的に選別されることが望まれる。これまでに子宮内膜幹細胞の報告として、side population 法によるもの (Kato et al. Hum Repeod, 2007, Tsuji et al. Fertil Steril, 2008) が in vitro での colony 形成や腺管形成に成功したとして報告されている。しかしながら、当該方法は細胞表面抗原マーカーによる選別ではないため、臨床応用には難しい面がある。

そのため、適切な幹細胞表面抗原マーカーの発見が早期に望まれる。その際に、マーカー発見の困難の一因として、幹細胞マーカーでの選別後に適切な niche で細胞培養を行わないと、幹細胞性の維持ができないことがあげられる。そのため、幹細胞の発見、同定においては、幹細胞表面抗原マーカーの探索と同時に適切な niche の探索も行われる必要がある。

2. 研究の目的

本研究においては、前述の幹細胞研究の難点に着目し、幹細胞表面抗原マーカーおよびその niche を同時に探索することを目的とした。近年注目されているオミックス解析に注目し、幹細胞表面抗原候補を選別することとした。

臓器において、その臓器の組織幹細胞機能が障害されると、当該臓器が年齢に比して早期に萎縮、機能障害を引き起こすことが予想される。

そこで、子宮における phenome 解析を行い、子宮内膜幹細胞マーカーの候補を選定することとした。その選定の際には、独自の点数化を行い、重み付けをして検討の優先順位づけを行った。そののちに、選定された幹細胞表面抗原候補を用いた細胞選別を行い、in vitro での培養ならびにマウスへの移植を行って、子宮内膜の再構築を認めるかを検討することとした。

3. 研究の方法

(1) phenome 解析

すでに IKMC (International Knockout Mouse Consortium) において、各遺伝子の knockout mouse および cell line での表現型は公表されている。そこで、IKMC ならびに既報の review 論文を用いて、knockout mouse の表現型から、子宮形成異常を呈する遺伝子を計 192 個抽出した。そののち、組織幹細胞およびその niche が障害された際に想定される表現型をもとに、組織学的、発生的、機能的に各遺伝子を点数化した (図)。その結果、Wnt7a が最も点数が高かった。また、Wnt において制御が報告されている CD44 が次点であった。これらのことから、子宮において

Wnt シグナルがその幹細胞性の維持に非常に重要であると推定され、その受容体を標的とすることとした。

Wnt シグナルにおいては、リガンドと受容体は 1 対 1 対応とは限らず、補受容体なども必要となるため、既報の論文から、in vitro および他臓器で Wnt7a の受容体足りえるものを選定した。その結果として、Fzd5 並びに LRP6 が選定された。

Knockout mouse の表現型

- 0点: 正常
- 1点: 層構造の乱れた組織構築
- 2点: 全体的な低形成 (構造異常を含む)
- 3点: 想定される幹細胞層の消失 (全体的な低形成、代償性の他層の増大を含む)
- +1点: ヒトでも同様の表現系
- 除外基準: 2次性変化、無形成、ウォルフ管形成異常、細胞表面抗原でない場合
- E2を介しての表現系の場合は、E2Rを含む

(2) ヒト子宮内膜の検討

既に当施設において承認されている臨床研究ののっとり、同意の得られた良性婦人科疾患患者より摘出された子宮の一部を使用した。摘出された子宮は、HE 染色ならびに免疫染色を行い、組織学的に検討を行った。

(3) 子宮内膜細胞の単離

さらに、摘出された子宮の一部を機械的、酵素的に単一細胞化を行った。得られた子宮内膜細胞は、フィルターを用いて子宮内膜腺上皮細胞および子宮内膜間質細胞に分離した。

(4) 子宮内膜再構築の評価

分離された子宮内膜細胞は in vitro にて培養を行った。培養後、各細胞表面抗原に対して flow cytometry 用抗体にて標識し、細胞分離を行った。細胞分離後、再度 in vitro で培養を行い、colony 形成の有無ならびに子宮内膜間質細胞、腺上皮細胞の細胞表面抗原の免疫染色ならびに腺管形成の有無を評価した。

また、培養した細胞の一部は、NOD. Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/Jic (以下 NOG マウス) 腎被膜下に移植を行い、子宮内膜再構築の有無を組織学的に評価した。

(5) マウス腹膜移植モデルの作成

Lifetechnology 社のレンチウイルスシステムを使用した。このレンチウイルスシステムは、GFP を指標に遺伝子導入の有無が判定できるようになっている。このシステムに in vivo imaging が可能となるように crick beetle luciferase (CBL) 遺伝子と、磁性体付着抗体に対応した細胞表面抗原を挿入した。このレンチウイルスを用いて、in vitro にて培養ヒト子宮内膜細胞に遺伝子導入を行い、GFP を指標に抗原が発現されたことを確認後、Milteney 社の MACS を用いて細胞選別を行った。その後、同細胞をマウス腹腔内に投与後、

磁性体をマウス腹部に留置して、細胞集積ならびに生着促進を試みた。

4. 研究成果

phenome解析において選出されたFzd5ならびにLRP6を用いて、flow cytometryを使用した細胞選別を行った。それら細胞をin vitroで培養を行ったが、腺上皮への分化は認めなかった。また、マウス腎被膜下へ移植実験を行ったが、子宮内膜再構築は認められなかった。

既に報告されているヒト子宮内膜幹細胞の選別法として、SP法があげられる。このSP法を用いた細胞ではCD93が発現されていることに注目し、同様の検討を行った。しかしながら、CD93を用いた検討においても、子宮内膜の再構築は認められなかった。

そこで、当研究室においてヒト子宮内膜細胞を用いたcDNA microarray結果と合わせて、再度細胞表面抗原マーカー候補を選出し、HEX遺伝子などの発現をRT-PCRにて検討したが、遺伝子発現は検体ごとのばらつきが大きく、幹細胞表面抗原とは考えられなかった。そのため、in vitroでのcolony形成assayでは、in vivoに準じたnicheの構築が難しいこと、マウス腎被膜下移植実験での困難さを考慮し、マウス腹膜への内膜移植モデルの作成を開始した。このモデルマウスは、子宮内膜症モデルマウスへの転用も可能であると考えられる。

マウス腹膜移植モデルの作成に当たっては、外科的移植では、炎症などの影響が不可避であるため、できる限りそのような影響がでないよう、磁力を用いて細胞を集積、生着させるものを開発した。

ヒト子宮内膜細胞を用いたモデルマウスにおいては、導入遺伝子の発現効率の低さ(およそ10~20%)ならびに発現量の低さから、安定的に移植モデルが作成できなかった。そのため、使用する細胞をヒト子宮内膜癌細胞ならびに不死化ヒト子宮内膜細胞を使用するようにしたところ、一定に生着を認めるようになった。

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 7 件)

- ① Uchida S, Uchida H, Maruyama T, Kajitani T, Oda H, Miyazaki K, Maki Kagami, Yoshimura Y: Molecular analysis of a mutated FSH receptor detected in a patient with spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. PLoS One. 査読有, Vol.8, 2013年, e75478. DOI:10.1371/journal.pone.0075478

- ② Kajitani T, Maruyama T, Asada H, Uchida H, Oda H, Nishikawa-Uchida S, Miyazaki K, Arase T, Ono M, Yoshimura Y: Possible involvement of nerve growth factor in dysmenorrhea and dyspareunia associated with endometriosis. Endocr J. 査読有, Vol.60, 2013年, 1155~64. DOI: 10.1507/endocrj.EJ13-0027
- ③ Miyazaki K, Maruyama T, Masuda H, Yamazaki A, Uchida S, Oda H, Uchida H, Yoshimura Y: Stem cell-like differentiation potentials of endometrial side population cells as revealed by a newly developed in vivo endometrial stem cell assay. PLoS ONE, 査読有, 7, 2012年, e50749. DOI: 10.1371/journal.pone.0050749
- ④ Uchida H, Maruyama T, Nishikawa-Uchida S, Oda H, Miyazaki K, Yamasaki A, Yoshimura Y: Studies using an in vitro model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. J Biol Chem. 査読有, 287, 2012年, 4441-4450. DOI: 10.1074/jbc.M111.286138
- ⑤ Kagami M, Maruyama T, Koizumi T, Miyazaki K, Nishikawa-Uchida S, Oda H, Uchida H, Fujisawa D, Ozawa N, Schmidt L, Yoshimura Y: Psychological adjustment and psychosocial stress among Japanese couples with a history of recurrent pregnancy loss. Hum Reprod, 査読有, 27, 2012年, 787-794. DOI: 10.1093/humrep/der441.

[学会発表] (計 8 件)

- ① **【基礎部門賞】** 小田英之: 希少部位子宮内膜症発生モデルマウスの開発の試み. 第35回日本エンドメトリオーシス学会, 2014年1月25日~26日、城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)
- ② 内田明花, 内田 浩, 丸山哲夫, 梶谷 宇, 小田英之, 宮崎 薫, 各務真紀, 吉村泰典: 自然発症 OHSS 患者に見いだされた変異 FSH 受容体の解析. 第18回日本生殖内分泌学会, 2013年12月7日、シェーンバッハ・サボー(東京都千代田区)
- ③ Kaoru Miyazaki, Tetsuo Maruyama, Hirotaka Masuda, Hideyuki Oda, Naoko Hida, Hiroshi Uchida, Yasunori Yoshimura: Novel decellularization and

recellularization techniques for reconstruction and regeneration of the uterus in rat. 29th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). 2013年7月7日～10日、London, United Kingdom.

- ④ **[25 SGI President's Presenter Awards]** Kaoru Miyazaki, Tetsuo Maruyama, Hirotaka Masuda, Akiko Yamasaki, Sayaka Uchida, **Hideyuki Oda**, Hiroshi Uchida, and Yasunori Yoshimura: Kaoru Miyazaki, Development of in vivo human endometrial stem cell assay, 60th Annual Meeting of Society for Gynecologic Investigation (SGI). 2013年3月20日～23日、Orlando, FL, USA.
- ⑤ 宮崎 薫, 丸山哲夫, 升田博隆, **小田英之**, 内田明花, 内田 浩, 吉村泰典: ヒト子宮内膜幹細胞の分化能を明らかにする in vivo 解析システムの開発、第34回日本エンドメトリオーシス学会、2013年1月18日～19日、栃木総合文化センター (栃木県宇都宮市)
- ⑥ **[平成24年度学術奨励賞]** 宮崎 薫, 丸山哲夫, 升田博隆, **小田英之**, 内田明花, 内田 浩, 吉村泰典: ヒト子宮内膜再構成システムを用いた in vivo 幹細胞アッセイの開発と内膜幹細胞の同定、第17回日本生殖内分泌学会、2012年12月8日、サピアタワー (東京都千代田区)
- ⑦ **[招請講演]** Tetsuo Maruyama, Masanori Ono, Takashi Kajitani, Hiroshi Uchida, **Hideyuki Oda**, Sayaka Uchida, Kaoru Miyazaki, Toru Arase, Takashi Nagashima, Hirotaka Masuda, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki, Yasunori Yoshimura: Isolation and characterization of human myometrial stem/progenitor cells: implication for pregnancy-induced myometrial remodeling. 63rd The Korean Society for Reproductive medicine Meeting (KSRM), 2012年12月1日, Seoul, Korea.
- ⑧ 宮崎 薫, 丸山哲夫, 升田博隆, **小田英之**, 内田明花, 内田 浩, 吉村泰典: ヒト子宮内膜幹細胞の in vivo 解析・同定システムの開発。第57回日本生殖医学会、2012年11月8日～9日、ブリックホール (長崎県長崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 英之 (ODA, Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 50445235