

神澤医学賞受賞講演

成体幹細胞を用いたヒト雌性生殖器官の再生・再建と疾患モデルの構築

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 専任講師 丸山 哲夫

【緒言】

ヒト雌性生殖器官は、周期的な機能的構造的変化を通じて、次世代の個体の再生産を担う。われわれは、ヒト雌性生殖器官のなかで子宮に着目し、その主な構成組織である子宮内膜と子宮平滑筋の機能と特性について、成体幹細胞の観点からこれまで研究を行ってきた。

成体幹細胞は、成体の様々な組織や臓器に存在する未分化な細胞で、その所属する組織・臓器の新生や損傷に対する組織修復を行う。成体幹細胞（組織幹細胞）は、通常、静止状態にあるか、あるいは緩徐に自己を複製する。必要に応じて、非対称性分裂により組織前駆細胞を産生し、さらに続いて次の段階の細胞群が生み出され、最終的には各組織・臓器を構成する様々な細胞に分化する。従って、成体幹細胞は、未分化で静止状態にある一方、様々な細胞を作る能力（多分化能）と本来の自己の組織を作る能力（自己組織構築能）を有する（1）。

ヒト子宮内膜は、着床・胎盤形成といった妊娠の成立とその維持の場として機能する。妊娠が成立しなければ、生殖可能期間を通じて、増殖（再生）と退縮（破壊）の月経周期性変化を延々と反復する。また、ヒト子宮平滑筋も、妊娠に伴って著明に増大し分娩により急激に縮小する。この劇的な変化は、年単位ではあるものの、何回も反復することが可能である。このような周期性・反復性は、内膜・子宮筋の極めて高い再生能・組織構築能を反映していると考えられ、子宮特有の再生メカニズムや成体幹細胞システムの存在が強く示唆される。

本講演では、これまでのわれわれの研究成果を中心に、子宮幹細胞研究の現況を俯瞰して紹介する（1-4）。さらに、成体幹細胞を用いた子宮の再生・再建ならびに疾患モデルの構築に関する現状をふまえて、今後想定される子宮関連疾患の新たな治療戦略、ならびに再生医療資源としての子宮幹細胞の臨床応用について考察する。

【ヒト子宮内膜の再生・内膜症モデル】

ヒト子宮内膜のユニークな組織特性の解明には、血管新生を伴う *in vivo* での内膜モデルが必要とされる。齧歯類を用いた *in vivo* 内膜研究は、その構造・機能がヒト内膜と異なる部分が多く、結果の妥当性や解釈には限界がある。

そこでわれわれは、ヒト子宮内膜を有するヒト化マウスモデル (humanized mouse) の開発に着手した (5)．摘出ヒト子宮より内膜を採取し、酵素処理により分散した細胞を重度免疫不全マウスの腎皮膜下に移植した．エストラジオール (E_2) とプロゲステロン (P_4) の調節投与によりさまざまな月経周期様環境に曝露させたところ、移植した全てのマウスの腎被膜下に子宮内膜様の組織構築を認めた．この組織は E_2 に対しては増殖期様変化を、 P_4 の併用では分泌期様変化を、 P_4 の消退により月経様変化を惹起した．移植部位周辺ではヒトとマウスのキメラ血管が存在し、内膜細胞 (血管) が異種動物と血管ネットワークを構築するポテンシャルを持つことが示唆された．さらに、構築組織の E_2 および P_4 に対する用量依存的かつ時間的な増殖ならびに退縮の振る舞いを、生物発光イメージングを用いることにより、非侵襲的かつ経時的に体外から定量的にモニタリングし得た (5)．

この内膜再生モデルは、ヒト子宮内膜の生理メカニズムを生体内に近い状態で解析できるだけでなく、子宮内膜症の *in vivo* モデルとしても応用可能と考える．また、非侵襲的かつリアルタイムに再構築内膜のモニタリングとその定量解析が可能であることから、本モデルは、内膜由来疾患に対する薬剤の検定・スクリーニングシステムとして有用なツールになり得る (6)．

【ヒト子宮内膜幹細胞】

前述のように、高い再生能力を有するヒト内膜の組織特性から、内膜幹細胞の存在が強く示唆される．近年、DNA 染色色素 (Hoechst33342) を排泄する能力の高い細胞が様々な組織に存在し、それらの多くは組織幹細胞活性を有することが明らかになってきた (7)．われわれは、この排泄能力を指標に、ヒト子宮内膜における幹細胞の同定と分離を試みた (8)．子宮内膜再生モデルと同様の手順で、ヒト内膜を機械的および酵素処理により単一細胞にまで分散し、Hoechst33342 染色による side population (SP) 分離法を用いることで、内膜 SP 細胞を内膜幹細胞候補として前方視的に解析した．その結果、内膜細胞にも SP 分画が存在し、重度免疫不全マウスの腎被膜下に SP を移植したところ、SP 移植部位には腺管構造を伴う内膜様組織の再構築が認められた．さらに、non-SP に比べて SP 移植の方が、内膜組織の各コンポーネントより成る多様な組織 (血管や間質など) が構築された (8)．また、内膜の SP 細胞および non-SP 細胞より RNA を抽出し GeneChip® (Affymetrix 社) を用いた遺伝子発現プロファイリング解析を行った．その結果、56 個の遺伝子が SP に高発現しており、その中には一般的な幹細胞マーカーが複数含まれていた．以上、SP の移植実験および発現遺伝子プロファイルの結果などより、内膜 SP が幹細胞的特性を有することが示された．

【ヒト子宮筋幹細胞】

子宮は妊娠・分娩時に著明な増大を示し、それが妊娠毎に繰り返されるという非常にユニークな雌性生殖器官である。その主な構成組織である子宮筋では、妊娠時、細胞肥大と細胞増殖が著明である (9, 10)。分娩後の子宮の退縮では大量のアポトーシスが起きることが報告されているが、その復古の過程で新しい子宮平滑筋細胞が生み出されなければならない (10)。しかし、その由来も含め子宮筋における組織幹細胞については十分に理解されていない。そこで、内膜幹細胞と同様に、SP 法により子宮筋幹細胞の同定と分離を試みた (11)。その結果、子宮筋にも SP 分画 (myometrial SP, myoSP) が存在し、myoSP 以外の子宮筋細胞の大部分を占める main population (myoMP) と myoSP の細胞周期を調べたところ、myoMP に比べて myoSP は細胞周期上 G₀ 期すなわち静止期に存在した。さらに、myoMP に比べて myoSP は、幹細胞マーカーである ABCG2 や OCT4/POU5F1 の高発現を認めたが (11, 12)、性ステロイド受容体や平滑筋分化マーカーは発現しておらず、myoSP は未分化な状態であった。次に、卵巣摘出を施した重度免疫不全マウスの子宮に myoSP あるいは myoMP を移植した後、E₂ を投与したところ、10 週間後の myoSP 移植部位に、高率にヒト平滑筋様組織が構築された。また移植後マウスを妊娠させ、myoSP によって再構築された子宮筋組織を解析したところ、妊娠時に再構築された子宮筋組織においてオキシトシン受容体の発現が認められた。さらに、myoMP とは異なり、myoSP は脂肪や骨細胞への多分化能を有することが判明した。以上より、myoSP が、①未分化状態、②多分化能、③自己組織構築能、といった組織幹細胞特性を有することから、子宮筋において、myoSP を中心とする幹細胞システムが存在する可能性が示された (1-3, 11)。

【幹細胞を用いた子宮再生・再建と子宮疾患モデル】

現在の癌（腫瘍）幹細胞に関するパラダイムは、内膜幹細胞や子宮筋幹細胞が、子宮内膜症、子宮腺筋症、子宮筋腫などの様々な子宮関連腫瘍性疾患の起源細胞になり得ることを強く支持する。現在われわれは、前述の内膜・子宮筋の再生あるいは疾患モデルだけでなく、内膜・子宮筋細胞あるいはその幹細胞を、腎被膜下、腹腔内、静脈内、皮下など様々な部位に投与し、さらに磁性体などを用いて任意の部位への集積を行うことにより、より洗練された疾患モデルの構築を試みている。まだ preliminary なデータではあるが、われわれが現在構築途上にある肺内膜症モデルでは、静脈内投与した内膜細胞を由来とする細胞集落が肺実質に認められるとともに、その集落には幹細胞マーカーのひとつである ABCG2 陽性細胞が含まれていることを見いだした (丸山, 未発表)。一方、SP 法には結果の不安定性や細胞毒性な

どいくつかの問題点がある (7). われわれは, 臨床への応用も含めてこれらの諸問題を解決すべく, SP 法ではなく, 表面抗原を用いた内膜・子宮筋の幹細胞の分離・同定法を開発している. また, ヒト子宮の再建に先立ち, その基盤技術の確立を目指して, 脱細胞化・再細胞化の技術を用いて小動物の子宮の再建にも取り組んでいる. 本講演では, これらの進行中の研究も紹介する.

【今後の展望】

子宮関連の幹細胞研究の目標のひとつとして, 遠き道なれども, 幹細胞を用いた子宮関連組織・細胞の再生・再建医療の開発が挙げられる. しかし, より現実的な研究のエンドポイントは, 幹細胞の側面から, 生殖・妊娠・分娩を担う子宮の生理と病理のメカニズムを明らかにすることであろう. その成果は, 子宮再生医療の開発にも貢献し得るが, より近き道として, 幹細胞, その支持環境 (ニッチ), さらに, それらを包括する幹細胞システム全体を標的にした, 子宮関連疾患に対する新しい治療法の開発や創薬につながると考えられる.

【参考文献】

1. 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.
2. Maruyama T. Stem/progenitor cells and the regeneration potentials in the human uterus. *Reprod Med Biol* 2010;9:9-16.
3. Ono M, Maruyama T, Yoshimura Y. Regeneration and adult stem cells in the human female reproductive tract. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 2008;1:23-9.
4. Maruyama T, Yoshimura Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocr J* 2008;55:795-810.
5. Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T *et al*. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/ γ_c^{null} immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1925-30.
6. Masuda H, Okano H, Maruyama T, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y. In vivo imaging in humanized mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;324:179-97.
7. Golebiewska A, Brons NH, Bjerkvig R, Niclou SP. Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell* 2011;8:136-47.
8. Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T *et al*. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PLoS ONE* 2010;5: e10387.
9. Ramsey EM. Anatomy of the human uterus. In: Chard T, Grudzinskas JG, eds. *The Uterus*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994:18-40.
10. Shynlova O, Tsui P, Jaffer S, Lye SJ. Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;144 Suppl 1:S2-10.
11. Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T *et al*. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:18700-5.
12. Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Nishikawa-Uchida S *et al*. OCT4 expression in human uterine myometrial stem/progenitor cells. *Hum Reprod* 2010;25:2059-67.

