

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460255

研究課題名(和文) 雌性生殖器官原基の誘導因子の探索

研究課題名(英文) An analysis of fate determining factors for development of female reproductive tract

研究代表者

友岡 康弘 (Tomooka, Yasuhiro)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号：10197949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵管・子宮・膣上皮への誘導因子を同定することを目的としている。発生期と成体マウスの卵管・子宮・膣における遺伝子発現量を網羅的に比較し、発生期に発現が上昇している遺伝子を候補遺伝子とした。さらに、性質を維持したまま増殖可能な、発生期の卵管・子宮・膣間充織由来株細胞が作製された。性質が維持されているため、卵管上皮を誘導する細胞、膣上皮を誘導する細胞、それらを誘導しない細胞のみにすることが出来た。しかし、間充織に特異的に発現し、上皮の運命決定を誘導する因子の同定には至っていないが、その同定に必要な上皮と間充織細胞の共培養系を確立し、現在は子宮上皮と膣上皮の運命決定因子を同定中である

研究成果の概要(英文)：In this study, identification of fate determining factors for oviductal, uterine and vaginal epithelium were attempted. First, transcriptome analysis was performed among developmental and adult oviducts, uteri and vaginae, and upregulated genes in developmental oviducts, uteri or vaginae were identified as candidate genes of fate determining factors. Clonal cell lines with tissue- and developmental stage-specific phenotypes were established from developmental oviductal, uterine and vaginal mesenchyme. Furthermore, 3D co-culture system was also established using the cell line for identification of the factors. Thus, the fate determining factors secreted from mesenchyme and acting into epithelium will be identified in the culture system.

研究分野：発生工学

キーワード：卵管 子宮 膣 マイクロアレイ 運命決定 クローン性株細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 胎仔期において、上皮細胞と、それを覆う間質細胞からなるミュー管が形成され、次いで、ミュー管間質領域の運命が卵管、子宮、膣間質へと決定される。その後、新生仔期において、運命決定されたそれぞれの間質から分泌された因子によって、卵管、子宮、膣上皮の運命が決定される [1, 2]。しかし、卵管は絨毛上皮細胞が存在し、子宮は単層上皮、膣は多層上皮であるなど、起源は同一でも、その形態と機能は大きく異なる。

(2) 当研究室では、*p53*^{-/-}マウスのミュー管、卵管、子宮、膣を初代培養することにより、それらの上皮または間質細胞をそれらの時期組織特異的な性質を維持したまま株細胞化出来ることを発見した [3, 4]。その運命未決定なミュー管上皮株細胞と、運命決定期の卵管間質株細胞を気相-液相界面で培養することにより、卵管絨毛上皮細胞を誘導できる培養系を開発した [2]。さらに、その培養系を用いて、間質から分泌され、卵管絨毛上皮細胞への運命決定を誘導する因子を明らかにした [2]。また、膣上皮細胞への分化誘導因子はいくつか報告されている [5, 6]。しかしながら、卵管分泌上皮細胞、子宮上皮細胞、へ運命決定を誘導する間質由来分泌因子の報告はなく、膣上皮への運命決定の包括的なシグナルもわかっていなかった。

2. 研究の目的

(1) 当研究室で樹立された株細胞と、上皮間質細胞と同様の方法を用いて、共培養系を用いて、卵管分泌上皮細胞、子宮上皮細胞、膣上皮細胞への運命決定因子を探索できるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

(1) 発生期と成体マウスの卵管、子宮、膣における mRNA 量をマイクロアレイにより網羅的に比較し、発生期に mRNA 量が上昇している遺伝子を探索し候補遺伝子を発見する。

(2) 卵管間質、子宮間質、膣間質に発現特異性がある液性因子に着目してスクリーニングを行い、候補遺伝子を絞り込む。

(3) 各上皮への誘導能を有した間質細胞と、誘導能を持たない間質細胞をスクリーニングする。

(4) 各上皮への運命決定誘導候補遺伝子を、誘導能を持たない間質株細胞に強制発現させ、運命決定因子を同定する。

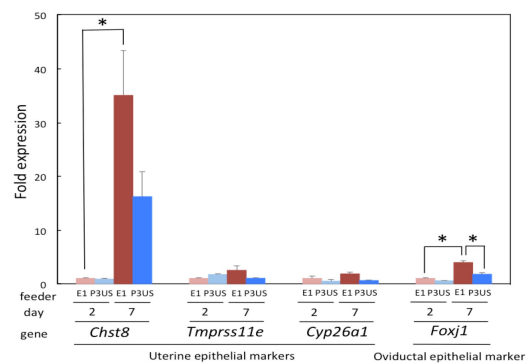
4. 研究成果

(1) 発生期と成体マウスの卵管、子宮、膣における mRNA 量をマイクロアレイにより網羅的に比較し、発生期に mRNA 量が上昇し

ている遺伝子を探索し候補遺伝子を発見することを旨とした。さらに、卵管間質、子宮間質、膣間質に発現特異性がある液性因子に着目してスクリーニングを行い、候補遺伝子を絞り込んだところ、卵管分泌上皮、膣上皮への運命決定因子の探索において、それぞれの発生期の間質で特異的に発現する候補遺伝子をいくつか発見された。一方で、子宮上皮への運命決定因子の探索においては、マイクロアレイで得られた発生期の子宮に特異的に発現している遺伝子が少なく、またその多くは運命決定に関与するとは考えられる液性因子ではなかった。

(2) 卵管分泌上皮の運命決定因子の探索において、候補遺伝子を強制発現された間質細胞と未分化な上皮株細胞との共培養系を改良し、その共培養系を利用することで、卵管分泌上皮の性質を表すマーカー遺伝子の発現を上昇させる、間質由来の因子である *Pdzd2*, *Gsc* を発見した。現在、この因子が卵管分泌上皮細胞への運命決定を不可逆的に誘導したかどうかを、マウスに移植することで調べている。

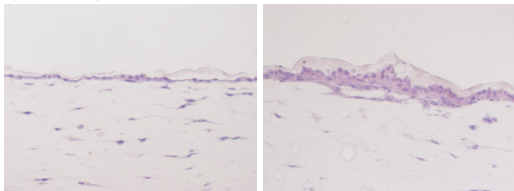
(3) 一方で、子宮、膣上皮への運命決定因子の探索においては、卵管の上皮と間質細胞で行われてきた共培養系が、運命決定の誘導に適していないことがわかった。そこで、子宮と膣の運命決定を誘導できる共培養系を、それぞれ確立した。子宮上皮への運命決定誘導を行う培養系は、間質細胞をグルタルアルデヒド固定したものをフィーダーとして用い、その上にコラーゲンコートを行って、運命未決定な上皮細胞を播種し、7日間培養することにより、分化上皮細胞のマーカーである *Chst8* の発現が誘導され、膣や卵管の上皮に特異的な遺伝子は発現しなかった (下図)。



膣上皮への運命決定誘導を行う培養系は、間質細胞をコラーゲンゲル内に混ぜて固め、その上に未分化な上皮細胞を播種し、気相-液相界面で3週間培養することにより、膣のみで形成される多層上皮を誘導可能となった。

(4) 膣上皮を誘導する間質細胞、それらを誘導しない間充細胞を有していたが、それらの株細胞だけでは十分に膣上皮の運命決定

を誘導出来ないことがわかり、腔間質株細胞においては再度クローニングを行った。これらの腔間質株細胞を用いて、上記腔上皮誘導培養法で未分化上皮細胞と共培養したところ、腔上皮を誘導する能力を持たない間質株細胞と(下左図)、腔上皮の運命決定を誘導する能力を有する間質株細胞を同定した。(下右図)



(5) 現在は子宮と腔の運命決定を誘導できる培養系を用いて、子宮上皮と腔上皮の運命決定因子を同定中である。また、子宮上皮の運命決定を誘導する際に、子宮上皮は未分化上皮から自発的に誘導される可能性が示唆されており、現在その可能性も踏まえて実験中である。

<引用文献>

1. Cunha GR. Stromal induction and specification of morphogenesis and cytodifferentiation of the epithelia of the Mullerian ducts and urogenital sinus during development of the uterus and vagina in mice. *J Exp Zool.* 1976, 196: 361-370.
2. Umezu T, Yamanouchi H, Iida Y, Miura M, Tomooka Y. Follistatin-like-1, a diffusible mesenchymal factor determines the fate of epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107: 4601-4606.
3. Umezu T, Hanazono M, Aizawa S, Tomooka Y. Characterization of newly established clonal oviductal cell lines and differential hormonal regulation of gene expression. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003, 39: 146-156.
4. Umezu T, Tomooka Y. An evidence of stromal cell populations functionally linked with epithelial cell populations in the mouse oviduct. *Zoolog Sci.* 2004, 21: 319-326.
5. Nakajima T, Hayashi S, Iguchi T, Sato T. The role of fibroblast growth factors on the differentiation of vaginal epithelium of neonatal mice. *Differentiation.* 2011, 82: 28-37.
6. Laronda MM, Unno K, Ishi K, Serna VA, Butler LM, Mills AA, Orvis GD, Behringer RR, Deng C, Sinha S, Kurita T. Diethylstilbestrol induces vaginal adenosis by disrupting SMAD/RUNX1-mediated cell fate

decision in the Müllerian duct epithelium. *Dev Biol.* 2013, 381: 5-16.

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 0件)

なし

現在投稿準備中

〔学会発表〕(計 6件)

中野翔太、中島忠章、友岡康弘、微小小胞を介した卵管上皮・間充織間相互作用の可能性、第 37 回日本分子生物学会、2014

飛田知央、中島忠章、友岡康弘、ミューラー管上皮細胞から子宮上皮細胞への運命決定因子の同定の試み、第 37 回日本分子生物学会、2014

高品里佳子、岡田淳雅、中島忠章、友岡康弘、腔上皮の多層化を誘導する間質由来因子の同定、日本動物学会第 85 回大会、2014

岡田淳雅、渡辺冴子、梅津知宏、友岡康弘、マウス卵管繊毛上皮細胞の発生運命を制御する分子メカニズムの解析、日本動物学会第 84 回大会、2013

飛田知央、岡田淳雅、友岡康弘、ミューラー管上皮細胞から子宮上皮細胞への運命決定因子の同定の試み、日本動物学会第 84 回大会、2013

中野翔太、岡田淳雅、野村彰吾、山本昌平、友岡康弘、微小小胞を介した上皮・間充織間相互作用の可能性、日本動物学会第 84 回大会、2013

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

友岡 康弘 (TOMOOKA, Yasuhiro)

東京理科大学・基礎工学部・生物工学科・

教授

研究者番号：10197949

(2)研究分担者

岡田 淳雅 (OKADA, Atsumasa)

東京理科大学・基礎工学部・生物工学科・
助教

研究者番号：00535809

(3)研究分担者

中島 忠章 (NAKAJIMA, Tadaaki)

東京理科大学・基礎工学部・生物工学科・
助教

研究者番号：40631213