慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	成体幹細胞システムを標的にした雌性生殖器官疾患の病因解明とその制御
Sub Title	Elucidation and regulation of the mechanism underlying female reproductive tract diseases by targeting adult stem cells
Author	吉村, 泰典(Yoshimura, Yasunori) 丸山, 哲夫(Maruyama, Tetsuo) 内田, 浩(Uchida, Hiroshi)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	ヒト雌性生殖器官における幹細胞の生理的・病理的意義と役割を明らかにするとともに、幹細胞を標的にした疾患制御法の開発を目指すことが本研究の目的である。研究成果としては、子宮筋の幹細胞を分離・同定するための新しい方法を開発するとともに、妊娠子宮のリモデリングに子宮筋幹細胞が重要な役割を果たすことを明らかにした。一方、子宮内膜の幹細胞の分離・同定とその解析を通じて、内膜幹細胞が子宮内膜の再生に加えて子宮内膜疾患のひとつである子宮内膜症の発生に関与する証左を提示し得た。
Notes	研究種目：基盤研究(A) 研究期間：2008～2010 課題番号：20249067 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20249067seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式 C -19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2008～2010
課題番号：20249067
研究課題名（和文）
成体幹細胞システムを標的にした雌性生殖器官疾患の病因解明とその制御
研究課題名（英文）
Elucidation and regulation of the mechanism underlying female reproductive tract diseases by targeting adult stem cells
研究代表者
吉村　泰典　(YOSHIMURA YASUNORI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：10129736

研究成果の概要（和文）：
ヒト雌性生殖器官における幹細胞の生理的・病理的意義と役割を明らかにするとともに、幹細胞を標的にした疾患制御法の開発を目指すことが本研究の目的である。研究成果としては、子宮筋の幹細胞を分離・同定するための新しい方法を開発するとともに、妊娠子宮のリモデリングに子宮筋幹細胞が重要な役割を果たすことを明らかにした。一方、子宮内膜の幹細胞の分離・同定とその解析を通じて、内膜幹細胞が子宮内膜の再生に加えて子宮内膜疾患のひとつである子宮内膜症の発生に関与する証左を提示し得た。

研究成果の概要（英文）：
The aim of this research project was to elucidate the mechanism underlying the female reproductive tract diseases and to develop novel therapeutic strategies by targeting adult stem cells. We have developed a novel method to isolate and characterize human myometrial stem cells and demonstrated their involvement in the pregnancy -induced uterine remodeling. We also have isolated and characterized human endometrial stem cells thereby proposing stem cell theory not only for the mechanism underlying physiological endometrial regeneration but also for the pathogenesis of endometriosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	28,500,000	8,550,000	37,050,000
2009 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総　計	38,600,000	11,580,000	50,180,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学
キーワード：再生医学，移植・再生医療，応用動物，細胞・組織，マイクロアレイ

１．研究開始当初の背景

ヒト雌性生殖器官の組織・細胞特性から、成体幹細胞の存在とその関与を示す報告がなされていた(Chan RW et al. Biol Reprod. 2004; Gargett CE., Hum Reprod Update, 2006) 。われわれも、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ていた (日本産科婦人科学会,2004・2006; 日本再生医療学会,2004 ・ 2006;日本内分泌学会,2004・2006;米国内分泌学会, 2005・2006、Ono, et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2007)。さらに、われわれは、内膜再生・内膜症モデルも作製し、幹細胞研究にとって有用な研究ツールを開発も行っていた(Masuda, et al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2007)。しかし、本研究当初の時点では、ヒト雌性生殖器官の組

織幹細胞に特異的なマーカーは同定されていなかったため、後方視的な解析が主であり、前方視的な解析・分離方法としては、DNA結合色素 Hoechst33342 を用いる SP (side population)法しかなかった。ただし、SP 法によって同定・分離されたヒト雌性生殖器官の組織幹様細胞についても、その詳細な特性解析はまだ十分になされていなかった。さらに、当時唯一の前方視的分離方法である SP 法には、DNA 結合色素 Hoechst33342 の紫外線照射による蛍光を利用しているため、侵襲性や無菌性に加えて、濃縮効率の安定性、安定培養・組織構築の効率性、安全性、あるいは細胞操作性などに解決すべき問題が少なくなかった。そこで、これらの問題を解決するためにはまず、幹細胞の有する様々な生物学的特性(未分化状態の維持、自己増殖能、多分化能)等を分子レベルで捕らえることが必須であると考え、その様々な場面において役割を果たす分子群について一つずつその働きを明らかにしていくことを目指した。また、幹細胞特異的に発現する表面マーカーが明らかになれば、それらを用いた新しい幹細胞分離法が可能となり、臨床応用への道も開ける。

２．研究の目的

本研究では，雌性生殖器官における成体幹細胞システムの基礎的解明をさらに進めていくと同時に，多角的な臨床応用を目指して，成体幹細胞を用いた疾患モデルの構築，および SP 法に拠らない新しい幹細胞分離法の確立を通じて，幹細胞を標的にした新しい雌性生殖器疾患に対する治療法の開発を目的とする．具体的には以下を研究目的に掲げた。

（１）ヒト子宮内膜・子宮筋の組織幹細胞(side population 細胞)に特異的に発現する遺伝子群の解析

（２）ヒト雌性生殖器官細胞およびその幹細胞を用いた疾患モデルマウスの作製とその解析

（３）ヒト雌性生殖器官幹細胞特異的表面マーカーを用いた新しい成体幹細胞分取方法の確立

（４）雌性生殖器官細胞およびその幹細胞を用いた着床不全治療の基盤研究

３．研究の方法

（１）ヒト子宮内膜・子宮筋の組織幹細胞(side population 細胞)に特異的に発現する遺伝子群の解析

RT-PCR 法を用いた validation により、われわれのこれまでの DNA マイクロアレイデータから上記の候補遺伝子を絞り込む．特に，新しい組織幹細胞分取方法を探る目的のため，これらの内膜あるいは子宮筋 SP 高発現遺伝子群のなかから，細胞表面に発現する遺伝子群を選ぶ．そして，それらの抗体を用いた免疫組織化学やウエスタンブロットにより，ヒト雌性生殖器官の細胞・組織における蛋白レベルでの発現様式を解析する．

（２）ヒト雌性生殖器官細胞およびその幹細胞を用いた疾患モデルマウスの作製とその解析

われわれが開発したヒト内膜再生・ヒト内膜症モデルマウス（Masuda，et al.，PNAS，2007）をプラットフォームとして、幹細胞w

① 再構築内膜組織における幹細胞の同定

これらのマウスに BrdU を投与し，label retaining cells (LRC)の振る舞いおよび組織内局在について解析を行い，以てヒト子宮内膜の組織幹細胞の特性を明らかにする．

② LRC を指標とした SP 細胞特異的マーカーの検証

上記 1)で同定した LRC が，上記 A.の解析より推測される幹細胞の候補マーカーを発現しているか否かを，免疫組織化学的に検証する．

③ 血管新生および幹細胞システムを標的にした新しい子宮内膜症治療法の開発:

１）血管新生・幹細胞機能を制御する種々の薬剤，抗体，遺伝子の導入（腹腔内投与，静脈投与，ミニポンプなど）

本モデルマウスに対して，血管新生阻害剤（TNP470，endostatin，抗 VEGF 抗体など）あるいは遺伝子（IL-8 や TNF-alpha などの siRNA）を投与し，再構築異所性内膜の増殖・進展に及ぼす影響を，発光イメージングおよび Tunnel assay など組織化学的に解析する．

④ 内膜症モデルマウスへの内膜幹細胞制御の試み

同定された内膜幹細胞関連遺伝子産物に対する siRNA を作製し，発光内膜細胞を有する内膜症モデルマウスへ投与し，再構築異所性内膜の増殖・進展に及ぼす影響を発光イメージングおよび組織化学的に解析する

（３）ヒト雌性生殖器官幹細胞特異的表面マーカーを用いた新しい成体幹細胞分取方法の確立

これまでのわれわれの DNA マイクロアレイデータと RT-PCR 法による検証を通じて、子宮内膜幹細胞あるいは子宮筋幹細胞の単離に必要な新たな表面抗原マーカーを同定する。さらに、この表面マーカーで分取された幹細胞と非幹細胞機能、ならびにそれを担う分子メカニズムの差異を比較検討する。特に、多分化能、in vivo 自己組織構築能、ならびに DNA マイクロアレイを用いた発現遺伝子プロファイルについて検討する。

（４）雌性生殖器官細胞およびその幹細胞を用いた着床不全治療の開発

４．研究成果

（１）我々の既報の内膜症モデルマウス（Masuda, et al., PNAS, 2007）を用い、再構築内膜組織における幹細胞の同定を label retaining cell（LRC）法と増殖マーカーにより行った。その結果、生体同様、内膜-筋接合部に特に増殖の盛んな細胞が集積していた。しかし LRC 細胞は十分に検出されず、BrdU 投与の時期や量など検討を要することが判明した。

組織幹細胞の候補集団である side population（SP）細胞が，ヒト子宮内膜においても存在することを明らかにし，DNA 色素排泄能を指標に内膜 SP 細胞（ESP）を分離し得た．ESP をマウス腎被膜下に移植すると，低率ながらも腺管構造を有する内膜様組織が構築された．ただし，移植部位に認められた多くは，血管成分や間質成分が優位な組織であった．その構築物の多様性は，非 ESP に比較して ESP を移植した群でより顕著であった．ESP は，in vitro においても，内膜組織の各構成細胞である腺細胞，間質細胞，平滑筋細胞，および血管内皮細胞のそれぞれに分化した．このような in vivo および in vitro の分化ポテンシャルに加えて，マーカー解析などから，ESP は血管内皮前駆細胞に類似した性格を有することが判明した．

われわれは，以上の結果とこれまでの内外の報告に基づいて，内膜幹細胞（含む ESP）が月経血の逆流あるいは血行性・リンパ行性転移により異所性に生着し，その局所環境が適切であった時に，腺細胞，間質細胞，および平滑筋細胞などの各コンポーネントを有する内膜症病変を構築する，という仮説を提唱した。

一方、SP 法に拠らない新しい幹細胞分離法として、まず子宮筋幹細胞について検討したところ、子宮筋細胞のなかで Lin (CD31, CD45, Glycophorin A)陰性かつ CD34 陽性/CD49f 陽性細胞（Lin -/Double Positive Cells; Lin -/DPC）が幹細胞特性を有することが判明した。具体的には、Lin -/DPC のみが SP 分画を含んでおり， in vitro で骨・脂肪・軟骨細胞へ分化した。また、我々の既報（Ono, et al., PNAS, 2007）では、子宮筋幹細胞は低酸素で効率良く増殖したが、Lin -/DPC も同様に低酸素で高い増殖効率を示した。さらに、重度免疫不全マウスへの子宮への移植実験では、in vivo でヒト子宮平滑筋様の組織を構築し得た．

（２）Lin (CD31, CD45, Glycophorin A)陰性かつ CD34 陽性/CD49f 陽性細胞（Lin -/Double Positive Cells; Lin -/DPC）が幹細胞としてどのような振る舞いをするかを in vivo で検討した。われわれは、「子宮筋幹細胞は妊娠子宮の増大を含むリモデリングに寄与する」、という作業仮説を立てており、その検証のために、重度免疫不全マウスの子宮に Lin -/DPC および非 Lin -/DPC を移植した後、①無処置、②卵巣摘出後エストロゲンペレット留置、③妊娠、の３群に分けて、それぞれのマウス子宮におけるヒト子宮筋構築の程度を調べた。免疫組織化学による検討では、Lin -/DPC 移植群において①＜②＜③の順で子宮平滑筋様の組織構築がみられた。一方、非 Lin -/DPC を移植したマウス子宮では①～③のいずれにも明らかなヒト組織の構築はみられなかった。より定量的なデータを得るために、マウス組織におけるヒト組織量を定量化する測定システムの開発を行った。種々の検討の結果、ヒトに特異的な内因性レトロウイルス配列を標的にしたリアルタイム PCR を用いることにより、ヒト組織の定量化に成功した。そこで、この測定システムを用いて、上記①～③のマウスの子宮において移植された Lin -DPC および非 Lin -/DPC 細胞から生成されるヒト組織の定量化を行ったところ、Lin -/DPC 移植群において、それぞれ統計学的な有意な差を持って①＜②＜③の順で組織量の構築が得られた。一方、非 Lin -/DPC を移植したマウス子宮では、①～③のいずれでも極めて低レベルの PCR シグナルしか得られなかった。以上より、新しい方法で分離した子宮筋幹細胞様集団は、in vivo 妊娠子宮リモデリングに貢献することが示された。

（３）我々が確立したヒト内膜組織再構成系モデル（Masuda, et al., PNAS, 2007）は、疾患モデルのプロトタイプになるが、その問題点として、従来法は、腎実質を貫通させて腎被膜下へ細胞移植をするため、高度な技術を要し、実験者によって再構成率にバラツキが生じていた。今回、コラーゲンゲルと極細の軟性チューブを用いることにより一定の割合の再構成率を安定的に得ることに成功した。本技術を用いて子宮腺筋症モデルを作製すべく、発光蛋白でそれぞれマーキングした子宮筋細胞と子宮内膜細胞を混合して移植し、１ヶ月後にバイオルミネッセンスイメージングを行ったところ、子宮筋細胞単独に比べて混合移植では強い発光シグナルを認め、その組織再構成を非侵襲的リアルタイムに確認した。腹腔子宮内膜症モデルとして、以前に発光蛋白でマーキングした内膜細胞を腹腔内に投与したが、シグナルの発光強度および発光場所が定まらず、生着場所の不安定性に起因することが示唆された。そこで、移植細胞を１カ所に集積すべく、発光蛋白でマーキングした移植細胞に磁性を持たせ、外部から磁場をかけたところ、ほぼ単独の発光シグナルに加えて、１カ所に集積した再構成組織をマクロで確認し得た。さらに、幹細胞

マーキングと磁性体を用いたその分離・選別を目指したベクターの構築を行ったところ、蛍光蛋白、発光蛋白、および非機能型細胞表面受容体の三者を発現することが可能なレンチウイルスベクターを得ることが出来た。

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 13 件）

*corresponding author

1. Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Nishikawa-Uchida S, Masuda H, Nagashima T, **Yoshimura Y**, Maruyama T*: OCT4 expression in human uterine myometrial stem/progenitor cells. Hum Reprod. 2010; 25(8), 2059-2067.査読有

2. Maruyama T*, Masuda H, Ono M, Kajitani T, **Yoshimura Y**: Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. Reproduction. 2010; 140, 11-22.査読有

3. Masuda H, Matsuzaki Y*, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, Arase T, Oda H, Uchida H, Asada H, Ito M, **Yoshimura Y**, Maruyama T*, Okano H: Stem Cell-Like Properties of the Endometrial Side Population: Implication in Endometrial Regeneration. PLoS ONE. 2010; 5(4), e10387.査読有

4. Maruyama T*: Stem/progenitor cells and the regeneration potentials the human uterus. Reprod Med Biol. 2010; 9, 9-16. 査読有

5. Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ozawa S, **Yoshimura Y**, Umezawa A: Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. Circ Res. 2010; 106, 1613-1623.査読有

6. Yamada N, Hamatani Y, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, **Yoshimura Y**, Umezawa A;Involvement of a novel preimplantation-specific gene encoding the high mobility group box protein Hmgpi in early embryonic development. Hum Mol Genet. 2010; 19, 480-493.査読有

7. Maruyama T*: Therapeutic Strategies for Implantation Failure due to Endometrial Dysfunction. J Mamm Ova Res. 2009; 26(3), 129-133.査読有

8. ［平成 21 年度日本産科婦人科学会優秀論文賞］ Arase T, Uchida H, Kajitani T, Ono M, TamakiK, Oda H, Nishikawa S, Kagami M, Nagashima T, Masuda H, Asada H, **Yoshimura Y**, Maruyama T: The UDP-glucose recepter P2RY14 triggers innate mucosal immunity in the female reproductive tract by inducing IL-8. J Immunol. 2009; 182(11), 7074-7084.査読有

9. Maruyama T*, **Yoshimura Y**: Molecular and cellular mechanisms for defferentiation and regeneration of the uterine endometrium.Endocrine J. 2008; 55(5), 795-810.査読有

10. Masuda H*, Okano.J.H, Maruyama T, **Yoshimura Y**, Okano H, Matsuzaki Y: In vivo Imaging in Humanized Mice. Current Topics in Microbiology and Immunology 324 2008; 179-196.査読有

11. ［平成 22 年度日本生殖学会学術奨励賞］ Nagashima T, Maruyama T*, Uchida H, Kajitani T, Arase T, Ono M, Oda H, Kagami M, Masuda H, Nishikawa S, Asada H, **Yoshimura Y**:Activation of SRC kinase and phosphorylation of STAT5 are required for decidual transformation of human endometrial stromal cells. Endocrinology. 2008; 149(3), 1227-1234. 査読有

12. Ohta K, Maruyama T*, Uchida H, Ono M, Nagashima T, Arase T, Kajitani T, Oda H, Morita M, **Yoshimura Y**: Glycodelin blocks progression to S phase and inhibits cell growth: a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth. Mol Hum Reprod. 2008; 14(1) 17-22.査読有

13. Ono M, Maruyama T*, **Yoshimura Y**: Regeneration and adult stem cells in the human female reproductive tract. Stem Cells and Cloning. 2008; 1, 23-29.査読有

〔学会発表〕（計 9 件）

1. 〔招請講演〕**吉村泰典**：いのちの誕生と生殖医療-光と影-. 第 55 回日本生殖医学会（徳島県徳島市）2011 年 11 月 11 日-12 日

2. 〔招請講演〕丸山哲夫： 子宮内膜症の幹細胞説．産婦人科スプリングフォーラム（京都府京都市・京都平安ホテル）2011 年 3 月 5 日-6 日

3. 〔招請講演〕**吉村泰典**： クローン、幹細胞そして iPS．金沢大学大学院医学系研究科産科婦人科同門会共催学術講演会（石川県）2011 年 3 月 5 日

4. 〔招請講演／セミナー〕 Tetsuo Maruyama; Human uterine stem/progenitor cells. Program in Developmental biology, Baylor College of Medicine(BCM). October 21, 2010, Huston, USA

5. 〔招請講演〕 Tetsuo Maruyama, Hirotaka Masuda, Takashi Nagashima, Takashi Kajitani, Masanori Ono, Sayaka Nishikawa-Uchida Hideyuki Oda, Kaoru Miyazaki, Toru Arase, Maki Kagami, Hiroshi Uchida Hironori Asada, **Yasunori Yoshimura**; Possible involvement of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of endocetriosis. The First Asian Conference on Endometriosis(ACE). October 16-17, 2010, Shanghai, China

6. 〔招請講演〕 Tetsuo Maruyama; Somatic Stem Cells in the myometrium and its putative implication in myoma formation. 26th European Society of Human Reproduction & Enbryology(ESHRE) June 27-30, 2010, Rome, Italy

7. 〔招請講演／セッション〕 丸山哲夫：幹細胞からみた子宮内膜症の発症・伸展メカニズム．第 2 回婦人科ホルモン依存性疾患研究会（東京）2010 年 5 月 8 日

8. 〔招請講演〕 Tetsuo Maruyama; Animal model for reconstructed functional human endometrium: Potential for drug testing and gene-target validation. IUPS Satellite Symposium on Endometrial Receptivity and Blastocyst. July 25, 2009, Kyoto, Japan

9. 〔招請講演〕 Tetsuo Maruyama; Regeneration potential of stem cell systems in the human female reproductive tract. 1st World Congress on Reproductive Biology(WCRB). May 24-25, 2008 USA,Hawai

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
吉村泰典（YOSHIMURA YASUNORI）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：10129736

(2)研究分担者
丸山　哲夫（MARUYAMA TETSUO）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10209702

内田　浩（UCHIDA HIROSHI）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：90286534

(3)連携研究者
なし