

『中山人間科学振興財団活動報告書 2016』【生体情報のモニタリング】

平成 28 年度 国際交流助成(海外渡航)

研究テーマ;

胚組織によるシグナル伝達が

子宮内膜における細胞老化・幹細胞分化の制御に果たす役割の検討

田丸 俊輔

所属;

埼玉医科大学 産科婦人科

留学先;

Division of Biomedical Sciences, Warwick Medical School, University of Warwick,
United Kingdom

〔背景・研究目的〕

子宮内膜幹細胞の異常が、妊娠に必須な子宮内膜脱落膜化の障害と密接に関わることが知られている。脱落膜化は子宮内膜間質の繊維芽細胞が、胚着床および胎盤形成に必須の分泌型細胞へと形態変化を遂げることにより特徴づけられ、排卵後のプロゲステロンおよび cyclic AMP の濃度上昇により惹起される¹。脱落膜化を経て内膜組織では一時的に急性炎症が引き起こされ、その後抑制される^{2,3}。急性炎症は胚の着床に、炎症抑制は着床胚の維持あるいは胚拒絶に重要な役割を果たす⁴。この過程は胚の選別機構ともいべきものであり、正常な妊娠維持、あるいは異常妊娠での妊娠維持機構破綻後の子宮内膜再構築に重要となる⁵。

臨床面では、子宮内膜幹細胞の異常や脱落膜化機構の障害は、習慣流産(3回以上の流産を繰り返す病態で、生殖年齢女性の約1%に生じるとされる)や、子宮内膜症(子宮内膜またはそれに似た組織が、本来あるべき子宮の内側以外の場所で発生し発育する疾患で、生殖年齢女性の5-10%に生じるとされる)との関連が示唆されている。さらに、子宮内膜症では、特に器質的原因の定かでない不妊症の併発するケースが多いが、その病態に関しては不明な点が多い。

プロジェクトの最終目標は、「胚組織によるシグナル伝達が子宮内膜における細胞老化・幹細胞分化の制御に果たす役割の検討」であるが、子宮内膜細胞の老化および子宮内膜幹細胞の分化メカニズムに関しても未だ解明すべき点が多い。また、留学先施設では、多様な疾患の子宮内膜検体を用いた研究が継続的に行われており、子宮内膜症や不妊症の症例も多く含まれる。したがって、まず子宮内膜症患者の子宮内膜細胞における幹細胞の分化メカニズムを解明すべく、以下の方法により実験を開始した。

〔方法〕

黄体期中期のヒト子宮内膜組織を生検により取得し、すべての実験に供した。生検は、施設倫理委員会による審査を経て、該当患者から書面での同意取得のもとに施行された。採取した内膜組織を間質細胞および上皮細胞に分離した後、間質細胞から磁気ソーティング技術を用いて、幹細胞の豊富な血管周囲間質細胞を単離した。

最初に、幹細胞を多く含むとされる血管周囲間質細胞を用いて、コロニー形成アッセイを施行した。次に、コロニー形成アッセイで得られる単細胞から増殖したコロニーを用いて、オルガノイド形成・細胞増殖・細胞接着アッセイを施行した。また、上皮細胞に関しては、低密度で播種した細胞からオルガノイドを形成した場合に、その内部に多数の幹細胞を含有することが推察されるため、低密度培養条件でオルガノイド形成アッセイを行った。各実験を、子宮内膜症群(過去に外科的処置で子宮内膜症を指摘された既往のある症例)と、コントロール群(過去に外科的処置で子宮内膜症を指摘されなかった既往のない症例、あるいは明らかな男性側因子が原因の不妊症症例)で行い、その結果を比較した。

[結果]

血管周囲間質細胞を用いたコロニー形成アッセイでは、子宮内膜症群とコントロール群で、コロニー形成率に差は認めなかった(図 1)。また、これらのコロニーから形成されたオルガノイドの総面積と(図 2)、コロニー細胞の増殖能(図 3a)および接着能(図 3b)に両群間で差は認めなかった。上皮細胞からのオルガノイド形成率にも、両群間で差は認めなかった(図 4)。

図 1

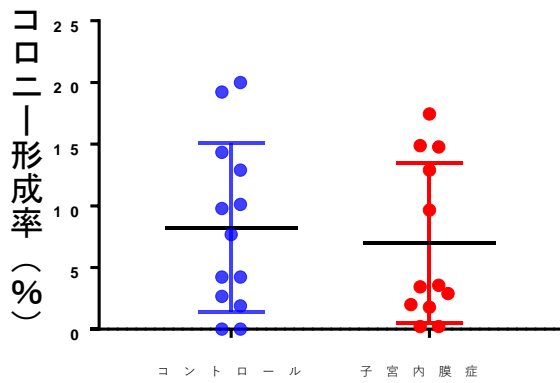


図 2

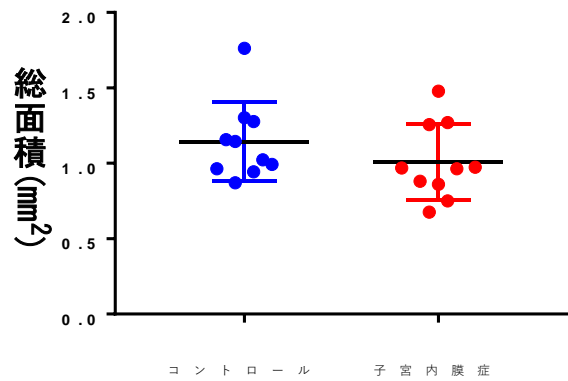
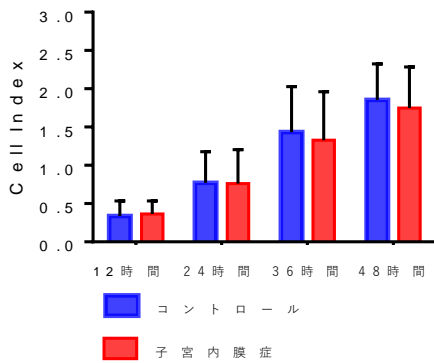


図 3a



b

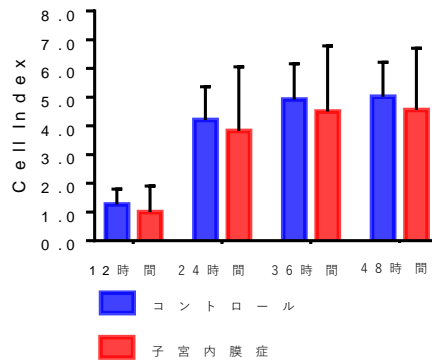
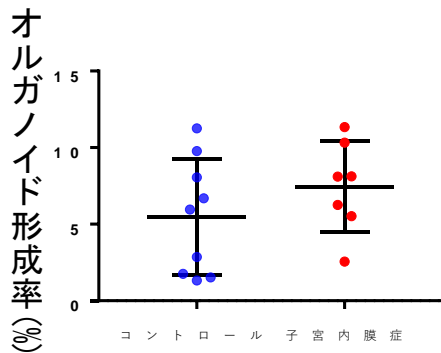


図 4



[考察・今後の展望]

これまでの実験では、子宮内膜症群患者の子宮内膜間質および上皮細胞由来の幹細胞において、コントロール群患者と比較して明らかな表現型の差異は認めていない。しかし、卵巣由来ホルモンおよび種々の内分泌因子による刺激を加えた場合には、両群間で表現型に差異を生じる可能性は極めて高いと考えている。今後は、これら内分泌因子の刺激に対する反応の差異についても検討する予定である。

また、子宮内膜組織全体と、組織より分離した内膜間質細胞、上皮細胞およびそれらからクローン・オルガノイド形成アッセイなどで得られた幹細胞における遺伝子発現の相違について、現在 RNA シーケンス解析での検討を進めている。我々は、子宮内膜組織全体と各細胞群では、元来の遺伝子発現パターンに大きな違いがあり、各細胞群の遺伝子発現情報を得ることが、子宮内膜組織の構築に関する生理や、関連する病態の解明に重要であると考えている。RNA シーケンス解析で、各細胞群の遺伝子発現パターンについて新たな知見が得られれば、それらを基に以降の研究を進めていきたいと考えている。

現在、子宮内膜症の確定診断は、外科的手術施行時の骨盤内所見から行われている。その発症から外科的診断までには長時間を要することが知られており、今回我々が検討したコントロール群の症例にも、未診断の子宮内膜症が含まれている可能性と、それらが実験結果に影響した可能性が否定できないと考えている。未診断の子宮内膜症においては、黄体期子宮内膜上皮細胞における **B-cell Lymphoma 6 Protein (BCL6)** の発現が高いことが報告されており⁶、現在子宮内膜組織の **BCL6** に関する免疫組織染色による検討を進めている。免疫組織染色の結果を加味して症例を再分類し、これまでの実験結果を再度比較する予定である。

留学期間中のため、本研究は現在も進行している。したがって記載内容は、これまでの研究の進捗状況にとどまる。残された留学期間を有効に活用し、研究成果をより充実したものにできるように努めていきたいと考える。

[参考文献]

1. Jones, M.C., *et al.* Regulation of the SUMO pathway sensitizes differentiating human endometrial stromal cells to progesterone. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 16272-16277 (2006).
2. Salker, M.S., *et al.* Deregulation of the serum-and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in the endometrium causes reproductive failure. *Nat Med* **17**, 1509-1513 (2011).
3. Salker, M.S., *et al.* Disordered IL-33/ST2 Activation in Decidualizing Stromal Cells Prolongs Uterine Receptivity in Women with Recurrent Pregnancy Loss. *PLoS One* **7**, e52252 (2012).
4. Brosens, J.J., *et al.* Uterine selection of human embryos at implantation. *Scientific reports* **4**, 3894 (2014).

5. Macklon, N.S. & Brosens, J.J. The human endometrium as a sensor of embryo quality. *Biol Reprod* **91**, 98 (2014).
6. Evans-Hoeker E., *et al.* Endometrial BCL6 Overexpression in Eutopic Endometrium of Women with Endometriosis. *Reprod Sci.* **23**, 1234-1241 (2016).

〔謝辞〕

留学にあたり、助成くださった公益財団法人中山人間科学振興財団の皆様に、厚く御礼申し上げます。また、留学期間中にご指導を賜ったウォーリック大学医学部 **Jan Brosens** 教授、留学前よりご支援を賜った埼玉医科大学産科婦人科 石原 理教授、さらに各施設にて多大なご指導、ご支援をくださった関係各位に、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。