

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861340

研究課題名(和文) iPS細胞および脱細胞化・再細胞化技術を用いた子宮再構築

研究課題名(英文) Reconstruction of the uterus through differentiation of induced pluripotent stem cells within decellularized uterine matrix

研究代表者

宮崎 薫 (MIYAZAKI, KAORU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90445370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラットiPS細胞を購入し、レンチウイルスベクターにてGFP遺伝子およびluciferase遺伝子を導入した。FACSにてGFP陽性細胞を分取し、GFP陽性ラットiPS細胞のクローニングに成功した。GFP陽性ラットiPS細胞を免疫不全マウスに皮下移植し、in vivo imaging systemを用いた細胞発光の追跡が可能であることを確認した。さらに、6週間後の奇形腫形成を確認した。ラットiPS細胞を、各分化段階に応じて培養液中の各種増殖因子の組成を変えながら培養した。リアルタイムPCRにて、ラットiPS細胞が中胚葉を経てミューラー管系統に分化していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rat iPS cells (riPSCs) were purchased and propagated. GFP gene and the luciferase gene were introduced in riPSCs with the lentiviral vector. GFP-positive riPSCs were cloned by single cell sorting of GFP-positive cells using FACS. GFP-positive riPSCs were transplanted into immunodeficient mice subcutaneously, and the cellular luminescence, which was generated by degradation of luciferin catalyzed by luciferase, and reflects the cell growth, was non-invasively tracked using in vivo imaging system. Teratoma formation was confirmed 6 weeks after the transplantation. RiPSCs were cultured in a medium supplemented with several growth factors for differentiation. Quantitative real-time PCR was performed to confirm the expression of the gene markers, and the results suggested that riPSCs underwent differentiation into Mullerian lineage via intermediate mesoderm.

研究分野：生殖医学

キーワード：生殖医学 組織再構築 脱細胞化 再細胞化

1. 研究開始当初の背景

子宮の構造不全として、ロキタンスキー症候群に代表される先天性子宮・腔欠損に加えて、子宮癌手術(円錐切除・トラケクトミー)による後天的な子宮欠損が挙げられる。また、子宮関連疾患の塞栓術の際、血流不全により子宮機能不全に陥ることも少なくない。このような子宮の構造・機能欠損に対する究極の医療は、代理母に代表される代理子宮であるが、倫理的かつ法的な問題が有り、その実現は極めて難しい。このような現状を鑑みると、子宮の再建・再生医療が医学的にも社会的にも切望される。近年、臓器の再建の一方法として、界面活性剤を用いて作成したDSを再細胞化することにより、心臓、肺、あるいは肝臓などを動物実験レベルで作成し得ることが報告された(Ott, et al, Nat Med, 2007)。われわれはこれまで、ヒト子宮の再建に向けて、世界に先駆けてヒト子宮内膜組織および子宮筋組織より幹細胞的性質を有する細胞集団を分離することに成功し、その組織再構築能ならびに多分化能について報告した(Ono, et al. PNAS, 2007; Masuda, et al., PLoS ONE, 2010; Ono, et al., Hum Reprod, 2010)。さらに、内膜再生・内膜症モデルも作製し、幹細胞研究を目指す本研究での基盤ツールを開発した(Masuda, et al. PNAS, 2007)。幹細胞を用いた子宮再生医療を完成させるべく、脱細胞化・再細胞化技術を用いた子宮再建・再構築を研究中であるが、その過程でラット子宮の完全な脱細胞化に成功した。さらに、ラット子宮単離細胞をこの脱細胞化Scaffoldに注入してin vitroで培養することで、子宮内膜様組織の再構築を認めた。しかし、実際のヒトでの臨床応用を考えると、再構築に用いる子宮細胞をどこから得るのが問題となる。なぜなら、子宮悪性疾患にて子宮摘出を行う患者の場合、自らの子宮細胞を用いた再構築子宮は悪性疾患再発のリスクがあり、また、

先天性子宮欠損の患者においては、自らの子宮細胞を得ることさえ不可能である。このような臨床応用上の問題点を解決するためには、患者自身から得られる幹細胞を子宮構成細胞(腺上皮細胞、間質細胞など)に分化させることが不可欠であり、具体的には induced pluripotent stem cell (iPS細胞) および間葉系幹細胞がその候補に挙げられる。現時点でiPS細胞を子宮構成細胞に分化させたという報告はないが、これを達成する上でヒントとなり得る報告はいくつか見られる。例えばYeらは、ヒト胚性幹細胞をマウス内膜間質細胞とともに免疫不全マウスの腎被膜下に移植することで、in vivoで内膜上皮様組織へと分化させることに成功した(Ye, et al, PLoS ONE, 2011)。また、Aghajanovaらは、ヒト間葉系幹細胞を特定条件下で培養することにより、in vitroで内膜間質細胞へと分化させることに成功した(Aghajanova, et al, Biol. Reprod., 2010)。これらの知見からiPS細胞と間葉系幹細胞からの子宮構成細胞への分化、さらにそれを我々のもつ子宮脱細胞化・再細胞化技術に応用させた子宮再構築の開発を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、iPS細胞を用いたヒト子宮の再構築を目指した再生医療を実現すべく、ラットなどの小動物を用いて、その基盤知見の収集と基盤技術の開発を目的とする。具体的には以下を行う。

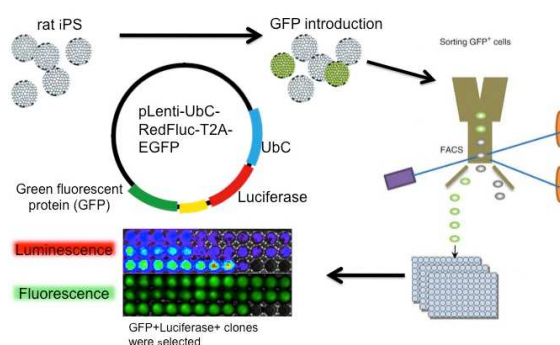
- #1. ラット iPS 細胞・間葉系幹細胞を、腺上皮・間質など子宮の各構成要素に分化させる
- #2. ラット iPS 細胞・間葉系幹細胞から分化した子宮構成細胞を、子宮組織に脱細胞化を施した足場 (decellularized scaffold; DS) に播種し、子宮を再構築する
- #3. 構築子宮の構造・機能解析
- #4. 構築子宮の生体移植

3. 研究の方法

(1) ラット iPS 細胞を Applied Biological Materials 社より購入し、培養・増殖を行った。

(2) 将来的な in vivo での非侵襲性解析や cell tracing を鑑み、レンチウイルスベクター (targeting systems 社より購入) にて green fluorescent protein (以下 GFP) 遺伝子および Luciferase 遺伝子を導入した (Figure 1)。

Fig. 1 Cloning of GFP+ rat iPS



(3) MoFlo XDP (Beckman Coulter 社) を使用した Fluorescence-activated cell sorting (FACS) にて GFP 陽性細胞を分取し、GFP 陽性ラット iPS 細胞のクローニングを行った (Figure 1)。

(4) GFP 陽性ラット iPS 細胞を免疫不全マウスに皮下移植し、in vivo imaging system (IVIS ; 住商ファーマ) を用い、非侵襲的に細胞発光の追跡を行った。

(5) ラット iPS 細胞を、各分化段階に応じて培養液中の各種増殖因子などの組成を変えながら培養した。

(6) リアルタイム PCR にて、中胚葉マーカー (LHX1, OSR1)、ミューラー管系統マーカー (HOXA10, ESR1, PGR) のメッセンジャーRNA 発現を評価した。

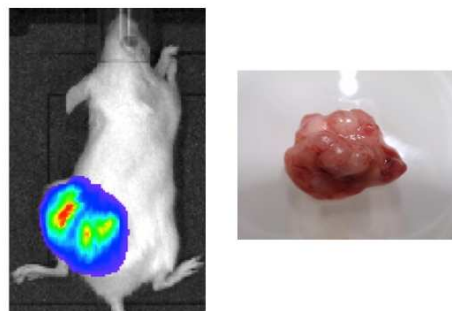
4. 研究成果

(1) FACS を用いた GFP 陽性ラット iPS 細胞のクローニングによって、GFP 遺伝子および Luciferase 遺伝子を恒常的に発現するクロー

ンを得ることに成功した。

(2) 上記クローン細胞を免疫不全マウスに皮下移植し、生体内での細胞増殖を IVIS にて非侵襲的に観察する事に成功した (Figure 2)。6 週間後には移植部位での奇形腫形成を確認した (Figure 2)。

Fig. 2 Teratoma formation of rat iPS



(3) ラット iPS 細胞の分化

① ラット iPS 細胞を増殖因子などの組成を変えながら培養することで、まず未分化マーカー-DPPA5/ESG1 の発現低下を認めた。

② 次に、中胚葉マーカー-Brachyury, MIXL1, GSC の発現上昇。そして中間中胚葉マーカー-LHX1, OSR1, PAX2 の発現上昇を認めた。

③ 最後に、ミューラー管系統マーカー-HOXA10, HOXA11, ESR1, PGR の発現上昇を認めた。

今回の一連の結果から、ラット iPS 細胞が今回の分化プロトコールによって、中間中胚葉を経てミューラー管系統に分化することが示唆された。今後は脱落膜化、すなわちプロゲステロン刺激による PRL および IGFBP1 上昇をはじめとした機能解析、および免疫不全マウスへの移植による子宮内膜様組織の再構築などを行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Masuda H, Maruyama T, Gargett C, **Miyazaki K**, Matsuzaki Y, Okano H, Tanaka M: Endometrial side population cells: potential adult stem/progenitor cells in endometrium. **Biol Reprod.** 2015; **93**(4): 1-8. 査読有り.
DOI: 10.1095/biolreprod.115.131490.

2. Cervelló I, Santamaría X, **Miyazaki K**, Maruyama T, Simón C: Cell therapy and tissue engineering from and toward the uterus. **Semin Reprod Med.** 2015; 33(5): 366-372. 査読有り.
DOI: 10.1055/s-0035-1559581.
3. Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Uchida S, Ota K, Nagashima T, Masuda H, **Miyazaki K**, Asada H, Hida N, Mabuchi Y, Morikawa S, Ito M, Bulun SE, Okano H, Matsuzaki Y, Yoshimura Y, Maruyama T: CD34 and CD49f double-positive and lineage marker-negative cells isolated from human myometrium exhibit stem cell-like properties involved in pregnancy-induced uterine remodeling. **Biol Reprod.** 2015; 93(2): 1-9. 査読有り.
DOI: 10.1095/biolreprod.114.127126.
4. **Miyazaki K**, Miki F, Uchida S, Masuda H, Uchida H, Maruyama T: Serum estradiol level during withdrawal bleeding as a predictive factor for intermittent ovarian function in women with primary ovarian insufficiency. **Endocr J.** 2015; 62(1): 93-99. 査読有り.
DOI: 10.1507/endocrj.EJ14-0189.
5. **宮崎 薫**, 佐藤健二, 太田邦明, 小川誠司, 飯野孝太郎, 升田博隆, 丸山哲夫, 末岡 浩, 田中 守: 臍部トロッカー挿入時に胃損傷をきたし, 腹腔鏡下にて修復し得た 1 例. **産科と婦人科** 2015; 82(7): 832-835. 査読有り.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020516784>
6. 世良亜沙子, 日原華子, 升田博隆, 三木史恵, **宮崎 薫**, 太田邦明, 内田 浩, 丸山哲夫, 田中 守, 青木大輔: 付属器摘出後より副角に子宮留血症を発症した 1 例. **東京産婦人科学会会誌** 2015; 64(3): 390-393. 査読有り.
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020576795>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 薫 (MIYAZAKI, Kaoru)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 90445370